

Оригинальная статья / Original article

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2025-6-34-40>
УДК: 635.342:576.3:581.3

Е.В. Козарь*, А.И. Минейкина,
Т.В. Заячковская, С.Н. Белов,
Ю.В. Кулаков, О.А. Чичварина,
М.Г. Фомичева, Я.П. Туксер,
К.С. Стебницкая, Т.С. Вюртц,
Д.Д. Васильева, Е.А. Домблидес

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный научный центр овощеводства" (ФГБНУ ФНЦО)
143072, Россия, Московская область, Одинцовский район, п. ВНИИССОК,
ул. Селекционная, д. 14

*Автор для переписки: koz.leno4ek@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 09.ССЦ.25.10 "Селекционно-семеноводческий центр овощных культур" № 075-15-2025-245.

Вклад авторов: Козарь Е.В.: методология, визуализация, ресурсы, проведение исследований, формальный анализ, верификация данных, администрирование данных, создание черновика рукописи. Минейкина А.И., Заячковская Т.В., Белов С.Н., Кулаков Ю.В., Чичварина О.А., Фомичева М.Г., Туксер Я.П., Стебницкая К.С., Вюртц Т.С., Васильева Д.Д.: проведение исследований, формальный анализ, верификация данных. Домблидес Е.А.: руководство исследованием, администрирование проекта, ресурсы, создание рукописи и ее редактирование.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Для цитирования: Козарь Е.В., Минейкина А.И., Заячковская Т.В., Белов С.Н., Кулаков Ю.В., Чичварина О.А., Фомичева М.Г., Туксер Я.П., Стебницкая К.С., Вюртц Т.С., Васильева Д.Д., Домблидес Е.А. Культивирование микроспор на шейкере повышает качество эмбриоидов и эффективность регенерации при получении удвоенных гаплоидов из микроспор капусты белокочанной (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Овощи России*, 2025;(6):34-40. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2025-6-34-40>

Поступила в редакцию: 22.10.2025

Принята к печати: 18.11.2025

Опубликована: 18.12.2025

Elena V. Kozar*, Anna I. Mineykina,
Tatyana V. Zayachkovskaya, Sergey N. Belov,
Yuri V. Kulakov, Olga A. Chichvarina,
Maria G. Fomicheva, Yana P. Tukuser,
Ksenia S. Stebnitskaya, Tatyana S. Vjurtts,
Daria D. Vasilieva, Elena A. Dombliides

FSBSI Federal Scientific
Vegetable Center (FSBSI FSVC)
14, Selektionnaya str., VNISSOK,
Odintsovo region, Moscow district, 143072, Russia

*Corresponding Author: oz.leno4ek@gmail.com

Funding. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, grant No. 09.SSC.25.10 "Breeding and Seed Center for Vegetable Crops" No. 075-15-2025-245.

Authors' Contribution: Kozar E.V.: methodology, visualization, resources, investigation, formal analysis, validation, data curation, writing – original draft. Mineykina A.I., Zayachkovskaya T.V., Belov S.N., Kulakov Yu.V., Chichvarina O.A., Fomicheva M.G., Tukuser Ya.P., Stebnitskaya K.S., Vjurtts T.S., Vasilieva D.D.: investigation, formal analysis, validation. Dombliides E.A.: supervision, project administration, resources, writing – review & editing.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

For citation: Kozar E.V., Mineykina A.I., Zayachkovskaya T.V., Belov S.N., Kulakov Yu.V., Chichvarina O.A., Fomicheva M.G., Tukuser Ya.P., Stebnitskaya K.S., Vjurtts T.S., Vasilieva D.D., Dombliides E.A. Shaker-based microspore culture improves embryoid quality and regeneration efficiency in the production of doubled haploids from microspores of white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Vegetable crops of Russia*, 2025;(6):34-40. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2025-6-34-40>

Received: 27.09.2025

Accepted for publication: 07.11.2025

Published: 18.12.2025

Культивирование микроспор на шейкере повышает качество эмбриоидов и эффективность регенерации при получении удвоенных гаплоидов из микроспор капусты белокочанной (*Brassica oleracea* var. *capitata*)

Check for updates



РЕЗЮМЕ

Актуальность. Технология получения удвоенных гаплоидов (DH) позволяет ускорить селекцию гомозиготных линий у белокочанной капусты, однако её эффективность ограничена генотип-зависимостью. Оптимизация условий культивирования, включая использование платформы-шейкера, может повысить выход и регенерационный потенциал эмбриоидов.

Методы. Исследованы три генотипа капусты белокочанной (№ 2502, 2503, 2504). Микроспоры культивировали в стационарных условиях и на шейкере (40–50 об/мин). На 30-е сутки оценивали стадии развития эмбриоидов; далее их переносили на среду регенерации и через 3 месяца фиксировали успешность регенерации в полноценные растения.

Результаты. Культивирование на шейкере достоверно увеличивало долю семядольных эмбриоидов (до 81,7% у генотипа 2502) и снижало частоту аномалий (до 0% у генотипа 2503). Общая регенерационная способность эмбриоидов в условиях шейкера составила 30,5±5,4% против 19,2±2,8% в стационарных условиях. Наиболее эффективно регенерировали семядольные эмбриоиды, полученные с использованием шейкера (36,5%). Результаты подтверждают целесообразность внедрения шейкера в DH-протоколы капусты белокочанной с целью повышения её эффективности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

капуста белокочанная, удвоенные гаплоиды, микроспоры, эмбриоиды, регенерация растений

Shaker-based microspore culture improves embryoid quality and regeneration efficiency in the production of doubled haploids from microspores of white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*)

ABSTRACT

Relevance. Doubled haploid (DH) technology enables accelerated breeding of homozygous lines in white cabbage; however, its efficiency is limited by genotype dependency. Optimizing culture conditions, including the use of a shaker platform, may enhance embryoid yield and regeneration potential.

Methodology. We studied three white cabbage genotypes (No. 2502, 2503, and 2504). Microspores were cultured under both static and shaking conditions (40-50 rpm) for 30 days. On day 30, we assessed the developmental stages of the embryoids. After that, the embryoids were transferred to a regeneration medium and, after three months, we recorded successful regeneration into fully developed plants.

Results. Shaker culture significantly increased the proportion of cotyledonary-stage embryoids (up to 81.7% in genotype 2502) and reduced the frequency of abnormalities (down to 0% in genotype 2503). Overall embryoid regeneration capacity under shaker conditions was 30.5±5.4%, compared to 19.2±2.8% under static conditions. Cotyledonary embryoids produced on the shaker showed the highest regeneration efficiency (36.5%). These findings support the implementation of shaker-based culture in DH protocols for white cabbage to improve overall efficiency.

KEYWORDS:

cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*), doubled haploids, microspores, embryoids, plant regeneration

Введение

Технология получения удвоенных гаплоидов (DH) через культуру микроспор *in vitro* представляет собой мощный инструмент современной селекции, позволяющий в сжатые сроки создавать полностью гомозиготные линии. Это значительно ускоряет селекционный процесс по сравнению с традиционными методами, требующими многолетнего инбридинга. В контексте капусты белокочанной (*Brassica oleracea* var. *capitata*), одной из важнейших овощных культур мира, внедрение этой технологии имеет колоссальный потенциал для ускорения создания новых высокоурожайных и адаптированных сортов и гибридов, поскольку эта культура имеет двухлетний вегетационный период [1].

Несмотря на очевидные преимущества, широкое применение DH-технологий в селекционной практике для ряда культур было и остается ограниченным из-за низкой и непредсказуемой эффективности, которая сильно зависит от множества факторов [2-7]. Одним из главных препятствий является генотип-зависимость отзывчивости культур к технологии: некоторые сорта или генотипы демонстрируют высокую чувствительность к стрессовым индукторам и легко образуют эмбриониды, в то время как другие практически не реагируют на стандартные протоколы. Эта вариабельность затрудняет разработку универсального протокола и требует тщательной оптимизации условий для каждого отдельного генотипа. Другими критически важными факторами, влияющими на успех, являются стадия развития микроспор, условия подготовки исходного материала, состав питательных сред, температурный режим, плотность клеток в культуре и пр. [8-14].

Эффективное получение удвоенных гаплоидов у капустных культур требует не только высокой урожайности эмбрионидов, но и их успешной регенерации в целые растения. Одним из ключевых факторов, определяющих общий выход эмбрионидов и их морфологическое качество, является режим культивирования микроспор на этапе индукции эмбриогенеза и созревания эмбриогенных структур.

В частности, использование ротационного шейкера вместо стационарных условий стало важным усовершенствованием протоколов культуры микроспор. Исследования на пак-чой (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) показали, что культивирование микроспор при умеренном встряхивании повышает урожайность эмбрионидов, ускоряет их морфогенез на несколько дней и увеличивает долю нормальных семядольных эмбрионидов снижая частоту аномальных форм [15]. Положительный эффект шейкера связывают с улучшением вентиляции и аэрации, интенсификацией дыхания клеток, равномерным перемешиванием компонентов среды и ускоренным поглощением питательных веществ эмбриоидами [16].

Остановка в развитии и деформация некоторых эмбрионов в культурах могут быть вызваны накоплением ингибиторов в питательной среде [18,19]. Аэрация за счёт встряхивания культуры микроспор различных видов *Brassica* может способствовать удалению ингибиторов, которые накапливаются в питательной среде [20].

Исследования накопления токсичных веществ, выделяемых в питательную среду *B. napus*, показали, что старые микроспоры, которые не развиваются в эмбриониды, выделяют антиэмбриогенные вещества, которые подавляют индукцию и заметно снижают рост и развитие существующих эмбрионов [18]. В культуре микроспор для перехода с гаметофитного на спорофитный путь развития используют-

ся различные стрессовые воздействия, такие как повышенные и пониженные температуры, которые приводят к повышенной выработке активных форм кислорода (АФК) и оксида азота (NO). Исследования указывают на тесную связь между выработкой АФК и аутофагией, естественным процессом деградации и переработки клеточных компонентов у растений [21]. В исследовании по изучению АФК на развитие эмбрионидов в культуре изолированных микроспор *B. napus* Rueda-Varela [22] в методике также упоминается использование платформы-шейкера.

Наряду с условиями индукции, успешность регенерации эмбрионидов в полноценные растения в высокой степени зависит от их физиологической зрелости и морфологической стадии развития на момент переноса на среду прорастания. Классическая работа Kott и Beversdorf [23] на *Brassica napus* выявила чёткую зависимость: эмбриониды пересаженные на твердую среду на 35-й день культивирования прорастали в несколько раз лучше, чем эмбриониды пересаженные на 21-й день или 49-й день культивирования. Это указывает на существование «временного окна», соответствующего оптимальной физиологической готовности эмбрионидов к прорастанию.

Этот феномен подтверждается и на уровне морфологии. В исследовании на *Brassica nigra* было показано, что эмбриониды на ранней семядольной стадии развития (early cotyledonary) регенерируют значительно эффективнее, чем более зрелые семядольные эмбриониды [24].

Консервативность этой закономерности подтверждается и у злаков. Например, у пшеницы, было показано, что регенерационный потенциал тесно связан с возрастом и размером эмбрионидов. Крупные эмбриониды, перенесенные на регенерационную среду в оптимальный временной интервал, демонстрируют максимальную частоту образования зеленых растений и минимальный уровень альбинизма [25, 26].

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый для модельных видов и отдельных сортов, капуста белокочанная (*Brassica oleracea* var. *capitata*) остается культурой, для которой надежные и высокоэффективные протоколы культуры микроспор требуют дальнейшей разработки. Комплексное изучение ключевых факторов, таких как физические условия культивирования (встряхивание) и стадия развития эмбрионидов на урожайность эмбрионидов и успешность регенерации соответственно в контексте данной культуры, является актуальной научной задачей.

Результаты этого исследования могут способствовать разработке более эффективных, стандартизированных и воспроизводимых протоколов микроспорового окультуривания для белокочанной капусты. Это, в свою очередь, окажет прямое практическое воздействие на селекционные программы, позволяя сократить сроки получения гомозиготных линий и повысить выход ценного, генетически стабильного материала, а также позволит внести вклад в понимание физиологических основ индукции эмбриогенеза.

Материалы и методы

Материал исследования и условия выращивания донорных растений. В работе использованы 3 сортаобразца капусты белокочанной из коллекции агрофирмы «Поиск»: № 2502, 2503, 2504. Донорные растения выращивали в условиях закрытого грунта.

Исследование влияния режима культивирования микроспор на урожайность эмбрионидов. Микроспоры

изолировали из бутонов размером 4,5-5,2 мм. из расчета 5 бутонов на 1 чашку Петри согласно протоколу, разработанному в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦО для культуры микроспор семейства Brassicaceae [27].

Температурная обработка 32°C в течение 24 часов в темноте сразу после введения микроспор в культуру *in vitro* в термостате проходила в стационарном состоянии. Затем культивируемые чашки Петри были помещены в условия термостата при 25°C в темноте на платформу-шейкер (40-50 об/мин) и без (стационарно). Урожайность и морфологию эмбриоидов оценивали на 30-е сутки культивирования микроспор. Опыты были проведены в 3-х кратной биологической и 3-х кратной технической повторностях.

Исследование влияния морфологии и стадии развития эмбриоидов на эффективность регенерации. После 30-ти суток культивирования микроспор эмбриоиды пересаживали на твердую без гормональную среду для регенерации МС с 2% сахарозы и 7,0 г/л агар, pH 5.8 [28]. Эмбриоиды пересаживали на всех стадиях развития, от глобулярной стадии до семядольной стадии развития. Культивирование проводили на стеллажах с люминесцентными лампами, с фотопериодом 14 ч, освещенностью 2500 люкс, постоянной температурой 25°C.

Оценку регенерационной способности проводили спустя 3 месяца с момента пересадки эмбриоидов на твердую питательную среду. Если растение к моменту оценки было успешно укоренено в условиях *in vitro*, то регенерацию считали успешной, во всех других случаях регенерацию считали не успешной. Опыты были проведены в 3-х кратной биологической и 3-х кратной технической повторностях.

Статистический анализ. Статистический анализ данных проводили в программе Statistica v 6.0. Проводили однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), после чего данный подвергались тесту Дункана на уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Исследование влияния режима культивирования микроспор на урожайность эмбриоидов

Исследование показало, что эффективность эмбриогенеза микроспор у капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *alba*) в значительной степени зависит как от генотипа, так и от способа культивирования микроспор – в стационарных условиях (без платформы-шейкера, «б/ш») или на платформе-шейкере («ш»). Анализ количества и популяционного состава полученных эмбриоидов выявил выраженные различия между условиями индукции и генотипами (табл. 1).

Наиболее высокая частота образования эмбриоидов на семядольной стадии, являющейся маркером зрелых и потенциально регенерирующих структур, наблюдалась у генотипа 2502 при культивировании на платформе-шейкере: $81,7 \pm 13,5\%$ от общего количества эмбриоидов ($24,0 \pm 5,3$ шт. на чашку Петри), что статистически значимо превышало показатель в стационарных условиях ($37,6 \pm 5,5\%$, $p < 0,05$). При этом в условиях культивирования на платформе-шейкере у генотипа 2502 наблюдалось почти полное отсутствие аномальных эмбриоидов ($1,8 \pm 3,1\%$ против $31,8 \pm 15,7\%$ в стационарных условиях), что свидетельствует о более высокой морфогенетической стабильности процесса эмбриогенеза.

У генотипа 2503 также зафиксировано достоверное увеличение доли нормальных эмбриоидов на семядольной стадии при культивировании на шейкере ($71,0 \pm 7,8\%$) по сравнению со стационарными условиями ($13,9 \pm 12,7\%$). Примечательно, что в последнем случае преобладали аномальные формы ($42,5 \pm 6,6\%$), в то время как при использовании шейкера аномалии в развитии полностью отсутствовали.

Таблица 1. Популяционный состав стадий развития эмбриоидов на 30-е сутки культивирования у различных генотипов капусты белокочанной при различном режиме культивирования
Table 1. The population composition of embryoid developmental stages on day 30 of culture for different white cabbage genotypes under various culture conditions

Генотип	Условия культивирования	Количество эмбриоидов, % от общего числа				Всего эмбриоидов на чашку Петри, шт.
		на семядольной стадии развития	на торпедовидной стадии развития	на глобулярной стадии развития	аномальные	
2502	б/ш	$37,6 \pm 5,5$ b1/A2	$14,1 \pm 8,8$ a/B	$16,5 \pm 10,0$ a/B	$31,8 \pm 15,7$ a/A	$37,3 \pm 5,5$ a
	ш	$81,7 \pm 13,5$ a/A	$11,5 \pm 7,2$ a/B	$5,1 \pm 5,4$ a/B	$1,8 \pm 3,1$ a/B	$29,7 \pm 7,0$ a
2503	б/ш	$13,9 \pm 12,7$ b/B	$21,9 \pm 10,6$ a/B	$21,7 \pm 20,2$ a/AB	$42,5 \pm 6,6$ a/A	$8,0 \pm 2,0$ a
	ш	$71,0 \pm 7,8$ a/A	$21,1 \pm 8,7$ a/B	$7,9 \pm 6,9$ a/BC	$0,0 \pm 0,0$ a/C	$9,3 \pm 1,5$ a
2504	б/ш	$26,1 \pm 11,1$ b/A	$13,9 \pm 13,6$ a/A	$27,5 \pm 19,6$ a/A	$32,5 \pm 21,4$ a/A	$14,3 \pm 3,5$ a
	ш	$50,8 \pm 5,5$ a/A	$32,1 \pm 5,0$ a/B	$10,4 \pm 11,2$ a/C	$6,7 \pm 11,5$ a/C	$11,7 \pm 3,1$ a

Ш – культивирование микроспор с использованием платформы-шейкера, б/ш – культивирование микроспор без платформы-шейкера. В таблице представлены средние \pm Sd. Варианты, отмеченные одной и той же строчной буквой (1) (сравнение процентной доли эмбриоидов внутри одной стадии развития и внутри одного генотипа при различных режимах культивирования), отмеченные одной и той же заглавной буквой (2) (сравнение процентной доли эмбриоидов на различных стадиях развития внутри одного генотипа и режима культивирования) не имеют значимых различий с вероятностью 95% согласно тесту Дункана.

Ш – microspore culture using a shaker platform; б/ш – microspore culture without a shaker platform. Data in the table are presented as mean \pm SD. Means with the same lowercase letters (1) (comparing the percentage of embryoids within the same developmental stage and within the same genotype under different culture conditions) or with the same uppercase letters (2) (comparing the percentage of embryoids across different developmental stages within the same genotype and culture condition) do not differ significantly at the 95% confidence level according to Duncan's test.

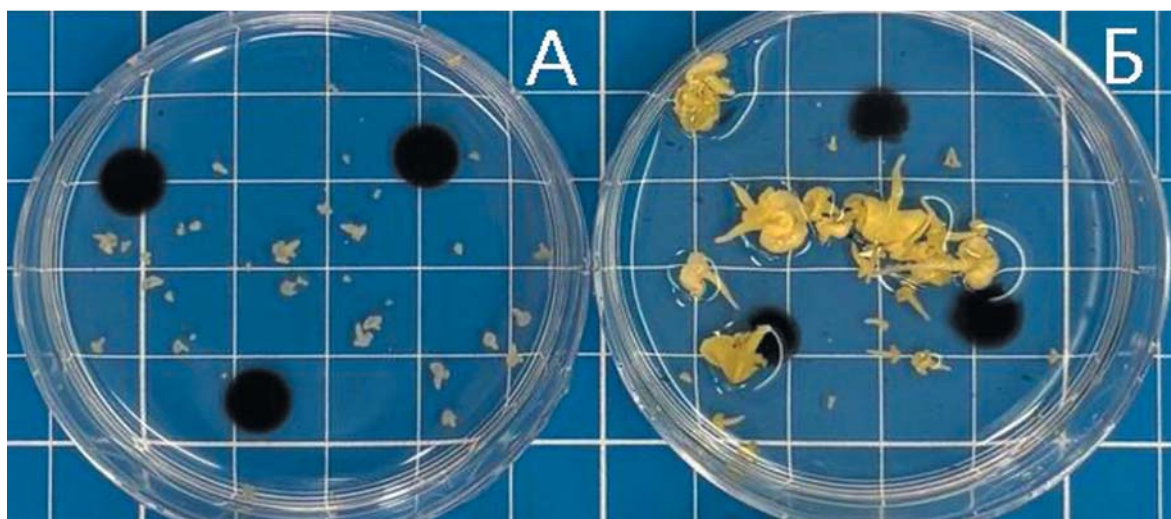


Рис. 1. Урожайность и морфологические особенности эмбриоидов капусты белокочанной № 2052 на 30-е сутки при различных режимах культивирования. А - культивирование в стационарном состоянии без платформы шейкера, Б - культивирование с использованием платформы-шейкера
Fig. 1. Yield and morphological characteristics of white cabbage (genotype No. 2052) embryooids on day 30 under different culture conditions. А – static culture without a shaker platform; Б – culture using a shaker platform

Генотип 2504 продемонстрировал умеренный, но статистически значимый положительный эффект от культивирования на платформа-шейкере: доля эмбриоидов на семядольной стадии развития увеличилась с $26,1 \pm 11,1\%$ (б/ш) до $50,8 \pm 5,5\%$ (ш), а частота аномальных форм снизилась с $32,5 \pm 21,4\%$ до $6,7 \pm 11,5\%$. Кроме того, в условиях шейкера у этого генотипа наблюдался рост доли эмбриоидов на торпедовидной стадии (с $13,9\%$ до $32,1\%$), что может указывать на ускорение морфогенеза под действием механического перемешивания среды.

Общее количество эмбриоидов на чашку Петри варьировалось незначительно между условиями культивирования внутри каждого генотипа, однако популяционное распре-

деление по стадиям развития эмбриоидов и частота аномалий существенно различались. В том числе стадии развития эмбриоидов различались в зависимости от режима культивирования (рис. 1). Эмбриоиды, сформировавшиеся в условиях стационарного культивирования были меньше и имели менее интенсивную окраску по сравнению с эмбриоидами, сформированными при использовании платформы-шейкера.

Таким образом, культивирование микроспор на платформа-шейкере способствовало не только повышению частоты формирования нормальных эмбриоидов на поздних стадиях развития (семядольной и торпедовидной), но и снижению доли аномальных структур во всех исследованных геноти-

Таблица 2. Доля эмбриоидов капусты белокочанной на различной стадии развития из которых были регенерированы растения
Table 2. The proportion of white cabbage embryos at different stages of development from which plants were successfully regenerated

Стадия развития	Доля эмбриоидов с успешной регенерацией, %	
	б/ш	ш
Семядольная	$15,7 \pm 8,6$ b	$36,5 \pm 7,6$ a
Торпедовидная	$16,1 \pm 0,9$ a	$26,9 \pm 20,5$ a
Глобулярная	$7,9 \pm 8,4$ a	$20,8 \pm 26,0$ a
Аномальные	$25,3 \pm 10,4$ a	$3,7 \pm 6,4$ b
Все стадии эмбриоидов	$19,2 \pm 2,8$ b	$30,5 \pm 5,4$ a

ш – культивирование микроспор с использованием платформы-шейкера, б/ш – культивирование микроспор без платформы-шейкера. В таблице представлены средние \pm Sd. Варианты, отмеченные одной и той же строчной буквой (сравнение процентной доли эмбриоидов с успешной регенерацией внутри одной стадии развития при различных режимах культивирования), не имеют значимых различий с вероятностью 95% согласно тесту Дункана.

Ш – microspore culture using a shaker platform; б/ш – microspore culture without a shaker platform. Data in the table are presented as mean \pm SD. Means sharing the same lowercase letter (comparing the percentage of embryooids with successful regeneration within the same developmental stage under different culture conditions) do not differ significantly at the 95% confidence level according to Duncan's test.

пах и более быстрому развитию эмбрионов в целом. Наибольший положительный эффект от использования шейкера был зафиксирован у наиболее отзывчивого генотипа (в частности, 2502), тогда как у менее отзывчивого генотипа (например, 2503) эффект проявлялся в основном в улучшении качества, а не количества эмбрионов.

Исследование влияния морфологии и стадии развития эмбрионов на эффективность регенерации

В ходе исследования оценено влияние стадии развития эмбрионов капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) на эффективность регенерации полноценных растений, а также влияние условий культивирования микро-спор — с использованием платформы-шейкера (Ш) и без неё (Б/Ш).

В результате анализа было показано, что между генотипами не было статистически значимых различий в доле успешно регенерированных эмбрионов в зависимости от их стадии развития (данные не показаны), когда как в зависимости от режима культивирования различия наблюдались. Ввиду этого для более достоверной статистической выборки было принято решение объединить результаты оценки доли успешно регенерируемых эмбрионов в зависимости от стадии развития эмбрионов у различных генотипов, результаты представлены в таблице 2.

Как следует из данных таблицы 2, общая доля эмбрионов, из которых были успешно регенерированы растения, составила 30,5±5,4% при культивировании на платформе-шейкере и 19,2±2,8% — при культивировании в статических условиях. Различия между этими значениями статистически значимы согласно тесту Дункана ($p < 0,05$), что свидетельствует о необходимости использования шейкера для повышения эффективности последующей регенерации эмбрионов.

Анализ по стадиям развития эмбрионов выявил следующие закономерности. Наиболее высокая регенерационная способность наблюдалась у эмбрионов на семядольной стадии развития при культивировании на платформе-шейкере — доля успешно регенерировавших эмбрионов составила 36,5±7,6%, что статистически значимо превышало показатель успешной регенерации эмбрионов такой же стадии развития, полученных в статических условиях (15,7±8,6%). Для торпедовидных и глобулярных эмбрионов различия в доле успешно регенерируемых из них не оказались статистически значимыми ($p > 0,05$) при различных режимах культивирования: в обеих группах эффективность регенерации оставалась сопоставимой и высоко вариабельной (особенно для торпедовидной стадии в условиях шейкера — 26,9±20,5%, и глобулярной — 20,8±26,0%).

Интересную тенденцию продемонстрировали аномальные эмбрионы: при статическом культивировании они показали относительно высокую регенерационную способность (25,3±10,4%), в то время как при использовании шейкера доля эмбрионов способных к регенерации резко снизилась до 3,7±6,4% (различия значимы, $p < 0,05$).

Обсуждение

Полученные в настоящем исследовании результаты подтверждают, что эффективность получения удвоенных гаплоидов у белокочанной капусты (*Brassica oleracea* var. *capitata*) в значительной степени определяется как генотипическими особенностями донорных растений, так и условиями культивирования микро-спор *in vitro*. Прежде всего,

подтверждается ключевая роль режима культивирования — в частности, использование платформы-шейкера — как важного фактора, способного не только повысить урожайность эмбрионов, но и улучшить их морфологическое качество и последующую регенерационную способность.

Наблюдаемое во всех трёх генотипах повышение доли эмбрионов на поздних (семядольной и торпедовидной) стадиях развития при культивировании с использованием шейкера согласуется с данными, полученными ранее на других видах *Brassica*, таких как *B. rapa* ssp. *chinensis* [15] и *B. napus* [22]. Эти результаты указывают на универсальность положительного эффекта механического перемешивания среды при индукции микро-спорного эмбриогенеза у капустных. Улучшение аэрации, равномерное распределение питательных веществ и, возможно, снижение концентрации ингибиторов, выделяемых незембрионными микро-спорами [18, 20], вероятно, способствуют более устойчивому и скоординированному развитию эмбрионов. Снижение доли аномальных форм в условиях шейкера — особенно ярко выраженное у генотипов 2502 и 2503 — дополнительно подтверждает гипотезу о том, что накопление токсичных метаболитов в стационарных условиях подавляет нормальный ход эмбриогенеза и способствует возникновению морфологических aberrаций.

Важно отметить, что генотипическая вариабельность в ответ на один и тот же протокол сохраняется, несмотря на оптимизацию условий. Генотип 2502 продемонстрировал максимальную отзывчивость как по количеству, так и по качеству эмбрионов, тогда как генотип 2503 оставался относительно малоотзывчивым даже при использовании шейкера. Это согласуется с общеизвестной проблемой генотип-зависимости в технологиях ДН и подчеркивает необходимость индивидуального подхода при разработке протоколов для конкретных генотипов. Тем не менее, даже у «трудных» генотипов, таких как 2503, использование шейкера позволило значительно повысить долю нормальных эмбрионов, что делает эту модификацию протокола ценной с практической точки зрения.

Что касается регенерационного потенциала, то наши данные подтверждают существенную роль стадии развития эмбрионов в успешной регенерации. Наиболее высокая эффективность регенерации наблюдалась у эмбрионов на семядольной стадии, полученных в условиях шейкера (36,5%), что статистически значимо превышало аналогичный показатель для стационарных условий. Это согласуется с работами Kott & Beversdorf [23] и Gu и др. [24], указывающими на критическую роль физиологической зрелости эмбрионов для успешного перехода к дальнейшей регенерации с органо-генезом. Интересно, что аномальные эмбрионы, полученные в стационарных условиях, демонстрировали относительно высокий уровень регенерации (25,3%), тогда как в условиях шейкера их регенерационный потенциал падал почти до нуля. Это может свидетельствовать о том, что в стационарных условиях часть «аномальных» структур на самом деле представляет собой эмбрионы с «задержанным» развитием или искажённой морфологией ввиду режима культивирования, но сохраняющие жизнеспособность и высокий регенерационный потенциал, тогда как в условиях улучшенной среды такие формы за счет лучшей аэрации и снижения токсической нагрузки при культивировании на платформе-шейкере смогли бы развиваться в эмбрионы семядольной стадии развития с нормальной морфологией.

Таким образом, культивирование микроспор на платформе-шейкере оказывает комплексное положительное влияние на весь процесс получения ДН-линий у белокочанной капусты: ускоряет морфогенез эмбриоидов, способствуя переходу к поздним (семядольным) стадиям; снижает частоту аномалий за счёт улучшения микросреды; повышает общую регенерационную способность, особенно у эмбриоидов оптимальной морфологической стадии.

Эти результаты представляют собой важный шаг в направлении стандартизации и повышения воспроизводимости протоколов культуры микроспор для белокочанной капусты. Разработка надёжных и эффективных методов *in vitro*-эмбриогенеза для этой культуры напрямую способствует ускорению селекционных программ, сокращению времени вывода новых гибридов и расширению генетического разнообразия селекционного материала.

В дальнейшем перспективным направлением исследований может стать изучение молекулярно-физиологических механизмов, лежащих в основе положительного эффекта шейкера – в частности, роль окислительного стресса, аутофагии и метаболического переустройства клеток в условиях улучшенной аэрации. Также целесообразно провести более детальный анализ связи между структурой эмбриоидов, их транскриптомным и метаболическим профилем и регенерационным потенциалом.

Заключение

В настоящей работе продемонстрировано, что использование платформы-шейкера при культивировании микроспор белокочанной капусты значительно повышает эффективность получения удвоенных гаплоидов за счёт улучшения морфологического качества эмбриоидов и увеличения их регенерационного потенциала. Показано, что культивирование с умеренным перемешиванием способствует преобладанию нормальных эмбриоидов на семядольной стадии развития и резко снижает долю аномальных форм во всех исследованных генотипах. Наибольший положительный эффект наблюдается у наиболее отзывчивого генотипа, однако даже у малореактивных линий использование шейкера позволяет получить более качественный эмбриогенный материал. Кроме того, подтверждена критическая роль стадии развития эмбриоида для успешной регенерации: максимальная эффективность достигается при переносе семядольных эмбриоидов, полученных в условиях шейкера. Полученные результаты вносят существенный вклад в оптимизацию протоколов микроспорной культуры для белокочанной капусты и открывают возможности для повышения воспроизводимости и практической применимости ДН-технологий в селекции этой важной овощной культуры.

• Литература / References

1. Mineykina A., Bondareva L., Soldatenko A., Domblides E. Androgenesis of red cabbage in isolated microspore culture *in vitro*. *Plants*. 2021;10(9). <https://doi.org/10.3390/plants10091950>
2. Kozar E., Domblides E. Protocol of European radish (*Raphanus sativus* L.) microspore culture for doubled haploid plant production. *In: Methods Mol Biol*. 2021;2288:217-232. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1335-1_13
3. Kozar E.V., Domblides E.A., Soldatenko A.V. Embryogenesis of european radish (*Raphanus sativus* L. subsp. *sativus* convar. *radicula*) in culture of isolated microspores *in vitro*. *Plants*. 2021;10(10). <https://doi.org/10.3390/plants10102117>
4. Kozar E.V., Domblides E.A., Soldatenko A.V. Factors affecting DH plants *in vitro* production from microspores of European radish. *Vavilov J Genet Breed*. 2020;24(1):31-39. <https://doi.org/10.18699/VJ20.592> <https://www.elibrary.ru/srrwyq>
5. 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 Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-6-10-18> <https://www.elibrary.ru/udnnot>
6. Kozar E.V., Kozar E.G., Domblides E.A. Effect of the method of microspore isolation on the efficiency of isolated microspore culture *in vitro* for Brassicaceae family. *Horticulturae*. 2022;8(10):864. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100864>
7. Kozar E.V., Kozar E.G., Soldatenko A.V., Domblides E.A. Rooting technique of double haploids obtained in culture of microspore *in vitro* for European radish. *Vegetable crops of Russia*. 2020;(5):3-15. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2020-5-3-15> <https://www.elibrary.ru/dsqppo>
8. Custers J.B.M. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). *In: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I., editors. Doubled Haploid Production in Crop Plants*. 2003. P. 185-186. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_29
9. da Silva Dias J.C. Protocol for broccoli microspore culture. *In: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I., editors. Doubled Haploid Production in Crop Plants*. 2003. P. 195-204. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_30
10. Ahmadi B., Ghadimzadeh M., Moghaddam A.F., Alizadeh K., Teixeira da Silva J.A. Bud length, plating density, and incubation time on microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Int J Veg Sci*. 2012;18(4):346-357. <https://doi.org/10.1080/19315260.2011.647265>
11. 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 Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2018-1-3-7> <https://www.elibrary.ru/xodpbb>
12. Kozar E.V., Domblides E.A. Protocol for obtaining doubled haploids in isolated microspore culture *in vitro* for poorly responsive genotypes of brassicaceae family. *Biol Methods Protoc*. 2024;9(1). <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpae091>
13. Shumilina D., Kozar E., Chichvarina O., et al. *Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* isolated microspore culture protocol. *In: Methods Mol Biol*. 2021;2288:145-162. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1335-1_9
14. Starosta E., Szwarc J., Niemann J., Szweczyk K., Weigt D. *Brassica napus* haploid and double haploid production and its latest applications. *Curr Issues Mol Biol*. 2023;45(5):4431-4450. <https://doi.org/10.3390/cimb45050282>
15. Yang S., Liu X., Fu Y., Zhang X., Li Y., Liu Z., Feng H. The effect of culture shaking on microspore embryogenesis and embryonic development in pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*). *Sci Hortic*. 2013;152:70-73. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.01.019>
16. He H.J., Wang X.W., Wang B.L. Embryogenesis and plant regeneration of Chinese kale via isolated microspore culture. *Acta Hortic Sin*. 2004;31(2):239-240.
17. Gland A., Lichter R., Schweiger H.G. Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica napus* L. *J Plant Physiol*. 1988;132:613-617.

18. Kott L.S., Polsoni L. Autotoxicity in isolated microspore culture of *Brassica napus*. *Can J Bot.* 1988;66:1665-1670.
19. Hansen M, Svinnsset K. Micropore culture of Swede (*Brassica napus* ssp. *rapifera*) and the effects of fresh and conditioned media. *Plant Cell Rep.* 1993;12:496-500.
20. Lichter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species. *Plant Breed.* 1989;103:119-123.
21. Pérez-Pérez M.E., Lemaire S.D., Crespo J.L. The ATG4 protease integrates redox and stress signals to regulate autophagy. *J Exp Bot.* 2021;72:3340-3351. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab063>
22. Rueda-Varela C., Carneros E., et al. Enhancing microspore embryogenesis initiation by reducing ROS, autophagy, and cell death with novel small molecules in rapeseed and barley. *J Plant Physiol.* 2025;311:8. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2025.154546>
23. Kott L.S., Beversdorf W.D. Enhanced plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus* by chilling, partial desiccation and age selection. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 1990;23:187-192. <https://doi.org/10.1007/BF00034430>
24. Gu H., Sheng X., Zhao Z., et al. Initiation and development of microspore embryogenesis and plant regeneration of *Brassica nigra*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 2014;50:534-540. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9612-6>
25. Kunz C., Islam S.M.S., Berberat J., Peter S.O., Büter B., Stamp P., Schmid J.E. Assessment and improvement of wheat microspore derived embryo induction and regeneration. *J Plant Physiol.* 2000;156(2):190-196. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80305-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80305-3)
26. Islam S.M. Effect of embryoids age, size and shape for improvement of regeneration efficiency from microspore-derived embryos in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant OMICS.* 2010;3(5).
27. Dombildes E.A., Shmykova N.A., Shumilina D.V., et al. Technology for obtaining doubled haploids in microspore culture of Brassicaceae family: guidelines. M., 2016. 40 p. ISBN 978-5-901695-71-5.
28. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plant.* 1962;15(3):473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Об авторах:

Елена Викторовна Козарь – кандидат биол. наук, научный сотрудник лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений, <https://orcid.org/0000-0001-5447-5341>, SPIN-код: 4950-0540, автор для переписки, koz.leno4ek@gmail.com

Анна Игоревна Минейкина – кандидат с.-х. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики и цитологии, <https://orcid.org/0000-0001-9864-1137>, SPIN-код: 7179-7360, anna-batmanova@mail.ru

Татьяна Владимировна Заячковская – кандидат с.-х. наук, научный сотрудник лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений, <https://orcid.org/0000-0001-8435-8197>, SPIN-код: 8777-2919, taivka34@mail.ru

Сергей Николаевич Белов – кандидат с.-х. наук, младший научный сотрудник лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений, <https://orcid.org/0000-0002-4387-9153>, SPIN-код: 2054-6579, belov.ser.nik@gmail.com

Юрий Владимирович Кулаков – младший научный сотрудник лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений, <https://orcid.org/0000-0002-3718-3854>, SPIN-код: 1070-4035, ykulakov12@yandex.ru

Ольга Александровна Чичварина – младший научный сотрудник лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений, <https://orcid.org/0000-0001-5297-2969>, SPIN-код: 1013-5493, chichvarina07@rambler.ru

Мария Григорьевна Фомичева – кандидат биол. наук, научный сотрудник лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений, <https://orcid.org/0000-0002-0281-0467>, SPIN-код: 3219-3462, maria.fomicheva.1@yandex.ru

Яна Петровна Тукусер – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики и цитологии, <https://orcid.org/0000-0003-2305-1575>, SPIN-код: 8520-1999, yana-tukuser@mail.ru

Ксения Станиславовна Стебницкая – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики и цитологии, <https://orcid.org/0000-0002-2284-0532>, SPIN-код: 1152-1934, k-korottseva@yandex.ru

Татьяна Сергеевна Вюртц – кандидат с.-х. наук, научный сотрудник лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений, <http://orcid.org/0000-0003-3956-4172>, SPIN-код: 5482-3921, tajtza@yandex.ru

Дарья Дмитриевна Васильева – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики и цитологии, <https://orcid.org/0009-0000-3965-9820>, vasiljeva206001@yandex.ru

Елена Алексеевна Домблидес – кандидат с.-х. наук, зав. лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений, <https://orcid.org/0000-0002-2695-190X>, SPIN-код: 4733-7540, edomblides@mail.ru

About the Authors:

Elena V. Kozar – Cand. Sci. (Biology), Researcher of Laboratory of Reproductive Biotechnology in Crop Breeding, <https://orcid.org/0000-0001-5447-5341>, SPIN-code: 4950-0540, Corresponding Author, koz.leno4ek@gmail.com

Anna I. Mineykina – Cand. Sci. (Agriculture), Researcher, Laboratory of Molecular Genetics and Cytology, <https://orcid.org/0000-0001-9864-1137>, SPIN-code: 7179-7360 anna-batmanova@mail.ru

Tatyana V. Zayachkovskaya – Cand. Sci. (Agriculture), Resercher of Laboratory of Reproductive Biotechnology in Crop Breeding, <https://orcid.org/0000-0001-8435-8197>, SPIN-code: 8777-2919, taivka34@mail.ru

Sergey N. Belov – Cand. Sci. (Agriculture), Junior Researcher of Laboratory of Reproductive Biotechnology in Crop Breeding, <https://orcid.org/0000-0002-4387-9153>, SPIN-code: 2054-6579, belov.ser.nik@gmail.com

Yuri V. Kulakov – Junior Researcher of Laboratory of Reproductive Biotechnology in Crop Breeding, <https://orcid.org/0000-0002-3718-3854>, SPIN-code: 1070-4035, ykulakov12@yandex.ru

Olga A. Chichvarina – Junior Researcher of Laboratory of Reproductive Biotechnology in Crop Breeding, <https://orcid.org/0000-0001-5297-2969>, SPIN-code: 1013-5493, chichvarina07@rambler.ru

Maria G. Fomicheva – Cand. Sci. (Biology), Researcher at the Laboratory of Reproductive Biotechnology in Crop Breeding, <https://orcid.org/0000-0002-0281-0467>, SPIN-code: 3219-3462, maria.fomicheva.1@yandex.ru

Yana P. Tukuser – Junior Researcher, Laboratory of Molecular Genetics and Cytology, <https://orcid.org/0000-0003-2305-1575>, SPIN-code: 8520-1999, yana-tukuser@mail.ru

Ksenia S. Stebnitskaya – Junior Researcher of Laboratory of Molecular Genetics and Cytology, <https://orcid.org/0000-0002-2284-0532>, SPIN-code: 1152-1934, k-korottseva@yandex.ru

Tatyana S. Vjurtts – Cand. Sci. (Agriculture), Researcher of Laboratory of Reproductive Biotechnology in Crop Breeding, <http://orcid.org/0000-0003-3956-4172>, SPIN-code: 5482-3921, tajtza@yandex.ru

Daria D. Vasilieva – Junior Researcher of Laboratory of Molecular Genetics and Cytology, <https://orcid.org/0009-0000-3965-9820>, vasiljeva206001@yandex.ru

Elena A. Domblides – Cand. Sci. (Agriculture), Head of Laboratory of Reproductive Biotechnology in Crop Breeding, <https://orcid.org/0000-0002-2695-190X>, SPIN-code: 4733-7540, edomblides@mail.ru