

Оригинальные статьи / Original articles

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2023-4-13-22>
УДК 635.345:631.524.85

А.Д. Заставнюк^{1*}, Г.Ф. Монахос²,
С.Г. Монахос¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» (ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева) 127550, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49

² ООО «Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева» 127550, Россия, г. Москва, ул. Пасечная, д.5

*Автор для переписки:
a.zastavnuk@rgau-msha.ru

Вклад авторов: Заставнюк А.Д. – проведение молекулярно-генетического анализа; выращивание растений; оценка устойчивости / восприимчивости к мучнистой росе; получение удвоенных гаплоидов капусты пекинской; взвешивание и учет продуктивности кочанов; статистический анализ; подготовка статьи. Монахос Г.Ф. – гибридизация; выращивание растений; консультации и общее руководство. Монахос С.Г. – общее руководство и окончательное одобрение варианта статьи для опубликования.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Заставнюк А.Д., Монахос Г.Ф., Монахос С.Г.. Получение и оценка селекционного материала для создания F₁ гибридов капусты пекинской (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) с устойчивостью к стрессовым факторам. *Овощи России*. 2023;(4):13-22.
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2023-4-13-22>

Поступила в редакцию: 31.05.2023

Принята к печати: 16.06.2023

Опубликована: 05.07.2023

Anastasia D. Zastavnyuk^{1*},
Grigory F. Monakhos², Sokrat G. Monakhos¹

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy. Timiryazevskaya str., 49, Moscow, 127550, Russia

² Breeding Station named after Nikolay N. Timofeev Pasechnaya str., 5, Moscow, 127550, Russia

*Corresponding Author:
a.zastavnuk@rgau-msha.ru

Authors' contributions: A.D. Zastavnyuk – conducting molecular genetic analysis; plants cultivation; assessment of resistance / susceptibility to powdery mildew; obtaining doubled haploids of Chinese cabbage; weighing plants and recording heads productivity; statistical analysis; preparation of the article. G.F. Monakhos – hybridization; plants cultivation; consultations and general guidance. S.G. Monakhos – general guidance and final approval of the article version for publication.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

For citations: Zastavnyuk A.D., Monakhos G.F., Monakhos S.G. Obtaining and evaluating breeding material for the creation of F₁ hybrids of Chinese cabbage (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) with resistance to stress factors. *Vegetable crops of Russia*. 2023;(4):13-22. (In Russ.)
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2023-4-13-22>

Received: 31.05.2023

Accepted for publication: 16.06.2023

Published: 05.07.2023

Получение и оценка селекционного материала для создания F₁ гибридов капусты пекинской (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) с устойчивостью к стрессовым факторам



Резюме

Актуальность и цель исследования. Капуста пекинская – овощная культура с высоким содержанием витаминов и низкой калорийностью, ценится за возможность получать несколько урожаев в год и высокую продуктивность. В последнее время поставки овоща в Россию сократились. В Госреестре менее 70 сортов и гибридов культуры, многие восприимчивы к важнейшим заболеваниям. Необходимо удовлетворить потребительский спрос и пополнить Госреестр новыми продуктивными коммерческими гибридами с устойчивостью к стрессорам. Цель исследования состояла в оценке и создании генотипов с набором ценных хозяйственных признаков, включая устойчивость к киле, мучнистой росе, раннему стеблеванию.

Материалы и методы. В качестве растительного материала были использованы линии капусты пекинской различной степени инбредности и ДН, а также гибридные комбинации от скрещивания этих линий. Линии получены в 2019-2020 годах, селекционный материал для них отбирали на провокационных фонах по устойчивости к киле и толерантности к внутреннему ожогу кочанов. Использовали следующие методы: выращивание растений; выделение ДНК (метод СТАВ); ПЦР-анализ; электрофорез и визуализация результатов; оценка продуктивности и дисперсионный анализ; создании удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro*; оценка устойчивости / восприимчивости к мучнистой росе.

Результаты. Рекомендованы 2 генотипа с высокой продуктивностью и выровненностью в обороте лето-осень 2022 года, выявлен генотип, превысивший 3 стандарта по массе кочана в обороте весна-лето 2022 года; в результате молекулярного генотипирования проведена дифференциация 41 линии по гену устойчивости к киле CRb; получены ДН растения для 4 генотипов с устойчивостью к стеблеванию, изучена их отзывчивость к эмбриогенезу; проведена оценка 18 линий на устойчивость к мучнистой росе, выделены 7 генотипов с устойчивостью к заболеванию.

Ключевые слова: капуста пекинская, *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*, кила, *P. brassicae*, мучнистая роса, устойчивость, молекулярно-генетический анализ, удвоенные гаплоиды

Obtaining and evaluating breeding material for the creation of F₁ hybrids of Chinese cabbage (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) with resistance to stress factors

Abstract

Relevance and purpose of the study. Chinese cabbage is a vegetable crop with a high content of vitamins and low calorie content, valued for its ability to receive several crops per year and high productivity. Recently, there has been a reduction in the supply of the vegetable to Russia. There are less than 70 varieties and hybrids of the crop in the State Register of Selection Achievements, many of them are susceptible to the most important diseases. It is necessary to meet consumer demand with new commercial hybrids with resistance to stressors. The aim of the study was to evaluate and obtain genotypes with a set of valuable economic traits, including resistance to clubroot, powdery mildew, and early bolting.

Materials and methods. The Chinese cabbage lines of various degrees of inbred and DH, as well as hybrid combinations from crossing these lines, were used as plant material. The lines were obtained in 2019-2020, the breeding material for them was selected on the ground infected with clubroot and with tolerance to tip burn of heads. To achieve the goal, the following methods were applied: plants cultivation; DNA isolation (CTAB method); PCR analysis; electrophoresis and visualization of results; productivity assessment and dispersion analysis; obtaining doubled haploids in culture of isolated microspores *in vitro*, assessment of resistance/susceptibility to powdery mildew.

Results. 2 genotypes with high productivity and alignment in turnover summer-autumn 2022 and a genotype exceeding 3 standards in head weight in turnover spring-summer 2022 were recommended; as a result of molecular genotyping, 41 lines were differentiated according to the clubroot resistance gene CRb; DH plants for 4 genotypes with resistance to early bolting were obtained, their responsiveness to embryogenesis was studied; 18 lines were evaluated for resistance to powdery mildew, 7 genotypes with resistance to the disease were identified.

Keywords: Chinese cabbage, *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*, clubroot, *P. brassicae*, powdery mildew, resistance, molecular genetic analysis, doubled haploids

Введение

Капуста пекинская – важный и ценный для рациона питания человека овощ, неизменный ингредиент многих диет из-за низкой калорийности и хорошего биохимического состава. Например, в ней много витамина С, В5, В2, витамина РР, противовоспалительного витамина U, β-каротина, белков и клетчатки. Она содержит также незаменимую аминокислоту лизин, которая способствует активному очищению крови [1].

Культуру возделывают как однолетнее растение, хотя по своей природе это двулетник. Овощ любят и широко выращивают во всем мире: это Северный и Северо-Восточный Китай, Япония, Америка, Австралия, Юго-Восточная Азия [2]. Ежегодная посевная площадь пекинской капусты в Китае достигает 2,67 млн. гектаров, что составляет 15% от общей посевной площади овощей, с выходной стоимостью почти 60 млрд. юаней [2].

В странах Европы также возделывают и потребляют культуру. Так, в Польше площадь её производства ежегодно составляет 5-7 тыс. га и зависит от гибридов F₁, поставляемых иностранными семеноводческими компаниями [3]. А в Австрии по данным компании Statista (2022), в 2020/21 году годовой объем потребления пекинской капусты составил около 32,6 тыс. тонн¹.

Привлекательность производства культуры заключается в высокой оптовой цене реализации и спросе, высокой урожайности (до 60 т с 1 га), а также в возможности получать два урожая в год [4]. Популярность капусты пекинской в России продолжает развиваться и в промышленном, и в частном овощеводстве. В данный период в стране посевные площади увеличиваются под культуры азиатских подвидов *Brassica*, и снижаются под корнеплодной репой [5]. Однако значительная доля потребляемой пекинской капусты импортируется в Россию из других стран. По материалам исследований АБ-Центра (2022), импорт культуры за пять лет был сокращен примерно на 58% [4] (рисунок 1).

Поэтому необходимо иметь отечественный сортимент гибридов пекинской капусты, чтобы обеспечить импортозамещение.

По состоянию на ноябрь 2022 года в Госреестр включено 16 отечественных сортов и 52 гибрида F₁ пекинской капусты, 48% из которых зарубежные [4].

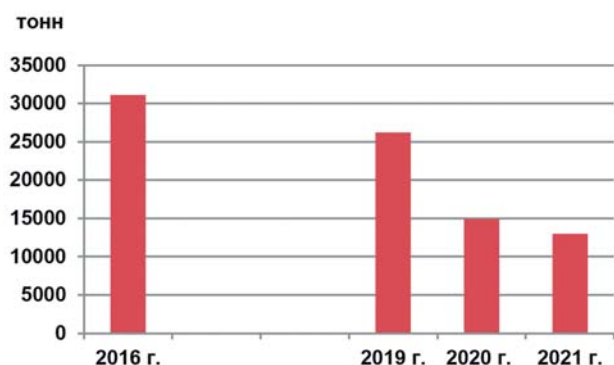


Рис. 1. Объем импорта пекинской капусты в Россию
Fig. 1. Import volume of Chinese cabbage to Russia

¹ Consumption volume collards & cabbages Austria 2008-2020 § Statista [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.statista.com/statistics/482483/consumption-volume-collards-and-chinese-cabbages-austria/>, свободный

Для сравнения, в Японии зарегистрировано более 300 гибридов. На урожайность капустных культур негативно влияют различные патогены, в том числе бактериальные, вирусные и грибковые инфекции [5]. Многие сорта и гибриды Госреестра восприимчивы к наиболее опасным патогенам. Такие заболевания, как кила (возбудитель *Plasmidiophora brassicae*), вершинный ожог (некроз капусты), альтернариоз (возбудители *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola*) и мучнистая роса (возбудитель *Erysiphe communis* f. sp. *brassicae* Hammarl.), хотя и не входят в перечень карантинных объектов на территории России и Евразийского экономического союза, обычно поражают значительную часть посевных площадей и приводят к ощутимой потере и снижению товарной продукции. Создание устойчивых к этим патогенам сортов является важным направлением в селекции. По состоянию на ноябрь 2022 г. устойчивость к киле имеют всего 29% гибридов капусты пекинской Госреестра, только 13% из которых отечественной селекции, менее 3% гибридов устойчивы к краевому некрозу, нет гибридов с толерантностью к альтернариозу.

Устойчивость к раннему стеблеванию, очень важную ввиду биологической особенности культуры, имеют всего 13% сортов Госреестра и только половина рекомендованных для выращивания растений имеют закрытую вершину кочана. Много сортов и гибридов пекинской капусты Госреестра представлены кочанными формами типа Аити (часто недостаточно устойчивыми к стеблеванию) и Чифу (с остроконечным кочаном типа «пуля»), а также гибридами этих сортогрупп с сортами с полукочанным кочаном типа Касин (с устойчивостью к стеблеванию, но часто недостаточно устойчивыми к альтернариозу и вирусу мозаики турнепса) [1].

Для перехода на зеленое сельское хозяйство и производство органической продукции необходимы сорта и гибриды, сочетающие высокую продуктивность и товарность с комплексной устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессовым факторам [6]. Для этого нужен селекционный материал, устойчивый к раннему стеблеванию, с высокой продуктивностью, а также с устойчивостью к заболеваниям, таким как кила, внутренний некроз, мучнистая роса.

По своей природе капуста пекинская высоко восприимчива к киле, от которой гибнет до 60% урожая [7]. Возбудитель заболевания *P. brassicae* – эндемичный организм, внутриклеточный паразит, который приводит к гипертрофии и гиперплазии клеток [8]. В результате разрастания паренхимной ткани корней, на корнях образуются клубневые наросты и в результате из-за блокировки проводящей системы растение не получает питание и гибнет. Покоящиеся споры возбудителя килы сохраняют патогенность до 20 лет [9]. Признано, что единственный эффективный способ справиться с заболеванием – выращивание растений с генетической устойчивостью к патогену [9]. Такие растения растут практически без применения пестицидов, к тому же происходит очищение почвы от спящих спор килы, которые прорастают, но не развиваются на корнях устойчивых растений и погибают [4]. При выращивании устойчивых растений дополнительно сохраняется до 40% урожая и это экономически целесообразно.

Лишь в конце XX века удалось получить первые устойчивые к киле (CR) гибриды культуры, когда удалось передать гены резистентности из европейского кормового турнепса (*B. rapa* ssp. *rapifera*) [10]. У *B. rapa* ssp. *pekinensis* и *B. rapa* ssp. *rapifera* одинаковое число хромосом (*B. rapa*, $2n = 20$, AA), поэтому интродукция любого признака между ними не вызывает сложности [11]. Для создания килоустойчивых гибридов и сортов различного назначения необходимо одновременно проводить отбор по CR и другим ценным хозяйственным признакам. Устойчивость, контролируемая одним доминантным геном CR, со временем может быть преодолена с высокой степенью вероятности [12]. Для придания высокой степени устойчивости к широкому спектру рас *P. brassicae* необходимо «пирамидировать» в одном генотипе несколько доминантных генов CR или QTL [13; 14]. Всего у *B. rapa* удалось обнаружить не менее 19 генов / QTL резистентности к *Plasmodiophora brassicae* Wor., которые локализованы на шести группах сцепления [9; 14]. К ключевым генам «главного действия» относят гены *CRa* [15], *CRb* [16], *Crr1* [17], и *CRA05* [18].

При создании F₁-гибридов растений *Brassica* в большинстве развитых стран традиционные методы классической селекции комбинируют с технологиями ускорения селекционного процесса, такими, как методы молекулярного маркирования (для отбора и «пирамидирования» генов), а также создания удвоенных гаплоидов (DH). Их применение позволяет создавать чистые линии с определёнными признаками (например, устойчивостью к киле или раннему стеблеванию) – исходный материал для скрещиваний – за 1-2 года вместо 5-6 лет традиционной селекции [19]. Наиболее эффективным и технологичным способом создания DH-линий является использование метода культуры изолированных микроспор [20]. Гаплоидные растения регенерируют *in vitro* из микроспор, изолированных из пыльников. Технология не универсальна, очень чувствительна к множеству факторов, тем не менее, её широко применяют для различных растений *Brassica*, в том числе для капусты пекинской и китайской [21]. В значительной степени на отзывчивость к микроспорогенному эмбриогенезу влияет генотип культуры. Однако основным преимуществом технологии является высокий выход эмбриоидов и, как следствие, – высокое количество удвоенных гаплоидов [22].

Цель исследования состояла в оценке и создании генотипов с набором ценных хозяйственных признаков, включая продуктивность, устойчивость к киле, мучнистой росе, раннему стеблеванию.

Материалы и методы

Растительный материал. Линии капусты пекинской произведены в 2019–2020 годах из образцов, отобранных на провокационных фонах по устойчивости к киле и толерантности к внутреннему некрозу кочанов. Изучали среднюю массу кочана 36 гибридов от скрещивания этих линий в весенне-летнем обороте и 22 гибрида в летне-осеннем обороте в 2022 г. Выделение перспективных гибридных комбинаций проводили в сравнении с лучшими стандартами: зарубежным гибридом F₁ Bilko и отечественными гибридами F₁ Ника и

F₁ Гидра. Для изоляции микроспор использовали 4 линии различной степени инбридинга: ОКС₂; ЕС₂₋₃×Е₂ки 6112; K₄₃₋₁₅ и K₄₃₋₁₂, устойчивые к раннему стеблеванию.

Выращивание растений и оценка продуктивности. Растения гибридных комбинаций выращивали рассадным способом с использованием кассетной технологии. В весенне-летнем обороте посев семян в кассеты с торфяным субстратом произвели 20 апреля 2022 г., в открытый грунт в многолетний инфекционный фон по киле растения высаживали по схеме 45×35 см² 16 мая 2022 г. с одновременным поливом. Для летне-осеннего оборота посев семян произведен 30 июня 2022 г., в открытый грунт растения высаживали 21 июля 2022 г. по той же схеме. Полевые испытания генотипов были проведены при размещении опытных делянок методом рандомизированных повторений по 8 растений в каждой с двукратной повторностью. Оценку продуктивности проводили в технической зрелости кочана при взвешивании по 4 растения, вычисляя среднюю массу для каждого генотипа. Растения выращивали традиционным способом.

Используемые для введения в культуру микроспор линии посажены в сентябре 2022 г в зимнюю теплицу. Яровизацию проводили в защищенном грунте в зимний период при температуре 4–6°C.

Статистический анализ. Существенность различий в проявлении признака оценивали с помощью дисперсионного анализа на 5%-ном уровне значимости.

Оценка устойчивости к мучнистой росе. Проводили в сложившихся благоприятных для развития заболевания естественных условиях в теплице для растений, посеянных в сентябре 2022 г. Оценку растений проводили по универсальной шкале для листовых пятнистостей [23]: 0 – устойчивое (отсутствие поражения); 1 – толерантное (поражение в виде отдельных белых пятен, до 10% площади листа); 2 – слабовосприимчивое (поражено от 11% до 25% поверхности; поражение в виде отдельных белых пятен, спороношение слабое); 3 – высоковосприимчивое (поражено от 25 до 50% площади листа, поражение в виде крупных пятен, спороношение сильное); 4 – высоковосприимчивое (поражено свыше 50% площади листа, сплошной белый налет). Оценку площади поражения проводили по эскизам листьев [24].

Изоляция и культивирование микроспор. Для изоляции микроспор при помощи штангенциркуля отбирали бутоны длиной 2,5–2,7 мм, содержащие микроспоры поздней одноядерной стадии развития. Изоляцию микроспор проводили по [25; 26]. Стерилизацию бутонов проводили в 2% гипохлорите натрия с добавлением 1–2 капель Твин-20 в течение 10 минут и промывали 3 раза в стерильной воде. Изоляцию микроспор проводили в питательной среде В5, содержащей 13% сахарозы. Простерилизованные ситечки с бутонами последовательно споласкивали в стерильной воде в течение 1, 5 и 10 минут. Бутоны помещали в одноразовые бюксы с добавлением 2 мл стерильной среды В5–13, измельчали плунжерами до суспензии и фильтровали в стерильную пробирку объемом 15 мл. Центрифугировали микроспоры 4 минуты при 800 оборотах в минуту 3 раза. Далее ресуспендировали микроспоры в 2 мл охлажденной среды NLN-13.

Определяли плотность микроспор, используя камеру Фукса-Розенталя, после чего средой для культивирования доводили до 4×10^4 микроспор/мл. Суспензию микроспор разливали в чашки Петри и культивировали при 33°C в течение 48 часов в полной темноте и затем переносили снова в темноту. При появлении эмбриоидов чашки Петри помещали на шейкер и инкубировали при 25°C (при 60 оборотах в минуту).

Регенерация/проращивание эмбриоидов.

Эмбриоиды в семядольной стадии развития помещали в автоклавируемые контейнеры, заполненные на 0,5–0,6 см агаризованной (1,1%) средой В5. Кислотность среды перед стерилизацией доводили до pH 5,8. Плотность размещения эмбриоидов составляла 9–12 шт. на один контейнер. Эмбриоиды культивировали при 24°C и фотопериоде 16 ч – день, 8 ч – ночь. Один раз в месяц при отсутствии развитых растений пересаживали на свежую питательную среду того же состава. При образовании из эмбриоида проростка с нормально развитыми листьями и корневой системой их пересаживали в кассеты с торфяным субстратом для адаптации.

Выделение ДНК. Проводили из молодых тканей листьев растений капусты пекинской по методике ЦТАБ согласно протоколу [27].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Амплификацию геномной ДНК проводили в 15 мкл реакционной смеси, содержащей: 1×ПЦР-буфер; 0,2 mM dNTPs; по 5–10 nM каждого праймера; 0,25 ед.а. Таq-полимеразы и 20 нг геномной ДНК. Амплификацию проводили в амплификаторе DNA Engine® Peltier Thermal Cyclers (BIO-Rad). ПЦР была выполнена при следующих условиях: начальная денатурация при 94°C 3 мин; 35 циклов – денатурация при 94°C 30 с; отжиг при 60°C 30 с, элонгация при 72°C 1 мин; завершающая элонгация при 72°C 5 мин. Хранение – при температуре 10°C [4].

Генотипирование устойчивости к киле проводили с использованием маркера B0902 гена CRb

(F: AGCCTTGCGTAAAAGCAACTAC,
R: GTTTGGAATCCGACAAATACATCCAT) [28].

Электрофорез, визуализация и документация.

Продукты амплификации окрашивали флуоресцентным красителем GelRed (Biotium, США) и разделяли в 1%-ном агарозном геле в однократном Трис-боратном-ЭДТА-буфере при напряженности 4 В/см в течение 60 мин. Визуализацию и документацию электрофореграмм проводили с использованием гель-документирующей системы GelDoc Go (Bio-Rad) [4].

Результаты и их обсуждение

Выделение продуктивных гибридов капусты пекинской

Проведён учёт массы кочанов гибридных комбинаций, устойчивых к киле: в весенне-летнем обороте 2022 года изучали 36 гибридов, в летне-осеннем обороте 2022 года – 22 гибрида. Изучаемый материал сравнивали с лучшими коммерческими CR-гибридами отечественной и зарубежной селекции: F₁ Ника, F₁ Гидра и F₁ Bilko.

Размах вариации средних значений массы кочана оцениваемых 36 генотипов, выращиваемых в весенне-летнем обороте, составил 970,5 г. Минимальное значение средней массы кочана было у генотипа Кви дг7-

3×Кви10, максимальное – у генотипа Чи₁мс×П₁дг7 (табл. 1). По результатам оценки в сравнении со стандартами, выявлена лучшая гибридная комбинация Чи₁мс×П₁дг7 ($m_{cp}=1458,25$ г.), среднее значение массы которой для 5% уровня значимости превысило 3 стандарта. Три генотипа: Чи₁мс×Квидг7, Квидг19×П₁дг9 и K₄₃₋₁₂×Чи₁ существенно превысили по продуктивности гибриды F₁ Ника. Выделенные генотипы были с максимальным проявлением признака свыше 1000 г (табл. 1).

Из таблицы 1 следует, что масса кочана слабо варьирует ($CV \leq 10\%$) только у четырех генотипов, не превышающих стандарты: Квидг(10)×Квидг7-2, Квидг8-2×8-1, Кви₁₉×П₁дг2 и K₄₃₋₁₅×Квидг(10). Среднюю степень варьирования признаков (11–20%) имеют 11 генотипов (30% от общего числа): Чи₁мс×Квидг7, Чи₁мс×П₂дг(13)2, Чи₁мс×П₁дг2-1, Чи₁мс×K43-15, Чи₁мс×Ec2, Квидг7-2×Квидг(10)1, Квидг19×П₁дг9, Чи₁мс×T₅₂, Кви₇×П₁дг4, Кви₁₉×П₁дг18 и Кви₈×П₁дг9. Сильную вариацию признака > 20% наблюдали у остальных 21 гибридных комбинаций, что составило 58% от общего числа линий. Выделенные 4 гибридные комбинации с высокой массой кочана имели высокую и среднюю степень варьирования, при этом средние значения диаметра и высоты кочана у данных генотипов слабо варьировали ($CV \leq 10\%$), что может свидетельствовать о разной плотности кочана.

Для 22 генотипов, оцениваемых в летне-осеннем обороте (июль–сентябрь 2022 года), размах вариации составил 805,16 г. Минимальное значение массы кочана было у генотипа Би₅дг2-1хП₁дг5-11, максимальное – у генотипа Би₅дг2-1 х П₁дг4-1 (табл.2). Примечательно, что у этих двух генотипов одна и та же материнская линия Би₅дг2-1, а в генотипе с максимальной массой отцовская линия П₁дг4-1 имела высокий эффект ОКС в исследовании [4] и была рекомендована к использованию для поиска «удачных» гибридных комбинаций. Можно предположить, что именно скрещивание с линией П₁дг4-1 привело к «удачной комбинации», так как эффект ОКС частично определяется доминированием [29]. По результатам оценки в сравнении с двумя стандартами выявлены 10 гибридных комбинаций, значимо превысивших по массе кочана стандарт F₁ Bilko. Ни один генотип не превзошел по продуктивности F₁ Гидра, но 7 гибридных комбинаций (выделены зеленым цветом в табл.2) значимо не отличаются от него по массе для $HCP_{05} = 279,7$ г. Лучший по массе генотип Би₅дг2-1 х П₁дг4-1 ($m_{cp} = 1404,56$ г) (табл. 2).

Одна из 7 гибридных комбинаций с высокой массой (Кви₁₉ х П₁дг9) была выделена ранее при полевых испытаниях в 2021 году и вошла в число 14 перспективных по продуктивности [4]. У данного генотипа было отмечено удачное сочетание высоких эффектов ОКС родительских линий и СКС гибридной комбинации, что подтверждает решающий вклад в генетический контроль массы кочана эффекта специфической комбинационной способности.

В 2021 году испытание данного генотипа проводили также в летне-осенний период. Примечательно, что средняя масса гибридных комбинаций, выращенных в летне-осеннем обороте ($m_{cp} = 1019,57$ г), выше средней массы генотипов, выращенных в весенне-летнем обороте ($m_{cp} = 838,71$ г.). Так, доля гибридов с массой свыше 1000 г во втором обороте составила 45%, а в первом – всего 8%. Это может свидетельствовать о

Таблица 1. Среднее значение и степень изменчивости массы кочана гибридных комбинаций капусты пекинской (весна-лето, 2022)
Table 1. The average value and degree of variability of the head weight of hybrid combinations of Chinese cabbage (spring-summer, 2022)

№	Генотипы	Средняя масса, г	Коэффициент вариации, %	№	Генотипы	Средняя масса, г	Коэффициент вариации, %
1.	Чи ₁ мс×Квидг7	1151,00	17,3%	19.	К ₄₃₋₁₅ ×Чи ₁	961,50	21,7%
2.	Чи ₁ мс×Квидг8	816,31	31,1%	20.	Квидг7-3×7-1	782,00	30,6%
3.	Чи ₁ мс×П ₂ дг(13)2	720,50	18,1%	21.	Квидг7-3×8-1	724,75	29,7%
4.	Чи ₁ мс×П ₁ дг2-1	786,00	18,9%	22.	Квидг19×П ₁ дг9	1086,00	14,5%
5.	Квидг(10)×Квидг7-2	663,50	6,5%	23.	К ₄₃₋₁₂ ×Чи ₁	1157,13	26,7%
6.	Кви дг8-1×8-2	626,75	34,4%	24.	Чи ₁ мс×П ₂ дг13	593,75	36,4%
7.	Чи ₁ мс×К ₄₃₋₁₅	513,25	16,3%	25.	Кви дг7-2×Чи ₁	708,50	24,2%
8.	Чи ₁ мс×П ₆ дг2	773,13	39,2%	26.	Чи ₁ мс×Т52	880,75	15,3%
9.	Кви дг7-3× Кви ₁₀	487,75	21,9%	27.	Чи ₁ мс×П ₁ дг7	1458,25	28,9%
10.	Кви дг7-4× Квидг10	857,75	26,0%	28.	Кви ₇ ×П ₁ дг4	765,63	16,4%
11.	Кви ₁₀ ×П ₁ дг2	956,63	33,0%	29.	Кви ₅ ×П ₁ дг8	748,50	23,9%
12.	Кви3×П ₁ дг1	864,50	22,1%	30.	Кви ₁₉ ×П ₁ дг2	783,00	9,8%
13.	К ₄₃₋₁₂ ×Квидг7-2	857,75	27,6%	31.	Кви ₁₉ ×П ₁ дг18	772,75	12,4%
14.	Кви дг8-2×8-1	963,75	9,4%	32.	Кви ₈ ×П ₁ дг9	679,75	10,4%
15.	Чи ₁ мс×Ес2	849,75	16,4%	33.	Кви ₁₀ ×П ₁ дг5	921,50	20,1%
16.	Чи ₁ мс×П ₁ дг4	865,00	22,7%	34.	Чи ₁ мс×Кви ₇	938,63	30,3%
17.	Кви ₈ ×П ₁ дг8	743,38	26,2%	35.	К ₄₃₋₁₂ ×Квидг(10)	575,50	23,1%
18.	Квидг7-2× Квидг(10)1	933,00	13,8%	36.	К ₄₃₋₁₅ ×Квидг(10)	763,25	4,6%

Примечание. НСР₀₅ масса кочана = 256,25 г. Средняя масса кочана 3 стандартов: Ника F₁ (816,5 г), Гидра F₁ (996,75 г), Вилко F₁ (1168,25 г). Зеленым цветом выделена гибридная комбинация, превышающая 3 стандарта, синим выделены генотипы, превосходящие Ника F₁.

Note. LSD₀₅ the cabbage head weight = 256.25 g. The average weights of the cabbage head of 3 hybrid standards are: F₁ Nika (816.5 g), F₁ Hydra (996.75 g), F₁ Bilko (1168.25 g). The hybrid combination that surpassed 3 standards is highlighted in green, the genotypes that surpassed the F₁ Nika are highlighted in blue.

Таблица 2. Среднее значение и степень изменчивости массы кочана гибридных комбинаций капусты пекинской (лето-осень, 2022 год)
Table 2. The average value and degree of variability of the head weight of hybrid combinations of Chinese cabbage (summer- autumn, 2022)

№	Генотипы	Средняя масса, г	Коэффициент вариации%	№	Генотипы	Средняя масса, г	Коэффициент вариации %
1.	К ₄₃₋₁₅ х Чи ₁	894,50	14,2%	12.	Би ₅ дг2-1 х П ₁ дг4-1	1404,56	9,7%
2.	Би ₅ дг2-1 х П ₁ дг5-11	599,40	9,5%	13.	К ₄₃₋₁₂ х Квидг(16)	940,57	17,5%
3.	П ₁ дг7-1 х Би ₅ дг2-1	934,14	35,1%	14.	Ги ₁₃ х Би ₅ дг	812,00	15,7%
4.	Би ₅ дг2 х Т52	956,13	19,7%	15.	Би ₅ дг7-1 х Квидг8-2	977,00	38,9%
5.	П ₁ дг4-11 х Би ₅ дг2-1	780,71	30,1%	16.	Кви ₅ дг2 х Квидг7-1	1156,63	41,4%
6.	Кви ₁₉ х П ₁ дг9	1227,25	35,4%	17.	Би ₅ дг2 х П ₁ дг2	1201,83	11,4%
7.	Би ₅ дг2-1 х П ₁ дг7-1	1052,64	30,0%	18.	Квидг7 х Би ₅ дг2-1	1260,75	37,9%
8.	Квидг(15)1 х Би ₅ дг2	1142,00	26,1%	19.	Квидг8-2 х Би ₅ дг2-1	1229,17	15,2%
9.	П ₂ дг2-11 х Би ₅ дг2	1369,33	24,1%	20.	Би ₅ дг2-2 х Квидг(15)	1010,25	15,7%
10.	П ₁ дг8-1 х Би ₅ дг2-1	919,45	33,3%	21.	Кви ₃ х П ₁ дг1	876,63	21,2%
11.	Би ₅ дг2 х Квидг(16)	789,08	27,0%	22.	Кви ₁₀ х П ₁ дг2	790,88	20,4%

Примечание. НСР₀₅ масса кочана = 279,7 г. Средняя масса кочана стандартов: Гидра F₁ (1424,25 г), Вилко F₁ (720,63 г). Зеленым цветом выделены гибридные комбинации, превосходящие Вилко F₁ и значимо не отличающиеся от Гидра F₁, синим цветом выделены генотипы, превысившие по массе кочана 1 стандарт.

Note. LSD₀₅ the cabbage head weight = 279.7 g. The average weights of the cabbage head of standards of hybrids are: F₁ Hydra (1424.25 g), F₁ Bilko (720.63 g). The hybrid combinations that have surpassed F₁ Bilko and are not significantly different from F₁ Hydra are highlighted in green, the genotypes that have exceeded the F₁ Bilko by cabbage head weight are highlighted in blue.

сложившихся благоприятных условиях для выращивания генотипов во втором обороте, так как среднесуточные температуры находились в оптимальном для культуры диапазоне 15-23°C.

Масса кочана слабо варьирует всего у двух генотипов: Би₅дг2-1 х П₁дг5-11 и у генотипа с максимальной массой Би₅дг2-1хП₁дг4-1. Семь генотипов, в том числе Би₅дг2 х П₁дг2 и Квидг8-2 х Би₅дг2-1 с высокой массой, имели среднюю степень варьирования признаков, остальные 13 генотипов сильно варьировали по массе (CV более 20%).

В совокупности, по выровненности и продуктивности выделены 2 лучшие гибридные комбинации: Би₅дг2-1 х П₁дг4-1 ($m_{cp}=1404,56$ г) и Би₅дг2 х П₁дг2 ($m_{cp} = 1201,83$ г).

Изучение устойчивости линий капусты пекинской к мучнистой росе

Мучнистая роса (возбудитель: *Erysiphe cruciferarum* Opiz ex L. Junell.) обычно поражает все капустные культуры при сложившихся благоприятных для заболевания условиях (жаркая погода и наличие влажной среды для прорастания конидий возбудителя, частые туманы).

Первые симптомы заболевания можно наблюдать в виде белых округлых пятен с белым мучнистым мицелием на верхней и нижней поверхности листа. По мере развития заболевания эти пятна сливаются, и вскоре вся поверхность листа покрывается порошкообразным налетом [7]. Поврежденная листовая поверхность становится более восприимчивой к другим патогенам.

Моногенная доминантная устойчивость к настоящей мучнистой росе встречается у капусты белокочанной. У капусты пекинской генов вертикальной устойчивости пока не обнаружено [7]. Важной селекционной работой является оценка устойчивости к заболеванию растительного материала.

Были оценены 18 линий капусты пекинской, посеянные в сентябре 2022 г в зимнюю теплицу (см. табл. 3). Оценка проявления симптомов заболевания была проведена в апреле 2023 г. Определяли степень болезнеустойчивости растений капусты пекинской на естественном инфекционном фоне по 4-балльной шкале (рис. 2). За устойчивые принимали растения с поражением 0-1 балла, за восприимчивые – с поражением 2-4 балла. Оценивали фактическое количество пораженных растений каждой линии (от 1 до 5) и процент распространённости болезни.

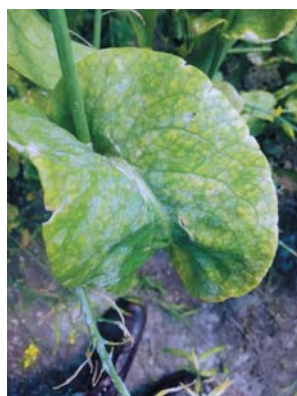
В результате оценки поражения (см. табл. 3) генотипы были разделены на группы по устойчивости к патогену:

- Устойчивые (К₄₃₋₁₂, К₄₃₋₁₅, Квидг12-2, ОКС2, Би₅дг2-1, Чи₁-0, Orient Q);
- Высоковосприимчивые (Чи₁мс×Квидг7, Чи₁мс×Квидг8, П₁дг4-12, П₂дг2-1);
- Слабовосприимчивые (Квидг7-2 цв, Квидг8-2, Квидг10-1, П₂дг7-1, Чи₁мс×Чи1, Чи₁-6 цв F, ЕС₂₋₃×Е₂ ки 6112).

Таким образом, выявлено 7 устойчивых и толерантных к мучнистой росе генотипов, которые можно рекомендовать для проведения дальнейших испытаний и включения в селекционный процесс для создания гибридов с устойчивостью к стрессовым факторам.



А) 0 баллов



В) 1 балл



С) 2 балла



Д) 3 балла



Е) 4 балла

Рис. 2. Поражение капусты пекинской мучнистой росой от 0 до 4 баллов
Fig. 2. The infestation of Chinese cabbage by powdery mildew from 0 to 4 points

Таблица 3. Оценка поражения линий капусты пекинской мучнистой росой
Table 3. Evaluation of the damage to Chinese cabbage lines from powdery mildew

№	Генотип	Балл поражения растений					Развитие болезни, %	Устойчивость
		1	2	3	4	5		
1.	Чи ₁ мс×Квидг7	4	4	–	–	–	100%	высоковосприимчивое
2.	Квидг7-2 цв	2	2	–	–	–	50,00%	слабовосприимчивое
3.	Квидг8-2	1	2	–	–	–	37,50%	слабовосприимчивое
4.	Квидг12-2	1	1	–	–	–	25,00%	толерантное
5.	Квидг10-1	1	2	–	–	–	37,50%	слабовосприимчивое
6.	Чи ₁ мс×Квидг8	3	3	–	–	–	75,00%	высоковосприимчивое
7.	К ₄₃₋₁₂	1	–	–	–	–	25,00%	толерантное
8.	К ₄₃₋₁₅	0	0	–	–	–	0,00%	устойчивое
9.	ОКС2	1	–	–	–	–	25,00%	толерантное
10.	Бидг2-1	1	1	0	–	–	25,00%	толерантное
11.	П ₁ дг4-12	3	3	3	2	2	65,00%	высоковосприимчивое
12.	П ₂ дг7-1	1	2	2	2	–	43,75%	слабовосприимчивое
13.	П ₂ дг2-1	4	4	3	–	–	91,66%	высоковосприимчивое
14.	Чи ₁ -0	0	–	–	–	–	0,00%	устойчивое
15.	Orient Q	1	1	1	–	–	25,00%	толерантное
16.	Чи ₁ мс×Чи1	2	2	2	2	2	50,00%	слабовосприимчивое
17.	Чи ₁ -6 цв F	1	2	2	–	–	41,66%	слабовосприимчивое
18.	ЕС ₂₋₃ ×Е ₂ ки 6112	2	2	–	–	–	50,00%	слабовосприимчивое

Создание удвоенных гаплоидов капусты пекинской в культуре изолированных микроспор *in vitro* и отзывчивость генотипов

Методы биотехнологии позволяют создавать линии с заданными свойствами, например, ценными хозяйственными признаками и генами устойчивости сразу к нескольким возбудителям заболеваний. Для создания ДН-растений в культуре изолированных микроспор использовали 4 селекционных образца с важной для культуры устойчивостью к раннему стеблеванию: ОКС₂; ЕС₂₋₃×Е₂ ки 6112; К₄₃₋₁₅ и К₄₃₋₁₂. Все указанные генотипы были созданы с помощью инфекционных фонов по устойчивости к киле и толерантности к верхушечному ожогу кочана. Дополнительно генотипы К₄₃₋₁₂, К₄₃₋₁₅ и ОКС₂ обладают устойчивостью к мучнистой росе, а линия ОКС₂ перспективна для получения высокоурожайных гибридов.

Использовали бутончики с размером 2,5-2,7 мм согласно литературным данным [25]. Происходило успешное развитие эмбриоидов (рис. 3А, 3В), которые в дальнейшем развивались в полноценные растения (рис. 3С).

Были изучены сортовые различия в эмбриогенезе данных генотипов пекинской капусты (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). Как известно, эмбриогенная способность зависит от множества факторов, но одним из ключевых моментов при работе с культурой микроспор *in vitro* является генотип донорных растений [21].

Селекционные образцы были разделены на группы по отзывчивости к эмбриогенезу (табл. 4). Для оценки

эмбриогенной способности *B. rapa* ssp. *pekinensis* в культуре изолированных микроспор нами предложена следующая шкала (число эмбриоидов в пересчете на 100 бутончиков): 0 шт./100 бут. – неотзывчивый; 1 - 500 шт./100 бут. – низко отзывчивый; 501 - 2000 шт./100 бут. – средне отзывчивый; ≥ 2001 шт./100 бут. – высоко отзывчивый [31]. Согласно данной шкале к средне отзывчивым отнесли генотип ЕС₂₋₃×Е₂ ки 6112, с частотой эмбриогенеза более 500 эмбриоидов на 100 бутончиков. Генотипы К₄₃₋₁₂, К₄₃₋₁₅ и ОКС₂ оказались низко отзывчивыми к эмбриогенезу (до 500 эмбриоидов на 100 бутончиков). Адаптировать удалось растения-регенеранты для всех 4 генотипов.

Всего было получено 498 эмбриоидов (~ 77% от общего числа из 649 бутончиков), из них:

- 3 эмбриоида – получено из донорного генотипа ОКС₂;
- 180 эмбриоидов – получено из донорного генотипа К₄₃₋₁₂;
- 9 эмбриоидов – получено из донорного генотипа К₄₃₋₁₅;
- 306 эмбриоидов – получено из донорного генотипа ЕС₂₋₃×Е₂ ки.

Молекулярное генотипирование коллекции образцов линий на устойчивость к киле

Для изучения генов устойчивости к киле линий капусты пекинской было проведено молекулярное генотипирование с ДНК маркером B0902 F/R на ген устойчивости *CRb*.



А) Эмбриониды в жидкой среде NLN-13
Embryos in a NLN-13 liquid medium

В) Прорастающие эмбриониды на среде B5
Shooting of embryos on medium B5



С) Укоренение и адаптация растений-регенерантов (K43-12)
Rooting and adaptation of regenerated DH-plants (K43-12)

Рис. 3. Развитие DH-растений капусты пекинской в культуре изолированных микроспор
Fig. 3. Development of Chinese cabbage DH-plant embryos in isolated microspore culture

Проведение отбора с помощью маркеров для ранних этапов селекционного материала способствует значительному сокращению трудоёмкости исследований. Фенотипическая оценка линий не проводилась, результат генотипирования основан на работе маркера гена *CRb*. Линии Кви₄ и Кви₉ использовали для проверки результатов маркирования в качестве контроля восприимчивости. Эти линии ранее в 2021 г. проверялись на искусственном инфекционном фоне к киле [4] и проявили восприимчивость с максимальным баллом поражения 3 балла по шкале [32]. В соответствии с рис.4 наблюдаются целевые фрагменты, ассоциированные с рецессивным аллелем восприимчивости размером 241 п.н. у пяти линий: Кит-3Са 1 бут; Кви₄, Кви₉, Би₅дг бут и ЕС₂₋₃-2102 бут.

У остальных 33 линий (кроме Ха6-111-4; Чи₁мс×Квидг₈ и Квидг₁₆)₂ бут) наблюдаются целевые фрагменты, ассоциированные с аллелем устойчивости, размером 160 п.н. (рис.4). Присутствие двух аллелей гена *CRb* наблюдается у 8 генотипов: П₁дг₄-1, Чи₁мс×П₁дг₉, Чи₁мс×П₁дг₂₁, Чи₁мс×Чи₁, ЕС₂₋₃×Ес ки 6112, ЕС₂×ЕС ки 6212, Orient Queen и Чи₁мс×Квидг₇, что свидетельствует о разных проявлениях гена. Ген *Crb* относят к генам «главного действия», он был обнаружен в 2013 г. у капусты китайской CR Shinki, локализован в 3 хромосоме [15]. Линии Ха6-111-4; Чи₁мс×Квидг₈ и Квидг₁₆)₂ бут, у которых не было обнаружено фрагмента амплификации, могут содержать другой ген устойчивости к киле.

Таблица 4. Отзывчивость генотипов в культуре изолированных микроспор *in vitro*
Table 4. Responsiveness of genotypes in culture of isolated microspores *in vitro*

Генотип	Число эмбрионидов/100 бутонов	Группа отзывчивости
К ₄₃₋₁₅	40,63±13,26	низко отзывчивый
К ₄₃₋₁₂	415,69±177,07	низко отзывчивый
ОКС_2	8,82±4,16	низко отзывчивый
ЕС ₂₋₃ ×Е ₂ ки 6112	608,66±19,69	средне отзывчивый

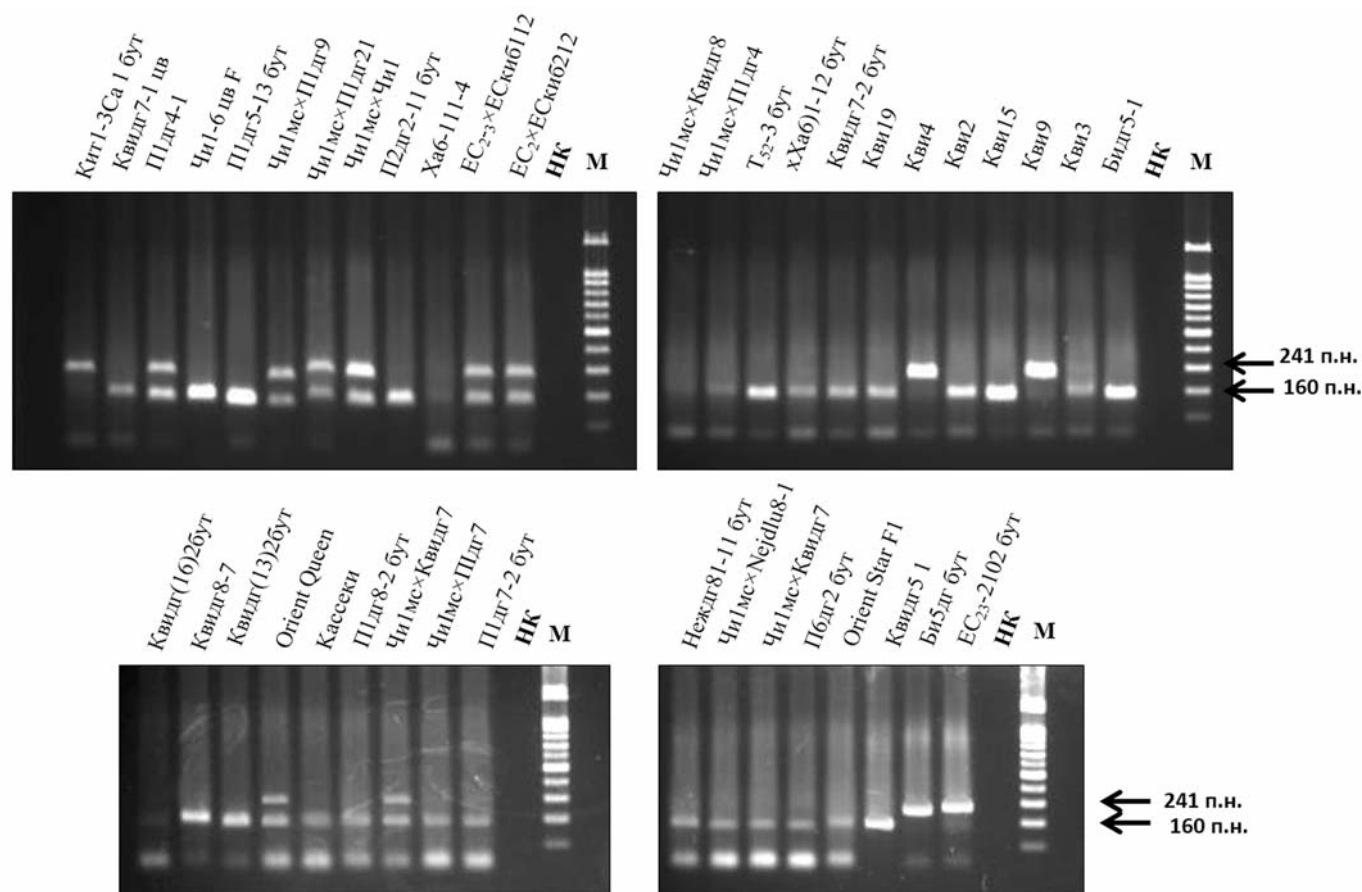


Рис. 4. ПЦР-анализ образцов капусты пекинской маркером B0902 гена CRb;
М-маркер размеров ДНК-фрагментов; НК – негативный контроль; 160 п.н. – ожидаемый размер
ампликона аллеля устойчивости; 241 п.н. – ожидаемый размер ампликона аллеля восприимчивости
Fig. 4. PCR analysis of Chinese cabbage accessions with marker B0902 of the CRb gene;
M- DNA-size marker; НК - negative control; 160 bp is the size of the expected amplicon of the resistance allele;
241 b.p. is the size of the expected amplicon of the susceptibility allele

ВЫВОДЫ

В результате полевого испытания устойчивых к киле 36 гибридных комбинаций капусты пекинской в обороте весна-лето 2022 г. выделен генотип Чи₁мс×П₁дг7 (мср = 1458,25 г.), значимо превысивший 3 стандарта по массе кочана. Однако коэффициент

вариации признака у генотипа был значительным (CV более 20%), что может свидетельствовать о разной плотности кочанов и низкой морфологической выровненности. Во втором обороте из 22 гибридных комбинаций в совокупности по выровненности и продуктивности выделены 2 перспективные с закрытой вершиной кочана гибридные комбинации: Би₅дг2-1 × П₁дг4-1 (мср = 1404,56 г) и Би₅дг2 × П₁дг2 (мср = 1201,83 г), которые рекомендованы для расширенного сортоиспытания генотипов с ценными хозяйственными признаками, включая устойчивость к киле.

В результате оценки симптомов поражения мучнистой росой на естественном инфекционном фоне из 18 линий капусты пекинской были выделены 7 устойчивых к патогену: К₄₃-12; К₄₃-15; Квтдг12-2; ОК_С_2; Би₅дг2-1; Чи₁-0; Orient Q, которые рекомендованы для включения в селекционные испытания для создания гибридов с устойчивостью к стрессорам.

В культуре изолированных микроспор на основе 4 селекционных образцов, ЕС₂₋₃×Е₂ки б112; ОК_С_2; К₄₃-15 и К₄₃-12, устойчивых к раннему стеблеванию, создана коллекция ДН-линий. Селекционный материал для всех линий получен на инфекционном фоне по устойчивости к киле и толерантности к верхушечному ожогу. Дополнительно генотипы К₄₃-12, К₄₃-15 и ОК_С_2 показали устойчивость к мучнистой росе. Это позволит получить гибриды с набором ценных хозяйственных признаков, включая устойчивость к раннему стеблеванию, резистентность сразу к нескольким возбудителям заболевания и высокую продуктивность (благодаря перспективной линии ОК_С_2). Самую высокую отзывчивость к эмбриогенезу из 4 генотипов проявил генотип ЕС₂₋₃×Е₂ки б112 (частота образования эмбриоидов 608,66±19,69 штук на 100 бутонів).

В результате молекулярного генотипирования была проведена дифференциация 41 линии капусты пекинской по гену «главного действия» устойчивости к киле CRb. Ген Crb обнаружен у подавляющего большинства линий (~ 80%). Требуется дифференцировать линии по другим CR-генам для пирамидирования различных генов в одном генотипе и создания гибридов с надежной устойчивостью к заболеванию.

Об авторах:

Анастасия Дмитриевна Заставнюк – аспирант кафедры ботаники селекции и семеноводства садовых растений, младший научный сотрудник, автор для переписки, a.zastavnyuk@rgau-msha.ru, <http://orcid.org/0000-0003-4115-0606>; ResearcherID: ADP-6159-2022

Григорий Федорович Монахос – кандидат с.-х. наук, генеральный директор, <http://orcid.org/0000-0002-6603-6933>

Сократ Григорьевич Монахос – доктор с.-х. наук, профессор, заведующий кафедрой ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, <http://orcid.org/0000-0001-9404-8862>, Researcher ID: L-5962-2013, Scopus Author ID: 56052882900

About the Authors:

Anastasia D. Zastavnyuk – PhD student, Department of Botany, Plant Breeding and Seed Technology; Junior Researcher, Correspondence Author, a.zastavnyuk@rgau-msha.ru; <http://orcid.org/0000-0003-4115-0606>; ResearcherID: ADP-6159-2022

Grigory F. Monakhos – Cand. Sci. (Agriculture), General Director, <http://orcid.org/0000-0002-6603-6933>

Sokrat G. Monakhos – Dr. Sci. (Agriculture), Prof., Head of the Department Botany, Plant Breeding and Seed Technology, <http://orcid.org/0000-0001-9404-8862>, Researcher ID: L-5962-2013, Scopus Author ID: 56052882900

• Литература / References

1. Артемьева А.М., Соловьева А.Е. Генетическое разнообразие и биохимическая ценность капустных овощных растений рода *Brassica* L. *Вестник НГАУ. Биология*. 2018;4(49):50-61. DOI:10.31677/2072-6724-2018-49-4-50-61 [Artemeva A.M., Soloveva A.E. Genetic diversity and biochemical value of cabbage vegetable plants of the genus *Brassica* L. *Vestnik NGAU. Biologiya*. 2018;4(49):50-61. DOI:10.31677/2072-6724-2018-49-4-50-61 (In Russ.)]
2. Yuan J., Shen C., Yuan R. et al. Identification of genes related to tipburn resistance in Chinese cabbage and preliminary exploration of its molecular mechanism. *BMC Plant Biol.* 2021;567(21):1-12. DOI:10.1186/s12870-021-03303-z
3. Kamiński P., Podwyszynska, M., Starzycki M. et al. Interspecific hybridisation of cytoplasmic male-sterile rapeseed with *Ogura* cytoplasm and *Brassica rapa* var. *pekinensis* as a method to obtain male-sterile Chinese cabbage inbred lines. *Euphytica*. 2016;(208):519–534. DOI:10.1007/s10681-015-1595-9
4. Заставнюк А.Д., Монахос Г.Ф., Вишнякова А.В., Миронов А.А., Монахос С.Г. Генотипирование устойчивости к киле и оценка комбинационной способности капусты пекинской. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2022;(5):77-91. DOI:10.26897/0021-342X-2022-5-77-91. EDN WDBKXQ. [Zastavnyuk A.D., Monakhos G.F., Vishnyakova A.V., Mironov A.A., Monakhos S.G. Chinese cabbage clubroot resistance genotyping and evaluation of combining ability. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2022;(5):77-91. (In Russ.) EDN WDBKXQ.]
5. Беренсен Ф.А., Антонова О.Ю., Артемьева А.М. Достижения и перспективы молекулярно-генетического маркирования устойчивости к некоторым патогенам у видов рода *Brassica* L. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(6):656-666. DOI:10.18699/VJ19.538. [Berensen F.A., Antonova O.Yu., Artemeva A.M. Achievements and prospects of molecular genetic marking of resistance to certain pathogens in species of the genus *Brassica* L. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(6):656-666. DOI:10.18699/VJ19.538 (In Russ.)]
6. Монахос С.Г., Воронина А.В., Байдина А.В., Зубко О.Н. Селекция растений на устойчивости – основа защиты от болезней в органическом земледелии. *Картофель и овощи*. 2019;(6):38-40. DOI: 10.25630/PAV.2019.92.83.009 [Monakhos S.G., Voronina A.V., Bajdina A.V., Zubko O.N. Plant breeding for sustainability is the basis of protection against diseases in organic farming. *Potato and vegetables*. 2019;6:38-40 (In Russ.). DOI: 10.25630/PAV.2019.92.83.009 (In Russ.)]
7. Монахос Г.Ф., Монахос С.Г. Капуста пекинская. Биологические особенности, генетика, селекция и семеноводство. Монография. Москва: Издательство РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; 2009. [Monakhos G.F., Monakhos S.G. Chinese cabbage *Brassica rapa* L. Em. Metz. ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt. Biological characteristics, genetics, breeding and seed production. Monograph]. M.: Izd-vo RGAU-MSKhA imeni K.A. Timiryazeva. 2009. 182 p. (In Russ.)]
8. Malinowski R., Truman W., Blicharz S. Genius architect or clever thief—How *Plasmodiophora brassicae* reprograms host development to establish a pathogen oriented physiological sink. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2019;32(10):1259–1266. DOI: 10.1094/MPMI-03-19-0069-CR
9. Wenjing R., Zhiyuan L., Fengqing H. et al. Utilization of *Ogura* CMS germplasm with the clubroot resistance Y. gene by fertility restoration and cytoplasm replacement in *Brassica oleracea* L. *Horticulture research*. 2020;(7):61. DOI:10.1038/s41438-020-0282-8
10. Yoshikawa H. Studies on breeding of clubroot resistance in cole [Cruciferae] crops. *Bulletin of the National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea. Series A.(Japan)*. 1993;(7):1–165. ISSN: 0916-684X.
11. Matsumoto E., Yasui C., Ohi M., Tsukada M. Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Euphytica*. 1998;104:79:86. DOI: 10.1023/A:1018370418201
12. Kuginuki Y., Yoshikawa H., Hirai M. Variation in virulence of *Plasmodiophora brassicae* in Japan tested with clubroot-resistant cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *European Journal of Plant Pathology*. 1999;(105):327-332. DOI: 10.1023/A:1008705413127
13. Hirai M. Genetic analysis of clubroot resistance in *Brassica rapa*. *Breeding science*. 2006;(56):223–229. DOI: 10.1270/jsbbs.56.223
14. Monakhos S.G., Li N.M. Breeding value of clubroot resistance genes of *Brassica rapa* L. lines and effectiveness of molecular markers of mapped loci. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy (TAA)*. 2013;(6):68-81. (In Russ.)]
15. Ueno H., et al. Molecular characterization of the CRa gene conferring clubroot resistance in *Brassica rapa*. *Plant molecular biology*. 2012;80:621–629. DOI: 10.1007/s11103-012-9971-5.
16. Kato T., Hatakeyama K., Fukino N. et al. Fine mapping of the clubroot resistance gene CRb and development of a useful selectable marker in *Brassica rapa*. *Breeding science*. 2013;63(1):116-124. DOI: 10.1270/jsbbs.73-1cover
17. Suwabe K., Tsukazaki H., Iketani H., Hatakeyama K., Fujimura M., Nunome T., Fukuoka H., Matsumoto S., Hirai M. Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. *Theoretical Application Genetic*. 2003.107:997-1002. DOI: 10.1007/s00122-003-1309-x
18. Nguen M.L., Monakhos G.F., Komahin R.A., Monakhos S.G. The new clubroot resistance locus is located on chromosome A05 in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L.). *Genetika*. 2018;54:296–304 (In Russ.) DOI: 10.7868/S0016675818030037.
19. Monakhos S.G., Li N.M. Breeding of Chinese cabbage using biotechnological methods. *Potato and vegetables*. 2014;9:34-35. (In Russ.)
20. Dong Y.Q. Influencing factors and physiochemical changes of embryogenesis through *in vitro* isolated microspore culture in *Brassica* species. *Biologia*. 2021;(76):2629-2654. DOI:10.1007/s11756-021-00721-0
21. Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Супрунова Т.П. Получение удвоенных гаплоидов у видов рода *Brassica* L. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(1):111-120. DOI:10.18699/VJ15.014. [Shmykova N. A., Shumilina D.V., Suprunova T.P. Obtaining doubled haploids in species of the genus *Brassica* L. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(1):111-120. DOI:10.18699/VJ15.014 (In Russ.)]
22. Monakhos S., Uwiragiye A., Zhao J., Zhang N., Bonnema G. Generation of doubled haploids through microspore culture from vegetable and oilseed *Brassica rapa* crops. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy (TAA)*. 2010;7:128-135 (In Russ.).
23. Krishnia S.K., Saharan G.S.; Singh D. Genetics of Alternaria blight resistance in inter and intraspecific crosses of *Brassica juncea* and *Brassica carinata*. *Annals of Biology*. 2000;16(2):211-216. ISSN: 0970-0153.
24. Conn K.L., Tewari J.P., Awasthi R.P. A disease assessment key for Alternaria blackspot in rapeseed and mustard. *Disease des plantes Survey/au Canada*. 1990;70(1):19–22. ISSN: 0008-476X
25. Monakhos S.G. Creation of pure lines-doubled cabbage haploids in the culture of isolated microspores and selection of F1 hybrids based on modern biotechnological methods: methodological recommendations]. M. 2014. 44 p. (In Russ.)
26. Custers J.B.M. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). Doubledhaploid production in crop plants. Academic Publisher. 2003. P.185-194. DOI: 10.1007/978-94-017-1293-4_29
27. Murray M.G. and Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*. 1980;8(19):4321-4326. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321
28. Kato T., Hatakeyama K., Fukino N. & Matsumoto S. Identification of a clubroot resistance locus conferring resistance to a *Plasmodiophora brassicae* classified into pathotype group 3 in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). *Breeding science*. 2012;62(3):282-287. DOI:10.1270/jsbbs.62.282
29. Griffing B.A. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian journal of biological sciences*. 1956;9(4):463-493. DOI: 10.1071/BJ9560463
30. Pechan P.M., Keller W.A. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*. 1988;74(2):377-384. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1988.tb00646.x
31. Monakhos S.G. Integration of modern biotechnological and classical methods in vegetable crop breeding. Moscow, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy. 2016. 335 p. (In Russ.).
32. Buczak S., Toxopeus H., Mattusch P., Johnston T., Dixon G. & Hobolth L. Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: proposals for attempted rationalization through an international approach. *Transactions of the British Mycological Society*. 1975;65(2):295-303. DOI:10.1016/S0007-1536(75)80013-1