

## СОЗДАНИЕ ГИБРИДОВ КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *alba* DC) НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИНИЙ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ

В.Ф. ПИВОВАРОВ, Л.Л. БОНДАРЕВА, Н.А. ШМЫКОВА, Д.В. ШУМИЛИНА,  
А.И. МИНЕЙКИНА

Селекция капусты белокочанной в настоящее время в основном ориентирована на создание  $F_1$  гибридов на основе константных родительских линий. В современной мировой селекции капустных культур с этой целью широко используются удвоенные гаплоиды, полученные в культуре изолированных микроспор *in vitro* по ДН-технологии. Метод позволяет быстро предлагать гомозиготные линии, на выделение которых при отборе на гетерозис у перекрестноопыляющихся культур приходится затрачивать до 7-10 (однолетние растения) и 14-20 лет (двулетние растения). Одна из задач ДН-технологий — максимальный выход удвоенных гаплоидных растений для наиболее полного охвата всего спектра генетических рекомбинаций, в том числе по рецессивным признакам. Целью наших исследований стала оценка константных линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *alba* DC) позднего срока созревания по комплексу хозяйственно ценных признаков и усовершенствование технологии создания гетерозисных гибридов  $F_1$  на их основе. При получении линий удвоенных гаплоидов методом культуры изолированных микроспор *in vitro* были использованы 11 селекционных линий капусты белокочанной позднего срока созревания. В создание гибридов были вовлечены 12 генотипов удвоенных гаплоидов. У выделенных линий оценивали плоидность и комбинационную способность. Семена репродуцировали при гибридизации растений-регенерантов в контролируемых условиях камеры искусственного климата в зимне-весенний период 2014-2015 годов. Использовали схему создания самонесовместимых линий и двухлинейных гибридов капусты белокочанной. Полевые опыты закладывали на земельных участках Всероссийского НИИ селекции и семеноводства овощных культур (ВНИИССОК) в 2014-2015 годах. Линии удвоенных гаплоидов и гибридных комбинаций на их основе оценивали в стадии технической спелости кочана по основным хозяйственно ценным признакам, сравнивая со стандартом (Северянка  $F_1$ ). Определяли содержание сухого вещества, нитратов, витамина С. Полевую устойчивость к фузариозному увяданию, альтернариозу, а также поврежденность вредителями изучали на естественном фоне в стадии технической спелости кочана. Фитопатологическую оценку устойчивости к киле проводили на искусственном инфекционном фоне. В результате анализа между средними значениями числа хромосом, числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и длины этих клеток была выявлена прямая зависимость во всех вариантах. Частота спонтанного удвоения числа хромосом варьировала от 50,0 до 87,5 % в зависимости от генотипа. Высокую самонесовместимость проявили от 11 до 73 % линий. После гейтеногамного опыления растений методом топкросса получили 42 гибридные комбинации. На основании проведенного анализа составлена модель  $F_1$  гибрида капусты белокочанной, наиболее полно соответствующего запросам потребительского рынка. По результатам двухлетней работы было выделено 10 перспективных гибридных комбинаций, рекомендованных для сортоиспытания. Гибриды характеризовались выравненностью, высокими биохимическими показателями, устойчивостью к основным болезням и вредителям капустных культур. Их урожайность достигала  $104,60 \pm 8,27$  т/га. Содержание сухого вещества у всех гибридов было высоким (10,5 %), аскорбиновой кислоты — находилось в пределах от 21,12 до 38,70 мг%, в одной гибридной комбинации — составляло 92,0 мг%. В той же гибридной комбинации отмечали наименьшее накопление нитратов — 33 мг/кг. Количество сахаров достигало 4,21-5,10 %. Таким образом, благодаря интеграции современного биотехнологического метода культуры изолированных микроспор *in vitro* для сортов капусты белокочанной отечественной селекции была разработана и успешно применена сокращенная селекционно-семеноводческая схема создания  $F_1$  гибридов, исключая использование инбридинга.

Ключевые слова: капуста белокочанная, *Brassica oleracea* var. *capitata*, линии удвоенных гаплоидов, гетерозисные гибриды  $F_1$ , культура изолированных микроспор *in vitro*, самонесовместимость, ДН-технологии, спонтанное удвоение, плоидность.

Самая распространенная культура среди растений вида *Brassica oleracea* L. — капуста белокочанная. Ее популярность объясняется комплексом биологических и хозяйственно полезных свойств. Наиболее востребованы гетерозисные  $F_1$  гибриды с высокими товарными качествами, устойчивые к возбудителям вредоносных заболеваний (1). В настоящее

время создание гетерозисных гибридов капусты белокочанной базируется на использовании цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) и скрещивании самонесовместимых инбредных линий. Семена от переопыления внутри одной линии при этом не образуются, но скрещивания с растениями другой линии дают 100 % гибридных семян. Реакция несовместимости проявляется на поверхности рыльца пестика: несовместимая пыльца не прорастает вовсе или пыльцевые трубки, появившись и достигнув поверхности сосочков рыльца, скручиваются и утолщаются (2). Такие линии размножают и поддерживают посредством гейтеногамного опыления бутонов вручную (3, 4). Основные современные требования к культуре — лежкость качана, пригодность к механизированной уборке, устойчивость к болезням (кила, сосудистый бактериоз, фузариоз и др.) и вредителям (5). Интенсивная сортосмена требует ускорения селекционного процесса (6).

Капуста белокочанная — перекрестноопыляемое растение с 2-летним циклом развития. В традиционной селекции инбредные линии капусты белокочанной получают посредством принудительного самоопыления в течение 6-12 поколений, что значительно удлиняет селекционный процесс. Для ускорения селекции применяют методы удвоения гаплоидов (doubled haploids, ДН-технологии) (7-12), в частности культуру микроспор *in vitro*, которая не только обеспечивает гомозиготность ДН-линии, но и усиливает формообразование за счет использования всего спектра генетических рекомбинаций, в том числе с рецессивными признаками. В основе технологии лежит способность микроспор переключаться с гаметофитного развития на спорофитное под действием стрессовых факторов (повышенная температура, высокое осмотическое давление и т.д.). В результате делений по спорофитному типу микроспоры образуют эмбриониды, которые развиваются в гаплоидные растения (Hs) или в удвоенные гаплоиды (ДН) (13, 14), при вовлечении которых в селекцию чистых линий сокращается время, затрачиваемое на скрещивания (15). Для овощных культур, в том числе капустных, разработана отечественная ДН-технология (16), однако ее необходимо оптимизировать для конкретных генотипов.

В культуре изолированных микроспор у растений после регенерации различается плоидность: наряду с удвоенными гаплоидами встречаются гаплоиды, тетраплоиды и миксоплоиды (17). При этом только гомозиготные диплоидные растения, возникающие в результате спонтанного удвоения числа хромосом, могут непосредственно использоваться в селекционных программах (18). Существует несколько методов анализа плоидности. Наиболее точен классический метод подсчета числа хромосом в клетках меристематической ткани корешка или в делящихся клетках молодых бутонов (19, 20). Однако он очень сложен и длителен и не подходит для скрининга больших выборок растений (21). Количественное определение содержания ядерной ДНК и плоидности методом проточной цитометрии (22) выполняется легко и быстро на минимальном количестве ткани листа, но требует значительных затрат на приобретение оборудования и реактивов (23). Как достаточно простой и дешевый метод, который можно использовать для большинства культур, в том числе капустных, рассматривается подсчет числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Показано, что между числом хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и плоидностью растений существует высокая корреляция (24). Таким образом, оптимизация ДН-подхода для его интродукции в технологии селекции и семеноводства остается актуальной (25-28).

Мы впервые в России, используя метод культуры изолированных микроспор *in vitro*, получили ДН-популяции капусты белокочанной, в ко-

торых были выявлены формы с заданными свойствами, что позволило за короткое время отобрать перспективные гибридные комбинации.

Целью настоящей работы стала оценка константных линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной по комплексу хозяйственно ценных признаков и усовершенствование технологии создания гетерозисных гибридов F<sub>1</sub> на их основе.

*Методика.* При получении линий удвоенных гаплоидов методом культуры изолированных микроспор *in vitro* были использованы 11 селекционных линий капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L. *convar. capitata* var. *alba* DC) позднего срока созревания. Донорные растения выращивали в климатической камере при режиме 20–22 °С, 16 ч/8 ч (день/ночь), освещение 9000 лк. Бутоны, собранные на начальной стадии цветения, стерилизовали 30 с в 96 % этаноле, далее 5 мин в 50 % водном растворе коммерческого препарата Белизна («Химальянс», Россия) с добавлением Tween 20 («PanReac Química S.L.U.», Испания) — 1 капля на 100 мл раствора, с последующим 3-кратным промыванием в стерильной дистиллированной воде. Стерильные бутоны размером 4–5 мм перемещали в среду Лихтера с половинным содержанием компонентов (1/2NLN) и 13 % сахарозы, pH 5,8 (29) (из расчета 30 бутонов на 6 мл среды) и измельчали. Суспензию микроспор пропускали через нейлоновый фильтр с размером ячеек 40 мкм и осаждали 5 мин при 125 g на центрифуге Eppendorf 5804R («Eppendorf AG», Германия). Микроспоры дважды промывали в среде 1/2NLN. Промытые микроспоры помещали в чашки Петри диаметром 6 см (из расчета 10 бутонов на чашку) с 5 мл питательной среды приведенного выше состава и инкубировали в течение 2 сут в темноте при 32 °С. Далее инкубацию проводили при 25 °С в темноте до образования эмбриоидов. По достижении эмбриоидами стадии крупных глобул, сердцевидной или торпедовидной фазы их помещали в чашки Петри на среду Гамборга (B5) (30) с добавлением 0,5 % глюкозы, 0,5 % сахарозы и фитогея (3 г/л).

Побеги, которые образовывали эмбриоиды, отделяли и помещали на среду Мурасиге-Скуга (MS) с половинным содержанием компонентов, 2 % сахарозы и 3 г/л фитогея. Культивирование осуществляли при 25 °С, фотопериоде 14 ч (2500 лк, люминесцентные лампы). Растения с нормально развитыми листьями и корневой системой переносили в вегетационные сосуды со смесью торфа и перлита (7:3) и накрывали перфорированными пластиковыми стаканчиками для адаптации *in vivo*. У растений-регенерантов, выращиваемых в тех же условиях, что и донорные растения (32), оценивали плоидность и комбинационную способность.

При подсчете числа хромосом в клетках меристематической ткани корешка методом распластывания кончики корней длиной 0,5–1,0 см помещали в раствор α-бром-нафталина (1 мкл на 10–15 мл) и оставляли на 12 ч в холоде. Далее корешки переносили в фиксатор Кларка (спирт и ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1) и оставляли на 1 ч в холоде, затем тщательно промывали в воде и перемещали в 0,3 мл смеси ферментов (10 мл цитратного буфера, pH 4,5, 0,2 г целлюлазы, 0,2 г пектиназы 5S, 0,25 г мацерозима, 0,1 г дрейзелазы) с добавлением 0,006 г целлюлазы и 2,7 мл цитратного буфера, закрывали крышкой и ставили на водяную баню (37 °С) на 1 ч. После размягчения корешков ферментную смесь заменяли водой. Белый кончик корешка отделяли и пипеткой переносили на стекло. Добавляли каплю уксусной кислоты, вносили свежеприготовленный фиксатор Кларка и подсушивали препарат на воздухе. Результаты оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager A2 («Carl Zeiss», Германия) с наборами фильтров для DAPI (Zeiss Filter set 1, «Carl

Zeiss», Германия) (33).

При косвенном определении ploидности подсчитывали хлоропласты в замыкающих устьичных клетках и измеряли их длину, используя микроскоп Axio Imager A2 («Carl Zeiss», Германия) с флуоресценцией (набор фильтров BR 490 и 515) (34). Эпидермальный слой клеток снимали с нижней стороны листьев, промывали в дистиллированной воде, помещали на предметное стекло в каплю воды, накрывали покровным стеклом и просматривали под микроскопом. Фотографировали не менее 20 пар устьичных клеток у каждого растения и подсчитывали хлоропласты. Визуализацию, измерения и подсчеты проводили с помощью программного обеспечения AxioVision («Carl Zeiss», Германия).

Семенное потомство получали при гибридизации растений-регенерантов в камере искусственного климата в зимне-весенний период 2014-2015 годов (в тех же условиях, что и при выращивании донорных растений). Использовали схему создания самонесовместимых линий и получения двухлинейных гибридов капусты белокочанной (35). Полевые опыты с семенами закладывали в 2014-2015 годах на опытных участках, подготовленных по стандартной для овощных культур агротехнике (36). Посев семян проводили в III декаде апреля в кассеты с диаметром ячейки 5×5 см. В III декаде мая рассаду высаживали в открытый грунт в 2-кратной повторности по 10 растений. Схема посадки — 70×50 см.

В стадии технической спелости кочана линии удвоенных гаплоидов и гибридные комбинации на их основе охарактеризовали по ряду хозяйственно ценных признаков (масса и размер кочана, диаметр розетки листьев, высота наружной и внутренней кочерыги, размеры листа), сравнивая со стандартом (Северянка F<sub>1</sub>). Срок вегетации учитывали по созреванию 90 % кочанов в варианте, после чего собирали урожай. Визуально оценивали расположение нижних листьев розетки, окраску листьев, интенсивность воскового налета, состояние поверхности листовой пластинки, жилкование. Биохимические показатели определяли в объединенной пробе наиболее типичных кочанов: содержание сухого вещества — после высушивания до постоянной массы, нитратов — потенциметрически, витамина С — йодометрическим методом (37).

Полевую устойчивость к фузариозному увяданию, альтернариозу, а также поврежденность вредителями изучали в полевых условиях на естественном фоне в стадии технической спелости кочана. Устойчивость к киле (степень поражения, %) оценивали на искусственном инфекционном фоне при рендомизированном размещении растений в 2-кратной повторности по 10 шт. в каждом варианте (38).

Статистическая обработка данных включала определение среднего арифметического ( $\bar{X}$ ) и ошибки среднего ( $m$ ).

*Результаты.* Среди 10 привлеченных селекционных линий капусты белокочанной лишь 5 оказались отзывчивыми на введение в культуру *in vitro*. В результате из изолированных микроспор *in vitro* получили от 20 до 1000 растений-регенерантов на родительскую линию.

Определение ploидности растений-регенерантов показало, что гаплоидные клетки в культуре были нестабильны, имели тенденцию к эндомитозу (удвоение хромосом без деления ядер) и формированию клеток различной ploидности. Это дало возможность разделить все изученные образцы на группы по степени ploидности в соответствии с предложенными показателями (табл. 1). Было показано, что частота спонтанного удвоения числа хромосом у растений-регенерантов варьировала от 50,0 до 87,5 % в зависимости от генотипа. В работах других авторов доля удвоен-

ных гаплоидов капусты белокочанной составляла 10-40 % (39), 21-67 % (40) и 50-70 % (41). В наших исследованиях доля гаплоидных и тетраплоидных растений варьировала от 0 до 25,0 %.

**1. Плоидность растений-регенерантов капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L. *convar. capitata* var. *alba* DC) позднего срока созревания по результатам цитологического анализа ( $X \pm m$ )**

Плоидность	ЧХЗК, шт.	ДЗК, нм
Гаплоиды ( $n = 9$ )	9,00±0,63	20,45±0,80
Диплоиды ( $2n = 18$ )	13,73±0,80	24,15±0,55
Тетраплоиды ( $4n = 36$ )	24,53±1,46	34,12±0,70

Примечание.  $n$  — число хромосом; ЧХЗК — число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц, ДЗК — длина замыкающих клеток устьиц.

Во всех вариантах мы наблюдали прямую зависимость между средним числом хромосом, числом хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и длиной этих клеток. Сообщается, что у растений число хлоропластов коррелирует с числом хромосом, то есть у диплоидных растений число хлоропластов примерно вдвое меньше, чем у гаплоидных (34). Согласно данным литературы, растения *B. oleracea* ssp. имеют следующее число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц: гаплоиды — 6-9, диплоиды — 10-15, тетраплоиды — 20-25 (42). Результаты наших исследований подтвердили, что подсчет числа хлоропластов может служить наиболее простым и быстрым методом массового определения плоидности растений.

Выбранная нами схема получения гетерозисных гибридов  $F_1$  предусматривала использование спорофитной физиологической самонесовместимости линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной. При искусственном гейтеногамном опылении цветков (с предварительной кастрацией бутонов) у растений-регенерантов отмечали различную степень проявления самонесовместимости линий, которую определяли по завязываемости семян в стручках: высокая — завязываемость 0-1 шт/стручок, средняя — 2-5 шт/стручок, низкая или отсутствует — более 5 шт/стручок. В зависимости от генотипа от 11 до 73 % линий удвоенных гаплоидов проявили высокую степень самонесовместимости, от 0 до 29 % — среднюю. Именно эти линии (12 генотипов) далее использовали в работе по созданию гетерозисных гибридов  $F_1$  (линии, у которых самонесовместимость отсутствовала, были включены в другие селекционные программы). В результате топкросса в условиях камеры искусственного климата на основе самонесовместимости получили 42 гибридные комбинации.

Для дальнейшего планирования работы была составлена целевая модель  $F_1$  гибрида по основным агротехническим и потребительским характеристикам: период вегетации 150 сут и более (от высадки рассады до технической спелости кочана); кочаны дружные в созревании, транспортабельные, пригодные для механизированной уборки, средней величины, округлой формы, плотные, массой 2,5-3,5 кг, с отличной внутренней структурой, небольшой внутренней кочерыгой, содержанием сухого вещества 9-10 %, высоким содержанием витамина С, сахаров и низким количеством нитратов, устойчивые к основным болезням и вредителям.

При комплексной оценке всех образцов в течение 2 лет в полевых условиях по основным хозяйственно ценным признакам были выделены 10 перспективных гибридных комбинаций (табл. 2). Период вегетации гибридов составлял 158-165 сут, что соответствовало позднему сроку созревания. Урожайность находилась в пределах от 64,41±5,13 до 104,60±8,27 т/га, что делало возделывания этих гибридов рентабельным. Внутренняя кочерыга была небольшой, соответствовала стандартному образцу, в большинстве случаев оказывалась меньше стандарта почти в 2 раза, благодаря чему увеличивалась товарная часть кочана. Среди гибридов были выявлены об-

**2. Комплексная оценка перспективных гибридных комбинаций на основе линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L. *convar. capitata* var. *alba* DC) позднего срока созревания по основным хозяйственно ценным признакам ( $X \pm m$ , Московская обл.)**

Гибридная комбинация	Вегетация, сут	Масса кочана, кг	Урожайность, т/га	Размер кочерыги, см			Биохимические показатели				Пораженность болезнями, %			Поврежденность вредителями, %
				внутренней		наружной	сухое вещество, %	сахара, %	витамин С, мг%	нитраты, мг/кг	кила	фузариозное увядание	альтернариоз	
				длина	ширина									
3-3-3×1-19-1	160	2,76±0,26	78,66±7,41	4,57±0,39	5,07±0,29	4,72±0,80	10,50	5,10	38,70	81	6,3±0,4	1,5±0,1	0,6±0,2	6,5±1,0
2-45-1×1-18-2	165	2,72±0,19	77,52±5,42	6,80±0,36	4,60±0,18	5,93±0,61	9,00	5,00	92,00	33	12,5±2,7	2,7±0,6	2,0±0,5	7,2±0,7
2-45-1×5-13	165	3,18±0,02	90,63±0,57	9,00±1,00	4,00±0,50	7,00±0,40	9,90	4,40	35,20	59	15,0±1,8	0,5±0,1	1,5±0,1	11,8±2,5
3-3-3×2-331	160	2,26±0,18	64,41±5,13	8,12±0,55	6,43±1,02	9,33±3,79	10,06	4,42	26,40	100	25,0±5,2	5,0±0,8	3,0±0,2	7,0±0,5
11-124-1×2-307	158	2,41±0,35	68,69±9,98	6,26±1,28	4,57±0,43	5,36±0,69	10,13	4,85	37,60	80	17,5±2,2	3,8±0,1	3,3±0,2	6,0±0,2
5-13-2×2-307	165	2,49±0,48	70,97±13,68	6,19±0,96	4,00±0,51	6,00±1,33	9,85	4,36	21,12	124	20,0±4,9	6,6±0,3	1,6±0,4	6,6±0,1
3-3-3×2×1-19-2	160	3,18±0,07	90,63±2,00	7,00±0,60	5,00±0,40	10,00±0,10	9,52	4,21	24,64	69	31,0±2,5	7,5±0,1	2,5±0,5	10,0±1,3
2-331×11-1-1	165	3,09±0,34	88,07±9,69	8,25±0,53	5,17±0,34	12,85±0,99	9,60	4,40	33,40	105	15,0±1,0	3,1±0,7	2,2±0,2	3,5±0,8
11-68×5-13	158	2,99±0,28	85,22±7,98	6,43±0,29	3,07±0,29	7,57±0,96	9,80	4,90	33,40	100	38,0±3,6	5,0±0,4	3,0±0,1	10,6±0,5
2-331×5-13	165	3,67±0,29	104,60±8,27	8,94±0,40	4,34±0,29	9,86±1,99	9,80	4,70	37,00	89	7,5±0,8	1,0±0,1	0,5±0,1	6,0±0,1
Северянка F <sub>1</sub> (стандарт)	160	2,98±0,54	84,93±15,39	9,00±0,90	5,00±0,40	5,00±0,20	9,00	4,10	31,70	109	45,0±2,7	0,5±0,1	2,0±0,5	11,0±1,5

разцы с высокой наружной кочерыгой (от  $9,33 \pm 3,79$  до  $12,85 \pm 0,99$  см), что делало их пригодными для механизированной уборки. Все гибриды характеризовались высоким содержанием сухого вещества (от 9,0 до 10,5 %). Количество аскорбиновой кислоты находилось в пределах от 21,12 до 38,70 мг%. Исключение составляла гибридная комбинация 2-45-1 $\times$ 1-18-2 с содержанием аскорбиновой кислоты 92,0 мг%, что почти в 3 раза превышало аналогичный показатель у остальных образцов. В той же гибридной комбинации накопление нитратов было наименьшим (33 мг/кг). В остальных образцах их количество составляло от 33 до 124 мг/кг, что не превышало ПДК 500 мг/кг сырой массы (ГОСТ Р 51809-2001) для капусты белокочанной позднего срока созревания. Содержание сахаров (4,21-5,10 %) превышало стандарт во всех гибридных комбинациях.

Следовательно, все гибридные комбинации имели высокие биохимические показатели. Поэтому при анализе необходимо исходить из их комплексной оценки, включающей также продуктивность и устойчивость к основным болезням и вредителям. Отметим, что поражение гибридов основными болезнями и вредителями оставалось невысоким, что указывает на проявление относительной полевой устойчивости.

Таким образом, методом культуры изолированных микроспор *in vitro* мы получили растения-регенеранты капусты белокочанной с разной ploидностью. Наблюдалась прямая зависимость между средним числом хромосом и числом хлоропластов в замыкающих клетках устьиц, а также длиной этих клеток. Частота спонтанного удвоения в культуре варьировала от 50,0 до 87,5 % и была наибольшей для удвоенных гаплоидов. Использование в селекционном процессе гомозиготных линий таких гаплоидов позволило нам за короткое время (2-3 года) создать гибридные комбинации капусты белокочанной позднего срока созревания, которые соответствуют заявленным требованиям конкурентоспособных F<sub>1</sub> гибридов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Крашенинник Н.В. Особенности технологии выращивания белокочанной капусты. Гавриш, 2010, 2: 16-19.
2. Nakanishi T. An effective time for CO<sub>2</sub> gas treatment in overcoming self-incompatible cabbage in *Brassica*. Plant Cell Physiol., 1973, 14: 837-873.
3. Pearson O.H. Breeding plants of the cabbage group. Bull. Calif. Agric. Exp. Stn., 1932, 532: 3-22.
4. Крючков А.В. Основные принципы получения гибридных семян на основе самонесовместимости. Известия ТСХА, 1972, 1: 124-131.
5. Пивоваров В.Ф., Старцев В.И. Капуста, ее виды и разновидности (разнообразие и способы выращивания). М., 2006.
6. Бондарева Л.Л. Научное обоснование и разработка системы методов селекции и семеноводства капустных культур. Автореф. докт. дис. М., 2009.
7. Zhang W., Fu Q., Dai X.G., Bao M.Z. The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration. Scientia Horticulturae, 2008, 117(1): 69-72 (doi: 10.1016/j.scienta.2008.03.023).
8. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnol. J., 2010, 8: 377-424 (doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x).
9. Winarto B., Teixeira da Silva J.A. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea*. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 2011, 107: 305-315 (doi: 10.1007/s11240-011-9981-z).
10. Kim J., Lee S.S. Identification of monogenic dominant male sterility and its suppressor gene from an induced mutation using a broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) microspore culture. Hortic. Environ. Biotechnol., 2012, 53(3): 237-241 (doi: 10.1007/s13580-012-0091-6).
11. Yuan S.X., Su Y.B., Liu Y.V., Fang Z.Y., Yang L.M., Zhuang M., Zhang Y.Y., Sun P.T. Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 2012, 110: 69-76 (doi: 10.1007/s11240-012-0131-z).
12. Gu H., Zhao Z., Sheng X., Yu H., Wang J. Efficient doubled haploid production in microspore culture of loose-curd cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). Euphytica, 2014, 195: 467-475 (doi: 10.1007/s10681-013-1008-x).

13. Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Супрунова Т.П. Получение удвоенных гаплоидов у растений рода *Brassica* L. Вавиловский журнал генетики и селекции, 2015, 19(1): 111-120.
14. Devaux P., Pickering R. Haploids in the improvement of *Poaceae*. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. V. 56 /C.E. Palmer, W.A. Keller, K.J. Kasha (eds.). Springer, Berlin-Heidelberg, 2005: 215-242 (doi: 10.1007/3-540-26889-8\_11).
15. Kasha K.J., Maluszynski M. Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. In: Doubled haploid production in crop plants: a manual /M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (eds). Springer Netherlands, 2003: 1-4 (doi: 10.1007/978-94-017-1293-4\_1).
16. Shmykova N.A., Suprunova T.P., Pivovarov V.F. Biotechnologies and molecular methods in vegetable crop breeding (to 95<sup>th</sup> Anniversary of VNISSOK). Agricultural Biology, 2015, 50(5): 561-570 (doi: 10.15389/agrobiol.2015.5.561eng).
17. Монахос С.Г. Селекция капусты пекинской с использованием биотехнологических методов. Картофель и овощи, 2014, 9: 34-35.
18. Резникова С.А. Цитология и физиология развивающегося пыльника. М., 1984.
19. Sari N., Abak K., Pitrat M. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai. Scientia Horticulturae, 1999, 82: 265-277.
20. Qin X., Rotino G.L. Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of in vitro-grown androgenic pepper plantlets. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 1995, 41(2): 145-149.
21. Намаока Y., Fujita Y., Iwai S. Number of chloroplasts in haploids and diploids produced via anther culture in *Brassica campestris*. Plant Tissue Culture Letters, 1991, 8(2): 67-72.
22. Galbraith D.W., Lambert G.M., Macas J., Dolezel J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. Current Protocols in Cytometry, 2001, 2(7.6): 7.6.1-7.6.227 (doi: 10.1002/0471142956.cy0706s02).
23. Heini K., Walker D.J., Gonzales E., Frayssinet N., Correal E., Bouzid S. Estimation of nuclear DNA content and determination of ploidy level in Tunisian populations of *Atriplex halimus* L. by flow cytometry. In: Flow cytometry — recent perspectives /I. Schmid (ed.). InTech, Rijeka, Croatia, 2012: 103-118 (doi: 10.5772/37955).
24. Winarto B., Mattjik N.A., Purwito A., Marwoto B. Ploidy screening of anthurium (*Anthurium andreaeanum* Linden ex André) regenerants derived from anther culture. Scientia Horticulturae, 2010, 127(1): 86-90 (doi: 10.1016/j.scienta.2010.09.004).
25. Friedt W., Zarhloul K. Haploids in the improvements of *Crucifers*. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. V. 56 /C.E. Palmer, W.A. Keller, K.J. Kasha (eds.). Springer, Berlin-Heidelberg, 2005: 191-213 (doi: 10.1007/3-540-26889-8\_10).
26. Smykalova I., Vetrovcova M., Klima M., Machackova M., Griga M. Efficiency of microspore culture for doubled haploid production in the breeding project «Czech Winter Rape». Czech J. Genet. Plant Breed., 2006, 42: 58-71.
27. Ferrie A.M.R., Caswell K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 2011, 104: 301-309 (doi: 10.1007/s11240-010-9800-y).
28. Takahata Y., Takahashi Y., Tsuwaamoto R. Microspore culture and doubled haploid. In: Biotechnology of *Crucifers* /S.K. Gupta (ed.). Springer, 2013: 45-62 (doi: 10.1007/978-1-4614-7795-2\_4).
29. Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol., 1982, 105: 427-434.
30. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 1968, 50: 151-158 (doi: 10.1016/0014-4827(68)90403-5).
31. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 1962, 15: 473-497 (doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x).
32. Шумилина Д.В., Шмыкова Н.А., Бондарева Л.Л., Супрунова Т.П. Влияние генотипа и компонентов среды на эмбриогенез в культуре микроспор капусты китайской *Brassica rapa* ssp. *chinensis* сорта Ласточка. Известия РАН, 2015, 4: 368-375 (doi: 10.7868/S000233291504013X).
33. Пухальский В.А., Соловьев А.А., Бадаева Е.Д., Юрцев В.Н. Практикум по цитологии и цитогенетике растений. М., 2007.
34. Монахос С.Г., Нгуен М.Л., Безбожная А.В., Монахос Г.Ф. Связь плоидности с числом хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у диплоидных и амфидиплоидных видов *Brassica*. Сельскохозяйственная биология, 2014, 5: 44-54 (doi: 10.15389/agrobiol.2014.5.44rus).
35. Монахос Г.Ф., Монахос С.Г. Капуста пекинская *Brassica rapa* L. Em. Metzg. ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt. Биологические особенности, генетика, селекция и семеноводство. М., 2009.
36. Доспехов Б.А. Методика опытного дела. М., 1985.
37. Сапожникова Е.В., Дорофеева Л.С. Определение содержания АК в окрашенных растительных экстрактах йодометрическим методом. Консервная и овощесушильная промышленность, 1966, 5: 29.

38. Квасников Б.В., Антонов Ю.П. Килоустойчивость сортов и видов крестоцветных культур. Защита растений, 1972, 9: 16.
39. Hansen M. Production of homogeneous varieties in *Brassica*. Modern plant Breeding. Proc. NJF Congress: Agriculture and Society. Norway, Aas (28 Jun–1 Jul 1999). Nordisk Jordbrugsforskning (Denmark), 1999, 81(3): 148-153.
40. Rudolf K., Bohanes B., Hansen M. Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. *capitata* L.: Genetic improvement of nonresponsive cultivars and effect of genome doubling agents. Plant Breeding, 1999, 118: 237-241 (doi: 10.1046/j.1439-0523.1999.118003237.x).
41. Байдина А.В., Моначос С.Г. Селекция капусты на базе удвоенных гаплоидов. Картофель и овощи, 2015, 11: 39-40.
42. Dias S.J.C. Protocol for broccoli microspore culture. In: Doubled haploid production in crop plants: a manual /M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (eds.). Springer Netherlands, 2003: 195-204 (doi: 10.1007/978-94-017-1293-4\_1).

ФГБНУ Всероссийский НИИ селекции и семеноводства  
овощных культур,  
143080 Россия, Московская обл., Одинцовский р-н,  
пос. ВНИИССОК, ул. Селекционная, 14,  
e-mail: vniissok@mail.ru

Поступила в редакцию  
7 июня 2016 года

*Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2017, V. 52, № 1, pp. 143-151

## NEW GENERATION HYBRIDS OF WHITE CABBAGE (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *alba* DC) BASED ON DOUBLED HAPLOIDS

V.F. Pivovarov, L.L. Bondareva, N.A. Shmykova, D.V. Shumilina, A.I. Mineikina

All-Russian Research Institute of Breeding and Seed Production of Vegetable Crops, Federal Agency of Scientific Organizations, 14, ul. Selekcionnaya, pos. VNISSOK, Odintsovskii Region, Moscow Province, 143080 Russia, e-mail vniissok@mail.ru

The authors declare no conflict of interests

Received June 7, 2016

doi: 10.15389/agrobiology.2017.1.143eng

### Abstract

Presently, cabbage breeding is mainly focused on F<sub>1</sub> hybrids necessitating constant parental lines to be obtained. Doubled haploid (DH) technology based on isolated microspore in vitro culture is widely used to produce pure lines of brassica crops. This method allows us to rapidly develop homozygous lines, in contrast to time-consuming traditional breeding for heterosis in cross-pollinating crops which takes 7 to 10 years for annuals and 14 to 20 years for biennial plants. One of the objectives of DH technology is to provide the all possible number of doubled haploid plants that allows more fully encompass the spectrum of genetic recombination, including the recessive locus. The aim of our study was to evaluate economically important traits in white cabbage (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *alba* DC) constant doubled haploid lines of late ripening and to improve the technology for producing DH based F<sub>1</sub> hybrids. Eleven breeding lines of late ripening cabbage were used to obtain doubled haploid lines from microspore in vitro culture. Of the obtained lines, twelve doubled haploid genotypes were selected for further use based on evaluation of ploidy and combining ability. Seed progeny was reproduced by hybridization of regenerated plants in a climatic chamber (2014-2015). We used the schemes of creating self-incompatible lines and two-line-based hybrids. In the field trials (Moscow region, 2014-2015), the doubled haploids and their hybrid combinations were compared to the standard (Severyanka F<sub>1</sub>) for the main valuable characteristics (i.e. the content of dry matter, nitrates, and vitamin C). The field resistance to Fusarium wilt, alternariosis, and pest damage were determined at cabbagehead technical maturity. The resistance to clubroot was assessed under artificial infection. There was a direct relationship of the average number of chromosomes to the number of chloroplasts in the stomata guard cells and the length of guard cells. The frequency of spontaneous doubling of the chromosomes numbers varied from 50.0 % to 87.5 % in different genotypes. A total of 11 to 73 % produced lines were high self-incompatible. Their geitonogamic pollination in the topcrosses resulted in 42 hybrid combinations. The model of F<sub>1</sub> hybrid most fully responding to consumer market demands was developed. Ten promising hybrid combinations which matched the model parameters in two-year field testing were recommended for variety testing. Hybrids were characterized by uniformity, high biochemical quality, the resistance to major diseases and pests and the yield of 104.60±8.27 t/ha. The dry matter content reached to 10.5 %, the sugar content was about 4.21-5.10 %, and ascorbic acid level ranged from 21.12 to 38.70 mg%. Both the highest level of ascorbic acid (92.0 mg%) and the smallest nitrate accumulation (33 mg/kg) were characteristic of one hybrid combination.

Keywords: white cabbage, *Brassica oleracea* L., doubled haploid lines, heterosis F<sub>1</sub> hybrids, in vitro isolated microspore culture, self-incompatibility, DH-technology, spontaneous doubling, ploidy.