

doi 10.18699/vjgb-25-55

Оптимизация этапов технологии получения ДН-растений капусты белокочанной

А.И. Минейкина , К.С. Стебницкая , М.Г. Фомичева , Л.Л. Бондарева, А.С. Домблидес, Е.А. Домблидес  

Федеральный научный центр овощеводства, пос. ВНИИССОК, Одинцовский район, Московская область, Россия

 edomblides@mail.ru

Аннотация. Одна из экономически важных сельскохозяйственных культур среди представителей рода *Brassica* L. – капуста белокочанная. Для создания высокопродуктивных F_1 гибридов с улучшенными показателями необходима генетически разнообразная база выровненного материала, получение которого занимает продолжительную часть селекционного процесса. Ускорить этот этап селекции можно за счет получения удвоенных гаплоидов (ДН-растений). Отсутствие стандартизированных, эффективных и воспроизводимых протоколов для культивирования *in vitro* разных видов растений, охватывающих несколько факторов и их взаимодействие, часто препятствует практической реализации метода. Растительный материал, условия культивирования и состав питательных сред являются определяющими факторами эффективности эмбриогенеза. В результате проведенного исследования оптимизирован протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для капусты белокочанной позднеспелого срока созревания. Оптимальный размер бутонов позднеспелой капусты белокочанной для введения в культуру *in vitro* варьировал от 3.5 до 5.0 мм. Для изученных генотипов капусты белокочанной совместное влияние высокотемпературного стресса при 32 °C в течение 48 ч и pH питательной среды 5.8 способствовало наибольшему выходу эмбриоидов. За счет использования платформы-шейкера при режиме 40 об./мин достигнуто ускорение развития эмбриоидов до семядольной стадии на 7–10 суток. Благодаря подобранному комплексу условий для успешного эмбриогенеза из микроспор капусты белокочанной достигнут выход эмбриоидов до 273.6 ± 32.2 шт./чашку Петри. Применение проточной цитометрии позволило отделить удвоенные гаплоиды (69.8 %) от гаплоидов (8.4 %), триплоидов (1.5 %) и тетраплоидов (20.3 %) на ранней стадии развития. Молекулярно-генетический анализ с использованием микросателлитных маркеров (SSR-анализ) подтвердил гаплоидное происхождение диплоидных растений-регенерантов.

Ключевые слова: капуста белокочанная; *Brassica oleracea* L.; ДН-растения; культура микроспор *in vitro*; андрогенез; удвоенные гаплоиды; кислотность питательной среды; платформа-шейкер; метод проточной цитометрии клеточных ядер; SSR-анализ

Для цитирования: Минейкина А.И., Стебницкая К.С., Фомичева М.Г., Бондарева Л.Л., Домблидес А.С., Домблидес Е.А. Оптимизация этапов технологии получения ДН-растений капусты белокочанной. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(4):517-529. doi 10.18699/vjgb-25-55

Благодарности. Авторы выражают большую благодарность канд. с.-х. наук Г.А. Костенко за предоставленные селекционные образцы капусты белокочанной позднеспелого срока созревания.

Optimization of technology steps for obtaining white cabbage DH-plants

A.I. Mineykina , K.S. Stebnitskaia , M.G. Fomicheva , L.L. Bondareva, A.S. Domblides, E.A. Domblides  

Federal Scientific Vegetable Center, VNISSOK, Odintsovo district, Moscow region, Russia

 edomblides@mail.ru

Abstract. White cabbage is one of the economically important crops among the representatives of the genus *Brassica* L. To create highly productive F_1 hybrids with improved characteristics, the breeders need genetically diverse breeding material, which takes a long time to produce. It is possible to significantly accelerate this stage of breeding by obtaining doubled haploids (DH-plants). The lack of standardized, efficient and reproducible protocols for *in vitro* cultivation of different plant species, covering several factors and their interactions, often hinders the practical implementation of the method. Plant material, cultivation conditions and composition of nutrient media are determinants of embryogenesis efficiency. As a result of this study, the protocol for obtaining doubled haploids in *in vitro* culture of isolated microspores was optimized for late maturing white cabbage. The optimal bud size for introduction into *in vitro* culture varied from 3.5 to 5.0 mm. For the studied genotypes, the combined effect of high-temperature stress

at 32 °C for 48 h and pH 5.8 stimulated the highest embryoid yield. The use of 3.5 g/L phytogel as a gelling agent was not effective. The use of flow cytometry allowed for separation of doubled haploids (69.8 %) from haploids (8.4 %), triploids (1.5 %) and tetraploids (20.3 %) at an early stage of development. Molecular genetic analysis with polymorphic microsatellite loci (SSR-analysis) confirmed the haploid origin of the diploid regenerant plants.

Key words: white cabbage; *Brassica oleracea* L.; DH-plants; *in vitro* microspore culture; androgenesis; doubled haploids; acidity of nutrient medium; shaker platform; flow cytometry; SSR-analysis

For citation: Mineykina A.I., Stebnitskaia K.S., Fomicheva M.G., Bondareva L.L., Domblides A.S., Domblides E.A. Optimization of technology steps for obtaining white cabbage DH-plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(4):517-529. doi 10.18699/vjgb-25-55

Введение

Среди представителей овощных культур рода *Brassica* L. наиболее распространенной и востребованной у потребителей является капуста белокочанная (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*): в Российской Федерации под данную культуру занято 14.3 % от всех посевных площадей овощных культур в открытом грунте. В последние годы импортозамещение – актуальная проблема, а в стратегическом плане Доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации (документ утвержден Указом Президента РФ от 21.01.2020 № 20) стоит задача по наращиванию экспортного потенциала в отрасли овощеводства. В связи с чем у производителей овощных культур существует большая потребность в гибридах F₁, поскольку они экономически выгодны для выращивания по качеству товарной продукции и устойчивости к неблагоприятным факторам среды.

Генетическая однородность линий для создания гибридов – необходимое требование. Она достигается за счет инбридинга в течение нескольких поколений. Так как капуста белокочанная – перекрестноопыляемая культура с двухлетним циклом развития, то для получения выровненной линии традиционным методом селекции необходимо затратить 12–14 лет.

Культура изолированных микроспор *in vitro* – один из передовых биотехнологических инструментов получения гомозиготных линий (удвоенных гаплоидов). Использование такой технологии позволяет достичь гомозиготности в одном поколении. Из-за генетической однородности удвоенные гаплоиды могут применяться не только в практической селекции, но и в других фундаментальных исследованиях, в том числе в генетической трансформации и индуцированном мутагенезе.

Первые успешные исследования в культуре микроспор капустных культур проведены в начале 1980-х годов (Lichter, 1982). Затем был разработан базовый протокол культуры микроспор рапса, который служит основой DH-технологии для растений рода *Brassica* (Pechan, Keller, 1988). В настоящее время эта технология активно развивается, но для полноценного включения в селекционный процесс необходим высокий уровень ее эффективности. Генотип растения, условия культивирования и ингредиенты питательной среды – определяющие факторы качества и количества получаемого растительного материала в любом протоколе культивирования клеток *in vitro*. В мировой практике реализовано множество стратегий для улучшения протоколов культивирования клеток растений семейства Brassicaceae. Важные достижения отмечены у всех

основных представителей рода *Brassica*. За счет высокой отзывчивости некоторых видов были изучены основные факторы, влияющие на индукцию эмбриогенеза у *B. napus* (Weber et al., 2005), *B. rapa* (Ferrie et al., 1995; Gu et al., 2003; Shumilina et al., 2020), *B. carinata* (Barro et al., 2003), *B. juncea* (Prem et al., 2008). Для капусты белокочанной такие исследования единичны в связи с меньшей отзывчивостью генотипов и низким выходом эмбриоидов (Cao et al., 1990; Rudolf et al., 1999; Bhatia et al., 2018).

Известно, что в основе метода культуры изолированных микроспор *in vitro* – способность микроспор переходить с гаметофитного пути на спорофитный под влиянием определенных факторов. Для растений рода *Brassica* такой способностью обладают микроспоры на поздней одноклеточной стадии и пыльцевые зерна ранней двухклеточной стадии развития (Pechan, Keller, 1988; Kott, 1998). В последующих исследованиях доказано, что жизнеспособность микроспор и влияние ее на выход эмбриоидов зависят от размера бутонов, что, в свою очередь, помогает сократить время на отбор в случае большого количества растительного материала (Takahata, Keller, 1991; Bhatia et al., 2018; Kozar et al., 2022). Именно правильный подбор размера бутонов, обеспечивающих однородность популяции микроспор на оптимальной стадии развития, – ключевой фактор для успеха методики (Cristea et al., 2020).

К основополагающим факторам, влияющим на индукцию эмбриогенеза, относятся холодовая предобработка бутонов и тепловой шок микроспор в первые дни культивирования (Takahata, Keller, 1991; Bhatia et al., 2018). Во всех изученных протоколах шоковое повышение температуры при культивировании инициировало деление микроспор. По данным исследований (Pechan, Smykal, 2001), температурная обработка при 32 °C в течение 1–4 суток является абсолютным условием индукции микроспор у *B. napus*. Так, сочетание предварительной обработки холодом (4 °C) на протяжении 1 или 2 суток и теплового шока (32.5 °C) в течение 1 суток значительно усилило эмбриогенез микроспор у брокколи (Yuan et al., 2012), а 32.5 °C в течение 1 или 2 суток было оптимально для капусты белокочанной (Yang et al., 2013).

Жидкая питательная среда для культивирования NLN с 13 % содержанием сахарозы разработана еще в 1982 г. (Lichter, 1982) и применяется в протоколах культивирования микроспор для множества культур. Но, как показали исследования, существенное влияние на успешность эмбриогенеза оказывает кислотность среды, для различных генотипов капустных культур она варьирует в пределах 5.6–6.6 (Yuan et al., 2012). Также для повышения жизне-

способности индуцированных микроспор и развивающихся эмбриоидов целесообразно добавлять в среду активированный уголь (Prem et al., 2008).

Однозначно положительная реакция отмечена при применении платформы-шейкера от 40 до 50 об./мин при культивировании микроспор на жидкой среде; его использование позволило увеличить образование эмбриоидов *Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* на 11.6–69.37 %, а также сократить время культивирования на 1–4 суток и ускорить регенерацию растений (Yang et al., 2013). Также важно поддержать дальнейшее развитие эмбриоидов и растений из них. Для размножения чаще всего используется твердая среда Мурасиге–Скуга (MS) (Murashige, Skoog, 1962), а для укоренения S. Yuan с коллегами (2012) применяли среду 1/2 MS с 50 % содержанием солей (Yang et al., 2013).

Процедура получения ДН-линий включает два основных этапа: индукцию эмбриогенеза и удвоение хромосом. Второй этап необходим для практического применения полученных регенерантов, так как до удвоения генома растения стерильны. В настоящее время механизм, лежащий в основе спонтанного удвоения хромосом, во многих случаях неясен, а его эффективность сильно различается у разных видов и внутри сортообразцов одного вида (Kasha, 2005). В исследовании J.C. da Silva Dias и его группы (da Silva Dias, 2003) обнаружено 43–88 % спонтанных диплоидов у брокколи и 7–91 % спонтанных диплоидов у других видов капусты. Поскольку среди регенерантов могут встречаться растения с различной ploидностью, необходимо анализировать уровень ploидности всех полученных растений.

Ранние научные работы показали, что способность к эмбриогенезу у капустных культур, как правило, – количественно наследуемый признак, контролируемый несколькими генами, варьирует в зависимости от сортов и генетических групп (Zhang et al., 2003; Kitashiba et al., 2016; Ji et al., 2023). Таким образом, подобранные оптимальные факторы успешного культивирования микроспор *in vitro* подходят для определенного генотипа и нет универсального протокола культивирования. Выявление и модификация потенциально взаимодействующих факторов на этот процесс, способствуют повышению выхода эмбриоидов, что особенно важно для низкоотзывчивых генотипов.

Цель настоящего исследования – модернизация базового протокола культуры изолированных микроспор для позднеспелых генотипов капусты белокочанной за счет подбора оптимальных условий культивирования.

Материалы и методы

Материал и условия выращивания. В работе использовано 8 сортообразцов капусты белокочанной (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) позднеспелого срока созревания из коллекции ООО «Агрофирма Поиск» (№ 2403, 2404, 2405, 2406, 2407) и ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства» (№ 127, 303, 360). Все генотипы имели срок созревания от 160 до 180 суток от всходов и представляли ценные селекционные образцы различного генетического происхождения, выделенные по хозяйственно ценным признакам.

Донорные растения выращивали в климатической камере при температуре 19 °С, освещенности 65 мкмоль · м⁻² · с⁻¹ и фотопериоде 16 ч – день, 8 ч – ночь. Яровизацию растений проводили при 6 °С в темноте в течение трех месяцев. По окончании яровизации на этапе акклиматизации вегетационные сосуды с растениями устанавливали в климатическую камеру для получения цветоноса. В течение 15–35 суток постепенно повышали температуру от +8 до 16 ± 2 °С при режиме 16 ч – день, 8 ч – ночь и освещении 65 мкмоль · м⁻² · с⁻¹.

Культура изолированных микроспор *in vitro*. На первом этапе отбирали по линейному размеру бутоны, содержащие максимальное количество микроспор на потенциально способных к эмбриогенезу стадиях от поздней одноядерной до ранней двухъядерной. Идентификацию стадий проводили на основе окрашивания содержимого пыльников дифференциальным красителем (Alexander, 1969) с использованием микроскопа Axio Imager A2 (Zeiss, Германия). Из отобранных бутонов готовили суспензию микроспор из расчета 1 бутон на 1 мл среды NLN (Lichter, 1982) с 13 % сахарозой и pH 5.8; 6.0; 6.1; 6.2; 6.4 в зависимости от опыта. Для этого в начале цветения донорных растений собирали бутоны и стерилизовали 30 с в 96 % этаноле, далее в течение 15 мин – в хлорсодержащем водном растворе коммерческого препарата «Белизна» (Россия) со стерильной дистиллированной водой в соотношении 1:1 и с добавлением Tween 20 (Panreac, Испания) (1 капля на 100 мл раствора) с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде.

Стерильные бутоны помещали в среду NLN и измельчали в стеклянных бюксах с помощью магнитов на магнитной мешалке (BioSan, Латвия). Полученную суспензию микроспор пропускали через нейлоновый фильтр с размером ячеек 40 мкм, а затем осаждали 5 мин на центрифуге Eppendorf 5804R (Германия) при 920 g. Промывку микроспор проводили дважды. Микроспоры после выделения и промывки помещали в чашки Петри диаметром 60 мм. Предварительно в каждую чашку добавляли 3–4 капли стерильного раствора активированного угля и агарозы (Sigma-Aldrich, США), расплавленной в микроволновой печи (1 г активированного угля на 100 мл 0.5 % раствора агарозы). Далее чашки Петри инкубировали в темноте при шоковой температуре 32 °С в течение 1, 2, 3 суток, затем при 25 °С непрерывно в темноте в шейкере-инкубаторе при 40 об./мин (New Brunswick Innova® 44/44R Eppendorf, Германия) до достижения эмбриоидами семядольной стадии развития. Все опыты закладывались в трехкратной повторности.

Регенерация растений. Эмбриоиды, достигшие семядольной стадии развития, переносили на твердую питательную среду MS с 2 % сахарозой и 0.7 % агаром, pH 5.8, с добавлением 1 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП), 0.1 мг/л 1-нафтилуксусной кислоты (НУК) или 0.1 мг/л гиббереллиновой кислоты (ГК). Субкультивирование побегов осуществляли каждые 4 недели на ту же среду без добавления гормонов. Культивирование проводили на стеллажах при смешанном освещении двух типов люминесцентных ламп: OSRAM Fluora L36W/77 (преимущественно синего и красного спектра) и Philips 36W/54-765 (преимущественно белого спектра), при суммарной освещенности 65 мкмоль · м⁻² · с⁻¹.

ценности $24 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ при 16 ч днем/8 ч ночью и $24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Адаптация растений к условиям *in vivo*. Сформировавшиеся растения-регенеранты с развитой листовой, стеблевой и корневой системами для адаптации к условиям *in vivo* пересаживали в горшки с торфом с добавлением перлита (7:3) диаметром 8 см. Для улучшения адаптации и поддержания высокой влажности в течение первой недели после пересадки в грунт растения-регенеранты накрывали перфорированными пластиковыми прозрачными стаканами, плотно прилегающими к земле, постепенно приподнимая стаканчик. Адаптация происходила в климатической комнате с теми же параметрами, что и для донорных растений.

Выделение ДНК для ПЦР-анализа из растений-регенерантов капусты белокочанной. Ткань молодых листьев каждого растения размалывали в 200 мкл СТАВ-буфера с применением шариков из карбида вольфрама (диаметром 3 мм) и гомогенизатора TissueLyser II (Qiagen, Германия) (1560 колебаний/мин, продолжительность 1.7 мин) до состояния суспензии. После измельчения к каждому образцу добавляли 15 мкл протеиназы К. Дальнейшую экстракцию ДНК выполняли СТАВ-методом с использованием набора реагентов Сорб-ГМО-Б («Синтол», Россия) согласно протоколу производителя. Конечную чистоту и концентрацию тотальной ДНК определяли спектрофотометрически (Smart Spec Plus, Bio-Rad, США). Полученное соотношение $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.6\text{--}1.8$ соответствовало чистому раствору ДНК. Препараты выделенной ДНК хранили в холодильнике при $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Проведение ПЦР-анализа растений-регенерантов капусты белокочанной. Для выполнения микросателлитного анализа было использовано 9 микросателлитных локусов (табл. 1) с известными последовательностями праймеров для амплификации, показывающих при ана-

лизе PIC праймера не менее 0.5 (Tonguç, Griffiths, 2004; Louarn et al., 2007).

Базовую постановку ПЦР проводили в объеме 25 мкл, включая 1х ПЦР буфер Б, 2.5 mM MgCl_2 , 0.25 mM каждого dNTP, 0.3 мкМ каждого праймера, 1.5 единиц Taq ДНК-полимеразы («Синтол», Россия) и 3 мкл ДНК каждого исследуемого растительного образца. Для выполнения амплификации использовали прибор C1000 Touch (Bio-Rad). Стандартная процедура амплификации состояла из шага денатурации 2–5 мин при $92\text{--}95 \text{ }^{\circ}\text{C}$; шага отжига 30 с при температуре от 52 до $58 \text{ }^{\circ}\text{C}$; шага элонгации 30 с – 1 мин при $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Программа была рассчитана на 35 циклов амплификации.

ПЦР-продукты разделяли методом вертикального электрофореза с помощью системы Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) в 6 % полиакриламидном геле. После электрофореза гели окрашивали красителем для гелей SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя и документировали с использованием системы ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad).

Размеры амплифицированных фрагментов определяли в сравнении с маркером молекулярных масс Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Литва). Полученные цифровые фотографии продуктов амплификации анализировали с помощью программы ImageLab 3.0 (Bio-Rad).

Определение плоидности с помощью проточной цитометрии клеточных ядер. Молодые здоровые листья измельчались лезвием бритвы в 300 мкл буфера Гэлбрейта (45 mM MgCl_2 , 20 mM MOPS, 30 mM цитрата натрия, 0.1 % Triton X-100, pH 7.0) на льду с добавлением 50 мкг/мл РНКазы I («Синтол», Россия). Затем образец фильтровали через 30 мкм нейлоновый фильтр и добавляли пропидий иодид (Sigma, США) до конечной концентрации 50 мкг/мл. Содержание ДНК определяли

Таблица 1. Характеристики микросателлитных локусов

Маркер/ обозначение в GenBank	Последовательность праймеров	Мотив	Тотж., $^{\circ}\text{C}$	Размер фрагмента/ диапазон	Известное число аллелей
BoDCTD1/ AF458409	AGAAAGCAGACGGGA TGGTTAAAGCGAAAGTGTGC	(aga) ₆	55.7	166/ 133–168	5
BoPLD2/ AF113918	GACCACCGACTCCGATCTC AGACAAGCAAATGCAAGGAA	(ct) ₇ (at) ₇₋₁	56.4	267/ 258–273	11
BoAP1/ U67451	GGAGGAACGACCTTGATT GCCAAAATATACTATGCGTCT	(at) ₉₋₁	56	138/ 136–150	6
BoCAM1/ AJ427337	GCTGATGTTGATGGTGATGG GCCGAAGCAGACAAATAAAC	(ga) ₅	56	206/ 187–212	3
BoABI1/ AF180355	TATCAGGGTTTCTGGGTTG GTGAACAAGAAGAAAGAGAGCC	(tc) ₁₆	55	172/ 164–190	2
BoKAN45TR/ BZ523957	ATTATGACGCCTGGTTTTA ATTGGTTAGAAGTTATGGGAAC	(ttg) ₆	50	269/ 231–272	5
BoIAB19TF/ CC969431	AAGCCACCTCACCTTAGCC GAAATCCCAGAGACTGAAAACC	(ga) ₆	55	258/ 237–272	13
BoCALa/ AF241115 (1)	TTGTAAATGTAACAAAGGGG CAAAATGAACAATTCTCAGGG	(at) ₅ (ta) ₆	53	204/ 202–237	6
BoCALb/ AF241115 (2)	GTAATTCCTTGATAATTGC TCTGATTGGTTTGATGTGTCC	(ta) ₆₋₁	46	236/ 237–242	2

по интенсивности флюоресценции пропидия иодида в ядрах на проточном цитометре Beckman Coulter CytoFLEX в комплектации B2-RO-V2 (Beckman Coulter, США) с лазерным источником излучения с длиной волны 532 нм.

Визуализацию и обработку гистограмм проводили в программном обеспечении CytExpert 2.4 (Beckman Coulter).

Для оценки плоидности и содержания ДНК в качестве внешнего стандарта использовали диплоидные образцы донорных растений. Плоидность определяли по индексу разницы между пиками диплоидного стандарта того же вида и образца:

$$\text{Индекс} = \frac{\text{среднее пика образца}}{\text{среднее пика стандарта}}.$$

Содержание ДНК (2С, пг) рассчитывали по формуле

$$2C = \frac{\text{среднее пика образца}}{\text{среднее пика стандарта}} \times 2C \text{ стандарта}.$$

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью дисперсионного анализа (one-way, two-way ANOVA), а средние значения сравнивали с применением множественного критерия Дункана (DMRT) с вероятностью 95 %. Статистический анализ выполняли с использованием программы Statistica 8.0 (Statsoft, www.statsoft.com).

Результаты

Этапы эмбриогенеза капусты белокочанной

После выделения микроспоры капусты белокочанной были подвергнуты высокотемпературному стрессу при 32 °С в течение 1–2 суток, по окончании которых наблюдалось начало их деления (рис. 1, а, б). Для всех изученных образцов капусты белокочанной позднеспелого

срока созревания на 15-е сутки культивирования можно было видеть многоклеточные структуры, дальнейшее развитие которых могло происходить различными путями формирования эмбриоидов. Наиболее распространенный путь – формирование делящимися клетками глобул. Далее, подобно зиготическим эмбрионам *in vivo*, при переходе в сердцевидную стадию происходит смена радиальной симметрии на биполярную с закладкой двух будущих семядолей (рис. 2). Другой путь формирования эмбриоидов – через суспензороподобные структуры. В таких структурах отмечено поперечное деление дочерних клеток, что приводило к образованию суспензора в виде длинной нити (см. рис. 1, е). Более подробно такие пути формирования эмбриоидов изучены для других культур семейства Brassicaceae X. Tang с коллегами (2013) и E.V. Kozar с коллегами (2021).

Наряду с нормально развитыми эмбриоидами в культуре у всех генотипов мы наблюдали и аномально развитые эмбриоиды, которые характеризовались отсутствием семядолей и гипокотили (рис. 3, а, б), а также различные близнецовые формы (см. рис. 3, в–е). Доля таких аномальных эмбриоидов составляла от 1 до 15 % в зависимости от количества образовавшихся эмбриоидов на чашку Петри (выход эмбриоидов). В вариантах с высокоотзывчивыми генотипами процент аномальных эмбриоидов повышался.

Влияние размера бутонов

на эффективность эмбриогенеза

Преобладающая в культуре стадия развития микроспор и, следовательно, размер бутонов были определяющим фактором эффективности эмбриогенеза капусты белокочанной. Нами отмечено, что нельзя определить один оптимальный размер бутонов для всех генотипов. Перед

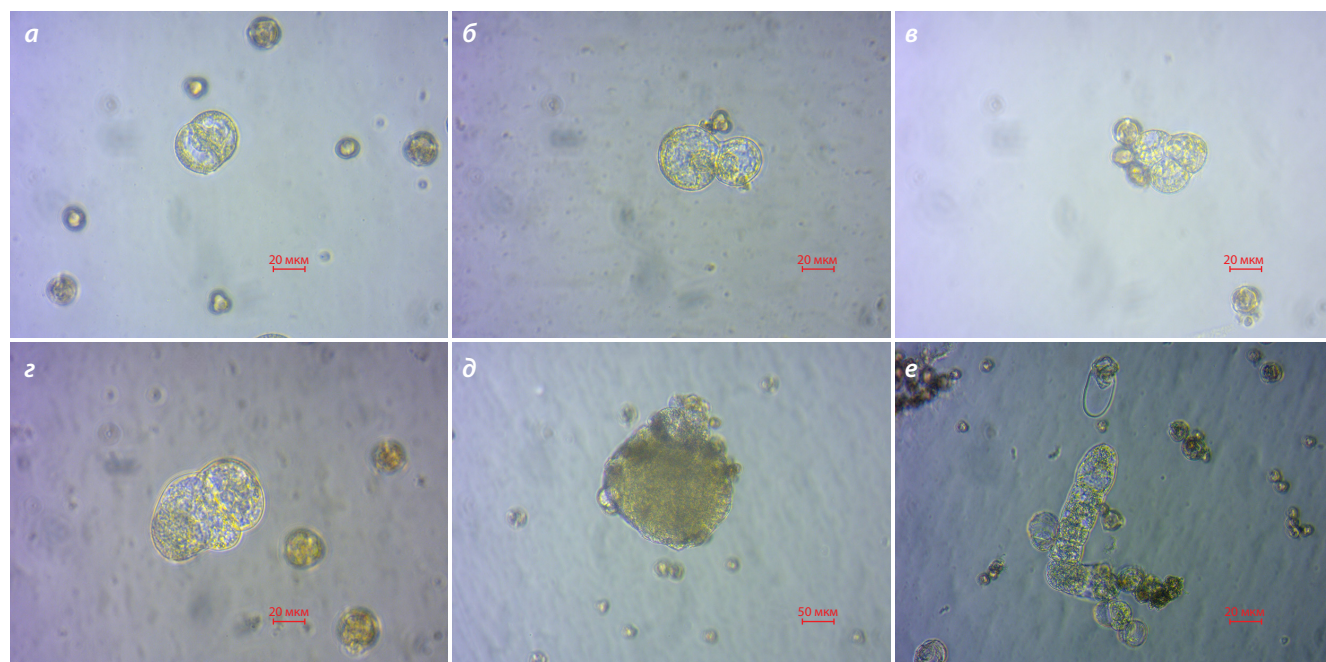


Рис. 1. Деление микроспор и формирование эмбриоидов капусты белокочанной в культуре *in vitro*.

а – первое деление микроспор – 1 сутки; б – 2 суток; в – 3 суток; г – 6 суток; д – формирование глобулы (14 суток); е – суспензороподобная структура.

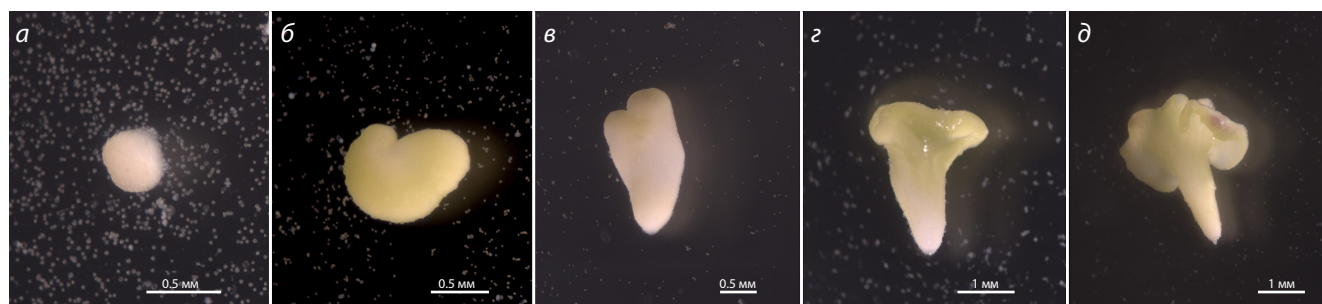


Рис. 2. Рост и развитие эмбриоида капусты белокочанной в культуре микроспор *in vitro*.

a – глобулярная стадия на 16-е сутки культивирования; *б* – сердечковидная стадия на 20-е сутки культивирования; *в* – сердечковидная стадия на 25-е сутки; *г* – эмбриоид на семядольной стадии на 30-е сутки; *д* – эмбриоид с разросшимися семядолями после 30-х суток культивирования.

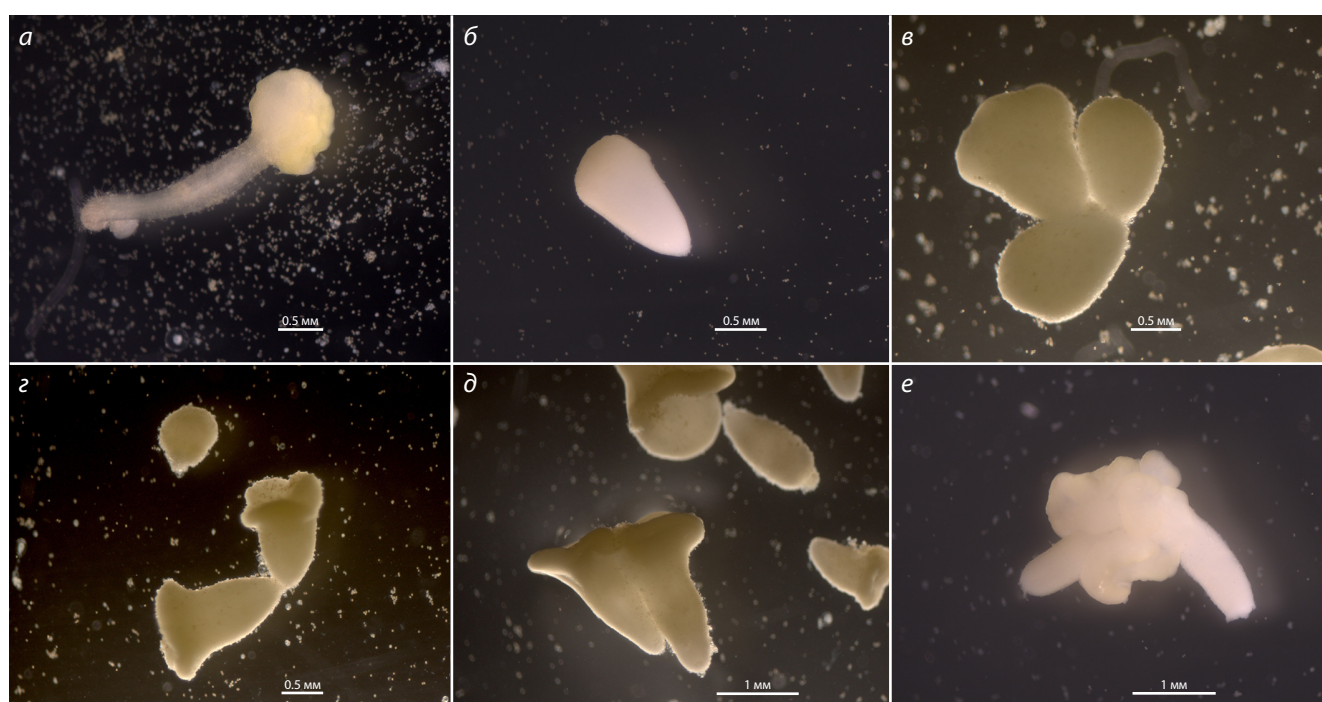


Рис. 3. Аномальное развитие эмбриоидов капусты белокочанной в культуре микроспор *in vitro*.

a – эмбриоид без явно выраженного гипокотыля; *б* – эмбриоид без сформированных семядолей; *в-е* – сросшиеся близнецовые формы эмбриоидов.

введением в культуру *in vitro* необходимо проводить рекогносцировочное определение линейных размеров бутонов каждого генотипа для сравнения наличия максимального количества микроспор на оптимальных для индукции андрогенеза стадиях развития с длиной бутона, так как генотипы имеют разные фенотипические особенности, проявляющиеся в том числе и в форме бутона. Округлая либо вытянутая форма бутона будет оказывать существенное влияние, отражающееся на диапазоне длин бутонов, подходящих для изоляции из них микроспор.

В предварительных экспериментах было определено, что выход эмбриоидов/чашку Петри существенно снижался вплоть до полного ингибирования эмбриогенеза, если в выборке бутонов диапазон длин превышал 1 мм. Это происходило за счет того, что в культуру *in vitro* попадало много микроспор/пыльцы, которые к 10–14-му дню культивирования погибали, оказывая токсическое действие на

культуру. Оптимальные для эмбриогенеза стадии развития мужского гаметофита содержались в выборках бутонов, варьирующих по длине в пределах 0.5 мм.

В эксперименте было выделено несколько групп, различающихся по длине бутонов, на которых был изучен выход эмбриоидов у восьми генотипов (табл. 2). Для всех генотипов максимальный выход эмбриоидов был получен только в какой-то одной из групп, что подтверждает необходимость отбирать бутоны по размеру с варьированием не более 0.5 мм в выборке. Только для генотипа № 2404 оптимальным оказался размер бутонов 3.5–3.9 мм. Для двух генотипов (№ 2403 и 303) оптимальным был размер 3.9–4.5 мм, а для пяти (№ 2405, 2406, 2407, 127, 360) – бутоны с размером в диапазоне 4.5–5.0 мм. Наибольший выход эмбриоидов достигнут для генотипа № 2406 из бутонов длиной 4.5–5.0 мм и составил в среднем 273.56 ± 32.21 шт./чашку Петри (см. табл. 2).

Таблица 2. Выход эмбриоидов капусты белокочанной в культуре микроспор *in vitro* в зависимости от размера бутон

Генотип	Количество эмбриоидов, шт./чашку Петри (среднее $\pm$ SE)*			
	3.5–3.9	3.9–4.5	4.5–5.0	5.0–5.5
2403	0a	10.85 $\pm$ 0.69c	0.50 $\pm$ 0.29b	–
2404	16.00 $\pm$ 4.00c	2.00 $\pm$ 1.08b	0a	–
2405	–	0a	2.43 $\pm$ 1.04b	0.11 $\pm$ 0.11a
2406	–	22.25 $\pm$ 4.91b	273.56 $\pm$ 32.21c	0.25 $\pm$ 0.25a
2407	–	0a	1.33 $\pm$ 0.88b	0a
127	–	136.50 $\pm$ 17.97b	265.00 $\pm$ 5.11c	2.50 $\pm$ 0.50a
360	–	16.75 $\pm$ 0.75b	136.25 $\pm$ 3.84c	1.00 $\pm$ 0.71a
303	0a	38.50 $\pm$ 0.65c	4.00 $\pm$ 1.58b	–

Примечание. «–» – в вариантах исследования отсутствовали микроспоры на оптимальной стадии развития.

* Здесь и в табл. 3: значения, за которыми следует одна и та же буква (a–c), существенно не различаются с вероятностью 95 %, согласно множественному критерию Дункана.

Влияние температурной обработки, pH среды и их взаимодействия на эмбриогенез микроспор

В вариантах эксперимента при культивировании микроспор при постоянной температуре 25 °C у всех включенных в исследование генотипов эмбриоидов не образовывалось. Кратковременная шоковая температурная обработка при 32 °C для всех изученных генотипов капусты белокочанной оказалась решающим фактором перепрограммирования микроспор на спорофитный путь развития с образованием эмбриоидов. При этом продолжительность температурной обработки оказала существенное влияние на выход эмбриоидов. Максимальный выход эмбриоидов для генотипа № 2406 достигнут при 48-часовой обработке. Температурная обработка в течение 1 суток также инициировала эмбриогенез, но оказалась недостаточной для большинства потенциально эмбриогенных микроспор у изученного генотипа (Приложение, рис. S1)¹. Для генотипов № 127 и 360 значимость между выходом эмбриоидов при высокотемпературной обработке в течение 24 и 48 ч была незначительна. При увеличении времени обработки до 3 суток происходило значительное снижение выхода эмбриоидов для всех изученных генотипов капусты белокочанной (рис. 4). При этом было отмечено, что у генотипов, отличающихся низкой отзывчивостью в этом варианте эксперимента, эмбриоидов не получено (табл. S1).

В результате серии экспериментов на четырех генотипах капусты белокочанной с применением сред с различным уровнем pH показано значительное влияние кислотности питательной среды на выход эмбриоидов. При этом все генотипы по-разному реагируют на значение данного показателя (табл. 3). В наших опытах использованы питательные среды с наиболее распространенными для культивирования *in vitro* (Yuan, 2012) показателями pH (5.8; 6.1; 6.4). Внутри каждого генотипа мы наблюдали существенное смещение выхода эмбриоидов относительно pH среды. Для генотипов № 2403, 2405, 2407 при pH среды 5.8 достигнут наибольший выход эмбриоидов. Однако для генотипа № 2404, напротив, среда с pH 6.1 и 6.4

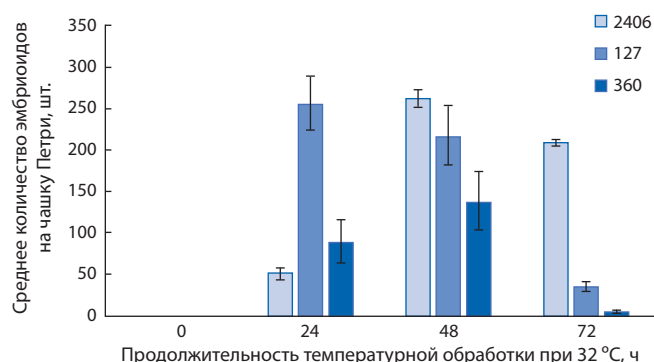


Рис. 4. Влияние продолжительности шоковой температурной обработки микроспор капусты белокочанной высокоотзывчивых генотипов № 2406, 127 и 360 при 32 °C на выход эмбриоидов (слева направо: 25 °C постоянно, 24 ч – 32 °C, 48 ч – 32 °C, 72 ч – 32 °C).

Таблица 3. Выход эмбриоидов капусты белокочанной в культуре микроспор *in vitro* в зависимости от pH питательной среды

Генотип	Количество эмбриоидов, полученных при различных уровнях pH, шт./чашку Петри (среднее $\pm$ SE)		
	5.8	6.1	6.4
2403	13.0 $\pm$ 1.0a	3.5 $\pm$ 2.5b	1.0 $\pm$ 0.0c
2404	9.5 $\pm$ 2.5b	21.0 $\pm$ 8.0a	18.0 $\pm$ 1.0a
2405	4.5 $\pm$ 2.5a	2.3 $\pm$ 0.9a	0.7 $\pm$ 0.3b
2407	0.5 $\pm$ 0.3a	0.5 $\pm$ 0.3a	0b

повысила эффективность эмбриогенеза более чем в 2 раза. В то же время питательная среда с pH 5.8 для этого генотипа также способствовала выходу эмбриоидов, но в меньшем количестве.

Для генотипа № 2403 был проведен эксперимент по совместному влиянию кислотности среды и высокотемпературной обработки на эмбриогенез. Проведенный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что и фактор

¹ Табл. S1, S2 и рис. S1, S2 Приложения см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx17.pdf>

кислотности питательной среды, и фактор индукционной высокотемпературной обработки, а также взаимодействие обоих факторов оказывают существенное влияние на выход эмбриоидов (табл. S2). При этом фактор индукционной температурной обработки является основным (доля влияния – 45 %) и, по-видимому, именно он запускает эмбриогенез в культуре изолированных микроспор. Это подтверждается отсутствием эмбриоидов во всех трех вариантах опыта с различной кислотностью питательной среды, если микроспоры не подвергались высокотемпературному стрессу и культивировались при 25 °С. Температурная обработка при 32 °С способствовала перепрограммированию микроспор на путь спорофитного развития и индукции эмбриогенеза во всех вариантах кислотности питательной среды. Наибольший выход эмбриоидов был достигнут при продолжительности высокой температурной обработки в течение 48 ч и pH среды 5.8. Также увеличение продолжительности температурной обработки до 2 суток способствовало повышению выхода эмбриоидов и при pH среды 6.1, но в меньшем количестве. Однако при более высоком значении pH, 6.4, продолжительность температурной обработки не оказала существенного влияния на выход эмбриоидов (см. табл. S2).

Регенерация DH-растений из эмбриоидов

Эмбриоиды с семядольными листьями, находящиеся в жидкой среде, пересаживали сначала на твердую сре-

ду MS (рис. 5, а) с добавлением 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара, БАП (1 мг/л), НУК (0.1 мг/л) и ГК (0.1 мг/л) для индукции побегообразования. Через 1 месяц образовавшиеся адвентивные побеги пересаживали для укоренения на два варианта твердой безгормональной среды MS, содержащей 20 г/л сахарозы и 7 г/л агара либо 3.5 г/л фитогеля (см. рис. 5, б). При посадке на среду с фитогелем отмечалось разрастание каллуса у основания побега, а корни не образовывались. На питательных средах, где в качестве гелеобразующего агента использован агар, побеги достаточно быстро (в течение 7–10 суток) образовывали хорошо развитую корневую систему (см. рис. 5, в).

Идентификация плоидности растений-регенерантов

Плоидность растений-регенерантов капусты белокочанной определяли на стадии рассады (5–8 листьев) с помощью метода проточной цитометрии клеточных ядер (рис. S2). Исследования показали, что в выборке 163 проанализированных растений-регенерантов изученных шести генотипов капусты белокочанной, успешно прошедших этап адаптации, в среднем было определено: гаплоидов – 8.4 %, удвоенных гаплоидов – 69.8 %, триплоидов – 1.5 %, тетраплоидов – 20.3 %. При этом между генотипами наблюдалась существенная разница по процентному соотношению выявленных уровней плоидности среди растений-регенерантов, полученных из определенного генотипа (табл. 4).

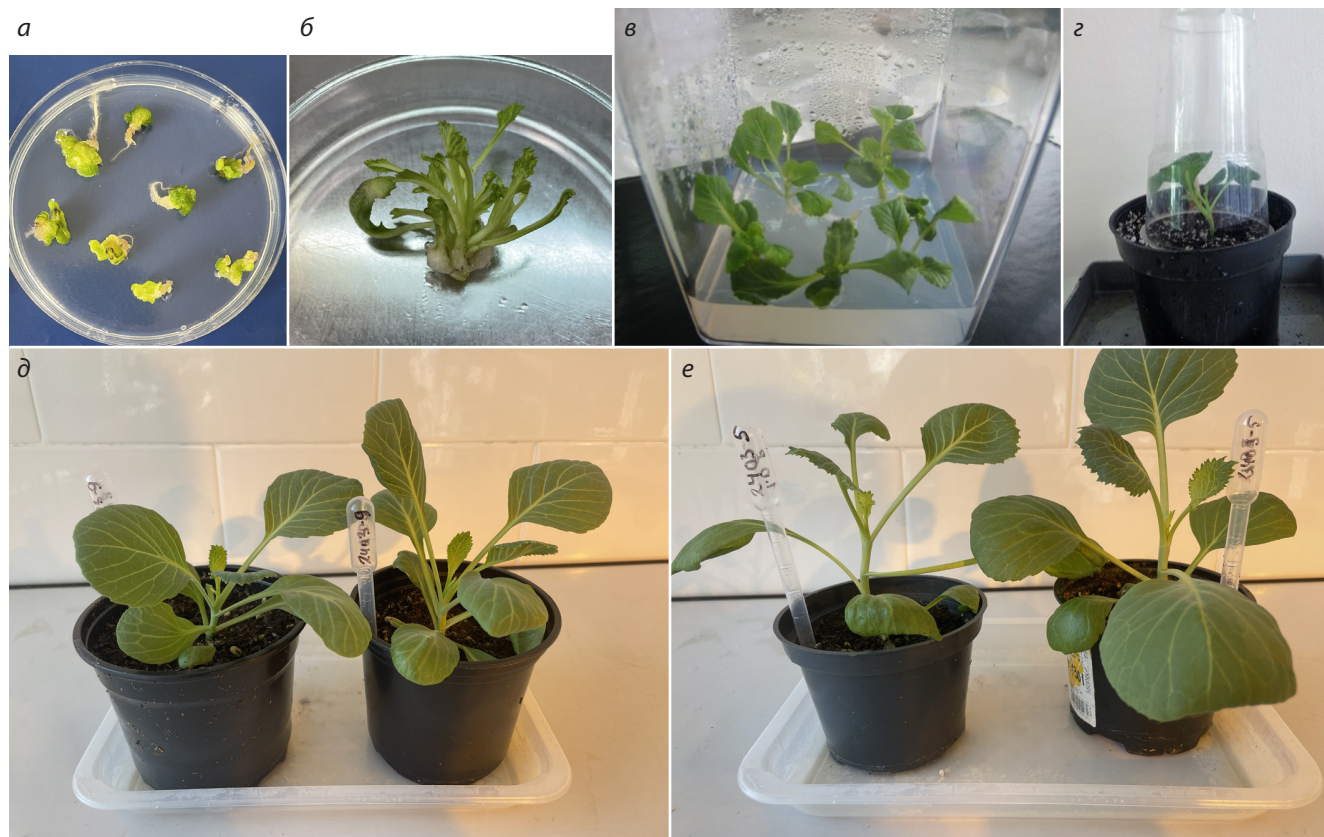


Рис. 5. Регенерация растений капусты белокочанной № 2403 из эмбриоидов и адаптация к условиям *ex vitro*.

а – разрастание эмбриоидов на среде MS; б – вторичный эмбриогенез; в – ризогенез; з – адаптация к условиям *ex vitro*; д – внешний вид диплоидных растений (2n), полученных из генотипа № 2403; е – внешний вид тетраплоидных растений (4n), полученных из генотипа № 2403.

Таблица 4. Определение уровня пloidности растений-регенерантов капусты белокочанной

Генотип	Количество проанализированных растений, шт.	Диагностированный уровень пloidности, %			
		<i>n</i>	2 <i>n</i>	3 <i>n</i>	4 <i>n</i>
2403	50	0.0	88.0	0.0	12.0
2406	25	0.0	64.0	0.0	36.0
2404	13	7.8	46.1	0.0	46.1
127	20	5.0	70.0	5.0	20.0
303	30	30.0	66.7	0.0	3.3
360	25	8.0	84.0	4.0	4.0
Итого	163	8.4	69.8	1.5	20.3

Подтверждение гаплоидного происхождения растений-регенерантов капусты белокочанной

Для подтверждения гаплоидного происхождения диплоидных растений-регенерантов из четырех образцов, № 2403, 2406, 303, 360, полученных через культуру изолированных микроспор, протестировано девять микросателлитных локусов, которые ранее были успешно использованы для генотипирования капусты белокочанной: AJ427337, AF180355, AF241115(1), AF241115(2), AF458409, AF113918, BZ5223957, CC969431, U67451 (Tonguç, Griffiths, 2004; Louarn et al., 2007; Домблидес и др., 2020). Генетических различий между растениями-регенерантами и исходными донорными генотипами не обнаружено по локусам AJ427337, AF180355 и AF241115(1), где был получен только один аллель для всех включенных в исследование генотипов донорных растений. Более четырех аллелей амплифицировалось с праймерами для локуса CC969431, что превышало ожидаемое число, и

поэтому данный маркер не был использован при оценке различий между изучаемыми образцами. Праймеры для локусов BZ5223957 и AF241115(2) позволяли обнаружить полиморфизм между донорными растениями и полученными растениями-регенерантами только у генотипов № 2406 и 303.

Амплификация с локусами AF458409, AF113918 и U67451 выявляла полиморфизм у всех четырех генотипов. Так, например, в результате амплификации локуса AF458409 у донорных растений обнаружено три аллеля для образца № 2403 и два аллеля для образца № 2406, тогда как у диплоидных растений-регенерантов наблюдали всего по одному аллелю (рис. 6).

Локус U67451 показал при анализе два аллеля у донорных растений образцов № 2406, 303 и 360 и три аллеля у донорных растений образца № 2403, в то время как у растений-регенерантов отмечено лишь по одному из аллелей (рис. 7).

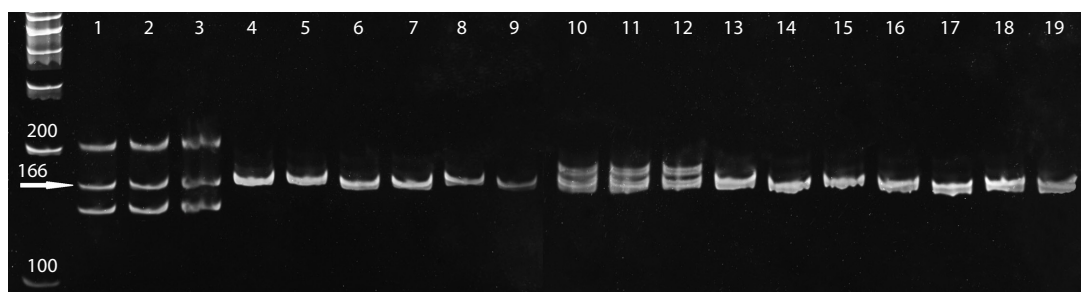


Рис. 6. Электрофореграмма результатов амплификации ДНК растений капусты белокочанной по микросателлитному локусу AF458409.

Здесь и на рис. 7: 1–3 – образцы донорных растений генотипа № 2406; 4–9 – диплоидные растения-регенеранты, полученные через культуру изолированных микроспор из образца № 2406; 10–12 – образцы донорных растений генотипа № 2403; 13–19 – диплоидные растения-регенеранты, полученные через культуру изолированных микроспор из образца № 2403.

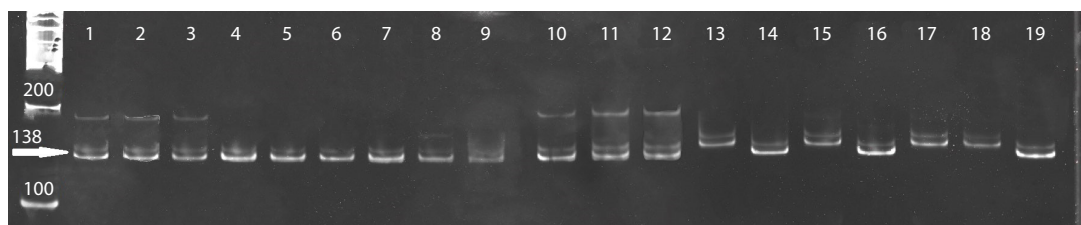


Рис. 7. Электрофореграмма результатов амплификации ДНК растений капусты белокочанной по микросателлитному локусу U67451.

Отсутствие идентичности в спектрах донорных растений с полученными из них растениями-регенерантами капусты белокачанной наблюдали и по микросателлитному локусу AF113918: у растений-регенерантов на спектрах присутствовало всегда уменьшенное относительно донорного растения количество аллелей.

Таким образом, молекулярно-генетический анализ с применением микросателлитных маркеров позволил подтвердить гаплоидное происхождение растений-регенерантов из микроспор. При анализе спектров трех микросателлитных локусов, AF458409, AF113918 и U67451, показано отсутствие сходства в спектрах донорных растений с растениями-регенерантами, а также отмечено присутствие меньшего числа аллелей у DH-растений капусты белокачанной. В случае использования для получения DH-растений культуры изолированных пыльников *in vitro* данный этап технологии должен быть обязательным, и только он со 100 % точностью даст возможность отделить истинные удвоенные гаплоиды от диплоидных растений-регенерантов, имеющих происхождение из соматических тканей пыльника.

Обсуждение

За последние десятилетия в развитии клеточных технологий растений рода *Brassica* были достигнуты значительные успехи. Они базируются на оптимизации условий культивирования и применении манипуляций, повышающих выход эмбриоидов.

Отбор бутонов на оптимальной стадии развития микроспор определяет успешность эмбриогенеза в любом протоколе культивирования *in vitro*. Согласно литературным данным, микроспоры на поздней одноядерной и ранней двухклеточной стадиях имеют наибольшую вероятность формирования эмбриоидов *in vitro* (Kott et al., 1988; Pechan, Keller, 1988). При этом стадия развития микроспор коррелирует с размером бутонов, что позволяет проводить отбор материала по этому признаку (Fan et al., 1988; Huang et al., 1990). Исследования для разных представителей рода *Brassica* продемонстрировали, что оптимальный размер бутонов варьирует между генотипами внутри каждого вида, зависит от межвидового различия растений и индивидуальных фенотипических особенностей. Так, опытным путем были установлены оптимальные размеры бутонов изучаемых генотипов: для брокколи 4–5 мм (Takahata, Keller, 1991), капусты цветной 4–6 мм (Gu et al., 2014), капусты краснокочанной 4.1–5.0 мм (Mineykina et al., 2021), горчицы сарептской 3.0–3.1 мм (Ali et al., 2008), капусты белокачанной 2.5–3.5 мм (Yuan et al., 2012; Tuncer et al., 2016), капусты белокачанной индонезийского происхождения 4.5–4.6 мм (Winarto, da Silva, 2011).

В ранних исследованиях показано, что большая доля незембрионных микроспор при совместном культивировании приводит к повышению уровня аутоксина в среде, влияющих на развитие эмбриоидов. При этом негативное действие токсина коррелировало с наличием в культуре двухъядерных микроспор (Kott et al., 1988). В более поздних исследованиях (Duijs et al., 1992) получены хорошие результаты в вариантах с содержанием в бутоне от 10 до 40 % двухъядерной пыльцы. Нами было отмечено, что стадия развития микроспор является ли-

митирующим фактором в культуре *in vitro* капусты белокачанной. Поскольку у капусты отмечено выраженное асинхронное развитие микроспор в пределах бутона, то их отбор с определенным пределом варьирования размера позволяет максимально охватить потенциально эмбрионные микроспоры.

В работе R. Lighter (1989) проведена модификация протокола культивирования микроспор для культур семейства Brassicaceae. Добавление в культивируемую среду активированного угля и использование шейкера в культуре микроспор способствовали минимизации факторов, влияющих на разрушение клеток и подавление их деления. Исследования J.C. da Silva Dias (1999) также указывают на повышение эмбриогенеза у различных генотипов капустных культур при использовании активированного угля в культуральной среде. Сокращение времени культивирования на 1–4 суток при применении платформы-шейкера отмечалось при культивировании микроспор капусты китайской на жидкой среде (Yuan et al., 2012).

В наших исследованиях для повышения уровня выживаемости микроспор капусты белокачанной и ингибирования продуктов окисления, негативно влияющих на деление клеток, мы применяли активированный уголь во всех вариантах как неотъемлемый элемент протокола. Использование платформы-шейкера позволило ускорить развитие эмбриоидов, тем самым повысить эффективность протокола за счет сокращения времени культивирования эмбриоидов в жидкой питательной среде. Это дало возможность большему количеству эмбриоидов на 7–10-е сутки быстрее достичь семядольной стадии развития, что особенно важно для высокоотзывчивых генотипов, где созревание эмбриоидов происходит неравномерно.

Стресс – самое важное условие при переходе микроспор с гаметофитного пути на спорофитный с образованием эмбриоидов (Touraev et al., 1996). Тип воздействия стрессом может применяться как *in vivo*, так и *in vitro*. Наиболее распространенные типы стресса для капустных культур – воздействие низкими положительными температурами на бутоны и соцветия (Gu et al., 2014) и кратковременный тепловой шок микроспор в культуре *in vitro* (Custers et al., 1994).

Предварительная обработка низкими положительными температурами не способствует перепрограммированию развития микроспор, однако эффективно поддерживает их жизнеспособность (Žur et al., 2009). Чаще всего как индуцирующий фактор эмбриогенеза используют тепловую обработку выделенных микроспор от 30 до 40 °C с различной временной экспозицией от 1 до 3 суток (Takahata, Keller, 1991; Duijs et al., 1992; Ferrie, Caswell, 2011). Некоторые исследователи указывают на влияние продолжительности высокотемпературной обработки на количество образующихся эмбриоидов (Telmer et al., 1992; Custers et al., 1994; Cordewener et al., 1995; Simmonds, Keller, 1999). Для капусты белокачанной индонезийского происхождения (Winarto, da Silva, 2011) было установлено успешное влияние 30.5 °C при воздействии в течение 48 ч, а затем непрерывное культивирование при 25 °C. Ограничением данного исследования было образование 30 % эмбриоидов с аномальным развитием семядолей и отсутствием гипокотилей. В. Tuncer с коллегами (2016) изучили влия-

ние температурного шока на индукцию эмбриогенеза и развитие эмбриоидов у *B. oleraceae* турецкого происхождения. Они отмечают положительное влияние 32 и 35 °C в течение 2 суток на индукцию эмбриогенеза, однако развитие эмбриоидов было затруднено, растения капусты белокочанной не были регенерированы.

Для понимания молекулярной регуляции эмбриогенеза, индуцированного высокотемпературной обработкой, Н. Су с коллегами (2020) провели протеомное исследование и на основании анализа обнаружили взаимодействие этих процессов. Высокотемпературный шок при 32 °C в течение 24 ч вызывал изменения в экспрессии специфических белков в культуре изолированных микроспор *in vitro* капусты.

Помимо того, что высокотемпературный стресс является эффективным триггером переключения развития микроспор по спорофитному пути, он также оказывает негативное влияние на процесс деления клеток. Исследования А. Zeng с коллегами (2015) указывают на массовую гибель микроспор капусты белокочанной (80–90 %) после 3 суток культивирования *in vitro*. Они зафиксировали начало гибели микроспор после 24 ч шоковой температурной обработки при 32.5 °C, предположительно, вызванное повышением уровня активных форм кислорода (АФК) и связанное с ним окислительным стрессом, влияющим на жизнеспособность клеток и их метаболизм. По результатам исследований I. Žig с коллегами (2009), летальный эффект высокой температуры при индукции эмбриогенеза микроспор тритикале связан с резким снижением ферментативной активности всех изученных антиоксидантов. Они предполагают, что высокотемпературный стресс индуцировал состояние окислительного стресса и клетки в среде, вызывающей азотно-углеводное голодание (Куо, Нарата, 1986), не могли активировать защитные реакции. Снижению уровня АФК способствовало применение в культуре микроспор аскорбиновой кислоты как специфического антиоксиданта (Zeng et al., 2015). Однако использование аскорбиновой кислоты в культуре *in vitro* не всегда оказывает положительный эффект и зависит от ее концентрации (Rodriguez-Serrano et al., 2012; Hoseini et al., 2014).

I. Varinova с коллегами (2004) при культивировании микроспор табака наблюдали влияние углеводного стресса, вызванного высокими значениями pH среды. В результате анализа метаболизма сахарозы при различных значениях pH было показано, что активность инвертазы (ЕС 3.2.1.26) в микроспорах была максимальной при pH 5.0 и сильно снижалась при более высоких pH, что приводило к замедлению расщепления сахарозы. Полученные данные позволили предположить, что изолированные микроспоры не способны к метаболизму углеводов при более высоких значениях pH и подвергаются голодному стрессу, который, в свою очередь, запускает спорофитное развитие.

Наши исследования подтверждают индуцирующее действие высокотемпературного стресса 32 °C на развитие микроспор капусты белокочанной по спорофитному пути. А влияние кислотности питательной среды на выход эмбриоидов определяется продолжительностью высокотемпературной обработки микроспор.

Среди применяемых для получения удвоенных гаплоидов технологий только при использовании культуры изолированных микроспор можно быть уверенным, что образовавшиеся эмбриоиды имеют происхождение из гаплоидных клеток, в то время как при культивировании пыльников и неопыленных семязпочек в культуру *in vitro* попадают и соматические ткани. Процесс образования каллуса и эмбриоидов, а впоследствии и растений-регенерантов из соматических (диплоидных) тканей стенок пыльника является общеизвестным фактом. Для того чтобы отличить истинные удвоенные гаплоидные линии, происходящие из гамет, от растений-регенерантов, имеющих соматическое происхождение, с успехом применяется молекулярный анализ. Из литературы известно об использовании скрининга с помощью молекулярных маркеров биотехнологических форм растений перца, полученных через культуру *in vitro* (Gyulai et al., 2000). В работе (Cousin, Nelson, 2009) использование восьми микросателлитных маркеров подтвердило гомозиготность и происхождение из гаплоидных клеток растений-регенерантов рапса, полученных в культуре микроспор.

SSR-анализ также успешно был применен для оценки гетерозиготности и определения происхождения (гаметофитного или соматического) у лимона (Yahyaoui, Germanà, 2021), огурца (Diao et al., 2009), дыни (Malik et al., 2011) и капусты пекинской (Adamus et al., 2021). Наши результаты также позволили подтвердить гаметофитное происхождение растений-регенерантов с использованием микросателлитных маркеров, были показаны отсутствие сходства в спектрах донорных растений с растениями-регенерантами и уменьшение числа аллелей у DH-растений капусты белокочанной.

Закключение

В результате проведенных исследований оптимизирован протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для капусты белокочанной позднеспелого срока созревания, позволяющий достичь выхода эмбриоидов до 273.6 ± 32.2 шт./чашку Петри. Для достижения результата нужно использовать многофакторный подход, учитывающий особенности генотипа. Перед введением в культуру *in vitro* необходимо обязательно проводить рекогносцировочное определение линейных размеров бутонов, содержащих преимущественно микроспоры на оптимальной для индукции эмбриогенеза стадии развития с диапазоном длин в выборке не более 0.5 мм. На конечный выход эмбриоидов капусты белокочанной существенную долю влияния оказывают продолжительность индукционной температурной обработки и кислотность питательной среды. Культивирование индуцированных микроспор в темноте на платформе-шейкере при режиме 40 об./мин дает возможность значительно ускорить достижение эмбриоидами семязольной стадии развития и сократить этот этап технологии на 7–10 суток. Использование проточной цитометрии позволяет достаточно быстро ранжировать полученные растения-регенеранты по уровню пloidности на ранней стадии развития. В выборке полученных растений отмечались: гаплоиды (8.4 %), удвоенные гаплоиды (69.8 %), триплоиды (1.5 %) и тетраплоиды (20.3 %).

Анализ с микросателлитными маркерами подтвердил гаплоидное происхождение диплоидных растений-регенерантов. На примере трех микросателлитных локусов, AF458409, AF113918 и U67451, показано отсутствие идентичности в спектрах донорных растений с растениями-регенерантами капусты белокочанной, а также отмечено присутствие меньшего числа аллелей у DH-растений.

Список литературы / References

- Домблидес А.С., Бондарева Л.Л., Пивоваров В.Ф. Оценка генетического разнообразия образцов капусты кочанной (*Brassica oleracea* L.) с использованием SSR маркеров. *Сельскохозяйственная биология*. 2020;55(5):890-900. doi 10.15389/agrobiology.2020.5.890rus
- [Domblides A.S., Bondareva L.L., Pivovarov V.F. Assessment of genetic diversity among headed cabbage (*Brassica oleracea* L.) accessions by using SSR markers. *Sel'skokhozyajstvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2020;55(5):890-900. doi 10.15389/agrobiology.2020.5.890rus (in Russian)]
- Adamus A., Szklarczyk M., Kielkowska A. Haploid and doubled haploid plant production in *Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* via microspore culture. *Methods Mol Biol*. 2021;2288:181-199. doi 10.1007/978-1-0716-1335-1_11
- Alexander M.P. Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Technol*. 1969;44(3):117-122. doi 10.3109/10520296909063335
- Ali M.M., Khaleque M.A., Custers J.B.M., Khurram M.M.H. Microspore culture and the performance of microspore derived doubled haploid in *Brassica juncea* (L.). *Bangladesh J Agric. Res*. 2008; 33(4):571-578. doi 10.3329/bjar.v33i4.2290
- Barinova I., Clément C., Martiny L., Baillieu F., Soukupova H., Heberle-Bors E., Touraev A. Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH. *Planta*. 2004;219(1):141-146. doi 10.1007/s00425-003-1202-5
- Barro F., Fernández-Escobar J., De La Vega M., Martín A. Modification of glucosinolate and erucic acid contents in doubled haploid lines of *Brassica carinata* by UV treatment of isolated microspores. *Euphytica*. 2003;129(1):1-6. doi 10.1023/A:1021578318098
- Bhatia R., Dey S.S., Parkash C., Sharma K., Sood S., Kumar 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. *Sci Hortic*. 2018;233:178-187. doi 10.1016/j.scienta.2018.01.017
- Cao M.Q., Charlot F., Dore C. Embryogenesis and plant regeneration in sauerkraut cabbage (*Brassica oleracea* L. subsp. *capitata*) by *in vitro* culture of isolated microspores. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III*. 1990;310:203-209. doi 10.1007/BF00231964
- Cordewener J.H.G., Hause G., Görgen E., Busink R., Hause B., Dons H.J.M., Van Lammeren A.A.M., Van Lookeren Campagne M.M., Pechan P. Changes in synthesis and localization of members of the 70-kDa class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. microspores. *Planta*. 1995;196:747-755. doi 10.1007/BF01106770
- Cousin A., Nelson M.N. Twinned microspore-derived embryos of canola (*Brassica napus* L.) are genetically identical. *Plant Cell Rep*. 2009;28(5):831-835. doi 10.1007/s00299-009-0677-3
- Cristea T.O., Iosob G.A., Brezeanu C., Brezeanu P.M. Effect of chemical composition of nutritive medium and explant size over androgenetic response in microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Rev Chim*. 2020;71(10):131-136. doi 10.37358/RC.20.10.8357
- Custers J.B.M., Cordewener J.H.G., Nöllen Y., Dons H.J.M., Van Lookeren Campagne M.M. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Rep*. 1994;13(5):267-271. doi 10.1007/BF00233317
- da Silva Dias J.C. Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis. *Euphytica*. 1999;108:65-69. doi 10.1023/A:1003634030835
- da Silva Dias J.C. Protocol for broccoli microspore culture. In: *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Springer Netherlands, 2003; 195-204. doi 10.1007/978-94-017-1293-4_30
- Diao W.P., Jia Y.Y., Song H., Zhang X.Q., Lou Q.F., Chen J.F. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. *Sci Hortic*. 2009; 119(3):246-251. doi 10.1016/j.scienta.2008.08.016
- Duijs J.G., Voorrips R.E., Visser D.L., Custers J.B.M. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. *Euphytica*. 1992;60:45-55. doi 10.1007/BF00022257
- Fan Z., Armstrong K.C., Keller W.A. Development of microspores *in vivo* and *in vitro* in *Brassica napus* L. *Protoplasma*. 1988;147: 191-199. doi 10.1007/BF01403347
- Ferrie A.M.R., Caswell K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2011;104:301-309. doi 10.1007/s11240-010-9800-y
- Ferrie A.M.R., Epp D.J., Keller W.A. Evaluation of *Brassica rapa* L. genotypes for microspore culture response and identification of a highly embryogenic line. *Plant Cell Rep*. 1995;14(9):580-584. doi 10.1007/BF00231942
- Gu H.H., Zhou W.J., Hagberg P. High frequency spontaneous production of doubled haploid plants in microspore cultures of *Brassica rapa* ssp. *chinensis*. *Euphytica*. 2003;134:239-245. doi 10.1023/B:EUPH.0000004945.01455.6d
- Gu H., Zhao Z., Sheng X., Yu H., Wang J. Efficient doubled haploid production in microspore culture of loose-curd cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Euphytica*. 2014;195:467-475. doi 10.1007/s10681-013-1008-x
- Gyulai G., Gemesne J.A., Sagi Zs., Venczel G., Pinter P., Kristof Z., Torjek O., Heszky L., Bottka S., Kiss J., Zatyko L. Doubled haploid development and PCR-analysis of F₁ hybrid derived DH-R₂ paprika (*Capsicum annuum* L.) lines. *J Plant Physiol*. 2000;156(2):168-174. doi 10.1016/S0176-1617(00)80302-8
- Hoseini M., Ghadimzadeh M., Ahmadi B., da Silva J.A. Effects of ascorbic acid, alpha-tocopherol, and glutathione on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 2014;50:26-35. doi 10.1007/s11627-013-9579-8
- Huang B., Bird S., Kemble R., Simmonds D., Keller W., Miki B. Effects of culture density, conditioned medium and feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Plant Cell Rep*. 1990;8(10):594-597. doi 10.1007/BF00270061
- Ji J., Su H., Cao W., Zhang X., Li H., Fang Z., Yang L., Zhang Ya., Zhuang M., Wang Yo., Taranov V., Lv H. Genetic analysis and mapping of QTLs for isolated microspore embryogenesis in cabbage. *Scientia Horticulturae*. 2023;313:111897. doi 10.1016/j.scienta.2023.111897
- Kasha K.J. Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants. In: Don Palmer C., Keller W.A., Kasha K.J. (Eds) *Haploids in Crop Improvement II. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 56. Springer, 2005;123-152. doi 10.1007/3-540-26889-8_7
- Kitashiba H., Taguchi K., Kaneko I., Inaba K., Yokoi S., Takahata Y., Nishio T. Identification of loci associated with embryo yield in microspore culture of *Brassica rapa* by segregation distortion analysis. *Plant Cell Rep*. 2016;35(10):2197-2204. doi 10.1007/s00299-016-0292-4. Epub 2016 Jul 20.
- Kott L.S. Application of doubled haploid technology in breeding of oilseed *Brassica napus*. *AgBiotech News Inf*. 1998;10:69N-73N. doi 10.1533/9781908818478.183
- Kott L.S., Polsoni L., Beversdorf W.D. Cytological aspects of isolated microspore culture of *Brassica napus*. *Can J Bot*. 1988;66(8):1658-1664. doi 10.1139/b88-226
- Kozar E.V., Domblides E.A., Soldatenko A.V. Embryogenesis of European radish (*Raphanus sativus* L. subsp. *sativus* convar. *radicula*) in

- culture of isolated microspores in vitro. *Plants*. 2021;10(10):2117. doi 10.3390/plants10102117
- Kozar E.V., Kozar E.G., Domblides E.A. Effect of the method of microspore isolation on the efficiency of isolated microspore culture in vitro for Brassicaceae family. *Horticultrae*. 2022;8(10):864. doi 10.3390/horticultrae8100864
- Kyo M., Harada H. Control of the developmental pathway of tobacco pollen in vitro. *Planta*. 1986;168:427-432. doi 10.1007/BF00392260
- Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 1982;105(5):427-434. doi 10.1016/S0044-328X(82)80040-8
- Lighter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species. *Plant Breeding*. 1989; 103(2):119-123. doi 10.1111/j.1439-0523.1989.tb00359.x
- Louarn S., Torp A.M., Holme I.B., Andersen S.B., Jensen B.D. Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea*. *Genet Resour Crop Evol*. 2007;54(8):1717-1725. doi 10.1007/s10722-006-9181-6
- Malik A.A., Cui L., Zhang S., Chen J. Efficiency of SSR markers for determining the origin of melon plantlets derived through unfertilized ovary culture. *Hort Sci*. 2011;38(1):27-34. doi 10.17221/47/2010-HORTSCI
- Minейкина А., Бондарева Л., Soldatenko А., Домблидес Е. Androgenesis of red cabbage in isolated microspore culture in vitro. *Plants*. 2021;10(9):1950. doi 10.3390/plants10091950
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962;15(3):473. doi 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Pechan P.M., Keller W.A. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol Plant*. 1988;74(2):377-384. doi 10.1111/j.1399-3054.1988.tb00646.x
- Pechan P.M., Smykal P. Androgenesis: affecting the fate of the male gametophyte. *Physiol Plant*. 2001;111(1):1-8. doi 10.1034/j.1399-3054.2001.1110101.x
- Prem D., Gupta K., Sarkar G., Agnihotri A. Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2008;93:269-282. doi 10.1007/s11240-008-9373-1
- Rodriguez-Serrano M., Bárány I., Prem D., Coronado M.-J., Risueño M.C., Testillano P.S. NO, ROS, and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. *J Exp Bot*. 2012;63(5):2007-2024. doi 10.1093/jxb/err400
- Rudolf K., Bohanec B., Hansen M. Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. *capitata* L.: genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. *Plant Breed*. 1999;118(3):237-241. doi 10.1046/j.1439-0523.1999.118003237.x
- Shumilina D., Korniyukhin D., Domblides E., Soldatenko A., Artemyeva A. Effects of genotype and culture conditions on microspore embryogenesis and plant regeneration in *Brassica rapa* ssp. *rapa* L. *Plants*. 2020;9(2):278. doi 10.3390/plants9020278
- Simmonds D.H., Keller W.A. Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus*. *Planta*. 1999;208:383-391. doi 10.1007/s004250050573
- Su H., Chen G., Yang L., Zhang Y., Wang Y., Fang Z., Lv H. Proteomic variations after short-term heat shock treatment reveal differentially expressed proteins involved in early microspore embryogenesis in cabbage (*Brassica oleracea*). *PeerJ*. 2020;8:e8897. doi 10.7717/peerj.8897
- Takahata Y., Keller W.A. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Plant Sci*. 1991;74(2):235-242. doi 10.1016/0168-9452(91)90051-9
- Tang X., Liu Y., He Y., Ma L., Sun M. Exine dehiscing induces rape microspore polarity, which results in different daughter cell fate and fixes the apical-basal axis of the embryo. *J Exp Bot*. 2013;64(1): 215-228. doi 10.1093/jxb/ers327
- Telmer C.A., Simmonds D.H., Newcomb W. Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol Plant*. 1992;84(3):417-424. doi 10.1111/j.1399-3054.1992.tb04685.x
- Tonguç M., Griffiths P.D. Genetic relationships of *Brassica* vegetables determined using database derived simple sequence repeats. *Euphytica*. 2004;137(2):193-201. doi 10.1023/B:EUPH.0000041577.84388.43
- Touraei A., Pfoesser M., Vicente O., Heberle-Bors E. Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta*. 1996;200:144-152. doi 10.1007/BF00196662
- Tuncer B., Çğ A., Yanmaz R., Yaşar F. Effect of heat shock treatment on microspore embryogenesis in *Brassica oleracea* species. *J Agric Sci (Belihuloya)*. 2016;22(4):548-554. doi 10.1501/Tarimbil_0000001413
- Weber M., Davies J.J., Wittig D., Oakeley E.J., Haase M., Lam W.L., Schuebeler D. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet*. 2005;37(8):853-862. doi 10.1038/ng1598
- Winarto B., da Silva J.A.T. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2011;107(2): 305-315. doi 10.1007/S11240-011-9981-Z/TABLES/6
- Yahyaoui E., Germanà M.A. Microspore embryogenesis in *Citrus*. In: Segui-Simarro J.M. (Ed.) Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology. Vol. 2289. New York, NY: Humana, 2021;149-166. doi 10.1007/978-1-0716-1331-3_10
- Yang S., Liu X., Fu Y., Zhang X., Li Y., Liu Z., Feng H. The effect of culture shaking on microspore embryogenesis and embryonic development in Pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*). *Sci Hortic*. 2013;152:70-73. doi 10.1016/j.scienta.2013.01.019
- Yuan S., Su Y., Liu Y., Fang Z., Yang L., Zhuang M., Zhang Y., Sun P. Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 2012;110(1): 69-76. doi 10.1007/s11240-012-0131-z
- Zeng A., Yan J., Song L., Gao B., Li J. Effects of ascorbic acid and embryogenic microspore selection on embryogenesis in white cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *J Hortic Sci Biotechnol*. 2015;90(6):607-612. doi 10.1080/14620316.2015.11668722
- Zhang F.L., Aoki S., Takahata Y. RAPD markers linked to microspore embryogenic ability in *Brassica* crops. *Euphytica*. 2003;131(2): 207-213. doi 10.1023/A:1023955131523
- Żur I., Dubas E., Golemic E., Szechyńska-Hebda M., Gołębiowska G., Wędzony M. Stress-related variation in antioxidative enzymes activity and cell metabolism efficiency associated with embryogenesis induction in isolated microspore culture of triticale (*x Triticosecale* Wittm.). *Plant Cell Rep*. 2009;28(8):1279-1287. doi 10.1007/s00299-009-0730-2

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.11.2024. После доработки 27.02.2025. Принята к публикации 04.03.2025.