

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ –  
МСХА имени К.А. ТИМИРЯЗЕВА»  
(ФГБОУ ВО РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева)

На правах рукописи

Синицына Анастасия Александровна

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ  
ГАПЛОИДОВ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР  
РАСТЕНИЙ РОДА *BRASSICA* L.

Специальность: 4.1.2. – Селекция, семеноводство и биотехнология  
растений

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:  
Монахос Сократ Григорьевич,  
доктор сельскохозяйственных наук,  
профессор

Москва – 2023

## Оглавление

Введение.....	5
1 Обзор литературы .....	13
1.1 Возможности гаплоидных технологий .....	13
1.2 Гаплоидные технологии у капустных культур .....	14
1.3 Эмбриогенез микроспор .....	15
1.4. Факторы, влияющие на получение УГ в культуре микроспор.....	19
1.5. Генотипспецифичность .....	20
1.6 Подготовка растения донора микроспор .....	23
1.7 Стадия развития микропор.....	25
1.8 Плотность микроспор в суспензии.....	27
1.9 Индукция эмбриогенеза микроспор.....	28
1.10 Состав питательной среды .....	30
1.10.1 Концентрация питательной среды .....	30
1.10.2 Микро и макроэлементы .....	31
1.10.3 Витамины и антиоксиданты .....	32
1.10.4 Сахара.....	33
1.10.5 Активированный уголь.....	34
1.10.6 Регуляторы роста .....	35
1.10.7 Полиамины .....	36
1.10.8 Антибиотики.....	37
1.11 pH среды.....	38
1.12 Связь морфологической зрелости эмбриоидов и их прорастания .....	39
1.13 Состав среды для прорастания эмбриоидов.....	41
1.13.1 Регуляторы роста .....	42
1.13.2 Применение веществ-ингибиторов .....	43
1.13.3 Влияние хитозана и пролина .....	44
1.14 Влияние фотопериода и пониженных температур на образование проростков из эмбриоидов .....	46

1.15 Удвоение гаплоидов.....	47
2 Материалы и методы .....	50
2.1. Растительный материал .....	50
2.2 Условия выращивания и подготовки растений-доноров .....	50
2.3 Определение стадии развития микроспор .....	51
2.4 Выделение и культивирование микроспор и эмбриоидов.....	52
2.4.1 Изучение влияния антиоксидантов на жизнеспособность микроспор и частоту микроспорогенного эмбриогенеза .....	53
2.4.2 Изучение влияния на частоту эмбриогенеза теплового шока микроспор при добавлении в среду цефотаксима .....	54
2.4.3 Изучение влияния совместного эффекта полиамина путресцина и теплового шока на частоту эмбриогенеза .....	54
2.4.4 Изучение влияния дисахаридов (мальтоза и сахароза), маннитола и теплового шока на частоту эмбриогенеза .....	55
2.4.5 Изучение эмбриогенного ответа <i>B. oleracea</i> на изоляцию, очистку и тепловой шок микроспор в растворе сахарозы 130 г/л.....	56
2.5 Регенерация/проращивание эмбриоидов .....	56
2.6 Укоренение и адаптация проростков в субстрате .....	57
2.7 Изучение влияния условий культивирования эмбриоидов при пониженной температуре в темноте .....	57
2.8 Определение ploидности растений-регенерантов.....	58
2.9 Статистическая обработка.....	59
3 Результаты и обсуждение.....	60
3.1 Влияние генотипа донорного растения на формирование и выход эмбриоидов в культуре изолированных микроспор растений рода <i>Brassica</i> .....	60
3.2 Влияние генотипа донорного растения на формирование и выход растений-регенерантов в культуре изолированных микроспор растений рода <i>Brassica</i> .....	71
3.3 Изучение влияния антиоксидантов на жизнеспособность микроспор и частоту микроспорогенного эмбриогенеза <i>B. oleracea</i> .....	80

3.4 Изучение влияния на частоту эмбриогенеза теплового шока микроспор при добавлении в среду цефотаксима.....	84
3.5 Изучение влияния совместного эффекта полиамина путресцина и теплового шока на частоту эмбриогенеза.....	89
3.6 Изучение влияния дисахаридов (мальтоза и сахароза), маннитола и теплового шока на частоту эмбриогенеза.....	91
3.7 Изучение эмбриогенного ответа <i>B. oleracea</i> на изоляцию, очистку и тепловой шок микроспор в растворе сахарозы 130 г/л .....	95
3.8 Изучение влияния условий культивирования эмбриоидов при пониженной температуре в темноте .....	100
Заключение .....	106
Список сокращений .....	109
Библиографический список .....	110

## Введение

### Актуальность темы исследования

В настоящее время возросли требования к используемым в производстве сортам и гибридам. На первый план вышли F1-гибриды, обладающие комплексной устойчивостью к болезням и вредителям и высокой выравненностью по основным хозяйственно ценным признакам. Одной из самых востребованных технологий для ускорения процесса получения F1-гибридов является производство линий удвоенных гаплоидов (ЛУГ) в культуре изолированных микроспор (КИМ) (Domblides et al., 2018; Djatchouk et al., 2019; Dong et al., 2021). КИМ ускоряет получение генетически стабильных линий, позволяет сочетать различные признаки в одном генотипе и облегчает поиск редких признаков, контролируемых рецессивными генами (Ferrie and Caswell, 2011). Наибольший успех в получении удвоенных гаплоидов через культуру микроспор достигнут у рапса (*Brassica napus* L.). Эффективность УГ-технологии у других представителей рода *Brassica* остается по-прежнему низкой (Шмыкова и др., 2015; Dong et al., 2021). Исследователи отмечают, что генотипы вида *Brassica oleracea* L., как правило, менее отзывчивы к эмбриогенезу в культуре микроспор, чем генотипы *B. napus* L. и *B. rapa* L. (Winarto and Teixeira da Silva, 2011; Gu et al., 2014; Шмыкова и др., 2015). Среди разновидностей вида *B. oleracea* частота эмбриогенеза в культуре микроспор наиболее высока у капусты брокколи (var. *italica* Plenck) (Lemonnier-Le Penhuizic et al., 2001), капусты брюссельской (var. *gemmifera* (DC.) Zenker) (Ockendon and Sutherland, 1987) и капусты цветной (var. *botrytis* L.) (Gu et al., 2014), в то время как у капусты белокочанной (var. *capitata* L.) частота эмбриогенеза в целом ниже (Rudolf et al., 1999; Bhatia et al., 2017). Высокая генотипспецифичность и низкая частота эмбриогенеза селекционно ценных генотипов является одной из главных проблем применяемых технологий производства ЛУГ растений рода *Brassica* (Olmedilla et al., 2010). Повышение

частоты эмбриогенеза капустных культур возможно при подборе оптимальных условий культивации, например, состава среды (Bhatia et al., 2017).

У эмбриоидов большинства генотипов рода *Brassica*, полученных в культуре микроспор, наблюдается низкая способность к прорастанию, а также не прямое прорастание эмбриоидов с образованием адвентивных побегов или вторичный эмбриогенез (Dong et al., 2021). Кроме того, удвоение полученных гаплоидов спонтанно происходит лишь у части растений. Наибольшая частота спонтанного удвоения наблюдается у растений *B. rapa*, таких как репа (77-100%) (Takahashi et al., 2012), горчица полевая (20-66%) (Takahashi et al., 2012), капуста пекинская (60%) (Lee et al., 2014), и разновидностей *B. oleracea*, например, брокколи (55-100%) (Yuan et al., 2015), кольраби (7-91%) (Dias et al., 2003). Повышение частоты регенерации и формирование проростков из эмбриоидов без промежуточных стадий, а также повышение частоты спонтанной диплоидизации могло бы обеспечить производство большего числа удвоенных гаплоидов с минимальными усилиями и техническими ресурсами, что в свою очередь облегчило бы создание F1-гибридов капустных культур.

### **Степень разработанности темы**

Первый протокол производства удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор был разработан для рапса (*B. napus* L.) (Lichter, 1981). Затем данный протокол, с небольшими модификациями, стали использовать для получения удвоенных гаплоидов у других растений рода *Brassica*: капусты цветной (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), брокколи (*B. oleracea* var. *italica*), капусты португальской (*B. oleracea* var. *costata*), кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes*), капусты листовой (*B. oleracea* var. *acephala*), капусты белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata*) и капусты китайской (*B. rapa* ssp. *chinensis*) (Duijs et al., 1992; Cao et al., 1994; Zhang et al., 2008; Winarto and Teixeira da Silva, 2011; Yuan et al., 2012).

Ряд исследователей сообщают об успешном усовершенствовании методики получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор брокколи (Dias et al., 2001; Na et al., 2011), капусты белокочанной (Yuan et al., 2012; Zeng et al., 2015), листовой капусты (Zhang et al., 2008; Wang et al., 2011), рапса (Tian et al., 2004; Klutschewski, 2012). При этом многие генотипы растений рода *Brassica* по-прежнему могут быть неотзывчивы или низко отзывчивы, имеют низкие частоты образования проростков и спонтанной диплоидизации в КИМ и требуют поиска способов увеличения конечного выхода УГ капустных растений в КИМ.

### **Цели и задачи исследования**

Цель исследования – изучение влияния факторов на частоту эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор, частоту образования проростков из эмбриоидов, частоту прямого прорастания эмбриоидов растений рода *Brassica*: разновидностей *Brassica oleracea* L., таких как: капуста белокочанная (var. *capitata* L.), капуста кольраби (var. *gongylodes* L.), капуста брокколи (var. *italica* Plenck), капуста листовая (var. *acephala* DC.) и рапса (*Brassica napus* L.).

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить генотипспецифичность эмбриогенной отзывчивости в культуре изолированных микроспор гомозиготных (ЛУГ, инбредные линии) и гетерозиготных (F1-гибриды, линии высокой степени гетерозиготности) генотипов капусты белокочанной (*B.oleracea* L.).
2. Изучить генотипспецифичность образования проростков из микроспорогенных эмбриодов *Brassica* и связь прямого прорастания эмбриоидов с их морфологической зрелостью.
3. Изучить влияние антиоксидантов (аскорбат и глутатион) на жизнеспособность изолированных микроспор и частоту эмбриогенеза отзывчивых и неотзывчивых генотипов капусты белокочанной (*B.oleracea* L.) в культуре изолированных микроспор.

4. Изучить влияние антибиотика (цефотаксим), полиамина (путресцин), дисахаридов (мальтоза, сахароза), спирта (маннитол) на этапе теплового шока (32,5 °С) изолированных микроспор *Brassica* на частоту микроспорогенного эмбриогенеза, образования проростков из эмбриоидов и прямого прорастания эмбриоидов.

5. Изучить влияние замены среды В5 на этапе изоляции и очистки микроспор и среды NLN-13 на этапе теплового шока 13%-м раствором сахарозы на частоту эмбриогенеза, частоту образования проростков и частоту спонтанной диплоидизации капусты белокочанной (*B. oleracea* L.) в культуре изолированных микроспор.

6. Изучить влияние воздействия низкой положительной температуры (5 °С) на микроспорогенные эмбриоиды (*B. oleracea* L.) на частоту их прямого прорастания.

### **Научная новизна**

Впервые показано, что изоляция, очистка микроспор и инкубирование во время прохождения теплового шока микроспор капусты белокочанной в 13% растворе сахарозы, рН 5,8 не оказывает негативного влияния на частоту эмбриогенеза микроспор и конечный выход УГ капусты белокочанной.

Впервые показано, что обработка эмбриоидов капусты кольраби низкими положительными температурами (5°С) в течение 3-9 дней увеличивает частоту их прямого прорастания в 2 раза и частоту образования проростков с 72,2% до 97,2%.

Впервые показано, что гомозиготные генотипы (ЛУГ, инбредные линии) и гетерозиготные генотипы (F1-гибриды, линии высокой степени гетерозиготности) капусты белокочанной имеют эквивалентные доли высоко и средне отзывчивых в культуре изолированных микроспор образцов – 27,3% и 24,5% соответственно.

## Теоретическая и практическая значимость

В результате анализа генотипспецифичности эмбриогенной отзывчивости в культуре изолированных микроспор 56 гомозиготных (ЛУГ, инбредные линии) и гетерозиготных генотипов (F1-гибриды, линии высокой степени гетерозиготности) капусты белокочанной (*B. oleracea*) отмечено, что соотношение высоко и средне отзывчивых к низко и неотзывчивым одинаково для гомозиготных 27,3/72,7% и гетерозиготных 24,5/75,5% образцов; соотношение отзывчивых генотипов (совокупность высоко, средне и низко отзывчивых) к неотзывчивым по каждой группе также имело сходство – 63,6/36,4% для группы гомозиготных и 50/50% для группы гетерозиготных генотипов.

Установлена высокая положительная связь ( $r=0,87$ ) числа морфологически зрелых эмбриоидов с числом эмбриоидов, прорастающих прямым путем. При этом в результате анализа генотипспецифичности прорастания эмбриоидов на твердой питательной среде показано, что частота образования проростков из эмбриоидов растений рода *Brassica* была в целом выше, чем в ранее проведенных исследованиях других авторов, и составила 57,9% у капусты белокочанной, 69,9% у рапса, 71,8% у кольраби, до 81,7% у брокколи.

Показано, что антиоксиданты (аскорбат, 20 мг/л и глутатион, 20 мг/л) повышают (в 1,7 раза) частоту эмбриогенеза отзывчивых и способствуют эмбриогенезу неотзывчивых генотипов *B. oleracea*, что объясняется более высоким уровнем жизнеспособности изолированных микроспор, инкубируемых в жидкой питательной среде с антиоксидантами.

Установлено, что инкубирование изолированных микроспор в питательной среде с цефотаксимом (50 мг/л) на этапе теплового шока в течение 24-48 часов с последующей заменой и культивированием микроспор в питательной среде NLN-13 (без цефотаксима) стимулирует эмбриогенез неотзывчивого генотипа *B. oleracea* var. *capitata* L. и существенно (в 3-7 раз)

повышает частоту эмбриогенеза, частоту образования проростков до 91,7% и частоту прямого прорастания эмбриоидов до 60% *B. napus* L.

Показано, что инкубирование изолированных микроспор в среде NLN-13 с путресцином (0,2-0,5 мг/л) при температуре 32,5°C в течение 24-48 часов с последующей заменой и культивированием микроспор в питательной среде NLN-13 (без путресцина) не влияет на эмбриогенез микроспор и образование проростков из эмбриоидов рапса (*B.napus* L.), однако способствует получению эмбриоидов и растений-регенерантов неотзывчивого к эмбриогенезу генотипа капусты белокочанной (*B.oleracea* var. *capitata* L.).

При исследовании влияния инкубирования микроспор в растворах дисахаридов (мальтоза 130 г/л, сахароза 130 г/л), спирта (маннитол, 50 г/л) на этапе теплового шока (24 ч., 32,5°C) показано, что растворы мальтозы или маннитола полностью ингибируют эмбриогенез микроспор *B. napus* L. и *B.oleracea* L., а раствор сахарозы увеличивает частоту эмбриогенеза и конечный выход удвоенных гаплоидов (УГ) *B. napus* L. (не менее чем в 2 раза), но не оказывает значимого влияния на частоту эмбриогенеза и конечный выход УГ *B.oleracea* L.

Отмечено, что использование раствора сахарозы (130 г/л) на этапе изоляции, очистки и инкубирования микроспор во время теплового шока (48 ч., 32,5°C) с последующей заменой и культивированием микроспор в питательной среде NLN-13 позволяет снизить трудоемкость и стоимость этих этапов, при этом значения частоты эмбриогенеза, частоты образования проростков, частоты спонтанной диплоидизации образцов *B.oleracea* L. сопоставимы со стандартным протоколом.

Показано, что воздействие низкой положительной температуры (5°C) на эмбриониды кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes* L.) в течение первых 3-9 дней после их пересадки на твердую питательную среду увеличивает частоту прямого прорастания в 2 раза и частоту образования проростков из

эмбриоидов до 94,4-97,2% по сравнению с культивированием эмбриоидов при 24°C.

### **Методология и методы исследования**

Теоретические исследования основаны на аналитическом обобщении опубликованных научных результатов. Экспериментальные исследования проведены с использованием стандартных и частных методик и последующей статистической обработкой данных. Полностью методология описана в главе «Материалы и методы».

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Использование 13% раствора сахарозы (pH 5,8) вместо среды B5 (130 г/л сахарозы, 50 г/л маннитола, pH 5,8) на этапе изоляции и очистки микроспор и вместо среды NLN-13 (pH 5,8) на этапе теплового шока не снижает частоту эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор.

2. Обработка микроспорогенных эмбриоидов *Brassica oleracea* var. *gongylodes* L. низкой положительной температурой (5°C) в течение 3-9 дней стимулирует их прямое прорастание.

3. Антиоксиданты поддерживают жизнеспособность микроспор *B. oleracea* L. в питательной среде и, как следствие, существенно повышают частоту эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор.

### **Степень достоверности**

Достоверность исследований подтверждается обширными экспериментальными исследованиями, выбором необходимого количества повторностей и объема выборки при закладке опытов, а также статистической обработкой полученных экспериментальных данных.

### **Апробация результатов**

Основные положения диссертационной работы доложены, обсуждены и одобрены на: Международной научной конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 160-летию В.А. Михельсона (г. Москва, 2020);

Всероссийской с международным участием научной конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 155-летию со дня рождения Н.Н. Худякова (г. Москва, 2021).

### **Публикация результатов исследований**

По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе 2 в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 2 статьи в сборниках докладов и тезисов, 1 патент на изобретение №2769815.

### **Личный вклад соискателя**

Результаты экспериментальных исследований получены автором лично. Соискателю принадлежат разработка программы исследования и проведение основных экспериментов, теоретическое обобщение полученных результатов.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 133 страницах, состоит из введения, основной части, содержащей 23 таблицы, 8 рисунков, заключения, списка принятых сокращений, библиографического списка, включающего 182 источника, в том числе 171 на иностранном языке.

# **1 Обзор литературы**

## **1.1 Возможности гаплоидных технологий**

Использование таких биотехнологических приемов как культура пыльников, микроспор или неоплодотворенных семязачатков для создания линий удвоенных гаплоидов овощных культур является важным инструментом в современной селекции (Domblides et al., 2018; Djatchouk et al., 2019; Dong et al., 2021).

Гаплоидные растения представляют интерес для генетики и селекции, так как каждый ген у гаплоида представлен единственным аллелем и рецессивные аллели у таких растений не подавляются доминантными, поэтому среди таких растений удобно отбирать формы с ценными мутациями. За счет того, что для идентификации конкретных генов может быть скринировано меньшее количество растений, удвоенные гаплоиды также полезны в процессе отбора полигенных признаков (Ferrie and Caswell, 2011).

Главное преимущество выращивания растений из гаплоидных клеток – быстрое получение константного нерасщепляющегося материала, гомозиготного по всем аллельным генам. Это особенно важно для растений с двулетним циклом развития и перекрестноопыляемых культур. Создание удвоенных гаплоидов сокращает длительность селекционного процесса на 6-12 лет (Байдина, 2018).

Гаплоидные клетки удобны для решения многих задач теоретического плана и для генно-инженерных манипуляций, получения моносомных линий и их использования для генетического анализа и хромосомной инженерии. При изучении гаплоидных клеточных линий возможно получить более точные данные о природе генных мутаций и цитоплазматической наследственности (Ferrie and Möllers, 2011). Линии УГ могут использоваться для идентификации маркеров, картирования генов и оценки генетической изменчивости и количества генов для количественных признаков (Ferrie and

Möllers, 2011; Ferrie and Caswell, 2011). Одним из новых направлений является использование удвоенных гаплоидов в качестве селекционного материала в «обратной» селекции (Rudolf-Pilih et al., 2019).

## 1.2 Гаплоидные технологии у капустных культур

Впервые о способе получения УГ в культуре изолированных микроспор в 1982 г. заявил Lichter, который смог получить проростки из эмбриоидов, сформировавшихся в культуре изолированных микроспор масличного рапса. В 90-х гг. технологию культуры микроспор стали использовать для получения удвоенных гаплоидов у капусты цветной (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), брокколи (*B. oleracea* var. *italica*), капусты португальской (*B. oleracea* var. *costata*), кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes*), капусты листовой (*B. oleracea* var. *acephala*), капусты белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata*) и капусты китайской (*B. rapa* ssp. *chinensis*) (Duijs et al., 1992; Cao et al., 1994; Zhang et al., 2008; Winarto and Teixeira da Silva, 2011; Yuan et al., 2012).

Гаплоидная технология интенсивно используется в селекции и улучшении сортов культур рода *Brassica*, например, для селекции *B. napus*, сортов типа 'canola' (Xu et al., 2007); у *B. oleracea*, в селекции на устойчивость к *Plasmodiophora brassicae*. Большинство выращиваемых в настоящее время гибридов рапса были получены с помощью технологии удвоенных гаплоидов (Hale et al., 2022).

Использование удвоенных гаплоидов значительно облегчает селекцию капустных культур на комплексную устойчивость, генетический анализ полигенных признаков, быстрое производство родительских чистых линий в программах получения F1-гибридов, и в конечном итоге ускоряет выпуск новых сортов, адаптированных к местным условиям (Dong et al., 2021; Сеницына и др., 2022).

Пивоваров и др. (2017) сообщают о получении перспективных гибридных комбинаций позднеспелой белокочанной капусты с

использованием линий удвоенных гаплоидов. За последнее время на базе УГ были созданы среднепоздний F1-гибрид Краут (Монахос, 2015), раннеспелый F1-гибрид Настя (Байдина, 2018). В 2020 в Госреестр был внесен позднеспелый F1-гибрид капусты белокочанной Натали (Минейкина, 2018).

Получение удвоенных гаплоидов из растений-доноров, подвергнутых искусственному мутагенезу, используется для увеличения морфологической и биохимической изменчивости растений рода *Brassica*. С этой целью обрабатывают пыльники и микропоры такими мутагенами как EMS (этилметансульфонат) и азид натрия. Например, перспективные формы *B.napus* были получены путем обработки микроспор с помощью EMS (Ferrie et al., 2008; Liu et al., 2010). Полукарликовый мутант *B. napus* был отобран из удвоенных гаплоидных растений после EMS-обработки соматических эмбриоидов, полученных в культуре микроспор (Liu et al., 2010). Мутанты с карликовостью, измененным кислотно-жировым составом и пониженным содержанием глюкозинолятов получены путем культивирования микроспор растений-доноров индийской горчицы (*B. juncea*), обработанных EMS и этилнитрозомочевинной (Prem et al., 2012).

### **1.3 Эмбриогенез микроспор**

У подавляющего большинства растений эмбриогенез происходит после слияния женских и мужских гамет (оплодотворения) и начинается с образования одноклеточной зиготы. Зигота проходит через программы видоспецифического клеточного деления и дифференцировки тканей для формирования морфологически зрелого эмбриона, который затем образует гипокотиль (эмбриональный стебель) и одну или несколько семядолей (Soriano et al., 2013).

Растительное царство характеризуется высоким уровнем пластичности развития, включая способность растений формировать эмбрионы из клеток, отличных от зиготы. Это явление называется тотипотентностью и может быть выражено как часть нормального развития некоторых растений, как при

апомиксисе, или может быть индуцировано в культуре тканей (George et al., 2008). Одной из форм тотипотентности является гаметофитный эмбриогенез, при котором мужские или женские гаметы индуцируются для образования эмбриоидов (Seguí-Simarro, 2010). Эти клетки получены в процессе мейоза, и, таким образом, эмбриоиды, полученные в культуре, представляют собой гаплоидное потомство родительского растения. В целом, индукция гаплоидного эмбриоида из микроспор чаще применяется и изучается чем из семязачатков. Это связано с большим количеством микроспор и меньшей трудоемкостью при их изоляции по сравнению с изоляцией семязачатков (Soriano et al., 2013).

Не все культивируемые микроспоры имеют спорофитный путь развития, и из микроспор, которые первоначально переключаются на спорофитный рост, лишь небольшой процент способен образовывать эмбриоиды. Например, в линии рапса Toras DN4079 около 40% микроспор делилось по спорофитному пути, а конечный выход эмбриоидов составил 5-10% (Telmer et al., 1995; Soriano et al., 2013). Данные большого количества исследований и покадровой визуализации процесса развития микроспор в культуре позволяют выделить некоторые маркерные признаки переключения микроспор на спорофитный путь развития (Indrianto et al., 2001).

Было высказано предположение, что одним из первых эффектов стрессовых воздействий на культивируемые микроспоры является перестройка цитоскелета со смещением ядра к центру клетки и образованием препрофазной полосы микротрубочек, отмечающей плоскость деления, которая отсутствует при нормальном развитии пыльцевого зерна (Simmonds and Keller, 1999; Shariatpanahi et al., 2006). Применение химических агентов, таких как колхицин, цитохалазин D или н-бутанол, показало, что перестройка сетей микротрубочек и актина играет важную роль в изменении путей клеточного развития, поскольку нарушение структуры этих сетей бывает достаточным для индукции эмбриогенеза без воздействия стрессовых

факторов (Gervais et al., 2000; Soriano et al., 2008). Перестройки цитоскелета способствуют смещению ядра к центру клетки, что приводит к звездообразной морфологии, в которой центральное ядро окружено цитоплазматическими нитями, расходящимися от ядра (Gervais et al., 2000). Эта звездообразная структура считается первым признаком индукции эмбриогенеза микроспор (Maraschin et al., 2005).

В то же время визуализация живых клеток иммобилизованных микроспор пшеницы и ячменя показала, что звездообразные структуры связаны с делением клеток (Indrianto et al., 2001; Maraschin et al., 2005), но не всегда являются надежным маркером эмбриогенеза, поскольку их также можно наблюдать в культивируемых микроспорах, которые не образуют эмбриоидов (Daghma et al., 2012; Maraschin et al., 2005; Zur et al., 2013). Появление звездообразной структуры может происходить одновременно с образованием крахмальных зерен, указывающих на развитие пыльцевого зерна (Daghma et al., 2012).

Еще одним клеточным маркером, который часто ассоциируется с индукцией эмбриогенеза, является начальное симметричное деление микроспоры или вегетативного ядра (Pulido et al., 2005). Однако, как симметричные, так и асимметричные деления микроспор *B. napus* могут заканчиваться формированием эмбриоидов. В соответствии с этим микроспора, которая подвергается симметричному делению, демонстрирует дефекты в спецификации генеративной клетки, но не изменение судьбы пыльцевой клетки как таковой (Soriano et al., 2013).

Другие морфологические различия, которые связаны с эмбриогенезом микроспор, включая тонкую внутреннюю стенку и отсутствие амилопластов, трудно идентифицировать с помощью световой микроскопии и покадровой визуализации (Maraschin et al., 2005). Напрямую или опосредованно в формирование эмбриоидов вовлечены различные регуляторные белки и фитогормоны, включая ауксины, гиббереллиновую кислоту (Prem et al.,

2012). Ряд исследований показал снижение мРНК, участвующих в синтезе белка в зрелых пыльцевых зернах, по сравнению со спорофитными тканями (Honys and Twell, 2003). В эмбриогенных микроспорах разрушается субинтинальный слой, повышается уровень эндогенного кальция, происходит постепенное замещение каллозы целлюлозой, что также может служить клеточными маркерами эмбриогенеза (Parra-Vega et al., 2015). Визуализация и анализ клеточных процессов в сочетании с описанными маркерными признаками является ценным инструментом для выявления эмбриогенных микроспор на ранних стадиях культуры клеток (Soriano et al., 2013).

Эмбриоиды образуются у большинства видов путем ряда случайно ориентированных делений внутри экзины (Parra-Vega et al. 2015). При разрыве оболочки (экзины) высвобождается шаровидный проэмбриоид, состоящий из скопления клеток без явной организации и мало похожий на зиготический аналог, за исключением четко выраженной протодермы. Образование протодермы считается маркером начала формирования эмбриоида. Затем проэмбриоиды развиваются в гистодифференцированные эмбриоиды, которые содержат все ткани и органы, обнаруженные в зиготических эмбрионах растений (Soriano et al., 2013).

Эмбриогенез микроспор может происходить путем прямого развития соматических зародышей из микроспор или с образованием суспензороподобных структур. Эти структуры состоят из скоплений более крупных клеток, коротких рудиментарных нитей или длинных нитей, прикрепленных к корневому полюсу эмбриоида. Большинство эмбриоидов имеют шаровидную форму без четких апикально-базальных полюсов и не имеют структуры суспензора или имеют рудиментарный суспензор, образованный несколькими клетками (Yeung, 2002). Формирование эмбриоидов с суспензором происходит аналогично формированию зиготических эмбрионов, у которых суспензор образуется в процессе

делений базальной клетки зиготы. При этом нить, похожая на суспензор, образуется путем повторяющихся поперечных делений микроспоры с последующим формированием эмбриоида на дистальном конце суспензора (Soriano et al., 2013; Domblides et al., 2018).

Суспензор необходим для хранения и транспорта к зародышу питательных веществ из эндосперма, синтеза и транспорта фитогормонов (Friml, 2003). Вероятно, в культуре микроспор суспензороподобные структуры имеют похожие функции и участвуют в регуляции роста и дифференциации клеток эмбриоида (Soriano et al., 2013; Domblides et al., 2018). Ряд авторов указывает, что суспензороподобные структуры играют решающую роль в правильном формировании эмбриоида посредством биосинтеза ауксина, особенно на начальных этапах развития (Prem et al., 2012). Клетки-суспензоры прекращают деление и часто дегенерируют после шаровидной или сердцевидной стадии, и не участвует в более позднем развитии эмбриоидов (Soriano et al., 2013).

Образование большого числа эмбриоидов с суспензороподобными структурами наблюдали у генотипов рапса при использовании щадящего стрессового воздействия при 32°C в течение 8-12 ч (Supena et al., 2008) или при постоянном культивировании при низкой температуре (18°C) (Prem et al., 2012). В культуре микроспор брокколи (Domblides et al., 2018), рапса (Supena, 2004) и капусты китайской (Шумилина и др., 2015) было отмечено, что эмбриоиды с суспензором, развиваются медленнее, чем бессуспензорные, а также способны образовывать цепочки из эмбриоидов (Domblides et al., 2018) и всевозможные близнецовые комбинации (Supena et al., 2008).

#### **1.4. Факторы, влияющие на получение УГ в культуре микроспор**

Выход удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор определяется двумя процессами: индукцией эмбриогенеза из микроспор и регенерацией растений из эмбриоидов (Kozar et al., 2020). Эмбриогенез микроспор сильно зависит от ряда внутренних и внешних факторов, включая

генотип и условия роста растений-доноров, стадия развития микроспор, наличие холодого воздействия на растения-доноры/бутоны/микроспоры, условия теплового шока, состав питательной среды (рН, углеводы, источник азота, гормоны и другие добавки), плотность культуры (Ferrie and Caswell, 2011; Ahmadi et al., 2014; Bhatia et al., 2017; Dong et al., 2021). На процесс прорастания/регенерации эмбриоидов, полученных из микроспор, влияют: генотип (Wei et al., 2008), стадия развития эмбриоидов (Klutschewski, 2012), питательная среда (Zhang et al. 2006) и условия культивирования (Klutschewski, 2012).

Высокая генотипспецифичность и низкая частота эмбриогенеза микроспор и регенерации/прорастания эмбриоидов селекционно ценных генотипов является одной из главных проблем применяемых технологий производства линий удвоенных гаплоидов (ЛУГ) растений рода *Brassica* (Wei et al., 2008; Ferrie and Möllers, 2011). Использование оптимальных состава среды и условий культивации, позволят повысить частоту прорастания эмбриоидов, а также не допустить разрастания, витрификации или вторичного эмбриогенеза нормально выглядящих эмбриоидов капустных культур (Klutschewski, 2012; Kozar et al., 2020).

### **1.5. Генотипспецифичность**

С началом изучения такого явления как андрогенез большинство исследователей отмечали, что генотип растения является одним из наиболее важных факторов, влияющих на успешную индукцию гаплоидов (Xu et al., 2007). Генотипспецифичность отзывчивости к эмбриогенезу при культивировании пыльников/микроспор наблюдалась у различных сельскохозяйственных культур, в том числе и у многих видов *Brassica* (Lee et al., 2014; Zeng et al., 2015; Bhatia et al., 2017). Существенное варьирование степени отзывчивости в культуре микроспор возможно даже среди разных растений одного сорта (Dong et al., 2021).

Исследователи отмечают, что генотипы вида *B. oleracea*, как правило, менее отзывчивы к эмбриогенезу в культуре микроспор, чем генотипы *B. napus* и *B. rapa* (Winarto and Teixeira da Silva, 2011; Gu et al., 2014; Шмыкова и др., 2015). Среди разновидностей вида *B. oleracea* частота эмбриогенеза в культуре микроспор наиболее высока у капусты брокколи (var. *italica* Plenck) (Lemonnier-Le Penhuizic et al., 2001), капусты брюссельской (var. *gemmifera* (DC.) Zenker) (Ockendon and Sutherland, 1987) и капусты цветной (var. *botrytis* L.) (Gu et al., 2014), в то время как у капусты белокочанной (var. *capitata* L.) (Bhatia et al., 2017) и капусты листовой (var. *acephala*) (Yan et al., 2020) частота эмбриогенеза в целом ниже.

Многие авторы указывают, что способность микроспор формировать эмбриониды контролируется генетически, однако нет единого мнения о количестве генов, участвующих в контроле данного признака (Weber et al., 2005). При скрещивании высокоотзывчивых и низкоотзывчивых генотипов белокочанной капусты, показано либо проявление промежуточного значения признака у потомства, либо превышение признака эмбриогенной отзывчивости у гибридного потомства по сравнению с лучшим родителем (Rudolf et al., 1999). При анализе наследования отзывчивости к эмбриогенезу в системе диаллельных скрещиваний у рапса и капусты пекинской выявили достоверное влияние аддитивных и доминантных эффектов генов на наследование признака. Выявление и картирование областей на хромосомах, которые являются эволюционно важными в поддержании и обеспечении взаимодействия генов, контролирующего андрогенез, поможет выбрать отзывчивые к андрогенезу генотипы (Soriano et al., 2013).

Перепрограммирование микроспор с гаметофитного пути развития на спорофитный, вызванное стрессом, включает в себя изменения в регуляции экспрессии большого числа генов за счет метилирования ДНК (Chen et al. 2016). В недифференцированных клетках и эмбриогенных микроспорах *B. napus* наблюдался значительно более низкий уровень метилирования ДНК и

обилие транскриптов ДНК метилтрансферазы I (BrMET1a) по сравнению с дифференцированной зрелой пыльцой, а также микроспорогенными эмбриоидами (Solis et al., 2012). Li et al. (2016) установили, что во время развития пыльцевых зерен *B. rapa* экспрессируется ДНК-метилтрансфераза (BsMF22), понижающая общий уровень экспрессии генов.

Сравнивая экспрессию генов в эмбриогенных и неэмбриогенных микроспорах, Malik et al. (2007) смогли идентифицировать определенное количество генов, которые экспрессируются только во время формирования эмбриоидов. Среди этих генов были FUSCA3, LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), LEC2, BABY BOOM (BBM), WOX2, WOX9 и ABSCISIC ACID INSENSITIVE3. Анализ экспрессии гена LEC2 после 3 дней культивирования может использоваться для определения способности микроспор к эмбриогенезу (Soriano et al., 2013). Ahmadi and Shariatpanahi (2015) в своей работе делают вывод о том, что образование семядольных эмбриоидов и регенерация проростков рапса, по-видимому, коррелируют с экспрессией генов BnSERK1 и BnSERK2. Уровни экспрессии BnLEC1, BnLEC2, BnBBM1 и BnUP1 в культивируемых микроспорах высоко отзывчивого генотипа масличного рапса 'Topas-DH4079' и низко отзывчивых генотипах 'Allons', 'Westar' и 'Garrison' на 3 и 7 день культуры сильно коррелировали с их эмбриогенным потенциалом (Malik et al. 2007).

Кроме того, различия в отзывчивости в культуре микроспор могут наблюдаться в пределах одного и того же генотипа, например, у капусты китайской (Шумилина и др., 2015), рапса (Ferrie et al., 1995). В работе Liu et al. (2001) частота эмбриогенеза капусты китайской раннеспелых сортов была выше, чем у среднеспелых и позднеспелых.

Генотип оказывает влияние не только на эмбриогенную компетентность микроспор, но и на процесс формирования проростков из эмбриоидов и, следовательно, конечный выход растений-регенерантов (Wei et al., 2008). Частота получения проростков из эмбриоидов у различных видов

*Brassica* варьирует от 0 до 94%: у *B. rapa* – 5-20 % (Takahashi et al., 2012), у *B. napus* – от 0 до 94 % (Smykalova et al., 2006; Ahmadi et al., 2014), у *B. oleracea* – от 11 до 70% (Klíma et al., 2004, Pilih et al., 2008, Wang et al., 2009). Среди разновидностей *B. oleracea* максимальная частота формирования растений-регенерантов наблюдается у брокколи 60-70% (Wang et al., 2010), у капусты кольраби частота регенерации варьирует от 11% до 63% (Klíma et al., 2004), у капусты белокочанной составляет менее 54% (Pilih et al., 2008). Кроме того, при высадке эмбриоидов капустных культур на регенерационную среду прямое прорастание и формирование побега происходит редко, у большинства видов *Brassica* частота прямого пути развития эмбриоидов составляет менее 30% (Klutschewski, 2012; Gu et al., 2014).

Основным фактором, влияющим на прямое образование проростков из эмбриоидов, является формирование апикальной меристемы (Stasolla et al., 2008). Этот процесс регулируется рядом генов (Dong et al., 2021). Экспрессия генов *ZWILLE* (*ZLL*), *ARGONAUTE1* (*AGO1*), *CLAVATA* (*CLV*), *WUSCHEL* (*WUS*), *WUSCHEL RELATED HOMEBOX* (*WOX*), *CUP-SHAPED COTYLEDON* (*CUC*) и *SCARECROW-LIKE* генов (*SCL*) предположительно может влиять на процесс морфогенеза эмбриоидов капустных культур (Stasolla et al., 2008; Elhiti et al., 2013).

## **1.6 Подготовка растения донора микроспор**

Возможность получения из микроспор эмбриоидов обусловлена не только генотипом, но и физиологическими факторами, такими как возраст растения, время, прошедшее с начала цветения, часы сбора бутонов, условия выращивания, формировка растения (Dong et al., 2021).

Растения-доноры могут быть выращены в открытом или защищенном грунте или в контролируемых условиях ростовой камеры. Однако возможность заражения болезнями и вредителями у растений-доноров микроспор, выращенных в открытом грунте, выше, чем у других вариантов.

Это в свою очередь может существенно снизить жизнеспособность микроспор (Dias, 2003).

Так, Prem et al. (2012) показали, что отзывчивость к эмбриогенезу у донорных растений рапса, выращиваемых в ростовой камере, была 7 раз выше, чем у растений, выращиваемых в теплице. Однако следует учитывать, что некоторые генотипы могут иметь специфические требования к условиям роста для повышения выхода эмбриоидов. Во время выращивания растений доноров на всех этапах не рекомендуются обработки ядохимикатами, т.к. это снижает жизнеспособность микроспор (Custers, 2003).

Различия в отзывчивости на культуру микроспор были выявлены в зависимости от сезона выращивания. Число ясных и солнечных дней, температура в период вегетации также влияют на индукцию эмбриогенеза в культуре пыльников (Ata et al., 2018).

При изучении влияния температурного режима и фотопериода у капустных культур значительно более высокая эмбриогенная компетентность была отмечена у микроспор, выделенных из растений-доноров, выращенных при температуре 15/12°C с чередованием свет/темнота 16/8 часов. Методом поточной цитометрии было установлено, что влияние температуры роста растений-доноров на эмбриогенез микроспор может быть объяснено изменением физиологии клетки микроспор, в частности снижению зернистости цитоплазмы и плотности экзины, изменением эндогенного уровня регуляторов роста и питательных веществ в пыльнике (Ata et al., 2018).

Повышенный выход эмбриоидов при выращивании растений-доноров микроспор в условиях низких положительных температур отмечали Ferrie and Caswell (2011). Считается, что влияние низкой температуры во время стеблевания и цветения замедляет развитие пыльцы, тем самым увеличивая количество микроспор, способных к формированию эмбриоидов. Для стимуляции эмбриогенеза микроспор на растения-доноры, в течение

нескольких дней перед цветением, можно воздействовать низкой положительной температурой (5-15°C) (Gu et al., 2004, 2014; Dubas et al., 2013; Bhatia et al., 2017). Так, например, Dubas et al. (2013) получили удвоенные гаплоиды рапса, обработав растения-доноры микроспор низкими температурами (10°C в течение 48 часов). Сообщается о высокой текучести плазматической мембраны и повышенных уровнях абсцизовой кислоты в культивируемых микроспорах, собранных с предварительно обработанных холодом донорных растений, что позволяет предположить существование взаимосвязи между обработкой холодом, физическими свойствами мембраны клеток микроспор и концентрацией эндогенного АБК (Dubas et al., 2013; Żur et al., 2015).

На частоту эмбриогенеза микроспор способно влиять и время отбора бутонов. Отбирать бутоны лучше всего ранним утром, так как ближе к 12 часам дня микроспоры начинают терять жизнеспособность. Выделять микроспоры из бутонов, образовавшихся в начале цветения, предпочтительнее, чем из бутонов появившихся позже (Май, 2010). Custers (2003) указывает, что оптимально собирать бутоны с соцветий, на которых раскрылось 1-3 цветка.

### **1.7 Стадия развития микропор**

Стадия развития микропор растения-донора также влияет на эффективность андрогенеза (Rivas-Sendra et al., 2017). Большинство исследований показывают, что наиболее благоприятным для индукции эмбриогенеза является период, начинающийся после перехода от стадии тетрад к одноядерной стадии и завершающийся двуядерной. На этом этапе микроспора сохраняет особенности спорофита, которые позволяют ей дифференцироваться в эмбриоид. В более ранних исследованиях аналогичным образом было установлено, что поздние одноклеточные и ранние митотические стадии пыльца наиболее чувствительны к культуре микроспор (Soriano et al., 2013). Однако Kim et al. (2004) сообщили, что

оптимальные для индукции эмбриогенеза бутоны содержат в пыльниках большую часть ранней двухклеточной пыльцы (>75%), что отличается от результатов других авторов. В основном для изоляции используют микроспоры, находящиеся на поздней одноядерной стадии развития (Soriano et al., 2013).

Интересно отметить, что условия культуры также влияют на оптимальную стадию, которая реагирует на индукцию эмбриогенеза. Например, неоднократно было показано, что культура пыльников требует более ранних стадий развития микроспор, чем культура изолированных микроспор (Duijs et al., 1992). Ткани пыльника способны обеспечить доступ питательных веществ и защиту от стресса, поддерживая развитие микроспор на ранних стадиях (Salas et al., 2012). Кроме того, по сравнению с культурой пыльников, изоляция микроспор представляет собой дополнительный физический стресс и, следовательно, может быть более эффективной для поздних стадий развития микроспор, которые требуют более интенсивного стрессового воздействия (Shariatpanahi et al., 2006; Soriano et al., 2013).

У капустных культур имеется прямая связь между размером бутона и стадией развития микроспор (Dong et al., 2021). По данным различных авторов, размер бутонов, содержащих в основном одноядерную позднюю стадию развития микроспор, для капусты брокколи и рапса составлял 3,5-3,9 мм (Gu et al., 2004; Domblides et al., 2018). Близкие значения рекомендуются для кольраби: 3,5-3,8 мм (Wang et al., 2011). Для изоляции микроспор капусты пекинской предпочтительно отбирать бутоны размером 2,3-2,8 мм, при этом чаще рекомендуется 2,5 мм (Maluszynski et al., 2003; Dunwell, 2010; Asif et al., 2013). Оптимальный размер бутона для капусты белокочанной и краснокочанной 4,5-4,6 мм и 4,5-5,0 мм соответственно (Winarto et al., 2011).

Размер бутонов, являющийся косвенным признаком наличия необходимой для индукции андрогенеза стадии развития микроспор, сильно зависит не только от конкретного вида растения-донора, но и от генотипа и

условий его выращивания. Для эффективного культивирования пыльников или микроспор желательно проводить цитологический анализ непосредственно перед изоляцией микроспор, что позволит установить точную корреляцию и выделить большее количество эмбриогенных микроспор.

### **1.8 Плотность микроспор в суспензии**

Плотность суспензии микроспор существенно влияет как на эмбриогенез микроспор (Ferrie and Caswell, 2011), так и на морфологию эмбриоидов, и, следовательно, на возможность прямого образования проростков из эмбриоидов у видов *Brassica* (Dong et al., 2021). Для получения высокой частоты образования эмбриоидов в культуре микроспор капусты кочанной (Bhatia et al., 2018), капусты цветной (Bhatia et al., 2017), горчицы (Prem et al., 2008) и рапса (Supena et al., 2008) требуется плотность суспензии  $1-6 \times 10^4$  клеток/мл. В других исследованиях для культивирования микроспор капусты китайской (Cao et al., 1994), белокочанной (Winarto and Teixeira da Silva, 2011), горчицы и рапса (Dong et al., 2021) была использована более высокая плотность суспензии микроспор ( $0,7-2 \times 10^5$  клеток/мл). Применение еще более высокой плотности суспензии микроспор ( $0,6-2 \times 10^6$  клеток/мл) рекомендуется для капусты листовой (Zhang et al., 2008).

Плотность суспензии выше или ниже оптимального значения приводит к снижению частоты эмбриогенеза увеличению числа аномалий в формировании эмбриоидов (Winarto and Teixeira da Silva, 2011). Оптимальная плотность суспензии микроспор может снизить существенность физического и/или химического стресса и способствовать высвобождению никотинамида и пурина, оказывающих сильное влияние на начальные фазы эмбриогенеза (Custers, 2003).

## 1.9 Индукция эмбриогенеза микроспор

Эмбриогенез микроспор происходит при индукции стрессом, перепрограммирующим микроспоры с гаметофитного пути на спорофитный (Dong et al., 2021). Тип, продолжительность и время применения стрессового воздействия варьируются в зависимости от вида капустных растений. В культуре микроспор растений рода *Brassica* эмбриогенез обычно индуцируются осмотическим стрессом (Ahmadi et al., 2014), тепловым шоком различной продолжительности (Prem et al., 2005), антиоксидантами (Hoseini et al., 2014) или гормонами роста (Ahmadi et al., 2014).

Стимуляция симметричного деления микроспор и их перехода с гаметофитного пути развития на спорофитный возможно под влиянием различных стрессоров, например, воздействием пониженных или повышенных температур. Для капустных культур это чаще всего обработка суспензии микроспор повышенными температурами. Эффективность такого воздействия на перепрограммирование пути развития микроспор и стимуляцию эмбриогенеза растений рода *Brassica* подтверждена в работах многих авторов (Duijs et al., 1992; Dias, 2001).

Тепловой шок имеет тенденцию повышать текучесть плазматических мембраны (Dubas et al., 2013), что способствует притоку ионов кальция и быстрому, временному повышению внутриклеточного кальция в эмбриогенных микроспорах (Rivas-Sendra et al., 2017). Информация о повышенном уровне внутриклеточного кальция затем фиксируется и передается набором кальцийсвязывающих белков, таких как кальмодулины (CAMs), кальмодулиноподобные белки (CAMLS), кальциневрин B-подобные белки (CBLS), кальций-зависимые протеинкиназы (CPKS) и активируемые митогеном протеинкиназы (MAPKs), в ядро и тем самым изменяет путь развития микроспор на спорофитный (Tsuwamoto and Takahata, 2008).

Температура и время воздействия тепловым шоком меняются в зависимости от вида капустной культуры. Чаще всего для у растений рода

*Brassica* используют тепловые режимы от 32°C до 35°C с временем воздействия от 1 до 10 суток (Шмыкова и др., 2015; Domblides et al., 2018; Dong et al., 2021).

Воздействие температурой 32-33°C на культуру микроспор в течение 1-2 дней приводит к образованию большого количества эмбриоидов у разновидностей *B. oleracea*, например, брокколи (Yuan et al., 2011), капусты брюссельской (Duijs et al., 1992), капусты кочанной (Yuan et al., 2012), капусты цветной (Gu et al., 2014), капусты листовой (Zhang et al., 2008), и разновидностей *B. rapa*, таких как капуста китайская (Wang et al., 2009; Шумилина и др., 2015), капуста полевая (*B. rapa* subsp. *campestris* (L.) A.R.Clapham) и репа (Takahashi et al., 2012). Однако культивирование микроспор при температуре от 32 до 35°C в течение 3-4 дней или более (7-14 дней) приводила к высокой частоте образования эмбриоидов таких видов, как *B. juncea* L. (Prem et al., 2008), и рапс (Ahmadi et al., 2014a).

Культивирование микроспор рапса при умеренной температуре (25°C или 27,5°C) привело к небольшому количеству или отсутствию эмбриоидов (Prem et al., 2012). Возможен вариант культивации при более низкой температуре (18°C), изученный на растениях *B. napus*, в ходе которого происходило образование суспензо-подобных эмбриоидов (52,4%), многоклеточных эмбриоидов без суспензора (13,1%) и небольшой доли зрелой пыльцы (Dubas et al., 2013). Кроме того, переключение микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития может быть индуцировано только в очень короткий временной промежуток. Например, культивация микроспор рапса при 25°C в течение 24 ч. перед воздействием тепловым шоком способна полностью ингибировать эмбриогенез (Pechan et al., 1991). Это указывает на то, что время индукции имеет решающее значение (Dong et al., 2021).

В качестве специального приема, используемого для повышения эффективности андрогенеза *in vitro*, может служить холодовая предобработка

пыльников перед выделением микроспор. Предварительная холодовая обработка способствует синхронизации процесса развития микроспор пшеницы (Dong et al., 2021). Воздействие 4-5°C на бутоны или соцветия перед культивированием повышало эмбриогенез микроспор у цветной капусты (Bhatia et al., 2017), горчицы полевой и репы (Takahashi et al., 2012). Комбинация предварительной холодовой обработки пыльников (4°C) в течение 1 или 2 дней и теплового шока (32,5°C) в течение 1 дня значительно увеличила частоту эмбриогенеза микроспор капусты брокколи (Yuan et al., 2011). В работе Gu et al. (2004) сообщается, что обработка бутонов холодом при 4°C в течение 2 или 3 дней значительно усиливает эмбриогенез микроспор рапса в 7 и 26 раз соответственно (по сравнению с вариантом без обработки).

### **1.10 Состав питательной среды**

Одним из факторов, влияющих на частоту формирования эмбриоидов, является питательная среда (Winarto and Teixeira da Silva, 2011). В настоящее время в большинстве методик получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор *Brassica*, таких как: рапс (Custers, 2003); капуста белокочанная, листовая горчица, сурепица, капуста пекинская (Dong et al., 2021); брокколи (Dias et al., 2003) используют преимущественно среду для культивации NLN-13.

#### **1.10.1 Концентрация питательной среды**

В работах Dias (2001), Na et al. (2011), Zhang et al. (2008) было показано, что применение половинной концентрации среды NLN повышает частоту эмбриогенеза капусты брокколи, капусты листовой и репы. При этом было доказано, что повышенные концентрации компонентов питательной среды ингибируют развитие микроспор в эмбриоиды (Na et al., 2011).

В ряде исследований влияние концентрации микро- и макроэлементов на частоту эмбриогенеза рассматривается отдельно (Na and Chun, 2009; Wang

et al., 2009; Na et al., 2011). Нитратный ион ( $\text{NO}_3$ ) важен для буферизации среды, высокая концентрация  $\text{NO}_3$  может снижать значение pH питательной среды и быть ингибирующей для индукции эмбриогенеза (Dong et al., 2021). Снижение концентрации некоторых макроэлементов в NLN-13, содержащих ионы  $\text{NO}_3$ , может способствовать индукции эмбриогенеза капустных культур (Dias, 2001). Wang et al. (2009) сообщают о значимом увеличении выхода эмбриоидов у капусты китайской при уменьшении концентрации макроэлементов в среде NLN-13 в два раза. Более высокие концентрации макроэлементов могут препятствовать индукции эмбриогенеза, а также развитию эмбриоидов (Na and Chun, 2009). При этом как повышение, так и понижение концентрации микроэлементов в жидкой среде NLN не оказали значимого влияния на частоту эмбриогенеза. Однако полное отсутствие микроэлементов позволило увеличить конечный выход эмбриоидов брокколи (Na et al., 2011).

### **1.10.2 Микро и макроэлементы**

Частоту эмбриогенеза микроспор может повышать добавление в среду для культивации отдельных микроэлементов, например, кобальта в виде хлорида кобальта (Leroux et al., 2009). На процесс образования эмбриоидов из микроспор могут также влиять повышенные концентрации железа и бора.

Известно, что недостаток железа в питательной среде останавливает развитие эмбриоидов на глобулярной стадии. На рапсе выявлена положительная корреляция между концентрацией хелатов в среде для культивации и частотой эмбриогенеза: от 0,53% в варианте без хелата до 2,32% в варианте с добавлением 10,0 мг/л хелата железа. Формированию сердцевидных эмбриоидов (50,0%) способствует добавление 12,5 мг/л хелата. Наибольшая частота эмбриогенеза торпедовидного типа (39,3%) получена при добавлении 10,0 мг/л хелата железа (Муравлев, 2007). Добавление ионов железа, хелатированных с ЭДТА, на 3-й день культуры микроспор *Brassica napus* приводит к удвоению выхода эмбриоидов (Leroux et al., 2016). По

другим данным наличие железа в среде является одним из факторов, провоцирующих окислительное повреждение. Отсутствие железа в среде NLN в течение первых 3 дней культивации микроспор приводило к удвоению числа эмбриоидов. Следовательно, дефицит железа в первые дни культивирования может помочь уменьшить стресс, вызванный активными формами кислорода (Leroux et al., 2016; Mittler, 2017).

Еще одним важным микроэлементом является бор, который необходим для разнообразных физиологических и метаболических процессов в клетке, многие двудольные растения демонстрирует высокую чувствительность к дефициту бора (Eggert and Von Wirén, 2016). NLN-среда содержит бор в концентрации 162 мкМ. При изучении влияния увеличения концентрации бора в 7-13 раз на индукцию эмбриоидов в культуре микроспор рапса было доказано, что до 2000 мкМ в разы увеличивает эмбриогенез в генотипах с низкой и высокой эмбриогенной способностью (Mahasuk, 2017)

### **1.10.3 Витамины и антиоксиданты**

Для нормального развития эмбриоидов в состав среды должны входить не только микроэлементы, но и витамины. Наиболее значимы витамины группы В, поскольку они участвуют в процессах фотосинтеза, дыхания и деления клеток (Ozsan and Onus, 2017). Повышенное содержание в жидкой питательной среде культуры микроспор кальция ( $Ca^{2+}$ ) и витаминов приводит к повышению частоты регенерации капустных растений до 65% при средней 29% (Tian et al., 2004).

На первых этапах культивации в состав питательной среды возможно добавление антиоксидантов, которые предотвращают активацию гидролитических ферментов и гибель культивируемых пыльников и микроспор, позволяют поддерживать нормальное содержание активных форм кислорода в митохондриях. Добавление антиоксидантов в среду для индукции эмбриогенеза рапса и капусты белокочанной обеспечивает нормальное развитие микроспор и увеличивает частоту эмбриогенеза,

происходящего из микроспор (Hoseini et al., 2014; Zeng et al., 2015). По мнению Zeng et al. (2017), антиоксиданты в эмбриоиндукционной среде могут повышать жизнеспособность микроспор, предотвращая снижение рН среды, что подтверждает важность окислительно-восстановительной регуляции среды, особенно на ранних стадиях развития эмбрионов из микроспор.

В исследованиях, направленных на повышение эффективности культуры микроспор у разных видов, в большинстве случаев в качестве антиоксидантов используют аскорбиновую кислоту и глутатион (Asif et al., 2013; Ahmadi and Shariatpanahi, 2015). Применение аскорбиновой кислоты (20 и 50 мг/л) в сочетании с тепловым шоком (32°C) и пониженным содержанием (0,3 М) маннита позволило значительно увеличить число продуцируемых семядольных зародышей и их способность к регенерации у растений гибридов перца сладкого (Heidari-Zefreh, 2019). Кроме того, Zeng et al. (2017) сообщили, что добавление 10 мг/л аскорбата и 20 мг/л глутатиона в 1/2 среды NLN увеличивала частоту образования эмбрионов брокколи. Добавление 0,2  $\mu$ М-5  $\mu$ М натриевой соли L-аскорбиновой кислоты (VcNa) увеличивает частоту эмбриогенеза капусты китайской (Niu et al., 2019).

К числу антиоксидантов также относятся разные виды витаминов группы В: биотин – витамин В7, фолиевая кислота – витамин В9, кобаламин – витамин В12. При добавлении в среду разных видов витаминов группы В (0,05 мг/л) наиболее эффективными были биотин и фолиевая кислота (Ozsan and Onus, 2017).

#### **1.10.4 Сахара**

В состав среды для культивации микроспор входят сахара, являющиеся регулятором осмотического давления и источником углерода, и для капустных культур в питательную среду чаще всего добавляют сахарозу в концентрации 8-17% (Wei et al., 2008; Silva and Sato, 2012; Dong et al., 2021).

При изучении влияния типа углевода в среде на частоту эмбриогенеза капусты белокочанной Cristea et al. (2013) сравнивали дисахариды (сахароза и мальтоза) и моносахариды (фруктоза и глюкоза) в концентрации 60, 130 и 200 г/л. Эмбриогенная отзывчивость микроспор была в разы ниже при содержании в среде моносахаридов, чем при добавлении дисахаридов, при этом на среде с сахарозой количество эмбриоидов было существенно меньше, чем на среде с мальтозой (Cristea et al., 2013).

Эффективность применения мальтозы по сравнению с сахарозой отмечена и в культуре микроспор ряда других культур: злаковых (*Gramineae* Juss.) (Wedzony et al., 2009), картофеля (*Solanum tuberosum* L.) (Dunwell, 2010), перца (*Capsicum annuum* L.) (Supena et al., 2006).

### **1.10.5 Активированный уголь**

Исследования показали, что добавление в жидкую питательную среду активированного угля (АУ) позволяет адсорбировать полифенольные компоненты и эндогенный ауксин, выделяемые эксплантами (Dong et al., 2021), и повысить выход хорошо развитых эмбриоидов культур вида *B.oleracea*, в том числе капусты цветной (Bhatia et al., 2017), брокколи (Yuan et al., 2011) и других представителей семейства капустные, таких как *B. juncea* (Prem et al., 2008) и репа (Shumilina et al., 2020).

Как общий выход эмбриоидов, так и выход эмбриоидов нормального вида увеличивается с повышением концентрации активированного угля от 0 до 2% или сочетания активированного угля (1%) с экстрактом моркови (3%) (Supena et al., 2006). Добавление 0,02% активированного угля в индукционную среду увеличивало частоту эмбриогенеза у низко отзывчивых генотипов капусты белокочанной, кроме того, на средах, содержащих активированный уголь, сформировались более крупные эмбриоиды, чем на средах без активированного угля (Pilih et al., 2018). Кроме ингибирующих эмбриогенез веществ, активированный уголь также может связывать вещества, способствующие эмбриогенезу, такие как биотин, фолиевая

кислота или пиридоксин. Например, в культуре микроспор капусты китайской и репы добавление активированного угля снизило эффект применения цитокинина (Takahashi et al., 2012; Han et al., 2014). Добавление избыточного количества активированного угля (более 3%) в культуральную среду снизило эмбриогенез у брокколи (Na et al., 2011), горчицы и репы (Takahashi et al., 2012).

#### **1.10.6 Регуляторы роста**

Исследования показали, что добавление в среду NLN оптимальной концентрации регуляторов роста, таких как этилен, абсцизовая кислота, индолилуксусная кислота, может значительно увеличить частоту эмбриогенеза микроспор у многих видов растений рода *Brassica* (Thorpe et al., 2008; Dong et al., 2021). Эмбриогенез микроспор регулируется экзогенным применением растительного гормона ауксина (Dong et al., 2021). Низкие концентрации 6-бензиламинопурина (БАП) и  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК) также повышали частоту эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор (Шмыкова и др., 2015). Самая высокая частота эмбриогенеза генотипов рапса была получена на среде NLN-13 с содержанием 0,5 мг/л абсцизовой кислоты, 1,0 мг/л жасмоновой кислоты или 0,2 мг/л салициловой кислоты, при этом применение абсцизовой кислоты (0,2-5 мг/л) снижало частоту образования вторичных эмбриоидов (Ahmadi et al., 2014b).

В работе Минейкиной (2018) было показано наличие генотипической гормонозависимости неотзывчивых на безгормональных средах генотипов. Максимальный выход эмбриоидов у ранее неотзывчивых генотипов был отмечен у образца капусты белокочанной 173-1 на среде с использованием зеатина в концентрации 1 мг/л и составил  $466,7 \pm 153,2$  шт./100 бут. Повышенные концентрации гормонов в питательной среде приводят к изменению метаболических процессов, что вызывает гибель пыльников и микроспор, и кроме того, использование гормонов у высокоотзывчивых генотипов снижает их частоту эмбриогенеза.

В то же время в культуре микроспор растений рода *Brassica* возможно использование и безгормональных сред для культивации (Custers, 2003; Domblides et al., 2018; Jia et al., 2019).

### **1.10.7 Полиамины**

Полиамины являются азотистыми поликатионными соединениями с низкой молекулярной массой, присутствуют во всех живых организмах и включают в себя спермидин, спермин и их облигатный предшественник путресцин. Полиамины играют важную роль в широком спектре физиологических процессов растений, в том числе в реакциях на биотические и абиотические стрессы (Martin-Tanguy, 2001), участвуют в соматическом эмбриогенезе (Bertoldi et al., 2004; Wu et al., 2009; Thiruvengadam et al., 2013). Увеличение количества свободных полиаминов и их биосинтетических ферментов связано с быстрым делением клеток во многих растительных системах, например, в соматическом эмбриогенезе (Kaur-Sawhney et al., 2003).

Стимулирование соматического эмбриогенеза возможно путем экзогенного применения полиаминов или чрезмерной экспрессии генов, связанных с биосинтезом полиаминов (Wu et al., 2009). Полиамины повышают частоту эмбриогенеза за счет снижения скорости синтеза этилена и ингибирования раннего старения культивируемых пыльников у *Oryza sativa* (Dewi and Purwoko, 2008). Снижение концентрации этилена, вероятно, происходит из-за того, что этилен и путресцин имеют общий биосинтетический путь (Leroux et al., 2009). Согласно Kaur-Sawhney et al. (2003), высокие уровни свободных полиаминов вызывали множественное деление клеток, в то время как их низкие уровни вызывали увеличение клеток в размере. Полиамины стимулировали процесс соматического эмбриогенеза у рапса, перца китайского, овса, женьшеня, риса, огурца и картофеля (Ahmadi et al., 2014; Regla-Marquez et al., 2016; Ebrahimzadeh et al., 2018).

### 1.10.8 Антибиотики

Для защиты от контаминации при культивировании клеток и тканей широко используются антибиотики (Lantos et al., 2009). Однако не все антибиотики подходят для использования в изолированных культурах. Есть антибиотики (например, рифампицин), которые эффективны в предотвращении роста бактерий, но обычно оказывают фитотоксическое воздействие на растительные экспланты (Nauerby et al., 1997; Teixeira da Silva et al., 2003). И напротив, существуют антибиотики (например, тиментин), дающие незначительные отрицательные эффекты при наличии подавления контаминации (Nauerby et al., 1997).

Кроме исключения или сдерживания роста большинства бактериальных загрязнений, некоторые антибиотики могут оказывать индуцирующее влияние на эмбриогенез микроспор (Ahmadi et al., 2014). В работе Mineyukina et al. (2020) было показано увеличение частоты эмбриогенеза капусты белокочанной при культивации микроспор на среде NLN-13 с добавлением 100 мг/л ампициллина по сравнению со средой NLN-13 без антибиотиков или с добавлением цефотаксима. Применение цефотаксима увеличило частоты эмбриогенеза микроспор и регенерации растений у рапса (Ahmadi et al., 2014), *Zea mays* (Danilova and Dolgikh, 2004), *Pinus pinaster* (Tereso et al., 2006), *Saccharum officinarum* L. (Mittal et al., 2009), *Solanum chacoense* (Rakosy-Tican et al., 2011), *Centella asiatica* L. (Panathula et al., 2014), а также стимулировало эмбриогенез у *Triticum aestivum* L. и тритикале (Asif et al., 2013).

Цефотаксим и продукты его распада снижают биосинтез этилена, а также обладают ауксиноподобной активностью (Danilova and Dolgikh, 2004). В то же время, цефотаксим в высоких дозах и длительной экспозиции оказывал сильное ингибирующее действие на образование эмбриоидов рапса и *P. pinaster*, при котором 400-500 мг/л в течение 48 и 72 ч. полностью ингибировали эмбриогенез микроспор (Tereso et al., 2006; Ahmadi et al.,

2014). Supena et al. (2006) также отмечали положительный эффект комбинации антибиотиков (тиментина и рифампицина в концентрации 200 и 10 мг/л, соответственно) для получения удвоенных гаплоидов перца острого. На эмбриогенез микроспор также влияет применение ванкомицина, так самое большое число эмбриоидов на ч.Петри (181,6) у рапса было получено при добавлении 100 мг/л ванкомицина. Однако ванкомицин ингибировал образование проэмбриоидов в культуре микроспор *T. aestivum* и тритикале (Asif et al., 2013).

### 1.11 pH среды

Одним из условий эффективного применения культуры микроспор, является pH питательной среды. Оптимальный показатель уровня pH для культивирования *in vitro* большинства растительных тканей поддерживается на уровне 5,8-6,0 (Dong et al., 2021). Если pH среды отличается от 5,5-5,8 то это снижает выход эмбриоидов у брокколи в культуре микроспор (Arnison, 1990) и у перца в культуре пыльников (Supena et al., 2006; Ozkum and Tipirdamaz, 2011).

Однако в некоторых исследованиях было показано, что высокое значение pH питательной среды (6,0–6,4) более эффективно для индукции эмбриогенеза микроспор у большинства генотипов капусты белокочанной по сравнению с pH 5,8 (Yuan et al., 2012; Cristea et al., 2013). Культивируя микроспоры у *Nicotiana tabacum* L. и *Antirrhinum majus* L. в среде с pH 8-8,5 в течение 4-6 дней, Varinova et al. (2004) наблюдали блокировку гаметофитного развития и инициирование первых этапов эмбриогенеза. В работе Shumilina et al. (2020) для каждого отдельного генотипа репы (Ronde witte roodkop herfst, Snow ball, York Globe и Roots) было подобрано оптимальное значение pH среды, составившее 6,2-6,6.

## 1.12 Связь морфологической зрелости эмбрионов и их прорастания

Важным для успешного получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор является не только отзывчивость генотипа, заключающаяся в частоте формирования эмбрионов, но и морфологическая зрелость эмбрионов. От зрелости эмбрионов зависит частота формирования проростков и прямого прорастания эмбрионов. Частота удвоения андрогенных гаплоидов также напрямую связана с качеством эмбрионов (Dong et al., 2021)

У капустных культур могут наблюдаться морфологические отклонения эмбрионов, такие как: ранний некроз, многосемядность, сросшиеся семядоли, указывающие на отсутствие апикальной меристемы побега или ее дисфункцию, эмбрионы с утолщенными гипокотелями, удлиненные эмбрионы, эмбрионы деформированные (Dong et al., 2021), сросшиеся или аномальной формы («лимон, банан и колба») (Zhang et al., 2011), эмбрионы с двумя суспензорами (Supena et al., 2008), эмбрионы, сросшиеся вдоль оси гипокотеля или у основания гипокотеля (Cousin and Nelson, 2009), и эмбрионы с отсутствием гипокотилей (Winarto and Teixeira da Silva, 2011). Подобные изменения эмбрионов в культуре микроспор у большинства генотипов рода *Brassica* встречаются достаточно редко. Например, частота аномальных эмбрионов капусты белокочанной составила 30% от общего числа полученных в культуре микроспор эмбрионов (Winarto and Teixeira da Silva, 2011). У таких эмбрионов чаще всего растут только корни, тогда как побеговый полюс развивается нестабильно, и эмбрион не способен произвести нормально развитый сеянец (Smykalova et al., 2006). Появление аномальных эмбрионов возникает из-за культивирования микроспор, выделенных из бутонов, отобранных с оцветающих растений (Abraha et al., 2008), или высокой доли микроспор, находящихся не в оптимальной для индукции эмбриогенеза стадии развития (Winarto and Teixeira da Silva, 2011).

Еще одним отклонением от нормального развития эмбриоидов может стать альбинизм, проявляющийся при дефиците хлорофилла в тканях проростка (Yan et al., 2020). Этиолированные проростки не способны позеленеть при нормальных условиях освещения и чаще всего останавливают свое развитие (Yang et al., 2005). Молекулярные механизмы формирования альбинизма сложны и связаны с множеством биохимических процессов, таких как биосинтез хлорофилла (Ma et al., 2018), биосинтез каротиноидов (Yuan et al., 2015) и метаболизм гемопротеинов (Zhang et al., 2020). Как правило, фенотипы альбиносов рассматриваются как аномальные и нежелательные (Ma et al., 2018), в то же время их можно использовать для отбора гибридных линий при соматической гибридизации. Например, отбор цибридов при переносе цитоплазмы *Lesquerella fendleri* в *Orychophragmus violaceus*, *B. napus* и *B. juncea* был основан на подавлении дефицита хлорофилла у растения-акцептора. Альбинизм может быть желательным признаком для окраски листьев некоторых видов капусты листовой (Yan et al., 2020).

Большинство культур *Brassica* при оптимальных условиях через 20-30 дней культивирования формируют хорошо развитые эмбриониды семядольной стадии готовые к пересадке на регенерационную среду. При высадке эмбриоидов на регенерационную среду у них удлиняется гипокотиль, семядоли становятся зелеными, развивается первичный корень, но прямое прорастание и формирование побега происходит редко. Внешне нормально выглядящие эмбриониды в большинстве случаев набухают и разрастаются. В дальнейшем набухшие семядоли и гипокотиль эмбриоида могут витрифицироваться или дифференцироваться во вторичные эмбриониды, адвентивные побеги (Fertie and Caswell, 2011; Pilih et al., 2018). Прямое прорастание эмбриоидов обеспечивает быстрое получение ценных для селекции новых сочетаний аллелей исходного генотипа, в то время как разрастание эмбриоидов приводит к увеличению времени и, как следствие,

стоимости и трудоемкости процесса культивации, смещению сроков яровизации и цветения капустных растений (Tian et al., 2004; Klutschewski, 2012).

### **1.13 Состав среды для прорастания эмбриоидов**

В качестве сред для регенерации эмбриоидов растений рода *Brassica* наиболее часто используются среды B5 (Gamborg et al., 1968); MS (Murashige, Skoog, 1962); MSm (Masuda, 1981) с полной или половинной концентрацией нутриентов в среде (Supena et al., 2006). Источником углерода обычно является 2-2,5% сахарозы (Kim et al., 2008). Также может быть использована и мальтоза в той же концентрации (Park et al., 2013).

Консистенция питательной среды, тип гелеобразователя или агара может влиять на рост ткани в культуре (Debergh, 2006; Vasilchenko et al., 2017). Традиционно для гелирования питательных сред в культуре растительных тканей используется природный полисахарид агар, способный образовывать стабильные, плотные, прозрачные и устойчивые к продуктам метаболизма растений гели. Культивирование морфологически зрелых эмбриоидов на среде с повышенным содержанием агара (1,5%) позволяет увеличить частоту регенерации (Wang et al., 2011). Возможен также положительный эффект культивирования эмбриоидов на фильтровальной бумаге, помещенной поверх агаризованной среды (Takahashi et al., 2012).

В то же время агар, как правило, является самым дорогостоящим компонентом питательных сред (Coelho et al., 2021). В качестве альтернативы агару (6-11 г/л) можно использовать, фитогель, агаргель (смесь агара и фитогеля), агарозу, крахмал, гуаровую камедь, ксантановую камедь (Dobranszki et al., 2011). Фитогель, или геллановая камедь, является экзополисахаридом, состоящим из глюкуроновой кислоты, рамнозы и глюкозы, который производится путем микробиологической ферментации и широко используется в культуре растительных тканей в качестве заменителя агара благодаря низкой стоимости, высокой плотности при низких

концентрациях (1,5-2,5 г /л), прозрачности и бесцветности геля (Banik et al., 2000; Thorpe et al., 2008). Агаргель сочетает положительные качества фитогеля и агара, способен образовывать плотный полупрозрачный гель в концентрации 3,5-5,0 г/л и предотвращает витрификацию растительных тканей (Hall, 2000). Как правило, для культивирования эмбриоидов капустных культур, в том числе разновидностей *B. oleracea* большинство исследователей используют среды с добавлением агара (Custers et al., 2003; Yuan et al., 2015; Cilingir et al., 2017; Bhatia et al., 2018). Работы с использованием других гелеобразователей немногочисленны, например, Шумилина и др. (2015) в культуре микроспор капусты китайской проводили культивацию эмбриоидов на питательной среде Мурасиге-Скуга с добавлением 3 г/л фитогеля в сочетании с 0,1 мг/л бензиламинопурина. Фитогель также применялся для культивации эмбриоидов капусты белокочанной (Минейкина и др., 2016), капусты брокколи (Domblides et al., 2018), репы (Shumilina et al., 2020). Zeng et al. (2015) для регенерации эмбриоидов капусты брюссельской использовали 10 г/л агарозы. При оценке регенерации/прорастания эмбриоидов капусты белокочанной на средах с разными гелеобразователями: агар (11 г/л), агаргель (4,5 г/л) и фитогель (2 г/л) было установлено, что частота образования проростков из эмбриоидов была существенно выше (в 2,5-3,5 раза) на питательной среде с агаром (Синицына и др., 2021).

### **1.13.1 Регуляторы роста**

Чаще всего, морфологически зрелые эмбриоиды капустных культур переносят на твердую безгормональную среду В5. На среде В5, не содержащей гормонов, наблюдалась высокая частота прорастания и регенерации эмбриоидов брокколи, капусты пекинской (Ahmadi et al., 2012). Для регенерации эмбриоидов возможно также использовать безгормональную среду MS (Custers et al., 2003) или 1/2 среды MS (Шумилина и др., 2015).

Однако в случае отсутствия успешного прямого развития из эмбриоидов растений-регенерантов на безгормональных средах, возможно добавление фитогормонов (Dong et al., 2021). Разросшиеся эмбриоиды капусты китайской и брокколи рекомендуется переносить на среду MSm, содержащую 0,1 мг/л БАП или 0,1 мг/л ГК. Образовавшиеся через 2-4 недели, вторичные эмбриоиды для дальнейшей регенерации пересаживают на стандартную MS без гормонов (Шумилина и др., 2015; Domblides et al., 2018).

С помощью добавления 2,4-D (0,2 мг/л) удалось добиться прорастания глобулярных соматических зародышей рапса. Спустя две недели их переносили на среду, содержащую 5 мг/л benzyladenine (BA). В результате примерно 82% проростков регенерировали в нормально развитые растения и в течение шести недель были готовы к адаптации (Maheshwari et al., 2011). BA (0,1 мкМ) возможно использовать и для стимулирования прямого пути регенерации у нормально развитых эмбриоидов в культурах микроспор рапса, капусты белокочанной (Esin et al., 2016).

### **1.13.2 Применение веществ-ингибиторов**

Применение buthionine sulfoximine (BSO), ингибитора GSH (восстановленного глутатиона), который сдвигает баланс клеточного глутатиона в сторону окисленной формы GSSG, положительно влияет на качество эмбриоидов, регулирует деятельность апикальной меристемы побега, тем самым способствуя увеличению прямого пути прорастания. Частоту прорастания/регенерации эмбриоидов, полученных из микроспор *Brassica napus*, культивируемых без добавления (контроль) или с добавлением BSO, анализировали с использованием микроаррей чипа. Было доказано, что окислительно-восстановительное состояние окисленного глутатиона, вызванное BSO, позволяет культивируемым эмбриоидам достигать как морфологической, так и физиологической зрелости, что, в

свою очередь, гарантирует успешное прорастание и регенерацию (Stasolla et al., 2008).

Такое вещество как этилен, продуцируемый в избытке самими микроспорами, оказывает негативное влияние на ранние стадии их эмбриогенного развития (Legoux et al., 2009). Возможным фактором, влияющим на регенерацию растений, является использование в качестве ингибитора этилена нитрата серебра (Dong et al., 2021), который наиболее часто применяют в культуре тканей *Brassica*. Для *B. napus* было показано, что добавление нитрата серебра в состав питательной среды приводит к значительному увеличению частоты регенерации (Phogat et al., 2000).

### **1.13.3 Влияние хитозана и пролина**

Пролин является протеиногенной аминокислотой, необходимой для устойчивости к стрессу, первичного метаболизма и роста клеток, а также оказывает стимулирующее влияние на индукцию соматического эмбриогенеза и регенерацию растений *in vitro* (Hayat et al., 2012).

Было показано, что пролин действует как положительный регулятор запрограммированной гибели клеток, его участие в индукции гибели клеток было отмечено у разных видов (Cecchini et al., 2011). Запрограммированная гибель клеток участвует в устранении ненужных структур внутри клеток и эмбриоидов, а также необходима для правильного формирования паттерна эмбриоидов (Choi, 2013).

Сравнивая эффекты трех разных аминокислот, т.е. пролина, серина и глутамина, на соматический эмбриогенез у *Paspalum scorbiculatum* L., Ceasar and Ignacimuthu (2010) отметили, что среда MS, содержащая 25 мг/л пролина, превосходила среду, содержащую серин, глутамин и контрольную среду без добавления аминокислот по частоте формирования и прорастания соматических зародышей.

Увеличение эмбриогенеза на 30-55% в культуре микроспор наблюдалось у генотипов рапса, подвергшихся воздействию 100 мг/л

пролина в течение 2 и 5 дней. Повышение концентрации и времени обработки пролином увеличивало интенсивность каллусогенеза, тогда как указанная концентрация и срок обработки позволяли получать семядольные эмбриониды с преимущественно прямым путем прорастания (Ahmadi and Shariatpanahi, 2015). Однако обработка пролином не оказала положительного эффекта на индукцию эмбриогенеза и регенерацию проростков из культивируемых пыльников *Capsicum annuum* L. (Ozkum and Tipirdamaz, 2011).

Хитозан – полимерное производное хитина, обычно получаемое из него методом щелочного дезацетилирования. В естественном виде присутствует в клеточных стенках некоторых грибов, панцире ракообразных. Выступает в качестве активатора деления растительных клеток и стимулятора роста, участвует в механизме запрограммированной гибели клеток (Ahmadi and Shariatpanahi, 2015).

Усиливающее действие хитозана на побегообразование *in vitro* и регенерацию проростков наблюдалось у многих видов овощных культур (Dastjerd et al., 2013). Значительные улучшения в росте также были отмечены у *Vitis vinifera* L. (Ait et al., 2004), ростков сои (Lee et al., 2005), *Ocimum basilicum* L. (Kim et al., 2005), а также декоративных культур, таких как, например, орхидеи *Dendrobium* (Nge et al., 2006). В ответ на обработку хитозаном (10 мг/л) в течение 2 дней наблюдалось увеличение частоты эмбриогенеза микроспор у рапса примерно в 1,8 раза по сравнению с контролем. Хитозан также влиял на тип регенерации эмбрионидов в зависимости от вносимой дозы. В культурах, обработанных высокой дозой хитозана (100 мг/л) в течение 1 дня, наблюдался высокий уровень каллусообразования (Ahmadi and Shariatpanahi, 2015).

## **1.14 Влияние фотопериода и пониженных температур на образование проростков из эмбриоидов**

Условия культивации, такие как температура и фотопериод, способны повлиять на развитие эмбриоидов в проростки и последующее формирование растений-регенерантов. Ряд исследований, посвященных стимуляции прямого пути прорастания эмбриоидов, свидетельствуют о положительном влиянии культивирования эмбриоидов рапса в течение 3-14 дней при температуре 1-10°C (Zhou et al., 2002, Gu et al., 2004; Zhang et al., 2006). Двухнедельная обработка холодом при температуре 4°C значительно увеличила частоту прямого пути развития эмбриоидов рапса с 14% (стандартные условия) до 28% (Klutschewski, 2012). Cegielska-Taras et al. (2002) сообщают, что при обработке пониженными температурами в течение 14 дней в сочетании с коротким фотопериодом (8 часов света в сутки) наблюдаемая частота прямого прорастания эмбриоидов рапса при 1°C составляла более 70% и была на 50% выше, чем при 4°C. Стимуляция прямого прорастания эмбриоидов посредством холодной обработки может быть связана с тем, что низкие температуры вызывают обезвоживание клеток, необходимое для органогенеза эмбриоидов (Chinnusamy et al., 2007; Fei et al., 2007).

В работе Rijven (1952) сообщается, что высокая интенсивность света в первые несколько дней культивации эмбриоидов может подавлять их прорастание. Содержание эмбриоидов в полной темноте дает лучшие результаты, чем чередование свет/темнота. Для увеличения скорости роста и длины проростков отсутствие света было, в целом, лучше, чем при различных фотопериодических режимах (Uma et al., 2011). Klutschewski (2012) при изучении влияния фотопериода на прорастание эмбриоидов у 13 генотипов рапса отметил, что при культивировании в полной темноте частота прорастания/регенерации эмбриоидов, включая прямое прорастание, увеличивалась, что свидетельствует о незначительной роли фотопериода на

начальных этапах формирования растений-регенерантов из эмбриоидов. Относительно низкие уровни IAA и зеатина (0,01 мг/л) в комбинации с 5-дневной инкубацией в темноте улучшали показатели эффективности прорастания эмбриоидов перца, особенно у самых ранних (глобулярных) соматических зародышей, частота прорастания которых увеличилась с 3% до 20%. (Manzur et al., 2014).

### **1.15 Удвоение гаплоидов**

Удвоение хромосом растений, полученных путем андрогенеза, является важным фактором практического применения культуры пыльников и микроспор, поскольку программы селекции требуют наличия большого количества генетически стабильных удвоенных гаплоидов с высоким уровнем фертильности. У гаплоидов, полученных из микроспор, спонтанное удвоение хромосом может произойти на самых ранних стадиях эмбриогенеза. Также этот процесс можно индуцировать на более поздних стадиях развития (Dong et al., 2021). Проростки, формирующиеся из эмбриоидов, могут быть гаплоидными, диплоидными, полиплоидными и миксоплоидными (Seguí-Simarro, 2008; Dong et al., 2021).

В настоящее время механизм, лежащий в основе спонтанного удвоения хромосом, невозможно определить однозначно. Спонтанное удвоение генетического материала может происходить в результате эндоредупликации, слияния ядер (Seguí-Simarro, 2008). Продолжительность культуры тканей от года и более также может изменить хромосомную ploидность регенерантов, полученных из микроспор, и большинство гаплоидов превращаются в удвоенные гаплоидные или миксоплоидные растения (Lu et al., 2016). Спонтанная диплоидизация является большим преимуществом, так как исключает необходимость в дополнительных обработках с целью удвоения хромосомного набора.

Наибольшая частота спонтанного удвоения наблюдается у растений *B. rapa*, таких как репа (77-100%) (Takahashi et al., 2012), горчица полевая (20-

66%) (Takahashi et al., 2012), капуста пекинская (60%) (Zhang et al., 2012; Lee et al., 2014), и разновидностей *B. oleracea*, например, брокколи (55-100%) (Yuan et al., 2015), кольраби (7-91%) (Dias et al., 2003). В работе Yuan et al. (2015) частота спонтанного удвоения в 14 популяциях капусты белокочанной колебалась от 0 до 76,9%. У *B.napus* и *B. juncea* вероятность спонтанного удвоения находится на уровне 10-20% (Smykalova et al., 2006, Weber et al., 2005). Однако значение частоты удвоения специфично в пределах не только рода, вида, но и для каждого отдельного генотипа, и в целом ниже у гибридов, по сравнению с родительскими генотипами (Weber et al., 2005). В популяциях растений, полученных из микропор, обычно преобладают гаплоиды и диплоиды, частота проявления полиплоидов и миксоплоидов значительно ниже (Yuan et al., 2015).

Колхицин является наиболее часто используемым химическим веществом для удвоения хромосом у многих культур (Dong et al., 2021). Niel and Scherrmann (2006) обнаружили, что колхицин образует тубулин-колхицин-комплекс, прикрепляясь к концам микротрубочек, и физически ингибирует полимеризацию микротрубочек. Добавление колхицина в эмбриоиндукционную среду влияет на скорость диплоидизации и выживаемость проростков в культуре изолированных микроспор (Klíma et al., 2008). Например, Möllers et al. (1994) сообщили, что применение колхицина в низкой концентрации (10 мг/л) в течение 72 ч. было эффективным для получения удвоенных гаплоидов рапса, а частота диплоидизации генотипов составила 77,3-81,5%, однако применение высокой концентрации (100 мг-л<sup>-1</sup>) колхицина в течение 6 ч. или 24 ч. снижало уровень диплоидизации (55,7-76,2%).

Некоторые гербициды, такие как трифлуралин, оризалин, амипрофосметил, деполимеризуют микротрубочки и также могут быть использованы для удвоения хромосом в культуре изолированных микроспор видов *Brassica* (Dong, et al., 2021). Частота удвоенных гаплоидных растений

рапса при обработке трифлуралином, колхицином и оризалином составила 85,7%, 74,1% и 66,5% соответственно, при этом они не оказывали заметного влияния на частоту эмбриогенеза у видов *Brassica* (Klíma et al., 2008).

Раствор антимиотического агента также можно наносить на верхушечную меристему или пазушные почки растений-регенерантов непосредственно перед пересадкой в грунт (Smýkalová et al., 2006; Abraha et al., 2008; Klíma et al., 2008). Частота удвоения гаплоидных растений некоторых генотипов после обработки колхицином растений-регенерантов рапса составила 7,1-100% (Smýkalová et al. 2006; Klíma et al., 2008), а при обработке оризалином – 43,8-86,0% (Klíma et al., 2008).

Индукция удвоения хромосом на ранних стадиях культуры микроспор имеет ряд преимуществ перед обработкой готовых к пересадке в грунт растений-регенерантов: частота удвоения хромосом при обработке *in vitro* выше; диплоидизация *in vitro* позволяет избежать появления химерных растений; растения, обработанные *in vitro*, начинают цвести раньше; обработка *in vitro* требует меньшее количество антимиотического агента, что снижает токсичность и затраты (Klíma et al., 2008; Dong, et al., 2021).

## **2 Материалы и методы**

Работа выполнена в 2019-2021 годах в лаборатории генетики, селекции и биотехнологии овощных культур ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

### **2.1. Растительный материал**

В качестве растительного материала (растений-доноров микроспор) были использованы 82 образца растений рода *Brassica*, включая *B. napus* L., представленные 5 F1-гибридами, и разновидности *B. oleracea* L.: 3 инбредные линии, 8 линий УГ, 8 F1-гибридов и 37 линий высокой степени гетерозиготности капусты белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata* L.); 4 линии высокой степени гетерозиготности капусты кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes* L.); 5 F1-гибридов и 7 линий высокой степени гетерозиготности капусты брокколи (*B. oleracea* var. *italica* Plenck); 3 F1-гибрида и 2 линии высокой степени гетерозиготности капусты листовой (*B. oleracea* var. *acephala* DC.). Растения-доноры микроспор предоставлены ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева» (табл. 1-3).

### **2.2 Условия выращивания и подготовки растений-доноров**

Растения-доноры разновидности *Brassica oleracea* L., такие как капуста белокочанная (*B. oleracea* var. *capitata* L.), капуста кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes* L.) и капуста листовая (*B. oleracea* var. *acephala* DC.) выращивали в условиях защищенного и открытого грунта, растения рапса (*B. napus* L.) и брокколи (*B. oleracea* var. *italica* Plenck) только в условиях защищенного грунта. Посев семян капусты белокочанной, листовой, кольраби на рассаду производили в два срока: весной (март-апрель) и в середине лета (начало июля), а у капусты брокколи и рапса в конце лета (август) в 64-х ячеистые кассеты со стороной ячейки 5 см. Посев проводили вручную в обильно увлажненный субстрат на основе сфагнового торфа с добавлением извести и удобрений 100-120 мг/л N, 120-220 мг/л P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 140-240 мг/л K<sub>2</sub>O, pH 5,5-6,5.

Посев проводили вручную на глубину 1 см. Полив проводили по мере необходимости.

В стадии 3-5 настоящих листьев рассаду капусты белокочанной, листовой и кольраби пересаживали в открытый грунт. Перед высадкой рассады проводили полив по бороздам. Растения выращивали по схеме 30×70 см. В середине вегетации проводили однократную корневую подкормку аммиачной селитрой из расчета 15 кг/га по д.в. Для борьбы с сорняками через один-три дня после высадки рассады междурядья обрабатывали гербицидом Бутизан с нормой расхода и концентрацией раствора, рекомендованной производителем, впоследствии дополнительно проводили однократную ручную прополку многолетних и крестоцветных сорняков.

Рассаду весеннего срока посева выращивали до получения кочана/стеблеплода. Из рассады летнего срока посева получали розетку листьев. Осенью здоровые, хорошо сформированные растения пересаживали в зимнюю теплицу для яровизации при температуре 6-10°C. После прохождения яровизации температуру воздуха повышали до 15-20°C, чем стимулировали растения к цветению. Во время выращивания растений в теплице не проводили обработок ядохимикатами, т.к. это снижает жизнеспособность микроспор. После распускания первых цветков с растений отбирали бутоны в течение двух недель.

### **2.3 Определение стадии развития микроспор**

Для изучения стадии развития микроспор использовали флуоресцентную микроскопию при окрашивании клеток красителем DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорид) (Custers, 2003; Монахос, 2014). Микроспоры оценивали в клетках пыльников, выделенных из бутонов размером: 2,5-4,0 мм для капусты листовой; 3,5-3,8 для капусты кольраби; 3,5-4,0 мм для капусты брокколи; 3,5-4,5 мм для раннеспелой капусты белокочанной; 5,0-6,5 мм для позднеспелой капусты белокочанной; 3,0-3,5

для рапса. Размер бутонов определяли с помощью электронного штангенциркуля.

В пробирку типа Eppendorf объемом 1,5 мл помещали 1 бутон и измельчали в 100 мкл дистиллированной воды, затем доводили объем суспензии до 1000 мкл. Полученную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром ячеек 45 мкм в чистую пробирку того же объема. Микроспоры осаждали центрифугированием в течение 4 мин. при 4000 об./мин., удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали в 10 мкл раствора DAPI. Раствор DAPI готовили следующим образом: порошок DAPI растворяли в воде в концентрации 1,5 мг/мл, затем разбавляли экстракционным буфером до 2,5 мкг/мл, добавляли тритон X100 в концентрации 1%. Смесь DAPI разбавляли 1:1 глицерином и хранили в морозильной камере. Микроспоры (10 мкл), ресуспендированные в растворе DAPI, помещали на предметное стекло и накрывали покровным. Через 5-10 мин. препараты обследовали под микроскопом Carl Zeiss Axio Lab.A1, оборудованным для флуоресцентной микроскопии.

Стадии развития микроспор и пыльцевых зерен определяли, как: ранняя одноядерная (РО), средняя одноядерная (СО), поздняя одноядерная (ПО), двуядерная пыльца (ДП), трехъядерная пыльца (ТП), в соответствии со стадиями развития, описанными Custers (2003), Монахос (2014).

#### **2.4 Выделение и культивирование микроспор и эмбрионидов**

Изоляцию микроспор проводили по Custers et al. (2003). Бутоны стерилизовали в 2% гипохлорите натрия с добавлением 1-2 капель Твин-20 в течение 10 минут и промывали 3 раза в стерильной воде. Размер бутонов варьировал от 4,0 до 6,5 мм в зависимости от генотипа. Бутоны измельчали в стерильных 60 мл стаканах с помощью плунжеров в 2 мл среды В5 (Gamborg et al., 1968), содержащей 13% сахарозы и 5% маннитола. Для отделения микроспор от соматических тканей бутонов и пыльников суспензию фильтровали в 15 мл пробирку через стерильный фильтр с размером ячеек 41

м и доводили объем среды до 10 мл. Фильтрат центрифугировали в охлажденной до 4°C центрифуге Eppendorf Centrifuge 5702R 3 раза в течение 4 минут при 800 об./мин., каждый раз сливая надосадочную жидкость и заменяя ее свежей средой.

После третьего цикла центрифугирования микроспоры ресуспендировали в 2 мл охлажденной среды NLN-13 (Lichter, 1982). Плотность микроспор определяли в камере Фукса-Розенталя и средой для культивирования доводили до  $4 \times 10^4$  микроспор/мл. Суспензию микроспор разливали в чашки Петри диаметром 60 мм по 3 мл и по 10 мл в чашки Петри диаметром 90 мм. В чашку диаметром 60 мм Петри добавляли 100 мкл 1% суспензии активированного угля, в чашку диаметром 90 мм – 200 мкл. Чашки Петри с суспензией микроспор инкубировали в термостате Binder в темноте в течение 48 ч. при  $32,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , затем – в темноте в климатической комнате при  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  до появления эмбриоидов. После появления визуально обнаруживаемых эмбриоидов, чашки Петри переносили на шейкер инкубатор Excella E-24 и инкубировали на свету при  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  и 50 об./мин. Эмбриоиды доращивали на шейкере до семядольной стадии, после чего пересаживали на твердую среду для регенерации. Оценку числа сформировавшихся эмбриоидов проводили на 30-40 день после выделения микроспор.

#### **2.4.1 Изучение влияния антиоксидантов на жизнеспособность микроспор и частоту микроспорогенного эмбриогенеза**

Изучение влияния антиоксидантов аскорбата натрия и глутатиона на частоту эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор проведено с использованием 4 образцов капусты белокочанной ФРГ 47-3, Сюг 3-2, Сюг 2-3, Плг1-3, краткая характеристика которых представлена в таблице 2. Подготовка донорных растений, изоляция и культивирование микроспор выполнены, как описано выше (пункты 2.2; 2.4). Культивирование микроспор проводили с добавлением в NLN-13 аскорбата в концентрации 10 или 20

мг/л, глутатиона в концентрации 10 или 20 мг/л, а также совместное добавление 10 мг/л аскорбата и 10 мг/л глутатиона. В качестве контроля использовали NLN-13 с рН среды 5,8 (Custers, 2003). Во всех вариантах опыта рН среды довели до 5,8. Опыт заложен в 3-кратной повторности в чашках Петри диаметром 60 мм по 3 мл суспензии в каждой чашке.

#### **2.4.2 Изучение влияния на частоту эмбриогенеза теплового шока микроспор при добавлении в среду цефотаксима**

Изучение влияния совместного действия цефотаксима и теплового шока  $32,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$  на частоту эмбриогенеза проводили на 2 образцах рапса Джаз и Фактор и 1 образце капусты белокочанной Б25Ки и 1 образце капусты листовой Раф 1-3, краткая характеристика образцов представлена в таблицах 1, 2 и 5. Подготовка донорных растений и изоляция микроспор выполнены, как описано в пунктах 2.2; 2.4. Культивирование микроспор проводили в питательной среде NLN-13 с добавлением 50; 70 или 100 мг/л цефотаксима в течение 24; 48; 72 ч. в центрифужных пробирках, доводя объем среды до 10 мл с последующей заменой питательной среды на NLN-13 с рН 5,8 и культивированием в чашках Петри диаметром 60 мм. В качестве контроля использовали среду NLN-13 с рН среды 5,8 (Custers, 2003) и тепловой шок в течение 24; 48; 72 ч. при температуре  $32,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Во всех вариантах опыта рН среды также равна 5,8. Опыт заложен в 3-кратной повторности в чашках Петри диаметром 60 мм по 3 мл суспензии в каждой.

#### **2.4.3 Изучение влияния совместного эффекта полиамина путресцина и теплового шока на частоту эмбриогенеза**

Изучение влияния совместного эффекта путресцина и теплового шока  $32,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$  на частоту эмбриогенеза проводили на 1 образце капусты белокочанной Б25Ки и 1 образце рапса Джаз, краткая характеристика генотипов представлена в таблицах 1, 2. Подготовка донорных растений и изоляция микроспор выполнены по методике, описанной выше (пункты 2.2;

2.4). Культивирование микроспор проводили на питательной среде NLN-13 с добавлением 0,2 и 0,5 мг/л пуресцина в течение 24 и 48 ч. в центрифужных пробирках, доводя объем среды до 10 мл с последующей заменой питательной среды на NLN-13 с рН 5,8 и культивированием в чашках Петри диаметром 60 мм. В качестве контроля использовали среду NLN-13 с рН среды 5,8 (Custers, 2003) и тепловой шок в течение 24; 48; 72 ч. при температуре  $32,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Во всех вариантах опыта рН среды также равна 5,8. Опыт заложен в 3-кратной повторности в чашках Петри диаметром 60 мм по 3 мл суспензии в каждой чашке.

#### **2.4.4 Изучение влияния дисахаридов (мальтоза и сахароза), маннитола и теплового шока на частоту эмбриогенеза**

Изучение влияния совместного действия на эмбриогенез сочетания культивации микроспор на растворах, содержащих 130 г/л сахарозы, 130 г/л мальтозы или 50 г/л маннитола и теплового шока  $32,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. было проведено на образце рапса Джаз, 2 образцах капусты листовой Нагроз, Кр3-10 и 2 образцах капусты белокочанной Б25КИ1-3 и Каптур, краткая характеристика которых представлена в таблицах 1, 2 и 5. Подготовка донорных растений и изоляция микроспор выполнены по методике, описанной выше (пункты 2.2; 2.4). Культивирование микроспор проводили на растворах, содержащих 130 г/л сахарозы, 130 г/л мальтозы или 50 г/л маннитола при температуре  $32,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. в центрифужных пробирках, доводя объем растворов до 10 мл с последующей заменой указанных растворов на NLN-13 с рН 5,8 и культивированием в чашках Петри диаметром 60 мм. В качестве контроля использовали среду NLN-13 с рН среды 5,8 (Custers, 2003) и тепловой шок в течение 24 ч. при температуре  $32,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Во всех вариантах опыта рН растворов сахарозы, мальтозы и маннитола также равна 5,8. Опыт заложен в 3-кратной повторности в чашках Петри диаметром 60 мм по 3 мл суспензии в каждой чашке.

#### **2.4.5 Изучение эмбриогенного ответа *B. oleracea* на изоляцию, очистку и тепловой шок микроспор в растворе сахарозы 130 г/л**

Изучение влияния на эмбриогенез изоляции и инкубирования микроспор в растворе, содержащим 130 г/л сахарозы и теплового шока  $32,5\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  в течение 48 ч. было проведено на 7 образцах капусты белокочанной МФ4хМЦ)М1х(МФ4х15)1-2, Ларсия, Каптур, 101ф3х15дг1, Гэс2рхк)4-4, Гэс2рх(гес2рх15цса)4)31, Гэс2р-15-5)4-3 краткая характеристика образцов представлена в таблице 2. Подготовка донорных растений и отбор бутонов для изоляции выполнены по методике, описанной выше (пункты 2.2; 2.4). Изоляцию и очистку микроспор осуществляли по методике, описанной в пункте 2.4, но с заменой среды В5 на раствор 130 г/л сахарозы. После последнего цикла центрифугирования микроспоры ресуспендировали в пробирках объемом 15 мл в 10 мл растворе сахарозы, если очистка происходила на раствор сахарозы. Инкубирование микроспор проводили в растворе, содержащим 130 г/л сахарозы при температуре  $32,5\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  в течение 48 ч. в центрифужных пробирках, доводя объем раствора сахарозы до 10 мл с последующей заменой на NLN-13 с рН 5,8 и культивированием в чашках Петри диаметром 60 мм. В качестве контроля использовали среду NLN-13 с рН среды 5,8 (Custers, 2003) и тепловой шок в течение 48 ч. при температуре  $32,5\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . Во всех вариантах опыта рН раствора сахарозы также равна 5,8. Опыт заложен в 3-кратной повторности в чашках Петри диаметром 60 мм по 3 мл суспензии в каждой чашке.

#### **2.5 Регенерация/проращивание эмбрионов**

Эмбриониды в семядольной стадии развития пересаживали в полипропиленовые автоклавируемые контейнеры, заполненные на 0,5-0,6 см агаризованной (1,1%) средой В5 (Gamborg et al., 1968), содержащей 2,5% сахарозы, рН среды перед стерилизацией автоклавированием доводили до

5,8. Плотность размещения эмбриоидов составляла 9 шт. на 1 контейнер (8×6×4,5 см).

Эмбриоиды культивировали в климатической комнате при 24°C, и фотопериоде 16 часов день, 8 часов ночь. Раз в 30 дней при отсутствии прямого прорастания эмбриоидов производили пересадку эмбриоидов на свежую питательную среду того же состава, а при прямом прорастании эмбриоида, саженцы высаживали в кассеты с торфяным субстратом для укоренения и адаптации.

### **2.6 Укоренение и адаптация проростков в субстрате**

Полностью сформировавшиеся проростки с развитой листовой, стеблевой и корневой системой пересаживали в кассеты, заполненные субстратом на основе сфагнового торфа с добавлением извести рН 5,5-6,5 и удобрений 100-120 мг/л N, 120-220 мг/л P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 140-240 мг/л K<sub>2</sub>O.

Для поддержания высокой влажности в первые 3 дня после пересадки в субстрат саженцы накрывали пластиковыми контейнерами, приоткрывая со 2-го дня на 2-3 часа для закалки. Адаптацию проводили в климатической комнате с температурой воздуха 24°C и фотопериодом 16 часов – день, 8 часов – ночь (Монахос, 2014).

### **2.7 Изучение влияния условий культивирования эмбриоидов при пониженной температуре в темноте**

Изучение влияния предварительной холодной обработки (5°C) и культивации в темноте на стимуляцию прямого пути прорастания эмбриоидов проводили с использованием 1 образца капусты кольраби (Кор17хКор2фКи)2-1, краткая характеристика генотипа представлена в таблице 3. В рамках эксперимента проводили холодовую обработку эмбриоидов сразу после пересадки на твердую питательную среду при 5°C и отсутствии света в холодильной камере в течение 3; 6; 9; 12 и 15 дней;

культивирование эмбриоидов сразу после пересадки на твердую питательную среду при 24°C и темноте в течение 3 и 6 дней.

Контроль сразу после пересадки эмбриоидов на твердую питательную среду переносили в климатическую комнату культивировали при 24°C и фотопериоде 16 часов день, 8 часов ночь.

## **2.8 Определение ploидности растений-регенерантов**

Pлоидность растений определяли подсчетом числа хромосом в корневых меристемах. Препараты готовили методом «Steam Drop» (Kirov et al., 2015).

Для мацерации использовали раствор смеси ферментов пектиназы и целлюлазы в цитратном буфере. Цитратный буфер готовили из лимонной кислоты (21,01 г/л), цитрата натрия (29,41 г/л) и дистиллированной воды. Количество ферментов определяли их активностью, необходимое количество пектиназы составляет 13,5 ед./мл, целлюлазы – 80 ед./мл. После приготовления раствор разливали по пробиркам 1 мл и хранили в морозильной камере при минус 20°C, размораживая непосредственно перед использованием.

Корневые меристемы исследуемого растения помещали в фиксатор 3:1 (3 части 96% этанола и 1 часть ледяной уксусной кислоты) и выдерживали сутки в холодильнике. Затем корни промывали в проточной воде в течение 15 мин., отрезали меристемы, помещали их в раствор смеси ферментов пектиназы и целлюлазы в цитратном буфере и инкубировали на водяной бане при температуре 37°C в течение 1 ч. 20 мин.

Меристему измельчали в пробирке с помощью препаровальной иглы, затем добавляли 600 мкл дистиллированной воды, перемешивали и центрифугировали при 10000 об./мин. 45 сек., удаляли надосадочную жидкость. После добавляли 600 мкл 96% этанола, перемешивали и центрифугировали 30 сек. при 11000 об./мин., удаляли надосадочную

жидкость. В суспензию клеток добавляли 20-100 мкл 96% этанола и готовили препарат.

Для приготовления препарата отбирали 10 мкл суспензии, помещали на предметное стекло и ждали несколько секунд, пока спирт подсохнет. Добавляли каплю свежеприготовленного фиксатора 3:1 и ждали, пока слой фиксатора подсохнет и станет тонким. Стекло с препаратом помещали над паром водяной бани, разогретой до 55°C, на 3-5 сек. Приготовленные препараты окрашивали в 4%-м водном растворе красителя Гимза в течение 20 мин., споласкивали дистиллированной водой, после высыхания микроскопировали при увеличении 630 крат с использованием масляной иммерсии (Kirov et al., 2015).

## **2.9 Статистическая обработка**

Оценку существенности различий вариантов опыта проводили с использованием U-теста Манна-Уитни, при этом значения, указанные в процентах, преобразовывали с помощью функции  $\arcsin$ . Существенность различий между вариантами опыта определяли с использованием уровня значимости  $P \leq 0.05$ . Для выявления и оценки тесноты связи между показателями применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для качественной характеристики тесноты связи применяли шкалу Чеддока.

### 3 Результаты и обсуждение

#### 3.1 Влияние генотипа донорного растения на формирование и выход эмбриоидов в культуре изолированных микроспор растений рода *Brassica*

Учет сформировавшихся эмбриоидов в культуре изолированных микроспор проводили в 2019-2021 гг. В этот период была оценена отзывчивость у 82 образцов растений рода *Brassica*. Для расчета доверительного интервала использовали только успешные выделения микроспор, закончившиеся формированием эмбриоидов.

Для оценки эмбриогенной способности растений-доноров в культуре микроспор использовали следующую шкалу: число эмбриоидов в пересчете на 100 бутонов 0 шт./100 бут. – образец неотзывчивый; 1-250шт./100 бут. – низко отзывчивый; 251-500 шт./100 бут. – средне отзывчивый;  $\geq 501$  шт./100 бут. – высоко отзывчивый (Байдина, 2018).

Эмбриогенная способность микроспор была оценена у 5 образцов растений-доноров рапса (*B. napus* L.), относящихся к группе F1-гибридов. Доля отзывчивых образцов рапса была высока и составила 60%, включая 40% высоко отзывчивых образцов (табл. 1).

Таблица 1 – Частота эмбриогенеза у образцов растений рапса (*B. napus* L.) в культуре изолированных микроспор.

№	Образец	Группа образца	Среднее число эмбриоидов, шт./100 бут.	Группа отзывчивости
1	Фактор	F1-гибрид	2290*	Высоко отзывчивый
2	Джаз	F1-гибрид	561,9 $\pm$ 331,8	Высоко отзывчивый
3	Маджонг	F1-гибрид	234 $\pm$ 12,1	Низко отзывчивый
4	ДР1	F1-гибрид	0	Неотзывчивый
5	ТР1	F1-гибрид	0	Неотзывчивый

Примечание: \*Данные по одному успешному выделению микроспор из донорного растения представлены без статистической обработки

Высоко отзывчивыми к эмбриогенезу (40%) в культуре изолированных микроспор были 2 из 5 образцов рапса, представленных F1-гибридами Джаз

и Фактор. Средне отзывчивых в культуре изолированных микроспор среди изученных образцов рапса выявлено не было. Низко отзывчивым (20%) был F1-гибрид Маджонг, неотзывчивыми (40%) – F1-гибриды ДР1 и ТР1. Следует отметить, что F1-гибриды Джаз и Фактор сохраняли высокую степень отзывчивости как в 2020 году, так и в 2021.

Оценка способности к эмбриогенезу микроспор растений-доноров капусты белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata* L.) была проведена у 56 образцов этой культуры. Образцы капусты белокочанной были представлены 8 F1-гибридами, 8 линиями удвоенных гаплоидов (УГ), 3 инбредными линиями и 37 линиями высокой степени гетерозиготности. Из представленных образцов капусты белокочанной 51,8% были отзывчивыми, при этом доля высоко и средне отзывчивых образцов капусты белокочанной составила 25% (табл. 2).

Таблица 2 – Частота эмбриогенеза у образцов растений капусты белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata* L.) в культуре изолированных микроспор.

№	Генотип	Группа образца	Среднее число эмбриоидов, шт./100 бут.	Группа отзывчивости
1	101ф3х15дг1	Линия**	1439,3±282,1	Высоко отзывчивый
2	((Гэс2рхК)4-4х(Гэс2рхСС4)1дг3)1(2)	Линия**	748,3±22,9	Высоко отзывчивый
3	На1Ки5дг(14)	Линия УГ	728,9±16,4	Высоко отзывчивый
4	Плг1ки2-2	Линия**	577,3±66,2	Высоко отзывчивый
5	МФ4×МЦ)М1×(15ЦрСа1-1)	Линия**	567*	Высоко отзывчивый
7	Чамп	F1-гибрид	462±7,1	Средне отзывчивый
8	Мл7×Фу4)1×БФЦ×МЦ)1-13	Линия**	388±131,3	Средне отзывчивый
9	Са1х(110КихСю2)12	Линия**	350*	Средне отзывчивый
10	(См8×Плг1×М2)13	Линия**	289,5±61,7	Средне отзывчивый
11	Каптур	F1-гибрид	285,7±21,1	Средне отзывчивый
12	Мп2-151×(Мп2×С110Ки)1-1	Линия**	274±33,31	Средне отзывчивый
13	ФРГ 47-3	Линия УГ	260,5±16,9	Средне отзывчивый

## Продолжение таблицы 2

14	((Гэс2рхК)4-4х(Гэс2рхСС4)1дг3)1(1)	Линия**	259,3±98,4	Средне отзывчивый
15	МФ4хМЦ)М1х(МФ4х15)1-2	Линия**	243,7±29,6	Низко отзывчивый
16	Бю107хАгр2ф21	F1-гибрид	216,7*	Низко отзывчивый
17	Б25-Ки 1-3	Линия**	166,7*	Низко отзывчивый
18	Сюг 3-2	Линия УГ	151±31,4	Низко отзывчивый
19	Ларсия	F1-гибрид	141,5±20,8	Низко отзывчивый
20	15×БПАГр1	Линия**	119,5±2,4	Низко отзывчивый
21	Victoria	F1-гибрид	115±10,2	Низко отзывчивый
22	Зму7/Зму7×15)13	Линия**	112*	Низко отзывчивый
23	(Гэс2р×(С110Ки×Сю2)1)1	Линия**	88±10,1	Низко отзывчивый
24	Плг1-3	Линия УГ	78±21,6	Низко отзывчивый
25	(Гэс2р×15ЦСа1-1)4	Линия**	52±9,3	Низко отзывчивый
26	ФРГ1	Линия УГ	44,7±9,2	Низко отзывчивый
27	См8Ки1-1	Инбредная линия	42,7±12,4	Низко отзывчивый
28	15дг1хХТ3)1	Линия**	33,3*	Низко отзывчивый
29	ЦСа1-1хСа1)1	Линия**	21,4±13,9	Низко отзывчивый
30	New York	F1-гибрид	0	Неотзывчивый
31	Сюг 2-3	Линия УГ	0	Неотзывчивый
32	Плг0-1	Линия УГ	0	Неотзывчивый
33	Кр3-10	Инбредная линия	0	Неотзывчивый
34	И34Ки31	Инбредная линия	0	Неотзывчивый
35	15-5БПАГрдг41	Линия**	0	Неотзывчивый
36	См8×Плг1Ки2)3	Линия**	0	Неотзывчивый
37	Са1×(110Ки×Сю2)12	Линия**	0	Неотзывчивый
38	Бю107×Агр2ф21 (2)	F1-гибрид	0	Неотзывчивый
39	Сю2×(Дт46×С110)11	Линия**	0	Неотзывчивый
40	Агрдh4[(Бю1×Па9)×Агрдh4)1]	Линия**	0	Неотзывчивый
41	ЕмпАгр1×Агрд 24-2	Линия**	0	Неотзывчивый
42	На1Ки5дг(14)	Линия УГ	0	Неотзывчивый
43	Аут3Ки(14)×Цв9)2	Линия**	0	Неотзывчивый
44	Апт1×(Апт1×Апт1Ки)2	Линия**	0	Неотзывчивый
45	(Амс15)23	Линия**	0	Неотзывчивый
46	Б25Ки	Линия**	0	Неотзывчивый
47	((Цр1хСа1)х14)дг1хХТ5)1	Линия**	0	Неотзывчивый
48	Б25-Ки 1-2	Линия**	0	Неотзывчивый
49	Гэс2р-15-5)4-3	Линия**	0	Неотзывчивый
50	Гэс2рх(гес2рх15ца)4)31	Линия**	0	Неотзывчивый

51	Фл4х15Нац3-1	F1-гибрид	0	Неотзывчивый
52	13с3071	Линия**	0	Неотзывчивый
53	МФ43х15)22	Линия**	0	Неотзывчивый
54	Мл7хФу4)1хБФЦхМЦ)1-13	Линия**	0	Неотзывчивый
55	Сю2х(Дт46хС110)11	Линия**	0	Неотзывчивый
56	Са1(ЦСах15)11	Линия**	0	Неотзывчивый

*Примечание: \*Данные по одному выделению микроспор из донорного растения представлены без статистической обработки; \*\* - линия высокой степени гетерозиготности*

Из 56 введенных в культуру микроспор образцов капусты белокочанной 6 (10,7%) образцов, представленных 2 линиями УГ N14дг На1Ки5дг(14) и 4 линиями высокой степени гетерозиготности Плг1Ки2-2, МФ4хМЦ)М1х(15ЦрСа1-1), 101ф3х15дг1 и ((Гэс2рхК)4-4х(Гэс2рхСС4)1дг3)1(2) были высоко отзывчивыми.

К средне отзывчивым образцам капусты белокочанной (14,3%) относили: 2 F1-гибрида Чамп и Каптур, линию УГ ФРГ 47-3 и 5 линий высокой степени гетерозиготности Мл7хФу4)1хБФЦхМЦ)1-13, (См8хПлг1хМ2)13, Мп2-151х(Мп2хС110Ки)1-1, Са1х(110КихСю2)12 и ((Гэс2рхК)4-4х(Гэс2рхСС4)1дг3)1(1).

В группу низко отзывчивых (26,8%) образцов вошли 3 F1-гибрида Ларсия и Victoria, Бю107хАгр2ф21, инбредная линия См8Ки1-1, 3 линии УГ Сюг 3-2, Плг1-3, ФРГ1 и 8 линий высокой степени гетерозиготности 15хБПАГр1, Зму7/Зму7х15)13, (Гэс2рх(С110КихСю2)1)1, (Гэс2рх15ЦСа1-1)4, МФ4хМЦ)М1х(МФ4х15)1-2, Б25-Ки 1-3, 15дг1хХт3)1, ЦСа1-1хСа1)1.

Неотзывчивыми были 27 (48,2%) образцов капусты белокочанной: 3 F1-гибрида New York, Бю107хАгр2ф21(2), Фл4х15Нац3-1, 3 линии УГ Сюг2-3, На1Ки5дг(14) и Плг0-1, 2 инбредные линии И34Ки31, Кр3-10 и 19 линий высокой степени гетерозиготности 15-5БПАГрдг41, См8хПлг1Ки2)3, Са1х(110КихСю2)12, Сю2х(Дт46хС110)11, Агрpdh4[(Бю1хПа9)хАгрpdh4)1], ЕмпАгр1хАгрд 24-2, Аут3Ки(14)хЦв9)2, Апт1х(Апт1хАпт1Ки)2, (Амс15)23,

((Цр1хСа1)х14)дг1хХТ5)1, Б25-Ки, Б25-Ки 1-2, Гэс2р-15-5)4-3, Гэс2рх(гес2рх15ца)4)31, 13с3071, МФ43х15)22, Мл7хФу4)1хБФЦхМЦ)1-13, Сю2х(Дт46хС110)11, Са1(ЦСах15)11. У данных образцов не удалось получить эмбриониды, в том числе при повторных выделениях микроспор.

Сравнение распределения образцов капусты белокочанной по группам отзывчивости к эмбриогенезу в культуре изолированных микроспор показало, что в представленной коллекции образцов высоко отзывчивые и средне отзывчивые образцы имели низкую долю – 10,7% и 14,3% соответственно. Большая часть изученных образцов (75%) имела низкую отзывчивость или была неотзывчива в культуре изолированных микроспор. Низкие частота эмбриогенеза и образования проростков из эмбрионидов с последующим неконтролируемым спонтанным удвоением хромосомного набора полученных растений-регенерантов снижают вероятность получения линий УГ (Байдина, 2018).

Способность к эмбриогенезу в культуре изолированных микроспор была оценена у 4 растений-доноров микроспор капусты кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes* L.), представленных линиями высокой степени гетерозиготности. Доля отзывчивых среди образцов капусты кольраби составила 75%, при этом 50% образцов были высоко отзывчивыми в культуре изолированных микроспор (табл. 3).

Таблица 3 – Частота эмбриогенеза у образцов растений капусты кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes* L.) в культуре изолированных микроспор

№	Генотип	Группа образца	Среднее число эмбрионидов, шт./100 бут.	Группа отзывчивости
1	(Кор17×Кор2фки)2-1	Линия**	5470,5±176,6	Высоко отзывчивый
2	Кор4Ки2-2	Линия**	897,1±119,2	Высоко отзывчивый
3	(Кор7×Кор2фКи)1-0	Линия**	14,3*	Низко отзывчивый
4	(Кор2фки×Кор7)3-1	Линия**	0	Неотзывчивый

Примечание: \*Данные по одному выделению микроспор из донорного растения представлены без статистической обработки; \*\* - линия высокой степени гетерозиготности

Из 4 введенных в культуру микроспор линий высокой степени гетерозиготности капусты кольраби 2 (50%) (Кор17×Кор2фки)2-1 и Кор4Ки2-2 были высоко отзывчивыми, один (25%) (Кор7×Кор2фКи)1-0 – низко отзывчивым и (Кор2фки×Кор7)3-1 (25%) был неотзывчивым.

Оценка способности к эмбриогенезу в культуре изолированных микроспор капусты брокколи показала высокую долю отзывчивых образцов – 75% от общего числа образцов брокколи (*B. oleracea* var. *italica* Plenck). Доля высоко и средне отзывчивых образцов этой культуры составила 33,3% (табл. 4).

Таблица 4 – Частота эмбриогенеза у образцов растений капусты брокколи (*B. oleracea* var. *italica* Plenck) в культуре изолированных микроспор

№	Генотип	Группа образца	Среднее число эмбрионов, шт./100 бут.	Группа отзывчивости
1	Lufeng	F1-гибрид	567±15,8	Высоко отзывчивый
2	Денди Эрли	F1-гибрид	398±31,1	Средне отзывчивый
3	Clepper	F1-гибрид	289±10,9	Средне отзывчивый
4	Sausern Commet	F1-гибрид	276±19,9	Средне отзывчивый
5	Green Goliaf	F1-гибрид	166±12,4	Низко отзывчивый
6	Б13	Линия**	80,9*	Низко отзывчивый
7	Б11	Линия**	21,9*	Низко отзывчивый
8	Б14	Линия**	18,2*	Низко отзывчивый
9	Б29	Линия**	12,9*	Низко отзывчивый
10	Б28	Линия**	0	Неотзывчивый
11	Б32	Линия**	0	Неотзывчивый
12	Б17	Линия**	0	Неотзывчивый

Примечание: \*Данные по одному выделению микроспор из донорного растения представлены без статистической обработки; \*\* - линия высокой степени гетерозиготности

Из 12 образцов брокколи к группе высоко отзывчивых были отнесены F1-гибрид Lufeng (8,3%), к средне отзывчивым – 3 F1-гибрида (25%) Денди

Эрли, Clepper, Sausern Commet, к низко отзывчивым (41,7%) – F1-гибрид Green Goliaf и 4 линии высокой степени гетерозиготности B13, B11, B14, B29, к неотзывчивым (25%) – 3 линии высокой степени гетерозиготности B28, B29 и B17.

В культуре изолированных микроспор капусты листовой (*B. oleracea* var. *acephala* DC.) была изучена отзывчивость у 5 образцов этой культуры, представленных 3 F1-гибридами и 2 линиями высокой степени гетерозиготности. У образцов капусты листовой доля отзывчивых составила 20% (табл. 5).

Таблица 5 – Частота эмбриогенеза у образцов растений капусты листовой (*B. oleracea* var. *acephala* DC.) в культуре изолированных микроспор

№	Образец	Группа образца	Среднее число эмбриоидов, шт./100 бут.	Группа отзывчивости
1	Нагроз	F1-гибрид	92,9±13,9	Низко отзывчивый
2	Цап 2-41	Линия**	21±11,5	Низко отзывчивый
3	Оса	F1-гибрид	0	Неотзывчивый
4	Нагрэд	F1-гибрид	0	Неотзывчивый
5	Раф 1-3	Линия**	0	Неотзывчивый

Примечание: \*\* - линия высокой степени гетерозиготности

Из 5 образцов капусты листовой F1-гибрид Нагроз и линию высокой степени гетерозиготности Цап 2-41 относили к низко отзывчивым генотипам (40%), а 2 F1-гибрида Оса, Нагрэд и линию высокой степени гетерозиготности Раф 1-3 – к неотзывчивым (60%).

Следует отметить, что нами были обнаружены значимые различия в отзывчивости к эмбриогенезу у образцов разновидностей *B. oleracea* при разделении на линии УГ, инбредные линии, линии высокой степени гетерозиготности, F1-гибриды и группы по степени отзывчивости в культуре микроспор (табл. 6).

Таблица 6 – Распределение генотипов капусты белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata* L.) по происхождению и группам отзывчивости

Группа генотипов по отзывчивости к эмбриогенезу	Происхождение генотипа				Всего, шт.	%
	Инбредная линия, шт.	Линия УГ, шт.	F1-гибрид, шт.	Линия высокой степени гетерозиготности, шт.		
Высоко отзывчивые	0	2	0	4	6	10,7
Средне отзывчивые	0	1	2	5	8	14,3
Низко отзывчивые	1	3	3	8	15	26,8
Неотзывчивые	2	2	3	20	27	48,2
Всего	3	8	8	37	56	100

Наименьшую отзывчивость в культуре микроспор наблюдали у линий поздних поколений инбридинга: 33,3% инбредных линий относились к низко отзывчивым, остальные – к неотзывчивым образцам. Существует мнение, что наибольшую стабильность проявления признаков и вероятность отзывчивости в культуре микроспор можно ожидать от линий УГ, так как линии УГ генетически однородны и получены от отзывчивых в культуре микроспор генотипов. За счет высокой выровненности линии УГ целесообразно использовать для проведения экспериментов по изучению влияния различных факторов на частоту эмбриогенеза в культуре микроспор. Однако в данном исследовании только 25% изученных линий УГ капусты белокочанной относились к группе высоко отзывчивых, 12,5% – средне отзывчивых, большая часть линий УГ были низко (37,5%) и неотзывчивы (25%) в культуре микроспор.

Наиболее перспективно использовать в качестве исходного материала линии ранних поколений инбридинга или беккроссирования и F1-гибриды из-за возможности получения максимального разнообразия линий УГ благодаря высокой гетерозиготности исходного материала. Доля высоко и

средне отзывчивых в культуре микроспор линий высокой степени гетерозиготности капусты белокочанной составляет 24,3%. Среди F1-гибридов капусты белокочанной не было высоко отзывчивых образцов, доля средне отзывчивых составила 25%.

Следует отметить, что при распределении генотипов капусты белокочанной по происхождению и группам отзывчивости наблюдали, что близкие соотношения доли отзывчивых образцов наблюдали у линий УГ и F1-гибридов (75% и 62,5% соответственно), а также у инбредных линий и линий высокой степени гетерозиготности (33,3% и 45,9% соответственно). Однако при разделении на гомозиготные генотипы (ЛУГ, инбредные линии) и гетерозиготные генотипы (F1-гибриды, линии высокой степени гетерозиготности) капусты белокочанной было отмечено сходство соотношения отзывчивых генотипов к неотзывчивым по каждой группе – 63,6/36,4% для группы гомозиготных и 50/50% для группы гетерозиготных генотипов, а также соотношения высоко и средне отзывчивых к низко и неотзывчивым – 27,3/72,7% для группы гомозиготных и 24,5/75,5 для группы гетерозиготных генотипов.

Как правило, растения вида *B. napus* имеют высокую способность к эмбриогенезу в культуре микроспор (Gu et al., 2014; Shmykova et al., 2015). В работе Zeng et al. (2010) 40% линий рапса были высоко отзывчивыми, 40% – средне отзывчивыми. В то же время в данном исследовании, проведенном с использованием F1-гибридов рапса, высоко отзывчивыми были 40%, средне отзывчивых образцов выявлено не было, а 40% образцов были неотзывчивыми. Это сходится с данными Zhang and Takahata (2001), указавшими среди изученных F1-гибридов рапса 50% неотзывчивых образцов и указывает на то, что не все образцы рапса, в том числе современные F1-гибриды отзывчивы в культуре изолированных микроспор.

Низкая отзывчивость к эмбриогенезу в культуре микроспор у образцов капусты белокочанной отмечают многие авторы (Tuncer et al., 2016; Байдина,

2018). В работе Байдиной (2018) за 5 лет была оценена отзывчивость у 205 образцов капусты белокочанной, и частота встречаемости высоко и средне отзывчивых генотипов в оцениваемых популяциях находилась в пределах 30%, в то время как доля низко и неотзывчивых генотипов доходила до 85%. Это совпадает с нашими данными: из 56 образцов капусты белокочанной 42 образца (75,4%) были низко и неотзывчивыми. Доля высоко и средне отзывчивых в культуре микроспор селекционных образцов ранних поколений инбридинга или беккроссирования капусты белокочанной в нашей работе сопоставима с данными Байдиной (2018) – 24,5% и составляет 24,3%. Среди исследованных Байдиной (2018) F1-гибридов капусты белокочанной доля высоко и средне отзывчивых составила 15,4%, а линий удвоенных гаплоидов – 18,75%. В нашей работе у исследованных образцов капусты белокочанной были отмечены близкие значения доли высоко и средне отзывчивых среди F1-гибридов и линий УГ, составившие 25% и 24,3% соответственно.

Считается, что большинство генотипов капусты брокколи имеют высокую отзывчивость в культуре микроспор (Domblides et al., 2018). Например, в работе Dias et al. (2001) у 8 из 10 (80%) изученных образцов брокколи степень отзывчивости была не ниже средней, доля высоко отзывчивых образцов составила 40%, но в нашей работе напротив, доля высоко и средне отзывчивых генотипов брокколи была 33,3%, из них высоко отзывчивым был 1 образец (8,3%). Однако большинство (80%) изученных Dias et al. (2001) образцов брокколи – F1-гибриды. Доля F1-гибридов среди высоко и средне отзывчивых образцов по данным Dias et al. (2001) составила 87,5%, что сходится с нашими данными, где 80% высоко и средне отзывчивых образцов брокколи были F1-гибридами. Можно сделать вывод, что большинство высоко и средне отзывчивых генотипов брокколи относятся к F1-гибридам.

Известно, что большинство генотипов капусты листовой имеет невысокую степень отзывчивости в культуре изолированных микроспор (Wang et al., 2011), что сходится с нашими данными: 60% образцов капусты листовой были неотзывчивыми, 40% – низко отзывчивы. В работе Tuncer et al. (2016) было показано, что из 8 образцов, включавших 3 сорта и 5 F1-гибридов капусты листовой, 50% были низко отзывчивыми, но при этом доля высоко и средне отзывчивых образцов среди F1-гибридов капусты листовой была 60%, и превосходила долю высоко и средне отзывчивых образцов среди сортов – 33,3%. Изученные нами F1-гибриды капусты листовой, напротив, были низко (33,3%) и неотзывчивыми в культуре микроспор.

Образцы капусты кольраби в нашей работе были представлены линиями ранних поколений инбридинга или беккроссирования, при этом 50% из них были высоко отзывчивыми, что превосходит данные других исследователей, сообщающих о низкой отзывчивости 80% (20% – неотзывчивых) образцов кольраби в культуре изолированных микроспор (Vyvadilová et al., 2001).

В результате анализа генотипспецифичности эмбрионной отзывчивости в культуре изолированных микроспор отмечено, что гомозиготные генотипы (ЛУГ, инбредные линии) и гетерозиготные генотипы (F1-гибриды, линии высокой степени гетерозиготности) капусты белокочанной (*B. oleracea*) имеют равное соотношение высоко и средне отзывчивых к низко и неотзывчивым образцам, 27,3/72,7% и 24,5/75,5%, соответственно; соотношение отзывчивых генотипов к неотзывчивым по каждой группе также имело сходство – 63,6/36,4% для группы гомозиготных и 50/50% для группы гетерозиготных генотипов.

При этом степень эмбрионной отзывчивости изученных коллекций образцов видов и подвидов *Brassica* в целом соответствует данным по отзывчивости растений *B. napus*, *B. oleracea* var. *capitata*, var. *gongylodes*, var. *italica* в ранее проведенных исследованиях других авторов.

### 3.2 Влияние генотипа донорного растения на формирование и выход растений-регенерантов в культуре изолированных микроспор растений рода *Brassica*

Нами были получены растения-регенеранты у 32 из 44 образцов растений рода *Brassica*, отзывчивых в культуре изолированных микроспор. У образцов растений рода *Brassica* были оценены частота образования проростков из эмбриоидов и частота прямого прорастания эмбриоидов. Частоту образования проростков оценивали как отношение числа всех сформировавшихся проростков к числу пересаженных на среду В5 эмбриоидов. Частоту прямого прорастания эмбриоидов определяли как отношение числа эмбриоидов с прямым прорастанием к общему числу пересаженных эмбриоидов.

Растения-регенеранты сформировались у 23 (76,5%) из 29 отзывчивых в культуре микроспор образцов капусты белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata* L.). Частота образования проростков из эмбриоидов образцов капусты белокочанной, у которых были получены растения-регенеранты, варьировалась от 13 до 87,7%. Частота прямого прорастания эмбриоидов образцов варьировалась от 2,1 до 45,1% (табл. 7).

Таблица 7 – Частота формирования растений-регенерантов у образцов капусты белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata* L.) в культуре изолированных микроспор

№	Образец	Число эмбриоидов, шт.	Количество растений-регенерантов, шт	Частота образования проростков из эмбриоидов, %	Число эмбриоидов с прямым прорастанием, шт.	Частота прямого прорастания эмбриоидов, %
1	Сюг 3-2	10	9	87,7	1	13
2	МФ4×МЦ)М1×(15ЦрСа 1-1)	44	37	84,4	20	45,1
3	На1Ки5 дг(14)	153	128	83,9	36	23,9

## Продолжение таблицы 7

4	((Гэс2рхК)4-4х(Гэс2рхС С4)1дг3)1(2)	217	163	75,1	32	14,7
5	Чамп	45	34	75	11	23,6
6	Victoria	31	21	67,9	10	32
7	N14дг	261	175	67	85	32,7
8	((Гэс2рхК)4-4х(Гэс2рхС С4)1дг3)1(1)	124	80	64,6	40	31,9
9	Каптур	38	24	63,6	7	18,1
10	(См8×Плг1×М2)13	73	41	56	13	18
11	Бю107хАгр2 ф21	7	4	54,5	1	15
12	Ларсия	12	6	50,2	4	33,3
13	Са1х(110Ки хСю2)12	108	54	49,9	39	35,6
14	Плг1-3	6	3	49,8	2	34,9
15	101ф3х15дг1	87	40	45,9	19	21,8
16	Мл7×Фу4)1 ×БФЦ×МЦ) 1-13	188	85	45,3	24	12,9
17	МФ4хМЦ)М 1х(МФ4х15) 1-2	12	4	33,3	3	25
18	Мп2- 151×(Мп2×С 110Ки)1-1	151	36	23,9	0	0
19	Плг1Ки2-2	248	57	23	29	11,6
20	Б25-Ки 1-3	35	7	19,8	1	2,1
21	ФРГ 47-3	103	19	18,5	0	0
22	15×БПАГр1	36	5	14	0	0
23	(Гэс2р×15Ц Са1-1)4	15	2	13	0	0
	Всего	2004	1034	-	377	-

Из 2004 шт. сформировавшихся в культуре изолированных микроспор эмбриоидов капусты белокочанной было получено 1034 шт. растений-регенерантов. Образцы капусты белокочанной N14дг, Сюг3-2, МФ4×МЦ)М1×(15ЦрСа1-1), На1Ки5дг(14), Чамп, (См8×Плг1×М2)13, Бю107хАгр2ф21, ((Гэс2рхК)4-4х(Гэс2рхСС4)1дг3)1(2), Victoria, ((Гэс2рхК)4-4х(Гэс2рхСС4)1дг3)1(1), Каптур и Ларсия имели частоту образования

проростков из эмбриоидов выше 50% и составили больше половины (52,2%) образцов капусты белокочанной, у которых были получены растения-регенеранты. Образцы капусты белокочанной Са1х(110КихСю2)12, Плг1-3, Мл7×Фу4)1×БФЦ×МЦ)1-13, Мп2-151×(Мп2×С110Ки)1-1, Плг1Ки2-2, ФРГ 47-3, 15×БПАГр1, (Гэс2р×15ЦСа1-1)4, 101ф3х15дг1, МФ4хМЦ)М1х(МФ4х15)1-2, Б25-Ки1-3 имели частоту образования проростков из эмбриоидов ниже 50%, при этом минимальные значения частоты образования проростков из эмбриоидов (13-19,8%) наблюдали у ФРГ 47-3, 15×БПАГр1, (Гэс2р×15ЦСа1-1)4, Б25-Ки 1-3.

У большинства полученных в культуре изолированных микроспор эмбриоидов капусты белокочанной (81,2%) наблюдали образование вторичных эмбриоидов и/или органогенез. Частота прямого прорастания эмбриоидов капусты белокочанной составила:

0-2,1% у образцов ФРГ 47-3, 15×БПАГр1, (Гэс2р×15ЦСа1-1)4, Мп2-151×(Мп2×С110Ки)1-1, Б25-Ки1-3;

11,6-18,1% у образцов Сюг 3-2, (См8×Плг1×М2)13, Мл7×Фу4)1×БФЦ×МЦ)1-13, Плг1Ки2-2, Бю107хАгр2ф21, ((Гэс2рхК)4-4х(Гэс2рхСС4)1дг3)1(2), Каптур;

21,8-45,1% у образцов N14дг, МФ4×МЦ)М1×(15ЦрСа1-1), На1Ки5дг(14), Чамп, Плг1-3, Са1х(110КихСю2)12, Victoria, ((Гэс2рхК)4-4х(Гэс2рхСС4)1дг3)1(1), Ларсия, 101ф3х15дг1, МФ4хМЦ)М1х(МФ4х15)1-2.

В среднем частота прямого прорастания эмбриоидов капусты белокочанной была 19,3%.

Частота образования проростков из эмбриоидов капусты кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes* L.) составила от 51,1% до 93,1%. Частота прямого прорастания эмбриоидов на среде В5 составила от 11,1 до 44,4% (табл. 8).

Таблица 8 – Частота формирования растений-регенерантов у образцов капусты кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes* L.) в культуре изолированных микроспор

№	Образец	Число эмбрионов, шт.	Количество растений-регенерантов, шт	Частота образования проростков из эмбрионов, %	Число эмбрионов с прямым прорастанием, шт.	Частота прямого прорастания эмбрионов, %
1	Кор4Ки2-2	132	123	93,1	43	32,5
2	(Кор17×Кор2фки)2-1	140	100	71,2	62	44,4
3	(Кор7×Кор2фКи)1-0	8	4	51,1	1	11,1
	Всего	280	227	-	106	-

В культуре изолированных микроспор капусты кольраби из 280 шт. сформировавшихся эмбрионов было получено 227 шт. растений-регенерантов, из них – 106 шт. образовалось при прямом прорастании эмбрионов на среде В5. Частота образования проростков из эмбрионов капусты кольраби образцов Кор4Ки2-2, (Кор17×Кор2фки)2-1, (Кор7×Кор2фКи)1-0 была 93,1%, 71,2%, 51,1% соответственно, и в среднем составила 71,8%. Частота прямого образования проростков из эмбрионов так же, как у капусты белокочанной, у образцов капусты кольраби (Кор17×Кор2фки)2-1, Кор4Ки2-2, (Кор7×Кор2фКи)1-0 была невысокой и равнялась 44,4%, 32,5% и 11,1% соответственно.

Растения-регенеранты сформировались у 5 (55,6%) из 9 отзывчивых в культуре микроспор образцов капусты брокколи (*B. oleracea* var. *italica* Plenck). Частота образования проростков из эмбрионов образцов капусты брокколи, у которых были получены растения-регенеранты, составила от 64 до 100%. Частота прямого прорастания эмбрионов образцов, у которых были получены растения-регенеранты, составила от 52,1 до 73,1% (табл. 9).

Таблица 9 – Частота формирования растений-регенерантов у образцов капусты брокколи (*B. oleracea* var. *italica* Plenck) в культуре изолированных микроспор

№	Образец	Число эмбрионов, шт.	Количество растений-регенерантов, шт	Частота образования проростков из эмбрионов, %	Число эмбрионов с прямым прорастанием, шт.	Частота прямого прорастания эмбрионов, %
1	Sausern Commet	49	49	100	34	69,3
2	Lufeng	4	4	98	3	73,1
3	Clepper	4	3	77,3	2	53,9
4	Green Goliaf	13	9	69,1	7	52,1
5	Денди Эрли	16	10	64	10	61,9
	Всего	86	75	-	56	-

Всего в культуре микроспор капусты брокколи было получено 86 шт. эмбрионов, из которых сформировалось 76 шт. растений-регенерантов. Число прямо прорастающих на среде В5 эмбрионов было достаточно высоким и составило 55 шт. (64%). Наибольшую частоту образования проростков из эмбрионов (98-100%) капусты брокколи наблюдали у образцов Lufeng и Sausern Commet. Частота образования проростков из эмбрионов генотипов Clepper, Green Goliaf и Денди Эрли составила 77,3%, 69,1%, 64% соответственно. В среднем частота образования проростков из эмбрионов капусты брокколи составила 81,7%.

Высокие значения частоты прямого прорастания эмбрионов капусты брокколи были отмечены у образцов Sausern Commet (69,9%) и Lufeng (73,1%). Частота прямого прорастания эмбрионов 52,1%, 53,9%, 61,9% была у образцов Green Goliaf, Clepper и Денди Эрли соответственно.

Растения-регенеранты были получены у отзывчивых в культуре микроспор образцов рапса (*B. napus* L.) Джаз, Фактор и Маджонг. Частота образования проростков из эмбрионов образцов рапса составила 65,2-73,9%.

Частота прямого прорастания эмбриоидов образцов рапса варьировала от 25 до 37,7% (табл. 10).

Таблица 10 – Частота формирования растений-регенерантов у образцов рапса (*B. napus* L.) в культуре изолированных микроспор

№	Образец	Число эмбриоидов, шт.	Количество растений-регенерантов, шт	Частота образования проростков из эмбриоидов, %	Число эмбриоидов с прямым прорастанием, шт.	Частота прямого прорастания эмбриоидов, %
1	Джаз	43	32	73,9	11	25
2	Маджонг	24	17	70,6	9	37,7
3	Фактор	38	25	65,2	13	33,1
	Всего	105	74	-	33	-

Из 106 шт. эмбриоидов рапса было получено 74 шт. растений-регенерантов, при этом только у 33 шт. (31,1%) эмбриоидов наблюдали прямое развитие. Частота образования проростков из эмбриоидов образцов Джаз, Маджонг и Фактор составила 73,9%, 70,6% и 65,2% соответственно. Среднее значение частоты образования проростков из эмбриоидов рапса было на уровне 69,9%. Частота прямого прорастания эмбриоидов образца рапса Джаз составила 25%, у образца Фактор частота прямого прорастания была 33,1%, у образца Маджонг – 37,7%. В среднем частота прямого прорастания образцов рапса была 31,9%.

Помимо зрелых хорошо развитых эмбриоидов, у всех генотипов в опыте формировались аномальные эмбриониды семядольной стадии с пролиферацией клеток гипокотили и семядолей (рис. 1).



Рисунок 1 – Эмбриониды перед пересадкой на среду для регенерации: 1 – хорошо развитый эмбрионид; 2 – деформированный эмбрионид; 3 – эмбриониды со сросшимися семядолями

Из-за низкой частоты прямого прорастания на 30 день культивирования эмбрионидов на среде В5 с добавлением 25 г/л сахарозы и 11 г/л агары формировались единичные растения у отдельных образцов. В среднем время формирования укорененных проростков у капусты белокочанной, кольраби, брокколи и рапса заняло 50-90 дней после переноса созревших эмбрионидов на твердую питательную среду.

Оценка связи образования проростков с морфологическими особенностями микроспорогенных эмбрионидов была проведена нами у 10 образцов капусты белокочанной, 2 образцов капусты кольраби, 3 образцов капусты брокколи и 3 образцов рапса. Общее число эмбрионидов оценивали как совокупность морфологически зрелых и аномальных эмбрионидов. В числе морфологически зрелых эмбрионидов наблюдали как эмбриониды с прямым образованием проростков на твердой питательной среде, так и эмбриониды с формирующимися вторичными эмбриоидами и органоогенезом (табл. 11).

Таблица 11 – Распределение эмбрионидов, сформировавшихся у образцов растений рода *Brassica*, на группы в соответствии с морфологическими особенностями и образованием проростков

Вид капустной культуры	№	Образец	Общее число эмбрионидов, шт.	Число морфологически зрелых эмбрионидов, шт.	Число эмбрионидов с прямым прорастанием, шт.	Доля эмбрионидов с прямым прорастанием из числа зрелых, %
<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.	1	МФ4×МЦ)М1×(15ЦрСа1-1)	44	41	20	48,8
	2	На1Ки5дг(14)	153	69	36	52,2
	3	((Гэс2рхК)4-4х(Гэс2рхС4)1дг3)1(2)	217	57	32	56,2

	4	N14дг	261	113	85	75,2
	5	((Гэс2рхК)4-4х(Гэс2рхСС4)1дг3)1(1)	124	73	40	54,8
	6	Са1х(110КихСю2)12	108	64	39	60,9
	7	101ф3х15дг1	87	34	19	55,9
	8	Мл7×Фу4)1×БФЦ×МЦ)1-13	188	42	24	57,1
	9	Мп2-151×(Мп2×С110Ки)1-1	151	11	-	-
	10	Плг1Ки2-2	248	43	29	67,4
<i>B. oleracea</i>	1	Кор4Ки2-2	132	76	43	56,6
var. <i>gongylodes</i> L.	2	(Кор17×Кор2фки)2-1	140	84	62	73,8
<i>B. oleracea</i>	1	Sauern Commet	49	43	34	79,1
var. <i>italica</i> Plenck	2	Green Goliaf	13	13	7	53,8
	3	Денди Эрли	16	16	10	62,5
<i>B. napus</i> L.	1	Джаз	43	33	11	33,3
	2	Маджонг	24	14	9	64,3
	3	Фактор	38	29	13	44,8

Доля эмбрионов с прямым прорастанием от числа морфологических зрелых эмбрионов варьировала от 48,8 до 75,2% у капусты белокочанной, от 56,6 до 73,8% у капусты кольраби, от 53,8 до 79,1% у капусты брокколи, от 33,3 до 64,3% у рапса, и в среднем составила 58,6%.

Прямое прорастание было отмечено только у морфологически зрелых эмбрионов, у аномально развитых эмбрионов после пересадки на среду В5 наблюдали формирование вторичных эмбрионов и адвентивных побегов, что задерживает образование проростков на 30-60 дней. При этом связи между общим количеством эмбрионов и эмбрионов с прямым прорастанием на твердой питательной среде обнаружено не было.

Наличие прямой достоверной связи было установлено между количеством морфологически зрелых эмбрионов и эмбрионов с прямым

путем прорастания у представленных образцов культур рода *Brassica* (табл. 10). Для совокупности образцов капусты белокочанной, капусты кольраби, брокколи и рапса корреляционная связь была высокой, коэффициент корреляции составил  $r=0,87$ . При оценке связи между количеством морфологически зрелых эмбрионов и эмбрионов с прямым путем прорастания отдельно у капусты белокочанной наблюдали весьма высокую корреляционную связь ( $r=0,96$ ). Следовательно, чем больше морфологически зрелых эмбрионов формируется у образца капустной культуры, тем выше число эмбрионов с прямым путем прорастания.

В культуре микроспор растений рода *Brassica* было получено 1410 шт. растений-регенерантов, в том числе 1034 шт. растений-регенерантов капусты белокочанной, 227 шт. растений-регенерантов капусты кольраби, 75 шт. растений-регенерантов капусты брокколи, 74 шт. растений-регенерантов рапса. Количество полученных растений-регенерантов культур рода *Brassica* зависело от разных факторов, и в большей степени от генотипа, определяющего эмбриогенную способность, частоту образования проростков из эмбрионов.

В среднем частота образования проростков из эмбрионов капусты белокочанной составила 57,9%, доходила до 87,7% и была выше, чем в работах других авторов (Klíma et al., 2004, Piliš et al., 2008, Wang et al., 2010). Частота образования проростков из эмбрионов капусты кольраби в среднем составила 71,8%, что выше, чем указано в других исследованиях: 11-60% (Klíma et al., 2004 и др.). Среднее значение частоты образования проростков из эмбрионов капусты брокколи составила 81,7%, и была выше, чем у капусты белокочанной (57,9%) и капусты кольраби (71,8%), что совпадает с данными Wang et al. (2010), указывающих, что среди разновидностей *B. oleracea* максимальная частота формирования растений-регенерантов наблюдается у брокколи (60-70%). Среднее значение частоты образования

проростков из эмбриоидов рапса было на уровне 69,9%, что совпадает с данными других авторов (Ahmadi et al., 2014a).

Нами было установлено, что чем больше морфологически зрелых эмбриоидов формируется у образцов растений рода *Brassica*, тем выше число эмбриоидов с прямым путем прорастания ( $r=0,87$ ). Следовательно, для быстрого получения растений-регенерантов УГ в культуре микроспор предпочтительным является культивирование морфологически зрелых эмбриоидов, в то время как у аномально развитых эмбриоидов наблюдается вторичный эмбриогенез и органогенез, что приводит к увеличению времени, и как следствие, стоимости и трудоемкости процесса культивации, смещению сроков яровизации и цветения капустных растений.

Таким образом, показано, что частота образования проростков из эмбриоидов растений рода *Brassica* зависит от генотипа и варьирует от 57,9% до 81,7%. Установлено, что прямое прорастание характерно только для морфологически зрелых эмбриоидов, при этом выявлена высокая положительная связь ( $r=0,87$ ) числа морфологически зрелых эмбриоидов с числом прямо прорастающих эмбриоидов. В результате исследования установлена максимальная частота прямого прорастания эмбриоидов на уровне 62,1% для капусты брокколи (*B.oleracea* var. *italica*), в тех же условиях частота прямого прорастания у капусты белокочанной (var. *capitata*), кольраби (var. *gongylodes*) и рапса (*B.napus*) варьировала от 19,3% до 31,9%.

### **3.3 Изучение влияния антиоксидантов на жизнеспособность микроспор и частоту микроспорогенного эмбриогенеза *B.oleracea***

При изучении влияния антиоксидантов на жизнеспособность изолированных микроспор *B.oleracea* мы наблюдали повышение доли жизнеспособных микроспор изученных образцов в среде с добавлением аскорбата (20 мг/л) и глутатиона (20 мг/л) после инкубации в условиях иницирующего стресса и после 7 дней культивирования (табл. 12).

Таблица 12 – Влияние аскорбата натрия и глутатиона в среде NLN-13 на жизнеспособность микроспор капусты белокочанной.

Образец	Жизнеспособность микроспор, %				
	Изолированные микроспоры	После 48 ч. температурного шока		После 7 дней культивирования	
		контроль	аскорбат, 20 мг/л и глутатион, 20 мг/л	контроль	аскорбат, 20 мг/л и глутатион, 20 мг/л
ФРГ 47-3	100	67	84	51	80
Сюг 3-2	72	43	55	33	50
Сюг 2-3	81	41	59	29	50
Плг1-3	75	33	41	25	38

Значимое снижение жизнеспособности инкубируемых микроспор наблюдали после температурного шока. При этом в контрольном варианте среды у всех образцов доля жизнеспособных микроспор снижалась в среднем в 1,5-2,3 раза, в то время как в среде с аскорбатом и глутатионом – в 1,2-1,8 раз. Жизнеспособность микроспор после 7 дней культивирования в контроле в среднем снизилась в 2-3 раза, а в среде с антиоксидантами – в 1,3-1,9 раз (рис. 2).

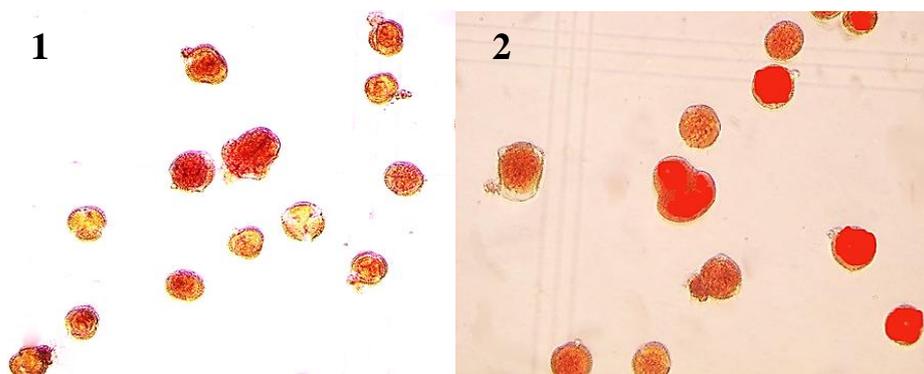


Рисунок 2 – Микроспоры образца Плг1-3 (*B. oleracea*) после 7 дней инкубирования в: 1) питательной среде NLN-13; 2) питательной среде NLN-13 с аскорбатом (20 мг/л) и глутатионом (20 мг/л)

Влияние антиоксидантов на частоту эмбриогенеза *V.oleracea* в культуре изолированных микроспор изучали с использованием линий УГ капусты белокочанной ФРГ 47-3, Сюг 3-2, Сюг 2-3 и ПЛГ1-3 при добавлении в среду NLN-13 10 или 20 мг/л аскорбата, 10 или 20 мг/л глутатиона, а также совместного добавления 10 мг/л аскорбата и 10 мг/л глутатиона (табл. 13). В качестве контроля использовали NLN-13 с рН среды 5,8.

Таблица 13 – Влияние антиоксидантов, аскорбата и глутатиона, в среде NLN-13 на частоту эмбриогенеза капусты белокочанной, шт./ч.Петри

Образец	Частота эмбриогенеза, шт./ч.Петри					
	Аскорбат 0 мг/л и глутатион 0 мг/л	Аскорбат		Глутатион		Аскорбат 10 мг/л и глутатион 10 мг/л
		10 мг/л	20 мг/л	10 мг/л	20 мг/л	
ФРГ 47-3	25,7±8,3a	28,7±8,1a	40, 7±1,7b	19, 3±3,9a	40, 3±8,6b	41, 7±5,2b
Сюг 3-2	9,3±1,7a	7, 7±0,7a	12, 3±3,5b	7, 3±1,7a	15, 7±4,7b	16,0±2,9b
Сюг 2-3	0,0a	0a	0a	3,0±0,3b	8±1,5c	0a
ПЛГ1-3	3, 3±0,7a	2,3±0,7a	4,7±2,7a	3,0±1,1a	6, 3±1,7b	8,0±1,1b

*Примечание: значения в строке, отмеченные одинаковыми строчными буквами (a, b, c), согласно t-критерию Стьюдента не имеют существенного различия на 5 % уровне значимости ( $P \leq 0.05$ ).*

Добавление в питательную среду NLN-13 10 мг/л аскорбата не оказывало существенного влияния на эмбриогенез в культуре микроспор у всех изученных образцов. Увеличение концентрации аскорбата до 20 мг/л значимо не изменило эмбриогенез образцов Сюг 2-3 и ПЛГ1-3, а у образцов ФРГ 47-3 и Сюг 3-2 вызвало увеличение частоты эмбриогенеза в 1,5 раза. Добавление 10 мг/л глутатиона не повлияло на частоту эмбриогенеза образцов ФРГ 47-3, Сюг 3-2, ПЛГ1-3, однако стимулировало эмбриогенез у Сюг 2-3, неотзывчивого в контрольном варианте среды (рис. 3). В среде NLN-13 с концентрацией глутатиона 20 мг/л наблюдали значимое увеличение частоты эмбриогенеза у всех изученных образцов. Добавление в среду 10 мг/л аскорбата и 10 мг/л глутатиона значимо увеличило выход эмбриоидов у образцов ФРГ 47-3, Сюг 3-2, ПЛГ1-3, а у неотзывчивого образца Сюг2-3 не оказывало влияния на частоту эмбриогенеза.

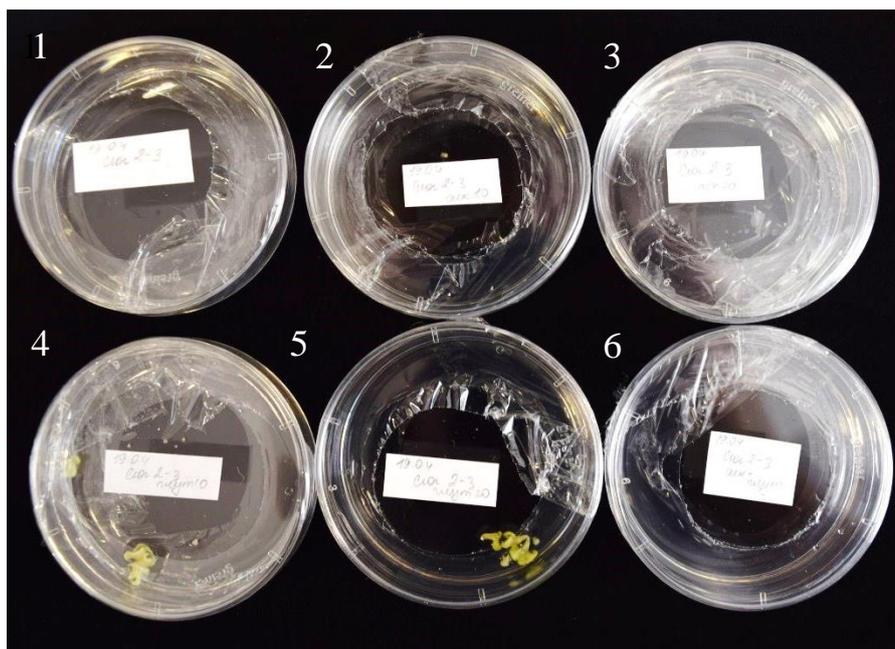


Рисунок 3 – Эмбриониды у образца Сюг2-3 сформировавшиеся на 30-й день культивирования в среде с добавлением: 1) контроль; 2) 10 мг/л аскорбата; 3) 20 мг/л аскорбата; 4) 10 мг/л глутатиона; 5) 20 мг/л глутатиона; 6) 10 мг/л аскорбата и 10 мг/л глутатиона

В нашей работе увеличение частоты эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор у образцов капусты белокочанной происходило при увеличении концентрации антиоксидантов в среде до 20 мг/л, что не совпадает с данными Noseini et al. (2014) и Zeng et al. (2017), указывающими, что для увеличения частоты эмбриогенеза микроспор у рапса и брокколи необходимы не более 5-10 мг/л аскорбата, и не более 10 мг/л глутатиона у рапса. Впервые была показана возможность стимуляции эмбриогенеза у неотзывчивого в контрольном варианте среды генотипа Сюг2-3 в среде с содержанием 10 и 20 мг/л глутатиона. Лучшим вариантом для капусты белокочанной в эксперименте, как и для брокколи (Zeng et al., 2017), была питательная среда, содержащая 20 мг/л глутатиона, вызвавшая увеличение частоты эмбриогенеза у всех изученных образцов.

В среде NLN-13 с антиоксидантами (аскорбат, 20 мг/л и глутатион, 20 мг/л) жизнеспособность изолированных микроспор капусты белокочанной через 7 дней культивирования на 20% выше по сравнению с

жизнеспособностью микроспор культивируемых в стандартной (контрольной) среде, при этом добавление в питательную среду глутатиона (20 мг/л) влечет существенное (в 1,7 раза) повышение частоты микроспорогенного эмбриогенеза отзывчивых генотипов и способствует эмбриогенезу неотзывчивого в контрольной питательной среде генотипа *B.oleracea*.

### 3.4 Изучение влияния на частоту эмбриогенеза теплового шока микроспор при добавлении в среду цефотаксима

Изучение влияния добавления антибиотика цефотаксима в среду NLN-13 во время прохождения теплового шока (32,5°C) на частоту эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор проводили с использованием двух образцов рапса Джаз и Фактор, образца капусты белокочанной Б25Ки и образца капусты листовой Раф 1-3. Микроспоры культивировали в среде NLN-13 в условиях температурного шока без добавления цефотаксима и с добавлением 50, 70 или 100 мг/л цефотаксима в течение 24, 48, 72 ч., с последующей заменой среды на свежую NLN-13 (табл. 14).

Таблица 14 – Влияние цефотаксима в среде NLN-13 на частоту эмбриогенеза растений рода *Brassica*, шт./ч.Петри

Образец	Частота эмбриогенеза, шт./ч.Петри											
	Время обработки											
	24 часа				48 часов				72 часа			
	Концентрация цефотаксима, мг/л											
	0	50	70	100	0	50	70	100	0	50	70	100
Джаз, ( <i>B.napus</i> L.)	19,3± 9,6a	43,0± 19,8b	37,0± 6,9b	0c	21,7± 3,5a	145,0± 19,2d	48,3± 0,7b	0c	17,3± 5,3a	9,3± 5,4e	4,0± 2,2e	0c
Фактор, ( <i>B.napus</i> L.)	35,7± 6,4a	39,3± 4,5a	38,7± 2,8a	0±0b	43,3± 7,7a	133,7± 23,9c	33,3± 17,4a	0±0b	43,3± 2,4a	8,7± 6,2d	7,0± 0,2d	0,0±0b
Б25Ки, ( <i>B.oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.)	0a	2,3± 1,3b	0,7± 1,3a	0a	0a	2,3±0, 7b	0a	0,3± 1,3a	0±2,3a	0±1,7a	0a	0a

Раф 1-3, ( <i>B.oleracea</i> var. <i>acephala</i> DC.)	0a											
---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Примечание: значения в строке, отмеченные строчными буквами (a, b, c, d, e), показывают разницу между вариантами в строке на уровне значимости  $P=0.05$ .

Частота эмбриогенеза у всех образцов растений рода *Brassica* в варианте среды без добавления цефотаксима значимо не различалась, и, следовательно, не зависела от времени инкубации в условиях температурного шока.

Увеличение частоты эмбриогенеза в два раза по сравнению с контролем у рапса Джаз наблюдали при культивации микроспор этого образца в течение 24 часов при  $32,5^{\circ}\text{C}$  в среде с добавлением 50 и 70 мг/л цефотаксима и при обработке 70 мг/л цефотаксима в течение 48 часов при  $32,5^{\circ}\text{C}$  (рис. 4). Различий в значении частоты эмбриогенеза по сравнению с контролем у рапса Фактор при инкубировании микроспор этого образца в течение 24 часов при  $32,5^{\circ}\text{C}$  в среде с добавлением 50 и 70 мг/л цефотаксима и при обработке 70 мг/л цефотаксима в течение 48 часов при  $32,5^{\circ}\text{C}$  не наблюдали. Наибольшее значение частоты эмбриогенеза у образцов рапса (Джаз и Фактор) было отмечено при культивации в среде, содержащей 50 мг/л цефотаксима в течение 48 часов ( $32,5^{\circ}\text{C}$ ).

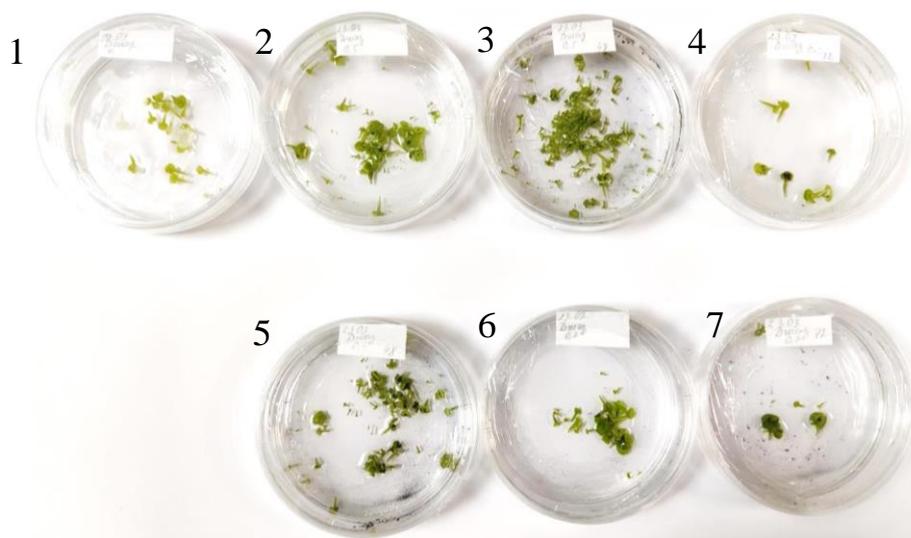


Рисунок 4 – Эмбриониды образца рапса Джаз на 30 день после изоляции, сформировавшиеся в различных вариантах опыта: 1) контроль; 2) 50 мг/л цефотаксима в течение 24 часов; 3) 50 мг/л цефотаксима в течение 48 часов; 4) 50 мг/л цефотаксима в течение 72 часов; 5) 70 мг/л цефотаксима в течение 24 часов; 6) 70 мг/л цефотаксима в течение 48 часов; 7) 70 мг/л цефотаксима в течение 72 часов

Появление единичных эмбрионидов неотзывчивого в контрольном варианте среды NLN-13 образца капусты белокочанной Б25Ки наблюдали после обработки с применением 50 мг/л, 70 мг/л цефотаксима в течение 24 часов (32,5°C) и 50 мг/л, 100 мг/л цефотаксима в течение 48 часов (32,5°C). Однако частота эмбриогенеза Б25Ки значительно отличалась от контроля только в вариантах обработки цефотаксимом в концентрации 50 мг/л в течение 24 и 48 часов в условиях температурного шока.

Концентрация цефотаксима 100 мг/л, а также культивация микроспор более 2 суток при 32,5°C в среде с цефотаксимом (50-100 мг/л) была избыточной и ингибировала эмбриогенез микроспор у всех изученных образцов. Образец капусты листовой Раф 1-3 был неотзывчивым во всех вариантах опыта.

Mineyukina et al. (2020) отмечают, что цефотаксим даже в минимальной концентрации (50 мг/л) ингибирует эмбриогенез в культуре микроспор *B. napus*, *B. oleracea* и *B. rapa*. Следует отметить, что в работе Mineyukina et al. (2020) культивация микроспор на среде с цефотаксимом велась до появления эмбрионидов, в нашей работе длительная обработка цефотаксимом (более 2 суток) и высокая концентрация (100 мг/л) также ингибировала эмбриогенез микроспор всех изученных образцов.

Изученный нами эффект применения антибиотика цефотаксима на частоту эмбриогенеза и дальнейшее формирование проростков из эмбрионидов сильно зависел от концентрации, времени обработки и вида капустной культуры. На это указывают и Ahmadi et al. (2014),

использовавшие ограниченное время обработки (1-3 суток) различными концентрациями цефотаксима (0-500 мг/л) в условиях температурного шока в культуре микроспор рапса. Лучшим вариантом для образцов рапса (Джаз и Фактор) в нашей работе была инкубация в условиях температурного шока в среде, содержащей 50 мг/л цефотаксима, в течение 48 часов, в то время как Ahmadí et al. (2014) для рапса рекомендуют 50 мг/л цефотаксима и 24 часа инкубации.

После инкубации в условиях иницирующего стресса в среде с цефотаксимом (50 мг/л) наблюдали индукцию эмбриогенеза образца капусты белокочанной Б25Ки, неотзывчивого в контрольном варианте среды, в то же время образец капусты листовой Раф 1-3 был неотзывчивым во всех вариантах опыта.

Полученные на среде с добавлением цефотаксима эмбриониды образца Б25Ки капусты белокочанной после пересадки на твердую питательную среду витрифицировались и не формировали проростки. При оценке прорастания эмбрионидов у образцов рапса Джаз и Фактор были выявлены различия частоты образования проростков и частоты прямого прорастания эмбрионидов в зависимости от времени обработки и концентрации цефотаксима в среде для инкубации микроспор (табл. 15).

Таблица 15 – Влияние цефотаксима в среде NLN-13 на получение растений-регенерантов рапса

Образец	Время обработки, ч	Концентрация цефотаксима, мг/л	Количество эмбрионидов, шт.	Частота образования проростков, %	Частота прямого прорастания, %
Джаз	24	0	58	61,2	19,2
		50	129	<b>91</b>	<b>59,6</b>
		70	111	70	27,4
	48	0	65	67,9	25
		50	435	<b>89,2</b>	<b>57,9</b>
		70	144	69,9	30
	72	0	52	53,3	24,1
		50	17	67,4	20,9
		70	12	53,3	30

Фактор	24	0	102	61	39,7
		50	117	<b>87,9</b>	<b>60</b>
		70	116	53,3	42,2
	48	0	120	69,9	39,7
		50	401	<b>91,7</b>	<b>58,8</b>
		70	100	54,2	32
	72	0	120	59,8	30,4
		50	26	50	27,9
		70	21	58,7	29,8

При различной продолжительности температурного шока значения частоты образования проростков и частоты прямого прорастания эмбриоидов варьировали от 53,3 до 67,9% и от 19,2 до 25% у образца Джаз, от 59,8 до 69,9% и от 30,4 до 39,7% у образца Фактор соответственно. Наибольшие значения частоты образования проростков, равные 91 и 89,2%, и частоты прямого прорастания эмбриоидов, равные 59,6 и 57,9%, у образца Джаз получили после инкубации микроспор в условиях температурного шока в среде с 50 мг/л цефотаксима в течение 24 и 48 часов соответственно. У образца Фактор наибольшие значения частоты образования проростков (87,9-91,7%) и частоты прямого прорастания эмбриоидов (58,8-60%) также были получены после инкубации микроспор в условиях температурного шока в среде с 50 мг/л цефотаксима в течение 24 и 48 часов.

Таким образом, установлено, что добавление в питательную среду NLN-13 цефотаксима (50 мг/л) на этапе теплового шока изолированных микроспор рапса (*B.napus* L.) в течение 1-2 суток с последующей заменой и культивированием микроспор на питательной среде NLN-13 (без цефотаксима) существенно (в 3-7 раз) повышает частоту эмбриогенеза, увеличивает частоту образования проростков до 91,7% и стимулирует прямое прорастание эмбриоидов на твердой питательной среде до 60%.

### 3.5 Изучение влияния совместного эффекта полиамина путресцина и теплового шока на частоту эмбриогенеза

Изучение влияния добавления полиамина путресцина в питательную среду во время прохождения теплового шока на частоту эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор проводили с использованием образца рапса Джаз (*B.napus*) и образца капусты белокочанной Б25Ки (*B.oleracea*). Микроспоры культивировали в среде NLN-13 без добавления путресцина и с добавлением 0,2 или 0,5 мг/л путресцина в течение 24 и 48 ч. при температуре 32,5°C, с последующей заменой питательной среды на NLN-13 (табл. 16).

Таблица 16 – Влияние путресцина в среде NLN-13 на частоту эмбриогенеза растений рода *Brassica*, шт./ч.Петри

Образец	Частота эмбриогенеза, шт./ч.Петри					
	Время температурной обработки при 32,5°C					
	24 часа			48 часов		
	Концентрация путресцина, мг/л					
	0	0,2	0,5	0	0,2	0,5
Б25 Ки, <i>B.oleracea</i>	0a	5,6±2,4b	2,3±1,7a	0a	1,6±1,7a	2,0±2,9a
Джаз, <i>B.napus</i>	48,3±3,5a	55,3±4,5a	53,3±12,0a	53,3±8,3a	53,3±7,7a	55,0±2,3a

Примечание: значения в строке, отмеченные строчными буквами (a, b), показывают разницу между вариантами в строке на уровне значимости  $P=0.05$ .

При добавлении путресцина в условиях температурного шока (0,2; 0,5 мг/л) в среде NLN-13 наблюдали появление эмбриоидов капусты белокочанной образца Б25Ки, неотзывчивого в контрольном варианте среды. При этом значимых отличий от контроля в частоте эмбриогенеза в вариантах среды с обработкой путресцином в концентрации 0,2 мг/л в течение 48 часов (32,5°C) и 0,5 мг/л в течение 24 и 48 часов (32,5°C) не было. Наибольшая частота эмбриогенеза образца Б25Ки была отмечена при культивации

микроспор в среде с путресцином в концентрации 0,2 мг/л при воздействии теплового шока (32,5°C) в течение 24 часов (рис. 5). Обработка путресцином не оказала существенного влияния на частоту эмбриогенеза микроспор образца рапса Джаз. Частота эмбриогенеза изученных образцов рапса и капусты белокочанной в варианте среды без путресцина не имела значимых различий и не зависела от времени инкубации в условиях теплового шока.



Рисунок 5 – Эмбриониды образца Б25Ки на 30 день после изоляции, сформировавшиеся в различных вариантах опыта: 1) контроль, температурный шок в течение 24 часов; 2) 0,5 мг/л путресцина в течение 24 часов; 3) 0,2 мг/л путресцина в течение 24 часов; 4) контроль, температурный шок в течение 48 часов; 5) 0,5 мг/л путресцина в течение 48 часов; 6) 0,2 мг/л путресцина в течение 48 часов

В работе Ahmadi et al. (2014) было отмечено, что высокая концентрация путресцина (более 1 мг/л) может ингибировать эмбриогенез микроспор, оптимальным вариантом является обработка микроспор рапса 0,2 мг/л путресцина в течение 48 часов. Однако в нашей работе добавление путресцина (0,2 и 0,5 мг/л) в сочетании с температурным шоком (32,5°C) не оказало значимого влияния на эмбриогенез микроспор рапса. Очевидно, что инкубация в среде с путресцином в концентрации не выше 0,5 мг/л эффективна не для всех образцов рапса. Инкубация в среде с путресцином

стимулировала эмбриогенез неотзывчивого в контрольном варианте среды образца капусты белокочанной: лучшим вариантом была самая низкая концентрация (0,2 мг/л) и самое короткое время обработки путресцином (24 часа) в сочетании с воздействием температуры 32,5°C.

Полученные на среде с путресцином эмбриониды капусты белокочанной Б25Ки после пересадки на среду В5 имели частоту образования проростков 73-79% и частоту прямого прорастания 34-41%, что выше, чем указано в работах других авторов (Klutschewski, 2012; Gu et al., 2014; Pilih et al., 2008). Существенных изменений в частоте образования проростков (73,9-75%) и частоте прямого прорастания эмбрионидов (25%) образца Джаз после культивации микроспор на среде с путресцином выявлено не было.

Таким образом, в нашей работе было показано, что инкубация микроспор при температуре 32,5°C в течение 24-48 часов в среде с концентрацией путресцина 0,2-0,5 мг/л не влияет на частоту эмбриогенеза, прорастание/регенерацию эмбрионидов рапса (*B.napus*), однако стимулирует эмбриогенез и способствует получению растений-регенерантов неотзывчивого при культивации микроспор по стандартной методике капусты белокочанной (*B.oleracea*).

### **3.6 Изучение влияния дисахаридов (мальтоза и сахароза), маннитола и теплового шока на частоту эмбриогенеза**

Изучение влияния замены питательной среды NLN-13 при инкубировании микроспор во время иницирующего стресса (32,5°C в течение 24 часов) раствором мальтозы (130 г/л), сахарозы (130 г/л) или маннитола (50 г/л), приготовленных растворением в дистиллированной воде с доведением рН до 5,8 перед стерилизацией автоклавированием, на частоту эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор проводили на 3 образцах капусты белокочанной (*B.oleracea*) Каптур, Б25Ки1-3, Кр3-10, одном образце капусты листовой (*B.oleracea*) Нагроз и одном образце рапса (*B.napus*) Джаз. Наблюдаемую частоту эмбриогенеза вариантов опыта сравнивали с частотой

эмбриогенеза в контрольном варианте – культивировании микроспор на среде NLN (130 г/л сахарозы, рН 5,8) для каждого из образцов (табл. 17).

Таблица 17. Влияние замены питательной среды NLN-13 при инкубировании микроспор во время иницирующего стресса (32,5°С в течение 24 часов) раствором мальтозы (130 г/л), сахарозы (130 г/л) или маннитола (50 г/л) на частоту эмбриогенеза микроспор растений рода *Brassica*

Образец	Частота эмбриогенеза, шт./ч.Петри			
	NLN-13	сахароза, 130 г/л	мальтоза, 130 г/л	маннитол, 50 г/л
Джаз ( <i>B.napus</i> )	5,3±1,7a	12,0±0,0b	0c	0c
Нагроз ( <i>B.oleracea</i> )	4,7±1,3a	3,7±0,7a	0b	0b
Каптур ( <i>B.napus</i> )	7,3±1,7a	6,7±2,4a	0b	0b
Б25Ки1-3 ( <i>B.oleracea</i> )	0a	0a	0a	0a
Кр3-10 ( <i>B.oleracea</i> )	0a	0a	0a	0a

Примечание: строчные буквы a, b, c - показывают разницу между вариантами в строке на уровне значимости  $P=0.05$ .

Значимых различий в частоте эмбриогенеза образцов капусты белокочанной Каптур и капусты листовой Нагроз при краткосрочной инкубации в растворе сахарозы или питательной среде выявлено не было. Частота эмбриогенеза образца рапса Джаз при инкубации во время температурного шока (24 часов) на растворе сахарозы была в 2,3 раза выше, чем при инкубации в среде NLN-13 (рис. 6).

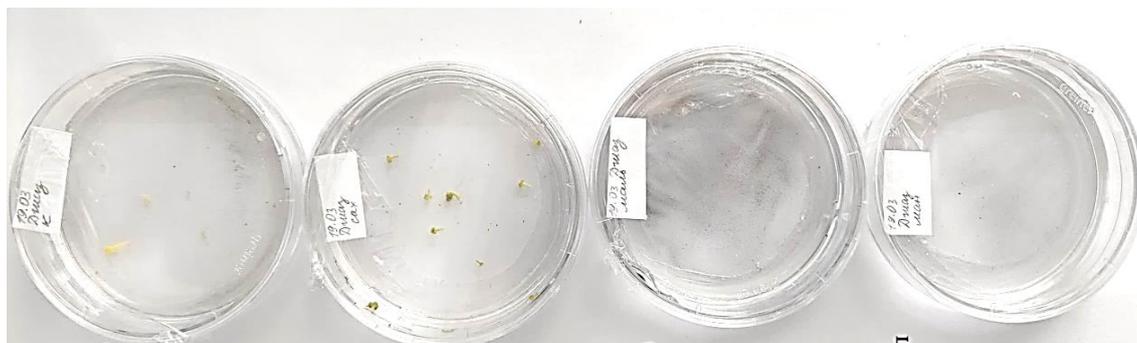


Рисунок 6 – Эмбриониды образца Джаз, сформировавшиеся на 30-й день культивирования в среде NLN-13 после инкубирования в течение 24 часов при 32,5°C, шт./ч.Петри в среде NLN-13 и растворах, содержащих сахарозу, мальтозу или маннитол (слева направо)

При инкубировании в условиях инициирующего стресса микроспор на растворах, содержащих мальтозу и маннитол, формирования эмбрионидов не происходило. Образцы капусты белокочанной Б25Ки1-3 и Кр3-10 были неотзывчивы как при прохождении микроспор теплового шока в растворах сахаров и маннитола, так и в среде NLN-13.

Культивирование в 0,3М (54,7 г/л) растворе маннитола во время инкубации при прохождении инициирующего стресса используется в культуре микроспор перца (*Capsicum annuum* L.) (Lantos et al., 2012). Отсутствие эмбриогенеза микроспор генотипов *Brassica*, отзывчивых в вариантах эксперимента с добавлением сахарозы, в растворе мальтозы указывает на преимущество использования сахарозы в качестве осмотика и источника углеводного питания в среде для культивации микроспор капустных культур. Это отличается от данных авторов, говорящих о преимуществе использования в питательной среде для культивации микроспор мальтозы по сравнению с другими типами сахаров (Cristea et al., 2013; Djatchouk et al., 2019).

Нами также была проведена оценка частоты образования проростков и частоты прямого прорастания эмбрионидов, полученных в контроле и при инкубации в растворе сахарозы, после пересадки на твердую питательную среду (табл. 18).

Таблица 18. Частота образования проростков и прямого прорастания эмбриоидов *Brassica*, сформировавшихся в растворе сахарозы (130 г/л), среде NLN-13 при обработке микроспор тепловым шоком (24 часа при 32,5°C)

Образец	Количество эмбриоидов, шт.		Частота образования проростков, %		Частота прямого прорастания, %	
	NLN-13	сахароза, 130 г/л	NLN-13	сахароза, 130 г/л	NLN-13	сахароза, 130 г/л
Джаз	16a	36b	67,9	58,3	25	23,9
Нагроз	14a	11a	0	0	0	0
Каптур	22a	20a	63,6	55	21,2	30

Примечание: строчные буквы *a*, *b* - показывают разницу между вариантами в строке на уровне значимости  $P=0.05$ .

Частота образования проростков и частота прямого прорастания на среде В5 эмбриоидов, сформировавшихся из микроспор, инкубированных во время температурного шока в среде NLN-13 или растворе сахарозы, находились на одном уровне. У образцов рапса и капусты белокочанной в эксперименте частота образования проростков варьировала от 58,3 до 67,9% и от 55 до 63,6% соответственно, а частота прямого прорастания – от 23,9 до 25% и от 21,2 до 30%. Растений-регенерантов образца капусты листовой генотипа Нагроз получено не было.

У полученных в культуре микроспор растений-регенерантов капусты белокочанной и рапса была проведена оценка плоидности (табл. 19).

Таблица 19. Плоидность растений-регенерантов рода *Brassica*, полученных из эмбриоидов, сформировавшихся в растворе сахарозы (130 г/л), среде NLN-13, при обработке микроспор тепловым шоком (24 часа при 32,5°C)

Образец	Вариант среды	Всего растений, шт.	Гаплоиды		Диплоиды		Тетраплоиды	
			Число, шт.	Частота, %	Число, шт.	Частота, %	Число, шт.	Частота, %
Джаз	NLN-13	9	7	77,8	2	22,2	0	0
	сахароза, 130 г/л	21	14	66,7	7	33,3	0	0
Каптур	NLN-13	14	0	0	14	100	0	0
	сахароза, 130 г/л	11	1	9,1	10	90,9	0	0

Частота спонтанного удвоения гаплоидов, сформировавшихся из эмбриоидов, полученных из микроспор, инкубированных во время температурного шока в среде NLN-13 или растворе сахарозы, находилась на одном уровне. У образца рапса Джаз доля удвоенных гаплоидов (УГ) в контрольном варианте и при инкубации в растворе сахарозы составили 22,2 и 33,3% соответственно; у капусты белокочанной Каптур – 100 и 90,9% соответственно. Однако за счет разницы в частоте эмбриогенеза в разных вариантах опыта количество растений-регенерантов и, следовательно, УГ рапса Джаз, полученных после инкубации микроспор в течение 24 часов в растворе сахарозы при 32,5°C, было в 2 раза выше, чем после культивации микроспор в среде NLN.

Таким образом, показано, что инкубирование микроспор рапса (*B. napus* L.) при температуре 32,5°C в течение 24 часов в 13% растворе мальтозы и 5% растворе маннитола полностью ингибирует эмбриогенез микроспор, а инкубирование микроспор в растворе сахарозы (130 г/л) во время тепловой обработки (32,5°C; 24 часа) увеличивает частоту эмбриогенеза и конечный выход УГ рапса (в 2,3 и 2 раза соответственно), но не оказывает значимого влияния на частоту эмбриогенеза и конечный выход УГ капусты белокочанной и листовой. Из этого следует, что инкубирование микроспор в растворе сахарозы (130 г/л) на этапе воздействия теплового шока (32,5°C; 24 часа) не повышает частоту эмбриогенеза микроспор всех испытанных растений *Brassica*, не приводит к увеличению выхода растений УГ, соответственно, не может быть рекомендовано как элемент технологии.

### **3.7 Изучение эмбриогенного ответа *B. oleracea* на изоляцию, очистку и тепловой шок микроспор в растворе сахарозы 130 г/л**

Изучение влияния на эмбриогенез сочетания изоляции, очистки и культивации микроспор в течение теплового шока в растворе 130 г/л сахарозы было проведено на 7 образцах капусты белокочанной (*B. oleracea*) МФ4хМЦ)М1х(МФ4х15)1-2, Ларсия, Каптур, 101ф3х15дг1, Гэс2рхк)4-4,

Гэс2рх(гес2рх15ца)4)31, Гэс2р-15-5)4-3. В ходе эксперимента мы заменили среду В5, включающую 130 г/л сахарозы, 50 г/л маннитола, рН 5,8 для выделения и очистки микроспор, а так же среду NLN-13 на этапе инкубации микроспор в условиях инициирующего стресса (48 ч. при 32,5°C) на 13%-ный раствор сахарозы с рН 5,8. Полученные результаты сравнивали с частотой эмбриогенеза микроспор изолированных, очищенных по стандартному протоколу: изоляция и очистка – в среде В5 (130 г/л сахарозы, 50 г/л маннитола и рН 5,8) с последующей инкубацией в условиях инициирующего стресса на среде NLN-13 (130 г/л сахарозы, рН 5,8) (табл. 20).

Таблица 20. Эмбриогенный ответ капусты белокочанной (*B. oleracea*) на изоляцию, очистку и тепловой шок микроспор в растворе сахарозы (130 г/л)

Образец	Частота эмбриогенеза, шт./ч.Петри	
	NLN-13	сахароза, 130 г/л
МФ4хМЦ)М1х(МФ4х15)1-2	4,0±1,2a	5,0±0,7a
Ларсия	4,7±3,3a	5,0±1,9a
Каптур	6,7±0,7a	6,3±2,6a
101ф3х15дг1	29,0±2,3a	30,0±1,1a
Гэс2рхк)4-4	22,0±7,4a	21,0±4,5a
Гэс2рх(гес2рх15ца)4)31	0,0a	0,0a
Гэс2р-15-5)4-3	0,0a	0,0a

*Примечание: строчные буквы показывают разницу между вариантами в строке на уровне значимости P=0.05*

Установлено отсутствие значимых различий в частоте эмбриогенеза у образцов капусты белокочанной при изоляции с последующим инкубированием в условиях инициирующего стресса в 13% растворе сахарозы и питательной среде NLN-13 (рис. 7). Образцы капусты белокочанной Б25Ки1-3 и Кр3-10 были неотзывчивы как при культивации микроспор по стандартной методике, так и при изоляции и краткосрочной инкубации микроспор в растворе сахарозы.

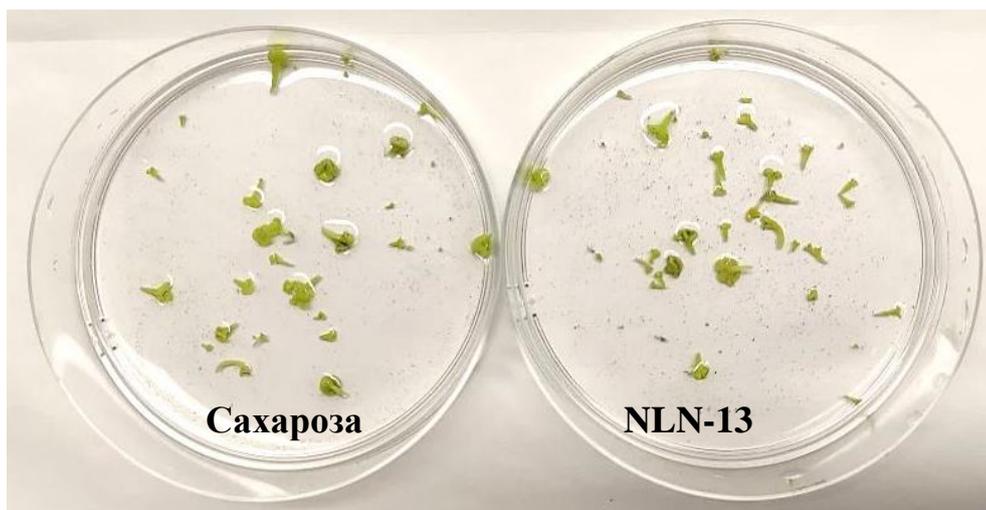


Рисунок 7 – Эмбриониды образца 101ф3х15дг1 (*B.oleracea*), сформировавшиеся на 30-й день после изоляции, очистки и инкубации 48 часов при 32,5 °С, шт./ч.Петри: в среде NLN-13;13% растворе сахарозы

Для каждого из отзывчивых образцов частота образования проростков и частота прямого прорастания на среде В5 эмбрионидов, сформировавшихся из микроспор, изолированных и инкубированных во время температурного шока в растворе сахарозы, и эмбрионидов, полученных в культуре микроспор по стандартной методике, находились на одном уровне (табл. 21).

Таблица 21. Влияние изоляции, очистки и теплового шока микроспор в растворе сахарозы (130 г/л) на частоты образования проростков и прямого прорастания эмбрионидов капусты белокочанной

Образец	Количество эмбрионидов		Частота образования проростков		Частота прямого прорастания	
	NLN-13	сахароза, 130 г/л	NLN-13	сахароза, 130 г/л	NLN-13	сахароза, 130 г/л
МФ4хМЦ)М1х (МФ4х15)1-2	12	11	33,3	45,5	25	27,3
Ларсия	12	15	50	46,7	33,3	26,7
Каптур	20	19	55	68,4	10	21,1
101ф3х15дг1	87	90	45,9	37,8	21,8	27,8
Гэс2рхк)4-4	66	63	34,8	30,2	10,6	12,6

Частота образования проростков из эмбриоидов варьировала в зависимости от образца, и, в среднем, в варианте с 13% раствором сахарозы составила 45,72%, а при культивации по стандартной методике – 43,8%. Частота прямого прорастания эмбриоидов в эксперименте не превышала 33,3%, среднее значение при культивации по стандартной методике было равно 20,14%, а в варианте с сахарозой – 23,1%. Наименьшие значения частоты прямого прорастания наблюдали у образца Гэс2рхк)4-4 при культивации по стандартной методике и в варианте с сахарозой (10,6% и 12,6% соответственно) и у образца Каптур при культивации по стандартной методике (10%). При этом в варианте с сахарозой частота прямого прорастания образца Каптур составила 21,1%.

В популяциях растений-регенерантов, сформировавшихся из эмбриогенных проростков образцов капусты белокочанной МФ4хМЦ)М1х(МФ4х15)1-2, Ларсия, Каптур, 101ф3х15дг1 и Гэс2рхк)4-4 была проведена оценка ploидности. Доли гаплоидов, диплоидов и тетраплоидов установили как для контрольного варианта с использованием стандартной методики, так и для варианта с изоляцией и инкубацией микроспор 48 часов при 32,5°C в растворе сахарозы (табл. 22).

Таблица 22. Влияние изоляции, очистки и теплового шока микроспор в растворе сахарозы (130 г/л) на ploидность растений-регенерантов капусты белокочанной

Образец	Вариант среды	Всего растений	Гаплоиды		Диплоиды		Тетраплоиды	
			Шт.	Частота, %	Шт.	Частота, %	Шт.	Частота, %
МФ4хМЦ)М1х(МФ4х15)1-2	NLN-13	4	0	0	4	100	0	0
	сахароза, 130 г/л	5	0	0	5	100	0	0
Ларсия	NLN-13	6	0	0	6	100	0	0
	сахароза, 130 г/л	7	0	0	7	100	0	0
Каптур	NLN-13	11	1	9,1	10	90,9	0	0
	сахароза, 130 г/л	13	1	7,7	12	92,3	0	0

101ф3х15 дг1	NLN-13	40	1	2,5	36	90	3	7,5
	сахароза, 130 г/л	34	2	5,9	32	94,1	0	0
Гэс2рхк)4 -4	NLN-13	23	0	0	23	100	0	0
	сахароза, 130 г/л	19	0	0	19	100	0	0

Частота спонтанного удвоения гаплоидов, сформировавшихся из эмбриоидов, полученных из микроспор, изолированных, очищенных и инкубированных во время температурного шока в 13% растворе сахарозы, и эмбриоидов, полученных в культуре микроспор по стандартной методике варьировала от 90 до 100% и было одинаковым (100%) у образцов МФ4хМЦ)М1х(МФ4х15)1-2, Ларсия и Гэс2рхк)4-4. У образца 101ф3х15дг1 при культивации по стандартной методике было отмечено появление тетраплоидов, а в варианте с раствором сахарозы тетраплоидов выявлено не было.

Известно, что в качестве промывочной среды возможно использовать среду 1/2 В5-13 (жидкая среда В5 с половинной концентрацией макроэлементов и содержащая 13% сахарозы) и В5-11(жидкая среда В5, содержащая 11% сахарозы). Другие группы исследователей для промывки микроспор применяли среды NLN-13, ВМ-13 и Nitsch Nitsch, содержащие 13% сахарозы (Dong et al., 2021). При этом использование В5-13, В5-11, 1/2 В5-13 и NLN-13 не оказывало существенного влияния на индукцию эмбриогенеза микроспор растений рода *Brassica*.

Использование питательной среды NLN-13 для выделения и очистки микроспор делает технологию производства удвоенных гаплоидов более трудоемкой и дорогостоящей, так как используется холодная фильтро-стерилизация питательной среды. Выделение и очистка микроспор с использованием питательной среды В5 с добавлением маннитола менее трудоемко и менее затратно, чем использование среды NLN-13, так как для ее стерилизации используется автоклавирование и не требуется

использование дорогостоящих одноразовых стерильных фильтров и шприцов.

В среднем выделение и очистка микроспор одного образца с использованием питательной среды B5 (Gamborg et al., 1968) обходится в 33-35 рублей, с использованием питательной среды NLN-13 – 37-40 руб., с использованием 13%-го раствора сахарозы – 13-15 руб. За счет замены дорогостоящих питательных сред 13%-м раствором сахарозы можно снизить затраты этапов выделения, очистки микроспор и индукции эмбриогенеза микроспор на 70%. При этом очистка микроспор и индукция эмбриогенеза микроспор капусты белокочанной в 13% растворе сахарозы, рН 5,8, не оказывает негативного влияния на частоту эмбриогенеза микроспор и конечный выход УГ капусты белокочанной.

Таким образом, установлено, что использование 13%-го раствора сахарозы вместо среды B5 на этапе изоляции и очистки микроспор и вместо среды NLN-13 на этапе теплового шока не приводит к снижению частоты эмбриогенеза, частоты образования проростков, частоты спонтанной диплоидизации, соответственно, не приводит к снижению выхода удвоенных гаплоидов капусты белокочанной в культуре изолированных микроспор по сравнению со стандартным протоколом. Это позволяет существенно снизить трудоемкость и расход химических реактивов при производстве удвоенных гаплоидов *Brassica* в культуре изолированных микроспор.

### **3.8 Изучение влияния условий культивирования эмбриоидов при пониженной температуре в темноте**

С целью стимуляции прямого прорастания эмбриоидов и сокращения сроков подготовки проростков *in vitro* к пересадке в грунт и адаптации было изучено сочетание воздействия низкой положительной температуры и темноты на прорастание эмбриоидов, регенерацию проростков (Синицына, 2021). Для этого морфологически зрелые эмбриоиды семядольной стадии развития капусты кольраби, линии (Кор17×Кор2фКи)2–1, пересаживали на

твердую среду В5 и культивировали в климатической комнате при 24°C в течение 3, 6 дней в полной темноте, а также в холодильной камере при температуре 5°C в течение 3, 6, 9, 12 или 15 дней в полной темноте. Частоту прямого прорастания эмбриоидов и регенерации проростков оценивали на 30-й и 45-й дни культивирования подсчетом числа нормально развитых и готовых к пересадке в грунт проростков. И сравнивали с контролем без холодной предобработки и культивированием эмбриоидов на свету сразу после пересадки их на среду для регенерации (табл. 23).

Таблица 23. Влияние обработки морфологически зрелых эмбриоидов низкой положительной температурой (5°C) в темноте на частоту прямого прорастания и регенерации проростков капусты кольраби

Условия эксперимента, число дней культивирования	Всего эмбриоидов, шт.	Число эмбриоидов с прямым прорастанием, шт.		Частота прямого прорастания, %	Общее число проростков, шт.	Частота образования проростков, %
		на 30 день	на 45 день			
0 (контроль)	36	10	16	44,4a	26	72,2a
3(24°C)	36	0	13	36,1a	19	52, 8b
6(24°C)	36	0	15	41,7a	17	47,2b
3(5°C)	36	26	31	<b>86,1b</b>	<b>34</b>	<b>94,4c</b>
6(5°C)	36	23	33	<b>91,7b</b>	<b>35</b>	<b>97,2c</b>
9(5°C)	36	21	32	<b>88,9b</b>	<b>35</b>	<b>97,2c</b>
12(5°C)	36	0	9	25,0c	24	66, 7a
15(5°C)	36	0	5	7,2d	26	72, 2a

Примечание: строчные буквы a, b, c, d - показывают разницу между вариантами в столбце на уровне значимости  $P=0.05$ .

При культивации эмбриоидов в темноте без холодной обработки в течение 3 и 6 дней частота прямого прорастания составила 36,11 и 41,67% соответственно и значимо не отличалась от контроля. Воздействие на эмбриоиды после пересадки на твердую среду температуры в 5°C в сочетании с отсутствием света на протяжении 3, 6 и 9 дней увеличило частоту прямого прорастания эмбриоидов с 44,44 до 86,11-91,67% по сравнению с контролем. При этом значимые различия между частотой прямого прорастания эмбриоидов при холодной обработке сроком 3-9 дней не наблюдались.

Более длительная культивация при 5°C в темноте сроком 12 и 15 дней привела к уменьшению частоты прямого прорастания эмбриоидов и сдвинула сроки пересадки растений в грунт на 15 дней по сравнению с холодной обработкой без света в течение 3-9 дней и контролем. Частота прямого прорастания эмбриоидов при 15 днях холодной обработки в темноте составила 7,5%, что было значительно меньше, чем 25% при 12 днях такой обработки (рис. 8).



Рисунок 8. Проростки, полученные из эмбриоидов после холодной обработки при 5°C образца (Кор17хКор2фКи)2-1 на 3-й неделе культивации

Воздействие холодом повлияло на длительность периода культивации эмбриоидов и сроки пересадки растений-регенерантов в почвенный субстрат. После 30 дней культивирования в почвенный субстрат было пересажено больше половины саженцев, полученных из эмбриоидов со сроками холодной обработки в темноте 3, 6, 9 дней и контроля. На 45-й день саженцы, полученные при прямом прорастании эмбриоидов, подвергавшихся воздействию холода в сочетании с темнотой сроком 3-9 дней, и контроль

были полностью адаптированы к нестерильным условиям среды. Пересадка в почвенный субстрат саженцев, полученных из прямо проросших эмбриоидов, находившихся при 5°C 12 и 15 дней и при 24°C 3 и 6 дней в отсутствие света, происходила однократно на 45-й день культивирования. Окончательно растения-регенеранты данного образца капусты кольраби были адаптированы через 70 дней после начала культивирования эмбриоидов на твердой питательной среде.

При изучении влияния холодовой обработки и темноты для каждого из вариантов опыта и контроля нами было использовано по 36 эмбриоидов образца (Кор17×Кор2фКи)2–1 и всего было получено 216 растений-регенерантов. Наибольшую частоту образования проростков (94,4-97,2%) наблюдали у эмбриоидов после холодовой обработки в темноте сроком 3, 6, 9 дней. Частота образования проростков из эмбриоидов, культивируемых при 5°C 12 и 15 дней была сопоставима с контролем и составила 66,7-72,2%. Меньше всего растений-регенерантов сформировалось из эмбриоидов, культивируемых в темноте при 24°C – 17 и 19 шт., частота образования проростков составила 47,2-52,8% (Синицына, 2021).

Работы многих авторов свидетельствуют о возможности стимуляции прямого прорастания эмбриоидов рапса при холодовой обработке низкой положительной температурой 1-10°C в течение 3-14 дней (Zhou et al., 2002; Gu et al., 2004). Стимуляция прямого прорастания эмбриоидов посредством холодовой обработки может быть связана с тем, что низкие температуры вызывают обезвоживание клеток, необходимое для органогенеза эмбриоидов (Chinnusamy et al., 2007; Fei et al., 2007).

В нашем исследовании у эмбриоидов образца капусты кольраби (Кор17×Кор2фКи)2–1, культивируемых в темноте при температуре 5°C в течение 3, 6 и 9 дней, частота прямого прорастания эмбриоидов увеличилась в два раза по сравнению с контролем. Более длительная культивация при 5°C в темноте сроком 12 и 15 дней привела к снижению частоты прямого

прорастания эмбрионов в 2 и 6 раз соответственно по сравнению с контролем. Очевидно, в отличие от рапса, для капусты кольраби холодная обработка (5°C) в темноте сроком более 9 дней является избыточной и оказывает ингибирующее влияние на прямое прорастание эмбрионов.

Продолжительность воздействия холодом в темноте повлияла и на сроки пересадки растений-регенерантов в почвенный субстрат. Растения-регенеранты, полученные из эмбрионов после культивации в темноте в течение 3, 6 дней и холодной обработки в темноте 12 и 15 дней, были готовы к адаптации на 15 дней позже, чем саженцы со сроками холодной обработки без света 3, 6, 9 дней и контроль. Таким образом, культивация в темноте и культивация в темноте при 5°C более 9 дней увеличивает время прорастания эмбрионов. Задержку побегообразования на 8–9 дней при культивировании эмбрионов в темноте в течение 15 дней также отмечает Asif et al. (2001).

Частота образования проростков и частота прямого прорастания эмбрионов капусты кольраби при холодной обработке (5 °C) в темноте 3, 6, 9 дней были сопоставимы и значимо превосходили контроль. Следовательно, оптимальным можно считать срок от 3 до 6 дней, требующий использования минимума ресурсов и достаточный для стимуляции прямого пути развития эмбрионов капусты кольраби.

Таким образом, показано, что обработка низкими положительными температурами (5°C) эмбрионов кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes* L.) в полной темноте в течение 3, 6, 9 дней увеличивает частоту их прямого прорастания в 2 раза по сравнению с культивацией эмбрионов при 24°C с фотопериодом 16/8 час. день/ночь (контроль) и при 24°C в темноте, при этом частота образования проростков достигла 94,4-97,2%.

Выявлено, что культивация эмбрионов в темноте при 24°C в течение 3, 6 дней не влияет на частоту их прямого прорастания по сравнению с контрольным вариантом, однако влечет снижение частоты образования

проростков до 47,2%. Обработка низкими положительными температурами (5°C) в течение 12 и 15 дней снижает частоту прямого прорастания в 1,8 и 6,2 раза соответственно, при этом частота образования проростков остается на уровне стандартной методики.

## Заключение

В результате анализа генотипспецифичности эмбриогенной отзывчивости в культуре изолированных микроспор отмечено, что гомозиготные генотипы (ЛУГ, инбредные линии) и гетерозиготные генотипы (F1-гибриды, линии высокой степени гетерозиготности) капусты белокочанной (*B.oleracea*) имеют равное соотношение высоко и средне отзывчивых к низко и неотзывчивым образцам, 27,3/72,7% и 24,5/75,5%, соответственно; соотношение отзывчивых генотипов к неотзывчивым по каждой группе также имело сходство – 63,6/36,4% для группы гомозиготных и 50/50% для группы гетерозиготных генотипов. При этом степень эмбриогенной отзывчивости изученных коллекций образцов видов и подвидов *Brassica* в целом соответствует данным по отзывчивости растений *B. napus*, *B.oleracea* var. *capitata*, var. *gongylodes*, var. *italica* в ранее проведенных исследованиях других авторов.

Показано, что частота образования проростков из эмбриоидов растений рода *Brassica* зависит от генотипа и варьирует от 57,9% до 81,7%. Установлено, что прямое прорастание характерно для морфологически зрелых эмбриоидов, показана высокая положительная связь ( $r=0,87$ ) числа морфологически зрелых эмбриоидов с числом эмбриоидов, прорастающих прямым путем. В результате исследования установлена максимальная частота прямого прорастания эмбриоидов на уровне 62,1% для капусты брокколи (*B.oleracea* var. *italica*), в тех же условиях частота прямого прорастания у капусты белокочанной (var. *capitata*), кольраби (var. *gongylodes*) и рапса (*B.napus*) варьировала от 19,3% до 31,9%.

Выявлено, что в среде NLN-13 с антиоксидантами (аскорбат, 20 мг/л и глутатион, 20 мг/л) жизнеспособность изолированных микроспор капусты белокочанной через 7 дней культивирования на 20% выше по сравнению с жизнеспособностью микроспор, культивируемых в стандартной (контрольной) среде. При этом добавление в питательную среду глутатиона

(20 мг/л) влечет существенное (в 1,7 раза) повышение частоты микроспорогенного эмбриогенеза отзывчивых генотипов и способствует эмбриогенезу неотзывчивого генотипа *B.oleracea*.

Добавление в питательную среду NLN-13 антибиотика цефотаксима (50 мг/л) на этапе теплового шока изолированных микроспор рапса (*B.napus* L.) в течение 1-2 суток с последующей заменой и культивированием микроспор на питательной среде NLN-13 (без цефотаксима) существенно (в 3-7 раз) повышает частоту эмбриогенеза, увеличивает частоту образования проростков до 91,7% и стимулирует прямое прорастание эмбриоидов на твердой питательной среде до 60%.

Показано, что инкубирование микроспор при температуре 32,5°C в течение 24-48 часов в среде с 0,2-0,5 мг/л полиамина путресцина не влияет на частоту эмбриогенеза, прорастания/регенерации эмбриоидов рапса (*B.napus*), однако стимулирует эмбриогенез и способствует получению растений-регенерантов генотипа капусты белокочанной (*B.oleracea*) неотзывчивого к эмбриогенезу при культивации микроспор по стандартной методике.

Установлено, что инкубирование микроспор рапса (*B. napus* L.) при температуре 32,5°C в течение 24 часов в 13% растворе мальтозы и 5% растворе маннитола полностью ингибирует эмбриогенез микроспор, а инкубирование микроспор в растворе сахарозы (130 г/л) во время тепловой обработки (32,5°C; 24 часа) увеличивает частоту эмбриогенеза и конечный выход УГ рапса (в 2,3 и 2 раза соответственно), но не оказывает значимого влияния на частоту эмбриогенеза и конечный выход УГ капусты белокочанной и листовой.

Выявлено, что использование 13%-го раствора сахарозы вместо среды В5 на этапе изоляции и очистки микроспор и вместо среды NLN-13 на этапе теплового шока не приводит к снижению частоты эмбриогенеза, частоты образования проростков, частоты спонтанной диплоидизации, а также к

снижению выхода удвоенных гаплоидов капусты белокочанной в культуре изолированных микроспор по сравнению со стандартным протоколом.

Показано, что обработка низкими положительными температурами (5°C) эмбриоидов кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes* L.) в полной темноте в течение 3, 6, 9 дней увеличивает частоту их прямого прорастания в 2 раза по сравнению с культивацией эмбриоидов при 24°C с фотопериодом 16/8 ч. день/ночь (контроль) и при 24°C в темноте, при этом частота образования проростков достигает 94,4-97,2%.

#### *Рекомендации производству*

1. В производстве линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной в культуре изолированных микроспор для повышения частоты эмбриогенеза культивируемых микроспор рекомендуется использовать среду NLN-13 с добавлением 20 мг/л глутатиона.

2. В производстве линий удвоенных гаплоидов рапса в культуре изолированных микроспор для повышения частоты эмбриогенеза культивируемых микроспор и прямого прорастания сформировавшихся эмбриоидов рекомендуется во время теплового шока (32,5±0,1°C в течение 48 ч.) использовать среду NLN-13, содержащую 50 мг/л цефотаксима.

3. В производстве линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной в культуре изолированных микроспор для изоляции, очистки и инкубирования микроспор в условиях иницирующего стресса (32,5±0,1°C в течение 48 ч.) рекомендуется использование 13% раствора сахарозы, что позволяет существенно снизить трудоемкость и расход химических реактивов.

4. В производстве линий удвоенных гаплоидов капусты кольраби в культуре изолированных микроспор для стимуляции прорастания эмбриоидов рекомендуется использовать обработку низкими положительными температурами (5°C) в течение 3-6 дней.

## Список сокращений

г. – год

гг. – годах

д.в. – действующее вещество

ч. – часы

УГ – удвоенные гаплоиды

ЛУГ – линии удвоенные гаплоиды

КИМ – культура изолированных микроспор

об./мин. – оборотов в минуту

мм – миллиметры

см – сантиметры

мл – миллилитры

мкл – микролитры

мин. – минута

сек. – секунда

бут. – бутоны

г/л – грамм на литр

мг/л – миллиграмм на литр

М – моль

мкМ – микромоль

ч.Петри – чашка Петри

шт. – штуки

r – коэффициент корреляции

## Библиографический список

1. Байдина, А. В. Оптимизация культуры изолированных микроспор и оценка комбинационной способности линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной: автореф. на соиск. ученой степ. канд. с.-х. наук: 06.01.05 / А. В. Байдина // М. – 2018. – С 21.
2. Май, Д. Ч. Совершенствование технологии получения гаплоидных и дигаплоидных растений рапса (*Brassica napus* L.) и белокочанной капусты (*Brassica oleracea* L.) *in vitro*: Автореф. дис ...канд биол. наук. – /РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. – М., 2010. – 23 с.
3. Минейкина, А. И. Оценка устойчивости гибридных комбинаций капусты белокочанной, созданных на основе линий удвоенных гаплоидов к *plasmiodiophora brassicae* wor. / А. И. Минейкина, А. А. Ушаков, Л. Л. Бондарева // Овощи России. – 2016. – № 2(31). – С. 90-93.
4. Минейкина, А. И. Создание исходного материала капусты белокочанной с использованием современных методов селекции: автореф. на соиск. ученой степ. канд. с.-х. наук: 06.01.05 / А. И. Минейкина // М. – 2018. – С. 21.
5. Монахос, С. Г. Интеграция современных биотехнологических и классических методов в селекции овощных культур: дис. доктора. с.-х. наук : 06.01.05, 03.02.07 / С. Г. Монахос. – М., 2015. – 335 с.
6. Муравлёв, А. А. Культура пыльников в селекции ярового рапса: автореф. на соиск. ученой степ. канд. с.-х. наук: 06.01.05 / А. А. Муравлёв // Саратов – 2007. – С 21.
7. Пивоваров, В. Ф. Создание гибридов капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L. convar. *Capitata* var. *Alba* DC) нового поколения с использованием линий удвоенных гаплоидов / В. Ф. Пивоваров, Л. Л. Бондарева, Н. А. Шмыкова, Д. В. Шумилина, А. И. Минейкина // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 52. – № 1. – С. 143-151.

8. Сеницына, А.А. Влияние условий культивирования на частоту прорастания/регенерации микроспорогенных эмбрионов *Brassica oleracea* L. = Effect of cultivation conditions on the germination/regeneration frequency of microsporogenic embryos *Brassica oleracea* L. / А.А. Сеницына, А.В. Вишнякова, А.А. Александрова, С.Г. Монахос // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy: Научно-теоретический журнал Российского государственного аграрного университета - МСХА имени К.А. Тимирязева. – 2021. – № 5.

9. Сеницына, А.А. Сравнительная оценка выхода удвоенных гаплоидов *Brassica oleracea* var. *capitata* L. и *Brassica napus* L. в культуре изолированных микроспор / А.А.Сеницына, А.В.Вишнякова, С.Г. Монахос// Картофель и овощи. – 2022. – №4. – С. 13-16.

10. Шмыкова, Н. А. Получение удвоенных гаплоидов у видов рода *Brassica* L. / Н. А. Шмыкова, Д. В. Шумилина, Т. П. Супрунова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – № 19(1). – С. 111-120.

11. Шумилина, Д. В. Влияние генотипа и компонентов среды на эмбриогенез в культуре микроспор капусты китайской *Brassica rapa* ssp. *chinensis* сорта Ласточка / Д. В. Шумилина, Н. А. Шмыкова, Л. Л. Бондарева, Т. П. Супрунова // Известия Российской академии наук. Сер. Биологическая. – 2015. – № 4. – С. 368-375.

12. Abraha, E. Analysis of factors affecting embryogenesis in microspore cultures of *Brassica carinata* / E. Abraha, M. Bechyn, M. Klíma, M. Vyvadilová //Agr Trop Subtrop. – 2008. – № 41(2). – P. 53-59.

13. Ahmadi, B. Efficient induction of microspore embryogenesis using abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid in *Brassica napus* L. / B. Ahmadi, M.E. Shariatpanahi, J.A.T.D. Silva // Plant Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2014b. – № 116(3). – P. 343–351. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0408-x>

14. Ahmadi, B. Enhanced regeneration of haploid plantlets from microspores of *Brassica napus* L. using bleomycin, PCIB, and phytohormones / B.

Ahmadi, K. Alizadeh, J.A.T. Silva // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2012. – №109(3). – P. 525–533. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0119-8>

15. Ahmadi, B. Improved microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration using putrescine, cefotaxime and vancomycin in *Brassica napus* L. / B. Ahmadi, M. E. Shariatpanahi, M. A. Ojaghkandi, A. A. Heydari // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2014a. – № 118(3). – P. 497-505.

16. Ahmadi, B. Proline and chitosan enhanced efficiency of microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration in *Brassica napus* L. / B. Ahmadi, M. E. Shariatpanahi // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2015. – № 123(1). – P. 57-65.

17. Ait, B. E. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea* / B. E. Ait, P. Eullaffroy, C. Clément, G. Vernet // Plant Cell Rep. – 2004. – № 22. – P. 608-614.

18. Arnison, P. G. A survey of the anther culture response of *Brassica oleracea* L.cultivars grown under field conditions / P. G. Arnison, W. A. Keller // Plant Breeding. – 1990. – № 104. – P. 125-133.

19. Asif, M. Cefotaxime prevents microbial contamination and improves microspore embryogenesis in wheat and triticale / M. Asif, F. Eudes, H. Randhawa, E. Amundsen, J. Yanke, D. Spaner // Plant Cell Rep. – 2013. – № 32. – P. 1637-1646.

20. Ata, A. Effects of season, genotype, and nutrient medium on pepper anther culture and microspore development / A. Ata, D. Keleş, H. Taşkin, S. Büyükalaca // Turk J Agric For. – 2019. – № 43. – P. 123-137.

21. Banik, R. M. Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential / R. M. Banik, B. Kanari, S. N. Upadhyay // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – № 16. – P. 407-414.

22. Barinova, J. Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH / J. Barinova, C. Clement,

L. Marting, F. Baillieul, H. Soukupova, E. Heberle-Bors, A. Touraev // *Planta*. – 2004. – № 219. – P. 141-146.

23. Bertoldi, D. Polyamines and somatic embryogenesis in two *Vitis vinifera* cultivars / D. Bertoldi, A. Tassoni, L. Martinelli, N. Bangi // *Physiol. Plant*. – 2004. – № 120. – P. 657-666.

24. Bhatia, R. Efficient microspore embryogenesis in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) for development of plants with different ploidy level and their use in breeding programme / R. Bhatia, S. S. Dey, S. Sood, K. Sharma, C. Parkash, R. Kumar // *Scientia Horticulturae*. – 2017. – № 216. – P. 83-92. DOI: 10.1016/j.scienta.2016.12.020

25. Bhatia, R. Modification of important factors for efficient microspore embryogenesis and doubled haploid production in field grown white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) genotypes in India / R. Bhatia, S.S. Dey, S. Sood, C. Parkash, K. Sharma, S. Sood, R. Kumar // *Sci Hortic*. – 2018. – № 233. – P. 178–187 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.017>

26. Cao, M. Q. Embryogenesis and plant regeneration of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) via *in vitro* isolated microspore culture / M. Q. Cao, Y. Li, F. Liu // *Dore Plant Cell Rep*. – 1994. – № 13 – P. 447-450.

27. Ceasar, S. A. Effects of cytokinins, carbohydrates and amino acids on induction and maturation of somatic embryos in kodo millet (*Paspalum scorbiculatum* Linn.) / S. A. Ceasar, S. Ignacimuthu // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2010. – № 102. – P. 153-162.

28. Cecchini, N. M. Proline dehydrogenase is a positive regulator of cell death in different kingdoms / N. M. Cecchini, M. I. Monteoliva, M. E. Alvarez // *Plant Signal Behav*. – 2011. – № 6(8). – P. 1195-1197.

29. Cegielska-Taras, T. Direct plant development from microspore-derived embryos of winter oilseed rape *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (DC.) Metzger / T. Cegielska-Taras, T. Tykarska, L. Szala, L. Kuraś, J. Krzymański // *Euphytica*. – 2002. – № 124. – P. 341-347.

30. Chen, Y. Epigenetic events in plant male germ cell heat stress responses / Y.Chen, F. Müller, I. Rieu, P. Winter // *Plant Reprod.* – 2016. – № 29. – P. 21-29.
31. Chinnusamy, V. Cold stress regulation of gene expression in plants / V. Chinnusamy, J. Zhu, J. K. Zhu // *Trends Plant Sci.* – 2007. – № 12. – P. 444-451.
32. Choi, C. Q. The fate of the plant embryo's suspensor: balancing life and death / C. Q. Choi // *PLoS Biology.* – 2013. – № 11(9). DOI:10.1371/journal.pbio.1001656
33. Cilingir, A. Anther Culture in Red Cabbage (*Brassica oleraceae* L. var. *capitata* subvar. *rubra*): Embryogenesis and Plantlet Initiation / A. Cilingir, S. M. Dogru, E. S. Kurtar, A. Balkaya // *Ekin. J.* – 2017. – № 3(2). – P. 82-87.
34. Coelho, N. Rheological and Microstructural Features of Plant Culture Media Doped with Biopolymers: Influence on the Growth and Physiological Responses of In Vitro-Grown Shoots of *Thymus lotocephalus* / N. Coelho, A. Filipe, B. Medronho, S. Magalhães, C. Vitorino, L. Alves, S. Gonçalves, A. Romano // *Polysaccharides.* – 2021. – № 2(2). – P. 538-553.
35. Cousin, A. Twinned microspore-derived embryos of canola (*Brassica napus* L.) are genetically identical / A. Cousin, M. N. Nelson // *Plant Cell Rep.* – 2009. – № 28(5). – P. 831–835. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0677-3>
36. Cristea, T. O. Effect of carbohydrate type over the microspore embryogenesis at *Brassica oleracea* L. / T. O. Cristea, M. Prisecaru, C. Brezeanu, M. Brezeanu // *Romanian Biotechnological Letters.* – 2013. – № 18. – P. 8677-8684.
37. Custers, J. B. M. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.) / J. B. M. Custers // *Doubled haploid production in crop plants* // Eds. M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster, I. Szarejko. – Kluwer Academic Publisher. – 2003. – P. 185-194.

38. Daghma, D. Timelapse imaging of the initiation of pollen embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) / D. Daghma, J. Kumlehn, G. Hensel, T. Rutten, M. Melzer // J. Exp. Bot. – 2012. – № 63. – P. 6017-6021.
39. Danilova, S. A. The stimulatory effect of the antibiotic cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture / S. A. Danilova, Y. I. Dolgikh // Russ. J. Plant Physiol. – 2004. – № 51(4). – P. 559-562.
40. Dastjerd, Z. H. Interaction effects of chitosan, benzyladenin, and gibberellic acid on in vitro proliferation of M26 apple rootstock / Z. H. Dastjerd, Z. Jabbarzadeh, R. J. Marandi // Hort. Environ. Biotechnol. – 2013. – № 54(6). – P. 538-547.
41. Debergh, P. C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium / P. C. Debergh // Physiologia Plantarum. – 2006. – № 59(2). – P. 270- 276.
42. Dewi, I. S. Role of polyamines in inhibition of ethylene biosynthesis and their effects on rice anther culture development / I. S. Dewi, B. S. Purwoko // Indones. J. Agric. Sci. – 2008. – № 9(2). – P. 60-67.
43. Dias, S. J. C. Doubled haploid production in crop plants: a manual. Protocol for broccoli microspore culture / S. J. C. Dias, M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster, I. Szarejko. – Dordrecht: Kluwer, 2003. – P. 195-204.
44. Dias, S. J. C. Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis / S. J. C. Dias // Euphytica. –2001. – № 119. – P. 389-394. DOI: 10.1023/A:1017563915319
45. Djatchouk, T. I. Microspore embryogenesis *in vitro*: the role of stresses / T. I. Djatchouk, O.V. Khomyakova, V. N. Akinina, I. A. Kibkalo, A. V. Pominov // Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2019. – № 23(1). – P. 86-94. DOI 10.18699/VJ19.466
46. Dobranszki, J. Comparison of the rheological and diffusion properties of some gelling agents and blends and their effects on shoot multiplication / J.

Dobranszki, K. Magyar-Tabori, E. Tombacz // Plant Biotechnol. – 2011. – № 5. – P. 345-352.

47. Domblides, E. A. Embryogenesis in culture of isolated microspore of broccoli / E. A. Domblides, E. V. Kozar, D. V. Shumilina, T. V. Zayachkovskaya, V. A. Akhramenko, A. V. Soldatenko // Vegetable crops of Russia. – 2018. – № 1. – P. 3-7.

48. Dong, Y. Q. Influencing factors and physiochemical changes of embryogenesis through in vitro isolated microspore culture in *Brassica* species / Y. Q. Dong, Y. H. Gao, T. Zhao, G. Q. Ren, Y. L. Liu, B. Guan, R. X. Jin, F. Gao, Y. L. Zhang, X. F. Tan, H. C. Zhu, Y. H. Zhang, J. X. Zhang, D. Peng, Y. X. Yan // Biologia. – 2021. – № 76. – P. 2629-2654. DOI:10.1007/s11756-021-00721-0

49. Dubas, E. Endogenous ABA concentration and cytoplasmic membrane fluidity in microspores of oilseed rape (*Brassica napus* L.) genotypes differing in responsiveness to androgenesis induction / E. Dubas, F. Janowiak, M. Krzewska, T. Hura, I. Żur // Plant Cell Rep. – 2013. – № 32. – P. 1465–1475. doi:10.1007/s00299-013-1458-6

50. Duijs, J. C. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. / J. C. Duijs, R. E. Voorrips, D. L. Visser, J. B. M. Custers // Euphytica. – 1992. – № 60. – P. 45-55.

51. Dunwell, J. M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation / J. M. Dunwell // Plant Biotechnol. – 2010. – № 8. – P. 377-424. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x

52. Ebrahimzadeh, H. Efficient parthenogenesis induction and *in vitro* haploid plant regeneration in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using putrescine, spermidine, and cycocel / H. Ebrahimzadeh, M. E. Shariatpanahi, B. Ahmadi, H. Soltanloo, M. Lotfi, E. Zarifi // J. of Plant Growth Regul. – 2018. – № 37(2). DOI:10.1007/s00344-018-9803-1

53. Eggert, K. The role of boron nutrition in seed vigour of oilseed rape (*Brassica napus* L.) / K. Eggert, N. Wirén // *Plant Soil*. – 2016. – № 402. – P. 63–76. doi: 10.1007/s11104-015-2765-1(2016).
54. Elhiti, M. Gene expression analysis in microdissected shoot meristems of *Brassica napus* microspore-derived embryos with altered SHOOTMERISTEMLESS levels / M. Elhiti, O.S.D. Wally, M.F. Belmonte, A. Chan, Y.G. Cao, D.Q. Xiang, R. Datla, C. Stasolla // *Planta*. – 2013. – № 237(4). – P.1065–1082. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1814-8>
55. Fei, H. Gene expression during seed maturation in *Brassica napus* in relation to the induction of secondary dormancy / H. Fei, E. Tsang, A. Cutler // *Genomics*. – 2007. – № 89. – P. 419-428.
56. Ferrie, A. Haploids and doubled haploids in *Brassica* spp. for genetic and genomic research / A. Ferrie, C. Möllers // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2011. – № 104. – P. 375–386.
57. Ferrie, A. M. R. Haploid embryogenesis. in thorpe t.a. (ed.): *in vitro* embryogenesis in plants / A. M. R. Ferrie, C. E. Palmer, W. A. Keller. – Dordrecht: Kluwer, 1995. – P. 309-344.
58. Ferrie, A. M. R. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production / A. M. R. Ferrie, K. L. Caswell // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2011. – № 104. – P. 301-309.
59. Ferrie, A. M. R. Microspore mutagenesis of *Brassica* species for fatty acid modifications: a preliminary evaluation / A. M. R. Ferrie, D. C. Taylor, S. L. MacKenzie, G. Rakow, J. P. Raney, W. A. Keller // *Plant Breed*. – 2008. – № 127. – P. 501–506. doi: 10.1111/j.1439-0523.2008.01502.x.
60. Friml, J. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis* / J. Friml, A. Vieten, M. Sauer, D. Weijers, H. Schwarz, T. Hamann, R. Offringa, G. Jürgens // *Nature*. – 2003. – № 426. – P. 147-153.

61. Gamborg, O. L. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells / O. L. Gamborg, R. A. Miller, K. Ojima // *Exp. Cell Res.* – 1968. – № 50. – P. 151-158.
62. George, E. F. Somatic embryogenesis plant propagation by tissue culture / E. F. George, M. A. Hall, G.-J. De Klerk. – Dordrecht: Springer, 2008. – P. 335-354.
63. Gervais, C. Rearrangement of the actin filament and microtubule cytoskeleton during induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas / C. Gervais, W. Newcomb, D. Simmonds // *Protoplasma.* – 2000. – № 213. – P. 194-202.
64. Gu, H. Efficient doubled haploid production in microspore culture of loose-curd cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) / H. Gu, Z. Zhao, X. Sheng, H. Yu, J. Wang // *Euphytica.* – 2014. – № 195. – P. 467-475.
65. Gu, H. H. Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.) / H. H. Gu, P. Hagberg, W. J. Zhou // *Plant Growth Regul.* – 2004. – № 42. – P. 137-143.
66. Hale, B. Androgenesis-Based Doubled Haploidy: Past, Present, and Future Perspectives / B. Hale, A.M.R. Ferrie, S. Chellamma, J.P. Samuel, G.C. Phillips // *Front. Plant Sci.* – 2022. – № 12. – P. 1-15. doi: 10.3389/fpls.2021.751230
67. Hall, R. D. *Plant Cell Culture Protocols* / R. D. Hall // *Methods in Molecular Biology.* – 2000. – № 111.
68. Han, Y. Improved efficiency of microspore culture of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Chinese cabbage) / Y. Han, X.L. Ye, H. Feng, H. Lou, Y.N. Ruan // *Appl Mech Mater.* – 2014. – № 677(27). – P. 1091–1096. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.675-677.1091>
69. Hayat, S. Role of proline under changing environments: a review / S. Hayat, Q. Hayat, M. N. Alyemeni, A. S. Wani, J. Pichtel, A. Ahmad // *Plant Signal Behav.* – 2012. – № 7(11). – P. 1456-1466.

70. Heidari-Zefreh, A.A. Enhancement of microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) using putrescine and ascorbic acid / A.A. Heidari-Zefreh, M. E. Shariatpanahi, A. Mousavi, S. Kalatejari // *Protoplasma*. – 2019. – № 256. – P.13–24
71. Honys, D. Comparative analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome / D. Honys, D. Twell // *Plant Physiol.* – 2003. – № 132. – P. 640-652.
72. Hoseini, M. Effects of ascorbic acid, alpha-tocopherol, and glutathione on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. / M. Hoseini, M. Ghadimzadeh, B. Ahmadi, J.T.D. Silva // *In Vitro Cell Dev Biol-Plant.* – 2014. – № 50(1). – P. 26–35. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9579-8>
73. Indrianto, A. Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo / A. Indrianto, I. Barinova, A. Touraev, E. Heberle-Bors // *Planta*. – 2001. – № 212. – P. 163-174.
74. Jia, J.X. Effects of brassinolide on microspore embryogenesis and plantlet regeneration in pakchoi (*Brassica rapa* var. *multiceps*) / J.X. Jia, Y. Zhang, H. Feng // *Sci Hort.* – 2019. – № 252. – P. 354–362. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.004>
75. Kaur-Sawhney, R. Polyamines in plants: an overview / R. Kaur-Sawhney, A. F. Tiburcio, T. Altabella, A. W. Galston // *J. Cell Mol. Biol.* – 2003. – № 2. – P. 1-12.
76. Kim, H. J. Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) / H. J. Kim, F. Chen, X. Wang, N. C. Rajapakse // *J. Agric Food Chem.* – 2005. – № 53. – P. 3696–3701.
77. Kim, M. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture/ M. Kim, I. Jang, J. Kim, E. Park, M. Yoon, Y. Lee // *Plant Cell Reports.* – 2008. – № 27. – P. 425–434.

78. Kim, M. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*) / M. Kim, J. Kim, M. Yoon, D.-I. Choi, K.-M. Lee // Plant Cell Tiss Org Cult. – 2012. – № 77. – P. 63–72.
79. Kirov, I. An easy “SteamDrop” method for high quality plant chromosome preparation. / I. Kirov [et al.] // Molecular Cytogenetics. – 2014. – Vol. 7. – P. 21.
80. Klíma, M. Chromosome doubling effects of selected antimetabolic agents in *Brassica napus* microspore culture / M. Klíma, M. Vyvadilová, V. Kučera, J. Czech // Genet Plant Breeding. – 2008. – № 44(1). – P. 30–36. [https://doi.org/ 10.17221/1328-CJGPB](https://doi.org/10.17221/1328-CJGPB)
81. Klíma, M. Production and utilization of doubled haploids in *Brassica oleracea* vegetables / M. Klíma, M. Vyvadilová, V. Kučera // Hort Sci (Prague). – 2004. – № 31. – P. 119-123.
82. Klutschewski, S. Methodical improvements in microspore culture of *Brassica napus* L. : dis. zur Erlangung des Doktorgrades / S. Klutschewski. – Göttingen, Germany, 2012. – P. 91.
83. Kozar, E.V. Factors affecting DH plants *in vitro* production from microspores of European radish / E. V. Kozar, E. A. Domblides, A. V. Soldatenko // Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2020. – № 24(1). – P. 31-39.
84. Lantos, C. Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) / C. Lantos, A.G. Juhasz, P.Vagi, R. Mihaly, Z. Kristof, J. Pauk // Plant Biotechnol Rep. – 2012. – № 6. – P. 123–132
85. Lee, M. H. High-purity seed production of doubled haploid Chinese cabbage [*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis* (Lour.)] through microspore culture / M. H. Lee, C. J. Lim, I. H. Lee, J. H. Song // Plant Breed Biotechnol . – 2014. – № 2(2). – P. 167-175. DOI:10.9787/PBB.2014.2.2.167

86. Lee, Y. S. Changes in the respiration, growth, and vitamin C content of soybean sprouts in response to chitosan of different molecular weights / Y. S. Lee, Y. H. Kim, S. B. Kim // Hort. Sci. – 2005. – № 40. – P. 1333-1335.

87. Lemonnier-Le Penhuizic, C. Carrageenan oligosaccharides enhance stress-induced micro-spore embryogenesis in *Brassica oleracea* var *italica* / C. Lemonnier-Le Penhuizic, C. Chatelet, B. Kloareg, P. Potin // Plant Sci. – 2001. – № 160(6). – P. 1211-1220. DOI: 10.1016/s0168-9452(01)00372-7

88. Leroux, B. Inhibition of ethylene biosynthesis enhances embryogenesis of cultured microspores of *Brassica napus* / B. Leroux, N. Carmoy, D. Giraudet, P. Potin, F. Larher, M. Bodin // Plant Biotechnol. Rep. – 2009. – № 3. – P. 347-353. DOI:10.1007/s11816-009-0109-4

89. Leroux, B. J. G. Enhancement of embryo yield from isolated microspores of *Brassica napus* by early iron starvation / B.J.G. Leroux, P. Potin, F.R. Larher, M. Bodin // Plant Biotechnol Rep. – 2016. – № 10(6). – P. 483–486. [https://doi.org/10.1007/s11816-016-0420-9\(2016\)](https://doi.org/10.1007/s11816-016-0420-9(2016))

90. Li, J. Global DNA methylation variations after short-term heat shock treatment in cultured microspores of *Brassica napus* cv. Topas / J. Li, Q. Huang, M.X. Sun, T.Y. Zhang, H. Li, B.Y. Chen, K. Xu, G.Z. Gao, F. Li, G.X. Yan, J.W. Qiao, Y.P. Cai, X.M. Wu // Sci Rep. – 2016. – № 6. – P. 38401. <https://doi.org/10.1038/srep38401>

91. Liu, C. A missense mutation in the VHYNP motif of a DELLA protein causes a semi-dwarf mutant phenotype in *Brassica napus* / C. Liu, J. Wang, T. Huang, F. Wang, F. Yuan, X. Cheng // Theor. Appl. Genet. – 2010. – № 21. – P. 249–258. doi: 10.1007/s00122-010-1306-9

92. Liu, F. Effects of genetic background of the donor plants and AC on microspore embryogenic ability (MEA) of Chinese cabbage / Liu F, Mo DF, Yao L, Zhang YY, Zhang FL, Cao MQ // J Agr Biotechnol. – 2001. – № 9(3). – P. 297–300

93. Lu, Y. Microspore induced doubled haploids production from ethyl methanesulfonate (EMS) soaked flower buds is an efficient strategy for mutagenesis in Chinese cabbage / Y. Lu, S. Y Dai, A. X. Gu, M. Y. Liu, Y. H. Wang, S. X. Luo, Y. J. Zhao, S. Wang, S. X. Xuan, X. P. Chen, X. F. Li, G. Bonnema, J.J. Zhao, S. X. Shen // *Front Plant Sci.* – 2016. – № 7. – P. 1780. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01780>
94. Ma, Q. Transcriptomic analyses identify albino-associated genes of a novel albino tea germplasm ‘Huabai 1’ / Q. Ma, H. Li, Z. Zou, E. Arkorful, Q. Lu, Q. Zhou, X. Chen, K. Sun, X. Li // *Hortic. Res.* – 2018. – № 5(1). – P. 54.
95. Mahasuk, P. Effect of boron on microspore embryogenesis and direct embryo to plant conversion in *Brassica napus* (L.) / P. Mahasuk, A.S. Kullik, M.C. Iqbal, C. Möllers // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2017. – № 130(2). – P. 443–447. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1232-5>
96. Malik, M.R. Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus* / M.R. Malik [et al.] // *Plant Physiology.* – 2007. – № 144. – P. 134-154.
97. Maluszynska, J. Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. Cytogenetic tests for ploidy level analyses — chromosome counting / M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster, I. Szarejko // Springer. – Netherlands, Dordrecht, 2003. – P. 391-395.
98. Manzur, J. P. In vitro germination of immature embryos for accelerating generation advancement in peppers (*Capsicum annuum* L.) / J. P. Manzur, M. O. Alarcón, A. R. Burruezo // *Scientia Horticulturae.* – 2014. – № 170. – P. 203–210. DOI:10.1016/j.scienta.2014.03.015
99. Maraschin, S.F. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective / S. F. Maraschin, W. de Priester, H. Spaink, M. Wang // *J. Exp. Bot.* – 2005. – № 56. – P. 1711-1726.

100. Martin-Tanguy, J. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches) / J. Martin-Tanguy // Plant Growth Regul. – 2001. – № 34. – P. 135-148.

101. Mineykina, A. Effect of Beta-Lactam antibiotics on microspore embryogenesis in *Brassica* species / A. Mineykina, D. Shumilina, L. Bondareva, A. Soldatenko, E. Domblides // Plants. – 2020. – № 9(4). – P. 489. <https://doi.org/10.3390/plants9040489>

102. Mittal, P. Impact of cefotaxime on somatic embryogenesis and shoot regeneration in sugarcane / P. Mital, S. S. Gosal, A. Senger, P. Kumar // Physiol. Mol. Biol. Plants. – 2009. – № 15(3). – P. 257-265.

103. Mittler, R. ROS are good / R. Mittler // Trends Plant Sci. – 2017. – № 22(1). – P. 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>

104. Möllers C, Iqbal MCM, Robbelen G (1994) Efficient production of doubled haploid *Brassica napus* plants by colchicine treatment of microspores. Euphytica 75(1). – P. 95–104. <https://doi.org/10.1007/BF00024536>

105. Na, H. Microspore derived embryo formation and doubled haploid plant production in broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*) according to nutritional and environmental conditions / H. Na, G. Hwang, J. H. Kwak, M. K. Yoon, C. Chun, J. Afr // Biotechnol. – 2011. – № 10. – P. 35-41.

106. Na, H. Y. Nutritional, chemical and physical factor affecting somatic embryo formation and germination in *Pimpinella brachycarpa* / H. Y. Na, C. Chun // Kor. J. Hort. Sci. Technol. – 2009. – № 27. – P. 280-286.

107. Nauerby, B. Influence of antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefatoxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tomeifaciens* / B. Nauerby, Z. Billing, R. Wyndaele // Plant Sci. – 1997. – № 123. – P. 169-177.

108. Nge, K. L. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture / K. L. Nge, N. Nwe, S. Chandkrachang, W. F. Stevens // Plant Sci. – 2006. – № 170. – P. 1185-1190.

109. Niel, E. Colchicine today / Niel E, Scherrmann JM// Joint Bone Spine. – 2006. – № 73(6): 672–678. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2006.03.006>
110. Niu, L. Efficient doubled haploid production in microspore culture of Zengcheng flowering Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* [L.] Makino var. *utilis* Tsen et Lee) / L. Niu, F. Shi, H. Feng, Y. Zhang // Scientia Horticulturae. – 2019. – № 245(9). – P. 57-64.
111. Ockendon, D. J. Genetic and nongenetic factors affecting anther culture of Brussels sprout (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) / D. J. Ockendon, R. A. Sutherland // Theor. Appl. Genet. – 1987. – № 74(5). – P. 566-570. DOI:10.1007/BF00288853
112. Olmedilla, A. Microspore embryogenesis. Plant developmental biology-biotechnological perspectives / A. Olmedilla, C. E. Pua, A. Davey // Springer. – 2010. – № 2. – P. 27-44.
113. Ozkum, D. Survival and sustainability, environmental earth sciences. Effects of L-proline and cold treatment on pepper (*Capsicum annuum* L.) anther culture / D. Ozkum, R. Tipirdamaz // Springer, Berlin, 2011. – P. 137-143.
114. Ozsan, T. *In vitro* Pepper (*Capsicum annuum* L.) Anther Culture: Can be Affected Via Vitamins B / T. Ozsan, A. N. Onus // Biotechnology Journal International. – 2017. – № 20(1). – P. 1-13.
115. Panathula, C. S. The stimulatory effect of the antimicrobial agents bavistin, cefotaxime and kanamycin on in vitro plant regeneration of *Centella asiatica* (L.) — an important antijaundice medicinal plant / C. S. Panathula, M. D. N. Mahadev, C. V. Naidu // Am. J. Plant Sci. – 2014. – № 5. – P. 279-285.
116. Park, S. G. Effect of Maltose Concentration on Plant Regeneration of Anther Culture with Different Genotypes in Rice (*Oryza sativa* L.) / S. G. Park, M. Ubaidillah, K. Kim // American Journal of Plant Sciences. – 2013. – № 4. – P. 2265-2270.
117. Parra-Vega, V. Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper

(*Capsicum annuum* L.) / V. Parra-Vega, B. González-García, J.M. Seguí-Simarro // Acta Physiol Plant. – 2013. – № 335. – P. 627-633.

118. Phogat, S. High Frequency Regeneration of *Brassica napus* Varieties and Genetic Transformation of Stocks Containing Fertility Restorer Genes for Two Cytoplasmic Male Sterility Systems / S. Phogat, S. Pasteur, P. Burma // Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. – 2000. – № 9(2). DOI:10.1007/BF03263088

119. Pilih, K. R. Improvements of doubled haploid production protocol for white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) / K. R. Pilih, U. K. Potokar, B. Bohanec // Folia Hort. – 2018. – № 30(1). – P. 57-66.

120. Pilih, K. R. Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. *capitata* L.: Genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents / K. R. Pilih, B. Bohanec, M. Hansen // Plant Breeding. – 2008. – № 118(3). – P. 237-241.

121. Prem, D. A new microspore embryogenesis system under low temperature which mimics zygotic embryogenesis initials, expresses auxin and efficiently regenerates doubled-haploid plants in *Brassica napus* / D. Prem, M. T. Solís, I. Bárány, H. Rodriguez-Sanz // BMC Plant Biology. – 2012. – № 12. – P. 127. DOI:10.1186/1471-2229-12-127

122. Prem, D. Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea* / D. Prem, K. Gupta, G. Sarkar, A. Agnihotri // Plant Cell Tiss Organ. – 2008. – № 93(3). – P. 269–282. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9373-1>

123. Prem, D. Effect of various endogenous and exogenous factors on microspore embryogenesis in Indian mustard [*Brassica juncea* (L.) Cern and Coss] / D. Prem, K. Gupta, A. Agnihotri // In Vitro Cell Dev Biol-Plant. – 2005. – № 41(3). – P. 266–273. <https://doi.org/10.1079/IVP2005636>

124. Priti, M. Optimization of *Brassica napus* (canola) explant regeneration for genetic transformation / P. Maheshwari, G. Selvaraj, I. Kovalchuk // New

Biotechnology. – 2011. – № 29(1). – P.144-55. DOI:10.1016/j.nbt.2011.06.014  
2011

125. Pulido, A. Cytological and ultrastructural changes induced in anther and isolated-microspore cultures in barley: Fe deposits in isolated-microspore cultures / A. Pulido, F. Bakos, A. Castillo, M. Vallés, B. Barnabas, A. Olmedilla // J. Struct. Biol. – 2005. – № 149. – P. 170-181.

126. Rakosy-Tican, E. The effects of cefotaxime and silver thiosulphate on in vitro culture of *Solanum chacoense* / E. Rakosy-Tican, C. M. Aurori, A. Aurori // Rom. Biotechnol. Lett. – 2011. – № 16(4). – P. 6369-6377.

127. Regla-Márquez, C. F. Cadaverine: a common polyamine in zygotic embryos and somatic embryos of the species *Capsicum chinense* Jacq. / C. F. Regla- Márquez, A. Canto-Flick, S. A. Avilés-Viñas, R. E. Valle-Gough, J. Pérez-Pastrana, F. J. García-Villalobos, N. Santana-Buzzy // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2016. – № 124. – P. 253-264. DOI:10.1007/s11240-015-0889-x

128. Rijven, A. H. G. In vitro studies on the embryos of *Capsella bursa-pastoris* / A. H. G. Rijven // Acta Bot. Neerl. – 1952. – № 1. – P.157-200.

129. Rivas-Sendra, A. Dynamics of Calcium during *In vitro* Microspore Embryogenesis and *In vivo* Microspore Development in *Brassica napus* and *Solanum melongena* / A. Rivas-Sendra, A. Calabuig-Serna, J. M. Seguí-Simarro // Front. Plant Sci. – 2017. – № 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01177>

130. Rudolf, K. Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. *capitata* L.: Genetic improvement of nonresponsive cultivars and effect of genome doubling agents / K. Rudolf, B. Bohanec, M. Hansen // Plant Breeding. – 1999. – № 118. – P. 237-241. DOI: 10.1007/978-94-017-1293-4\_32

131. Rudolf-Pilih, K. Proposal of a new hybrid breeding method based on genotyping, inter-pollination, phenotyping and paternity testing of selected elite F1 hybrids / K. Rudolf-Pilih, M. Petkovšek, J. Jakše, N. Štajner, J. Murovec, B. Bohanec // Front. Plant Sci. – 2019. – № 10. – P. 1111. doi: 10.3389/fpls.2019.0111

132. Salas, P. Influence of the stage for anther excision and heterostyly in embryogenesis induction from eggplant anther cultures / P. Salas, A. Rivas-Sendra, J. Prohens, J. M. Seguí-Simarro *Euphytica*. – 2012. – № 184. – P. 235-250.
133. Seguí-Simarro, J. M. Androgenesis revisited / J. M. Seguí-Simarro // *Bot. Rev.* – 2010. – № 76(3). – P. 377-404.
134. Seguí-Simarro, J. M. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis / J. M. Seguí-Simarro, F. Nuez // *Physiol Plantarum*. – 2008. – № 134(1). – P. 1-12. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01113.x>
135. Shariatpanahi, M. E. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis / M. E. Shariatpanahi, U. Bal, E. Heberle-Bors, A. Touraev // *Physiol. Plant*. – 2006. – № 127. – P. 519-534.
136. Shumilina, D. Effects of Genotype and Culture Conditions on Microspore Embryogenesis and Plant Regeneration in *Brassica Rapa* ssp. *Rapa* L. / D. Shumilina, D. Korniyukhin, E. Domblides, A. Soldatenko, A. Artemyeva // *Plants*. – 2020. – № 9(2). – P. 278.
137. Silva, T. D. Microspore Embryogenesis, Embryogenesis / T. D. Silva, C. H. Sato // Rijeka: InTech Europe, 2012. – P. 573-591. DOI: 10.5772/37039
138. Simmonds, D. H. Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus* / D. H. Simmonds, W. A. Keller // *Planta*. – 1999. – № 208. – P. 383-391.
139. Smykalova, I. Efficiency of Microspore Culture for Doubled Haploid Production in the Breeding Project “Czech Winter Rape” / I. Smykalova, M. Větrovcova, M. Klima, M. Macháčková, M. Griga // *Czech J. Genet. Plant Breed.* – 2006. – № 42. – P. 58-71.
140. Soriano, M. Enhanced induction of microspore embryogenesis after n-butanol treatment in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture / M. Soriano, L. Cistué, A. Castillo // *Plant Cell Reports*. – 2008. – № 27. – P. 805-811.

141. Soriano, M. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture / M. Soriano, H. Li, K. Boutilier // *Plant Reprod.* – 2013. – № 26(3). – P. 181-196.

142. Stasolla, C. Buthionine sulfoximine (BSO)-mediated improvement in cultured embryo quality in vitro entails changes in ascorbate metabolism, meristem development and embryo maturation / C. Stasolla, M. F. Belmonte, M. Tahir, M. A. Elhiti // *Planta.* – 2008. – №228(2). – P. 255-72. DOI:10.1007/s00425-008-0735-z

143. Supena, E. D. J. Innovations in microspore embryogenesis in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) and *Brassica napus* L. // Ph.D. thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. – 2004. – P. 131.

144. Supena, E. D. J. Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning / E. D. J. Supena, B. Winarto, T. Riksen, E. Dubas, A. van Lammeren, R. Offringa, K. Boutilier, J. Custers // *J. Exp. Bot.* – 2008. – № 59. – P. 803-814. DOI:10.1093/jxb/erm358

145. Supena, E. D. J. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid in Indonesia hot pepper (*Capsicum annuum* L.) / E. D. J. Supena, S. Suharsono, E. Jacobsen, J. B. M. Custers // *Plant Cell Reports.* – 2006. – № 25(1). – P. 1-10. DOI:10.1007/s00299-005-0028-y

146. Takahashi, Y. Effects of genotypes and culture conditions on microspore embryogenesis and plant regeneration in several subspecies of *Brassica rapa* L. / Y. Takahashi, S. Yokoi, Y. Takahata // *Plant Biotechnol. Rep.* – 2012. – № 6(4).

147. Teixeira da Silva, J. A. The effect of antibiotics on the in vitro growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs) / J. A. Teixeira da Silva, N. Duong, T. Michio, T. S. Fukai // *Scientia Horticulturae.* – 2003. – № 97. – P. 397-410 DOI:10.1016/S0304-4238(02)00219-4

148. Telmer, C. A. Cellular changes during heat shock induction and embryo and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus* cv. Topas / C. A. Telmer, W. Newcomb, D. H. Simmonds // *Protoplasma*. – 1995. – № 185. – P. 106-112.

149. Tereso, S. Susceptibility of embryogenic and organogenic tissues of maritime pine (*Pinus pinaster*) to antibiotics used in Agrobacterium-mediated genetic transformation / S. Tereso, C. Miguel, J. Maroco, M. M. Oliveira // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2006. – № 87. – P. 33-40.

150. Thiruvengadam, M. Effect of exogenous polyamines enhances somatic embryogenesis via suspension cultures of spine guard (*Momordica dioidca* Roxb. ex. Wild) / M. Thiruvengadam, K. T. Rekha, N. Jayabalan, N. Praveen, E. H. Kim, I. M. Chung // *Australian J. Crop. Sci.* – 2013. – № 7(3). – P. 446-453.

151. Thorpe, T. The components of plant tissue culture media: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems / T. Thorpe, C. Stasolla, E. C. Yeung, G. J. de Klerk, A. Roberts, E. F. George // *Plant propagation by tissue culture*, Springer, Dordrecht.– 2008. – № 3. – P. 115-173.

152. Tian, H. High frequency conversion of microspore-derived embryos of *Brassica napus* cv. Topas by supplemental calcium and vitamins / H. Tian, C. Y. Yao, M. X. Sun // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2004. – № 76. – P. 159-165.

153. Tsuwamoto, R. Identification of genes specifically expressed in androgenesis-derived embryo in rapeseed (*Brassica napus* L.) / R. Tsuwamoto, Y. Takahata // *Breeding Sci* . – 2008. – № 58(3). – P. 251–259. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.58.251>

154. Tuncer, B. Effect of heat shock treatment on microspore embryogenesis in *Brassica oleracea* species / B. Tuncera, A. Çiğb, R. Yanmazc, F. Yaşara // *Tarım Bilimleri Dergisi – Journal of Agricultural Sciences*. – 2016. – № 22. – P. 548-554. [https://doi.org/10.1501/Tarimbil\\_0000001413](https://doi.org/10.1501/Tarimbil_0000001413)

155. Uma, S. Embryo rescue and plant regeneration in banana (*Musa* spp.) / S. Uma, S. Lakshmi, M. S. Saraswathi, A. Akbar, M. M. Mustaffa // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2011. – № 105. – P. 105-111.
156. Vasilchenko, E. N. Peculiarities of in vitro reproduction of sugar beet haploid regenerants / E. N. Vasilchenko, T. P. Zhuzhzhhalova, T. G. Vashchenko, O. A. Zemlyanukhina, N. A. Karpechenko, O. A. Podvigina // *Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great*. – 2017. – № 3(54). – P.57-66.
157. Vyvadilová, M. Embryogenic responsibility of *Brassica oleracea* vegetables in a microspore culture / M. Vyvadilová, M. Klíma, V. Kučera // *Hort. Sci. (Prague)*. – 2001. – № 4. – P. 121-124
158. Wang, T. Initiation and development of microspore embryogenesis in recalcitrant purple flowering stalk (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *Purpurea* Hort.) genotypes / T. Wang, H. Li, J. Zhang, B. Ouyang, Y. Lu, Z. Ye // *Scientia Horticulturae*. – 2009. – № 121(4). – P. 419-424.
159. Wang, Y. S. High frequency plant regeneration from microspore-derived embryos of ornamental kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) / Y. S. Wang, Y. Tong, Y. F. Li, Y. Zhang, J. Zhang, J. Y. Feng, H. Feng // *Sci Hortic*. – 2011. – № 130(1). – P. 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.029>
160. Weber, S. Improved doubled haploid production protocol for *Brassica napus* using microspore colchicine treatment in vitro and ploidy determination by flow cytometry / S. Weber, F. Unker, W. Friedt // *Plant Breeding*. – 2005. – № 124(5). – P. 511–513. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01114.x>
161. Wedzony, M. Progress in doubled haploid technology in higher plants. Advances in haploid production in higher plants / M. Wedzony, A. Touraev, B. P. Forster, S. M. Jain // Dordrecht, Netherlands: Springer, 2009. – P. 1-33. DOI: 10.1007/978-1-4020-8854-4
162. Wei, Z. The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo

regeneration / Z. Wei, F. Qiang, D. Xigang, B. Manzhu // *Scientia Horticulturae*. – 2008. – № 117(1). – P. 69-72. DOI:10.1016/j.scienta.2008.03.023

163. Winarto, B. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea* / B. Winarto, J. A. Teixeira da Silva // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2011. – № 107. – P. 305-315. DOI:10.1007/s11240-011-9981-z

164. Wu, X.-B. Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) induced by glycerol / X.-B. Wu, J. Wang, J.-H. Liu, X.-X. Deng // *J. Plant Physiol.* – 2009. – № 166. – P. 52-62.

165. Xu, L. Haploid and doubled haploid technology / L. Xu [et al.], In: S.K. Gupta (eds.) // *Advances in botanical research : rapeseed breeding*. – Elsevier, California, 2007. – P. 181-216.

166. Yan, C. Fine mapping of a candidate gene for cool-temperature-induced albinism in ornamental kale / C. Yan, L. Peng, L. Zhang, Z. Qiu // *BMC Plant Biology*. – 2020. – № 20 (460). DOI:10.1186/s12870-020-02657-0

167. Yang, M. T. Chilling stress suppresses chloroplast development and nuclear gene expression in leaves of mung bean seedlings / M. T. Yang, S. L. Chen, C. Y. Lin, Y. M. Chen // *Planta*. – 2005. – 221(3). – P. 374-385.

168. Yeung, E. C. The canola microspore-derived embryo as a model system to study developmental processes in plants / E. C. Yeung // *J. Plant Biol.* – 2002. – № 45. P. 119-133.

169. Yuan S. X. Effect of combined cold pretreatment and heat shock on microspore cultures in broccoli / S.X. Yuan, Y.M. Liu, Z.Y. Fang, L.M. Yang, M. Zhaung, Y.Y. Zhang, P.T. Sun // *Plant Breeding*. – 2011. – № 130(1). – P. 80–85. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01754.x>

170. Yuan, S. Chromosome Doubling of Microspore-Derived Plants from Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) and Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) / S. Yuan, Y. Su, Y. Liu, Z. Li, Z. Fang, L. Yang, M. Zhuang, Y. Zhang, H. Lu, P. Sun // *Plant Sci.* – 2015. – № 6. – P. 1-10.

171. Yuan, S. X. Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage / S. X. Yuan [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2012. – № 110. – P. 69-76. DOI:10.1007/s11240-012-0131-z

172. Zeng, A. Microspore embryogenesis and plant regeneration in Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera*) / A. Zeng, Y. Yan, J. Yan, L. Song // Scientia Horticulturae. – 2015. – № 191.

173. Zeng, L. Reduced ascorbate and reduced glutathione improve embryogenesis in broccoli microspore culture / L. Zeng, Y. Song, J. Cui // Yan South African Journal of Botany. – 2017. – № 109. – P. 275-280. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.01.005>

174. Zeng, X.H. Effects of bleomycin on microspore embryogenesis in *Brassica napus* and detection of somaclonal variation using AFLP molecular marker / X.H. Zeng, J. Wen, Z.J. Wan, B. Yi, J.X. Shen, C.Z. Ma, J.X. Tu, T.D. Fu // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2010. – № 101(1). – P. 23–29. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9658-z>

175. Zhang, F.L. Inheritance of microspore embryogenic ability in *Brassica* crops / F.L. Zhang, Y. Takahata // Theor Appl Genet. – 2001. – № 103(2). – P. 254–258. <https://doi.org/10.1007/s001220100602>

176. Zhang, G. Q. Plant development from microspore derived embryos in oilseed rape as affected by chilling, desiccation and cotyledon excision / G. Q. Zhang, D. Q. Zhang, G. X. Tang, Y. He, W. J. Zhou // Biol. Plantarum. – 2006. – № 50. – P. 180-186.

177. Zhang, K. Identification of two recessive etiolation genes (*py1*, *py2*) in pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) / K. Zhang, Y. Mu, W. Li, X. Shan, N. Wang, H. Feng // BMC Plant Bio. – 2020. – № 20(1). – P. 68.

178. Zhang, W. The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration / W. Zhang, Q. Fu, X. Dai, M. Bao // Sci. Hortic. – 2008. – № 117. – P. 69-72. DOI:10.1016/j.scienta.2008.03.023

179. Zhang, Y. Effects of the antiauxin PCIB on microspore embryogenesis and plant regeneration in *Brassica rapa* / Y. Zhang, A.J. Wang, Y. Liu, Y.S. Wang, H. Feng // *Sci Hortic.* – 2011. – № 130(6). – P 32–37.

180. Zhang, Y. Improved production of doubled haploids in *Brassica rapa* through microspore culture / Y. Zhang, A.J. Wang, Y. Liu, Y.S. Wang, H. Feng // *Plant Breeding.* – 2012. – № 131(1). – P. 164–169. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2011.01927.x>

181. Zhou, W. J. Efficient production of doubled haploid plants by immediate colchicine treatment of isolated microspores in winter *Brassica napus* / W. J. Zhou, G. X. Tang, P. Hagberg // *Plant Growth Regul.* – 2002. – № 37. – P. 185-192.

182. Zur, I. Failure of androgenesis in *Miscanthus giganteus* *in vitro* culture of cytologically unbalanced microspores / I. Zur, E. Dubas, A. Słomka, F. Dubert, E. Kuta, A. Płazek // *Plant Reprod.* – 2013. – № 26(3). – P. 1-11.