МИНЕЙКИНА Анна Игоревна

УДК 631.526:573.6:635.342

СОЗДАНИЕ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ СЕЛЕКЦИИ

Специальности:

06.01.05 — селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений 03.01.06 — биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук

Работа выполнена в лаборатории селекции и семеноводства капустных культур и в лаборатории биотехнологии на базе ФГБНУ ВНИИССОК (ныне ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства») в 2014-2017 годах.

Научные руководители: Бондарева Людмила Леонидовна,

доктор сельскохозяйственных наук, ст.н.с., зав. лабораторией селекции и семеноводства

капустных культур ФГБНУ ФНЦО

Шумилина Дарья Владимировна,

кандидат биологических наук, ст.н.с.

лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦО

Официальные оппоненты: Бухарова Альмира Рахметовна

доктор сельскохозяйственных наук, профессор,

ФГБОУ ВО РГАЗУ

Калашникова Елена Анатольевна доктор биологических наук, профессор

ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное

научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений

имени Н.И. Вавилова» (ВИР)

Защита диссертации состоится <u>«19» июля</u> 2018 г. в <u>12</u> часов <u>00</u> минут на заседании диссертационного совета Д 220.019.02, созданного на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства» по адресу: 143080, Московская область, Одинцовский район, пос. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д.14, сектор защиты диссертаций.

Факс (495) 599-22-27 E-mail: vniissok@mail.ru

aspirantura@vniissok.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ФНЦО и на сайте института www.vniissok.ru.

Автореферат разослан « » июня 2018 года

Ученый секретарь совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 220.019.02, доктор с.-х. наук, ст.н.с.

Бондарева Людмила Леонидовна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Селекция капусты белокочанной в настоящее время в основном ориентирована на создание F_1 гибридов, отличающихся от сортопопуляций высокой урожайностью, выравненностью растений по срокам созревания и качеству продуктивных органов. Наиболее сложным, трудоемким и продолжительным этапом в этом процессе является создание константных родительских линий, на получение которых уходит от 7 до 14 лет при использовании традиционных методов селекции (Бондарева, 2009).

В большинстве развитых стран в настоящее время для ускорения селекции широко используются биотехнологические методы, а именно, технологии получения удвоенных гаплоидов (DH-технологии) (Dunwell, 2010). Среди таких технологий ведущее место занимает культура изолированных микроспор *in vitro*, которая не только обеспечивает гомозиготность получаемых удвоенных гаплоидов (DH-линий), но и способствует расширению спектра формообразования генетических рекомбинантных форм, в том числе с рецессивными признаками. Получение стабильных гомозиготных линий из популяции облегчает поиск редких генотипов.

Несмотря на успехи биотехнологии в этой области, универсальной технологии получения удвоенных гаплоидов у различных растений рода *Brassica* не существует в силу генотипической зависимости в отзывчивости к андрогенезу. В основном используются базовые протоколы для растений рода *Brassica*, описанные ранее, которые постоянно оптимизируются под конкретные генотипы (Шмыкова и др., 2015).

Цель исследования — получение исходного материала капусты белокочанной ($Brassica\ oleracea\ L$.) для создания F_1 гибридов с использованием современных биотехнологических методов селекции.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать отдельные элементы методики получения большого числа DH (удвоенных гаплоидных) растений.

- 2. Оценить полученные DH (удвоенные гаплоиды) и H (гаплоиды) растения капусты белокочанной для включения в селекционную работу.
- 3. Провести оценку по основным хозяйственно ценным признакам гибридных комбинаций капусты белокочанной, полученных с использованием линий удвоенных гаплоидов.
- 4. Оценить полевую устойчивость гибридных комбинаций к болезням и вредителям (фузариозное увядание, альтернариоз, кила и листогрызущие вредители) на естественном и искусственном инфекционном фоне.
- 5. Рассчитать экономическую выгоду производства линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной.

Научная новизна. Разработана технология получения удвоенных гаплоидов капусты белокочанной для создания принципиально нового исходного материала.

Показано, что использование ампициллина и гормонов в составе питательной среды оказывает положительное влияние на выход эмбриоидов.

Выявлена прямая зависимость между средними значениями числа хромосом, числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и длиной этих клеток, что позволяет использовать метод подсчета хлоропластов как наиболее быстрый и простой метод массового определения плоидности растений.

Впервые предложено использовать среду для проращивания пыльцы при опылении растений с низким содержанием жизнеспособной пыльцы. Показано положительное влияние трис-буфера (трисгидроксиметиламинометана) на прорастание пыльцы за счет поддержания уровня рН.

Определена комбинационная способность линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной по основным хозяйственно ценным признакам и выделены перспективные линии для использования в селекционном процессе.

Установлено, что использование удвоенных гаплоидных линий в селекции капусты белокочанной экономически оправдано, так как сокращает отдельные этапы селекционного процесса в 2 раза, повышает эффективность отбора.

Практическая значимость. Разработана и внедрена технология селекционного процесса создания F_1 гибридов для отдельных генотипов капусты белокочанной с использованием современных методов селекции.

Получен принципиально новый исходный материал для селекции – удвоенные гаплоидные линии капусты белокочанной.

С использованием разработанной технологии был создан гибрид капусты белокочанной F_1 «Натали» и передан на государственное испытание в ФГБУ «Госсорткомиссия».

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- 1. Особенности использования метода культуры изолированных микроспор *in vitro* при создании удвоенных гаплоидных линий капусты белокочанной.
- 2. Комплексная оценка основных хозяйственно ценных признаков новых гибридных комбинаций капусты белокочанной на основе линий удвоенных гаплоидов.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были доложены на отчетных сессиях ФГБНУ ВНИИССОК (2015 – 2016 годы), на конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные исследования молодых ученых в биологии и защите растений» (Большие Вяземы, 26 декабря 2014г.); IV Международной научно-практической конференции «Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы» (ВНИИССОК, 10-14 августа 2015г.); Ежегодной научной конференции «Аграрное образование и наука в 21 веке: вызовы и проблемы развития» (Москва, 13 ноября 2015г.); Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы селекции и семеноводства капустных культур» (Москва, 13 сентября 2016г.); IV Международной конференции «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам» (Санкт-Петербург, 11-13 октября 2016 г).

Публикации результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, 3 из них — в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК РФ.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, 3 глав, которые включают обзор литературы, материалы, методику и условия проведения, результаты исследования, а также заключения, рекомендаций, списка использованной литературы, приложения. Работа изложена на 118 страницах, содержит 22 таблицы, 11 рисунков. Список литературы содержит 171 источник, из них 72 на иностранных языках.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в 2014 — 2017 годах в ФГБНУ ВНИИССОК (ныне ФГБНУ ФНЦО) с использованием классических и современных биотехнологических методов селекции капусты белокочанной.

В качестве исходного материала для исследования были использованы:

- 1. Селекционные образцы капусты белокочанной лаборатории селекции и семеноводства капустных культур ФГБНУ ФНЦО.
- 2. Растения-регенеранты капусты белокочанной, полученные в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦО в культуре изолированных микроспор *in vitro*.

Выращивание растений. Донорные растения, выращенные в полевых условиях, отбирали в стадии технической спелости кочана по основным признакам согласно методическим рекомендациям. Яровизацию проводили в холодильной камере с температурой 4-6 °C в течение 2-х месяцев. Акклиматизацию, получение цветоноса и скрещивание проводили в климатической камере при температуре + 16-18 °C при режиме 16 час. - день/8 час. – ночь и освещении – 9000 лк (Бондарева, 2014).

<u>Определение стадии развития микроспор.</u> Цитологическое исследование стадий развития микроспор проведено по методике дифференциального окрашивания (Alexander, 1969) с помощью микроскопа Axio Imager A2.

Культура микроспор. В качестве питательных сред использовали модифицированные базовые среды. Микроспоры, выделенные из стерильных бутонов размером 4-5 мм, инкубировали в среде Лихтера с половинным содержанием компонентов (½NLN), рН 5,8 (Lichter, 1982) в течение 2-х суток в темноте при 32°С, далее при 25°С до образования эмбриоидов. При достижении эмбриоидами стадии крупных глобул, сердцевидной или торпедовидной фазы их помещали в чашки Петри на среду Гамборга (В5) (Gamborg et al., 1968). При образовании побегов их отделяли и переносили на среду ½МС (Murashige, Skoog, 1962). Растения, у которых были нормально развиты листья и корневая система, переносили в вегетационные сосуды. Адаптацию и выращивание растений-регенерантов проводили в тех же условиях, что и донорные (Шумилина и др., 2015).

Определение плоидности растений-регенерантов. Определение плоидности у растений-регенерантов проведено двумя методами. Первый метод — подсчёт числа хромосом в клетках меристематической ткани корешка методом «распластывания». Результаты оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа (Zeiss, Германия) с наборами фильтров для DAPI (Zeiss Filter set 1) (Пухальский и др., 2007).

Второй метод заключался в подсчете хлоропластов в замыкающих устьичных клетках и измерении длины этих клеток с помощью микроскопа Axio Imager A2 (Zeiss, Германия) с флуоресценцией (набор фильтров - BR 490 и 515). Визуализацию, измерения и подсчеты проводили с использованием программного обеспечения AxioVision (Zeiss, Германия). Данные обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel 2010.

<u>Определение фертильности растений</u>. Фертильность растений устанав-ливали путем окрашивания пыльцевых зерен методом дифференциального окрашивания (Alexander, 1969). Наблюдения проводили с помощью микроскопа Axio Imager A2 (Zeiss, Германия).

<u>Подбор сред для проращивания пыльцы и определение ее</u> жизнеспособности. Сбор пыльцы проводили с недавно раскрывшихся цветков

капусты белокочанной сорта Зимовка 1474 в период массового цветения. Определение жизнеспособности пыльцы определяли согласно методике (табл.1) (Бунин, 2003).

Таблица 1 – Искусственные среды для проращивания пыльцевых зёрен капусты белокочанной (по Roberts, 1983 и Бунину, 2003)

sepen kanyerbi oesioko iai	mon (no rec	Der 65, 1700 1	1 D ymmiy, 2 0	<i>••</i>
Состав среды	Среда Т*	Среда Т+	Среда 8**	Среда 8+
Сахароза, г	20	20	20	20
Бор, мг	1	1	10	10
Нитрат кальция, мг	-	-	10	10
Нитрат калия, мг	10	10	-	-
Хлорид кальция х 6 H_2 O, г	36,2	36,2	-	-
pН	от 8 до 9	от 8 до 9	8	8
Трис, мг	10	10	ı	-
Экстракт из пестика, сорт Слава	-	+	-	+
грибовская 231				
Вода, мл	100	100	100	100

^{*} Roberts I. N. et al., 1983;

Опыление растений с низким содержанием жизнеспособной пыльцы в пыльниках. Сбор пыльцы проводили с недавно раскрывшихся цветков растений с низким содержанием жизнеспособной пыльцы в период массового цветения. Свежесобранную пыльцу при помощи пинцета равномерно распределяли в среде в пробирках объемом 1,5 мл. Затем получившуюся суспензию пипеткой наносили на рыльце пестика в бутонах и цветках, этикетировали и изолировали.

Оценка полученного материала на основные хозяйственно ценные признаки. Полевые опыты закладывали на опытных полях ФГБНУ ФНЦО, подготовленных по стандартной для овощных культур агротехнике (Доспехов, 1985). Посев семян проводили в третьей декаде апреля в кассеты с диаметром ячейки 5х5 см. В третьей декаде мая рассаду высаживали в открытый грунт. Схема посадки 70х50 см.

Оценка полученных гибридных комбинаций капусты белокочанной проводилась по основным хозяйственно ценным признакам в стадии технической спелости кочана. Анализ комбинационной способности родительских линий определяли в системе полных диаллельных скрещиваний

^{**}Бунин М.С. и др., 2003.

по Гриффингу методом 1 (Griffing, 1956). Обработку данных проводили методом дисперсионного анализа по Доспехову (1985) с помощью прикладных программ Excel пакета Microsoft Office.

Биохимические анализы проведены в лабораторно-аналитическом центре ФГБНУ ФНЦО по общепринятым методикам (Сапожникова, Дорофеева, 1966).

Оценка устойчивости к основным болезням и вредителям. Оценка устойчивости растений капусты белокочанной проведена визуально в полевых условиях на естественном фоне в стадии технической спелости кочана. Оценка пораженности килой растений капусты белокочанной проведена на искусственном инфекционном фоне открытого грунта лаборатории иммунитета и защиты растений ФГБНУ ФНЦО (Квасников, Белик, 1970; Маслова и др., 2013).

Статистическую обработку проводили в программе Microsoft Excel 2010.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Получение линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной с использованием метода культуры изолированных микроспор *in vitro*

Для опытов были использованы различные питательные среды, которые отличались кислотностью, наличием регуляторов роста и развития растений, антибиотиков. В качестве донорных растений в работе использовали 18 сортообразцов капусты белокочанной среднепозднего и позднего сроков созревания селекции ФГБНУ ВНИИССОК.

Влияние фазы развития микроспор на эффективность эмбриогенеза

В результате анализа зависимости между стадией развития микроспор и размером бутона капусты белокочанной было показано, что в вариантах, где микроспоры были изолированы из бутонов длиной 4 и 5 мм, происходило успешное развитие эмбриоидов, которые в дальнейшем развились в полноценные растения (рис.1, 2). Из микроспор на ранней стадии развития и пыльцевых зёрен регенерации эмбриоидов не происходило.

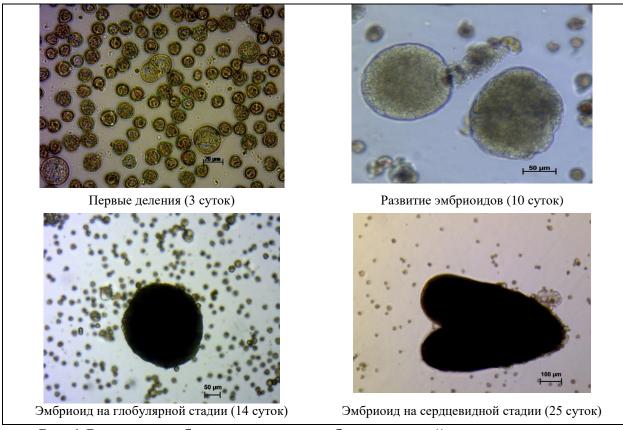


Рис.1 Развитие эмбриоидов капусты белокочанной из микроспор

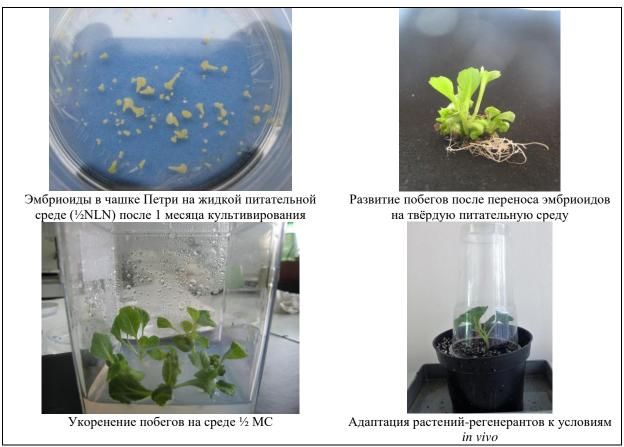


Рис. 2 Развитие растений-регенерантов капусты белокочанной из микроспор

Влияние кислотности питательной среды на образование эмбриоидов

В результате серии опытов с использованием сред с различным уровнем кислотности было показано, что значение рН среды оказывает влияние на выход эмбриоидов отдельных генотипов. При этом все используемые генотипы по-разному реагируют на значение данного показателя питательной среды (табл. 2).

Таблица 2 — Влияние кислотности питательной среды на эмбриогенную активность генотипов капусты белокочанной в культуре изолированных микроспор *in vitro*

Кислотность питательной	Число эмбриоидов шт./ 100 бутонов для различных генотипов капусты белокочанной				
среды	Генотип 22-2	Генотип 30-1	Генотип 116-2	Генотип 116-1	Генотип 145-1
pH 5,8	20,0±5,0	21,0±5,5	54,0±11,0	0	0
pH 6,2	0	0	0	18,0±6,5	45,0±12,7
pH 6,6	15,0±6,0	0	0	0	0

Разная реакция сортотипов капусты белокочанной на кислотность питательной среды свидетельствует о необходимости проведения подбора параметров инкубирования для каждого генотипа индивидуально.

Влияние антибиотиков в питательной среде на образование эмбриоидов

Для изучения влияния различных антибиотиков на развитие эмбриоидов в культуре микроспор капусты белокочанной в питательную среду добавляли ампициллин (Amp) и цефотаксим (Cf) в концентрации 100 мг/л. В качестве контроля использовали среду без антибиотиков (Б/А) (табл. 3).

Наибольший выход эмбриоидов изученных генотипов отмечен в вариантах среды с ампициллином. Так, использование ампициллина в среде генотипа 145-1 способствует увеличению образования эмбриоидов в 3 раза по сравнению с цефотаксимом. Аналогичное индуцирующее действие ампициллина в сравнении с цефотаксимом наблюдается у генотипа 116-2. У генотипа Сл-1 в среде без антибиотиков эмбриоиды не образовались, что

возможно связано с ингибирующим действием эндогенного микробного загрязнения.

Таблица 3 – Влияние антибиотиков в составе питательной среды на эмбриогенную активность генотипов капусты белокочанной в культуре изолированных микроспор *in vitro*

nsompobanibix mukpoenop ii viii o				
Питательная	Число эмбриоидов шт./ 100 бут.			
среда	Генотип 145-1	Генотип 116-2	Генотип Сл-1	
рН 5,8 Б/А	-	40,0±11,0	-	
pH 5,8 Amp	-	100±25,3	-	
pH 5,8 Cf	-	46,7±9,1	-	
рН 6,2 Б/А	33,3±12,6	-	0	
pH 6,2 Amp	120,0±34,7	-	60,0±18,6	
pH 6,2 Cf	40,0±10,3	-	0	

Влияние гормонов в составе питательной среды на эмбриогенную активность

В ходе исследований было изучено влияние на процесс эмбриогенеза ряда регуляторов роста и развития растений: цитокининов (кинетин (KIN) и зеатин (ZEA)) и ауксина (индолил уксусная кислота (IAA)). В качестве контроля использовали безгормональную среду (Б/Г). В опыте использовали 3 генотипа капусты белокочанной, ранее не отозвавшихся на выход эмбриоидов на безгормональной среде (табл. 4).

Таблица 4 — Влияние гормонов в составе питательной среды на эмбриогенную активность генотипов капусты белокочанной в культуре изолированных микроспор *in vitro*

Питательная среда	Число эмбриоидов шт./ 100 бут.		
	Генотип	Генотип	Генотип
	173-1	142-2	Сл-2
рН 6,2 Б/Г	0	0	0
рН 6,2 KIN 2мг/л	40,0±10,6	0	33,3±8,5
рН 6,2 KIN 2мг/л + IAA 0,2 мг/л	100,0±21,3	0	0
рН 6,2 ZEA 1 мг/л	466,7±153,2	20,0±28,5	0
6,2 ZEA 1 мг/л + IAA 0,1 мг/л	0	0	0

Использование зеатина в питательной среде способствовало наибольшему выходу эмбриоидов. Максимальный выход эмбриоидов был отмечен у генотипа 173-1 на среде с использованием зеатина в концентрации 1 мг/л и составил 466,7±153,2 шт./100 бут. Во всех вариантах прослеживается генотипическая зависимость на данный фактор. Возможно, для каждого отдельного генотипа необходимо индивидуально подбирать концентрации гормонов для наибольшего выхода эмбриоидов.

Таким образом, серия опытов показала, что эффективность образования эмбриоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* зависит от состава питательной среды и генотипа донорного растения, что подтверждает данные ранних исследований (Baillie et al., 1992; Burnett et al., 1992).

3.2. Определение плоидности растений-регенерантов капусты белокочанной

В работе растения оценивались на число хромосом, число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и на длину этих клеток. В результате анализа между средними значениями данных показателей была выявлена их прямая зависимость во всех вариантах (рис. 3).

Результаты анализа показали, что растения капусты белокочанной имеют следующее число хромосом: гаплоиды — 9 шт., диплоиды — 18 шт., тетраплоиды — 36шт.; число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц: гаплоиды — $9,21\pm0,85$ шт., диплоиды — $12,48\pm0,89$ шт., тетраплоиды — $18,90\pm1,17$ шт.; средняя длина устьичной клетки составляет: у гаплоидов — $18,69\pm0,79$ нм, диплоидов — $22,47\pm0,65$ нм, тетраплоидов — $28,64\pm0,63$ нм.

Результаты проведенных исследований аналогичны полученным ранее (Dias et al., 2003; Монахос и др., 2014) и позволяют далее использовать подсчёт числа хлоропластов в качестве наиболее простого и быстрого метода массового определения плоидности растений.

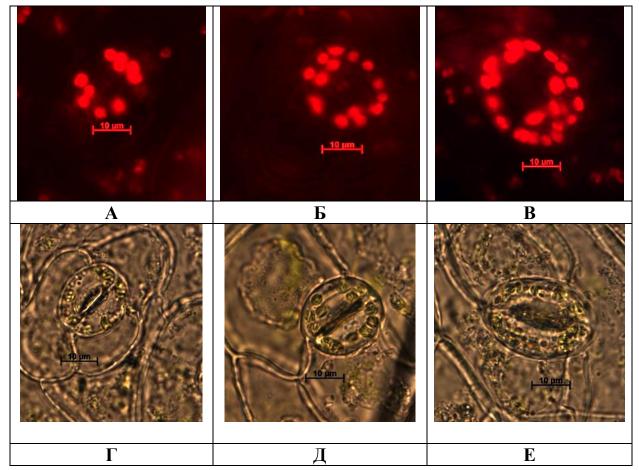


Рис. 3 Подсчет числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц капусты белокочанной (увеличение х100)

А,Г – гаплоид; Б,Д – диплоид; В,Е –тетраплоид.

3.3. Повышение эффективности опыления капусты белокочанной в случае низкой жизнеспособности пыльцы

Полученные удвоенные гаплоиды капусты белокочанной были высажены в защищенном грунте с целью получения семенного потомства для дальнейшей работы. В период цветения у некоторых генотипов были обнаружены трудности при самоопылении растений. При цитологическом анализе пыльцевых зёрен методом дифференциального окрашивания было показано, что содержание зрелых пыльцевых зерен в пыльниках не превышает 10%.

Для того чтобы получить семенное потомство, необходимо было повысить эффективность опыления, для чего была проведена работа по подбору индуцирующего прорастание пыльцы раствора.

Из-за недостаточного количества пыльцы у растений удвоенных гаплоидов, опыты по подбору сред для проращивания пыльцы были проведены

на сортопопуляции Зимовка 1474. Нами были протестированы среды для проращивания пыльцы, отличающиеся химическим составом, в том числе, содержанием в некоторых вариантах трис-буфера, поддерживающего оптимальные значения рН (табл. 1).

В результате анализа интенсивности прорастания пыльцевых зерен капусты белокочанной сорта Зимовка 1474 на различных средах, была выделена среда Т, на которой было зафиксировано наибольшее количество проросших пыльцевых зёрен — 17,46 %.

Растения капусты белокочанной с частичной стерильностью пыльцы были подвергнуты самоопылению в бутонах суспензией пыльцы в растворе для прорастания Т. В контрольном варианте при самоопылении растений сорта Зимовка 1474, завязалось в среднем 23 семени на стручок. В вариантах опыта, где опыление растений с низкой жизнеспособностью пыльцы проводили без использования среды, завязывания семян не происходило. После опыления таких растений суспензией пыльцы в питательной среде Т завязалось меньшее число семян по сравнению с контрольными растениями капусты белокочанной сорта Зимовка 1474, в среднем с каждого стручка растений удвоенных гаплоидов было получено около 7 штук семян. Тем не менее, такое количество семян является достаточным для проведения дальнейшей работы.

3.4. Оценка степени проявления самонесовместимости популяций растений-регенерантов капусты белокочанной

Важным этапом в селекционной работе с исходным материалом является определение степени самонесовместимости растений, которую определяли по завязываемости семян в стручках при самоопылении цветков. Показано, что каждая популяция содержала растения-регенеранты с высокой степенью самонесовместимости. Поэтому в дальнейшей работе был использован метод получения гибридов на основе самонесовместимости.

Для оценки полученных гибридных комбинаций нами была составлена модель F_1 гибрида, которая должна соответствовать следующим параметрам: среднепоздний срок технической спелости, с периодом вегетации 120-130 суток

от высадки рассады, дружный в созревании, транспортабельный, пригодный для механизированной уборки. Кочан средней величины, округлой формы, плотный, массой 2,5-3,5 кг, с отличной внутренней структурой, небольшой внутренней кочерыгой; содержание сухого вещества — 9-10%, с высоким содержанием витамина С, сахаров и низким уровнем нитратов; устойчивый к основным болезням и вредителям.

3.5. Изучение комбинационной способности линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной

Для определения селекционной ценности 14 перспективных линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной проводили их диаллельное скрещивание. Оценку проводили по общей и специфической комбинационной способности по признакам: средняя масса кочана, средний диаметр розетки листьев, средняя высота наружной кочерыги, средняя длина внутренней кочерыги (табл. 5).

Селекция гетерозисных гибридов капусты белокочанной в конечном итоге сводится к созданию линий, которые обладают высокими значениями ОКС, сочетающими комплекс хозяйственно ценных признаков.

Для селекции на высокую урожайность перспективны линии: 1-123, 1-19,2-307, 2-331, 3-3-1. Линия 1-19 имеет высокое значение ОКС по средней массе кочана с компактной розеткой листьев, высокой наружной кочерыгой для механизированной уборки и оптимальной длиной внутренней кочерыги. Линия 1-123 сочетает высокое значение ОКС по средней массе кочана и отрицательные значения по среднему диаметру розетки листьев и средней высоте внутренней кочерыги. Линия 2-307 имеет положительное значение ОКС по средней массе кочана в сочетании с отрицательным значением ОКС по средней длине внутренней кочерыги. Линии 2-331 и 3-3-1 в сочетании с высокими значениями ОКС по средней массе кочана имеют высокие значения ОКС по средней высоте наружной кочерыги.

Для селекции на порционный тип кочана (менее 2 кг) перспективными являются линии: 3-3-3, 11-65. Линия 3-3-3 также имеет отрицательные значения

ОКС по среднему диаметру розетки листьев и средней длине внутренней кочерыги. Линия 11-65 помимо отрицательного значения ОКС по среднему диаметру розетки листьев имеет высокое положительное значение ОКС по средней высоте наружной кочерыги.

Таблица 5 — Комплексная оценка эффектов ОКС линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной (2014-2016 годы)

	удвосиных га	шлоидов капуст	ы ослокочанной (20	14-2010 годы)
Линии	Значения эффектов ОКС			
	средняя	средний диаметр	средняя высота	средняя длина
	масса кочана,	розетки листьев,	наружной кочерыги,	внутренней
	ΚΓ	СМ	СМ	кочерыги, см
1-18	-0,11	-2,19	-0,11	-0,73
1-123	0,19	-2,59	-0,40	-0,45
1-19	0,24	-0,19	0,46	-0,20
5-13	-0,03	-1,01	-0,00	-0,02
5-11	-0,18	-5,12	-0,30	0,18
2-307	0,13	0,84	-0,51	-0,69
2-45	-0,04	1,26	-0,78	0,83
2-123	0,08	2,27	0,12	0,27
2-331	0,23	1,93	2,27	0,29
3-3-1	0,17	5,60	0,09	0,04
3-3-3	-0,32	-0,69	-0,73	-0,23
3-3-2	0,08	-2,62	-0,52	-0,26
11-124	-0,21	2,53	-0,02	0,25
11-65	-0,23	-0,03	0,45	0,70
HCP ₀₅	0,03	0,61	0,39	0,38

3.6. Биохимическая оценка гибридных комбинаций капусты белокочанной

При оценке качества продукции важным показателем является биохимический состав продуктовых органов. Изучено 13 перспективных гибридных комбинаций капусты белокочанной на основе линий удвоенных гаплоидов. Стандартами служили гибриды — F_1 Северянка и F_1 Галакси.

Существенных различий по содержанию сухого вещества, моносахаров и суммы сахаров между гибридными комбинациями и стандартами не выявлено. Содержание сухого вещества находилось в пределах от 9,1 до 10,5%, моносахаров — 3,3-4,6%, суммы сахаров — 4,3-5,1%.

Однако по содержанию аскорбиновой кислоты выделена гибридная комбинация 2-45 x 1-18, в которой по этому показателю показано трёхкратное

пре-вышение показателей стандартов. В этой же гибридной комбинации отмечено наименьшее содержание нитратов (рис.4).

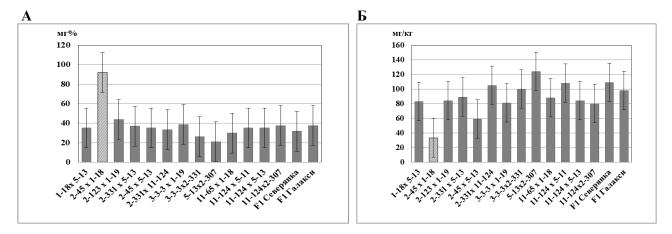


Рис. 4 Содержание A — аскорбиновой кислоты и B — нитратов в гибридных комбинациях капусты белокочанной

3.7. Оценка устойчивости гибридных комбинаций капусты белокочанной к основным болезням и вредителям

Получение стабильных гомозиготных линий из популяции облегчает поиск редких генотипов, в том числе устойчивых к болезням и вредителям. При комплексной оценке гибридных комбинаций капусты белокочанной на хозяйственную ценность необходимо иметь данные устойчивости к основным болезням и вредителям.

Полученные данные показали, что в годы исследования наблюдалась высокая распространенность патогена *Fusarium oxysporum* — от 60 до 100%. Однако, степень поражения в гибридных комбинациях варьировала в пределах 3,1-7,5%.

Симптомы пораженности *Alternaria brassicae* полностью отсутствовали в трех гибридных комбинациях, в остальных распространенность варьировала в широких пределах от 10 до 85%.

Из вредителей в годы исследования были наиболее распространены листогрызущие насекомые (капустная белянка, капустная моль и др.), степень повреждения которыми составляла от 2,5 до 12,2% при распространенности от 31 до 100%. Степень поражения растений возбудителем килы *Plasmodiophora brassicae* варьировала от 12,5 % до 45%.

3.8. Характеристика перспективного гибрида F_1 Натали

В результате оценки основных хозяйственно ценных признаков гибридных комбинаций капусты белокочанной, полученных на основе линий удвоенных гаплоидов, была выделена гибридная комбинация $3-3-3 \times 1-19$ (рис. 5), которая соответствовала созданной модели F_1 гибрида (табл. 6).



Рис.5 Перспективный гибрид капусты белокочанной F_1 «Натали»

Таблица 6 – Характеристика гибрида F₁ Натали по основным хозяйственно ценным признакам

Π	F ₁ «Натали»	
Вегетационный пери-	125	
Масса кочана, кг		3,4
Диаметр розетки лист	гьев, см	61,2
Длина внутренней ко	черыги, см	4,7
Высота наружной ко	черыги, см	7,2
Биохимические:	сухое вещество, %	10,5
	моносахара,%	4,6
	сумма сахаров, %	5,1
	нитраты, мг/кг	81,0
	аскорбиновая кислота, мг/%	38,7
Степень поражения	фузариозное увядание, %	7,5
болезнями и	болезнями и альтернариоз, %	
вредителями кила, %		6,0
	поврежденность	10,0
	вредителями, %	

На основании данных показателей в 2017 году был подготовлен гибрид F_1 «Натали» и передан на государственное испытание в ФГБУ «Госсорткомиссия».

3.9. Сравнительная оценка затрат на производство гибридов капусты белокочанной с использованием традиционного метода и DH-технологии

С учетом сокращения отдельных этапов селекционного процесса за счет камер искусственного климата, схема создания чистых линий капусты белокочанной выглядит следующим образом:

- 1. Посев семян и изучение исходного материала, отбор маточников, яровизация: весна-осень X – год начала селекционной работы;
- 2. Производство линий удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор (получение, адаптация, яровизация на стадии «штеклингов»): зимаосень X+1;
- 3. Размножение линий удвоенных гаплоидов, получение гибридных комбинаций, оценка комбинационной способности линий: зима-осень X+2.

Таким образом, с использованием камер искусственного климата требуется 3 года для получения и оценки гибридных комбинаций капусты белокочанной на основе линий удвоенных гаплоидов.

Для определения основных экономических показателей руководствовались затратами на выращивание согласно технологической карте возделывания капусты белокочанной, сметой на производство линий удвоенных гаплоидов и наблюдениями (табл. 7).

Таблица 7 — Затраты на создание чистых линий капусты белокочанной с использованием различных методов селекции

The horizonal passin in the following in					
Показатели		Традиционный метод селекции		Биотехнологический	
		путем инбридинга		метод культуры изолированных	
		в течение	в течение 7 лет с	микроспор in vitro	
		14 лет	использованием камер		
			искусственного		
	1		климата		
Затраты на выращивание,	открытый грунт	1,446	1,446	0,413	
млн. руб./га	защищен- ный грунт	0,364	-	-	
Затраты на хран маточников, млн.руб./50 раст		1,473	-	-	
Затраты на гибр камере искусств климата, млн.руб./50 раст	венного	-	0,921	0,132	
Затраты на производство линий-удвоенных гаплоидов, млн.руб./50 растений		_	_	0,205	
Общие затраты, млн.руб.		3,282	2,366	0,750	

Анализ данных показал, что при создании F_1 гибридов капусты белокочанной наиболее экономически выгодным является использование биотехнологического метода культуры изолированных микроспор in vitro, который позволяет не только сократить время на создание чистых линий капусты белокочанной, но и в 3-4 раза уменьшить финансовые затраты по сравнению с традиционными методами. Следует отметить, что использование камер искусственного климата в селекционном процессе позволяет сократить как финансовые затраты, так и время на производство гибридов капусты белокочанной в 2 раза по сравнению с традиционным методом селекции. А это необходимым быстрого реагирования запросы является ДЛЯ на потребительского рынка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- 1. Оптимизирована методика получения удвоенных гаплоидов с большим выходом эмбриоидов путем модификации питательной среды. Установлена необходимость подбора рН среды для каждого генотипа индивидуально. Показано положительное влияние антибиотика ампициллина на индукцию эмбриогенеза. При использовании в среде ампициллина выход эмбриоидов увеличился более чем в 2 раза в отдельных генотипах. Максимальный выход эмбриоидов был получен у генотипа 173-1 в среде с рН 6,2, с использованием ампициллина и зеатина в концентрации 1мг/л и составил 466,7±153,2 шт./100 бут.
- 2. Доказано, что гаплоидные клетки в культуре микроспор имеют тенденцию к эндомитозу и формированию клеток различной плоидности. Выявлена прямая зависимость между средними значениями числа хромосом, числом хлоропластов и длиной замыкающей устьичной клетки. Предложен метод подсчета числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц как наиболее простой и быстрый для определения плоидности растений-регенерантов.
- 3. Показано стимулирующее влияние среды для проращивания пыльцевых зерен при опылении в случае низкой жизнеспособности пыльцы. Зафиксирован наибольший процент проросших пыльцевых зерен капусты белокочанной (17,46 %) на среде с трис-буфером.
- 4. Проведенная оценка эффектов ОКС, констант и варианс СКС линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной позволила определить конкретные пути дальнейшего использования исходного материала. Выделены линии 1-123, 1-19, 2-307, 2-331, 3-3-1, являющиеся наилучшими исходными формами при создании высокогетерозисных гибридов F₁ по урожайности. Линии 1-18, 1-123, 1-19, 5-13, 5-11, 2-307, 3-3-1, 3-3-3, 3-3-2, 11-65 можно использовать в качестве исходного материала для получения F₁ гибридов с компактной розеткой листьев, при этом линии 1-19 и 11-65 сочетают высокие значения ОКС по высоте наружной кочерыги, что является преимуществом для механизированной уборки. Линии 1-18, 1-123, 1-19, 5-13, 2-307, 3-3-3, 3-3-2 целесообразно использовать в селекции на короткую внутреннюю кочерыгу.

- 5. Все гибридные комбинации, созданные с использованием линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной характеризуются следующими биохимическими показателями: высоким содержанием сухого вещества от 9,1 до 10,5 %, моносахаров от 3,3 до 4,6 %, суммы сахаров от 4,3 до 5,1 %. Содержание аскорбиновой кислоты находится в пределах от 21,1 до 92,0 мг/%, нитратов от 33,0 до 124,0 мг/кг, что не превышает ПДК.
- 6. В результате проведенной оценки гибридных комбинаций капусты белокочанной, полученных с использованием удвоенных гаплоидных линий, был выделен и подготовлен на государственное испытание гибрид F_1 «Натали». Гибрид среднепоздний с периодом вегетации 125 суток от высадки рассады, масса кочана 3,4 кг, с компактной розеткой листьев 61,2 см, с короткой внутренней кочерыгой 4,7 см, при этом наружная кочерыга 7,2 см. Гибрид отличается высокими биохимическими показателями: сухое вещество 10,5 %, моносахара 4,6 %, сумма сахаров 5,1 %, аскорбиновая кислота 38,7 мг%. Полевая оценка устойчивости к основным болезням и вредителям показала небольшой процент пораженности растений: *Fusarium охуѕрогит* 7,5%, *Alternaria brassicae* 2,5%, *Plasmodiophora brassicae* 6%, вредителями 10%.
- 7. Путем расчета затрат на создание чистых линий капусты белокочанной доказана экономическая выгода использования современного метода культуры изолированных микроспор *in vitro* при создании гибридов капусты белокочанной. При этом сокращается время производства гибридов с 14 до 7 лет, а финансовые затраты уменьшаются в 3-4 раза.

РЕКОМЕНДАЦИИ

- 1. Для наибольшего выхода эмбриоидов рекомендуется проводить для каждого генотипа подбор кислотности среды в интервале 5,8-6,2, использовать среду без гормонов или с содержанием зеатина в концентрации 1 мг/л и ампициллином в концентрации 100 мг/л.
- 2. В качестве наиболее простого и быстрого метода массового определения плоидности растений рекомендуется использовать метод подсчета хлоропластов замыкающих клеток устьиц и измерения их длины.

- 3. Для получения семенного потомства растений капусты белокочанной с низким содержанием жизнеспособной пыльцы рекомендуется при опылении использовать среду для проращивания пыльцевых зерен с содержанием трисбуфера.
- 4. В качестве исходного материала на высокоурожайные гибриды рекомендуется использовать линии: 1-123, 1-19, 2-307, 2-123, 2-331, 3-3-1, 3-3-2; гибриды с компактной розеткой листьев линии: 1-18, 1-123, 1-19, 5-13, 5-11, 3-3-3, 3-3-2, 11-65; гибриды с оптимальной высотой наружной кочерыги линии: 2-331, 1-19, 2-123, 3-3-1, 11-65; гибриды с короткой внутренней кочерыгой линии: 1-18, 1-123, 1-19, 5-13, 2-307, 3-3-3, 3-3-2.
 - 5. Рекомендуется для производственного испытания гибрид F_1 «Натали».
- 6. Полученные результаты могут быть использованы при чтении лекций и проведении практических работ по дисциплинам: «Селекция и семеноводство», «Сельскохозяйственная биотехнология», «Физиология растений».

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

- Минейкина (Батманова), А.И. Повышение эффективности опыления капусты белокочанной в случае низкой жизнеспособности пыльцы / Д.В. Шумилина, А.И. Батманова, Н.А. Шмыкова, Л.Л. Бондарева //Овощи России. 2014. № 4. С.10-13.
- 2. Минейкина, А.И. Оценка устойчивости гибридных комбинаций капусты белокочанной, созданных на основе линий удвоенных гаплоидов к *Plasmodiophora Brassicae* Wor / А.И. Минейкина, А.А. Ушаков, Л.Л. Бондарева // Овощи России. 2015. № 2. С. 90-93.
- 3. Минейкина, А.И. Создание гибридов капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. alba DC) нового поколения с использованием линий удвоенных гаплоидов / В.Ф. Пивоваров, Л.Л. Бондарева, Н.А. Шмыкова, Д.В. Шумилина, А.И. Минейкина // Сельскохозяйственная биология. − 2017. − Т.52. − №1. − С.143-151.

Статьи в прочих изданиях

- 1. Минейкина (Батманова), А.И. Усовершенствование метода опыления капусты белокочанной для применения в случае низкой жизнеспособности пыльцы / А.И. Батманова, Д.В. Шумилина, Н.А. Шмыкова, Л.Л. Бондарева // Материалы конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные исследования молодых ученых в биологии и защите растений» // Russian Agricultural Science Review. Большие Вяземы, 2015. Т.6. №6-2. С. 20-21.
- 2. Минейкина (Батманова), А.И. Оценка гибридных комбинаций капусты белокочанной с использованием линий удвоенных гаплоидов на комплекс хозяйственно ценных признаков / А.И. Батманова, Л.Л. Бондарева, Д.В. Шумилина, Н.А. Шмыкова, А.А. Маслова // Материалы IV Международной научно-практической конференции «Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы» // Селекция и семеноводство овощных культур. ВНИИССОК, 2015. №46. С. 118-125.
- 3. Минейкина (Батманова), А.И. Использование DH-технологий в селекции капусты белокочанной / А.И. Батманова, Д.В. Шумилина, Л.Л. Бондарева // Материалы Ежегодной научной конференции «Аграрное образование и наука в 21 веке: вызов и проблемы развития». Москва, 2015. № 288-1. С. 195.
- 4. Минейкина, А.И. Исходный материал для создания гибридов F_1 капусты белокочанной с использованием современных методов селекции / А.И. Минейкина, Л.Л. Бондарева, Д.В. Шумилина // Материалы Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы селекции и семеноводства капустных культур». Москва, 2016. С. 116.
- 5. Минейкина, А.И. Технология получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор семейства капустные: Методические рекомендации / Е.А. Домблидес, Н.А. Шмыкова, Д.В. Шумилина, Т.В. Заячковская, А.И. Минейкина, Е.В. Козарь, В.А. Ахраменко, Л.Л. Шевченко, Л.Ю. Кан, Л.Л. Бондарева, А.С. Домблидес // Изд-во ВНИИССОК. 2016. 46 с.

6. Минейкина, А.И. Фитопатологическая оценка гибридных комбинаций капусты белокочанной, полученных на основе удвоенных гаплоидных линий / А.А. Маслова, А.А. Ушаков, Л.Л. Бондарева, А.И. Минейкина // Материалы IV Международной конференции «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам». — Санкт-Петербург, 2016. — 124 с.