

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Соответствие морфологии бутонов и пыльников стадиям развития мужского гаметофита дыни (*Cucumis melo* L.)

М.А. Нгуен<sup>1</sup>✉, Т.Н.Б.Т. Хуен<sup>1</sup>, Д.М. Чинь<sup>1</sup>, А.В. Воронина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Университет Дананг – Университет образования и науки, Дананг, Вьетнам

<sup>2</sup> Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

✉ [nmly@ued.udn.vn](mailto:nmly@ued.udn.vn)

**Аннотация.** Выявление корреляций между морфологическими признаками бутонов и стадиями развития мужского гаметофита представляет большой практический интерес, так как наличие надежного маркера ускоряет и упрощает отбор подходящего растительного материала для культуры изолированных микроспор. Культура изолированных микроспор позволяет в короткие сроки получать чистые линии многих овощных культур, однако для дыни (*Cucumis melo* L.) эта технология пока не получила распространения. Чтобы успешно применить данную технологию для новой культуры, необходимо оптимизировать множество ее элементов, прежде всего подобрать морфологические маркеры, позволяющие отбирать бутоны, которые содержат микроспоры определенных стадий развития. В нашей работе приведена оценка корреляции между длиной бутонов, диаметром бутонов, длиной видимой части венчика, длиной пыльников и стадиями развития мужского гаметофита дыни F<sub>1</sub> гибрида Kim Hong Ngoc. Наиболее сильная корреляция установлена для диаметра бутонов, коэффициент корреляции составил 0.885. Сильная корреляция выявлена также для длины бутона, коэффициент корреляции 0.880. Длина видимой части венчика являлась менее надежным признаком, а длину пыльников не следует использовать в качестве параметра для прогнозирования стадий развития мужского гаметофита дыни. Отмечено, что в одном пыльнике одновременно находились микроспоры и пыльцевые зерна разных стадий развития. В бутонах длиной менее 4.00 мм и диаметром до 1.51 ± 0.02 мм преобладали тетрады; в бутонах длиной 4.0–4.9 мм и диаметром 2.30 ± 0.02 мм обнаружена наибольшая доля ранних микроспор, при этом преобладали микроспоры средней стадии развития; в бутонах длиной 5.0–5.9 мм и диаметром 2.32 ± 0.00 мм преобладали средние и поздние вакуолизованные микроспоры; в бутонах длиной 6.0–8.9 мм и диаметром 2.96 ± 0.37 мм – поздние вакуолизованные микроспоры; в бутонах длиной 9.0 мм и более, диаметром 3.97 ± 0.34 мм и более – двухклеточная пыльца.

Ключевые слова: мужской гаметофит; стадии развития микроспор; тетрада; пыльца; бутон; пыльник; *Cucumis melo* L.; дыня.

**Для цитирования:** Нгуен М.А., Хуен Т.Н.Б.Т., Чинь Д.М., Воронина А.В. Соответствие морфологии бутонов и пыльников стадиям развития мужского гаметофита дыни (*Cucumis melo* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(2):146-152. DOI 10.18699/VJGB-22-18

## Association of bud and anther morphology with developmental stages of the male gametophyte of melon (*Cucumis melo* L.)

M.L. Nguyen<sup>1</sup>✉, T.N.B.T. Huyen<sup>1</sup>, D.M. Trinh<sup>1</sup>, A.V. Voronina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Da Nang University – University of Education and Science, Da Nang City, Vietnam

<sup>2</sup> Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

✉ [nmly@ued.udn.vn](mailto:nmly@ued.udn.vn)

**Abstract.** Correlations between the morphological features of flower buds and the developmental stages of the male gametophyte are of great practical interest as a reliable marker that accelerates and simplifies the selection of appropriate plant material for isolated microspore culture. Microspore culture enables one to quickly obtain many pure lines of different vegetable crops, but it has not yet been widely applied in the melon (*Cucumis melo* L.). To successfully apply this technique in a new culture, one has to optimize many of its elements: first, find the biological markers for selecting the flower buds containing the microspores of certain development stages. The paper presents the results of research estimating the correlations between the length and diameter of the flower buds, the length of the visual part of the corolla, the length of the anthers and the development stages of the male gametophyte in the F<sub>1</sub> hybrid of the Kim Hong Ngoc melon. The strongest correlation (CC = 0.885) was found for the flower bed diameter and a strong correlation (CC = 0.880), for the bud length. The corolla's visual part was a less reliable morphological feature, and the anther's length should not be used as a parameter to predict the developmental stages of the melon's male gametophyte. It was also found that one anther could contain the microspores and pollen grains of different developmental stages. In the flower buds less than 4 mm in length and 1.51 ± 0.02 mm in diameter prevailed tetrads, and in the buds 4.0–4.9 mm in length and 2.30 ± 0.02 mm in diameter, early microspores. The micro-

spores of a middle stage of development prevailed in the flower buds 5.0–5.9 mm in length and  $2.32 \pm 0.00$  mm in diameter; mid and late vacuolated microspores, in the buds 6.0–8.9 mm in length and  $2.96 \pm 0.37$  mm in diameter; and two-celled pollen, in the buds more than 9 mm in length and more than  $3.97 \pm 0.34$  mm in diameter.

Key words: male gametophyte; stages of microspore development; tetrad; pollen; flower bud; anther; *Cucumis melo* L.; melon.

**For citation:** Nguyen M.L., Huyen T.N.B.T., Trinh D.M., Voronina A.V. Association of bud and anther morphology with developmental stages of the male gametophyte of melon (*Cucumis melo* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):146-152. DOI 10.18699/VJGB-22-18

## Введение

Дыня (*Cucumis melo* L.) – важная с экономической точки зрения сельскохозяйственная культура (Sebastian et al., 2010), которая по состоянию на 2019 г. в мире занимала площадь более 1 млн га (FAOSTAT)<sup>1</sup>. В настоящее время в производстве дыни распространены F<sub>1</sub> гибриды, отличающиеся выровненностью, более высокой урожайностью и обеспечивающие биологическую защиту авторских прав оригинаторов.

Удвоенные гаплоиды являются ценным материалом для генетических исследований и селекции, особенно при создании F<sub>1</sub> гибридов сельскохозяйственных культур (Шмыкова и др., 2015б; Abdollahi et al., 2016). На сегодняшний день технологии получения удвоенных гаплоидов разработаны более чем для 250 видов (Maluszynski et al., 2003), для многих из них этот метод используют с целью массового производства гомозиготных растений (Ferrie, Caswell, 2011).

Известны публикации, в которых описано успешное получение удвоенных гаплоидов дыни путем опыления облученной пыльцой (Sauton, 1988; Hooghorst et al., 2020) либо методом отдаленной гибридизации с последующим доразвиванием зародышей *in vitro* (Lotfi et al., 2003). Авторы других работ культивировали пыльники (Abdollahi et al., 2016), неоплодотворенные семяпочки (Шмыкова и др., 2015а) и изолированные микроспоры (Zhan et al., 2009; Chen et al., 2017) растений семейства Тыквенные.

Культура изолированных микроспор отличается высоким выходом регенерантов по сравнению с культурой неоплодотворенных семяпочек и культурой пыльников и получила широкое применение, особенно у Капустных (Дьячук и др., 2019; Козарь и др., 2020). К тому же культура микроспор подразумевает отсутствие на питательной среде соматических клеток донорного растения и, таким образом, позволяет исключить сомнения о происхождении растений-регенерантов. Однако данная технология не реализована для производства удвоенных гаплоидов растений семейства Тыквенные.

На эффективность технологии получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор влияет множество факторов: стадия развития микроспор, генотип, состав питательной среды, плотность клеточной суспензии, особенности технологии введения в культуру, температурное воздействие и другие условия культивирования (Dunwell, 2010; Niazian, Shariatpanahi, 2020). Стадия развития микроспор является первым фактором, который необходимо учитывать при разработке технологии культивирования микроспор любой новой культуры. В зависимости от вида оптимальными могут быть разные

<sup>1</sup> <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (дата обращения 01.06.2021).

стадии развития микроспор – от тетрад до двухклеточной пыльцы (Touraev et al., 1996; Germanà, 2011). Так, для производства удвоенных гаплоидов моркови рекомендуют культивировать тетрады и ранние микроспоры (Goreska et al., 2010). Для индукции каллуса в культуре пыльников момордики наиболее эффективны средние и поздние микроспоры (Нгуен и др., 2019). У растений семейства Капустные высокой способностью к эмбриогенезу обладают поздние вакуолизованные микроспоры и двухклеточная пыльца (Telmer et al., 1992; Binarova et al., 1997; Custers et al., 2001; Babbar et al., 2004; Winarto, Teixeira da Silva, 2011).

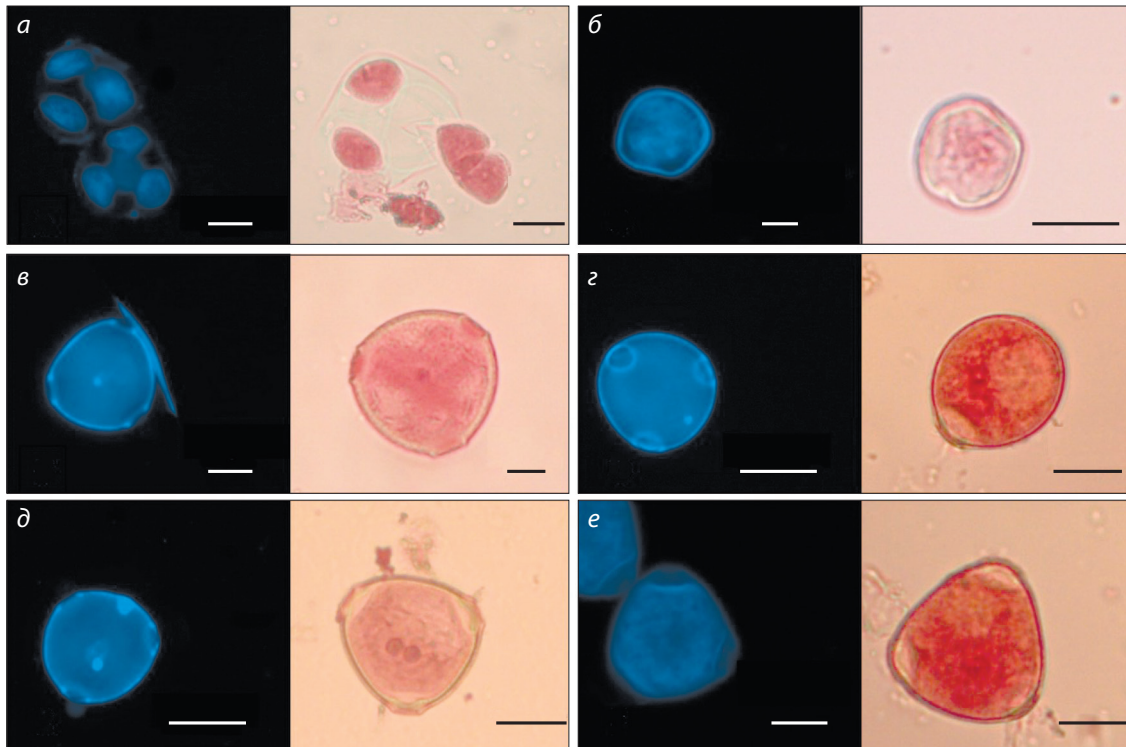
Прямой отбор отдельных микроспор соответствующей стадии развития для культивирования *in vitro* представляется невыполнимой задачей. Как правило, отбор растительного материала выполняют по косвенным признакам с помощью морфологических характеристик бутонов или пыльников (Takahata, Keller, 1991; Parra-Vega et al., 2013). У рапса, сои, редиса, томата, момордики в качестве маркеров стадии развития микроспор используют длину и ширину цветочных бутонов (Weber et al., 2005; Han et al., 2014; Sumarmi et al., 2014; Adhikari, Kang, 2017; Нгуен и др., 2019). В нескольких исследованиях демонстрируется пригодность таких параметров, как размер и цвет чашечки, соотношение длин чашечки и венчика, размер пыльника (De Moraes et al., 2008; Parra-Vega et al., 2013; Zhang et al., 2013). Эти показатели видоспецифичны, поэтому для отбора растительного материала дыни необходимо разработать свой протокол.

В данной работе представлено изучение взаимосвязи между морфологическими характеристиками бутонов и пыльников и стадией развития микроспор дыни.

## Материалы и методы

Отбор бутонов проводили с растений гибрида дыни F<sub>1</sub> Kim Hong Ngoc, произведенного компанией Chia Tai Seed, Таиланд. Бутоны длиной от 3.6 до 15.9 мм с интервалом 1 мм отбирали в 5:30–6:30 ч утра, перевозили на льду и хранили в течение 24 ч при 4 °С. Учитывали не менее десяти бутонов каждого интервала длины.

Характеристики бутонов и пыльников фиксировали с помощью стереомикроскопа Zeiss Stemi 2000-C (Suzhou Co., Ltd). Микроспоры каждого бутона выделяли из пыльника и помещали на предметное стекло в каплю смеси глицерина и дистиллированной воды в соотношении 1:1, затем в полученную суспензию добавляли 15 мкл 2 % раствора ацетокармина, накрывали покровным стеклом и микроскопировали. Для флуоресцентного окрашивания микроспоры извлекали из пыльников, трижды промывали буферным раствором PBS (8.00 г/л NaCl, 0.20 г/л KCl,



**Рис. 1.** Стадии развития микроспор *Cucumis melo* L., окрашенных DAPI и ацетокармином: а – тетрады; б – ранние микроспоры; в – средние микроспоры; з – поздние микроспоры; д – ранняя двухклеточная пыльца; е – поздняя двухклеточная пыльца.

Бар 20 мкм.

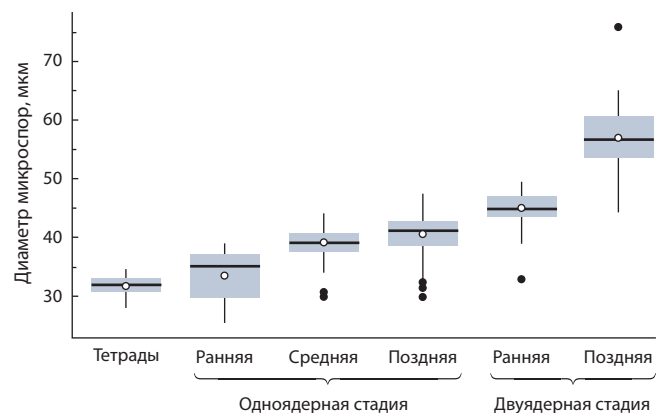
1.44 г/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.24 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  растворяли в 3/4 требуемого объема дистиллированной воды, с помощью HCl и KOH доводили pH до значения 7.4, доливали дистиллированную воду до конечного объема), добавляли DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) и наблюдали под оптическим флуоресцентным микроскопом Zeiss Axio Lab1 (Suzhou Co., Ltd).

Стадии развития микроспор определяли по размеру и форме клеток, количеству ядер и их расположению (Vergne et al., 1987; Maluszynski et al., 2003; Blackmore et al., 2007; Zhang et al., 2013). В каждом препарате наблюдали стадии развития 100 микроспор. Отмечали наличие тетрад, ранних, средних и поздних микроспор, двухклеточной пыльцы. Процентную долю каждой стадии развития в конкретном препарате рассчитывали как отношение количества микроспор определенной стадии к общему количеству наблюдаемых микроспор, умноженное на 100 %.

Достоверность различий проверяли с помощью дисперсионного анализа ANOVA и теста Тьюки с  $\alpha = 0.05$ . Связь между параметрами измерения и стадиями развития микроспоры определяли с помощью коэффициента линейной регрессии и коэффициента корреляции. Статистическое описание и обработку данных проводили в программе R.

## Результаты и обсуждение

При цитологическом анализе бутонов дыни наблюдали шесть стадий развития микроспор, включая тетрады, ранние, средние, поздние вакуолизованные микроспоры, раннюю двухклеточную и позднюю двухклеточную пыльцу (рис. 1).



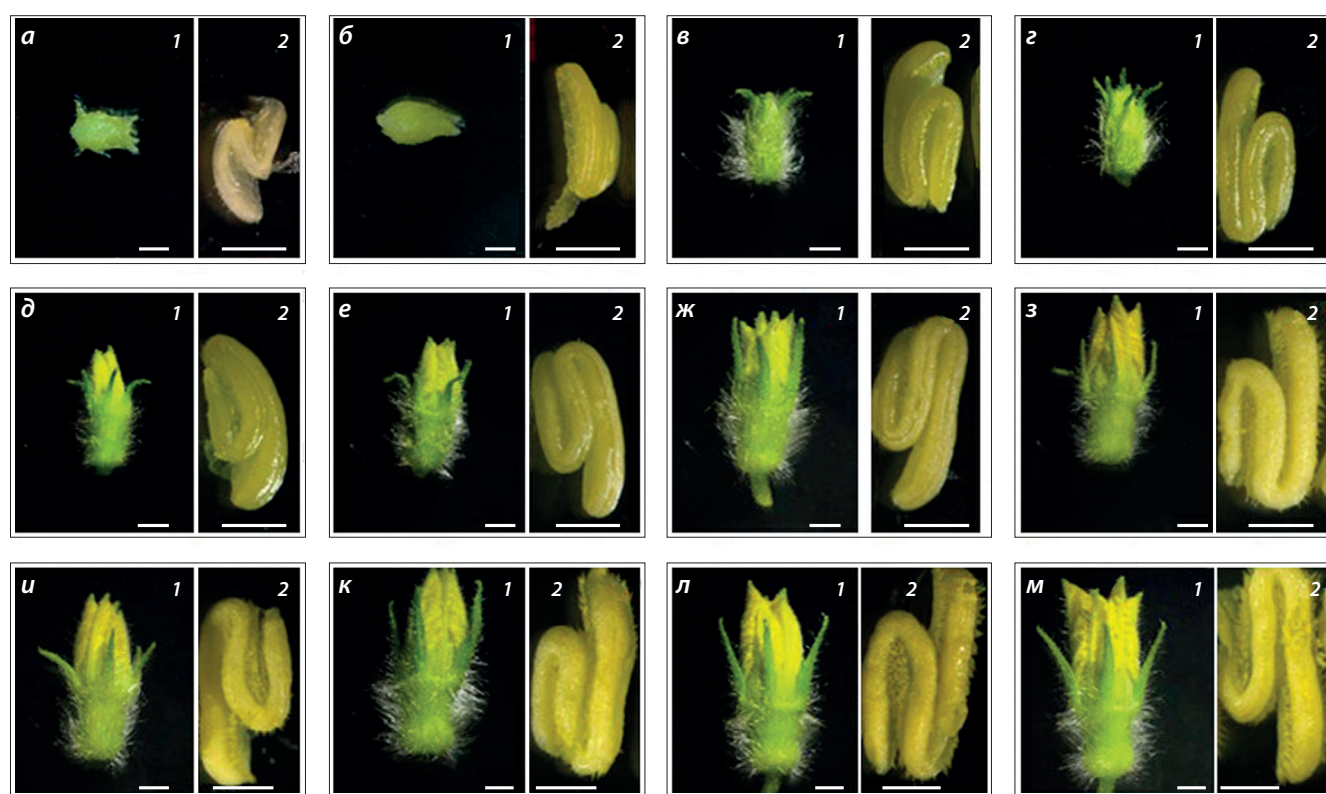
**Рис. 2.** Изменение диаметра клеток мужского гаметофита в зависимости от стадии их развития.

Диаметр микроспор увеличивался по мере их развития и достигал максимального значения у поздней двухклеточной пыльцы (рис. 2). Отмечено, что каждая стадия характеризовалась определенной формой и размером клеток. Ранние микроспоры, образовавшиеся после распада тетрад, имели диаметр  $33.41 \pm 4.34$  мкм, отличались нестабильной округлой формой, тонкими клеточными стенками и крупными ядрами. Средние микроспоры были округлой формы, с центральным расположением ядра, их диаметр  $39.06 \pm 2.33$  мкм. Поздние микроспоры имели округлую форму, диаметр  $40.45 \pm 3.26$  мкм и характеризовались хорошо развитой трехлопастной стенкой экзины и

Соответствие размеров бутончика и длины пыльника стадиям развития мужского гаметофита

№ п/п	Длина бутончиков, мм	Диаметр бутончиков, мм	Длина пыльников, мм	Доля микроспор разных стадий развития, %					
				Тетрады	Ранняя	Средняя	Поздняя	Ранняя двухклеточная	Поздняя двухклеточная
1	<4	1.51 ± 0.02 <sup>a*</sup>	1.63 ± 0.19 <sup>a</sup>	48.00 ± 5.66	22.00 ± 8.49	6.00 ± 2.83	22.00 ± 2.83	2.00 ± 2.83	0.00 ± 0.00
2	4.0–4.9	2.30 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.83 ± 0.16 <sup>a</sup>	0	30.00 ± 14.14	46.00 ± 25.46	22.00 ± 14.14	2.00 ± 2.83	0.00 ± 0.00
3	5.0–5.9	2.32 ± 0.00 <sup>b</sup>	2.50 ± 0.51 <sup>b</sup>	0	2.00 ± 2.83	50.00 ± 14.14	48.00 ± 11.31	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
4	6.0–8.9	2.96 ± 0.37 <sup>b</sup>	2.89 ± 0.23 <sup>c</sup>	0	0.40 ± 1.26	40.40 ± 24.91	56.80 ± 23.61	2.40 ± 6.31	0.00 ± 0.00
5	9.0–11.9	3.97 ± 0.34 <sup>c</sup>	2.96 ± 0.20 <sup>c</sup>	0	0	0.67 ± 1.63	14.67 ± 34.00	51.33 ± 50.62	33.33 ± 50.13
6	>12	5.16 ± 0.27 <sup>d</sup>	3.12 ± 0.22 <sup>c</sup>	0	0	0	0	0	100.00

\* Значения, отмеченные одинаковыми буквами, не различаются при уровне значимости  $p = 0.05$ .



**Рис. 3.** Изменение морфологических характеристик бутончиков (1, бар 20 мкм) и пыльников (2, бар 10 мкм) дыни в зависимости от длины бутончиков: а – 3.6–4.0 мм; б – 4.0–4.9 мм; в – 5.0–5.9 мм; г – 6.0–6.9 мм; д – 7.0–7.9 мм; е – 8.0–8.9 мм; ж – 9.0–9.9 мм; з – 10.0–10.9 мм; и – 11.0–11.9 мм; к – 12.0–12.9 мм; л – 13.0–13.9 мм; м – более 14.0 мм.

смещенным от центра ядром, прижатым к стенке большой вакуолю. В клетках ранней двухклеточной пыльцы с диаметром клеток  $44.94 \pm 2.65$  мкм при микроскопировании были четко видны два ядра: вегетативное (более крупное) и генеративное (более ярко окрашенное). Диаметр поздней двухклеточной пыльцы составлял  $56.93 \pm 4.81$  мкм, форма клеток варьировала от округлых до овальных, причем в одном пыльнике можно было наблюдать пыльцевые зерна разной формы. Цитоплазма в пыльце становилась плотной и непрозрачной, ядро при этом было труднее различить.

В результате анализа соответствия морфологических признаков стадиям развития микроспор и существующих

изменений бутончики разделили на шесть групп. Каждая группа могла содержать микроспоры разных стадий развития, но при этом одна из них преобладала (см. таблицу). Отмечено также, что в одном пыльнике одновременно могли находиться микроспоры разных стадий развития. Это соответствует наблюдениям исследователей, изучавших данный вопрос на других культурах.

Тетрады были обнаружены в зеленых опушенных, полностью покрытых чашелистиками бутончиках овальной формы длиной менее 4 мм, диаметром до 1.85 мм (рис. 3, а). Пыльники при этом имели светло-бежевую окраску и длину 1.6–1.63 мм.

Ранние микроспоры были найдены в бутонах длиной от 3.8 до 7.0 мм, наибольшая их доля ( $30 \pm 14.14\%$ ) обнаружена в бутонах длиной 4.0–4.9 мм. При этом пыльники становились зеленовато-желтыми, их длина составляла 1.63–2.74 мм (см. рис. 3, б). В целом количество микроспор ранней стадии было небольшим по сравнению с другими стадиями.

Микроспоры средней стадии развития содержались в бутонах длиной от 4.0 до 10.9 мм. Длина пыльников при этом достигала  $2.15 \pm 0.05$  мм, их цвет был желтоватым с глянцевой поверхностью (см. рис. 3, в). Максимальное количество микроспор средней стадии ( $50 \pm 14.14\%$ ) выявлено в бутонах длиной 5.0–5.9 мм, имевших четкое морфологическое отличие от более молодых бутонов – приоткрытые чашелистики, позволяющие видеть кончик венчика.

Микроспоры поздней вакуолизированной стадии преобладали в бутонах длиной 6.0–8.9 мм. На этом этапе бутоны продолжали увеличиваться в размерах, венчик удлинялся за пределом чашелистиков, однако морфология пыльников не изменялась (см. рис. 3, г–е). Статистически достоверного увеличения длины пыльников тоже не происходило.

Ранняя двухклеточная пыльца преобладала в бутонах длиной 9.0–12.0 мм (см. рис. 3, ж–и). При этом длина пыльников не изменилась по сравнению с предыдущей стадией. На поверхности пыльников можно было увидеть зрелую двухклеточную пыльцу.

В бутонах длиной более 12.0 мм была обнаружена только двухклеточная пыльца. Переход от поздней стадии к зрелой пыльце характеризовался небольшим увеличением размера бутона, лепестки начинали открываться (см. рис. 3, к–л). Пыльники увеличивались и вскрывались, так что на их поверхности можно было увидеть множество пыльцевых зерен.

В результате статистического анализа длины пыльника вычислен коэффициент линейной регрессии  $R^2 = 0.52$ , т. е. длину пыльников не следует использовать в качестве параметра для прогнозирования стадий развития микроспор. Это соответствует данным, полученным на некоторых других культурах, например томата и баклажана (Segui-Simarro, Nuez, 2005; Salas et al., 2012). Известна публикация, в которой похожий коэффициент ( $R^2 = 0.59$ ) характеризовал связь между длиной пыльника и стадиями развития микроспор томата (Adhikari, Kang, 2017).

Часто исследователи рекомендуют измерять длину бутонов при отборе подходящего растительного материала для культивирования изолированных микроспор; это удобный и надежный показатель для многих культур. В качестве способа отбора бутонов советуют использовать также диаметр бутонов. Так, в 2019 г. наилучшие результаты эмбриогенеза в культуре микроспор люцерны были получены при культивировании поздних микроспор из бутонов длиной 6.02–6.20 мм и диаметром 1.50–1.72 мм (Yi et al., 2019). В 2017 г. была представлена корреляция между размером бутонов (длиной и диаметром), длиной пыльника и стадиями развития микроспор томата (Adhikari, Kang, 2017).

В нашем исследовании линейный регрессионный анализ показал четкую линейную зависимость ( $p < 0.05$ ) между характеристиками бутонов и стадиями развития

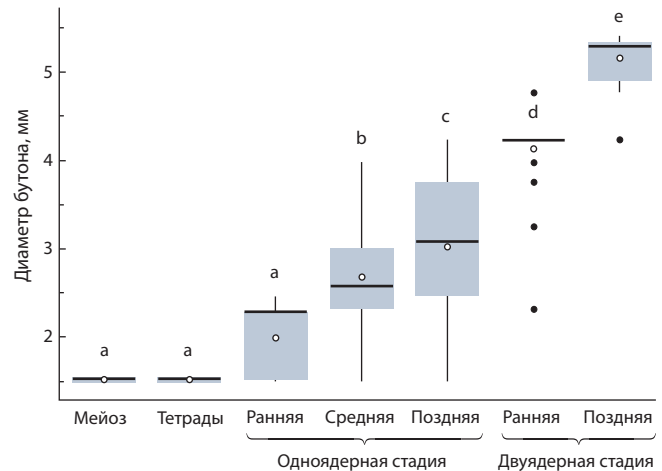


Рис. 4. Зависимость между диаметром бутонов и стадиями развития мужского гаметофита дыни.

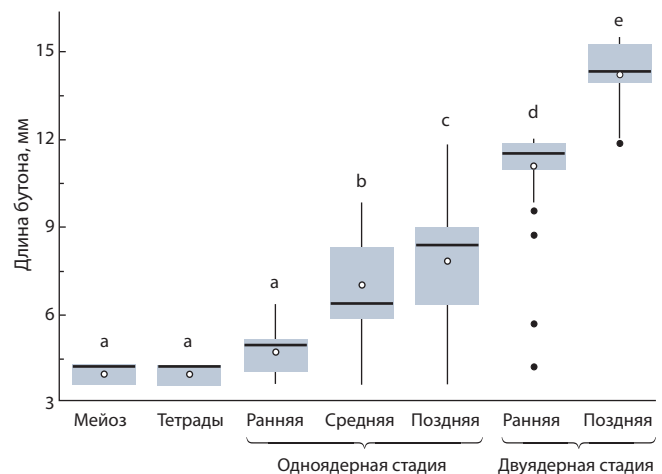


Рис. 5. Зависимость между длиной бутонов и стадиями развития мужского гаметофита дыни.

Буквы а–е соответствуют разным группам бутонов.

микроспор, коэффициенты линейной регрессии ( $R^2$ ) варьировали от 0.767 до 0.783. Самая сильная корреляция выявлена для диаметра бутонов:  $r = 0.885$ ,  $R^2 = 0.783$  (рис. 4), затем идет длина бутонов ( $r = 0.880$ ,  $R^2 = 0.775$ ) (рис. 5) и, наконец, длина венчика, которая является менее надежным признаком ( $r = 0.876$ ,  $R^2 = 0.763$ ).

## Заключение

Корреляция между морфологическими характеристиками бутонов и пыльников и стадиями развития микроспор дыни (*Cucumis melo* L.) позволяет отбирать подходящий материал для культивирования изолированных микроспор *in vitro*. Для этой цели лучше всего подходят три показателя: диаметр бутона, длина бутона, длина видимой части венчика. Диаметр и длина бутона обеспечивают более сильную корреляцию, и их легче использовать.

Результат исследования может быть полезен для дальнейшей разработки технологии получения удвоенных гаплоидов дыни в культуре изолированных микроспор.

## Список литературы / References

- Дьячук Т.И., Хомякова О.В., Акинина В.Н., Кибкало И.А., Поминов А.В. Микроспоровый эмбриогенез *in vitro* – роль стрессов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(1):86-94. DOI 10.18699/VJ19.466.
- [Djatchouk T.I., Khomyakova O.V., Akinina V.N., Kibkalo I.A., Pominov A.V. Microspore embryogenesis *in vitro*: the role of stresses. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(1):86-94. DOI 10.18699/VJ19.466. (in Russian)]
- Козарь Е.В., Домблидес Е.А., Солдатенко А.В. Факторы, влияющие на получение ДН-растений в культуре микроспор *in vitro* редиса европейского. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(1):31-39. DOI 10.18699/VJ20.592.
- [Kozar E.V., Domblides E.A., Soldatenko A.V. Factors affecting DH plants *in vitro* production from microspores of European radish. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(1):31-39. DOI 10.18699/VJ20.592.]
- Нгуен М.Л., Та Ч.Х.Т., Хуен Т.Н.Б.Т., Воронина А.В. Каллусообразование в культуре пыльников момордики (*Momordica charantia* L.) в зависимости от стадии развития микроспор и состава питательной среды. *С.-х. биология*. 2019;54(1):140-148. DOI 10.15389/agrobiology.2019.1.140rus.
- [Nguyen M.L., Ta T.H.T., Huyen T.N.B.T., Voronina A.V. Anther-derived callus formation in bitter melon (*Momordica charantia* L.) as influenced by microspore development stage and medium composition. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2019;54(1):140-148. DOI 10.15389/agrobiology.2019.1.140eng.]
- Шмыкова Н.А., Химич Г.А., Коротцева И.Б., Домблидес Е.А. Перспективы получения удвоенных гаплоидов растений семейства Cucurbitaceae. *Овощи России*. 2015a;3-4:28-31. DOI 10.18619/2072-9146-2015-3-4-28-31.
- [Shmykova N.A., Khimich G.A., Korotseva I.B., Domblides E.A. Prospective of development of doubled haploid plants of Cucurbitaceae family. *Ovoshchi Rossii = Vegetable Crops of Russia*. 2015a; 3-4:28-31. DOI 10.18619/2072-9146-2015-3-4-28-31. (in Russian)]
- Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Супрунова Т.П. Получение удвоенных гаплоидов у видов рода *Brassica* L. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015b;19(1):111-120. DOI 10.18699/VJ15.014.
- [Shmykova N.A., Shumilina D.V., Suprunova T.P. Doubled haploid production in *Brassica* L. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015b;19(1):111-120. DOI 10.18699/VJ15.014. (in Russian)]
- Abdollahi M.R., Najafi S., Sarikhani H., Moosavi S.S. Induction and development of anther-derived gametic embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by optimizing the macronutrient and agar concentrations in culture medium. *Turk. J. Biol.* 2016;40:571-579. DOI 10.3906/biy-1502-55.
- Adhikari P.B., Kang W.H. Association of floral bud and anther size with microspore developmental stage in Campari tomato. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 2017;35(5):608-617. DOI 10.12972/kjst.20170065.
- Babbar S.B., Agarwal P.K., Sahay S., Bhojwani S.S. Isolated microspore culture of *Brassica*: an experimental tool for developmental. *Indian J. Biotechnol.* 2004;3:185-202.
- Binarova P., Hause G., Cenklova V., Cordewener J.H.G., Van Lookeren Campagne M.M. A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. *Sex. Plant Reprod.* 1997;10:200-208. DOI 10.1007/s004970050088.
- Blackmore S., Wortley A.H., Skvarla J.J., Rowley J.R. Pollen wall development in flowering plants. *New Phytol.* 2007;174(3):483-498. DOI 10.1111/j.1469-8137.2007.02060.x.
- Chen J., Vanek E., Pieper M. Method for Producing Haploid, Dihaploid and Doubled Haploid Plants by Isolated Microspore Culture. Patent Int. Publ. No. WO 2017/017108 A1. Publ. date Feb. 2, 2017.
- Custers J.B.M., Cordewener J.H.G., Fiers M.A., Maasen B.T.H., van Lookeren Campagne M.M., Liu C.M. Androgenesis in *Brassica*: a model system to study the initiation of plant embryogenesis. In: Bhojwani S.S., Soh W.T. (Eds.) *Current Trends in The Embryology of Angiosperms*. Dordrecht: Springer, 2001;451-469. DOI 10.1007/978-94-017-1203-3\_18.
- De Moraes A.P., Bered F., De Carvalho F.I.F., Kaltchuk-Santos E. Morphological markers for microspore developmental stage in maize. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2008;51(5):911-916. DOI 10.1590/S1516-89132008000500006.
- Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol. J.* 2010;8:377-424. DOI 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x.
- Ferrie A.M.R., Caswell K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2011;104:301-309. DOI 10.1007/s11240-010-9800-y.
- Germanà M.A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2011;104:283-300. DOI 10.1007/s11240-010-9852-z.
- Gorecka K., Kowalska U., Krzyżanowska D., Kiszczak W. Obtaining carrot (*Daucus carota* L.) plants in isolated microspore cultures. *J. Appl. Genet.* 2010;51(2):141-147. DOI 10.1007/BF03195722.
- Han N., Kim S.U., Park H.Y., Na H. Microspore-derived embryo formation and morphological changes during the isolated microspore culture of radish (*Raphanus sativus* L.). *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 2014;32(3):382-389. DOI 10.7235/hort.2014.13170.
- Hooghvorst I., Torrico O., Hooghvorst S., Nogués S. *In situ* parthenogenetic doubled haploid production in melon “Piel de Sapo” for breeding purposes. *Front. Plant Sci.* 2020;11:378. DOI 10.3389/fpls.2020.00378.
- Lotfi M., Alan A.R., Henning M.J., Jahn M.M., Earle E.D. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Rep.* 2003;21(11):1121-1128. DOI 10.1007/s00299-003-0636-3.
- Maluszynski M., Kasha K., Forster B.P., Szarejko I. (Eds.) *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A manual*. Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 2003.
- Niazian M., Shariatpanahi M.E. *In vitro*-based doubled haploid production: recent improvements. *Euphytica.* 2020;216:69. DOI 10.1007/s10681-020-02609-7.
- Parra-Vega V., Renau-Morata B., Sifres A., Seguí-Simarro J.M. Stress treatments and *in vitro* culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2013; 112(3):353-360. DOI 10.1007/s11240-012-0242-6.
- Salas P., Rivas-Sendra A., Prohens J., Seguí-Simarro J.M. Influence of the stage for anther excision and heterostyly in embryogenesis induction from eggplant anther cultures. *Euphytica.* 2012;184:235-250. DOI 10.1007/s10681-011-0569-9.
- Sauton A. Doubled haploid production in melon. In: *Proceedings of the EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*. Avignon-Montfavet, France, 1988;06(01-02):119-128.
- Sebastian P., Schaefer H., Telford I.R.H., Renner S.S. Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107(32):14269-14273. DOI 10.1073/pnas.1005338107.
- Seguí-Simarro J.M., Nuez F. Meiotic metaphase I to telophase II as the most responsive stage during microspore development for callus induction in tomato (*Solanum lycopersicum*) anther cultures. *Acta Physiol. Plant.* 2005;27:675-685. DOI 10.1007/s11738-005-0071-x.
- Sumarmi S., Daryono B.S., Rachmawati D., Indrianto A. Determination of soybean (*Glycine max* L. [Merrill]) microspores development stage based on the length of flower buds. *J. Biol. Res.* 2014;20:6-11. DOI 10.23869/bphjbr.20.1.20142.
- Takahata Y., Keller W.A. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Plant Sci.* 1991;74:235-242. DOI 10.1016/0168-9452(91)90051-9.

- Telmer C.A., Simmonds D., Newcomb W. Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol. Plant.* 1992;84:417-424. DOI 10.1111/j.1399-3054.1992.tb04685.x.
- Touraev A., Pfosser M., Vicente O., Heberle-Bors E. Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta.* 1996;200:144-152.
- Vergne P., Delvallee I., Dumas C. Rapid assessment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permeabilization. *Stain Technol.* 1987;62:299-304. DOI 10.3109/10520298709108014.
- Weber S., Unker W., Friedt W. Improved doubled haploid production protocol for *Brassica napus* using microspore colchicine treatment *in vitro* and ploidy determination by flow cytometry. *Plant Breeding.* 2005;124:511-513. DOI 10.1111/j.1439-0523.2005.01114.x.
- Winarto B., Teixeira da Silva J.A. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2011;107:305-315. DOI 10.1007/s112400110081z.
- Yi D., Sun J., Su Y., Tong Z., Zhang T., Wang Z. Doubled haploid production in alfalfa (*Medicago sativa* L.) through isolated microspore culture. *Sci. Rep.* 2019;9:9458. DOI 10.1038/s41598-019-45946-x.
- Zhan Y., Chen J.F., Malik A.A. Embryoid induction and plant regeneration of cucumber (*Cucumis sativus* L.) through microspore culture. *Acta Hortic. Sin.* 2009;36(2):221-226.
- Zhang C., Tsukuni T., Ikeda M., Sato M., Okada H., Ohashi Y., Matsuno H., Yamamoto T., Wada M., Yoshikawa N., Matsumoto S., Li J., Mimida N., Watanabe M., Suzuki A., Komori S. Effects of the microspore development stage and cold pre-treatment of flower buds on embryo induction in apple (*Malus domestica* Borkh.) anther culture. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 2013;82(2):114-124. DOI 10.2503/jjshs1.82.114.

---

#### ORCID ID

M.L. Nguyen [orcid.org/0000-0002-0652-891X](https://orcid.org/0000-0002-0652-891X)  
T.N.B.T. Huyen [orcid.org/0000-0003-0467-9391](https://orcid.org/0000-0003-0467-9391)  
D.M. Trinh [orcid.org/0000-0002-3662-2392](https://orcid.org/0000-0002-3662-2392)  
A.V. Voronina [orcid.org/0000-0003-0249-246X](https://orcid.org/0000-0003-0249-246X)

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.07.2021. После доработки 06.09.2021. Принята к публикации 06.09.2021.