

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-4-3-7>
УДК 635.342:631.527.5

**Минейкина А.И., Бондарева Л.Л.,
Шумилина Д.В., Домблидес Е.А.,
Солдатенко А.В.**

ФГБНУ
«Федеральный научный центр овощеводства»
143072, Россия, Московская обл., Одинцовский
р-н, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д. 14
E-mail: stevijaelena@yandex.ru,
lyuda_bondareva@mail.ru,
edomblides@mail.ru,
alex-soldat@mail.ru

Ключевые слова: капуста белокочанная, гетерозисные гибриды, культура изолированных микроспор *in vitro*, удвоенные гаплоидные линии, гомозиготность, самонесовместимость, комбинационная способность.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Минейкина А.И., Бондарева Л.Л., Шумилина Д.В., Домблидес Е.А., Солдатенко А.В. Усовершенствование методов создания гибридов капусты белокочанной. Овощи России. 2019;(4):3-7. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-4-3-7>

Поступила в редакцию: 09.04.2019
Опубликована: 25.08.2019

**Anna I. Mineykina,
Lyudmila L. Bondareva,
Darya V. Shumilina,
Elena A. Domblides,
Alexey V. Soldatenko**

FSBSI Federal Scientific Vegetable Center
Selekcionnaya St. 14, VNISSOK,
Odintsovo district, Moscow region,
Russia, 143072
E-mail: stevijaelena@yandex.ru,
lyuda_bondareva@mail.ru,
edomblides@mail.ru,
alex-soldat@mail.ru

Keywords: cabbage, heterosis F₁ hybrids, *in vitro* isolated microspore culture, doubled haploid lines, homozygosity, self-incompatibility, combining ability.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For citation: Mineykina A.I., Bondareva L.L., Shumilina D.V., Domblides E.A., Soldatenko A.V. Improvement of methods of creating hybrids of cabbage. Vegetable crops of Russia. 2019;(4):3-7 (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-4-3-7>

Received: 09.04.2019
Accepted: 25.08.2019

Усовершенствование методов создания гибридов капусты белокочанной



АННОТАЦИЯ

Актуальность

Одним из основных направлений селекции капустных культур является создание гетерозисных гибридов F₁ с комплексом хозяйственно ценных признаков. Этот процесс является длительным и трудоемким, поскольку для получения выровненных линий необходимо в течение 6-12 лет проводить инбридинг. При этом не каждая линия дает желаемый гетерозисный эффект, что, в свою очередь, требует дополнительной проверки.

Методика

Для ускорения некоторых этапов селекционного процесса в работе использовали биотехнологический метод культуры изолированных микроспор *in vitro*, который позволяет уже в первом поколении получать линии со 100% гомозиготностью. Комбинационную способность определяли в системе полных диаллельных скрещиваний по основным морфологическим признакам.

Результаты

В результате работы оптимизирован состав питательной среды культуры изолированных микроспор *in vitro* и индивидуально подобран для каждого генотипа капусты белокочанной для наибольшего выхода эмбриоидов. Максимальный выход эмбриоидов был получен на среде с pH 6,2 с использованием ампициллина 100 мг/л и зеатина 1 мг/л и составил 466,7±153,2 шт./100 бутонов. Получен принципиально новый исходный материал для селекции – удвоенные гаплоидные линии капусты белокочанной. Выделены линии, являющиеся наилучшими исходными формами при создании высокогетерозисных гибридов F₁ по урожайности, линии с компактной розеткой листьев, с оптимальной наружной и короткой внутренней кочерыгой. Проведенные исследования показали, что с учетом оптимизации некоторых этапов селекционного процесса для создания чистых линий капусты белокочанной требуется 3 года, что сокращает селекционный процесс в 2 раза.

Improvement of methods of creating hybrids of cabbage

ANNOTATION

Relevance

One of the basic directions of the cabbage crop breeding is the creation of F₁ hybrids with a complex of economically valuable traits. This process is difficult and time-consuming as to get pure lines must be within 6-12 years hold inbreeding. Herewith not every line gives the desired heterotic effect that also requires additional verification.

Methods

Biotechnological method culture of isolated microspores *in vitro*, which allows in the first generation to receive a line with 100% homozygosity, was used to speed up the breeding process. Combination ability were performed in complete diallel cross on the basic morphological signs.

Results

Culture medium for cultivation of isolated microspores *in vitro* was optimized for each genotype of cabbage for the best embryoids regeneration. Maximum amount of embryoids was received on medium with pH 6.2 using ampicillin 100 mg/l and zeatin 1 mg/l: 466.7 ± 153.2 PCs/100 buds. A new source material for breeding – doubled haploid lines of cabbage was received. Lines – the best parents for F₁ hybrids with high yield, compact rosette of leaves, with optimum inside and short outside cabbage stump was created. Studies have shown that optimization of breeding process in case of creation of pure lines of cabbage in 3 years with microspore culture requires to reduce the breeding process in 2 times.

Введение

Одной из приоритетных задач отечественной селекции капустных культур является создание качественных сортов и гибридов в кратчайшие сроки, при этом отличающихся разнообразием, выровненностью, устойчивостью к болезням. Наиболее сложным, трудоемким и продолжительным этапом в этом процессе является создание константных родительских линий, на получение которых при использовании традиционных методов селекции уходит от 7 до 14 лет [1,2]. В настоящее время в современной селекции активно используются различные методы, позволяющие ускорить селекционный процесс. Одним из таких методов является биотехнологический метод культуры изолированных микроспор *in vitro*, который позволяет ускорить процесс создания F₁ гибридов в 2 раза. Данный метод не только обеспечивает гомозиготность получаемых удвоенных гаплоидов, 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 [3]. 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 используют базовые протоколы для растений рода *Brassica*, описанные ранее, которые постоянно оптимизируют под конкретные генотипы [4].

При этом крайне мало информации по внедрению полученных линий удвоенных гаплоидов капустных культур в селекционный процесс [5].

Цель исследования – усовершенствование метода культуры изолированных микроспор *in vitro* для наибольшего выхода эмбрионидов и использование полученных

удвоенных гаплоидных растений в селекционном процессе капусты белокочанной.

Материалы и методы исследования

Работу выполняли в период с 2014 по 2018 годы в ФГБНУ ФНЦО. В качестве исходного материала для исследования были использованы:

1. Селекционные образцы капусты белокочанной лаборатории селекции и семеноводства капустных культур.

2. Растения-регенеранты капусты белокочанной, полученные в культуре изолированных микроспор *in vitro* в лаборатории биотехнологии.

Выращивание растений.

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

Определение стадии развития микроспор. Цитологическое исследование стадий развития микроспор проведено по методике дифференциального окрашивания [7] с помощью микроскопа Axio Imager A2.

Культура микроспор. Получение растений-регенерантов методом культуры изолированных микроспор проводили согласно методических рекомендаций [8]. В качестве питательных сред использовали модифицированные базовые среды. Микроспоры, выделенные из стерильных бутонов размером 4-5 мм, инкубировали в среде Лихтера с половинным содержанием компонентов (SNLN), pH 5,8 [9] в течение 2-х суток в темноте при 32°C, далее при 25°C до образования эмбрионидов. При достижении эмбриоидами стадии крупных глобул, сердцевидной или торпедовидной фазы их помещали в чашки Петри на среду Гамборга (B5) [10]. При обра-

зовании побегов их отделяли и переносили на среду SMC [11]. Растения, у которых были нормально развиты листья и корневая система, переносили в вегетационные сосуды. Адаптацию и выращивание растений-регенерантов проводили в тех же условиях, что и донорные [12].

Оценка полученного материала на основные хозяйственно ценные признаки. Полевые опыты закладывали на опытных полях ФГБНУ ФНЦО, подготовленных по стандартной для овощных культур агротехнике [13]. Посев семян проводили в третьей декаде апреля в кассеты с диаметром ячейки 5x5 см. В третьей декаде мая рассаду высаживали в открытый грунт. Схема посадки 70x50 см.

Оценку полученных гибридных комбинаций капусты белокочанной осуществляли по основным хозяйственно ценным признакам в стадии технической спелости кочана. Анализ комбинационной способности родительских линий определяли в системе полных диаллельных скрещиваний по Гриффингу методом 1 [14].

Биохимические анализы проводили в лаборатории применения агрохимических средств в семеноводстве овощных культур ФГБНУ ФНЦО по общепринятым методикам [15].

Оценка устойчивости к основным болезням и вредителям. Оценку устойчивости растений капусты белокочанной осуществляли визуально в полевых условиях на естественном фоне в стадии технической спелости кочана. Оценку пораженности килой растений капусты белокочанной – на искусственном инфекционном фоне в открытом грунте в лаборатории иммунитета и защиты растений ФГБНУ ФНЦО [16, 17].

Обработку данных проводили методом дисперсионного анализа по Доспехову [13] с помощью прикладных программ Excel пакета Microsoft Office.

Таблица 1. Степень проявления самонесовместимости линий капусты белокочанной
Table 1. The degree of manifestation of self-incompatibility lines of cabbage

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

Результаты исследований

Влияние состава питательной среды на выход эмбриоидов

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 для капусты белокочанной среднепозднего и позднего сроков созревания селекции ФНЦО.

Для изучения влияния кислотности на образование эмбриоидов капусты белокочанной были использованы среды с pH 5,8; 6,2; 6,6. В результате серии опытов 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. Разная реакция сортообразцов капусты белокочанной на кислотность питательной среды свидетельствует о необходимости проведения подбора параметров инкубирования для каждого генотипа индивидуально. В качестве антибиотика для предотвращения контаминации в культуре микроспор был использован ампициллин.

В работах ряда авторов отмечено положительное влияние на морфогенез капусты белокочанной использования в различных соотношениях в питательной среде цитокининов и ауксинов [18,19]. В ходе исследований было изучено влияние на процесс эмбриогенеза ряда регуляторов роста и развития растений: цитокининов (кинетин и зеатин) и ауксина (индолилуксусная кислота). В качестве контроля использовали безгормональную среду. В опыте использовали те генотипы капусты белокочанной, которые ранее не отзывались на безгормональную среду. Максимальный выход эмбриоидов был отмечен на среде с использованием зеатина в концентрации 1 мг/л и составил $466,7 \pm 153,2$ 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, в результате проведенных опытов нами были подобраны среды для каждого изученного генотипа капусты белокочанной, которые способствовали наибольшему выходу эмбриоидов.

Полученные в культуре микроспор растения-регенеранты были протестированы на плоидность. Для дальнейшей селекции были использованы лишь удвоенные гаплоидные растения.

Оценка степени проявления самонесовместимости популяций растений-регенерантов

Важным этапом при работе с растениями капусты белокочанной является определение степени самонесовместимости, которая опреде-



Рис. 1. Перспективная гибридная комбинация капусты белокочанной
Fig. 1. Perspective hybrid of cabbage

ляет их дальнейшее использование в селекционном процессе. Данный показатель 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. 1) [20].

Показано, что каждая популяция содержала растения-регенеранты с высокой степенью самонесовместимости. Поэтому в дальнейшей работе была использован метод получения гибридов на основе самонесовместимости.

Составление модели F₁ гибрида капусты белокочанной

Для оценки полученных гибридных комбинаций капусты белокочанной нами была составлена модель F₁ 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.

Изучение комбинационной способности линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной

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

Селекция гетерозисных гибридов капусты белокочанной в конечном итоге сводится к созданию линий, которые обладают высокими значениями ОКС, сочетающимися комплекс хозяйственно ценных признаков (табл.2).

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 сред-

ней 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.

Заключение

В результате исследований оптимизирована методика получения удвоенных гаплоидов с большим выходом эмбриоидов путем модификации питательной среды. Установлена необходимость подбора рН среды для каждого генотипа инди-

Таблица 2. Оценка эффектов ОКС линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной
Table 2. Estimation of the effects of the general combining ability (GCA) of lines doubled haploids of cabbage

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

видуально. Максимальный выход эмбриоидов был получен на среде с рН 6,2 с использованием ампициллина 100 мг/л и зеатина 1 мг/л и составил 466,7±153,2 шт./100 бутонов.

С учетом сокращения временных затрат 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 X – год начала селекционной работы;

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

3. Размножений линий удвоенных гаплоидов, получение гибридных ком-

бинаций, оценка комбинационной способности линий: зима-осень X+2.

Таким образом, используя метод культуры изолированных микроспор *in vitro*, требуется 3 года для получения и оценки линий со 100% гомозиготностью, которые в дальнейшем можно включать в различные селекционные программы.

Об авторах:

Минейкина Анна Игоревна – кандидат с.-х. наук, н.с. лаборатории биотехнологии <https://orcid.org/0000-0001-9864-1137>

Бондарева Людмила Леонидовна – доктор с.-х. наук, зав. лаб. селекции и семеноводства капустных культур <https://orcid.org/0000-0002-0912-5913>

Шумилина Дарья Владимировна – кандидат биол. наук, ст.н.с. лаборатории биотехнологии <https://orcid.org/0000-0002-1462-8486>

Домблидес Елена Алексеевна – кандидат с.-х. наук, зав. лабораторией биотехнологии <https://orcid.org/0000-0002-2695-190X>

Солдатенко Алексей Васильевич – доктор с.-х. наук, проф. РАН, главный н.с. <https://orcid.org/0000-0002-9492-6845>

About the authors:

Anna I. Mineykina – Ph.D. in Agriculture, Research Officer of Laboratory of Biotechnology

Lyudmila L. Bondareva – Doctor of Sc. in Agriculture, Head of Laboratory of Cole Crop Breeding and Seed Production

Darya V. Shumilina – PhD in Biological sciences, Senior Research Officer of Laboratory of Biotechnology

Elena A. Domblides – Ph.D. in Agriculture, Head of Laboratory of Biotechnology

Alexey V. Soldatenko – Dr. of. Sc. in Agriculture

• Литература

1. Пивоваров В.Ф., Старцев В.И. Капуста, её виды и разновидности (разнообразии и способы выращивания) // М.: ВНИИССОК. – 2006. – 192 с.
2. Бондарева, Л.Л. Научное обоснование и разработка системы методов селекции и семеноводства капустных культур: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.05 / М., 2009. – 47 с.
3. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation // J. Plant Biotech. – 2010. – Vol. 8. – P.377-424.
4. Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Супрунова Т.П. Получение удвоенных гаплоидов у растений рода *Brassica* L. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т.19. – №1. – С.111-120.
5. Монахос С.Г. Интеграция современных биотехнологических и классических методов в селекции овощных культур: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.05 / М., 2015. – 22 с.
6. Бондарева Л.Л., Разин О.А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАМЕР ИСКУССТВЕННОГО КЛИМАТА ПРИ СЕЛЕКЦИИ КАПУСТЫ. Овощи России. 2014;(4):37-39. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2014-4-37-39>
7. Alexander M.P. Differential staining of aborted and non-aborted pollen // Stain technol. – 1969. – Vol.44. – P.117-122.
8. Домблидес Е.А., Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Заячковская Т.В., Минейкина А.И., Козарь Е.В., Ахраменко В.А., Шевченко Л.Л., Кан Л.Ю., Бондарева Л.Л., Домблидес А.С. Технология получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор семейств капустные (методические рекомендации) / ВНИИССОК. – М.: Изд-во ВНИИССОК. – 2016. – 40 с.
9. Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* // Z. Pflanzenphysiol. – 1982. – Vol.105. – P.427-434.
10. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp Cell Res. – 1968. – Vol.50. – P.151-158.
11. Murashige T.A., Skoog F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. – 1962. – V.15. – P.473-497.
12. 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. Серия биологическая. – 2015. – №4. – 368с.
13. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / под ред. Б.А. Доспехова // М.: Агропромиздат, 1985. – 350 с.
14. Griffing B.A. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems // Australian J. Biol. Sci. – 1956. – Vol.9. – P.463-493.
15. Саложенникова Е.В., Дорофеева Л.С. Определение содержания АК в окрашенных растительных экстрактах йодометрическим методом // Консервная и овощесушильная промышленность. – 1966. – № 5. – 29 с.
16. Квасников Б.В., Белик Т.А. Методика оценки сортов капусты на устойчивость к киле // М., ВАСХНИЛ, 1970. – 16 с.
17. Маслова А.А., Ушаков А.А., Старцев В.И., Бондарева Л.Л. БОЛЕЗНЕУСТОЙЧИВОСТЬ СОРТОВ КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ КАК ФАКТОР СНИЖЕНИЯ ФИТОСАНИТАРНЫХ РИСКОВ В ОВОЩЕВОДСТВЕ. Овощи России. 2013;(3):50-54. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2013-3-50-54>
18. Lazzeri P.A., Dunwell J.M. *In vitro* shoot regeneration from seedling root segments of *Brassica oleracea* and *Brassica napus cultivars* // Ann. Bol. – 1984. – Vol. 54. – P. 341.
19. Klimaszewska K., Keller W.A. Plant regeneration from stem cortex protoplasts of *Brassica napus* // Plant Cell Tissue Org Cult. – 1987. – Vol.8. – P. 225-233.
20. Монахос С.Г., Нгуен М.Л., Безбожная А.В. и др. Связь плоидности с числом хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у диплоидных и амфидиплоидных видов *Brassica* // С.-х. биология. – 2014. – №5. – С.44-54.

• References

1. Pivovarov V.F., Startsev V.I. Cabbage, its types and of the variety (variety and cultivation methods) // М.: VNISSOK, 2006. – 192 p. (In Russ.)
2. Bondareva, L.L. Scientific justification and system development methods of breeding and seed production of Cole crops: katege. Dees. ... Dr. agricultural Science: 06.01.05/ M., 2009. – 47 p. (In Russ.)
3. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation // J. Plant Biotech. 2010. – Vol. 8. – P.377-424. (In Russ.)
4. Shmykova N.A., Shumilina D.V., Suprunova T.P. Doubled haploid production in *Brassica* L. Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):111-120. (In Russ.)
5. Monakhos S.G. Integration of modern biotechnology and classical methods in breeding vegetable crops: katege. Dees. ... Dr. agricultural Science: 06.01.05/ M., 2015. – 22 p. (In Russ.)
6. Bondareva L.L., Razin O.A. USE OF GROWTH CHAMBERS FOR CABBAGE BREEDING. Vegetable crops of Russia. 2014;(4):37-39. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2014-4-37-39>
7. Alexander M.P. Differential staining of aborted and non-aborted pollen // Stain technol. – 1969. – Vol.44. – P.117-122. (In Russ.)
8. Domblides E.A., Shmykova N.A., Shumilina D.V., Zayachkovskaya T.V., Mineykina A.I., Kozar E.V., Akhramenko V.A., Shevchenko L.L., Kan L.Yu., Bondareva L.L., Domblides A.S. Technology for producing doubled haploids in the culture of microspores of the cabbage family (methodical recommendations) / VNISSOK, 2016. – 40 p. (In Russ.)
9. Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* // Z. Pflanzenphysiol, 1982;(105):P.427-434. (In Russ.)
10. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp Cell Res., 1968;(50):P.151-158. (In Russ.)
11. Murashige T.A., Skoog F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum, 1962;(15):P.473-497. (In Russ.)
12. Shumilina D.V., Shmykova N.A., Bondareva L.L., Suprunova T.P. Effect of genotype and medium culture content on microspore-derived embryo formation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) cv. Lastochka // Biology Bulletin, 2015; 42(4):P. 302-309. (In Russ.)
13. Dosphehov B.A. Methods of field experience. M., Agropromizdat, 1985. 350 p. (In Russ.)
14. Griffing B.A. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems // Australian J. Biol. Sci., 1956. – Vol.9. P.463-493. (In Russ.)
15. Sapolzhnikova E.V., Dorofeeva L.C. Determination of AA content in dyed plant extracts by iodometric method // Canning and vegetable drying industry. – 1966. – 5. – 29 p. (In Russ.)
16. Kvasnikov B.V., Belik T.A. Method of assessment of cabbage varieties for resistance to keel // M. VASHNIL., 1970. – 16 p. (In Russ.)
17. Maslova A.A., Ushakov A.A., Startsev V.I., Bondareva L.L. DISEASE RESISTANCE OF WHITE HEAD CABBAGE VARIETIES AS A FACTOR OF REDUCTION OF THE PEST RISKS IN VEGETABLE GROWING. Vegetable crops of Russia. 2013;(3):50-54. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2013-3-50-54>
18. Lazzeri P.A., Dunwell J.M. *In vitro* shoot regeneration from seedling root segments of *Brassica oleracea* and *Brassica napus cultivars* // Ann. Bol., 1984. – Vol. 54. – P. 341. (In Russ.)
19. Klimaszewska K., Keller W.A. Plant regeneration from stem cortex protoplasts of *Brassica napus* // Plant Cell Tissue Org Cult., 1987. – 8. – P.225-233. (In Russ.)
20. Monakhos S.G., Nguen M.L., Bezbozhnaya A.V. et al. A relationship between ploidy level and the number of chloroplasts in stomatal guard cells in diploid and amphidiploid *Brassica species* // S.-h. biology, 2014;5:p.44-54. (In Russ.)