

ФАКТОРЫ ПРЯМОГО ПРОРАСТАНИЯ МИКРОСПОРОГЕННЫХ ЭМБРИОИДОВ *BRASSICA NAPUS* L.

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

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

Культура изолированных микроспор – основной метод производства удвоенных гаплоидов рапса, широко используемый в научно-исследовательских учреждениях и коммерческих компаниях. Протокол производства эмбриоидов рапса хорошо разработан и эффективен для многих генотипов, при этом сохраняются сложности, выражающиеся в низкой частоте регенерации проростков из эмбриоидов. При применении стандартного протокола регенерация проростков из микроспорогенных эмбриоидов, как правило, включает стадию каллусообразования и последующей регенерации адвентивных побегов, или вторичных эмбриоидов, что увеличивает срок производства растений-регенерантов и затрудняет производство удвоенных гаплоидов. Выявление факторов, влияющих на частоту прямого прорастания эмбриоидов, позволит увеличить частоту формирования проростков и сократить срок производства растений-регенерантов. При проведении исследований было изучено влияние кислотности среды на продолжительность регенерации проростков при культивировании микроспорогенных эмбриоидов рапса, а также влияние воздействия на микроспорогенные эмбриоиды в семядольной стадии развития пониженных температур +1 и +5°C в течение 3, 6, 8, 9, 12 дней при культивировании в темноте на частоту прямого прорастания эмбриоидов. Повышение pH питательной среды с 5,8 до 6,1 увеличило частоту прямого прорастания эмбриоидов на 18% и общую частоту регенерации проростков с 46 до 76%. Культивирование эмбриоидов при низких положительных температурах повлияло на частоту прямого прорастания эмбриоидов в сеянцы: наблюдали максимальную частоту прямого прорастания эмбриоидов 44–53% при культивировании при +1°C в течение 6 и 9 дней. При культивировании эмбриоидов при +5°C частота прямого прорастания составляла 0–10%, в контрольном варианте без холодной обработки – 16%.

Ключевые слова: культура изолированных микроспор, яровой рапс, частота регенерации, холодовая обработка, эмбриоид, *Brassica napus*.

Введение

ДН-технологии широко используются в частных селекционных фирмах и в академических исследованиях для ускоренного производства гомозиготных растений [8, 15]. Наиболее эффективным технологическим подходом для производства удвоенных гаплоидов рапса является культивирование изолированных микроспор. Вклад многих исследовательских групп за последние десятилетия позволил разработать эффективный протокол получения эмбриоидов *Brassica napus* L., работающий на многих генотипах [4, 24]. При этом частота формирования растений-регенерантов из эмбриоидов у *Brassica napus* L. в среднем является невысокой и варьирует от 0 до 65% [6, 13, 17, 27]. Кроме того, остаются сложности с получением растений-регенерантов в короткие сроки, в основе чего лежит низкая частота прямого прорастанием эмбриоидов [19].

Некоторые авторы [16, 22, 23] считают, что благодаря оптимизации этапа регенерации эмбриоидов можно существенно улучшить методику культуры микроспор, так как во многих исследованиях скорость регенерации является низкой, и большая часть потенциальных регенерантов погибает. Прямое прорастание эмбриоидов в сеянцы является желательным при использовании удвоенных гаплоидов в селекции:

отсутствие промежуточного этапа каллусообразования позволяет синхронизировать развитие растений, сохранить генотипическую стабильность [2, 18], а также получить цветущие растения, осуществить размножение и гибридизацию в тот же год.

На скорость и частоту регенерации эмбриоидов влияют морфологическая зрелость эмбриоидов, состав питательной среды и условия культивирования. Ряд исследований [3, 11, 18] посвящен модификации условий культивирования микроспор и эмбриоидов для повышения частоты нормального развития эмбриоидов. Другие исследователи концентрировались на модификации состава питательной среды и условий культивирования уже после пересадки эмбриоидов на агаризованную питательную среду: ряд их работ свидетельствует о положительном влиянии культивирования эмбриоидов культур рода *Brassica* в течение 3–28 дней при температуре 1–10°C [5, 6, 12, 21, 26]. Другие авторы модифицировали состав питательной среды: снижали концентрацию питательных веществ [10], добавляли регуляторы роста [1].

Наши исследования посвящены изучению влияния кислотности питательной среды на продолжительность и частоту формирования растений из микроспорогенных эмбриоидов *Brassica napus* L., а также изучению возможности стимулировать прямое прорастание эмбриоидов при воздействии на них низкими положительными температурами.

Материал и методика исследований

Растения-доноры и условия выращивания. Для изоляции микроспор использовали генотип ярового рапса F1 Джаз, растения которого были выращены в условиях защищенного грунта в 2021–2022 гг.

Изоляция и культивирование микроспор. Перед изоляцией микроспор определяли соответствие длины бутона и поздней одноядерной стадии развития микроспор, в качестве красителя использовали 4',6-диамидино-2-фенилиндо́л (DAPI) в концентрации 1,75 мкг/мл. Препараты изучали на флюоресцентном микроскопе Axio Lab A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) [25].

Изоляцию микроспор проводили по Custers et al. (2003) с модификациями С.Г. Монахос [7, 25]. Для изоляции микроспор с помощью электронного штангенциркуля отбирали бутоны размером 2,8 мм. Стерилизацию бутонов проводили в 2%-ном растворе гипохлорита натрия в течение 10 мин. Изоляцию микроспор проводили в охлажденной безгормональной питательной среде В5 с добавлением с добавлением 13% сахарозы и 5% маннитола [9]. Суспензию микроспор осаждали на центрифуге Centrifuge 5702R (Eppendorf, Hamburg, Germany) в течение 4 мин при температуре 4°C и 800 об/мин. Концентрацию микроспор определяли с помощью камеры Фукса-Розенталя и доводили до 4×10^4 микроспор/мл.

После изоляции микроспоры культивировали в безгормональной жидкой питательной среде NLN-13 с добавлением 130 г/л сахарозы, pH 5,8 [14], в течение двух суток в темноте при температуре 33°C, после чего переносили в климатическую комнату и культивировали при температуре +22°C в темноте. После появления первых эмбриоидов в торпедовидной стадии развития чашки Петри переносили на лабораторный шейкер Excella E-24 (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA) и культивировали при естественном освещении при 70 об/мин и температуре $+24 \pm 2^\circ\text{C}$ до семядольной стадии. Частота эмбриогенеза F1 Джаз составила 1876 эмбриоидов на 100 бутонов.

Регенерация/проращивание эмбриоидов. Эмбриоиды в семядольной стадии развития пересаживали в полипропиленовые автоклавируемые контейнеры размером (8 × 6 × 4,5 см), заполненные на 0,5–0,6 см средой В5 [9], содержащей 2,5% сахарозы, 1,1% агар-агара (Sigma-Aldrich, USA), pH среды перед стерилизацией автоклавированием доводили до 5,8. Плотность размещения эмбриоидов составляла 9–12 шт. на один контейнер. Эмбриоиды культивировали в климатической комнате при 22°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 эмбриоида проростка с нормально развитыми листьями и корневой системой их пересаживали в кассеты с торфяным субстратом для укоренения и адаптации.

Для изучения влияния кислотности питательной среды В5, содержащей 2,5% сахарозы и 1,1% агар-агара, на продолжительность регенерации проростков из эмбриоидов рапса кислотность среды перед автоклавированием доводили до рН 5,8; 6,1; 6,4. Эмбриоиды, достигшие семядольной стадии, пересаживали в контейнеры с питательной по 12 шт. в каждый. Опыт был заложен в 6-кратной повторности для каждого варианта. Контролем в эксперименте была питательная среда В5 с рН 5,8.

Изучение влияние низких положительных температур на частоту прямого прорастания эмбриоидов проводили при температуре +1°C и +5°C в течение 3, 6, 9, 12 дней после пересадки эмбриоидов на твердую безгормональную питательную среду В5 с добавлением 2,5% сахарозы и 1,1% агар-агара, рН 5,8. После холодной обработки контейнеры с эмбриоидами переносили в климатическую камеру и инкубировали до формирования семян при температуре 22°C и фотопериоде: 16 ч – день; 8 ч – ночь. Опыт заложен в 3–14-кратной повторности по 9 эмбриоидов в контейнере. Контроль сразу после пересадки эмбриоидов на твердую питательную среду переносили в климатическую комнату, культивировали при 22°C и фотопериоде: 16 ч – день; 8 ч – ночь.

Частоту прямого прорастания оценивали на 30 день культивирования как отношение числа эмбриоидов с прямым прорастанием к общему числу эмбриоидов на среде. Частоту формирования проростков определяли как отношение числа полученных растений-регенерантов в определенный период к общему числу пересаженных эмбриоидов. Существенность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа на уровне значимости 0,05 с использованием критерия Фишера.

Результаты и их обсуждение

Изучение влияния кислотности питательной среды на частоту регенерации эмбриогенных проростков и продолжительность формирования растений-регенерантов. При изучении влияния кислотности питательной среды на частоту формирования проростков фиксировали динамику формирования растений-регенерантов из эмбриоидов. Неразвившиеся в проростки эмбриоиды пересаживали на питательную среду с той же кислотностью. Всего было произведено около 7 пассажей, длительность регенерации растений из отдельных эмбриоидов варьировала от 30 до 220 дней (рис. 1).

В эксперименте выделено три периода формирования растений-регенерантов: с 30 по 50 дни культивирования растения-регенеранты формируются из эмбриоидов, как правило, прямым прорастанием; с 60 до 100 дни растения-регенеранты формируются за счет развития адвентивных побегов, которые при пересадке легко укореняются; с 110 по 220 дни формирование растений происходит при разрастании эмбриоидов, формировании каллуса и последующей непрямой регенерации побегов.

Развитие эмбриоидов в растения-регенеранты в контрольном варианте культивирования на питательной среде с рН 5,8 происходило с задержкой: первые растения-регенеранты были получены на 60 день культивирования, после одного пассажа. В период с 60 по 100 дни культивирования получена основная масса растений. Частота регенерации в этот период составила 32% при общей частоте регенерации для данного варианта эксперимента 46%.

При культивировании эмбриоидов на питательной среде с рН 6,1 первые растения были получены уже на 30 день культивирования эмбриоидов, а к 50 дню культивирования были пересажены в грунт 18%. Наибольшая частота регенерации была

в период 60–100 дней от начала культивирования и составляла 36% от посаженных на питательную среду эмбриоидов. Всего к 100 дню проростки образовались у более чем 50% эмбриоидов. Общая частота регенерации при культивировании эмбриоидов на питательной среде с рН 6,1 составила 76%, что на 30% выше контрольного варианта.

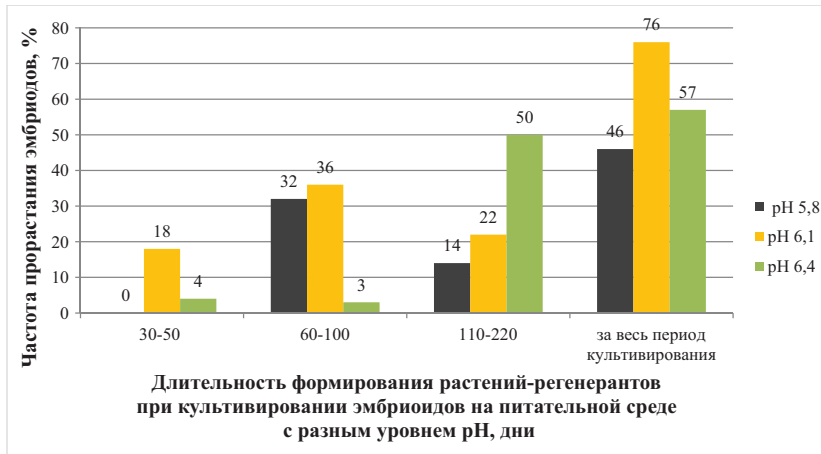


Рис. 1. Динамика частоты формирования растений-регенерантов при культивировании эмбриоидов на регенерационной среде с рН 5,8; 6,1; 6,4

Культивирование эмбриоидов на питательной среде с рН 6,4 сдерживало развитие проростков из эмбриоидов. Несмотря на то, что первые растения были сформированы к 30 дню культивирования, большая часть растений-регенерантов (50% при общей частоте регенерации 57%) была получена в период с 100 по 220 дни.

Изучение влияния воздействия низкими положительными температурами на частоту прямого прорастания эмбриоидов. С целью стимуляции прямого прорастания эмбриоидов и сокращения сроков подготовки растений-регенерантов к пересадке в грунт было изучено воздействие низких положительных температур на частоту прямого прорастания эмбриоидов. Для этого эмбриоиды в семядольной стадии развития пересаживали на среду, агаризованную 11 г/л агар-агара, с добавлением 25 г/л сахарозы, рН 5,8, и культивировали в холодильной камере при +1 и +5°C в течение 3, 6, 9 и 12 дней. После холодной обработки при проращивании эмбриоидов на 30 день культивирования оценивали количество готовых к пересадке в грунт растений и сравнивали с контролем (без холодной обработки) (табл. 1).

Частота прямого прорастания эмбриоидов зависела от температурного режима и длительности его воздействия на эмбриоиды: показано, что культивирование при температурах +1 и +5°C в течение более 10 дней приводит к задержке формирования растений из эмбриоидов. Культивирование эмбриоидов при более низкой температуре (+1°C) показало положительный эффект в отношении прямого прорастания эмбриоидов по сравнению с культивированием эмбриоидов при +22 и +5°C после пересадки на агаризованную питательную среду (рис. 2).

В контрольном варианте, без воздействия низкими положительными температурами, частота прямого прорастания эмбриоидов составила 16%. Это несущественно выше частоты прямого прорастания при трехдневном культивировании эмбриоидов при температуре +1 и +5°C. При культивировании эмбриоидов при +1°C в течение 6 и 9 дней частота прямого прорастания была существенно выше по сравнению с контрольным вариантом и составила 44 и 53% соответственно. При культивировании в течение 6 и 9 дней при температуре +5°C прямого прорастания эмбриоидов не наблюдали.

**Влияние воздействия пониженными температурами +1 и +5°C
различной продолжительности на частоту прямого прорастания
эмбрионов ярового рапса**

T, °C	Длительность культивирования эмбрионов при пониженных температурах, дн	Общее число эмбрионов, пересаженных на регенерационную среду, шт.	Количество растений-регенерантов, полученных к 30 дню культивирования, шт.	Частота прямого прорастания эмбрионов*, %
+1	3	36	3	8 ab
	6	36	16	44 c
	9	45	24	53 c
	12	27	5	19 a
+5	6	72	7	10 ab
	9	72	0	– b
	12	72	0	– b
Без обработки (контроль)	-	126	20	16 a

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

Кислотность питательной среды влияет на скорость протекания биохимических реакций, усвоение питательных веществ клетками экспланта, степень токсичности ингибиторов роста, плотности геля и на другие свойства питательной среды. Исследования Yuan et al. [20] показали, что повышение уровня pH эмбриоиндукционной питательной среды NLN-13 увеличивало частоту эмбриогенеза у различных генотипов капусты белокочанной. Наши исследования демонстрируют влияние pH питательной среды на продолжительность формирования проростков из эмбрионов, а также на общую частоту их регенерации. Увеличение уровня pH среды до 6,1 перед автоклавированием оказало положительное влияние на регенерацию проростков



Рис. 2. Развитие растений-регенерантов на 30 день культивирования на питательной среде: А – типичный проросток в контрольном варианте при культивировании эмбрионов при +22°C; Б – растение-регенерант, образовавшееся в результате прямого прорастания эмбриода, при воздействии на эмбриоды низкой положительной температурой +1°C в течение 6 дней

из эмбриоидов по сравнению с культивированием их в контрольных условиях при рН 5,8. Дальнейшее увеличение рН до 6,4 приводило преимущественно к непрямому пути образования проростков и увеличению продолжительности формирования растений. Для изучения данного феномена с помощью цифрового пенетрометра МЕГЕОН 03004 (МЕГЕОН, Москва, Россия) была измерена сила упругости, остывшей до комнатной температуры, затвердевшей питательной среды. Показана существенная разница ($HSP = 32 \text{ г/см}^2$) между вариантами с разным значением рН: для среды с рН 5,8 она составила 285 г/см^2 , при рН 6,1— 321 г/см^2 , при рН 6,4— 233 г/см^2 .

Таким образом, показано, что рН питательной среды влияет на физические свойства агаризованной питательной среды, что в свою очередь оказывает влияние на развитие эмбриоидов в растения.

Положительное влияние кратковременного воздействия низкой положительной температуры на частоту регенерации эмбриоидов культур рода *Brassica* отмечают многие исследователи [5, 12, 21, 26]. Так, исследование влияния культивирования эмбриоидов рапса при $+4^\circ\text{C}$ в течение 3, 5 и 7 дней проводили G.Q. Zhang et al. [21], наблюдая существенное увеличение частоты регенерации практически у всех изученных генотипов при культивировании эмбриоидов при $+4^\circ\text{C}$ в течение 3 и 5 дней. Увеличение частоты регенерации проростков после инкубирования эмбриоидов при низких положительных температурах исследователи связывают с дегидратацией клеток эмбриоидов, что является ключевым этапом в формировании эмбриоидов.

В наших исследованиях показано, что снижение температуры культивирования эмбриоидов до $+1^\circ\text{C}$ в первые 6–9 дней после пересадки на агаризованную среду существенно увеличивает частоту прямого прорастания по сравнению с культивированием при 22°C и 5°C . Продолжительность воздействия холодом также повлияла на частоту прямого прорастания: при культивировании в течение 12 дней при температурах $+1$ и $+5^\circ\text{C}$ частота прямого прорастания снижалась. Культивирование в течение 3 дней при $+1^\circ\text{C}$ и 6 дней при $+5^\circ\text{C}$ не было достаточным для стимуляции прямого прорастания эмбриоидов ярового рапса, и частота прямого прорастания не отличалась от контрольного варианта с культивированием эмбриоидов при 22°C .

Таким образом, оптимальным можно считать культивирование эмбриоидов при $+1^\circ\text{C}$ в течение 6–9 дней.

Выводы

Результаты исследований выявили существенное влияние на частоту регенерации/прорастания эмбриоидов рапса (*Brassica napus* L.) кислотности питательной среды в трех вариантах рН 5,8; 6,1; 6,4 и воздействия на эмбриоиды низкими положительными температурами $+1$ и $+5^\circ\text{C}$ в течение 3, 6, 9 и 12 дней на частоту их прямого прорастания.

При сравнении частоты регенерации/прорастания эмбриоидов на питательной среде с различным значением рН было установлено, что частота регенерации проростков F1 Джаз была на 30% выше при культивировании на питательной среде с рН 6,1 по сравнению с рН 5,8. Культивирование эмбриоидов на питательной среде с рН 6,4 приводило к непрямой регенерации побегов и растянутому периоду формирования растений-регенерантов.

Для стимуляции прямого прорастания эмбриоидов рапса оптимальным условием было культивирование в течение 6–9 дней при температуре $+1^\circ\text{C}$ с продолжением культивирования при $+22^\circ\text{C}$ с фотопериодом: 16 ч – день; 8 ч – ночь. Частота прямого прорастания при таком варианте культивирования была примерно в 3 раза выше, чем в контрольном варианте. Культивирование в течение 3 дней при температуре $+1^\circ\text{C}$ и 6 дней при $+5^\circ\text{C}$ не имело существенного эффекта в отношении частоты

прямого прорастания эмбриоидов по сравнению с контрольным вариантом. Культивирование эмбриоидов в течение 12 дней при пониженных температурах, а также культивирование в течение 6 и 9 дней при +5°C увеличивали срок формирования растений-регенерантов и снижали частоту прямого прорастания эмбриоидов.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075–15–2022–745 от 13 мая 2022 г., заключенного по гранту МК-3440.2022.5.

Библиографический список

1. *Ahmadi B., Ghadimzadeh A.F., Moghaddam K.* Alizadeh Embryogenesis and plant regeneration from isolated microspores of *Brassica napus* L. under different incubation time M. // *J. Food Agric. Environ.* – 2011. – Т. 9. – С. 434–437.
2. *Babbar S., Agarwal P.* Isolated microspore culture of Brassica: an experimental tool for developmental studies and crop improvement // *Indian J.* – 2004. – № 3. – P. 185–202.
3. *Belmonte M.F., Ambrose S.J., Ross A.R.S., Abrams S.R., Stasolla C.* Improved development of microspore derived embryo cultures of *Brassica napus* cv Topaz following changes in glutathione metabolism // *Physiologia Plantarum.* – 2006. – № 127. – P. 690–700.
4. *Corral-Martínez P.* Doubled haploid production in high- and low-response genotypes of rapeseed (*Brassica napus*) through isolated microspore culture / P. Corral-Martínez C., Camacho-Fernández R., Mir J.M. Seguí-Simarro // *Doubled haploid technology.* – Humana: New York, NY, 2021. – С. 129–144.
5. *Coventry J., Kott L., Beversdorf W.D.* Manual for microspore culture technique for *Brassica napus* // In *Technical bulletin* (Ontario Agricultural College. Dept. of Crop Science); O.A.C. publication, 0489, University of Guelph. – 1988.
6. *Chuong P.V., Deslauriers C., Kott L.S., Beversdorf W.D.* Effects of donor genotype and bud sampling on microspore culture of *Brassica napus* // *Can. J. Bot.* – 1988. – Vol. 66. – P. 1653–1657.
7. *Custers J.B.M., Eds. M., Maluszynski K.J., Kasha B.P., Forster I.* Szarejko Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.) // *Doubled haploid production in crop plants.* – Kluwer Academic Publisher. – 2003. – P. 185–194.
8. *Forster B.P., Thomas W.T.B.* Doubled haploids in genetics and plant breeding // *Plant breeding reviews.* – 2010. – Т. 25. – С. 57–88.
9. *Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K.* Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells // *Exp Cell Res.* – 1968. – Vol. 50. – P. 151–158.
10. *Gland-Zwenger A.* Culture conditions affecting induction and regeneration in isolated microspore cultures of different *Brassica* species // *GCIRC Proceedings of the Ninth International Rapeseed Congress.* GCIRC, Cambridge, UK. – 1995. – С. 799–801.
11. *Huang B. et al.* Plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus*: Effect of embryo age, culture temperature, osmotic pressure, and abscisic acid // *In vitro Cell Dev Biol.* – 1991. – Vol. 27. – P. 28–31.
12. *Klutschewski S.* Methodical improvements in microspore culture of *Brassica napus* L.: dis. zur Erlangung des Doktorgrades. – Göttingen, Germany, 2012. – P. 91.
13. *Kott L.S., Beversdorf W.D.* Enhanced plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus* by chilling, partial desiccation and age selection // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1990. – Vol. 23. – Pp. 187–192.
14. *Lichter R.* Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* // *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie.* – 1982. – Т. 105, № 5. – С. 427–434.
15. *Seguí-Simarro J.M.* Doubled haploid technology // *Methods in Molecular Biology.* – 2021. – Т. 2287.

16. *Sendra A.R.* Calcium and cell wall dynamics during microspore embryogenesis and doubled haploid production in rapeseed and eggplant: Thesis ... Doctor in Biotechnology. – Valencia, 2017. – P. 235.
17. *Smykalova I. et al.* Efficiency of microspore culture for doubled haploid production in the breeding project «czech winter rape» // *Genet. Plant Breed.* – 2006. – Pp. 58–71.
18. *Tian H., Yaoy C.H., 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. – Vol. 76. – Pp. 159–165.
19. *Touraev A., Forster B.P., Jain S.M.* Advances in haploid production in higher plants. – Berlin: Springer, 2009. – С. 161–169.
20. *Yuan S. et al.* Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC).* – 2012. – Т. 110, № 1. – С. 69–76.
21. *Zhang G.Q. et al.* Plant development from microspore-derived embryos in oilseed rape as affected by chilling, desiccation and cotyledon excision // *Biologia Plantarum.* – 2006. – Т. 50, № 2. – С. 180–186.
22. *Wedzony M., Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. et al.* Progress in doubled haploid technology in higher plants // *Advances in haploid production in higher plants.* Springer. – Dordrecht: Netherlands, 2009. – Pp. 1-33.
23. *Вишнякова А.В., Александрова А.А.* Изучение факторов, влияющих на регенерационную способность эмбриоидов рапса ярового, полученных в культуре изолированных микроспор // Сборник статей Международной научной конференции «Агробиотехнология-2021». – М.: Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, 2021. – С. 648–652.
24. *Зубарева И.А., Головешкина Е.Н., Виноградова С.В., Грибова Т.Н., Игнатов А.Н. и др.* Создание дигаплоидных линий *Brassica napus* L. – доноров устойчивости к вирусу мозаики турнепса // *Сельскохозяйственная биология.* – 2013. – № 5. – С. 122–125.
25. *Монахос С.Г.* Создание чистых линий – удвоенных гаплоидов капусты в культуре изолированных микроспор и селекция F1-гибридов на основе современных методов биотехнологии: Методические рекомендации. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2014. – 44 с.
26. *Синицына А.А., Вишнякова А.В., Александрова А.А., Монахос С.Г. и др.* Влияние условий культивирования на частоту прорастания/регенерации микроспорогенных эмбриоидов *Brassica oleracea* L. // *Известия ТСХА.* – 2021. – № 5. – С. 39–54.
27. *Синицына А.А.* Сравнительная оценка выхода удвоенных гаплоидов *Brassica oleracea* var. *capitata* L. и *Brassica napus* L. в культуре изолированных микроспор / А.А. Синицына, А.В. Вишнякова, С.Г. Монахос // *Картофель и овощи.* – 2022. – № 4. – С. 37–40. – DOI 10.25630/PAV.2022.29.31.008. – EDN HAFNFC.

FACTORS OF DIRECT GERMINATION OF MICROSPORE DERIVED EMBRYOS OF *BRASSICA NAPUS* L.

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

(Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy)

Isolated microspore culture is the main method of producing doubled rapeseed haploids and is widely used in research institutions and commercial companies. The protocol of rapeseed embryo production is well developed and efficient for many genotypes, but some issues remain due to the low regeneration frequency of plantlets from embryos. When the standard protocol is applied, regeneration of plantlets from microspore-derived embryos usually involves a callus-forming stage

followed by regeneration of adventitious shoots or secondary embryos, which prolong the period of plantlet regeneration and makes production of doubled haploids complicated. Identifying factors, which affect the frequency of direct embryo germination will increase the frequency of plantlet formation and reduce the period of DH plant production. In this work, we studied the effect of medium pH on the duration of plantlet regeneration from rapeseed microspore-derived embryos and effect of their low temperature treatment of +1 and +5°C for 3, 6, 8, 9, 12 days in complete darkness on the embryo maturation and germination. Raising the pH of the nutrient medium from 5.8 to 6.1 increased the frequency of direct embryos germination up to 18% and the overall frequency of plantlet regeneration up to 76%. Culturing embryos at low temperatures effected the frequency of direct germination of embryos into plantlets. The maximum frequency of 44–53% direct embryo germination was observed when cultured at +1°C for 6 and 9 days, when embryos were cultured at +5°C the frequency of direct germination was 0–10%. In the control variant without cold treatment it was 16%.

Key words: isolated microspore culture, spring rapeseed, regeneration frequency, DH technology, cold treatment, embryo, *Brassica napus*.

References

1. Ahmadi B., Ghadimzadeh M., Moghaddam A F, Alizadeh K. Embryogenesis and plant regeneration from isolated microspores of *Brassica napus* L. under different incubation time. *J. Food Agric. Environ.* 2011; 9: 434–437.
2. Babbar S., Agarwal P. Isolated microspore culture of *Brassica*: an experimental tool for developmental studies and crop improvement. *Indian J.* 2004; 3: 185–202.
3. Belmonte M.F., Ambrose S.J., Ross A.R.S., Abrams S.R., Stasolla C. Improved development of microspore derived embryo cultures of *Brassica napus* cv Topaz following changes in glutathione metabolism. *Physiologia Plantarum.* 2006; 127: 690–700.
4. Corral-Martínez P., Camacho-Fernandez C., Mir R., Seguí-Simarro J.M. Doubled haploid production in high-and low-response genotypes of rapeseed (*Brassica napus*) through isolated microspore culture. *Doubled haploid technology.* Humana, New York, NY. 2021: 129–144.
5. Coventry J., Kott L., Beversdorf W.D. Manual for microspore culture technique for *Brassica napus*. In Technical bulletin (Ontario Agricultural College. Dept. of Crop Science); O.A.C. publication, 0489, University of Guelph. 1988.
6. Chuong P.V., Deslauriers C., Kott L.S., Beversdorf W.D. Effects of donor genotype and bud sampling on microspore culture of *Brassica napus*. *Can. J. Bot.* 1988; 66: 1653–1657.
7. Custers J.B.M., Maluszynski Eds. M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Doubled haploid production in crop plants.* Kluwer Academic Publisher. 2003: 185–194.
8. Forster B.P., Thomas W.T.B. Doubled haploids in genetics and plant breeding // *Plant breeding reviews.* 2010; 25: 57–88.
9. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res.* 1968; 50: 151–158.
10. Gland-Zwenger A. Culture conditions affecting induction and regeneration in isolated microspore cultures of different *Brassica* species. *GCIRC Proceedings of the Ninth International Rapeseed Congress.* GCIRC, Cambridge, UK. 1995: 799–801.
11. Huang B. *et al.* Plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus*: Effect of embryo age, culture temperature, osmotic pressure, and abscisic acid. *In vitro Cell Dev Biol.* 1991; 27: 28-31.
12. Klutschewski S. Methodical improvements in microspore culture of *Brassica napus* L.: dis. zur Erlangung des Doktorgrades. Göttingen, Germany, 2012: 91.

13. Kott L.S., Beversdorf W.D. Enhanced plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus* by chilling, partial desiccation and age selection. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1990; 23: 187–192.
14. Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie.* 1982; 105 (5): 427–434.
15. Seguí-Simarro J.M. Doubled haploid technology. *Methods in Molecular Biology.* 2021; 2287.
16. Sendra A.R. Calcium and cell wall dynamics during microspore embryogenesis and doubled haploid production in rapeseed and eggplant: Thesis ... Doctor in Biotechnology. Valencia, 2017: 235.
17. Smykalova I., et al. Efficiency of microspore culture for doubled haploid production in the breeding project “czech winter rape”. *Genet. Plant Breed.* 2006: 58–71.
18. Tian H. et al. 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.
19. Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. Advances in haploid production in higher plants. Berlin: Springer. 2009: 161–169.
20. Yuan S. et al. Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC).* 2012; 110 (1): 69–76.
21. Zhang G.Q. et al. Plant development from microspore-derived embryos in oil-seed rape as affected by chilling, desiccation and cotyledon excision. *Biologia Plantarum.* 2006; 50 (2): 180–186.
22. Wedzony M. et al. Progress in doubled haploid technology in higher plants. Advances in haploid production in higher plants. Springer. Dordrecht, Netherlands. 2009: 1-33.
23. Vishnyakova A.V., Aleksandrova A.A. Izuchenie faktorov, vliyayushchikh na regeneratsionnyuyu sposobnost' embrioidov rapsa yarovogo, poluchennykh v kul'ture izolirovannykh mikrospor [Study of factors affecting the regenerative capacity of spring rapeseed embryos obtained in culture of isolated microspores]. *Sbornik statey mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii: “Agrobiotekhnologiya-2021”.* Moscow: Rossiyskiy gosudarstvenniy agrarniy universitet – MSKkA im. K.A. Timiryazeva, 2021: 648–652. (In Rus.)
24. Zubareva I.A., Goloveshkina E.N., Vinogradova S.V., Gribova T.N., Ignatov A.N. Sozdanie digaploidnykh liniy *Brassica napus* L. – donorov ustoychivosti k virusu mozaiki turnepa [Development of *Turnip mosaic virus* resistant doubled haploid lines of *Brassica napus* L]. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya.* 2013; 5: 122–125. (In Rus.)
25. Monakhos S.G. Sozdanie chistykh liniy – udvoennykh gaploidov kapusty v kul'ture izolirovannykh mikrospor i selektsiya F1-gibridov na osnove sovremennykh metodov biotekhnologii: metod. Rekomendatsii [Creation of pure lines – doubled haploids of cabbage in the culture of isolated microspores and selection of F1 hybrids based on modern methods of biotechnology: guidelines]. Moscow: Izd-vo RGAU – MSKhA imeni K.A. Timiryazeva, 2014: 44. (In Rus.)
26. Sinitsyna A.A., Vishnyakova A.V., Aleksandrova A.A., Monakhos S.G. Vliyanie usloviy kul'tivirovaniya na chastotu prorastaniya/regeneratsii mikrosporogennykh embrioidov *Brassica oleracea* L. [Effect of cultivation conditions on the germination/regeneration frequency of microsporogenic embryos *Brassica Oleracea* L.]. *Izvestiya Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii.* 2021; 5: 39–54. (In Rus.)
27. Sinitsyna A.A., Vishnyakova A.V., Monakhos S.G. Sravnitel'naya otsenka vykhoda udvoennykh gaploidov *Brassica oleracea* var. *capitata* L. i *Brassica napus* L. v kul'ture izolirovannykh mikrospor [Comparative evaluation of the yield of doubled haploids of *Brassica oleracea* var. *capitata* L. and *Brassica napus* L. in isolated microspore culture]. *Kartofel' i ovoshchi.* 2022; 4: 37–40. (In Rus.)

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, 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.: (910) 466-03-09; e-mail: a.alexandrova@rgau-msha.ru)

Монахос Сократ Григорьевич, д-р с.-х. наук, профессор, 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 V. Vishnyakova, PhD (Ag), Associate Professor of the Department of Botany, Plant Breeding and Seed Technology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; phone: (499) 976-41-71; E-mail: a.vishnyakova@rgau-msha.ru)

Anastasiya A. Aleksandrova, post-graduate student of the Department of Botany, Plant Breeding and Seed Technology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; phone: (910) 466-03-09; E-mail: nastya445577@gmail.com)

Sokrat G. Monakhos, DSc (Ag), Professor, Head of the Department of Botany, Plant Breeding and Seed Technology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; phone: (499) 976-41-71; E-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru)