

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ОВОЩЕВОДСТВА»
(ФГБНУ ФНЦО)

На правах рукописи

КОЗАРЬ Елена Викторовна

УДК 601.2:573.6:635.152

**Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов
редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре
изолированных микроспор *in vitro***

4.1.2 – Селекция, семеноводство и биотехнология растений

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

**Научный
руководитель:**

кандидат сельскохозяйственных
наук, старший научный сотрудник
Е.А. Домблидес

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Культура редиса	11
1.1.1 Систематика редиса.....	12
1.1.2 Современное состояние селекции редиса в России и мире	15
1.2 Гаплоидные технологии в селекции	15
1.3 Культура изолированных микроспор в семействе <i>Brassicaceae</i>	17
1.4 Культура изолированных микроспор для вида <i>R. sativus</i> L.....	17
1.5 Эмбриогенез в культуре микроспор <i>in vitro</i> семейства <i>Brassicaceae</i>	20
1.6 Факторы, влияющие на получение удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор <i>in vitro</i>	21
1.6.1 Стадия развития микроспор.....	23
1.6.2 Чистота препарата микроспор.....	24
1.6.3 Индукция эмбриогенеза, температурный стресс.....	25
1.6.4 Питательная среда для индукции эмбриогенеза	28
1.6.5 Регуляторы роста.....	28
1.6.5 Питательная среда для регенерации	31
1.6.6 Питательная среда для укоренения.....	32
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
2.1 Растительный материал.....	33
2.2 Условия выращивания и подготовки растений-доноров.....	34
2.3 Определение оптимального размера бутона для изоляции микроспор	34
2.3.1 Определение качественного состава популяции микроспор в различных размерах бутонов.....	35
2.4 Предварительная холодовая обработка бутонов.....	35
2.5 Культура изолированных микроспор <i>in vitro</i>	35
2.5.1 Влияние качественного состава популяции изолированных микроспор на выход эмбриоидов	36
2.5.2 Оценка загрязненности препарата микроспор и качественного состава популяции микроспор в препарате в зависимости от способов изоляции микроспор	37
2.5.3 Оценка выхода эмбриодов в зависимости от способов изоляции микроспор	38
2.5.4 Влияние состава питательной среды на индукцию эмбриогенеза в культуре микроспор редиса европейского.....	39
2.5.5 Влияние длительности температурной обработки на индукцию эмбриогенеза в культуре микроспор редиса европейского	39
2.5.6 Эмбриогенез редиса европейского в культуре изолированных микроспор <i>in vitro</i>	39
2.6 Регенерация эмбриоидов.....	40

2.6.1	Влияние состава питательной среды для регенерации на эффективность получения микропобегов редиса европейского	40
2.7	Укоренение микропобегов редиса европейского в условиях <i>in vitro</i>	41
2.7.1	Укоренение микропобегов редиса европейского при использовании стандартного протокола ИМС технологии для семейства <i>Brassicaceae</i>	41
2.7.1	Влияние на ризогенез микропобегов редиса европейского добавления гормонов роста в питательную среду для регенерации.....	41
2.7.2	Влияния различных техник пересадки микропобегов редиса европейского на эффективность ризогенеза при культивировании на твердой безгормональной среде МС	42
2.7.3	Влияние последовательных пересадок микропобегов редиса европейского с иссечением корнеплодоподобных структура в области гипокотилия при культивировании на твердой безгормональной среде МС	42
2.7.4	Изучение эффективности ризогенеза микропобегов редиса европейского при культивировании на жидкой питательной среде с последовательными пересадками с иссечением корнеплодоподобных структура в области гипокотилия	43
2.12	Укоренение растений-регенерантов редиса европейского в условиях <i>in vivo</i>	43
2.13	Определение ploидности растений-регенерантов	44
2.13.1	Определение ploидности растений-регенерантов методом проточной цитометрии клеточных ядер.....	44
2.13.2	Определение ploидности растений-регенерантов методом подсчета числа хромосом с использованием пропионо-лакмоидного метода окраски	44
2.13.3	Определение ploидности растений-регенерантов методом подсчета числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц	45
2.14	Статистическая обработка	46
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	47
3.1	Культура изолированных микроспор <i>in vitro</i> редиса европейского	47
3.1.1	Определение качественного состава популяции микроспор в бутонах различного размера	47
3.1.2	Влияние качественного состава популяции изолированных микроспор на выход эмбриоидов.....	48
3.1.3	Оценка загрязненности препарата микроспор и качественного состава популяции микроспор в препарате в зависимости от способов изоляции микроспор	50
3.1.4	Оценка выхода эмбриоидов в зависимости от способов изоляции микроспор ...	53
3.1.5	Влияние состава питательной среды на индукцию эмбриогенеза в культуре микроспор <i>in vitro</i> редиса европейского	55
3.1.6	Влияние длительности температурной обработки на индукцию эмбриогенеза в культуре микроспор редиса европейского	57
3.1.7	Эмбриогенез редиса европейского в культуре изолированных микроспор <i>in vitro</i>	60
3.2	Регенерация микропобегов редиса европейского из эмбриоидов.....	78
3.2.1	Влияние состава питательной среды для регенерации на эффективность получения микропобегов редиса европейского	78
3.3	Укоренение микропобегов редиса европейского.....	79

3.3.1 Укоренение микропобегов редиса европейского при использовании стандартного протокола ИМС технологии для семейства <i>Brassicaceae</i>	79
3.3.2 Влияние на ризогенез микропобегов редиса европейского добавления гормонов роста в питательную среду для регенерации.....	83
3.3.3 Оптимизация технологии укоренения микропобегов редиса европейского	84
3.4 Определение ploидности растений-регенерантов.....	100
3.5 Практические результаты	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	109
Рекомендации по практическому применению результатов диссертационной работы	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Овощные культуры в распоряжении правительства РФ «Об утверждении перечня показателей в сфере обеспечения продовольственной безопасности Российской Федерации» стоят на третьем месте. В повышении эффективности овощеводства важная роль отводится селекции, на которую возложена задача создания новых сортов и гибридов, особенно в связи с тем, что доля импортных семян овощных культур составляет около 80%.

Культура изолированных микроспор *in vitro* (андрогагенез, *isolated microspore culture* - ИМС) занимает ведущее место в селекционных программах по ускорению процесса создания генетического разнообразия растений. В крупнейших иностранных селекционных кампаниях (Syngenta, Bayer и др.), наряду с различными методами биотехнологии, получение удвоенных гаплоидов для ряда сельскохозяйственных культур поставлено на конвейерную основу. Однако овощные культуры оказались не всегда отзывчивыми к ДН-технологиям и сейчас стали объектами изучения индукции гаплоидного эмбриогенеза по всему миру (Dunwell, 2010; Ferrie, Möllers, 2011; Dong et al., 2021). Исследования в этой области активно поддерживают FAO и Евросоюз, которыми учреждена программа COST 851 «Гаметные клетки и молекулярная селекция для улучшения растений».

Пока не существует универсальных протоколов и выявлены не только межвидовые, но и внутривидовые (генотип-зависимые) различия в отзывчивости к ДН-технологиям. Сложность разработки эффективной технологии получения удвоенных гаплоидов состоит в необходимости подбора оптимальных значений многих факторов, степень влияния каждого из которых для разных культур может существенно отличаться.

В семействе *Brassicaceae* встречаются как отзывчивые, так и не отзывчивые культуры. Для отдельных видов семейства *Brassicaceae* Varn. уже разработаны эффективные протоколы получения ДН-растений в культуре

изолированных микроспор *in vitro*. К таким культурам относится род *Brassica* L. семейства капустные, в пределах которого у многих видов достаточно детально изучены биологические процессы эмбриогенеза и регенерации и сейчас продолжаются исследования уже на генетическом уровне (Lichter, 1982; Shmykova et al., 2015). Редис европейский, относящийся к роду *Raphanus sativus* L., является самой сложной и неотзывчивой к ИМС технологии культурой в семействе *Brassicaceae*. До настоящего времени по культуре редиса европейского не было сведений об успешном завершении полного цикла ИМС технологии и отсутствовали фундаментальные исследования по изучению этапов андрогенеза в условиях *in vitro*, позволяющие определить основные причины и пути преодоления его низкой отзывчивости. Поэтому изучение андрогенеза и разработка ИМС технологии для редиса европейского актуальная тема для исследований.

Цель исследования: разработать технологию получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* редиса европейского для создания линейного материала.

Задачи:

1. Изучить факторы (размер бутона, структура популяции микроспор, изоляция микроспор, состав питательной среды, режим термообработки), влияющие на индукцию эмбриогенеза и формирование эмбриоидов в культуре микроспор *in vitro* редиса европейского. Подобрать оптимальные условия по изученным факторам для оптимизации ИМС протокола.

2. Изучить особенности андрогенеза редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro*.

3. Изучить факторы влияния на эффективность регенерации эмбриоидов редиса европейского и дальнейший органогенез растений-регенератов (состав питательной среды для регенерации и ризогенеза, способы посадки микропобегов), оптимизировать условия по изученным факторам и предложить модификации этапов технологии, повышающие эффективность ИМС протокола.

4. Получить удвоенные гаплоиды редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro*.

5. Провести анализ пloidности растений-регенератов редиса европейского, полученных с помощью ИМС технологии.

6. Провести инбридинг полученных ДН-растений редиса европейского для получения линейного материала для селекции.

Научная новизна

В процессе выполнения диссертационной работы впервые изучены все этапы андрогенеза редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro* и обнаружены новые паттерны формирования эмбриогенных структур, ранее не описанные в литературе ни для одной из культур - упорядоченные деления в микроспорах с интактными экзинами, прикрепление суспензоров к апикальным частям эмбриоидов и формирование апикально-базальной оси эмбриоида вдоль оси суспензорных нитей при формировании эмбриоида в середине филамента.

Для редиса европейского впервые исследованы факторы, влияющие на его отзывчивость к эмбриогенезу (размер бутона, структура популяции микроспор, изоляция микроспор, состав питательной среды, режим термообработки), проведены наблюдения за поведением этой культуры на всех этапах ИМС технологии и обнаружены биологические особенности на этапе укоренения.

Впервые подобраны оптимальные условия для индукции андрогенеза, регенерации эмбриоидов и дальнейшего органогенеза растений-регенерантов редиса европейского.

Применен не стандартный подход к подбору питательных сред на этапах индукции эмбриогенеза и укоренении микропобегов редиса европейского. Для семейства *Brassicaceae* впервые была показана эффективность применения модифицированной питательной среды МСм с 13 % сахарозой и 500 мг/л гидролизата казеина на этапе индукции эмбриогенеза и жидкой питательной

среде МСм с добавлением 0,1 мг/л кинетина на этапе укоренения микропобегов редиса европейского.

Найдены оригинальные методические решения для повышения эффективности ИМС технологи редиса европейского на этапах изоляции микроспор и индукции ризогенеза.

Показана высокая частота спонтанного удвоения гаплоидного набора хромосом растений-регенерантов редиса европейского.

В результате работы разработан первый протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для редиса европейского и впервые в мире получены ДН-линии этой культуры.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные новые сведения о паттернах формирования эмбриогенных структур при андрогенезе РЕ расширяют теоретические знания биологии эмбриогенеза в целом.

Предложенный оригинальный способ изоляции микроспор позволяет повысить эффективность ИМС технологии, как для редиса европейского, так и для других культур семейства *Brassicaceae* (Kozar et al., 2022).

Разработанный принципиально новый подход к повышению эффективности корнеобразования, ранее не описанный в литературе, открывает перспективы для разработки новых способов индукции ризогенеза различных культур, как в рамках ДН-технологий, так и в других технологиях, где необходим этап укоренения растений *in vitro* (микрклональное размножение растений, агробактериальная трансформация растений и др.)

Применение в селекционных программах разработанной технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro* позволяет ускорить создание родительских линий гибридов F1 в четыре-шесть раз по сравнению с традиционным методами селекции.

Полученные ДН-линии редиса европейского являются ценным материалом для создания родительских линий гибридов F₁ и могут быть использованы в качестве объектов для генетических исследований.

Методология и методы исследования

Исследования проводились с использованием стандартных методик совместно с новыми модификациями и последующей статистической обработкой данных, согласно главе «Материалы и методы».

Основные положения, выносимые на защиту

1. Эмбриогенез редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro* имеет ряд особенностей биологического развития, ранее не отмеченных для других культур семейства *Brassicaceae*.
2. Разработка новых методических подходов и подбор критических факторов на разных этапах эмбриогенеза, регенерации эксплантов, ризогенеза *in vitro* и укоренения *in vivo*, повышает эффективность технологии и позволяет завершить полный цикл получения ДН-растений редиса европейского.
3. Культуре редиса европейского свойственна высокая частота спонтанного удвоения хромосом в культуре изолированных микроспор *in vitro* и не требует обработки антимиотическими веществами.
4. Создание исходных гомозиготных линий для гетерозисной селекции гибридов F₁ редиса европейского, возможно с помощью разработанного ИМС протокола в четыре-шесть раз быстрее, чем традиционными методами селекции.

Степень достоверности

Достоверность исследований подтверждена экспериментальными исследованиями, которые были проведены в необходимом количестве повторности для надежности результатов, в так же статистической обработкой полученных данных.

Апробация результатов

Результаты исследований по диссертации были представлены на:

- VIII Международной школе молодых ученых по молекулярной генетике «Генетическая организация и молекулярные механизмы функционирования живых систем» (2018г. Россия, г. Звенигород)
- Научной конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (2018г. Россия, г. Москва, ВНИИСБ, РАН).
- 2-м средиземноморском форуме для аспирантов и молодых исследователей. «Исследования и инновации как инструменты устойчивого сельского хозяйства, продовольственной безопасности и безопасности питания» / 2nd Mediterranean Forum for PhD students and Young Researchers Research and Innovation as Tools for Sustainable Agriculture, Food and Nutrition Security (2018г.Италия, г. Бари).
- Международной конференции «состояние и перспективы селекционных исследований культур семейства *Brassicaceae* в современных условиях» (2019г. Россия, г. Санкт-Петербург, ВИР)
- 3-ей международной конференции «Растительные клетки и ткани *in vitro*» / 3rd International Conference on «Plant Cells & Tissue in Vitro» (2019г. Австрия, г. Вена).
- 7-й международной научно-практической конференции «Современные тенденции в селекции, семеноводстве и товарном производстве овощных, бахчевых и цветочных культур. Традиции, современность, перспективы.» (2020 Россия, Московская обл.).
- 12-й международной школе молодых ученых «Системная биология и биоинформатика» / 12th International young scientists school «System Biology and Bioinformatics», SBV-2020 (2020г. Россия, Республика Крым).
- международной конференции «Биотехнология наука и практика» (2020г. Россия, Республика Крым).
- 21-й научной конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (2021 г. Россия, г. Москва, ФГБНУ ВНИИСБ).

- Всероссийской конференции «Генетические ресурсы растений для генетических технологий: к 100-летию Пушкинских лабораторий ВИР» (2022г. Россия, г. Санкт-Петербург, ВИР).

Личный вклад автора

Экспериментальные исследования, обработка и анализ данных, а также постановка проблемы, целей и задач исследований на 85% выполнены автором.

Публикация результатов исследований

По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 2 в рецензируемых научных журналах в изданиях, входящих в перечень ВАК РФ, 5 работ рецензируемых Scopus, Web of science, 6 в сборниках докладов и тезисов, в том числе поданы заявки на 3 патента на ДН-линии редиса европейского: «Жегалов», «Веня», «Персей» и патент на изобретение «Модифицированный метод изоляции микроспор в культуре микроспор *in vitro* для семейства *Brassicaceae*».

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 128 страницах компьютерного текста, содержит 8 таблиц и 32 рисунка. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, заключения, рекомендаций по практическому применению результатов диссертационной работы и списка использованной литературы. Список литературы содержит 166 источников, из них – 154 на иностранных языках.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Культура редиса

Для поддержания здорового образа жизни значительную часть в рационе человека занимают овощные культуры. Редис (*Raphanus sativus* L.) - представитель семейства Капустные (*Brassicaceae*) относится к монокарпическим травам и бывает двулетним (зимняя редька) или однолетним (редис, летняя редька, китайский редис, лоба, дайкон, масличная редька). Эта культура считается не только овощной, но и лекарственной

растением во всем мире. Особенно она популярна в Китае, Японии, Корее и Южной Азии. Мировое производство редиса (7 миллионов тонн в год) составляет около 2% от всего производства овощей (Корта, Pokluda, 2013)). Редис очень перспективен с экономической точки зрения, так как считается самым скороспелым овощем. Еще одним его преимуществом перед остальными культурами, является то, что все части растения можно употреблять в пищу. Наиболее часто в пищу используется корнеплод редиса. Несмотря на то, что редис и редька относятся к одному и тому же виду *R. sativus*, они отличаются по способу образования корнеплода, где у редиса корнеплод является гипокотилем, а у редьки корнем. Корнеплоды бывают разных типов, цветов, и размеров. Помимо богатства аскорбиновой (витамином С), фолиевой кислотой и калием, редис также является источником витамина В6, рибофлавина, магния и кальция.

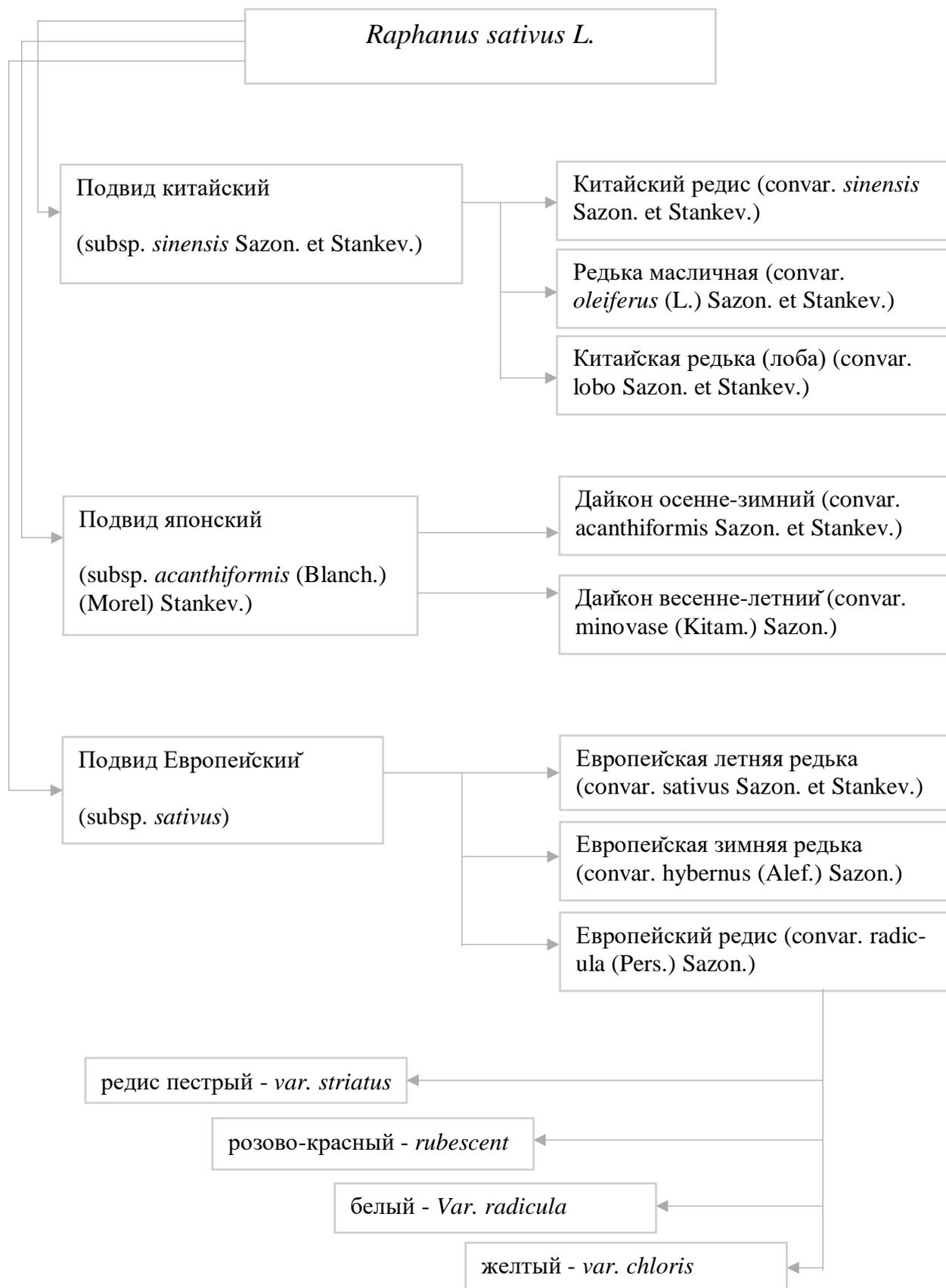
1.1.1 Систематика редиса

Несмотря на то, что род *Raphanus* небольшой, нет единства в определении его объема и в систематике. Первое упоминание о разнообразии корнеплодной редьки датируется 1в. до н. э. в Древней Греции. Так же описано, что редьку возделывали в Европе, еще во времена Римской империи. В средневековых «травниках» имеются рисунки редьки и описания разных форм. Однако в названиях была путаница, под латинским названием «*rapa*» могли подразумеваться разные культуры (редька, свекла, репа, хрен).

До настоящего момента нет однозначно верной классификации. Дело в том, что все возделываемые редьки легко скрещиваются между собой и дают плодовитое потомство. Ввиду этого внутри вида стираются границы признаков, свидетельствующие о генетической близости или отдаленности, даже в географически изолированных группах. В нашей стране руководствуются внутривидовой классификацией, которая была разработана в 1971 г. Л. В. Сазоновой (Сазонова Л.В., 1971) и уточнена в 1985г. Л.В. Сазоновой и А. К. Станкевич и изложена в работе Л.В. Сазоновой и Э.А. Власовой (Сазонова, Власова Э.А., 1990).

В этой классификации таксономическая принадлежность культуры редиса европейского, как подвида, следующая: надцарство эукариоты - *Eukaryota Chatton*; царство растения - *Plantae Haeckel*; подцарство высшие растения – *Telomobionta*; надотдел семенные растения – *Spermatophyta*; отдел покрытосеменные или цветковые растения - *Magnoliophyta, Angiospermae*; класс магнолиописиды, или двудольные - *Magnoliopsida, Dicotyledones*; подкласс дилленииды – *Dilleniidae*; порядок каперсовые – *Capparales*; подпорядок – *Capparineae*; семейство крестоцветные, капустовые – *Brassicaceae*; род редька – *Raphanus*; вид редис и редька посевные *R. sativus* L. Вид *R. sativus* L. подразделяется на три подвида (схема): китайский (subsp. *sinensis* Sazon. et Stankev.), японский (subsp. *acanthiformis* (Blanch.) (Morel) Stankev.) и европейский (subsp. *sativus*). Подвид европейский в свою очередь подразделяется на: европейскую летнюю редьку (convar. *sativus* Sazon. et Stankev.), европейскую зимнюю редьку (convar. *hybernus* (Alef.) Sazon.) и европейский редис (convar. *radicula* (Pers.) Sazon.).

Схема современной классификации вида *Raphanus sativus* L.



1.1.2 Современное состояние селекции редиса в России и мире

В России выращиванием редиса занимаются преимущественно в частном секторе и в мелких фермерских хозяйствах, а в крупных овощеводческих тепличных комплексах редис используют как промежуточную или уплотняющую культуру. В открытом и защищенном грунтах культурой редиса ежегодно засевают 10–15 тыс. га. По разным данным урожайность корнеплодов редиса варьируется от 15 до 26 т/га (Бобренко Елена Геннадиевна, 2001; Борисов А.Л., Теньков А.Л., 2004). В последнее время популярным способом выращивания редиса стало выращивание в рассадных комплексах с контролируемыми условиями на стеллажных гидропонных установках или в кассетах методом подтопления (Антипова О.В., 2007)), для чего подходят в основном сорта и гибриды F₁ зарубежной селекции. В целом доля товарного производства корнеплодов редиса в России очень ограничена, и данную нишу в зимне-весенний период занимает импорт из стран Европы (Янаева Д.А., 2011). Ввиду этого особенно актуален вопрос отечественной селекции редиса европейского (Заячковская, 2005; Янаева Д.А. et al., 2012).

1.2 Гаплоидные технологии в селекции

В современной селекции сельскохозяйственных культур приоритетным является создание гибридов F₁, отличающихся от сортов высокой урожайностью, выравненностью растений по срокам созревания и качеству продуктивных органов. Для гибридов F₁ в качестве родительских линий используются гомозиготные линии. Выведение гомозиготных родительских линий с помощью традиционных методов селекции наиболее трудоемкое и продолжительное звено в селекционном процессе. Выведение константных родительских линий может занимать от 6 до 12 лет в зависимости от культуры. Особенно затруднено получение чистых родительских линий у перекрестноопыляемых культур, к которым относится и вид *R. Sativus* L..

Биотехнологические методы культивирования клеток совершили прорыв в различных областях науки, открыли новые горизонты как для

пополнения фундаментальных теоретических знаний, так и для совершенствования практического производства. В большинстве развитых стран в для ускорения селекции широко используются ДН-технологии (Dunwell, 2010), которые позволяют получить полностью гомозиготные растения за одно поколение и ускорить селекционный процесс по меньшей мере на три-четыре года (Ferrie, Möllers, 2011). В том числе гаплоидные технологии могут повысить биоразнообразие за счет гаметоклональной изменчивости и облегчить отбор растений с рецессивными и селекционно ценными признаками, таким образом, повысить эффективность практической селекции (Henderson, Pauls, 1992; Bansal' et al., 1998; Forster, Thomas, 2005; Ferrie, Caswell, 2011; Behla et al., 2017). Помимо ускорения селекционного процесса ДН-растения, полученные в культуре клеток, благодаря своей полной гомозиготности являются прекрасным материалом для генетических исследований. Такой растительный материал облегчает скрининг генов и сегментирование генома, а также создание картографических популяций и коллекций мутантных форм.

Основные методы получения удвоенных гаплоидов и классификация методов рассмотрены в ряде обзоров (Maluszynski et al., 2003; Dunwell, 2010; Asif, 2013). Удвоенные гаплоиды возможно получить на основе андрогенеза (культура пыльников или культура микроспор), гиногенеза (культура неоплодотворенных семязпочек) и партеногенеза (опыление облученной/обработанной химическими веществами пыльцой или пыльцой отдаленных видов). Из вышеперечисленных методов наиболее перспективной технологией получения удвоенных гаплоидов является культура изолированных микроспор *in vitro* (ИМС). Она основана на способности клеток незрелого мужского гаметофита (микроспор) под воздействием внешних контролируемых условий изменять путь развития с гаметофитного на спорофитный и, благодаря тотипотентности, формировать полноценное растение. В отличие от других гаплоидных технологий, в культуре микроспор отсутствуют соматические диплоидные клетки. Это позволяет избежать

необходимости дополнительного подтверждения происхождения полученных тканей и быть уверенными, что все сформировавшиеся эмбриониды являются продуктом эмбриогенеза гаплоидных клеток микроспоры (Aslam et al., 1990; Dunwell, 2010).

1.3 Культура изолированных микроспор в семействе *Brassicaceae*

Первые успешные исследования по культуре изолированных микроспор *in vitro* в семействе *Brassicaceae* были проведены в начале 1980-х гг.) (Lichter, 1982). Позднее был разработан базовый протокол культуры макроспор рапса, который служит основой ДН-технологии для представителей 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*), полу- и рыхлокочанной капусты (*B. oleracea* var. *costata*), кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes*), капусты декоративной (*B. oleracea* var. *acephala*) и белокачанной (*B. oleracea* var. *capitata*), а также китайской (*B. rapa* ssp. *chinensis*) (Lichter, 1989; Cao et al., 1990; Takahata, Keller, 1991; Duijs' et al., 1992; Winarto, Teixeira da Silva, 2011; Yuan et al., 2012). Опубликованные протоколы для семейства *Brassicaceae* приведены в обзоре (Maluszynski et al., 2003). Несмотря на то, что для ряда культур семейства *Brassicaceae* ИМС технология разработана и активно используется в практических задачах, в связи с тем, что биоразнообразие растений обширно и имеет индивидуальные особенности, технология получения ДН-растений не может быть универсальной. Так, в семейство *Brassicaceae* включает в себя помимо культур с высокой чувствительностью к эмбриогенезу (рапс, капуста белокочанная), культуры для которых эффективная технология получения ДН-растений не разработана (редис европейский).

1.4 Культура изолированных микроспор для вида *R. sativus* L.

Несмотря на то, что внутри семейства *Brassicaceae* Vurn. (крестоцветные, капустные) для ряда культур удвоенные гаплоиды получают довольно успешно с помощью ИМС технологии, редис,

относящийся к виду *Raphanus sativus* L., является самой не отзывчивой и сложной культурой в этом семействе. В настоящее время существует всего несколько работ, посвященных виду *Raphanus sativus* L. в области методов *in vitro*. Однако, из-за особенностей систематики данного вида, не всегда очевидно на какой именно культуре проведено исследование - на культуре редиса или, например, редьки или дайкона, поскольку все они относятся к данному виду и международное латинское название одинаково. Так, первое упоминание о тестировании ИМС технологии для вида *R. sativus* L. появилось в статье 1989 года. (Lichter, 1989). В данной статье описывается успешное получение эмбриоидов у вида *R. sativus* L., однако не уточняется какой подвид был использован в работе, в том числе в статье не уточняется удалось ли получить полноценные растения-регенераты и адаптировать их в условиях *in vivo*. Следующая статья была опубликована в 1996 году (Takahata et al., 1996), в ней в качестве материала использовались 11 генотипов вида *R. sativus* L.. В статье перечислены сорта (Chuogoku-ao, Minikon, Ohkura, Sushirazu-shogoin, Taiwankei-kabuba, Tenshun, Hohryo, Miura, Miyashige-shirimaru, Natsuminowase, Temari), однако точную принадлежность к подвидам нам удалось установить лишь у некоторых генотипов, которые относились к дайконам - подвид японский (subsp. *acanthiformis* (Blanch.) (Morel) Stankev.). Получить эмбриоды исследователям удалось у 6 генотипов, однако они отметили, что столкнулись со сложностями при дальнейшей регенерации эмбриоидов в растения-регенераты и оценка плоидности растений, которые удалось получить, показало, что все они имели геном превышающий диплоидный набор хромосом, но увеличение генома были не кратным. Следующее сообщение с упоминанием культуры микроспор *in vitro* для вида *R. sativus* L. было опубликовано японскими исследователями в 2002 году, и была посвящена использованию удвоенных гаплоидов, полученных из микроспор для создания гибридов F1 дайкона, т. е. как и в предыдущей статье, исследования проводились на японском подвиде вида *R. sativus* L.. Далее в 2011 году была опубликована статья ученых из Кореи, в которой описывается

исследование влияния состава питательных сред, размера бутонов, концентрации сахарозы, тепловой обработки и ингибитора этилена на эмбриогенез микроспор (Chun et al., 2011). В качестве донорного растения был взят гибрид F1, полученный из сорта вида *R. sativus* L. - Gwanhun, Moungsan Co., Korea. Исследователи не уточняют к какому подвиду относится данный гибрид F1, однако судя по данным статьи и принадлежности сорта это китайский подвид (subsp. *sinensis* Sazon. et Stankev.). В 2014 году была опубликована статья другими учеными из Кореи (Han et al., 2014), которые в качестве донорных генотипов для исследований выбрали: *Raphanus sativus* L. cvs. Taebaek and Chungwoon (Monsanto Co., Seoul, Korea). Эти сорта дайконов принадлежат к японскому подвиду (subsp. *acanthiformis* (Blanch.) (Morel) Stankev.). Ученым удалось получить эмбриоды из сорта Taebaek и запечатлеть первые фотографии основных этапов эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор *in vitro*. Следующая публикация, где в качестве донорных растения для ИМС технологии использовали вид *Raphanus sativus* L. принадлежит учёным из Турции (Tuncer, 2017). Они изучали влияния различных концентраций колхицина на каллусообразование в культуре изолированных микроспор *in vitro* в различных сортах, которые принадлежат различным подвидам вида *Raphanus sativus* L. и впервые в качестве донорных растений использовали два сорта редиса, которые относятся к европейскому подвиду (subsp. *sativus*), это сорта cv. Cherry Belle и cv. Burkir. Однако исследователям удалось получить только каллус, а эмбриоидов получено не было. Последнее упоминание о культуре изолированных микроспор *in vitro* для вида *R. sativus* L. было в статье (Han et al., 2018) Идентификация и изменение основных алифатических глюкозинолатов в ДН- линиях редиса японского подвида *Raphanus sativus* L.

То есть, в отечественной и зарубежной литературе по культуре редиса подвида европейский (subsp. *sativus*) нет пока сведений об успешном завершении полного цикла получения ДН-растений в культуре изолированных микроспор *in vitro*. Соответственно, отсутствуют и

теоретические знания биологии процессов андрогенеза в условиях *in vitro*, что затрудняет создание научно обоснованной эффективной технологии получения ДН-растений, являющихся основой расширения биоразнообразия форм и создания новых генисточников в короткие сроки для селекционных программ и генетических исследований.

1.5 Эмбриогенез в культуре микроспор *in vitro* семейства *Brassicaceae*

Культура изолированных микроспор *in vitro* начала развиваться давно, но ее потенциал продолжает раскрываться, как для практического применения, так и для получения фундаментальных знаний. Например, развитие некоторых микроспор очень похоже на зиготический эмбриогенез, и относительно недавно были разработаны протоколы, в которых значительная часть микроспор способна развиваться по зиготическому типу, что позволяет тщательно изучать эмбриогенез с самых ранних стадий развития (Mordhorst et al., 1997; Maluszynski et al., 2003; Joosen et al., 2007; Supena et al., 2008; Wędzony et al., 2009; Dubas et al., 2011; Prem et al., 2012; Tang et al., 2013). Эмбриогенез в культуре микроспор был изучен очень широко для культур, хорошо реагирующих на технологию ИМС. Действительно, для изучения биологических механизмов необходимо много статистических данных, чтобы сделать надежные выводы. Культура микроспор *in vitro* одной из самых отзывчивых на эмбриогенез культур, *B. napus*, использовалась для изучения тотипотентности (Martín et al., 2000; Joosen et al., 2007; Malik et al., 2007; Li et al., 2014), гормональной сигнализации (Hays et al., 2000; Dubas et al., 2013, 2014; Li et al., 2014; Soriano et al., 2014; Robert et al., 2015; Rodríguez-Sanz et al., 2015), клеточных стенок (Solís et al., 2016; Corral-Martínez et al., 2019; Rivas-Sendra et al., 2019) и роли суспензора в формировании эмбриоида (Supena et al., 2008; Soriano et al., 2014). Тем не менее, в этой области знаний еще много неизвестного, мнения ученых не во всем совпадают, продолжают появляться новые доказательства и опровержения гипотез. Кроме того, любые дополнительные знания об этом процессе у новых культур могут значительно

расширить знания и продвинуть исследования, поскольку каждая культура имеет свои особенности.

1.6 Факторы, влияющие на получение удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro*

Получение удвоенных гаплоидов с помощью биотехнологических методов открывает огромные перспективы для повышения эффективности селекции и генетических исследований, однако все эти технологии не просты в исполнении и зависят от огромного числа факторов, многие из которых вероятно еще даже не определены. В силу того, что биотехнологические методы очень чувствительны к различным факторам, а каждая культура имеет свои особенности, невозможно разработать универсальную технологию для всех культур и ИМС технология не исключение. Для того чтобы разработать ИМС технологию для ранее не отзывчивых культур обычно используют уже разработанные протоколы, которые эффективны для близкородственных к ним культурам. Далее необходимо производить многочисленные эксперименты на базе разработанных протоколов с изменением различных факторов для того, чтобы подобрать оптимальные условия. Не всегда удается изменить лишь один фактор, для того чтобы получить положительный эффект, тем более что изначально у исследователя нет понимания почему именно та или иная культура не отзывчива. Поэтому производится огромное количество различных экспериментов, чтобы «нащупать путь», который приведет к положительным результатам и это долгий и трудоемкий процесс, который зачастую определяется не только профессиональностью исследователя, но и случайными факторами. Обычно подбор оптимальных условий начинают с общепризнанно «базовых» факторов, таких как определение линейного размера бутона с оптимальным соотношением стадий развития микроспор для индукции эмбриогенеза, оптимальной продолжительности теплового шока после введения в культуру, состава питательной среды для индукции др. На протяжении всего процесса культивирования микроспор исследователи наблюдают за живой культурой с помощью инверторного микроскопа, для того

чтобы отследить процессы индукции эмбриогенеза и развития эмбриоидов, или, если положительных результатов не достигается, постараться выдвинуть гипотезы о причинах такого результата для их дальнейшей проверки и продолжить постановку опытов с измененными параметрами. В случае, если удастся получить эмбриоиды, исследователи приступают ко второму этапу ИМС технологии – регенерации эмбриоидов в растения-регенеранты. Этап регенерации в свою очередь также можно разделить на два этапа – это индукция вторичного эмбриогенеза и/или побегообразование, и второй этап – индукция ризогенеза у полученных микропобегов. Эти этапы также зависят от различных факторов и особенностей культивируемой культуры и требуют со стороны ученого изучения литературы для составления оптимальных схем опытов для подбора оптимальных условий, а также в случае необходимости разработки уникальных модификаций элементов технологии. Общепринятым фактором, влияющим на этап регенерации считается состав питательной среды, однако не всегда этого бывает достаточно и необходим поиск других способов повышения эффективности регенерации. После успешного укоренения растений-регенерантов в условиях *in vitro* наступает следующий этап – адаптация растений в условиях *in vivo*. Как правило этот этап оказывается менее трудоемким, чем остальные, при условии, что у растений-регенерантов удалось получить мощную корневую систему в условиях *in vitro*, однако, как и на всех других этапах для различных культур могут быть «исключения». Далее производится анализ полученных растений-регенерантов на ploидность. У многих культур происходит спонтанное удвоение генома, но, если такого не наблюдается, применяется дополнительный этап обработки растений антимиотическими веществами, который обычно труден в отработке оптимальной методологии для положительного результата.

Ниже представлен обзор литературы по влияющим на эффективность ИМС технологии факторам, которые применимы к результатам данной диссертационной работы.

1.6.1 Стадия развития микроспор

Одним из важнейших факторов, влияющих на эффективность эмбриогенеза, является стадия развития микроспор. Многочисленные исследования показали, что менять путь развития с гаметофитного на спорофитный способны микроспоры на поздней одноклеточной вакуолизированной стадии развития и пыльца на ранней двухклеточной стадии развития (далее для удобства мы будем называть обе эти стадии микроспорами) (Dong et al., 2021). Поскольку только эти стадии микроспор способны к эмбриогенезу, микроспоры на других стадиях развития в процессе культивирования погибают и оказывают токсичное действие на культуру клеток (Kott et al., 1988a). Еще в 1998 Kott и др. (Kott et al., 1988b) отметили влияние популяционного состава микроспор на выход эмбриоидов, показав, что генотип с более равномерным развитием микроспор давал значительно большую урожайность. Действительно, у тех генотипов, где наблюдается неравномерное развитие микроспор из-за постоянного присутствия разнообразных стадий развития микроспор в бутонах, относительная концентрация микроспор на отзывчивой стадии развития всегда снижена, а значит и потенциальная токсическая нагрузка из-за погибших микроспор повышена.

Ввиду этого в культуре клеток важно не только присутствие микроспор на отзывчивых к эмбриогенезу стадиях развития, но и минимальное количество микроспор на других стадиях развития (Kott et al., 1988b). Для того, чтобы ввести в культуру микроспоры на оптимальной стадии развития исследователи проводят рекогносцировочный анализ стадий развития микроспор в зависимости от линейного размера бутонов, которые, как правило, хорошо коррелируют между собой (Dong et al., 2021). Оптимальный размер бутонов может существенно отличаться у разных культур. Так, для капусты белокочанной диапазон оптимальных размеров бутонов обычно варьируется в пределах культур 4,5–5,0 мм (Winarto, Teixeira da Silva, 2011), для рапса и брокколи 3,5–3,9 мм (Gu et al., 2004; Domblides et al.,

2018), а для капусты китайской 2,5-3,2мм (Kozar et al., 2019) и т.д.. В том числе значительные различия по оптимальному размеру бутонов может встречаться и внутри одной культуры, более того, даже внутри одного генотипа размер бутонов может варьироваться в зависимости от возраста донорного растения. Поэтому рекогносцировочный анализ линейного размера бутонов необходим и в процессе закладки опытов по одному и тому же генотипу с течением времени. Тем не менее несмотря на то, что исследователи всегда стараются подобрать бутоны оптимального размера, микроспоры в пыльниках бутонов всегда созревают не равномерно и у разных культур это выражено в разной степени. Для культур, где неравномерность развития микроспор значительна это может играть решающую роль в успешности ИМС технологии (Kott et al., 1988b). Кроме того, это приводит к сужению диапазона подходящих размеров бутонов, что технически осложняет технологию (Bhatia et al., 2018; Kozar, Domblides, 2021). Существует целый ряд исследований, посвященных попыткам отделить из суспензии микроспор только отзывчивые к эмбриогенезу стадии развития, но данные модификации сложны для практического применения, требуют дорогостоящих реактивов, что ограничивает их использование в обширной практике (Takahata et al., 1996; Bhowmik et al., 2011; Dupl'Áková et al., 2016).

1.6.2 Чистота препарата микроспор

Помимо погибших микроспор на культуру клеток токсическое воздействие могут оказывать попавшие в культуру органические компоненты клеточного содержимого протопластов и разрушенные фрагменты соматических клеток пыльников и тканей бутонов. Так, еще в 1990 году Aslam и др. (Aslam et al., 1990) писали о негативном воздействии стенок пыльников на эмбриогенез микроспор. Ткани пыльников могут попадать в культуру не только при их прямом погружении в препарат, но и в процессе изоляции микроспор, где происходит активное механическое воздействие на ткани бутонов и вместе с этим на пыльники, где они разрушаются и частицы разрушенных клеток попадают в препарат. В стандартных протоколах

получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор *in vitro* для семейства *Brassicaceae* изоляция микроспор происходит с помощью разбивки бутонов, погруженных в питательную среду: в бюксах с магнитами на магнитной мешалке (Kozar, Domblides, 2021); путем сжатия бутонов поворотным движением в пробирках с помощью поршня (шприца) (Corral-Martínez et al., 2021); путем растирания бутонов пестиком в ступке (Chun et al., 2011); путем раздавливания бутонов стеклянной палочкой в пробирке (Smýkalová et al., 2018) или путем измельчения бутонов в блендере (Vabbar et al., 2004).

1.6.3 Индукция эмбриогенеза, температурный стресс

Для индукции эмбриогенеза необходимо перепрограммирование клеток на спорофитный путь развития, для инициирования этого процесса на культуру клеток воздействуют различными стрессовыми факторами (Dong et al., 2021). Это может быть воздействие холодной предобработкой бутонов (ссылка), осмотическим стрессом или гормонами роста (Ahmadi et al., 2014), антиоксидантами (Hoseini et al., 2014) или тепловым шоком различной температурной экспозиции и продолжительности (Prem et al., 2005).

Наиболее распространенными стрессами, которые используются в обширной практике, являются холодовая предобработка бутонов и тепловая обработка суспензии микроспор, сразу после их введения в культуру.

Холодовая обработка микроспор для индукции эмбриогенеза у растений рода *Brassica* применяется редко. Тем не менее была показана эффективность холодовой предобработки бутонов или соцветий, предназначенных для получения культуры микроспор *B. napus*, *B. oleracea*, *B. Rapa* (Lichter, 1982; Osolnik et al., 1993; Sato et al., 2002) и предобработки непосредственно изолированных микроспор у *B. napus* (Charne, Beversdorf, 1988), Интересные результаты были получены Gu с соавторами (Gu et al., 2004) в эксперименте, сочетающем низкотемпературный шок с осмотическим. Они использовали холодовую предобработку стерильных бутонов *B. napus*, помещенных в питательную среду NLN с 13%-ой сахарозой. У яровых сортообразцов, таких как Топаз, Ханна, No 7039, No 7041, No 7042, эта предобработка

способствовала увеличению выхода эмбриоидов в 2–8 раз в зависимости от сотообразца. Менее значительное увеличение прослеживалось у озимых сортообразцов *B. napus*. Однако в литературе встречаются данные и об отрицательных эффектах низкотемпературных обработок у *B. napus* и *B. rapa* (Dunwell et al., 1985). Вышеизложенные факты подчеркивают, что для каждого сортообразца нужен индивидуальный подбор индуцирующего фактора, который, по-видимому, зависит от устойчивости растения к нему (Shmykova et al., 2015). Обычно рекомендуется использовать холодовую предобработку бутонов для капустных культур при культивировании микроспор до 3 суток. Это позволяет планировать рабочее время и дает возможность увеличить количество бутонов оптимального размера, собирая их с растения в течение нескольких дней (Домблидес et al., 2016).

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°C до 40°C 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 соавторами (Pechan et al., 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 (Simmonds, 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, Keller, 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°C продолжалось 18–24 ч, а затем температурный режим сменялся на 25°C (Simmonds, Keller, 1999). Другие исследователи наблюдали самый большой выход эмбриоидов при воздействии температуры 32°C 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 соавторами (Зубарева et al., 2013). В культуре микроспор *B. juncea* эмбриогенез индуцируется при более длительном температурном воздействии. По данным Chanana (Chanana et al., 2005), продолжительность его составляет 72 ч, а другие исследователи (Prem et al., 2005, 2008) проводят предобработку такой же температурой (32,5°C) в течение 10–11 суток. Для растений вида *B. oleracea*, к которому относятся слабо отзывчивые генотипы, температурная обработка также является необходимой для индукции эмбриогенеза. Keller и Armstrong (Keller, Armstrong, 1981) наблюдали максимальный выход эмбриоидов у капусты декоративной при предобработке температурой 35°C в течение 1 суток. У капусты брюссельской (*B. oleracea* var. *gemmifera*) лучшие результаты были получены в культуре пыльников, когда для индукции применяли температуру 35°C 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°C в течение 2 суток. В

более поздней работе (Silva Dias da, 2001) было показано, что для культуры микроспор 9 сортообразцов брокколи из 10 оптимальной была индукция эмбриогенеза при температурном воздействии 32,5°C в течение суток и для одного сортообразца – 30°C в течение 2 суток (Shmykova et al., 2015). Поэтому подбирать оптимальный режим температурной обработки необходимо индивидуально для каждой культуры и сортообразца.

1.6.4 Питательная среда для индукции эмбриогенеза

Питательная среда для индукции эмбриогенеза является также важным фактором, влияющим на эффективность ИМС технологии (Winarto, Teixeira da Silva, 2011). Самой распространенной средой для индукции эмбриогенеза семейства *Brassicaceae* является среда NLN-13 (Lichter, 1982; Silva Dias da, 2003; Dong et al., 2021). Однако в ряде работ исследователи использовали половинную концентрацию среды NLN-13 и получали положительный эффект на эмбриогенез капусты листовой, брокколи и репы (Silva Dias da, 2001; Zhang et al., 2008; Na et al., 2011).

1.6.5 Регуляторы роста

Некоторые химические вещества, возникающие естественным образом в тканях растений (т. е. эндогенно), играют не питательную, а регуляторную роль в росте и развитии. Эти соединения, которые обычно активны при очень низких концентрациях, известны как гормоны растений (или вещества роста растений). Синтетические химические вещества, обладающие сходной физиологической активностью с веществами роста растений, или соединения, способные изменять рост растений каким-либо другим способом обычно называют регуляторами роста растений. Некоторые из природных ростовых веществ получают синтетическим путем или с помощью процессов ферментации и могут быть приобретены у поставщиков химикатов. Эти химические вещества добавляются в среду для культивирования тканей растений. Существует несколько признанных классов веществ роста растений. До относительно недавнего времени были признаны только пять групп, а именно: ауксины, цитокинины, гиббереллины, этилен, абсцизовая кислота.

Ауксины и цитокинины, безусловно, наиболее важны для регуляции роста и морфогенеза в культурах тканей и органов растений; в этих классах были открыты синтетические регуляторы с биологической активностью, которая равна или превышает активность эквивалентных природных ростовых веществ. Химических альтернатив природным гиббереллинам или абсцизовой кислоте не существует, но некоторые природные гиббереллины выделены из культивируемых грибов и доступны для использования в качестве экзогенных регуляторов. В последнее двадцатилетие стало ясно, что существует гораздо большее количество классов растительных гормонов, чем ранее признанных пять. Некоторые из них, такие как брассиностероиды, жасмоновая кислота, олигосахариды и системин, уже относительно хорошо описаны, в то время как другие, о существовании которых известно, например, природные аналоги фузикоцина и фитотропины, еще предстоит идентифицировать. Кроме того, стало ясно, что элиситоры и липохитоолигосахариды, полученные от микроорганизмов, должны рассматриваться как регуляторы роста растений, и действительно, оказалось, что растения обладают специфическими рецепторными белками для таких веществ. Более того, теперь ясно, что сахара, такие как глюкоза, о которых обычно думают только с точки зрения их питательной/энергетической роли, действительно взаимодействуют с гормонами и/или их трансдукционными цепями (George et al., 2008).

Наиболее часто в культурах тканей в качестве экзогенных регуляторов роста используют ауксины и цитокинины. Они регулируют многочисленные аспекты развития растений и часто выступают в качестве антагонистической пары гормонов. Один из наиболее ярких примеров антагонизма между ауксином и цитокинином - регуляция соотношения роста побега и корня, при которой цитокинин способствует росту побега и подавляет рост корня, в то время как ауксин делает обратное.

Первые эксперименты по культуре тканей показали, что каллус может быть получен из эксплантов при комбинированной обработке ауксином и цитокинином, и что увеличение соотношения ауксин-цитокинин способствует

развитию корней, тогда как уменьшение соотношения ауксин-цитокинин приводит к образованию побегов (SKOOG, MILLER, 1957). Эти эксперименты, которые сегодня являются краеугольным камнем фундаментальных и прикладных исследований растений, впервые показали, что ауксин является гормоном, стимулирующим рост корней, тогда как цитокинин - стимулятор роста побегов [67]. Последующая работа с мутантными и трансгенными линиями предоставила неоспоримые доказательства того, что ауксин и цитокинин оказывают противоположные эффекты на рост корней и побегов. У трансгенных линий *Arabidopsis* с сильной конститутивной реакцией на ауксин или цитокинин подавляется рост как корней, так и побегов (Li et al., 2009; Kurepa et al., 2014)

Адаптивная регуляция соотношения роста побегов и корней является эволюционно сохраненным механизмом развития наземных растений, который обеспечивает максимальное производство потомства при колебаниях условий окружающей среды. В условиях роста, когда вода и минеральные питательные вещества не являются лимитирующими, предпочтение отдается росту побега, поскольку он воплощает признаки, способствующие репродуктивному успеху и выживанию вида, а развитие корня ограничивается до уровня, достаточного для поддержания развития побега без излишнего истощения фотосинтатов (Lynch et al., 2012). Таким образом, при оптимальных водных и питательных условиях у растений прогнозируется высокое соотношение побегов и корней (Greenwood, 1983; Lynch et al., 2012). Однако, когда доступность воды или минеральных питательных веществ снижается, рост побега - основного места потери воды и потребления минеральных питательных веществ - должен быть уменьшен в пользу роста более крупной корневой системы (Gregory et al., 1984; Chapin III, 1988; Kang, Iersel Van, 2004). Поскольку снижение роста побегов в сочетании с увеличением роста корней приводит к выживанию в условиях стресса засухи и ограничения питательных веществ, неудивительно, что ауксин способствует повышению, а цитокинин снижает устойчивость к стрессу засухи и поглощение питательных веществ. С

другой стороны, цитокинин обычно действует как негативный регулятор поглощения минеральных питательных веществ (Martín et al., 2000; Maruyama-Nakashita et al., 2004; Sakakibara, 2006; Kiba et al., 2011) и при избытке питательных веществ концентрация цитокининов возрастает. Эта регуляция активна только в ответ на избыток питательных веществ, цитокинин предотвращает накопление питательных веществ до чрезмерного и потенциально токсичного уровня (Kiba et al., 2011). Последние данные показывают, что стресс от засухи и доступность питательных веществ также изменяют сигнальные и биосинтетические пути цитокинина и ауксина и что эта вызванная стрессом регуляция влияет на цитокинин и ауксин противоположным образом. Эти антагонистические эффекты цитокинина и ауксина позволили предположить, что каждый гормон напрямую и негативно регулирует биосинтез или сигнализацию другого. Однако растущее число фактов свидетельствует в пользу однонаправленной регуляции, причем основным регуляторным компонентом становится ауксин (Kurepa, Smalle, 2022).

Ингибирующий контроль ауксина на биосинтез цитокинина включает канонический путь ауксинреакции и функционирует в целых растениях и в определенных органах (например, в апикальной меристеме и междоузлиях стебля) (Nordström et al., 2004; Tanaka et al., 2006; Cheng et al., 2013; Kolachevskaya et al., 2017; Zhang et al., 2018). Напротив, цитокинин стимулирует биосинтез ауксина во всем растении (Jones et al., 2010; Moubayidin et al., 2013; Di et al., 2016; Müller et al., 2017). Недавно было показано, что в то время, как ауксин ингибирует сигнализацию цитокинина в органах побега и корня, цитокинин не оказывает негативного влияния на сигнализацию ауксина (Kurepa et al., 2019).

1.6.5 Питательная среда для регенерации

Для регенерации эмбриоидов семейства *Brassicaceae* чаще всего используют среды MS (Murashige, Skoog, 1962); MSm (Masuda et al., 1981) или B5 (Gamborg et al., 1968) с 2–2,5% сахарозой (Kim et al., 2008). Среда также

иногда используют с половинной концентрацией питательных веществ. Питательные среды для регенерации используют совместно с гелеобразователями – агаром или фитогелем. Фитогель значительно дешевле агара, однако в некоторых работах отмечается, что гелеобразователь может влиять на регенерацию тканей в культуре и в недавних исследованиях была показана эффективность регенерации на агаре в сравнении с фитогелем (Debergh, 1983; Сеницына et al., 2021). Помимо типа гелеобразователя, на эффективность регенерации влияет его концентрация (Takahata, Keller, 1991; Wang et al., 2011; Takahashi et al., 2012).

Как правило для регенерации используют безгормональные среды, однако в случае проблем с регенерацией в питательные среды добавляют фитогормоны (Dong et al., 2021). Добавление БАП значительно улучшало регенерацию эмбриоидов таких видов как: китайская капуста (Han et al., 2014), масличный рапс (Charne, Beversdorf, 1988; Gland et al., 1988; Zhang et al., 2006; Ahmadi et al., 2012), декоративная капуста (Zhang et al., 2008) и репа (Takahashi et al., 2012). Так, (Zhang et al., 2006) показали, что использование среды для проращивания $1/2 MS + 2,0 \text{ мг-L-1BAP}$ положительно влияет на формирование проростков масличного рапса. Для регенерации эмбриоидов брокколи рекомендуется добавление в питательную среду MSm 0,1 мг/л БАП или 0,1 мг/л ГК, а затем спустя 2–4 недели образовавшиеся вторичные эмбриоиды переносят на безгормональную среду MS для дальнейшей регенерации (Domblides et al., 2018).

1.6.6 Питательная среда для укоренения

На этапе укоренения используют такие же твердые среды, как и для регенерации на первом этапе: MS; MSm или B5. Среда используют с различными концентрациям сахарозы, половинной или полной концентрацией питательных веществ и с добавлением гормонов роста. В 2000 году была опубликована статья, где исследовалось влияние на регенерацию рапса добавления в питательную среду различных ауксинов и их комбинаций (Yantao Zhu et al., 2000). Результаты показали, что добавление индолил-3-

масляной кислоты (ИМК) 0,5 мг/л оказало лучшее влияние на укоренение, а нафталин уксусная кислота (НУК) 0,5 мг/л и ИМК 0,5 мг/л + НУК 0,5 мг/л - худшее. Ученые из США в 2003 году сообщили, что снижение сахарозы в питательной среде с 3% до 1% и использование половинной среды MS способствовало укоренению трансгенного рапса (Cardoza, Stewart, 2003). Для *Brassica oleracea L. var. Capitata* в 2007 году исследователи из Германии и Сербии для укоренения использовали выращенных на среде MS с 4% сахарозы и 4,0 мг/л ИМК (Sretenović-Rajičić et al., 2007). В 2017 году исследователи из Бангладеш сообщили об успешном укоренении растений *Brassica napus* и *Brassica juncea* на среде с половинной концентрацией MS плюс 1,0 мг л⁻¹ ИМК (Nasrin et al., 2017).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась в лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений ФГБНУ «Федерального центра овощеводства» в 2017–2021 годах.

2.1 Растительный материал

В качестве донорных растений были использованы 42 генотипа редиса европейского отечественной и зарубежной селекции. Из которых отзывчивыми к эмбриогенезу оказались 4 сортообразца: Тепличный Грибовский, Моховский, Розово-красный с белым кончиком (РБК) и Родос. Родос – сортообразец селекции Замен Маузер Кведлинбург, Германия. Остальные сортообразцы селекции «ВНИИССОК», Россия из коллекции лаборатории селекции и семеноводства столовых корнеплодов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО). Во всех опытах использовали сортообразцы Тепличный Грибовский, Моховский, Розово-красный с белым кончиком (РБК) и Родос, если не указано иное.

2.2 Условия выращивания и подготовки растений-доноров

Донорные растения выращивали в вегетационной камере с лампами дополнительного освещения (Osram plantstar 600 Вт) при постоянной температуре 19°C, освещенности 9000 люкс и 16-часовом фотопериоде для стимулирования цветения. Все распустившиеся бутоны цветущих донорных растений, не используемые в работе, удаляли с растения, чтобы не происходило завязывания плодов, поскольку на плодоносящем растении снижается, как количество новых бутонов, так и эмбриогенный потенциал микроспор в бутонах.

2.3 Определение оптимального размера бутона для изоляции микроспор

Подходящий размер бутонов подбирают экспериментально, определяя стадию развития микроспор и пыльцы в бутонах разного размера. Для определения стадии развития микроспор/пыльцы, можно использовать различные методы окраски: окраска ацетокармином, пропионо-лакмоидом, DAPI и др. Мы использовали метод дифференциального окрашивания (Alexander, 1969), поскольку он не требует предварительной фиксации.

Перед окрашиванием мы производили измерение линейного размера бутона. Затем пыльник отделяли от бутона и помещали его в каплю красителя, после чего препаровальными иглами вскрывали пыльник и добивались максимального выхода пыльцевых зёрен и микроспор в каплю красителя, после чего стенки пыльника удаляли из препарата и каплю красителя с пыльцой и микроспорами накрывали покровным стеклом. Препараты окрашенных микроспор и пыльцы просматривали с помощью микроскопа Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Германия).

При окрашивании дифференциальным красителем стерильная пыльца и микроспоры окрашиваются в зеленовато-голубой цвет, фертильные – от розового до интенсивно красного цвета. Основные стадии развития микроспор и пыльцы у капустных культур хорошо изучены и определить их стадию развития можно по их форме.

Для введения в культуру мы отбирали бутоны, в которых относительное содержание микроспор на поздней одноядерной вакуолизированной стадии развития и пыльцы на ранней двухклеточной стадии развития было максимальным. Рекогносцировочную диагностику бутонов проводили для каждого используемого в исследованиях сортообразца, поскольку это генотип специфический параметр.

2.3.1 Определение качественного состава популяции микроспор в различных размерах бутонов

Для данной серии опытов отбирали бутоны с линейным размером от 2.5 до 6мм, разбивая их на группы с шагом 0.5мм. Затем определяли популяционный состав микроспор по стадиям развития с помощью дифференциального окрашивания (Alexander, 1969).

2.4 Предварительная холодовая обработка бутонов

Холодовая обработка бутонов для капустных культур при культивировании микроспор позволяет планировать рабочее время и дает возможность увеличить количество бутонов оптимального размера, собирая их с растения в течение нескольких дней. Бутоны оптимального размера отбирали и помещали на влажную вату в баночки с крышкой в холодильник при температуре 7-10°C на 1–2 суток.

2.5 Культура изолированных микроспор *in vitro*

После холодной обработки бутоны стерилизовали. Поверхностную стерилизацию бутонов проводили в течение 30 с в 70% этаноле, затем 15 мин в 50% водном растворе коммерческого препарата «Белизна», с добавлением Tween-20 (1 капля на 100 мл). Промывку бутонов осуществляли троекратно в течение 10 мин в стерильной дистиллированной воде.

Затем стерильные бутоны погружали в стерильные бюксы с магнитами и охлажденной средой NLN-13 (Lichter, 1982). Бюксы помещали на магнитную

мешалку, чтобы под действием магнита нарушилась целостность бутонов, и микроспоры попали в суспензию.

После получения суспензии с микроспорами ее фильтровали через 40-микронный нейлоновый фильтр в пробирки типа фалькон на 50мл. Затем объем суспензии в пробирках доводили до 20мл охлажденной промывочной средой NLN-13(отличается от среды для культивирования тем, что добавляется сахароза G2 вместо сахарозы G1), после чего пробирки с суспензией центрифугировали в течение 5 мин при 130 g в центрифуге Eppendorf 5804R (Eppendorf, Гамбург, Германия. Супернатант сливали и доводили уровень жидкости до прежнего объема охлажденной промывочной средой NLN-13, pH 5.8, такую процедуру промывки проводили еще два раза. После последнего слива надосадочного раствора в пробирки добавляли среду NLN-13, pH 5.8 для культивирования из расчёта 1 мл среды на 5 бутонов.

В одну чашку Петри диаметром 6 см добавляли по 1 мл суспензии с микроспорами. Количество чашек рассчитывают исходя из количества 5 бутонов на 1 чашку Петри диаметром 6 см.

В среду для культивирования вносили антибиотик ампицилин до конечной концентрации 100 мг/л и разливали среду по стерильным чашкам Петри, в которые предварительно были добавлены три капли активированного угля, растворенного в агарозе и суспензия микроспор. Далее чашки Петри закрывали крышкой и герметизировали эластичной лентой «Parafilm M» или пищевой плёнкой, после чего чашки Петри помещали в темноту в термостат на 32° С для культивирования.

После температурной обработки культуры микроспор в темноте в термостате 1–2 суток (в зависимости от генотипа) при 32 ° С, чашки Петри с микроспорами переносили в термостат без освещения, где поддерживалась контролируемая температура 25°С. Культивирование производили 20–30 дней, пока эмбриониды не достигали семядольной стадии развития.

2.5.1 Влияние качественного состава популяции изолированных микроспор на выход эмбрионидов

Для выявления влияния качественного состава изолированных микроспор на индукции эмбриогенеза, мы провели оценку выхода эмбриоидов в культуре микроспор *in vitro* в зависимости от размера бутона на примере сортообразца Тепличный Грибовский. Для этого изолировали микроспоры из бутонов линейным размером от 2.5 до 6.0мм, разбивая их на группы с шагом 0.5мм на стандартной среде NLN-13 (Lichter, 1982) как указано в п. 2.5. и оценивали выход эмбриоидов на 30-й день культивирования.

2.5.2 Оценка загрязненности препарата микроспор и качественного состава популяции микроспор в препарате в зависимости от способов изоляции микроспор

В качестве донорных растений использовали сортообразец редиса европейского «РБК». Введение микроспор в культуру производили согласно методике, указанной в п. 2.5 с изменением метода изоляции микроспор после стерилизации бутонов и до фильтрации суспензии через фильтры в пробирки для центрифугирования типа фалькон. Использовали бутоны размерами от 2.0 до 4.5 мм с разбиением их по группам с шагом 0.5мм.

Было заложено два независимых опыта в трехкратной повторности. Варианты опытов соответствовали трем применяемым типам изоляции:

- 1) Стандартный способ №1-растирание пестиком: стерильные бутоны погружают в простерилизованную ступку с промывочной питательной средой NLN-13 и растирают стерильным пестиком (Chun et al., 2011).
- 2) Стандартный способ №2-магнитная мешалка: стерильные бутоны погружают в стерильные бюксы с магнитами и промывочной средой NLN-13 (Lichter, 1982). Бюксы помещают на магнитную мешалку на некоторое время. Необходимо чтобы под действием магнита нарушилась целостность бутонов, и микроспоры попали в суспензию (Kozar, Domblydes, 2021).
- 3) Новый способ №3-разрезание: стерильные бутоны разрезаются скальпелем на две части, надрез производится поперёк в середине бутона. Половинки бутонов погружают в стерильные пробирки с круглым дном и промывочной

питательной средой NLN-13. Пробирки с бутонами взбалтывают на Mini-Centrifuge/Vortex FV-2400 Micro-Spin от 1 до 30 секунд.

Сразу после введения микроспор в культуру чашки Петри осматривали с помощью микроскопа Primo Vert, Zeiss и полностью рандомизированно фото фиксировали каждый вариант опыта на камеру AxioCam 305 color, Zeiss в шестикратной повторности.

Оценку загрязненности препарата производили путем подсчета видимых загрязнений (частиц) в шт. и подсчета количества микроспор на полученных фотографиях в программе ScopePhoto 3.1. Загрязненность препарата посторонними частицами оценивали как соотношение примесей в штуках к количеству микроспор в культуре в штуках.

Оценку качественного состава популяции микроспор проводили прямым подсчетом микроспор на разных стадиях развития на полученных фотографиях препаратов в программе ScopePhoto 3.1, ориентируясь на их площадной размер и форму. Для удобства анализа стадии развития микроспор были разбиты на три группы фракций. Наиболее отзывчивые к эмбриогенезу стадии развития – поздняя одноядерная вакуолизирующая стадия и ранняя двухъядерная стадия, были выделены во вторую фракционную группу. В первую фракцию вошли все стадии развития микроспор, соответствующие более раннему развитию микроспор (до одноядерной не вакуолизирующей стадии развития), а в третью фракцию вошли микроспоры на более поздней стадии развития (после ранней двухъядерной стадии развития) по сравнению со второй фракцией.

2.5.3 Оценка выхода эмбриодов в зависимости от способов изоляции микроспор

В качестве донорных растений использовали сортообразец редиса европейского «РБК». Введение микроспор в культуру производили согласно методике, описанной в п. 2.5.2, исключая способ изоляции №1 (в опыте были применены способы изоляции №2 и №3). Культивирование микроспор происходило как указано в п. 2.5. Опыты проводили в трехкратной

повторности в 3 независимых экспериментах. Оценку выхода эмбриодов в зависимости от двух способов изоляции микроспор осуществляли путем подсчета количества эмбриодов на 30-й день культивирования в вариантах опытов со способами изоляции микроспор №2 и №3 при различных размерах бутонов.

2.5.4 Влияние состава питательной среды на индукцию эмбриогенеза в культуре микроспор редиса европейского

Для изучения влияния состава питательной среды на выход эмбриодов использовали методику, описанную в п 2.5, изменяя в вариантах опыта состав питательных сред для индукции эмбриогенеза. Были заложены варианты опытов со следующими питательными средами: NLN-13 (Lichter, 1982); ½-нормы NLN-13 и Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с 13% сахарозой и 500 мг/л гидролизата казеина (Vjurts et al., 2017). Опыты проводились в пятикратной повторности. Выход эмбриодов оценивали на 30-й день культивирования.

2.5.5 Влияние длительности температурной обработки на индукцию эмбриогенеза в культуре микроспор редиса европейского

Введение микроспор в культуру проводили согласно методике, указанной в п 2.5, используя оптимальные среды для индукции эмбриогенеза, определенные в предыдущем опыте и с изменением временной экспозиции температурной обработки культуры микроспор в термостате при 32 ° С. Температурную обработку проводили в течение одних, двух, трех и четырех суток. Исследование проводили для каждого сортообразца в пятикратной повторности.

2.5.6 Эмбриогенез редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro*

Введение микроспор в культуру проводили согласно методике, указанной в п 2.5. В качестве донорных растений использовали сортообразец

редиса европейского «РБК». Наблюдения живой культуру проводили каждые 2-3 дня используя микроскоп Primo vert и камеру AxioCam 305 color, Zeiss.

2.6 Регенерация эмбриоидов

После культивирования эмбриоидов на жидкой среде для индукции эмбриогенеза, эмбриониды на семядольной стадии развития помещали в чашки Петри на среду МС с 2% сахарозой, 1 мг/л бензиламинопурина (БАП), 0,1 мг/л гиббереллиновой кислоты (ГК), 3,0 г/л фитогеля или 7 г/л агара. После образования вторичных эмбриоидов их переносили на безгормональную среду МС, далее в процессе побегообразования побеги с точками роста отделяли друг от друга и переносили в новые пробирки с безгормональной средой МС. Перенос микропобегов на новые питательные среды осуществляли каждые 2–3 недели. Культивирование проводили на стеллажах с люминесцентными лампами при фотопериоде 16/8 часов, освещенности 2500 люкс и постоянной температуре 25°C.

2.6.1 Влияние состава питательной среды для регенерации на эффективность получения микропобегов редиса европейского

Культивирование эмбриоидов и микропобегов производилось согласно п. 2.6 с изменением состава питательной среды для регенерации со следующими вариантами опыта:

- 1) МС с 2% сахарозы и 7 г/л агара;
- 2) МС с 2% сахарозы, 0,1 мг/л БАП и 7 г/л агара;
- 3) МС с 2% сахарозы, 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ГК и 7 г/л агара;
- 4) МС с 2% сахарозы, 0,2 мг/л тиадизурона (N – фенил – N'- (1, 2, 3 – тиадиазол – 5ил) мочевины) (ТДЗ) 7 г/л агара.

В качестве материала использовали ДН-растения редиса европейского полученных из сортообразцов «РБК», «Тепличный Грибовский», «Моховский» и «Родос» - №4

2.7 Укоренение микропобегов редиса европейского в условиях *in vitro*

Для укоренения микропобеги переносили на твердую безгормональную среду MS с 2% сахарозой и 7 г/л агара. Культивирование проводили на стеллажах с люминесцентными лампами при фотопериоде 16/8 часов, освещенности 2500 люкс и постоянной температуре 25°C.

2.7.1 Укоренение микропобегов редиса европейского при использовании стандартного протокола ИМС технологии для семейства *Brassicaceae*

Укоренение микропобегов редиса европейского осуществляли согласно п. 2.7. В качестве материала использовали ДН-линии редиса европейского полученных из сортообразцов «РБК» - № 1,2, «Тепличный Грибовский» - № 3 и «Родос» - №4 и другие ДН-линии редиса европейского, полученные с помощью ИМС технологии.

2.7.1 Влияние на ризогенез микропобегов редиса европейского добавления гормонов роста в питательную среду для регенерации

Укоренение микропобегов редиса европейского осуществляли согласно п. 2.7 с изменением состава питательной среды для укоренения согласно следующим вариантам опыта:

- 1) MS с 2% сахарозы, 7 г/л агара
- 2) MS с 2% сахарозы, 7 г/л агара + 0,5 мг/л ИУК
- 3) MS с 2% сахарозы, 7 г/л агара + 1 мг/л ИУК
- 4) MS с 2% сахарозы, 7 г/л агара + 2 мг/л ИУК
- 5) MS с 2% сахарозы, 7 г/л агара + 0,5 мг/л ИМК
- 6) MS с 2% сахарозы, 7 г/л агара + 1 мг/л ИМК
- 7) MS с 2% сахарозы, 7 г/л агара + 2 мг/л ИМК

2.7.2 Влияния различных техник пересадки микропобегов редиса европейского на эффективность ризогенеза при культивировании на твердой безгормональной среде МС

Укоренение микропобегов редиса европейского осуществляли согласно п. 2.7 с использованием трех техник пересадки:

- 1) Посадка микропобегов с погружением их базальной части на 2–3 мм в среду
- 2) Посадка микропобегов в лунку, сделанную в питательной среде с помощью пинцета в стерильных условиях
- 3) Посадка микропобегов на поверхность питательной среды без заглабления

В качестве материала использовали три ДН-линии редиса европейского полученных из сортообразцов «РБК» - № 1,2 и «Теаличный Грибовский» - № 3, у которых наблюдалось интенсивное побегообразование, что позволило размножить микропобеги этих линий в необходимом для эксперимента количестве. Для каждого варианта эксперимента было взято по 10 микропобегов каждой ДН-линии. Эксперимент проводился в трех повторах, пролонгированных во времени (осень, зима, весна).

2.7.3 Влияние последовательных пересадок микропобегов редиса европейского с иссечением корнеплодоподобных структура в области гипокотилия при культивировании на твердой безгормональной среде МС

Для этой серии опытов в качестве материала использовали микропобеги редиса европейского с аномальным развитием гипокотилия, которые не удалось укоренить в результате предыдущей серии опытов. Культивирование микропобегов проводили согласно п. 2.7 с предварительным частичным или полным иссечением корнеплодоподобных структур, оставляя 1–2 мм базальной части микропобегов ниже точки роста и помещая микропобеги в культуральные сосуды на поверхность питательной среды без заглабления (п. 2.7.2). При повторном разрастании гипокотилия манипуляцию по иссечению аномальной структуры повторяли. Количество пересадок варьировало от одной до шести, в зависимости от индивидуального

микробога (если после шестой пересадки образование аномальных структур повторялось, то такие микробоги классифицировались как не реагирующие на корнеобразование и исключались из работы).

2.7.4 Изучение эффективности ризогенеза микробога редиса европейского при культивировании на жидкой питательной среде с последовательными пересадками с иссечением корнеплодоподобных структура в области гипокотила

В экспериментах по изучению корнеобразования на жидкой среде использовали питательную среду МСм (Masuda et al., 1981) с добавлением 0,1 мг/л кинетина и 2% сахарозой. Культивирование проводили в пробирках высотой 20 см и диаметром 2 см на мостиках из фильтровальной бумаги, помещенных в 10 мл среды и закрытых крышкой из фольги. В качестве материала использовали четыре ДН-линии редиса европейского полученных из сортообразцов «РБК» - № 1,2, «Тепличный Грибовский» - № 3 и «Родос» - №4. Культивирование проводили на стеллажах с люминесцентными лампами при фотопериоде 16/8 часов, освещенности 2500 люкс и постоянной температуре 25°C.

2.12 Укоренение растений-регенерантов редиса европейского в условиях *in vivo*

Растения с нормально развитыми листьями и корневой системой *in vitro* переносили в вегетационные сосуды, заполненные смесью торфа и перлита (7:3) и накрытые перфорированными пластиковыми стаканчиками для адаптации растений к условиям *in vivo*. После появления двух-трех настоящих листьев стаканчики удаляли. Регенерированные растения выращивали в вегетационной камере при постоянной температуре 23°C, освещенности 8000 люкс и 16-часовом световом периоде. После начала цветения растения помещали под индивидуальные изоляторы. Проводили опыление в бутонах для получения потомства от ДН растений.

2.13 Определение ploидности растений-регенерантов

2.13.1 Определение ploидности растений-регенерантов методом проточной цитометрии клеточных ядер

Относительное содержание ДНК определяли при помощи техник проточной цитометрии с использованием иодида пропидия. Для исследования использовали свежие молодые листья растений-регенерантов, полученных в культуре микроспор *in vitro*. Листья измельчали при помощи лезвия в 1 мл Tris-MgCl₂ буфера [84] с изменениями следующего состава: 0,2 М Tris основание, 4 мМ MgCl₂, 0,5 % Triton X-100, 50 мкг/мл РНазы, 0,5 % поливинилпирролидон К15, 50 мкг/мл иодида пропидия, рН 7,5). Данные флюоресценции изолированных ядер детектировали при помощи проточного цитометра Partec CyFlow PA (Partec, GmbH) с лазерным источником излучения с длиной волны 532 нм. Визуализацию и обработку гистограмм проводили в программном обеспечении Flowing Software 2.5.1. (University of Turku, Finland). Статистические данные рассчитывали в программе XLStat (Addinsoft).

Для определения ploидности и содержания ДНК в качестве внешнего стандарта использовали диплоидные образцы.

Pлоидность определяли по индексу разницы между пиками диплоидного стандарта того же вида и образца:

Индекс = Среднее пика Образца / Среднее пика Стандарта

Содержание ДНК (2С, пг) рассчитывали по формуле:

2С, пг = (Среднее пика Образца / Среднее пика Стандарта) * 2С Стандарта

2.13.2 Определение ploидности растений-регенерантов методом подсчета числа хромосом с использованием пропионо-лакмоидного метода окраски

Данный метод был применен для проверки достоверности результатов, полученных с помощью проточной цитометрии клеточных ядер. Для этого были взяты образцы растений-регенерантов, которые были определены как диплоиды и гаплоиды.

Цитологическое исследование проводили путем приготовления давленных препаратов кончиков корней растений растений-регенерантов (Соловьева, 1982). При использовании данного метода фиксация материала (в пропионовой кислоте) и окрашивание (лакмоидом) происходит одновременно в стандартном растворе пропионо-лакмоида в течение 24 часов, что положительно влияет на качество приготовления препаратов. Мацерацию производили путём кипячения окрашенных меристем мелких корней – 20–30 с момента закипания в термостойкой пробирке над спиртовкой в 40%-ной пропионовой кислоте. После этого давали материалу остыть 1–3 минуты (и больше) после чего его раздавливали в капле 40%-ной пропионовой кислоты. Для этого покровное стекло 3-5 накрывали полосками фильтровальной бумаги, прижав её по краям покровного стекла. Плоским концом деревянной ручки препаровальной иглы, очень сильно надавливая, «проглаживали» всю поверхность покровного стекла по горизонтали и вертикали. Препараты просматривали с помощью микроскопа Zeiss Scope.A1, оснащенного камерой Digital Camera Power Shot G10 Canon. Обработку изображений проводили с помощью программы Axio Vision, версия 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany).

2.13.3 Определение плоидности растений-регенерантов методом подсчета числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц

Этот косвенный метод определения плоидности растений-регенерантов использовали, когда не было возможности применить методы, описанные 2.12.1 и 2.12.2

Эпидермальный слой клеток снимали с нижней стороны листьев, промывали в дистиллированной воде и помещали на предметное стекло в каплю воды, накрывали сверху покровным стеклом и просматривали под микроскопом с флуоресценцией. Подсчет хлоропластов производили ее менее ем в 10 парах устьичных клеток.

2.14 Статистическая обработка

Обработку экспериментальных данных проводили с использованием общепринятых математико-статистических методов с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel и Statistika 6.0

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Культура изолированных микроспор *in vitro* редиса европейского

Общие этапы прохождения полного цикла ДН-технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro* принципиально не отличаются от аналогичных протоколов, предложенных для других видов семейства *Brassicacea* и схематично представлены на рисунке 1. Но, как показали наши исследования на ряде этапов у данного вида есть существенные отличия, специфика которых во многом и влияет на низкую отзывчивость к эмбриогенезу.



Рисунок 1 - Полный цикл получения удвоенных гаплоидов редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro*, на примере сортообразца РБК (Розово-красный с белым кончиком)

3.1.1 Определение качественного состава популяции микроспор в бутонах различного размера

В таблице 2 представлены результаты анализа процентного содержания (доли) микроспор на восприимчивой стадии развития (на поздней вакуолизированной одноклеточной и ранней двухклеточной стадиях

развития). в бутонах разных размеров у четырех генотипов редиса, проявивших отзывчивость к эмбриогенезу.

Таблица 2 - Зависимость между длиной бутона редиса европейского и содержанием в них восприимчивых к эмбриогенезу микроспор (на поздней одноклеточной вакуолизированной и ранней двухклеточной стадиях развития)

Генотип	Доля микроспор на поздней одноклеточной вакуолизированной и ранней двухклеточной стадиях развития в бутонах разной длины, %						
	2.5–3.0 мм	3.0–3.5 мм	3.5–4.0 мм	4.0–4.5 мм	4.5–5.0 мм	5.0–5.5 мм	5.5–6.0 мм
Родос	38.2±5.6ab	43.7±4.8a	25.1±3.2b	17.3±2.1c	15.8±3.4c	12.6±4.2d	10.4±5.1d
Тепличный Грибовский	29.8±2.3c	38.2±5.1b	46.8±4.0a	40.5±2.7b	27.2±3.5c	21.4±6.2cd	18.5±3.9d
Моховский	28.1±4.2b	51.2±2.4a	30.3±3.7b	25.2±3. b	19.9±2.7c	18.7±1.9c	18.9±3.2c
РБК	29.1±3.3b	44.2±2.9a	43.7±3.1a	28.6±4.6b	20.1±3.8cd	17.6±4.1d	16.8±3.7d

В таблице приведены средние \pm Sd. Варианты, отмеченные одной и той же буквой (сравнение доли микроспор на восприимчивых к эмбриогенезу стадиях развития в зависимости от размера бутона в пределах одного генотипа), не имеют значимых различий с вероятностью 95% согласно тесту множественного ряда Дункана (MRT).

Исследования показали, что структура популяции микроспор в пыльниках бутонов редиса европейского очень неоднородна и представлена фракциями микроспор на разных стадиях развития в одном бутоне.

Выявлено, что процент восприимчивых микроспор в бутонах редиса редко достигает 50%. Для сравнения, в бутонах отзывчивых культур, показатели доли таких микроспор достигают 80%, например у *B. oleracea var. capitata* L. При этом отмечено, что оптимальные размеры бутонов с точки зрения отзывчивости микроспор к индукции эмбриогенеза в культуре *in vitro* у разных генотипов редиса существенно отличаются. В результате для каждого изученного генотипа редиса европейского был подобран оптимальный размер бутонов для индукции эмбриогенеза в культуре микроспор *in vitro*.

3.1.2 Влияние качественного состава популяции изолированных микроспор на выход эмбрионов

Для выявления значимости качественного состава изолированных микроспор для индукции эмбриогенеза, провели оценку выхода эмбриоидов в культуре микроспор *in vitro*, изолируя микроспоры из бутонов различных размеров на примере сортообразца Тепличный Грибовский (Рисунок 2).

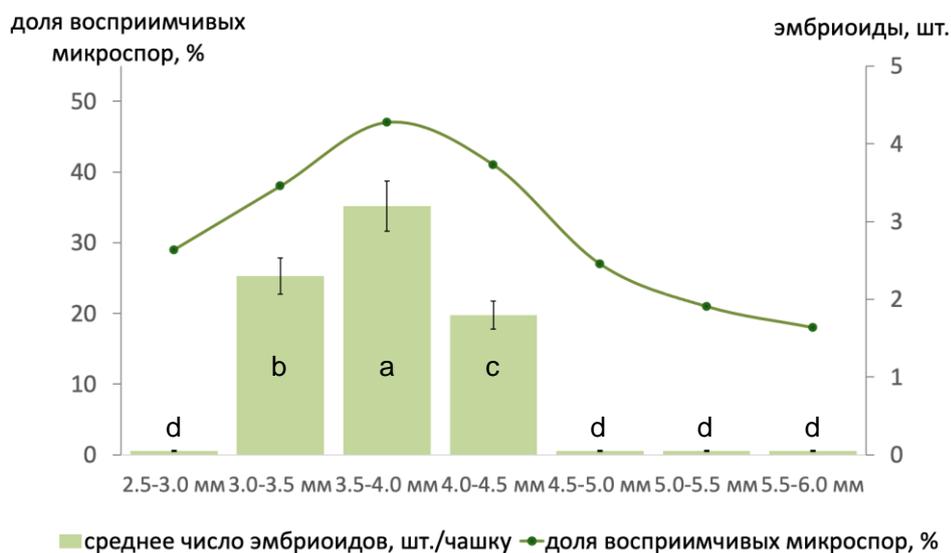


Рисунок 2 - Зависимость выхода эмбриоидов от размера бутона и процентного содержания микроспор на восприимчивой стадии развития сортообразца редиса европейского Тепличный Грибовский. Столбчатая диаграмма построена по средним с варьированием по повторностям. Столбцы диаграммы с одинаковой буквой (сравнение выхода эмбриоидов в зависимости от размера бутона) достоверно не различаются с вероятностью 95% согласно тесту множественного ряда Дункана (MRT).

Таким образом, в результате проведенного опыта было подтверждено, что при размерах бутонов, в которых содержится наибольший процент микроспор на восприимчивой стадии развития к индукции эмбриогенеза (в среднем 44–51% в зависимости от генотипа) выход эмбриоидов максимален. При изменении процентной доли содержания восприимчивых микроспор на 6–8% наблюдается резкое снижение выхода эмбриоидов, причем при падении доли содержания восприимчивых микроспор ниже 30%, не зависимо от размера бутонов, образование эмбриоидов не происходит. Аналогичные результаты были получены и для других сортообразцов редиса (данные не показаны).

3.1.3 Оценка загрязненности препарата микроспор и качественного состава популяции микроспор в препарате в зависимости от способов изоляции микроспор

В процессе работы с культурой изолированных микроспор редиса европейского мы заметили, что в препаратах помимо микроспор присутствуют различные включения. Чистота препарата оказывает значительное влияние на эффективность эмбриогенеза, так как посторонние примеси могут быть токсичны. Кроме того, в предыдущих опытах было показано, что микроспоры в бутонах редиса европейского созревают очень неравномерно, что уменьшает относительную концентрацию микроспор на отзывчивых к эмбриогенезу стадиях развития в препарате. Ввиду этих причин была необходимость в модификации метода изоляции микроспор с целью повышения чистоты препарата и относительного содержания потенциально эмбриогенных микроспор в препарате. На рисунке 3 представлены фотографии препаратов редиса европейского «РБК» при способах изоляции №2 и №3, где видно, что помимо микроспор в препарате присутствуют видимые посторонние частицы.

В качестве модификации этапа изоляции был предложен способ, основанный на индивидуальном препарировании бутонов скальпелем с последующей экстракцией микроспор из половинок бутонов путем их взбалтывания на вортексе в пробирках с промывочной питательной средой NLN-13, как указано в разделе материалы и метода в п. 2.5.2. Данный способ изоляции сравнивали с двумя стандартными способами изоляции микроспор. В таблице 3 представлены результаты оценки чистоты препарата микроспор в зависимости от метода изоляции и размера бутонов и доли влияния этих факторов и их взаимодействия на чистоту препарата.

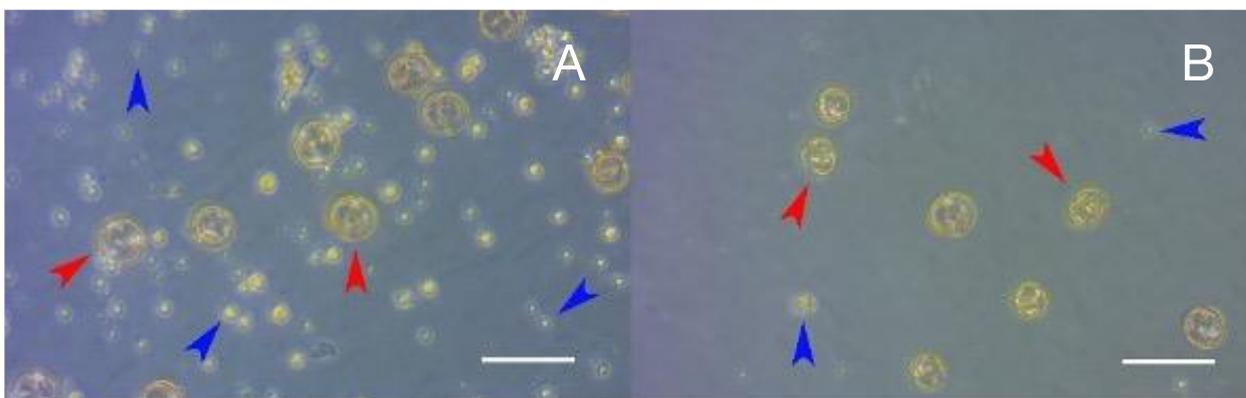


Рисунок 3 - Препараты редиса европейского «РБК» сразу после введения в культуру (А, Б) при различных способах изоляции на первый день культивирования. А-способ изоляции №2; Б-способ изоляции №3. Красными стрелочками показаны микроспоры; синими стрелочками показаны посторонние примеси (частицы). Размер линейки =50мкм.

Таблица 3 - Загрязнение мусором препаратов культуры микроспор редиса европейского «РБК» в зависимости от способа изоляции микроспор и линейного размера бутонов на первый день культивирования

Размер бутона, мм	Коэффициент соотношения мусора в шт. к микроспорам в шт. в препарате			Two-way ANOVA факторы/ Доля влияния фактора, %
	Способ изоляции №3	Способ изоляции №2	Способ изоляции №1	
2.0-2.5	0.59 a/B	11.45 a/A	13.60 b/A	размер бутона ***/ 9% способ изоляции***/ 64%
2.5-3.0	0.28 a/C	3.95 c/B	16.31 b/A	
3.0-3.5	0.38 a/C	6.40 bc/B	40.47 a/A	размер бутона x способ изоляции ***/ 25%
3.5-4.0	0.46 a/B	3.72 c/B	35.33 a/A	
4.0-4.5	0.52 a/C	8.30 ab/B	12.06 b/A	случайные факторы/ 2%

Значения в таблице являются средними; *, ** и ***: значимы на 5%, 1% и 0,1% уровнях вероятности, соответственно, ns: не значимы. Значения с одинаковой маленькой буквой в столбцах (сравнение между всеми размерами бутонов в рамках одного метода изоляции) и заглавной буквой в строках (сравнение между всеми методами изоляции в рамках одного размера бутона) достоверно не различаются с вероятностью 95% согласно тесту множественного ряда Дункана (MRT). Долю влияния факторов рассчитывали, как отношение SS каждого фактора к общей SS.

Было показано, что при растирании пестиком (способ изоляции №1) препарат был наиболее загрязнённым; коэффициент загрязнения составил 12,06–40,47. При использовании магнитной мешалки (способ №2) препарат показал промежуточные значения степени загрязнения; коэффициент загрязнения составил 3,72–11,45. При разрезании (способ №3) бутонов скальпелем препарат был наиболее чистым; коэффициент загрязнения 0,28–0,58, что примерно в 15 раз чище, чем препарат, подготовленный с использованием второго способа изоляции. Разница коэффициентов

загрязнения препарата в зависимости от способа изоляции микроспор, размера бутонов и взаимодействия этих факторов была достоверной. Доли влияния способа изоляции, размера бутона и их взаимодействия составили 64, 9 и 25% соответственно. Таким образом наибольшее влияние на загрязненность препарата оказывается способ изоляции микроспор.

Оценка популяционного состава микроспор в зависимости от способа изоляции микроспор и размера бутонов представлена на рисунке 4.

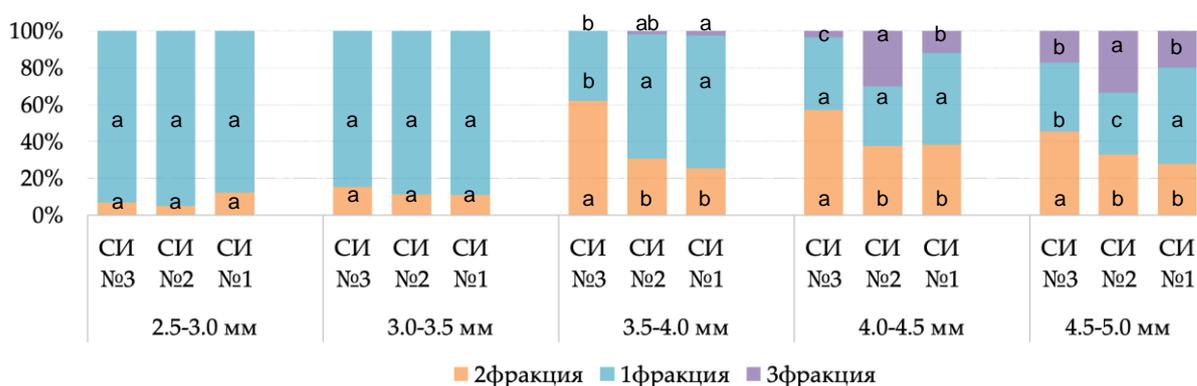


Рисунок 4 - Соотношение различных фракций в популяции микроспор редиса европейского «РБК» в зависимости от размера бутонов и способа изоляции:

1 фракция - очень ранние стадии развития; 2 фракция - оптимальные для индукции эмбриогенеза стадии развития; 3 фракция - поздние стадии развития. СИ-способ изоляции. Участки диаграммы с одинаковой буквой (сопоставление процентного соотношения долей в популяции микроспор в пределах одной фракции (одного цвета) и одного размера бутона) существенно не различаются с вероятностью 95% согласно тесту множественных диапазонов Дункана (MRT).

Относительная концентрация микроспор второй фракции (поздняя одноядерная вакуолизированная и ранняя двухъядерная стадии развития) у редиса европейского «РБК» максимально достигала 61,9% - при размере бутона 3,0–3,5 мм при способе изоляции №3, 34% при размере бутона 3,5–4,0мм при способе изоляции №2 и 38,2% при размере бутона 3,5–4,0мм при способе изоляции №1. В культуре редиса европейского третий способ изоляции повысил концентрацию второй фракции на 27,9% по сравнению со вторым способом. Причем концентрация второй фракции при третьей изоляции была выше на диапазоне бутонов 3,0–4,5мм, чем во всех размерах бутонов при изоляциях №1 и №2.

Таким образом третий способ изоляции микроспор повысил чистоту и относительную концентрацию микроспор на отзывчивой к эмбриогенезу стадии развития. Мы полагаем, что эффект повышения чистоты препарата при третьем способе изоляции обеспечивается за счет уменьшения механического воздействия на ткани бутонов в сравнении со способами изоляции №1 и №2. Это уменьшает разрушение соматических клеток и тканей бутона/пыльников и попадание их элементов в препарат. Относительное содержание микроспор на восприимчивой к эмбриогенезу стадии развития увеличивается за счет того, что в новом способе изоляции пыльники не измельчаются и сохраняют свою структуру, которая, по-видимому, играет роль «сита» и более крупные по размеру фракции микроспор (тетрады и зрелая пыльца) задерживаются в тканях пыльника. Помимо увеличения концентрации отзывчивых микроспор, эффект «сита» из структур пыльника позволяет пролонгировать диапазон подходящих для введения в культуру линейных размеров бутонов, что облегчает задачу отбора бутонов и вероятность попадания в «нужный» размер. В совокупности это говорит о том, что способ изоляции микроспор №3 потенциально способен увеличить эффективность получения эмбриоидов в культуре микроспор *in vitro* редиса европейского, что и было проверено в следующем опыте.

3.1.4 Оценка выхода эмбриоидов в зависимости от способов изоляции микроспор

Конечной целью всех исследований в области ИМС технологии является повышение ее эффективности. Поэтому в данной серии опытов мы оценивали главный параметр, который важен для практического применения технологии – урожайность эмбриоидов в зависимости от способа изоляции микроспор. Мы применяли способы изоляции микроспор №2 и №3, так как они показали лучшие результаты согласно серии опытов 3.3.

В результате проведенных опытов сортобразец редиса европейского «РБК» показал чувствительность к способу изоляции. В таблице 4 представлены результаты опыта по оценке урожайности эмбриоидов в

зависимости от способа изоляции и размера бутон (в размере бутон 2.0–3.0мм получить эмбриониды не удалось).

Таблица 4 - Урожайность эмбрионидов редиса Европейского «РБК» на 30-й день культуры в зависимости от способа изоляции и линейного размера бутон

Размер бутон, мм	Способ изоляции №2	Способ изоляции №3	Two-way ANOVA факторы/ Доля влияния фактора, %
3.0-3.5	0.3 a/B	7.0 a/A	размер бутон ^{ns} / 17%
3.5-4.0	2.7 a/A	3.3 ab/A	способ изоляции **/ 23%
4.0-4.5	0.7 a/A	1.3 b/A	размер бутон x способ изоляции **/ 26%
			случайные факторы / 34%

Значения в таблице являются средними; *, ** и ***: значимы на 5%, 1% и 0,1% уровнях вероятности, соответственно, ns: не значимы. Значения с одинаковой маленькой буквой в столбцах (сравнение между всеми размерами бутон в рамках одного метода изоляции) и заглавной буквой в строках (сравнение между всеми методами изоляции в рамках одного размера бутон) достоверно не различаются с вероятностью 95% согласно тесту множественного ряда Дункана (MRT). Долю влияния факторов рассчитывали, как отношение SS каждого фактора к общей SS.

Разница между урожайностью эмбрионидов в зависимости от способа изоляции микроспор, размера бутон и взаимодействия этих факторов была статистически достоверной при $p < 0,05$. Урожайность эмбрионидов на чашку Петри увеличилась примерно в 2,6 раза при способе изоляции №3 ($7 \pm 2,6$) по сравнению со способом изоляции №2 ($2,7 \pm 1,41$). Интересно, что при способе изоляции №3 лучшие показатели урожайности сместились в сторону меньшего размера бутон – 3.0–3.5мм, по сравнению с лучшим размером бутон – 3.5–4.0мм для способа изоляции №2. Эти результаты коррелируют с данными опыта 3.3, где максимальная доля восприимчивой фракции микроспор к эмбриогенезу при способе изоляции №3 содержалась в бутонх размером 3.0–3.5мм, а при втором способе изоляции в бутонх размером 3.5–4.0мм.

Доли влияния факторов метода изоляции, размера бутон и их взаимодействия, а также случайных факторов на урожайность эмбрионидов редиса европейского «РБК» составила 23, 17, 26 и 34% соответственно. Мы полагаем, что высокая доля влияния случайных факторов сопряжена с неравномерным развитием микроспор в бутонх редиса европейского и слабой

эмбриогенной отзывчивостью микроспор этой культуры в целом, однако доля влияния метода изоляции -23% также существенна.

В совокупности улучшение параметров чистоты препарата и содержания восприимчивых микроспор в культуре (п. 3.3) привело к повышению урожайности эмбриоидов редиса европейского «РБК» в 2,6 раза при изоляции номер №3 в сравнении с изоляцией № 2. В данном случае это очень значительный эффект, поскольку у редиса европейского очень низкий уровень урожайности эмбриоидов и любое ее повышение имеет большое значение для практической селекции. Таким образом было показано, что эффективность ИМС технологии можно повысить за счет модификации метода изоляции микроспор.

3.1.5 Влияние состава питательной среды на индукцию эмбриогенеза в культуре микроспор *in vitro* редиса европейского

Состав питательной среды для индукции эмбриогенеза оказывает большое влияние на эффективность ИМС технологии. Питательных среды для опытов мы подбирали на основе литературных данных, так для индукции эмбриогенеза растений семейства *Brassicaceae* обычно используются среды NLN-13 (Lichter, 1982; Chun et al., 2011; Han et al., 2014) или 1/2 NLN-13 (Takahata et al., 1996; Tuncer, 2017; Han et al., 2018) в состав которых входят аминокислоты глутамин и серин, оказывающие положительное влияние на эмбриогенез. Также известно, что большую роль в стимуляции соматического эмбриогенеза в суспензионной культуре играет гидролизат казеина, который представляет собой смесь различных аминокислот и используется в питательных средах для моркови столовой (Masuda et al., 1981; Vjurtts et al., 2017). Ввиду чего мы решили впервые применить среду МС с добавлением гидролизата казеина в культуре микроспор *in vitro* для редиса европейского.

В наших экспериментах ни у одного из изученных генотипов при использовании среды ½-нормы NLN-13 эмбриоидов не образовалось, поэтому в последующих экспериментах данная среда не применялась. При инкубировании микроспор редиса на стандартной среде NLN-13 и МС с

гидролизатом казеина процесс эмбриогенеза удалось индуцировать у четырех сортообразцов (Таблица 5).

Было показано, что доля влияния взаимодействия факторов «генотип * состав питательной среды» составила более 50%, что свидетельствует о высокой генотипспецифичности культуры редиса к составу питательной среды для индукции (Рисунок 5).

Таблица 5 - Влияние состава питательных сред на эмбриогенез (выход эмбриоидов) в культуре микроспор у разных генотипов редиса европейского

Генотип (сортообразец)	NLN-13		МС+500мг/л гидролизат казеина	
	Среднее число эмбриоидов, шт./1 чашку Петри	Макс-ое число эмбриоидов, шт./1 чашку Петри	Среднее число эмбриоидов, шт./1 чашку Петри	Макс-ое число эмбриоидов, шт./1 чашку Петри
Родос	0 b	0	3.8±0.6 a	6
Тепличный Грибовский	2.4±0.5 b	4	4.6±1.0 a	8
Моховский	1.8±0.4 a	3	1.0±0.3 a	2
РБК	4.4±1.0 a	8	0 b	0

В таблице приведены средние ± Sd. Варианты, отмеченные одной и той же буквой (сравнение выхода эмбриоидов в зависимости от среды для индукции эмбриогенеза), не имеют значимых различий с вероятностью 95% согласно тесту множественного ряда Дункана (MRT). Достоверность отличий: фактор А (сорт) - Fфакт 4.2 > Fтеор 2.9; фактор В (среда) - Fфакт 0.2 < Fтеор 4.1; взаимодействие АхВ - Fфакт 17.1 > Fтеор 2.9, при p < 0.05

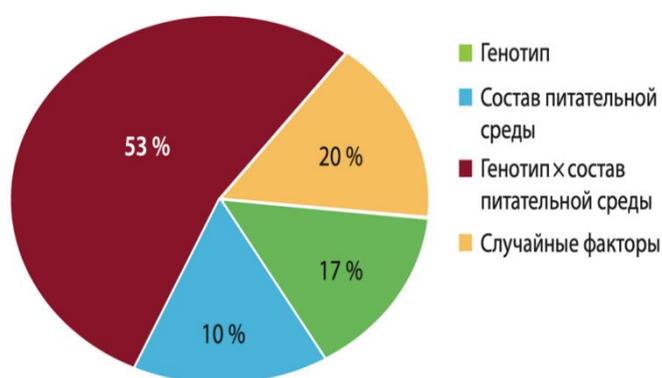


Рисунок 5 - Доли влияния факторов «генотип», «состав питательной среды» и их взаимодействия на процесс индукции эмбриогенеза редиса европейского в культуре микроспор *in vitro*.

Расчёт долей влияния факторов производился по данным SS two-way ANOVA.

Так, у сортообразца Родос получить эмбриониды на стандартной среде NLN-13 не удалось, а на среде МС с гидролизатом казеина их выход составил до шести эмбрионидов на чашку Петри, для сортообразца Тепличный Грибовский эта среда так же оказалась более подходящей - максимальный выход эмбрионидов составил восемь эмбрионидов на чашку Петри. Для сортообразцов Моховский и РБК лучшие результаты были получены на стандартной среде NLN-13, и максимальный выход достиг трех и восьми эмбрионидов на чашку Петри соответственно. Таким образом, требуется тестирование обеих сред для индукции при введении новых сортообразцов редиса европейского в культуру изолированных микроспор *in vitro*.

3.1.6 Влияние длительности температурной обработки на индукцию эмбриогенеза в культуре микроспор редиса европейского

Для инициации процесса переключения микроспор с гаметофитного пути развития на спорофитный необходимо оказать стрессовое воздействие высокой температурой, без которого изолированные микроспоры либо останавливаются в своем развитии и погибают, либо продолжают развиваться по гаметофитному пути. Температурный стресс применяется на стадии, предшествующей первому гаплоидному митозу или во время него, что, как правило, происходит в первые восемь часов после введения микроспор в культуру, поэтому они являются критическими. Подбирая оптимальный режим для каждого индивидуального образца, было проанализировано влияние температурной обработки на эмбриогенез изолированных микроспор в термостате при 32°C в течение одних — четырех суток сразу после введения микроспор в культуру (Рисунок 6).

Было показано, что для сортообразцов Родос, Моховский и РБК оптимальна обработка в течение двух суток, и только для сортообразца Тепличный Грибовский -одни сутки. Инкубация эмбрионидов в течение трех суток приводила к замедлению скорости развития эмбрионидов у сортообразца РБК, и полному их отсутствию у остальных сортообразцов. При увеличении

времени температурной обработки до 4 суток образование эмбрионов не происходило ни у одного генотипа.

Доля влияния эффекта длительности термообработки (фактор В) на выход эмбрионов была составила 48%, доля влияния генотипа составила 9%, а доля взаимодействия этих факторов - 25%, что говорит о необходимости тестирования различных временных экспозиций температурной обработки для новых сортообразцов редиса европейского (Рисунок 7).

На рисунке 8, на примере сортообразца редиса европейского «Розово-красный с белым кончиком» (РБК), представлены наиболее наглядные результаты формирования эмбрионов внутри одного сортообразца в культуре микроспор *in vitro*, в зависимости от продолжительности температурного стресса.

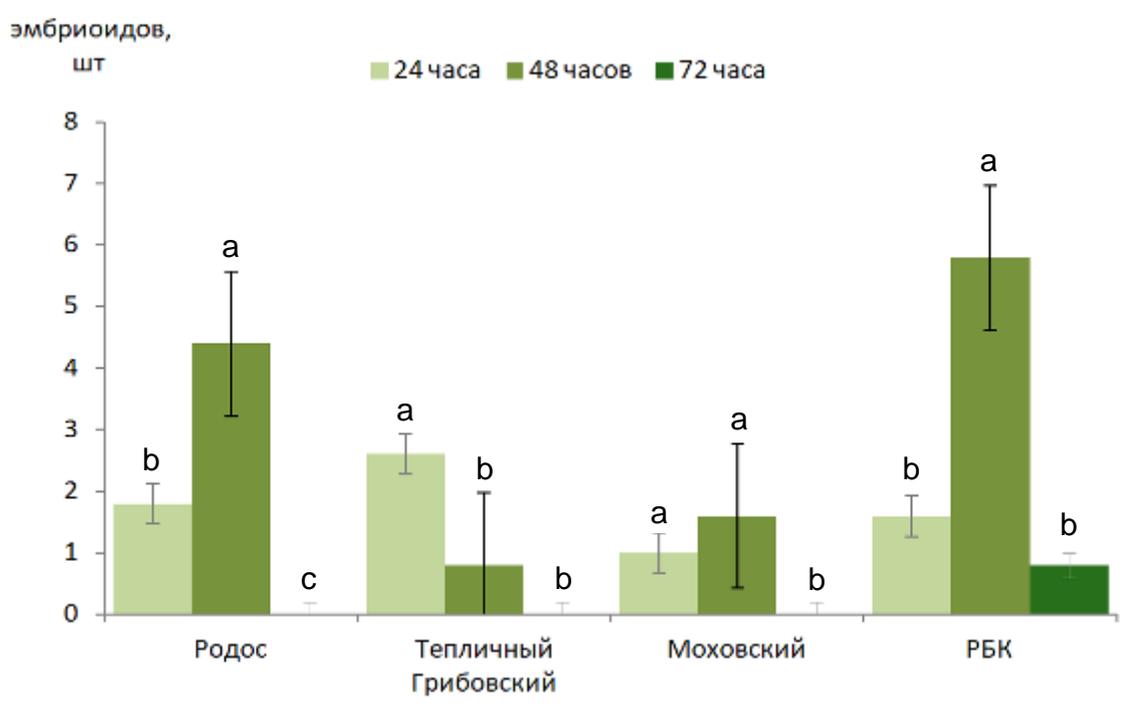


Рисунок 6 - Влияние длительности термообработки изолированных микроспор в термостате при 32°C на образование эмбрионов (шт./чашку Петри) в культуре микроспор у разных генотипов редиса европейского. Столбцы диаграммы с одинаковой буквой (сравнение выхода эмбрионов в зависимости от размера бутона в пределах одного генотипа) достоверно не различаются с вероятностью 95% согласно тесту множественного ряда Дункана (MRT).

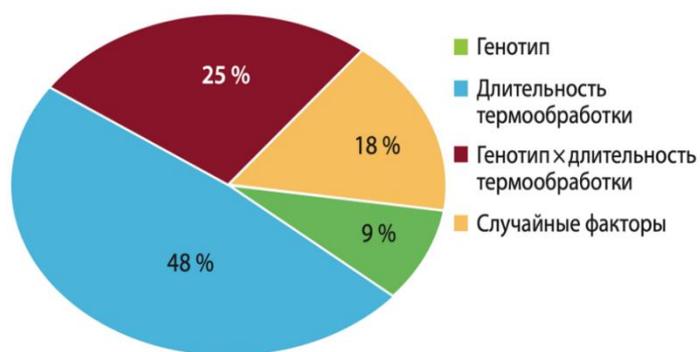


Рисунок 7 - Доли влияния факторов «генотип», «экспозиции термообработки» и их взаимодействия на процесс индукции эмбриогенеза редиса европейского в культуре микропор *in vitro*.

Расчёт долей влияния факторов производился по данным SS two-way ANOVA.

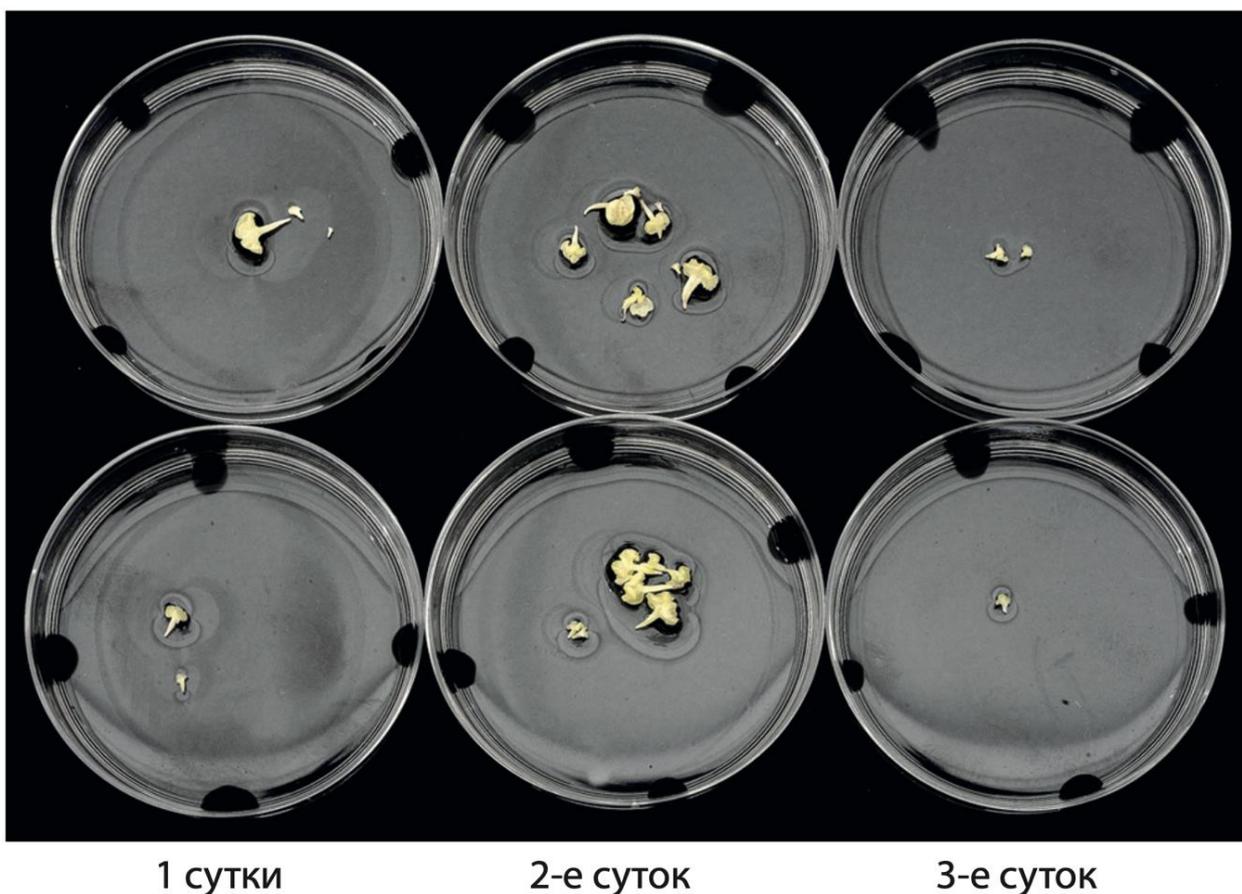


Рисунок 8 - Влияние длительности термообработки изолированных микроспор в термостате при 32°C на эмбриогенез (выход эмбриоидов) в культуре микроспор у сортообразца редиса европейского РБК на среде NLN-13

В данном варианте при обработке в течение одних суток максимальный выход достигал трех эмбриоидов на чашку Петри, выход эмбриоидов при экспозиции двое суток составил до восьми хорошо развитых эмбриоидов, а в течение трех суток – до двух слаборазвитых эмбриоидов на чашку Петри.

В целом, в результате эксперимента удалось выяснить, что оптимальная температурная обработка для редиса европейского составляет 1–2 суток в зависимости от генотипа.

3.1.7 Эмбриогенез редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro*

Целью исследования было изучить пути основных этапов и биологические особенности эмбриогенеза редиса европейского в изолированной культуре микроспор *in vitro* с первого дня до семядольной стадии развития эмбрионов, когда он готов к переносу на твердую среду для регенерации.

Редис европейский сложная культура для ИМС технологии, разработанный протокол для этой культуры все еще не является высокоэффективным и позволяет получить не более восьми эмбрионов на чашку Петри (Kozar et al., 2020). По этой причине каждый эмбрион представляет большую ценность, и чтобы не нарушить их развитие, мы наблюдали за формированием эмбрионов только в живой культуре. Наблюдения в живой жидкой культуре не могут дать много информации, но мы использовали именно ее, поскольку не могли расходовать любую из полученных эмбриогенных структур на фиксированные препараты, так как это требует умерщвления структур. В том числе мы не могли наблюдать за индивидуальным развитием каждой структуры, поскольку это требует введения в метод элементов, снижающих выход эмбрионов. Со второго дня после инокуляции мы наблюдали первые деления микроспор (Рисунок 9А).

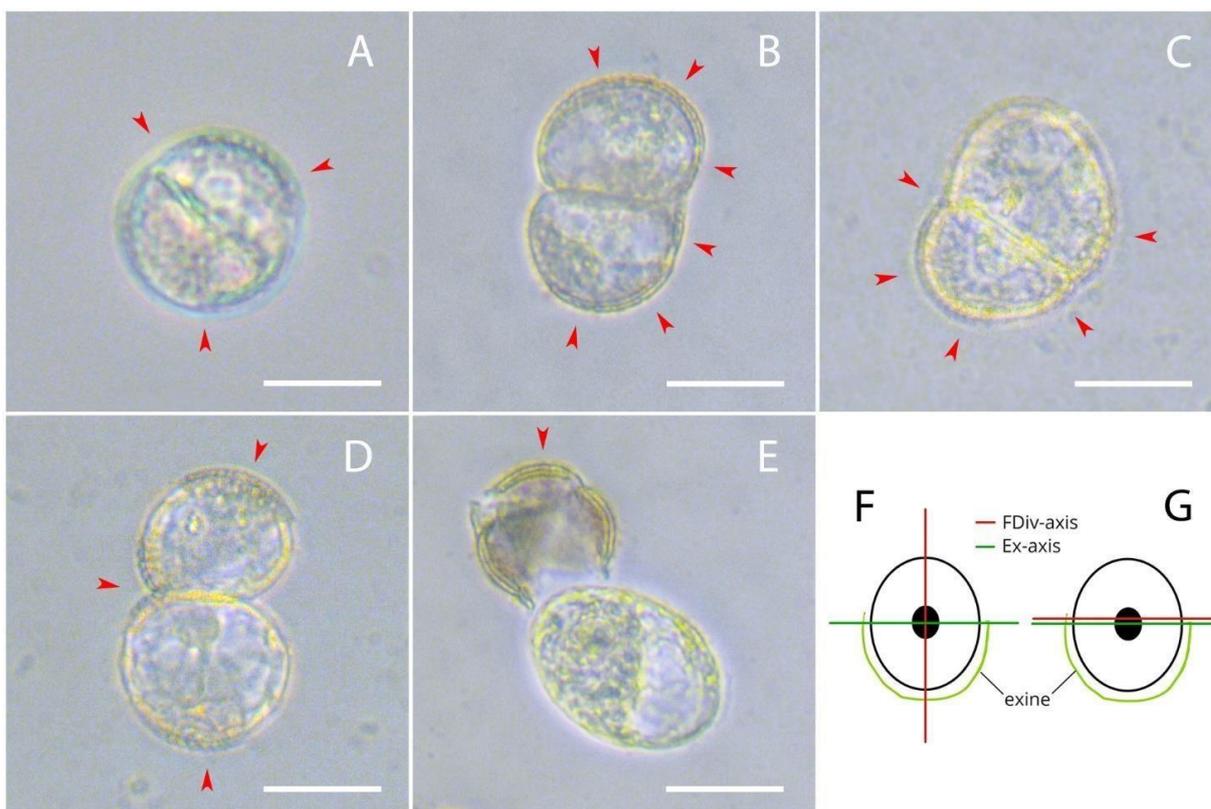


Рисунок 9 - Деления в культуре микроспор *in vitro* редиса европейского на второй день культуры: (A) Микроспора с неповрежденной экзиной с классическим равным делением; (B,F) микроспора с одним разрывом экзины и плоскостью деления клеток перпендикулярной разрыву экзины с ограниченной потерей адгезии; (C,G) микроспора с плоскостью неравного деления клеток параллельно разрыву экзины без потери адгезии; (D) микроспора с разрывом экзины в трех местах с обширной потерей адгезии между клетками; (E) микроспора без экзины. Красные стрелки указывают на экзину. Ось плоскости разрыва экзины обозначена как Ex-axis, а ось плоскости первого деления клетки - как FDiv-axis. Размер линейки = 20 мкм.

В культуре наблюдали микроспоры с неповрежденной экзиной с симметричным делением (Рисунок 9А); микроспоры с одним разрывом экзины и плоскостью деления клеток, перпендикулярной разрыву экзины, с ограниченной потерей адгезии (Рисунок 9В,Ф), из которых могут образовываться близнецовые эмбриониды; микроспоры с одним разрывом экзины, где ось разрыва экзины была параллельна оси первого неравного деления клетки без потери адгезии (Рисунок 9С,Г), из которых, вероятно, формируются дальнейшие эмбриониды с суспензорами; микроспоры с разорванной экзиной в трех местах с обширной потерей адгезии между клетками (Рисунок 9D) и микроспоры, полностью лишенные экзины (рис.9 E).

Затем мы наблюдали большое разнообразие типов делений в культуре, которые отличались по форме и плотности клеточных структур (Рисунок 10).

Развитие делящихся микроспор происходило неравномерно, похожие деления микроспор можно было наблюдать как на 4, так и на 7 день культуры (Рисунок 10 А-С, Н и 11 В, Е, F).

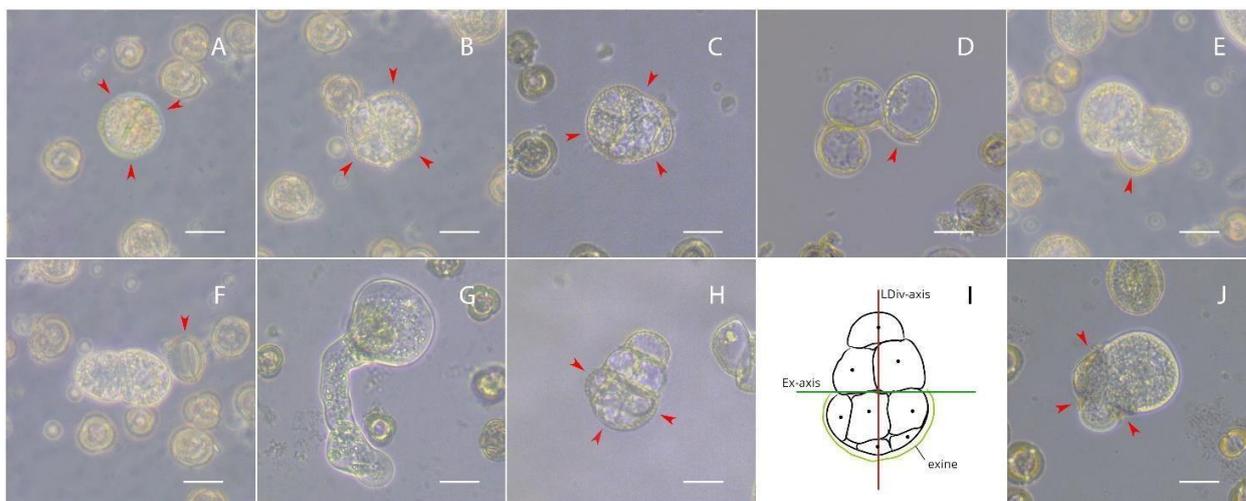


Рисунок 10 - Деления в культуре микроспор *in vitro* редиса европейского на 3–5 день культуры: (А-С) Деления микроспор с неповрежденной экзиной; (D) сильно вакуолизованные клеточные деления микроспоры; (Е) деление с плотными клетками; (F) "плотное" клеточное деление микроспоры без экзины; (G) вакуолизованные структуры неправильной формы; (H,I) микроспора с менее вакуолизованными и мелкими клетками в области контакта с экзиной и с вакуолизованными клетками в области, свободной от экзины; (J) остатки экзины, натянутые на эмбриогенные структуры, способствующие их неправильной форме. Красные стрелки указывают на экзину. Ось плоскости разрыва экзины обозначена как Ex-axis, а ось длинной плоскости деления - как LDiv-axis. Размер линейки = 20 мкм.

На 3–5 дни культуры наиболее компактными были структуры с неповрежденной экзиной (Рисунок 10 А-С). В микроспорах с интактной экзиной мы наблюдали деления, которые были упорядочены подобно тому, как это происходит при формировании эмбриоидов с суспензорами (дальнейшая судьба таких клеточных структур не была отслежена) (Рисунок 10 С). Микроспоры с обширной потерей клеточной адгезии демонстрировали различные схемы деления.

Так, в одном случае клетки были сильно вакуолизованы и не выглядели потенциально эмбриогенными (Рисунок 10 D), а в другом случае клетки были плотными и имели шансы на дальнейшее развитие в эмбриоиды (Рисунок 10 E). Микроспоры, полностью свободные от экзины были делились на плотные клетки (Рисунок 10 F) и вакуолизованные структуры неправильной формы (Рисунок 10 G). Часть микроспор формировала более

плотные и мелкие клетки в области контакта с экзиной, в то время как клетки в свободной от экзины части были более вокализированы, такие клетки обычно свойственны суспензорам (Рисунок 10 Н). Длинная плоскость деления таких структур (полярность/будущая апикально-базальная ось) была перпендикулярна плоскости разрыва экзины (Рисунок 10 I). Аналогичным образом, были обнаружены деления, где остатки экзины натягивались на эмбриогенные структуры, способствуя их аберрантной форме (Рисунок 10 J).

После недели культивирования мы наблюдали в культуре микроспоры с небольшим количеством клеточных делений, как и на 3–5 день культивирования (Рисунок 11 В), что указывает на задержку начала делений или гибель эмбриогенных структур. В культуре присутствовали эмбриониды шаровидной формы как с различными рудиментарными выростами, похожими на аберрантный суспензор, так и без них (Рисунок 11 А).

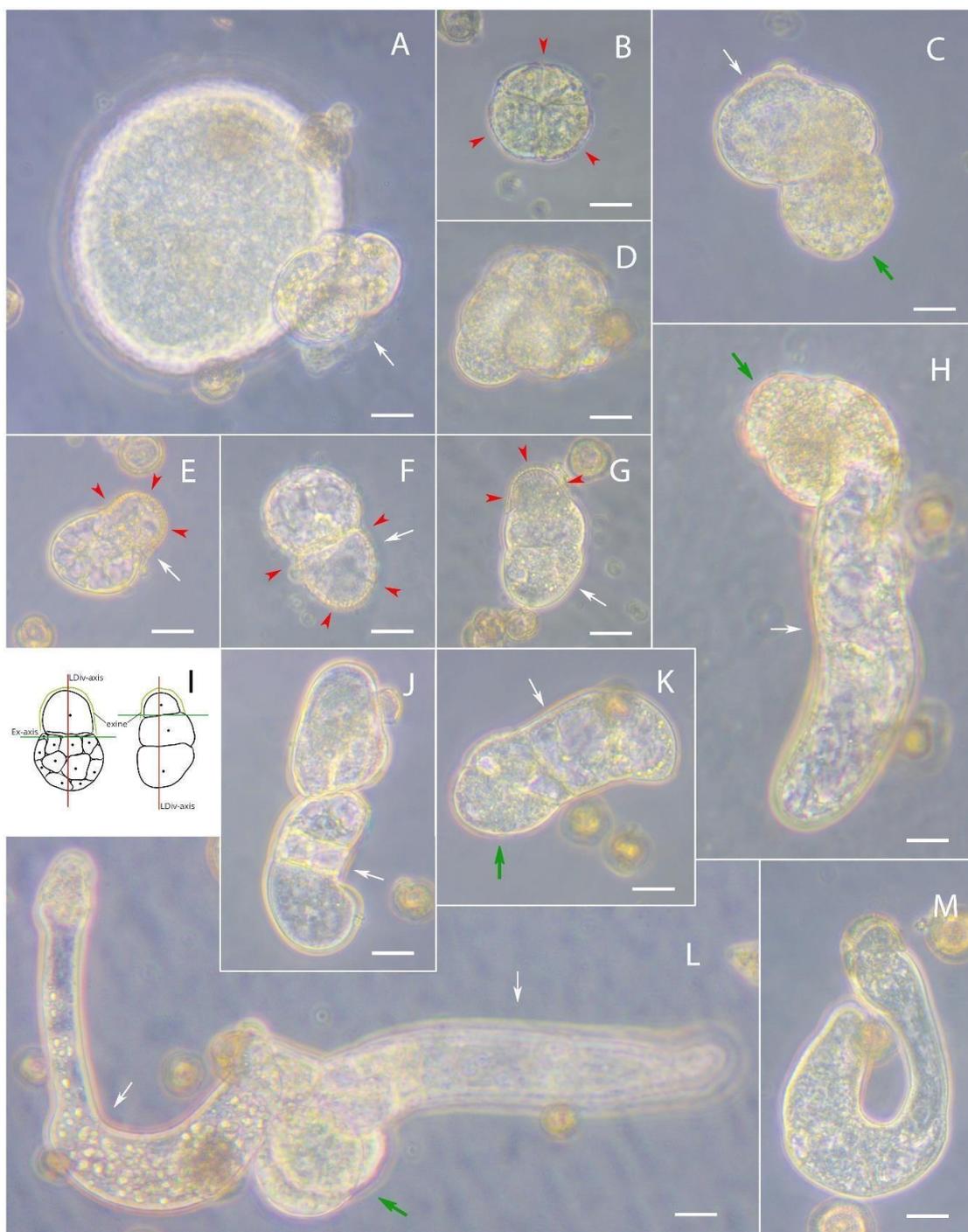


Рисунок 11 - Деления в культуре микроспор *in vitro* редиса европейского на 7 день культуры: (А) Шаровидный эмбрионид с aberrантным суспензором; (В) структура с небольшим количеством клеточных делений и интактной экзиной; (С) массив плотных клеток и клеток с повышенной вакуолизацией неправильной формы; (D) массив плотных клеток неправильной формы; (E,F) деления с большой вакуолизированной клеткой в зоне контакта с экзиной и более плотной группой клеток в свободной от экзины части; (G) клетки суспензора; (H) структура с собственно эмбрионидом и суспензором; (I) схематическое изображение различных типов деления клеток; (J) зародыш близнецовых эмбрионидов; (K) клетки суспензора с первыми делениями собственно эмбриоида; (L) структура суспензора с зародышем близнецов; (M) суспензор. Красные стрелки указывают на экзину. Зеленые стрелки на эмбрионид, белые стрелки на суспензор. Ось плоскости разрыва экзины обозначена как Ex-axis, а ось длинной плоскости деления - LDiv-axis. Размер линейки = 20 мкм.

Некоторые структуры не имели правильной формы и выглядели как массив плотных клеток (Рисунок 11 D), или между массивами плотных клеток были отмечены клетки с повышенной вакуолизацией, похожие на будущие абберрантные суспензоры (Рисунок 11 C). Некоторые микроспоры формировали большую вакуолизированную клетку в зоне контакта с экзиной и более плотную группу клеток в свободной от экзины части (Рисунок 11 E, F). Это похоже на начальную стадию развития эмбриоида с суспензором, когда формирование собственно эмбриоида и суспензора происходит одновременно.

Мы наблюдали структуры, развитие которых было похоже на зиготическое, где сначала формируется ряд клеток суспензора, и только потом на одном конце суспензора начинает формироваться эмбриоид (Рисунок 11 G, H, K). На изображениях видно, что эти структуры находятся на разных стадиях развития, начиная с начальной, где формируются только вакуолизированные клетки суспензора (Рисунок 11 G), затем наблюдаются первые плотные деления собственно эмбриоида (Рисунок 11 K) и структура, где уже четко видны собственно эмбриоид и суспензор (Рисунок 11 H). Эти изображения были сделаны в один и тот же день культивирования, что еще раз подтверждает разную скорость формирования эмбриогенных структур. Важно отметить, что во всех структурах, где мы могли идентифицировать остатки разорванной экзины, длинная ось плоскости деления всегда была перпендикулярна плоскости разрыва экзины (Рисунок 11 E-G, I). В культуре присутствовали и образования неправильной формы (Рисунок 11 J, L, M). Мы предполагаем, что структура на рисунке 11 M — это суспензор, на рисунке 11 J - зародыш эмбриоидов-близнецов, а на рисунке 11 L - структура суспензора и зародыши будущих близнецов. К сожалению, из-за подвижности жидкой культуры микроспор мы не смогли проследить точную судьбу таких структур, но их наличие представляет интерес для дальнейшего изучения различных путей эмбриогенеза.

Шаровидная стадия развития эмбриоида формировалась приблизительно на 7–13 день культивирования (Рисунок 12 А, Е), сердцевидная - на 12–15 день культуры (Рисунок 12 В, F), торпедовидная - на 13–18 день культуры (Рисунок 12 С, G) и семядольная - на 17–23 день культуры (Рисунок 12 D, H). Эмбриониды развивались с суспензором (Рисунок 12 А-D) или без него (Рисунок 12 Е-H), и мы не наблюдали различий в скорости развития эмбрионидов в зависимости от наличия суспензора.

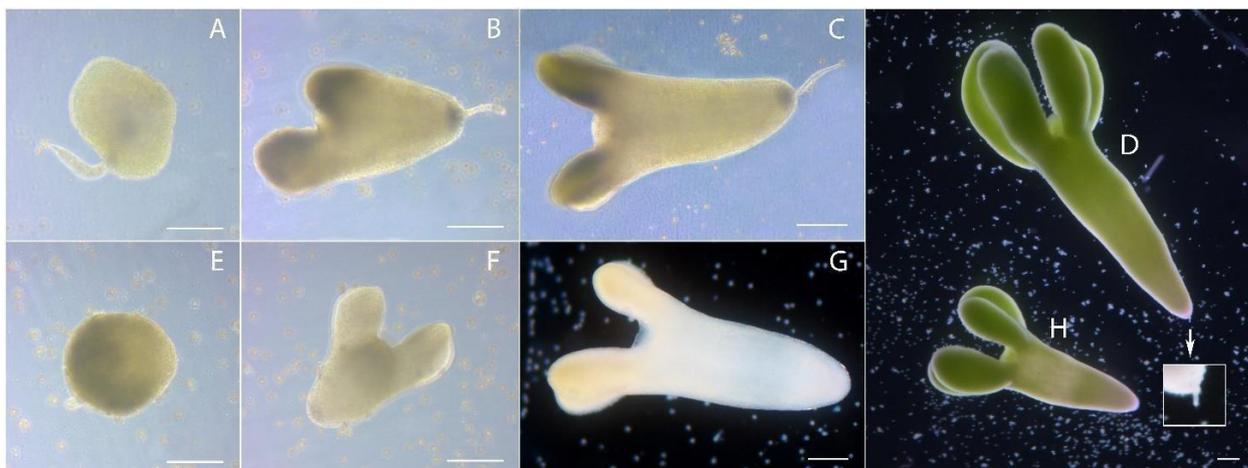


Рисунок 12 - Стадии развития эмбрионидов редиса европейского в культуре микроспор *in vitro* (классические стадии эмбрионидов): (А) шаровидная стадия эмбриоида с суспензором; (В) сердцевидная стадия эмбриоида с суспензором; (С) торпедовидная стадия эмбриоида с суспензором; (D) семядольная стадия эмбриоида с суспензором; (Е) шаровидная стадия эмбриоида; (F) сердцевидная стадия эмбриоида; (G) торпедовидная стадия эмбриоида; (H) семядольная стадия эмбриоида. Размер линейки = 200 мкм.

Помимо классического развития эмбрионидов, мы наблюдали многочисленные нетипичные элементы. Особый интерес представляет разнообразие морфологии эмбрионидов с суспензорами (Рисунок 13). Мы наблюдали прикрепление суспензора к апикальной части эмбриоида между семядолями (Рисунок 13 А) или к апикальной части с боковой стороны (Рисунок 13 Б). В эмбриоидах, которые формировались в центральной части суспензора, мы наблюдали ориентацию апикально-базальной оси эмбрионидов параллельно оси суспензора, так что один суспензор был прикреплен к базальной части эмбриоида, а другой - к апикальной (Рисунок 13 С). Наблюдались эмбриониды с суспензором, прикрепленным к латеральной стороне базальной части эмбрионидов (Рисунок 13 D) и к центральной оси

базальной части эмбриоидов (Рисунок 12 В, С и 13Е). Следует отметить, что суспензоры не всегда были нитевидными, иногда они представляли собой группу клеток неправильной формы (Рисунок 13 D). Нитевидные суспензоры характеризовались нерегулярными клеточными перегородками и различной длиной клеток. Это можно было наблюдать на всех стадиях развития эмбриоидов (Рисунок 10G, 11 L,М и 12F).

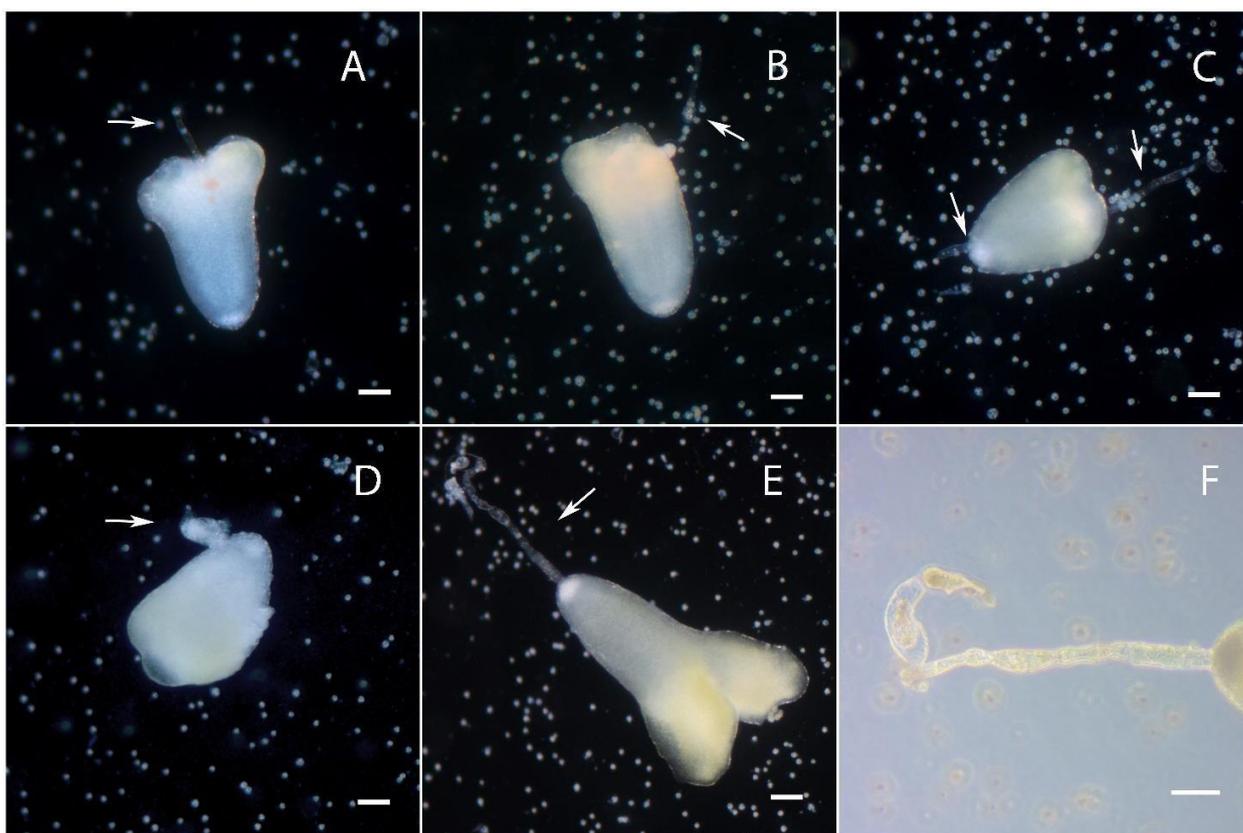


Рисунок 12 - Эмбриониды редиса европейского, полученные в культуре микроспор *in vitro*, с различными типами прикрепления суспензоров: Белые стрелки указывают на суспензоры. (А) Эмбрионид с прикреплением суспензора к апикальной части между семядолей; (В) эмбрионид с прикреплением суспензора к апикальной части с боковой стороны; (С) эмбрионид, сформированный в центральной части суспензора с апикально-базальной осью эмбриоида, параллельной оси суспензора, так что один суспензор прикреплен к базальной части эмбриоида, а другой к апикальной части; (D) эмбрионид с суспензором, прикрепленным к базальной части латерально; (Е) эмбрионид с суспензором, прикрепленным к центральной оси базальной части эмбриоида; (F) суспензор с нерегулярными клеточными перегородками и различной длиной клеток. Размер линейки = 100 мкм.

На семядольной стадии развития наблюдались aberrантные формы семядолей. Например, помимо двух семядолей (Рисунок 12), в культуре

присутствовали эмбриониды с тремя (Рисунок 13 А-С) или более апикальными меристемами (Рисунок 13 Е, F) или котиледоны со сросшейся воротничковой формой (Рисунок 13 D), либо они отсутствовали вовсе (Рисунок 13 G).

Помимо классического развития и частично аберрантного развития, в культуре присутствовали совершенно аномальные структуры. На рисунке 14 показаны некоторые из них. Аномалии заключались в отсутствии полярности (Рисунок 14 А, В, D, Е), симметрии по апикально-базальной оси и упорядоченности апикальных меристем (Рисунок 14 В, D-F). Также наблюдались аномалии в морфологии клеток наружного слоя (Рисунок 14 А).

В культуре присутствовали близнецовые формы эмбрионидов. Близнецы формировались с (Рисунок 15 В1, В2, С1, С2) и без (Рисунок 15 А1, А2) суспензоров. Соединение близнецов выглядело как тонкий слой клеток (Рисунок 15 В1) или близнецы были сращены (Рисунок 15 А1, А2, С1, С2). Соединение и срастание было в апикальной части эмбрионидов (Рисунок 15 А1, А2, С1, С2) или в базальной части одного эмбриоида и апикальной части другого (Рисунок 15 В1). Если близнецы были соединены тонким слоем клеток, они в процессе развития отделялись друг от друга путем разрыва соединительного слоя клеток (Рисунок 15 В2). Суспензоры у близнецовых форм наблюдали (Рисунок 15 В1, В2, С1, С2). Закономерности в скорости развития эмбрионидов в зависимости от наличия суспензора не наблюдалось.

Помимо близнецовых форм с двумя эмбриоидами, в культуре были обнаружены тройные близнецы (Рисунок 16). В отличие от близнецовых форм с двумя эмбриоидами, тройные близнецы могли быть соединены вместе с помощью суспензора. Так, на рисунке 16 А1, В1, С1 показаны тройные близнецы (13-й день культуры), где два эмбриоида соединены суспензором (Рисунок 16 А1, В1), а два других слиты (Рисунок 16 В1, С1).

В этом случае суспензоры были прикреплены ко всем трем эмбриоидам в базальной части. Затем, на 18 день культуры, как и в случае близнецовых форм, соединенных тонким слоем клеток, мы наблюдали разрыв суспензора, и близнецы разделились на один отдельный эмбрионид (Рисунок 16 А2) и два

сросшихся эмбриоида (Рисунок 16 В2, С2), которые продолжали развиваться слитно.

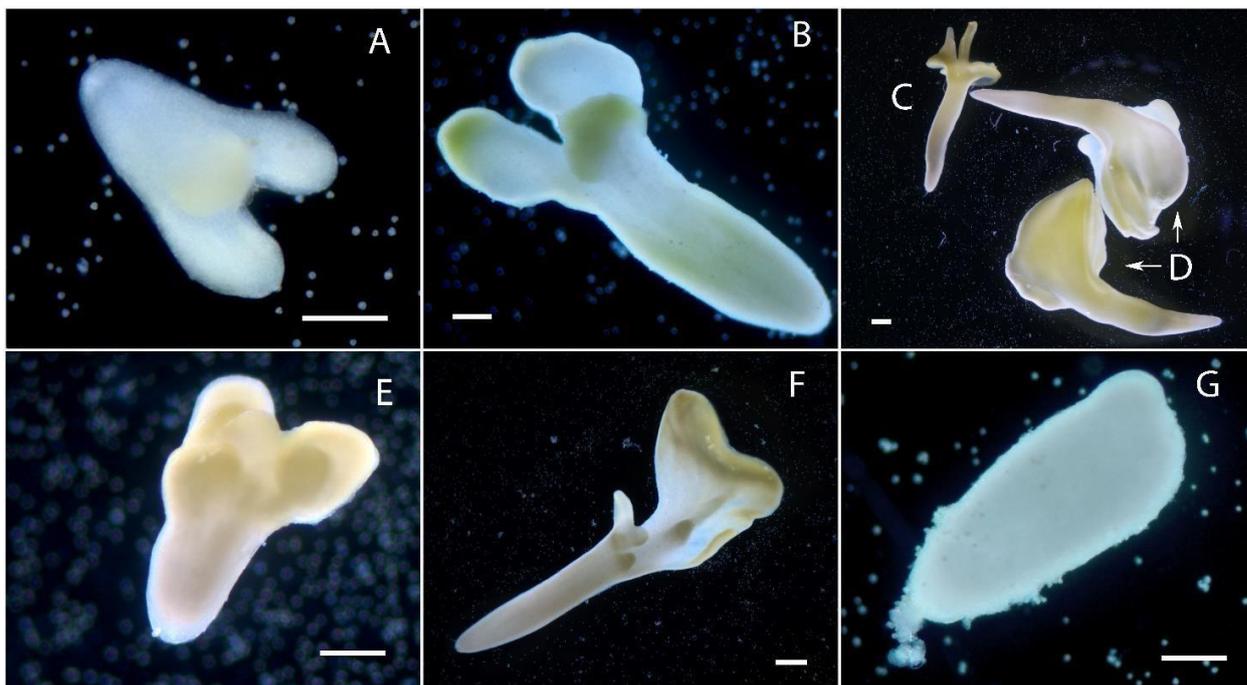


Рисунок 13 - Эмбриониды редиса европейского, полученные в культуре микроспор *in vitro*, с различными типами развития семядолей: (А-С) эмбриониды с тремя семядолями; (D) эмбриониды с семядолями в форме сросшегося воротничка; (E, F) эмбриониды с более чем тремя семядолями; (G) эмбрионид без семядолей. Размер линейки = 200 мкм.

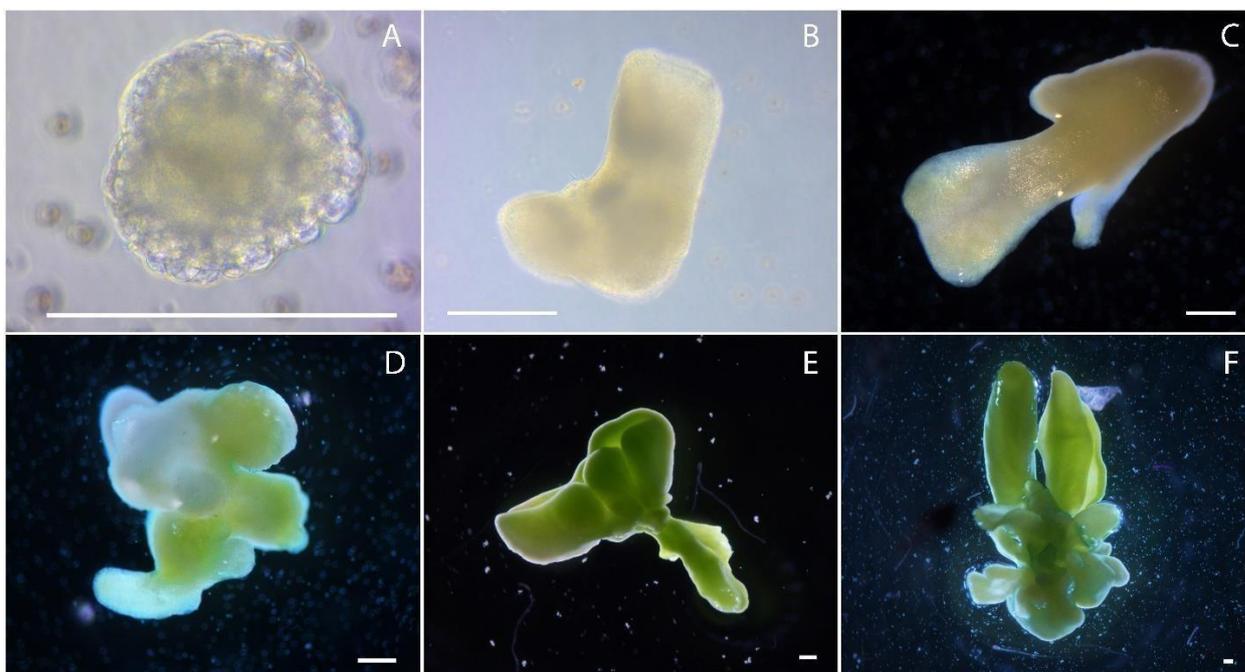


Рисунок 14 - Аберрантное развитие эмбрионидов редиса европейского, полученных в культуре микроспор *in vitro*: (А) Эмбрионид с аномалиями в морфологии клеток наружного слоя; (В-F) эмбриониды с различными аномалиями. Размер линейки =300 мкм.

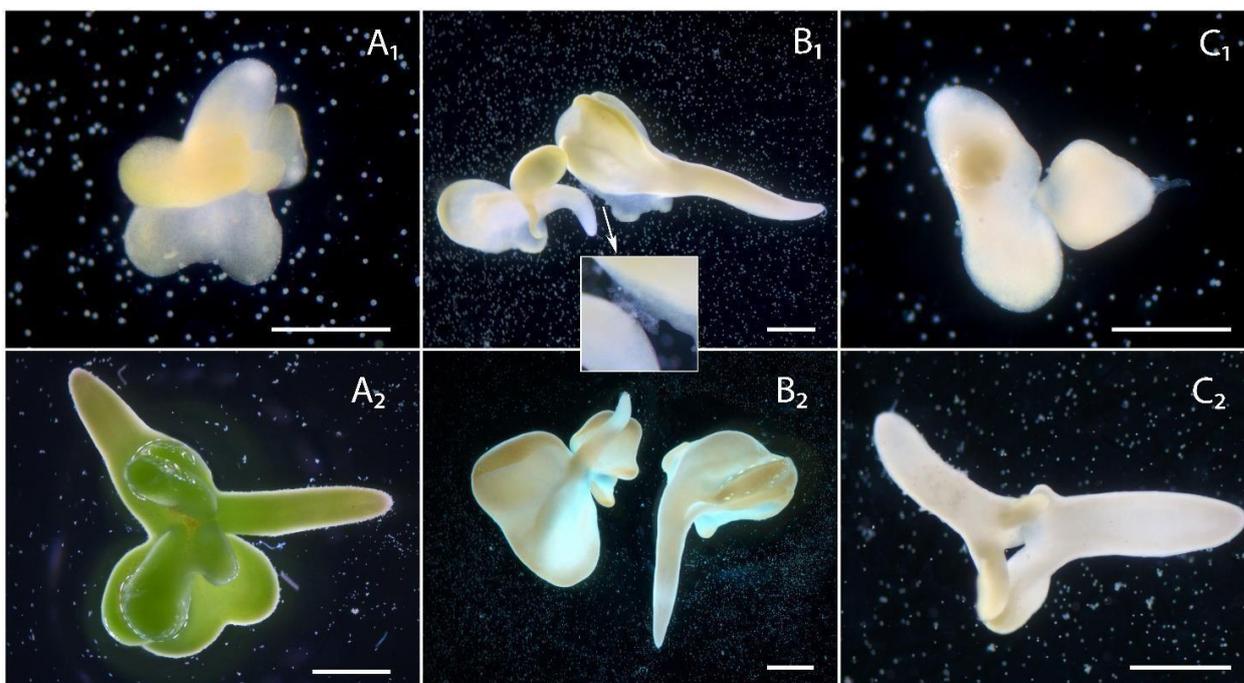


Рисунок 15 - Развитие двойных эмбриоидов в культуре *in vitro* микроспор редиса европейского: (A1,A2) Сросшиеся близнецовые эмбриоиды без суспензоров на 13-й день культуры и 23-й день; (B1,B2) Близнецовые эмбриоиды, соединенные тонким слоем клеток и с суспензором, прикрепленным к базальной части одного из эмбриоидов на 13-й день культуры и 18-й день; (C1,C2) Сросшиеся близнецовые эмбриоиды с суспензором, прикрепленным к базальной части одного из эмбриоидов на 13-й день культуры и 18-й день. Размер линейки = 500 мкм.

К сожалению, мы не смогли определить раннее развитие тройняшек, но была очевидна разница в их стадиях развития на 13 день культуры. На рисунке 16 A1-C1 можно одновременно наблюдать семядольную, позднюю глобулярную и сердцевидную стадии развития эмбриоидов. Однако в процессе роста стадии развития близнецов выровнялись, и на 23-й день культуры все они находились примерно на одной и той же семядольной стадии развития и были готовы к переносу на твердую питательную среду (Рисунок 16 A3-C3). Второй тип тройных близнецов показан на рисунке 16 D1, D2, в этом случае все три эмбриоида были слиты, два базально и два апикально. Здесь тоже наблюдались различия в стадиях развития эмбриоидов (18 день, Рисунок 16 D1), причем различия оставались заметными на протяжении всего развития (23 день, Рисунок 16 D2). Семядоли этих тройных близнецов были аномальными.

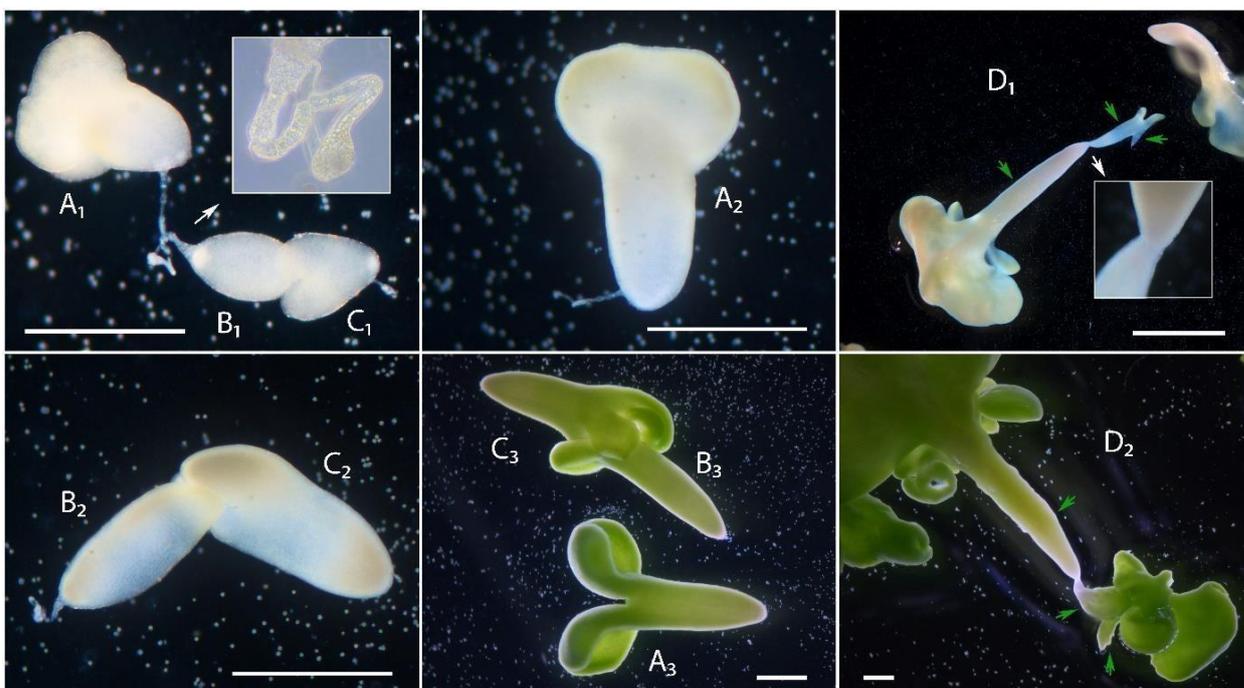


Рисунок 16 - Развитие тройных двойных эмбрионов в культуре микроспор европейского редиса *in vitro*: (A1,B1,C1) тройные близнецы, где два эмбриоида соединены суспензором, а два других сращены на 14 день культуры, (A2,B2,C2) 18 день и (A3,B3,C3) 23 день; (D1) тройные близнецы, где все три эмбриоида сливаются, два базально и два апикально на 18 день культуры и (D2) 23 день. Зеленые стрелки - эмбрионы. Размер линейки = 500 мкм.

В результате наблюдения за культурой *in vitro* микроспор редиса европейского, мы составили диаграмму зависимости стадий развития эмбрионов от продолжительности культуры, которая представлена на рисунке 17.

Несмотря на то, что процесс эмбриогенеза активно изучается и многие аспекты биологии эмбриогенеза для модельных культур уже известны, остается много вопросов, и продолжают появляться новые данные, которые иногда противоречат более ранним теориям и предположениям. Структуры, возникающие при культивировании микроспор *in vitro*, очень разнообразны, и можно наблюдать совершенно различную морфологию делений в зависимости от степени и времени высвобождения микроспор из экзины, которая считается одним из основных регуляторов начальных путей развития эмбриоида, и определения их полярности (Tang et al., 2013; Shmykova et al., 2021).

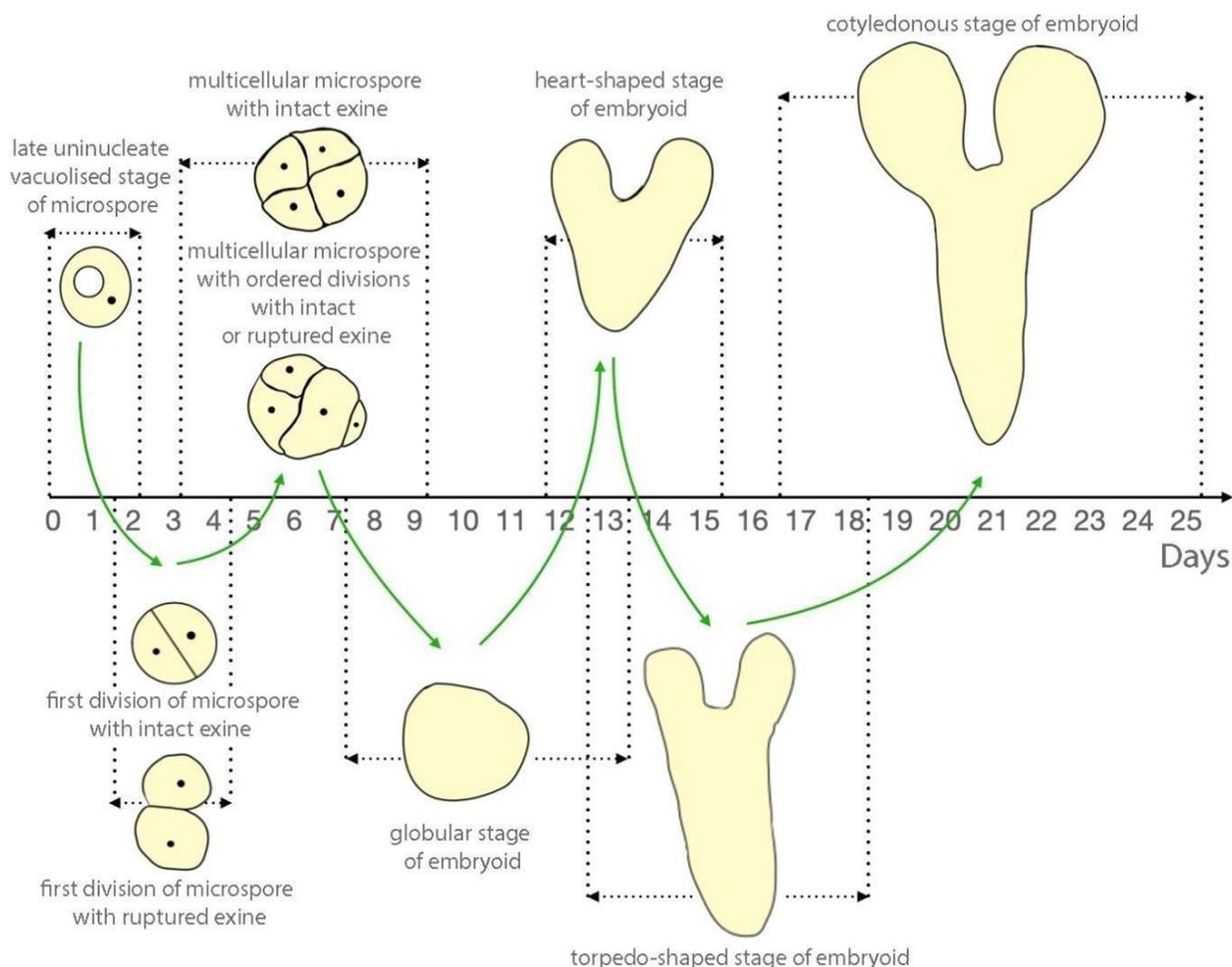


Рисунок 17 - Стадии развития эмбриоида в культуре *in vitro* микроспор редиса европейского в зависимости от продолжительности культуры

Мы наблюдали различные варианты разрывов экзины от интактных до полностью свободных от экзины микроспор уже на второй день культивирования, что не было описано ранее в литературе. Мы полагаем, что характер деления полностью свободных от экзины клеток должен быть сходен с микроспорами, в которых наблюдается обширный разрыв экзины с нарушением клеточной адгезии, поскольку при обширном разрыве экзина не оказывает давления на протопласт микроспоры, как и при полном ее отсутствии (Li et al., 2014; Corral-Martínez et al., 2020).

В литературе, где описывался эмбриогенез в культуре микроспор рапса, особенно тщательно изучался путь развития микроспор с одним разрывом экзины (Tang et al., 2013).

Было показано, что полярность эмбриоидов зависит от разрыва экзины и не связана с асимметричным делением клеток, поскольку разрыв экзины еще

до первого деления клеток вызывает реорганизацию органелл, которая определяет полярность эмбриоидов и фиксирует дальнейшую их апикально-базальную ось. В наших исследованиях это было подтверждено - в эмбриогенных структурах будущих одиночных эмбриоидов, сформированных из микропор с одним разрывом экзины, длинная ось деления (полярность/будущая апикально-базальная ось) всегда была перпендикулярна оси разрыва экзины. К сожалению, у нас нет данных, подтверждающих или опровергающих эту гипотезу для близнецовых форм эмбриоидов. Однако мы полагаем, что пути формирования близнецов, прикрепленных друг к другу без суспензора, не столь однозначны, как описано Tang и другими (Tang et al., 2013).

Они, описывают, что близнецы формируются одновременно при первом делении микроспоры которая разделилась перпендикулярно разрыву экзины, а значит полярность апикально-базальной оси будущих эмбриоидов должна быть зафиксирована «из одной точки» (Рисунок 18) и близнецы могут быть соединены либо в апикальной, либо в базальной частях.

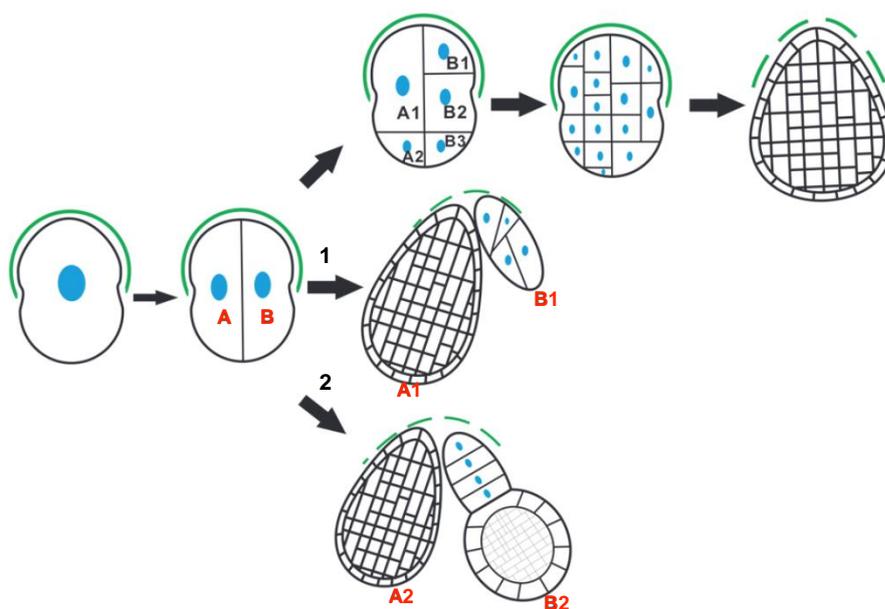


Рисунок 18 - Пути деления микроспоры рапса с одним разрывом экзины, где первое деление произошло перпендикулярно плоскости разрыва экзины (цит. по Tang et all (Tang et al., 2013)). Зеленым цветом показана экзина, голубым цветом показаны ядра клеток. Красные буквы А, В – клетки после первого деления микроспоры. Красные буквы А1, В1, А2, В2- близнецовые эмбриоиды, сформированные из клеток, отмеченных красными буквами А и В. 1, 2 – пути формирования близнецовых эмбриоидов.

В наших исследованиях наблюдались близнецы, прикрепленные друг к другу через апикальную часть одного и базальную часть другого (Рисунок 15 В1, В2). Это предполагает, что их апикально-базальные оси были выстроены последовательно друг за другом и не могли возникнуть из одной точки. С другой стороны, в нашем исследовании мы наблюдали различия в стадиях развития близнецов и их соединение друг с другом тонким слоем клеток, что в совокупности с расположением их базально-апикальных осей относительно друг друга предполагает, что первоначально образовался один эмбриоид и только потом второй на поверхности первого, что похоже на вторичный эмбриогенез (Shmykova et al., 2021).

В нашем исследовании было подтверждено, что сам эмбриоид может развиваться как из покрытой экзиной клетки, так и из клетки без экзины, что согласуется с данными Tang et al. (Tang et al., 2013) и не согласуется с данными других авторов (Plić-Grubor et al., 1998; Supena et al., 2008; Li et al., 2014). В литературе описано, что более вакуолизированные клетки развивались в суспензор, а более "плотные" клетки развивались в эмбриоиды (Tang et al., 2013; Soriano et al., 2014). В наших исследованиях мы наблюдали аналогичный сценарий развития клеток в зависимости от степени их вакуолизации.

Танг и др. (Tang et al., 2013), исследуя эмбриогенез рапса, предположили, что разрыв экзины определяет ось первого деления в большинстве случаев, что происходит из-за разницы давления внутри клетки между ее областями с экзиной и без нее, но в культуре редиса европейского часто встречались первые деления микроспор, которые были перпендикулярны оси разрыва экзины, что говорит о том, что ось первого деления вряд ли в большинстве случаев зависит от разрыва экзины.

В отличие от многих исследований, описывающих классический эмбриогенез с интактной экзиной, где деления происходят бессистемно до ее разрыва, а апикально-базальная ось формируется после разрыва экзины (Hause et al., 1994; Yeung et al., 1996; Nitta et al., 1997; Indrianto et al., 2001; Tang et al.,

2013; Soriano et al., 2014). В наших наблюдениях некоторые микроспоры демонстрировали упорядоченные деления в интактных экзинах уже на первой неделе культуры (Рисунок 10 С).

Деления микроспор с обширным разрывом экзины и те, которые полностью вышли из нее, образовывали несколько слабо связанных клеток (рыхлый каллус). Ранее считалось, что каллусоподобные структуры не являются эмбриогенными (Hause et al., 1994; Ilić-Grubor et al., 1998), но затем было показано, что они экспрессируют несколько генов эмбриональной идентичности и способны формировать гистодифференцированные эмбриониды (Li et al., 2014; Corral-Martínez et al., 2020). Corral-Martínez и др. (Corral-Martínez et al., 2019) получили удивительные результаты, проследив индивидуальный путь развития структур с неповрежденной экзиной, с одним разрывом экзины (компактный каллус) и полным разрывом экзины (рыхлый каллус). Было обнаружено, что рыхлый каллус, клеточная морфология которого была более схожа с морфологией клеток суспензора, имеет гораздо больше шансов на формирование эмбрионидов, чем компактный каллус с одним разрывом экзины, и является основным источником эмбрионидов с рудиментарными клетками суспензория. Мы можем подтвердить, что микроспоры с обширным разрывом экзины являются эмбриогенными - большинство структур с суспензорными клетками не имеют следов прикрепленных остатков экзины (Рисунок 11) (мы описали выше, что считаем, что клеточные деления микроспор с обширным разрывом экзины сходны по своей морфологии с делениями микроспор, полностью свободных от экзины). Однако мы не всегда могли проследить хронологию развития всех групп делений на начальных стадиях эмбриогенеза (до стадии глобулы/ядра), поэтому мы не можем утверждать развились ли эти структуры в полноценные эмбриониды или нет.

В наших исследованиях культуры микроспор *in vitro* редиса европейского мы наблюдали два пути развития эмбрионидов с суспензором. В одном случае формирование суспензора и эмбриоида происходило

одновременно, а во втором - клетки сначала делились поперечно и формировали суспензор, и только потом формировали эмбриоид, что согласуется с данными других исследователей (Supena et al., 2008; Prem et al., 2012; Tang et al., 2013). Интересно, что в литературе существуют различные мнения относительно механизма формирования эмбриоида с суспензором (Friml et al., 2003; Blilou et al., 2005; Tanaka et al., 2006; Weijers et al., 2006; Corral-Martínez et al., 2020). Supena et al. (Supena et al., 2008) подробно изучили варианты формирования эмбриоида с суспензорами, включая близнецовые формы. Исследователи провели интересный эксперимент, в котором суспензоры были пересажены на твердую среду, где по мере деления клеток суспензор изгибался, и на его изгибах формировались эмбриоиды. Таким образом, исследователи получили цепочку эмбриоидов на одном суспензоре. Эти наблюдения показывают, что все клетки в суспензора имеют эмбриогенный потенциал и он коррелирует с местом изгиба суспензора. Эти исследования хорошо коррелируют с работой Liu et al. (Liu et al., 1993), где был подтвержден эмбриогенный потенциал клеток суспензора, который подавляется самим эмбриоидом. Supena et al. (Supena et al., 2008) отметили, что хотя они наблюдали различные варианты формирования суспензора, они никогда не прикреплялись к апикальной части эмбриоидов. Даже, в случае, когда эмбриоид формировался в центре суспензора, апикально-базальная ось эмбриоида формировалась перпендикулярно оси суспензора, так что оба плеча суспензора оставались в базальной части эмбриоида и у эмбриоидов-близнецов плечи суспензора прикреплялись к их базальным частям. Из этих наблюдений исследователи сделали вывод о важной функции суспензора в определении будущей апикально базальной оси эмбриоидов.

В нашем исследовании мы наблюдали различные места прикрепления суспензора относительно апикально базальной оси эмбриоидов. Мы также впервые столкнулись с прикреплением суспензора к апикальным частям эмбриоидов между семядолями и сбоку от апикальной части. Более того, мы наблюдали эмбриоиды в центральной части суспензора, которые

образовывали апикально-базальную ось, параллельную оси плечей суспензора, так что один суспензор был прикреплен к базальной части, а другой - к апикальной части эмбриоида (Рисунок 12 С). Эти наблюдения позволяют опровергнуть вывод о том, что суспензор определяет апикально-базальную ось эмбриоидов и всегда является маркером будущей базальной части. В том числе, Supena и др. (Supena et al., 2008) сообщают, что эмбриоиды, сформированные из центральной части суспензора, развивались в несколько раз дольше, чем эмбриоиды, сформированные на одном из концов суспензора. В наших наблюдениях это не подтвердилось - в скорости развития эмбриоидов в зависимости от их положения относительно суспензора, закономерности не наблюдалось. Другие исследователи часто отмечали для семейства *Brassicaceae* более медленное развитие эмбриоидов с суспензорами по сравнению с эмбриоидами, развивающимися по классическому пути без суспензора, однако в нашем эксперименте такой закономерности тоже не прослеживалось (Liu et al., 1993; Hadfi et al., 1998; Hakman et al., 2009; Prem et al., 2012; Shumilina et al., 2015, 2020; Domblides et al., 2018). Тем не менее, мы наблюдали неравномерное развитие эмбриоидов в целом, поэтому в одно и то же время культуры мы могли видеть эмбриоиды на разных стадиях. Например, на 13 день культуры мы могли наблюдать эмбриоиды на шаровидной, сердцевидной и торпедовидной стадиях развития одновременно. Интересно, что эмбриоиды-близнецы почти всегда демонстрировали разницу в стадиях развития в середине культивирования, но к семядольной стадии их развитие часто выравнивалось, что говорит о неравномерной скорости развития эмбриоидов на разных этапах.

Было отмечено более быстрое созревание эмбриоидов редиса европейского до семядольной стадии (18–23 дня) по сравнению с данными исследователей о скорости развития эмбриоидов рапса (26–40 дней) (Prem et al., 2012). Однако до глобулярной стадии развития эмбриогенез у рапса и редиса европейского протекает с одинаковой скоростью, и только затем скорость созревания эмбриоидов редиса возрастает по сравнению с *V. parvus*.

Так, стадию торпеды у редиса мы наблюдали с 13 по 18 день культуры, а эмбриониды рапса достигают этой стадии только на 16–20 день (Prem et al., 2012).

Что касается абберрантных форм эмбрионидов редиса европейского, то для объяснения причин их возникновения необходимы дополнительные исследования. Однако в литературе имеются данные о том, что абберрантные семядоли формируются в результате нарушения транспорта ауксина, что, вероятно, может объяснить и наши результаты (Liu et al., 1993; Hadfi et al., 1998; Friml et al., 2003; Накман et al., 2009).

В данном исследовании показано, что эмбриогенез микроспор редиса европейского в культуре *in vitro* во многом схож с эмбриогенезом других культур *Brassicaceae*, но есть особенности, которые ранее не были описаны в литературе и требуют особого внимания при дальнейших исследованиях.

3.2 Регенерация микропобегов редиса европейского из эмбрионидов

3.2.1 Влияние состава питательной среды для регенерации на эффективность получения микропобегов редиса европейского

После этапа культивирования эмбрионидов на жидких средах для индукции эмбриогенеза следует этап регенерации.

Прямого прорастания эмбрионидов редиса европейского в растения-регенеранты не происходило, поэтому на начальном этапе было необходимо запустить процесс вторичного эмбриогенеза и формирования вторичных точек роста с последующим побегообразованием (Shumilina et al., 2015; Domblides et al., 2016). Иногда вторичные эмбриониды и точки роста образовывались на безгормональной среде, но для дополнительной стимуляции используют различные регуляторы роста растений. В нашем эксперименте были использованы следующие твердые питательные среды: МС безгормональная, МС с 1 мг/л БАП; МС с 0,2 мг/л ТДЗ; МС с 0,1 мг/л ГК и 1мг/л БАП.

Частота образования вторичных точек роста и эмбриогенеза с последующим побегообразованием составила от 30% до 80% (для всех сред, кроме варианта с ТДЗ), в зависимости от генотипа и состава питательной

среды. У большинства сортообразцов, лучшие результаты были получены на средах с совместным добавлением БАП и ГК. (от 69 до 80%). Исключение составил сортообразец Тепличный Грибовский, где лучший результат (до 63%) был получен на среде с добавлением БАП (Рисунок 19).

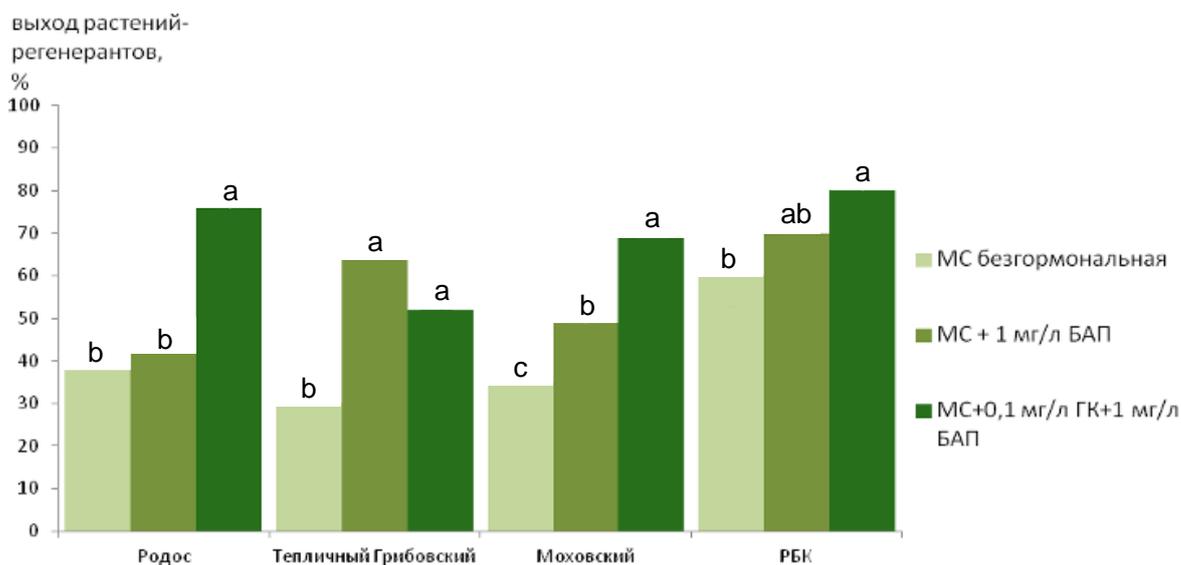


Рисунок 19 - Процент выхода растений-регенерантов редиса европейского на первом этапе регенерации в зависимости от состава питательной среды и генотипа: Столбцы диаграммы с одинаковой буквой (сравнение выхода растений-регенерантов (микроробегов) в зависимости от состава питательной среды) достоверно не различаются с вероятностью 95% согласно тесту множественного ряда Дункана (MRT).

Включение в состав среды тидиазурона дало отрицательный эффект, хотя есть статьи, где описаны успешные опыты по регенерации на среде МС - 0,8% агар, 3% сахароза, 0,2 мг/л TDZ (Заячкова, 2005). В нашем опыте все эмбриониды, пересаженные на эту среду, темнели и останавливались в своем развитии в течение трех-пяти суток.

3.3 Укоренение микроробегов редиса европейского

3.3.1 Укоренение микроробегов редиса европейского при использовании стандартного протокола ИМС технологии для семейства *Brassicaceae*

Согласно стандартным протоколам ИМС технологии для культур семейства *Brassicaceae*, на этапе укоренения используют среду МС или В-5 без гормонов, и у регенерированных растений формируются нормальная корневая система, после чего они успешно адаптируются при пересадке в

условия *in vivo* (Custers, 2003; Ferrie, 2003; Silva Dias da, 2003; Shumilina et al., 2020). Однако в наших экспериментах с использованием стандартной технологии укоренения ДН-растения редиса европейского формировали нормальную корневую систему (Рисунок 20, тип I) максимум в 6% случаев, в зависимости от генотипа (Рисунок 21, тип I).



Рисунок 20 - Типы корневой системы ДН-растений редиса европейского: А, В – нормальная корневая система – I тип; С, D – корнеплодоподобные структуры (КС) с вторичными опухолями (ВО) со слабой корневой системой – II тип; Е, F – КС с ВО без корней – III тип

В остальных случаях базальная часть микропобегов разрасталась, образуя аномальные структуры, внешне напоминающие аномальный корнеплод. В дальнейшем такие структуры мы будем называть корнеплодоподобными структурами (КС) с вторичными опухолями (ВО). Если формировались КС с ВО, то корневая система либо полностью отсутствовала (Рисунок 20, тип III), либо была слабой и состояла из единичных корней, сформированных на поверхности этих структур (Рисунок 20, тип II). При адаптации в естественных условиях растения третьего типа всегда погибали.

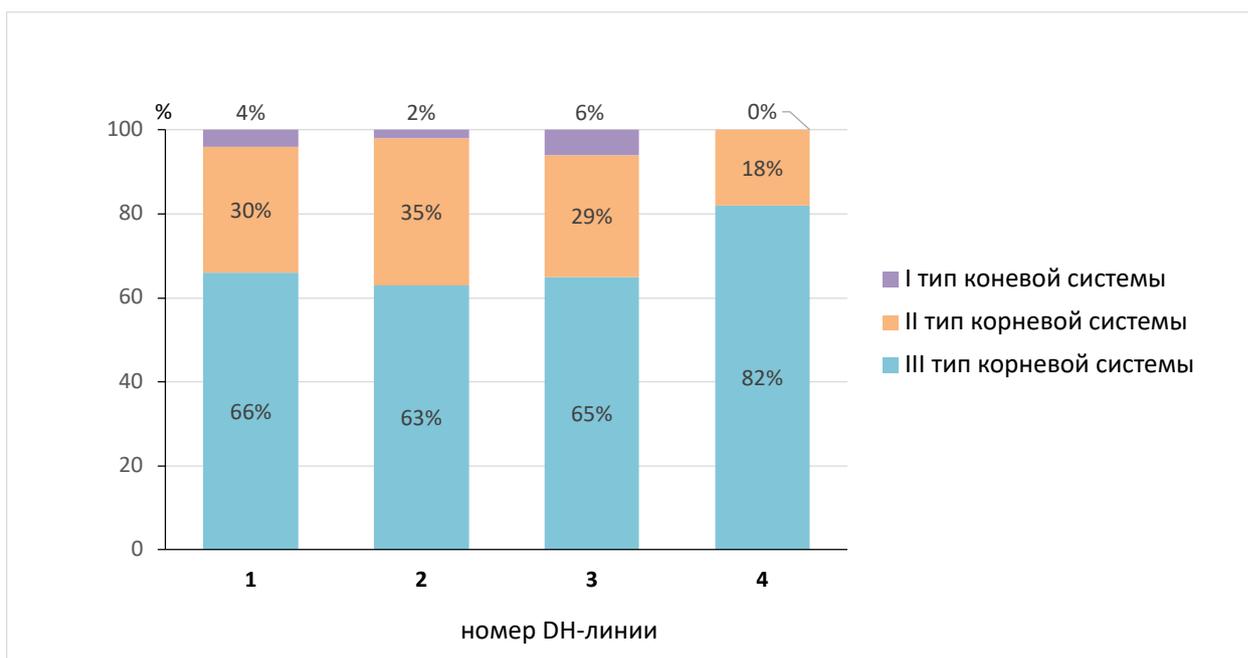


Рисунок 21 - Процентное соотношение типов корневой системы у ДН-линий редиса европейского: Нормальная корневая система – I тип; корнеплодоподобные структуры (КС) с вторичными опухолями (ВО) со слабой корневой системой – II тип; КС с ВО без корней – III тип.

Среди растений второго типа при адаптации выживало от 0 до 35% в зависимости от генотипа (Таблица 6, где по ряду генотипов, где все растения погибли при адаптации в условиях *in vivo* данные в таблице не представлены).

Такие низкие показатели связаны с тем, что опухоли и покрытые ими участки КС в процессе роста формируют спиральные, волнистые, неравномерно распределенные сосуды (данные не представлены; согласуются с данными других исследователей (Pi'ina et al., 2006; Lebedeva et al., 2015)). Поэтому питание растений через корни, сформированные на поверхности КС

с ВО, нарушено и не способно обеспечить растения-регенеранты всем необходимым при пересадке в почву в условиях *in vivo*. Это означает, что для успешного укоренения растений-регенерантов редиса европейского необходимо индуцировать процесс корнеобразования, минуя или минимизируя образование КС и опухолей, так как их ткани являются буферной зоной, препятствующей прямому контакту клеток сосудистой системы корней с базальной частью микропобегов регенерантов.

В таблице 6 приведены результаты укоренения четырех ДН-линий редиса, полученных в культуре ИМС. Для них процент регенерированных растений, которые смогли быть адаптированы в условиях *in vivo*, от общего количества микропобегов в эксперименте варьировал от 6 до 14%. Остальные линии редиса ДН были потеряны из-за проблем на стадии укоренения *in vitro*, поэтому статистических данных по ним получить не удалось.

Таблица 6 - Результаты укоренения микропобегов редиса европейского при стандартной методике на твердой безгормональной среде ИМС

Номер ДН-линии	ДН-регенеранты								
	Всего получено			В том числе:					
	<i>in vitro</i> шт.	Укоренилось <i>in vivo</i>		с КО и ВО структурами					
		шт.	%	С нормальными корнями (I тип)		С корнями (II тип)		Без корней (III тип)	
			<i>in vitro</i> шт.	Из них укоренилось <i>in vivo</i> , %	<i>in vitro</i> шт.	Из них укоренилось <i>in vivo</i> , %	<i>in vitro</i> шт.	Из них укоренилось <i>in vivo</i> , %	
1	50	6	12	2	100	15	27	33	0
2	57	8	14	1	100	20	35	36	0
3	34	4	12	2	100	10	20	22	0
4	17	1	6	0	0	3	33	14	0
среднее			11		100		29		0

Таким образом, этап укоренения растений-регенерантов редиса европейского, являлся одним из самых ограничивающих факторов ИМС технологии и требовал существенной модификации.

3.3.2 Влияние на ризогенез микропобегов редиса европейского добавления гормонов роста в питательную среду для регенерации

Поскольку на контроль деления и дифференциации клеток прямо или косвенно влияет баланс фитогормонов, обычно решение проблем на всех этапах регенерации ДН-растений сводится к модификации твердых сред для регенерации путем добавления ауксинов, цитокининов и/или гиббереллинов. Известно, что индукция побегообразования наблюдается при смещении баланса фитогормонов в сторону цитокининов, а индукция корнеобразования - в сторону ауксинов. В наших экспериментах корни у ДН-растений формировались редко, в то время как образование побегов было достаточно интенсивным. Из этого можно сделать вывод, что баланс фитогормонов в случае редиса европейского смещен в сторону цитокининов, и для того, чтобы вызвать образование корней, требуется увеличение концентрации ауксинов.

По этим причинам был проведен эксперимент по культивированию микропобегов редиса европейского на среде МС с добавлением ИУК и ИМК в концентрациях 0,5, 1 и 2 мг/л. К сожалению, существенных отличий от культивирования растений-регенерантов на средах с добавлением гормонов и на средах без гормонов обнаружено не было (данные не показаны). В связи с этим возникла необходимость поиска других путей решения проблемы индукции корнеобразования.

3.3.3 Оптимизация технологии укоренения микропобегов редиса европейского

После многочисленных экспериментов нам удалось заметить, что у некоторых микропобегов базальная часть в процессе роста изгибалась так, что оказывалась над поверхностью питательной среды. В результате ткани базальной части микропобега под воздействием воздуха локально подсыхали. В таких микропобегах реже наблюдалось образование КС с ВО, и чаще формировалась нормально развитая корневая система. В связи с этим мы предположили, что площадь контакта с питательной средой, хорошая аэрация и локальное высыхание тканей в нижней части микропобегов могут играть важную роль в успешной индукции корнеобразования при регенерации эксплантов редиса европейского.

Для проверки нашей гипотезы мы провели эксперимент с использованием различных методов пересадки микропобегов. Мы также обратили внимание на метод укоренения растений-регенерантов на жидкой среде с мостиками, который используется для моркови. С одной стороны, морковь также является корнеплодным растением, а с другой стороны, выращивание микропобегов на мостиках обеспечивает необходимые условия - небольшую площадь контакта эксплантов с питательной средой, хорошую аэрацию базальной зоны микропобегов и возможность частичного подсушивания ее поверхности. Эксперименты по различным технологиям пересадки редиса европейского и выращивания микропобегов на мостиках в жидкой питательной среде проводились параллельно. Ниже приведены результаты по каждой серии экспериментов.

3.3.3.1 Влияния различных техник пересадки микропобегов редиса европейского на эффективность ризогенеза при культивировании на твердой безгормональной среде MS

В эксперименте использовали три варианта пересадки: высадка микропобегов с погружением гипокотилия на 2–3 мм в твердую питательную среду MS (Рисунок 22 - 1 вариант); посадка в лунку, сделанную в питательной среде пинцетом в стерильных условиях (Рисунок 22 - 2 вариант); посадка на поверхность твердой питательной среды для регенерации без заглабления (Рисунок 22 - 3 вариант).



Рисунок 22 - Техники посадки микропобегов редиса европейского: 1 – посадка микропобега с погружением гипокотилия на 2-3мм в твердую питательную среду MS; 2 – посадка микропобега в лунку, сделанную в питательной среде с помощью пинцета в стерильных условиях; 3 – посадка микропобега на поверхность твердой питательной среды для регенерации без заглабления.

В результате исследования было показано, что при первом и втором вариантах посадки микропобегов в среду MS образование КС с ВО (II и III типы корневых систем) наблюдалось в 96% и 90,3% случаев соответственно (Таблица 7).

Таблица 7 - Типы корнеобразования при различных техниках посадки (способ 1,2,3) микропобегов и приживаемость растений в условиях *in vivo* в зависимости от типа корнеобразования

ДН-линия № (генотип)	Среднее число растений-регенерантов по всем сериям опытов, шт.								
	I тип корневой системы			II тип корневой системы			III тип корневой системы		
	Способ посадки			Способ посадки			Способ посадки		
	№1	№2	№3	№1	№2	№3	№1	№2	№3
1	1.2 b	1.6 b	6.1 a	3.1 b	5.8 a	3.9 b	5.7 a	2.6 b	0.0 c
2	0.0 c	1.3 b	7.4 a	2.6 a	2.0 a	2.4 a	7.4 a	6.7 a	0.2 b
3	0.0 b	0.0 b	8.4 a	3.7 a	4.6 a	1.2 b	6.3 a	5.4 a	0.0 b
	Из них укоренилось в условиях <i>in vivo</i> , %								
1	100	100	100	0	24.1	51.3	0	0	-
2	-	100	100	0	35.0	45.8	0	0	0
3	-	-	100	37.8	32.6	50.0	0	0	-

Варианты, отмеченные одной и той же строчной буквой (сравнение числа растений-регенерантов в зависимости от способа посадки в пределах одного типа корневой системы и одного генотипа), не имеют значимых различий с вероятностью 95% согласно тесту множественного ряда Дункана (MRT). Среднее по трем независимым сериям опытов. Нормальная корневая система – I тип; корнеплодоподобные структуры (КС) с вторичными опухольями (ВО) со слабой корневой системой – II тип; КС с ВО без корней – III тип; Способ посадки №1 – посадка микропобега с погружением гипокотила на 2-3мм в твердую питательную среду MS; Способ посадки №2 – посадка микропобега в лунку, сделанную в питательной среде с помощью пинцета в стерильных условиях; Способ посадки №3 – посадка микропобега на поверхность твердой питательной среды для регенерации без заглубления.

Третий способ пересадки способствовал формированию мощной корневой системы непосредственно из базальной части микропобегов у 60–80% растений в зависимости от генотипа (Рисунок 23 А, В, С, Е, Таблица 7). Причем в последнем варианте пересадки растений-регенерантов, в котором наблюдалось аномальное развитие базальной части, КС с ВО формировались небольшого размера (до 3-4 мм в диаметре, Рисунок 23 Г) и корни на их поверхности образовывались более интенсивно, чем в аналогичных

структурах большого размера в других вариантах эксперимента (Рисунок 20 С, Д; 23 F).



Рисунок 23 - Корневые системы ДН-растений редиса европейского при третьем варианте пересадки на твердую безгормональную среду МС: А, В, С, Е – нормальная корневая система; D – структура КС с ВО маленького размера 3-4 мм в диаметре, с развитой корневой системой (пригодной для адаптации *in vivo*); F– структура КС с ВО размером более 4 мм в диаметре со слаборазвитой корневой системой (не пригодной для выживания в *in vivo*) ; G – полная диссекция КС с ВО перед повторной пересадкой

Соответственно, растения с небольшими КС с ВО и более развитой корневой системой имели больше шансов адаптироваться после пересадки в почву (Таблица 7).

Таким образом, третий способ пересадки микропобегов редиса европейского увеличивал долю растений, успешно прошедших адаптацию и укоренившихся в естественных условиях, до 80–90% (Рисунок 24).

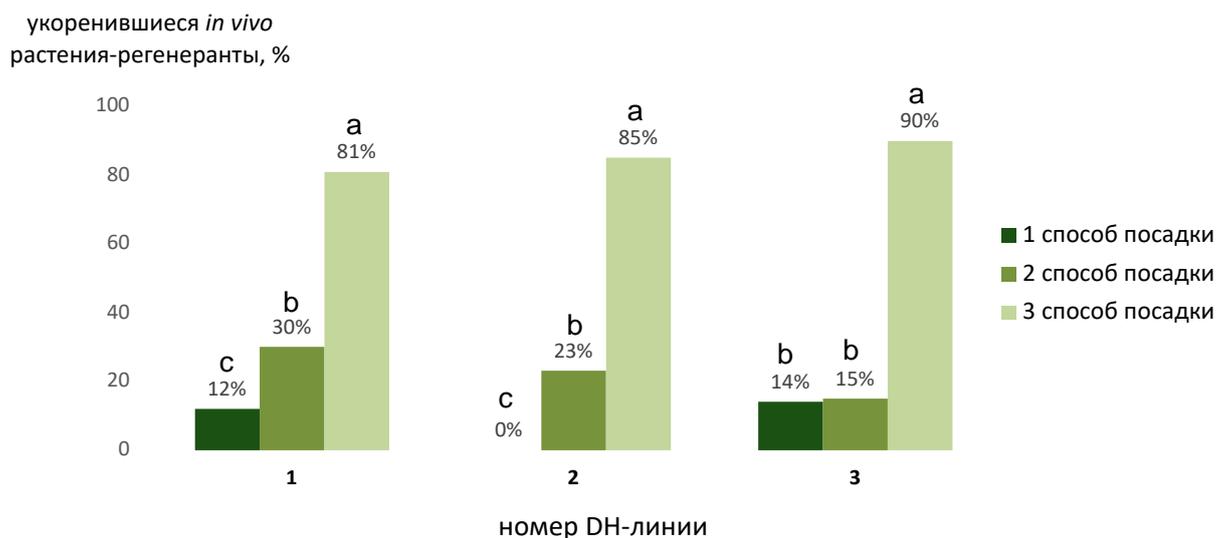


Рисунок 24 -Процент укоренившихся растений-регенерантов ДН-линий в условиях *in vivo* в зависимости от варианта пересадки микробегов в условиях *in vitro* (среднее по трем независимым сериям опытов): 1 способ посадки – посадка микробегов с погружением гипокотыля на 2-3мм в твердую питательную среду MS; 2 способ посадки – посадка микробегов в лунку, сделанную в питательной среде с помощью пинцета в стерильных условиях; 3 способ посадки – посадка микробегов на поверхность твердой питательной среды для регенерации без заглабления. Столбчатая диаграмма построена по средним по трем независимым опытам. Столбцы диаграммы с одинаковой буквой (сравнение % укорененных растений-регенерантов в зависимости от способа посадки в пределах одной ДН-линии) достоверно не различаются с вероятностью 95% согласно тесту множественного ряда Дункана (MRT).

3.3.3.2 Влияние последовательных пересадок микробегов редиса европейского с иссечением корнеплодоподобных структура в области гипокотыля при культивировании на твердой безгормональной среде MS

Несмотря на то, что в предыдущей серии опытов удалось значительно повысить эффективность укоренения микробегов редиса европейского за счет модификации техники посадки, доля микробегов, которые формировали довольно крупные КС с ВО со слабыми или отсутствующими корнями, все еще сохранялась. В связи с этим представляло интерес разработать методику укоренения растений-регенерантов с уже сформированными КС с ВО.

Мы предположили, что для повторной попытки инициирования корнеобразования, необходимо частичное или полное (Рисунок 23 - G) удаление аномальных структур, поскольку даже при длительном

культивировании у растений-регенерантов с КС и ВО не наблюдалось изменений в мощности или индукции корневой системы.

В результате проведенных экспериментов было отмечено, что при частичном иссечении ткани КС с ВО продолжали разрастаться, не изменяя своей спецификации - корнеобразования не происходило. У растительных эксплантов, где ткани КС с ВО были полностью удалены, образование корневой системы наблюдалось примерно в 50% случаев уже после первой пересадки с иссечением аномальных структур, независимо от того, каким способом они были пересажены на питательную среду ранее (Рисунок 25).

Было установлено, что у растений, у которых базальная часть микропобегов была склонна к повторному разрастанию, многократное иссечение КС и ВО с пересадкой на поверхность безгормональной питательной среды почти всегда приводило к формированию нормальной корневой системы.

В результате последовательных пересадок с иссечением аномальных структур, около 90% всех микропобегов, склонных к разрастанию базальной части, сформировали мощную корневую систему и успешно укоренились в условиях *in vivo* (Рисунок 25).

Таким образом, разработанная методика пересадки (в среду без заглубления) в сочетании с последовательным удалением КС с ВО улучшает корнеобразование у микропобегов редиса европейского и увеличивает процент растений, успешно прошедших адаптацию в условиях *in vivo* с 0–14% до 95–98%.

Предложенная техника пересадки в сочетании с удалением аномальных структур оказалась эффективной и для четвертой ДН-линии, которая не участвовала в серии экспериментов по отработке технологических этапов укоренения. Девять из одиннадцати растений смогли укорениться и адаптироваться в условиях *in vivo*.

укоренившиеся *in vivo*
растения-регенеранты, %

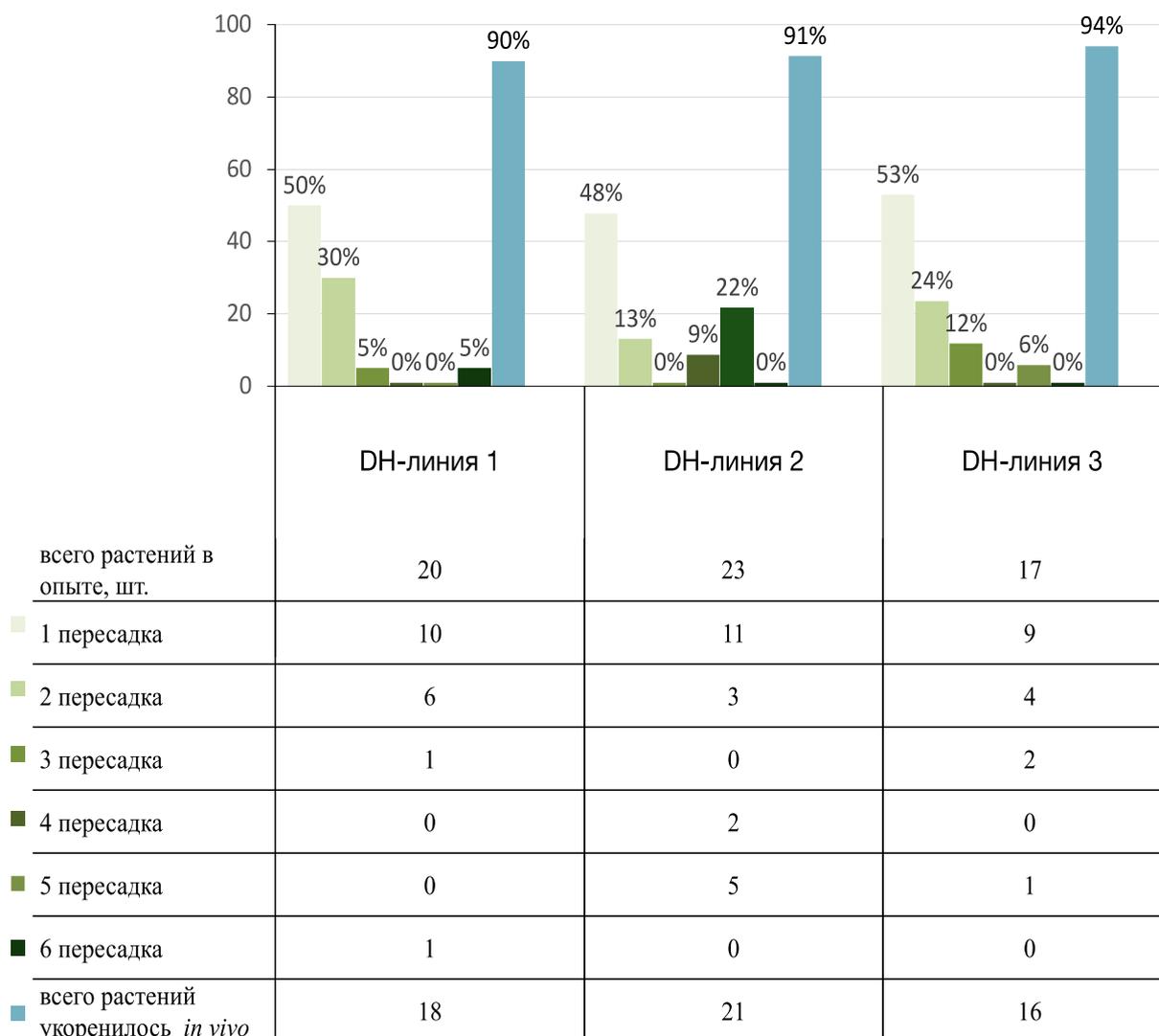


Рисунок 25 - Число укоренившихся в условиях *in vivo* микропобегов ДН- линий редиса европейского с нормально развитой корневой системой в зависимости от числа пересадок после проведения последовательных пересадок с диссекцией КС и ВО

3.3.3.3 Изучение эффективности ризогенеза микропобегов редиса европейского при культивировании на жидкой питательной среде с последовательными пересадками с иссечением корнеплодоподобных структура в области гипокотилия

Культивирование микропобегов редиса европейского на бумажных мостиках в жидкой среде снижало относительный процент образования КС и ВО и повышало процент микропобегов с нормальным корнеобразованием (Таблица 8).

Таблица 8 - Типы корневых систем ДН-растений, формирующихся при культивировании микропобегов на мостиках в жидкой питательной среде МСм с добавлением 0,1 мг/л кинетина и 2% сахарозой и показатели адаптации растений-регенерантов в условиях *in vivo* в зависимости от типа корневой системы и генотипа микропобегов

ДН- линия №	Всего микропобегов шт.	Микропобеги с различным типом корневой системы						Итого укоренилось в условиях <i>in vivo</i> , %
		I тип		II тип		III тип		
		шт.	%	шт.	%	шт.	%	
1	19	10	52.6	7	36.8	2	10.5	
2	20	10	50.0	6	30.0	4	20.0	
3	15	8	53.3	7	46.7	0	0.0	
4	8	5	62.5	1	12.5	2	25.0	
Из них укоренилось в условиях <i>in vivo</i>								
1	15	10	100.0	5	71.4	0	0.0	78.9
2	15	10	100.0	5	83.3	0	0.0	75.0
3	14	8	100.0	6	85.7	0	0.0	93.3
4	6	5	100.0	1	-	0	0.0	75.0

Нормальная корневая система – I тип; корнеплодоподобные структуры (КС) с вторичными опухольями (ВО) со слабой корневой системой – II тип; КС с ВО без корней – III тип.

Более того, КС с ВО на мостиках были в основном маленькими и часто формировали развитую корневую систему (Рисунок 26 А), благодаря чему смогли адаптироваться *in vivo*. Эффекты, полученные при культивировании на мостиках, были аналогичны результатам, полученным при культивировании микропобегов на твердой безгормональной среде МС с пересадкой на поверхность питательной среды без заглубления.

Для растений, не показавших развития корневой системы, пригодной для адаптации *in vivo*, а также растений с КС и ВО без корней, мы также применяли диссекции КС с ВО с повторным культивированием до образования нормальной корневой системы (Рисунок 26 С). Однако в микропобегах на жидкой среде с бумажными мостиками наблюдалось выраженное апикальное доминирование и удлинение междоузлий (Рисунок 26 С). Поэтому растений с КС и ВО и апикальным доминированием при препарировании удаляли не

только разросшуюся базальную часть микропобега, но и все части растительного экспланта на 2-3 мм ниже точки роста (Рисунок 26 В). В результате многократного удаления (до шести раз) КС с ВО удалось укоренить десять из двенадцати растений-регенерантов, которые первоначально формировали КС и ВО со слабыми или отсутствующими корнями.



Рисунок 26 - Корневые системы ДН-растений редиса европейского в пробирках на мостиках из фильтровальной бумаги в жидкой среде МСм с 0,1 мг/л кинетина: А – структура КС с ВО маленького размера с хорошо развитой корневой системой; В – микропобег после отсечения всех частей микропобега ниже точки роста на 2–3 мм; С – растение-регенерант с ярко выраженным апикальным доминированием и удлиненными междоузлиями

Таким образом, эффективность укоренения растений-регенерантов редиса европейского при выращивании с использованием многократного иссечения, как на твердой безгормональной среде при технике посадки растений-регенерантов без заглабления, так и на бумажных мостиках в жидкой среде, достигает 95–98%, в зависимости от генотипа растения-донора.

3.3.3.4 Преимущества и недостатки культивирования микропобегов редиса европейского на твердой и с жидкой средах, рекомендации по оптимизации укоренения

Как мы отмечали ранее, эти два способа культивирования микропобегов редиса европейского сопоставимы по эффективности корнеобразования у растений-регенерантов и позволяют решить главную проблему - укоренение

растений с КС. Тем не менее, они имеют свои особенности, которые заслуживают внимания, начиная с этапа подготовки среды. Работа с твердой средой не так трудоемка, как с жидкой, где процесс вырезания мостиков из фильтровальной бумаги и помещения их в пробирки занимает много времени. Однако, как мы предполагаем, на жидких средах с мостиками питание растений происходит более равномерно. Питательные вещества находятся в более доступной для растений жидкой форме, а благодаря их постепенному подъему по фильтровальной бумаге, не происходит локального снижения концентрации питательных веществ в области контакта среды с базальной частью растения. Это позволяет выращивать растения в одной пробирке без пересадки до трех месяцев. На твердой среде растением поглощаются питательные элементы в непосредственной близости от него. В результате концентрация питательных веществ вокруг растений локально снижается, что может привести к голоданию и общему ухудшению состояния растений. Поэтому выращивание регенерированных растений на твердой среде без пересадки возможно не более трех-четырех недель.

Другим существенным различием между анализируемыми методами культивирования является их влияние на способность растений формировать побеги. Так, на твердых средах отмечено более интенсивное образование побегов второго порядка, благодаря чему растения-регенеранты можно эффективно размножать микроклонально и получать большое количество идентичных эксплантов. Это удобно для проведения различных экспериментов, а также необходимо для прикладного использования ДН-растений в селекционном процессе. Культивирование в жидкой среде не позволяет размножать растения в больших количествах из-за более выраженного апикального доминирования.

Также стоит отметить различия между твердой и жидкой средой с точки зрения повреждения корневой системы растений при пересадке. При извлечении растения из твердой питательной среды корни повреждаются сильнее, особенно в зоне поглощения, что вызывает стресс у растения, и после

пересадки ему требуется больше времени для адаптации. Кроме того, во время укоренения *in vivo*, если корни плохо очищены от агара/фитогеля, могут возникнуть проблемы, связанные с плохим контактом корней с почвой. А также с тем, что остатки питательной среды служат благоприятным субстратом для интенсивного развития почвенной микробиоты, в том числе патогенов, присутствующих в ее композиции. В результате растения могут поражаться корневой гнилью и другими заболеваниями. В случае с жидкими средами этих проблем не наблюдается. Даже если корневая система растения проросла в “мостик”, растение можно высаживать, не отделяя его от фильтровальной бумаги, поскольку это не влияет на успешность укоренения и адаптацию.

Учитывая вышесказанное, мы предлагаем сочетать эти два вида выращивания для оптимизации этапа укоренения. На первом этапе укоренения мы рекомендуем высаживать растения на твердую питательную среду, чтобы иметь возможность размножить их микроклонально. Затем укоренившиеся растения следует высаживать на мостики с жидкой средой, чтобы уменьшить количество пересадок до того, как растение будет готово к укоренению в условиях *in vivo*, а также уменьшить механические повреждения и повреждения корневой системы при переносе укоренившегося растения в почву.

3.3.3.5 Теоретические обоснования разработанных модификаций этапа укоренения микропобегов редиса европейского

Наше исследование показывает, что при разработке методов биотехнологии для ранее невосприимчивых культур можно столкнуться с их разнообразными и поистине удивительными особенностями. При этом трудности возникают на тех этапах, которые для других культур давно отработаны и не преподносят сюрпризов. Поиск решений для преодоления проблем в рамках конкретного вида, на ранних стадиях, чаще всего происходит эмпирически, а полученные результаты еще предстоит изучить, чтобы понять механизмы их действия.

Этап укоренения регенерированных ДН растений редиса европейского был одним из основных, который ограничивал эффективность ИМС технологии. Это связано с биологическими особенностями редиса. Причем дело не только в том, что редис является корнеплодом, в отличие от основной массы культур семейства *Brassicaceae* (рапс, белокочанная капуста и др.), для которых уже разработана ИМС технология, но и в том, что у диких предков редиса корнеплода не было. Это означает, что съедобный корнеплод у культурного редиса - довольно молодой признак, появившийся в результате отбора мутантных форм с нарушенным контролем деления клеток (Buzovkina, Lutova, 2007). Соответственно, все сорта и гибриды редиса насыщены различными мутациями, и при инбридинге, а тем более у ДН-растений, проявление неожиданных отклонений в развитии фенотипа вполне естественно.

Первые записи об аномалиях корнеплодов у инбредных линий редиса относятся к 1967 году, когда было отмечено спонтанное образование опухолей на корнеплодах после 2–3 поколений инбридинга (Narbut, 1967). Впоследствии редкость такой аномалии сделала редис удобной модельной культурой для изучения генетической регуляции дифференцировки и пролиферации клеток. В связи с этим на данный момент существует информация и гипотезы о возможных механизмах индукции подобных образований, которые описаны в ряде обзоров (Ludmila, Irina, 2019; Dodueva et al., 2020).

Интерпретация наших данных в этом аспекте несколько затруднена тем, что в результате изучения представленного в литературе материала мы не пришли к единому мнению о том, по каким критериям можно визуально отличить КС от ВО, сформированных в *in vitro*. В некоторых статьях структуры, внешне напоминающие те, которые мы наблюдали в наших исследованиях, описывались как КС с вторичными ВО, в то время как в других источниках они описывались как структуры КС без указания на наличие ВО на их поверхности. Интересно, что в литературе нет данных о спонтанном

образовании КС или ВО на безгормональных средах в культуре *in vitro*. Образование таких структур было отмечено только в ответ на среду с высокими концентрациями цитокининов (Buzovkina et al., 1993; П'ина et al., 2006; Buzovkina, Lutova, 2007). Только сформированные КС, отрезанные от растения-донора, были способны к гормонезависимому росту в безгормональной среде. Это означает, что индукция и последующий рост КС и/или ВО происходят в разных условиях, а аномалии, которые мы наблюдали у ДН-растений редиса европейского при культивировании на безгормональной среде описаны впервые.

По мнению ряда исследователей, формирование структур КС и ВО регулируется разными генами (Buzovkina et al., 1993). Тем не менее, оба эти процесса связаны с нарушением дифференцировки и пролиферации клеток на фоне дисбаланса фитогормонов, поэтому все предложенные нами и описанные в литературе гипотезы о причинах подобных образований можно считать подходящими для обоих типов аномалий.

В литературе описано несколько возможных причин спонтанного образования опухолей и других аномальных структур у редиса (П'ина et al., 2006). Среди них наиболее распространенная версия - дисбаланс эндогенных гормонов со сдвигом в сторону цитокининов, а также их высокое абсолютное содержание (Matveeva et al., 2004). Согласно теории, изложенной Ильиной и другими исследователями (П'ина et al., 2006), если уровень эндогенных гормонов в растениях повышен, то при добавлении цитокининов в питательную среду происходит некроз котиледонных эксплантов, что мы наблюдали в наших исследованиях по подбору питательных сред для первого этапа регенерации, где на среде с ТДЗ эмбриониды подвергались некрозу в течение 3–5 дней. Более того, в наших экспериментах на микропобегах редиса, полученных в ИМС культуре, КС с опухолями формировались на безгормональной среде, что означает, что эндогенный дисбаланс фитогормонов был настолько выражен, что экзогенное вмешательство не требовалось. Соответственно, для формирования нормальной корневой

системы необходимо сместить баланс фитогормонов в сторону ауксинов. Исходя из этого, мы смогли выдвинуть некоторые идеи о возможных механизмах влияния разработанных нами технологических приемов и модификаций на эффект укоренения растений-регенерантов.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что нормальное укоренение ДН-растений в условиях *in vitro* облегчается, если высаживать микропобеги строго на поверхность питательной среды, не заглубляя их. В связи с этим можно выделить три необходимых параметра для успешного укоренения микропобегов редиса: небольшая площадь контакта базальной части с поверхностью твердой питательной среды, хорошая аэрация тканей базальной части микропобега, а также частичное подсушивание микропобегов в базальной части. Пока неизвестно, что именно, как и в какой степени каждый из параметров влияет на процессы корнеобразования ДН-растений редиса, но в совокупности они обеспечивают успешное укоренение удвоенных гаплоидов, полученных в культуре ИМС.

Известно, что цитокинин является гормоном благополучия корней, то есть сигнализирует растению, что корневая система работает хорошо и не требует реорганизации. В нашем случае, из-за уменьшения площади контакта базальной части микропобегов с твердой питательной средой, в тканях регенерированных растений, вероятно, возникает дефицит воды и питательных веществ. Вызванная стрессом регуляция влияет на цитокинин и ауксин противоположным образом: стимулируется выработка ауксина, который, в свою очередь ингибирует синтез цитокининов (Nordström et al., 2004; Tanaka et al., 2006; Cheng et al., 2013; Kolachevskaya et al., 2017; Zhang et al., 2018).

Соответственно, баланс фитогормонов смещается в сторону ауксинов, что способствует индукции корнеобразования. Напротив, при большой площади контакта базальной части микропобега с питательной средой его ткани могут перенасыщаться питательными веществами, а поскольку цитокинин действует как негативный регулятор поглощения минеральных

питательных веществ при их избытке, концентрация цитокининов возрастает (Martín et al., 2000; Maruyama-Nakashita et al., 2004; Sakakibara, 2006; Kiba et al., 2011), на фоне чего клетки начинают хаотично делиться и формировать КС с ВО.

Вторым условием укоренения является хорошая аэрация тканей базальной части микропобега. Когда базальная часть погружена в питательную среду (1 способ пересадки) или в лунку (2 способ пересадки), вокруг тканей может локально образоваться гипоксия. Тогда как расположение базальной части на поверхности питательной среды без заглабления в нее способствует повышению уровня экзогенного кислорода вокруг тканей, что может косвенно повысить уровень кислорода в тканях базальной части. Недавние исследования влияния гипоксических условий на формирование вторичных корней показали, что уровень экзогенного и эндогенного кислорода может влиять на передачу сигналов ауксина. Это связано с чувствительными к кислороду факторами транскрипции ERF-VII, которые в условиях гипоксии связываются с индуцируемыми ауксином генами LBD16 и LBD18 и подавляют их экспрессию, тем самым ингибируя инициацию формирования корневой примордии (Licausi et al., 2011; Gibbs et al., 2015; Shukla et al., 2019). Т. е. можно предположить, что расположение базальной части микропобега редиса европейского на поверхности питательной среды за счет повышения уровня аэрации усиливает сигналы ауксина, тем самым нивелируя фитогормональный дисбаланс.

И, наконец, элемент частичного подсушивания базальной части микропобегов. Известно, что ауксин синтезируется в апикальных меристемах побегов и транспортируется сверху вниз. Тогда можно предположить, что вследствие высыхания базальной части, между живыми клетками и окружающей средой образуется барьер из слоя мертвой ткани. При движении сверху вниз ауксин может локально накапливаться в тканях, прилегающих к такому барьеру, не имея возможности диффундировать во внешнюю среду,

что в свою очередь способствует смещению баланса фитогормонов в сторону ауксинов.

Все выводы и предположения аналогичны для культивирования микропобегов редиса на жидкой среде МСм с мостиками.

В результате можно выстроить следующую логическую цепочку: небольшая площадь контакта с питательной средой снижает синтез цитокининов и "вызывает" приток ауксинов из апикальной меристемы побега. Подсушивание тканей способствует локальному накоплению ауксинов в базальной части микропобегов. А хорошая аэрация усиливает генный ответ на ауксины, так что даже небольшие концентрации оказывают ощутимый эффект. В результате сочетания всех этих факторов баланс фитогормонов смещается в сторону ауксинов, что индуцирует образование корней.

Что касается эффективности полного иссечения КС для укоренения растений-регенерантов, то в литературе имеются данные о том, что во время иссечения тканей в области повреждения благодаря самоорганизующемуся взаимодействию ауксина и цитокинина настройки идентичности раневых клеток могут "сбрасываться" и подаваться новые позиционные сигналы оставшимся делящимся клеткам (Efroni et al., 2016). Также при иссечении образуется раневая поверхность, в клетках которой, в ответ на стресс, начинает активно вырабатываться жасминовая кислота (ЖК). Известно, что ЖК способствует образованию корней в эксплантах листьев арабидопсиса (Zhang et al., 2019). ЖК активно вырабатывается в течение 10–30 минут после травмы, после чего обнаруживается ген ERF109, который идентифицирован как ключевой фактор в регенерации корней *de novo*. Кроме того, ген ERF109 активирует ANTHRANILATE SYNTHASE $\alpha 1$ (ASA1), который в свою очередь кодирует один из ферментов, участвующих в биосинтезе триптофана, а триптофан является предшественником ауксина (Liu et al., 2014; Zhang et al., 2019; Zhou et al., 2019). А это значит, что ранение путем отсечения КС с ВО увеличивает синтез ауксина и тем самым приближает нас к главной задаче - восстановлению баланса фитогормонов. Стоит также отметить, что при

анализе содержания цитокининов в опухолевых и неопухолевых линиях редиса было обнаружено, что наибольшие различия в концентрации цитокининов были в корнях растений (Matveeva et al., 2004). Это говорит о том, что срезание частей с повышенным содержанием цитокининов может иметь положительный эффект, снижая их концентрацию в базальной части микропобегов.

Таким образом, в результате проведенной работы был отработан этап укоренения растений-регенерантов, полученных в культуре микроспор *in vitro* редиса европейского. В качестве дальнейшего направления исследований было бы интересно определить эндогенное содержание гормонов в аномальных образованиях КС с ВО в зависимости от метода их культивирования. Это поможет лучше понять механизм влияния предложенных модификаций на образование корней *in vitro* и укоренение *in vivo*. Это также даст представление о том, какой эндогенный контроль и баланс фитогормонов соответствует появлению отклонений в фенотипе растений в виде КС с ВО.

3.4 Определение плоидности растений-регенерантов

Анализ полученных растений-регенерантов показал, что около 70% растений были удвоенными гаплоидами, около 5% гаплоидами, около 20% растений с нарушениями плоидности -миксоплоидия, анеуплоидия растения с эндо полиплоидией и около 5% -полипоиды. Таким образом, для растений-регенерантов редиса европейского не требуется дополнительный этап удвоения набора хромосом антимиотическими агентами.

В одной из линий растений-регенерантов были обнаружены октоплоиды, которые при длительном культивировании на безгормональной среде *in vitro* со временем кратно уменьшали плоидность до $2n$. Растения, пересаженные в условия *in vivo* в октоплоидном состоянии, были маленького размера и с трудом достигали фазы цветения, цветков было мало и семена с таких растений получить не удалось. Растения-регенеранты, пересаженные в условия *in vivo* в тетраплоидной форме, напротив, были мощными, обильно

цвели и легко завязывали семена при самоопылении (Рисунок 27), однако их семенное потомство R_0 было диплоидным.



Рисунок 27 - Разрез стручка с семенами, полученного при самоопылении тетраплоидной линии редиса европейского, полученной в культуре микроспор *in vitro*

Растения той же линии, достигшие уровня ploидности $2n$ в условиях *in vitro* при пересадке в условия *in vivo* были потеряны ввиду заражения ростовой камеры вредителями, поэтому данных по величине габитуса, цветению и способности завязывать семена для таких растений - нет.

У линии растений-регенератов с гексоплоидным набором хромосом были обнаружены проблемы с органогенезом. Эмбриоды этой линии разрастались в каллус, продуцируя микропобеги с очень мелкими листьями, которые при отделении от каллуса и повторной посадке плохо развивались.

Гаплоидные формы растений-регенерантов были ослабленными, плохо цвели и не завязывали семена, часто гаплоиды зацветали в пробирках в условиях *in vitro*.

Зависимость между габитусом растений, способностью завязывать семена при опылении и ploидностью миксоploидов и диплоидов не выявлено, однако семенное потомство R_0 не зависимо от ploидности родительских растений всегда были диплоидами.

Редис европейский интересен в качестве объекта исследований ploидности растений и ее лабильности, и необходимы дальнейшие исследования в этой области.

Растения-регенеранты анализировались на ploидность различными методами: методом проточной цитометрии клеточных ядер, методом подсчета числа хромосом с использованием пропионо-лакмоидного метода окраски, методом подсчета числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Методы выбирались в зависимости от технических возможностей и целей, так подсчет хромосом с использованием пропионо-лакмоидного метода окраски, как прямой метод определения ploидности, использовали рандомизированно для подтверждения достоверности полученных данных другими методами, а проточную цитометрию клеточных ядер или подсчет числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц использовали в зависимости от технических возможностей на время проведения анализа. На рисунках 28 и 29 представлены примеры полученных данных с помощью этих методов.

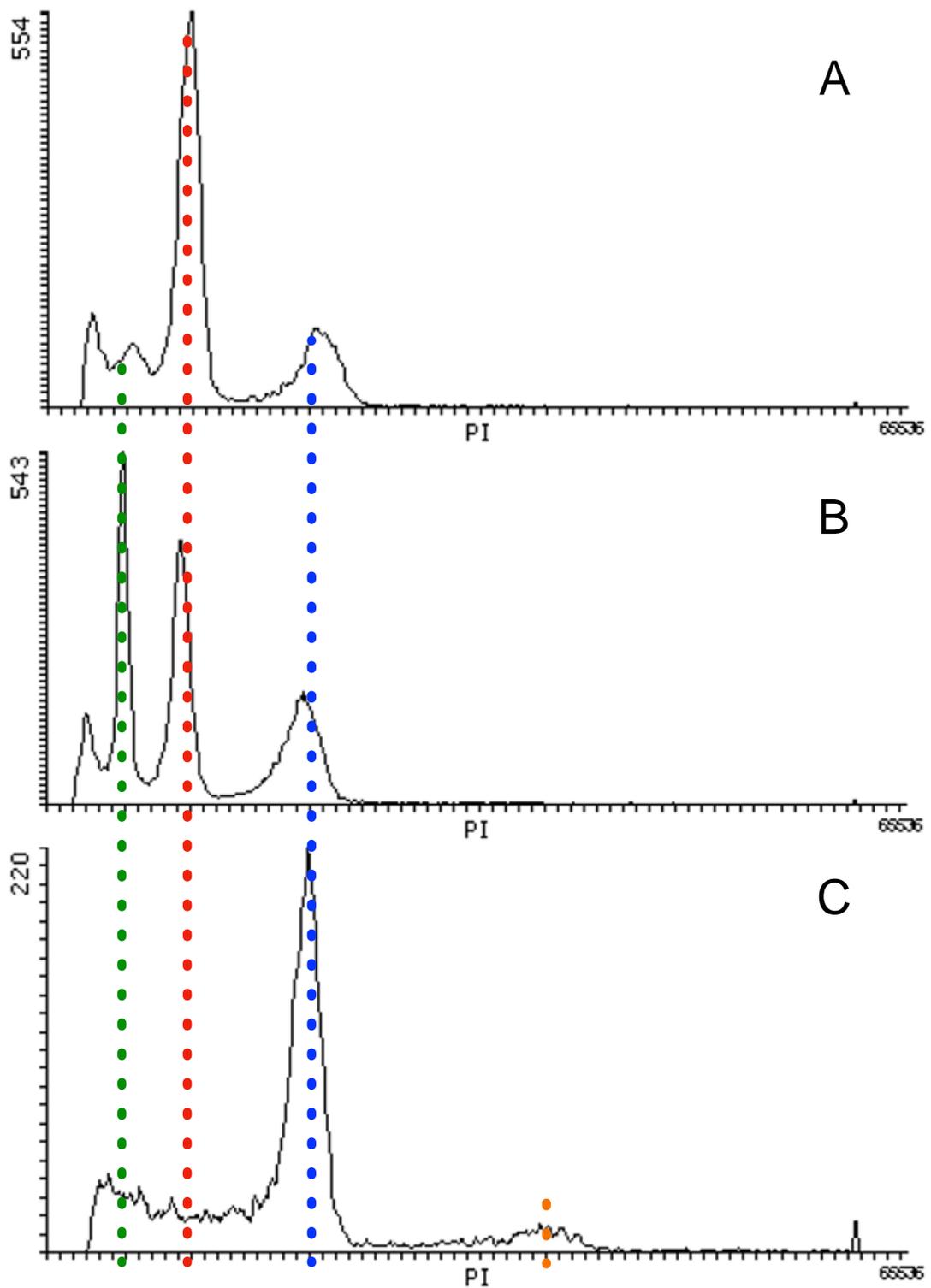


Рисунок 28 - Гистограммы, полученные при определении ploидности растений-регенерантов редиса европейского методом проточной цитометрии клеточных ядер: А- диплоид $2C=2x=18$, В-микосплоид, С- тетраплоид $2C=2x=36$. Пунктирными линиями показаны: зелена- $1n$ набор хромосом, красная- $2n$ набор хромосом, синяя – $4n$ набор хромосом, оранжевая $8n$ -набор хромосом.

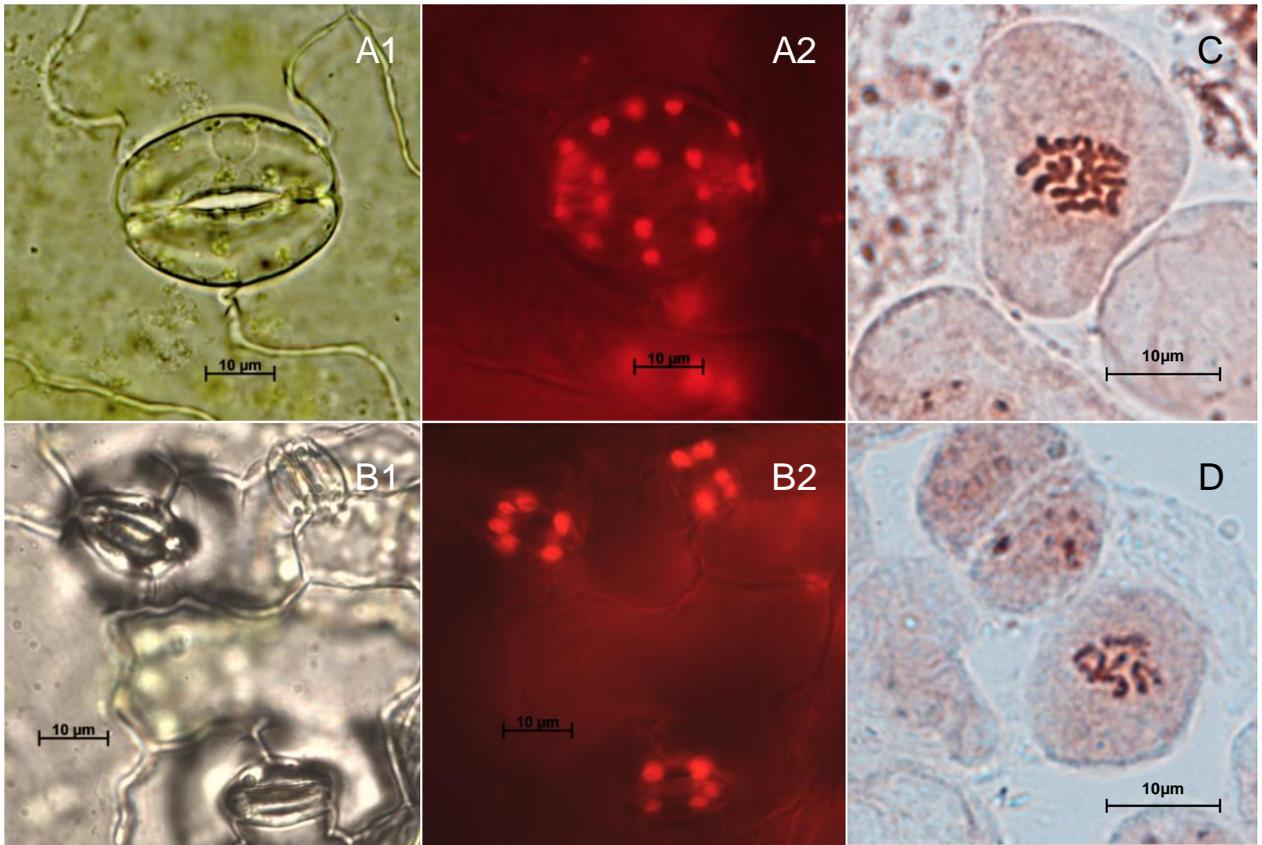


Рисунок 29 - Изображения, полученные при определении пloidности растений-регенерантов редиса европейского методами подсчета числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и подсчета числа хромосом с использованием пропионо-лакмоидного метода окраски. A1, A2, C -диплоид $2C=2x=18$, B1, B2, D- гаплоид $2C=x=9$; A, B-метод подсчета числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (под светом флуоресцентной лампы – A2, B2 и без – A1, B1); C, D- метод подсчета числа хромосом с использованием пропионо-лакмоидного метода окраски.

Выявлено, что для редиса европейского свойственна высокая степень спонтанного кратного увеличения набора хромосом и дополнительного этапа удвоения набора хромосом антимиотическими агентами не требуется. Анализ полученных растений-регенерантов методом проточной цитометрии клеточных ядер показал, что примерно в 70 % случаев растения-регенеранты редиса европейского являются удвоенными гаплоидами. Гаплоидный набор хромосом обнаруживается менее, чем в 10% случаев. Также среди растений-регенерантов редиса европейского встречаются миксо и анеуплоиды. Обнаружено, что пloidность растений-регенерантов не стабильна.

Были проведены наблюдения за октоплоидными растениями-регенерантами на этапе регенерации *in vitro*. Интересно, что в процессе культивирования таких растений кратность ploидности уменьшалась с течением времени и постепенно изменялась до $4n$ и $2n$ соответственно. Способность завязывать семена зависела от ploидности, наиболее продуктивными по семенному потомству были растения с ploидностью $4n$, однако полученные из них растения R1 имели ploидность $2n$. Растения из семенного потомства, полученного от самоопыления миксоploидов также имели ploидность $2n$ ($2n = 2c = 18$). Пока это предварительные результаты, и они требуют проведения дальнейших исследований для их фундаментального обоснования и наработки статистических данных.

У удвоенных гаплоидов и некоторых миксоploидов самоопылением было получено семенное потомство, в котором все растения R1 имели диплоидный набор хромосом ($2n=2c=18$).

3.5 Практические результаты

В результате работы из полученных в культуре изолированных микроспор растений по хозяйственно-ценным признакам было выделено три ДН-линии редиса европейского и получено их семенное потомство R_0 , которое передано селекционерам ФГБНУ ФНЦО (Рисунок 30,31,32). Две из этих линий имеют практически овальную форму корнеплода и равномерную насыщенную бордово-красную окраску внешних покровов, но отличаются по окраске внутренней части: у ДН-линии «Веня» - она частично окрашена, у ДН-линии «Персей» - чисто белая. Третья ДН-линия «Жегалов» имеет округлую форму и розовую окраску корнеплодов с белым кончиком, и белую нежную мякоть. Иммунологическая оценка этих линий выявила более высокую их устойчивость к бактериальной гнили относительно исходных родительских форм. Данные линии уже включены в процесс гибридизации и в настоящее время идет их регистрация и патентование (поданы заявки).



Рисунок 30 - ДН-линия редиса европейского «Веня», полученная из сортообразца «Тепличный Грибовский» в культуре изолированных микроспор *in vitro*



Рисунок 31 - ДН-линия редиса европейского «Персей», полученная из сортообразца «Тепличный Грибовский» в культуре изолированных микроспор *in vitro*



Рисунок 32 - ДН-линия редиса европейского «Жегалов», полученная из сортообразца «РБК» в культуре изолированных микроспор *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги проведенной исследовательской работы, можно выделить следующие важнейшие результаты.

1. На этапах сбора материала с донорного растения, пробоподготовки, изоляции микроспор в культуру *in vitro* и индукции эмбриогенеза:

- показана генотип-специфичность линейного размера бутона редиса европейского с оптимальными стадиями развития микроспор для ИМС культуры;
- выявлена высокая неоднородность популяционного состава микроспор по стадиям развития в бутонах редиса европейского, что может являться одной из главных причин низкой отзывчивости редиса европейского к ИМС технологии, так как при снижении в культуре процента восприимчивых к эмбриогенезу стадий микроспор до 30% и ниже, образования эмбриоидов не происходит;
- разработан оригинальный метод изоляции микроспор, который позволяет повысить урожайность эмбриоидов редиса европейского в среднем в 2,6 раза в сравнении с стандартным методом изоляции (оформлена заявка на патент на изобретение «Модифицированный метод изоляции микроспор в культуре микроспор *in vitro* для семейства *Brassicaceae*»);
- подобрана оптимальная продолжительность температурного шока 32°C для редиса европейского, которая составляет 1–2 суток в зависимости от генотипа и впервые показана высокая эффективность модифицированной среды MSm с 13 % сахарозой и 500 мг/л гидролизата казеина для индукции эмбриогенеза редиса европейского;

2. Впервые изучены, описаны и фотодокументированы все этапы эмбриогенеза редиса европейского в культуре микроспор *in vitro*. Получены новые фундаментальные знания о паттернах формирования эмбриогенных структур ранее не описанные в литературе (упорядоченные деления в микроспорах с интактными экзинами, прикрепление суспензоров к апикальным частям эмбриоидов и формирование апикально-базальной оси

эмбриоида вдоль оси суспензорных нитей при формировании эмбриоида в середине филамента).

3. На этапах регенерации эмбриоидов, индукции ризогенеза микропобегов *in vitro*, адаптации и укоренения растений-регенрантов *in vivo*:

- выявлено, что на этапе регенерации прямого прорастания эмбриоидов не происходит и для индукции вторичного эмбриогенеза и побегообразования в питательные среды следует добавлять БАП и ГК;
- на этапе индукции корнеобразования в условиях *in vitro* обнаружена биологическая особенность микропобегов редиса европейского - высокая склонность при использовании стандартной методики укоренения к образованию корнеплодоподобных структур (опухолеобразование) в области гипокотыля, что препятствует формированию нормальной корневой системы и может приводить к полной потере растений;
- показано отсутствие стимулирующего эффекта добавления ауксинов в твердую питательную среду на корнеобразование у микропобегов редиса европейского;
- разработан оригинальный методический подход повышения эффективности ризогенеза микропобегов редиса европейского, основанный на технике посадки микропобегов на агаризованную среду для регенерации, который позволил повысить долю растений, прошедших адаптацию в условиях *in vivo*: с 0–14% (при стандартной методике укоренения) до 81–90%;
- для растений редиса европейского с повышенной склонностью к опухолеобразованию доказана эффективность применения последовательных пересадок микропобегов с иссечением корнеплодоподобных структур до образования нормальной корневой системы, что в совокупности с разработанным способом посадки микропобегов позволило повысить процент успешно укоренившихся растений в условиях *in vivo* до 95–98%.
- впервые для семейства *Brassicaceae* показана перспективность использования жидкой питательной среды МСм с добавлением 0,1 мг/л кинетина на этапе

укоренения микропобегов с целью снижения образования корнеплодоподобных структур в области гипокотыля, что позволяет повысить процент адаптированных растений в условиях *in vivo* до 75–93% .

4. Выявлена высокая склонность растений-регенерантов редиса европейского к спонтанному удвоению набора хромосом, в связи с чем отсутствует необходимость в дополнительном трудоемком этапе - обработке токсичными антимиотическими агентами.

5. В процессе выполнения диссертационной работы получены новые фундаментальные знания о биологии андрогенеза редиса европейского, найдены оригинальные методические решения и модифицированы элементы ДН технологии, разработан протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для редиса европейского и впервые в мире получены ДН-линии этой культуры.

Рекомендации по практическому применению результатов диссертационной работы

Для успешного получения удвоенных гаплоидов редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro* рекомендуется:

- Рекогносцировочное определение оптимального размера бутонов для каждого генотипа редиса европейского перед этапом изоляции.

- Изоляцию микроспор следует проводить разработанным методом путем поперечного разреза каждого бутона с последующей изоляцией на ротационном шейкере Mini-Centrifuge/Vortex FV-2400 Micro-Spin в стерильных пробирках с жидкой питательной средой NLN-13 в течение 1–30 секунд (время экспозиция подбирается индивидуально).

- В качестве среды для индукции эмбриогенеза рекомендуется использовать питательные среды NLN-13 или MSm-13 (подбирается индивидуально для каждого генотипа).

- Оптимальная продолжительность термообработки культуры микроспор при 32°C для редиса европейского составляет 1–2 суток (подбирается эмпирически для каждого генотипа).

- Оптимальные среды для индукции побегообразования редиса европейского: МС с 2% сахарозы, 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ГК и 7 г/л агара и МС с 2% сахарозы, 0,1 мг/л БАП и 7 г/л агара (подбирается индивидуально для каждого генотипа).

- Укоренение микропобегов редиса европейского следует проводить на безгормональной среде МС с 2% сахарозы и 7 г/л агара и/или на мостиках на жидкой среде МСм с добавлением 0,1 мг/л кинетина. При посадке микропобегов на твердую среду МС, микропобеги следует помещать в культуральные сосуды строго на поверхность питательной среды без заглабления.

- В случае образования корнеплодоподобных структур (КС) в области гипокотыля микропобегов, КС необходимо удалить скальпелем в стерильных условиях, и повторно пересадить микропобег в новый культуральный сосуд/пробирку с твердой средой МС/жидкой средой МСм соответственно (число пассажей не более восьми).

Перспективы дальнейшей разработки темы состоят:

- В дальнейшей оптимизации разработанной технологии получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для редиса европейского с целью повышения ее эффективности.

- В изучении особенностей процесса спонтанной дупликации хромосом растений-регенерантов редиса европейского в процессе культивирования в условиях *in vitro* (в зависимости от факторов продолжительности культивирования, состава питательной среды и пр.) для получения новых фундаментальных знаний и поиска новых способов удвоения хромосом без применения антимиотических агентов.

- В дальнейшем изучении причин опухолеобразования у микропобегов редиса европейского в области гипокотыля в разных условиях культивирования с целью определения биологических механизмов данной аномалии.

- В дальнейшем исследовании эндогенных механизмов регуляции корнеобразования при различных способах культивирования микропобегов на питательных средах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahmadi B. Enhanced regeneration of haploid plantlets from microspores of *Brassica napus* L. using bleomycin, PCIB, and phytohormones / B. Ahmadi, K. Alizadeh, J.A. Teixeira da Silva // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. – 2012. – Vol. 109. – № 3. – P. 525-533.
2. Ahmadi B. Improved microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration using putrescine, cefotaxime and vancomycin in *Brassica napus* L. / B. Ahmadi, M.E. Shariatpanahi, M.A. Ojaghkandi, A.A. Heydari // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. – 2014. – Vol. 118. – № 3. – P. 497-505.
3. Alexander M.P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen / M.P. Alexander // *Biotechnic and Histochemistry*. – 1969. – Vol. 44. – № 3. – P. 117-122.
4. Asif M. Progress and Opportunities of Doubled Haploid Production / M. Asif // *SpringerBriefs in Plant Science*. – 2013.
5. Aslam F.N. Rapid-cycling Brassica Species: Inbreeding and selection of *B. campestris* for anther culture ability / F.N. Aslam, M. V. Macdonald, P. Loudon, D.S. Ingram // *Annals of Botany*. – 1990. – Vol. 65. – № 5. – P. 557-566.
6. Babbar S.B. Isolated microspore culture of Brassica: An experimental tool for developmental studies and crop improvement / S.B. Babbar, P.K. Agarwal, S. Sahay, S.S. Bhojwani // *Indian Journal of Biotechnology*. – 2004. – Vol. 3. – № 2. – P. 185-202.
7. Baillie A.M.R. In vitro culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris* / A.M.R. Baillie, D.J. Epp, D. Hutcheson, W.A. Keller // *Plant cell reports*. – 1992. – Vol. 11. – № 5. – P. 234-237.
8. Bansal V.K. Haploid plantlet screening in the development of blackleg resistant DH lines of *Brassica napus* / V.K. Bansal, M.R. Thiagarajah, G.R.

Stringam', R.T. Hardin' // Plant Breeding. – 1998. – Vol. 117. – P. 103-106.

9. Behla R. Identification of common QTL for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in three doubled haploid populations of *Brassica napus* (L.) / R. Behla, A.H. Hirani, C.D. Zelmer, F. Yu, W.G.D. Fernando, P. McVetty, G. Li // *Euphytica*. – 2017. – Vol. 213. – № 11.

10. Bhatia R. Modification of important factors for efficient microspore embryogenesis and doubled haploid production in field grown white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) genotypes in India / R. Bhatia, S.S. Dey, C. Parkash, K. Sharma, S. Sood, R. Kumar // *Scientia Horticulturae*. – 2018. – Vol. 233. – № October 2017. – P. 178-187.

11. Bhowmik P. A high throughput *Brassica napus* microspore culture system: Influence of percoll gradient separation and bud selection on embryogenesis / P. Bhowmik, J. Dirpaul, P. Polowick, A.M.R. Ferrie // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2011. – Vol. 106. – № 2. – P. 359-362.

12. Blilou I. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots / I. Blilou, J. Xu, M. Wildwater, V. Willemsen, I. Paponov, J. Friml, R. Heidstra, M. Aida, K. Palme, B. Scheres // *Nature*. – 2005. – Vol. 433. – № 7021. – P. 39-44.

13. Buzovkina I.S. In vitro modeling of tumor formation in radish lines and hybrids / I.S. Buzovkina, I. Kneshke, L.A. Lutova // *Genetika*. – 1993. – Vol. 29. – № 6. – P. 1002-1008.

14. Buzovkina I.S. The genetic collection of radish inbred lines: History and prospects. / I.S. Buzovkina, L.A. Lutova // *Russian Journal of Genetics*. – 2007. – Vol. 43. – № 10.

15. Cao M.Q. Embryogenesis and plant regeneration of sauerkraut cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata*) via in vitro isolated microspore culture | embryogenese et regeneration de plantes de chou a choucroute (*Brassica oleracea* l. Ssp. *Capitata*) par culture in vit / M.Q. Cao, F. Charlot, C. Dore // *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie III*. – 1990. – Vol. 310. – № 5. – P. 203-208.

16. Cardoza V. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and

rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants / V. Cardoza, C.N. Stewart // *Plant Cell Reports*. – 2003. – Vol. 21. – № 6. – P. 599-604.

17. Chanana N.P. Morphogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica juncea* / N.P. Chanana, V. Dhawan, S.S. Bhojwani // *Plant cell, tissue and organ culture*. – 2005. – Vol. 83. – № 2. – P. 169-177.

18. Chapin III F.S. Ecological aspects of plant mineral nutrition / F.S. Chapin III // *Advances in mineral nutrition*. – 1988. – Vol. 3. – P. 61-191.

19. Charne D.G. Improving microspore culture as a rapeseed breeding tool: the use of auxins and cytokinins in an induction medium / D.G. Charne, W.D. Beversdorf // *Canadian Journal of Botany*. – 1988. – Vol. 66. – № 8. – P. 1671-1675.

20. Cheng Z.J. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3 / Z.J. Cheng, L. Wang, W. Sun, Y. Zhang, C. Zhou, Y.H. Su, W. Li, T.T. Sun, X.Y. Zhao, X.G. Li // *Plant physiology*. – 2013. – Vol. 161. – № 1. – P. 240-251.

21. Chun C. Microspore-derived embryo formation in radish (*Raphanus sativus* L.) according to nutritional and environmental conditions / C. Chun, H. Park, H. Na // *Horticulture Environment and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 52. – № 5. – P. 530-535.

22. Cordewener J.H.G. 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 / J.H.G. Cordewener, G. Hause, E. Görger, R. Busink, B. Hause, H.J.M. Dons, A.A.M. Van Lammeren, M.M. Van Lookeren Campagne, P. Pechan // *Planta*. – 1995. – Vol. 196. – № 4. – P. 747-755.

23. Corral-Martínez P. Dynamic changes in arabinogalactan-protein, pectin, xyloglucan and xylan composition of the cell wall during microspore embryogenesis in *Brassica napus* / P. Corral-Martínez, A. Driouich, J.M. Seguí-Simarro // *Frontiers in plant science*. – 2019. – Vol. 10. – P. 332.

24. Corral-Martínez P. Live Imaging of embryogenic structures in *Brassica*

napus microspore embryo cultures highlights the developmental plasticity of induced totipotent cells / P. Corral-Martínez, C. Siemons, A. Horstman, G.C. Angenent, N. de Ruijter, K. Boutilier // *Plant Reproduction*. – 2020. – Vol. 33. – № 3-4. – P. 143-158.

25. 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. – 2021. – Vol. 2289. – P. 129-144.

26. Custers J.B.M. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.) / J.B.M. Custers // *Doubled haploid production in crop plants*. – Springer, 2003. – P. 185-193.

27. Debergh P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium / P.C. Debergh // *Physiologia plantarum*. – 1983. – Vol. 59. – № 2. – P. 270-276.

28. Di D.-W. Functional roles of *Arabidopsis* CKRC2/YUCCA8 gene and the involvement of PIF4 in the regulation of auxin biosynthesis by cytokinin / D.-W. Di, L. Wu, L. Zhang, C.-W. An, T.-Z. Zhang, P. Luo, H.-H. Gao, V. Kriechbaumer, G.-Q. Guo // *Scientific reports*. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 1-9.

29. Dodueva I.E. Plant tumors: a hundred years of study / I.E. Dodueva, M.A. Lebedeva, K.A. Kuznetsova, M.S. Gancheva, S.S. Paponova, L.L. Lutova // *Planta*. – 2020. – Vol. 251. – № 4. – P. 1-28.

30. Domblides E. A technology for obtaining doubled haploids in microspore cultures of the Brassicaceae family (guidelines). / E. Domblides, N. Shmykova, D. Shumilina, T. Zayachkovskaya, A. Mineykina, E. Kozar, V. Ahramenko, L. Shevchenko, L. Kan, L. Bondareva, A. Domblides. – 2016.

31. 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. – № 1. – P. 3-7.

32. Dong Y.Q. Influencing factors and physiochemical changes of

embryogenesis through in vitro isolated microspore culture in Brassica species / Y.Q. Dong, Y.H. Gao, T. Zhao, G.Q. Ren, Y.L. Liu, B. Guan, R.X. Jin, F. Gao, Y.L. Zhang, X.F. Tan, H.C. Zhu, Y.H. Zhang, J.X. Zhang, D. Peng, Y.X. Yan // *Biologia*. – 2021. – Vol. 76. – № 9. – P. 2629-2654.

33. Dubas E. Microtubule configurations and nuclear DNA synthesis during initiation of suspensor-bearing embryos from Brassica napus cv. Topas microspores / E. Dubas, J. Custers, H. Kieft, M. Wędzony, A.A.M. van Lammeren // *Plant cell reports*. – 2011. – Vol. 30. – № 11. – P. 2105-2116.

34. Dubas E. Endogenous ABA concentration and cytoplasmic membrane fluidity in microspores of oilseed rape (Brassica napus L.) genotypes differing in responsiveness to androgenesis induction / E. Dubas, F. Janowiak, M. Krzewska, T. Hura, I. Żur // *Plant cell reports*. – 2013. – Vol. 32. – № 9. – P. 1465-1475.

35. Dubas E. The influence of heat stress on auxin distribution in transgenic B. napus microspores and microspore-derived embryos / E. Dubas, J. Moravčíková, J. Libantová, I. Matušíková, E. Benková, I. Zur, M. Krzewska // *Protoplasma*. – 2014. – Vol. 251. – № 5. – P. 1077-1087.

36. Duijs J.G. Microspore culture is successful in most crop types of Brassica oleracea L. Vol. 60 / J.G. Duijs, R.E. Voorrips, D.L. Visser, J.B.M. Custers. – 1992. – 45-55 p.

37. Dunwell J.M. Influence of Genotype, Plant Growth Temperature and Anther Incubation Temperature on Microspore Embryo Production in Brassica napus ssp. oleifera. Vol. 36 / J.M. Dunwell, M. Cornish, A.G.L. De Courcel. – 1985. – 679-689 p.

38. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: Origins and exploitation / J.M. Dunwell // *Plant Biotechnology Journal*. – 2010. – Vol. 8. – № 4. – P. 377-424.

39. Dupl'Áková N. Rapid separation of Arabidopsis male gametophyte developmental stages using a Percoll gradient / N. Dupl'Áková, P.I. Dobrev, D. Renák, D. Honys // *Nature Protocols*. – 2016. – Vol. 11. – № 10. – P. 1817-1832.

40. Efroni I. Root regeneration triggers an embryo-like sequence guided by hormonal interactions / I. Efroni, A. Mello, T. Nawy, P.-L. Ip, R. Rahni, N. DelRose,

A. Powers, R. Satija, K.D. Birnbaum // *Cell*. – 2016. – Vol. 165. – № 7. – P. 1721-1733.

41. Ferrie A. Microspore culture of Brassica species / A. Ferrie // *Doubled haploid production in crop plants*. – Springer, 2003. – P. 205-215.

42. Ferrie A.M.R. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production / A.M.R. Ferrie, K.L. Caswell // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2011. – Vol. 104. – № 3. – P. 301-309.

43. Ferrie A.M.R. Haploids and doubled haploids in Brassica spp. for genetic and genomic research / A.M.R. Ferrie, C. Möllers // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2011. – Vol. 104. – № 3. – P. 375-386.

44. Forster B.P. Doubled haploids in genetics and plant breeding / B.P. Forster, W.T.B. Thomas // *Plant Breed Rev*. – 2005. – Vol. 25. – № 57-88.

45. Friml J. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis / J. Friml, A. Vieten, M. Sauer, D. Weijers, H. Schwarz, T. Hamann, R. Offringa, G. Jürgens // *Nature*. – 2003. – Vol. 426. – № 6963. – P. 147-153.

46. Gamborg O.L. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells / O.L. Gamborg, R. Miller, K. Ojima // *Experimental cell research*. – 1968. – Vol. 50. – № 1. – P. 151-158.

47. George E.F. Plant growth regulators I: Introduction; Auxins, their analogues and inhibitors / E.F. George, M.A. Hall, G.J. De Klerk // *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. – Springer Netherlands, 2008. – Vol. 1. – P. 175-204.

48. Gibbs D.J. Group VII ethylene response factors coordinate oxygen and nitric oxide signal transduction and stress responses in plants / D.J. Gibbs, J.V. Conde, S. Berckhan, G. Prasad, G.M. Mendiondo, M.J. Holdsworth // *Plant Physiology*. – 2015. – Vol. 169. – № 1. – P. 23-31.

49. Gland A. Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore cultures of Brassica napus L. / A. Gland, R. Lichter, H.-G.

- Schweiger // Journal of plant physiology. – 1988. – Vol. 132. – № 5. – P. 613-617.
50. Greenwood D.J. Quantitative theory and the control of soil fertility / D.J. Greenwood // The New Phytologist. – 1983. – Vol. 94. – № 1. – P. 1-18.
51. Gregory P.J. Effects of fertilizer on root growth and water use of barley in northern Syria / P.J. Gregory, K.D. Shepherd, P.J. Cooper // The Journal of Agricultural Science. – 1984. – Vol. 103. – № 2. – P. 429-438.
52. Gu H.H. Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.) / H.H. Gu, P. Hagberg, W.J. Zhou // Plant Growth Regulation. – 2004. – Vol. 42. – № 2. – P. 137-143.
53. Hadfi K. Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos / K. Hadfi, V. Speth, G. Neuhaus, B. Ii, U. Freiburg. – 1998. – Vol. 887. – P. 879-887.
54. Hakman I. The polar auxin transport inhibitor NPA impairs embryo morphology and increases the expression of an auxin efflux facilitator protein PIN during *Picea abies* somatic embryo development / I. Hakman, H. Hallberg, J. Palovaara // Tree Physiology. – 2009. – Vol. 29. – № 4. – P. 483-496.
55. Han N.R. Microspore-derived embryo formation and morphological changes during the isolated microspore culture of Radish (*Raphanus sativus* L.) / N.R. Han, S.U. Kim, H.Y. Park, H. Na // Korean Journal of Horticultural Science and Technology. – 2014. – Vol. 32. – № 3. – P. 382-389.
56. Han N. Identification and variation of major aliphatic glucosinolates in doubled haploid lines of radish (*Raphanus sativus* L.) / N. Han, H. Na, J. Kim // HORTICULTURAL SCIENCE & TECHNOLOGY. – 2018. – Vol. 36. – P. 302-311.
57. Hause B. Expression of Polarity during early Development of Microspore-derived and Zygotic Embryos of *Brassica napus* L. cv. Topas / B. Hause, W.L.H. van Veenendaal, G. Hause, A.A.M. van Lammeren // Botanica Acta. – 1994. – Vol. 107. – № 6. – P. 407-415.
58. Hays D.B. Role of ethylene in cotyledon development of microspore-derived embryos of *Brassica napus* / D.B. Hays, D.M. Reid, E.C. Yeung, R.P. Pharis

// Journal of experimental botany. – 2000. – Vol. 51. – № 352. – P. 1851-1859.

59. Henderson C.A.P. The use of haploidy to develop plants that express several recessive traits using light-seeded canola (*Brassica napus*) as an example / C.A.P. Henderson, K.P. Pauls // Theoretical and Applied Genetics. – 1992. – Vol. 83. – № 4. – P. 476-479.

60. Hoseini M. Effects of ascorbic acid, alpha-tocopherol, and glutathione on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L / M. Hoseini, M. Ghadimzadeh, B. Ahmadi, J.A. Teixeira da Silva // In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. – 2014. – Vol. 50. – № 1. – P. 26-35.

61. Il'ina E.L. The effect of cytokinins on in vitro cultured inbred lines of *Raphanus sativus* var. *radicula* Pers. with genetically determined tumorigenesis / E.L. Il'ina, I.E. Dodueva, N.M. Ivanova, L.A. Lutova // Russian Journal of Plant Physiology. – 2006. – Vol. 53. – № 4. – P. 514-522.

62. Ilić-Grubor K. Comparative morphological study of zygotic and microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. as revealed by scanning electron microscopy / K. Ilić-Grubor, S.M. Attree, L.C. Fowke // Annals of Botany. – 1998. – Vol. 82. – № 2. – P. 157-165.

63. Indrianto A. Tracking individual wheat microspores in vitro: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo / A. Indrianto, I. Barinova, A. Touraev, E. Heberle-Bors // Planta. – 2001. – Vol. 212. – № 2. – P. 163-174.

64. Jones B. Cytokinin regulation of auxin synthesis in *Arabidopsis* involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction / B. Jones, S.A. Gunnerås, S. V Petersson, P. Tarkowski, N. Graham, S. May, K. Dolezal, G. Sandberg, K. Ljung // The Plant Cell. – 2010. – Vol. 22. – № 9. – P. 2956-2969.

65. Joosen R. Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development / R. Joosen, J. Cordewener, E.D.J. Supena, O. Vorst, M. Lammers, C. Maliepaard, T. Zeilmaker, B. Miki, T. America, J. Custers // Plant

Physiology. – 2007. – Vol. 144. – № 1. – P. 155-172.

66. Kang J.-G. Nutrient solution concentration affects shoot: root ratio, leaf area ratio, and growth of subirrigated salvia (*Salvia splendens*) / J.-G. Kang, M.W. Van Iersel // *HortScience*. – 2004. – Vol. 39. – № 1. – P. 49-54.

67. Keller W.A. Stimulation of Embryogenesis and Haploid Production in *Brassica campestris* Anther Cultures by Elevated Temperature Treatments / W.A. Keller, K.C. Armstrong. – 1979. – 65-67 p.

68. Keller W.A. Production of anther-derived dihaploid plants in autotetraploid marrowstem kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) / W.A. Keller, K.C. Armstrong // *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. – 1981. – Vol. 23. – № 2. – P. 259-265.

69. Kiba T. Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin / T. Kiba, T. Kudo, M. Kojima, H. Sakakibara // *Journal of experimental botany*. – 2011. – Vol. 62. – № 4. – P. 1399-1409.

70. Kim M. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture / M. Kim, I.-C. Jang, J. Kim, E.-J. Park, M. Yoon, Y. Lee // *Plant cell reports*. – 2008. – Vol. 27. – № 3. – P. 425-434.

71. Kolachevskaya O.O. Auxin synthesis gene *tms1* driven by tuber-specific promoter alters hormonal status of transgenic potato plants and their responses to exogenous phytohormones / O.O. Kolachevskaya, L.I. Sergeeva, K. Floková, I.A. Getman, S.N. Lomin, V. V Alekseeva, E.B. Rukavtsova, Y.I. Buryanov, G.A. Romanov // *Plant Cell Reports*. – 2017. – Vol. 36. – № 3. – P. 419-435.

72. Kopta T. Yields, quality and nutritional parameters of radish (*Raphanus sativus*) cultivars when grown organically in the Czech Republic / T. Kopta, R. Pokluda // *Horticultural Science*. – 2013. – Vol. 40. – № 1. – P. 16-21.

73. Kott L.S. Autotoxicity in isolated microspore cultures of *Brassica napus* / L.S. Kott, L. Polsoni, B. Ellis, W.D. Beversdorf // *Canadian Journal of Botany*. – 1988a. – Vol. 66. – № 8. – P. 1665-1670.

74. Kott L.S. Cytological aspects of isolated microspore culture of *Brassica napus* / L.S. Kott, L. Polsoni, W.D. Beversdorf // *Canadian Journal of Botany*. – 1988b. – Vol. 66. – № 8. – P. 1658-1664.
75. Kozar E. V. Production of doubled haploids in *Brassica purpuraria* / E. V. Kozar, K.S. Korottseva, O. V. Romanova, O.A. Chichvarina, L.Y. Kan, V.A. Ahramenko, E.A. Domblides // *Vegetable crops of Russia*. – 2019. – № 6. – P. 10-18.
76. 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 Seleksii*. – 2020. – Vol. 24. – № 1. – P. 31-39.
77. Kozar E. V. Protocol of European Radish (*Raphanus sativus* L.) Microspore Culture for Doubled Haploid Plant Production / E. V. Kozar, E.A. Domblides // *When the Menorah Fades*. – 2021. – Vol. 2288. – P. 217-232.
78. Kozar E. V. Effect of the Method of Microspore Isolation on the Efficiency of Isolated Microspore Culture In Vitro for Brassicaceae Family / E. V. Kozar, E.G. Kozar, E.A. Domblides // *Horticulturae*. – 2022. – Vol. 8. – № 10. – P. 864.
79. Kurepa J. Ectopic expression of the phosphomimic mutant version of Arabidopsis response regulator 1 promotes a constitutive cytokinin response phenotype / J. Kurepa, Y. Li, S.E. Perry, J.A. Smalle // *BMC plant biology*. – 2014. – Vol. 14. – № 1. – P. 1-15.
80. Kurepa J. Antagonistic activity of auxin and cytokinin in shoot and root organs / J. Kurepa, T.E. Shull, J.A. Smalle // *Plant Direct*. – 2019. – Vol. 3. – № 2. – P. e00121.
81. Kurepa J. Auxin/Cytokinin Antagonistic Control of the Shoot/Root Growth Ratio and Its Relevance for Adaptation to Drought and Nutrient Deficiency Stresses / J. Kurepa, J.A. Smalle // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 4.
82. Lebedeva M.A. Initiation of spontaneous tumors in radish (*Raphanus sativus*): Cellular, molecular and physiological events / M.A. Lebedeva, V.E.

Tvorogova, A.P. Vinogradova, M.S. Gancheva, M. Azarakhsh, E.L. Ilina, K.N. Demchenko, I.E. Dodueva, L.A. Lutova // *Journal of plant physiology*. – 2015. – Vol. 173. – P. 97-104.

83. Li H. Constitutive repression and activation of auxin signaling in *Arabidopsis* / H. Li, Y. Cheng, A. Murphy, G. Hagen, T.J. Guilfoyle // *Plant physiology*. – 2009. – Vol. 149. – № 3. – P. 1277-1288.

84. Li H. The histone deacetylase inhibitor trichostatin a promotes totipotency in the male gametophyte / H. Li, M. Soriano, J. Cordewener, J.M. Muiño, T. Riksen, H. Fukuok, G.C. Angenent, K. Boutilier // *Plant Cell*. – 2014. – Vol. 26. – № 1. – P. 195-209.

85. Licausi F. Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization / F. Licausi, M. Kosmacz, D.A. Weits, B. Giuntoli, F.M. Giorgi, L.A.C.J. Voesenek, P. Perata, J.T. van Dongen // *Nature*. – 2011. – Vol. 479. – № 7373. – P. 419—422.

86. Lichter R. Induction of Haploid Plants From Isolated Pollen of *Brassica napus* / R. Lichter // *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. – 1982. – Vol. 105. – № 5. – P. 427-434.

87. Lichter R. Efficient Yield of Embryoids by Culture of Isolated Microspores of Different Brassicaceae Species / R. Lichter // *Plant Breeding*. – 1989. – Vol. 103. – P. 119-123.

88. Liu C.M. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis / C.M. Liu, Z.H. Xu, N.H. Chua // *Plant Cell*. – 1993. – Vol. 5. – № 6. – P. 621-630.

89. Liu J. WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during de novo root organogenesis in *Arabidopsis* / J. Liu, L. Sheng, Y. Xu, J. Li, Z. Yang, H. Huang, L. Xu // *The Plant Cell*. – 2014. – Vol. 26. – № 3. – P. 1081-1093.

90. Ludmila L. Genetic control of regeneration processes of radish plants in vitro: from phenotype to genotype / L. Ludmila, D. Irina // *Biological Communications*. – 2019. – Vol. 64. – № 2. – P. 124-132.

91. Lynch J. Effect of internal and external factors on root growth and

development / J. Lynch, P. Marschner, Z. Rengel // Marschner's mineral nutrition of higher plants. – Elsevier, 2012. – P. 331-346.

92. Malik M.R. Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus* / M.R. Malik, F. Wang, J.M. Dirpaul, N. Zhou, P.L. Polowick, A.M.R. Ferrie, J.E. Krochko // *Plant Physiology*. – 2007. – Vol. 144. – № 1. – P. 134-154.

93. Maluszynski M. Doubled haploid production in crop plants: a manual / M. Maluszynski, K. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko. – Springer Science & Business Media, 2003.

94. Martín A.C. Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis* / A.C. Martín, J.C. Del Pozo, J. Iglesias, V. Rubio, R. Solano, A. De La Peña, A. Leyva, J. Paz-Ares // *The Plant Journal*. – 2000. – Vol. 24. – № 5. – P. 559-567.

95. Maruyama-Nakashita A. A novel regulatory pathway of sulfate uptake in *Arabidopsis* roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation / A. Maruyama-Nakashita, Y. Nakamura, T. Yamaya, H. Takahashi // *The Plant Journal*. – 2004. – Vol. 38. – № 5. – P. 779-789.

96. Masuda K. Instructions for use a revision of the medium for somatic embryogenesis in carrot / K. Masuda, Y. Kikuta, Y. Okazawa // *Journal of the faculty of agriculture*. – 1981.

97. Matveeva T. V. Hormonal control of tumor formation in radish / T. V. Matveeva, N. V. Frolova, R. Smets, I.E. Dodueva, I.S. Buzovkina, H. Van Onckelen, L.A. Lutova // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2004. – Vol. 23. – № 1. – P. 37-43.

98. Mordhorst A.P. Plant embryogenesis / A.P. Mordhorst, M.A.J. Toonen, S.C. de Vries, D. Meinke // *Critical Reviews in Plant Sciences*. – 1997. – Vol. 16. – № 6. – P. 535-576.

99. Moubayidin L. Spatial coordination between stem cell activity and cell differentiation in the root meristem / L. Moubayidin, R. Di Mambro, R. Sozzani, E. Pacifici, E. Salvi, I. Terpstra, D. Bao, A. van Dijken, R. Dello Ioio, S. Perilli //

Developmental cell. – 2013. – Vol. 26. – № 4. – P. 405-415.

100. Müller C.J. Cytokinin-auxin crosstalk in the gynoecial primordium ensures correct domain patterning / C.J. Müller, E. Larsson, L. Spíchal, E. Sundberg // *Plant physiology*. – 2017. – Vol. 175. – № 3. – P. 1144-1157.

101. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiologia plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – № 3. – P. 473-497.

102. Na H. Microspore derived embryo formation and doubled haploid plant production in broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*) according to nutritional and environmental conditions / H. Na, G. Hwang, J.-H. Kwak, M.K. Yoon, C. Chun // *African Journal of Biotechnology*. – 2011. – Vol. 10. – № 59. – P. 12535-12541.

103. Narbut S.I. Genetic tumor in a radish obtained by inbreeding / S.I. Narbut // *Vestnik Leningradskogo universiteta. Biologiya*. – 1967. – Vol. 3. – P. 144-149.

104. Nasrin F. In vitro plant regeneration from callus of hypocotyls and cotyledonary explants of some indigenous mustard varieties / F. Nasrin, L. Khaleda, M. Al-Forkan // *Online International Journal Available at*. – 2017. – Vol. 6. – № 2. – P. 21-30.

105. Nitta T. Scanning electron microscopy of microspore embryogenesis in *Brassica* spp. / T. Nitta, Y. Takahata, N. Kaizuma // *Plant Cell Reports*. – 1997. – Vol. 16. – № 6. – P. 406-410.

106. Nordström A. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development / A. Nordström, P. Tarkowski, D. Tarkowska, R. Norbaek, C. Åstot, K. Dolezal, G. Sandberg // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101. – № 21. – P. 8039-8044.

107. Ockendon D.J. Anther culture in Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) I. Embryo yields and plant regeneration / D.J. Ockendon // *Annals of Applied Biology*. – 1984. – Vol. 105. – № 2. – P. 285-291.

108. Osolnik B. Stimulation of androgenesis in white cabbage (*Brassica*

oleracea var. capitata) anthers by low temperature and anther dissection. Vol. 32 / B. Osolnik, B. Bohanec, S. Jelaska. – 1993. – 241-246 p.

109. Pechan P.M. Messenger-RNA and protein changes associated with induction of Brassica microspore embryogenesis / P.M. Pechan, D. Bartels, D.C.W. Brown, J. Schell // *Planta*. – 1991. – Vol. 184. – № 2. – P. 161-165.

110. Pechan P.M. Identification of potentially embryogenic microspores in Brassica napus / P.M. Pechan, W.A. Keller // *Physiologia Plantarum*. – 1988. – Vol. 74. – № 2. – P. 377-384.

111. Pechan P.M. Androgenesis: Affecting the fate of the male gametophyte / P.M. Pechan, P. Smykal // *Physiologia Plantarum*. – 2001. – Vol. 111. – № 1. – P. 1-8.

112. Prem D. Effect of various exogenous and endogenous factors on microspore embryogenesis in Indian mustard (Brassica juncea (L.) Czern and Coss) / D. Prem, K. Gupta, A. Agnihotri // *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. – 2005. – Vol. 41. – № 3. – P. 266-273.

113. Prem D. Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in Brassica juncea / D. Prem, K. Gupta, G. Sarkar, A. Agnihotri // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2008. – Vol. 93. – № 3. – P. 269-282.

114. Prem D. A new microspore embryogenesis system under low temperature which mimics zygotic embryogenesis initials, expresses auxin and efficiently regenerates doubled-haploid plants in Brassica napus / D. Prem, M.T. Solís, I. Bárány, H. Rodríguez-Sanz, M.C. Risueño, P.S. Testillano // *BMC Plant Biology*. – 2012. – Vol. 12.

115. Rivas-Sendra A. Embryogenic competence of microspores is associated with their ability to form a callosic, osmoprotective subintinal layer / A. Rivas-Sendra, P. Corral-Martínez, R. Porcel, C. Camacho-Fernández, A. Calabuig-Serna, J.M. Seguí-Simarro // *Journal of Experimental Botany*. – 2019. – Vol. 70. – № 4. – P. 1267-1281.

116. Robert H.S. Plant embryogenesis requires AUX/LAX-mediated auxin

influx / H.S. Robert, W. Grunewald, M. Sauer, B. Cannoot, M. Soriano, R. Swarup, D. Weijers, M. Bennett, K. Boutilier, J. Friml // *Development*. – 2015. – Vol. 142. – № 4. – P. 702-711.

117. Rodríguez-Sanz H. Auxin biosynthesis, accumulation, action and transport are involved in stress-induced microspore embryogenesis initiation and progression in *Brassica napus* / H. Rodríguez-Sanz, M.-T. Solís, M.-F. López, A. Gómez-Cadenas, M.C. Risueño, P.S. Testillano // *Plant and Cell Physiology*. – 2015. – Vol. 56. – № 7. – P. 1401-1417.

118. Sakakibara H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation / H. Sakakibara // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2006. – Vol. 57. – P. 431-449.

119. Sato S. Effect of Low Temperature Pretreatment of Buds or Inflorescence on Isolated Microspore Culture in *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*). Vol. 52 / S. Sato, N. Katoh, S. Iwai, M. Hagimori. – 2002. – 23-26 p.

120. Shmykova N.A. Doubled haploid production in *Brassica L.* / N.A. Shmykova, D. V. Shumilina, T.P. Suprunova // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. – 2015. – Vol. 19. – № 1. – P. 111.

121. Shmykova N. Haploid embryogenesis in isolated microspore culture of carrots (*Daucus carota L.*) / N. Shmykova, E. Domblides, T. Vjurtts, A. Domblides // *Life*. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 1-17.

122. Shukla V. Endogenous hypoxia in lateral root primordia controls root architecture by antagonizing auxin signaling in *Arabidopsis* / V. Shukla, L. Lombardi, S. Iacopino, A. Pencik, O. Novak, P. Perata, B. Giuntoli, F. Licausi // *Molecular Plant*. – 2019. – Vol. 12. – № 4. – P. 538-551.

123. Shumilina D. V. Effect of genotype and medium culture content on microspore-derived embryo formation in Chinese cabbage (*Brassica rapa ssp. chinensis*) cv. Lastochka / D. V Shumilina, N.A. Shmykova, L.L. Bondareva, T.P. Suprunova // *Biology Bulletin*. – 2015. – Vol. 42. – № 4. – P. 302-309.

124. Shumilina D. Effects of genotype and culture conditions on microspore embryogenesis and plant regeneration in *Brassica Rapa ssp. Rapa L.* / D. Shumilina, D. Korniyukhin, E. Domblides, A. Soldatenko, A. Artemyeva // *Plants*. – 2020. –

Vol. 9. – № 2.

125. Silva Dias J.C. da. Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis / J.C. da Silva Dias // *Euphytica*. – 2001. – Vol. 119. – № 3. – P. 389-394.

126. Silva Dias J.C. da. Protocol for broccoli microspore culture / J.C. da Silva Dias // *Doubled haploid production in crop plants*. – Springer, 2003. – P. 195-204.

127. Simmonds D.H. Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus* / D.H. Simmonds, W.A. Keller // *Planta*. – 1999. – Vol. 208. – № 3. – P. 383-391.

128. Skoog F. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. / F. Skoog, C. Miller // *Symposia of the Society for Experimental Biology*. – 1957. – Vol. 11. – P. 118-130.

129. Smýkalová I. Efficiency of Microspore Culture for Doubled Haploid Production in the Breeding Project “Czech Winter Rape” / I. Smýkalová, M. Větrovcová, M. Klíma, I. Macháčková, M. Griga // *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. – 2018. – Vol. 42. – № No. 2. – P. 58-71.

130. Solís M.-T. Bn PME is progressively induced after microspore reprogramming to embryogenesis, correlating with pectin de-esterification and cell differentiation in *Brassica napus* / M.-T. Solís, E. Berenguer, M.C. Risueño, P.S. Testillano // *BMC plant biology*. – 2016. – Vol. 16. – № 1. – P. 1-15.

131. Soriano M. Plasticity in cell division patterns and auxin transport dependency during in vitro embryogenesis in *Brassica napus* / M. Soriano, H. Li, C. Jacquard, G.C. Angenent, J. Krochko, R. Offringa, K. Boutilier // *Plant Cell*. – 2014. – Vol. 26. – № 6. – P. 2568-2581.

132. Sretenović-Rajičić T. Effects of plant genotype and bacterial strain on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* / T. Sretenović-Rajičić, S. Ninković, B. Uzelać, B. Vinterhalter, D. Vinterhalter // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2007. – Vol. 54. – № 5. – P. 653-658.

133. Supena E.D.J. Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning / E.D.J. Supena, B. Winarto, T. Riksen, E. Dubas, A. Van Lammeren, R. Offringa, K. Boutilier, J. Custers // *Journal of Experimental Botany*. – 2008. – Vol. 59. – № 4. – P. 803-814.
134. 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 biotechnology reports*. – 2012. – Vol. 6. – № 4. – P. 297-304.
135. Takahata Y. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. / Y. Takahata, W.A. Keller // *Plant Science*. – 1991. – Vol. 74. – № 2. – P. 235-242.
136. Takahata Y. Microspore culture of radish (*Raphanus sativus* L.): Influence of genotype and culture conditions on embryogenesis / Y. Takahata, H. Komatsu, N. Kaizuma // *Plant Cell Reports*. – 1996. – Vol. 16. – № 3-4. – P. 163-166.
137. Tanaka M. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance / M. Tanaka, K. Takei, M. Kojima, H. Sakakibara, H. Mori // *The Plant Journal*. – 2006. – Vol. 45. – № 6. – P. 1028-1036.
138. Tang X. Exine dehiscing induces rape microspore polarity, which results in different daughter cell fate and fixes the apical–basal axis of the embryo / X. Tang, Y. Liu, Y. He, L. Ma, M. Sun // *Journal of Experimental Botany*. – 2013. – Vol. 64. – № 1. – P. 215-228.
140. Telmer C.A. Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica impus* / C.A. Telmer, D.H. Simmonds, W. Newcomb Telmer, C.A. Simmonds, C. Telmer, W. Newcomb. – 1992. – 417-425 p.
141. Tuncer B. Callus formation from isolated microspore culture in radish (*Raphanus sativus* L.) / B. Tuncer // *Journal of Animal and Plant Sciences*. – 2017. – Vol. 27. – № 1. – P. 277-282.

142. Vjurtts T.S. Production of Dh-Plants in Culture of Isolated Microspore in Carrot / T.S. Vjurtts, E.A. Domblides, N.A. Shmykova, M.I. Fedorova, L.J. Kan, A.S. Domblides // *Vegetable crops of Russia*. – 2017. – Vol. 5. – № 5. – P. 25-30.
143. Wang Y. High frequency plant regeneration from microspore-derived embryos of ornamental kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) / Y. Wang, Y. Tong, Y. Li, Y. Zhang, J. Zhang, J. Feng, H. Feng // *Scientia horticultruae*. – 2011. – Vol. 130. – № 1. – P. 296-302.
144. Wędzony M. Progress in doubled haploid technology in higher plants / M. Wędzony, B.P. Forster, I. Żur, E. Golemic, M. Szechyńska-Hebda, E. Dubas, G. Gotębiowska // *Advances in haploid production in higher plants*. – 2009. – P. 1-33.
145. Weijers D. Auxin triggers transient local signaling for cell specification in *Arabidopsis* embryogenesis / D. Weijers, A. Schlereth, J.S. Ehrismann, G. Schwank, M. Kientz, G. Jürgens // *Developmental cell*. – 2006. – Vol. 10. – № 2. – P. 265-270.
146. Winarto B. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea* / B. Winarto, J.A. Teixeira da Silva // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. – 2011. – Vol. 107. – № 2. – P. 305-315.
147. Yantao Zhu. Selection of Shoots Rooting Medium for *Brassica napus* / Yantao Zhu, Xinqiang Hu, Dianrong Li // *Journal of Anhui Agricultural University*. – 2000. – Vol. 27. – P. 86-88.
148. Yeung E.C. Comparative development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. CV Topas. I. Histodifferentiation / E.C. Yeung, M.H. Rahman, T.A. Thorpe // *International Journal of Plant Sciences*. – 1996. – Vol. 157. – № 1. – P. 27-39.
149. Yuan S. Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage / S. Yuan, Y. Su, Y. Liu, Z. Fang, L. Yang, M. Zhuang, Y. Zhang, P. Sun // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. – 2012. – Vol. 110. – № 1. – P. 69-76.
150. 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 // *Biologia Plantarum*. – 2006. – Vol. 50. – № 2. – P. 180-186.

151. Zhang G. Jasmonate-mediated wound signalling promotes plant regeneration / G. Zhang, F. Zhao, L. Chen, Y. Pan, L. Sun, N. Bao, T. Zhang, C.-X. Cui, Z. Qiu, Y. Zhang // *Nature Plants*. – 2019. – Vol. 5. – № 5. – P. 491-497.

152. Zhang K. AUXIN RESPONSE FACTOR3 regulates floral meristem determinacy by repressing cytokinin biosynthesis and signaling / K. Zhang, R. Wang, H. Zi, Y. Li, X. Cao, D. Li, L. Guo, J. Tong, Y. Pan, Y. Jiao // *The Plant Cell*. – 2018. – Vol. 30. – № 2. – P. 324-346.

153. Zhang W. The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration / W. Zhang, Q. Fu, X. Dai, M. Bao // *Scientia Horticulturae*. – 2008. – Vol. 117. – P. 69-72.

154. Zhou W. A Jasmonate Signaling Network Activates Root Stem Cells and Promotes Regeneration / W. Zhou, J.L. Lozano-Torres, I. Blilou, X. Zhang, Q. Zhai, G. Smant, C. Li, B. Scheres // *Cell*. – 2019. – Vol. 177. – № 4. – P. 942-956.e14.

155. Антипова О.В. Рекомендации по выращиванию редиса кассетным способом методом подтопления на установках гидропонных стеллажных УГС4 / Антипова О.В. // *Теплицы России*. – 2007. – Т. 2. – С. 19-24.

156. Бобренко Елена Геннадиевна. Диагностика минерального питания, величины и качества урожая различных сортов и гибридов редиса в условиях Западной Сибири / Бобренко Елена Геннадиевна. – 2001. – 229 с.

157. Борисов А.Л. Урожай и качество редьки, редиса и дайкона в Московской области. / Борисов А.Л., Теньков А.Л. // *Картофель и овощи*. – 2004. – Т. 2. – С. 22-23.

158. Домблидес Е. Технология получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор семейства капустные (методические рекомендации) / Е. Домблидес, Н. Шмыкова, Д. Шумилина, Т. Заячковская, А. Минейкина, Е.

Козарь, В. Ахраменко, Л. Шевченко, Л. Кан, Л. Бондарева, А. Домблидес. – 2016. – 40 с.

159. Заячковская Т.В. Оценка исходного материала вида *Raphanus sativus* L. с использованием методов репродуктивной биологии для селекции на гетерозис / Т.В. Заячковская. – [ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур] М., 2005.

160. Зубарева И.А. Создание дигаплоидных линий *Brassica napus* L.— доноров устойчивости к вирусу мозаики турнепса / И.А. Зубарева, Е.Н. Головешкина, С.В. Виноградова, Т.Н. Грибова, С.Г. Монахос, А.Н. Игнатов // Сельскохозяйственная биология. – 2013. – № 5. – С. 122-125.

161. Сазонова Л.В. Внутривидовая классификация корнеплодных форм *Raphanus sativus* L. / Сазонова Л.В. // Тр. по прикл. бот.и сел. . – 1971. – Т. 50. – № 1. – С. 12-24.

162. Сазонова Л.В. Корнеплодные растения (морковь, сельдерей, петрушка, пастернак, редис, редька) / Л.В. Сазонова, Власова Э.А. – 1990.

163. Сеницына А.А. Влияние условий культивирования на частоту прорастания/регенерации микроспорогенных эмбрионов *Brassica oleracea* L / А.А. Сеницына, А.В. Вишнякова, А.А. Александрова, С.Г. Монахос // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2021. – № 5. – С. 39-54.

164. Тюкавин Г.Б. Цитология эмбриогенеза в культуре пыльников моркови / Г.Б. Тюкавин, Н.А. Шмыкова, М.А. Монахова // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – № 6. – С. 876-883.

165. Янаева Д.А. Создание исходного материала для гетерозисной селекции редиса европейского (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*) для защищенного грунта: автореферат диссертации на соискание уч. ст. кандидата сельскохозяйственных наук / Янаева Д.А. – 2011. – 26 с.

166. Янаева Д.А. Новые хозяйственно ценные признаки в селекции редиса европейского / Янаева Д.А., Леунов В.И., Ховрин А.Н. // Плодоводство и ягодоводство России. – 2012. – Т. 34. – № 2. – С. 412-419.

