

# Получение удвоенных гаплоидов у видов рода *Brassica* L.

Н.А. Шмыкова, Д.В. Шумилина, Т.П. Супрунова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Всероссийский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства овощных культур», Московская область, Одинцовский район, пос. ВНИИССОК, Россия

Технология получения удвоенных гаплоидов (DH (double haploid)-технологии) через культуру пыльников или микроспор *in vitro* – один из способов генетического улучшения сельскохозяйственных растений. С помощью DH-технологии полностью гомозиготные растения можно получить в течение одного года, в отличие от классических методов селекции, при использовании которых процесс инбридинга занимает 6–12 лет. Преимущество этого биотехнологического подхода также состоит в расширении формообразовательного процесса за счет гаметоклональной изменчивости. Наибольший успех в получении DH-растений через культуру микроспор достигнут у некоторых сортов рапса (*Brassica napus* L.). Эффективность DH-технологии у других представителей рода *Brassica* остается по-прежнему низкой. На индукцию эмбриогенеза микроспор влияют многочисленные факторы: условия выращивания донорных растений, их генотип, стадия развития микроспор, состав питательной среды, условия культивирования. Перепрограммирование микроспор с гаметофитного пути развития на спорофитный происходит под действием различных стрессовых воздействий. К факторам, способным повысить эффективность эмбриогенеза у представителей рода *Brassica*, относятся предобработка пыльников и микроспор повышенной температурой или колхицином. Улучшение процесса регенерации растений из эмбриоидов может быть достигнуто за счет использования регуляторов роста (этилен, абсцизовая кислота, индолилуксусная кислота). Оптимальное значение и комбинация этих факторов являются необходимым условием для успешного эмбриогенеза. В данной обзорной статье обобщен опыт зарубежных и российских ученых в области разработки технологии получения удвоенных гаплоидов капустных культур, показаны различные факторы, влияющие на процессы получения DH-растений, а также подходы, позволяющие повысить индукцию эмбриогенеза из микроспор у растений рода *Brassica*.

Ключевые слова: *Brassica*, DH-технологии, культура микроспор, эмбриогенез, удвоенные гаплоиды.

## Doubled haploid production in *Brassica* L.

N.A. Shmykova, D.V. Shumilina, T.P. Suprunova

All-Russia Research Institute of Vegetable Breeding and Seed Production, VNIISOK village, Odintsovo district, Moscow region, Russia

Doubled haploids (DHs) production through androgenesis is a biotechnological method for genetic improvement of crops. Biotechnological DH line production offers advantages to plant breeders, including the possibility to obtain homozygous lines within a year in contrast to common inbreeding methods, which may take 6–12 years. The greatest success in androgenesis has been achieved in some varieties of rapeseed (*Brassica napus* L.). However, the efficiency of androgenesis in other *Brassica* species is still poor. Induction of microspore embryogenesis is usually induced by many factors such as conditions of donor plant growth, genotype, microspore developmental stage, culture medium composition, and culture conditions. The reprogramming of microspores from the gametophytic to the sporophytic habit of development depends on various stress factors. Certain pretreatments of microspores, such as high temperature and colchicine, can favor androgenesis in *Brassica* species. Plant regeneration from microspores can be improved by proper application of different growth regulators (ethylene, abscisic acid, and indole acetic acid). Optimal combinations of these factors are mandatory for efficient androgenesis. In this review, we summarize the experience of our colleagues in DH-technology in the *Brassica* genus. Attention is focused on some factors influencing the development of doubled haploid plants and their impact on enhancing the efficiency of androgenesis in *Brassica* species.

Key words: *Brassica*, DH technology, microspore culture, embryogenesis, doubled haploids.

### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Супрунова Т.П. Получение удвоенных гаплоидов у видов рода *Brassica* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):111-120. DOI 10.18699/VJ15.014

### HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Shmykova N.A., Shumilina D.V., Suprunova T.P. Doubled haploid production in *Brassica* L. seeds. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):111-120. DOI 10.18699/VJ15.014

DOI 10.18699/VJ15.014

УДК 573.6:635.33:581.3

Поступила в редакцию 18.11.2014 г.

Принята к публикации 27.01.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015



e-mail: shmykovanat@mail.ru

**Х**озяйственное значение растений рода *Brassica* L. трудно переоценить. Среди них наиболее широкую известность имеют масличные, овощные, кормовые и медоносные культуры. В современной селекции сельскохозяйственных культур приоритетным является создание гибридов  $F_1$ , отличающихся от сортов высокой урожайностью, выравненностью растений по срокам созревания и качеству продуктивных органов. Наиболее сложным, трудоемким и продолжительным звеном в этом процессе является выведение константных родительских линий, на создание которых уходит от 6 до 12 лет при использовании традиционных методов селекции.

В большинстве развитых стран в настоящее время для ускорения селекции широко используются технологии получения удвоенных гаплоидов (ДН-технологии) (Dunwell, 2010). Среди таких технологий ведущее место занимает культура микроспор *in vitro*, которая не только обеспечивает гомозиготность получаемых удвоенных гаплоидов (ДН-линии), но и способствует расширению спектра формообразования генетических рекомбинантных форм, в том числе с рецессивными признаками. В основе технологии лежит способность микроспор переходить с гаметофитного пути развития на спорофитный под действием стрессовых факторов (повышенная температура, высокое осмотическое давление и т. д.). При соответствующих условиях такие микроспоры начинают делиться по спорофитному типу, образуя эмбриониды.

Первые успешные исследования по культуре микроспор капустных культур проведены в начале 1980-х годов (Lichter, 1982). Позднее был разработан базовый протокол культуры микроспор рапса, который служит основой ДН-технологии для растений рода *Brassica* L. (Pechan, Keller, 1988). Затем культуру микроспор стали применять для различных разновидностей капусты: капусты цветной (*B. oleracea* var. *botrytis*), брокколи (*B. oleracea* var. *italica*), капусты полу- и рыхлокочанной (*B. oleracea* var. *costata*), кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes*), капусты декоративной (*B. oleracea* var. *acephala*) и капусты белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata*), а также капусты китайской (*B. rapa* ssp. *chinensis*) (Lichter, 1989; Takahata, Keller, 1991; Duijs et al., 1992; Cao et al., 1994; Zhang et al., 2008; Winarto, Teixeira da Silva, 2011; Yuan et al., 2012).

Несмотря на успехи биотехнологии в этой области, универсальной технологии получения удвоенных гаплоидов у различных растений рода *Brassica* не существует, так как на процессы получения ДН-растений влияют многочисленные факторы: условия выращивания донорных растений, их генотип, стадия развития микроспор, тип предобработки бутонов и микроспор, состав питательных сред, условия культивирования. При этом оптимальное значение перечисленных факторов является необходимым условием для эмбриогенеза.

Если в развитых зарубежных странах ДН-технологии успешно развиваются в течение последних 25 лет, то в России они находятся на начальном этапе. Однако задача, стоящая перед селекционерами в нашей стране, требует устойчивого наращивания конкурентоспособной продукции при условии сокращения затрат. Решение ее возможно за счет привлечения современных биотехнологических подходов.

Цель данной работы – обобщить опыт зарубежных коллег в области разработки технологии получения удвоенных гаплоидов капустных культур, показать различные подходы, позволяющие повысить индукцию эмбриогенеза из микроспор у растений рода *Brassica*.

### Факторы, влияющие на образование эмбрионидов

Универсальных протоколов культуры изолированных пыльников/микроспор для всех видов не существует в силу межвидовых и внутривидовых (генотип-зависимых) различий в отзывчивости к андрогенезу. При проведении первоначального скрининга видов на отзывчивость к андрогенезу в основном используются базовые протоколы, разработанные для растений рода *Brassica* (рапс сорта Топаз). Основные шаги таких протоколов остаются неизменными. Они включают выращивание растений-доноров, отбор бутонов, выделение микроспор, культивирование микроспор и индуцирование эмбриогенеза, регенерацию растений, удвоение хромосом. Тем не менее в каждом конкретном случае необходима разработка индивидуальных протоколов культуры изолированных пыльников/микроспор для каждого конкретного вида, сорта, генотипа, растения.

Основной протокол и шаги, описанные ранее, постоянно оптимизируются учеными. В этом контексте такие параметры, как стадия развития донорного растения и бутонов (Pechan, Keller, 1988; Baillie et al., 1992), плотность культуры микроспор (Huang et al., 1990; Ferrie et al., 1999), сахароза или полиэтиленгликоль (ПЭГ), регуляторы осмотического давления (Baillie et al., 1992; Ilic-Grubor et al., 1998; Lionneton et al., 2001) являются объектами различных исследований.

### Стадия развития микроспор

У растений рода *Brassica* к эмбриогенезу способны микроспоры на поздней стадии развития и ранние двухклеточные пыльцевые зерна (Pechan, Keller, 1988; Huang et al., 1990). В процессе культивирования наблюдаются различные цитологические изменения, происходящие в них, например появление большого числа крахмальных зерен (Kott et al., 1988; Zaki, Dickinson, 1990; Lo, Pauls, 1992). Характерным признаком перехода микроспор с гаметофитного пути развития на спорофитный является первый симметричный митоз клеток взамен асимметричному.

Исследование изменений структуры цитоскелета в процессе инициации эмбриогенеза показало, что в поздних микроспорах, характеризующихся присутствием крупной вакуоли и латерально расположенного ядра, к симметричному делению клеток ведут два пути (Zaki, Dickinson, 1990). В первом случае в течение первых 12 ч культивирования при 32 °С микроспор, находящихся на поздней стадии развития, ядро клетки сохраняет свое маргинальное положение, но при этом меняется плоскость деления, что приводит к симметричному делению клеток и, соответственно, эмбриогенному развитию. Во втором случае митоз инициируется тогда, когда ядро смещается от оболочки к центру микроспоры (Zaki, Dickinson, 1990; Hause et al., 1993). По мнению исследователей, центральная вакуоль и микротрубочки удерживают ядро в ацентричном положении вблизи клеточной мембраны. Исчезновение центральной вакуоли и нарушение образования микротрубочек, инициируемое высокой температурой, являются причиной миграции ядра к центру микроспоры. Таким образом, вследствие митоза образуются две равноценные клетки, что также приводит к эмбриогенному развитию.

Возможен также и третий тип развития эмбрионидов, который инициируется в раннем двухклеточном пыльцевом зерне (Hause et al., 1993). В этом случае после 24 ч культивирования происходит деление вегетативной клетки, что не наблюдается в случае гаметофитного пути развития. При этом генеративная клетка оказывается блокированной возле интины и, как правило, не вступает в митоз (Binarova et al., 1993).

Таким образом, успех индукции эмбриогенеза зависит от правильной оценки состояния развития мужского гаметофита донорного растения. Развитие цветка управляется взаимодействием гомеозисных генов. Так, например, тычиночные примордии развиваются после того, как появились примордии чашелистиков и лепестков, но до инициации плодolistиков (Goldberg et al., 1993). Эта взаимосвязь в развитии частей цветка сохраняется на протяжении всего периода его жизни, поэтому по морфологическим признакам одних частей цветка можно судить о степени развития других. Например, коэффициент корреляции между длиной бутона и стадией развития мужского гаметофита у капусты брокколи составляет 0,85–0,94 (Шмыкова, 2006). Можно предположить, что у более длинного бутона будут более длинные тычинки, лепестки и пестик, а в пыльниках более крупных бутонов микроспоры или пыльца будут находиться на более поздних стадиях развития. По данным Pechan и Keller (1988), норма удлинения бутона рапса в сутки составляет  $0,75 \pm 0,02$  мм, а время, в течение которого микроспора у рапса является способной к прохождению эмбриогенеза, приблизительно равно 8 ч. Это период между стадиями G2 перед митозом и G1 после митоза (Telmer et al., 1992). Однако определить оптимальную стадию развития бутона для культивирования микроспор, ориентируясь только

на его размер, проблематично. Для этого необходимо учитывать различные факторы, такие как условия выращивания донорного растения, его фенотипические особенности. Например, Baillie с соавт. (1992) оценивали бутоны *B. campestris* длиной 2,2–2,9 мм и 3,0–3,9 мм, и ими было отмечено, что эмбриониды развивались лишь из микроспор, выделенных из бутонов 2,2–2,9 мм. Оптимальный размер бутонов у *B. napus* сильно отличается от *B. campestris* и составляет 4,02–4,2 мм (Pechan, Keller, 1988). По данным других исследователей, этот показатель значительно зависит от сортообразца. Так, у гибрида Топаз он составил 3,5–3,9 мм, а у сортообразцов DH1 2075 – 2,0–2,4 мм и Westor – 2,5–2,9 мм (Bhowmik et al., 2011). Различие между сортообразцами также прослеживается у *B. juncea*, оптимальными для эмбриогенеза у сорта Vaguna считаются бутоны длиной 3,1–3,5 мм, а для сортов Pusa Bold и B10-902 – 2,5–3,0 мм (Prem et al., 2005, 2008). При исследовании различных видов капустных культур было показано, что микроспоры, находящиеся на поздней стадии развития, подходящей для эмбриогенеза, тоже различаются по величине: самые маленькие у *B. nigra*, средние у *B. napus* и самые крупные у *B. oleracea* (Lichter, 1989). Отсюда следует, что определение оптимальных размеров бутонов, содержащих отзывчивые микроспоры для индукции эмбриогенеза, является необходимым условием для успешного культивирования.

### Индукция эмбриогенеза

К числу наиболее важных факторов, способных вызывать индукцию эмбриогенеза у представителей рода *Brassica*, относится тепловая предобработка пыльников (Keller, Armstrong, 1979; Telmer et al., 1992; Simmonds, Keller, 1999). Чаще всего для этой цели используют тепловые режимы от 32 °С до 40 °С с различной временной экспозицией. Эффективность индукции эмбриогенеза зависит от генотипа, температуры и времени воздействия. Обычно температурный стресс эффективно применяется на стадии, предшествующей первому гаплоидному митозу или во время него. Pechan с соавт. (1991) показали, что стрессовая предобработка культуры микроспор высокой температурой необходима для инициации процесса переключения микроспор с гаметофитного пути развития на спорофитный. Во время высокотемпературного стресса первые 8 ч культивирования являются критическими. Активация процессов, регулирующих индукцию и поддерживающих эмбриогенез микроспор, происходит в эти временные рамки. Simmond и Keller (1999) наблюдали, что первое деление в микроспорах, стрессированных высокой температурой, является симметричным, в отличие от нормального асимметричного деления, предшествующего образованию пыльцевого зерна. Другой наблюдаемый феномен в этот период – образование в микроспорах белков теплового шока (БТШ), вызванное высокотемпературным воздействием на них (Pechan et al., 1988;

Cordewener et al., 1995; Pechan, Smykal, 2001). Наличие этих белков в пыльцевых зернах после теплового воздействия, по мнению авторов, указывает на их связь с процессом эмбриогенной индукции.

В большинстве случаев было показано, что воздействие высокой температурой должно быть кратковременным. Например, микроспоры *B. napus* становились эмбриогенными, если культивирование при 32,5 °С продолжалось 18–24 ч, а затем температурный режим сменялся на 25 °С (Simmonds, Keller, 1999). У *B. campestris* также отмечено положительное действие температурных предобработок на эмбриогенез в культуре пыльников (Keller, Armstrong, 1979). У *B. napus* в культуре микроспор на поздней стадии их развития переход на эмбриогенный путь развития был индуцирован повышенной температурой (32,5 °С) в течение 4 суток (Telmer et al., 1992; Custers et al., 1994; Cordewener et al., 1995). Другие исследователи наблюдали самый большой выход эмбриоидов при воздействии температуры 32 °С в течение 48 ч, при этом проявлялась генотипическая зависимость (Baillie et al., 1992). Индивидуальная восприимчивость разных сортообразцов *B. napus* к температурному воздействию отмечена в работе Зубаревой с соавт. (2013). Так, эмбриоиды были получены при температурном воздействии 32 °С на культуру микроспор в течение 72 ч у сортообразцов Ханна, Jr-8, Jr-4 и № 444; в варианте воздействия с температурой 33 °С – у сортообразцов № 1, № 417, Луговской и Гриффин, а для сортообразцов Кобра, SR, Центр 1 и Центр 2.1 потребовалась предобработка температурой 35 °С продолжительностью 24 ч. Положительное влияние температурной предобработки (32 °С) на эмбриогенез из микроспор выявлено у редиса (*Raphanus sativus*) (Takahata et al., 1996; Chun et al., 2011). В культуре микроспор *B. juncea* эмбриогенез индуцируется при более длительном температурном воздействии. По данным Chanana (2005), продолжительность его составляет 72 ч, а другие исследователи (Prem et al., 2005, 2008) проводят предобработку такой же температурой (32,5 °С) в течение 10–11 сут. Для растений вида *B. oleracea*, к которому относятся слабо отзывчивые генотипы, температурная обработка также является необходимой для индукции эмбриогенеза. Keller и Armstrong (1981) наблюдали максимальный выход эмбриоидов у капусты декоративной (*B. oleracea* var. *acephala*) при предобработке температурой 35 °С в течение 1 сут. У брюссельской капусты (*B. oleracea* var. *gemmifera*) лучшие результаты были получены в культуре пыльников, когда для индукции применяли температуру 35 °С в течение 16 ч (Ockendon, 1984). Исследователями было показано, что оптимальность временной и температурной экспозиции предобработки зависит от сортообразца. Так, Keller и Armstrong (1983) отметили, что оптимальный режим предобработки для брокколи (*B. oleracea* var. *italica*) составляет 35 °С в течение 2 сут. Другие авторы (Duijs et al., 1992) показали,

что для трех сортов этой разновидности капусты лучшей является предобработка температурой 30 °С в течение 48 ч, а Takahata и Keller (1991), Halkjaer и Ringgaard (1997) наблюдали положительное воздействие на культуру микроспор температурой 32,5 °С и 35 °С в течение суток. В более поздней работе Dias (2001) было показано, что для культуры микроспор 9 сортообразцов брокколи из 10, оптимальной была индукция эмбриогенеза при температурном воздействии 32,5 °С в течение суток и для одного сортообразца – 30 °С в течение 2 сут.

Накопившиеся факты позволили предположить участие цитоскелета в регулировании положения ядра перед первым гаплоидным митозом и его причастность к эмбриогенезу (Hause et al., 1993). Было показано влияние колхицина на образование эмбриоидов у *B. napus* в культуре микроспор, а также трифлюралина, обладающего антимиотубулярным действием на цитоскелет микроспоры (Mollers et al., 1994; Zaki, Dickenson, 1995; Zhou et al., 2002). В этих исследованиях эффективность индукции эмбриогенеза сочеталась с удвоением хромосом, что способствовало сокращению времени получения ДН-растений.

Холодовая предобработка микроспор для индукции эмбриогенеза у растений рода *Brassica* применяется редко и кажется противоречащей ранее проведенным исследованиям. Тем не менее была показана эффективность холодовой предобработки бутонов или соцветий, предназначенных для получения культуры микроспор *B. napus* (Lichter, 1982), *B. oleracea* (Osolnik et al., 1993), *B. rapa* (Sato et al., 2002), и предобработки непосредственно изолированных микроспор у *B. napus* (Charne, Beversdorf, 1988). Интересные результаты были получены Gu с соавт. (2004) в эксперименте, сочетающем низкотемпературный шок с осмотическим. Они использовали холодовую предобработку стерильных бутонов *B. napus*, помещенных в питательную среду NLN с 13 %-й сахарозой. У яровых сортообразцов, таких как Топаз, Ханна, № 7039, № 7041, № 7042, эта предобработка способствовала увеличению выхода эмбриоидов в 2–8 раз в зависимости от образца. Менее значительное увеличение прослеживалось у озимых сортообразцов *B. napus*. Однако в литературе встречаются данные и об отрицательных эффектах низкотемпературных обработок у *B. napus* (Dunwell et al., 1985) и *B. rapa* (Sopogy, Munshi, 1996). Вышеизложенные факты подчеркивают, что для каждого сортообразца нужен индивидуальный подбор индуцирующего фактора, который, по-видимому, зависит от устойчивости растения к нему.

### Плотность культуры микроспор

Другим фактором, влияющим на выход микроспор, является плотность культуры клеток. Показано, что для *B. napus* плотность 30 000–40 000 кл/мл в первые 2–4 суток с последующим разведением до 10 000 кл/мл является критической для эмбриогенеза. Плотность

культуры выше 100 000 кл/мл ингибирует эмбриогенез (Huang et al., 1990). Для *B. oleracea* более высокую частоту эмбриогенеза дает плотность, не превышающая 50 000 кл/мл, по сравнению с 100 000 кл/мл (Fertig et al., 1999). Однако, по данным этих исследователей, два генотипа (Bo-1 и Bo-4) составили исключение: у них высокая частота эмбриогенеза проявлялась при более высокой плотности. Это говорит о том, что утверждение об оптимальной плотности не может быть применено для всех капустных культур, тем не менее плотность 10–40 тыс. клеток в 1 мл более предпочтительна для многих видов и сортов образцов.

### Осмотическое давление

Сахароза используется в культуре растительных клеток *in vitro* как источник углеводов и регулятор осмотического давления. Осмотическое давление в среде является критическим фактором для развития зиготического эмбриоида *in vitro*. Обычно высокое осмотическое давление требуется для эмбриоида на ранних стадиях развития, но на поздних стадиях оно должно быть более низким. В культуре микроспор различных видов рода *Brassica* в питательных средах используют, как правило, сахарозу в концентрации 10 или 13 % (Palmer et al., 1996). Однако в ряде работ использование более высокой концентрации сахарозы на начальных этапах обеспечивало высокий выход эмбриоидов. Так, Baillie с соавт. (1992), работавшие с *B. campestris*, Ferrie с соавт. (1999), изучавшие *B. oleracea*, и Lionneton с коллегами (2001) на *B. juncea* показали, что культивирование микроспор на среде с 17 %-й сахарозой в течение 48 ч с последующей заменой ее на 10 %-ю увеличивает частоту эмбриогенеза. Сахароза в высоких концентрациях может действовать как осмотический стресс, с другой стороны, она необходима для формирования эмбриоидов. Доказательство двойного эффекта сахарозы на формирование эмбриоидов показано в исследованиях Ilie-Grubog с соавт. (1998) у *B. napus*. Так, эмбриоиды на сердечковидной, торпедовидной и ранних семядольных стадиях, образовавшиеся на средах с полиэтиленгликолем (ПЭГ), имеют большое сходство с зиготическими аналогами. В противоположность этому внешняя морфология эмбриоидов, индуцируемых на средах с высокой сахарозой, отличается от образованных на средах с ПЭГ и зиготических эмбриоидов. Это подтверждает влияние высокой концентрации сахарозы на морфологию эмбриоидов. В работах Ferrie с соавт. (1999) на *B. oleracea* также показано, что сахароза является наиболее важным компонентом среды, влияющим на эмбриогенез.

### Активированный уголь

Активированный уголь (АУ) часто вводят в питательные среды, что способствует повышению эффективности эмбриогенеза из микроспор у ряда растений, таких как *B. rapa* ssp. *oleifera* (Guo, Pulli, 1996), *B. oleracea* (Dias,

1999) и *B. juncea* (Prem et al., 2008). Gland с соавт. (1988) показали, что АУ не повышает эмбриогенез, но улучшает регенерацию растений из эмбриоидов у рапса. Margale и Chevre (1991) обнаружили, что АУ в концентрации 1 % способствует продукции эмбриоидов, тогда как в его отсутствие развитие эмбриоидов заканчивается на уровне 4–8 клеток. В работе Dias (2001) было показано, что при культивировании микроспор капусты брокколи и капусты цветной эффект от добавления АУ в питательные среды был различным, в зависимости от сортов образцов. Положительное влияние АУ на увеличение числа эмбриоидов происходило у капусты цветной сорта Bola de Neva и капусты брокколи гибридов Marathon и Mariner. В работе другого исследователя (Mathias, 1988) было показано, что использование двухслойной питательной среды, в которой нижний слой содержал АУ, позволяло увеличить частоту образования эмбриоидов у *B. napus*.

В химии АУ используется как сильный адсорбент для газообразных и растворенных твердых веществ. Gland с соавт. (1988) предположили, что АУ адсорбирует токсичные вещества, выделяемые неактивными микроспорами, тем самым, способствует эмбриогенному развитию микроспор. Одним из таких веществ является этилен и другие газообразные вещества, выделяемые клетками в культуре *in vitro* (Johansson, 1983). Косвенным подтверждением этого являются данные по увеличению числа эмбриоидов при культивировании микроспор капусты цветной и капусты брокколи на средах с добавлением нитрата серебра, который является антагонистом этилена (Dias, Martins, 1999).

Другое предположение заключается в том, что АУ может также адсорбировать фенольные соединения, которые выделяются поврежденными тканями в процессе культивирования (Fridborg et al., 1978). Так, в культуре пыльников дурмана и анемоны адсорбция фенольных соединений АУ способствовала стимуляции эмбриогенеза (Johansson, 1983). Однако в культуре микроспор *Brassica* ожидается низкий уровень фенольных соединений, так как суспензия микроспор лишена соматических тканей, хотя высвобождение некоторого количества фенольных соединений в питательную среду возможно.

Lichter (1989), культивируя различные виды семейства Капустные, предположил, что АУ, добавленный в питательные среды для культивирования изолированных микроспор, может адсорбировать не только вредные вещества, но также и некоторые компоненты, необходимые для развития растений. Weatherhead с коллегами (1979) показал, что добавление 0,3 % АУ в питательную среду в культуре пыльников табака привело к полной адсорбции тиамин хлорида и никотиновой кислоты. По мнению авторов, также была снижена концентрация биотина, фолиевой кислоты и пиридоксина, однако это не касалось мезоинозита.

По мнению других исследователей, благодаря способности АУ адсорбировать катионы, он может влиять

на показатель рН питательной среды в сторону его увеличения (Langowska, 1980; Smith, Krikorian, 1990). В одних исследованиях применение АУ повышало эмбриогенез микроспор *B. rapa* (Guo, Pulli, 1996), *B. oleracea* (Dias, 1999), *B. nigra* (Margale, Chevre, 1991) и *B. juncea* (Prem et al., 2008), другими авторами показано, что АУ дает негативный эффект на эмбриогенез в культуре микроспор *B. juncea* (Prem et al., 2005) и *B. rapa* (Takahashi et al., 2012). Возможно, что эти разногласия в эффективности применения АУ заключаются в различии способов его применения. В экспериментах Guo и Pulli (1996), в которых проявлялся положительный эффект на эмбриогенез, АУ был добавлен с агарозой. В других экспериментах, показавших отрицательное действие, АУ добавлялся без агарозы, при этом авторы предположили, что происходит прилипание частиц угля к микроспорам и образующимся эмбриоидам, что препятствует их росту и развитию (Prem et al., 2005).

Эффективность влияния АУ зависит от концентрации макросолей в питательной среде (Takahashi et al., 2012). По мнению Wang с соавт. (2009), индукция эмбриогенеза лучше происходит на среде, содержащей половинную концентрацию макросолей NLN (без АУ), чем на полной среде. Поскольку АУ не является избирательным адсорбентом, он может одновременно поглощать не только вещества-ингибиторы, выделяемые микроспорами, но и часть макросолей, находящихся в питательной среде. При использовании полной NLN концентрация солей может быть снижена до оптимальной величины, и в этом случае добавление АУ будет играть положительную роль. При применении сред с пониженной концентрацией солей эффект от добавления угля может быть отрицательным.

### Другие факторы, влияющие на эмбриогенез в культуре микроспор

В первоначальном протоколе культивирования микроспор капустных культур экзогенные регуляторы роста не применялись. Однако в ряде случаев использование низких концентраций N<sup>6</sup>-бензиламинопурина (БАП) и  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК) повышало результативность технологии получения эмбриоидов в культуре микроспор. Например, добавление БАП способствовало развитию нормальных эмбриоидов у *B. napus* (Charne, Beversdorf, 1988; Ferrie, 2003), *B. rapa* (Takahashi et al., 2012), *B. campestris* ssp. *pekinensis* (Lee, Kim, 2000) и *B. oleracea* var. *italica* (Na et al., 2011). В работе Е.А. Калашниковой с соавт. (2011) было показано положительное действие кинетина и НУК (1 мг/л) на процесс прямого эмбриогенеза в культуре микроспор рапса.

Одним из факторов, отрицательно влияющих на индукцию эмбриогенеза, является этилен, образующийся при разрушении клеток стенок пыльников в процессе получения суспензии микроспор. За последнее десятилетие проведен целый ряд исследований, направленных

на снижение концентрации этилена в культуре микроспор растений рода *Brassica*. С этой целью были использованы ингибиторы синтеза этилена, такие как нитрат серебра, тиосульфат серебра, хлорид кобальта, аминоксидвинилглицин, которые добавлялись в питательные среды, что способствовало повышению эмбриогенеза (Prem et al., 2005, 2008; Na et al., 2011). В некоторых работах показан положительный эффект предобработки микроспор растений рода *Brassica* антиауксином РСІВ (3-хлорфеноксизомаляная кислота), который уменьшает ауксин-индуцированное образование этилена (Agarwal et al., 2006; Ahmadi et al., 2012). Понижение концентрации этилена также возможно при добавлении в питательные среды полимера Pluronic F-68, что позволяет индуцировать эмбриогенез у неотзывчивых генотипов *B. napus* (Barbulescu et al., 2011).

Положительное влияние на образование и развитие эмбриоидов в культуре микроспор растений рода *Brassica* могут оказывать брассиностероиды (Ferrie et al., 2005; Belmonte et al., 2010). Не менее важную физиологическую роль играет рН питательной среды. В исследованиях Yuan с соавт. (2012) было показано, что относительно высокое значение рН питательной среды (6,2–6,4) более эффективно для индукции эмбриогенеза из микроспор у большинства генотипов капусты белокочанной по сравнению с рН 5,8. Наилучший результат в этом исследовании был получен при использовании питательной среды NLN 13 (рН 6,4), дополненной 10 мг арабиногалактонового белка и 3 мМ 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (MES) в качестве буфера. Эффективность эмбриогенеза при этом возросла с 4,5 до 22,9 эмбриоидов/бутон. Требование к более высоким значениям рН среды, по-видимому, объясняется физиологическими особенностями пыльцы капустных культур, которая способна прорасти на искусственных питательных средах при значениях рН 8–9 в зависимости от сортообразца (Бунин и др., 2003).

Условия выращивания донорных растений также влияют на эмбриогенез. Так, выход эмбриоидов, полученных в культуре микроспор от растений рапса, растущих при 12–15 °С вместо 18–23 °С при световом периоде 16/8 ч, был выше (Lo, Pauls, 1992).

Зависимость эмбриогенеза от генотипа показана для капусты брюссельской (Ockendon, 1985), капусты цветной (Ockendon, 1988) и брокколи (Orton, Browers, 1985; Wang et al., 1999).

### Факторы, влияющие на регенерацию растений

Вторая составляющая часть протокола ДН-технологии – регенерация растений из эмбриоидов – также требует усовершенствования, так как частота получения полноценных растений бывает низкой и непостоянной. Большинство эмбриоидов подвержено аномальному развитию, такому как нарушение пролиферации клеток гипокотыля и семядолей и образование вторичных

эмбриоидов. По литературным данным, ряд предобработок эмбриоидов пониженными температурами, гибберелловой кислотой (ГК), абсцизовой кислотой (АБК) и подсушиванием (обезвоживанием) повышают регенерацию растений (Kott, Beversdorf, 1990; Huang et al., 1991; Cegielska-Taras et al., 2002; Zhang et al., 2006). Культивирование эмбриоидов на подкладке из фильтровальной бумаги поверх агаризованной среды или среды, содержащей высокие концентрации желирующих веществ, также повышало регенерацию (Takahata, Keller, 1991; Takahashi et al., 2012).

Регуляторы роста, такие как этилен, АБК,  $\beta$ -индолилуксусная кислота (ИУК), могут также играть ключевую роль в улучшении качества апикальной меристемы стебля. Во многих соматических эмбриогенных системах дефицит этилена способствует каллусообразованию и росту. И наоборот, стимулирование биосинтеза этилена оказывает положительное влияние на формирование соматических эмбриоидов (Chen, Chang, 2003).

В зиготических эмбриоидах рапса латеральное разрастание семядолей находится под влиянием локальной аккумуляции этилена в 20-дневных культурах. Позже второй пик концентрации этилена наблюдается во время стадии обезвоживания зародышей семени. У эмбриоидов такого же возраста, полученных из микроспор, второй пик концентрации этилена значительно ниже. У них отсутствуют обезвоживание и стадия покоя, типичные для зиготических эмбриоидов. Различия в количестве этилена, наблюдаемое между зиготическим эмбриоидом и эмбриоидом из микроспор у рапса, по всей видимости, может быть причиной разрастания семядолей у последнего (Hays et al., 2001).

Многие другие примеры иллюстрируют решающую роль правильной гормональной регуляции во время развития. Ауксины ответственны за симметричный переход от глобулярного до сердечковидного эмбриоида. Отсутствие необходимого уровня ауксинов препятствует удлинению гипокотила во время перехода от торпеды к семядольной стадии (Yeung, Ramesar-Fortner, 2006). У эмбриоидов рапса из микроспор уровень ИУК ниже, чем у зиготических эмбриоидов. Зиготические эмбриоиды рассматриваются как источник этого ауксина в ответ на регуляторные сигналы, идущие от других тканей семени, из которых ИУК экспортируется по всему растению. Таким образом, аномальный уровень, наблюдаемый у андрогенных эмбриоидов, может происходить из-за отсутствия материнских окружающих тканей (Hays et al., 2000).

Другой гормон со значительной морфогенной ролью, АБК – синтезируется в вегетативных частях растений, транспортируется в семена, где накапливается в эндосперме и коже. Было показано, что поддержание правильного, регулируемого эндогенного уровня АБК, а также ИУК связано с соматическим эмбриогенным ответом у разных видов растений (Feher et al., 2003). Во время

зиготического эмбриогенеза АБК, в частности, вовлечена в поддержание морфологической целостности ранних эмбриоидов, а также последних стадий созревания, обезвоживания и сохранения питательных элементов. Абсолютный уровень АБК в эмбриоидах из микроспор ниже по сравнению с зиготическими у тех же самых видов (Hays et al., 2001). В ряде работ дефицит АБК в эмбриоидах, полученных из микроспор, был компенсирован добавлением экзогенного гормона, что способствовало увеличению числа нормально развивающихся эмбриоидов *B. napus* и *B. oleraceae* (Rudolf et al., 1999; Yeung, Ramesar-Fortner, 2006; Yadollani et al., 2011).

Несмотря на ограниченные и фрагментарные данные, связанные с эмбриогенным развитием микроспор, сегодня получение ДН-линий растений семейства *Brassicaceae* с помощью биотехнологических методов, таких как культура микроспор, широко востребовано селекционными компаниями развитых стран. Главным преимуществом ДН-технологий по сравнению с традиционной селекцией является снижение временных затрат на получение гомозиготного материала и сокращение площадей, занятых под селекционными посевами, что обеспечивает значительное понижение стоимости вновь создаваемых сортов и гибридов.

Внедрение ДН-технологий в селекционный процесс требует надежных и недорогих протоколов культуры клеток. Несмотря на то что в получении гаплоидов у растений рода *Brassica* достигнуты большие успехи, тем не менее существует множество факторов, которые могут способствовать улучшению и оптимизации ДН-технологий. Необходимо более глубокое фундаментальное понимание процессов индукции эмбриогенеза микроспор и развития гаплоидных растений, которое будет обеспечивать высокую эффективность получения ДН-линий у высокоотзывчивых генотипов и сокращать число неотзывчивых сортообразцов. Чем больше микроспор будет вовлечено в эмбриогенез, тем большее разнообразие новых генотипов будет доступно селекционеру.

Таким образом, необходимо, чтобы значительные инвестиции, направленные в сельскохозяйственные исследования, были сфокусированы на поддержку научных проектов, направленных на повышение эффективности ДН-технологий сельскохозяйственных растений.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

- Бунин М.С., Шмыкова Н.А., Степанов В.А. Методы репродуктивной биологии в селекции овощных культур рода *Brassica* L. М.: ВО Минсельхоза России, 2003:3-21.
- Зубарева И.А., Головешкина Е.Н., Виноградова С.В., Грибова Т.Н., Монахов С.Г., Игнатов А.Н. Создание дигаплоидных линий *Brassica napus* L. – доноров устойчивости к вирусу мозаики турнепса. С.-х. биология. 2013;5:122-124.

- Калашникова Е.А., Чунг М.Д., Соловьев А.А., Шевелуха В.С. Технология получения дигаплоидных растений рода *Brassica in vitro*. Докл. РАСХН. 2011;1:5-8.
- Шмыкова Н.А. Разработка системы биотехнологических методов, направленных на ускорение селекционного процесса овощных культур: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. М., 2006.
- Agarwal P.K., Agarwal P., Custers J.B.M., Liu C., Bhojwan S.S. PCIB an antiauxin enhances microspore embryogenesis in microspore culture of *Brassica juncea*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2006;86:201-210. DOI 10.1007/s11240-006-9108-0.
- Ahmadi B., Alizadeh K., da Silva J.A.T. Enhanced regeneration of haploid plantlets from microspores of *Brassica napus* L. using bleomycin, PCIB, and phytohormones. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2012;109:525-533. DOI 10.1007/s11240-012-0119-8.
- Baillie A.M.R., Epp D.J., Hutcheson D., Keller W.A. *In vitro* culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris*. Plant Cell Rep. 1992;11:234-237.
- Barbulescu D.M., Burton W.A., Salisbury P.A. Pluronic F-68: an answer for shoot regeneration recalcitrance in microspore-derived *Brassica napus* embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2011;47:282-288. DOI 10.1007/s11627-011-9353-8
- Belmonte M., Elhiti M., Waldner B., Stasolla C. Depletion of cellular brassinolide decreases embryo production and disrupts the architecture of the apical meristems in *Brassica napus* microspore-derived embryos. J. Exp. Bot. 2010;61:2779-2794. DOI: 10.1093/jxb/erq110
- Bhowmik P., Dirpaul J., Polowick P., Ferrie A.M.R. A high throughput *Brassica napus* microspore culture system: influence of percoll gradient separation and bud selection on embryogenesis. Plant Cell Tissue Org. Cult. 2011;106:359-362. DOI: 10.1007/s11240-010-9913-3
- Binarova P., Straatman K., Hause B., Hause G., van Lammeren A.A.M. Nuclear DNA synthesis during the induction of embryogenesis in cultured microspores and pollen of *Brassica napus* L. Theor. Appl. Genet. 1993;87:9-16.
- Cao M.Q., Li Y., Liu F., Dore C. Embryogenesis and plant regeneration of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) via *in vitro* isolated microspore culture. Plant Cell Rep. 1994;13:447-450.
- Cegielska-Taras T., Tykarska T., Szala T., Kuras M., Krzymanski J. Direct plant development from microspore-derived embryos of winter oilseed rape *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (DC.) Metzger. Euphytica. 2002;124:341-347.
- Chanana N.P., Dhawan V.V., Bhojwani S.S. Morphogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica juncea*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2005;83:169-177. DOI: 10.1007/s11240-005-4855-x
- Charne D.G., Beversdorf W.D. Improving microspore culture as a rapeseed breeding tool: the use of auxins and cytokinins in an induction medium. Can. J. Bot. 1988;66:1671-1675.
- Chen J.T., Chang W.C. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid enhanced direct somatic embryogenesis from *Oncidium* leaf cultures. Biol. Plant. 2003;46:455-458.
- Chun C., Park H., Na H. Microspore-derived embryo formation in radish (*Raphanus sativus* L.) according to national and environmental conditions. Hort. Environ. Biotechnol. 2011;52:530-535. DOI:10.1007/s13580-011-0080-1
- Cordewener J.H.G., Hause G., Gorgen E., Busink R., Hause B., Hans J.M., 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.
- Custers J.B.M., Cordewener J.H.G., Nollen 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;13:267-271.
- Dias J.C.S. Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis. Euphytica. 1999;108:65-69.
- Dias J.C.S. Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. Euphytica. 2001;119:389-394.
- Dias J.C.S., Martins M.G. Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different *Brassica oleracea* morphotypes. Sci. Hort. 1999;82:299-307.
- 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.
- Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnol. J. 2010;8:377-424. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x
- Dunwell J.M., Cornish M., De Courcel A.G.L. Influence of genotype, plant growth temperature and anther incubation temperature on microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifera*. J. Exp. Bot. 1985;36:679-689.
- Feher A., Pasternak T.P., Dudits D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2003;74:201-228.
- Ferrie A.M.R. Microspore culture of *Brassica* species. Doubled haploid production in crop plants (Ed. M. Maluszynski et al.). Kluwer, Dordrecht. 2003:205-215.
- Ferrie A.M.R., Dirpaul J., Krishna P., Krochko J., Keller W.A. Effects of brassinosteroids on microspore embryogenesis in *Brassica* species. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2005;41:742-745. DOI: 10.1079/IVP2005690
- Ferrie A.M.R., Taylor D.C., MacKenzie S.L., Keller W.A. Microspore embryogenesis of high sn-2 erucic acid *Brassica oleracea* germplasm. Plant Cell Tissue Organ Cult. 1999;57:79-84.
- Fridborg G., Pedersen M., Landstrom A., Eriksson T. The effect of charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiol Plant. 1978;43:104-106.
- Gland F., Lichter R., Schweiger H.G. Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in microspore cultures of *Brassica napus* L. J. Plant Physiol. 1988;132:613-617.
- Goldberg R.B., Beals T.P., Sanders P.M. Anther development: basic principles and practical applications. Plant Cell. 1993;5:1217-1229.
- 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.
- Guo Y.D., Pulli S. High-frequency embryogenesis in *Brassica campestris* microspore culture. Plant Cell Tiss Org Cult. 1996;46:219-225.
- Halkjaer M., Ringgaard S. Microspore culture in *B. oleracea* L. COST-824: Gametic Embryogenesis Workshop, Book of Abstracts. Sjusjoen, Norway, 1997.
- Hause G., Hause P., Pechan P., van Lammeren A.A.M. Cytoskeleton changes and induction of embryogenesis in microspore and pollen cultures of *Brassica napus* L. Cell Biol. Int. 1993;17:153-166.
- Hays D.B., Mandel R.M., Pharis R.P. Hormones in zygotic and microspore embryos of *Brassica napus*. Plant Growth Regul. 2001;35:47-58.
- Hays D.B., Reid D.M., Yeung E.C., Pharis R.P. Role of ethylene in cotyledon development of microspore-derived embryos of *Brassica napus*. J. Exp. Bot. 2000;51:1851-1859. DOI:10.1093/jxb/51.352.1851
- Huang B., Bird S., Kemble R., Miki B., Keller W. 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.
- Huang B., Bird S., Kemble R., Simmonds D., Keller W., Miki B. Effects of culture density, conditioned medium feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Plant Cell Rep.* 1990;8:594-597.
- Ilic-Grubor K., Attree S.M., Fowke L.C. Comparative morphological study of zygotic and microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. as revealed by scanning electron microscopy. *Ann. Bot.* 1998;82:157-165.
- Johansson L. Effects of activated charcoal in anther cultures. *Physiol. Plant.* 1983;59:397-403.
- Keller W.A., Armstrong K.C. Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. *Theor. Appl. Genet.* 1979;55:65-67.
- Keller W.A., Armstrong K.C. Production of anther-derived dihaploid plants in autotetraploid marrowstem kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). *Can. J. Genet. Cytol.* 1981;23:259-265.
- Keller W.A., Armstrong K.C. Production of haploids via anther culture in *Brassica oleracea* var. *italica* of Broccoli. *Plant Breed.* 1983;32:151-159.
- Kott L., Beversdorf W.D. Enhanced plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus* by chilling, partial desiccation and age selection. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1990;23:187-192.
- Kott L.S., Polsoni L., Beversdorf W.D. Cytological aspects of isolated microspore culture in *Brassica napus*. *Can. J. Bot.* 1988;66:1658-1664.
- Langowska T. Effect of activated carbon and brown coal suspensions for growth and development of *Scenedes musobliquus* (Sc.449). *Pol. Arch. Hydrobiol.* 1980;27:125-136.
- Lee S.S., Kim A.J. Effect of cultural vessel, plant growth regulator, illuminating and shaking on embryo induction and growth in microspore culture of heading Chinese cabbage. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 2000;41:16-20.
- Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenphysiol.* 1982;105:427-434.
- Lichter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassicaceae* species. *Plant Breeding.* 1989;103:119-123.
- Lionneton E., Beuret W., Delaitre C., Rancillac M. Improved microspore culture and doubled-haploid plant regeneration in the brown condiment mustard (*Brassica juncea*). *Plant Cell Rep.* 2001;20:126-130.
- Lo K.H., Pauls K.P. Plant growth environment effects on rapeseed microscope development and culture. *Plant Physiol.* 1992;99:468-472.
- Margale E., Chevre A.M. Factors effecting embryo production from microspore culture of *Brassica nigra* (Koch). *Cruciferae Newslett.* 1991;14(15):100-101.
- Mathias R. An improved *in vitro* procedure from embryoids derived from isolated microspores of rape (*Brassica napus* L.). *Plant Breeding.* 1988;100:320-322.
- Mollers C., Iqbal M.C.M., Robbelen G. Efficient production of doubled haploid *Brassica napus* plants by colchicines treatment of microspores. *Euphytica.* 1994;75:95-104.
- Na H., Kwak J.H., Chun C. The effect of plant growth regulators, activated charcoal and AgNO<sub>3</sub> on microspore derived embryo formation in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *Hort. Environ. Biotechnol.* 2011;52(5):524-529. DOI: 10.1007/s13580-011-0034-7
- Ockendon D.J. Anther culture in Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). I. Embryo yields and plant regeneration. *Ann. Appl. Biol.* 1984;105:285-291.
- Ockendon D.J. Anther culture in Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). II. Effect of genotype on embryo yields. *Ann. Appl. Biol.* 1985;107:101-104.
- Ockendon D.J. The ploidy of plants obtained from anther culture of cauliflowers (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Ann. Appl. Biol.* 1988;113:319-325.
- Orton T.J., Browers M.A. Segregation of genetic markers among plants regenerated from cultured anthers of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Theor. Appl. Genet.* 1985;69:637-643.
- Osolnik B., Bohanes B., Jelaska S. Stimulation of androgenesis in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) anthers by low temperature and anther dissection. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1993;32:241-246.
- Palmer C.E., Keller W.A., Arnison P.G. Experimental haploidy in *Brassica* species. *In vitro* haploid production in higher plants (Ed. S.M. Jain et al.). V. 3: Important selected plants. Kluwer. Dordrecht. 1996:143-171.
- Pechan P.M., Bartels D., Brown D.C.W., Schell J. Messenger-RNA and protein changes associated with induction of *Brassica* microspore embryogenesis. *Planta.* 1991;184:161-165.
- Pechan P.M., Keller W.A. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol. Plant.* 1988;74:377-384.
- Pechan P.M., Smykal P. Androgenesis: affecting the fate of the male gametophyte. *Physiol. Plant.* 2001;111:1-8. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110101.x
- Prem D., Gupta K., Agnihotri A. Effect of various exogenous and endogenous factors on microspore embryogenesis in Indian mustard (*Brassica juncea* [L.] Czern & Coss). *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2005;41:266-273. DOI: 10.1079/IVP2005636
- 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 Tiss. Org. Cult.* 2008;93:269-282. DOI: 10.1007/s11240-008-9373-1
- 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 Breeding.* 1999;118:237-241.
- Sato S., Katoh N., Iwai S., Hagimori M. Effect of low temperature pretreatment of buds or inflorescence on isolated microspore culture in *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*). *Breed. Sci.* 2002;52:23-26. <http://dx.doi.org/10.1270/jsbbs.52.23>
- Simmonds D.H., Keller W.A. Significance of pre-prophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus*. *Planta.* 1999;208:383-391.
- Smith D.L., Krikorian A.D. Somatic pro-embryo production from excised wounded zygotic carrot embryos on hormone free medium; evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. *Plant Cell Rep.* 1990;9:34-37.
- Sopory S., Munshi M. Anther culture. *In vitro* haploid production in higher plants (Ed. J.M. Mohan et al.). Dordrecht: Kluwer, 1996;1:145-176.
- Takahata Y., Keller W.A. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore cultures of *Brassica oleracea* L. *Plant Sci.* 1991;74:235-242.
- Takahata Y., Komatsu H., Kaizuma N. Microspore culture of radish (*Raphanus sativus* L.): influence of genotype and culture conditions on embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 1996;16:163-166.
- Takahashi Y., Yokoi S., Takahata Y. Improvement of microspore culture method for multiple samples in *Brassica*. *Breed. Sci.* 2012;61:96-98. <http://dx.doi.org/10.1270/jsbbs.61.96>
- Telmer C.A., Simmonds D., Newcomb W. Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol. Plantarum.* 1992;84:417-424.

- Wang M., Farnham M.W., Nannes J.S.P. Ploidy of broccoli regenerated from microspore culture versus anther culture. *Plant Breed.* 1999;118:249-252.
- Wang T., Li H., Zhang J., Ouyang B., Lu Y.G., Ye Z.B. Initiation and development of microspore embryogenesis in recalcitrant purple flowering stalk (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *purpurea Hort.*) genotypes. *Sci. Hortic.* 2009;121:419-424. DOI:10.1016/j.scienta.2009.03.012
- Weatherhead M.A., Burdon J., Henshaw G.G. Effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. *Z. Pflanzenphysiol.* 1979;94:399-406.
- Winarto B., Teixeira da Silva J.A. **Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea*.** *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2011;107:305-315. DOI:10.1007/s11240-011-9981-z
- Yadollani A., Abdollani M.R., Moieni A. Effects of carbon source, polyethylene glycol and abscisic acid on secondary embryo induction and maturation in rapeseed (*Brassica napus* L.) microspore-derived embryos. *Acta Physiol. Plant.* 2011;33:1905-1912. DOI:10.1007/s11738-011-0738-4
- Yeung E.C., Ramesar-Fortner N.S. Physiological influences in development and function of shoot apical meristem of microspore-derived embryos of *Brassica napus* «Топас». *Can. J. Bot.* 2006;84:371-384.
- Yuan S.X., Su Y.B., Liu Y.M., Fang Z.Y., Yang L.M., Zhuang M., Zhang Y.Y., Sun P.T. Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2012;110:69-76. DOI:10.1007/s11240-012-0131-z
- Zaki M., Dickinson H. Modification of cell development *in vitro* – the effects of colchicines on anther and isolated microspore culture in *Brassica napus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1995;40:255-270.
- Zaki M., Dickinson H.G. Structural changes during the first division of embryos resulting from anther and microspore culture in *Brassica napus*. *Protoplasma.* 1990;156:149-162.
- Zhang G., Zhang D., Tang G., He Y., Zhou W. Plant development from microspore-derived embryos in oilseed rape as affected by chilling, desiccation and cotyledon excision. *Biol. Plant.* 2006;50:180-186.
- Zhang W., 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. *Sci. Hortic.* 2008;117:69-72. DOI:10.1016/j.scienta.2008.03.023
- Zhou W.J., Hagberg P., Tang G.X. Increasing embryogenesis and doubling efficiency by immediate colchicine treatment of isolated microspores in spring *Brassica napus*. *Euphytica.* 2002;128:27-34.