**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение**
**«Федеральный научный центр овощеводства»**

УДК 631.526:573.6:635.342

*На правах рукописи*

**МИНЕЙКИНА АННА ИГОРЕВНА**

# 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)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук

**Научные руководители:**
Доктор сельскохозяйственных наук,
Бондарева Людмила Леонидовна
Кандидат биологических наук,
Шумилина Дарья Владимировна

Москва – 2018

# ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ ..... 4

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ..... 8

1.1. Народно-хозяйственное значение, морфологические и биологические особенности капусты белокочанной ..... 8

1.2. Основные направления селекции капусты белокочанной ..... 10

1.3. Особенности селекции капусты белокочанной на гетерозис ..... 12

1.4. Методы получения гибридных семян капустных культур ..... 14

1.5. Комбинационная способность исходных родительских линий ..... 18

1.6. Селекция капусты белокочанной на устойчивость к основным болезням и вредителям ..... 22

1.7. Биотехнологические методы создания линий удвоенных гаплоидов для селекции F1 гибридов ..... 26
1.7.1. Получение и использование гаплоидов в селекционной работе ..... 26
1.7.2. Факторы, влияющие на образование эмбриоидов ..... 28
1.7.3. Плоидность получаемых растений-регенерантов ..... 34

2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ..... 37

2.1. Материалы и методика проведения исследований ..... 37
2.1.1. Материалы исследований ..... 37
2.1.2. Методы исследований ..... 37

2.2. Условия проведения исследований ..... 44

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ..... 48

3.1. Получение линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной с использованием метода культуры изолированных микроспор *in vitro* ..... 48
3.1.1. Влияние фазы развития микроспор на эффективность эмбриогенеза ..... 48
3.1.2. Влияние кислотности питательной среды на образование эмбриоидов ..... 51
3.1.3. Влияние антибиотиков в питательной среде на образование эмбриоидов ..... 53
3.1.4. Влияние гормонов в составе питательной среды на эмбриогенную активность ..... 54

3.2. Определение плоидности растений-регенерантов капусты белокочанной, полученных в культуре изолированных микроспор *in vitro* ..... 56

3.3. Повышение эффективности опыления капусты белокочанной в случае низкой жизнеспособности пыльцы ..... 58

3.4. Оценка степени проявления самонесовместимости популяций растений-регенерантов ..... 63

3.5. Изучение комбинационной способности удвоенных гаплоидных линий капусты белокочанной ..... 65
3.5.1. Комбинационная способность по признаку «средняя масса кочана» .... 65
3.5.2. Комбинационная способность по признаку «средний диаметр розетки листьев» ..... 68
3.5.3. Комбинационная способность по признаку «средняя высота наружной кочерыги» ..... 70
3.5.4. Комбинационная способность по признаку «средняя длина внутренней кочерыги» ..... 72

3.6. Характеристика линий удвоенных гаплоидов и гибридных комбинаций капусты белокочанной по основным хозяйственно ценным признакам ..... 75
3.6.1. Комплексная оценка эффектов ОКС линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной ..... 75
3.6.2. Биохимический анализ гибридных комбинаций удвоенных гаплоидов капусты белокочанной ..... 76
3.6.3. Оценка устойчивости гибридных комбинаций капусты белокочанной к основным болезням и вредителям ..... 78

3.7. Характеристика перспективного гибрида капусты белокочанной $F_1$ «Натали» ..... 81

3.8. Сравнительная оценка затрат на производство гибридов капусты белокочанной с использованием традиционного метода и DH-технологии ..... 82

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ..... 85
РЕКОМЕНДАЦИИ ..... 87
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ ..... 88
ПРИЛОЖЕНИЕ ..... 106

# ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Среди растений рода *Brassica oleracea* L. самой распространенной культурой является капуста белокочанная. Ее популярность объясняется целым комплексом биологических и хозяйственно полезных свойств (Крашенинник, 2010). По данным ФАО, площади, занятые под производством капусты в Российской Федерации составили 112,7 тыс./га в 2016 году, а объем производства 3,618 млн. т (данные ФАО, 2016).

Основные направления в современной селекции капусты белокочанной это лёжкость, пригодность к механизированной уборке, устойчивость к возбудителям таких болезней как кила, сосудистый бактериоз, фузариозное увядание и повреждениям вредителями (Пивоваров, Старцев, 2006). 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.

В условиях постоянно меняющейся конъюнктуры рынка, селекция должна оперативно реагировать на его запросы, оставаться конкурентоспособной. В настоящее время в нашей стране интенсивно происходит сортосмена, поэтому необходимы методы ускорения селекционного процесса капусты, использование в работе достижений научно-технического прогресса, широкого применения инструментальных и прецизионных методов, позволяющих максимально эффективно использовать потенциал отечественного и зарубежного генофонда (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).

**Целью исследований –** получение исходного материала капусты белокочанной (*B. oleracea* L.) для создания F1 гибридов с использованием современных биотехнологических методов селекции.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать отдельные элементы методики получения большого числа удвоенных гаплоидных растений.
2. Оценить полученные удвоенные гаплоидные и гаплоидные растения капусты белокочанной.
3. Провести оценку по основным хозяйственно ценным признакам гибридные комбинации капусты белокочанной, полученные 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 pH.

Определена комбинационная способность линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной по основным морфологическим 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».

**Методология и методы исследования**. Работа выполнена в 2014 – 2017 годы в ФГБНУ ВНИИССОК (ныне ФГБНУ ФНЦО) с использованием классических и современных биотехнологических методов селекции для получения и

анализа исходного материала капусты белокочанной. Более подробно методология и методы исследования отражены в разделе «Материалы и методика проведения исследования».

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Особенности использования метода культуры изолированных микроспор *in vitro* при создании удвоенных гаплоидных растений 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 в 2015 – 2016 годах в ФГБНУ ВНИИССОК, представлены на конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные исследования молодых ученых в биологии и защите растений» (Большие Вяземы, 26 декабря 2014 г.); 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 2015 г.); Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы селекции и семеноводства капустных культур» (Москва, 13 сентября 2016 г.); 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 изложена на 118 страницах, содержит 22 таблицы, 11 рисунков, состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, рекомендаций производству, приложения. Список литературы содержит 171 источник из них 72 на иностранных языках.

# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Народно-хозяйственное значение, морфологические и биологические особенности капусты белокочанной

Капуста белокочанная (*Brassica oleracea* convar. *capitata* (L.) Alef. var. *capitata* L. f. *alba* DC) – древнейший вид культивируемых овощных растений. Капуста была введена в культуру более пяти тысяч лет назад. Родиной всех возделываемых видов капусты считают Средиземноморье. На протяжении тысячелетий из дикой капусты человеку удалось получить большое разнообразие форм. В результате отбора растений с укороченными междоузлиями были получены кочанные формы – савойская, краснокочанная и белокочанная (Лизгунова, 1984).

Капуста белокочанная — одна из самых распространенных овощных культур в России. В Центральном, Северо-Западном и Уральском регионах, в Сибири и на Дальнем Востоке удельный вес капусты в структуре площадей под овощными культурами составляет 40-60%, в южных районах — 10-20%, в Нечерноземной зоне она занимает до 50% (Пивоваров, Старцев, 2006).

Широкое распространение капусты белокочанной объясняется целым комплексом ее биологических и хозяйственно полезных свойств. Кочаны капусты белокочанной – кладовая витаминов, белков, углеводов, минеральных солей ферментов, биологически активных веществ (Старикова, 1989). Основные полезные минералы, содержащиеся в капусте: кальций, натрий, калий, фосфор, магний, а также микроэлементы: марганец, селен, железо, сера, медь, цинк, хлор. Также учеными в ней были обнаружены витамины, регулирующие основные процессы обмена веществ, протекающие в организме человека. Это витамины – С, $B_1$, $B_2$, $B_3$, РР, К (Китаева, 1977).

Все многообразие выращиваемых видов капусты относится к роду *Brassica* семейства капустные (*Brassicaceae*) отдела покрытосеменных (*Magnoliophyta*) класса двудольных (*Magnoliatae*) порядка *Capparales* (Прохоров и др., 1997).

Капуста белокочанная – двулетнее растение. В первый год растение образует укороченный толстый густо облиственный стебель-кочерыгу и продуктовый орган кочан (или видоизмененный стебель), который используется для употребления в пищу. На второй год из верхушечной почки образуются мощные высокие (от 1,0-1,8 м) цветоносные побеги (стебли), на которых в дальнейшем формируются стручки с семенами (Прохоров и др., 1997; Путырский, 2004).

Корневая система капусты мощная, хорошо разветвлённая, мочковатая при рассадном способе выращивания культуры и стержневая при безрассадном. Стебли прямостоячие или полуприподнятые, ветвистые. Стебель короткий у раннеспелых сортов и удлинённый у позднеспелых сортов. Стебель (кочерыга) высотой до 15 см считается низким, 16-20 см - средним и более 20 см - высоким. Листья у капусты очередные, нижние часто образуют розетку. Нижние листья черешковые, раскидистые, а верхние - сидячие. Пластинка листа крупная, с толстыми жилками. Лист бывает короткочерешковым (4-10 см), средне черешковым (10-15 см), длинночерешковым (более 15 см). Форма листовой пластинки - удлиненная (широколанцетная, овальная, сбежистая к верху и к низу, обратнояйцевидная, широко-обратнояйцевидная), округлая (округлая, усеченно-овальная), широкая (поперечно-овальная, почковидная). Величина листовой пластинки (характеризуют по длине) может быть мелкая (25-40 см), средняя (40-50 см), крупная (более 50 см), а ее поверхность - плоская, вогнутая и выпуклая. Поверхность ткани листьев - гладкая и морщинистая (морщинистость мелкая, средняя и крупная). Окраска листьев от светло- и серо-зеленой до темно-зеленой и фиолетовой разной интенсивности, часто с восковым налетом разной степени (Белик, 1992, методические указания по апробации овощных культур, 2006).

Кочан разных сортов может сильно различаться по размеру и форме. По форме кочаны разделяются на пять типов: круглые, плоские, плоскоокруглые, конусовидные, овальные. Диаметр кочана от 10 до 45 см и более. Цветки

собраны в длинные кисти или щитки. Цветок обоеполый, среднего размера. Околоцветник свободный, состоит из четырех чашелистиков и четырех лепестков. Лепестки желтые или белые, гладкие и слабо гофрированные. Тычинок шесть: две наружные короткие, четыре внутренние длинные. Пестик образован двумя плодолистиками, имеет головчатое рыльце, короткий столбик и длинную верхнюю завязь.

Плод – стручок с коническим носиком, имеет цилиндрическую и плоскоцилиндрическую форму, ровную или в разной мере бугорчатую поверхность. В стручке до 25-35 семян. Семена округлые или шаровидные со слабо мелкоячеистой поверхностью. Окраска от коричневой до черной. Масса 1000 шт. – 2,5-5,0 г (Белик, 1992; Прохоров и др., 1997; Лудилов, 2000).

Капуста белокочанная — холодостойкая культура, переносит заморозки до -3 – -4°С, оптимальная температура для роста +15- +17°С. Капуста очень влаголюбива, однако переувлажнение почвы выносит плохо. Хорошо растет на плодородной, окультуренной почве с pH не ниже 5,5. Кислых почв не переносит, отзывчива на удобрения (органические и минеральные). В начале вегетации наиболее требовательна к азоту (N), во время формирования кочана – к фосфору (Р) и калию (К) (Лизгунова, 1984).

## 1.2. Основные направления селекции капусты белокочанной

Получение стабильного и качественного урожая капусты белокочанной является одной из приоритетных задач овощеводства, решение которой подразумевает как увеличение продуктивности, так и повышение устойчивости к неблагоприятным воздействиям окружающей среды.

Селекционная работа с капустой белокочанной направлена на создание сортов и гибридов, обеспечивающих круглогодичное снабжение населения свежей продукцией. Сорта и гибриды должны быть как ультраскороспелыми, скороспелыми и среднеспелыми, так и позднеспелыми, с высокой лёжкостью продукции. В настоящее время меняются требования к качеству товарной продукции: кочаны должны быть универсального использования, пригодными

как к хранению, так и к переработке (квашению) (Квасников, Белик, 1970; Бондарева, 2009).

Новые сорта и гибриды должны обладать высокой урожайностью, быть пригодными для механизированного возделывания. В этой связи наиболее важными показателями является дружность созревания, морфологическая выравненность, отсутствие полегания кочанов. Розетка листьев должна быть небольшой, с вертикальным и приподнято-вертикальным расположением листьев, и хорошо прикрывать кочан. Эти задачи полностью могут быть решены созданием гетерозисных гибридов $F_1$ (Пивоваров, Бондарева, 2013).

Следующее важное направление селекции — баланс содержания сухого вещества, а также сахаров и витаминов в зависимости от назначения использования гибридов.

Приоритетным направлением селекции на устойчивость к болезням и вредителям становится толерантность и устойчивость сортов и $F_1$ гибридов к возбудителям основных болезней в каждой зоне. Актуальность объясняется тем, что в узкоспециализированных хозяйствах большая насыщенность культурой приводит к постоянным нарушениям севооборота и способствует быстрому накоплению специфических болезней, с которыми не в состоянии справиться предупредительные и агротехнические мероприятия. Поэтому наиболее эффективным методом в борьбе с болезнями и вредителями является внедрение устойчивых сортов и гибридов. Находящиеся в производстве сорта и гибриды $F_1$ капусты сильно поражаются килой, слизистым и сосудистым бактериозом, фузариозным увяданием, а в период хранения – серой гнилью и точечным некрозом (Пивоваров, Старцев, 2006).

В последние годы селекция капусты белокочанной вышла на качественно новый уровень благодаря созданию гибридов $F_1$, которые оказались устойчивыми, высокоурожайными и соответствующими всем стандартам современного промышленного овощеводства. Селекция $F_1$ гибридов капустных культур базируется на использовании физиологической спорофитной

самонесовместимости и цитоплазматической мужской стерильности (Монахос, 2007).

### 1.3. Особенности селекции капусты белокочанной на гетерозис

Одним из эффективных способов селекции, позволяющих повысить урожайность сельскохозяйственных культур и улучшить качественные показатели урожая, является гибридизация родительских линий с получением гетерозисного потомства.

Под гетерозисом понимают свойство гибридов первого поколения превосходить родителей или лучшую из родительских форм по определенным биологическим и хозяйственно ценным признакам и свойствам, по степени их выраженности (Брежнев, 1966; Гужов, 1969; Гуляев, 1984). Термин гетерозис был предложен Шеллом в 1914 г., но явление более мощного развития гибридов по сравнению с родительскими формами у многих видов растений было описано Дарвином в 1862 г. (Абрамова, 1985).

Явление гетерозиса объясняется тремя основными гипотезами: 1. гипотеза сверхдоминирования объясняет проявление гетерозиса гетерозиготным состоянием гибридов;  2. гипотеза доминирования исходит из того, что к гетерозису ведёт вызванное скрещиванием накопление доминантных аллелей продуктивности; 3. гипотеза генетического баланса объясняет гетерозис физиологической сбалансированностью процессов обмена веществ. На сбалансированность гибридов влияют также ядерно-плазменные взаимоотношения, например, если в гибридномидеотипе присутствуют генетически различные митохондрии (усиливаются дыхание и энзиматическая активность) (Шаманин, Трущенко, 2006).

А. Густафсон описывает три типа гетерозиса у растений в зависимости от характера признаков, в которых он проявляется: репродуктивный (семян, плодов), соматический (стеблей, побегов, листьев, клубней, корнеплодов) и адаптивный (зимостойкости, засухоустойчивости, скороспелости) (Gustafson, 1946).Следует различать также позитивный и негативный гетерозис, то есть положительное и отрицательное влияние гибридизации на развитие соответству-

ющих признаков у гибридов по сравнению с родительскими формами. Для селекционера интерес представляет позитивный гетерозис, проявляющийся в повышенной жизнеспособности и продуктивности гибридов. Но следует отметить, что увеличение признаков у гибридов в результате гетерозисного эффекта не всегда сопровождается увеличением приспособленности организмов (Турбин, 1967).

Явление гетерозиса проявляется в большей жизнеспособности, быстром росте и развитии, раннем созревании и большей продуктивности. Гибриды $F_1$ также отличаются повышенной устойчивостью к болезням и внешним неблагоприятным условиям, приспособляемостью и экологической адаптивностью (Даскалов, 1981). Гетерозисные гибриды по урожайности превышают обычные свободноопыляющиеся сорта на 30–50%.

Изучение гетерозисного эффекта у капусты в СССР началось в 20-30-х годах (Синская, 1927). Вопросами гетерозиса у капусты занимались Химич(1935), Колобердина (1941), Кулышева (1947), Рыкова (1949), Перлова и Новиков (1960) и другие.

Первые работы в этом направлении были начаты во Всесоюзном НИИ растениеводства, затем во Всесоюзном НИИ селекции и семеноводства овощных культур, МСХА и других опытных учреждениях страны (Химич, 1935). За рубежом (США, Япония, Скандинавские страны) первые исследования были предприняты в 20-х годах (Pearson, 1929; 1932). Наибольшее развитие они получили в 50-х годах. В настоящее время исследования в этой области ведутся во многих странах мира.

Большую урожайность по сравнению с обоими родительскими линиями отмечали многие исследователи. Проявление гетерозиса по урожайности в большинстве случаев наблюдается при наличии различий между родительскими линиями по биологическим особенностям, морфологическим признакам и географическому происхождению. Урожайность гетерозисных гибридов в зависимости от ботанического вида культурного растения, а также

комбинационной способности скрещиваемых пар могут превышать родительские пары в среднем от 30 до 200 %, а в отдельных случаях и выше. При скрещивании близкородственных сортов гетерозис по урожайности, скороспелости и по другим хозяйственно ценным признакам отмечали гораздо реже (Химич, 1935; Колобердина, 1941; Никулина, 1954; Попова, 1958; 1963; Китаева, Орлова, 1980).

Гетерозисная селекция состоит из нескольких этапов. Селекционная работа начинается с выбора исходного материала, из которого создают самоопыленные линии. Затем изучают комбинационную способность этих линий, а наиболее пригодные к комбинированию используют в качестве родительских форм для создания простых, двойных и других типов гибридов (Гужов и др., 2003).

Успех селекции на гетерозис в большей степени является зависимым от богатства и разнообразия исходного материала, обладающего важнейшими хозяйственно ценными признаками и биологическими свойствами.

### 1.4. Методы получения гибридных семян капустных культур

Для производственных целей существует различные методы получения гибридных семян капустных культур.

Гибридизация самонесовместимых инбредных линий базируется на том, что растения не образуют семян от переопыления внутри линии, но хорошо скрещиваются с растениями другой линии, что позволяет получить гибридные семена. Размножение и поддержание родительских линий производится гейтеногамным опылением бутонов вручную (Pearson, 1932; Крючков, 1972).

Самонесовместимость, или неспособность растения оплодотворяться своей пыльцой, была обнаружена И.Г. Кельрейтером еще в середине 18 в. Позднее ученые установили, что она широко распространена среди высших перекрестноопыляющихся растений. По времени действия генов, их числу, особенностям строения цветка и другим показателям различают 10 типов самонесовместимости, которые по генетическому контролю в пыльце и рыльце

разделяют на две большие группы: гаметофитная и спорофитная самонесовместимость. В обеих системах несовместимость осуществляется при активности одного и того же аллеля в пыльце и рыльце. У растений с гаметофитной системой пыльца двухъядерная, реакция самонесовместимости осуществляется в тканях столбика пестика. В пыльце действует находящийся в ней аллель гена самонесовместимости, в рыльце – оба аллеля. У растений со спорофитной системой пыльца трехъядерная, реакция самонесовместимости осуществляется на поверхности рыльца. Растения линии, гомозиготной по одному аллелю или гетерозиготной по одним и тем же двум аллелям, могут завязывать семена только при опылении пыльцой другой линии, имеющей иные аллели. На этом основана схема селекции линий и производство гибридных семян (Малецкий, 1996).

В нашей стране в селекции гибридов $F_1$ капусты применяют разработанную в ТСХА А.В. Крючковым четырехлинейную схему, позволяющую производить гибридные семена при минимальных затратах ручного труда на размножение линий. Ее сущность состоит в сохранении в течение ряда поколений инбридинга гетерозигот по аллелям гена самонесовместимости до достижения в них гомозиготности по генам, контролирующим хозяйственно ценные признаки, с одновременной оценкой их комбинационной способности в скрещиваниях с другими гетерозиготами. Затем выделяют исходные гомозиготные линии в потомстве от гетерозиготы по доминантному и рецессивному аллелям. Скрещиванием исходных линий в каждой паре получают семена родительских линий, а скрещиванием последних– гибридные семена (Прохоров и др., 1997).

Реакция несовместимости происходит на поверхности рыльца пестика: несовместимая пыльца не прорастает вовсе или пыльцевые трубки, появившись и достигнув поверхности сосочков рыльца, скручиваются и утолщаются. Стенки сосочков рыльца состоят из внешнего кутикулярного слоя, покрытого воском, и внутреннего – пектино-целлюлозного. При несовместимом

опылении, по мнению одних авторов, барьером служит пектино-целлюлозный слой, по мнению других – кутикула, третьих – восковой слой (Крючков, 1968; Nakanishi, 1973).

Так как самонесовместимость проявляется, в основном, в раскрывшихся цветках и достигает максимума у самого крупного бутона и трех самых молодых цветков (Крючков, Гутиэррес, 1986), эти растения размножают гейтеногамным опылением вскрытых вручную бутонов (Pearson, 1929).

Проявление самонесовместимости у растений рода *Brassica* зависит от генотипа, состояния цветка, места выращивания и других факторов. Детальное изучение этих зависимостей имеет большое научное и практическое значение.

Современное производство гибридных семян основано на особенностях биологии цветения. Если необходимо получать гибридные семена для производства, то ручная кастрация не применима (Шаманин, Трущенко, 2006).

Для массового производства гибридных семян капустных культур в настоящее время наибольшую популярность и практическую значимость приобрела цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС), которая позволяет значительно упростить получение гибридных семян.

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС, Cytoplasmic male sterility, CMS) – явление полной или частичной стерильности высших растений, возникающее при наличии особой мутации в митохондрионе, то есть в геноме митохондрий, фертильность растений восстанавливается полностью или частично при наличии доминантного аллеля ядерного гена-восстановителя фертильности. Впервые была открыта у кукурузы, независимо и практически одновременно американским генетиком Маркусом Роудсом (Rhoades, 1931) и сотрудником отдела генетики ВИР М.И. Хаджиновым. Цитоплазматическая мужская стерильность основана на взаимодействии между генами ядра (хромосомами) и генами, находящимися в цитоплазме. Существует три типа генетически обусловленной мужской стерильности: 1) генетическая, или ядерная, – мужская стерильность, обусловленная действием одного и более генов в хромосомах; 2)

цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС), обусловленная экстрахромосомными факторами, или плазмогенами; 3) ядерно-цитоплазматическая мужская стерильность, обусловленная действием обоих факторов. Из всех типов стерильности наиболее пригодной для селекции растений оказалась цитоплазматическая мужская стерильность (Шаманин, Трущенко, 2006).

Цитоплазматическая мужская стерильность основана исключительно на плазмогенах, передающихся по материнской линии. Поэтому фертильность гибрида не может быть восстановлена. Этот феномен послужил идеальной моделью для изучения материнского наследования у растений (Френкель, Галун, 1982).

Мужская стерильность встречается более чем у 200 видов высших растений и связана с аномальным развитием пыльников (нераскрываемость пыльника или абортация пыльцы на различных стадиях микроспорогенеза) (Бунин, 1994; Иванов, Дымшиц, 2007). Этот признак широко используется в селекции при создании гибридов первого поколения, поскольку позволяет контролировать процесс опыления пыльцой отцовских форм. ЦМС открыла широкие возможности для практического использования гетерозиса в растениеводстве. Она исключает необходимость кастрации цветков материнских стерильных линий, обеспечивая возможность их контролируемого опыления пыльцой отцовских форм и получения гибридных семян. ЦМС используется в семеноводстве гибридов кукурузы, риса, хлопчатника, подсолнечника, рапса, овощных культур. Неоценимый вклад в разработку методик использования ЦМС в селекции сельскохозяйственных растений внесли многие отечественные ученые (Хаджинов, Пашинин, 1935; Анащенко, Дука, 1985; Бочкарев, Цухло, 1991).

Цитоплазматическая мужская стерильность может быть использована для перевода на стерильную основу уже районированных гибридов и создания на стерильной основе новых гибридов. Для получения гибридов на стерильной основе необходимо, чтобы простой межлинейный гибрид или сорт,

используемый в качестве материнского компонента двойного межлинейного или сортолинейного гибрида, имели стерильную пыльцу. У материнского простого гибрида стерильной должна быть материнская линия, а у отцовских простых гибридов одна или обе линии должны обладать восстановительной способностью. При производстве гибридных семян применяют одну из трёх схем скрещиваний*:* восстановления, полувосстановления и смешения. При выращивании гибридных семян на основе любой из этих схем простые стерильные гибриды получают путём скрещивания стерильного аналога материнской линии с линией-закрепителем стерильности. При использовании в товарных посевах простых межлинейных гибридов материнская линия должна быть стерильной, а отцовская – обладать восстанавливающей способностью (Шаманин, Трущенко, 2006).

Использование при семеноводстве $F_1$ гибридов материнских форм с цитоплазматической мужской стерильностью исключает самоопыление и наличие сибсов в партиях гибридных семян.

### 1.5. Комбинационная способность исходных родительских линий

Успех и продолжительность выведения новых гибридов во многом зависит от правильного подбора исходного материала, представляющего начальный этап селекционной работы. Не каждое скрещивание двух линий приводит к получению гетерозисных гибридов. Чтобы найти наиболее пригодные для этого линии, необходимо проводить диаллельные скрещивания. Для создания гетерозисных высокоурожайных гибридов $F_1$ важное значение имеет подбор компонентов скрещивания и оценка их комбинационной способности.

Создание гетерозисных гибридов подразумевает скрещивание родительских линий, обладающих различными хозяйственно ценными признаками. При этом получаемые гибридные комбинации не всегда дают ожидаемый гетерозисный эффект, поэтому важным этапом селекционного процесса при создании $F_1$ гибридов является оценка комбинационной

способности исходных родительских линий (Турбин, 1967; Хотылева, 1965; Буренин, 1971; Крючков и др., 1979; Монахос, 1984).

Комбинационная способность представляет собой способность родительских форм проявлять гетерозисный эффект при скрещивании с другими генотипами. Это наследственный признак (Турбин и др., 1974; Савченко, 1978). При оценке линий различают общую комбинационную способность (ОКС) и специфическую комбинационную способность (СКС). Под ОКС понимают разницу между средним показателем гибридов, полученных с ее участием, и средним показателем всех гибридов комплекса. ОКС выражает среднюю ценность сорта (линии) в гибридных комбинациях и измеряется средней величиной отклонения признака у всех гибридов с участием этой родительской формы от общего среднего по всем гибридам. СКС – это показатель в конкретном скрещивании. Эффект СКС математически определяется как разность между конкретным проявлением признака у гибрида и суммарным эффектом ОКС родительских линий и средней по комплексу гибридов. СКС используют для характеристики отдельных комбинаций, когда они оказываются хуже или лучше, чем предполагалось, на основании среднего качества изучаемых родительских форм (Бунин и др., 2011).

Интерпретация общей и специфической комбинационной способности впервые была сделана Спрэгом и Тэйтумом (Sprague, Tatum, 1942). В их исследованиях были разработаны основные теоретические положения и методы селекции гетерозисных форм, важнейшей частью которых является селекция на комбинационную способность. Именно эти исследования позволили разработать приемы математической оценки комбинационной способности путем использования метода диаллельных скрещиваний. Применение математических методов оценки не только ускоряет селекционный процесс, но и ставит его на более высокий качественный уровень (Савченко, 1966).

Комбинационная способность передается потомству, как при самоопылении, так и при скрещивании (Турбин и др., 1974). Оценка

комбинационной способности изучаемых сортов и линий позволяет предвидеть результаты будущих скрещиваний и отбирать перспективный материал, избегая при этом затрат времени и средств на получение и испытание большого числа гибридов, не имеющих практической ценности.

Различные требования, предъявляемые к выбору тестера, связаны с тем, что формы комбинационной способности различаются по своей генетической основе. ОКС определяется аддитивными наследственными факторами, а в основе СКС лежат доминирование, сверхдоминирование и эпистаз (Sprague, Tatum, 1942; Griffing, 1956). Установлено, что специфическая комбинационная способность значительно более изменчива, чем общая. Она в большей степени варьирует в зависимости от места и года испытания, в значительной мере определяется взаимодействием генотипа с условиями окружающей среды. Поэтому для получения надежных данных о специфической комбинационной способности необходимо проводить исследования в большем числе пунктов и в течение более длительного времени, чем при испытании на общую комбинационную способность (Турбин, 1967).

Установлено, что эффекты СКС отражают характер наследования у конкретного гибрида и гибридные комбинации с наибольшими положительными эффектами СКС будут и наиболее гетерозисными.

Самые лучшие методы оценки ОКС родительских форм – это диаллельные и топкроссные скрещивания. Диаллельные скрещивания – это система, при которой испытываемые сорта или линии скрещиваются во всех возможных комбинациях (полные) или только части комбинаций (неполные). Метод диаллелльного анализа не только помогает оценить ОКС и СКС, но и определить другие показатели – степень доминирования, структуру генетической вариансы. Наиболее полная и всесторонняя оценка комбинационной способности в диаллельных скрещиваниях представлена в работе Гриффинга, в которой даны формулы и схемы расчетов эффектов и вариванс ОКС и СКС при различных сочетаниях прямых и обратных гибридов и

родительских линий (Griffing,1956). В свое время эти методы довольно подробно описывались и в нашей отечественной литературе (Хотылева, 1965; Турбин и др., 1974). Метод диаллельных скрещиваний считается более информативным, позволяет установить одновременно ОКС и СКС конкретных форм (Дремлюк, 1976). Результаты диаллельных скрещиваний с повторностью определяют разные пути дисперсионного анализа, целью которого является оценка генетических компонентов дисперсии или проверка справедливости ряда предложений, лежащих в основе модели. Метод диаллельных скрещиваний более точный и информативный. Он позволяет определить эффекты и вариансы ОКС и СКС в целом по опыту и для каждой конкретной линии, оценить реципрокные различия, выяснить аддитивные и неаддитивные эффекты генов, рассчитать наследуемость в широком и узком смысле, предсказать направление дальнейшей селекционной работы. Однако этот метод является трудоемким ввиду большого количества скрещиваний и испытания гибридов.

С целью сокращения числа гибридных комбинаций и, следовательно, уменьшения объема работы при оценке родительских форм по комбинационной способности проводят скрещивания методом топкросс. Таким образом, гибриды F1 получаются при скрещивании родительских форм с некоторыми (не менее трех) сортами – тестерами, часто используемыми в качестве опылителя. Метод топ-кросса является перспективным при оценке ОКС сортов и линий, так как существенно упрощает работу, особенно когда требуется испытание большого числа линий и сортов. При этом Пакудин отмечает, что в топ-кроссных скрещиваниях достигается практически та же степень полноты информации, как и в диаллельных скрещиваниях (Пакудин, 1972). Этот метод получил широкое признание в селекции кукурузы и некоторых других перекрестноопыляющихся культур после опубликования Дженкинсом и Брунсом в 1932 году обширного материала, свидетельствующего о том, что линии, выделенные на основе топкросс, дают лучшие межлинейные гибриды

(Хотылева, 1965). Основным недостатком метода топкросс является невозможность оценки линий по специфической комбинационной способности. Этот метод используют при изучении комбинационной способности линий с цитоплазматической мужской стерильностью, где возможно их использование только в качестве материнской, а фертильной в качестве опылителей.

Высокий гетерозисный эффект можно получить от скрещивания линий с высоким значением ОКС по данному признаку, однако установлено, что для получения наибольшего гетерозиса необходимо вести подбор пар для скрещивания в первую очередь по специфической комбинационной способности (Крючков, Кулиев, 1979; Монахос, 1984). Максимальное значение гетерозисного эффекта по данному признаку достигается при сочетании высокой ОКС линий с высокой СКС при их скрещивании.

По мнению многих исследователей оценка комбинационной способности изучаемых сортов (линий) дает возможность исключить ненужные затраты времени и средств на получение и испытание большого количества малоценных гибридов и сконцентрировать внимание на перспективном материале (Савченко, 1978; Федин и др., 1980).

Особенности наследования различных признаков у самонесовместимых инбредных линий различных видов *Brassica oleraceae* изучены и описаны многими авторами (Крючков, 1979; Сердюк, 2003; Монахос, 2007 и другие), однако в связи с использованием биотехнологических методов для получения гомозиготных линий удвоенных гаплоидов, изучение характера наследования хозяйственно ценных признаков этих линий представляет как большой практический интерес, так и научный.

## 1.6. Селекция капусты белокочанной на устойчивость к основным болезням и вредителям

Одной из основных причин, ведущих к потерям урожая, является поражение растений болезнями и вредителями.

В последние годы степень поражения болезнями усилилась вследствие

концентрации площадей под капустой, приспособительной способности патогенов к фону применяемых средств защиты растений, ослабления или нарушений приемов агротехники. Для защиты капусты белокочанной от болезней во время хранения нет фунгицидов, разрешенных к применению, поэтому основным фактором является устойчивость (Кашнова, 2009).

Одним из наиболее эффективных подходов к защите растений от болезней и вредителей является создание устойчивых к ним сортов.

Устойчивость растений – это комплексный показатель, который формируется сразу под влиянием нескольких факторов: физиологических и сортовых особенностей растений, погодных условий среды, применяемой агротехники, наличия болезней и вредителей (Маслова и др., 2013).

Особенностью селекции на иммунитет является то, что необходима постоянная работа по созданию новых сортов, так как устойчивость растений определяется взаимодействием генома растений с генофондом популяции патогенов. При изменении генофонда популяции вредных организмов устойчивость растений может преодолеваться. В отличие от других признак устойчивости сортов к болезням и вредителям не стабилен. В связи с этим селекцию и использование сортов нужно организовывать с учётом расового состава патогенов (Шаманин, Трущенко, 2006).

Наиболее распространенные и вредоносные болезни капусты белокочанной: кила (*Plasmodiophora brassicae* Wor.), сосудистый бактериоз (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*), фузариозное увядание (*Fusarium oxysporum* f. sp. *coglutinans*), альтернариоз (*Alternaria brassicae* Sacc.) и др. Они наносят значительный ущерб семеноводству, способствуют снижению урожая до 25% и снижают качество кочанов. Успех в селекционной работе в данном направлении определяется наличием доноров устойчивости к болезням.

Кила крестоцветных, вызываемая облигатным грибным паразитом *Plasmodiophora brassicae* Wor., широко распространена в мире и является одной из наиболее вредоносных болезней этого семейства. Поражения *Plasmodiophora*

*brassicae* приводят к снижению урожая капусты белокочанной на 10-60 % и более (Donald et al., 2006). В России *Plasmodiophora brassicae* распространена от Архангельской области до Закавказья, она захватывает Нечерноземный округ, Центрально-черноземный округ и Дальний Восток, включая Сахалин и Якутию. По данным Монахоса и Джалилова (2009) в Северо-западных районах России ежегодно поражается килой до 50 – 75% от общего количества выращенных растений капусты белокочанной. Сложность борьбы с килой заключается в том, что агрохимические меры, такие как известкование почвы и внесение борных удобрений, ослабляют развитие болезни, но не предотвращают ее. В связи с этим, основной борьбой с данным заболеванием является селекция и возделывание устойчивых сортов (Crute et al., 1983). Однако селекционная работа затруднена тем, что возбудитель образует физиологические расы, находящиеся в почве в виде смесей, что обуславливает его большую генетическую вариабельность (Монахос, 1998).

Сосудистый бактериоз – вредоносное заболевание капустных культур, которое распространено в течение всего периода вегетации растения. Возбудителем сосудистого бактериоза является бактерия *Xanthomonas campestris*. Пораженные растения отстают в росте, листья желтеют. Характерными признаками заболевания являются темно-окрашенные сосуды листьев, черешков и кочерыг, что хорошо видно на поперечном срезе. Основной путь заражения – это гидатоды (водяные поры). Бактерии при высокой влажности и механических повреждениях распространяются по сосудам растения, проникая в листья и кочерыгу (Ахатов и др., 2013).

В Центральной зоне Российской Федерации (Московская область) поражение растений достигает в эпифитотийные годы 90-100% (при развитии болезни 40-47%). В Черноземной зоне (Воронежская область) отмечают 15-53% больных растений у сортов раннего созревания и 6-8% - у сортов среднего и позднего созревания. В Западно-Сибирской зоне (Алтайский край, Омская область и др.) поражение растений нередко превышает 10-25% в зависимости от

выращиваемых сортов (Джалилов, 1989).

Высокоустойчивых сортов и гибридов капусты к возбудителю сосудистого бактериоза нет вследствие отсутствия природных источников устойчивости у *Brassica oleracea* и сложности передачи ее отдаленной гибридизацией из близкородственных видов *B. carinata* и *B. juncea* (Монахос, Елышко, 2015).

Фузариозное увядание, возбудителем которого является почвенный несовершенный гриб *Fusarium oxysporum*, имеет широкое распространение среди заболеваний капустных культур. На капусте заболевание проявляется в виде сосудистого увядания растений, пожелтения листьев и потери ими тургора. Болезнь передается через почву, растительные остатки с посадочным материалом и семенами. Проявлению фузариоза способствуют нарушение водного режима, резкие колебания температуры, полив холодной водой, уплотненная почва. В результате таких стрессовых условий происходит ослабление растений и снижается их устойчивость к проникновению инфекции. Усилению фузариоза может способствовать предварительное заражение капусты другими почвенными микроорганизмами. Пораженные растения или не дают урожая, или качество его резко снижается (Дьяков, 1998; Маслова и др., 2013).

К мерам борьбы с фузариозным увяданием относится создание генетически устойчивых сортов и $F_1$ гибридов капустных культур (Лежнина, Круглова, 2011).

Альтернариоз – это заболевание распространено почти во всех зонах ее выращивания. Поражаются молодые, взрослые растения и семенники. Возбудители — грибы *Alternaria brassicae* Sacc. и A. *brassicicola* Wilts. Наиболее типичные симптомы альтернариоза проявляются у взрослых растений кочанной капусты в виде темных зональных пятен диаметром до 1 см и более. Основными мерами борьбы с альтернариозом являются межвидовые и межродовые гибридизации, а также возделывание устойчивых генотипов

(Ганнибал и др., 2011).

Для создания устойчивых сортов и гибридов культур *Brassica oleracea* в мире проведено много работ по поиску источников устойчивости внутри вида. Однако большинство из них легко преодолевается патогеном в полевых условиях (Crute et al., 1980; Dixon, Robinson, 1986).

## 1.7. Биотехнологические методы создания линий удвоенных гаплоидов для селекции F1 гибридов

### 1.7.1. Получение и использование гаплоидов в селекционной работе

Гаплоидия (от греч. *haploos* – одиночный, простой и *eidos* – вид) — явление, заключающееся в кратном уменьшении числа хромосом по сравнению с материнской особью.

Гаплоидия — одно из важнейших прикладных направлений генетики и селекции. Путем удвоения числа хромосом у гаплоидов можно сразу создать гомозиготные линии, на выделение которых при селекции на гетерозис у перекрёстноопыляющихся культур приходится затрачивать до 7-10 лет (однолетние растения) и/или 14-20 лет (двулетние растения) (Поляков, 2000).

Явление гаплоидии было открыто в 1922 году. Первое гаплоидное растение экспериментально получено у дурмана (*Datura stramonium*) (Blakeslee et al., 1922). Это открытие вызвало большой интерес, и вскоре стало появляться большое количество новых исследований в этом направлении. Уже к середине 30-х годов были получены и изучены десятки гаплоидов у различных видов растений (Навашин, 1934; Хаджинов, Пашинин , 1935).

Впервые на перспективность применения гаплоидов для решения селекционных задач указал Карпеченко (1935). Поскольку в гаметах желательное сочетание генов бывает чаще, чем в зиготах, то проще и быстрее получить гомозиготную форму с нужным сочетанием признаков путём прямого удвоения хромосом у гаплоидов. Например, для получения всех возможных типов гомозиготных линий на основе перекомбинации семи пар независимых генов необходимо перевести на диплоидный уровень только 128 гамет гибридов

$F_1$ ($2^7$). На диплоидном уровне для достижения такого же результата потребуется уже не менее 16384 растений $F_2$ ($4^7$). То есть эффективность комбинационной селекции во много раз возрастает при разработке способа массового выделения гаплоидов для последующего перевода их на диплоидный уровень (Шаманин, Трущенко, 2006).

Первые успешные исследования по культуре микроспор капустных культур проведены в начале 80-х годов (Lichter, 1982). Позднее был разработан базовый протокол культуры микроспор рапса, который служит основой DH-технологии для растений рода *Brassica* L. (Pechan, Keller, 1988). Затем культуру микроспор стали применять для различных разновидностей капусты (Lichter, 1989; Takahata, Keller, 1991; Duijs et al., 1992; Cao et al., 1994; Zhang et al., 2008; Winarto, Teixeira da Silva, 2011; Yuan et al., 2012).

Для экспериментального получения гаплоидных растений используют следующие методы: 1) культивирование пыльников, микроспор или неопылённых семяпочек в стерильных условиях на питательной среде; 2) отбор близнецов; 3) межвидовые скрещивания; 4) радиологический метод; 5) гибридизация на разных уровнях плоидности.

Наиболее перспективными методами являются культивирование пыльников и пыльцы (микроспор) в стерильных условиях *in vitro*. (Шаманин, Трущенко, 2006).

Использование удвоенных гаплоидных линий позволяет проводить более эффективно отбор желательных генотипов из сравнительно небольших популяций по сравнению с традиционной технологией выделения самоопыленных генотипов (Lazar, 1984). Кроме того, поскольку у гаплоидов отсутствует явление доминантности, их можно успешно использовать в мутационной селекции. Гаплоиды можно также использовать для передачи генов от полиплоидных видов диплоидным, при решении теоретических вопросов, связанных с происхождением видов, созданием серий моносомиков (Ницше, Венцель, 1980).

Различные DH-технологии получения гаплоидных растений, в том числе капусты, становятся особо востребованными и актуальными на сегодняшний день. Использование культуры микроспор позволяет в разы сократить затраты времени на получение гомозиготных генетически стабильных линий (чистые линии по морфологическим и хозяйственным признакам), которые в дальнейшем используются в качестве исходного материала на гетерозис в селекционной работе. Это, в свою очередь позволяет сократить время при создании новых гибридов капусты (Dias, Martins, 1999).

### 1.7.2. Факторы, влияющие на образование эмбриоидов

Несмотря на успехи биотехнологии в этой области, универсальной технологии получения удвоенных гаплоидов у различных растений рода *Brassica* не существует, так как на процессы получения DH-растений влияют многочисленные факторы: условия выращивания донорных растений, их генотип, стадия развития микроспор, тип предобработки бутонов и микроспор, состав питательных сред, условия культивирования. При этом оптимальное значение перечисленных факторов является необходимым условием для эмбриогенеза.

Универсальных протоколов культуры изолированных микроспор для всех видов не существует и в силу межвидовых и внутривидовых (генотип-зависимых) различий в отзывчивости к андрогенезу. При проведении первоначального скрининга видов на отзывчивость к андрогенезу, в основном, используют базовые протоколы, разработанные для растений рода *Brassica* (рапс сорта Топаз). Основные шаги таких протоколов остаются неизменными. Они включают выращивание растений-доноров, отбор бутонов, выделение микроспор, культивирование микроспор и индуцирование эмбриогенеза, регенерацию растений, удвоение хромосом. Тем не менее, в каждом конкретном случае необходима разработка индивидуальных протоколов культуры изолированных микроспор для каждого конкретного вида, сорта, генотипа, растения (Шмыкова и др., 2015).

Процесс регенерации в культуре *in vitro* может протекать по двум направлениям: органогенез и соматический эмбриогенез. Эмбриогенез микроспоры является наиболее мощным андрогенным путем для получения гаплоидных и удвоенных гаплоидных растений. Соматический или неполовой эмбриогенез — образование биполярных зародышеподобных структур из соматических клеток. Такие зародыши в дальнейшем развиваются в регенеранты через стадии аналогичные зиготе. Образование соматических зародышей в культуре *in vitro* может проходить прямым или непрямым путем. В первом случае эмбриоид образуется из клеток экспланта, минуя стадию каллуса (Муромцев и др., 1990).

Эффективность андрогенеза  в значительной степени зависит от стадии развития микроспор в момент введения в культуру *in vitro*. У растений рода *Brassica* отзывчивыми считаются микроспоры на поздней стадии развития и ранние двухклеточные пыльцевые зерна (Pechan, Keller, 1988; Huang et al., 1990).

Развивающиеся микроспоры высших растений обладают способностью переключать свою стандартную гаметофитную программу развития на спорофитный путь при определенных обстоятельствах. Характерным признаком изменения способа развития поздних одноядерных микроспор с гаметофитного на спорофитный является первый симметричный митоз клеток, а не асимметричный (Brooks, Shaw, 1978).

Исследование изменений структуры цитоскелета в процессе инициации эмбриогенеза показало, что в поздних микроспорах, характеризующихся присутствием крупной вакуоли и латерально расположенного ядра, к симметричному делению клеток ведут два пути (Zaki, Dikinson, 1990). В первом случае в течение первых 12 часов культивирования при 32°С микроспор, находящихся на поздней стадии развития, ядро клетки сохраняет свое маргинальное положение, но при этом меняется плоскость деления, что приводит к симметричному делению клеток и, соответственно, эмбриогенному

развитию. Во втором случае митоз инициируется тогда, когда ядро смещается от оболочки к центру микроспоры (Zaki, Dikinson, 1990; Hause et al., 1993). По мнению исследователей, центральная вакуоль и микротрубочки удерживают ядро в ацентричном положении вблизи клеточной мембраны. Исчезновение центральной вакуоли, нарушение образования микротрубочек, инициируемое высокой температурой, являются причиной миграции ядра к центру микроспоры. Таким образом, вследствие митоза образуются две равноценные клетки, что также приводит к эмбриогенному развитию. Возможен также и третий тип развития эмбриоидов, который инициируется в раннем двухклеточном пыльцевом зерне (Hause et al., 1993). В этом случае после 24 часов культивирования происходит деление вегетативной клетки, что не наблюдается в случае гаметофитного пути развития. При этом генеративная клетка оказывается блокированной возле интины и, как правило, не вступает в митоз (Binarova et al., 1993). Таким образом, успех индукции эмбриогенеза зависит от правильной оценки состояния развития мужского гаметофита донорного растения (Шмыкова и др., 2015).

Как показывают результаты многочисленных исследований ряда культур, для обеспечения перехода пыльцы на спорофитный путь развития и успешного получения андрогенетических растений-регенерантов, более важными являются эндогенные и экзогенные факторы растений, которые определяют их андрогенетическую способность. В зависимости от генотипа и условий выращивания растений формируются пыльцевые зерна определенного типа, отличные от нормальных, которые способны в дальнейшем реализовывать свой эмбриогенный потенциал (Heberle-Bors,1983; 1985).

На ранних этапах исследований по андрогенезу *in vitro* было отмечено, что одним из наиболее важных факторов, влияющих на успешную индукцию гаплоидов, является генотип растения. Различия по отзывчивости в культуре пыльников/микроспор *in vitro* наблюдались у различных видов и сортов растений. Генотипическая зависимость андрогенеза описана у всех видов

*Brassica*, у которых применяли технологию культуры пыльников или микроспор (Dunwell et al., 1985; Arnison et al., 1990; Takahata, 1991; Baillie et al., 1992; Burnett et al., 1994). Даже в пределах одного сорта возможно существенное варьирование отношения к культуре микроспор от растения к растению (Ferrie et al., 2005).

Результаты исследований на пшенице показали, что способность к андрогенезу *in vitro* контролируется не цитоплазмой, а ядерным геномом, хотя не исключено и влияние ядерно-цитоплазматического взаимодействия. Также было показано, что высокая андрогенная способность пыльников одного из родителей передается $F_1$ гибриду (Bullock, 1982).

Выявление и картирование областей на хромосомах, которые являются эволюционно важными в поддержании и обеспечении совместимости генов, контролирующих андрогенез, поможет выбрать отзывчивые к андрогенезу генотипы. Как только предполагаемые гены будут идентифицированы, ДНК и белок секвенированы, экспрессия генов в андрогенных и не андрогенных видах детализирована, можно будет определить функцию этих генов в пыльце (Шмыкова, 2006).

Для селекционеров важно отсутствие неконтролируемого отбора в андрогенезе, сужающего генотипическое варьирование получаемых в культуре микроспор популяций. В тоже время возможность селекционера контролировать отбор эмбриоидов *in vitro* стала бы дополнительным инструментом для отбора желаемых генотипов (Hormaza, Herrero, 1992).

В первоначальном протоколе культивирования микроспор капустных культур экзогенные регуляторы роста не применялись. Однако в ряде случаев использование в низких концентрациях $N^6$-бензиламинопурина (БАП) и α-нафтилуксусной кислоты (НУК) повышало результативность технологии получения эмбриоидов в культуре микроспор (Шмыкова и др., 2015). В работе Калашниковой с соавторами (2011) было показано положительное действие кинетина и НУК на процесс прямого эмбриогенеза в культуре микроспор рапса.

Одним из важных факторов, влияющих на успех работы с культурой пыльников, является pH питательной среды. Оптимальное значение pH для большинства растительных тканей лежит в пределах от 5,0-5,5 (Бутенко, 1999). Если показатель pH в среде ниже 5,5-5,8 или выше, то это снижает выход эмбриоидов у брокколи (Arnison, 1990). В некоторых исследованиях было показано, что относительно высокое значение pH питательной среды (6,2–6,4) более эффективно для индукции эмбриогенеза из микроспор у большинства генотипов капусты белокочанной по сравнению с pH 5,8 (Yuan et al., 2012). Наилучший результат в этом исследовании был получен при использовании питательной среды NLN 13 (pH 6,4), дополненной 10 мг арабиногалактонового белка и 3 μM 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (MES) в качестве буфера. Эффективность эмбриогенеза при этом возросла с 4,5 до 22,9 эмбриоидов/бутон. Требование к более высоким значениям pH среды, по-видимому, объясняется физиологическими особенностями пыльцы капустных культур, которая способна прорастать на искусственных питательных средах при значениях pH 8–9 в зависимости от сортообразца (Бунин и др., 2003; 2004).

Эндогенное микробное загрязнение уже давно рассматривается в качестве главной проблемы в индукции андрогенеза. В культуре изолированных микроспор, эндогенное бактериальное загрязнение инокулятов приводит к значительным потерям в ряде изолированных культур (Supena et al., 2006). Источники загрязнения в культуре *in vitro* могут возникнуть из зараженных растений-доноров, в процессе манипуляций в вытяжке ламинарного потока и недостаточных септических условиях (Shen et al., 2010). Для защиты от нежелательных микробных инфекций при культивировании широко используются антибиотики (Lantos et al., 2009). Для получения стерильных культур тканей известен способ введения в питательную среду антибиотиков (Бутенко, 1984). Цефотаксим и карбенициллин были показаны как наиболее эффективные для стерилизации и бактериостаза (Okkel, Pederson, 1988; Lin et al., 1995).

Кроме контроля роста большинства бактериальных загрязнений, некоторые антибиотики могут оказывать индуцирующее влияние на регенерацию микроспор. Так в работе по изучению цефотаксима и карбенициллина на регенерацию каллусов пшеницы было показано 55%-ное увеличение регенерации зеленых растений пшеницы на среде с добавлением 100 мг/л цефотаксима (Yu et al., 2008). Аналогично, Греуол с соавторами отметили увеличение скорости соматического эмбриогенеза риса при использовании цефотаксима (Grewal et al., 2006). Симмонд и Грейнджер изучали токсичность семи антибиотиков (гигромицина, генетицина, беканамицина, канамицина, спектиномицина, цефотаксима и ванкомицина) относительно культуры протопластов пшеницы. Ванкомицин способствовал делению клеток и повышению эффективности покрытия протопластов в два раза. Они также сообщили, что ванкомицин, цефотаксим и спектиномицин были менее токсичными, а генетицин, гигромицин, канамицин и беканамицин были очень фитотоксичны для клеток пшеницы (Simmonds, Grainger, 1993). Супена с соавторами также отмечали положительный эффект комбинации антибиотиков (тиментина и рифампицина в концентрации 200 и 10 мг/л, соответственно) для получения DH-растений перца острого (*Capsicum annuum* L.) в Индонезии через культуру микроспор (Supena et al., 2006).

В исследованиях Мэна с соавторами изучена эффективность канамицина, ампициллина, цефотаксима и карбенициллина на регенерацию китайской капусты в культуре *in vitro* и показана их избирательная основа для культуры и для дальнейшего усовершенствования частоты регенерации. Эти антибиотики мало влияют на индукцию каллуса, но влияют на развитие побега и корня с дифференциацией различной степени. Даже очень низкие концентрации канамицина ингибируют повторную дифференцировку побега и корня от каллуса. Также обнаружено, что цефотаксим ингибирует повторное дифференцирование при относительно низкой концентрации и задержку морфогенеза органов. Влияние карбенициллина на дифференциацию бутонов,

побегов или корней не было обнаружено. Ампициллин стимулировал дифференциацию корня и побега в концентрации до 1000 мг/л. Более высокие концентрации ампициллина способствовали большей стимуляции дифференциации побегов. При этом в концентрации 1000 мг/л частота дифференциации побега достигла 93,3 % по сравнению с контролем 73,6 % без добавления антибиотиков (Meng et al., 2014).

### 1.7.3. Плоидность получаемых растений-регенерантов

Общая особенность DH-технологий заключается в том, что получаемые *in vitro* растения обладают разным уровнем плоидности и наряду с удвоенными гаплоидами встречаются гаплоидные, тетраплоидные и миксоплоидные формы (Smykalova et al., 2006). Определение плоидности растений-регенерантов относится к обязательным элементам технологии получения удвоенных гаплоидов (Hamaoka et al, 1991; Murovec, Bohanec, 2012).

Существуют различные методы определения плоидности растений, которые можно разделить на две большие группы: прямые и косвенные методы (Sari et al., 1999). В первом случае непосредственно подсчитывают количество хромосом на метафазных пластинках (Ницше, Венцель, 1980; Паушева, 1988) или определяют количество ДНК в клетках на соответствующем оборудовании (Bohanec, 2003; Claveria et al., 2005), а во втором – используют различные характеристики клеток, тканей и растений в целом, тесно коррелирующие с плоидностью растительного организма. К таковым относят количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и в клетках основных тканей (Qin, Rotino, 1995; Давыдова, 2008), размер клеток тканей, а также их количество на единицу площади (Котлярова, 2010; Сорока, 2013), морфологию цветка и целого растения (Муравлев, Кривошеева, 1999; Малецкая и др., 2009), размер семян и зародышей (Bouvier et al., 1992; Kita et al., 2001), флотацию в растворе соляной кислоты или в культуральной среде (Aalders, 1958; Lotfi, Salehi, 2008).

В процессе вторичного эмбриогенеза и регенерации растений в системе *in vitro* происходит смена плоидности от *n* до *2n*. При прямом и непрямом (через

каллус) андрогенезе из микроспор образуются андрогенные структуры различной плоидности, из которых развиваются растения-регенеранты, также в свою очередь различающиеся числом хромосом. С практической генетико-селекционной точки зрения необходимо получение гомозиготных удвоенных гаплоидов, так как у гаплоидных растений мейоз нарушен в связи с отсутствием гомологичных хромосом, что приводит к формированию нежизнеспособных гамет, и такие растения являются стерильными. Для того чтобы получить фертильные гомозиготные удвоенные гаплоиды, необходимо удвоить число хромосом гаплоидных растений. Известно несколько возможных способов получения удвоенных гаплоидных растений:

*1. Спонтанное удвоение числа хромосом***.** Эффективность этого метода зависит от вида растения и путей формирования андрогенных структур. Гаплоидные клетки в культуре *in vitro* являются нестабильными и имеют тенденцию к эндомитозу (удвоение хромосом без деления ядер) и формированию диплоидных клеток. Это свойство клеточных культур было использовано для получения гомозиготных растений табака (Nitsch, 1969). Возникающие в результате спонтанного удвоения числа хромосом диплоидные растения являются гомозиготными и могут непосредственно использоваться в селекционных программах (Резникова, 1984).

*2. Обработка растений колхицином* является традиционным методом получения полиплоидных форм растений. Имеются разные способы колхицирования. Получить удвоенные гаплоиды можно путём добавления колхицина в среду для культивирования пыльников. Этот метод был использован при получении гомозиготных диплоидных линий ячменя. С использованием различных способов колхицирования удвоенные гаплоиды были получены и у гибридов капусты кочанной. Используя колхицин для получения удвоенных гаплоидов, следует учитывать, что у некоторых видов растений он может приводить к различным, нежелательным хромосомным нарушениям (Dore, Boulidard, 1988).

Давно известный классический прямой метод подсчета числа хромосом в

клетках меристематической ткани корешка или в делящихся клетках молодых бутонов является наиболее точным в определении уровня плоидности растений (Sari et al., 1999; Qin et al., 1995). Однако этот метод очень сложен и длителен. Кроме того, его невозможно выполнить при большом количестве анализируемых растений, поэтому он остается лабораторным методом (Hamaoka et al., 1991).

Достаточно простой метод определения плоидности растений с минимальными материальными и временными затратами представляет собой подсчет числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (ЗКУ), который может быть применен для большого круга растений (Winarto et al., 2011).

Согласно литературным данным, растения *Brassica oleracea ssp.* имеют следующее число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц: гаплоиды – 6-9, диплоиды – 10-15 и тетраплоиды – 20-25 хлоропластов (Dias, 2003). В то время в другой работе установлено, что у гаплоидов капусты белокочанной это число достигает 8 – 12 шт., а у диплоидов до 18 – 22 шт. (Май, 2010). Также показано, что число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц существенно не варьирует в пределах одного растения между листьями разных стадий развития и между растениями, находящимися на одном уровне плоидности (Hamaoka et al., 1991).

У *Brassica oleracea* при исследовании популяции растений, полученных методом культуры микроспор, установлена высокая точность метода подсчета числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц для определения плоидности регенерантов – 93,93% (Yuan et al., 2009).

Длина замыкающих клеток устьиц (ЗКУ) является важным и достаточно объективным признаком для определения уровня плоидности различных видов растений при искусственной полиплоидизации. Известно, что размеры устьиц варьируют в зависимости от возраста листа и его положения на растении (Раджабли, Рудь, 1972). По общепринятой методике измерение длины ЗКУ проводят на листьях среднего яруса, в средней части листовой пластинки.

# 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

## 2.1. Материалы и методы исследований

### 2.1.1. Материалы исследований

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*.

### 2.1.2. Методы исследований

Выращивание растений

Донорные растения, выращенные в полевых условиях, отбирали в стадии технической спелости кочана по основным апробационным признакам. Затем отобранные маточники высаживали в вегетационные сосуды объемом 5 литров с питательной смесью, состоящей из двух частей дерновой земли, по одной части перегноя и торфа с добавлением нитроаммофоски (10 г на вегетационный сосуд) и доломитовой муки. Затем ставили маточники на яровизацию в холодильную камеру с температурой 4-6 $^0$С на 2 месяца. По окончании яровизации на этапе акклиматизации вегетационные сосуды с растениями устанавливали в вегетационную камеру для получения цветоноса. В течение 15-35 суток постепенно повышали температуру от + 8 $^0$С до 16-18 $^0$С при режиме 16 ч. - день/8 ч. – ночь и освещении – 9000 л. (Бондарева, 2014).

Определение стадии развития микроспор

При отборе бутонов растений капусты белокочанной в начале цветения проведено цитологическое исследование стадий развития микроспор. Для визуализации микроспор и пыльцы использована методика дифференциального окрашивания (Alexander, 1969) и микроскоп Axio Imager A2, с помощью которых определена зависимость между размером бутона и стадией развития

микроспор. Для этого с помощью препаровальных игл микроспоры выделяли из бутонов на предметное стекло, добавляли каплю красителя, накрывали покровным стеклом и обследовали при 200 и 400-кратном увеличении. Стадию развития определяли по форме микроспор. Суспензию микроспор готовили из бутонов различной длины: 3-5 мм, 4-5 мм и 5-6 мм.

Культура микроспор

В качестве питательных сред использовали модифицированные базовые среды (прил.1).

На начальной стадии цветения растений собирали бутоны и стерилизовали 30 секунд в 96%-ном этаноле, далее в течение 5 мин в 50%-ном водном растворе коммерческого препарата «Белизна» (Россия) с добавлением Tween20 (Panreac, Испания) 1 капля на 100 мл раствора с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде.

Стерильные бутоны размером 4-5 мм перемещали в среду Лихтера с половинным содержанием компонентов (½NLN), pH 5.8 (Lichter, 1982) с 13%-ным содержанием сахарозы (из расчета 30 бутонов на 6 мл среды) и измельчали. Полученную суспензию микроспор пропускали через нейлоновый фильтр с размером ячеек 40 мкм, а затем осаждали 5 мин на центрифуге Eppendorf 5804R (Германия) при 125g. Промывку микроспор проводили дважды в среде ½NLN.

Микроспоры после выделения и промывки помещали в чашки Петри диаметром 6 см (из расчета 5 бутонов на чашку) с 5 мл питательной среды, в которой они инкубировались в течение 2-х суток в темноте при 32°С. В состав питательной среды входили гормоны и антибиотики в соответствии со схемами опытов. Далее инкубацию проводили при 25°С в темноте до момента образования эмбриоидов. При достижении эмбриоидами стадии крупных глобул, сердцевидной или торпедовидной фазы их помещали в чашки Петри на среду Гамборга (B5) (Gamborg et al., 1968) с содержанием 0,5% глюкозы, 0,5% сахарозы и 3 г/л фитогеля. При образовании побегов и эмбриоидов их отделяли и переносили на среду ½MC (Murashige, Skoog, 1962) с 2%-ным содержанием

сахарозы и 3 г/л фитогеля. Культивирование проводили при 25°С, при фотопериоде 14 часов и освещенности 2500 лк на стеллажах с люминесцентными лампами.

Растения, у которых были нормально развиты листья и корневая система, переносили в вегетационные сосуды, заполненные смесью торфа и перлита (7:3). Для адаптации растений к условиям *in vivo* их накрывали перфорированными пластиковыми стаканчиками. Растения-регенеранты выращивали в тех же условиях, что и донорные растения (Шумилина и др., 2015).

Определение плоидности растений-регенерантов

Определение плоидности у растений-регенерантов проведено двумя методами. Первый - подсчёт количества хромосом в клетках меристематической ткани корешка методом «распластывания». Для этого у растений срезали кончики корней длиной 0,5-1 см и помещали в раствор α-бром- нафталина (1мкл на 10-15мл) и оставляли на 12 часов в холоде. Далее переносили корешки в фиксатор Кларка (3 части спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты) и оставляли на 1 час в холоде. Для приготовления ферментной смеси использовали 10 мл цитратного буфера (pH 4,5), 0,2 г целлюлазы, 0,2 г пектиназы 5S, 0,25 г мацерозиме, 0,1 г дрейзелазы. Корешки тщательно промывали в воде и перемещали в 0,3 мл ферментной смеси с добавлением 0,006 г целлюлазы и 2,7 мл цитратного буфера, закрывали крышкой и ставили на водяную баню (37°С) на 1 час. После размягчения корешков удаляли ферментную смесь для приостановки процесса и добавляли воду. При помощи иголок отрывали белый кончик корешка и переносили его на стекло с помощью пипетки. Добавляли каплю уксусной кислоты, немного ждали, а затем вносили свежеприготовленный фиксатор Кларка и оставляли препарат подсушиваться. Результаты оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа (Zeiss, Германия) с наборами фильтров для DAPI (Zeiss Filterset 1) (Пухальский и др., 2007).

Второй метод косвенного определения плоидности растений заключался в подсчете хлоропластов в замыкающих устьичных клетках и измерения длины устьичных клеток с помощью микроскопа Axio Imager A2 (Zeiss, Германия) с флуоресценцией (набор фильтров - BR 490 и 515). Для этого эпидермальный слой клеток снимали с нижней стороны листьев капусты белокочанной и промывали в дистиллированной воде, затем его помещали на предметное стекло в каплю воды, накрывали сверху покровным стеклом и просматривали под микроскопом. Не менее 20 пар устьичных клеток каждого растения были сфотографированы и проведен подсчет хлоропластов (Пухальский и др., 2007). Визуализацию, измерения и подсчеты проводили с использованием программного обеспечения AxioVision (Zeiss, Германия). Данные обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel 2003.

Определение фертильности растений

Фертильность растений устанавливали путем окрашивания пыльцевых зерен методом дифференциального окрашивания (Alexander, 1969). Пыльник отделяли от полностью раскрывшегося цветка и помещали в каплю красителя, препаровальными иглами вскрывали пыльник и добивались максимального выхода пыльцевых зёрен, после чего стенки пыльника удаляли с препарата и накрывали пыльцу в окрашивающем растворе покровным стеклом. Стерильная пыльца окрашивалась в зеленовато-голубой цвет, фертильная – от розового до интенсивно красного. Наблюдения проводили с помощью микроскопа Axio Imager A2 (Zeiss, Германия).

Подбор сред для проращивания пыльцы и определение ее жизнеспособности

Сбор пыльцы проводили с недавно раскрывшихся цветков капусты белокочанной сортопопуляции Зимовка 1474 в период массового цветения. Для определения жизнеспособности пыльцы на предметное стекло наносили пипеткой несколько капель питательной среды. Свежесобранную пыльцу при помощи пинцета равномерно распределяли на поверхности среды. В опыте

использовали четыре варианта сред: Т, Т+, 8, 8+ (табл. 1).

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

| 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 $6H_2O$, г | 36,2 | 36,2 | - | - |
| pH | от 8 до 9 | от 8 до 9 | 8 | 8 |
| Трис, мг | 10 | 10 | - | - |
| Экстракт из пестика, сорт Слава грибовская 231 | - | + | - | + |
| Вода, мл | 100 | 100 | 100 | 100 |

* Roberts I. N. et al, 1983.

**Бунин М.С. и др., 2003.

В двух вариантах сред (Т+ и 8+) использовали экстракт пестиков цветков капусты белокочанной сорта Слава грибовская 231. Выбор сорта для получения экстракта был обусловлен показанной ранее совместимостью сортов Слава грибовская 231 и Зимовка 1474 при перекрёстном опылении. Экстракт готовили путём растирания 1 пестика в 1 мл воды и последующим цетрифугированием с целью удаления осадка. К 20 мкл среды добавляли 1 мкл экстракта. Предметные стекла с пыльцой в питательной среде помещали в увлажненные чашки Петри и оставляли в термостате на 2 часа при t=22°С для проращивания. Далее к среде с проросшей пыльцой добавляли несколько капель дифференцирующего красителя и накрывали покровным стеклом. В каждом препарате анализировали не менее 10 полей зрения (увеличение 100х), подсчитывали общее количество пыльцевых зерен и число проросших. Проросшими считали пыльцевые зерна, трубки которых по длине превышали диаметр пыльцевого зерна. Жизнеспособность пыльцы определяли путем вычисления процента проросших пыльцевых зерен по отношению к общему количеству пыльцевых зерен (Бунин, 2003).

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, этикировали и изолировали.

Получение семенного потомства растений-регенерантов

Получение семенного потомства путем гибридизации растений-регенерантов после адаптации проводили в контролируемых условиях камеры искусственного климата в зимне-весенний период 2014-2017 гг. при режиме 20-22°С, 16 ч. - день/8 ч. – ночь, освещение – 9000 лк. Была использована схема создания самонесовместимых линий и получения 2-х линейных гибридов капусты белокочанной (Монахос, 2007).

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 линий удвоенных гаплоидов и гибридных комбинаций на их основе проводилась на основные хозяйственно ценные признаки в стадии технической спелости (масса и размеры кочана, диаметр розетки листьев, высота наружной и внутренней кочерыги) при сравнении со стандартами ($F_1$ Северянка и $F_1$ Галакси). Проведена визуальная оценка расположения нижних листьев розетки, окраски листьев, степени воскового налета, поверхности листовой пластинки, жилкования.

Анализ комбинационной способности родительских линий определяли в

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

Биохимические анализы проведены в лабораторно-аналитическом центре ФГБНУ ФНЦО по общепринятым методикам: содержание сухих веществ – методом высушивания до постоянной массы, нитратов – потенциометрическим методом, витамина С – йодометрическим методом (Сапожникова, Дорофеева, 1966).

Оценка устойчивости к основным болезням и вредителям

Оценка устойчивости к фузариозному увяданию, альтернариозу, а также поврежденность вредителями проведена визуально в полевых условиях на естественном фоне в стадии технической спелости кочана.

Оценка пораженности килой проведена на искусственном инфекционном фоне открытого грунта лаборатории иммунитета и защиты растений ФГБНУ ФНЦО (нагрузка $10^6$ спор КОЕ/см$^3$). Растения размещали рендомизированно в двухкратной повторности в количестве 10 шт. в каждом варианте. Оценку проводили в период уборки растений согласно методике. Для этого каждое растение выкапывали, отмывали и учитывали индивидуально пораженность корневой системы по 5-ти балльной шкале (Квасников, Белик, 1970; Квасников, Антонов, 1972; Маслова и др., 2013). Подсчитывали количество пораженных килой растений в каждом варианте, затем выводили средний балл и степень поражения.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Microsoft Excel 2010.

## 2.2. Условия проведения исследований

Полевые опыты проведены в 2014-2017 гг. в условиях Московской области Одинцовского района на базе ФГБНУ ФНЦО.

*Почвенные условия.*

Почвы центральной экспериментальной базы ФГБНУ ФНЦО дерново-подзолистые, тяжело- и средне суглинистого механического состава с предельной полевой влагоемкостью 38-45%. Содержание гумуса в них составляет 2,6-3,2% (по Тюрину). Реакция среды кислая и близкая к нейтральной от 4,5 до 6,2. Содержание подвижного фосфора 190 мг/кг почвы и калия в среднем 227 мг/кг почвы.

*Метеорологические условия.*

Климат данной местности умеренно-континентальный с относительно мягкой зимой, с редкими оттепелями и теплым влажным летом. Среднемесячная температура воздуха самого теплого месяца (июля) составляет 18,4°С. Самый холодный месяц в году – январь. Среднемесячная температура воздуха в январе составляет -10,2°С, в отдельные годы она понижается до -14°С. Продолжительность безморозного периода 156 дней. Сумма среднемесячных температур воздуха выше +10°С составляет 120 дней. Вегетация растений продолжается 160 дней. Область относится к зоне достаточного увлажнения. Годовая сумма осадков в среднем 550-650 мм с колебаниями в отдельные годы от 270 до 900 мм. За период активной вегетации выпадает 250-270 мм осадков. Благоприятные климатические условия позволяют успешно выращивать в открытом грунте такие овощные культуры как капуста, столовые корнеплоды, лук, редис, кабачок и др.

*Метеорологические условия 2014 года* в период высадки рассады в поле характеризовались повышенным количеством выпавших осадков в июне, что на 89,1 мм больше по сравнению со среднемноголетним значением (рис. 1). Среднемесячная температура в этот месяц была на 1,1°С ниже среднемноголетней. В этот период растения получили достаточно влаги для

приживаемости. В июле-сентябре количество выпавших осадков было меньше среднемноголетних значений. Среднемесячная температура воздуха в маеи в период вегетации превышала среднемноголетние значения. Среднесуточная относительная влажность в течение всего периода роста и развития растений находилась в пределах 61-76 % и была меньше среднемноголетней на 8-11%. Таким образом, условия года складывались относительно благоприятные для роста и развития капусты белокочанной.

Рис.1 Метеорологические данные за вегетационный период, 2014 год

*Метеорологические условия 2015 года* складывались достаточно благоприятные для роста и развития растений капусты белокочанной в период всего вегетационного периода (рис. 2). Количество выпавших осадков в мае превышало среднемноголетние значения на 51,9 мм, а температура воздуха на 1,6°С, что способствовало благоприятному росту и развитию рассады. В июне количество осадков резко снизилось, а температура воздуха при этом была выше среднемноголетней на 0,7°С, что неблагоприятно повлияло на приживаемость рассады в поле. Однако, в июле количество выпавших осадков превышало среднемноголетние на 35,7 мм, а температура воздуха снизилась. На август пришлось наименьшее количество выпавших осадков, их количество на

53,1 мм было меньше среднемноголетних. Температура воздуха находилось в пределах среднемноголетних значений. В сентябре значения показателей были выше среднемноголетних значений. Среднесуточная относительная влажность воздуха, как и в предыдущем году в течение всего периода вегетации находилась в пределах ниже среднемноголетней.

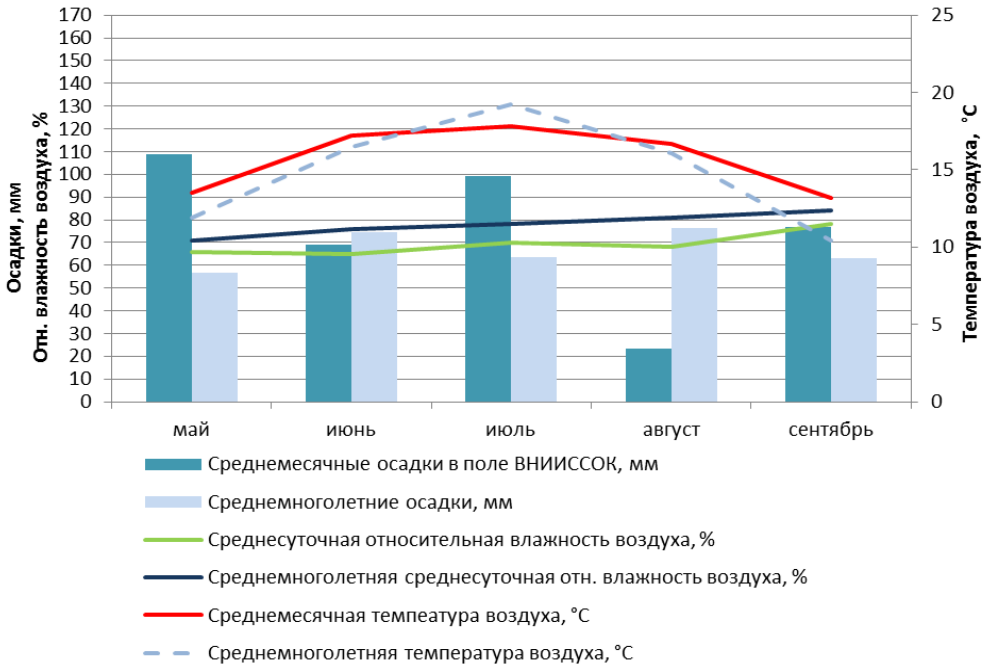



Рис.2 Метеорологические данные за вегетационный период, 2015 год

*Метеорологические условия 2016 года* складывались так, что весна оказалась недостаточно благоприятна для начального этапа роста и развития растений капусты белокочанной, но не критична (рис. 3). Среднемесячная температура в мае составляла 15,1°С, это выше среднемноголетней температуры воздуха на 3,2 °С. При этом осадков было недостаточно для приживаемости растений и их количество составило 50 мм, что на 6,8 мм меньше среднемноголетней. Относительная влажность воздуха также оказалась ниже среднемноголетней на 9 %. В июне осадков выпало на 5,4 мм больше среднемноголетнего значения, а в июле на 25,6 мм больше, при этом температура оставалась оптимальной, что способствовало благоприятному росту и развитию растений в этот период. В августе температура также оставалась оптимальной и составила 19,2°С, что на 3,1 °С выше

среднемноголетней, однако количество осадков выпало на уровне среднемноголетнего значения при невысокой влажности воздуха 63 %. В сентябре, в период массового нарастания листьев, температура воздуха оказалась выше среднемноголетней на 1,1 °С, осадков выпало на уровне среднемноголетнего значения – 62 мм. В целом погодные условия в 2016 году складывались достаточно благоприятные для роста и развития капусты белокочанной, за исключением начального этого во время высадки рассады. Недостаток влаги в этот период компенсировался поливом.

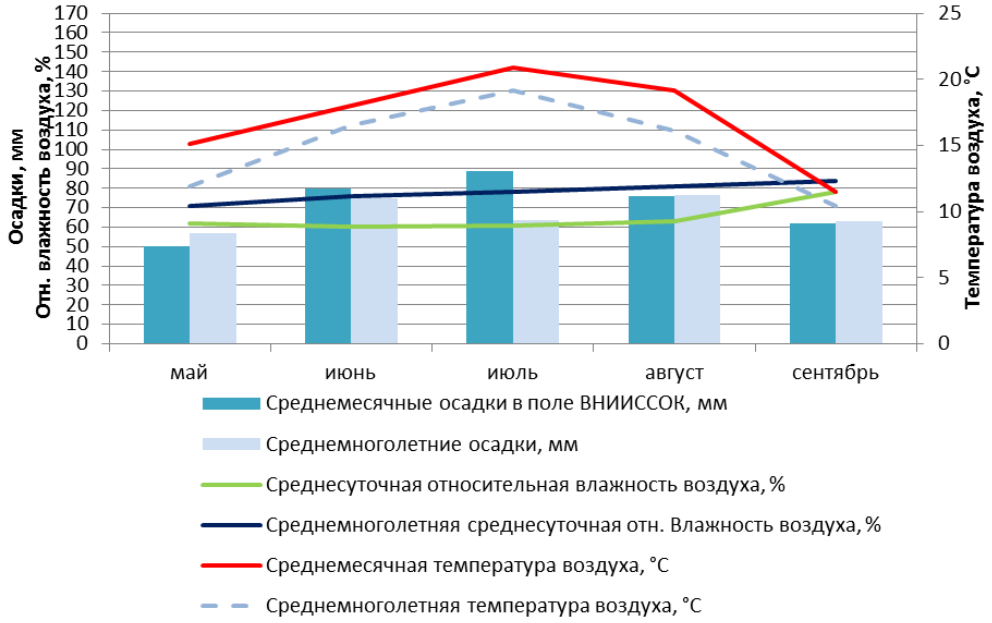



Рис.3 Метеорологические данные за вегетационный период, 2016 год

Анализируя метеорологические условия за 2014-2016 гг., можно сделать вывод о достаточно благоприятных условиях для роста и развития капусты белокочанной при условии компенсации недостатка осадков в засушливые месяцы поливом.

# 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

Одна из главных задач DH-технологий – получение как можно большего числа удвоенных гаплоидных растений, что позволяет наиболее полно охватить спектр генетических рекомбинантных форм, в том числе с рецессивными признаками (Шумилина и др., 2015). Это, тем самым, позволяет облегчить поиск редких генотипов для селекционных целей.

Эмбриогенная способность, как известно, зависит от множества факторов. Основными ключевыми моментами при работе с культурой микроспор *in vitro* являются условия выращивания донорных растений, их генотип, стадия развития микроспор, состав питательной среды (Шмыкова и др., 2015).

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 селекции ФГБНУ ФНЦО.

### 3.1.1. Влияние фазы развития микроспор на эффективность эмбриогенеза

В результате анализа фазы развития микроспор была составлена схема зависимости между стадией развития микроспоры и размером бутона капусты белокочанной (рис.4).

Таким образом, было выявлено, что в бутонах длиной от 4 до 6 мм содержатся микроспоры на поздней одноклеточной и ранней двухклеточной стадиях развития. По литературным данным именно эти стадии являются наиболее отзывчивыми в культуре микроспор капусты белокочанной (Pechan, Keller, 1988; Huang et al., 1990).

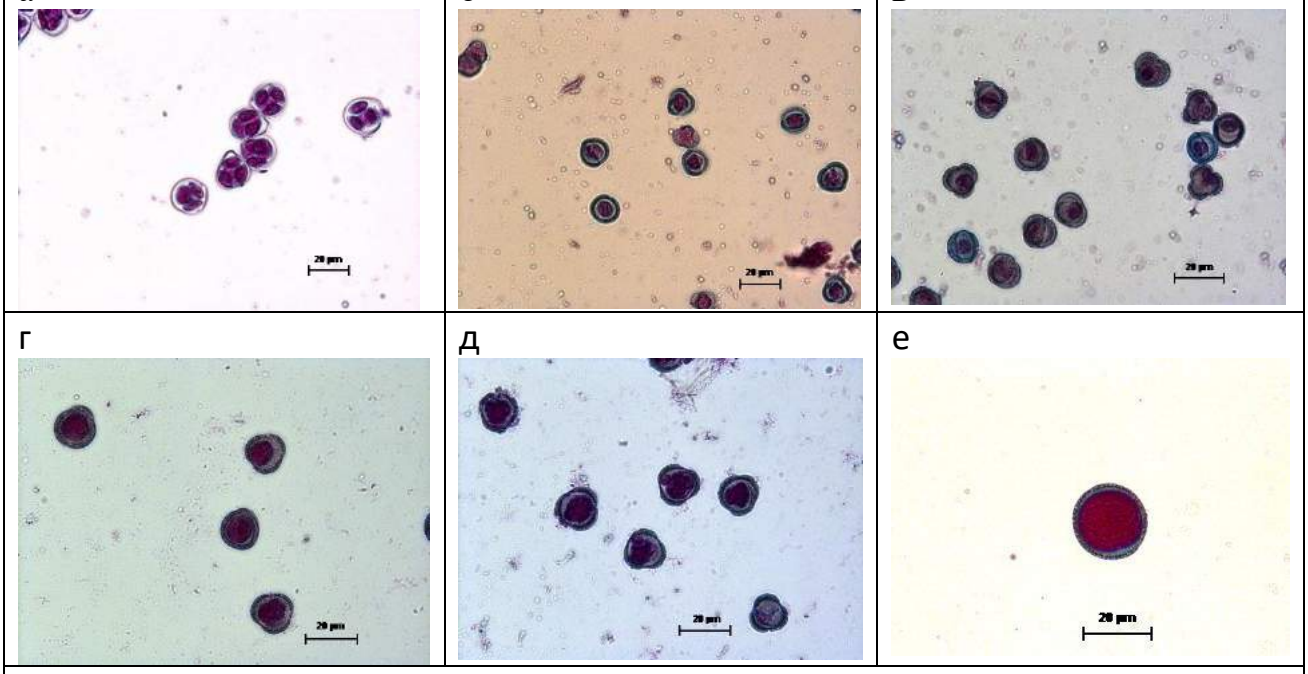



Рис 4 Зависимость между фазой развития пыльцы и длиной бутона капусты белокочанной, сортообразец №1 (а – тетрады (длина бутона 2 см), б - ранние одноклеточные микроспоры (длина бутона 3 см), в - одноклеточные микроспоры (длина бутона 4 см), г – поздние одноклеточные микроспоры (длина бутона 5 см), д – поздние одноклеточные и ранние двухклеточные микроспоры (длина бутона 6 см), е – зрелые пыльцевые зёрна (длина бутона 7-8 см)

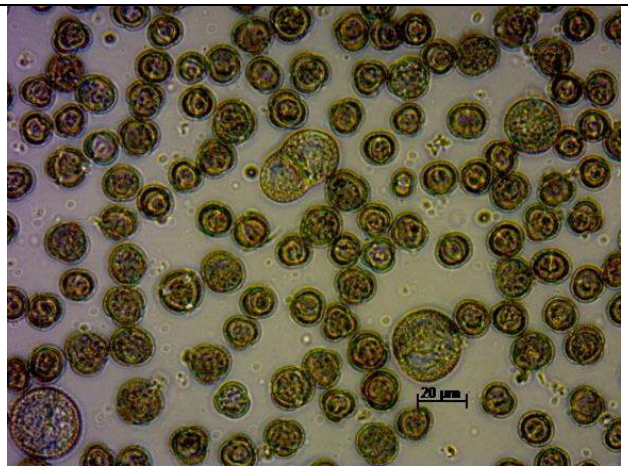
На следующем этапе исследования нами были проведены опыты, где в качестве исходного материала использовали бутоны различной длины, от 4 до 8 мм. В качестве опытного растения был выбран сортообразец №1, микроспоры инкубировали на среде 1/2 NLN с 13 % сахарозы, pH 6.0.

Было показано, что в вариантах, где микроспоры были изолированы из бутонов длиной 4 и 5 мм (табл. 2), происходило успешное развитие эмбриоидов (рис. 5), которые в дальнейшем развились в полноценные растения (рис. 6). Из микроспор на поздней стадии развития и пыльцевых зёрен регенерации эмбриоидов не происходило.

Определение зависимости между развитием микроспор и длиной бутона позволило в дальнейших опытах использовать микроспоры на наиболее восприимчивой стадии развития, проводя отбор бутонов по длине.

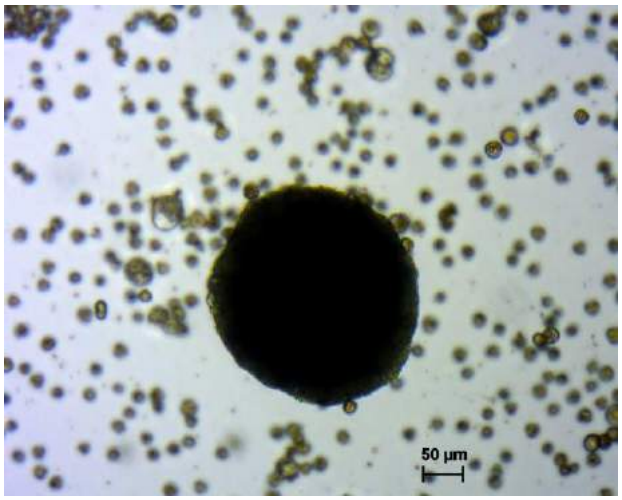
Таблица 2 – Влияние фазы развития микроспор на эффективность развития эмбриоидов и растений

| Размер бутона, мм | Количество эмбриоидов, шт./10 бутонов | | Количество растений-регенерантов, шт./10 бутонов |
|---|---|---|---|
| | Сумма | В том числе ненормальных | |
| 4 | 8±3,6 | 2±1,2 | 6±1,6 |
| 5 | 23±12,6 | 10±5,7 | 12±5,8 |
| 6 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 0 | 0 |

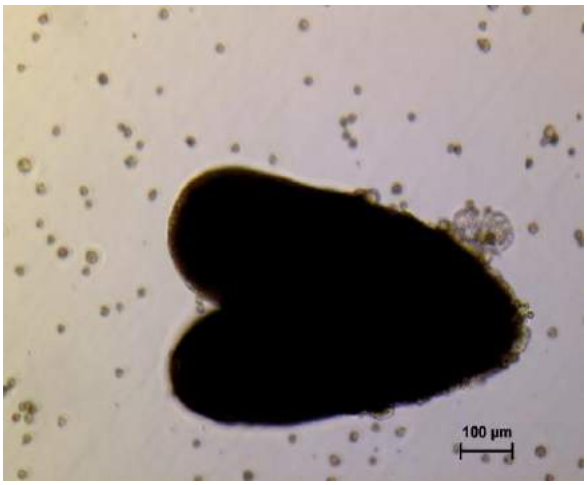



Первые деления (3 суток)

Развитие эмбриоидов (10 суток)

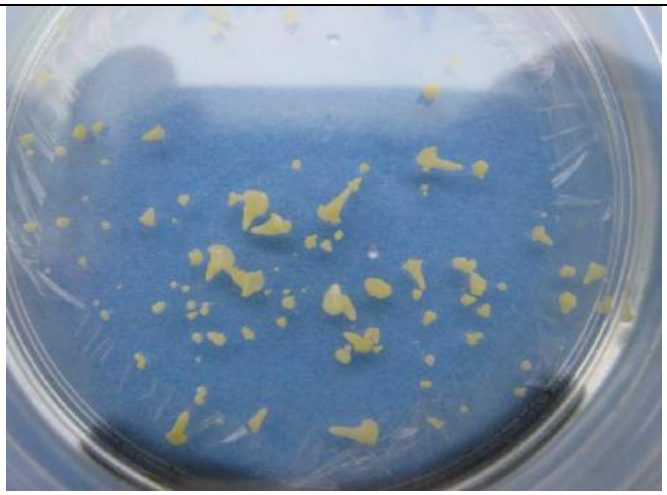



Эмбриоид на глобулярной стадии (14 суток)




Эмбриоид на сердцевидной стадии (25 суток)

Рис.5 Развитие эмбриоидов капусты белокочанной из микроспор



Эмбриоиды в чашке Петри на жидкой питательной среде (½NLN) после 1 месяца культивирования

Развитие побегов после переноса эмбриоидов на твёрдую питательную среду

Укоренение побегов на среде ½ МС

Адаптация растений-регенерантов к условиям *in vivo*

Рис.6 Развитие растений-регенерантов капусты белокочанной из эмбриоидов

### 3.1.2. Влияние кислотности питательной среды на образование эмбриоидов

Согласно литературным данным, оптимальное значение pH питательной среды для культивирования растений *in vitro* находится в пределах 5,0-5,8 (Arnison, 1990; Бутенко, 1999). В более поздних исследованиях показана эффективность индукции эмбриогенеза капусты белокочанной при повышении значений pH до 6,2-6,4 (Бунин и др., 2003).

В нашем исследовании были использованы среды со значениями pH 5,8;

6,2 и 6,6 (табл. 3).

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

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

| Кислотность питательной среды | Число эмбриоидов шт./ 100 бут. для различных генотипов капусты белокочанной | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Генотип 22-2 | Генотип3 0-1 | Генотип 116-2 | Генотип1 16-1 | Генотип14 5-1 |
| 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 |

Наиболее оптимальной для большинства генотипов оказалась среда с pH 5,8. Для генотипа 22-2 эмбриогенная способность наблюдалась как при кислотности 5,8, так и при 6,6. Разная реакция сортотипов капусты белокочанной на кислотность питательной среды свидетельствует о необходимости проведения подбора параметров инкубирования для каждого генотипа индивидуально.

В дальнейшей серии экспериментов по оптимизации состава питательной среды для наибольшего выхода эмбриоидов учитывали отзывчивость генотипа на соответствующую кислотность.

### 3.1.3. Влияние антибиотиков в питательной среде на образование эмбриоидов

Согласно методическим рекомендациям, традиционно для стерилизации растительных эксплантов используют антибиотик цефотаксим (Okkel, Pederson, 1988; Simmonds, Grainger, 1993; Lin et al, 1995; Grewal et al., 2006; Yu, Wei, 2008). В исследованиях Мэна с соавторами показано положительное влияние ампициллина на соматический эмбриогенез капусты (Meng et al., 2014). Следовательно, возможность применения того или иного антибиотика во многом зависит от используемой культуры в опыте.

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/мл. В качестве контроля использовали среду без антибиотиков (Б/А) (табл. 4).

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

| Питательная среда | Число эмбриоидов шт./ 100 бут. | | |
|---|---|---|---|
| | Генотип 145-1 | Генотип 116-2 | Генотип Сл-1 |
| pH 5,8Б/А | - | 40,0±11,0 | - |
| pH 5,8 Amp | - | 100±25,3 | - |
| pH 5,8 Cf | - | 46,7±9,1 | - |
| pH 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 |

В результате проведённой серии экспериментов на 3-х генотипах капусты белокочанной было показано, что антибиотики в составе питательной среды оказывают положительный эффект на развитие эмбриоидов. 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 эмбриоидов не образовалось, что возможно связано с ингибирующим действием эндогенного микробного загрязнения.

Следовательно, использование антибиотиков в среде способствует не только угнетению роста инфекции, но и большему образованию эмбриоидов. При этом использование в среде ампициллина увеличивает выход эмбриоидов в некоторых генотипах более чем в 2 раза по сравнению с цефотаксимом.

### 3.1.4. Влияние гормонов в составе питательной среды на эмбриогенную активность

Одним из важнейших факторов, оказывающих положительное влияние на индукцию эмбриогенеза, является наличие в составе питательной среды регуляторов роста в различных комбинациях (Thorpe et al., 2008).

В работах ряда авторов отмечено положительное влияние на морфогенез капусты белокочанной использование в различных соотношениях в питательной среде цитокининов и ауксинов (Lazzeri, Dunwell, 1984; Klimaszewska, Keller, 1986). Однако, другие авторы утверждают о снижении эффективности при добавлении ауксинов и рекомендуют использовать только цитокинины (Singh, Gupta, 1985).

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) (табл. 5). В опыте использовали 3 генотипа капусты белокочанной, ранее не отозвавшихся на безгормональной среде.

Таблица 5 – 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. | | |
|---|---|---|---|
| | 173-1 | 142-2 | Сл-2 |
| pH 6,2Б/Г | 0 | 0 | 0 |
| pH 6,2 KIN2мг/л | 40,0±10,6 | 0 | 33,3±8,5 |
| pH 6,2KIN2мг/л +IAA 0,2 мг/л | 100,0±21,3 | 0 | 0 |
| pH 6,2 ZEA1 мг/л | 466,7±153,2 | 120,0±28,5 | 0 |
| 6,2ZEA1 мг/л +IAA 0,1 мг/л | 0 | 0 | 0 |

В результате проведенного исследования нами было выявлено, что изучаемые генотипы капусты белокочанной оказались гормонозависимыми, при этом на безгормональной среде эмбриоидов не образовывалось. Так, у генотипа 142-2 эмбриогенная активность отмечена только на среде с зеатином, а у генотипа Сл-2 – только с кинетином. Однако генотип 173-1 оказался отзывчивым на все используемые цитокинины, причем при использовании кинетина в сочетании с IAA выход эмбриоидов оказался больше, нежели при использовании только кинетина. 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 генотипическую зависимость отзывчивости культуры методом изолированных микроспор *in vitro* от состава питательной среды, что подтверждает данные ранних исследований (Baillie et al., 1992; Burnett et al., 1992).

## 3.2. Определение плоидности растений-регенерантов капусты белокочанной, полученных в культуре изолированных микроспор *in vitro*

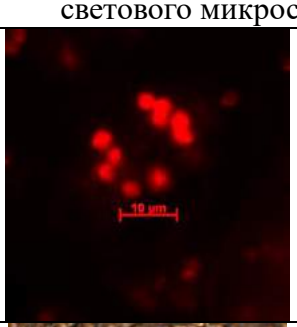
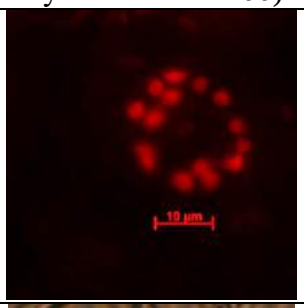
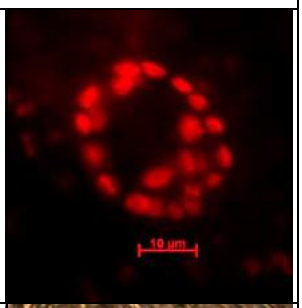
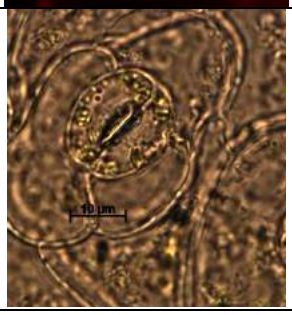
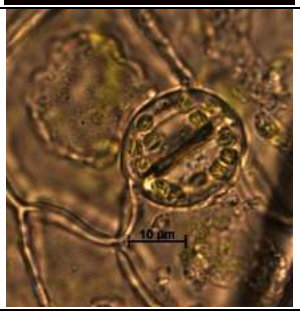
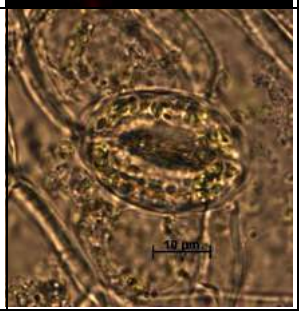
Общая особенность технологии получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор заключается в том, что получаемые *in vitro* растения обладают разным уровнем плоидности и наряду с удвоенными гаплоидами встречаются гаплоиды, тетраплоиды и миксоплоиды (Монахос и др., 2014). Поэтому обязательным этапом в работе данным методом является определение плоидности полученных растений-регенерантов.

Доказано, что у растений число хлоропластов коррелирует с числом хромосом, т.е. у диплоидных растений число хлоропластов примерно вдвое меньше, чем у гаплоидных. Согласно литературным данным, растения *B. oleracea ssp.* имеют следующее число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц: гаплоиды – 6-9, диплоиды – 10-15 и тетраплоиды – 20-25 хлоропластов (Dias et al., 2003).

В нашей работе растения оценивались на число хромосом, число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и на длину этих клеток (табл. 6). В результате анализа между средними значениями данных показателей была выявлена их прямая зависимость во всех вариантах. При этом коэффициент корреляции (r) равен 0,7. Значения данных показателей донорных растений капусты белокочанной соответствуют показателям растений-регенерантов удвоенных гаплоидов.

Результаты проведенных исследований аналогичны полученным ранее и позволяют далее использовать подсчёт числа хлоропластов в качестве наиболее простого и быстрого метода массового определения плоидности растений.

Таблица 6 – Результаты цитологического анализа уровня плоидности растений-регенерантов капусты белокочанной

| Определенная плоидность | Гаплоид (n) | Диплоид (2n) | Тетраплоид (4n) |
|---|---|---|---|
| Число изученных растений, шт. | 8 | 42 | 10 |
| Число хромосом в меристеме корня, шт. | 9 | 18 | 36 |
| Среднее число хлоропластов в 2х клетках, шт. | 9,21±0,85 | 12,48±0,89 | 18,90±1,17 |
| Средняя длина устьичной клетки, нм | 18,69±0,79 | 22,47±0,65 | 28,64±0,63 |
| Замыкающие клетки устьиц у капусты белокочанной (фотографии с использованием светового микроскопа и увеличения х100) | | | |
| Свечение хлоропластов при облучении |  |  |  |
| Определение размера клеток |  |  |  |

Полученные нами данные по определению плоидности растений-регенерантов различных генотипов капусты белокочанной доказывают, что гаплоидные клетки в культуре являются нестабильными, они имеют тенденцию к эндомитозу (удвоение хромосом без деления ядер) и формированию клеток различной плоидности. Это дало возможность все изученные образцы разделить на группы по уровню плоидности для дальнейшего использования в работе (прил. 2).

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

Размножение ценного материала является одной из первых задач при работе селекционера с растениями удвоенных гаплоидов, полученных в культуре микроспор.

Как правило, в результате индукции андрогенного эмбриогенеза из каждой микроспоры получается одно растение – регенерант. Поскольку для селекционной работы необходимо иметь большее количество индивидуальных растений, первым этапом становится самоопыление растений-регенерантов для получения семенного потомства – гомозиготной линии. Результат самоопыления растений складывается из таких составляющих как самосовместимость, фертильность растения, в частности наличие большого количества зрелой пыльцы в пыльниках на момент их открытия и жизнеспособность пыльцы – способность прорастать на рыльце пестика.

Довольно часто у капустных культур, в частности у капусты белокочанной, наблюдается самонесовместимость. Как правило, при необходимости самоопыления таких растений селекционеры применяют методику опыления в бутонах, то есть пыльца с раскрывшихся цветков наносится на рыльце пестиков нераскрывшихся бутонов с контролем самонесовместимости в цветах.

Фертильность растений зависит от условий внешней среды и возраста растений. Неблагоприятные почвенные, климатические условия (повышение температуры воздуха, резкое похолодание) и продолжительное цветение растений увеличивают их стерильность.

Другим фактором, обеспечивающим нормальное оплодотворение и качество завязавшихся семян, является жизнеспособность пыльцы (Френкель, Галун, 1982). Показатели жизнеспособности пыльцы имеют решающее значение для прогнозирования качества семенной продукции и при проведении работ по гибридизации самонесовместимых растений. Большое значение для

селекционера имеет возможность предварительного определения степени жизнеспособности используемой в его работе пыльцы.

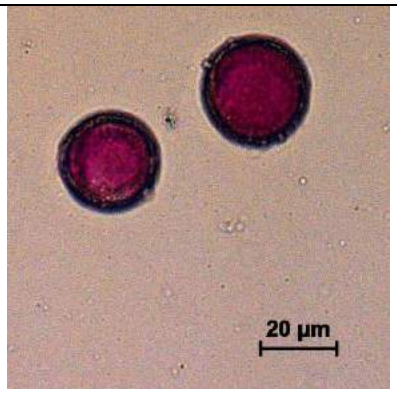
Существует несколько методов определения жизнеспособности пыльцы в лабораторных условиях, наиболее распространенным из которых является проращивание пыльцы на искусственных питательных средах *in vitro* (Бунин и др., 2003). Основными компонентами таких питательных сред являются сахароза, борная кислота, хлорид кальция или нитрат кальция, сульфат магния, нитрат калия (Чеботарь и др., 1987; Балашова и др., 1995; Matsubara et al., 1999; Лях и др., 2000; Степанов и др., 2000). Для роста пыльцевых трубок некоторых растений в состав искусственной питательной среды вводят экстракт из рыльца пестика. Подбор универсальной среды для проращивания пыльцы является затруднительным, поскольку требования пыльцы к среде изменяются не только в зависимости от вида или разновидности, но и от конкретных условий произрастания исследуемого растения.

Для определения жизнеспособности пыльцы у разных видов рода *Brassica* предложено несколько вариантов питательных сред, где одним из важных факторов является pH, определенный уровень которого достигается с помощью буферных смесей. Часто в таких случаях используют трис-буфер (трисгидроксиметиламинометан), который обеспечивает подщелачивание среды, необходимое для проращивания пыльцы растений рода *Brassica* (Лях, 2000; Matsubara, 1999).

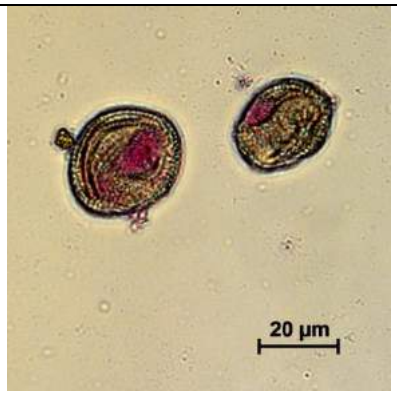
Полученные удвоенные гаплоиды капусты белокочанной были высажены в закрытый грунт с целью получения семенного потомства для дальнейшей селекционной работы. В летний период 2014 года были обнаружены трудности при самоопылении этих растений: пыльники плохо раскрывались и содержали малое количество пыльцы.

При цитологическом анализе пыльцевых зёрен методом дифференциальной окраски было показано, что содержание зрелых пыльцевых зерен в пыльниках не превышает 10% (рис. 7).

Пыльца удвоенных гаплоидных растений




Жизнеспособные пыльцевые зёрна




Стерильные пыльцевые зерна

Рис.7 Цитологический анализ пыльцевых зерен капусты белокочанной

Для того чтобы получить семенное потомство, необходимо было повысить эффективность опыления. Было сделано предположение, что завязываемость семян можно увеличить, проведя ручной сбор пыльцы из пыльников и нанесением ее на рыльце пестика в специальном индуцирующем прорастание растворе.

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 pH (табл. 1). В некоторых вариантах использовали экстракт пестика цветков, согласно литературным данным он повышает эффективность прорастания пыльцы.

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 % (рис. 8). Мы предполагаем, что положительное влияние на прорастание оказывает трис-буфер (трисгидроксиметиламино-метан), обеспечивающий поддержание уровня pH (рис. 9). Количество пыльцы,

проросшей на среде 8, не содержащей буферного раствора, оказалось меньшим. Добавление экстракта пестика в состав среды 8 привело к некоторому увеличению доли проросшей пыльцы, однако разница между средой с добавлением экстракта и без него статистически была не существенной. В то же время, в среде, содержащей трис, при добавлении экстракта пестика наблюдалось существенное снижение способности индуцировать прорастание пыльцы. Таким образом, среда Т на основе трис-буфера без экстракта пестика была выбрана для проведения искусственного самоопыления девяти растений удвоенных гаплоидов, у которых была отмечена низкая жизнеспособность пыльцы.

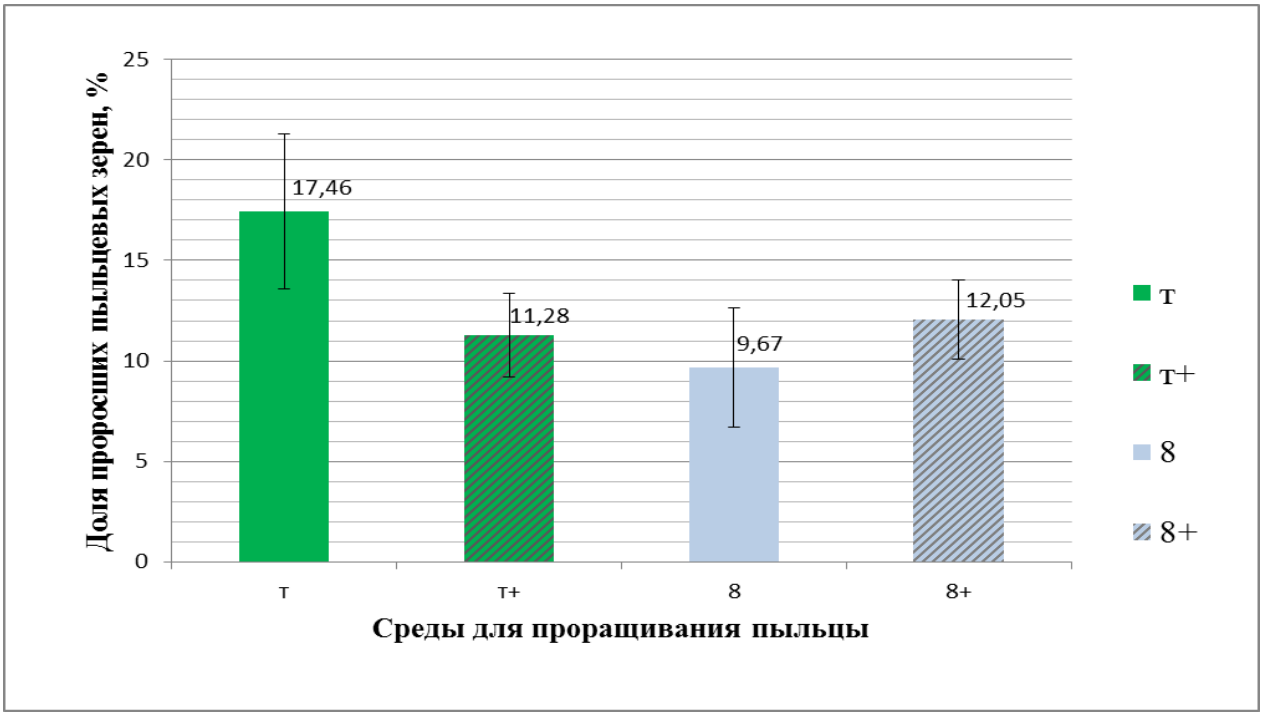



Рис.8 Влияние различных сред на прорастание пыльцевых зёрен капусты белокочанной сортопопуляции Зимовка 1474

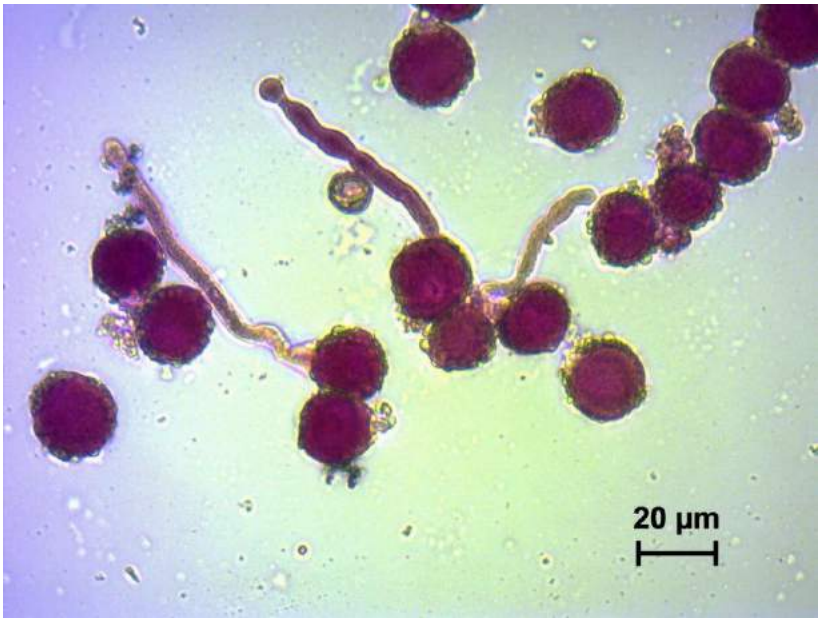



Рис.9 Прорастание пыльцы капусты белокочанной сортопопуляции Зимовка 1474 в среде Т

Растения капусты белокочанной, с частичной стерильностью пыльцы, были подвергнуты самоопылению в бутонах. Через 2,5 месяца был произведён сбор созревших семян в опыте и контроле. В контрольном варианте, при самоопылении растений сорта Зимовка1474, завязалось в среднем 23 семени на стручок (табл. 7). 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 семян. Однако, такое количество семян является достаточным для проведения дальнейшей селекционной работы.

Таблица 7 – Влияние способа опыления на завязываемость семян у капусты белокочанной

| Способ опыления | Среднее число семян/стручок, шт. | |
|---|---|---|
| | Удвоенные гаплоидные растения | Зимовка 1474 |
| Без использования среды | 0 | 23,0±5,0 |
| С использованием среды Т | 7,0±1,5 | - |
| Завязываемость семян в стручке | | |

Таким образом, показано, что использование среды Т для проращивания пыльцевых зерен капусты белокочанной при самоопылении растений, является одним из способов получения семенного потомства растений с низким содержанием жизнеспособной пыльцы.

Благодаря данному способу опыления, удалось получить семена растений удвоенных гаплоидов, которые в дальнейшем были включены в селекционный процесс.

### 3.4. Оценка степени проявления самонесовместимости популяций растений-регенерантов

Для оценки полученных гибридных комбинаций капусты белокочанной нами была составлена модель $F_1$ гибрида. Гибриды должны соответствовать

следующим параметрам: поздний 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.

Далее была проведена оценка степени проявления самонесовместимости популяций растений-регенерантов, которую определяли по завязываемости семян в стручках при самоопылении цветков: высокая – завязываемость 0-1 шт/стручок, средняя – средняя 2-5 шт/стручок, низкая или отсутствует – более 5 шт/стручок (табл. 8) (Бунин и др., 2011).

Таблица 8 – Степень проявления самонесовместимости популяций растений-регенерантов капусты белокочанной

| Популяция растений-регенерантов | Степень проявления самонесовместимости | | | | | | Всего |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Высокая | | Средняя | | Отсутствует | | |
| | шт. | % | шт. | % | шт. | % | |
| 1 | 3 | 27 | 1 | 9 | 7 | 64 | 11 |
| 2 | 4 | 40 | 4 | 40 | 2 | 20 | 10 |
| 11 | 2 | 40 | 3 | 60 | 0 | 0 | 5 |
| 5 | 2 | 50 | 0 | 0 | 2 | 50 | 4 |
| 3 | 3 | 50 | 3 | 50 | 0 | 0 | 6 |

В зависимости от генотипа до 50% линий удвоенных гаплоидов проявили высокую степень самонесовместимости, поэтому были включены в дальнейшую селекционную работу по созданию $F_1$ гибридов на основе самонесовместимости.

## 3.5. Изучение комбинационной способности удвоенных гаплоидных линий капусты белокочанной

Для определения селекционной ценности полученных линий удвоенных гаплоидов проводили их диаллельное скрещивание, т.е. скрещивание каждой линии с другой в циклическом порядке. Оценку проводили по общей и специфической комбинационной способности.

Анализ комбинационной способности позволяет выделить линии – ценные для получения высокоурожайных гибридов $F_1$, повысить эффективность селекционного процесса, улучшить качество подбора родительских линий для гибридизации и конкретизировать пути использования изучаемых родительских форм.

Наиболее полную генетическую информацию о свойствах и признаках исходного материала можно получить, используя систему диаллельных скрещиваний, которая позволяет:

1. определить общую и специфическую комбинационную способность генотипов и прогнозировать эффективность селекции на основе коэффициентов наследуемости (Griffing, 1956; Турбин и др., 1974);

2. изучить генетическую природу количественного признака (Jinks, Hayman, 1953).

### 3.5.1. Комбинационная способность по признаку «средняя масса кочана»

Одним из важнейших хозяйственных признаков, от которого напрямую зависит урожайность капусты белокочанной, является масса кочана.

Дисперсионный анализ изучаемых генотипов по признаку «средняя масса кочана» показал наличие значимых (Fфакт.>Fтеор.) различий между гибридными комбинациями (прил.3). Различия между родительскими линиями по комбинационной способности оказались также достоверными на высоком уровне значимости (прил. 4). Это дает основание перейти к

следующим этапам анализа, то есть к вычислению эффектов ОКС, констант СКС и варианс СКС линий.

В годы исследования средняя масса кочана у родительских линий варьировала в пределах от 0,52 кг у линии 3-3-2 до 2,33 кг у линии 11-124. У гибридных комбинаций средняя масса кочана находилась в пределах от 0,81 до 5,04 кг, максимальное значение которых превышало стандарты ($F_1$ Северянка - 3,38 кг; $F_1$Галакси – 4,16 кг). Данные значения указывают на высокое варьирование показателя, что дает возможность создания как высокоурожайных гибридов, превышающих стандарты, так и гибридов, находящихся в пределах стандарта по средней массе кочана.

ОКС родительских линий определяли по величине оценок эффектов ОКС (g) (табл. 9). Величина данного показателя варьировала в пределах от -0,32 до 0,24 кг. Выявлено, что высокую оценку эффектов ОКС имеют линии: 1-123, 1-19, 2-307, 2-331, 3-3-1. Эти линии представляют практическую ценность как исходный материал для получения высокоурожайных гибридов. А также отмечены линии, имеющие низкую оценку ОКС: 2-123 и 3-3-2. Целесообразность их дальнейшего использования в селекции на урожайность возможна при высоких эффектах СКС. Линии с отрицательными эффектами ОКС неперспективны в селекции на высокую урожайность.

Выявлены существенные различия родительских линий по материнским эффектам (МЭ). Наибольшее влияние на наследование средней массы кочана плазмогенов, увеличивающих массу кочана, отмечено у линий 1-18, 1-123, 1-19, 3-3-1, 3-3-2 и 11-65. Эти линии следует использовать в качестве материнского компонента скрещивания. Линии 5-11, 2-45, 2-123, 3-3-3, имеют плазмогены, которые уменьшают среднюю массу кочана, поэтому их рекомендуется использовать в качестве отцовских компонентов.

Таблица 9 – Средняя масса кочана линий удвоенных гаплоидов и гибридов F1, эффекты ОКС и средние цитоплазматические эффекты самонесовместимых родительских линий, кг (2014-2016 годы)

| ♂ \ ♀ | 1-18 | 1-123 | 1-19 | 5-13 | 5-11 | 2-307 | 2-45 | 2-123 | 2-331 | 3-3-1 | 3-3-3 | 3-3-2 | 11-124 | 11-65 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1-18 | **2,29** | 2,54 | 3,00 | 0,81 | 2,44 | 2,59 | 2,75 | 2,66 | 2,50 | 5,01 | 1,91 | 4,14 | 3,67 | 2,78 |
| 1-123 | 2,07 | **1,73** | 3,16 | 1,56 | 2,91 | 2,95 | 2,51 | 3,60 | 2,86 | 4,79 | 2,21 | 4,24 | 3,42 | 3,43 |
| 1-19 | 3,24 | 3,44 | **1,78** | 2,12 | 2,65 | 3,40 | 4,52 | 2,16 | 3,20 | 4,23 | 3,37 | 3,78 | 3,86 | 2,65 |
| 5-13 | 2,13 | 3,68 | 3,46 | **2,00** | 2,35 | 2,98 | 2,67 | 3,86 | 2,31 | 4,73 | 2,50 | 3,45 | 2,78 | 2,71 |
| 5-11 | 3,33 | 3,15 | 3,79 | 4,98 | **1,11** | 3,07 | 3,10 | 3,34 | 1,97 | 3,39 | 2,51 | 4,01 | 2,76 | 3,20 |
| 2-307 | 3,26 | 3,64 | 4,68 | 2,40 | 1,44 | **1,71** | 2,68 | 3,49 | 4,33 | 3,56 | 3,02 | 3,77 | 1,84 | 3,62 |
| 2-45 | 2,85 | 4,10 | 4,22 | 3,18 | 1,52 | 3,87 | **1,15** | 3,24 | 5,04 | 4,33 | 2,57 | 4,01 | 2,23 | 3,69 |
| 2-123 | 4,29 | 3,90 | 2,88 | 3,76 | 2,35 | 4,69 | 3,65 | **1,00** | 3,95 | 3,87 | 3,49 | 3,67 | 2,66 | 3,20 |
| 2-331 | 3,49 | 3,61 | 3,23 | 4,98 | 3,02 | 4,12 | 2,25 | 3,24 | **1,22** | 4,00 | 2,24 | 3,72 | 3,25 | 3,53 |
| 3-3-1 | 3,18 | 3,25 | 2,60 | 3,48 | 3,13 | 4,43 | 3,55 | 2,49 | 3,93 | **0,77** | 1,90 | 4,02 | 2,60 | 3,77 |
| 3-3-3 | 3,15 | 4,37 | 3,15 | 3,70 | 3,52 | 3,87 | 2,98 | 2,66 | 4,17 | 1,25 | **1,29** | 3,77 | 3,27 | 4,01 |
| 3-3-2 | 3,47 | 4,02 | 4,49 | 3,00 | 3,84 | 3,26 | 2,96 | 1,58 | 3,65 | 2,05 | 1,70 | **0,52** | 3,66 | 3,65 |
| 11-124 | 3,38 | 3,78 | 4,27 | 2,35 | 3,46 | 3,15 | 2,26 | 2,17 | 3,50 | 2,39 | 2,12 | 1,23 | **2,33** | 3,13 |
| 11-65 | 2,76 | 3,82 | 3,83 | 4,37 | 2,76 | 1,14 | 1,02 | 4,47 | 3,13 | 2,50 | 1,19 | 1,08 | 1,30 | **1,00** |
| G | -0,11 | 0,19 | 0,24 | -0,03 | -0,18 | 0,13 | -0,04 | 0,08 | 0,23 | 0,17 | -0,32 | 0,08 | -0,21 | -0,23 |
| gr ♀ | 0,02 | 0,46 | 0,43 | 0,01 | -0,43 | 0,19 | -0,32 | -0,18 | 0,23 | 0,31 | -0,83 | 0,20 | -0,21 | 0,13 |
| gs ♂ | -0,25 | -0,08 | 0,06 | -0,07 | 0,08 | 0,06 | 0,24 | 0,34 | 0,24 | 0,04 | 0,19 | -0,05 | -0,22 | -0,59 |
| ME | 0,27 | 0,54 | 0,37 | 0,08 | -0,51 | 0,13 | -0,57 | -0,53 | -0,01 | 0,27 | -1,01 | 0,25 | 0,01 | 0,71 |
| F1-p | 0,69 | 1,62 | 1,62 | 1,09 | 1,89 | 1,57 | 1,99 | 2,28 | 2,21 | 2,63 | 1,54 | 2,80 | 0,54 | 1,95 |
| НСР 05 (х) = 0,12; НСР 05 (ОКС) = 0,03; НСР 05 (МЕ) = 0,03; Стандарты: F1Северянка - 3,38 кг; F1 Галакси – 4,16 кг | | | | | | | | | | | | | | |

Примечание: g - средний эффект; gr - эффекты ОКС материнского компонента; gs – эффекты ОКС отцовского компонента; ME - средний материнский эффект; F 1-p - средний гетерозисный эффект (относительно гибридов, истинный гетерозис по отношению к родителям).

Анализ эффектов СКС показал варьирование данного показателя в широких пределах от -1,43 в комбинации 1-18х5-13 до 1,13 в комбинации 1-19х2-45, что объясняется специфичностью данного признака (табл. 10). У всех родительских линий были отмечены высокие вариансы СКС, находящихся в пределах от 0,19 до 0,49 при НСР (sp) = 0,01.

Исходя из анализа данных, следует отметить, что линии 1-123, 1-19, 2-307, 2-331, 3-3-1, обладающие высокими оценками эффектов ОКС и вариансе СКС, являются наилучшими исходными формами при создании высокогетерозисных гибридов F1 по урожайности. Линии 2-123 и 3-3-2 с низкими оценками эффектов ОКС также представляется возможным использовать при селекции на создание урожайных гибридов, так как у них отмечены высокие вариансы СКС. Использование остальных линий с низкой ОКС нецелесообразно при селекции на урожайность, так как высокие вариансы

СКС линий лишь незначительно увеличивают возможность их применения. Однако это не исключает их использование в других селекционных программах.

Таблица 10 – Анализ эффектов и варианс СКС самонесовместимых родительских линий по признаку «средняя масса кочана» (2014-2016 годы)

| ♂ \ ♀ | 1-18 | 1-123 | 1-19 | 5-13 | 5-11 | 2-307 | 2-45 | 2-123 | 2-331 | 3-3-1 | 3-3-3 | 3-3-2 | 11-124 | 11-65 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1-18 | - | | | | | | | | | | | | | |
| 1-123 | -0,81 | - | | | | | | | | | | | | |
| 1-19 | -0,05 | -0,17 | - | | | | | | | | | | | |
| 5-13 | -1,43 | -0,58 | -0,46 | - | | | | | | | | | | |
| 5-11 | 0,13 | -0,02 | 0,11 | 0,83 | - | | | | | | | | | |
| 2-307 | -0,13 | -0,06 | 0,63 | -0,45 | -0,74 | - | | | | | | | | |
| 2-45 | -0,09 | 0,11 | 1,13 | -0,05 | -0,52 | 0,15 | - | | | | | | | |
| 2-123 | 0,47 | 0,44 | -0,84 | 0,72 | -0,10 | 0,85 | 0,36 | - | | | | | | |
| 2-331 | -0,17 | -0,23 | -0,30 | 0,40 | -0,60 | 0,83 | 0,41 | 0,25 | - | | | | | |
| 3-3-1 | 0,99 | 0,62 | -0,04 | 0,92 | 0,23 | 0,65 | 0,76 | -0,11 | 0,52 | - | | | | |
| 3-3-3 | -0,08 | 0,38 | -0,21 | 0,41 | 0,47 | 0,60 | 0,09 | 0,28 | 0,25 | -1,32 | - | | | |
| 3-3-2 | 0,80 | 0,82 | 0,78 | 0,14 | 0,99 | 0,27 | 0,40 | -0,57 | 0,33 | -0,26 | -0,06 | - | | |
| 11-124 | 0,81 | 0,58 | 1,00 | -0,23 | 0,46 | -0,46 | -0,54 | -0,49 | 0,32 | -0,50 | 0,19 | -0,46 | - | |
| 11-65 | 0,07 | 0,62 | 0,19 | 0,76 | 0,34 | -0,56 | -0,42 | 0,95 | 0,28 | 0,15 | 0,11 | -0,52 | -0,38 | - |
| S | 0,44 | 0,27 | 0,37 | 0,49 | 0,29 | 0,33 | 0,26 | 0,34 | 0,19 | 0,47 | 0,24 | 0,34 | 0,31 | 0,25 |
| NSR(sp) = 0,01 | | | | | | | | | | | | | | |

### 3.5.2. Комбинационная способность по признаку «средний диаметр розетки листьев»

При создании F1 гибридов и в последующем внедрении их в производственный процесс, важно сопровождать их разработанной технологией выращивания. Такой показатель, как «средний диаметр розетки листьев» определяет систему агротехнических мероприятий при выращивании. Он определяет густоту посадки растений, от которой в последующем зависит выход продукции с единицы площади.

Дисперсионный анализ результатов исследования по признаку «средний диаметр розетки листьев» показал существенные различия изучаемых генотипов и комбинационной способности (прил. 5, 6).

Средний диаметр розетки листьев изучаемых линий варьировал от 47,65 см до 82,25 см, у гибридных комбинаций – от 45,57 см до 88,50 см. У стандартов F1 Северянка и F1 Галакси средний диаметр розетки листьев составил 69,23 см и 75,30 см соответственно (табл. 11).

Таблица 11 – Средний диаметр розетки листьев линий удвоенных гаплоидов и гибридов F1, эффекты ОКС и средние цитоплазматические эффекты самонесовместимых родительских линий, см (2014-2016 годы)

| ♂ \ ♀ | 1-18 | 1-123 | 1-19 | 5-13 | 5-11 | 2-307 | 2-45 | 2-123 | 2-331 | 3-3-1 | 3-3-3 | 3-3-2 | 11-124 | 11-65 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1-18 | **55,71** | 64,65 | 49,80 | 45,58 | 48,64 | 63,54 | 65,45 | 69,75 | 65,68 | 64,39 | 65,55 | 60,51 | 87,30 | 66,37 |
| 1-123 | 64,60 | **61,65** | 46,95 | 45,57 | 49,83 | 65,95 | 65,85 | 80,20 | 68,80 | 65,90 | 61,53 | 72,40 | 85,70 | 64,97 |
| 1-19 | 58,44 | 72,45 | **67,18** | 46,60 | 51,41 | 64,35 | 62,55 | 63,58 | 76,05 | 86,43 | 61,20 | 61,53 | 86,63 | 86,60 |
| 5-13 | 62,49 | 69,05 | 67,54 | **54,30** | 49,48 | 90,55 | 62,05 | 58,85 | 65,70 | 88,50 | 75,65 | 77,50 | 62,75 | 70,52 |
| 5-11 | 64,39 | 65,38 | 69,80 | 52,55 | **54,42** | 62,04 | 61,64 | 62,61 | 60,90 | 70,15 | 67,37 | 78,36 | 62,88 | 68,07 |
| 2-307 | 55,15 | 55,90 | 60,54 | 62,50 | 62,75 | **71,45** | 65,37 | 75,30 | 69,79 | 84,95 | 84,00 | 54,55 | 55,17 | 53,78 |
| 2-45 | 63,55 | 54,78 | 55,43 | 72,65 | 63,30 | 68,29 | **80,42** | 67,53 | 69,75 | 80,54 | 75,76 | 66,64 | 69,85 | 53,80 |
| 2-123 | 77,38 | 67,50 | 74,50 | 62,75 | 61,77 | 66,90 | 70,52 | **73,65** | 64,84 | 74,60 | 79,56 | 57,44 | 68,60 | 55,96 |
| 2-331 | 76,45 | 59,80 | 68,89 | 82,65 | 62,45 | 65,81 | 67,27 | 70,70 | **75,50** | 77,95 | 77,39 | 53,15 | 69,44 | 58,40 |
| 3-3-1 | 64,54 | 54,13 | 64,42 | 62,65 | 62,98 | 66,67 | 68,35 | 69,29 | 67,50 | **82,25** | 62,52 | 51,05 | 77,70 | 67,20 |
| 3-3-3 | 62,57 | 57,76 | 73,60 | 60,39 | 61,73 | 65,75 | 74,56 | 64,07 | 71,25 | 76,35 | **47,65** | 64,18 | 70,30 | 60,28 |
| 3-3-2 | 67,84 | 67,55 | 69,91 | 65,45 | 62,78 | 64,80 | 68,42 | 67,70 | 68,58 | 76,24 | 55,06 | **49,75** | 75,35 | 65,32 |
| 11-124 | 75,60 | 56,26 | 71,34 | 82,95 | 61,65 | 69,90 | 71,34 | 72,51 | 67,28 | 81,67 | 59,42 | 56,31 | **58,51** | 58,36 |
| 11-65 | 76,80 | 80,40 | 69,64 | 79,97 | 62,65 | 85,95 | 69,08 | 71,68 | 56,26 | 85,46 | 57,29 | 58,29 | 57,14 | **59,32** |
| G | -2,19 | -2,59 | -0,19 | -1,01 | -5,12 | 0,84 | 1,26 | 2,27 | 1,93 | 5,60 | -0,69 | -2,62 | 2,53 | -0,03 |
| gr ♀ | -0,31 | -3,04 | -1,45 | -3,81 | -8,14 | 3,01 | 1,64 | 2,68 | 1,29 | 11,82 | 0,01 | -4,87 | 4,10 | -2,92 |
| gs ♂ | -4,07 | -2,14 | 1,08 | 1,79 | -2,09 | -1,33 | 0,89 | 1,86 | 2,57 | -0,61 | -1,39 | -0,36 | 0,95 | 2,86 |
| ME | 3,76 | -0,90 | -2,53 | -5,60 | -6,05 | 4,34 | 0,75 | 0,82 | -1,28 | 12,44 | 1,39 | -4,51 | 3,16 | -5,78 |
| F1-p | 9,17 | 2,34 | -1,02 | 11,97 | 7,41 | -4,52 | -13,71 | -5,34 | -7,70 | -11,02 | 19,47 | 15,13 | 11,24 | 7,62 |

НСР 05 (х) =2,41; НСР 05 (ОКС) = 0,61; НСР 05 (ME) = 0,51;
Стандарты: F1Северянка - 69,23 см; F1 Галакси – 75,30 см

Примечание: g - средний эффект; gr - эффекты ОКС материнского компонента; gs – эффекты ОКС отцовского компонента; ME - средний материнский эффект; F 1-p - средний гетерозисный эффект (относительно гибридов, истинный гетерозис по отношению к родителям).

Максимальное положительное значение эффекта ОКС отмечено у линии 3-3-1, низкое значение у линии 2-307, среднее у линий 2-45, 2-123, 2-331 и 11-124. Причем линии со средним значением оказывают положительное влияние на ОКС взятые как в качестве материнских, так и отцовских компонентов. Эти линии не перспективны для селекции на компактную розетку листьев. Остальные линии, обладающие отрицательными эффектами ОКС, можно использовать в качестве исходного материала для получения F1 гибридов с компактной розеткой листьев.

Все линии обладали высокими значениями варианс СКС и различия между ними существенны. Эффекты СКС варьировали в пределах от -11,16 в комбинации 11-124х11-65 см до 14,70 см в комбинации 1-18х11-124 (табл. 12).

Таблица 12 – Анализ эффектов и варианс СКС самонесовместимых родительских линий по признаку «средний диаметр розетки листьев» (2014-2016 годы)

| ♂ \ ♀ | 1-18 | 1-123 | 1-19 | 5-13 | 5-11 | 2-307 | 2-45 | 2-123 | 2-331 | 3-3-1 | 3-3-3 | 3-3-2 | 11-124 | 11-65 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1-18 | - | | | | | | | | | | | | | |
| 1-123 | 2,99 | - | | | | | | | | | | | | |
| 1-19 | -9,92 | -3,94 | - | | | | | | | | | | | |
| 5-13 | -9,18 | -5,51 | -8,16 | - | | | | | | | | | | |
| 5-11 | -2,60 | -1,11 | -0,51 | -9,28 | - | | | | | | | | | |
| 2-307 | -5,72 | -3,74 | -4,63 | 10,28 | 0,26 | - | | | | | | | | |
| 2-45 | -1,00 | -4,78 | -8,50 | 0,68 | -0,10 | -1,69 | - | | | | | | | |
| 2-123 | 7,06 | 7,75 | 0,53 | -6,88 | -1,39 | 1,57 | -0,94 | - | | | | | | |
| 2-331 | 4,91 | -1,45 | 4,31 | 6,84 | -1,55 | -1,39 | -1,10 | -2,85 | - | | | | | |
| 3-3-1 | -5,37 | -9,42 | 3,59 | 4,56 | -0,34 | 2,95 | 1,16 | -2,35 | -1,22 | - | | | | |
| 3-3-3 | 0,52 | -3,49 | 1,86 | 3,30 | 3,94 | 8,31 | 8,17 | 3,81 | 6,66 | -1,90 | - | | | |
| 3-3-2 | 2,56 | 8,77 | 2,10 | 8,68 | 11,89 | -4,96 | 2,46 | -3,50 | -4,87 | -5,76 | -3,49 | - | | |
| 11-124 | 14,70 | 4,63 | 10,23 | 4,92 | -1,56 | -7,25 | 0,38 | -0,66 | -2,51 | 5,14 | -3,39 | -0,49 | - | |
| 11-65 | 7,39 | 8,89 | 11,92 | 9,86 | 4,09 | 2,64 | -6,21 | -4,84 | 10,99 | 4,34 | -6,91 | -1,97 | -11,16 | - |
| S | 51,03 | 36,10 | 46,72 | 58,01 | 22,91 | 28,58 | 17,87 | 18,94 | 25,15 | 20,86 | 26,01 | 35,06 | 49,23 | 64,54 |
| NSR(sp) = 0,26 | | | | | | | | | | | | | | |

### 3.5.3. Комбинационная способность по признаку «средняя высота наружной кочерыги»

Высота наружной кочерыги капусты белокочанной является признаком, определяющим агротехнические мероприятия, связанные с полеганием и пораженностью слизистым бактериозом, а также с возможностью механизированной уборки (Монахос и др., 1996).

Дисперсионный анализ результатов исследования по признаку «средняя высота наружной кочерыги» показал существенные различия изучаемых генотипов и комбинационной способности (прил. 7, 8).

Высота наружной кочерыги изучаемых линий варьировала от 2,91 см до 12,85 см, у гибридных комбинаций – от 4,24 см до 13,25 см. Максимальные значения высоты наружной кочерыги гибридных комбинаций и линий существенно превышало стандартные, которые составляли у F1 Северянка – 5,00 см и F1 Галакси – 6,15 см (табл. 13).

Таблица 13 – Средняя высота наружной кочерыги линий удвоенных гаплоидов и гибридов F1, эффекты ОКС и средние цитоплазматические эффекты самонесовместимых родительских линий, см (2014-2016 годы)

| ♂ \ ♀ | 1-18 | 1-123 | 1-19 | 5-13 | 5-11 | 2-307 | 2-45 | 2-123 | 2-331 | 3-3-1 | 3-3-3 | 3-3-2 | 11-124 | 11-65 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1-18 | **6,45** | 6,66 | 9,35 | 5,43 | 5,86 | 7,67 | 7,96 | 7,94 | 6,18 | 8,99 | 5,71 | 5,92 | 8,01 | 5,36 |
| 1-123 | 6,61 | **8,32** | 7,81 | 7,00 | 5,55 | 6,68 | 5,74 | 6,79 | 6,83 | 9,50 | 2,88 | 5,83 | 6,35 | 8,18 |
| 1-19 | 7,04 | 6,94 | **9,99** | 6,48 | 4,93 | 6,04 | 6,34 | 4,68 | 8,04 | 11,92 | 7,22 | 4,75 | 7,36 | 8,66 |
| 5-13 | 5,92 | 7,16 | 8,93 | **4,78** | 13,63 | 6,06 | 5,78 | 7,61 | 9,87 | 7,66 | 6,47 | 7,32 | 6,91 | 7,44 |
| 5-11 | 8,05 | 7,26 | 7,61 | 6,07 | **10,21** | 5,31 | 8,32 | 7,26 | 9,82 | 5,88 | 7,51 | 7,01 | 8,34 | 6,33 |
| 2-307 | 5,41 | 7,04 | 7,11 | 6,74 | 5,13 | **5,47** | 4,33 | 6,36 | 9,53 | 6,44 | 5,62 | 6,97 | 4,86 | 6,64 |
| 2-45 | 5,65 | 5,95 | 6,78 | 5,23 | 4,92 | 6,34 | **8,49** | 8,76 | 9,95 | 5,88 | 7,05 | 6,68 | 5,84 | 6,63 |
| 2-123 | 5,69 | 6,19 | 8,08 | 5,50 | 7,13 | 8,04 | 5,22 | **10,48** | 11,04 | 6,31 | 5,08 | 5,26 | 6,40 | 6,34 |
| 2-331 | 9,43 | 9,84 | 8,98 | 11,97 | 6,81 | 8,62 | 7,18 | 9,65 | **12,85** | 4,94 | 9,82 | 5,48 | 8,90 | 6,83 |
| 3-3-1 | 9,89 | 7,25 | 9,10 | 9,87 | 7,24 | 8,65 | 6,37 | 8,18 | 12,07 | **3,61** | 4,11 | 7,07 | 8,28 | 7,39 |
| 3-3-3 | 8,48 | 6,42 | 8,73 | 8,06 | 4,62 | 7,62 | 5,69 | 10,80 | 12,89 | 6,14 | **2,91** | 4,24 | 7,31 | 7,71 |
| 3-3-2 | 7,86 | 7,60 | 8,01 | 8,04 | 5,42 | 8,64 | 5,94 | 9,49 | 11,82 | 6,58 | 4,83 | **6,44** | 6,70 | 11,53 |
| 11-124 | 7,98 | 6,68 | 8,60 | 6,99 | 5,48 | 9,54 | 5,98 | 7,44 | 13,20 | 5,61 | 6,82 | 2,81 | **7,01** | 12,31 |
| 11-65 | 10,16 | 6,46 | 8,60 | 7,40 | 4,82 | 8,43 | 5,91 | 6,24 | 13,25 | 9,13 | 7,06 | 6,03 | 5,82 | **8,58** |
| G | -0,11 | -0,40 | 0,46 | -0,00 | -0,30 | -0,51 | -0,78 | 0,12 | 2,27 | 0,09 | -0,73 | -0,52 | -0,02 | 0,45 |
| gr ♀ | 0,15 | -0,20 | 1,08 | -0,22 | -0,78 | 0,04 | -0,95 | 0,65 | 3,20 | -0,29 | 1,39 | -1,48 | -0,32 | 0,52 |
| gs ♂ | -0,36 | -0,61 | -0,16 | 0,21 | 0,17 | -1,07 | -0,60 | -0,42 | 1,34 | 0,46 | -0,07 | 0,45 | 0,27 | 0,38 |
| ME | 0,51 | 0,41 | 1,23 | -0,43 | -0,95 | 1,10 | -0,35 | 1,07 | 1,86 | -0,75 | -1,32 | -1,94 | -0,60 | 0,15 |
| F1-p | 0,83 | -1,51 | -2,37 | 2,74 | -3,42 | 1,44 | -2,09 | -3,26 | -3,51 | 4,10 | 3.97 | 0,40 | 0,32 | -0,86 |

НСР 05 (х) =1,29; НСР 05 (ОКС) = 0,39; НСР 05 (МЕ) = 0,37;
Стандарты: F1Северянка - 5,00 см; F1 Галакси – 6,15 см

Результаты показали, что высокую оценку эффектов ОКС имеют линии 1-19, 2-331 и 11-65. Средние величины эффектов ОКС имеет одна линия 2-123, низкие – линия 3-3-1. Благодаря высоким значениям варианс СКС эти линии возможно использовать в селекции на высокую наружную кочерыгу в качестве материнских компонентов (табл. 14). Остальные линии с данной целью нецелесообразно использовать, либо в качестве отцовских компонентов.

Таблица 14 – Анализ эффектов и варианс СКС самонесовместимых родительских линий по признаку «средняя высота наружной кочерыги» (2014-2016 годы)

| ♂ \ ♀ | 1-18 | 1-123 | 1-19 | 5-13 | 5-11 | 2-307 | 2-45 | 2-123 | 2-331 | 3-3-1 | 3-3-3 | 3-3-2 | 11-124 | 11-65 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| 1-18 | - | | | | | | | | | | | | | |
| 1-123 | -0,18 | - | | | | | | | | | | | | |
| 1-19 | 0,51 | -0,01 | - | | | | | | | | | | | |
| 5-13 | -1,54 | 0,16 | -0,08 | - | | | | | | | | | | |
| 5-11 | 0,04 | -0,21 | -1,21 | 2,83 | - | | | | | | | | | |

продолжение таблицы 14

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2-307 | -0,17 | 0,45 | -0,70 | -0,41 | -1,29 | - | | | | | | | | |
| 2-45 | 0,37 | -0,30 | -0,45 | -1,04 | 0,37 | -0,70 | - | | | | | | | |
| 2-123 | -0,52 | -0,55 | -1,52 | -0,88 | 0,05 | 0,27 | 0,32 | - | | | | | | |
| 2-331 | -1,68 | -0,86 | -1,54 | 1,33 | -0,97 | -0,01 | -0,25 | 0,64 | - | | | | | |
| 3-3-1 | 2,13 | 1,36 | 2,63 | 1,35 | -0,56 | 0,65 | -0,51 | -0,29 | -1,18 | - | | | | |
| 3-3-3 | 0,61 | -1,54 | 0,92 | 0,67 | -0,23 | 0,54 | 0,56 | 1,22 | 2,49 | -1,56 | - | | | |
| 3-3-2 | 0,19 | 0,30 | -0,89 | 0,87 | -0,29 | 1,51 | 0,28 | 0,45 | -0,43 | -0,07 | -1,55 | - | | |
| 11-124 | 0,80 | -0,38 | 0,22 | -0,35 | -0,10 | 0,41 | -0,62 | -0,50 | 1,48 | -0,45 | 0,49 | -2,03 | - | |
| 11-65 | 0,09 | -0,05 | 0,39 | -0,35 | -1,91 | 0,27 | 0,73 | -1,61 | -0,01 | 0,39 | 0,34 | 1,52 | 1,31 | - |
| S | 0,96 | 0,49 | 1,32 | 1,46 | 1,36 | 0,53 | 0,32 | 0,74 | 1,59 | 1,70 | 1,46 | 1,11 | 0,85 | 0,95 |
| NSR(sp) = 0,13 | | | | | | | | | | | | | | |

### 3.5.4. Комбинационная способность по признаку «средняя длина внутренней кочерыги»

Длина внутренней кочерыги – важный сортоотличительный признак и имеет большое хозяйственное значение. Внутренняя кочерыга может быть короткая (до 1/3 высоты кочана), средняя (около 1/2 высоты кочана), длинная (более 1/2 высоты кочана). Оптимальной для $F_1$ гибридов считается внутренняя кочерыга средней длины: 35-40% от высоты кочана. При меньших значениях возможно растрескивание кочанов вдоль внутренней кочерыги во время уборки. При этом слишком длинная кочерыга уменьшает товарную часть кочана.

Для оценки длины внутренней кочерыги относительно кочана было высчитано процентное соотношение этих показателей (табл. 15). В результате полученных данных выделены гибридные комбинации, имеющие среднюю длину внутренней кочерыги. Следует отметить, что большинство линий удвоенных гаплоидов имели длинную внутреннюю кочерыгу относительно небольшой длины кочана. Однако данный показатель в гибридных комбинациях с использованием этих линий варьировал в широких пределах. Поэтому, для оценки хозяйственной значимости необходимо знать механизмы наследования данного признака в определенной гибридной комбинации.

Таблица 15 – Процентное соотношение длины внутренней кочерыги к высоте кочана у родительских линий и гибридных комбинаций капусты белокочанной, %

| ♂ \ ♀ | 1-18 | 1-123 | 1-19 | 5-13 | 5-11 | 2-307 | 2-45 | 2-123 | 2-331 | 3-3-1 | 3-3-3 | 3-3-2 | 11-124 | 11-65 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1-18 | **26** | 29 | 36 | 50 | 55 | 39 | 48 | 34 | 56 | 27 | 38 | 47 | 41 | 41 |
| 1-123 | 37 | **36** | 34 | 68 | 53 | 35 | 58 | 50 | 47 | 25 | 36 | 40 | 50 | 50 |
| 1-19 | 28 | 34 | **77** | 70 | 53 | 32 | 26 | 47 | 59 | 27 | 27 | 22 | 39 | 58 |
| 5-13 | 34 | 29 | 50 | **63** | 49 | 28 | 43 | 47 | 54 | 28 | 49 | 27 | 40 | 43 |
| 5-11 | 28 | 21 | 46 | 33 | **55** | 37 | 44 | 38 | 53 | 25 | 54 | 31 | 51 | 51 |
| 2-307 | 33 | 30 | 29 | 69 | 90 | **58** | 61 | 42 | 25 | 30 | 33 | 24 | 33 | 28 |
| 2-45 | 22 | 45 | 30 | 77 | 98 | 39 | **90** | 39 | 30 | 25 | 46 | 52 | 59 | 54 |
| 2-123 | 36 | 34 | 55 | 65 | 86 | 34 | 48 | **96** | 22 | 27 | 44 | 23 | 65 | 51 |
| 2-331 | 43 | 29 | 38 | 46 | 63 | 33 | 56 | 47 | **31** | 30 | 53 | 31 | 45 | 24 |
| 3-3-1 | 51 | 26 | 82 | 43 | 37 | 36 | 45 | 49 | 56 | **70** | 57 | 19 | 38 | 57 |
| 3-3-3 | 50 | 27 | 45 | 39 | 53 | 31 | 43 | 54 | 41 | 53 | **51** | 25 | 36 | 42 |
| 3-3-2 | 49 | 37 | 36 | 64 | 38 | 34 | 54 | 49 | 48 | 44 | 48 | **57** | 49 | 37 |
| 11-124 | 52 | 38 | 35 | 60 | 32 | 30 | 49 | 38 | 42 | 55 | 46 | 41 | **41** | 48 |
| 11-65 | 77 | 46 | 38 | 34 | 41 | 68 | 82 | 21 | 37 | 64 | 61 | 56 | 49 | **76** |
| Стандарты: F1Северянка - 51 %; F1 Галакси – 29 % | | | | | | | | | | | | | | |

Дисперсионный анализ результатов исследования по признаку «средняя длина внутренней кочерыги» показал существенные различия изучаемых генотипов и комбинационной способности (прил. 9, 10).

Линии, имеющие отрицательные эффекты ОКС целесообразно использовать в селекции на короткую внутреннюю кочерыгу. К ним относятся линии 1-18, 1-123, 1-19, 5-13, 2-307, 3-3-3, 3-3-2 (табл. 16).

Наибольшее влияние на наследование размеров внутренней кочерыги плазмогенов, увеличивающих длину (при условии использования их в качестве материнского компонента скрещивания) отмечено у линий 5-13, 5-11, 2-123, 2-331, 11-124, 11-65. Линии 1-18, 1-123, 1-19, 2-307, 2-45, 3-3-1, 3-3-3, 3-3-2 имеют плазмогены, которые уменьшают длину внутренней кочерыги при использовании их в качестве отцовских компонентов.

Широкого варьирования значений вариансСКС не выявлено (табл. 17). Это связано с тем, что большинство изученных гибридных комбинаций имели среднюю длину внутренней кочерыги, которые соответствовали значениям стандартов.

Таблица 16 – Средняя длина внутренней кочерыги линий удвоенных гаплоидов и гибридов F1, эффекты ОКС и средние цитоплазматические эффекты самонесовместимых родительских линий, см (2014-2016 годы)

| ♂ \ ♀ | 1-18 | 1-123 | 1-19 | 5-13 | 5-11 | 2-307 | 2-45 | 2-123 | 2-331 | 3-3-1 | 3-3-3 | 3-3-2 | 11-124 | 11-65 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1-18 | **4,36** | 5,98 | 4,55 | 4,01 | 6,01 | 5,78 | 6,98 | 5,18 | 7,88 | 6,63 | 4,94 | 9,93 | 8,04 | 6,20 |
| 1-123 | 4,82 | **5,46** | 5,29 | 6,11 | 6,38 | 5,39 | 7,67 | 8,43 | 6,82 | 5,97 | 4,46 | 8,82 | 9,43 | 8,88 |
| 1-19 | 4,52 | 5,64 | **6,91** | 7,11 | 5,88 | 4,94 | 5,42 | 6,61 | 9,57 | 5,68 | 3,67 | 4,44 | 7,39 | 10,43 |
| 5-13 | 5,23 | 4,39 | 7,74 | **6,29** | 5,10 | 4,08 | 6,33 | 7,89 | 6,64 | 6,76 | 7,01 | 5,33 | 6,50 | 6,41 |
| 5-11 | 5,00 | 4,22 | 7,43 | 6,22 | **5,94** | 5,60 | 6,89 | 6,49 | 6,37 | 4,61 | 6,46 | 6,54 | 8,37 | 8,94 |
| 2-307 | 5,68 | 5,48 | 5,53 | 5,93 | 7,51 | **7,00** | 7,79 | 7,52 | 5,29 | 5,36 | 4,78 | 4,65 | 4,38 | 5,18 |
| 2-45 | 4,38 | 6,06 | 5,34 | 8,66 | 10,50 | 6,37 | **8,38** | 6,51 | 8,55 | 5,54 | 6,25 | 9,66 | 7,39 | 10,18 |
| 2-123 | 6,06 | 5,39 | 5,69 | 7,36 | 7,03 | 6,06 | 8,01 | **7,83** | 3,58 | 5,29 | 7,90 | 4,22 | 8,43 | 7,88 |
| 2-331 | 5,39 | 5,16 | 4,85 | 9,59 | 6,50 | 5,83 | 7,78 | 9,40 | **4,33** | 6,60 | 7,89 | 5,84 | 6,52 | 4,47 |
| 3-3-1 | 5,64 | 4,90 | 7,61 | 7,47 | 6,90 | 6,66 | 7,69 | 8,46 | 10,38 | **4,93** | 6,85 | 4,33 | 5,19 | 9,65 |
| 3-3-3 | 5,70 | 4,24 | 6,68 | 5,94 | 9,97 | 5,43 | 7,29 | 8,66 | 8,24 | 5,82 | **4,56** | 4,99 | 6,22 | 8,49 |
| 3-3-2 | 5,48 | 5,54 | 7,22 | 7,68 | 7,26 | 5,87 | 6,90 | 5,39 | 8,36 | 5,84 | 4,75 | **4,59** | 7,34 | 7,05 |
| 11-124 | 5,46 | 5,61 | 6,58 | 6,61 | 6,01 | 5,24 | 6,61 | 5,56 | 7,36 | 7,67 | 6,86 | 5,67 | **6,98** | 8,56 |
| 11-65 | 7,00 | 7,17 | 6,61 | 6,38 | 6,68 | 6,08 | 7,50 | 4,56 | 6,37 | 9,53 | 6,71 | 6,18 | 5,85 | **6,16** |
| G | -0,73 | -0,45 | -0,20 | -0,02 | 0,18 | -0,69 | 0,83 | 0,27 | 0,29 | 0,04 | -0,23 | -0,26 | 0,25 | 0,70 |
| gr ♀ | -1,15 | -1,12 | -0,20 | 0,32 | 0,49 | -0,75 | 0,74 | 0,54 | 0,63 | -0,33 | 0,55 | -0,41 | 0,51 | 1,26 |
| gs ♂ | -0,31 | 0,22 | -0,19 | -0,37 | -0,13 | -0,63 | 0,92 | -0,01 | -0,05 | 0,41 | 0,10 | -0,11 | -0,01 | 0,14 |
| ME | -0,84 | -1,34 | -0,01 | 0,69 | 0,61 | -0,13 | -0,18 | 0,55 | 0,68 | -0,74 | -0,65 | -0,29 | 0,52 | 1,12 |
| F1-p | 1,51 | 0,63 | -0,67 | 0,19 | 0,79 | -1,30 | -1,13 | -1,15 | 2,64 | 1,73 | 1,83 | 1,77 | -0,26 | 1,11 |

НСР 05 (х) =1,09; НСР 05 (ОКС) = 0,38; НСР 05 (ME) = 0,28;
Стандарты: F1Северянка - 9,16 см; F1 Галакси – 7,28 см

Таблица 17 – Анализ эффектов и варианс СКС самонесовместимых родительских линий по признаку «средняя длина внутренней кочерыги» (2014-2016 годы)

| ♂ \ ♀ | 1-18 | 1-123 | 1-19 | 5-13 | 5-11 | 2-307 | 2-45 | 2-123 | 2-331 | 3-3-1 | 3-3-3 | 3-3-2 | 11-124 | 11-65 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1-18 | - | | | | | | | | | | | | | |
| 1-123 | 0,09 | - | | | | | | | | | | | | |
| 1-19 | -1,03 | -0,38 | - | | | | | | | | | | | |
| 5-13 | -1,12 | -0,77 | 1,15 | - | | | | | | | | | | |
| 5-11 | -0,43 | -0,92 | 0,18 | -0,99 | - | | | | | | | | | |
| 2-307 | 0,66 | 0,08 | -0,37 | -0,77 | 0,57 | - | | | | | | | | |
| 2-45 | -0,91 | -0,01 | -1,75 | 0,19 | 1,20 | 0,45 | - | | | | | | | |
| 2-123 | -0,40 | 0,60 | -0,42 | 0,89 | -0,18 | 0,72 | -0,33 | - | | | | | | |
| 2-331 | 0,59 | -0,34 | 0,62 | 1,36 | -0,53 | -0,54 | 0,55 | -0,56 | - | | | | | |
| 3-3-1 | 0,34 | -0,65 | 0,31 | 0,60 | -0,96 | 0,17 | -0,75 | 0,08 | 1,66 | - | | | | |
| 3-3-3 | -0,21 | -1,46 | -0,89 | 0,24 | 1,77 | -0,47 | -0,33 | 1,75 | 1,51 | 0,03 | - | | | |
| 3-3-2 | 2,21 | 1,40 | -0,21 | 0,30 | 0,49 | -0,28 | 1,22 | -1,69 | 0,58 | -1,19 | -1,14 | - | | |
| 11-124 | 0,74 | 1,22 | 0,43 | -0,17 | 0,27 | -1,25 | -0,58 | -0,02 | -0,10 | -0,36 | 0,03 | 0,02 | - | |
| 11-65 | 0,14 | 1,28 | 1,53 | -0,77 | 0,44 | -0,87 | 0,82 | -1,24 | -2,06 | 2,36 | 0,64 | -0,32 | -0,24 | - |
| S | 0,82 | 0,81 | 0,81 | 0,71 | 0,72 | 0,43 | 0,76 | 0,83 | 1,13 | 1,03 | 1,13 | 1,23 | 0,37 | 1,51 |

NSR(sp) = 0,10

## 3.6. Характеристика линий удвоенных гаплоидов и гибридных комбинаций капусты белокочанной по основным хозяйственно ценным признакам

### 3.6.1. Комплексная оценка эффектов ОКС линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной

Для определения путей использования линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной на основании комбинационной способности нами была проведена их комплексная оценка по основным хозяйственно ценным признакам (табл. 18).

Таблица 18 – Комплексная оценка эффектов ОКС линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной (2014-2016 годы)

| Линии | Значения эффектов ОКС | | | |
|---|---|---|---|---|
| | средняя масса кочана, кг | средний диаметр розетки листьев, см | средняя высота наружной кочерыги, см | средняя длина внутренней 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 |
| $НСР_{05}$ | 0,03 | 0,61 | 0,39 | 0,38 |

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 (с массой 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.

### 3.6.2. Биохимический анализ гибридных комбинаций удвоенных гаплоидов капусты белокочанной

При оценке качества выращенной продукции важным показателем является химический состав продуктовых органов. Содержание сухого вещества, сахаров, витамина С, нитратов в продукции определяет не только пригодность ее для употребления, но и степень сохранности продукции при длительном хранении. Оценено 13 перспективных гибридных комбинаций капусты белокочанной на основе линий удвоенных гаплоидов (прил. 11). Стандартами служили гибриды $F_1$ Северянка и $F_1$ Галакси. В таблице 19 представлены биохимические данные перспективных гибридных комбинаций в сравнении со стандартами.

Все гибридные комбинации характеризуются высоким содержанием сухого вещества от 9,1 до 10,5 %. Содержание аскорбиновой кислоты находится в пределах от 21,1 до 44,0 мг/%. Исключение составляет гибридная комбинация 2-45х1-18с содержанием аскорбиновой кислоты 92,0 мг/%, это почти в 3 раза превышает содержание в остальных образцах. В этой же гибридной комбинации отмечено наименьшее содержание нитратов, которое составляет 33,0 мг/кг. В остальных образцах содержание нитратов составляет от 33,0 до 124,0 мг/кг, это значение не превышает ПДК. По санитарно-гигиеническим нормам ПДК нитратов капусты белокочанной позднего срока созревания составляет 500 мг/кг сырой массы (ГОСТ Р 51809-2001). Содержание моносахаров варьирует от 3,3% до 4,6 %, сумма сахаров находится в пределах от 4,3% до 5,1%.

Таблица 19 – Оценка биохимических показателей гибридных комбинаций, полученных с использованием линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной (2014 -2016 годы)

| Вариант | Сухое в-во, % | Моносахара, % | Сумма сахаров, % | Содержание нитратов, мг/кг | Содержание аскорбиновой кислоты, мг/% |
|---|---|---|---|---|---|
| 1-18х 5-13 | 9,1 | 4,4 | 4,7 | 83,0 | 35,2 |
| 2-45 х 1-18 | 9,8 | 4,3 | 5,0 | 33,0 | 92,0 |
| 2-123 х 1-19 | 9,3 | 4,3 | 4,5 | 84,0 | 44,0 |
| 2-331 х 5-13 | 9,8 | 4,3 | 4,7 | 89,0 | 37,0 |
| 2-45 х 5-13 | 9,9 | 4,3 | 4,9 | 59,0 | 35,2 |
| 2-331х 11-124 | 9,6 | 4,2 | 4,4 | 105,0 | 33,4 |
| 3-3-3 х 1-19 | 10,5 | 4,6 | 5,1 | 81,0 | 38,7 |
| 3-3-3х2-331 | 10,1 | 3,7 | 4,4 | 100,0 | 26,4 |
| 5-13х2-307 | 9,9 | 3,9 | 4,3 | 124,0 | 21,1 |
| 11-65 х 1-18 | 9,3 | 4,0 | 4,8 | 88,0 | 29,9 |
| 11-124 х 5-11 | 9,3 | 4,6 | 4,9 | 108,0 | 35,2 |
| 11-124 х 5-13 | 9,5 | 4,0 | 4,4 | 84,0 | 35,2 |
| 11-124х2-307 | 10,1 | 3,3 | 4,9 | 80,0 | 37,6 |
| F1 Северянка | 9,0 | 4,1 | 4,7 | 109,0 | 31,7 |
| F1 Галакси | 10,3 | 3,8 | 4,5 | 98,0 | 37,5 |
| НСР | 0,4 | 0,1 | 0,2 | 26,2 | 20,4 |

Следовательно, все гибридные комбинации имеют отличные характеристики по основным биохимическим показателям, в некоторых

комбинациях превышающие стандарты. При оценке перспективных гибридных комбинаций, необходимо исходить из комплексной их оценки, включающей также продуктивность и устойчивость к основным болезням и вредителям.

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

Для создания устойчивых сортов и гибридов культур *Brassica oleracea* в мире проведено много работ по поиску источников устойчивости внутри вида. Однако большинство из них легко преодолевается патогеном в полевых условиях (Crute et al., 1980; Dixon, 1986).

Использование удвоенных гаплоидных линий позволяет проводить более эффективно отбор желательных генотипов из сравнительно небольших популяций по сравнению с традиционной технологией выделения самоопыленных генотипов (Lazar, 1984). Получение стабильных гомозиготных линий из популяции облегчает поиск редких генотипов, в том числе устойчивых к болезням и вредителям. При комплексной оценки гибридных комбинаций на хозяйственную ценность необходимо иметь данные устойчивости к основным болезням и вредителям.

Учет пораженностью болезнями (фузариозное увядание и альтернариоз) и поврежденностью вредителями проводили перед уборкой визуально на естественном фоне в полевых условиях (табл. 20).

Из полученных данных видно, что в годы исследования наблюдалась высокая распространенность патогена фузариозного увядания от 60 до 100%. Однако, степень поражения в гибридных комбинациях варьировала в пределах 3,1-7,5%. Симптомы альтернариоза полностью отсутствовали в трех гибридных комбинациях, в остальных распространенность варьировала в широких пределах от 10 до 85%. Степень поражения фузариозным увяданием в четырёх гибридных комбинациях оказалось ниже стандартных, альтернариозом – в шести гибридных комбинациях.

Из вредителей 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%.

Учет пораженности гибридных комбинаций капусты белокочанной килой проводили в период технической спелости кочана на искусственном инфекционном фоне с нагрузкой $10^6$ спор КОЕ/см$^3$ (табл. 21). Учитывали пораженность каждого растения индивидуально согласно составленной нами шкале от 0 до 4 баллов (рис. 10).

Рис.10 Шкала пораженности капусты белокочанной *Plasmodiophora brassicae.*

В результате проведенного анализа установлено, что распространенность болезни находилась в пределах от 25 до 80%., однако степень поражения растений болезнью варьировала от 12,5 % до 45%. В дальнейшей работе планируется изучение устойчивости к киле полученных DH-линий индивидуально путем инокуляции возбудителем на стадии рассады.

Таблица 20 – Результаты оценки устойчивости гибридных комбинаций капусты белокочанной к основным болезням и вредителям (2014-2016 годы)

| Гибридная комбинация | Пораженность болезнями, % | | | | | | Поврежденность вредителями, % | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Фузариозное увядание | | Альтернариоз | | Кила | | Распространенность | Степень повреждения |
| | Распространенность | Степень поражения | Распространенность | Степень поражения | Распространенность | Степень поражения | | |
| 1-18х 5-13 | 89,0 | 6,1 | 0 | 0 | 25 | 12,5 | 100,0 | 12,2 |
| 2-45 х 1-18 | 90,0 | 5,5 | 10,0 | 6,5 | 75 | 31 | 80,0 | 4,4 |
| 2-123 х 1-19 | 60,0 | 3,1 | 0 | 0 | 62,5 | 37,5 | 50,0 | 2,5 |
| 2-331 х 5-13 | 100,0 | 6,1 | 80,0 | 1,2 | 25 | 12,5 | 90,0 | 5,0 |
| 2-45 х 5-13 | 90,0 | 5,0 | 30,0 | 1,6 | 67 | 42 | 70,0 | 4,4 |
| 2-331х 11-124 | 100,0 | 6,0 | 10,0 | 0,5 | 25 | 12,5 | 80,0 | 5,5 |
| 3-3-3 х 1-19 | 100,0 | 7,5 | 50,0 | 2,5 | 25 | 6 | 100,0 | 10,0 |
| 3-3-3х2-331 | 90,0 | 5,0 | 80,0 | 3,0 | 80 | 45 | 90,0 | 7,0 |
| 5-13х2-307 | 100,0 | 6,6 | 10,0 | 1,6 | 75 | 31 | 90,0 | 6,6 |
| 11-65 х 1-18 | 70,0 | 4,0 | 0 | 0 | 40 | 20 | 80,0 | 6,5 |
| 11-124 х 5-11 | 80,0 | 3,8 | 70,0 | 3,3 | 33 | 17 | 31,0 | 6,0 |
| 11-124 х 5-13 | 100,0 | 6,5 | 30,0 | 1,5 | 50 | 19 | 80,0 | 5,0 |
| 11-124х2-307 | 60,0 | 4,4 | 20,0 | 1,6 | 25 | 12,5 | 100,0 | 5,0 |
| F1 Северянка | 100,0 | 5,9 | 85,0 | 2,0 | 100 | 35 | 100,0 | 7,8 |
| F1 Галакси | 95,0 | 5,0 | 80,0 | 1,8 | 25 | 20 | 60 | 5,7 |
| НСР | 11,5 | 1,0 | 21,6 | 1,7 | 21,6 | 10,4 | 19,8 | 2,8 |

## 3.7. Характеристика перспективного гибрида капусты белокочанной $F_1$ «Натали»

В результате оценки основных хозяйственно ценных признаков гибридных комбинаций капусты белокочанной, полученных на основе линий удвоенных гаплоидов, была выделена гибридная комбинация 3-3-3х1-19, которая соответствовала созданной модели $F_1$ гибрида (табл. 21).

Таблица 21 – Характеристика гибрида $F_1$ Натали по основным хозяйственно ценным признакам

| Показатели | | $F_1$ Натали |
|---|---|---|
| Вегетационный период от высадки рассады, суток | | 125 |
| Масса кочана, кг | | 3,4 |
| Диаметр розетки листьев, см | | 61,2 |
| Длина внутренней кочерыги, см | | 5,7 |
| Высота наружной кочерыги, см | | 11,2 |
| Биохимические: | сухое вещество, % | 10,5 |
| | моносахара,% | 4,6 |
| | сумма сахаров, % | 5,1 |
| | нитраты, мг/кг | 81,0 |
| | аскорбиновая кислота, мг/% | 38,7 |
| Степень поражения болезнями и вредителями | фузариозное увядание, % | 7,5 |
| | альтернариоз, % | 2,5 |
| | кила, % | 6,0 |
| | поврежденность вредителями, % | 10,0 |

На основании данных показателей в 2017 году был подготовлен гибрид $F_1$ «Натали» и передан на государственное испытание в ФГБУ «Госсорткомиссия» (рис. 11).

Рис. 11 – Перспективный гибрид капусты белокочанной $F_1$ «Натали»

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

Целесообразность применения современных методов в селекции капусты белокочанной определяется экономической эффективностью производства и временными затратами.

Селекция капусты белокочанной в настоящее время, в основном, ориентирована на создание $F_1$ гибридов, для получения которых требуются константные родительские линии. При селекции на гетерозис на создание таких линий у перекрёстноопыляющихся культур приходится затрачивать до 7-10 лет

(однолетние растения) и 14-20 лет (двулетние растения).

Для ускорения отдельных этапов селекционного процесса в нашей работе по созданию гомозиготных линий использованы камеры искусственного климата с заданным световым и температурным режимом. Использование этих климатических камер в селекционной работе позволяет перевести выращивание двулетних культур в одногодичный цикл. Использование камер искусственного климата позволяют в регулируемых условиях сократить селекционный процесс в 2 раза (Бондарева и др., 2014).

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

1. Посев семян и изучение исходного материала, отбор маточников, яровизация: весна-осень Х – год начала селекционной работы;

2. Производство линий удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор (получение, адаптация, яровизация на стадии «штеклингов»): зима-осень Х+1;

3. Размножений линий удвоенных гаплоидов, получение гибридных комбинаций, оценка комбинационной способности линий: зима-осень Х+2.

Таким образом, необходимо 3 года для получения линий со 100%-ной гомозиготностью.

Далее определены основные экономические показатели на производство линий в конкретных условиях Московской области, руководствуясь при этом затратами на выращивание согласно технологической карте возделывания капусты белокочанной (прил. 12), сметой на производство линий удвоенных гаплоидов (прил. 13) и наблюдениями (табл. 22).

Таблица 22 – Затраты на создание чистых линий капусты белокочанной с использованием различных методов селекции

| Показатели | | Традиционный метод селекции путем инбридинга | | Биотехнологический метод культуры изолированных микроспор *in vitro* |
|---|---|---|---|---|
| | | в течение 14 лет | в течение 7 лет с использованием камер искусственного климата | |
| Затраты на выращивание, млн.руб./га | открытый грунт | 1,446 | 1,446 | 0,413 |
| | защищен-ный грунт | 0,364 | - | - |
| Затраты на хранение маточников, млн.руб./50 растений | | 1,473 | - | - |
| Затраты на гибридизацию в камере искусственного климата, млн.руб./50 растений | | - | 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 |

Полученные данные показали, 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 по сравнению с традиционным методом селекции. А это является необходимым для быстрого реагирования на запросы потребительского рынка.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Оптимизирована методика получения удвоенных гаплоидов с большим выходом эмбриоидов путем модификации питательной среды. Установлена необходимость подбора pH 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 pH 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 $F_1$ 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 механизирован-

ной 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 F1 «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 oxysporum* – 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 – 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 содержание зеатина в концентрации 1 мг/л и ампициллином в концентрации 100мг/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 использовать среду для проращивания пыльцевых зерен с содержанием трис-буфера.

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. Рекомендуются для производственного испытания гибрид $F_1$ «Натали».

6. Полученные результаты могут быть использованы при чтении лекций и проведении практических работ по дисциплинам: «Сельскохозяйственная биотехнология», «Селекция и семеноводство», «Физиология растений».

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. Абрамова, З.В. Генетика: программированное обучение / З.В. Абрамова. – М.: Агропромиздат, 1985. – 286 с.
2. Анащенко, А. В. Изучение генетической системы ЦМС-Rf у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) / А. В. Анащенко, М. В. Дука // Генетика. – 1985. – Т.21, № 12. – С.1999-2004.
3. Ахатов, А.К. болезни и вредители овощных культур и картофеля /А.К. Ахатов, Ф.Б. Ганнибал, Ю.И. Мешков, Ф.С. Джалилов, В.Н. Чижов, А.Н. Игнатов, В.П. Полищук, Т.П. Шевченко, Б.А. Борисов, Ю.М. Стройков, О.О. Белошапкина // Товарищество научных изданий КМК. – 2013. – 463 с.
4. Балашова, Н.Н. Жизнеспособность микрогаметофита белокочанной капусты под влиянием возбудителей бактериозов и килы / Н.Н. Балашова, А.Н. Игнатов, А.Н. Самохвалов, Ю.Б. Рогачев, Н.А. Шмыкова // С.-х. биология. – 1995. – № 5. – С.115-118.
5. Белик, В.Ф. Методика опытного дела в овощеводстве и бахчеводстве / В.Ф. Белик. - М.: Агропромиздат, 1992. – 319 с.
6. Бондарева, Л.Л. Научное обоснование и разработка системы методов селекции и семеноводства капустных культур: автореф. дис. … д-ра с.-х. наук: 06.01.05 / Бондарева Людмила Леонидовна. – М. – 2009. – 47с.
7. Бондарева, Л.Л. Научное обоснование и разработка системы методов селекции и семеноводства капустных культур: дис. … д-ра с.-х. наук: 06.01.05 / Бондарева Людмила Леонидовна. – М., 2009. – 365 с.
8. Бондарева, Л.Л. Использование камер искусственного климата при селекции капусты / Л.Л. Бондарева, О.А. Разин // Овощи России – 2014. – №4 – 37 с.
9. Бочкарев, Н. И. Мужская стерильность / Н. И. Бочкарев, Л. Г. Цухло // в кн. Биология, селекция и возделывание подсолнечника. – М.: Агропромиздат. – 1991. – С.49-52.

10. Брежнев, Д.Д. Гетерозис и его значение: в кн. Гетерозис в овощеводстве / Д.Д. Брежнев. – Л.: Колос. – 1966. – С. 5-52.
11. Бунин, М.С. Мужская стерильность сельскохозяйственных растений семейства *Brassicacea* L и ее использование в селекции / М.С. Бунин // С.-х. биология. – 1994. – №1. – С. 20-31.
12. Бунин, М.С. Методы репродуктивной биологии в селекции овощных культур рода *Brassica* L. / М.С. Бунин, Н.А. Шмыкова, В.И. Степанов, В.И. Старцев, Л.Л. Бондарева. – М.: Минсельхоз, 2003. – С.37-39.
13. Бунин, М.С. Использование биотехнологических методов для получения исходного селекционного материала капусты / М.С. Бунин, Н.А. Шмыкова. – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2004. – 44с.
14. Бунин, М.С. Производство гибридных семян овощных культур: уч. пособие / М. С. Бунин, Г. Ф. Монахос, В.И. Терехова. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2011. – 182 с.
15. Буренин, В.И. Способ оценки общей комбинационной способности на основе топкросса / В.И. Буренин // Бюл. ВИР. – 1971. – вып.19. – С.32-36.
16. Бутенко, Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1984. – 272 с.
17. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160с.
18. Ганнибал, Ф.Б. Оценка устойчивости селекционного материала крестоцветных и пасленовых культур к альтернариозам: методическое пособие / Ф.Б. Ганнибал, Е.Л. Гасич, А.С. Орина; под ред. М.М. Левитина. – СПб.: ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии, 2011. – 50 с.
19. Гужов, Ю.Л. Гетерозис и урожай / Ю.Л. Гужов. – М.: Колос. – 1969. – 224 с.

20. Гужов, Ю.Л. Селекция и семеноводство культивируемых растений / Ю.Л. Гужов, А. Фукс, П. Валичек. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Мир, 2003. – 536с.
21. Гуляев, Г.В. Генетика / Г.В. Гуляев // 3-е изд. перераб. и доп. – М.: Колос. – 1984. – 351 с.
22. Давыдова, Н.Н. Усовершенствование метода культуры пыльников для использования в селекционном процессе капусты (*Brassica oleracea* L.): автореф. дис. … канд. с.-х. наук: 06.01.05, 03.00.23 / Давыдова Наталья Николаевна. – М, 2008. – 25 с.
23. Даскалов, Х.С. Сущность и значение гетерозиса. Опыт овощеводства / Х.С. Даскалов // в кн.: Наука и человечество. – М.: Знание. – 1981. – С.121-126.
24. Джалилов, Ф.С. Вредоносность сосудистого бактериоза капусты / Ф.С. Джалилов, Г.Ф. Монахос, Р.Д. Тивари // Известия ТСХА. – 1989. – №3. – С. 169-172.
25. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / под ред. Б.А. Доспехова. – М.: Агропроимздат, 1985. – 350 с.
26. Дремлюк, Г.К. Метод оценки комбинационной способности при нерегулярных скрещиваниях / Г.К. Дремлюк // Доклады ВАСХНИЛ. – 1976. – №1. – С.10-12.
27. Дьяков, Ю.Т. Популяционная биология фитопатогенных грибов / Ю.Т. Дьяков. - М.: Изд. дом «Муравей», 1998. – 384 с.
28. Иванов, М. К. Цитоплазматическая мужская стерильность и восстановление фертильности пыльцы у высших растений / М.К. Иванов, Г. М. Дымшиц // Генетика. – 2007. – Т.43, № 4. – С.437-576.
29. Калашникова, Е.А. Технология получения дигаплоидных растений рода *Brassica in vitro* / Е.А. Калашникова, М.Д. Чунг, А.А. Соловьев, В.С. Шевелуха // Доклады РАСХН. – 2011. – №1. – С. 5-8.

30. Карпеченко, Г.Д. Теоретические основы селекции растений / Г.Д. Карпеченко. - М.-Л.: Сельхозгиз, 1935. – Т.1. – 435 с.
31. Кашнова, Е.В. Устойчивость селекционного материала капусты белокочанной к болезням в условиях Алтайского края / Е.В. Кашнова, Н.Н. Чернышева // Вестник Алтайского государственного университета. – 2009. – №2(52) – С. 8-10.
32. Квасников, Б.В. Методика оценки сортов капусты на устойчивость к киле / Б.В. Квасников, Т.А. Белик. – М. ВАСХНИЛ., 1970. – 16 с.
33. Квасников, Б.В. Килоустойчивость сортов и видов крестоцветных культур / Б.В. Квасников, Ю.П. Антонов // Защита растений. – 1972. – №9. – 6-17.
34. Квасников, Б.В. Основные направления селекции капусты в НИИ овощного хозяйства / Б.В. Квасников, Т.А. Белик // Бюл.ВИР. – 1980. – Вып.101. – С. 29-31.
35. Кельрейтер, И.Г. Учение о поле и гибридизация растений / И.Г. Кельрейтер. – М.Л.: Огиз-Сельхозгиз. – 1940. – 245 с.
36. Китаева, И.Е. Капуста / И.Е. Китаева // М.: Московский Рабочий. – 1977. – 128 с.
37. Китаева, И.Е., Белокочанная капуста / И.Е. Китаева, В.И. Орлова // М.: Россельхозиздат, 1980. – 44 с.
38. Колобердина, З.И. Использование гетерозиса для повышения урожайности / З.И. Колобердина // Вестник с.-х. науки. – М. – 1941. –Вып.1. – С.79-84.
39. Котлярова, О.В. Усовершенствование элементов технологии получения регенерантов для создания удвоенных гаплоидов моркови (*Daucus carota* L.): автореф. дис. … канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Котлярова Оксана Валерьевна. – М., 2010. – 26 с.
40. Крашенинник, Н.В. Особенности технологии выращивания белокочанной капусты / Н.В. Крашенинник // Гавриш. – 2010. – №2. – С. 16-19.

41. Крючков, А.В. Проявление самонесовместимости у некоторых сортов белокочанной капусты/ А.В. Крючков // Гетерозис в овощеводстве. – М.: Колос. – 1968.- С. 289- 292.
42. Крючков, А.В. Основные принципы получения гибридных семян на основе самонесовместимости / А.В. Крючков // Извест. ТСХА. – 1972. – Вып.1. – С.124-131.
43. Крючков, А.В. Оценка общей и специфической комбинационной способности самонесовместимых инбредных линий белокочанной капусты при летнем и весеннем выращивании гибридов / А.В. Крючков, Ш.Б. Кулиев, Р.Д. Алиаскер-Заде // Извест. ТСХА. – 1979. – Вып.1. – С.108-118.
44. Крючков, А.В. Проявление самонесовместимости у белокочанной капусты в зависимости от условий выращивания / А.В. Крючков, А.Г. Гутиэррес // Изв. ТСХА. – 1986. – Вып.4. – С.45-48.
45. Кулышева, Ю. Изучение гетерозиса у капусты / Ю. Кулышева // Сборник рефератов. Молотов, 1947. – С. 45-46.
46. Лежнина, А.А. Инбредные линии капусты краснокочанной, устойчивые к фузариозу – основа создания гибридов / А.А. Лежнина, Н.А. Круглова // Картофель и овощи. – 2011. – №4. – 25 с.
47. Лизгунова, Т.В. Капуста / Т.В. Лизгунова // Культурная флора СССР Т. 11. – Л.: Колос. – 1984. – 328 с.
48. Лудилов, В.А. Семеноводство овощных и бахчевых культур / В.А. Лудилов. – М.: Глобус, 2000. - 256 с.
49. Лях, В.А. Методы отбора ценных генотипов на уровне пыльцы / В.А. Лях, А.И. Сорока, Л.Ю. Мищенко, М.Г. Калинова, Е.Н. Мирошниченко // Методические рекомендации. – Запорожье: Ин-т масличных культур Укр. академии аграрных наук, 2000. – 213 с.
50. Май, Д.Ч. Совершенствование технологии получения гаплоидных и дигаплоидных растений рапса (*Brassica napus* L.) и белокочанной капусты

(*Brassica oleracea* L.) in vitro: автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.01.06 / Май Дык Чунг. – М., 2010. – 22 с.

51. Малецкая, Е.И. Гаплоидия в апозиготических семенных потомствах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) / Е.И. Малецкая, С.С. Юданова, С.И. Малецкий // Докл. АН. – 2009. – Т.426, № 5. – С.710–713.
52. Малецкий, С.И. Гены самонесовместимости контролируют у цветковых растений перекрестное оплодотворение / С.И. Малецкий // Соровский образовательный журнал, 1996. – Вып.12. – С.19-25.
53. Маслова, А.А. Болезнеустойчивость сортов капусты белокочанной как фактор снижения фитосанитарных рисков в овощеводстве / А.А. Маслова, А.А. Ушаков, В.И. Старцев, Л.Л. Бондарева // Овощи России, 2013. – №3. – С. 50-54.
54. Методические указания по апробации овощных культур / О.Н. Пышная, М.И. Федорова, А.Ф. Агафонов, Л.Л. Бондарева, И.Ю. Кондратьева, И.Б. Коротцева, В.И. Старцев, В.А. Степанов, А.В. Темичев, В.А. Харченко, Н.С. Цыганок, Л.М. Шило, Г.А. Химич; под ред. Л.В. Павлова. – М.: ВНИИССОК, 2006. – 130 с.
55. Монахос, Г.Ф. Проявление комбинационной способности самонесовместимых промежуточных гибридов в зависимости от площади питания четырехлинейных гибридов среднеспелой белокочанной капусты: автореф. дис. … канд. с.-х. наук: 06.01.05. / Монахос Григорий Федорович. – М., 1984 – 22 с.
56. Монахос, Г.Ф. Генетические источники устойчивости к килe крестоцветных (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) при селекции пекинской капусты / Г.Ф. Монахос, Н.С. Теренина //Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 1998. – №3. – 87с.
57. Монахос, Г.Ф. Схема создания двухлинейных гибридов капустных овощных культур на основе самонесовместимости / Г.Ф. Монахос // Изв. ТСХА, 2007. – Вып.2. – С.86-93.

58. Монахос, Г.Ф. Оценка устойчивости капустных растений к киле (возбудитель - *Plasmodiophora brassicae* Wor.): учебно-методическое пособие / Г.Ф. Монахос, Ф.С. Джалилов, С.Г. Монахос. – М.: РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2009. – 23 с.
59. Монахос, С.Г. Связь плоидности с числом хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у диплоидных и амфидиплоидных видов *Brassica* / С.Г. Монахос, М.Л. Нгуен, А.В. Безбожная, Г.Ф. Монахос // С.-х. биология. – 2014. – №5. – С. 44-54.
60. Монахос, С.Г. Устойчивость капусты к сосудистому бактериозу / С.Г. Монахос, Н.В. Елышко // Картофель и овощи. – 2015. – №9. – С. 38-39.
61. Муравлев, А.А. Методические рекомендации по получению андроклинных растений ярового рапса / А.А. Муравлев, О.Г. Кривошеева. – М.: Россельхозакадемия, 1999. – 23 с.
62. Муромцев, Г.С. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г.С. Муромцев, Р.Г. Бутенко, Т.И. Тихоненко, М.И. Прокофьев. – М.: Агропромиздат, 1990. – 383 с.
63. Навашин, М.С. Новая возможность в селекции (об использовании гаплоидов) / М.С. Навашин // Ботанический журнал. – 1934. – Т.19, №4. – С. 640-641.
64. Никулина, Л.Б. Межсортовая гибридизация капусты как способ повышения урожайности / Л.Б. Никулина // автореф. … дис. с.-х. наук. – Мичуринск. – 1954. – 16с.
65. Ницше, В. Гаплоиды в селекции растений. / В. Ницше, Г. Венцель; пер. с англ. В.В. Попова. – М.: Колос, 1980. – 127с.
66. Пакудин, В.З. Оценка комбинационной способности линий кукурузы в диаллельных и анализирующих скрещиваниях / В.З. Пакудин // автореф. дис. … канд. с.-х. наук. – Краснодар. – 1972. – 26 с.
67. Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.

68. Перлова, Р.А. Гетерозисная форма капустного растения / Р.А. Перлова, В.К. Новиков // Бюллетень глав.ботан. сада. – Вып.37. – 1960. – С.107-109.
69. Пивоваров, В.Ф., Капуста, её виды и разновидности (разнообразие и способы выращивания) / В.Ф. Пивоваров, В.И. Старцев. – М.: ВНИИССОК, 2006. – 192с.
70. Пивоваров, В.Ф. Основные направления и результаты селекции и семеноводства капустных культур / В.Ф. Пивоваров, Л.Л. Бондарева // Овощи России. – 2013. – №3. – С. 4-9.
71. Поляков, А.В. Биотехнология в селекции льна / А.В. Поляков. – Тверь: Формат, 2000. – 178 с.
72. Попова, Е.М. Гибридные семена капусты / Е.М. Попова // Сад и огород. – 1958. – №6. – С.10-13.
73. Попова, Е.М. Высокоурожайные гибридные семена капусты / Е.М. Попова // Использование гетерозиса в овощеводстве. – Краснодар. – 1963. – С.165-168.
74. Прохоров, И.А., Селекция и семеноводство овощных культур / И.А. Прохоров, А.В. Крючков, В.А. Комиссаров. – М.: Колос, 1997. – 480 с.
75. Путырский, И.Н. Капуста / И.Н. Путырский. – Ростов-на-Дону.: Феникс, 2004. – 96 с.
76. Пухальский, В.А. Практикум по цитологии и цитогенетике растений / В.А. Пухальский, А.А. Соловьев, Е.Д. Бадаева, В.Н. Юрцев. – М.: КолосС, 2007. – С. 99-100.
77. Раджабли, Е.П. Получение и использование полиплоидных форм растений / Е.П. Раджабли, В.Д. Рудь; под ред. А.Н. Луткова. – Новосибирск: Наука. Сибирское отделение, 1972. – 132 с.
78. Резникова, С.А. Цитология и физиология развивающегося пыльника / С.А. Резникова. – М.: Наука, 1984. – 272с.
79. Рыкова, А.Т. За высокие урожаи капусты / А.Т. Рыкова // Свердлгиз. – 1949. – 7 с.

80. Савченко, В. К. Оценка общей и специфической комбинационной способности полиплоидных форм в системах диаллельных скрещиваний / В.К. Савченко // Генетика. – 1966. – №1. – С.29-40.
81. Савченко, В.К. Многоцелевой метод количественной оценки комбинационной способности в селекции на гетерозис / В.К. Савченко // Генетика. – 1978. – №5 – С. 793-804.
82. Сапожникова, Е.В. Определение содержания АК в окрашенных растительных экстрактах йодометрическим методом / Е.В. Сапожникова, Л. С. Дорофеева// Консервная и овощесушильная промышленность. – 1966. – № 5. – 29 с.
83. Сердюк, М.А. Наследование хозяйственно-ценных признаков инцухт-линий позднеспелой капусты белокочанной используемых при селекции на жаростойкость: дис. … канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Сердюк Михаил Анатольевич. – М., 2003. – 188 с.
84. Синская, Е.Н. Межвидовые скрещивания культурных Brassica / Е.Н. Синская // Труды по прикладной ботаники и селекции. – 1927. – т.17. – Вып.1. – С.3-39.
85. Сорока, А.И. Дифференциация гаплоидных и дигаплоидных растений рапса на цитологическом и морфологическом уровнях / А.И. Сорока // Цитология и генетика. – 2013. – №2. – С.34-39.
86. Старикова, Д.А. Капуста / Д.А. Старикова. – Новосибирск. – 1989. – 63 с.
87. Степанов, В.А. Методические указания по селекции репы японской на холодостойкость с использованием микрогаметофита / В.А. Степанов, М.С. Бунин, Н.Н. Балашова. – М.: ВНИИССОК. – 2000. – 43с.
88. Турбин, Н.В. Генетика гетерозиса и методы селекции растений на комбинационную способность / Н.В. Турбин // Вестник с.-х. науки. – М., 1967. – №3 – С.16-91.
89. Турбин, Н.В. Диаллельный анализ в селекции растений / Н.В. Турбин, Л.В. Хотылева, Л.А. Тарутина. – Минск: Наука и техника. – 1974. – С. 5-20.

90. Федин, М.А. Статистические методы генетического анализа / М.А. Федин, Д.Я. Силис, А.В. Смиряев. – М.: Колос. – 1980. – 207с.
91. Френкель, Р. Механизмы опыления, размножения и селекция растений / Р. Френкель, Э. Галун; пер. с англ. Л.В. Ковалевой. – М.: Колос. – 1982. – 384 с.
92. Хаджинов, М. И. Селекция перекрестноопыляющихся растений / М. И. Хаджинов, Б.И. Пашинин // Теоретические основы селекции растений, 1935. – Т.1. – С.569-596.
93. Химич, Р.Е. Гетерозис у капусты / Р.Е. Химич // Сб.: Итоги работ по селекции овощных культур Грибовской станции. – М. – 1935. - Вып.1. – С.63-81.
94. Хотылева, Л.В. Принципы и методы селекции на комбинационную способность / Л.В. Хотылева // в сб. «Селекция гибридной кукурузы». – Минск: Наука и техника, 1965. – 168 с.
95. Чеботарь, А.А. Эмбриология зерновых, бобовых и овоще-бахчевых возделываемых растений / А.А. Чеботарь, В.Р. Челак, А.М. Мошкович, М.Г. Архипенко; под ред. М.С. Яковлева, Ботан. сад. – Кишинев, 1987. – 224 с.
96. Шаманин, В.П. Общая селекция и сортоведение полевых культур / В.П. Шаманин, А.Ю. Трущенко. – Омск: Изд-во ФГОУ ВПО ОмГАУ, 2006. – 142с.
97. Шмыкова, Н.А. Разработка системы биотехнологических методов, направленных на ускорение селекционного процесса овощных культур: автореф. дис. … д-ра с.-х. наук: 06.010.05, 03.00.23 / Шмыкова Наталья Анатольевна. – М., 2006. – 47 с.
98. Шмыкова, Н.А. Получение удвоенных гаплоидов у растений рода *Brassica* L. / Н.А. Шмыкова, Д.В. Шумилина, Т.П. Супрунова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т.19. – №1. – С. 111-120.
99. Шумилина, Д.В. Влияние генотипа и компонентов среды на эмбриогенез в культуре микроспор капусты китайской *Brassica rapa* ssp. *chinensis* сорта

Ласточка / Д.В. Шумилина, Н.А. Шмыкова, Л.Л. Бондарева, Т.П. Супрунова // Известия РАН. Серия биологическая. – 2015. – №4. – 368с.

100. Aalders, L. E. Monoploidy in cucumbers / L. E. Aalders // J. Hered. – 1958. – Vol.49. – P.41–44.
101. Alexander, M.P. Differential staining of aborted and non-aborted pollen / M.P. Alexander // Stain technol. – 1969. – Vol.44. – P.117-122.
102. Arnison, P.F. Genotype specific response of cultured broccoli anther to cytokinins / P.F.Arnison, P. Donaldson, A. Jackson, C. Sempel, W. Keller // Plant Gell, Tissue and Organ Culture. – 1990. – Vol.3 – P.217-222.
103. Baillie, A.M.R. *In vitro* culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris* / A.M.R. Baillie, D.J. Epp, D. Hucheson, W.A. Keller // Plant Cell Rep. – 1992. – Vol.11. – P.234-237.
104. Binarova, P. Nuclear DNA synthesis during the induction of embryogenesis in cultured microspores and pollen of *Brassica napus* L / P. Binarova, K. Straatman, B. Hause, G. Hause, A.A.M. Lammeren // Theor. Appl. Genet. – 1993. – Vol.87. – P. 9-16.
105. Blakeslee, A.F. A haploid mutant in the Jimson weed *Datura stramonium* / A.F. Blakeslee, J. Belling, M. E. Farnham, A.D. Berger // Science. – 1922. – Vol.55 – P.646-647.
106. Bohanec, B. Ploidy determination using flow cytometry / B. Bohanec // Doubled haploid production in crop plants: a manual / Eds. M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko. – Dordrechts: Kluwer, 2003. – P. 397-403.
107. Bouvier, L. Using radiography to attempt to screen for haploid embryosin apple / L. Bouvier, A. Chavagnat, Y.X. Zhang, Y. Lespinasse // Sci. Hortic. – 1992. – Vol.52. – P.215.
108. Brooks, J. Chemical structure of the exine of pollen walls and a new function for carotenoids in nature /J. Brooks, G. Shaw // Nature. – 1978. – Vol.219. – P.532-533.

109. Bullock, P. Anther culture of wheat (*Triticumae stivum* L.) F-1s and their reciprocal crosses / P. Bullock // Theor. Appl. Genet. – 1982. – Vol.62. – P.155-159.

110. Burnett, L. Enhancement of shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica rapa* ssp. *oleifera* through pretreatment with auxin and cytokinin and use of ethylene inhibitors / L. Burnett, M. Arnoldo, S.Yarrow, B. Huang // Plant Cell Tiss. OrganCult. – 1994. – Vol.37. – P.253-256.

111. Cao, M.Q. Embryogenesis and plant regeneration of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) via in vitro isolated microspore culture / M.Q. Cao, Y. Li, F. Liu, C. Dore // Plant Cell Rep. – 1994. – Vol.13. – P.447-450.

112. Claveria, E. Optimization of cucumber doubled haploid. Line production using in vitro rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos / E. Claveria, J. Garcia-Mas, R. Dolcet-Sanjuan // J. Amer. Soc. Hort. Sci. – 2005. – Vol.130. – P.555–560.

113. Crute, I.R. Variation in *Plasmodiophora brassicae* and resistance to clubroot disease in *Brassicae* and allied crops – a critical review / I.R. Crute, A.R. Gray, P. Crisp, S.T. Buczacki // PlantBreed. Abstr. – 1980. – Vol. 50. – P. 91–104.

114. Crute, I.R. The relationship between genotypes of three *Brassica species* and collections of *Plasmodiophora brassicae* / I.R. Crute, K. Phelps, A. Barnes, S.T. Buczacki, P. Crisp // Plant Pathol. – 1983. – Vol. 32. – P. 405–420.

115. Dias, J.C.S. Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different *Brassica oleracea* morphotypes / J.C.S. Dias, M.G. Martins // Sci. Hort. – 1999. – Vol.82. – P.299-307.

116. Dias, J.C.S. Protocol for broccoli microspore culture / S.J.C. Dias // Doubled haploid production in crop plants: a manual / Eds. M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko. – Dordrecht: Kluwer, 2003. – P.195-204.

117. Dixon, G.R. The susceptibility of *Brassica oleracea* cultivars to clubroot / G.R. Dixon, D.L. Robinson // Plant Pathol. – 1986. – Vol. 35. – P. 101–107.

118. Donald, E.C. Pathotypes of *Plasmodiophora brassicae*, the cause of clubroot, in Australia / E.C. Donald, S.J. Cross, J.M. Lawrence, I.J Porter // Ann Appl Biol. – 2006. – Vol. 148. – P. 239–244.
119. Dore, C. Production de plantesandrogenetiques de chou a choucroute (Brassicaoleracea L. sspcapitatal) par culture d'anthers in vitro: comportement des lignees haploids doubles HD et leurinteretcomme parents d'hybrides F1 / C. Dore, L. Boulidard // Agronomie. – 1988. – P.851-862.
120. Duijs, J.C. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L / J.C. Duijs, R.E. Voorrips, D.L. Visser, J.B. Custers // Euphytica. – 1992. – Vol.60. – P.45-55.
121. Dunwell, J.M. Embriogenesis from pollen *in vitro*. Biotechnology in plant science. Relevance to agriculture in the eighties / J.M. Dunwell //Acad. Press. – 1985. – P.44-49.
122. Dunwell, J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation / J.M. Dunwell // J. Plant Biotech. – 2010. – Vol. 8. – P. 377-424.
123. Ferrie, A.M.R. Effects of brassinosteroids on microspore embryogenesis in *Brassica* sp. // A.M.R. Ferrie, J. Dirpaul, P. Krishna, J. Krochko, W.A. Keller // In vitro Cell Dev. Biol. Plant. – 2005. – Vol.41. – P.742-745.
124. Gamborg, O.L. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells / Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. // Exp Cell Res. – 1968. – Vol.50. – P. 151–158.
125. Grewal, D. Influence of antibiotic cefotaxime on somatic embryogenesis and plant regeneration in *indica rice* / D. Grewal, R. Gill, S.S. Gosal // Biotechnology Journal. – 2006. – Vol.1. – P. 1158-1162.
126. Griffing, B.A. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems / B.A. Griffing // Australian J. Biol. Sci. – 1956. – Vol.9. – P.463-493.
127. Gustafson, A. The effect of heterozygosity on variability and vigour / A. Gustafson // Hereditas. – 1946. – Vol.32. – P. 263-284.

128. Hamaoka, Y. Nimber of Chloroplasts in Haploids and Diploids Produced via Anther Culture in *Brassica campestris* / Y. Hamaoka, Y. Fujita, S. Iwai // Plant tissue culture letters. – 1991. – Vol.8. – P. 67-72.
129. Hause, G. Cytoskeleton changes and induction of embryogenesis in microspore and pollen cultures of *Brassica napus* L / G. Hause, P. Hause, P. Pehan., A.A.M. Lammeren // Cell Biol. Int. – 1993. – Vol.17. – P. 153-166.
130. Heberle-Bors, E. Induction of embryogenic pollen grains and subsequent embryogenesis / E. Heberle-Bors // Physiol. Plant. – 1983. – Vol.59. – 67-72.
131. Heberle-Bors, E. In vitro haploid formation from pollen: A critical review / E. Heberle-Bors // Theor. Appl. Genet. – 1985. – Vol.71. – P. 361-374.
132. Hormaza, J.I. Pollen selection / J.I. Hormaza, M. Herrero // Theor. Appl. Genet. – 1992. – Vol.83. – P. 663-672.
133. Huang, B. Effects of culture density, conditioned medium feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas / B. Huang, S. Bird, R. Kemble, D. Simmonds // Plant Cell Rep. – 1990. – Vol.8. – P.594-597.
134. Jinks, J.L. The analysis of diallel crosses // J.L. Jinks, B.I. Hayman // Maize Genetics Cooperation Newsletter. – 1953. – Vol. 27. – P. 48-54.
135. Kita, K. Triploid and haploid seedlingsobtained from small seedsof lemon / K. Kita, Y. Shigematsu, H. Yakushiji // J. Jap. Soc. Hort. Sci. – 2001. – Vol.70. – P.121.
136. Klimaszewska, K. Plant regeneration from stem cortex protoplasts of *Brassica napus* / K. Klimaszewska, W.A. Keller // Plant Cell Tissue Org Cult. – 1987. – Vol.8. – P. 225-233.
137. Lantos, C. Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat / C. Lantos, A. Juhasz, G. Somogyi, K. Otvos, P. Vagi, R. Mihaly, Z. Kristof, N. Somogyi, J. Pauk // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2009. – Vol.97. – P.285-293.

138. Lazar, M.D. Combining abilities and heritability of callus formation and plantley regeneration in wheat (*Triticumae stivum*) anther culture / M.D. Lazar // Theor. Appl. Genet. – 1984. – Vol.68. – P.131-134.

139. Lazzeri, P.A. *In vitro* shoot regeneration from seedling root segments of *Brassica oleracea* and *Brassica napus* cultuvars / P.A. Lazzeri, J.M. Dunwell // Ann. Bol. – 1984. – Vol. 54. – P. 341.

140. Lichter, R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* / R. Lichter // Z. Pflanzenphysiol. – 1982. – Vol.105. – P.427–434.

141. Lichter, R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassicacea* species / R. Lichter // Plant Breeding. – 1989. – Vol. 103. – P.119-123.

142. Lin, J.J. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissue by *Agrobacterium tumefacies* cells / J.J. Lin, N. Assad-Garcis, J. Kuo // Plant Sci. – 1995. – Vol.109. – P. 171-177.

143. Lotfi, M. Detection of cucumber parthenogenic haploid embryosby floating the immature seedsin liquid medium / M. Lotfi, S. Salehi // Proc. of the IXth EUCARPIA Meeting on Geneticsand Breeding of Cucurbitaceae / Ed. M. Pitrat. – Avignon, France: INRA. – 2008. – P.375–379.

144. Matsubara, S. Promoters of in vitro pollen germination of *Radish* and *Brassica campestris* / S. Matsubara, K. Murakami, H. Tawara, Y. Hamamoto, N. Harasawa // J. Japan. Soc. Hort. Sci. – 1999. – Vol.68. – P.421-427.

145. Meng, Q. Effects of antibiotics on *in vitro*-cultured cotyledons / Q. Meng, Z. Liu, Y. Zhang, C. Liu, F. Ren, H. Feng // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2014. – Vol.50 – P. 436-441.

146. Murashige, T.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. A. Murashige, F. Skoog // PhysiologiaPlantarum. – 1962. – V.15. – P.473-497.

147. Murovec, J. Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding / J. Murovec, B. Bohanec // Plant Breeding. – 2012. – P.87-106.

148. Nakanishi, T. An effective time for $CO_2$ gas treatment in overcoming self-incompatible cabbage in *Brassica* / T. Nakanishi // P.L. Coll. Ph. – 1973. – Vol.14. – P.837-873.

149. Nitsch, J.P. Experemental androgenesis in *Nicotiana* / J.P. Nitsch // Phytomorphology. – 1969. – Vol.19. – P.389-404.

150. Okkel, F.T. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics / F.T. Okkel, M.G. Pederson // Acta Hort. – 1988. – Vol.225. – P.199-207.

151. Pearson, O.H. Observation on the type of sterility in *Brassica oleraceae* var. *capitata* / O.H. Pearson // Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. – 1929. – Vol. 26, №1. – P. 34-38.

152. Pearson, O. H. Breeding Plants of the cabbage group / O.H. Pearson // Calif. Agr. Exp. Sta. Bull. – 1932. – P. 532.

153. Pechan, P.M. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus* / P.M. Pechan, W.A. Keller // Physiol Plant. – 1988. – Vol.74. – P. 377-384.

154. Qin, X. Chloroplast number in guard cellsasploidy indicator of in vitro-grown androgenic pepper plantlets / X. Qin, G.L. Rotino // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1995. – Vol.41. – P.145–149.

155. Rhoades, M. M. Cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays* / M.M. Rhoades // Science. – 1931. – Vol. 73, № 1891. – P.340-341.

156. Roberts, I.N. Pollen-stigma interactions in *Brassica oleracea*; a new pollen germination medium and its use in elucidating the mechanism of self incompatibility / I.N. Roberts, T. C. Gaude, G. Harrod, H. G. Dickinson // Springer-Verlag. Berlin. – 1983. – P.231-238.

157. Sari, N. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: Citrulluslanatus Thunb. Matsum and Nakai / N.Sari, K. Abak, M. Pitrat // Scientia Horticulturae. – 1999. – Vol.82. – P.265-277.

158. Shen, H. Detection of indigenous endophytic bacteria in Eucalyptus urophylla *in vitro* conditions / H. Shen, Z. Li, D. Han, F. Yang, Q. Huang, L. Ran // Frontiers of Agriculture in China. – 2010. – Vol.4. – P.37-41.

159. Simmonds, J.A. The toxicity of antibiotics to protoplast cultures of *Triticumae stivum* L. / J.A. Simmonds, J.L. Grainger // Plant Science. – 1993. – Vol.89. – P. 209-214.

160. Singh, D. Selection of diverse genotypes for heterosis in yield and response in toria (*Brassica campestris* L.) / D. Singh, P.K. Gupta // Theor. Appl. Genet. – 1985. – Vol. 69. – P. 515-517.

161. Smykalova, I. Efficiency of Microspore Culture for Doubled Haploid Production in the Breeding Project «Czech Winter Rape» / I. Smykalova, M. Vetrovcova, M. Klima, M. Machackova, M. Griga // Czech J. Genet. PlantBreed. – 2006. – Vol.42. – P.58-71.

162. Sprague, G.F. General vs. specific combining ability in single crosses of corn / G.F. Sprague, L.A.Tatum // Jour. Amer. Soc. Agr. – 1942. – Vol.34. – P.923-932.

163. Supena, E.D.J. Successful development of a shed-microspore culture of protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) / E.D.J. Supena, S. Suharsono, E. Jacobsen, J.B.M. Custers // Plant Cell Reports. – 2006. – Vol.25. – P. 1-10.

164. Takahata, Y. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore cultures of *Brassica oleracea* L / Y. Takahata, Keller W.A. // Plant Sci. – 1991. – Vol.74. – P.235-242.

165. Thorpe, T. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems / T. Thorpe, C. Stasolla, E.C. Yeung, G-J. de Klerk, A. Roberts, E.F. George // Plant Propagation by Tissue Culture Volume 1. TheBackground / Edited by E. F.George. - Springer, 2008. – P. 115-174.

166. Winarto, B. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea* / B. Winarto, Teixeira da Silva J.A. // Plant Cell Tiss Org Cult. – 2011. – Vol. 107. – P.305-315.

167. Yu, Y. Influences of cefotaxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos / Y. Yu, Z.M. Wei // BiologiaPlantarum. – 2008. – Vol.52. – P. 553-556.

168. Yuan, S.X. Study on the Relationship Between the Ploidy Level of Microspore-Derived Plants and the Number of Chloroplast in Stomatal Guard Cells in *Brassica oleracea* / S.X. Yuan, Y.M. Liu, Z. Fang, L. Yang, M. Zhuang, Y. Zhang, P. Sun // Agricultural Sciences in China. – 2009. – Vol.8. – P.939-946.

169. Yuan, S.X. Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage / S.X. Yuan, Y.B. Su, Y.M. Liu // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2012. – Vol.110. – P.69-76.

170. Zaki, M. Structural changes during the first division of embryos resulting from anther and microspore culture in *Brassica napus* / M. Zaki, H.G. Dickinson // Protoplasma. – 1990. – Vol.156. – P. 149-162.

171. Zhang, W. The culture of isolated microspores of ornamental kale *(Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration / W. Zhang, F. Qiang, D. Xigang, B. Manzhu // Sci. Hortic. – 2008. – Vol.117. – P.69-72.

# ПРИЛОЖЕНИЕ

# ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Состав базовых питательных сред, мг/л среды

| **Компоненты среды** | **B5 (Gamborg O.L. et al, 1968)** | **MS (Murashige T., Skoog F., 1962)** | **NLN (Lichter R., 1982)** |
|---|---|---|---|
| Макроэлементы | | | |
| $NH_4NO_3$ | - | 1650 | - |
| $KN0_3$ | 2500 | 1900 | 125 |
| $CaCl_2*2H_2O$ | 150 | 440 | - |
| $Ca(NO_3)_2*4H_2O$ | - | - | 500 |
| $KH_2PO_4$ | - | 170 | 125 |
| $MgSO_4*7H_2O$ | 250 | 370 | 125 |
| KCl | 300 | - | - |
| $NaH_2PO_4*H_2O$ | 150 | - | - |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 134 | - | - |
| Микроэлементы | | | |
| $MnSO_4*4H_2O$ | 10,0 | 22,3 | 25 |
| $ZnS0_4*7H_2O$ | 2,0 | 8,6 | 10 |
| $H_3BO_3$ | 3,0 | 6,2 | 10 |
| KI | 2,5 | 0,83 | - |
| $Na_2MoO_4*2H_2O$ | 0,3 | 0,25 | 0,25 |
| $CoCl_2*6H_2O$ | 0,025 | 0,025 | 0,025 |
| $CuSO_4*5H_2O$ | 0,025 | 0,025 | 0,025 |
| Источник железа | | | |
| $FeSO_4*7H_2O$ | 30,0 | 27,8 | - |
| $Na_2EDTA*2H_2O$ | 36,0 | 37,3 | - |
| NaFe(III)EDTA | - | - | 40 |
| Органические вещества | | | |
| Thiamin*HCl | 10,0 | 0,1 | 0,5 |
| Glycine | - | 2,0 | 2,0 |
| Nicotinicacid | 1,0 | 0,5 | 5,0 |
| Pyridoxine*HCl | 1,0 | 0,5 | 0,5 |
| Folic asid | - | - | 0,5 |
| Biotin | - | - | 0,05 |
| Myo-Inositol | 100 | 100 | 100 |
| L-Serine | - | - | 100 |
| L-Glutamine | - | - | 800 |
| Glutation | - | - | 30 |

# ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Разделение растений-регенерантов капусты белокочанной на группы по уровню плоидности

| Генотип | Длина устьичной клетки, нм | Число хлоропластов в 2х клетках, шт. |
|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 |
| Гаплоиды (n) | | |
| 1-3 | 20,18±1,57 | 9,40±1,05 |
| 1-3-2 | 20,32±0,67 | 9,93±1,14 |
| 1-19-1 | 20,56±0,70 | 9,40±0,95 |
| 1-19-2 | 20,45±0,80 | 9,00±0,63 |
| 1-18-2 | 20,60±0,57 | 9,47±0,83 |
| 5-11-1 | 18,83±0,76 | 9,07±0,49 |
| 11-68 | 20,46±0,63 | 8,53±0,88 |
| 11-124-2 | 20,13±0,63 | 8,87±0,83 |
| Диплоиды (2n) | | |
| 1-3-1 | 19,82±0,93 | 11,13±1,18 |
| 1-18 | 22,63±0,74 | 12,53±0,69 |
| 1-19 | 21,77±0,62 | 12,16±1,05 |
| 2-45 | 21,85±0,64 | 10,47±0,81 |
| 2-60 | 22,89±1,04 | 10,27±0,49 |
| 2-73-1 | 25,15±0,79 | 13,20±1,66 |
| 2-123 | 23,85±0,61 | 11,47±0,86 |
| 2-307 | 27,60±0,86 | 14,60±1,23 |
| 2-331 | 22,47±0,53 | 12,53±0,93 |
| 2-351 | 25,61±0,80 | 12,80±1,13 |
| 3-1-2 | 20,89±0,90 | 12,33±0,97 |
| 3-3-1 | 22,45±0,86 | 11,73±1,14 |
| 3-3-2 | 21,71±0,84 | 13,20±1,05 |

продолжение приложения 2

| 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|
| 3-3-3 | 20,60±0,54 | 11,33±1,06 |
| 5-13 | 21,98±0,62 | 11,07±0,90 |
| 5-11 | 22,21±0,56 | 12,67±1,06 |
| 11-124 | 25,40±0,57 | 13,73±0,80 |
| 11-10 | 27,23±0,61 | 12,67±1,10 |
| 11-30-2 | 24,15±0,75 | 11,20±0,63 |
| 11-49 | 21,68±0,56 | 10,67±0,93 |
| 11-65 | 23,95±0,79 | 11,07±1,10 |
| 11-70-1 | 21,12±0,90 | 10,73±0,80 |
| М2-1 | 21,19±0,47 | 13,93±0,77 |
| М2-3 | 21,01±0,74 | 12,73±1,10 |
| М2-4 | 21,00±0,68 | 11,67±0,93 |
| М2-5 | 19,71±0,56 | 13,27±0,64 |
| П2-1 | 22,89±0,43 | 13,73±0,95 |
| П2-2 | 23,28±0,56 | 13,73±0,97 |
| П2-7 | 20,69±0,58 | 12,20±0,79 |
| П2-8 | 22,91±0,36 | 14,27±0,92 |
| П2-9 | 22,34±0,52 | 11,67±0,95 |
| 116-1-5 | 23,65±0,20 | 13,20±0,34 |
| 116-1-8 | 21,05±0,22 | 12,45±0,87 |
| 116-1-10 | 19,06±0,85 | 11,00±0,95 |
| 116-2-1 | 23,27±0,52 | 15,22±0,76 |
| 173-1-3 | 23,15±0,67 | 13,27±0,92 |
| 173-1-4 | 25,67±0,32 | 15,28±0,54 |
| 173-1-10 | 21,55±0,69 | 12,25±0,81 |
| 173-1-11 | 19,96±0,74 | 11,96±0,66 |
| 173-1-13 | 19,12±0,92 | 11,03±0,62 |

продолжение приложения 2

| 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|
| 173-1-16 | 21,41±0,58 | 13,27±0,71 |
| 173-1-18 | 23,91±0,83 | 14,35±0,56 |
| Тетраплоиды (4n) | | |
| 2-318 | 29,61±0,89 | 19,73±1,53 |
| 5-3 | 27,68±0,43 | 17,80±0,52 |
| 11-80 | 27,34±0,49 | 17,86±1,13 |
| 11-81-1 | 27,85±0,80 | 18,00±1,58 |
| М2-2 | 34,12±0,75 | 24,53±1,46 |
| П2-3 | 26,84±0,60 | 18,40±1,20 |
| П2-4 | 25,85±0,46 | 17,80±1,39 |
| П2-5 | 28,47±0,49 | 19,07±1,19 |
| П2-6 | 29,58±0,76 | 17,87±0,76 |
| П2-10 | 29,06±0,60 | 17,93±0,97 |

## ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Дисперсионный анализ изучаемых генотипов по признаку «средняя масса кочана

| Источник изменчивости | Число степеней свободы | Дисперсия | Критерий Фишера | |
|---|---|---|---|---|
| | | | $F_{факт}$ | $F_{теор.}$ |
| Общая | 587 | 0,95 | 170,76 | 1,00 |
| Генотипы | 195 | 2,84 | 511,96 | 1,00 |
| Повторности | 2 | 0,04 | 7,40 | 2,99 |
| Случайные отклонения | 390 | 0,01 | - | - |

## ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Дисперсионный анализ комбинационной способности по признаку «средняя масса кочана»

| Источник изменчивости | Число степеней свободы | Дисперсия | Критерий Фишера | |
|---|---|---|---|---|
| | | | $F_{факт}$ | $F_{теор.}$ |
| ОКС | 13 | 0,98 | 529,66 | 1,69 |
| СКС | 91 | 1,08 | 585,18 | 1,24 |
| РЭ | 91 | 0,81 | 436,20 | 1,24 |
| Случайные отклонения | 390 | 0,00 | - | - |

## ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Дисперсионный анализ изучаемых генотипов по признаку «средний диаметр розетки листьев»

| Источник изменчивости | Число степеней свободы | Дисперсия | Критерий Фишера | |
|---|---|---|---|---|
| | | | $F_{факт}$ | $F_{теор.}$ |
| Общая | 391 | 88,84 | 58,89 | 1,19 |
| Генотипы | 195 | 176,63 | 117,08 | 1,19 |
| Повторности | 1 | 0,51 | 0,34 | 3,89 |
| Случайные отклонения | 195 | 1,51 | - | - |

## ПРИЛОЖЕНИЕ 6

Дисперсионный анализ комбинационной способности по признаку «средний диаметр розетки листьев»

| Источник изменчивости | Число степеней свободы | Дисперсия | Критерий Фишера | |
|---|---|---|---|---|
| | | | $F_{факт}$ | $F_{теор.}$ |
| ОКС | 13 | 204,75 | 271,44 | 1,74 |
| СКС | 91 | 77,01 | 102,09 | 1,32 |
| РЭ | 91 | 82,99 | 110,02 | 1,32 |
| Случайные отклонения | 195 | 0,75 | - | - |

## ПРИЛОЖЕНИЕ 7

Дисперсионный анализ изучаемых генотипов по признаку «средняя высота наружной кочерыги»

| Источник изменчивости | Число степеней свободы | Дисперсия | Критерий Фишера | |
|---|---|---|---|---|
| | | | $F_{факт}$ | $F_{теор.}$ |
| Общая | 391 | 4,25 | 9,83 | 1,19 |
| Генотипы | 195 | 8,08 | 18,69 | 1,19 |
| Повторности | 1 | 1,47 | 3,39 | 3,89 |
| Случайные отклонения | 195 | 0,43 | - | - |

## ПРИЛОЖЕНИЕ 8

Дисперсионный анализ комбинационной способности по признаку «средняя высота наружной кочерыги»

| Источник изменчивости | Число степеней свободы | Дисперсия | Критерий Фишера | |
|---|---|---|---|---|
| | | | $F_{факт}$ | $F_{теор.}$ |
| ОКС | 13 | 16,19 | 74,85 | 1,74 |
| СКС | 91 | 2,69 | 12,46 | 1,32 |
| РЭ | 91 | 3,65 | 16,90 | 1,32 |
| Случайные отклонения | 195 | 0,22 | | |

## ПРИЛОЖЕНИЕ 9

Дисперсионный анализ изучаемых генотипов по признаку «средняя длина внутренней кочерыги»

| Источник изменчивости | Число степеней свободы | Дисперсия | Критерий Фишера | |
|---|---|---|---|---|
| | | | $F_{факт}$ | $F_{теор.}$ |
| Общая | 391 | 2,40 | 7,76 | 1,19 |
| Генотипы | 195 | 4,51 | 14,55 | 1,19 |
| Повторности | 1 | 0,06 | 0,20 | 3,89 |
| Случайные отклонения | 195 | 0,31 | - | - |

## ПРИЛОЖЕНИЕ 10

Дисперсионный анализ комбинационной способности по признаку «средняя длина внутренней кочерыги»

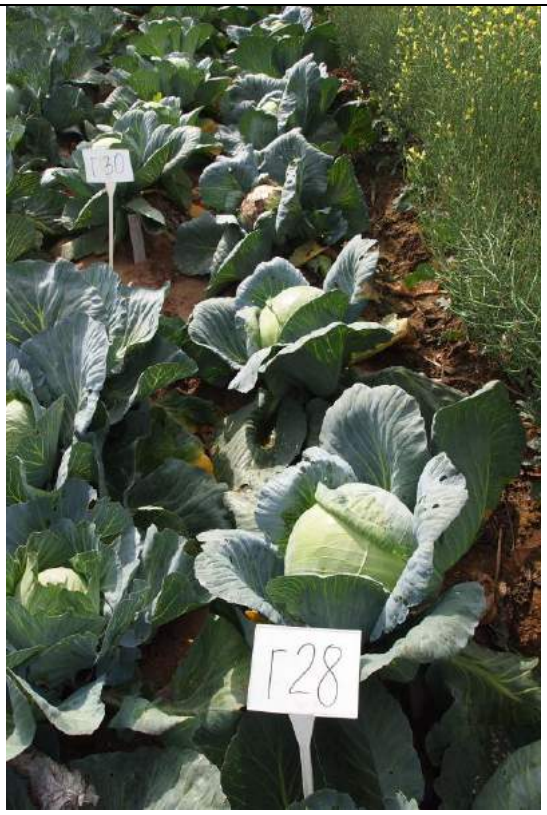
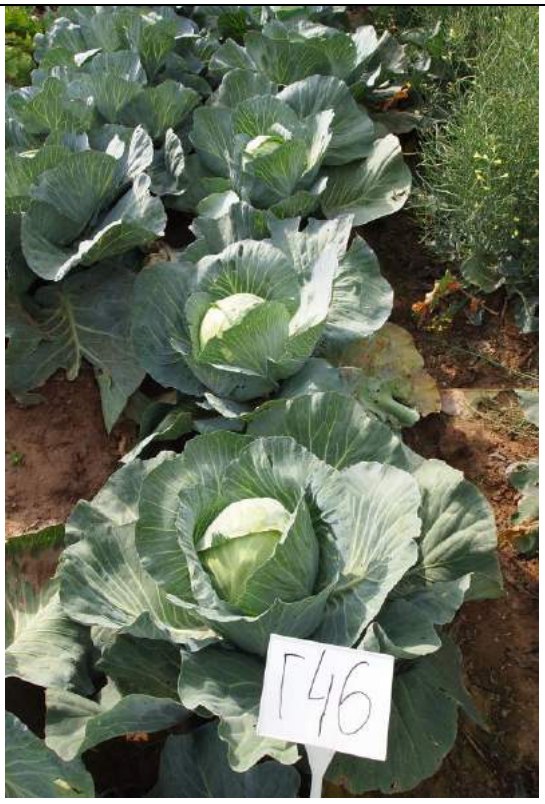
| Источник изменчивости | Число степеней свободы | Дисперсия | Критерий Фишера | |
|---|---|---|---|---|
| | | | $F_{факт}$ | $F_{теор.}$ |
| ОКС | 13 | 6,05 | 39,06 | 1,74 |
| СКС | 91 | 1,88 | 12,14 | 1,32 |
| РЭ | 91 | 2,09 | 13,47 | 1,32 |
| Случайные отклонения | 195 | 0,15 | - | - |

# ПРИЛОЖЕНИЕ 11

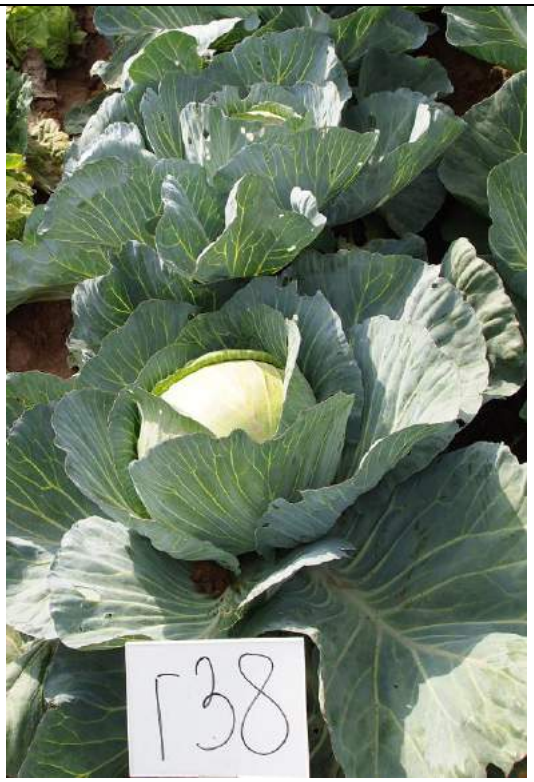
Перспективные гибридные комбинации капусты белокочанной на основе линий удвоенных гаплоидов

| | |
|---|---|
| | |
| 1-18х 5-13 | 2-45 х 1-18 |
| | |
| 2-123 х 1-19 | 2-331 х 5-13 |

продолжение приложения 11

| | |
|---|---|
| | |
| 2-331х 11-124 | 3-3-3х2-331 |
|  |  |
| 11-124х2-307 | 2-45 х 5-13 |

продолжение приложения 11

| | |
|---|---|
| |  |
| 11-124 х 5-13 | 11-124 х 5-11 |
| | |
| 11-65 х 1-18 | 5-13х2-307 |

# ПРИЛОЖЕНИЕ 12

## Затраты на выращивание растений капусты белокочанной традиционным методом в 2х-годичном цикле

| Капуста белокочанная | Площадь, га | Урожайность, кг | Валовый сбор, кг | Затраты, руб. | | | | | | | | | | Всего, руб. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $м^2$ | $г/м^2$ | | Заработная плата | | Начисления (30,2%) | Семена | Удобрения | Работа тракторов | Амортизация | Коммунальные услуги | Материалы | Накладные расходы | |
| | | | | Открытый грунт | Защищенный грунт | | | | | | | | | |
| 1 год | 1 | 30000 | 30000 | 66666 | 15000 | 24663 | 214 | 8714 | 4221 | - | 371 | 5000 | 81666 | 206515 |
| 2 год (защищенный грунт) | 125 | 50 | 6,250 | - | 13125 | 3964 | 8 | 5800 | 7658 | 5663 | 550 | 2134 | 13125 | 52027 |
| Итого за 2года | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 258542 |
| Итого за 14лет | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1809794 |

# ПРИЛОЖЕНИЕ 13

## Смета расходов на производство удвоенных гаплоидов капусты белокочанной

| № | название | Стоимость единицы | количество | сумма |
|---|---|---|---|---|
| **1** | **Климатическая камера** | | | |
| 1.1 | свет | 4,80 | 120 дней (16 часов в день, мощность 2 кВт, 6 ламп) | 110592,00 |
| 1.2 | Уход за растениями, человеко-часы | 120,01 | 140чел-час | 16801,40 |
| 1.3 | Почва | 3,00 | 50 растений* 5л=250л | 750,00 |
| 1.4 | удобрения | 103,00 | 4 кг | 412,00 |
| 1.5 | Вегетационные сосуды | 60,00 | 50 по 5л | 3000,00 |
| **2** | **Закладка микроспор** | | | |
| 2.1 | Питательная среда | 512,34 | 1л Nitsch | 512,34 |
| 2.2 | посуда для приготовления среды | 240,00<br>660,00 | 2 стакана<br>2 бутыли | 480,00<br>1320,00 |
| 2.3 | Посуда для культивирования | 55,88 | 50 банок с крышками | 2794,00 |
| 2.4 | Автоклавирование | 4,80 | 1 час (мощность 3 кВт) | 14,40 |
| 2.5 | Электрические затраты ламинар | 4,80 | 6 часов (мощность 330 Вт) | 9,50 |
| 2.6 | Работа, человеко-часы | 960,04 | 2 человеко-дня | 1920,08 |
| **3** | **Культивирование микроспор** | | | |
| 3.1 | Термостат, затраты энергии | 4,80 | 1 месяц (мощность 330 Вт) | 1,58 |
| 3.2 | Работа, человеко-часы | 120,01 | 4 человеко-часа | 480,04 |
| **4** | **Культивирование эмбриоидов** | | | |
| 4.1 | Питательная среда | 334,75 | МС: 1,5л в чашки, 10л*2 в банки | 7197,13 |
| 4.2 | посуда для приготовления среды | 240,00<br>660,00 | 2 стакана<br>2 бутыли | 480,00<br>1320,00 |
| 4.3 | Посуда для культивирования | 10,00<br>55,88 | 50 чашек петри,<br>500 банок с крышками | 500,00<br>27940,00 |
| 4.4 | Автоклавирование | 4,80 | 5 часов (мощность 3 кВт) | 72,00 |
| 4.5 | Электрические затраты ламинар | 4,80 | 40 часов (мощность 330 Вт) | 63,36 |
| 4.6 | Работа, человеко-часы | 120,01 | 5чел-дней | 4800,16 |
| **5** | **Накладные расходы** | | | **24001,68** |
| **6** | **Итого** | | | **205461,67** |