

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
НА ЧАСТОТУ ПРОРАСТАНИЯ/РЕГЕНЕРАЦИИ  
МИКРОСПОРОГЕННЫХ ЭМБРИОИДОВ  
*BRASSICA OLERACEA L.*

А.А. СИНИЦЫНА, А.В. ВИШНЯКОВА, А.А. АЛЕКСАНДРОВА, С.Г. МОНАХОС

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

Большинство генотипов капусты белокочанной (*Brassica oleracea L.*) в культуре микроспор имеют низкую регенерационную способность, а также непрямо развитие проростков посредством образования адвентивных побегов или вторичного эмбриогенеза. Повышение частоты регенерации и формирование проростков из эмбриоидов без промежуточных стадий могут обеспечить больший выход удвоенных гаплоидов. Изучено влияние гелеобразователей: агара (11 г/л), агаргеля (4,5 г/л) и фитагеля (2 г/л) – на частоту регенерации/прорастания эмбриоидов в культуре изолированных микроспор капусты белокочанной (*B. oleracea var. capitata*), а также воздействие холодной обработки при 5°C в течение 3, 6, 9, 12 и 15 дней в темноте на прямое прорастание эмбриоидов капусты кольраби (*B. oleracea var. gongylodes*). На регенерационной среде В5 с добавлением агара частота регенерации проростков капусты белокочанной была существенно выше, чем на средах с добавлением агаргеля и фитагеля. Кроме того, на средах, содержащих агаргель и фитагель, наблюдали витрификацию тканей эмбриоидов. Прямое прорастание эмбриоидов не происходило. Предварительная холодовая обработка эмбриоидов капусты кольраби при температуре 5°C в течение 3, 6 и 9 дней в полной темноте способствовала стимуляции прямого образования проростков из эмбриоидов и увеличению частоты прямого прорастания в два раза по сравнению с контролем. Более длительные сроки холодной обработки в темноте, напротив, снизили частоту прямого прорастания эмбриоидов по сравнению с контролем в два раза при 12 днях, в шесть раз – при 15 днях инкубирования.

**Ключевые слова:** капуста белокочанная, капуста кольраби, культура изолированных микроспор, частота регенерации, прямое прорастание, холодовая обработка, агар, агаргель, фитагель, эмбриоид, проросток.

### Введение

Выход удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор определяется двумя процессами: индукцией эмбриогенеза из микроспор и частотой прорастания эмбриоидов, и регенерацией проростков из эмбриоидов (Kozar et al., 2020). Частота формирования проростков из эмбриоидов у различных видов *Brassica* варьирует от 0 до 94%: у *Brassica 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., 2010). Среди разновидностей *B. oleracea* максимальная частота формирования растений-регенерантов отмечена у брокколи – 60–70% (Duijs et al., 1992); у капусты кольраби частота регенерации варьирует от 11 до 63% (Klíma et al., 2004), у капусты белокочанной она составляет менее 54% (Pilih et al., 2008).

При высадке эмбрионов капустных культур на регенерационную среду прямое прорастание и формирование побега происходят редко, у большинства видов *Brassica* частота такого развития эмбрионов составляет менее 30% (Klutschewski, 2012; Gu et al., 2014). Микроспорогенные эмбрионы, которые внешне нормально выглядят, в большинстве случаев набухают и разрастаются. В дальнейшем набухшие семядоли и гипокотиль эмбриона могут витрифицироваться или дифференцироваться во вторичные эмбрионы, адвентивные побеги (Ferrie and Caswell, 2011; Pilih et al., 2018). Прямое прорастание эмбрионов обеспечивает быстрое получение ценных для селекции новых сочетаний аллелей исходного генотипа, в то время как разрастание эмбрионов 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).

На процесс прорастания/регенерации эмбрионов, полученных из микроспор, влияют генотип (Wei et al., 2008), стадия развития эмбрионов, питательная среда (Tian et al., 2004; Zhang et al., 2006) и условия культивирования (Klutschewski, 2012). Высокая генотип-специфичность и низкая частота регенерации/прорастания эмбрионов 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 для каждого вида или генотипа состава среды и условий культивации позволит повысить частоту прорастания эмбрионов, а также не допустить разрастания, витрификации или вторичного эмбриогенеза нормально выглядящих эмбрионов капустных культур (Klutschewski, 2012; Kozar et al., 2020).

Консистенция питательной среды, тип гелеобразователя или марка агара могут влиять на рост ткани в культуре (Debergh, 2006; Sendra, 2017; Vasilchenko, 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. 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 фитагель, агаргель (смесь агара и фитагеля), агарозу, крахмал, гуаровую камедь, ксантановую камедь (Dobrzenski et al., 2011). Фитагель, 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 геля при низких концентрациях (1,5–2,5 г/л), прозрачности и бесцветности геля (Banik et al., 2000; Thorpe et al., 2008). Агаргель сочетает положительные свойства фитагеля 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 эмбрионов 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; Niu et al., 2019). Работы с использованием других гелеобразователей немногочисленны. Например, Шумилина и др. (2015) в культуре микроспор капусты китайской проводили культивацию эмбрионов на питательной среде Мурасиге-Скуга с добавлением 3 г/л фитагеля в сочетании с 0,1 мг/л бензиламинопурина. Фитагель также применялся для культивации эмбрионов капусты белокочанной (Минейкина и др., 2016), капусты брокколи (Domblides et al., 2018), репы (Shumilina et al., 2020) Zeng et al. (2015) для регенерации эмбрионов капусты брюссельской использовали 10 г/л агарозы. Эффективность использования сред, содержащих агар-гель для получения растений из эмбрионов *B. Oleracea*, не изучалась.

Условия культивации – такие, как температура и фотопериод, способны повлиять на развитие эмбрионов в проростки и последующее формирование

растений-регенерантов. Ряд исследований, посвященных стимуляции прямого пути прорастания эмбриоидов, свидетельствует 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 увеличивала 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 ч света в сутки) наблюдаемая частота прямого прорастания эмбриоидов рапса при 1°C составляла более 70% и была на 50% выше, чем при 4°C.

В работе Rijven (1952) сообщается, что высокая интенсивность света в первые несколько дней культивации эмбриоидов *Capsella bursa-pastoris* L. может подавлять их прорастание. Инкубирование эмбриоидов *Musa acuminata* Colla в полной темноте дает лучшие результаты, чем чередование свет/тьма (Uma et al., 2011). Для увеличения скорости роста и длины проростков *Musa balbisiana* Colla отсутствие света было в целом лучше, чем при различных фотопериодических режимах (Ahmed et al., 2006).

Работа посвящена изучению влияния гелеобразователей на частоту регенерации/прорастания эмбриоидов, полученных в культуре микроспор *B. oleracea* var. *capitata*, а также изучению возможности стимулирования прямого прорастания эмбриоидов *B. oleracea* var. *gongylodes* при воздействии холодной обработки в сочетании с культивацией в темноте. В качестве вариантов гелеобразователей использовали 11 г/л агара, 4,5 г/л агаргеля и 2 г/л фитагеля. Обработку холодом в отсутствие света проводили при 5°C в течение 3, 6, 9, 12 и 15 дней.

## Материалы и методы исследований

**Растения-доноры и условия выращивания.** Для изоляции микроспор использовали разновидности вида *B. oleracea* L., представленные 2 линиями капусты белокочанной *B. oleracea* var. *capitata* БФЦЗ×N14 и ЦрI×Фy4–5I и одной линией капусты кольраби *B. oleracea* var. *gongylodes* Кор17×Кор2фКи)2–1 из коллекции ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева».

Донорные растения выращивали в условиях открытого и защищенного грунта. В стадии 3–5 настоящих листьев рассаду пересаживали в открытый грунт. Осенью здоровые, хорошо сформированные растения пересаживали в зимнюю теплицу для яровизации при температуре 4–6°C в течение трех месяцев. Далее температуру воздуха повышали до 15–20°C, чем стимулировали активный рост и цветение.

**Изоляция и культивирование микроспор.** Для изоляции микроспор отбирали бутоны длиной 5,0 мм для капусты кольраби и 5,1–5,3 мм – для генотипов капусты белокочанной, содержащие микроспоры поздней одноядерной стадии развития. Изоляцию и культивирование микроспор проводили по методике, описанной Байдиной (2018).

**Регенерация/проращивание эмбриоидов.** Эмбриониды в семядольной стадии развития пересаживали в полипропиленовые автоклавируемые контейнеры размером (8×6×4,5 см), заполненные на 0,5–0,6 см агаризованной (1,1%) средой B5 (Gamborg et al., 1968), содержащей 2,5% сахарозы, рН среды перед стерилизацией автоклавированием доводили до 5,8. Плотность размещения эмбриоидов составляла 9 шт. на один контейнер. Эмбриониды культивировали в климатической комнате при 24°C и фотопериоде 16 ч – день, 8 ч – ночь. Один раз в 30 дней при отсутствии развитых растений производили пересадку развивающихся эмбриоидов на свежую питательную среду того же состава. При образовании из эмбрионидов проростка с нормально развитыми листьями и корневой системой их пересаживали в кассеты с торфяным субстратом для адаптации.

Изучение влияния различных типов гелеобразователей в среде B5 на морфогенез эмбриоидов было проведено у капусты белокочанной. В качестве гелеобразующих

веществ были использованы агаргель в концентрации 4,5 г/л и фитагель в концентрации 2 г/л. Контролем в эксперименте был агар в концентрации 11 г/л.

Изучение влияния холодной обработки (5°C) и инкубирования в темноте на стимуляцию прямого прорастания эмбриоидов проводили на капусте кольраби. В рамках эксперимента эмбриоиды сразу после пересадки на твердую питательную среду помещали в холодильную камеру и культивировали при 5°C и отсутствии света в течение 3, 6, 9, 12 и 15 дней. Кроме того, проводили культивирование эмбриоидов в темноте при 24°C в течение трех и шести дней. Контроль сразу после пересадки эмбриоидов на твердую питательную среду переносили в климатическую комнату, культивировали при 24°C и фотопериоде 16 ч – день, 8 ч – ночь.

**Статистический анализ.** Оценку существенности различий вариантов опыта проводили с использованием U-теста Манна-Уитни. При этом значения, указанные в процентах, преобразовывали с помощью функции arcsin. Эксперименты заложены в четырёхкратной повторности, одна повторность соответствует одному контейнеру с 9 эмбриоидами. Существенность различий между вариантами опыта определяли с использованием уровня значимости  $P \leq 0.05$ .

## Результаты и их обсуждение

**Изучение влияния гелеобразователей питательной среды на частоту регенерации эмбриогенных проростков.** Изучение влияния гелеобразующих веществ на частоту формирования проростков проводили с использованием линий капусты белокочанной БФЦ3×N14 и ЦрI×Фу4–5I. В качестве гелеобразователей в среде для стимуляции морфогенеза эмбриоидов использовали агар (11 г/л), агаргель (4,5 г/л) и фитагель (2 г/л) (табл. 1). Частоту регенерации генотипов капусты белокочанной оценивали как отношение общего числа образовавшихся из эмбриоидов растений-регенерантов к числу эмбриоидов.

Таблица 1

### Влияние гелеобразователя в питательной среде на частоту прорастания эмбриоидов/регенерацию проростков капусты белокочанной

Генотип	Гелеобразователь	Среднее число растений-регенерантов, образовавшихся из эмбриоидов, на один контейнер, шт.	Среднее число эмбриоидов с прямым путем развития на один контейнер, шт.	Частота регенерации, %
БФЦ3×N14	Агар (11 г/л)	4,3 ± 0,7a	3,7 ± 0,3a	48,1a
	Агаргель (4,5 г/л)	1,7 ± 1,3b	0,0 ± 0,0b	18,5b
	Фитагель (2 г/л)	0,0 ± 0,0c	0,0 ± 0,0b	0,0c
ЦрI×Фу4–5I	Агар (11 г/л)	2,3 ± 0,7a	2,2 ± 0,4a	25,9a
	Агаргель (4,5 г/л)	0,0 ± 0,0b	0,0 ± 0,0b	0,0b
	Фитагель (2 г/л)	0,7 ± 0,7b	0,0 ± 0,0b	7,4b

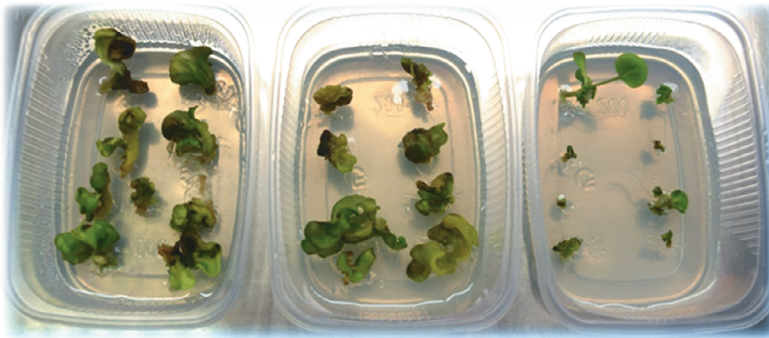
**Примечание.** Строчные буквы a, b, c указывают на существенное различие между вариантами в столбце для каждого генотипа на уровне значимости  $P = 0.05$ .

Наибольшая частота регенерации генотипов БФЦ3×N14 и ЦрI×Фу4–5I была отмечена на агаризированной среде, составив 48,1% и 25,9% соответственно.

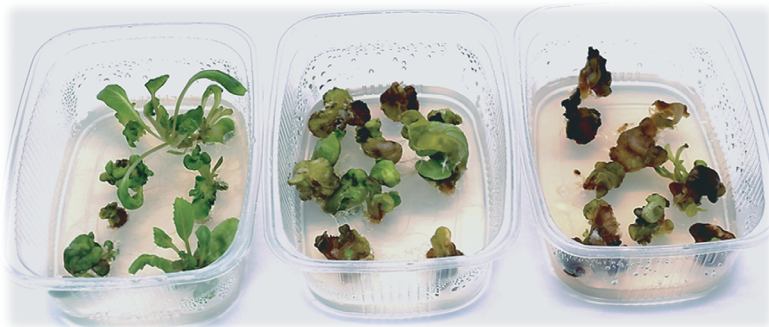
Частота регенерации генотипа БФЦЗ×N14 на среде с использованием агаргеля имела значение 18,5%, а у генотипа ЦрI×Фу4–5I – 0%. Частота регенерации генотипов БФЦЗ×N14 и ЦрI×Фу4–5I на среде с добавлением фитагеля составила 0 и 7,4% соответственно, при этом значение 7,4% значимо не отличается от 0%.

Среднее число растений-регенерантов, образовавшихся из эмбриоидов, культивируемых на питательной среде с добавлением агара, равнялось 4,3 шт/контейнер у генотипа БФЦЗ×N14 и 2,3 шт/контейнер у генотипа ЦрI×Фу4–5I и было значимо больше, чем на средах с добавлением агаргеля и фитагеля. При культивации эмбриоидов генотипа БФЦЗ×N14 на средах с агаргелем и фитагелем образование проростков наблюдали только на среде, содержащей агаргель (1,7 шт/контейнер). У генотипа ЦрI×Фу4–5I на среде с фитагелем удалось получить единичные проростки, в то время как на агаргеле растения-регенеранты не развивались.

Прямое прорастание эмбриоидов было отмечено только на среде, содержащей агар. Среднее число эмбриоидов генотипов БФЦЗ×N14 и ЦрI×Фу4–5I, развившихся без формирования промежуточных стадий, значимо не отличалось и составляло 3,7 и 2,2 шт/контейнер соответственно. На средах, содержащих агаргель или фитагель, наблюдали витрификацию эмбриоидов исследуемых генотипов, а эмбриоидов, прорастающих без формирования промежуточных стадий, не было (рис. 1, 2). Эмбриониды, помещенные на среды, содержащие агаргель и фитагель, набухали и имели низкую корнеобразовательную и побегообразующую способность, большинство эмбриоидов витрифицировались, поражались некрозами, темнели и прекращали свое развитие (рис. 2).



**Рис. 1.** Регенерация проростков из эмбриоидов на твердой питательной среде с различными гелеобразователями (слева направо: агар, 11 г/л; фитагель, 2 г/л; агаргель, 4,5 г/л); генотипа БФЦЗ×N14 на 4-й неделе регенерации



**Рис. 2.** Регенерация проростков из эмбриоидов на твердой питательной среде с различными гелеобразователями (слева направо: агар, 11 г/л; фитагель, 2 г/л; агаргель, 4,5 г/л) генотипа ЦрI×Фу4–5I на 4-й неделе регенерации

**Изучение влияния условий культивирования эмбриоидов в темноте при пониженной температуре.** С целью стимуляции прямого прорастания эмбриоидов и сокращения сроков подготовки проростков к пересадке в грунт было изучено сочетание воздействия низкой положительной температуры и темноты на прорастание/регенерацию эмбриоидов. Для этого зрелые эмбриоиды линии (Кор17×Кор2фКи)2–1 капусты кольраби 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. После проращивания эмбриоидов в темноте и холодной обработки в темноте на 30-й и 45-й дни культивирования оценивали количество готовых к пересадке в грунт растений и сравнивали с контролем без холодной предобработки и культивированием эмбриоидов на свету сразу после пересадки их на среду для регенерации (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние условий культивирования на частоту прямого прорастания и регенерации эмбриоидов капусты кольраби**

Условия эксперимента, число дней культивирования эмбриоидов	Количество проростков при прямом прорастании эмбриоидов, шт.			Частота прямого прорастания, %	Среднее число эмбриоидов с развитием без промежуточных стадий на 1 контейнер, шт.	Частота формирования проростков, всего, %	Всего проростков (с учетом образования адвентивных побегов и вторичного эмбриогенеза), шт.
	на 30-й день	на 45-й день	Всего				
0 (контроль)	10	6	16	44,44a	4±0,8a	125	45
3 (при 24°C)	0	13	13	36,11a	3,25±0,49a	52,78	19
6 (при 24°C)	0	15	15	41,67a	3,75±0,48a	47,22	17
3 (при 5°C)	26	5	31	86,11b	7,75±1,47b	100	36
6 (при 5°C)	23	10	33	91,67b	8,25±1,01b	102,78	37
9 (при 5°C)	21	11	32	88,89b	8±0,9b	119,45	43
12 (при 5°C)	0	9	9	25c	2,25±0,3c	125	45
15 (при 5°C)	0	5	5	7,2d	1,25±0,39d	127,78	46

**Примечание.** Строчные буквы a, b, c, d указывают на существенное различие 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. Среднее число проростков при прямом прорастании эмбриоидов при культивации в темноте было сопоставимо с контролем, в то же время число полученных из них саженцев было ниже, чем образовалось из эмбриоидов в контроле.

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 среднее число полученных растений на 45-й день культивирования эмбриоидов с 4 до 7,75–8,25 шт/контейнер и частоту прямого прорастания эмбриоидов с 44,44 до 86,11–91,67% по сравнению с контролем. При этом значимые различия

между частотой прямого прорастания эмбрионов 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 эмбрионов, среднего числа растений-регенерантов из прямо проросших эмбрионов и сдвинула сроки пересадки растений в грунт на 15 дней по сравнению с холодной обработкой без света в течение 3–9 дней и контролем. Число растений, полученных на 45-й день культивирования эмбрионов, и частота прямого прорастания эмбрионов при 15 днях холодной обработки в темноте составили 1,25 шт/контейнер, или 7,5% соответственно, что было значительно меньше, чем 2,25 шт/контейнер, или 25% при 12 днях такой обработки (рис. 3).



**Рис. 3.** Регенерация проростков из эмбрионов после холодной обработки при 5°C генотипа (Кор17×Кор2фКи)2–1 на 3-й неделе культивации

Воздействие холодом повлияло на длительность периода культивации эмбрионов и сроки пересадки растений-регенерантов в почвенный субстрат. После 30 дней культивирования в почвенный субстрат было пересажено больше половины саженцев, полученных из эмбрионов со сроками холодной обработки в темноте 3, 6, 9 дней и контроля. На 45-й день саженцы, полученные при прямом прорастании эмбрионов, подвергавшихся воздействию холода в сочетании с темнотой сроком 3–9 дней, и контроль были полностью адаптированы к условиям *in vivo*. Пересадка в почвенный субстрат саженцев, полученных из прямо проросших эмбрионов, находившихся при 5°C 12 и 15 дней и при 25°C 3 и 6 дней в отсутствие света, происходила однократно на 45-й день культивирования.

При изучении влияния холодной обработки и темноты для каждого из вариантов опыта и контроля нами было использовано по 36 эмбрионов генотипа (Кор17×Кор2фКи)2–1 и получено от 17 до 46 растений-регенерантов на контейнер. Превышение количества растений-регенерантов над количеством культивируемых эмбрионов произошло за счет формирования нескольких проростков из одного

эмбриоида в результате вторичного эмбриогенеза и роста адвентивных побегов. Частота прямого прорастания эмбриоидов при культивации эмбриоидов только в темноте в течение 3 и 6 дней (36,11 и 41,67% соответственно) сопоставима с контролем, однако общая частота регенерации в темноте составила 52,78% для 3-х дней и 47,22% для 6 дней культивации, что ниже, чем общая частота регенерации с чередованием темнота/свет у контроля в первые дни культивирования, равная 125%, и общая частота регенерации в темноте при 5°C, имеющая значение от 100 до 127,78%. Общая частота регенерации эмбриоидов со сроками холодной обработки в темноте 3, 6 и 9 дней составляет 100–119,45%, общая частота регенерации контроля и эмбриоидов со сроками холодной обработки в темноте 12 и 15 дней – 125–127,78%.

### Результаты и их обсуждение

Известно, что фитагель и агаргель являются экономичной заменой агару за счет способности образовать стабильные плотные и прозрачные гели в меньшей концентрации (1,5–2,5; 3,5–5,0 г/л соответственно), чем агар (7,0–11,0 г/л). Nairn (1988) отмечает, что использование фитагеля может вызывать витрификацию тканей некоторых видов растений. Hall (2000) считает, что проблему витрификации можно решить применением агаргеля, предотвращающего гипергидрацию и изменение структуры растительных тканей. Однако в нашем опыте на генотипах капусты белокочанной БФЦЗ×N14 и ЦрI×Фу4–5I витрификация эмбриоидов происходила на среде как с фитагелем, так и с агаргелем.

В культуре микроспор капусты китайской и брокколи добавление 3 г/л фитагеля и 0,1 мг/л бензиламинопурина в среду для культивации эмбриоидов используют для стимулирования образования вторичных эмбриоидов, что позволяет получить большое число удвоенных гаплоидных растений (Шумилина и др., 2015; Dombldes et al., 2018). На средах с гелеобразователями, заменяющими агар, также было отмечено разрастание эмбриоидов с образованием адвентивных побегов или вторичным эмбриогенезом. Однако растения, регенерирующие посредством вторичного эмбриогенеза и органогенеза, являются клонами одного генотипа, не несут новых сочетаний аллелей исходного эмбриоида.

Прямое прорастание эмбриоидов в проростки наблюдали только на среде с добавлением агара. Доля эмбриоидов с прямым прорастанием, культивируемых на питательной среде с добавлением агара, генотипов БФЦЗ×N14 и ЦрI×Фу4–5I, составила 41 и 25% соответственно при общей частоте регенерации 48,1 и 25,9% соответственно. Частота формирования растений-регенерантов при культивации эмбриоидов на агаризированной среде была в несколько раз выше, чем на средах с добавлением фитагеля и агаргеля, и варьировала в пределах 25,9–48,1%, что сопоставимо с данными Pilih et al. (2008), отмечающим частоту регенерации генотипов капусты белокочанной менее 54%.

Таким образом, для получения растений-регенерантов в культуре микроспор капусты белокочанной является более предпочтительным использование в качестве гелеобразователя агара.

Работы многих авторов свидетельствуют о возможности стимуляции прямого прорастания эмбриоидов рапса при холодной обработке низкой положительной температурой 1–10°C в течение 3–14 дней (CegielskaTaras et al., 2002; Zhou et al., 2002; Gu et al., 2004). 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 значительной роли фотопериода



на начальных этапах формирования растений-регенерантов из эмбриоидов. 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 нашем исследовании у эмбриоидов генотипа 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 эмбриоидов в два и шесть раз соответственно по сравнению с контролем. Очевидно, в отличие от рапса для капусты кольраби холодовая обработка (5°C) в темноте сроком более 9 дней является избыточной и оказывает ингибирующее влияние на прямое прорастание эмбриоидов.

Продолжительность воздействия холодом в темноте повлияла и на сроки пересадки растений-регенерантов в почвенный субстрат. Растения-регенеранты, полученные из эмбриоидов 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 контроля.

Таким образом, культивация в темноте и культивация в темноте при 5°C более 9 дней увеличивает время прорастания эмбриоидов. Задержку побегообразования на 8–9 дней при культивировании эмбриоидов в темноте в течение 15 дней также отмечает Asif et al. (2001).

Среднее число эмбриоидов с прямым прорастанием на один контейнер при холодной обработке в темноте в течение 3, 6 и 9 дней значимо не отличалось, и сроки культивации таких эмбриоидов до получения проростков сопоставимы с контролем. Однако количество растений-регенерантов, полученных из эмбриоидов, культивируемых в темноте при 5°C на протяжении 9 дней, превышало количество исходных эмбриоидов на 7 шт. за счет появления клонов одного генотипа в результате образования адвентивных побегов и вторичного эмбриогенеза. Меньшее количество клонов было отмечено при прорастании эмбриоидов после холодной обработки в темноте сроком 3, 6 дней.

Таким образом, оптимальным можно считать срок от 3 до 6 дней, требующий использования минимума ресурсов и достаточный для стимуляции прямого пути развития эмбриоидов капусты кольраби.

## Выводы

Было изучено влияние гелеобразователей: агара (11 г/л), агаргеля (4,5 г/л) и фитагеля (2 г/л) – на частоту регенерации/прорастания эмбриоидов капусты белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata*), произведенных в культуре изолированных микроспор, а также возможность стимулирования прямого прорастания эмбриоидов капусты кольраби (*B. oleracea* var. *gongyloides*) при воздействии низкими положительными температурами (5°C) на эмбриоиды на протяжении 3, 6, 9, 12 и 15 дней в темноте.

При сравнении частоты регенерации/прорастания капусты белокочанной на средах с добавлением в качестве гелеобразователя агара (11 г/л), агаргеля (4,5 г/л) и фитагеля (2 г/л) было установлено, что частота регенерации изученных генотипов капусты белокочанной была существенно выше на питательной среде с добавлением агара в среднем в 2,5–3,5 раза. На питательных средах, содержащих агаргель и фитагель, не происходило прямое прорастание эмбриоидов, в то время как на питательной среде с агаром прямое прорастание эмбриоидов наблюдали

с частотой 3,7 эмбр/контейнер у генотипа БФЦ3×N14 и 2,2 эмбр/контейнер у генотипа ЦрI×Фу4–5I.

Таким образом, повсеместно используемый агар лучше стимулирует развитие эмбриоидов капусты белокочанной на питательной среде, чем альтернативные гелеобразователи агаргель и фитагель.

Прямое прорастание эмбриоидов имеет ряд преимуществ: сокращается время получения растений-регенерантов, что дает возможность проведения яровизации в оптимальные сроки, сокращает расходы и трудозатраты на культивирование разрастающихся эмбриоидов на питательной среде, исключается появление дублирования генотипа ввиду развития нескольких растений из одного эмбриоида, что исключает необходимость в контроле и последующей дифференциации подобных генотипов. Нами показано положительное влияние культивирования эмбриоидов при низких положительных температурах 5°C в течение 3, 6 и 9 дней: частота прямого прорастания эмбриоидов в этих условиях была в два раза выше по сравнению с контролем (культивирование эмбриоидов при 24°C и фотопериоде 16 ч – день, 8 ч – ночь).

Более длительные сроки холодной обработки в темноте в течение 12 и 15 дней, напротив, снизили частоту прямого прорастания эмбриоидов по сравнению с контролем в два и шесть раз соответственно. Также мы наблюдали увеличение сроков культивации эмбриоидов/проростков при холодной обработке в темноте на протяжении более 9 дней. При начале проращивания эмбриоидов на питательной среде при 24°C в темноте частота прямого прорастания эмбриоидов была на уровне контроля.

Таким образом, показано, что обработка низкими положительными температурами оказывает стимулирующее воздействие на прорастание эмбриоидов капусты кольраби.

### Библиографический список

1. *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 Tiss Organ Cult.* – 2014. – Vol. 118 (3). – P. 497–505.
2. *Ahmed K.Z.* Germination of *Musa balbisiana* seeds and embryos / K.Z. Ahmed, S. Remy, L. Sagi, R. Swennen // *Reunilao International*. – Brasil, 2006. – Vol. XVII.
3. *Asif M.J.* In vitro zygotic embryo culture of wild *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* and factors affecting germination and seedling growth / M.J. Asif, C. Mak, R.Y. Othman // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2001. – Vol. 67. – P. 267–270.
4. *Banik R.M.* Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential / R.M. Banik, B. Kanari, S.N. Upadhyay // *World J. Microbiol Biotechnol.* – 2000. – Vol. 16. – P. 407–414.
5. *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. – Vol. 216. – P. 83–92.
6. *Cegielska-Taras T.* Direct plant development from microspore-derived embryos of winter oilseed rape *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (DC.) / T. Cegielska-Taras T. Tykarska, L. Szała, L. Kuraś, J. Krzymański // *Metzger. Euphytica.* – 2002. – Vol. 124. – P. 341–347.
7. *Chinnusamy V.* Cold stress regulation of gene expression in plants / V. Chinnusamy, J. Zhu, J.K. Zhu // *Trends Plant Sci.* – 2007. – Vol. 12. – P. 444–451.
8. *Cilingir A.* Anther Culture in Red Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* subvar. *rubra*): Embryogenesis and Plantlet Initiation / A. CILINGIR, S.M. Dogru, E.S. Kurtar, A. Balkaya // *Ekin J.* – 2017. – Vol. 3 (2). – P. 82–87.

9. *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. – Vol. 2 (2). – P. 538–553.
10. *Custers J.B.M.* Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.) / J.B.M. Custers, Eds. M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko // *Doubled haploid production in crop plants*. – Kluwer Academic Publisher. – 2003. – P. 185–194.
11. *Debergh P.C.* Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium / P.C. Debergh // *Physiologia Plantarum*. – 2006. – Vol. 59 (2). – P. 270–276.
12. *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. – Vol. 5. – P. 345–352.
13. *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. – Vol. 1. – P. 3–7.
14. *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.
15. *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. – Vol. 89. – P. 419–428.
16. *Ferrie A.* Haploids and doubled haploids in *Brassica* spp. for genetic and genomic research / A. Ferrie, C. Möllers // *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* – 2011. – Vol. 104. – P. 375–386.
17. *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 Organ Cult.* – 2011. – Vol. 104. – P. 301–309.
18. *Gamborg O.L.* Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells / O.L. Gamborg, R.A. Miller, K. Ojima // *Exp. Cell Res.* – 1968. – Vol. 50. – P. 151–158.
19. *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. – Vol. 195. – P. 467–475.
20. *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. – Vol. 42. – P. 137–143.
21. *Hall R.D.* *Plant Cell Culture Protocols* / R.D. Hall // *Methods in Molecular Biology*. – 2000. – Vol. 111.
22. *Klíma M.* Production and utilization of doubled haploids in *Brassica oleracea* vegetables / M. Klíma, M. Vyvadilová, V. Kučera // *Hort Sci (Prague)*. – 2004. – Vol. 31. – P. 119–123.
23. *Klutschewski S.* Methodical improvements in microspore culture of *Brassica napus* L.: dis. thesis zur Erlangung des Doktorgrades / S. Klutschewski. – Göttingen, Germany, 2012. – P. 24.
24. *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. – Vol. 24 (1). – P. 31–39.
25. *Nairn B.J.* Significance of gelling agents in a production tissue culture laboratory / B.J. Nairn // *Comb Proc Int Plant Pop Soc.* – 1988. – Vol. 37. – P. 200–205.
26. *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. – Vol. 245 (9). – P. 57–64.
27. *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. – Vol. 30 (1). – P. 57–66.
28. *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. – Vol. 118 (3). – P. 237–241.
29. Rijken A.H.G. In vitro studies on the embryos of *Capsella bursa-pastoris* / A.H.G. Rijken // *Acta Bot Neerl.* – 1952. – Vol. 1. – P. 157–200.
30. *Shumilina D.* Effects of Genotype and Culture Conditions on Microspore Embryogenesis and Plant Regeneration in *Brassica Rapa* ssp. *Rapa* L. / D. Shumilina, D. Kornukhin, E. Domblides, A. Soldatenko, A. Artemyeva // *Plants*. – 2020. – Vol. 9 (2). – P. 278.
31. *Smykalova I.* Efficiency of Microspore Culture for Doubled Haploid Production in the Breeding Project «Czech Winter Rape» / I. Smykalova, M. Větrovcova, M. Klima, M. Machačková, M. Griga // *Czech J. Genet. Plant Breed.* – 2006. – Vol. 42. – P. 58–71.
32. *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. – Vol. 6 (4).
33. *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. – Vol. 3. – P. 115–173.
34. *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. – Vol. 76. – P. 159–165.
35. *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 Tiss Organ Cult.* – 2011. – Vol. 105. – P. 105111.
36. *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. – Vol. 3 (54). – P. 57–66.
37. *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. – Vol. 117 (1). – P. 69–72.
38. *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. Lv, P. Sun // *Plant Sci.* – 2015. – Vol. 6. – P. 1–10.
39. *Zeng A.* Microspore embryogenesis and plant regeneration in Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera*) / Aisong Zeng Yuanyuan, Yan Jiyong, Yan Lixiao Song // *Scientia Horticulturae*. – 2015. – Vol. 191.
40. *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. – Vol. 50. – P. 180–186.
41. *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. – Vol. 37. – P. 185–192.

42. Байдина А.В. Оптимизация культуры изолированных микроспор и оценка комбинационной способности линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – М., 2018. – 21 с.

43. Минейкина А.И. Оценка устойчивости гибридных комбинаций капусты белокочанной, созданных на основе линий удвоенных гаплоидов к *Plasmodiophora brassicae* wor. / А.И. Минейкина, А.А. Ушаков, Л.Л. Бондарева // Овощи России. – 2016. – № 2 (31). – С. 90–93.

44. 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. Серия «Биологическая». – 2015. – № 4. – С. 368–375.

## EFFECT OF CULTIVATION CONDITIONS ON THE GERMINATION/REGENERATION FREQUENCY OF MICROSPOROGENIC EMBRYOS *BRASSICA OLERACEA* L.

A.A. SINITSYNA, A.V. VISHNYAKOVA, A.A. ALEKSANDROVA, S.G. MONAKHOS

(Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy)

*Most genotypes of white cabbage (*Brassica oleracea* L.) have a low frequency of microspore-derived embryos germination and regeneration through adventitious shoots or secondary embryogenesis. Increasing the frequency of regeneration and the formation of seedlings can ensure the production of a large number of doubled haploids. This work studied the effects of gelling agents, such as agar (11 g/l), agar-gel (4.5 g/l), and phytigel (2 g/l), on the frequency of regeneration/germination of microspore-derived embryos of white cabbage (*B. oleracea* L.), as well as the effect of a cold incubation of kohlrabi cabbage embryos (*B. oleracea* var. *gongyloides* L.) at 5°C for 3, 6, 9, 12 and 15 days in complete darkness. The studies showed that when culturing embryos on regeneration medium B5 solidified with agar, the embryo germination and seedling regeneration were higher than those on media solidified with agar-gel and phytigel. No embryo germination but vitrification of embryo tissues was observed on media containing agar-gel and phytigel. Cold incubation of Kohlrabi cabbage embryos at 5°C for 3, 6 and 9 days in complete darkness twice increased the frequency of embryo germination compared to the control sample. More extended periods of cold incubation for 12 days in the dark, on the other hand, twice reduced the rate of direct embryo germination compared to the control sample, and for 15 days – 6 times.*

**Key words:** white cabbage, kohlrabi cabbage, isolated microspore culture, regeneration frequency, embryo germination, cold treatment, agar, agar-gel, phytigel, seedling

### References

1. Ahmadi B., Shariatpanahi M.E., Ojaghkandi M.A., Heydari A.A. Improved microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration using putrescine, cefotaxime and vancomycin in *Brassica napus*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2014; 118 (3): 497–505.
2. Ahmed K.Z., Remy S., Sagi L., Swennen R. Germination of *Musa balbisiana* seeds and embryos. *Reunilao International.* Brasil. 2006; XVII.
3. Asif M.J., Mak C., Othman R.Y. In vitro zygotic embryo culture of wild *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* and factors affecting germination and seedling growth. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2001; 67: 267–270.
4. Banik R.M., Kanari B., Upadhyay S.N. Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential. *World J. Microbiol Biotechnol.* 2000; 16: 407–414.

5. *Bhatia R., Dey S.S., Sood S., Sharma K., Parkash C., Kumar 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. *Scientia Horticulturae*. 2017; 216: 83–92.
6. *Cegielska-Taras T., Tykarska T., Szala L., Kuraś L., Krzymański J.* Direct plant development from microspore-derived embryos of winter oilseed rape *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (DC.). *Me`tzger. Euphytica*. 2002; 124: 341–347.
7. *Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.K.* Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci*. 2007; 12: 444–451.
8. *Cilingir A., Dogru S.M., Kurtar E.S., Balkaya A.* Anther Culture in Red Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* subvar. *rubra*): Embryogenesis and Plantlet Initiation. *Ekin J*. 2017; 3 (2): 82–87.
9. *Coelho N., Filipe A., Medronho B., Magalhães S., Vitorino C., Alves L., Gonçalves S., Romano A.* 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*. 2021; 2 (2): 538–553.
10. *Custers J.B.M., Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I.* Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). Doubled haploid production in crop plants. Academic Publisher. 2003: 185–194.
11. *Debergh P.C.* Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum*. 2006; 59 (2): 270–276.
12. *Dobranszki J., Magyar-Tabori K., Tombacz E.* Comparison of the rheological and diffusion properties of some gelling agents and blends and their effects on shoot multiplication. *Plant Biotechnol*. 2011; 5: 345–352.
13. *Domblides E.A., Kozar E.V., Shumilina D.V., Zayachkovskaya T.V., Akhramenko V.A., Soldatenko A.V.* Embryogenesis in culture of isolated microspore of broccoli. 2018; 1: 3–7.
14. *Duijs J.C., 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.
15. *Fei H., Tsang E., Cutler A.* Gene expression during seed maturation in *Brassica napus* in relation to the induction of secondary dormancy. *Genomics*. 2007; 89: 419–428.
16. *Ferrie A., Möllers C.* Haploids and doubled haploids in *Brassica* spp. for genetic and genomic research. *Plant Cell. Tissue Organ Cult*. 2011; 104: 375–386.
17. *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.
18. *Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K.* Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res*. 1968; 50: 151–158.
19. *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.
20. *Gu H.H., Hagberg P., Zhou W.J.* Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Growth Regul*. 2004; 42: 137–143.
21. *Hall R.D.* Plant Cell Culture Protocols. *Methods in Molecular Biology*. 2000; 111.
22. *Klíma M., Vyvadilová M., Kučera V.* Production and utilization of doubled haploids in *Brassica oleracea* vegetables. *Hort. Sci. (Prague)*. 2004; 31: 119–123.
23. *Klutschewski S.* Methodical improvements in microspore culture of *Brassica napus* L.: dis. thesis zur Erlangung des Doktorgrades. Göttingen. Germany. 2012: 24.
24. *Kozar E.V., Domblides E.A., Soldatenko A.V.* Factors affecting DH plants in vitro production from microspores of European radish. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekt-sii*=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020; 24 (1): 31–39.

25. *Nairn B.J.* Significance of gelling agents in a production tissue culture laboratory. *Comb Proc Int Plant Pop Soc.* 1988; 37: 200–205.
26. *Niu L., Shi F., Feng H., Zhang Y.* Efficient doubled haploid production in microspore culture of Zengcheng flowering Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinesis* [L.] Makino var. *utilis* Tsen et Lee). *Scientia Horticulturae.* 2019; 245 (9): 57–64.
27. *Pilih K.R., Potokar U.K., Bohanec B.* Improvements of doubled haploid production protocol for white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.). *Folia Hort.* 2018; 30 (1): 57–66.
28. *Pilih K.R., 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 Breeding.* 2008; 118 (3): 237–241.
29. *Rijven A.H.G.* In vitro studies on the embryos of *Capsella bursa-pastoris*. *Acta Bot Neerl.* 1952; 1: 157–200.
30. *Shumilina 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.
31. *Smykalova I., Větrovčova M., Klima M., Macháčková M., Griga M.* Efficiency of Microspore Culture for Doubled Haploid Production in the Breeding Project “Czech Winter Rape”. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2006; 42: 58–71.
32. *Takahashi Y., Yokoi S., Takahata Y.* Effects of genotypes and culture conditions on microspore embryogenesis and plant regeneration in several subspecies of *Brassica rapa* L. *Plant Biotechnol Rep.* 2012; 6 (4).
33. *Thorpe T., Stasolla E.C., Yeung G. – J. de Klerk, Roberts A., George E.F.* The components of plant tissue culture media: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. *Plant propagation by tissue culture.* Springer. Dordrecht. 2008; 3: 115–173.
34. *Tian H., Yao C.Y., Sun M.X.* High frequency conversion of microspore-derived embryos of *Brassica napus* cv. *Topas* by supplemental calcium and vitamins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2004; 76: 159–165.
35. *Uma S., Lakshmi S., Saraswathi M.S., Akbar A., Mustaffa M.M.* Embryo rescue and plant regeneration in banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2011; 105: 105–111.
36. *Vasilchenko E.N., Zhuzhzhhalova T.P., Vashchenko T.G., Zemlyanukhina O.A., Karpechenko N.A., Podvigina O.A.* Peculiarities of in vitro reproduction of sugar beet haploid regenerants. *Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great.* 2017; 3 (54): 57–66.
37. *Wei Z., Qiang F., Xigang D., Manzhu B.* The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration. *Scientia Horticulturae.* 2008; 117 (1): 69–72.
38. *Yuan S., Su Y., Liu Y., Li Z., Fang Z., Yang L., Zhuang M., Zhang Y., Lv H., Sun P.* Chromosome Doubling of Microspore-Derived Plants from Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) and Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.). *Plant Sci.* 2015; 6: 1–10.
39. *Zeng Aisong, Yuanyuan Yan, Jiyong Yan, Lixiao Song.* Microspore embryogenesis and plant regeneration in Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera*). *Scientia Horticulturae.* 2015; 191.
40. *Zhang G.Q., Zhang D.Q., Tang G.X., He Y., Zhou W.J.* Plant development from microspore derived embryos in oilseed rape as affected by chilling, desiccation and cotyledon excision. *Biol Plantarum.* 2006; 50: 180–186.
41. *Zhou W.J., Tang G.X., Hagberg P.* Efficient production of doubled haploid plants by immediate colchicine treatment of isolated microspores in winter *Brassica napus*. *Plant Growth Regul.* 2002; 37: 185–192.
42. *Baydina A.V.* Optimizatsiya kul'tury izolirovannykh mikrospor i otsenka kombinatsionnoy sposobnosti liniy udvoennykh gaploidov kapusty belokochannoy [Optimization

of the isolated microspore culture and the assessment of the combinational ability of the lines of doubled haploids of white cabbage]. Self-review of PhD (Ag) thesis. Moscow. 2018: 21. (In Rus.)

43. *Mineykina A.I., Ushakov A.A., Bondareva L.L.* Otsenka ustoychivosti gibridnykh kombinatsiy kapusty belokochannoy, sozdannykh na osnove liniy udvoennykh gaploidov k *Plasmodiophora brassicae* wor [Evaluation of the resistance of hybrid combinations of white cabbage, created on the basis of lines of doubled haploids to *Plasmodiophora brassicae* wor]. *Ovoshchi Rossii*. 2016; 2 (31): 90–93. (In Rus)

44. *Shumilina D.V., Shmykova N.A., Bondareva L.L., Suprunova T.P.* Vliyanie genotipa i komponentov sredy na embriogenez v kul'ture mikrospor kapusty kitayskoy *Brassica rapa* ssp. *chinensis* sorta Lastochka [The effect of genotype and environmental components on embryogenesis in the culture of microspores of Chinese cabbage *Brassica rapa* ssp. *chinensis* variety Lastochka]. *Izvestiya Rossiyskoy akademii nauk. Ser. Biologicheskaya*. 2015; 4: 368–375. (In Rus)

**Синицына Анастасия Александровна**, аспирант кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (925) 176–67–49; e-mail: sinitsynaaa@inbox.ru).

**Вишнякова Анастасия Васильевна**, канд. с.-х. наук, доцент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976–41–71; e-mail: a.vishnyakova@rgau-msha.ru).

**Александрова Анастасия Алексеевна**, магистр кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (910) 466–03–09; e-mail: nastya445577@gmail.com).

**Монахос Сократ Григорьевич**, д-р с.-х. наук, доцент, заведующий кафедрой ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976–41–71; e-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru).

**Anastasiya A. Sinitsyna**, postgraduate student, the Department of Botany, Breeding and Seed Production of Garden Plants, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow (127550, Russian Federation; phone: (925) 176–67–49; E-mail: sinitsynaaa@inbox.ru).

**Anastasiya V. Vishnyakova**, PhD (Ag), Associate Professor, the Department of Botany, Breeding and Seed Production of Garden Plants, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow (127550, Russian Federation; phone: (499) 976–41–71; E-mail: a.vishnyakova@rgau-msha.ru).

**Anastasiya A. Aleksandrova**, MSc student, the Department of Botany, Breeding and Seed Production of Garden Plants, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow (127550, Russian Federation; phone: (910) 466–03–09; E-mail: nastya445577@gmail.com).

**Sokrat G. Monakhos**, DSc (Ag), Associate Professor, Head of the Department of Botany, Breeding and Seed Production of Garden Plants, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow (127550, Russian Federation; phone: (499) 976–41–71; E-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru).