

Обзорная статья  
УДК 631.52:631.575:575.22  
DOI: 10.30901/2658-6266-2023-3-01



## Индукция эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор *Brassica rapa* L.

А. А. Асланова, А. Б. Курина

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

**Автор, ответственный за переписку:** Анастасия Андреевна Асланова, a.aslanova@vir.nw.ru

На сегодняшний день создание гибридов  $F_1$ , сочетающих в себе высокую продуктивность, ценный биохимический состав и устойчивость к биотическим и абиотическим факторам среды, является актуальным направлением работы с культурами семейства капустные (*Brassicaceae* Burnett).

Для создания однородного, генетически стабильного исходного материала в селекции применяют методы клеточных технологий *in vitro*, которые призваны увеличить выход удвоенных гаплоидов, используемых в качестве исходного материала при создании новых сортов и гибридов.

*Brassica rapa* L. включает однолетние и двулетние культуры. Методами традиционной селекции *B. rapa* получение селекционно ценных гибридов  $F_1$  возможно не менее, чем за 8-10 лет. При помощи современной технологии производства удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор этот процесс можно сократить до 2-3 лет.

*B. rapa* является одним из наименее пригодных видов для культивирования микроспор *in vitro* в пределах рода *Brassica*, большинство исследуемых образцов являются самонесовместимыми, сохраняют высокую степень гетерозиготности и гетерогенности. На сегодняшний день не существует эффективного протокола, который одинаково подойдет для индукции эмбриогенеза у различных образцов *B. rapa*.

Эмбриогенез в культуре изолированных микроспор рода *Brassica* зависит от стадии развития микроспор, предобработки бутонов, состава питательной среды (макро- и микроэлементы, источники железа, органические добавки, углеводы, регуляторы роста) и условий культивирования. Кроме того, этот процесс сильно зависит от генотипа отдельного растения.

В данном обзоре отражены основные достижения в разработке протоколов получения удвоенных гаплоидов *B. rapa*. Особое внимание уделено факторам, влияющим на эффективность производства гаплоидов в культуре изолированных микроспор.

**Ключевые слова:** *Brassica rapa*, культура микроспор, индукция эмбриогенеза, питательная среда, удвоенные гаплоиды.

**Благодарности:** Статья подготовлена в рамках государственного задания ВИР согласно тематическому плану НИР по теме FGEM-2022-0012 «Клеточные технологии для расширения селекционного потенциала культур овощного направления использования».

**Для цитирования:** Асланова А.А., Курина А.Б. Индукция эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор *Brassica rapa* L. *Биотехнология и селекция растений*. 2023;6(3):14-24. DOI: 10.30901/2658-6266-2023-3-01

Прозрачность финансовой деятельности. Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их местам работы.

© Асланова А.А., Курина А.Б., 2023

## Review article

DOI: 10.30901/2658-6266-2023-3-01

# Induction of embryogenesis in *Brassica rapa* L. isolated microspore culture

Anastasiya A. Aslanova, Anastasiya B. Kurina

N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

**Corresponding author:** Anastasiya A. Aslanova, a.aslanova@vir.nw.ru

The creation of  $F_1$  hybrids combining high productivity, valuable biochemical composition and resistance to biotic and abiotic environmental factors is an urgent area of work with *Brassicaceae* Burnett.

To create a homogeneous, genetically stable source material in breeding, *in vitro* cell technologies are used to increase the number of doubled haploids used as source material for creating new cultivars and hybrids.

*Brassica rapa* L. includes annual and biennial crops. Using traditional breeding methods, it takes at least 8-10 years to produce selectively valuable  $F_1$  hybrids of *B. rapa*. With the help of modern technology for producing doubled haploids in the isolated microspore culture, this process can be shortened to 2-3 years.

*B. rapa* is one of the *Brassica* crops least suitable for microspore *in vitro* cultivation; most of the studied accessions are self-incompatible and retain a high degree of heterozygosity and heterogeneity. To date, there is no effective protocol that is equally suitable for the induction of embryogenesis in different *B. rapa* accessions.

Embryogenesis in an isolated microspore culture of the *Brassica* plants is subject to the timing of microspore development, pre-treatment of buds, composition of the nutrient medium (macro- and microelements, iron sources, organic additives, carbohydrates, growth regulators) and cultivation conditions. In addition, this process strongly depends on the genotype of the individual plant.

This review presents the main achievements in the development of protocols for obtaining doubled haploids of *B. rapa*. Particular attention is paid to the factors influencing the efficiency of haploid production in the isolated microspore culture.

**Keywords:** *Brassica rapa*, microspore culture, embryogenesis induction, culture medium, doubled haploids.

**Acknowledgments:** The article was prepared as part of the State Assignment to VIR in accordance with the R&D Thematic Plan, Topic FGEM-2022-0012 “Cell technologies for expanding the breeding potential of vegetable crops”.

**For citation:** Aslanova A.A., Kurina A.B. Induction of embryogenesis in *Brassica rapa* L. isolated microspore culture. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2023;6(3):14-24. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2023-3-01

Financial transparency. The authors have no financial interest in the presented materials or methods. The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employers.

© Aslanova A.A., Kurina A.B., 2023

## Введение

Культивируемые виды рода *Brassica* L. составляют разнообразную группу овощных, масличных и кормовых культур (Zhao et al., 2010a).

Род *Brassica* включает шесть видов сельскохозяйственных культур. В ходе геномного анализа в пределах рода было установлено три элементарных диплоидных вида: *B. rapa* L. (геном A,  $n=10$ ), *B. oleracea* L. (геном C,  $n=9$ ) и *B. nigra* L. (геном B,  $n=8$ ), которые дали начало трем амфидиплоидным видам *B. napus* L. (геном AC,  $n=19$ ), *B. juncea* L. (геном AB,  $n=18$ ) и *B. carinata* L. (геном BC,  $n=17$ ) (Nagaharu, 1935; Fadeyeva et al., 1980).

*B. rapa* (синонимичное название = syn. *Brassica campestris* L. см. URL: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30076075-2> [дата обращения 28 июля 2023]) – один из старейших культивируемых видов семейства *Brassicaceae* (Zhao et al., 2005). Капуста китайская (*B. rapa* L. ssp. *chinensis* (L.) Hanelt) впервые описана в V в. н.э., капуста пекинская (*B. rapa* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt) – в X в., японская капуста (*B. rapa* L. ssp. *nipposinica* (Bailey) Hanelt) – в XVI в. Капустные культуры *B. rapa* обладают широким внутривидовым разнообразием: капуста пекинская, китайская, розеточная, ноздреватая, пурпурная, японская, брокколетто. К виду *B. rapa* также относят японские листовые репы – комацуна, куруна, хирошимана, сирона, мана, являющиеся скороспелыми продуктивными культурами, относительно простыми в выращивании и обладающими ценными биохимическими соединениями. Китайская, японская, пекинская и розеточная капусты содержат большое количество аскорбиновой кислоты, каротина, витамины (B1, B2, PP), фолиевую кислоту, хлорофиллы, значительное количество минеральных элементов – калий, кальций, фосфор, железо (Artemieva, Solovieva, 2018).

В России в промышленных и частных овощеводствах возделывают в основном пекинскую капусту. Изначально местные сорта пекинской капусты выращивали на Дальнем Востоке, на юго-западе Сибири и в Казахстане. Китайская и японская капусты, листовая репа комацуна относятся в России к очень малораспространенным, об остальных культурах практически ничего неизвестно (Artemieva, Solovieva, 2018).

Селекция растений направлена на постоянное увеличение объемов производства сельскохозяйственных культур. Одной из основных задач, стоящих перед селекционерами, является поиск новых признаков, позволяющих повысить урожайность, не снижая качества растения (Germana, 2011).

Технология получения удвоенных гаплоидов является быстрым и эффективным способом ускорения селекционного процесса за счет получения гомозиготных линий. Растение по такой технологии получают из клеток растений на стадии гаметофитов, развивающихся из продуктов мужского мейоза – микроспор – в пыльнике, и женского – мегаспор – в семязпочке. Продукты мейоза, равно

как и клетки гаметофита, имеют гаплоидный набор хромосом. Существует два способа получения удвоенных гаплоидов: на основе андрогенеза, в культуре изолированных микроспор пыльника, и гиногенеза, когда в культуре используются неопыленные семязпочки (Kolesnikova et al., 2021).

Культура изолированных микроспор является эффективной технологией получения удвоенных гаплоидов от растений рода *Brassica* (Zhang et al., 2012). Использование удвоенных гаплоидов в селекции сортов *Brassica* изменило время получения инбредных линий для использования в качестве родительских форм с 6+ лет до примерно 2 лет (Dias, 2001).

Успешность *in vitro* культивирования микроспор *B. rapa* является наименьшей среди растений в пределах рода *Brassica*, большинство исследуемых образцов являются самонесовместимыми, сохраняют высокую степень гетерозиготности и гетерогенности (Zhao et al., 2010b).

Эмбриогенез в культуре изолированных микроспор у растений рода *Brassica*, в том числе и у *B. rapa*, зависит от стадии развития микроспор, предобработки бутончиков, состава питательной среды (макро- и микроэлементы, источники железа, органические добавки, углеводы, регуляторы роста) и условий культивирования. Кроме того, этот процесс сильно зависит от генотипа отдельного растения (Ferrie et al., 1995; Shumilina et al., 2015; 2020; Domblides et al., 2016, 2018).

Цель данного обзора заключается в обобщении протоколов получения удвоенных гаплоидов *B. rapa* в работах российских и зарубежных исследователей и определении факторов, позволяющих повысить индукцию эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор *in vitro*.

## Методики производства удвоенных гаплоидов применительно к растениям рода *Brassica*

Производство удвоенных гаплоидов в случае растений рода *Brassica* может быть достигнуто путем гиногенеза или андрогенеза. В первом случае гаплоиды происходят из зародышевого мешка (мегагаметофит), а во втором из микроспор, при этом используют культуру пыльников или изолированных микроспор (Friedt et al., 2005). В последнем случае микроспоры должны находиться на поздней одноядерной стадии развития. Это необходимо для их перехода с гаметофитного на спорофитный путь развития (путь эмбриогенеза) (Touraev et al., 1996; Shmykova et al., 2015).

Из гаплоидных клеток образуется сначала эмбрионид, затем эмбрион, которые имеют половинный ( $n$ ) набор хромосом. Растение, образовавшееся из гаплоидного эмбриона, является стерильным и не представляет интереса для селекции. Для получения удвоенных гаплоидов на ранних стадиях развития растений проводится процедура, которая приводит к удвоению числа хромосом. Можно применять множество различных методов стрессового воздействия, включая высокие и низкие темпера-

туры, колхицин и углеродное голодание (Shariatpanahi et al., 2006). Обычно, это обработка растений-регенерантов раствором колхицина, после чего растение восстанавливает диплоидный набор хромосом ( $2n$ ) и вновь становится фертильным, однако такое удвоение может происходить и самопроизвольно (Karpechenko, 1927).

В соответствии с протоколом, разработанным для капустных культур коллективом авторов под руководством Е.А. Domblides (Domblides et al., 2016), удвоение числа хромосом в эмбриоидах происходит спонтанно и, как следствие, образуются удвоенные гаплоиды. Большинство растений, полученных таким путем, имели диплоидный набор хромосом и не нуждались в этапе обработки колхицином. Растение-регенерант, полученное по данной методике, гомозиготно по аллелям генов, отвечающих за все признаки. Технология получения удвоенных гаплоидов позволяет за 2-3 года получить чистую линию (Shmykova et al., 2015). Выведение чистой линии методами традиционной селекции не позволяет достичь такого результата: можно получить линии – гомозиготы по аллелям генов, отвечающих за признаки, по которым ведётся отбор. Для достижения наибольшей степени гомозиготности может потребоваться не менее 6-12 лет.

Универсального протокола получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор, подходящего для всех видов *Brassica*, не существует. Это связано с межвидовыми и внутривидовыми различиями по способности к андрогенезу. Стандартный протокол, разработанный для большинства капустных культур, постоянно подвергается оптимизации и включает в себя следующие этапы: выращивание растений-доноров, отбор бутонов, выделение и культивирование пыльников или микроспор, индукцию эмбриогенеза, регенерацию растений, удвоение хромосом (при необходимости). Однако для успешного производства удвоенных гаплоидов необходима разработка индивидуального протокола для каждого вида растений и, в частности, для каждого отдельного образца (Shmykova et al., 2015).

### **Факторы, влияющие на эффективность производства гаплоидов в культуре изолированных микроспор *B. rapa***

**Подготовка донорных растений.** Донорные растения выращивают в климатической камере при температуре 21°C, фотопериоде 16 часов – день/ 8 часов – ночь и освещенности 9000 люкс (Domblides et al., 2016). В других исследованиях авторы предлагают выращивать растения-доноры при том же световом режиме, но при более низких температурах, а именно при 15 и 19°C (Shumilina et al., 2015; 2020; 2021; Domblides et al., 2018).

**Определение стадии развития мужского гаметофита** донорного растения необходимо для успешной индукции эмбриогенеза в культуре микроспор (Touraev et al.,

1997). У растений рода *Brassica* к эмбриогенезу способны микроспоры на поздней стадии развития и ранние двуклеточные пыльцевые зерна. Характерным признаком перехода микроспор с гаметофитного пути развития на спорофитный является первое митотическое деление ядра с симметричным цитокинезом взамен асимметричному (Shmykova et al., 2015). Важно отметить, что одноядерная стадия развития мужского гаметофита у *B. rapa* должна составлять не менее 80% в бутоне (Keller, 1975; Custers et al., 1994; Babbar et al., 2004; Shariatpanahi et al., 2006). Выбор бутона с более чем 20% двуклеточных ранних пыльцевых зёрен приведет к ингибированию непрерывного роста эмбрионов (Kott et al., 1988; Custers, 2003).

В своём исследовании J.B.M. Custers с соавторами (Custers et al., 1994) разделили ранние пыльцевые зёрна, находящиеся на двуклеточной стадии развития, на три класса: ранние, средние и поздние. При культивировании пыльцевых зёрен первого класса ещё возможно получить эмбриониды. Однако, группа исследователей под руководством Р. Бинарова (Binarova et al., 1997) отметила, что даже в случае двуклеточных пыльцевых зёрен, находящихся на более поздней стадии развития, ещё может произойти переключение с гаметофитного на спорофитный путь развития (см. также Shmykova et al., 2015). Культуру клеток, осуществивших такой переход, называют культурой микроспор (Custers et al., 1994; Babbar et al., 2004; Shariatpanahi et al., 2006).

Критическим фактором для эффективности эмбриогенеза в культуре микроспор является жизнеспособность микроспор. Мертвые клетки будут производить дополнительные токсичные соединения в культуре микроспор (Custers et al., 1994). Условия выращивания растения донора оказывают влияние на жизнеспособность микроспор. Например, опрыскивание растений против тли в климатической камере влияет на качество и количество жизнеспособных микроспор (Minkhorst, 2012).

В методике, разработанной коллективом авторов под руководством Е.А. Domblides (Domblides et al., 2016) стадия развития микроспор коррелировала с размером бутонов. Такая корреляция была установлена разными исследователями, особенно изучающими мейоз у растений. Однако отбор бутонов по размеру является косвенным, поскольку фактическая стадия развития микроспор определяется только после их выделения из пыльников. Стадию развития микроспор определяют при изучении их под микроскопом на цитологических препаратах, окрашенных DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид). Для этого бутоны определенного размера собирают с каждого растения случайным образом.

**Холодовая предобработка бутонов** синхронизирует деления ядер гаплоидных микроспор и повышает их жизнеспособность. Микроспоры, выделенные из бутонов, предварительно прошедших холодовую предобработку, переходят с гаметофитного пути развития на спорофитный, что приводит к формированию многоклеточных

гаплоидных эмбриоидов (Koshkin, 2010).

Группа исследователей под руководством Е.А. Domblides (Domblides et al., 2016) в своей методике рекомендуют отобрать бутоны оптимального размера и поместить их на предобработку на 1-3 суток в холодильник при температуре 4-10°C. Однако, в литературе встречаются данные об отрицательных эффектах низкотемпературных обработок у *B. rapa* (Sorogy, Munshi, 1996).

Исходя из изученной литературы, можно сделать вывод, что каждый исследуемый генотип требует индивидуального подхода при подборе индуцирующего фактора, которым, в частности, может быть повышенная температура культивирования микроспор (Shmykova et al., 2015).

**Состав питательной среды для индукции эмбриогенеза у образцов *B. rapa*.** Для таблицы «Протоколы получения удвоенных гаплоидов *B. rapa* в культуре изолированных микроспор» были выбраны публикации российских и зарубежных исследователей, в которых сообщалось об успешной индукции эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор *B. rapa*. Если в протоколах, разработанных для других видов *Brassica*, *B. rapa* оказывалась отзывчивой на условия культивирования *in vitro*, то результаты таких исследований также были включены в таблицу. Как видно из таблицы, исследователи используют разные способы определения эффективности эмбриогенеза в культуре микроспор и выхода эмбриоидов. Это может быть количество эмбриоидов, рассчитанное с учетом количества пыльников, использованных для приготовления суспензии микроспор, либо отнесенное к количеству чашек Петри с учетом содержания микроспор в миллилитре среды, определяемое с помощью камеры Горяева, и объема суспензии микроспор, наносимого на чашку. В первом случае выход эмбриоидов выражают в количестве на бутон или на 100 бутонов, во втором – в количестве на чашку. Третий вариант представления эффективности эмбриогенеза – это выход эмбриоидов, выраженный в процентах от общего числа микроспор, введенных в культуру.

В большинстве протоколов в качестве среды для промывки микроспор было предложено использовать среду B5 с 13% сахарозой (B5-13) (Gamborg, Eveleigh, 1968). Промывочная среда необходима на этапе центрифугирования изолированных микроспор. В протоколе, разработанном командой исследователей под руководством Domblides (Domblides et al., 2016), содержится рекомендация использовать среду B5 в качестве промывочной. Группы исследователей под руководством A.M.R. Baillie (Baillie et al., 1992) и A.M.R. Ferrie (Ferrie et al., 1995) применяли ½B5-13 в качестве промывочной среды, однако нет доказательств того, что снижение концентрации солей является ключевым фактором повышения выхода эмбриоидов. В протоколах, описанных группами ученых под руководством A.L. Burnett (Burnett et al., 1992) и Y-D. Guo, S. Pulli (Guo Y-D., Pulli S., 1996), использовали промывочную среду B5 без добавления железа.

В отличие от единства мнения исследователей в отношении промывочной среды, в различных публикациях можно увидеть множество вариаций среды для индукции, дополненных ещё и культивированием микроспор в условиях повышенной температуры сразу после их выделения из пыльников. Индукционная среда необходима для культивирования изолированных микроспор до появления эмбриоидов. Базовой питательной средой для культивирования микроспор капустных культур является жидкая среда NLN (Lichter, 1982) с 13% сахарозой (NLN-13). Группы исследователей под руководством S. Sato (Sato et al., 1989), F.L. Zhang (Zhang, Takahata, 2001) и T. Wang (Wang et al., 2009) использовали среду ½NLN-13 в качестве индукционной. Половинная концентрация компонентов среды увеличила образование зародышей (Sato et al., 1989). При использовании ½NLN-13 некоторые невосприимчивые образцы также продуцировали зародыши, чего не происходило при культивировании на среде NLN-13 (Wang et al., 2009). В своем исследовании A.M.R. Ferrie (Ferrie et al., 2005) с соавторами предложили использовать NLN с 17% сахарозой (NLN-17) в качестве индукционной среды.

Использование среды NLN-17 с последующей заменой на среду NLN с 10% раствором сахарозы (NLN-10) через 48 часов приводит к увеличению количества образующихся эмбриоидов и сокращает время, необходимое для появления зародышей в культуре микроспор у образцов *B. rapa* (Baillie et al., 1992; Ferrie et al., 1995; Gu et al., 2003). Замена питательной среды NLN-17 на NLN-10 имеет два преимущества. Во-первых, на разных стадиях развития микроспор требуются разные концентрации сахарозы. Высокий уровень сахарозы благотворно влияет на жизнеспособность и развитие микроспор, создает необходимый для начального развития микроспор осмотический потенциал, однако для продолжения развития требуется более низкая концентрация сахарозы (Dunwell, Thurling, 1985; Baillie et al., 1992; Lionneton, 2001). Во-вторых, смена индукционной среды через 48 часов на начальном этапе культивирования микроспор необходима для избавления от токсичных элементов, высвобождаемых из более старых двудерных ранних пыльцевых зёрен, что приводит к нормальному зарождению и развитию эмбриона (Kott et al., 1988).

Уменьшение содержания железа в среде NLN в два раза приводило к увеличению выхода эмбриоидов, а также влияло на цвет микроспор, они становились жёлтыми. Последнее можно было использовать в качестве фенотипического критерия эффективности эмбриогенеза. Микроспоры желтого цвета указывали на хороший эмбриогенез, в то время как микроспоры зеленого цвета не давали зародышей (Burnett et al., 1992). R.S. Wong (Wong et al., 1996) с соавторами применяли среду NLN с 13% содержанием в ней сахарозы (NLN-13) как в качестве промывочной среды, так и в качестве культуральной. В качестве промывочной среды также может быть использована среда ½NLN-13 (Domblides et al., 2016; Shumilina et al., 2020).



Таблица. Протоколы получения удвоенных гаплоидов *B. rapa* в культуре изолированных микроспор  
Table. Protocols for producing doubled haploids in *B. rapa* isolated microspore culture

Вид/ Species	Холодовая предобработка бутонов (°C), часы/ Bud cold pretreatment (°C), hrs	Промывочная среда для культуры микроспор/ Microspore culture rinsing medium	Индукционная среда для культуры микроспор/ Microspore culture induction medium	Тепловой шок микроспор °C (часы)/ Heat shock °C (hrs)	Микроспор/ мл Microspores/ ml	Выход эмбрионов/ Embryo yield	Публикация/ Literature source
<i>B. campestris</i> ssp. <i>pekinensis</i>	-	B5-13	1/2 макро + витамины NN микро MS-10	33°C (24)	200000	0,1-0,25%	Sato et al., 1989
<i>B. rapa</i> ssp. <i>oleifera</i>	-	B5 без Fe	NLN 0,5 Fe с заменой на NLN-13	33°C (8-12)	25000-100000		Burnett et al., 1992
<i>B. campestris</i> ssp. <i>oleifera</i>	-	1/2B5-13	NLN-17 + 0,83 мг/л KI с заменой через 48 ч на NLN-10	32°C (48)	100000	4 6 , 3 / 1 0 0 бутонов	Baillie et al., 1992
<i>B. ssp. chinensis</i>	-	-	NLN-10 с 0,5 мг/л NAA и 0,05 мг/л BA	33°C (24)	100000-200000	57/бутон	Cao et al., 1994
<i>B. rapa</i> ssp. <i>oleifera</i>	-	1/2B5-13	NLN-17 + 0,83 мг/л KI с заменой через 48 ч на NLN-10	32°C (48)	100000	До 0,7/бутон	Ferrie et al., 1995
<i>B. campestris</i> ssp. <i>oleifera</i>	-	B5 без Fe	NLN-13 + 0,83 мг/л KI	32°C (72)	50000	До 59,3/бутон	Guo, Pulli, 1996
<i>B. campestris</i> ssp. <i>parachinensis</i>	-	NLN-13	NLN-13 + 0,05мг/л BAP	32°C (48)	100000	0,2–15/бутон	Wong et al., 1996
<i>B. rapa</i>	-	B5-13	NLN-13	25°C (10-12×24)	20000	До 0,12%	Parihar et al., 1999
<i>B. campestris</i> ssp. <i>pekinensis</i>	-	B5-13	1/2NLN-10	32,5°C (24)	100000	до 800	Zhang, Takahata, 2001
<i>B. campestris</i> ssp. <i>Pekinesis</i>	7-20×24*****	mB5-13	NLN-13 + 0,3 мг/л BAP	33°C (24)	50000	-	Sato et al., 2002
<i>B. rapa</i> ssp. <i>chinensis</i>	-	B5-13	NLN-17;NLN-10 + 0,83 мг/л KI	32°C (48)	20000	3,8-42,2/бутон	Gu et al., 2003
<i>B. rapa</i>	-	-	NLN-17 + 0,44 мкг BAP	32°C (48)	-	-	Ferrie et al., 2005
<i>B. rapa</i>	-	NLN-13	NLN-13	31°C (72)	40000	-	Lou et al. 2008
<i>B. campestris</i> ssp. <i>chinensis</i>	-	B5-13	1/2NLN-13 макро	32°C (18)	50000	до 70/чашка	Wang et al., 2009
<i>B. campestris</i> ssp. <i>Pekinesis</i> x <i>chinensis</i>	5×24	B5-13	NLN-13 + PCIB	35°C (24)	50000	8, 2 7 - 1 9 , 2 0 / бутон	Zhang et al., 2011
<i>B. campestris</i>	-	B5-13	NLN-13	33°C (24; 48)	50000	-	Zhang et al., 2012
<i>Brassicaceae</i>	7-10/ 1-3×24	B-5/NLN-13	NLN-13	32°C (1-3×24)*	-	до 800/ ***	Dombildes et al., 2016

Вид/ Species	Холодовая предобработка бутонов (°C), часы/ Bud cold pretreatment (°C), hrs	Промывочная среда для культуры микроспор/ Microspore culture rinsing medium	Индукционная среда для культуры микроспор/ Microspore culture induction medium	Тепловой шок микроспор °C (часы)/ Heat shock °C (hrs)	Микроспор/ мл Microspores/ ml	Выход эмбрионов/ Embryoid yield	Публикация/ Literature source
<i>B. rapa</i> L. ssp. <i>chinensis</i> (L.) Hanelt var. <i>purpuraria</i> (L.H. Bailey) Hanelt	-	-	NLN-13 + AgNO <sub>3</sub>	32°C	-	до 40/ чашка	Kozar et al., 2019
<i>B. rapa</i> L. ssp. <i>chinensis</i>	4-10/ 1-3×24	NLN-13****	NLN-13****	32°C (3×24)**	40000-50000	-	Shumilina et al., 2021
<i>B. rapa</i> L. ssp. <i>pekinensis</i>	-	B5-13	NNS-10	34°C (24)*	40000	-	Adamus et al., 2021

**Примечания:**\* – стрессовое воздействие в темноте; \*\* – 50 оборотов/мин в инкубаторе-шейкере в темноте; \*\*\* – всего в эксперименте. Микроспоры, выделенные из 4-5 бутонов, помещали на чашку Петри d=60 мм; \*\*\*\* – в среде mB5-13; 1/2NLN-13 макро – среда NLN-13 с половинной концентрацией макроэлементов; микро – содержание в среде микроэлементов; NAA – 6-бензиламинопурин; BAP – 6-бензиламинопурин; NAA – нафтилуксусная кислота (НУК); KI – йодид калия

**Добавление активированного угля.** В нескольких публикациях Н.Н. Гу (Gu et al., 2003), Н.У. На (Na et al., 2009) и У. Zhang (Zhang et al., 2012) с соавторами было сообщено об улучшении образования эмбрионов при добавлении активированного угля вместе с агарозой. Использование активированного угля приводит к повышению эффективности эмбриогенеза, формированию, росту и развитию эмбрионов за счет нейтрализации токсичных соединений, продуцируемых старыми и нежизнеспособными микроспорами (Kott et al., 1988; Dias, 2001).

**Использование регуляторов роста.** Выделение этилена при культивировании микроспор оказывает токсическое действие и препятствует нормальному развитию эмбриоидов. Ингибиторы синтеза этилена (нитрат серебра, тиосульфат серебра, хлорид кобальта, аминокислоты, ингибиторы синтеза этилена (нитрат серебра, тиосульфат серебра, хлорид кобальта, аминокислоты, ингибиторы синтеза этилена) способствуют повышению эффективности эмбриогенеза (Prem et al., 2005; 2008; Na et al., 2011). К.М.Р. Кабир (Kabir et al., 2013) с соавторами пишут о положительном действии нитрата серебра на выход эмбриоидов в культуре микроспор разных подвидов *B. rapa* – концентрация 0,1 мг/л повышала выход эмбриоидов на 27-36% в зависимости от генотипа растения-донора.

В исследовании У. Zhang с соавторами (Zhang et al., 2011) сообщалось, что добавление 40 мкмоль ингибитора ауксина п-хлорфеноксиизомасляной кислоты (PCIB) увеличивало интенсивность эмбриогенеза до шести раз. Эти наблюдения были аналогичны наблюдениям Р.К. Агарвал с соавторами (Agarwal et al., 2006), согласно которым PCIB, вероятно, участвует в стимулировании развития эмбрионов благодаря подавлению ингибирующего эффекта высокой концентрации ауксина.

S.S. Lee., A.J. Kim (Lee, Kim, 2000) и У. Takahashi с соавторами (Takahashi et al., 2012) показали, что добавление БАП (6-Бензиламинопурин) способствовало развитию нормальных эмбриоидов у *B. rapa*.

Брассиностероиды также могут оказывать положительное влияние на образование и развитие эмбриоидов в культуре микроспор растений рода *Brassica* (Ferrie et al., 2005; Belmonte et al., 2010).

## Заключение

Таким образом, из данных литературы следует, что индукция эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор *in vitro* у *B. rapa* возможна при выполнении следующих условий: выборе подходящих растений-доноров, выращивании при соблюдении температурных и световых режимов, определении оптимальной стадии развития микроспор, отборе бутонов подходящего размера в зависимости от стадии развития микроспор, предобработке бутонов холодом, подборе промывочной среды и среды для культивирования, добавлении активированного угля и регуляторов роста. Способность к эмбриогенезу в культуре изолированных микроспор *in vitro*

у образцов *B. rapa* может варьировать не только у растений в пределах вида, но и у каждого индивидуального растения.

На сегодняшний день в мире достигнуты большие успехи в получении удвоенных гаплоидов рода *Brassica*. Однако, культуры клеток, выращенных из микроспор, далеко не у всех растений демонстрируют способность к эмбриогенезу. Для масштабного внедрения удвоенных гаплоидов в практику создания исходного селекционного материала нужно разработать универсальный протокол, позволяющий индуцировать эмбриогенез в культуре изолированных микроспор *in vitro* с использованием образцов различных сельскохозяйственных культур.

В перспективе эта технология позволит в кратчайшие сроки предоставить высокопродуктивный селекционный материал для создания отечественных сортов репы, пекинской и китайской капусты, обладающих ценным биохимическим составом и устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессам.

## References/Литература

- Adamus A., Szklarczyk M., Kielkowska A. Haploid and doubled haploid plant production in *Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* via microspore culture. In: J.M. Segui-Simarro (ed.). *Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana; 2021. Vol. 2288. p.181-199. DOI: 10.1007/978-1-0716-1335-1\_11
- Agarwal P.K., Agarwal P., Custers J.B.M., Chun-ming L., Bhojwani S.S. PCIB an antiauxin enhances microspore embryogenesis in microspore culture of *Brassica juncea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2006;86:201-210. DOI: 10.1007/s11240-006-9108-0
- Artemieva A.M., Solovieva A.E. Genetic diversity and biochemical value of *Brassica* L. cabbage plants. *Bulletin of NSAU (Novosibirsk State Agrarian University)*. 2018;(4):50-61. [in Russian] (Артемяева А.М., Соловьева А.Е. Генетическое разнообразие и биохимическая ценность капустных овощных растений рода *Brassica* L. *Вестник НГАС (Новосибирский государственный аграрный университет)*. 2018;(4):50-61. DOI: 10.31677/2072-6724-2018-49-4-50-61
- Babbar S.B., Agarwal P.K., Sahay S., Bhojwani S.S. Isolated microspore culture of Brassica: An experimental tool for developmental studies and crop improvement. *Indian Journal of Biotechnology*. 2004;3:185-202.
- Baillie A.M.R., Epp D.J., Hutcheson D., Keller W.A. In vitro culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris*. *Plant Cell Reports*. 1992;11:234-237. DOI: 10.1007/BF00235072
- Belmonte M, Elhiti M, Waldner B, Stasolla C. Depletion of cellular brassinolide decreases embryo production and disrupts the architecture of the apical meristems in *Brassica napus* microspore-derived embryos. *Journal of Experimental Botany*. 2010;61(10):2779-94. DOI: 10.1093/jxb/erq110
- Binarova P., Hause G., Cenková V., Cordewener J.H.G., Lookeren Campagne M.M. A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. *Sexual Plant Reproduction* 1997;10:200-208. DOI: 10.1007/s004970050088
- Burnett L., Yarrow S., Huang B. Embryogenesis and plant regeneration from isolated microspores of *Brassica rapa* L. ssp. *oleifera*. *Plant Cell Reports* 1992;11:215-218. DOI: 10.1007/BF00232537
- Cao M.Q., Li Y., Liu F., Doré C. Embryogenesis and plant regeneration of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) via *in vitro* isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*. 1994;13:447-450. DOI: 10.1007/BF00231964
- Custers J.B.M., Cordewener J.H., Nöllen Y., Dons H.J., Lockeren



- Campagne M.M. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Reports*. 1994;13(5):267-271. DOI: 10.1007/BF00233317
- Custers J.B.M. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). In: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (eds). *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Springer, Dordrecht; 2003. p.185-193. DOI: 10.1007/978-94-017-1293-4\_29
- Dias J.S. Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. *Euphytica*. 2001;109:389-394. DOI: 10.1023/A:1017563915319
- Domblides E.A., Kozar E.V., Shumilina D.V., Zayachkovskaya T.V., Akhramenko V.A., Soldatenko A.V. Embryogenesis in culture of isolated microspore of broccoli. *Vegetable crops of Russia*. 2018;(1):3-7. [In Russian] (Домблидес Е.А., Козарь Е.В., Шумилина Д.В., Заячковская Т.В., Ахраменко В.А., Солдатенко А.В. Эмбриогенез в культуре микроспор брокколи. *Овощи России*. 2018;(1):3-7). DOI: 10.18619/2072-9146-2018-1-3-7
- Domblides E.A., Shmykova N.A., Shumilina D.V., Zayachkovskaya T.V., Mineikina A.I., Kozar E.V., Akhramenko V.A., Shevchenko L.L., Kan L.Yu., Bondareva L.L., Domblides A.S.. Technology for obtaining doubled haploids in the culture of microspores of the cabbage family: (methodical recommendations) (Технология получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор семейства капустные: (методические рекомендации)). Moscow: VNISSOK; 2016. [in Russian] (Домблидес Е.А., Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Заячковская Т.В., Минейкина А.И., Козарь Е.В., Ахраменко В.А., Шевченко Л.Л., Кан Л.Ю., Бондарева Л.Л., Домблидес А.С. Технология получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор семейства капустные: (методические рекомендации)). Москва: ВНИИССОК; 2016).
- Dunwell J.M., Thurling N. Role of sucrose in microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Journal of Experimental Botany*. 1985;36(9):1478-1491. DOI: 10.1093/jxb/36.9.1478
- Fadeyeva T.S., Sosnikhina S.P., Irkayeva N.M. Comparative genetics of plants. Tutorial (Svravnitel'naya genetika rastenii. Uchebnoe posobie). Leningrad: Leningrad University Publishing House; 1980. p.98-101. [in Russian] (Фадеева Т.С., Соснихина С.П., Иркаева Н.М. Сравнительная генетика растений. Учебное пособие. Ленинград: Издательство Ленинградского университета; 1980. С.98-101).
- Ferrie A.M.R., Dirpaul J., Krishna P., Krochko J., Keller W.A. Effects of brassinosteroids on microspore embryogenesis in *Brassica* species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2005;41(6):742-745. DOI: 10.1079/IVP2005690
- Ferrie A.M.R., Epp D.J., Keller W.A. Evaluation of *Brassica rapa* L. genotypes for microspore culture response and identification of a highly embryogenic line. *Plant Cell Reports*. 1995;14:580-584. DOI: 10.1007/BF00231942
- Friedt W., Zarhloul M.K. Haploids in the improvement of crucifers. In: C. Don Palmer, W.A. Keller, K.J. Kasha (eds). *Haploids in Crop Improvement II. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer: Berlin, Heidelberg; 2005. Vol. 56. p.191-213. DOI: 10.1007/3-540-26889-8\_10
- Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Canadian Journal of Biochemistry*. 1968;46(5):417-421. DOI: 10.1139/o68-063
- Germana M.A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2011;104(3):283-300. DOI: 10.1007/s11240-010-9852-z
- Gu H.H., Zhou W.J., Hagberg P. High frequency spontaneous production of doubled haploid plants in microspore cultures of *Brassica rapa* ssp. *chinensis*. *Euphytica*. 2003;134:239-245.
- Guo Y.-D., Pulli S. High-frequency embryogenesis in *Brassica campestris* microspore culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1996;46:219-225. DOI: 10.1007/BF02307098
- Kabir K.M.R., Kwon S.-W., Park Y.-J. Application of cobalt chloride and silver nitrate for efficient microspore culture of *Brassica rapa* ssp. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 2013;23(1):1-10. DOI: 10.3329/ptcb.v23i1.15554
- Karpechenko G.D. Polyploid hybrids of *Raphanus sativus* L. × *Brassica oleracea* L. (On the problem of experimental species formation) (Полиплоидные гибриды *Raphanus sativus* L. × *Brassica oleracea* L. (К проблеме экспериментального видообразования)). *Bulletin of Applied Botany, of Genetics and Plant Breeding*. 1927;17(3):305-410. [in Russian] (Карпеченко Г.Д. Полиплоидные гибриды *Raphanus sativus* L. × *Brassica oleracea* L. (К проблеме экспериментального видообразования). *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 1927;17(3):305-410).
- Keller W.A., Rajhathy T., Lacapra J. *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 1975;17(4):655-666. DOI: 10.1139/g75-081
- Kolesnikova E.O., Donskikh E.I., Berdnikov R.V. Haploid biotechnology as a tool for creating a selection material for sugar beets. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8):812-821. [in Russian] (Колесникова Е.О., Донских Е.И., Бердников Р.В. Биотехнологии гаплоидов как инструмент создания селекционного материала сахарной свеклы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(8):812-821). DOI: 10.18699/VJ21.094
- Koshkin E.I. Physiology of sustainability of agricultural crops: textbook (Fiziologiya ustoychivosti selskokhozyaystvennykh kultur: uchebnik). Moscow: Drofa; 2010. [in Russian] (Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур: учебник. Москва: Дрофа; 2010).
- Kott L.S., Polsoni L., Ellis B., Beversdorf W.D. Autotoxicity in isolated microspore cultures of *Brassica napus*. *Canadian Journal of Botany*. 1988;66(8):1665-1670. DOI: 10.1139/b88-227
- Kozar E.V., Korotseva K.S., Romanova O.V., Chichvarina O.A., Kan L.Yu., Ahramenko V.A., Domblides E.A. Production of doubled haploids in *Brassica purpuraria*. *Vegetable crops of Russia*. 2019;(6):10-18. [In Russian] (Козарь Е.В., Коротцева К.С., Романова О.В., Чичварина О.А., Кан Л.Ю., Ахраменко В.А., Домблидес Е.А. Получение удвоенных гаплоидов *Brassica purpuraria*. *Овощи России*. 2019;(6):10-18). DOI: 10.18619/2072-9146-2019-6-10-18
- Lee S.S., Kim A.J. Effect of cultural vessel, plant growth regulator, illuminating and shaking on embryo induction and growth in microspore culture of heading *Chinese cabbage*. *Korean journal of horticultural science and technology*. 2000;41:16-20.
- Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 1982;105:427-434. DOI: 10.1016/S0044-328X(82)80040-8
- Lionneton E., Beuret W., Delaire C., Ochatt S., Rancillac M. Improved microspore culture and doubled-haploid plant regeneration in the brown condiment mustard (*Brassica juncea*). *Plant Cell Reports*. 2001;20:126-130. DOI: 10.1007/s002990000292
- Lou P., Zhao J., He H., Hanhart C., Carpio D.P.D., Verkerk R., Custers J., Koornneef M., Bonnema G. Quantitative trait loci for glucosinolate accumulation in *Brassica rapa* leaves. *The New Phytologist*. 2008;179(4):1017-1032. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02530.x
- Minkhorst T. Optimization of doubled haploid protocol for *Brassica rapa* ssp.: the effect of sucrose reduction in the culture medium on embryo formation [dissertation]. Wageningen University; 2012.
- Na H., Kwak J.H., Chun C. The effect of plant growth regulators activated charcoal and AgNO<sub>3</sub> on microspore derived embryo formation in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 2011;52(5):524-529. DOI: 10.1007/s13580-011-0034-7
- Na H.Y., Park S.H., Hwanh G.Y., Yoon M.K., Chun C.H. Medium, AgNO<sub>3</sub>, activated charcoal and NAA effects on microspore culture in *Brassica rapa*. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*. 2009;27(4):657-661.
- Nagaharu U. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*. 1935;7:389-452.
- Parihar D.S., Aradhye S. Microspore culture for induction of doubled haploidy in *B. juncea* and *B. rapa*. In: *Proceedings 10th International Rapeseed Congress, 1999 Sept. 26-29; Canberra, Australia*. Australia: the regional institute online publishing. Available from: URL: <http://www.regional.org.au/au/gcirc/4/246>.

- htm [дата обращения: 28.07.2023].
- Prem D., Gupta K., Agnihotri A. Effect of various exogenous and endogenous factors on microspore embryogenesis in Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern & Coss). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2005;41:266-273. DOI: 10.1079/IVP2005636
- Prem D., Gupta K., Sarkar G., Agnihotri A. Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2008;93:269-282. DOI: 10.1007/s11240-008-9373-1
- Sato S., Kato N., Iwai S., Hagimori M. Effect of low temperature pretreatment of buds or inflorescence on isolated microspore culture in *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*). *Breeding Science*. 2002;52:23-26. DOI: 10.1270/jsbbs.52.23
- Sato T., Nishio T., Hirai M. Plant regeneration from isolated microspore cultures of Chinese cabbage (*Brassica campestris* spp. *pekinensis*). *Plant Cell Reports*. 1989;8:486-488. DOI: 10.1007/BF00269055
- Shariatpanahi M.E., Bala U., Heberle-Bors E., Touraev A. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiologia Plantarum*. 2006;127:519-534.
- Shmykova N.A., Shumilina D.V., Suprunova T.P. Doubled haploid production in *Brassica* L. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(1):111-120. [in Russian] (Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Супрунова Т.П. Получение удвоенных гаплоидов у видов рода *Brassica* L. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(1):111-120). DOI: 10.18699/VJ15.014
- Shumilina D., Kornukhin D., Domblides E., Soldatenko A., Artemyeva A. Effects of genotype and culture conditions on microspore embryogenesis and plant regeneration in *Brassica Rapa* ssp. *rapa* L. *Plants*. 2020;9(2):278. DOI: 10.3390/plants9020278
- Shumilina D., Kozar E., Chichvarina O., Korotseva K., Domblides E. *Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* isolated microspore culture protocol. In: J.M. Segui-Simarro (ed.). *Doubled Haploid Technology: Methods in Molecular Biology*. New York: Humana; 2021. Vol. 2288. p.145-162. DOI: 10.1007/978-1-0716-1335-1\_9
- Shumilina D.V., Shmykova N.A., Bondareva L.L., Suprunova T.P. The effect of genotype and environmental components on embryogenesis in the culture of microspores of Chinese cabbage *Brassica rapa* ssp. *chinensis* variety Lastochka (Vliyanie genotipa i komponentov sredy na embriogenez v kulture mikrospor kapusty kitayskoy *Brassica rapa* ssp. *chinensis* sorta Lastochka). *Biology Bulletin*. 2015;4:368-375. [in Russian] (Шумилина Д.В., Шмыкова Н.А., Бондарева Л.Л., Супрунова Т.П. Влияние генотипа и компонентов среды на эмбриогенез в культуре микроспор капусты китайской *Brassica rapa* ssp. *chinensis* сорта Lastochka). *Известия Российской академии наук. Серия: Биологическая*. 2015;4:368-375).
- Takahashi Y., Yokoi S., Takahata Y. Improvement of microspore culture method for multiple samples in *Brassica*. *Breeding Science*. 2012;61:96-98. DOI: 10.1270/jsbbs.61.96
- Touraev A., Indrianto A., Wratschko I., Vicente O., Heberle-Bors E. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sexual Plant Reproduction*. 1996;9:209-215. DOI: 10.1007/BF02173100
- Touraev A., Vicente O., Heberle-Bors E.F. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in plant science*. 1997;2(8):297-302.
- Wang T., Li H., Zhang J., Ouyang B., Lu Y., Ye Z. Initiation and development of microspore embryogenesis in recalcitrant purple flowering stalk (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *purpurea* Hort.) genotypes. *Scientia Horticulturae*. 2009;121:419-424. DOI: 10.1016/J.SCIEN.2009.03.012
- Wong R.S.C., Zee S.Y., Swanson E.B. Isolated microspore culture of Chinese flowering cabbage (*Brassica campestris* ssp. *parachinensis*). *Plant Cell Reports*. 1996;15:396-400. DOI: 10.1007/BF00232062
- Zhang F., Takahata Y. Inheritance of microspore embryogenic ability in *Brassica* crops. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001;103:254-258. DOI: 10.1007/s001220100602
- Zhang Y., Wang A., Liu Y., Wang Y., Feng H. Effects of the antiauxin PCIB on microspore embryogenesis and plant regeneration in *Brassica rapa*. *Scientia Horticulturae*. 2011;130:32-37.
- Zhang Y., Wang A., Liu Y., Wang Y., Feng H. Improved production of doubled haploids in *Brassica rapa* through microspore culture. *Plant Breeding* 2012;131:164-169. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2011.01927.x
- Zhao J., Artemyeva A.M., Del Carpio D.P., Basnet R.K., Zhang N., Gao J., Li F., Bucher J., Wang X., Visser R.G., Bonnema G. Design of a *Brassica rapa* core collection for association mapping studies. *Genome*. 2010a;53(11):884-98. DOI: 10.1139/G10-082
- Zhao J., Kulkarni V., Liu N., Del Carpio D.P., Bucher J., Bonnema G. *BrFLC2* (FLOWERING LOCUS C) as a candidate gene for a vernalization response QTL in *Brassica rapa*. *Journal of Experimental Botany*. 2010b;61(6):1817-1825. DOI: 10.1093/jxb/erq048
- Zhao J., Wang X., Deng B., Lou P., Wu J., Sun R., Xu Z., Vromans J., Koornneef M., Bonnema G. Genetic relationships within *Brassica rapa* as inferred from AFLP fingerprints. *Theoretical and Applied Genetics*. 2005;110(7):1301-1314. DOI: 10.1007/s00122-005-1967-y

### Информация об авторах

**Анастасия Андреевна Асланова**, младший научный сотрудник, лаборатория селекции и клеточных технологий отдела генетических ресурсов овощных и бахчевых культур, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, a.aslanova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0009-0006-3429-0060>

**Анастасия Борисовна Курина**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, и.о. зав. лабораторией селекции и клеточных технологий отдела генетических ресурсов овощных и бахчевых культур, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, a.kurina@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3197-4751>

### Information about the authors

**Anastasiya A. Aslanova**, Junior researcher, Laboratory of Breeding and Cell Technologies, Department of Genetic Resources of Vegetable and Cucurbit Crops, N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, a.aslanova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0009-0006-3429-0060>

**Anastasiya B. Kurina**, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Acting Head, Laboratory of Breeding and Cell Technologies at the Department of Genetic Resources of Vegetable and Cucurbit Crops, N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, a.kurina@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3197-4751>

---

**Вклад авторов:** все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

**Contribution of the authors:** *the authors contributed equally to this article.*

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interests:** *the authors declare no conflicts of interests.*

Статья поступила в редакцию 10.07.2023; одобрена после рецензирования 31.07.2023; принята к публикации 25.09.2023.

The article was submitted on 10.07.2023; approved after reviewing on 31.07.2023; accepted for publication on 25.09.2023.