

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ОВОЩЕВОДСТВА»
(ФГБНУ ФНЦО)

На правах рукописи

ЕРМОЛАЕВ АЛЕКСЕЙ СТАНИСЛАВОВИЧ

**СОЗДАНИЕ ЛИНИЙ ЖЕЛТОПЛОДНОГО КАБАЧКА И ПАТИССОНА
(*CUCURBITA PEPO* L.), С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И КЛАССИЧЕСКИХ МЕТОДОВ
СЕЛЕКЦИИ**

4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:
кандидат сельскохозяйственных наук
Домблидес Елена Алексеевна

Москва

2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Ботаническая классификация кабачка и патиссона.....	13
1.2 Морфологические особенности кабачка (<i>var. giraumonts Duch</i>) и патиссона (<i>var. melopepo (L.)</i>).....	14
1.3 Биохимический состав кабачков и патиссонов	17
1.4 Мировое производство кабачка и патиссона	17
1.5 Сорта и гибриды кабачка в Государственном реестре селекционных достижений РФ.....	19
1.6 Основные направления селекции кабачка и патиссона	20
1.6.1 Селекция на раннеспелость	20
1.6.2 Селекция на женский тип цветения	21
1.7 Методы создания исходного материала	22
1.7.1 Подбор родительских пар для скрещивания.....	22
1.7.2 Виды скрещиваний	22
1.8 Поражение кабачка и патиссона настоящей мучнистой росой.....	23
1.9 Использование гаплоидных технологий у <i>C. pepo</i> L.....	25
1.9.1 Предпосылки использования удвоенных гаплоидов в селекции культур семейства Cucurbitaceae.....	25
1.9.2. Современное состояние исследований по получению удвоенных гаплоидов <i>C. pepo</i> L.	29
2. МАТЕРИАЛЫ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	51
2.1 Место и условия проведения исследований	51
2.2 Культура неопыленных семяпочек <i>in vitro</i>	54
2.2.2. Стерилизация эксплантов.....	54

2.2.3. Изоляция семян и введение в культуру <i>in vitro</i>	55
2.2.4. Цитологические наблюдения за развитием семян в культуре <i>in vitro</i> и развитием эмбрионов/калуса	56
2.2.5. Получение растений-регенерантов	57
2.2.6. Адаптация к условиям <i>ex vitro</i> и выращивание растений-регенерантов.....	57
2.3. Изучение влияния факторов на индукцию гиногенеза в культуре неопыленных семян кабачка и патиссона <i>in vitro</i>	58
2.4. Проведение самоопылений растений-регенерантов R ₀ и R ₁ и получение семенного потомства	60
2.5. Выделение ДНК из донорных растений, растений-регенерантов R ₀ и R ₁	61
2.6. SSR-анализ	62
2.7. Оценка фертильности пыльцы с использованием дифференциального окрашивания цитоплазмы	63
2.8. Пропионо-лактоидный метод окраски хромосом	63
2.9. Исследование плоидности растений с использованием проточной цитометрии клеточных ядер	65
2.10. Идентификация плоидности растений-регенерантов на основе морфометрических параметров эпидермиса с абаксальной стороны листа	66
2.11. Исследование пыльцы с помощью электронного сканирующего микроскопа.....	67
2.12 Статистический анализ.....	68
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	69
3.1 Результаты изучения образцов кабачка и патиссона в коллекционном и гибридном питомниках.....	69
3.2 Определение оптимальной стадии развития женского гаметофита для индукции гиногенеза.....	79

3.3 Стерилизация завязи методом обжигания.....	82
3.4 Влияние холодной предобработки	84
3.5 Оптимальный состав питательной среды для получения удвоенных гаплоидов в культуре неопыленных семяпочек <i>in vitro</i>	85
3.6 Изучение эмбриогенеза в культуре неопыленных семяпочек <i>in vitro</i>	92
3.7 Оценка полученного материала на уровень пloidности.....	94
3.7.1 Анализ растений - регенерантов с использованием проточной цитометрии клеточных ядер	94
3.7.2 Кариологический анализ растений-регенерантов кабачка, полученных в культуре неопыленных семяпочек <i>in vitro</i>	99
3.7.3 Показатели абаксимального эпидермиса у растений-регенерантов <i>C. pepo</i>	104
3.8 Оценка морфологических признаков пыльцы кабачка и патиссона	112
3.9 SSR-анализ	116
3.10 Оценка линейного материала, полученного методами биотехнологии	118
3.11 Технология создания бессемянных плодов кабачка	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	129
Рекомендации по практическому применению результатов диссертационной работы.....	131
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	133
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	157

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Кабачок и патиссон относятся к семейству Cucurbitaceae Juss., виду *Cucurbita pepo* L. и имеют большую экономическую значимость и широкое распространение во многих странах мира. В качестве овощной продукции их выращивают для получения плодов, которые достаточно быстро растут и могут употребляться в пищу в свежем, тушеном, жареном виде, а также в виде соков, пюре, консервов, супов. Эти популярные овощи являются лидерами среди остальных выращиваемых тыквенных культур данного вида во всем мире.

Ассортимент тыквенных культур в крупнейших мировых компаниях по производству семян представлен исключительно гибридами F1. Использование гибридов позволяет не только повысить урожайность и выравненность плодов, но и защитить авторские права селекционера-семеновода. Среди культур, относящихся к виду *C. pepo*, в Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию в РФ, гибриды составляют менее 50 %, что свидетельствует об отсутствии у селекционеров возможности внедрять технологии, позволяющие быстро создавать родительские линии. Для кабачка и патиссона, даже несмотря на наличие достаточно крупных цветков, с которыми легко проводить скрещивания, процесс искусственного самоопыления трудоемок ввиду особенностей культуры. У *C. pepo* цветки раздельнополые и достаточно тяжело подобрать на одном растении мужские и женские цветки, раскрывшиеся одновременно. Все скрещивания необходимо проводить вручную и индивидуально изолировать каждый цветок. Для создания выровненной линии традиционными методами селекции необходимо проводить самоопыление в течение 7-10 лет. Длительность создания линий и инбредная депрессия являются основными проблемами селекции гибридов F1. В мировой практике технологии получения удвоенных гаплоидов (DH-

технологии, от англ. Doubled Haploid) широко используются крупнейшими селекционными компаниями в селекционных программах для увеличения выхода новых рекомбинантных гомозиготных форм и включения их в качестве исходного материала (родительских линий) при создании новых сортов и гибридов. Культура неопыленных семяпочек *in vitro* (гиногенез) является одной из наиболее перспективных и востребованных биотехнологий, применяемых для овощных культур семейства Cucurbitaceae. К преимуществам этой технологии относится 100 % гомозиготность получаемых ДН – растений, безопасность (отсутствие необходимости работы с источником излучения, как при технологии индуцированного партеногенеза *in situ*) и относительно низкая себестоимость получаемых гомозиготных линий за счет сокращения временных и трудовых затрат. Для создания эффективной технологии необходимо подобрать оптимальные значений многих факторов, степень влияния каждого из которых на гиногенез может существенно отличаться. Для отдельных видов семейства Cucurbitaceae (огурец, дыня – род *Cucumis*) уже разработаны протоколы получения ДН-растений в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* и имеются патенты, но для большинства генотипов кабачка немногочисленные опубликованные ДН-протоколы малоэффективны, а сведения о получении удвоенных гаплоидов патиссона отсутствуют [61; 63]. Не отражены в литературных источниках морфологические характеристики спорофита, а также мужского и женского гаметофита *C. pepo* с разным уровнем ploидности, нет данных о возможностях. Отсутствуют сведения об использовании удвоенных гаплоидов и тетраплоидных гиногенных форм в скрещиваниях для получения триплоидных гибридов, аналогов которых в мире еще не создано. Имеются лишь аналогичные работы по созданию триплоидных гибридов арбуза [98; 189]. У *C. pepo* в диплоидных клетках содержится 40 хромосом, имеющих очень мелкие размеры, и в открытых литературных источниках отсутствуют эффективные протоколы окраски хромосом, позволяющие проводить кариологический анализ полученных

растений-регенерантов, отсутствуют фото хромосом и какая-либо информация о получении полиплоидных форм у этого вида. В литературе не представлены протоколы для определения плоидности кабачка и патиссона с использованием методов проточной цитометрии клеточных ядер, количественного содержания ДНК у диплоидных образцов *C. pepo*, описания цитотипов. Для создания эффективной технологии необходимо включение в нее обязательного этапа – анализа полученных растений-регенерантов с использованием молекулярных маркеров. На данный момент мы не нашли сведений о разработке эффективных молекулярных маркеров для подтверждения гиногенного происхождения полученных растений-регенерантов кабачка и патиссона и включения данного этапа в протокол получения ДН-растений.

В рамках импортозамещения и решения задач, определенных в 2020 году в «Доктрине продовольственной безопасности», необходимо создание отечественных гибридов кабачка и патиссона, превышающих по урожайности и не уступающих по другим хозяйственно ценным признакам гибридам иностранной селекции, в том числе и с яркой насыщенной окраской плодов. В настоящий момент на консервных комбинатах и при реализации в фазе технической спелости в сетевых магазинах в основном используют гибриды иностранной селекции.

Для создания отечественных гибридов кабачка необходимы линии женского типа цветения. Очень важно вести селекцию на улучшение характеристик плодов желтоплодных сортов, так как многие из них отличаются жесткой корой, тонкой мякотью и ребристостью. Для нечерноземной климатической зоны востребованы раннеспелые гибриды кабачка и патиссона.

Для ускорения селекционного процесса, необходимо провести оптимизацию этапов технологии получения удвоенных гаплоидов кабачка и патиссона в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*. Это позволит повысить эффективность технологии и даст возможность внедрить ее в

традиционный селекционный процесс, что поставит на поток создание линий, обладающих комплексом хозяйственно ценных признаков.

Цель исследования: Оптимизировав этапы технологии получения удвоенных гаплоидов в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* и используя классические методы селекции получить исходный гомозиготный селекционный материал кабачка и патиссона с насыщенной желто-оранжевой окраской и комплексом хозяйственно-ценных признаков.

Задачи:

1. Оценить коллекционный и селекционный материал кабачка и патиссона, по комплексу хозяйственно полезных признаков.
2. Усовершенствовав элементы технологии получения ДН-растений кабачка и патиссона в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* выделить наиболее отзывчивые к эмбриогенезу генотипы.
3. Получить растения-регенеранты кабачка и патиссона в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* и провести анализ их плоидности и гомозиготности.
4. Получить триплоидные бессемянные гибриды кабачка и патиссона в результате скрещиваний между ди- и тетраплоидными формами.
5. Получить желтоплодные линии кабачка и патиссона, отличающиеся высокой урожайностью, раннеспелостью, женским типом цветения и плодами высокого качества.

Научная новизна. Впервые, в России, с использованием биотехнологических методов получены гиногенные линии кабачка и патиссона разного уровня плоидности, проведена их оценка по комплексу хозяйственно ценных признаков с целью их дальнейшего включения в селекционный процесс.

Впервые с использованием микросателлитных (SSR) маркеров было протестировано потомство, полученное в культуре неопыленных семяпочек кабачка и патиссона. Была показана эффективность использования этого типа молекулярных маркеров для подтверждения гиногенного происхождения

полученных растений-регенерантов (истинных ДН-растений) и отделения растений, полученных в результате деления соматических клеток (микрклоны).

Впервые удалось получить потомство от скрещиваний между диплоидными и тетраплоидными гиногенными линиями и получить триплоидные гибриды кабачка и патиссона.

Впервые с использованием сканирующего электронного микроскопа было проведено изучение морфологических особенностей пыльцы и получены изображения пыльцевых зерен у гиногенных растений кабачка и патиссона с разным уровнем плоидности.

Получены микрофотографии хромосом кабачка и патиссона у растений разного уровня плоидности, которые будут представлять интерес для других исследователей, работающих с данными культурами.

Теоретическая и практическая значимость. Усовершенствование элементов технологии получения ДН растений в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*, позволяющие получать до 55 эмбриоидов на одну культивируемую завязь, что превосходит по эффективности технологии, отраженные в литературных источниках для вида *C. pepo*.

Предложен более быстрый способ стерилизации завязей краткосрочным обжиганием в 96% спирте, подходящий для кабачка и патиссона и позволяющий сократить время с 50 минут (при использовании ступенчатой стерилизацией с 5% гипохлоритом натрия) до 1 минуты для получения эксплантов со 100% отсутствием контаминации и без потери эмбриогенного потенциала семяпочек.

Были разработаны эффективные протоколы оценки уровня плоидности растений-регенерантов, относящихся к виду *C. pepo*.

Подобраны два SSR маркера (CMTm61 и CMTmC27), которые могут быть использованы для оценки происхождения полученных растений-регенерантов кабачка в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*.

В условиях провокационного инфекционного фона из растений-регенерантов патиссона гиногенного происхождения выделены ДН-растения с насыщенно желтыми плодами, преимущественно женского типа цветения и толерантностью к патогенам мучнистой росы (*Erysiphe cichoracearum*).

Полученное семенное потомство растений – регенерантов кабачка и патиссона с желтой окраской коры и комплексом хозяйственно полезных признаков, различной ploидности, будут включены в дальнейший селекционный процесс и могут служить объектами для генетических исследований.

Методология и методы исследования. Методология данного исследования основана на традиционных методах селекции (самоопыление, гибридизация и отбор), методах культивирования *in vitro* клеток, тканей и органов растений, фитопатологической, цитологической и молекулярно-генетической оценки.

Работа в селекционных питомниках выполнялась в соответствии с Методикой полевого опыта [8; 18], описание морфологических признаков выполнялось по Методике проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность [20].

Объектами исследования являются образцы вида *Cucurbita pepo* L.-кабачок и патиссон, предметом – этапы технологии культивирования неопыленных семяпочек *in vitro* и микрклонального размножения. Аналитическое обобщение научных данных, представленных в открытых источниках информации, легло в основу теоретического обоснования проводимых исследований. Эксперименты проведены с использованием стандартных методик, подробно представленных в разделе «Материалы и методы» с различными модификациями и последующей статистической обработкой результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Новые генетические источники кабачка и патиссона по: скороспелости, высокой насыщенности женскими цветками, насыщенно

желтой окраске плода и др. хозяйственно ценным признакам, которые могут быть использованы в селекции на эти признаки.

2. Усовершенствованная технология получения ДН-растений кабачка и патисона путем индукции гиногенеза, регенерации эксплантов, ризогенеза *in vitro* и укоренения *in vivo*.

3. Адаптирована к культуре кабачка технология получения бессемянных форм с использованием растений-регенерантов, созданных в культуре неопыленных семян *in vitro*, различной ploидности.

4. Эффективные протоколы оценки уровня ploидности растений-регенерантов, относящихся к виду *C. pepo*.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность проведенных исследований подтверждена закладкой опытов в соответствии с существующими методиками, обширными экспериментальными исследованиями, которые были проведены в необходимом числе повторностей и достаточном объеме выборки, а также статистической обработкой полученных данных.

Результаты исследований и основные положения диссертационной работы были представлены, обсуждены и одобрены на: 6-ом Международном Симпозиуме по тыквенным культурам / VI International Symposium on Cucurbits (2019 г., Бельгия, г. Гент); 21-ой научной конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (2021 г., Россия, г. Москва, ФГБНУ ВНИИСБ); Всероссийской научно-практической конференции «Генетические ресурсы растений для генетических технологий: к 100-летию Пушкинских лабораторий ВИР» / «Генетические ресурсы растений для генетических технологий: к 100-летию Пушкинских лабораторий ВИР» (2022 г., Россия, г. Санкт-Петербург, ВИР); IX Международной научно-практической конференции «Современные тенденции в селекции и семеноводстве тыквенных культур. Традиции и перспективы» (2022 г., Россия, п. ВНИИССОК, ФГБНУ ФНЦО); VII Международной научной конференции

«Генетика, Геномика, Биоинформатика и Биотехнология растений (PlantGen – 2023)» (2023 г., Россия, г. Казань). X Международной научно-практической конференции «Современные тенденции в селекции, семеноводстве и товарном производстве овощных, бахчевых и цветочных культур. Традиции и перспективы» (2023 г., Россия, п. ВНИИССОК, ФГБНУ ФНЦО).

Публикация результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 6 научных работ в отечественных и зарубежных изданиях, в том числе из них 3 в рецензируемых научных журналах в изданиях, входящих в перечень ВАК РФ, 1 работа в рецензируемом журнале Scopus, Web of Science, участие в 1 заявке на патент селекционного достижения.

Личный вклад автора. Результаты экспериментальных и теоретических исследований, представлены в диссертации, обработка и анализ данных выполнены автором. Соискателем разработана программа исследования, получены основополагающие данные, проведено теоретическое обобщение полученных результатов, подготовлены и опубликованы в соавторстве научные публикации.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 171 страницах компьютерного текста. Работа содержит 15 таблиц, 32 рисунка и 7 приложений, состоит из введения, 3 глав, заключения, рекомендаций по практическому применению результатов диссертационной работы, списка использованной литературы и приложений. Список литературы содержит 189 источник, из них – 154 иностранных авторов.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ботаническая классификация кабачка и патиссона

Вид *Cucurbita pepo* L., к которому относятся кабачки и патиссоны, объединяет однолетние травянистые растения, принадлежащие к семейству Cucurbitaceae Juss, роду *Cucurbita* L. и имеет широкое распространение в мире в виду большой экономической значимости. Этот вид отличается огромным многообразием форм. В связи с большой амплитудой изменчивости, присущей виду, А.Н. Duchesne называл его *Cucurbita polymorpha*. Н.И. Вавилов отмечал, что в пределах *C. pepo* L. имеются формы, легко скрещивающиеся между собой и в тоже время отличающиеся примерно в 1 000 раз по весу плодов [4]. Вид характеризуется огромнейшим разнообразием формы плода (от круглого до очень длинного или до плоского) и окраски (зеленой, оранжевой, желтой, белой). При этом интенсивность окраски также сильно варьирует от яркой до бледной, а цветовая окраска – от почти черной до почти белой. Цветовые узоры на плоде могут включать продольные полосы различной ширины и пятнистость, сетчатость, а также иметь сложный двухцветный узор, так что на поверхности одного плода может присутствовать сразу четыре цвета [140].

Среди вида *C. pepo* L., на основе молекулярно-генетического изучения было выделено восемь групп, принадлежащих к двум подвидам (subsp. *pepo* и subsp. *ovifera* (L.) Decker (subsp. *texana* (Scheele) Filov)), отчетливо различающихся по форме плода и выращиваемых для кулинарных целей, которые в англоязычной литературе получили следующие названия: pumpkin, scallop, acorn, crookneck, straightneck, cocozelle, vegetable marrow, zucchini [138; 141] (рисунок 1).

Патиссоны (scallop) относятся к подвиду subsp. *ovifera* (L.) Decker., а кабачки к подвиду subsp. *pepo*. В русскоязычной литературе у производителей и покупателей овощной продукции деление на группы не полное и «кабачок» объединяет овощные культуры с различной формой плода (cocozelle, vegetable marrow, zucchini).



Рисунок 1 – Молодые плоды *C. pepo*, расположенные в соответствии с сортогруппой, по три в каждой группе. Левая колонка, сверху вниз: Pumpkin, Vegetable marrow, Cocozelle, Zucchini. Правая колонка, сверху вниз: Scallop, Acorn, Crookneck, Straightneck [139].

1.2 Морфологические особенности кабачка (*var. giraumonts Duch*) и патиссона (*var. melopepo (L.)*)

Кабачки и патиссоны являются перекрестно опыляемыми однодомными растениями, формирующими крупные, правильные, одиночные (мужские цветки могут быть собраны в пучки) раздельнополые

цветки, размещающиеся на главном стебле и боковых побегах. Цвет венчика обычно ярко желтый в основании и оранжевый на кончике [11]. Цветки обычно однополые, но в редких случаях способны формировать обоеполые цветки. Чашечка и венчик колокольчатые или ворончато-колокольчатые из пяти (редко четырёх-семи) долей. В мужских цветках тычинки спаялись пыльниками в головку, пыльники извитые; в женском цветке развиты три-пять стаминодиев и пестик, с толстым коротким столбиком, с трёх- или пятилопастным рыльцем и с нижней, 3-5-гнездной многосемянной завязью. Плод – тыква (лат. *perо, peronium*) – паракарпный многосемянный с сочным эндокарпием, мясистым мезокарпием и твердым экзокарпием. Плод образуется из нижней завязи, включающей обычно 3 плодолистика [33].

По основным морфологическим признакам: длине стебля; площади, рассеченности и строению листовых пластинок; форме и индексу плодов; длине и ширине плодоножек; габитусу растений – кабачки и патиссоны мало чем отличаются друг от друга. Форма плода-зеленца у кабачка, преимущественно, цилиндрическая (часто со сбегом к плодоножке), белой, желтой, зеленой окраски и их различных оттенков. Плоды патиссона дисковидные, по краю плодов, можно наблюдать ярко выраженные фестоны – зубцы. Внутренне строение плодов однотипно. После слоя коры идет мякоть, как и окраска коры, она может быть различных цветов и оттенков. В центре имеется камера с плацентой и семенами, при этом, в зависимости от подвида, она может отличаться по форме и размеру. Чем меньше камера, тем большее пространство занимает мякоть, тем ценнее генотип.

Несмотря на смешанный, но продолжительный тип цветения, кабачки и патиссоны, при регулярных сборах плодов в фазе технической спелости, могут обеспечить высокий уровень валового сбора. Поверхность коры может быть гладкой, ребристой или, в зависимости от сорта, бугристой (бородавчатой) [30].

По габитусу обе культуры могут быть кустовыми, полуплетистыми или плетистыми.

Размер листовой пластинки может варьировать от мелкой до очень крупной. Форма листа – цельной, треугольной или пятиугольной формы. Рассеченность листовой пластинки может отсутствовать либо быть очень сильно выраженной. Площадь одного листа достигает 260-410 см², а всего растения может достигать 5 500 до 8 000 см². Цвет листьев зеленый, различных оттенков, при этом на листьях могут присутствовать пустулы, образуя рисунок, от мелких до крупных прозрачных пятен. В пазухах листьев, начиная с 6-7-го узлов, могут образовываться ветвистые усики. Стебель, листовая пластина и черешок покрыты тонкими колючими или неколючими шипами [2].

Корневая система патиссона и кабачка хорошо развита. У патиссона она располагается на малой глубине в то время, как у кабачка главный корень проникает в почву до глубины 1,0-1,7 м. Физиологическая часть корней расположена в основном на боковых корнях второго и третьего порядков, которые размещены в пахотном слое почвы [1].

Семена заключены в особые однослойные слизистые оболочки - эндокарпии, которые сохраняются только в плоде и препятствуют проникновению воздуха к семенам и их прорастанию. При высыхании семян эндокарпий легко разрушается. Семена патиссона по внешнему виду сходны с семенами тыквы, но мельче их, белые или кремовые, мелкие и среднего размера, масса 1 000 шт. – 65-120 г [23].

Пыльца крупнозернистая, шаровидная, шиповатая, липкая. Мужские цветки образуются на растении через 30-40 дней после появления всходов, женские, в среднем на 5-7 дней позже мужских. Период развития бутона мужского цветка (от появления до раскрытия) длится 26-30 дней, женского – 10-15 дней. Верхние бутоны развиваются быстрее, чем нижние. Цветки с сильным запахом, распускаются ранним утром – в 4-5 часов. К концу дня мужские цветки увядают, женские сохраняются более продолжительное время [7].

Наилучшим временем для опыления является утро - от 6 до 10 часов при температуре не ниже +12...+15°C. Опыляют цветки пчелы, шмели, осы, жуки и другие насекомые. При ведении селекционной работы все скрещивания проводятся искусственно, вручную. Поэтому, для предотвращения переопыления насекомыми, заранее отобранные мужские и женские цветки изолируют ватой, изолирующими колпачками, заколками прищепками и т.д. Цветение и плодоношение почти неразрывны во времени. При образовании определенного числа семенных плодов завязывание последующих прекращается, а образующиеся завязи почти не развиваются [29]

1.3 Биохимический состав кабачков и патиссонов

Плоды патиссона, в технической спелости, содержат 3,8 г углеводов в 100 г продукта, это примерно 68 % всей энергии из порции или 15 кКал. Состав патиссона: жиры – 0,20 г, белки 1,20 г, углеводы – 3,84 г, вода – 94,18 г, зола – 0,58 г. Суммарное содержание сахаров – 2,4 г, клетчатки – 1,2 г. Из жирорастворимых витаминов в патиссоне присутствуют А, бета-каротин, Е и К. Из водорастворимых — витамины С, В1, В2, В3 (РР), В4, В5, В6 и В9 [22].

Плоды кабачка, в технической спелости, содержат 3,1 г углеводов в 100 г продукта, это примерно 60 % всей энергии из порции или 12 кКал. Состав кабачка: жиры — 0,32 г, белки — 1,21 г, углеводы — 3,11 г, вода — 94,79 г, зола — 0,58 г. Суммарное содержание сахаров — 2,5 г, клетчатки — 1,0 г. Из жирорастворимых витаминов в кабачке присутствуют А, бета-каротин, Е и К. Из водорастворимых — витамины С, В1, В2, В3 (РР), В4, В5, В6 и В9 [14].

Согласно рекомендациям Food and Agriculture Organization of the United Nations и World Health Organization, рацион человека должен включать не менее 400 г овощей и фруктов в день [31].

1.4 Мировое производство кабачка и патиссона

Согласно последним данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций (Food and Agriculture Organization of the United Nations и World Health Organization) за

последние три года (2019-2021 гг.), посевные площади в мире, занимаемые под тыквами, кабачками и патиссонами увеличились с 1,43 млн. га в 2019 г., 1,46 млн. га в 2020 г., до 1,50 млн. га в 2021 г. При этом, за указанный срок, было собрано 22,2 млн. т., 22,9 млн. т. и 23,7 млн. т. продукции соответственно.

По показателю площадей, занятых под тыквами, кабачками и патиссонами, в течение трех лет (2019-2021 гг), Российская Федерация находится на 6-м месте – 56,08 тыс. га 55,94 тыс. га 56,73 тыс. га соответственно, что составляет в среднем 3,83 % от мировых площадей. Наибольшие площади расположены в Китайской Народной Республике 398,16 тыс. га (27,15 %) и Камеруне 153,72 тыс. га (10,48 %).

По показателю собранной продукции, тройку лидеров возглавляет Китайская Народная Республика (32,06 %) – 7,35 млн. т., 7,36 млн. т., 7,38 млн. т.; Украина (5,70 %) – 1,34 млн. т., 1,26 млн. т., 1,31 млн. т.; и Российская Федерация (5,09 %) 1,19 млн. т., 1,14 млн. т., 1,17 млн. т.

По оценке федеральной службой государственной статистики Российской Федерации в 2022 г., посевные площади сельскохозяйственных культур всех категорий составили 82 286,1 тыс. га; посевные площади занятые под кабачком - 19,6 тыс. га, что равняется 0,02 % от всех посевных площадей [169].

Объем импорта консервированных продуктов (овощные продукты; овощи и смеси овощей, приготовленные или консервированные без добавления уксуса или уксусной кислоты, незамороженные) в 2021 г. вырос на 5,9 млн. т. в сравнении с 2020 г. и составил 38,73 млн. т. Выросла и стоимость импорта, по сравнению с 2020 г. она стала выше на 23,37 млн. и составила 56,39 млн. долларов США. Тройку лидеров импортеров составляют: Китай 35,7 % – 20,11 млн. дол., Беларусь 20,7% – 11,86 млн. дол. и Армения 18% – 10,14 млн. дол. Объем экспорта в 2021 г. составил 2,78 млн. т., что ниже показателей 2020 г. на 3,94 млн. т. Стоимость экспорта составила 3,83 что так же ниже показателей 2020 г. на млн. дол. 2,19. В тройку лидеров

экспортеров входят такие страны как: Беларусь 27,5 % – 1,05 млн. дол., Германия 25,8 % – 986,06 тыс. дол., Австралия 17,4 % – 666,65 тыс. дол. [182].

Представленные данные, за последние три года, говорят как об увеличении посевных площадей, валового сбора, так и увеличении произведенной продукции тыкв, кабачков и патиссонов, из чего можно сделать вывод о все возрастающей популярности этих культур [88].

Так же стоит отметить, что для граждан, проживающих на территории Российской Федерации, рекомендуется употреблять в свежем или переработанном виде порядка 120-140 кг в год/на одного человека овощных и бахчевых культур (согласно Рекомендациям по рациональным нормам потребления пищевых продуктов Управления федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека). При этом, по показателю фактического потребления тыквенных культур на человека за 2020 г. на первом месте находится Украина (33 кг в год/человека), а Российская Федерация занимает 4-ое место (8,7 кг в год/человека) [97].

1.5 Сорты и гибриды кабачка в Государственном реестре селекционных достижений РФ

Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в РФ, каждый год пополняется новыми сортами и гибридами кабачка и патиссона. Так, на 02.06.2022 в нем зарегистрировано 228 сортов и гибридов кабачка. По признаку разнообразия окраски коры генотипы представлены следующим образом: с темно-желтой – 11 шт., желтой – 13 шт., светло-желтой – 3 шт., оранжевой – 1 шт., темно-зеленой – 52 шт., зеленая – 24 шт., светло-зеленая – 81 шт., белая – 24 шт., остальные – 19 шт.

Генотипы с желтой окраской плодов составляют 12,3 % от общего числа зарегистрированных сортов (16 шт) и гибридов (12 шт). Среди гибридов F₁, четыре образца являются продуктом иностранной селекции, а восемь создано отечественными селекционерами. При этом, для

центрального региона, районировано два иностранных и шесть отечественных гибридов F_1 . В Государственном реестре 20 сортов и гибридов зарегистрированы для садово-огородного назначения, а семь – для товарного производства.

Патиссон представлен меньшим, чем у кабачка, числом сортов и гибридов всего 44 из которых 6 гибриды F_1 . При этом так же разнообразен по цвету окраски коры: белая – 17 шт., желтая – 10 шт., темно-желтая – 2 шт., светло-желтая – 3 шт., кремовая – 2 шт., темно-зеленая – 6 шт., зеленая – 4 шт. Генотипы с желтой окраской плодов представлены 34 % от общего числа. Из них сортов – 11 шт, гибридов, один из которых иностранной селекции, F_1 – 4 шт. Эти гибриды могут выращиваться в Центральном округе. Однако, все они садово-огородного назначения. По срокам созревания плодов образцы распределяются на раннеспелые – 7 шт., среднеспелые – 7 шт., один образец относится к группе очень раннеспелых.

1.6 Основные направления селекции кабачка и патиссона

1.6.1 Селекция на раннеспелость

Для Нечернозёмной зоны РФ, где в силу климатических условий вегетационный период у теплолюбивых культур очень короткий, немаловажное хозяйственное значение будет иметь скорость вступления гибрида/сорта в плодоношение (период от всходов до начала образования плодая). По этому показателю образцы кабачка и патиссона можно разделить на три группы: раннеспелые – 30-40 дней, среднеспелые – 45-50 дней, позднеспелые - больше 50 дней [6].

Было отмечено, что чем ближе к корневой шейке закладывается женский цветок, тем более раннеспелым будет растение. При скрещивании селекционных образцов, различающихся по скорости вступления в плодоношение, гибридное потомство чаще всего уклоняется в сторону материнской линии. Существует зависимость между раннеспелостью и началом образования женских цветков. Поэтому раннеспелость растений

можно определить уже в фазе бутонизации женских цветков. Короткий межфазный период от всходов до начала цветения женскими цветками указывает на скороспелость гибрида [10].

Для селекции на раннеспелость семена кабачка и патиссона высевают в ранние сроки (в Нечерноземной полосе – III декада мая) и из них отбирают формы, отличающиеся повышенной всхожестью семян в неблагоприятных условиях, способных переносить возвратные заморозки и раньше всех цветущих женскими цветками [12].

1.6.2 Селекция на женский тип цветения

Большинство сортов и гибридов кабачка и патиссона представлены однодомными растениями (моноэция), у которых мужские (тычиночные) и женские (пестичные) цветки находятся на одном растении и как правило более насыщены мужскими цветками. По типу и соотношению на растении цветков, выделяют следующие половые типы: андромоноэция (*andromonoecious*) и гиномоноэция (*gynomonoecious*), которые встречаются гораздо реже, чем моноэцийные. При андромоноэции (*andromonoecious*) на растении присутствуют обоеполые и тычиночные цветки, а при гиномоноэции (*gynomonoecious*) на растении отмечается большая часть пестичных цветков и лишь небольшое количество обоеполых [52; 145].

Селекционерами достаточно продолжительное время ведется отбор и уже созданы линии кабачка и патиссона с преимущественно женским типом цветения, однако линий не имеющих мужских цветков практически нет [32]. Первый селекционный материал кабачка с преимущественно женскими цветками, в котором соотношение женских цветков к мужским составляло 5:1, был получен С.И. Шуничевым в ТСХА и НИИ с-х центральных районов Нечерноземной зоны. У данного образца встречались отдельные растения совершенно без мужских цветков. С использованием женской формы был успешно получен гибрид, превосходящий контрольный сорт Грибовский 37, как по ранней, так и по общей урожайности [26].

При селекции кабачка и патиссона обязательно необходимо учитывать появление первого женского цветка в нижнем узле растения, поскольку это определяет не только раннеспелость, но также является одним из признаков склонности к женскому типу цветения. Определяющим фактором будет являться соотношение мужских и женских цветков [15], а также расположение женских цветков на растении. Чем больше узлов с женскими цветками расположено подряд, тем выше экспрессия женского пола [13].

1.7 Методы создания исходного материала

1.7.1 Подбор родительских пар для скрещивания

Прежде чем приступать к скрещиванию необходимо иметь четкое представление, какими хозяйственно ценными и биологическими признаками должен обладать будущий сорт, гибрид (модель сорта), на основе этого планируется подбор исходного материала, обладающего конкретными хозяйственно ценными признаками [35].

В селекции тыквенных культур с успехом применяется принцип подбора пар из географически отдаленных мест. Потомство от такого скрещивания получается более жизнеспособным и пластичным [9].

Подбираются родительские формы для скрещивания по наибольшему количеству положительных признаков, чтобы у гибрида было меньше отрицательных свойств. Причем необходимо учитывать, что характер морфологических признаков материнского растения у гибрида чаще всего проявляются сильнее, чем признаки отцовского [28].

По скороспелости у тыквенных культур наблюдается промежуточное наследование, чаще с уклонением в сторону скороспелого родителя под влиянием материнской формы, по размеру плода тоже промежуточное с уклонением в сторону крупноплодного родителя [21].

1.7.2 Виды скрещиваний

Внутривидовые скрещивания – парные, насыщающие, беккроссы.

Ступенчатые скрещивания – с привлечением высокоустойчивых сортов и гибридов в целях генетического обогащения потомства, в котором последовательно участвует несколько родительских форм. Такие скрещивания особенно эффективны при создании сортов и гибридов с комплексной устойчивостью к болезням.

Возвратные скрещивания (беккроссы) – применяют для придания форме устойчивости к болезням и сохранения ценных хозяйственных признаков. При этом восприимчивая к болезням линия служит повторной (рекуррентной) родительской формой. На искусственно зараженном фоне отбирают устойчивые формы, однородные по фенотипу и близкие к исходному сорту. Через несколько беккроссов получают сорт с такими же хозяйственно ценными признаками, как исходный, но устойчивый к болезни. Этот метод эффективен, когда устойчивость контролируется небольшим числом генов.

Если намечено передать продуктивному сорту ценные признаки от двух различных сортов или гибридов, параллельно проводят две серии возвратных скрещиваний, получают две линии и скрещивают их между собой, чтобы объединить в одном сорте или гибриде лучшие признаки (конвергентная селекция).

Инбридинг (инцухт) – самоопыление – в пределах популяции выдающихся по ряду признаков форм. Однако в этом случае деградируют растения третьего-пятого поколений (J3-J5). До этого этапа необходимо переходить к скрещиванию устойчивых линий, проверять их на комбинационную способность и выделять лучшие межлинейные гибриды для размножения.

1.8 Поражение кабачка и патиссона настоящей мучнистой росой

Среди экономически значимых заболеваний семейства Cucurbitaceae Московского региона является настоящая мучнистая роса. Её вредоносность обуславливается высокой вирулентностью, способностью преодолевать

различные механизмы устойчивости растений, а также быстрому возникновению рас, устойчивых к химическим средствам защиты. Возбудители мучнистой росы являются облигатными биотрофами, идеально приспособленные к существованию на фотосинтезирующих частях растений-хозяев. Благодаря чему по всему земному шару регулярно возникают локальные очаги поражения и массовые эпифитотии при стечении благоприятных почвенно-климатических условий, среди культурных и дикорастущих представителей семейства Cucurbitaceae. В Нечернозёмной зоне Российской Федерации обнаружены два патогенных вида настоящей мучнистой росы тыквенных культур: *Podosphaera xanthii* (*Sphaerotheca fuliginea* (Schltld.) Pollacci) и *Erysiphe cichoracearum* DC, которые относятся к царству *Fungi* отделу *Ascomycota*; подотделу *Pezizomycotina*; классу *Leotiomycetes*; порядку *Erysiphales* семейству *Erysiphaceae* родам *Sphaerotheca* и *Erisiphe* [27].

В связи с восприимчивостью культуры кабачка к различным видам и расам патогена в программы селекции необходимо включение этапа иммунологической оценки на инфекционном фоне. В условиях Московского региона в открытом грунте растения кабачка поражаются мучнистой росой при наступлении благоприятных почвенно-климатических условий в фазе плодоношения к концу вегетационного периода (II декада августа – I декада сентября), что почти не отражается на урожайности. Однако, в последние годы отмечено более раннее появление первых симптомов: уже на стадии цветения (II или III декада июля) с возникновением локальных эпифитотий (с поражением до 2-4 баллов и с распространением заболевания до 100 %). Поэтому в связи с нарастанием вредоносности фитопатогена селекционный материал необходимо исследовать на устойчивость к местному патоккомплексу.

Характерными симптомами, проявляющиеся на листьях растений, являются пятна белого, позднее – светло-кремового порошкообразного мучнистого налёта на нижнем ярусе листьев с последующим

распространением по растению. Места поражения представляют собой скопления многочисленных конидиеносцов с конидиями, которые легко переносятся с токами воздуха и при наступлении оптимальных условий – вызывают поражение восприимчивых растений. Гидротермический оптимум для возбудителей *Podosphaera xanthii* находится в интервале +15...+21 °C и влажностью 65 %. Для другого вида *Erysiphe cichoracearum* – +21...+27 °C при влажности, предпочтительно в виде мелко дисперсной влаги ниже 50 %.

1.9 Использование гаплоидных технологий у *C. pepo* L.

1.9.1 Предпосылки использования удвоенных гаплоидов в селекции культур семейства Cucurbitaceae

Исследования по получению удвоенных гаплоидов и их использованию для решения фундаментальных и практических задач уже проводятся в мире в течение 100 лет. Первые два гаплоидных покрытосеменных растения, для которых было получено цитологическое подтверждение, были обнаружены у Дурмана обыкновенного (*Datura stramonium* L.) при проведении опытов с применением холодной обработки для индукции хромосомных нарушений [36; 51]. Однако, опираясь на сведения Harland [101], можно предположить, что гаплоиды были впервые описаны несколько ранее на хлопке сорта Map Cotton, образующем относительно многочисленные пары близнецов в семенах [36; 102]. Вскоре за этим последовали аналогичные открытия гаплоидов и у других видов [71]. На данный момент протоколы производства удвоенных гаплоидов уже описаны для 384 видов. Они разработаны путем применения различных *in vivo* и *in vitro* гаплоидных технологий, таких как опыление облученной пылью, межвидовые и внутривидовые скрещивания, скрещивание с естественно или искусственно полученными линиями гаплоидных индукторов, культура неопыленных завязей или семяпочек *in vitro* и культура изолированных пыльников или микроспор *in vitro* [171].

Для культур, относящихся к семейству Cucurbitaceae, большая часть протоколов разработана для огурца и дыни, в то время как для культур,

относящихся к такому экономически значимому виду как *C. перо*, их количество не велико, и если сообщения о получении удвоенных гаплоидов кабачка встречаются, то для патиссона таких работ нам обнаружить не удалось в связи с чем их разработка является крайне актуальной задачей.

Только через тридцать лет после открытия гаплоидии у высших растений, удалось обнаружить гаплоиды в семействе Cucurbitaceae. Первое упоминание об обнаружении гаплоидных близнецовых зародышей в семенах, полученных от межвидовых скрещиваний *C. maxima* × *C. moschata*, произошло в работе Hayase, вышедшей в 1954 г. Автору удалось не только подробно описать выращенные из близнецовых зародышей растения, но и получить кариологическое подтверждение гаплоидного набора хромосом. В работе отмечалось, что эти растения формировали женские цветки в большом количестве, в то время как мужские цветки либо вообще не образовывались (в полевых условиях), либо их можно было обнаружить (в условиях теплицы), но при этом пыльники в них были пустыми белого или коричневого цвета. При опылении женских цветков нормальной пыльцой различных диплоидных растений происходило завязывание плодов, однако семян в них не было [103].

В 1958 г. L. E. Aalders проводя опыты с семенами огурца *Cucumis sativus* L. обнаружил, что при помещении в воду большая часть семян огурца тонет, а другая часть остается на поверхности воды. При извлечении зародышей из плавающих на поверхности воды семян и помещении их на питательную среду в культуре *in vitro*, ему удалось обнаружить и вырастить гаплоиды. Всего им было получено 13 моноплоидных растений (термин «monoploids» автор использовал в своих статьях), но только восемь из них удалось довести в теплице до цветущего состояния [41]. Несмотря на произведенные обработки колхицином и образующиеся плоды, получить семян от самоопыления в этом исследовании так и не удалось. Способ выделения гаплоидов из флотирующих на поверхности воды семян,

предложенный Aalders, до сих пор успешно используется с различными модификациями, как у огурца, так и у других культур семейства Тыквенные [48; 124].

Гаплоидные растения также удалось получить у дыни в потомстве от межвидового скрещивания *Cucumis melo* L. ($2n = 2x = 24$) с *Cucumis ficifolius* A. Rich ($2n = 4x = 48$). При этом количество обнаруженных гаплоидов было крайне низким (до трех гаплоидных зародышей на 1 000 семян) и зависело от генотипа и сезона [74].

Низкий уровень спонтанного образования гаплоидов в природных популяциях у культур семейства Cucurbitaceae (менее одного гаплоидного зародыша на тысячу семян) [41], способствовал проведению исследований по индукции гаплоидии с использованием различных химических и физических факторов и биотехнологических методов *in vitro*. Однако по сравнению с другими сельскохозяйственными культурами, для которых уже в 70-х годах XX века были созданы сорта с использованием ДН-линий (сорт рапса (*Brassica napus*) Maris Naplona [176], сорт Mingo у ячменя (*Hordeum vulgare*) в 1980 г. [104] и т.п.), сообщения об успешном получении гаплоидов в этом семействе были крайне малочисленные.

Использование рентгеновских лучей (X-лучи) в качестве мутагенного фактора широко использовалось учеными в 50-60-х годах. В 1958 г. при проведении опытов по облучению семян арбуза рентгеновскими лучами (48,000 г) было получено диплоидное растение, у которого одна из ветвей была гаплоидной. Листья и цветки на гаплоидной плети были меньшего размера, а стебель и лепестки были тоньше. Получить плод на этой ветви не удалось, несмотря на предпринятые попытки опыления [175]. Это одна из первых работ по индуцированному получению гаплоидов у культур семейства Cucurbitaceae.

Первые исследования по индукции андрогенеза в семействе Cucurbitaceae были проведены на *Luffa cylindrica* в 1979 г. [168]. Пыльники, выделенные из бутонов длиной от 1 до 4 см. культивировали на

питательной среде MS. Авторы протестировали большое количество разнообразных регуляторов роста в различных сочетаниях, добавленных в индукционную питательную среду, в результате чего удалось добиться образования бело-зеленого каллуса в растрескивающихся пыльниках. Цитологические исследования показали, что часть микроспор при культивировании переходило на спорофитный путь развития. Проведенные эксперименты по индукции органогенеза из полученного каллуса при его субкультивировании на различных питательных средах не увенчались успехом, и получить растения не удалось.

В 1983 г. было сообщено о получении первого гаплоидного растения арбуза в культуре изолированных пыльников *in vitro*, однако при пересадке в грунт это растение погибло [186].

С тех пор как San Noeum в 1976 г. получил первые гаплоидные растения в культуре неоплодотворенных завязей/семяпочек *in vitro* у ячменя *Hordeum vulgare* [159], работы по культивированию женского гаметофита были продолжены и на других сельскохозяйственных культурах. Первое сообщение об успешном получении удвоенных гаплоидов из женского гаметофита в семействе Cucurbitaceae было сделано Dumas de Vaulx R. и Chambonnet D. в 1985 г. [57]. Авторам удалось индуцировать гиногенное развитие и получить растения *C. pepo* L. в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*. В своей работе авторы изучили влияние стадия развития женского гаметофита на образование эмбриодов у семи коммерческих гибридов F₁ (Ambassador, Black Beauty, Diamant, Greyzini, Opal, Tara, Tarmino). Наилучшие результаты были получены из семяпочек, извлеченных из женских цветков, находящихся на стадии за один день до распускания цветка. Максимальный выход составил 4,3 эмбриоида на 100 культивируемых семяпочек. При этом было отмечено, что из одной семяпочки могло образовываться сразу несколько эмбриодов. Всего в теплицу было высажено более 50 растений, большинство из которых имели диплоидный набор хромосом, однако встречались миксоплоиды,

анеуплоиды, полиплоиды. При этом отмечалось, что фенотипы полученных в культуре неопыленных семяпочек диплоидных растений отличались от гибридных растений-доноров, и, кроме того, индивидуальные растения отличались между собой. Потомство, полученное от самоопыления диплоидных растений-регенерантов при высадке на следующий год и оценке по морфологическим признакам выглядело достаточно выровнено. Все это свидетельствовало о гаметофитном происхождении полученных растений [57; 184].

Работы по индукции гаплоидии при культивировании неопыленных завязей/семяпочек в дальнейшем продолжились и на других культурах семейства Cucurbitaceae [69; 86; 92; 158; 172].

Одной из самых популярных технологий получения гаплоидов в семействе Cucurbitaceae является технологии спасения партенокарпических зародышей, индуцированных опылением γ -облученной пылью. Впервые об успешном получении гаплоидов при опылении пылью, обработанной Co^{60} было сообщено для дыни *Cucumis melo* L. [160], а в последствие эта технология была применена на огурце [132; 161; 178]. Значительно позже появились сообщения об использовании этой технологии у видов, относящихся к роду *Cucurbita*: для кабачка *C. pepo* [118], тыквы мускатной *C. moschata* [109] и тыквы крупноплодной *C. maxima* [117].

Основные достижения по получению удвоенных гаплоидов у культур семейства Cucurbitaceae были освещены в ряде обзоров [43; 89; 105; 148; 153] и опубликованы в виде протоколов в том числе и в вышедшей в 2021 г. книге «Doubled Haploid Technology» под редакцией Jose M. Seguí-Simarro [45; 67; 119–121; 171].

1.9.2. Современное состояние исследований по получению удвоенных гаплоидов *C. pepo* L.

Для получения удвоенных гаплоидов у культур *C. pepo* L. обычно используют три различных метода: партеногенез *in situ* стимулированный

обработанной/облученной пылью, гиногенез *in vitro* (культура неопыленных семяпочек *in vitro*) и андрогенез *in vitro* (культура пыльников /микроспор *in vitro*) [43; 122]. При партеногенезе *in situ* индукция развития гаплоидного партеногенетического эмбриоида происходит из яйцеклетки под воздействием *in vivo* опыления облученной пылью. В качестве источника облучения пыли чаще всего применяют γ -лучи (γ -облучение), используя ^{60}Co и ^{137}Cs , либо X-лучи (рентгеновское облучение). Впоследствии, через 3-4 недели образовавшийся эмбрионд извлекается из семени и помещается на питательную среду в условия *in vitro*, для прорастания и развития во взрослое растение. При андрогенезе и гиногенезе, изолированные пыльники или семяпочки из неопыленных завязей культивируют на индукционной питательной среде в условиях *in vitro*. В этих случаях под воздействием различных индуцирующих факторов (температурные обработки, регуляторы роста растений и т.п.), происходит переключение программы развития мужского/женского гаметофита на спорофитный путь развития. Формирование взрослого растения при этом возможно, как за счет прямого эмбриогенеза (этот путь более предпочтительный), так и через промежуточную стадию – образование каллуса. Поскольку во всех трех способах процесс происходит в гаплоидных клетках, то первоначально формирующейся эмбрионд или каллус будет иметь гаплоидный набор хромосом. На втором этапе под воздействием определенных факторов/агентов происходит удвоение хромосом и образующийся организм приобретает диплоидный набор хромосом с гомозиготным состоянием аллелей.

У каждого из этих методов при использовании их для тыквенных культур имеются свои преимущества и ограничения, которые были освещены в ряде обзоров [43; 89; 148]. Для эффективного внедрения гаплоидных технологий в селекционный процесс, необходимо добиваться увеличения выхода удвоенных гаплоидов, воспроизводимости разрабатываемых методик, что невозможно сделать без тщательной отработки всех этапов

технологии. Полученные растения-регенеранты необходимо в дальнейшем обязательно исследовать на уровень ploидности и на гомозиготность [71].

1.9.2.1 Партеногенез *in situ*

Первые работы на *C. pero* L. целью которых было получить гаплоидные растения методами опыления облученной пылью, были начаты Kurtar, Sari, Abak в 2002 г. [118] и продолжаются до настоящего времени [68] (Приложение А). За все время было изучено около 60 генотипов *C. pero* L. В большинстве экспериментах в качестве источника γ -облучения использовали Co^{60} , ввиду легкости его применения, хорошей проникающей способности в ткани и индукции высокой скорости мутации при низкой летальности по сравнению с другими видами облучения. Только в исследовании Košmrlj et al., проведенном на тыкве голосемянной *C. pero* ssp. *pero* var. *styriaca* [114] сообщалось об успешном использовании X-излучения (рентгеновское облучение). Облучению обычно подвергали либо мужские цветки (часто после удаления чашелистиков и лепестков) [81], либо заранее изолированные пыльники [68; 114; 118; 121]. Обязательным условием являлась строгая изоляция женского цветка за сутки до распускания и сразу после опыления, чтобы избежать нежелательных опылений.

Известно, что одним из важнейших факторов, определяющих успех этой технологии, будет правильно подобранная доза облучения (Гр мин^{-1}). На практике оптимальной чаще всего оказывается критическая доза или полуметальная доза (LD50, то есть доза для ингибирования прорастания 50 % пыльцы) [43]. Авторы проводили эксперименты с различными дозами облучения в диапазоне от 25 Гр [76; 118] до 400 Гр [118] для γ -облучения и от 50 до 350 Гр для X-облучения. Оптимальная доза в разных исследованиях значительно колебалась в зависимости от генотипа и составляла 50 Гр [68; 118], 150 Гр [68; 76; 81] и 200 Гр [114]. При использовании рентгеновского излучения было отмечено, что завязываемость плодов значительно снижалась при 200 Гр, тогда как при 100 Гр наблюдалось снижение образования зародышей. Также интересным представлялся обнаруженный

факт, что образование тетраплоидных зародышей коррелировало с повышенным уровнем излучения, используемого для пыльцевых зерен [114].

Вторым важным моментом технологии, является определение оптимальной стадии для изолирования образовавшегося партеногенетического зародыша. Этот показатель также может варьировать в зависимости от генотипа донорного растения и используемой питательной среды для «спасения зародыша». В опубликованных исследованиях возраст плода, из которого извлекали зародыш, составлял от 3-4 недель после опыления [76; 115] до 4-5 недель [114; 115; 118]. В плодах более длительного срока созревания 5-6 недель увеличивался процент некротических эмбрионов коричневого и черного цвета. Поскольку самым трудозатратным в этой технологии будет процесс извлечения зародышей из семян, то этому этапу уделяется особенное место. При рассмотрении экономической эффективности (трудозатраты, затраченное время, микробные загрязнения, сохранность эмбрионов) наилучшими методами считается «посев семян непосредственно в питательную среду» и «осмотр семян под флуоресцентным источником света» [48]. Наиболее распространенный метод, применяемый у тыквенных культур — это проверка серии семян один за другим под стереомикроскопом. Именно этот метод применялся и для *C. pepo* L. Стадия развития, на которой находились зародыши при извлечении их из семян, могла быть от глобулярной до семядольной, что также влияло на последующее развитие зародыша во взрослое растение-регенерант и на конечный выход гаплоидов и удвоенных гаплоидов. Было отмечено, что из эмбрионов на глобулярной стадии развития развивались только гаплоидные растения, тогда как из зародышей на семядольной стадии развития развивались диплоиды. Из эмбрионов на стадии торпеды и из сердцевидных зародышей могло образоваться до 53,8 % и 23,1 % гаплоидных растений соответственно [81; 118]. Хотелось бы отметить, что образование диплоидных растений не всегда будет связано с процессом спонтанной диплоидизации первоначально гаплоидных эмбрионов. В работе Košmrlj et

al., (2013) при проверке полученных диплоидных растений с использованием SSR-маркеров было показано, что все они являются зиготическими зародышами [114].

В качестве индукционных питательных сред, на которые помещали незрелые зародыши использовались среды E20A [114; 115; 118] и MS [131] с добавлением IAA (0,01 мг / л) [68] и среда CP [60] дополненная витамином B12 (0,08 мг/л) и IAA (0,02 мг / л) [81]. Kurtar et al., [68] в 2021 г. модифицировал питательную E20A, увеличив содержание Na₂EDTA и FeSO₄*7H₂O в 2 раза и снизив концентрацию агара с 10 г/л до 8 г/л. В качестве регенерационной питательной среды в дальнейшем использовалась E20A[118], и MS с добавлением IAA (0,01 мг / л) и BAP (0,01 мг/л) [76].

Режим культивирования в разных протоколах мог несколько варьировать по температуре от +23 °C [114], +25 °C [115], +26 °C [68; 76] и до +28 °C [118]. Культивирование во всех случаях проводили на свету при 16-часовом фотопериоде и интенсивности освещенности от 3 000 люкс [68; 118] до 5 000 люкс [76]. Максимальный выход по этой технологии был получен Kurtar et al. в 2021 г. [68]. Авторам удалось получить 64 семенника, из которых было выделено 7034 семени с 521 зародышем. Всего регенерировано 144 растения, из которых 28 гаплоидных, 77 диплоидных и 6 миксполоидных растений. Среднее количество семян на один семенник/завязь составило 110 штук, а количество образовавшихся зародышей на одну завязь - 8 штук. Полученный результат является хорошим достижением, но учитывая большую генотипспецифичность, для массового включения этой технологии в селекционные программы, его еще нужно улучшать.

1.9.2.2. Андрогенез

Число публикаций, в которых сообщается об успешной индукции андрогенеза у *C. pepo* L. крайне ограничено [86; 100; 119; 129; 163], впрочем, как и для всех представителей семейства Cucurbitaceae. Первое упоминание об исследовании, в котором сообщалось об успешном получении нескольких

гаплоидных растений *C. pepo* было проведено Shail JW, Robinson RW в 1987 г. [162]. На данный момент нет ни одного сообщения об использовании культуры изолированных микроспор для этого вида, хотя именно эта технология является наиболее перспективным способом получения удвоенных гаплоидов, поскольку отсутствие соматических тканей в культуре *in vitro* позволяет не ставить под сомнение происхождение полученных растений. Хорошо известно, что на индукцию андрогенеза влияют многие факторы, такие как генотип, условия роста донорных растений, стадия развития микроспор, использующиеся предварительные температурные обработки, состав индукционной и регенерационной питательной среды, условия культивирования и субкультивирования.

Сорт Eskandranі оказался относительно отзывчивым к андрогенезу и использовался практически во всех опубликованных протоколах [100; 129; 163] в качестве исходного материала. В 2006 г. в исследования были включены и другие генотипы (Arlika F1, E 82-110 F1, Giad F1, Rula F1, Queen F1, Yellow Bik F1.), среди которых наибольшая отзывчивость к андрогенезу была выявлена у образца Yellow Bik F₁ [163].

Все исследователи использовали мужские цветочные бутоны, собранные рано утром. Оптимальный размер бутонов, содержащий пыльники с микроспорами на средней или поздней стадии развития, для этого вида составляет 9-10 мм (длина) и 4–6 мм (ширина). Плотно закрытые бутоны с такими параметрами бутонов отбирают для введения в культуру *in vitro* и выделяют из них пыльники.

Поскольку мужские бутоны кабачка имеют опушение и более чувствительные к температурной обработке покровные ткани, по сравнению с женскими бутонами и партенокарпными плодами, то использовать стерилизацию 96 % спиртом с последующим краткосрочным обжиганием для этой технологии не подходит. Во всех исследованиях по андрогенезу рекомендовалось проводить ступенчатую стерилизацию материала с использованием 70% водного раствора этанола и 5,2 % гипохлорита натрия.

Хорошо известно, что для перехода микроспор с гаметофиного на спорофитный путь развития необходимо использовать индуцирующие стрессовые факторы. Чаще всего с этой целью используют разнообразные предобработки и обработки пониженными и повышенными температурами, либо сочетание контрастных температурных режимов культивирования [75]. Впервые об успешном использовании предварительной холодовой обработки было сообщено в 1973 г. при культивировании пыльников дурмана [133] и в последующем она использовалась при андрогенезе у многих культур. Во всех опубликованных для *C. pero* исследованиях рекомендовалось также использовать холодовую предобработку бутонов при +4 °C в течении 4 суток (Приложение Б). Все исследователи качестве индукционной питательной среды использовали агаризованную среду MS [131] с различными концентрациями сахарозы: от 30 г/л до 150 г/л [100]. Концентрации сахарозы, оптимальные для индукции каллусообразования у культивируемых пыльников находились в достаточно широком диапазоне от 90 до 150 г/л [86; 119].

Культивировать пыльники рекомендуется в темноте при использовании температурной обработки повышенной температурой в течении 7 дней при +35⁰C [100; 129] или +32⁰C [163], а затем переносить на +25⁰C (Приложение Б).

Metwally et al. получил максимальный выход, при использовании индукционной среды с добавлением сахарозы в концентрации 150 г/л вместе с 2,4-D в концентрации 5 мг/л. Всего, удалось получить с этого варианта опыта 19,3 растения или 30 растений на 100 пыльников. Во время исследования было проведен подсчет хромосом 20 полученных растений-регенерантов, из которых 10 были диплоидными, а 10 были гаплоидными [100].

Было проведено исследование по изучению влияния сезонного фактора на выход андрогенных растений. Mohamed, Refaei показали, что максимальный выход растений-регенерантов был получен из пыльников,

посеянных в ноябре, что превышало в два раза количество посаженных в марте и составило 260 растений на 100 пыльников. В данном исследовании анализ на уровень ploидности показал, что 60 % образовавшихся в культуре пыльников растений были гаплоидными, 23 % диплоидными и 17 % анеуплоидными [129].

Shalaby (2006) было отмечено, что самым отзывчивым к каллусообразованию генотипом оказался Yellow Bik F₁, который показал самый высокий процент образования эмбриогенного каллуса – 38,7 %, а количество регенерированных растений на каллус составило 8,9 шт. В общем количестве полученных и проанализированных на уровень ploидности растений 48,3 % оказались гаплоидными, а 51,7 % были диплоидными [163].

Существенный прорыв в получении удвоенных гаплоидов при использовании мужского гаметофита у вида *C. pero* может быть достигнут только при разработке протокола культуры изолированных микроспор и при обязательном включении этапа оценки полученных растений-регенерантов с использованием молекулярных маркеров [71].

1.9.2.3. Гиногенез

Технология получения растений-регенерантов в культуре неопыленных семязпочек включает в себя пять основных этапов. Первый этап – индукция эмбриогенеза, обеспечивающая переход клеток зародышевого мешка с гаметофитного пути развития на спорофитный с образованием эмбриоидов или морфогенного каллуса. Второй и третий этап включает регенерацию растений и их укоренение в культуре *in vitro*. Четвертый этап – это адаптация растений к условиям *in vivo* и пятый – самопыление полученных растений-регенерантов R₀ и получение семенного потомства. На каждый этап будут влиять свои критические факторы (Приложение А, Б, В).

На первом этапе одним из критических факторов будет стадия развития зародышевого мешка. У тыквенных культур зародышевый мешок

образуется по Polygonium–типу, полностью созревает и готов к оплодотворению через несколько часов после раскрытия цветка. Оптимальной стадией для введения в культуру *in vitro* будет почти зрелый зародышевый мешок. Часть исследователей считает, что вводить в культуру необходимо семязпочки, выделенные из бутонов, находящихся в стадии за 1 сутки до опыления [150] [164], другая же часть предполагает, что бутоны необходимо изолировать с вечера, а рано утром срывать (Приложение В).

В исследованиях Metwally et al. [150] и Domblides et al. [24; 147] проверяли воздействие предварительной обработки завязей низкими положительными температурами: 4°C в течение 2, 4, 8 суток и +4°C в течении 1-2 суток, соответственно. Результат показал, что для женских завязей тыквенных культур, таких как кабачок, обработка низкими температурами для индукции гиногенеза не эффективна.

Следующим важным фактором будут условия культивирования и использования высокотемпературного стресса для индукции гиногенеза. Для *S. perо* оптимальным является культивирование выделенных семязпочек, а не кусочков завязи (ovarian sliced), что достаточно часто практикуется у других тыквенных культур [43].

Выделенные семязпочки оптимально сразу помещать на свет и культивировать при +25°C. Только в протоколе, опубликованном в 2021 г., рекомендовалось использовать для индукции гиногенеза температурную обработку при +35°C в течении 3 дней в темноте [120] (Приложение В). В качестве основы индукционных питательных сред были использованы разнообразные питательные среды: среда С, разработанная ранее для перца [184]; среда MS [150; 164]; среда N6 [53], и среда IMC [24; 147].

Для культур рода *Cucurbita* критичным будет пятый этап технологии (этот же этап будет присутствовать при получении удвоенных гаплоидов с использованием партеногенеза *in situ* и андрогенеза). У растений, имеющих раздельнополые цветки после культуры *in vitro*, достаточно часто бывает трудно добиться одновременного распускания мужского и женского цветка,

чтобы провести самоопыление, в связи с чем большая часть потомства от растений-регенерантов R_0 теряется из-за отсутствия семян.

Об эффективности созданной технологии обычно судят по выходу гаплоидов/удвоенных гаплоидов на 1 культивируемую завязь или числу полученных растений из 1 завязи. Однако более правильным было бы учитывать количество полученных растений-регенерантов R_0 (линий)/на число культивируемых семяпочек. В первом исследовании по получению удвоенных гаплоидов, проведенном с использованием культуры неопыленных семяпочек был достигнут результат – 4,3 эмбриоида на 100 культивируемых семяпочек [57; 184]. Shalaby T. в 2007 сообщил о успешном получении гиногенных растений кабачка, при этом он привел данные об отошедших семяпочках – 48.8 % и 15 растений полученных на одну чашку Петри, в которой содержится 25 семяпочек. Metwally et al., 1998а приводят сведения об наилучшем результате, полученном на кабачке сорта Eskandari – 11 регенерированных растений на 100 культивируемых завязей.

1.9.3. Определение плоидности полученных растений-регенерантов

Оценить полученные растения-регенеранты на уровень плоидности крайне важный этап технологии, поскольку для успешного включения полученных растений в селекционный процесс необходимо получить потомство от самоопыления, что невозможно будет сделать у гаплоидных и триплоидных форм без перевода их на повышенный уровень плоидности. Миксоплоидные формы без стабилизации уровня плоидности, также должны выбраковываться.

Плоидность полученных растений-регенерантов можно определить несколькими способами:

- **прямым подсчетом хромосом** (микроскопирование цитологических препаратов). Этот метод широко используется в течение многих лет, несмотря на сложность получения качественного препарата [99]. Как правило, кончики молодых, развивающихся корней, считаются наиболее

удобным материалом для хромосомных наблюдений, как альтернативу, можно использовать начинающие развиваться цветочные почки или листья [73; 136]. Для получения качественных препаратов приходится применять разнообразные холодовые обработки фиксированного материала, либо образцы обрабатывают антимиотрубочковыми агентами для деполимеризации митотических веретен, предотвращения сегрегации хромосом и увеличения конденсации хромосом, и лишь затем окрашивают ДНК-красителями для визуализации [167]. Прямой подсчет хромосом является наиболее надежным методом определения уровня ploидности [54], однако этот метод требует много времени, оборудованной для этого лаборатории, квалифицированной рабочей группы, технически сложен и подвержен ошибкам, особенно у видов с маленькими и нечеткими хромосомами, такими как у представители рода *Brassica* [107; 170] и рода *Cucurbita* [33].

Несмотря на огромный прогресс в цитогенетических исследованиях, появлении новых красителей и микроскопов с высоким разрешением представители рода *Cucurbita* до сих пор остаются плохо изученным цитогенетическом плане. В настоящий момент нам удалось обнаружить изображения хромосом только для тыквы мускатной [116; 185]. Проведенные Waminal et al. (2011) исследования показали, что полный набор хромосом *C. moschata* составляет $2n=2x=40$, длина хромосом варьирует от $1,05\pm0,30$ мкм до $1,78\pm0,03$ мкм и общей длиной $25,19\pm0,30$ мкм. Было определено 36 метацентрических и 4 суб-метацентрических хромосом [185]. Аналогичных работ для *C. pepo* нам обнаружить не удалось, что подтверждает трудности с проведением кариологического анализа у этого вида. Несмотря на это, именно этот анализ чаще всего выбирают исследователи при тестировании растений, полученных с использованием ДН технологий, однако цитологические иллюстрации в этих публикациях достаточно часто отсутствуют, либо оказываются не достаточно хорошего качества [100; 119–

121; 163; 164]. Отсутствие удобной методики окраски хромосом может приводить к получению недостоверных результатов.

- **методом проточной цитометрии клеточных ядер** (определение содержания количества хроматина в ядрах клеток). Это относительно простой и крайне быстрый, позволяющий за рабочие сутки проанализировать несколько сотен образцов, метод, требующий незначительное количество анализируемого материала. К преимуществам также относится возможность проводить исследование на любой стадии развития растения *in vitro* и *in vivo*, даже когда проростки находятся на ранних стадиях роста [135]. Кроме того, проточная цитометрия – единственный метод, который дает подробную информацию о существовании миксоплоидных тканей и их пропорциях в исследуемом генотипе [54]. В основе метода лежит окрашивание клеток ДНК-специфическим флуоресцентным красителем и последующая их детекция, подсчет и сортировка с использованием лазера [134]. Несмотря на то, что быстрая обработка образцов сделала метод проточной цитометрии наиболее эффективным, точным и удобным подходом для определения уровня ploидности регенерантов, его применение во многих лабораториях все еще ограничено из-за высокой стоимости оборудования и более высокой стоимости каждого анализа [71]. Имеется ограниченное количество публикаций по использованию метода проточной цитометрии для представителей рода *Cucurbita*, в том числе и собранных в базе данных Plant DNA C-values database [143; 144], где минимальный размер генома (1C) представлен у *C. foetidissima* 0.34 пг и максимальный у *C. pepo* 0.54 пг [44]. В тоже время по результатам других исследователей размер генома для вида *C. pepo* (2 C) был равен 1.18 pg, а у *C. moschata* - 0.97 pg [50]. Внутри вида *C. pepo* отмечалась достаточно сильная изменчивость по этому показателю, так для тыквы был определен размер генома – 0,74 пг, а для кабачка (gourd) – 1,05 пг [125]. Были выявлены значительные внутривидовые вариации размера генома у этого вида, даже среди сортов со сходной морфологией [56;

94; 95]. Анализ литературы подтверждает высокий уровень полиморфизма вида *C. pero* и его недостаточную изученность.

Следует также отметить, что, хотя проточное цитометрическое определение плоидности, несомненно, является превосходным методом анализа плоидности, в Cucurbitaceae оно в определенной степени проблематично. Как было показано ранее на арбузе [110], огурце [66] и тыкке голосемянной [114], в молодых тканях часто наблюдается эндоредупликация и эти дополнительные пики могут частично заслонять присутствие первого, часто меньшего пика G1, представляющего уровень плоидности. В исследовании Barow M, Meister A. (2003) был отмечен высокий уровень эндоплоидии *C. pero* в зависимости от выбранного экспланта для исследования [49]. Об использовании метода проточной цитометрии при анализе потомства, полученного при использовании ДН технологий у вида *C. pero* имеется ограниченное число публикаций [114; 147].

- по комплексу косвенных морфологических признаков абаксимального эпидермиса листа (включает в себя количество замыкающих клеток устьиц в поле зрения микроскопа, расположенных на абаксимальной стороне листа; размер этих устьиц; число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц [40; 75]. При этом наблюдается корреляция: чем меньше количество устьиц в поле зрения микроскопа, тем больше длина и ширина устьица, тем выше уровень плоидности. Эффективность данного метода была отмечена для разных культур: *Brassica* spp. [40; 173], *Solanum tuberosum* L. [165], *Capsicum annuum* L. [111], *Physalis peruviana* L., [90], *Beta vulgaris* [19]. Определение плоидности растений по числу хлоропластов в замыкающих клетках устьиц является самым легким, быстрым, дешевым и применяется в практической селекции растений уже более 50 лет [80].

Choe et al., (2012) показали, что идентификация гаплоидов и диплоидов по комплексу косвенных морфологических признаков абаксимального эпидермиса листа в три раза быстрее и в 20 раз дешевле, чем проточная цитометрия, при этом этот метод не требует больших инвестиций или

обучения [108]. Однако следует отметить, что разные условия роста, такие как интенсивность света и температура [82; 187; 188], и стадии развития, такие как возраст и положение листьев [46; 137; 146], а также принадлежность генотипа к определенной группе спелости [40], может достаточно сильно влиять на показатели абаксимального эпидермиса листа. Поэтому при включении этого анализа в протоколы по получению ДН растений желательно оценивать растения, выращенные в одних и тех же условиях, использовать при анализе листья на одной и той же стадии развития, а также обязательно брать в качестве контроля исходные диплоидные генотипы донорных растений.

Морфологические признаки абаксимального эпидермиса листа используются для идентификации плоидности в роде *Cucurbita* у растений, полученных при использовании ДН технологий (Приложение Г). Для облегчения процесса подсчета хлоропластов в замыкающих клетках устьиц рекомендуют использовать окрашивание эпидермиса 10% раствором люголя [77], либо 1% AgNO_3 [118–121]. Поскольку в этих исследованиях не сообщалось о получении растений с более высоким, чем диплоидный уровнем плоидности, то соответственно и не приводятся параметры абаксимального эпидермиса листа для триплоидных ($3n$) и тетраплоидных ($4n$) растений.

- **фенотипическая сравнительная оценка растений.** Гаплоидные растения обычно имеют более мелкие цветки, аномальное развитие завязей, нерегулярное и неравномерное развитие пыльников, более мелкие листья [59; 90; 107; 165]. Только в одной публикации по регенерации растений *C. maxima* и *C. moschata* из семядольных эксплантов нам встретила информация, что среди полученных 122 растений было обнаружено 4 тетраплоида. Указывалось, что у тетраплоидных растений листья, имели больший размер, толщину и были более темного цвета по сравнению с диплоидными образцами, при этом никаких иллюстраций и численных показателей в публикации не приводится [122].

Каждый из способов идентификации ploидности отличается по себестоимости расходных материалов, стоимости необходимого оборудования, времени получения результата для одного образца. Несмотря на то, что все эти способы определения ploидности употреблялись в немногочисленных опубликованных протоколах для *C. pepo* L., подробного описания методик нам не удалось найти. В литературе практически не встречаются качественные фотографии метафазных хромосом у гаплоидных, диплоидных, триплоидных, тетраплоидных растений кабачка, ввиду большого их количества у этого вида ($2n=4x=40$) и их мелкого размера. Крайне мало информации о референсных значениях показателей у растений с различным уровнем ploидности для использования протоколов по проточной цитометрии клеточных ядер и количеству хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (табл. 1, 2, 3) [71].

1.9.4. Использование молекулярного анализа для оценки гомозиготности растений, полученных с использованием ДН-технологий

Несмотря на разработанные многообещающие подробные протоколы получения ДН–растений, образование удвоенных гаплоидов не происходит в 100% случаев. Скорость производства ДН может варьировать в зависимости от вида и используемого метода. Например, линии, индуцирующие образование гаплоидов у кукурузы, показывают уровень образования гаплоидных эмбриоидов от 8 до 10%, в то время как все другие полученные особи являются нежелательными продуктами обычного оплодотворения [91]. Вне зависимости от выбранной технологии получения ДН–растений особенно тщательно необходимо исследовать растения-регенеранты с диплоидным набором хромосом. Несмотря на наличие достаточного количества работ, в которых было показано, что спонтанная диплоидизация может происходить на очень ранних стадиях эмбриогенеза [93], необходимо понимать, что часть образующихся растения-регенерантов, несущих диплоидный набор хромосом может происходить из соматической ткани

донорного/материнского растения, а не из гаметофитных (гаплоидных) клеток. Особенно это нужно учитывать при использовании методов культивирования пыльников и неопыленных завязей/семяпочек [130; 174]. Подтверждение того, что полученные растения действительно гаплоидны или являются удвоенными гаплоидами, необходимо, чтобы избежать нежелательной гетерозиготности и расщепления в потомстве при последующих самоопылениях и скрещиваниях. Тщательный анализ предполагаемых гаплоидов/удвоенных гаплоидов особенно важен при разработке новых методов и передаче полученных растений в селекционные лаборатории. Отсутствие подтверждения гомозиготности полученных растений-регенерантов может добавить годы дополнительных усилий к исследовательским и селекционным проектам [181]. Отличить спонтанные удвоенные гаплоиды (DH) от соматических диплоидов с помощью проточной цитометрии и цитогенетических наблюдений не возможно, поскольку они содержат одинаковое количество ядер и хромосом [85]. Идентификация гомозиготного удвоенного гаплоида по морфологическим характеристикам представляется достаточно трудоемкой и малоэффективной процедурой вследствие влияния условий окружающей среды на морфологические признаки [106], хотя о таких исследованиях достаточно часто сообщается [112; 165], в том числе и для культур семейства Cucurbitaceae [156]. Использование молекулярных маркеров является хорошей альтернативой и эффективным методом, позволяющим проводить тестирование большого количества спонтанных удвоенных гаплоидов или гомозиготных растений на ранних стадиях развития [71].

Методы молекулярного скрининга для проверки гомозиготности могут быть применены к большинству сельскохозяйственных культур. По сравнению с изоферментным анализом, который также используют в протоколах получения DH-растений [55; 62; 151; 152; 180], молекулярные маркеры, основаны на последовательностях генома, в связи, с чем более удобны и надежны для анализа на гомозиготность.

SSR маркеры (Simple Sequence Repeat), представляющие собой микросателлиты (короткие последовательности ядерной ДНК, состоящие из tandemно повторяющихся нуклеотидных единиц длиной 1–5 нуклеотидов) являются наиболее широко используемыми ДНК-маркерами для подтверждения гаметического происхождения при использовании ДН-технологий [43; 83; 183]. SSR довольно распространены в геномах эукариот и широко используются для генетического анализа из-за их кодоминантности, мультиаллельной природы, воспроизводимости, обширного охвата генома и легкости обнаружения [72].

Aleza et al. при использовании технологии индукции партеногенеза при опылении облученной пылью получили гаплоидные и ДН растения клементинов, у которых затем подтвердили наличие единичных аллелей, специфичных для материнского растения, с использованием анализа 52 SSR-маркеров [154].

При использовании 43 SSR-маркеров, которые были гетерозиготными у донорной линии апельсина Valencia, подтвердили гомозиготность и удвоение гаплоидов в линиях, полученных в культуре изолированных пыльников. Кроме того, анализ удвоенных гаплоидов с помощью CAPS маркеров (cleaved amplified polymorphic sequence) и последующее секвенирование целевых областей подтвердил гомозиготное аллельное состояние двух генов (LCYE и LCYB), участвующих в биосинтезе каротиноидов у полученных ДН-растений *Citrus sinensis* L. [72].

Аналогичное исследование было проведено Wang et al. (2015), в котором был индуцирован андрогенез с помощью культуры пыльников *in vitro* у сладкого апельсина «Rohde Red» и получено два ДН растения. Авторы подтвердили, что эти два ДН растения обладают лишь одним аллелем в каждом из 43 протестированных маркеров SSR [155].

Генетический анализ пяти гаплоидных растений *Citrus maxima* (Burm.) Merr. с использованием 32 SSR маркеров был проведен с целью подтверждения их гиногенетического происхождения и изучения

генетического разнообразия. В результате проведенного анализа было показано, что все гаплоидные растения обладали только одним из аллелей. Также было подтверждено, что гаплоидное растение (BX1) и его удвоенный гаплоид (BX1-DH) имеют абсолютно одинаковые SSR-аллели. Исследование 30 растений, полученных от самоопыления DH растений, показало точно такие же SSR аллели, что и у исходного удвоенного гаплоида. В результате было доказано, что самоопыленные DH-потомства могут поддерживать точно такие же аллели, что и их родитель [149].

SSR маркеры успешно использовались для идентификации гомозиготных спонтанных двойных гаплоидов у кокосовой пальмы *Cocos nucifera* L. [179], масличной пальмы *Elaeis guineensis* [75], груши *Pyrus communis* L. [62], ячменя *Hordeum vulgare* L. [37; 181], *Mimulus* [127], картофеля *Solanum tuberosum* L. [58; 165], перца *Capsicum annuum* L. [79] и межвидовых гибридов рода *Brassica* [128].

Еще одним интересным подходом для оценки на гомозиготность полученного в результате использования DH-технологий растений-регенерантов будет использование EcoTILLING. Известно, что методы ферментативного расщепления несовпадения для обнаружения полиморфизма в гетеродуплексных молекулах ДНК (Enzymatic mismatch cleavage methods for polymorphism discovery in heteroduplexed DNA molecules) широко применялись в проектах обратной генетики TILLING (от англ. Targeting Induced Local Lesions in Genomes - введение индуцированных локальных повреждений в геномах) [39; 157]. Этот подход выгоден тем, что с небольшими изменениями его можно применить к большинству видов. Кроме того, он позволяет обнаружить полиморфизм не только у диплоидных, но и у полиплоидных видов [65; 70; 177]. Для анализа используется ряд ферментов, которые могут вызывать двухцепочечные разрывы, что позволяет применять при детекции результатов недорогие агарозные гели. Стратегия обнаружения множественных типов естественных полиморфизмов в природных популяциях «multiple types of natural polymorphisms in natural

populations» впервые была описана при изучении различных природных экотипов у арабидопсиса, в связи с чем она и получила название «EcoTILLING» [84]. Использование этого метода позволяет легко оценить у большого количества генотипов нуклеотидное разнообразие и потерю гетерозиготности без использования дорогостоящего секвенирования ДНК. Этот подход был успешно использован для оценки девяти предположительно ДН растений-регенерантов ячменя, полученных в культуре изолированных микроспор. Авторы протестировали 26 ампликонов, ранее разработанных для TILLING с использованием самоизвлекаемой однокитевой нуклеазы и стандартных агарозных гелей. Одиннадцать из двадцати шести протестированных праймеров позволили однозначно определить гетерозиготность в гибриде F₁ (использовался в качестве донорного растения для получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор) и потерю гетерозиготности у полученных растений-регенерантов, имеющих диплоидный набор хромосом. Путем параллельного тестирования ранее разработанных SSR маркеров в этом же исследовании было показано, что только три из 33 отобранных ранее SSR-маркеров подходили для скрининга этих же образцов. Это позволило авторам предположить, что подходы к ферментативному расщеплению несовпадений могут быть более эффективными, чем скрининг на основе SSR, даже у видов с хорошо разработанными маркерами [181]. Данный подход в дальнейшем может быть использован и на других видах.

У культур семейства Cucurbitaceae также имеются сообщения об успешном использовании SSR маркеров для оценки растений-регенерантов, полученных в культуре изолированных пыльников огурца [47] и неопыленных завязей/семяпочек дыни [83] и огурца *Cucumis sativus* L. [85].

Diao et al. использовал микросателлитные маркеры (SSR) для анализа гомозиготности диплоидных растений, полученных в культуре неопыленных завязей огурца. Из 33 проанализированных диплоидных растений 17 (51,5%) были идентифицированы как удвоенные гаплоиды. Для анализа было

отобрано 7 SSR пар праймеров (CMAG59, CMGA104, CMCTT144, CMTC47, CMAT141, CMCCA145, CMTC123), которые изначально были разработаны на основе геномной библиотеки дыни [70], и выявляли гетерозиготное состояние у материнских/донорных растений. Три пары праймеров (CMAG59, CMGA104 и CMCTT144) могли также и различать разные линии (Jinlv, Biyu и Jinchun) на которых проводилось исследование [85].

В исследовании, проведенном Malik et al. [83] в 2011 г. на дыне (*Cucumis melo* L.) было протестировано 23 пары SSR праймеров, из которых было отобрано шесть (CMCT158, CMAT141, CMCCA145, CMGA172, CMCT505 и CSGTT15b), выявляющих гетерозиготность донорных растений, из которых в культуре неопыленных завязей были получены растения-регенеранты, имеющие диплоидный набор хромосом. Все регенерированные проростки оказались гомозиготными и имели гаметофитное происхождение с последующей спонтанной диплоидизацией. Примечательно, что одна пара праймеров (CMGA172) у донорного растения амплифицировала 4 аллеля, в то время как у гиногенных проростков можно было наблюдать только два из них. Таким образом, частично гетерозиготных растений, гомозиготных по этому локусу, обнаружено не было. Выбрав этот локус первым для анализа неизвестных диплоидов, возможно эффективно выявить гетерозиготы за одну амплификацию. Ранее Perera et al. [179] также пришли к выводу, что одной пары праймеров с разделяющим аллелем в родительском доноре достаточно для дифференцировки популяции, поскольку все проанализированные проростки произошли от одного и того же родителя-донора.

Микросателлитные праймеры оказались удобными для оценки растений, полученных не только в культуре изолированных неопыленных завязей/семяпочек, но и в культуре изолированных пыльников огурца. Из 15 протестированных SSR праймеров два (CMAG59 и CMCTT144) оказались полиморфными и, следовательно, полезными для идентификации ДН среди популяции растений [47]. Как и ожидали авторы, согласно оригинальному

описанию Danin-Poleg et al. [64], растения-доноры имели три полосы амплификации для СМАG59, тогда как растения, полученные из пыльников, представили одну/две (для ДН) или три исходные полосы (для соматических регенерантов). Для СМСТТ144 растения-доноры представляли две полосы, а растения, производные от пыльников, представляли только одну (для ДН) или две исходные полосы (для соматических регенерантов). Среди 47 диплоидных растений, полученных органоогенезом из каллусов Beta Alpha F1, 19% были соматическими диплоидами, тогда как 81% были удвоенными гаплоидами, что также подтвердило высокий уровень возникновения спонтанной диплоидизации на ранних стадиях андрогенеза.

Нам удалось обнаружить только одно исследование по применению микросателлитных маркеров в виде *C. pepo* для оценки полученных растений-регенерантов. Диплоидные растения были получены при использовании технологии партеногенетического развития, стимулированного опылением X-облученной пылью цветков тыквы голосемянной *Cucurbita pepo* ssp. *pepo* var. *styriaca*. Из протестированных 23 SSR маркеров, было отбрано шесть (СМТр80, СМТр88, СМТр125, СМТр142, СМТр235 и СМТр245), амплифицирующих несколько дискретных аллелей. Молекулярный анализ был проведен на 253 подтвержденных методом проточной цитометрии диплоидных растениях-регенерантах, полученных из плодов трех разных генотипов. Чтобы различать диплоиды зиготического происхождения и спонтанно удвоенные гаплоиды, их аллельный состав сравнивали с аллельным составом родительских растений; 245 (96,8%) образцов показали гетерозиготность по первым двум протестированным локусам, тогда как восемь были гомозиготными по обоим тестируемым локусам. Проведенный дальнейший углубленный SSR анализ показал, что все полученные диплоидные растения являются зиготическими зародышами, а не образовались в результате спонтанной диплоидизации [114].

Появившиеся в последнее время публикации по изучению генетического разнообразия *C. pepo* с использованием молекулярных

маркеров, большое количество разработанных праймеров и построенная генетическая карта этого вида [38; 96], не оставляет сомнения, что в ближайшее время в протоколы получения удвоенных гаплоидов у различных разновидностей *C. pero* будет обязательно включен этап тестирования с использованием молекулярных маркеров, поскольку только с его помощью можно подтвердить происхождение полученных растений-регенерантов [71].

2. МАТЕРИАЛЫ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнялась в лабораториях: селекции и семеноводства тыквенных культур и репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений ФГБНУ «Федерального центра овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО) в 2019–2023 годах.

Коллекционный материал, изучался в условиях открытого грунта опытно производственной базы ФГБНУ ФНЦО. По каждому образцу было высажено, в зависимости от ценности селекционного материала, от 5 до 15 растений. Схема посадки 70×70 см. Учетная площадь делянки – 4,9 м². Технология выращивания культуры общепринятая для данной зоны для весенних теплиц и открытого грунта. Полученные растения-регенеранты выращивали в условиях защищенного грунта (пленочной теплицы).

В качестве стандарта для линий кабачка с желтой окраской плодов использовался гибрид Голдкрэш селекции Seminis Vegetable Seeds, Inc. (после 2005 года Monsanto Company), для линий кабачка с зеленой окраской плодов – сорт отечественной селекции Фараон селекции ВНИИССОК (ФГБНУ ФНЦО). Стандартом для линий патиссона был использован гибрид с оранжевой окраской коры гибрид Сани Делайт селекции Seminis. В коллекционном питомнике изучались 19 гибридов и сортов кабачка и патиссона с оранжевой, кремовой, черно-зеленой, золотистой и жёлтой окраской. Селекционный материал, состоящий из более 100 селекционных образцов, был предоставлен лабораторией селекции и семеноводства тыквенных культур ФГБНУ ФНЦО.

Скрещивания проводили только на цветках, заранее изолированных пергаментными колпачками. После скрещивания бутон изолировали ватой.

2.1 Место и условия проведения исследований

Поселок ВНИИССОК, расположен в Одинцовском районе Московской области. Распределение температуры по территории различается в зависимости от времени года. Самым холодным месяцем является январь,

среднемесячная температура воздуха которого достигает -10°C , а самым теплым месяцем – июль со среднемесячной температурой $+17...+18^{\circ}\text{C}$. К неблагоприятным погодным явлениям относятся поздние весенние и ранние осенние заморозки. Весенние заморозки на ровных открытых местностях прекращаются в среднем 10-20 мая, но бывают такие годы, когда заморозки наблюдаются и в I декаде июня. Осенние заморозки в среднем начинаются 20-25 сентября, но в отдельные годы бывают в конце августа.

Среднегодовое количество осадков по территории области колеблется в пределах 450-600 мм и несколько более, убывая с северо-запада на юго-восток. Относительная влажность воздуха в среднем за год составляет 70%. Среднее число дней со снежным покровом за зиму составляет 140-150. Запас воды в снежном покрове к началу снеготаяния достигает 100-130 мм.

Сумма положительных температур за период с температурой $+10^{\circ}\text{C}$ (активных) составляет 1 900-1 950. Продолжительность безморозного периода – 120 суток (с 20 мая по 20 сентября), с температурой более $+15^{\circ}\text{C}$ – 60-65 дней. Переход среднесуточных температур воздуха через $+15^{\circ}\text{C}$ – начало 10 июня, конец – 20 августа; $+10^{\circ}\text{C}$ – начало 5 мая, конец 15 сентября; $+5^{\circ}\text{C}$ – начало 20 апреля, конец 10 октября. Дата полного оттаивания почвы: ранняя - 22 апреля, средняя – 30 апреля, поздняя – 5 мая.

Почвы района дерново-слабоподзолистые, характеризуются отсутствием сплошного подзолистого горизонта, по своему механическому составу относятся к группе легких почв. Суглинистые разновидности встречаются небольшими пятнами. Почвы опытных участков ВНИИССОК дерново-подзолистые, тяжелосуглинистые, содержание гумуса невысокое - 2,5-3,2%. Почвы характеризуются слабокислой и близкой к нейтральной реакцией почвенного раствора, pH сол 5,9-6,9. Содержание подвижных форм фосфора P_2O_5 2,15-6,4 мг на 100 г почвы, калия, K_2O 20,0 - 37,5 мг на 100 г почвы.

Характеристика погодных условий проведена по данным автоматической метеорологической станции (АМС) ВНИИССОК.

На рисунке 2 показано колебание среднесуточной температуры по месяцам. Температурные условия в 2021 г. отличались от средних, в 2019 г. и 2022 г. Теплые весна, начало и середина лета были благоприятны для выращивания и кабачка и патиссона, среднемесячная температура за 2021 год превышала 2020 г. в мае на 2,57 °С, июне на 4,14 °С, июле на 2,53 °С, при этом сентябрь был холодным, среднемесячная температура, по сравнению с 2020 г., была ниже на 4,56 °С. Температурные условия в 2022 г. отличались теплым августом (по сравнению с 2019 г. среднемесячная температура была выше на 5,6 °С, при этом, теплый август сменился холодным сентябрем, и температура составила 9,12 °С (рисунок 2, Приложение Д). В течение всего времени проведения исследований приходилось проводить искусственное орошение коллекционного и селекционного питомников по причине крайне низкого уровня выпадаемых осадков (рисунок 3, Приложение Д).

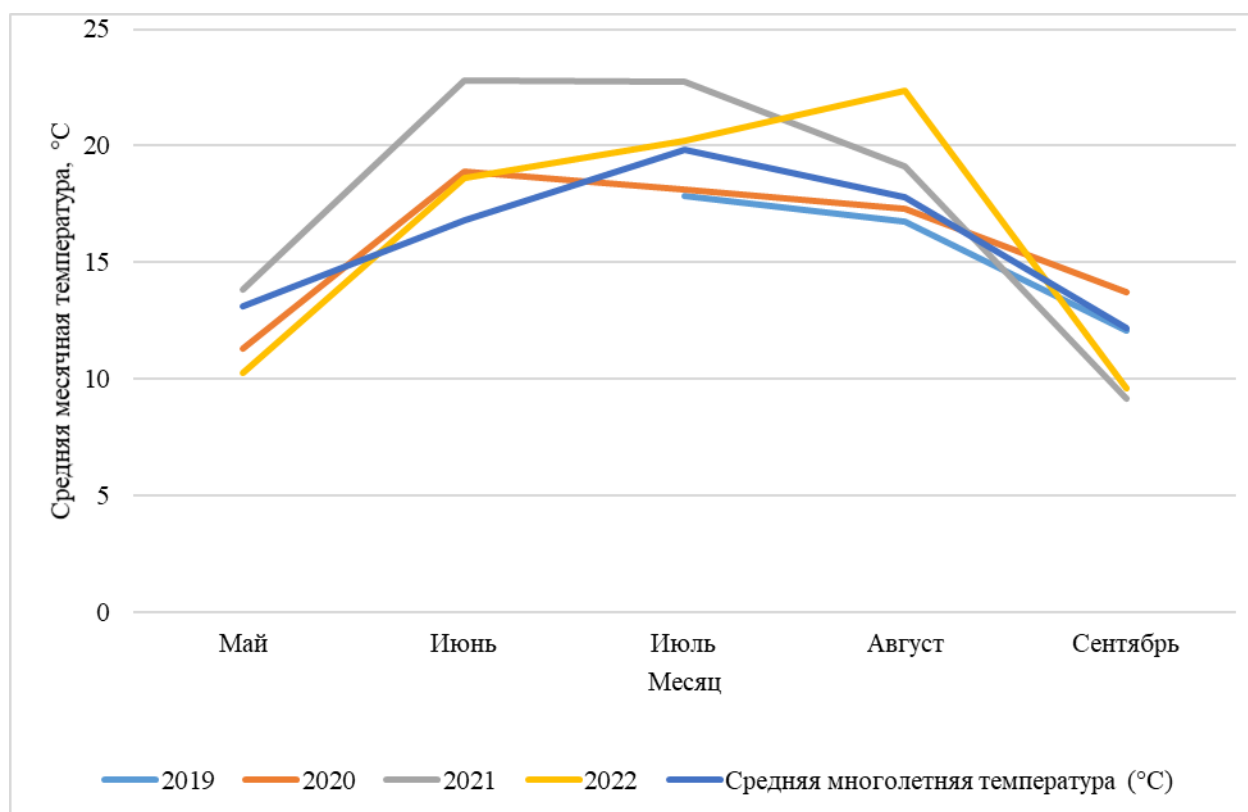


Рисунок 2 – Среднемесячные температурные условия на территории ОПБ ФГБНУ ФНЦО 2019-2022 гг.

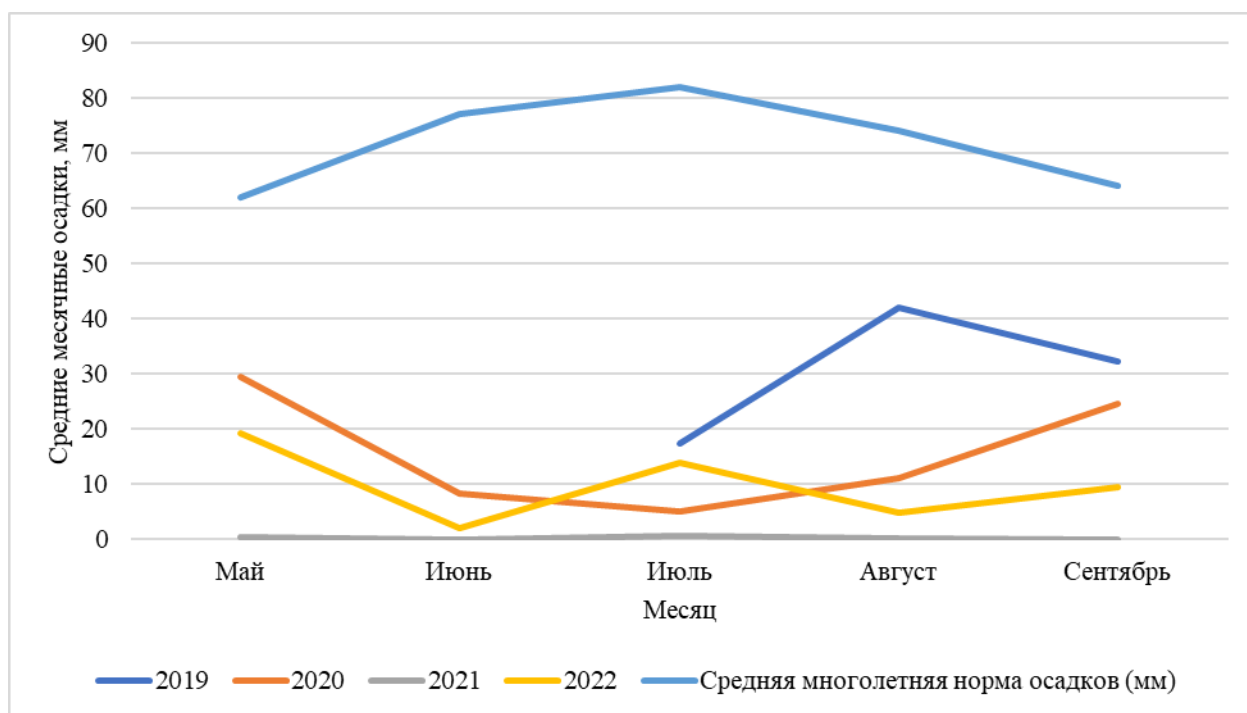


Рисунок 3 – Среднемесячные осадки (мм) на территории ОПБ ФГБНУ ФНЦО 2019-2022 гг.

2.2 Культура неопыленных семяпочек *in vitro*

2.2.1. Отбор бутонов на оптимальной стадии развития женского гаметофита

Для выделения неопыленных семяпочек использовали женские бутоны, находящиеся на стадии 1-2 суток до распускания и в день распускания цветка. Стадию идентифицировали по интенсивности окраски венчика. С вечера бутоны, находящиеся за 1 сутки до распускания, изолировали с использованием колпачка из пергаментной бумаги и на следующий день рано утром срывали. В зависимости от схемы опыта бутоны помещали в холодильник на +4°C до момента введения в культуру.

Сбор бутонов с растений производили с середины июня по середину сентября.

2.2.2. Стерилизация эксплантов

С женских бутонов удаляли околоцветник и промывали под струей водопроводной воды с коммерческим моющим средством «АОС» (или

иными аналогичными) в течение двух минут, после чего переносили в ламинарный бокс.

Стерилизация поверхности проводилась двумя способами: ступенчатой стерилизацией (около 45 минут рабочего времени) и оригинальным, впервые предложенным именно для кабачка и патисона, позволяющим сократить стерилизацию до 1 минуты.

1) в ламинарном боксе завязи промывали в течение 30 секунд в 96% этаноле, затем переносили на 15 минут в 50% водный раствор коммерческого препарата «Белизна» (содержит 10% гипохлорит натрия) и добавляли Твин-20 (1 капля на 100 мл). Далее, завязи трехкратно промывали (по 10 минут) в стерильной дистиллированной воде.

2) в ламинарном боксе завязь пинцетом опускали на 10 секунд в мерный стаканчик с 96% этанолом, после чего вынимали и быстро поджигали в пламени горелки до выгорания находящегося на поверхности спирта (эту манипуляцию можно было проводить 2-3 раза). Стерилизовать завязи можно непосредственно перед выделением из них семяпочек.

2.2.3. Изоляция семяпочек и введение в культуру *in vitro*

Простерилизованные завязи разрезали пополам стерильным скальпелем и проводили выделение препаровальными иглами, удерживая половину завязи пинцетом, в стерильных условиях в стеклянных чашках Петри диаметром 10 см под стереомикроскопом Stemi 305 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) при 10× увеличении в ламинарном боксе. Семяпочки без признаков повреждения помещали на поверхность агаризованной индукционной питательной среды в стерильные, пластиковые чашки Петри диаметром 94×16мм (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Германия) или стеклянные баночки объёмом 100 мл, закрытые пластиковыми крышками Magenta™ B-cap (кат. Номер B8648, Magenta Corporation, Chicago, USA).

Для индукции гиногенеза применяли разработанную в лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений специально для тыквенных культур питательную среду IMC (Induction Medium for Cucurbitaceae) [24]. Состав данной питательной среды значительно отличается от среды CBM и MS (наиболее часто используются для культур семейства Cucurbitaceae). Эта среда содержит повышенное содержание KNO_3 (2496,3 мг/л), увеличенное содержание никотиновой кислоты (5 мг/л) и обогащенный аминокислотный состав. Минеральная основа (макросоли и микросоли) питательной среды IMC аналогичен питательной среде МСм [126] с уменьшенным в два раза содержанием NH_4NO_3 , дополнен аминокислотами (100 мг/л пролина, 100 мг/л серина, 800 мг/л глутамина), витаминами из прописи среды NLN [123]. В качестве источника углевода использовалась сахароза 30 г/л. После подведения pH до 5,8 (0.1M раствором NaOH) в питательную среду добавляли 7 г/л агара и стерилизовали автоклавированием при +121°C, 90 kPa в течение 25 минут. При приготовлении питательной среды после ее остывания до +50...+60 °C в нее добавляли 200 мг/л ампициллина и регуляторы роста:

- 1) 2,4 D 2 мг/л
- 2) TDZ 0,2 мг/л
- 3) 2,4 D 0,8 мг/л + НУК 1,2 мг/л

Для приготовления питательных сред использовали реактивы марки «протестировано для культуры клеток» (Sigma) и сверхчистая вода (Type 1, 18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$), полученная с помощью установки для очистки воды Simplicity® UV Water Purification System (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

2.2.4. Цитологические наблюдения за развитием семязпочек в культуре *in vitro* и развитием эмбрионидов/каллуса

Изучение процесса гиногенеза в культуре неопыленных семязпочек проводили каждые 3-7 суток, измеряя их длину и ширину в течение 1,5-2

месяцев с использованием инвертированного стереомикроскопа Stemi 508 с камерой AxioCam 305 color (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany).

2.2.5. Получение растений-регенерантов

Нормально развитые образовавшиеся эмбриониды переносили на безгормональную среду МС с 2% сахарозой и 3 г/л фитогеля [131].

Был оптимизирован состав регенерационной питательной среды, позволяющий обеспечить образование проростков из аномальных, плохо развивающихся эмбриоподобных структур. Аномальные эмбриоподобные структуры и не развивающиеся эмбриониды переносили на регенерационную среду СВМ дополненную 2% сахарозой, 3 г/л фитогеля, 0,2 мг/л НУК, 0,1 мг/л ГК, 0,8 мг/л БАП и 100 мг/л ампициллина, а через 3 недели, после формирования точек роста и нормально развитых побегов для укоренения помещали на безгормональную среду МС с 2% сахарозой и 3 г/л фитогеля.

Культивирование проводили на стеллажах со смешанным освещением люминесцентными лампами двух типов: OSRAM Fluora L36W/77 (с преобладанием синего и красного спектра) и Philips 36W/54-765 (с преобладанием белого спектра), при общей освещенности 2 500 люкс, фотопериоде 16 часов – день и 8 часов – ночь при круглосуточной температуре +25°C.

2.2.6. Адаптация к условиям *ex vitro* и выращивание растений-регенерантов

Растения-регенеранты с нормально развитыми листьями и корневой системой переносили в вегетационные сосуды 0,5/1 литр, заполненные смесью торфа и перлита (7:3), накрывали перфорированными пластиковыми стаканчиками для адаптации растений к условиям *ex vitro*. После появления двух новых листьев стаканчик удаляли.

Растения-регенеранты выращивали в вегетационной камере с лампами досвечивания (Osram plantstar 600 W) при постоянном температурном режиме +25...+28 °С, освещенности 8 000 люкс и 16ч/8ч-фотопериоде.

Еженедельно проводили подкормку раствором коммерческого комплексного водорастворимого удобрения «Акварин» 1,5-2,0 г/л. для стимуляции роста и последующего цветения.

По мере развития растения проводили пересадки в горшки большего объема (5 л, 8 л). С мая по июль хорошо развитые растения пересаживались в летние пленочные теплицы для оценки по морфологическим признакам и проведения самоопыления.

2.3. Изучение влияния факторов на индукцию гиногенеза в культуре неопыленных семяпочек кабачка и патиссона *in vitro*

Для изучения факторов, оказывающих влияние на частоту эмбриогенеза в культуре неопыленных изолированных семяпочек кабачка и патиссона в 2019, 2020, 2021 и 2022 гг. был проведен ряд экспериментов:

Влияние генотипа донорного растения

Изучение влияния генотипа на частоту эмбриогенеза и каллусогенеза, а также выход растений-регенерантов проводили на генотипах коллекционного и селекционного питомников кабачка и патиссона (таблица 1, Приложение Ж). Растения выращивались как в условиях защищенного грунта (блочная теплица), так и в условиях открытого грунта. Опыт был заложен в 3-30 кратной повторности. Повторность представлена чашкой Петри диаметром 94 мм с 25 изолированными семяпочками на чашку. Изоляция и культивирование семяпочек выполнены как описано в п. 2.2.3, отзывчивость генотипов изучали на питательных среде ИМС с добавлением 30 г/л сахарозы, 200 мг/л ампициллина, 0,2 мг/л TDZ / либо 2 мг/л 2,4-Д, рН среды 5,8 перед автоклавированием.

Эксперимент по изучению влияния концентрации сахарозы проводился на генотипах кабачка: Голдкрэш и селекционной линии 228 (получена из сорта Русские Спагетти). Выделенные семяпочки культивировали в одноразовых чашках Петри диаметром 6 см на жидкой питательной среде ИМС с 200 мг/л ампициллина и 0,2 мг/л ТДЗ и твердой питательной среде (7 г/л агара) аналогичного состава, рН среды перед автоклавированием 5,8. В опытах использовали разные концентрации сахарозы: 2%, 4%, 6%, 8%. Каждый вариант опыта проводили в трех повторностях по 20-25 семяпочек на чашку Петри. Культивирование выделенных семяпочек в чашках Петри на агаризованных питательных средах проводили при условиях описанных в п. 2.2.3, а для культивирования на жидких питательных средах дополнительно использовалась платформа-шейкер (Biosan, Латвия) с режимом 40 качаний в минуту.

Влияние фазы развития цветка

Заранее заизолированные пергаментными колпачками завязи: за 2 суток (FL-2), за 1 сутки до распускания (FL-1) и полностью раскрывшийся цветок (FL), срывались с растения и стерилизовались классическим методом. После чего выделяли неопыленные семяпочки и высаживали их на питательную среду ИМС. Опыт закладывался для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого опыта, в каждой чашке петри высаживали 25 семяпочек. По истечении месяца чашки петри проверяли на число индуцированных семяпочек и рассчитывали %.

Влияние типа стерилизации

Сравнивалось два варианта стерилизации неопыленных завязей для получения хорошо растущей стерильной культуры. В первом случае использовался классический (стандартный) режим ступенчатой поверхностной стерилизации с использованием 96% этанола и 50% водного раствора коммерческого препарата «Белизна» (содержит 5-15% гипохлорит натрия). Во втором случае применялся вариант краткосрочного обжигания

после обработки 96% спиртом. Опыт закладывался для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого опыта, в каждой чашке петри высаживали 25 семян. По истечении месяца чашки петри проверяли на наличие контаминации, число индуцированных семян и рассчитывали %.

Влияние холодной предобработки

Неопыленные завязи, исследуемых генотипов, помещали на хранение в холодильный шкаф, в течение 1-2 суток, при +4°C. Опыт закладывался для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого опыта, в каждой чашке петри высаживали 25 семян. По истечении месяца чашки петри проверяли на число индуцированных семян и рассчитывали %.

Оптимизация состава питательной среды (влияние различных концентраций сахарозы на индукцию гиногенеза у кабачка, использования гелирующих компонентов, регуляторов роста).

Опыт состоит из двух частей. В первой части опыта использовалась концентрация сахарозы (20 г/л, 40 г/л, 60 г/л, 80 г/л) с добавлением агаризованной (7 г/л агара) и жидкой питательной среды ИМС с 0.2 мг/л ТДЗ. Во второй части были использованы регуляторы роста: 2 мг/л 2,4 Д; 0,2 мг/л ТДЗ; 0,8 мг/л 2,4 Д и 1,2 мг/л НУК. Минерально-витаминный состав среды был выбран ИМС дополненный сахарозой 30 г/л и агаром 7 г/л. Опыты закладывались для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого опыта, в каждой чашке петри высаживали 25 семян. По истечении месяца чашки петри проверяли на число индуцированных семян и рассчитывали %.

2.4. Проведение самоопылений растений-регенерантов R₀ и R₁ и получение семенного потомства

Образующиеся женские цветки в стадии за одни сутки до распускания цветка, с вечера изолировали колпачком из пергаментной

бумаги. Рано утром удаляли колпачок и наносили на рыльце пестика пыльцу из только что распустившегося (1-3 шт.) мужского цветка (для удобства околоцветник у мужского цветка можно удалить). После опыления женский цветок опять изолируют собственными лепестками, скрученными при помощи ватного жгутика для предотвращения заноса чужеродной пыльцы и сохранения влажности. Необходимо учитывать, что мужская пыльца сохраняет жизнеспособность не более 5 часов от момента распускания цветка.

Через 2-2,5 месяца после опыления развившиеся плоды в фазе биологической спелости удаляли с куста. Хранили в чистых, сухих, не зараженных вредителями, без постороннего запаха, вентилируемых помещениях в соответствии с установленными правилами при температуре от +8°C до +10°C [5]. Далее, плоды, аккуратно, по толщине мякоти, разрезали пополам и выделяли из них семена проводя описание внутреннего строения. В каждом плоде учитывали только хорошо сформированные семена. Их просушивали и хранили в бумажных пакетах при температуре не выше +20°C.

2.5. Выделение ДНК из донорных растений, растений – регенерантов R₀ и R₁

Ткань молодых листочков каждого растения кабачка размалывали в 200 мкл СТАВ-буфера с использованием шариков из карбида вольфрама (диаметром 3 мм) и гомогенизатора TissueLyser II («Qiagen», Германия) (частота 26 Гц, 1560 колебаний/мин, продолжительность 1,7 мин) до состояния суспензии. После измельчения к каждому образцу добавляли 15 мкл протеиназы К. Дальнейшую экстракцию ДНК проводили СТАВ-методом с использованием набора реагентов Сорб-ГМО-Б (ООО «Синтол», Россия) согласно протоколу производителя. Конечную чистоту и концентрацию тотальной ДНК определяли спектрофотометрически (Smart

Спец Plus, «Bio-Rad», США). Полученное соотношение OD260/280 = 1,6-1,8 соответствовало чистому раствору ДНК. Препараты выделенной ДНК хранили в холодильнике при -70 °С.

2.6. SSR-анализ

Для осуществления SSR-анализа было отобрано 10 микросателлитных локусов разработанных для *Cucurbita pepo* L. с известными последовательностями праймеров, число аллелей которых составляло 2-4 [38].

Базовую постановку ПЦР проводили в реакционной смеси (объем 20 мкл), которая состояла из 2,5 мкл 10 × ПЦР буфера, 2,5 mM MgCl₂, 0,25 mM каждого dNTP, 0,3 мкМ каждого праймера, 1,5 ед. Taq ДНК-полимеразы (ООО «Синтол», Россия) и 3 мкл ДНК исследуемого образца. Основной протокол амплификации включал следующие этапы: 45 с при +92...+95°C (денатурация), 30 с при температуре от +52...+58°C в зависимости от пары праймеров (отжиг), от 30 с до 1 мин при +72°C (элонгация). Амплификацию, рассчитанную на 35 циклов, осуществляли на приборе C1000 Touch («Bio-Rad», США).

ПЦР-продукты разделяли методом вертикального электрофореза с использованием системы Mini-PROTEAN Tetra Cell («Bio-Rad», США) в 6 % полиакриламидном геле при напряжении 200 В в течение 30 мин. После электрофореза гели окрашивали красителем для гелей SYBR™ Safe DNA Gel Stain («Invitrogen», США), результаты документировали с использованием системы ChemiDoc XRS+ («Bio-Rad», США). Размеры амплифицированных фрагментов определяли в сравнении с маркером молекулярных масс GeneRuler100 bp plus DNA ladder («Thermo Fisher Scientific», США). Полученные цифровые фотографии электрофореграмм анализировали в программе Image Lab 3.0 («Bio-Rad», США).

2.7. Оценка фертильности пыльцы с использованием дифференциального окрашивания цитоплазмы

Для оценки фертильности пыльцы без фиксации материала использовали дифференциальный краситель (DIF) [42].

Для приготовления красителя для дифференциальной окраски пыльцы смешивали: 95% этанол 10 мл, малахитовый зеленый 10 мг, дистиллированная вода 50 мл, глицерин 25 мл, фенол 5 мг, хлоралгидрат 5 мг, фуксин 50 мг, оранжевый G. 5 мг, ледяная уксусная кислота 2-3 мл. Все компоненты добавляли в указанном порядке, встряхивали после добавления и хранили в цветном флаконе при комнатной температуре.

В каплю красителя (DIF) на предметном стекле выдавливали микроспоры/пыльцу и накрывали предметным стеклом и просматривали под световым микроскопом, либо без покровного стекла при просмотре с использованием инвертированного микроскопа Primo Vert (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) с камерой AxioCam ERc5s или стереомикроскопа Stemi 508 с камерой AxioCam 305 color (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). Окрашивание происходило в течение 10-20 минут. У фертильных пыльцевых зерен через экзину просвечивала ярко окрашенная в красный цвет цитоплазма, у стерильных пыльцевых зерен она была сине-зеленого цвета.

Степень фертильности образца определяли по числу фертильных пыльцевых зерен (ПЗ) в образце к общему числу ПЗ, выраженных в процентах.

2.8. Пропионо-лакмоидный метод окраски хромосом

Впервые для кариологического исследования образцов кабачка был успешно использован модернизированный нами пропионо-лакмоидным

метод путем приготовления давленных препаратов меристемы стебля и кончиков корней кабачка.

Растительный материал предварительно ничем не предобрабатывался, ввиду большого числа мелких по размеру хромосом кабачка. Фиксация (в пропионовой кислоте) и окрашивание (лакмоидом) материала происходила одновременно в стандартном растворе пропионolakмоида в течение 24 часов. Для фиксации использовали только интенсивно растущие молодые ткани, чтобы обеспечить большое количество делящихся клеток.

Для приготовления пропионolakмоида 5 г лакмоида добавляли к 50 мл 50%-ной пропионовой кислоты, и оставляли в тёмном месте на 3-5 суток, периодически встряхивая колбу, но, не нагревая ее. После этого раствор фильтровали в стеклянный сосуд из темного стекла и хранили в тёмном месте.

Мацерация окрашенных тканей проводилась путём кипячения в 40%-ом растворе пропионовой кислоты: меристемы стебля – 20-30 с; меристемы крупных корней – 45-60 с; меристемы мелких корней – 20-30 секунд с момента закипания.

После кипячения давали материалу остыть 1-3 минуты и переносили часть материала в каплю 40%-ной пропионовой кислоты на предметное стекло, накрывали покровным стеклом для приготовления давленных препаратов. Полосками фильтровальной бумаги, прижав её по краям покровного стекла, раздавливали содержимое препарата. При этом, плоским концом деревянной ручки препаравальной иглы, очень сильно надавливая, «проглаживали» всю поверхность покровного стекла по горизонтали и вертикали. Такой способ уплотнения клеток применим для объектов с мелкими хромосомами большинства овощных культур, в том числе тыквенных. Для сохранности препарат оплавливали парафином и оставляли его для дифференцировки на 30 и более минут.

Просмотр препаратов проводили с помощью микроскопа Axio Imager A2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) при объективе 20× и 40×; подсчёт хромосом, фотографирование — при объективе 100× (с масляной иммерсией). Число хромосом каждой формы подсчитывали на 25 метафазах при увеличении 100×10×1 в клетках, имеющих цельную, нераздавленную оболочку.

Фотографирование наиболее удачных микроскопических объектов проводилась на микроскопе Axio Imager A2 оснащенного камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany).

Обработка и документирование полученных изображений проводили с помощью программы Axio Vision, версия 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany).

2.9. Исследование плоидности растений с использованием проточной цитометрии клеточных ядер

Относительное содержание ДНК определяли при помощи техник проточной цитометрии с использованием иодида пропидия. Для исследования использовали свежие молодые листья донорных растений и растений-регенерантов, полученных в культуре *in vitro*. Листья измельчали при помощи лезвия в 1 мл Tris-MgCl₂ буфера [87] с изменениями следующего состава: 0,2 М Tris основание, 4 мМ MgCl₂, 0,5 % Triton X-100, 50 мкг/мл РНазы, 0,5 % поливинилпирролидон K15, 50 мкг/мл иодида пропидия, рН 7,5). Данные флюоресценции изолированных ядер детектировали при помощи проточного цитометра Partec CyFlow PA (Partec, GmbH) с лазерным источником излучения с длиной волны 532 нм. Визуализацию и обработку гистограмм проводили в программном обеспечении Flowing Software 2.5.1. (University of Turku, Finland). Статистические данные рассчитывали в программа XLStat (Addinsoft). В качестве внутреннего стандарта для определения содержания ДНК внешних стандартов (образцов с известной плоидностью, используемых в

качестве внешних стандартов, т.е. исследуемых отдельно друг от друга без изменения настроек прибора) использовали *Ficus benjamina* ($2C = 1,07$ пг) [25]. Содержание ДНК диплоидных стандартов ($2C$, пг) рассчитывали по формуле:

$$2C, \text{ пг} = (\text{Среднее пика Образца} / \text{Среднее пика Ficus benjamina}) * 2C \text{ Ficus benjamina}$$

Для определения плоидности и содержания ДНК в качестве внешнего стандарта использовали диплоидные образцы донорных растений. Плоидность определяли по индексу разницы между пиками диплоидного стандарта того же вида и образца:

$$\text{Индекс} = \text{Среднее пика Образца} / \text{Среднее пика Стандарта}$$

Содержание ДНК ($2C$, пг) рассчитывали по формуле:

$$2C, \text{ пг} = (\text{Среднее пика Образца} / \text{Среднее пика Стандарта}) * 2C \text{ Стандарта}$$

2.10. Идентификация плоидности растений-регенерантов на основе морфометрических параметров эпидермиса с абаксиальной стороны листа

Эпидермальный слой клеток снимали с абаксиальной стороны листьев с помощью острого пинцета, промывали в дистиллированной воде и помещали на предметное стекло в каплю воды, накрывали сверху покровным стеклом и просматривали под флюоресцентным микроскопом Axio Imager A2 с набором фильтров - Filter Set 14 (EX BP 510/560, BS FT 580, EM LP 590) (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). Хлоропласты проявляли очень сильную автофлуоресценцию красного цвета с пиком примерно при 680 nm.

Фотодокументирование полученных препаратов проводили на камеру AxioCam MRc5 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) с использованием объективов 20×, 40×, 100× (с масляной иммерсией).

При использовании объектива 20 $\times$ – подсчитывали количество устьиц, попавших в поле зрения микроскопа в эпидермисе с нижней стороны листа у растений-регенерантов (пятикратная повторность).

При использовании объектива 40 $\times$ – проводили измерение длины и ширины замыкающих клеток устьиц (10 кратная повторность), после чего рассчитывали Индекс устьица (длина устьица/ ширина устьица).

При использовании объектива 100 $\times$ с масляной иммерсией – проводили подсчет количества хлоропластов, находящихся в двух замыкающих клетках устьиц (10 кратная повторность для каждого растения).

2.11. Исследование пыльцы с помощью электронного сканирующего микроскопа

Для получения изображений пыльцевых зерен (ПЗ) пыльцу из 3 $\times$ цветков с 3 $\times$ растений каждой линии в стадии бутонов с ярко окрашенными лепестками за 1 сутки до распускания и молодых раскрывшихся цветков в период массового цветения наносили на алюминиевые рабочие столики с углеродным скотчем (Double-Sided Carbon Tape, 8 $\times$ 20 мм, EMS Cat#77817-08-AL, Шанхай, Китай). Пыльцу с каждого цветка наносили на отдельный участок столика. Пыльцевые зерна изучали на сканирующем электронном микроскопе JEOL, JSM-6380LA, при ускоряющем напряжении 20 кВ; IB-3 Ion Coater (EIKO, Shawnee, KS, USA) и нанесенном напылением слое золота (Au) толщиной 20 нм. Работа проводилась в Межкафедральной лаборатории электронной микроскопии (МЛЭМ) Биологического факультета МГУ.

Размеры выполненных пыльцевых зерен без видимых нарушений определялись с использованием программного обеспечения для сканирующего электронного микроскопа SEM Control User Interface Version 7.11 Copyright 2004 JEOL Technics LTD. Для каждого образца измеряли не менее 100 пыльцевых зерен.

2.12 Статистический анализ

Обработку экспериментальных данных проводили с использованием общепринятых математико-статистических методов с использованием программы Statistika 10 и пакета анализа научных данных для Microsoft Exel 2016 для Windows 10.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты изучения образцов кабачка и патиссона в коллекционном и гибридном питомниках

При оценке коллекционных и селекционных образцов кабачка и патиссона в качестве эталонного образца были использованы модели сорта разработанные в лаборатории селекции и сменоводства ФГБНУ ФНЦО. Она создавалась на основе Гос. Задания № FNRN-2019-0065, учитывая запросы потребителей. Основными требованиями для кабачка и патиссона является: создание сортов и гибридов с компактным кустом, раннеспелых, холодостойких, высокопродуктивных, многоплодных, разнообразной формой и окраской плодов, с высокими вкусовыми и технологическими качествами и высоким содержанием сухого вещества; мягкой, тонкой, светлоокрашенной корой и маленькой семенной камерой; характеризующихся ранним и дружным плодоношением; предназначенных для приготовления соков, икры и пюре, с [16; 17] (приложение Е).

В качестве стандарта, по раннеспелости, были выбраны районированные, белоплодные сорта кабачка Ролик и Якорь, а по основным хозяйственно ценным признакам желтоплодный гибрид голландской селекции St Голдкрэш. По форме плода наиболее соответствовали модели сорта: Фараон, Ясмин, Желтоплодный, Золотинка, Уголек и Голдкрэш. По окраске коры не соответствуют модели сорт: Фараон, Уголек. Все изучаемы коллекционные образцы, кроме Русские Спагетти и Уголек, по толщине мякоти имели тонкую (1,5 см.) толщину мякоти. Ролик и Якорь зацвели женскими цветками на 27-45 сутки. Так же, по срокам цветения женскими цветками, к раннеспелым, можно отнести: Фараон, F₁ Желтый Банан, Русские Спагетти, Уголек. Стандарт Голдкрэш зацвел на 50 сутки после всходов, на 5-13 суток позже вышеуказанных сортов и нуждается в доработке по этому признаку. В связи с чем, большинство желтоплодных образцов, были

включены в дальнейшие скрещивания с белоплодными и зеленоплодными формами (таблица 1, рисунок 4, Приложение Ж).

Для патиссона качестве стандарта, по раннеспелости, был выбран сорт отечественной селекции Диск, по основным хозяйственно ценным признакам желтоплодный гибрид голландской селекции Сани Делайт. По форме плода все генотипы соответствовали модели сорта. По окраске коры не соответствовали Диск и Чебурашка, при этом все образцы имели почти одинаковую толщину мякоти. Так же, по срокам цветения женскими цветками, к раннеспелым, можно отнести: Чебурашка и Сани Делайт. F₁ Солнечный Зайчик зацвел на 80 сутки после всходов, и в дальнейшей селекции участия не принимал (таблица 1, рисунок 4, Приложение Ж).

Таблица 1 – Характеристика плода коллекционных образцов кабачка и патиссона (коллекционный питомник, открытый грунт, 2019-2022 гг.)

Образец	Характеристика плода			
	Форма	Окраска	Толщина мякоти, см.	Внутреннее строение
St. Якорь	цилиндрический, гладкий	кремовая	3,5	рыхлая
St. Ролик	цилиндрический, со сбегом	кремовая	3,5	рыхлая
St Голдкрэш	длинный, цилиндрический, со сбегом к плодоножке, слабо ребристый	оранжевая	1,5	плотная
Фараон	длинный, цилиндрический	темно - зеленая, мелкая сетка	1,5	паленька
F ₁ Ясмин	короткий, тонкий	ярко-оранжевый	1,5	слитная
Желтоплодный	длинный со сбегом	оранжевая	1,5	слитная
Золотинка	цилиндрический, со сбегом	оранжевая	1,5	слитная
Золотой Телец	короткий, изогнутый	оранжевая	1,5	слитная
F ₁ Желтый Банан	овальный, с ручкой	оранжевая	1,5	слитная
F ₁ Афина Полька	короткий, ребристый	оранжевая	1,5	слитная
Золотой Ключик	короткий, ребристый от плодоножки	желтая	1,5	слитная
Русские Спагетти	широко-каплевидный	золотистая	3,5	рыхлая

Продолжение таблицы 1

Уголек	длинный, со сбегом	темно - зеленая	3,5	рыхлая
Сани Делайт	округло-плоский, неглубокие фистоны	оранжевая	2-2,5	рыхлая
Копейка	округло-плоский, неглубокие фистоны	оранжевая	2-2,5	рыхлая
НЛО оранжевый	округло-плоский, неглубокие фистоны	оранжевая	2-2,5	рыхлая
F ₁ Солнечный Зайчик	округло-плоский, неглубокие фистоны	оранжевая	2-2,5	рыхлая
Чебурашка	округло-плоский, фистоны	белая	2-2,5	рыхлая
Диск	округло-плоский, фистоны	белая	2-2,5	рыхлая

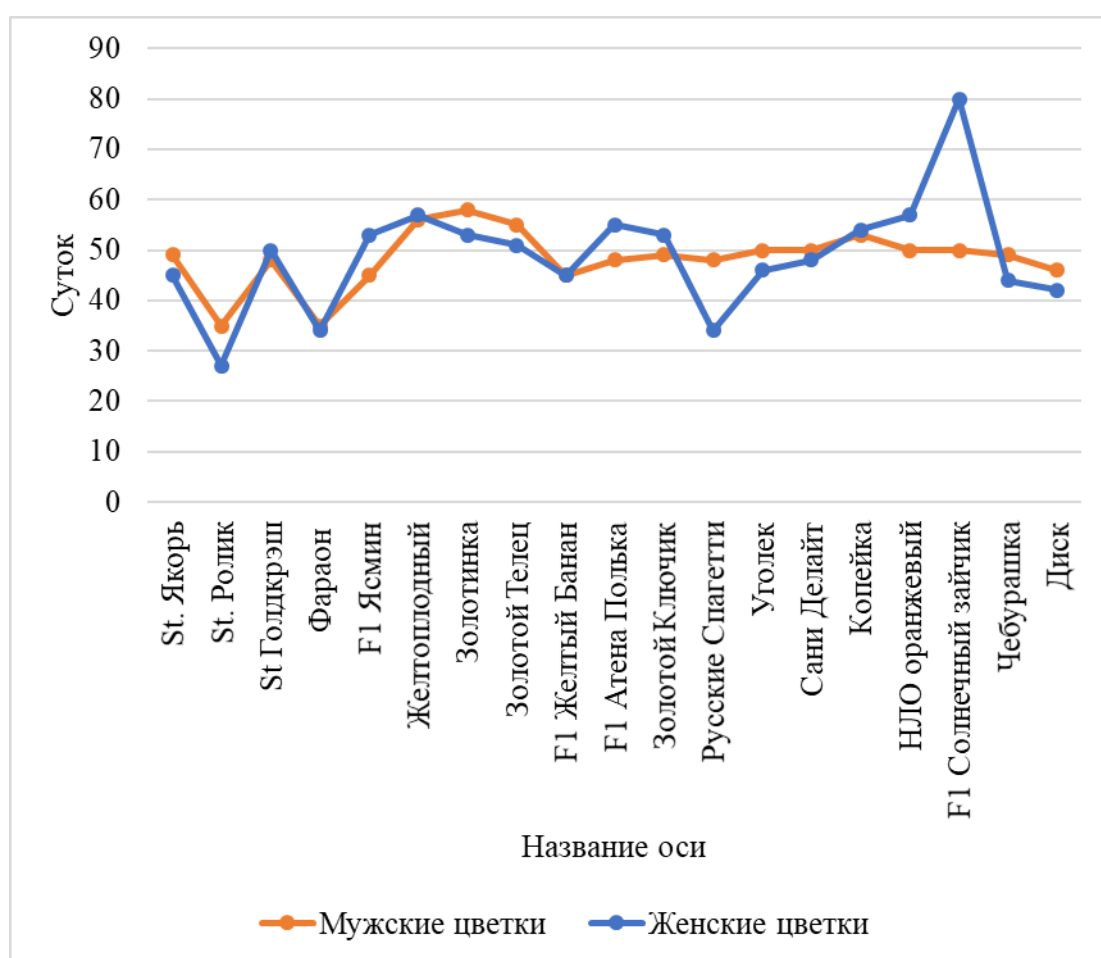


Рисунок 4 – Начало цветения коллекционных образцов кабачка и патиссона (коллекционный питомник, открытый грунт, 2019-2022 гг.)

Для того, чтобы придать скороспелость, женский тип цветения, улучшить характеристики плода, желтоплодные сорта и гибриды были вовлечены в скрещивания с образцами другой окраски. В первом поколении от скрещиваний насыщенно-зеленоплодных материнских и желтоплодных

отцовских образцов кабачка, 56 % комбинаций имели желтую, а 43 % – зеленую окраску плода. Для того, чтобы получить желтую окраску плода в F₁ более интересными были обратные скрещивания – материнская форма с желтыми плодами, отцовская с насыщенно-зелеными. В этом случае 75 % комбинаций имели желтые плоды. Интересно, что от скрещиваний родительских форм с насыщенно-зеленой окраской большинство гибридов первого поколения (66 %) также имели желтую окраску плодов (таблица 2).

Таблица 2 – Наследование окраски плода в первом гибридном поколении, гибридных комбинаций, шт. (2019-2021 годы)

Кабачок			
Комбинация скрещивания	Гибрид F ₁ , окраска		
	желтая	белая	зеленая
♀насыщенно-зеленая × ♂желтая	9	0	7
♀желтая × ♂насыщенно-зеленая	6	1	1
♀желтая × ♂желтая	10	0	0
♀насыщенно-зеленая × ♂насыщенно-зеленая	4	0	2
Патиссон			
♀желтая × ♂белая	2	3	0
♀белая × ♂желтая	0	8	0
♀желтая × ♂насыщенно-зеленая	1	0	0
♀желтая × ♂желтая	1	2	0

Возможно, насыщенно-зеленая окраска плодов была определена b/b. Shifriss O. (1955) объясняет, что практически для всех природных разновидностей *C. pepo*, у b/b растений, в зависимости от генотипа по другим локусам окраски плодов, особенно D, l-1 и l-2, плоды либо остаются насыщенно-зелеными, либо, позже в своем развитии, становятся оранжевыми или желтыми [166]. У *Cucurbita pepo* L. зачастую белая окраска плодов доминирует по отношению к насыщенно-зеленой и желтой [142]. В нашем опыте гибриды первого поколения патиссонов от скрещиваний материнской формы с белыми плодами с отцовской с желтыми – имели белую окраску плода (100% комбинаций). При скрещивании материнской формы с желтыми

с отцовской формой с белыми плодами наблюдали комбинации как с желтой, так и с белой окраской плода. И даже от скрещиваний желтых с желтыми формами не всегда получали в первом поколении желтые плоды. Все это говорит о довольно сложном характере наследования окраски. В работе Чернявской О.В. (2009) при прямых и обратных скрещиваниях белоплодного патиссона с желтоплодным в первом поколении гибридов была отмечена бледно желтая окраска плодов, то есть признак «окраска плода» имел промежуточный характер наследования [34]. Поэтому целесообразно использовать насыщающие скрещивания с желтой формой параллельно с отбором по комплексу хозяйственно полезных признаков.

В результате проводимых отборов, скрещиваний и последующих самоопылений были отобраны лучшие линейные формы кабачка и патиссона. Линейный материал кабачка по показателю оранжевой окраски коры соответствует у 4-х линий I₄ Ясмин 21/194, I₄ Ясмин 21/196, I₄ Ясмин 21/198, I₄ Ясмин 21/199; I₃ Сангрум 21/200, I₃ Сангрум 21/201 и линии I₃ Сани Делайт 22/E23. Отобранные оранжевоплодные линии характеризуются цилиндрической формой плода со сбегом к плодоножке, без ребер. По показателю толщины мякоти выделилась линия I₄ Ясмин 21/194- 2,5-3 см. и I₄ Святозар 21/221 2,5 см. По срокам цветения женскими цветками особенно выделяется линия кабачка I₄ Святозар 21/221 цветение женскими цветками которого начиналось через 36 суток, при этом группа линий I₄ Ясмин 21/194, I₄ Ясмин 21/196, I₄ Ясмин 21/198, I₄ Ясмин 21/199, I₄ Ясмин 21/206, I₄ Ясмин 22/E5 показывала дружное цветение (таблица 3, рисунок 6). Линия I₄ Святозар 21/221 показала наибольшую толерантность к поражению настоящей мучнистой росой.

Таблица 3 – Хозяйственно полезные признаки лучших линий кабачка и патиссона, полученных методами классической селекции

Линия	Характеристика плода						Тип цветения
	Окраска	Форма	Индекс, см	Внутренне строение плода			
				толщина мякоти, см.	цвет мякоти	камера	
I ₄ Ясмин 21/194	оранжевая	цилиндрическая, со сбегом к плодоножке	1-1,5	2,5-3	оранжевая	рыхлая	преимущественно женского
I ₄ Ясмин 21/196	оранжевая	цилиндрическая, со сбегом к плодоножке	1	1-1,5	оранжевая	рыхлая	преимущественно женского
I ₄ Ясмин 21/198	оранжевая	овальный, со сбегом, ребра сглажены	1,5-2	2	оранжевая	плотная	преимущественно женского
I ₄ Ясмин 21/199	оранжевая	цилиндрическая, со сбегом	2	1,5-2	оранжевая	рыхлая	преимущественно женского
I ₄ Ясмин 21/206	черно-зеленый	цилиндрический, со сбегом, ребра сглажены	2	2	темно-желтая	плотная	преимущественно женского
I ₄ Ясмин 22/E5	черно-зеленый, оранжево сетчатый	цилиндрический, со сбегом, ребра сглажены	2	2	темно-желтая	рыхлая	преимущественно женского
I ₃ Сани Делайт 22/E23	светло-оранжевая	дисковидный, фистоны	2-2,5	2	оранжевая	рыхлая	преимущественно женского
I ₃ Сани Делайт 22/E24	светло-оранжевая	дисковидный, фистоны	3	1-1,5	кремовая	плотная	преимущественно женского
I ₃ Сани Делайт 22/E25	светло-оранжевая	дисковидный, фистоны	2-2,5	2	темно-желтая	рыхлая	преимущественно женского
I ₃ (Сангруппа Уголек) 21/203	чёрно-зелёный	цилиндрический со сбегом	5,4	2	светло-оранжевая	рыхлая	преимущественно женского
I ₃ Сангруппа 21/200	оранжевый	цилиндрический со сбегом	5,5	2	оранжевая	рыхлая	преимущественно женского

Продолжение таблицы 3

I ₃ Сангрум 21/201	оранже вый	овальный со сбегом	5,5	2	оранже вая	рыхл ая	преимущес твенно женского
I ₄ Святозар 21/221	оранже вый	цилиндричнски й со сбегом	5,5	2,5	бледно- оранже вая	сухая	преимущес твенно женского

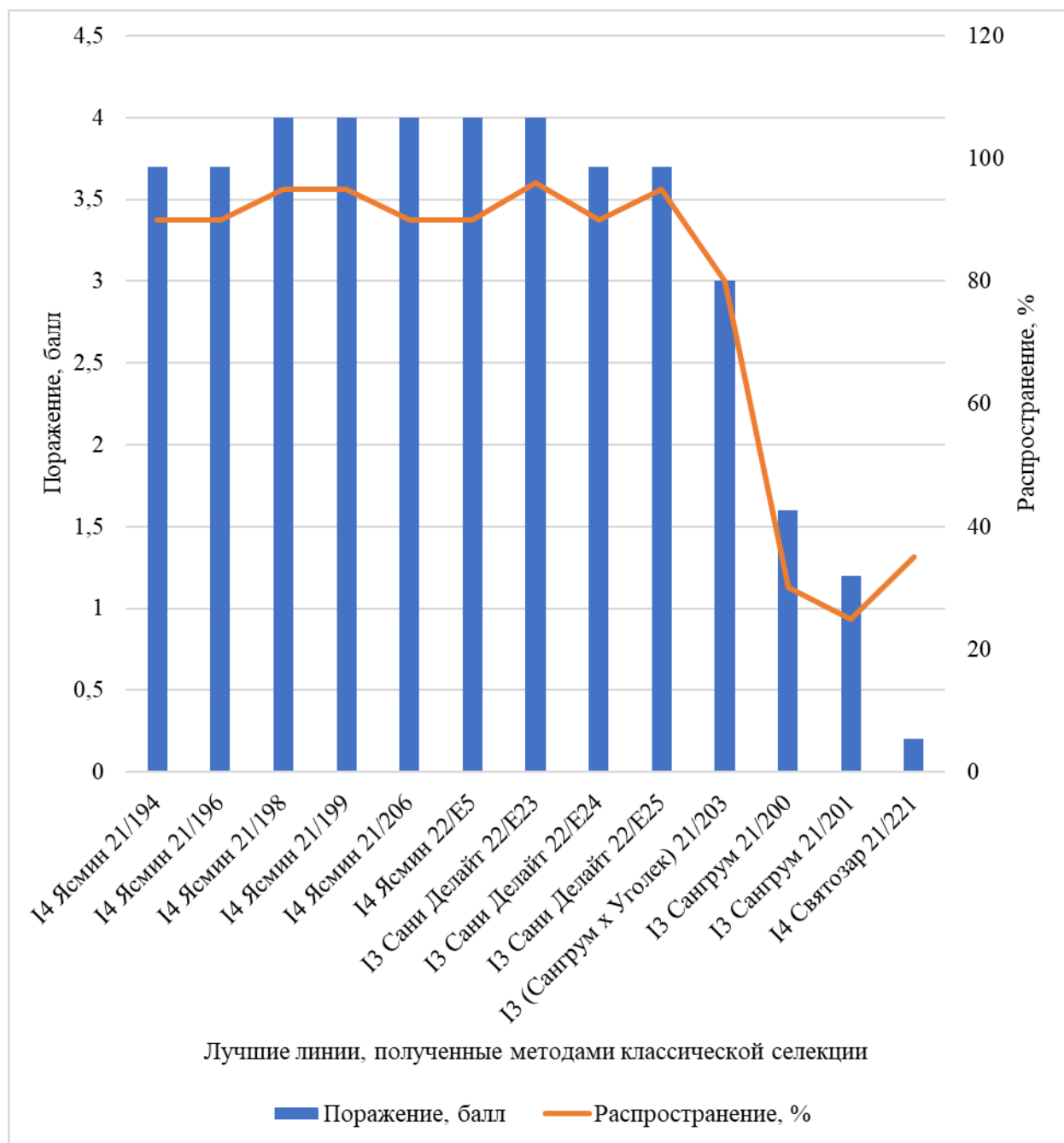


Рисунок 5 – Поражение патогенами мучнистой росы лучших линий, полученных методами классической селекции (открытый грунт, 2019-2022 гг.)

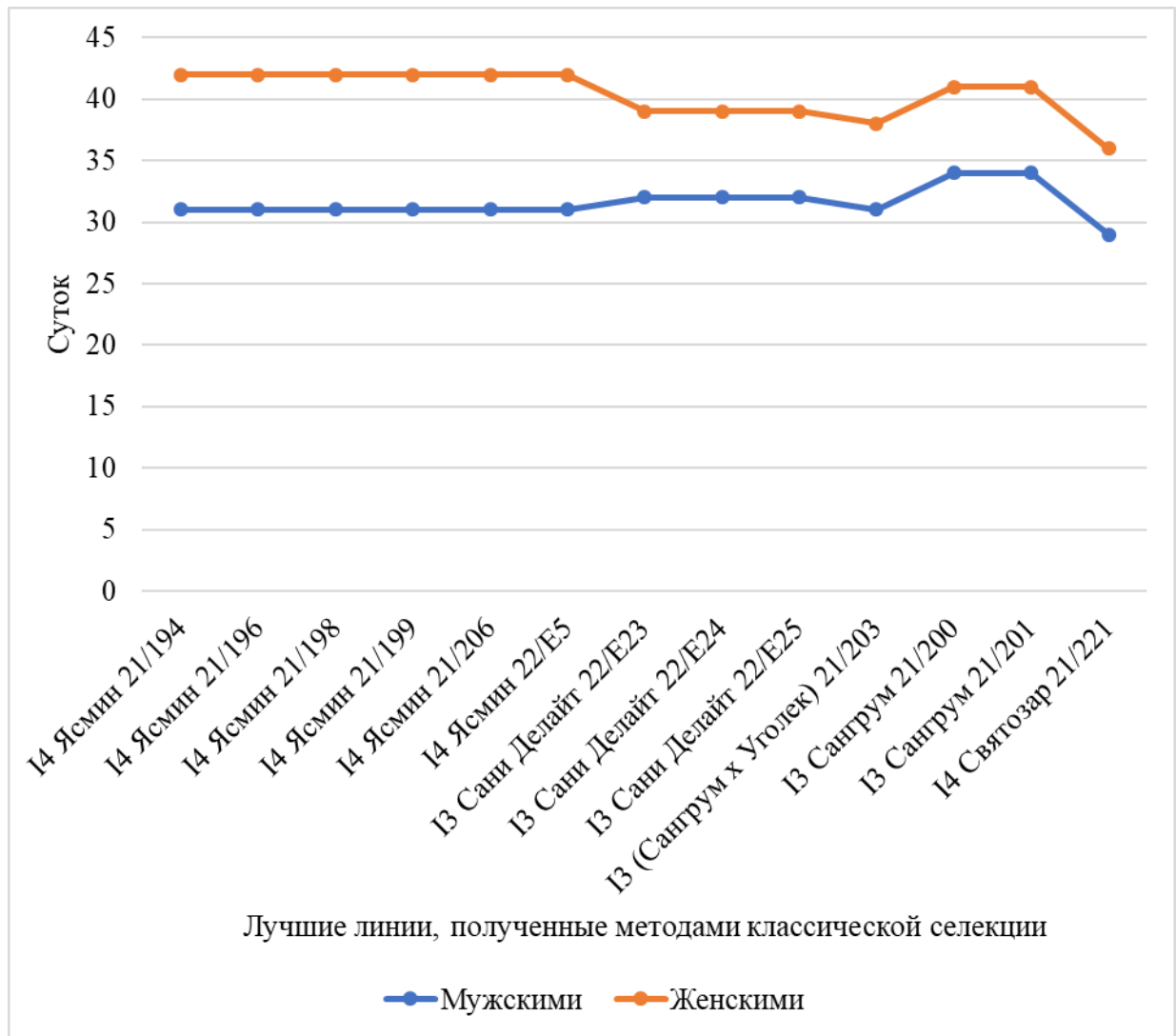


Рисунок 6 – Цветение лучших линий кабачка и патиссона, полученных методами классической селекции (открытый грунт, 2019-2022 гг.)

В 2022 г. питомник, в котором проводилась оценка выделившихся линий по показателю урожайности, находился в условиях сильного провокационного фона. Как результат, удалось провести оценку по уровню поражения патогенами мучнистой росы лучших линий, кабачка и патиссона, полученных методами классической селекции. При этом, поражение бактериозом было незначительным ввиду крайне сильно распространения патогенов мучнистой росы. Стоит выделить линии I₅ Святозар 22/E9 и I₅ Святозар 22/E10. По сравнению с остальными поражение было не столь значительным и составило 2,5 балла, а распространение не превышало 50-60% (Рисунок 7). Несмотря на поражение растений патогенами мучнистой росы удалось провести оценку. Так, ни одна из линий не смогла превзойти контроль Голдкрэш по урожайности, однако, показатели стандарта кабачка Фараон превысила линия I₅ Святозар 22/E10 на 2,6 кг. и составили 80,58% от контрольных значений Голдкрэш. Низкая урожайность может быть объяснена сильным провокационным фоном и массовым поражением мучнистой росой селекционных образцов (таблица 4, рисунок 7).

Таблица 4 – Характеристика по урожайности лучших линий кабачка и патиссона, полученных методами классической селекции (Контрольный питомник и ПСИ, открытый грунт, 2022 г.)

Генотип	Урожайность т/га	Урожайность в % к St
Патиссон		
Сани Делайт	35,31	100,00
Чебурашка	42,15	119,37
Кабачок		
Голдкрэш	68,66	100,00
Фараон	52,67	76,71
I ₅ Святозар 22/E12	32,90	47,91
I ₅ Святозар 22/E9	42,53	61,94
I ₅ Святозар 22/E10	55,33	80,58
I ₅ Святозар 22/E13	1,63	2,38
F ₂ (Фараон х Сангрум)	5,61	8,17
I ₃ Ясмин	1,59	2,32
I ₅ Святозар 22/E11	27,61	40,21
НСР _{0,5}		1,46

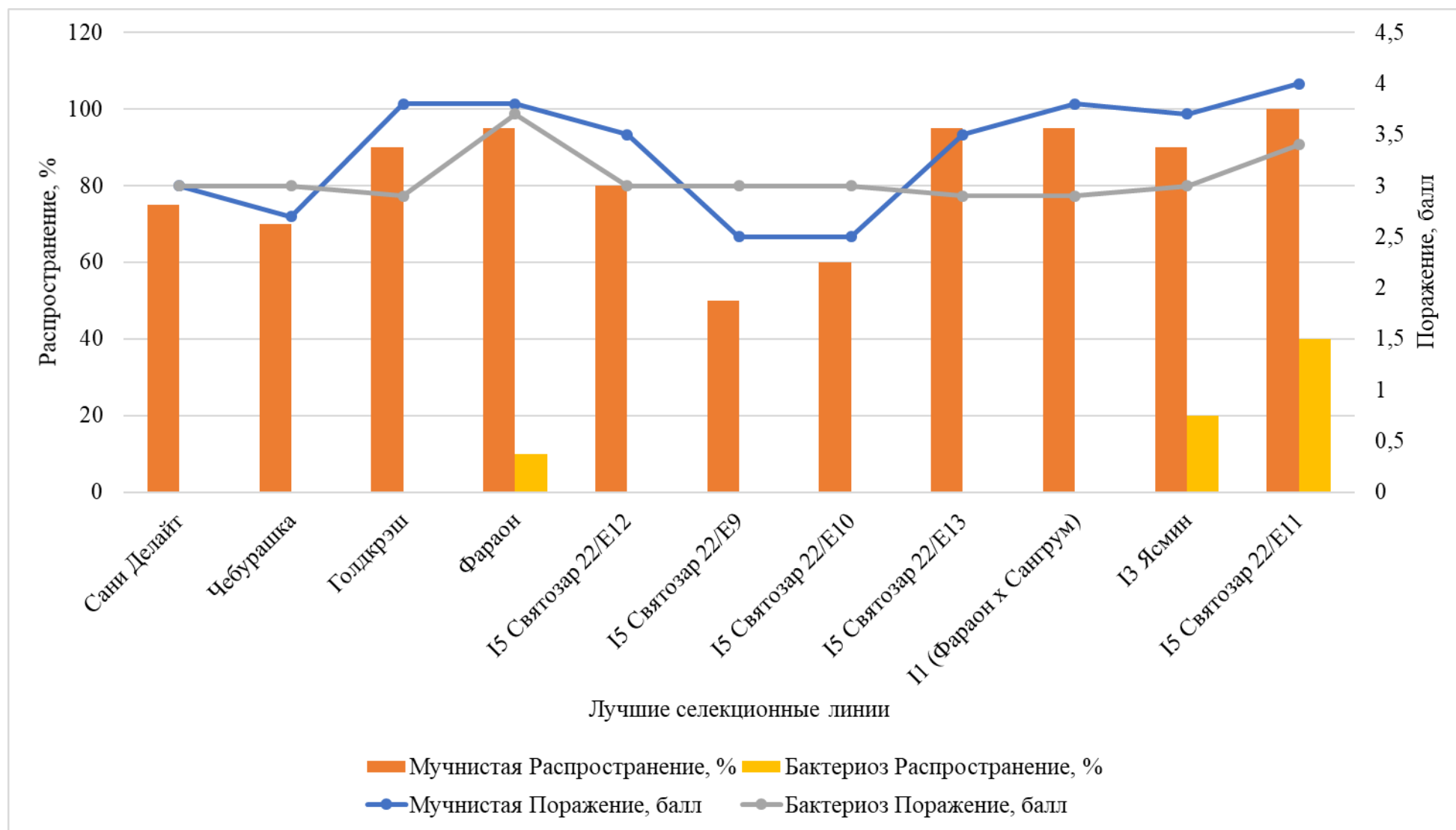


Рисунок 7 – Поражение патогенами мучнистой росы лучших линий, кабачка и патиссона, полученных методами классической селекции (Контрольный питомник и ПСИ, открытый грунт, 2022 г.)

Для кабачка в качестве ген источников скороспелости можно использовать: Фараон, F₁ Желтый Банан, Русские Спагетти, Уголек, Якорь и Ролик; по форме плода - Фараон, Желтоплодный, Золотинка и Голдкрэш; Русские Спагетти и Уголек, по толщине мякоти, Якорь и Ролик. Для патиссона в качестве ген источников скороспелости можно использовать: сорт Диск, Чебурашка и Сани Делайт. Весь материал подходит в качестве ген источников по форме плода и толщине мякоти. По окраске оранжевой окраске коры: Сани Делайт, Копейка, НЛО оранжевый, F₁ Солнечный Зайчик.

Были отобраны лучшие линейные формы кабачка и патиссона по большинству хозяйственно ценных признаков. С оранжевой окраской плодов, цилиндрической формой плода со сбегом к плодоножке, без ребер, толщине мякоти - I₄ Ясмин 21/194- 2,5-3 см. и I₄ Святозар 21/221 2,5 см. По срокам цветения женскими цветками особенно выделяется линия кабачка I₄ Святозар 21/221 цветение женскими цветками которого начиналось через 36 суток. Кроме того, линии кабачка I₅ Святозар 22/E9 и I₅ Святозар 22/E10 при проведении иммунологической оценки показали наибольшую толерантность к поражению патогенами мучнистой росы.

Кроме того, на поздних этапах работы, а именно – проведение скрещиваний, проведение сборов плодов в технической спелости и анализ урожайности, было принято участие в создании сорта желтоплодного кабачка, переданного на регистрацию в 2022 году.

3.2 Определение оптимальной стадии развития женского гаметофита для индукции гиногенеза

В п 3.1. коллекционные гибриды и сорта кабачка и патиссона, были оценены по комплексу хозяйственно ценных признаков. Так же, эти генотипы были введены в культуру *in vitro* для оценки на способность женского гаметофита переключаться на спорофитный путь развития и формировать гаплоидный каллус или эмбриоид. Правильная идентификация оптимальной стадии развития женского гаметофита для введения в культуру *in vitro* является одним из важнейших факторов, влияющих на индукцию

гиногенеза. Для кабачка и патиссона характерны женские цветки с ценокарпным гинецеем (паракарпный тип), состоящим обычно из трех плодолистиков, образующих нижнюю завязь, в которой семязпочки располагаются рядами. Зародышевый мешок моноспорический, трехмитозный, биполярный, образуется по Polygonium-типу. Мегаспорогенез или первые этапы мегагаметогенеза начинаются за 3-4 дня до распускания цветка. Зародышевый мешок полностью созревает и готов к оплодотворению через несколько часов после раскрытия цветка. В большинстве исследований показано, что оптимальной стадией для введения в культуру *in vitro* у видов семейства Cucurbitaceae является почти зрелый, либо полностью зрелый зародышевый мешок. Gémes Juhász et al. (2002), проводившие исследования по идентификации оптимальной стадии развития женского гаметофита для индукции гиногенеза огурца, считают, что оптимальным является время за 6 часов до распускания цветка [78]. Цитологические наблюдения показали, что в это время зародышевый мешок обычно восьмиядерный, хотя иногда встречаются и четырехядерные мешки. У кабачка цветки обычно распускаются до 10 часов дня и, следовательно, период за шесть часов до распускания цветка это очень раннее утро, поэтому необходимо определить возможно ли заранее срывать цветок или можно выделять семязпочки из завязей уже полностью распустившихся цветков. Удобно для описания фазы раскрытия цветка использовать такой показатель, как количество дней до распускания цветка. Селекционеры, работающие с кабачком и патиссоном, легко определяют фазу, ориентируясь на цвет околоцветника (рисунок 8).



Рисунок 8 – Внешний вид женских бутонов кабачка Голдкрэш и патиссона Сани Делайт: за двое суток до раскрытия бутона – FL-2 (А.), за 1 сутки до раскрытия бутона – FL-1 (В), в день раскрытия бутона FL (С), масштабная линейка 1 см

Проведенные нами на двух генотипах эксперименты с бутонами разной степени раскрытия цветка (2 суток (FL-2), 1 сутки до распускания (FL-1) и полностью раскрывшийся цветок (FL) показали, что оптимальным для кабачка будет предварительно заизолированный с вечера, сорванный утром раскрывшийся бутон. Для генотипа Голдкрэш и Камили F1 было получено 17,3% и 12,0% индуцированных семязпочек из бутонов в стадии FL. Впоследствии из этих индуцированных семязпочек развились эмбриониды. В четыре раза меньше эмбрионидов было получено из бутонов на стадии (FL-1) и полное отсутствие гиногенного развития наблюдалось при введении в культуру бутонов на стадии FL-2. Именно из бутонов на стадии FL, содержащих семязпочки с зрелым зародышевым мешком, были получены эмбриониды у 30 генотипов при выявлении их отзывчивости к гиногенезу (Таблица 5).

Таблица 5 – Влияние фазы развития цветка на индукцию гиногенного развития

Генотип (фактор А)	Стадия развития бутона (фактор В)	эмбрионов, шт /на чашку Петри	Индукцированных семяпочек, %	Двухфакторный дисперсионный анализ: факторы/доля влияния фактора, %
Голдкрэш	FL-2	0 ^c	0 ^c	фактор А ** /2.6 фактор В ***/81.3 фактор А × фактор В */2.6
	FL-1	1.1 ^b	4.4 ^b	
	FL	4.3 ^a	17.3 ^a	
Камили F1	FL-2	0 ^b	0 ^b	случайные факторы/ 13.5
	FL-1	0.67 ^b	2.68 ^b	
	FL	3.0 ^a	12.0 ^a	

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого опыта. Для каждого генотипа использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), а средние значения сравнивались с использованием критерия множественных диапазонов Дункана (MRT). Значения, отмеченные одинаковой буквой, не имели достоверных различий при $p \leq 0.05$.

* значимо на уровне 0.05, ** значимо на уровне 0.01, *** значимо на уровне 0.001.

Долю влияния факторов рассчитывали, как отношение SS каждого фактора к общей SS В одну чашку Петри диаметром 9,4 см высаживалось 25 семяпочек.

Полностью раскрывшийся цветок (FL), 1 сутки до распускания (FL-1), 2 суток (FL-2).

3.3 Стерилизация завязи методом обжигания

На первом этапе работы необходимо было добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. Ранее мы использовали режим ступенчатой поверхностной стерилизации с использованием 96% этанола и 50% водного раствора коммерческого препарата «Белизна» (содержит 5-15% гипохлорит натрия), который оказался одинаково эффективным для всех образцов культур семейства Cucurbitaceae, и в сочетании с добавлением в питательную среду ампициллина в концентрации 200 мг/л обеспечивал 100% выход неинфицированных жизнеспособных эксплантов. Использование данного режима стерилизации позволяло не только избавиться от контаминации, но и размягчить стенки завязи, обеспечивая более удобное извлечение семяпочек. К недостатку этого способа относится длительность этого этапа по времени и то, что поскольку выделение семяпочек из завязи кабачка занимает достаточно продолжительное время (25 семяпочек – 1 чашка Петри – 30 минут), очень часто заранее простерилизованные завязи (стерилизуют сразу несколько завязей, чтоб экономить время и реактивы) в течение рабочего дня

хранятся в ламинарном боксе и начинают темнеть, что в последствии может оказывать влияние на индукцию гиногенеза при закладке обширных опытов.

Нами был оптимизирован этап стерилизации завязей кабачка и предложен вариант краткосрочного обжигания после обработки 96% спиртом. Это позволило сократить временные затраты с 50 минут (при использовании ступенчатой стерилизации с использованием 5 % раствора гипохлорита натрия) до 1 минуты для получения эксплантов со 100 % отсутствием контаминации и без потери эмбрионного потенциала семяпочек (таблица 6).

Предложенный нами метод стерилизации позволяет значительно сократить временные затраты и вводить в стерильную культуру завязи непосредственно перед использованием, без длительного хранения в простерилизованном виде.

Таблица 6 – Влияние типа стерилизации на индукцию гиногенеза и контаминацию

Генотип (фактор А)	Тип стерилизации (фактор В)			
	ступенчатая стерилизация 5% раствором гипохлорита натрия		стерилизация краткосрочным обжиганием	
	индуцированных семяпочек, %	контаминированных чашек Петри, %	индуцированных семяпочек, %	контаминированных чашек петри, %
F ₁ Камили	9.3 ^a	0	8.5 ^a	0
с.о. 1	1.3 ^b	0	2.4 ^a	0
с.о. 51	18.5 ^a	0	17.8 ^a	0
Голдкрэш	15.2 ^a	0	17.3 ^a	0
Двухфакторный дисперсионный анализ: Фактор А ***, фактор В ^{NS} , фактор А × фактор В ^{NS}				

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), а средние значения сравнивались с использованием критерия множественных диапазонов Дункана (MRT). Значения, отмеченные одинаковой буквой, не имели достоверных различий при $p \leq 0.05$.

* значимо на уровне 0.05, ** значимо на уровне 0.01, *** значимо на уровне 0.001, NS = не значимо

В одну чашку Петри диаметром 9,4 см высаживалось 25 семяпочек; с.о. – селекционный образец.

Тип вводимого в культуру экспланта.

У видов семейства Cucurbitaceae в культуру *in vitro* можно вводить как фрагменты завязей (поперечные или продольные срезы), так и неопыленные семяпочки. Проведенные эксперименты по изучению этих двух вариантов введения в культуру, показали, в нашем случае, неэффективность использования фрагментов завязей для индукции гиногенного развития у кабачка. Большая часть семяпочек повреждалась при разрезании завязи на фрагменты, а разрастание соматических тканей завязи на питательной среде полностью ингибировало развитие семяпочек. Эмбриониды у всех генотипов были получены только при культивировании изолированных семяпочек (рисунок 9).

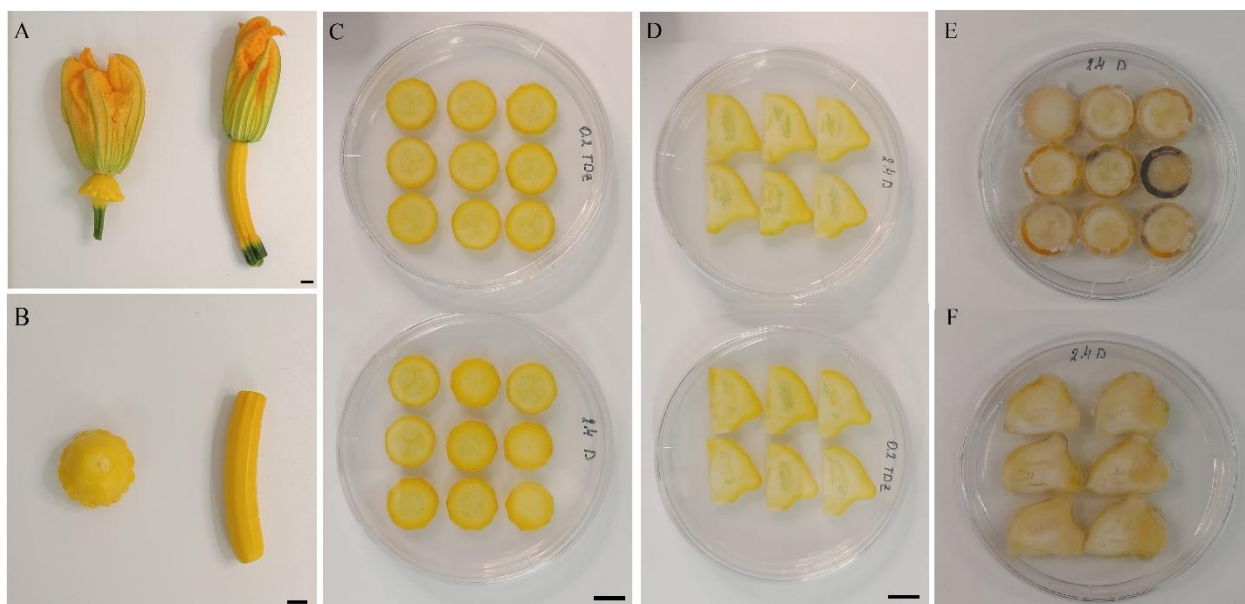


Рисунок 9 – Пример введения в культуру фрагментов завязей (поперечные срезы завязей) кабачка и патиссона: А – женский гаметофит кабачка и патиссона в фазе раскрыти цветка; В – очищенные от плодоножек и соцветий женские гаметофиты кабачка и патиссона; С – поперечные срезы кабачка на питательной среде, толщина среза 1 мм.; D – поперечные срезы патиссона на питательной среде, толщина среза 1 мм.; E, F – внешний вид срезов женского гаметофита кабачка и патиссона через 1 месяц после закладки опыта; длина масштабной линейки – 1 см.

3.4 Влияние холодной предобработки

Проведенные в 2020-2022 гг. эксперименты по изучению влияния холодной предобработки завязей кабачка в течение 1-2 суток при +4⁰С на

восьми генотипах показали, что обработка завязей холодом значительно снижала образование эмбриоидов и оказалась неэффективной. Только у одного из восьми изученных генотипов наблюдалось образование эмбриоидов после двух суток холодовой обработки, но и для этого генотипа отмечалось существенное снижение количества индуцированных семяпочек при использовании холодовой обработки (таблица 7).

Таблица 7 – Влияние холодовой предобработки завязей кабачка на индукцию гиногенеза

Генотип	Количество индуцированных семяпочек/чашку Петри		
	2 суток холода	1 сутки холода	Без холода
Голдкрэш	1.3 с	3.5 b	13.7 a
с.о. 228	0 b	1.0 b	13.3 a
Фараон	0 b	0.5 b	6.3 a
с.о 51	0 b	0.7 b	4.7 a
Камили F1	0 b	0 b	2.3 a
с.о. 278	0 b	0,7 b	6.8 a
с.о 125	0 b	0 b	2.0 a
с.о 1	0 b	0 b	1.3 a

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого опыта. Для каждого генотипа использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), а средние значения сравнивались с использованием критерия множественных диапазонов Duncan (DMRT). Значения, отмеченные одинаковой буквой, не имели достоверных различий при $p \leq 0.05$.

3.5 Оптимальный состав питательной среды для получения удвоенных гаплоидов в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*

Оптимальный состав питательной среды определяет успех технологии получения удвоенных гаплоидов. Обычно в технологии выделяют две питательные среды – индукционная питательная среда и регенерационная питательная среда. Иногда еще используется промежуточная среда – для созревания эмбриоидов. Наиболее часто варьирующими компонентами питательных сред являются: (1) источник органического азота, (2) углеводы и (3) регуляторы роста. Традиционно для индукции процесса гиногенеза при культивировании семяпочек *C. pepo* используют питательную среду MS, или индукционную питательную среду CBM (Cucumber Basal Medium), специально разработанную для огурца. В лаборатории репродуктивной

биотехнологии ФГБНУ ФНЦО для культур семейства Cucurbitaceae была разработана новая питательная среда ИМС (Induction Medium for Cucurbitaceae). Состав этой питательной среды значительно отличается от среды СВМ и MS. Эта среда содержит повышенное содержание KNO_3 (2496,3 мг/л), увеличенное содержание никотиновой кислоты (5 мг/л) и обогащенный аминокислотный состав. Минеральная основа (макросоли и микросоли) питательной среды ИМС аналогичен питательной среде MSm [126] с уменьшенным в два раза содержанием NH_4NO_3 , дополнен аминокислотами (100 мг/л пролина, 100 мг/л серина, 800 мг/л глутамина), витаминами из прописи среды NLN [123] и ампициллином 100 мг/л.

В предварительно проведенных нами экспериментах по тестированию наиболее часто используемых питательных сред (MS, СВМ, ИМС) для индукции гиногенеза в культуре неопыленных семяпочек для кабачка наилучшие результаты были получены на питательной среде ИМС, именно поэтому мы ее использовали в последующих экспериментах.

В качестве источника углеводов в питательные среды добавляют сахарозу. В культуральных средах сахароза обычно гидролизруется полностью или частично на составляющие моносахариды – глюкозу и фруктозу под действием инвертазы, расположенной в клеточных стенках растений, либо путем высвобождения внеклеточного фермента. Концентрация сахарозы играет важную роль в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* поскольку обеспечивает определенное осмотическое давление в питательной среде. Особенно сильно влияние сахарозы при использовании жидких питательных сред. Нами была заложена серия экспериментов с использованием различной концентрации сахарозы (20 г/л, 40 г/л, 60 г/л, 80 г/л) при использовании агаризованной (7 г/л агара) и жидкой питательной среды ИМС с 0.2 мг/л ТДЗ на двух генотипах Голдкрэш и с.о 228.

Впервые была показана возможность использования жидкой питательной среды для индукции гиногенеза в культуре неопыленных

семяпочек кабачка. Было отмечено образование эмбриоидов уже через 45 суток культивирования. При увеличении концентрации сахарозы в питательной среде наблюдалась разница в увеличении размеров культивируемых семяпочек уже после первой недели культивирования (семяпочки на питательной среде с сахарозой 20 г/л были в 1,4 раза меньше, чем на питательной среде с сахарозой 80 г/л) (рисунок 10, таблица 8).

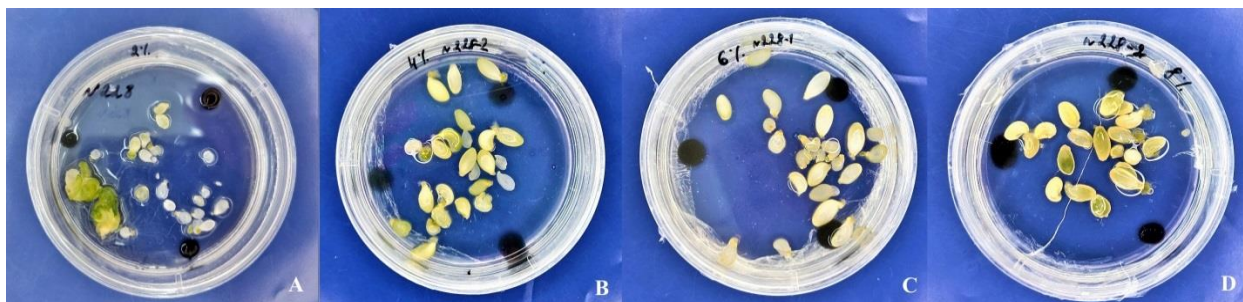


Рисунок 10 – Изучение влияния концентрации сахарозы в жидкой питательной среде ИМС с 0.2 мг/л ТДЗ на индукцию эмбриогенеза у с.о. 228 (45 суток культивирования). А. сахароза 20 г/л; В. сахароза 40 г/л; С. сахароза 60 г/л; D. сахароза 80 г/л.

Таблица 8 – Влияние концентрации сахарозы в жидкой питательной среде ИМС с 0.2 мг/л ТДЗ на изменение размеров культивируемых семяпочек

Содержание сахарозы	Размер семяпочки		Индекс формы
	Длина, μm	Ширина, μm	
2%	4430,19 $\pm$ 119,16	2714,35 $\pm$ 68,86	1,74 $\pm$ 0,10
4%	5974,71 $\pm$ 127,07	3457,34 $\pm$ 60,55	1,74 $\pm$ 0,03
6%	6214,68 $\pm$ 184,81	3481,17 $\pm$ 92,65	1,78 $\pm$ 0,03
8%	6383,08 $\pm$ 155,16	3938,56 $\pm$ 59,19	1,65 $\pm$ 0,03
НСр	1596,75	768,46	0,62

Вне зависимости от консистенции питательной среды эмбриоиды были получены только на питательных средах с концентрацией сахарозы 20 г/л и 40 г/л. Проведенные эксперименты подтвердили полученные ранее нами данные для агаризованных питательных сред, что для индукции эмбриогенеза в культуре неопыленных семяпочек в семействе Cucurbitaceae оптимально использовать питательные среды с концентрацией сахарозы около 30 г/л. Также было показано, что увеличение концентрации сахарозы

до 40 г/л не приводило к увеличению индукции у культивируемых семяпочек. При культивировании уже индуцированных семяпочек на среде с повышенной сахарозой (40 г/л) чаще наблюдалось образование аномальных эмбриоидов.

Для индукции эмбриогенеза в культуральные среды необходимо добавлять регуляторы роста. В эксперименте по изучению влияния наиболее часто используемых регуляторов роста (2 мг/л 2,4 Д; 0,2 мг/л ТДЗ; 0,8 мг/л 2,4 Д и 1,2 мг/л НУК) минерально-витаминный состав среды был выбран ИМС дополненный сахарозой 30 г/л и агаром 7 г/л. Исследование было проведено на 30 генотипах. Была отмечена различная генотипспецифическая реакция на использующиеся в питательной среде регуляторы роста. Несмотря на разный тип использующихся регуляторов роста (2,4Д и НУК относятся к ауксинам, а ТДЗ к цитокининам) и их различающуюся концентрацию, на всех трех вариантах были получены эмбриоиды.

Для девяти генотипов образование эмбриоидов происходило только на среде с добавлением 2 мг/л 2,4 Д; для восьми генотипов на среде с 0,2 мг/л TDZ; для четырех на среде с 0,8мг/л 2,4 Д и 1,2мг/л НУК; восемь генотипов отзывались как на питательной среде с 2 мг/л 2,4 Д, так и с 0,2 мг/л TDZ, а один генотип на среде с 0,2 мг/л TDZ и на среде с 0,8 мг/л 2,4 Д и 1,2 мг/л НУК (таблица 9).

Использование питательной среды с 2 мг/л 2,4 Д для большинства генотипов оказалось более эффективным и позволяло получить большее количество эмбриоидов, по сравнению с питательной средой содержащей 0,2 мг/л ТДЗ и со средой с 0,8 мг/л 2,4 Д и 1,2 мг/л НУК.

Таблица 9 – Образование эмбриоидов на индукционных питательных средах с различными регуляторами роста

Генотип	Эмбриоидов/на чашку Петри, шт		
	Среда ИМС 2 мг/л 2,4 D	Среда ИМС 0.2 мг/л TDZ	Среда ИМС 0,8мг/л 2,4 D и 1,2 мг/л НУК
Голдкрэш	13.7 ^a	4.7 ^b	0 ^c
с.о 228	13.3 ^a	2.0 ^b	0 ^c
Фараон	6.3 ^a	0.7 ^b	0 ^c
F ₁ Камили	2.3 ^a	0.3 ^b	0 ^c
с.о 125	2.0 ^a	0.3 ^b	0 ^c
с.о 1	0.7 ^a	1.3 ^a	0 ^c
с.о 92	0.3 ^a	1.0 ^a	0 ^b
с.о 278	0.3 ^b	3.7 ^a	0 ^b
с.о 35	0 ^b	0.7 ^b	1.0 ^a
с.о 51	4.7 ^a	0 ^b	0 ^b
Ролик	1.7 ^a	0 ^b	0 ^b
с.о 38	0.7 ^a	0 ^a	0 ^a
Грибовский 37	1.3 ^a	0 ^b	0 ^b
Якорь	0.3 ^a	0 ^a	0 ^a
с.о 263	0.3 ^a	0 ^a	0 ^a
с.о 549	0.7 ^a	0 ^a	0 ^a
с.о 564	0.7 ^a	0 ^a	0 ^a
с.о 556	0.7 ^a	0 ^a	0 ^a
Уголек	0 ^a	0.7 ^a	0 ^a
с.о 566	0 ^a	0.7 ^a	0 ^a
с.о 62	0 ^a	0.3 ^a	0 ^a
с.о 283	0 ^a	0.3 ^a	0 ^a
с.о 285	0 ^a	0.7 ^a	0 ^a
Цукеша	0 ^b	1.0 ^a	0 ^a
с.о 279	0 ^a	0.3 ^a	0 ^a
Погребок	0 ^b	4.0 ^a	0 ^b
с.о 50	0 ^a	0 ^a	0.7 ^a
Ясмин	0 ^b	0 ^b	9.0 ^a
с.о 550	0 ^b	0 ^b	2.3 ^a
с.о 541	0 ^a	0 ^a	0.7 ^a

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), а средние значения сравнивались с использованием

критерия множественных диапазонов Дункана (MRT). Значения, отмеченные одинаковой буквой, не имели достоверных различий при $p \leq 0.05$. В одну чашку Петри диаметром 9,4 см высаживалось 25 семязпочек. с.о. – селекционный образец

Проведенный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что и фактор генотипа, и фактор использующихся регуляторов роста, а также взаимодействие этих факторов оказывают существенное влияние на выход эмбрионов. При этом доля влияния фактора генотипа на количество образовавшихся эмбрионов оказалась – 31 %, фактора применяемых регуляторов роста – 5 %, а их взаимодействие – 57 %. При этом доля неучтенных факторов, влияющих на количество эмбрионов, составила – 7 %. Большая доля влияния взаимодействия фактора генотипа и фактора использующихся регуляторов роста свидетельствует о том, что для каждого генотипа необходимо тестировать несколько вариантов питательных сред (рисунок 11).

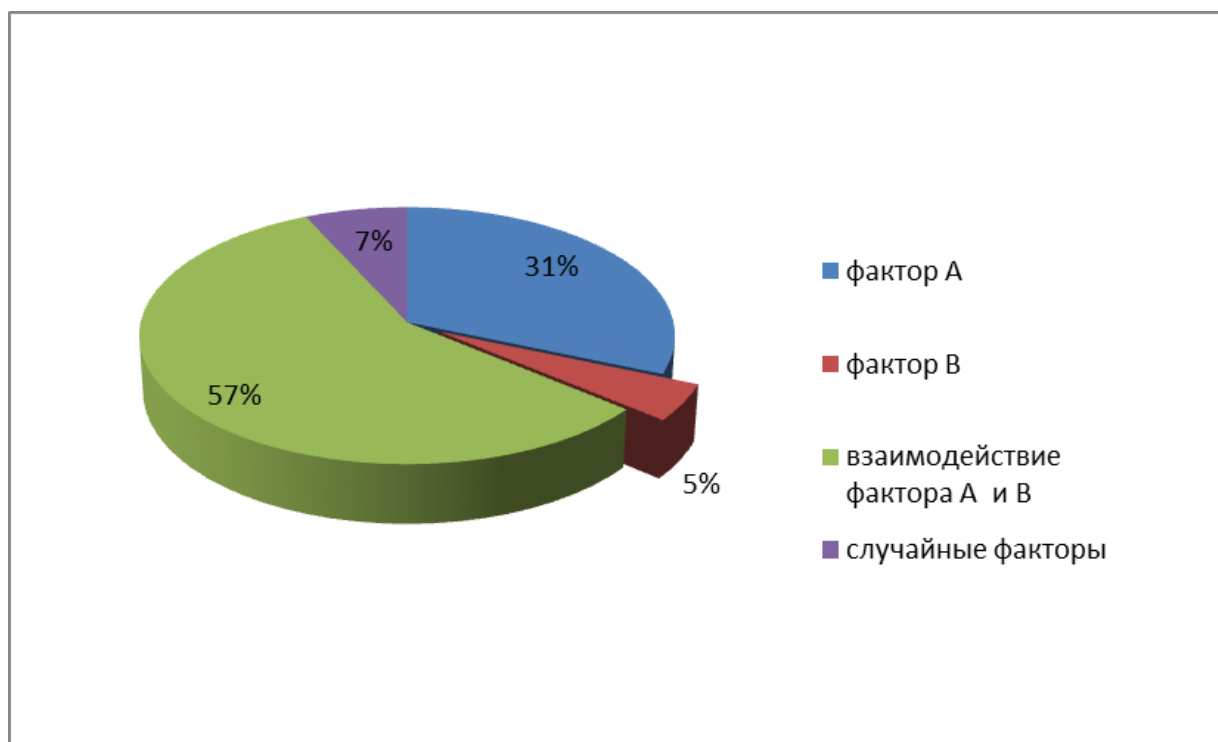


Рисунок 11 – Доля влияния генотипа (фактора А) и различных регуляторов роста в составе питательной среды (фактор В) и их взаимодействия на выход эмбрионов в культуре неопыленных семязпочек *in vitro*

Был оптимизирован этап регенерации и укоренения побегов. Нормально развитые образовавшиеся эмбриониды переносили на безгормональную среду MS с 2% сахарозой и 3 г/л фитогеля. Для плохо развивающихся эмбрионидов необходимо было добавление в питательную среду ампициллина (100 мг/л) и регуляторов роста (НУК 0.2 мг/л, ГК 0,1 мг/л, БАП 0,8 мг/л) для индуцирования дополнительных точек роста. Поскольку у *C. pepo* цветки раздельнополые, сохраняющие возможность к опылению только 5 часов, и достаточно тяжело подобрать мужские и женские цветки одного возраста для самоопыления, в связи с этим можно рекомендовать на этапе регенерации проводить клональное микроразмножение, чтобы получить как можно больше растений одного генотипа для проведения последующих скрещиваний.

После оптимизации отдельных этапов технологии удалось достичь максимального выхода эмбрионидов у отдельных генотипов кабачка – 13,7 эмбрионидов на чашку Петри, содержащую 25 семян, что в пересчете на 100 культивируемых семян составит до 55 штук (рисунок 12). У образцов патиссона этот показатель оказался ниже и составил максимально до 4 эмбрионидов на чашку Петри, что в пересчете на 100 культивируемых семян составит 16 штук.



Рисунок 12 – Этапы технологии получения ДН-растений *Cucurbita pepo* L. в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*. А – внешний вид женского цветка кабачка за 1 сутки до распускания; В – изоляция женского цветка колпачком из пергаментной бумаги; С – стерилизация завязи методом краткосрочного обжигания; D – выделение неопыленных семяпочек на индукционную питательную среду IMC; E – образование эмбриоидов на 35-60 сутки культивирования; F – эмбриоид, готовый к пересадке на регенерационную питательную среду MS; G – регенерация проростка из эмбриоида (на этой стадии возможно микроклональное размножение); H, I – адаптация растений-регенерантов к условиям *ex vitro*; J – высадка растений-регенерантов R0 в пленочную теплицу; K – самоопыление растений-регенерантов R0; L – развитие плода до фазы биологической спелости; M – Плод с семенами от самоопыления, оценка внутреннего строения плода; N – ДН-линия на следующий следующий вегетационный год

3.6 Изучение эмбриогенеза в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*

Были изучены и описаны основные этапы образования и развития эмбриоидов из семяпочек изолированных неопыленных завязей *Cucurbita*

реро L. После помещения на питательную среду семяпочки, находящиеся на оптимальной стадии развития начинали достаточно быстро увеличиваться в размере изменять свой цвет с молочного на зеленоватый.

Было отмечено, что первые эмбриониды на среде с 2 мг/л 2,4Д появлялись через 5 недель культивирования, а на среде с 0,2 мг/л ТДЗ и на среде с 0,8 мг/л 2,4 Д и 1,2 мг/л НУК появляются через 6-7 недель.

Чаще всего образование эмбриогенного каллуса или эмбрионидов наблюдалось при разрыве семяпочки, как правило, в районе микопиллярного конца.

У генотипа с.о 228 было отмечено образование сразу нескольких эмбрионидов (до 5 шт) внутри одной индуцированной семяпочки на среде с 2,4 Д, что не встречалось ранее и представляет интерес для дальнейшего изучения обнаруженного у кабачка явления нуцеллярной полиэмбрионии (рисунок 13).

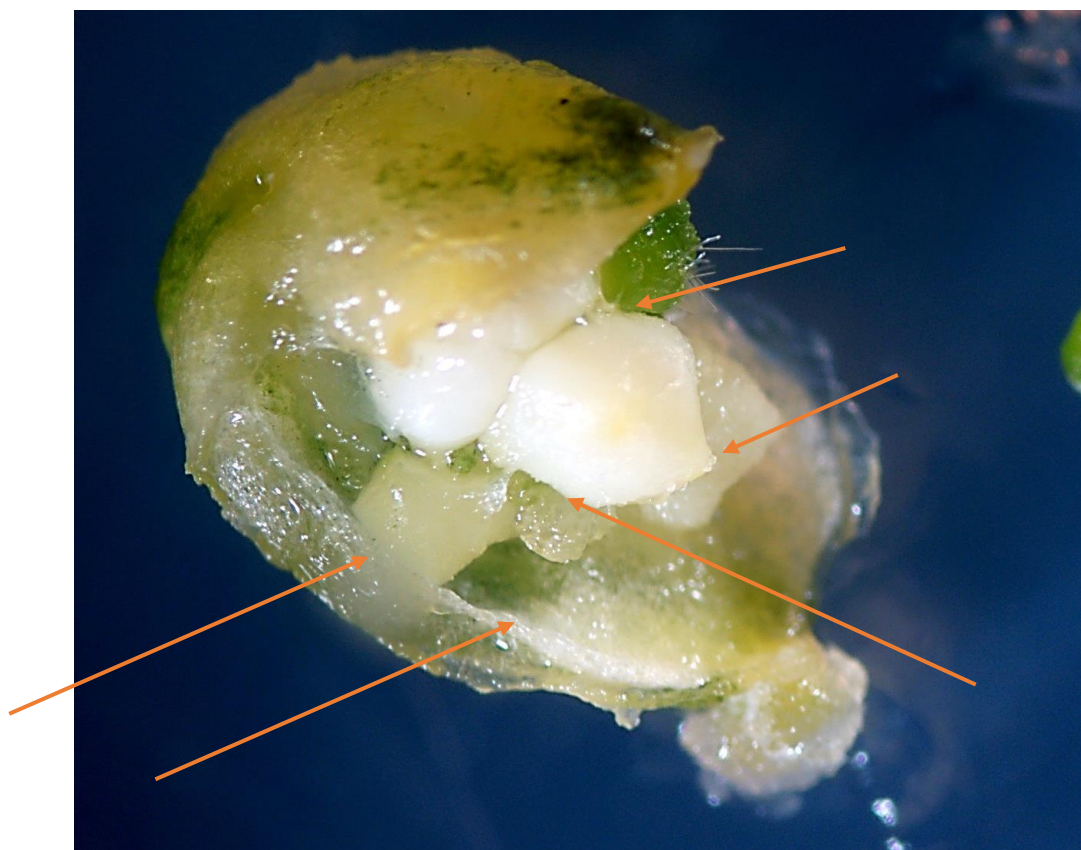


Рисунок 13 – Образование пяти эмбрионидов внутри одной семяпочки после шести недель культивирования на индукционной питательной среде ИМС с 2 мг/л 2,4 Д

Известно, что генотип является одним из важнейших факторов, определяющих образование удвоенных гаплоидов. В наше исследование в 2020-2022 гг. было включено 42 селекционных образца из коллекции лаборатории селекции тыквенных культур ФГБНУ ФНЦО, имеющих различное происхождение. Для оценки отзывчивости индивидуального генотипа из каждого образца выделялось не менее 100 семян, которые высаживались на отобранные варианты питательных сред (на каждый вариант питательной среды высаживалось не менее 25 семян). Индуцировать образование ДН-растений удалось только у 30 образцов, отличающихся в том числе и по окраске плода.

Всего для 30 отозвавшихся образцов было введено в культуру *in vitro* 6 820 семян, из которых 338 дали начало новым генотипам, при последующей регенерации которых было получено 202 растений-регенеранта и только у 98 удалось получить семенное потомство.

3.7 Оценка полученного материала на уровень ploидности

Одной из особенностей технологии получения линейного материала методом неопыленных семян является важность определения уровня ploидности проросших из эмбрионидов растений-регенерантов. Для этого было проведено изучение полученного потомства R_0 (полученные гомозиготные линии) по уровню ploидности с использованием проточной цитометрии, прямого подсчета хромосом и по количеству хлоропластов в замыкающих клетках устьиц.

3.7.1 Анализ растений-регенерантов с использованием проточной цитометрии клеточных ядер

В литературе имеется очень ограниченное количество публикаций, где проводится оценка уровня ploидности кабачка с использованием проточной цитометрии. Нами был оптимизирован протокол для анализа растений *C.*

перо с использованием модифицированного Tris-MgCl₂ буфера для экстракции ядер и пропидия иодида.

По литературным данным для вида *C. perо var. перо* известно число хромосом равное $2n = 2x = 40$. Исходя из литературных данных, содержание ДНК для различных сортов кабачка варьирует от 1,06 до 1,10 пг.

В результате исследований методами проточной цитометрии выявлено четыре варианта ploидности для растений, полученных в культуре неопыленных семян *in vitro*: диплоиды с $2n = 2x = 40$, тетраплоиды $2n = 4x = 80$, триплоиды $2n = 3x = 60$ и октаплоиды с $2n = 8x = 160$.

Для диплоидных образцов было выявлено два цитотипа с содержанием ДНК $2C = 1,07 \pm 0,03$ пг, соответствующий литературным данным и второй цитотип $2C = 0,95 \pm 0,03$ пг (рисунок 14 b, i).

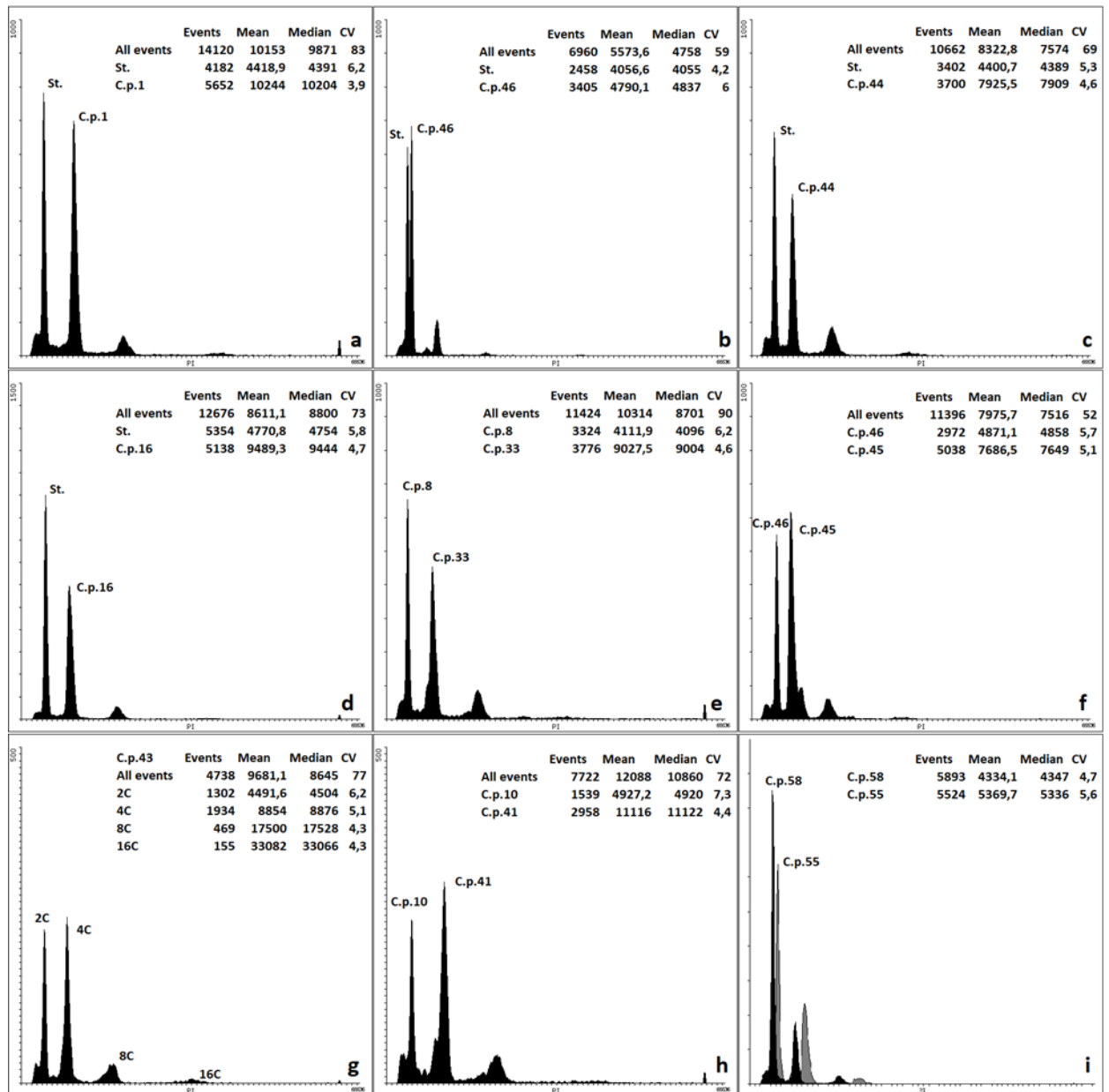


Рисунок 14 – Примеры гистограмм при цитофлуориметрическом исследовании кабачка (внутренняя стандартизация). а – Стандарт (*Ficus benjamina* 2C = 0,90 пг) и тетраплоидный образец с цитотипом 2C = 2,08 пг; б – Стандарт и диплоидный образец с цитотипом 2C = 1,07 пг; в – Стандарт и триплоидный образец с цитотипом 2C = 1,62 пг; г – Стандарт и тетраплоидный образец с цитотипом 2C = 1,84 пг; д – совместное исследование диплоида и тетраплоида; е – совместное исследование диплоида и триплоида; ж – пример эндополиплоидии; з – совместное исследование диплоида и тетраплоида; и – объединенная гистограмма исследования диплоидов с цитотипами 2C = 1,07 пг и 2C = 0,95 пг (внешняя стандартизация, образцы исследуются без изменения настроек прибора)

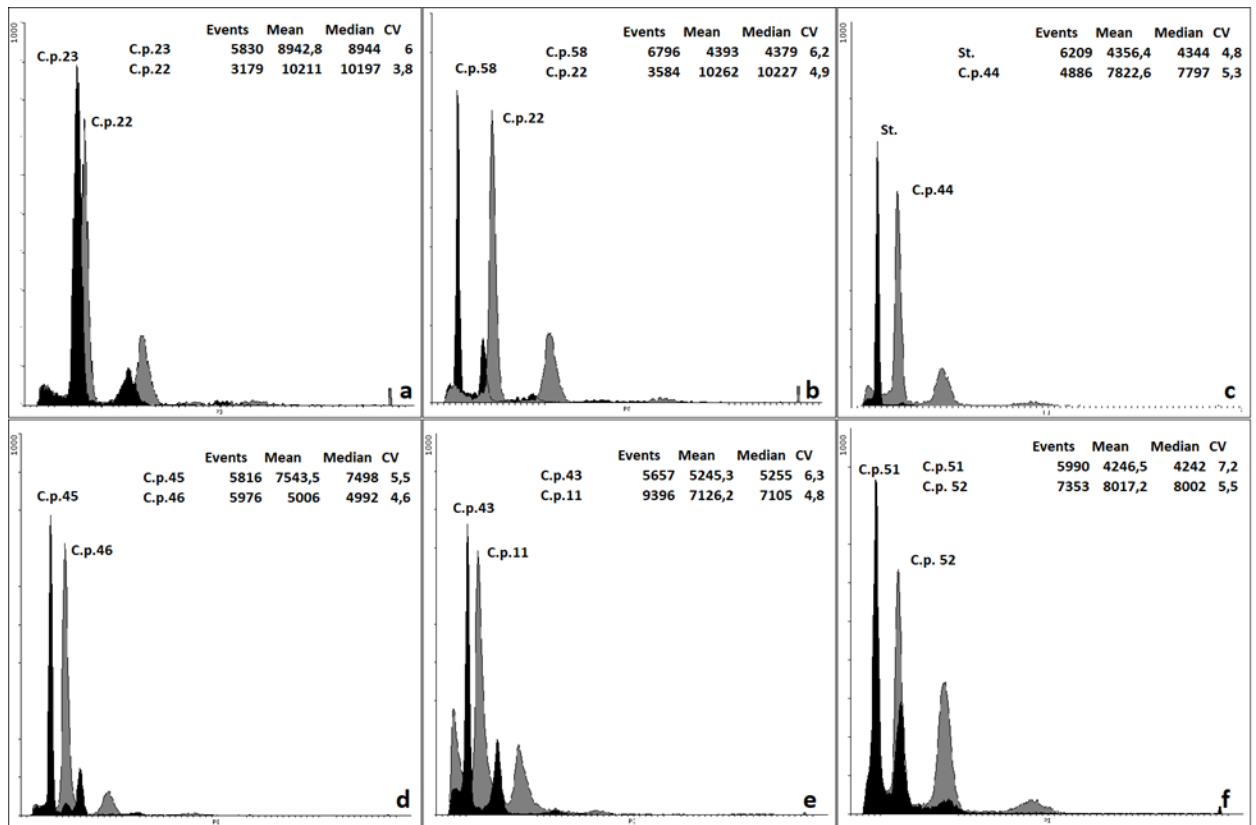


Рисунок 15 – Примеры гистограмм при цитофлуориметрическом исследовании кабачка (объединенные гистограммы, внешняя стандартизация, образцы исследуются без изменения настроек прибора). а – объединенная гистограмма исследования тетраплоидов с цитотипами $2C = 1,84$ пг и $2C = 2,08$ пг; б – объединенная гистограмма исследования диплоида и тетраплоида с цитотипами $2C = 0,95$ пг и $2C = 2,08$ пг; в – объединенная гистограмма исследования стандарта и триплоида с цитотипом $2C = 1,62$ пг; д – объединенная гистограмма исследования диплоида и триплоида с цитотипами $2C = 1,08$ пг и $2C = 1,62$ пг; е – объединенная гистограмма исследования диплоида и триплоида с цитотипами $2C = 1,08$ пг и $2C = 1,50$ пг; ф – объединенная гистограмма исследования тетраплоида и октаплоида с цитотипами $2C = 2,08$ пг и $2C = 3,61$ пг

Также по два цитотипа выявлено для триплоидов и тетраплоидов, пропорционально диплоидным цитотипам.

Так у тетраплоидов распространены цитотипы с содержанием ДНК $2C = 2,08 \pm 0,05$ пг и $2C = 1,84 \pm 0,04$ пг (рисунок 14 а, д).

У триплоидов основной цитотип с содержанием ДНК $2C = 1,62 \pm 0,02$ пг, в редких случаях $2C = 1,50 \pm 0,02$ пг (рисунок 14 с; рисунок 15 д, е).

Для трех образцов выявлен октаплоидный цитотип $2C = 3,61 \pm 0,04$ пг (рисунок 15 ф).

Сниженное содержание ДНК возможно связано с хромосомными мутациями и потерей ДНК при размножении и морфогенезе в культуре *in vitro*.

Также отмечены образцы со сложно диагностируемой плоидностью, отличающиеся двумя пиками, где второй пик содержит большее количество ядер. В данном случае, как показывает практика при последующей акклиматизации в тепличных условиях первый пик «пропадает», что косвенно говорит о наличии клеток с двумя плоидностями, один из данных типов клеток, по-видимому, в последующем редуцируется (рисунок 14 г).

Для всех исследованных образцов присуща эндополиплоидия с присутствием на гистограммах трех и более пиков (рисунок 14 и 15).

Известно, что вид *C. pepo* характеризуется как один из самых полиморфных, генотипы очень сильно различаются как по окраске, размеру так и форме плода. Взятые в качестве контрольных образцов для анализа по проточной цитометрии генотипы исходных донорных растений Фараон, Якорь, Голдкрэш по форме плода можно отнести к *subsp. pepo*, а Диск, Сани Делайт к *subsp. ovifera*. Поскольку у контрольных образцов было определено содержание ДНК Фараон (Zucchini) - 1.03 пг, Якорь (Vegetable Marrow) - 1.05 пг, Голдкрэш (yellow Zucchini) - 1.08 пг, в то время как у Диск (Scallop) – 0.92 пг, Чебурашка (Scallop) – 0.93 пг, Сани Делайт (yellow Scallop) – 0.95 пг, то можно заключить, что выявленные цитотипы характеризуют принадлежность к определенной разновидности. В наших исследованиях у образцов относящихся к *subsp. pepo* было определено и большее содержание ДНК. Эти результаты также согласуются с данными [95], которые обнаружили, что образцы *C. pepo subsp. texana (ovifera)* имеют меньшее количество ДНК, чем *C. pepo subsp. pepo*.

В нашем исследовании растения-регенеранты, полученные в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*, распределились в соответствии с цитотипом донорного растения, из которого они были получены, пропорционально уровню плоидности. Метод проточной цитометрии позволил достаточно

точно и быстро идентифицировать плоидность у полученных при использовании ДН технологий растений-регенерантов *C. pepo*.

3.7.2 Кариологический анализ растений-регенерантов кабачка, полученных в культуре неопыленных семян *in vitro*

Микроскопический подсчет хромосом в апикальных меристемах является эталоном и остается единственным однозначным инструментом для определения хромосомного набора растения. В связи с этим, именно этот анализ мы использовали в качестве подтверждающего после определения плоидности с использованием проточной цитометрии клеточных ядер. *C. pepo* оказался трудным в цитологическом плане объектом ввиду большого количества хромосом, мелкого их размера, малой частоты митозов и небольшого числа метафаз с хорошим разбросом хромосом. В нашем исследовании у кабачка и патиссона наиболее удобным эксплантом для приготовления давленных препаратов оказались пазушные почки/верхушечные меристемы либо очень молодые листочки. Именно с них удавалось получить препараты с максимальным количеством делящихся клеток, в то время как из молодых корешков такие препараты получались гораздо хуже. При этом молодые апексы побегов можно было отщипывать пинцетом в стерильных условиях даже у образцов, находящихся в культуре *in vitro*. Однако хотелось бы отметить, что гаплоидные образцы в нашем исследовании чаще всего были очень мелкими/хилыми и достаточно часто после того, как часть апикальных меристем бралась для хромосомного анализа, они погибали. Препараты клеток, содержащих гаплоидный набор хромосом получить было тяжелее всего. Частота митозов у гаплоидных растений была крайне низкой.

При подборе оптимальной методики для цитологического анализа мы руководствовались удобством и быстротой ее проведения. Модернизированная нами методика окрашивания хромосом в меристемных клетках с использованием пропион-лакмоида, была успешно применена при

цитологическом анализе растений-регенерантов кабачка и патиссона, полученных в культуре неопыленных семян. К несомненному удобству этой методики можно отнести отсутствие необходимости использования флуоресцентного микроскопа, легкодоступность и небольшое количество недорогих реактивов, отсутствие отдельного этапа фиксации (при данном методе она происходит одновременно с окраской и занимает не более 24 ч.), после чего можно проводить этап мацерации в 40 %-ной пропионовой кислоте и готовить давленный препарат. Просматривать препараты *C. pero* можно под обычным световым микроскопом при использовании объектива 100× с масляной иммерсией.

Нам удалось получить микрофотографии хромосом кабачка и патиссона разного уровня плоидности, которые будут представлять интерес для других исследователей, работающих с данной культурой и до настоящего исследования еще не встречались в опубликованной литературе. На рисунке 16 представлены клетки *C. pero* содержащие 20 хромосом, 40 хромосом, 60 и 80 хромосом, соответствующие уровням плоидности гаплоидному (n), диплоидному ($2n$), триплоидному ($3n$) и тетраплоидному ($4n$), соответственно. Плоидность всех этих растений полностью совпала с уровнем плоидности, определенным с использованием метода проточной цитометрии. Получить качественные препараты от подтвержденных на основе метода проточной цитометрии октаплоидных растений ($8n$) нам не удалось, эти растения достаточно плохо развивались и вскоре погибли (рисунок 16).

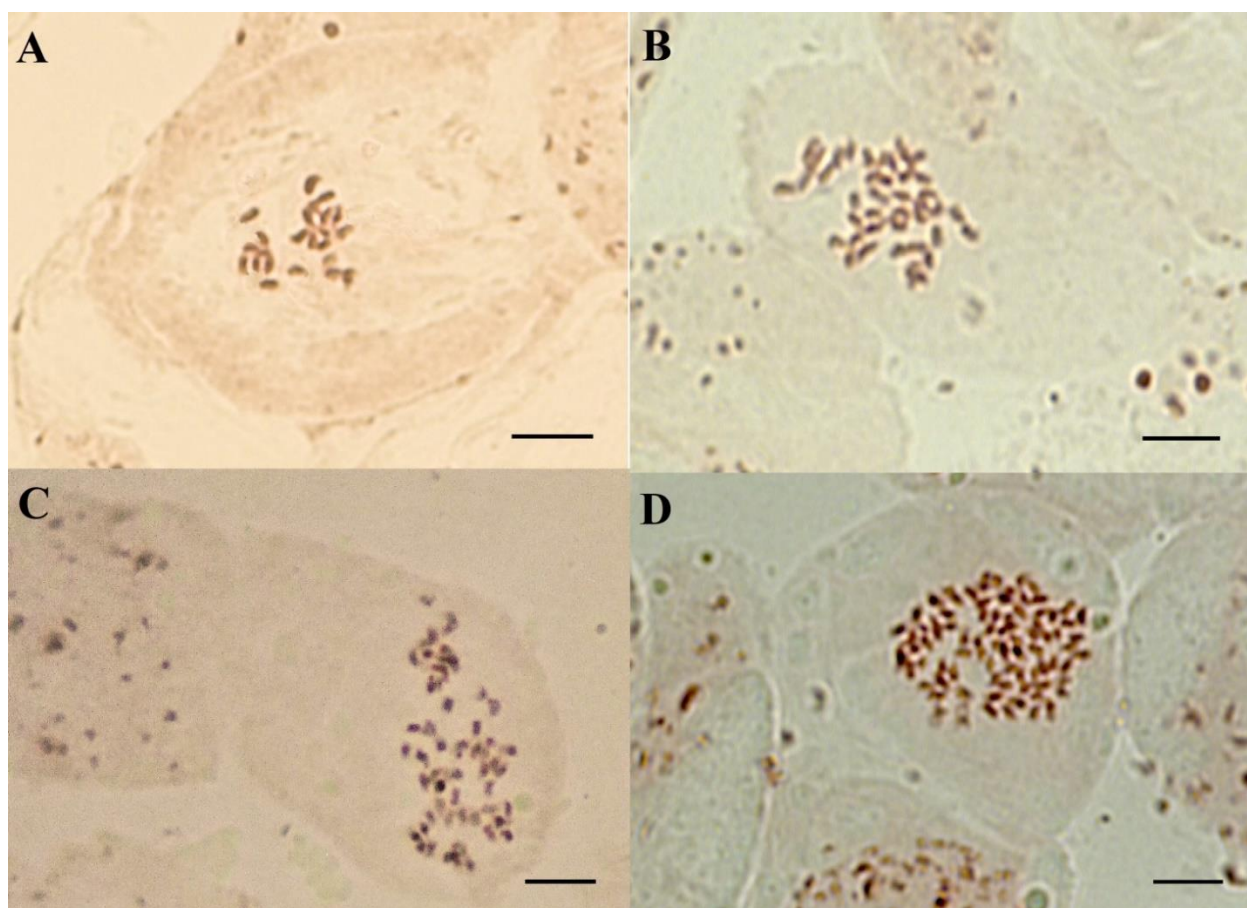


Рисунок 16 – Метафазы в меристемах растений-регенерантов кабачка разного уровня плоидности. А, В – гаплоид ($2n=x=20$); С, D - диплоид ($2n=2x=40$); Е, F – триплоид ($2n = 3x=60$); G, H – тетраплоид ($2n=4x= 80$). Масштабная линейка = 10 μm

Среди проанализированных образцов на препаратах, обычно сделанных из растений, находящихся еще в культуре *in vitro* можно было обнаружить миксоплоидию, когда в одном препарате могли встретиться клетки разного уровня плоидности в различном соотношении (n и $2n$; $2n$ и $3n$; $3n$ и $4n$). Также в выборке растений были обнаружены и анеуплоидные образцы, чаще всего у этих растений наблюдались проблемы с образованием генеративных органов, а на анализе по проточной цитометрии можно было отметить несколько сниженное содержание ДНК (рисунок 17).

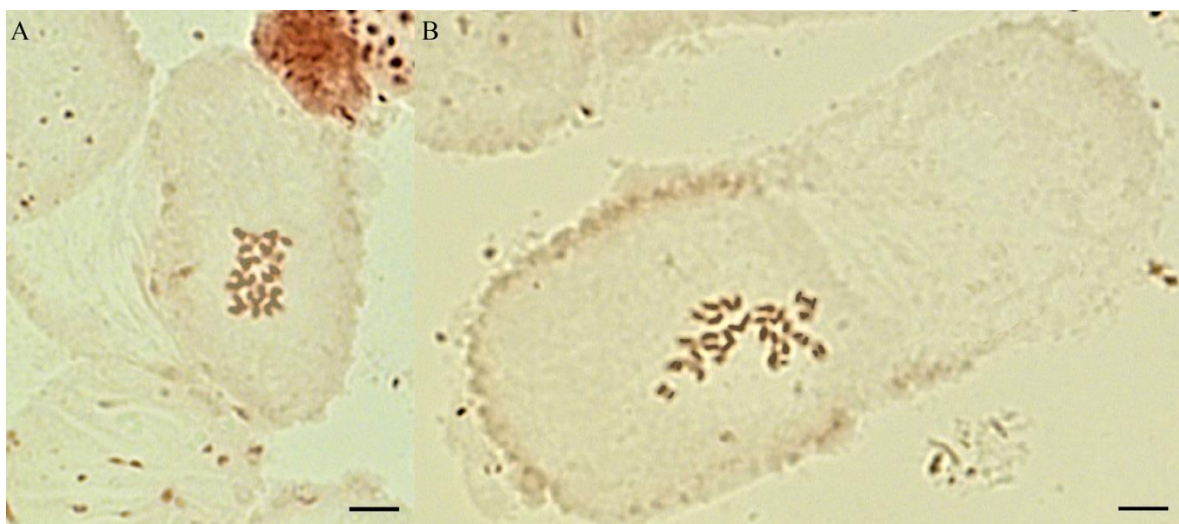


Рисунок 17 – Метафазы в меристемах анеуплоидных растений – регенерантов кабачка. А. – анеуплоид с 36 хромосомами; В. – анеуплоид с 38 хромосомами.

Масштабная линейка = 10 μ m



Рисунок 18 – Аномальные мужские цветки *C. pepo* (венчик удален).
Масштабная линейка = 1 см



Рисунок 19 – Аномальные женские и гинандроморфные цветки *C. pepo* (венчик удален). А – аномальный женский цветок кабачка; В, С, D – гинандроморфные цветки. Масштабная линейка = 1 см

Из литературы известно, что регенеранты некоторых видов имеют тенденцию либо представлять негомогенный уровень ploидности, либо быть химерами, когда их гаплоидная природа сомнительна, и после спонтанного или индуцированного удвоения хромосом они могут оказаться субфертильными или даже стерильными, что сводит на нет все усилия, предпринятые для их получения. В тоже время, длительное воздействие условий культуры *in vitro*, в частности, регуляторов роста растений, может способствовать более чем одному раунду удвоения хромосом в клетках, и появлению полиплоидных организмов.

Несмотря на достаточно мелкие размеры (около 2 мкм), при использовании пропион-лакмоидного способа окраски, хромосомы достаточно четко видны и отличаются от опубликованных другими авторами клеток, где за хромосомы принимаются темно окрашенные точки. Такие точки достаточно часто и в большом количестве встречающиеся в окрашенных меристемных клетках кабачка и как можно видеть не связаны с уровнем ploидности, их количество совершенно разное даже в близлежащих клетках одного препарата. В литературе по оценке растений-регенерантов, полученных с использованием ДН технологий в роде *Cucurbita* чаще всего

использовали подсчет хромосом в кончике корня с использованием окраски по Фельгену, либо при окрашивании 1-2% раствором ацетокармина. При этом в обязательном порядке исследуемый материал необходимо было предварительно обрабатывать в течение 2-3 часов 0,05% водным раствором колхицина или α -mono bromo naphthalene с последующей фиксацией в фиксаторе карнуа в течении 48 ч. После всех этих этапов материал должен был быть промыт в 70% этаноле и лишь затем (после мацерации в 1 N HCl) можно было готовить давленный препарат и окрашивать. Такая длительная и многоступенчатая процедура приготовления препарата с большим количеством необходимых реактивов при этом не обеспечивала получения качественных препаратов, на которых можно было легко подсчитать хромосомы. По нашему предположению, именно сложность получения качественного цитологического препарата у видов рода *Cucurbita* повлияла на то, что в большинстве исследований, проведенных с использованием ДН технологий, среди растений-регенерантов не были диагностированы триплоиды и тетраплоиды, в то время как в наших исследованиях они образовывались в достаточно больших количествах. Таким образом пропион-лакмоидный метод окраски хромосом имеет явные преимущества перед другими методами кариологического анализа и может быть использован для рутинного анализа на уровень пloidности у образцов *C. pero* и рекомендован к включению в протоколы по получению ДН растений.

3.7.3 Показатели абаксимального эпидермиса у растений - регенерантов *C. pero*

Растения-регенеранты кабачка и патиссона, полученные в культуре неопыленных семян *in vitro*, были оценены по основным показателям абаксимального эпидермиса: размер замыкающих клеток устьиц (длина и ширина), плотность устьиц (количество устьиц на mm^2) и количество хлоропластов в обеих половинках замыкающих клеток устьиц. Для анализа брали 5-6 лист от кончика побега, поскольку из литературных данных

известно, что листья разного возраста могут различаться по исследуемым показателям. Листья *C. pepo* крупные и эпидермис с нижней стороны листа достаточно хорошо отделяется при использовании пинцета. Препараты были проанализированы нами без использования дополнительного окрашивания (10% раствор люголя или 1% AgNO_3), которое предлагается в опубликованных протоколах. Для подсчета количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц использовали флуоресцентный микроскоп с набором фильтров, позволяющих детектировать естественную автофлуоресценцию хлоропластов (рисунок 20, 21).

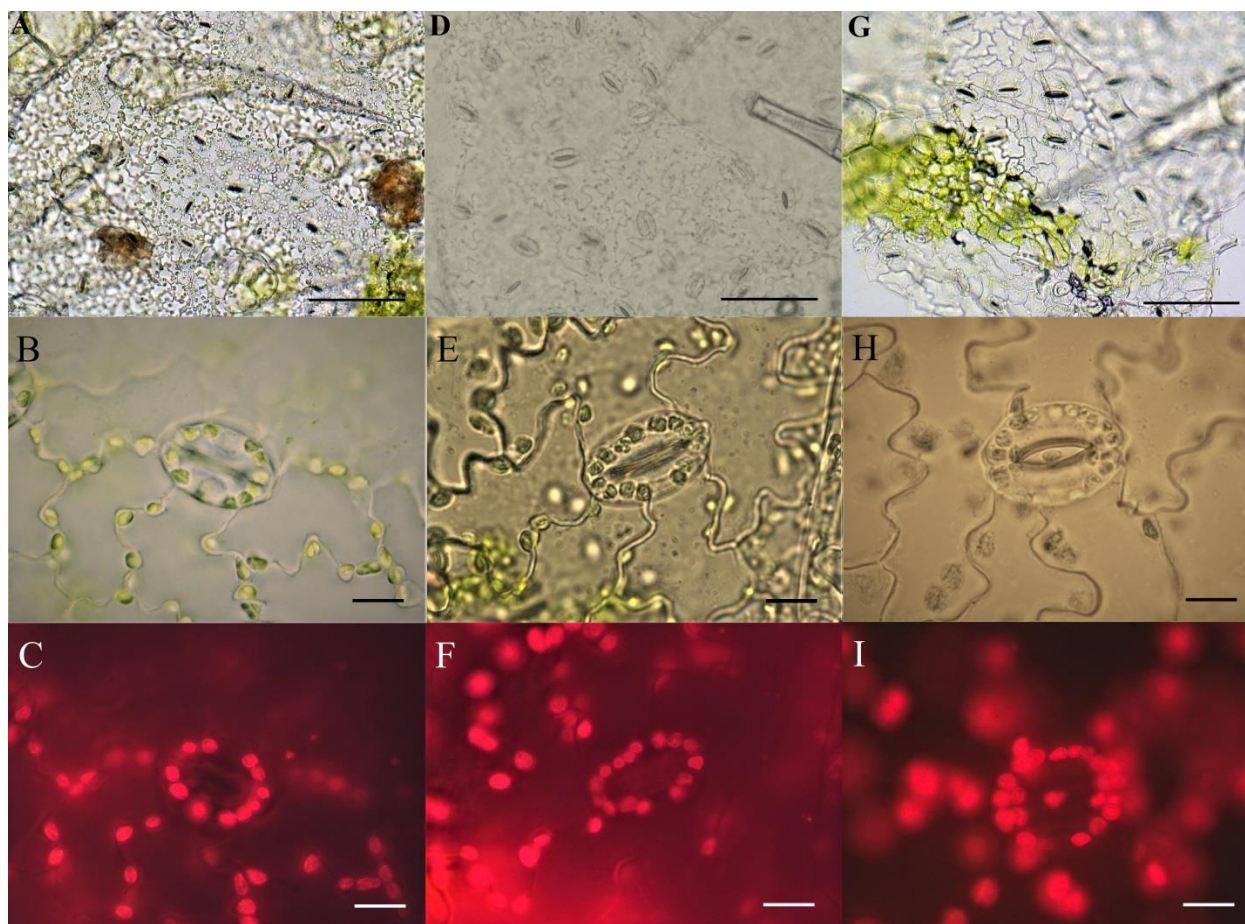


Рисунок 20 – Эпидермис абаксиальной поверхности листьев растений-регенерантов кабачка разной пloidности полученных в культуре неопыленных семязпочек *in vitro*. А, В, С – Растение с диплоидным набором хромосом ($2n=2x=40$); D, E, F – растение с триплоидным набором хромосом ($2n=3x=60$); G, H, I – растение с тетраплоидным набором хромосом ($2n=4x=80$); А, D, G – устьичные клетки у растений-регенерантов разного уровня пloidности при использовании объектива 20 $\times$; В, Е, Н – устьичные клетки

растений-регенерантов разного уровня ploидности при использовании объектива 100×; С, F, I – автофлуоресценция хлоропластов при использовании набора флуоресцентных фильтров при использовании объектива 100×

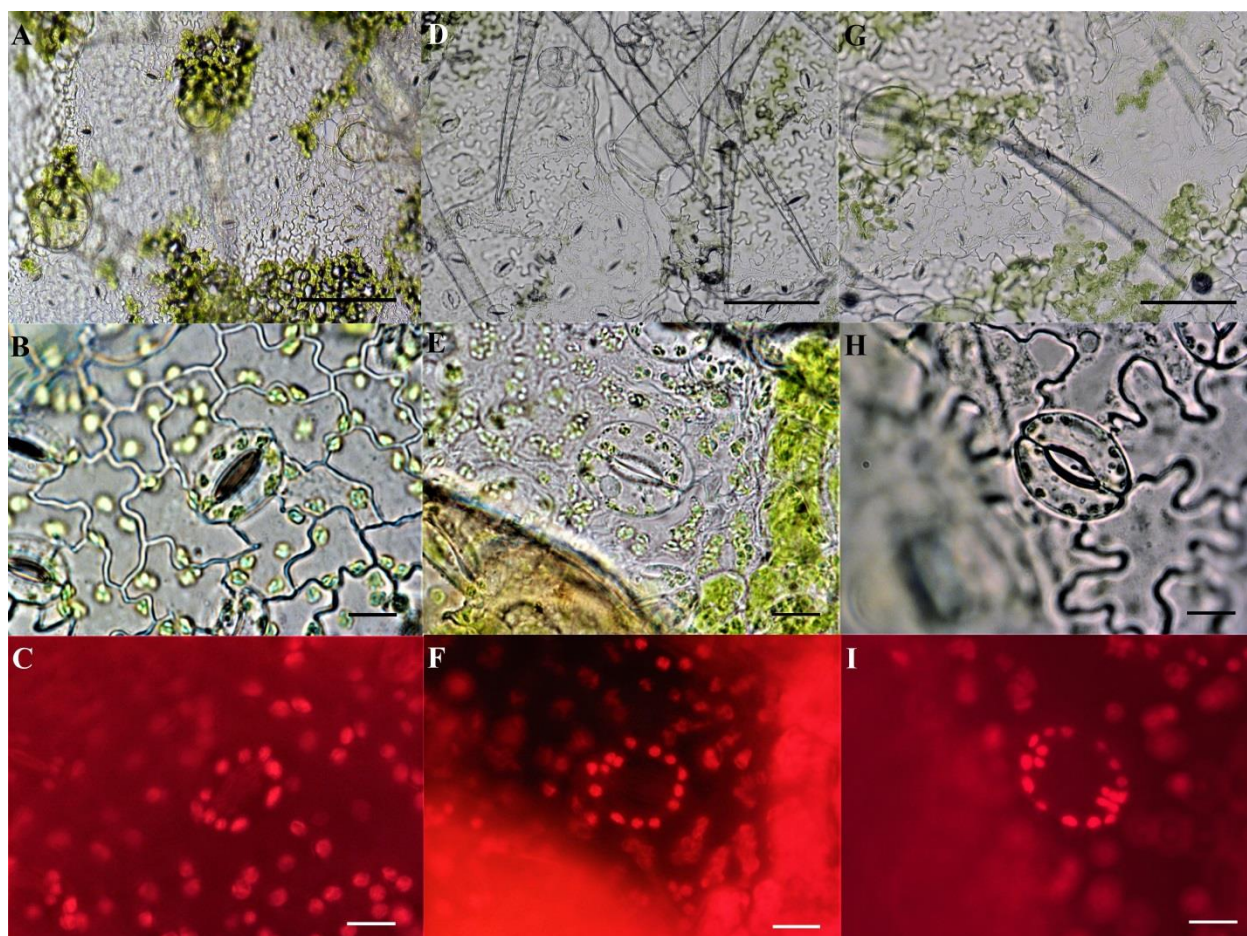


Рисунок 21 – Эпидермис абаксиальной поверхности листьев растений-регенерантов патиссона разной ploидности полученных в культуре неопыленных семязпочек *in vitro*. A, B, C – растение с диплоидным набором хромосом; D, E, F – растение с триплоидным набором хромосом; G, H, I – растение с тетраплоидным набором хромосом; A, D, G – устьичные клетки у растений-регенерантов разного уровня ploидности при использовании объектива 20×; B, E, H – устьичные клетки растений-регенерантов разного уровня ploидности при использовании объектива 100×; C, F, I – Автофлуоресценция хлоропластов при использовании набора флуоресцентных фильтров при использовании объектива 100×

Первоначально были произведены замеры основных показателей абаксимального эпидермиса у контрольных образцов кабачка и патиссона, выращенных в условиях открытого грунта и пленочной теплицы. Среди выбранных контрольных образцов внутри группы патиссона (*subsp. ovifera*) и группы кабачка (*subsp. pepo*) фактор генотипа не оказывал существенного

влияния на изучаемые показатели, однако наблюдалась существенная разница между растениями одного генотипа, но выращенных в разных условиях (таблица 10). Показатель длины устьиц у растений, выращенных в теплице, был больше в 1,2 раза, а плотность устьиц меньше (в 1,99 раза), по сравнению с растениями, выращенными на поле в условиях солнечного и жаркого лета. Варьирование этих признаков было сопоставимо с данными, полученными другими исследователями для вида *C. pepo* на гаплоидных и диплоидных образцах. Таким образом, использование показателей абаксимального эпидермиса (SL и SD) для идентификации плоидности растений, возможно, использовать только для растений, выращенных в одинаковых условиях. В тоже время не было выявлено существенной разницы по количеству хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (CN) у растений, выращенных в разных условиях. Кроме того, выявлена существенная разница по показателям абаксимального эпидермиса между образцами summer squash, относящимся к разным разновидностям. Длина (SL) и ширина (SW) замыкающих клеток устьиц у патиссона была меньше, в то время как плотность устьиц (SD) была больше. Если для патиссона, выращенного в условиях открытого грунта (поле) показатель SL в среднем был 20,00 μm , а число устьиц в среднем составляло 550,55 шт на 1 mm^2 , то для кабачка SL была 24,96 μm , а SD была меньше и составляла 446,89 шт/ mm^2 . Количество хлоропластов, в замыкающих клетках устьиц у контрольных диплоидных образцов не зависело от генотипа и условий выращивания, и составило в среднем для обеих разновидностей 10,7 штук. Показатель CN оказался самым стабильным и именно его можно рекомендовать к использованию для идентификации плоидности. Полученные результаты подтвердили данные, опубликованные для других культур, что условия выращивания растений, могут оказывать влияние на показатели абаксимального эпидермиса, и это необходимо учитывать при проведении анализа на уровень плоидности, если используются показатели SL, SW, SI и SD.

Таблица 10 – Показатели абаксимального эпидермиса у донорных растений *С. перо* выращенных в разных условиях

Показатель	Условия выращивания (factor B)	Genotype (Factor A)							
		subsp. <i>ovifera</i>				subsp. <i>perо</i>			
		Сани Делайт	Диск	Чебурашка	Среднее	Голдкрэш	Фараон	Якорь	Среднее
SL (μm)	поле	20.02 ¹ b/B	20.46 b ³ /B ⁴	19.52 b/B	20.00	25.84 b/A	24.32 b/A	24.74 b/A	24.96
	теплица	24.47 a/B	25.4 a/B	25.87 a/B	25.25	30.51 a/A	31.01 a/A	29.72 a/A	30.41
two-way ANOVA factors		Factor A ns, Factor B ^{2***} , Factor A × Factor B ns				Factor A ns, Factor B ^{***} , Factor A × Factor B ns			
SW (μm)	поле	15.85 b/B	15.97 b/B	15.93 b/B	15.91	18.46 a/A	17.25 b/A	18.19a/ A	17.96
	теплица	18.16 a/B	18.89 a/B	18.73 a/B	18.59	19.55 a/A	20.81 a/A	19.81a/ A	20.06
two-way ANOVA factors		Factor A ns, Factor B ^{***} , Factor A × Factor B ns				Factor A ns, Factor B ^{**} , Factor A × Factor B ns			
SI (SL/SW)	поле	1.26 a/AB	1.28 a/AB	1.23 b/B	1.26	1.40 b/A	1.41 a/A	1.36 a/AB	1.39
	теплица	1.35 a/C	1.34 a/C	1.38 a/BC	1.36	1.56 a/A	1.49 a/B	1.50 a/B	1.51
two-way ANOVA factors		Factor A ns, Factor B ^{***} , Factor A × Factor B ns				Factor A ns, Factor B ^{***} , Factor A × Factor B ns			
SD (number per mm ²)	поле	575.14a /A	550.00 a/A	526.5 a/AB	550.55	421.43 a/C	444.5 a/C	474.74 a/BC	446.89
	теплица	263.81 b/B	281.87 b/A	280.68 b/A	275.50	271.43 b/A	262.97 b/B	293.92 b/A	276.10
two-way ANOVA factors		Factor A **, Factor B ^{***} , Factor A × Factor B ns				Factor A **, Factor B ^{***} , Factor A × Factor B ns			
CN	поле	11.00a/ A	10.43 a/A	11.02 a/A	10.81	10.50 a/A	11.76 a/A	11.07 a/A	11.11
	теплица	11.33a/ A	10.67 a/A	10.14 a/A	10.71	9.77 a/A	10.50 a/A	10.57 a/A	10.28
two-way ANOVA factors		Factor A ns, Factor B ns, Factor A × Factor B ns				Factor A ns, Factor B ns, Factor A × Factor B ns			

Примечание: ¹представленные в таблице значения являются средними; ² *, **, и ***: значимо при 5%, 1% и 0,1% уровне значимости соответственно, ns: не значимо. Значения с одинаковой строчной буквой³ в столбцах (сравнение между всеми условиями

выращивания в пределах одного показателя и генотипа) и заглавной буквой ⁴ в строках (сравнение всех генотипов двух разновидностей в пределах одного и того же показателя и условий выращивания) значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с Duncan's Multiple Range Test (MRT). SL – длина устьиц; SW – ширина устьиц; SI – индекс устьиц (длина устьица/ширина устьица); SD – плотность устьиц; CN – количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц

Растения-регенеранты кабачка и патиссона, полученные в культуре неопыленных семян *in vitro*, выращивались в теплице, и у диплоидных образцов средние показатели абаксиального эпидермиса практически не отличались от аналогичных показателей контрольных донорных растений, выращенных в тех же условиях (таблица 10). В проанализированной выборке растений-регенерантов были обнаружены образцы, отличающиеся по количеству хлоропластов в замыкающих клетках устьиц абаксиального эпидермиса листа от контрольных диплоидных образцов (содержащих от 8 до 12 штук). У кабачка количество хлоропластов у растений-регенерантов, полученных в культуре неопыленных семян варьировало от 7 до 24 штук. Соотнеся полученные данные (таблица 11, рисунок 1) с данными, полученными при анализе проточной цитометрии клеточных ядер и прямого подсчета хромосом, можно было заключить, что растения, содержащие в среднем 11,31 хлоропластов в замыкающих клетках устьиц, будут иметь диплоидный набор хромосом, а 17,66 – тетраплоидный.

Таблица 11 – Показатели абаксимального эпидермиса у растений-регенерантов кабачка (*C. pepo* subsp. *pepo*), полученных в культуре неопыленных семян *in vitro* в зависимости от уровня пloidности

Пloidность	SL, μm	SW, μm	SI (SL/ SW)	SD (number/per mm ²)	CN
2n	29.01 c	19.66 a	1.48 b	251.8 a	11.31 c
3n	31.83 b	20.36 b	1.57 a	195.57 b	14.84 b
4n	33.30 a	20.98 b	1.59 a	163.76 c	17.66 a

Примечание: представленные в таблице значения являются средними; Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с Duncan's Multiple Range Test (MRT). SL – длина устьиц; SW – ширина устьиц; SI – индекс устьиц (длина устьица/ширина устьица); SD – плотность устьиц; CN – количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц

У триплоидных образцов, наблюдалось очень большое варьирование всех показателей абаксимального эпидермиса. На одном поле зрения микроскопа можно было наблюдать устьица, сильно различающиеся по размеру и содержащие от 7 до 24 штук хлоропластов, однако в среднем

показатель CN для триплоидных образцов составил 14,84 шт. По показателям SL, SD и CN группы растений с диплоидным, триплоидным и тетраплоидным уровнем плоидности достоверно отличались. Аналогичная закономерность наблюдалась для растений разного уровня плоидности и у патиссона (таблица 12, рисунок 14).

Таблица 12 – Показатели абаксимального эпидермиса у растений-регенерантов патиссона (*C. pepo* subsp. *ovifera*), полученных в культуре неопыленных семян *in vitro* в зависимости от уровня плоидности

Плоидность	SL, μm	SW, μm	SI (SL/ SW)	SD (number/per mm^2)	CN
2n	25.95 c	18.81 c	1.39 a	264.32 a	9.41 c
3n	32.00 b	26.65 b	1.21 b	191,83 b	16.30 b
4n	35.83 a	29.09 a	1.24 b	173.71 c	17.58 a

Примечание: представленные в таблице значения являются средними; Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с Duncan's Multiple Range Test (MRT). SL – длина устьиц; SW – ширина устьиц; SI – индекс устьиц (длина устьица/ширина устьица); SD – плотность устьиц; CN – количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц

Диплоидные и тетраплоидные образцы по CN отличались в 1,87 раз. По показателям SW достоверно можно было разделить все три изучаемые группы по уровню плоидности у патиссона, в то время как у кабачка по этому показателю можно было только достоверно разделить только диплоидные образцы от образцов с большим уровнем плоидности.

Таким образом, показатели абаксимального эпидермиса можно использовать для идентификации плоидности у *C. pepo*. Использование такого косвенного показателя, как количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (CN) может служить достаточно точным, относительно быстрым и не дорогим способом идентификации плоидности у растений-регенерантов кабачка и патиссона.

Проведённое изучение полученного потомства растений-регенерантов, полученных в культуре неопыленных семян *in vitro* и по уровню плоидности с использованием проточной цитометрии, прямого подсчета хромосом и по параметрам абаксимального эпидермиса листьев, показало, что среди проанализированных растений-регенерантов кабачка, успешно

прошедших этап адаптации, на основе трех методов было определено: диплоидов – 32,35%, триплоидов – 26,47%, тетраплоидов – 33,82%, октаплоидов – 4,41%, анеуплоидов – 2,94%. Гаплоидные растения были обнаружены только в культуре *in vitro* и среди высаженных в теплицу растений обнаружены не были, что объяснялось их потерей на этапе регенерации, как наименее жизнеспособных.

Проведя поиск опубликованных данных, для *C. pero* при использовании разнообразных гаплоидных технологий среди образовавшихся растений-регенерантов идентифицированы преимущественно гаплоиды и диплоиды и лишь иногда были диагностированы миксоплоидные растения [71]. Мы смогли найти только два сообщения об индуцированной тетраплоидии при попытках гаплоидной индукции у образцов *C. pero* [71; 114]. Примечательно, что именно в этих исследованиях идентификация плоидности производилась с использованием проточной цитометрии клеточных ядер (рекомендуется как один самых точных и быстрых для данного вида), в то время как в других исследованиях предпочтение отдавалось цитологическому анализу (крайне сложный у представителей этого вида) и анализу плоидности с использованием показателей абаксимального эпидермиса (крайне зависит у этого вида от условий выращивания и требует предварительной стандартизации). Механизм образования триплоидов и тетраплоидов до конца еще неясен и требует дальнейшего изучения, но, по-видимому, связан с длительным нахождением в культуре *in vitro* и именно воздействием регуляторов роста. Низкий же уровень выявления мы связываем с проблематичностью проведения идентификации плоидности у этого вида. Разработанные и оптимизированные нами протоколы позволят более точно идентифицировать плоидность полученных растений-регенерантов с учетом имеющегося в лаборатории оборудования.

3.8 Оценка морфологических признаков пыльцы кабачка и патиссона

Растения-регенеранты R_0 с разным уровнем плоидности и R_1 (от самоопыления растений $2n$ и $4n$) также были оценены по морфологическим признакам мужского гаметофита.

Впервые с использованием сканирующего электронного микроскопа было проведено изучение морфологических особенностей пыльцы у растений кабачка и патиссона с разным уровнем плоидности и получены изображения пыльцевых зерен гиногенных линий кабачка с различным уровнем плоидности (рисунок 22).

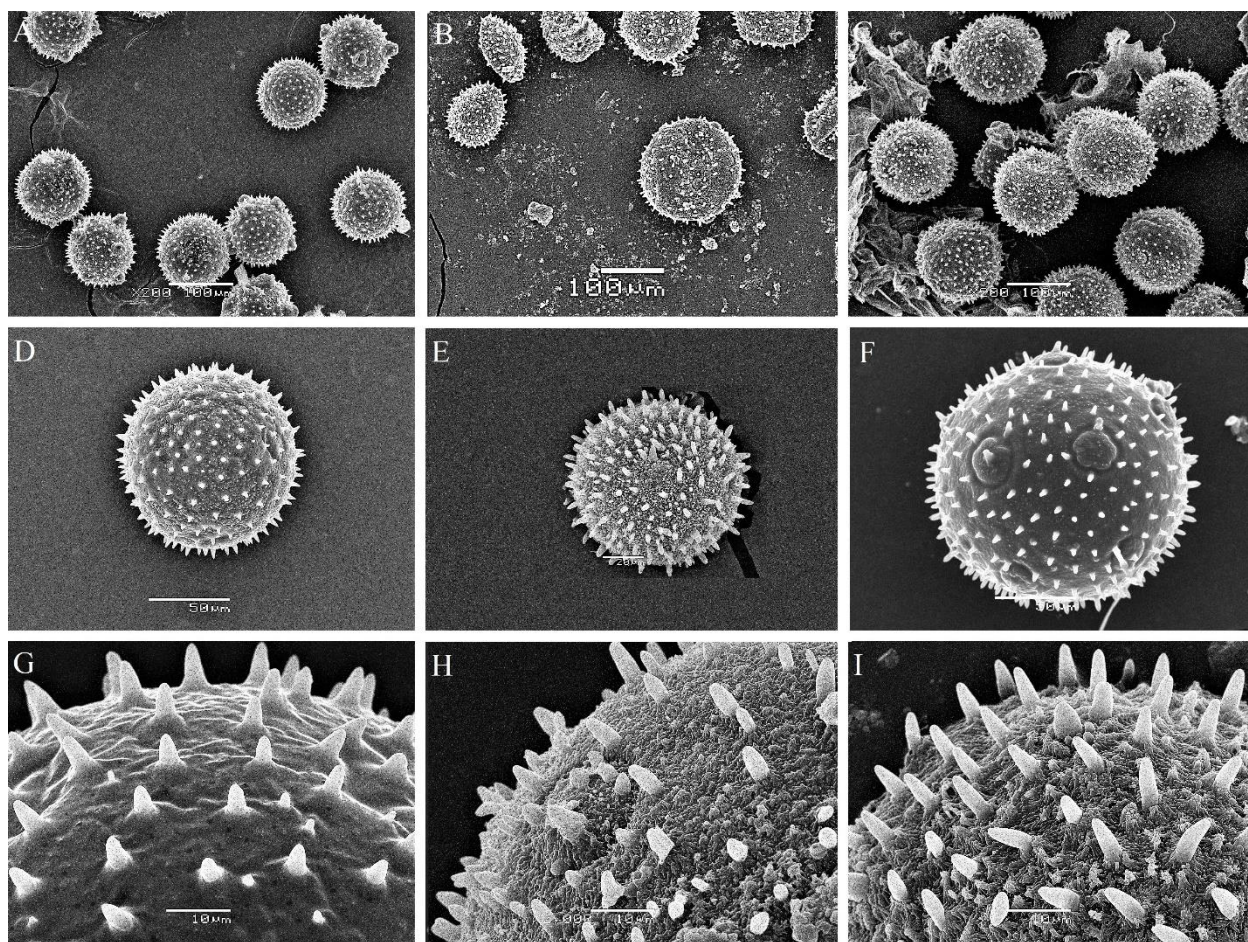


Рисунок 22 – Изображения пыльцевых зерен растений кабачка с разной плоидностью, полученные с использованием электронного сканирующего микроскопа JEOL, JSM-6380LA (Япония), средняя толщина напыления сплава Au-Pd 20nm. А, D, G – Голдкрэш ($2n$); В, Е, Н – Голдкрэш ($4n$); С, F, I – Патиссон ($4n$); А, В, С – общий вид, длина масштабной линейки (МЛ) 100μm; D, Е, F – пыльцевое зерно, длина МЛ 50μm; G, Н, I – поверхность ПЗ, длина МЛ 10μm

Изучение пыльцы исследуемых линий кабачка с различным уровнем плоидности показало, что наибольшее число пыльцевых зерен (ПЗ) с нарушениями развития (недоразвитых, не разделившихся, деформированных) наблюдалось у триплоидных растений. Так, например, в исследуемой выборке, фертильность пыльцы для контроля F1 Голдкрэш (2n) и R₁ Голдкрэш (2n) составила 100%; для триплоидной R₂ Голдкрэш ($\varnothing(4n) \times \sigma^{\circ}(2n)$) она не превышала 5,56%, для тетраплоидной R₁ Голдкрэш (4n) – 84,21%. (рисунок 22).

При проведении исследований – сравнение показателей длины шипов, диаметра пыльцевых зерен кабачка, диаметр пор на одном генотипе и его производных формах разного уровня плоидности, были получены следующие результаты (таблица 13).

Таблица 13 – Изучение пыльцы биотехнологических линий кабачка с различным уровнем плоидности

Плоидность	Диаметр пор, μm	Длина шипов, μm	Диаметр ПЗ, μm
Голдкрэш - 2n (контроль)	16,83±0,41	5,52±0,19	112,20±1,16
R ₁ Голдкрэш - 2n	16,69±0,58	7,19±0,22	109,09±0,85
R ₂ Голдкрэш ($\varnothing(4n) \times \sigma^{\circ}(2n)$) - 3n	19,32±0,83	6,92±0,16	103,08±1,54
R ₁ Голдкрэш - 4n	21,32±0,62	6,99±0,25	148,13±0,25

Так, по показателю диаметр пор, наблюдалась тенденция к увеличению размера пор ПЗ в зависимости от уровня плоидности, при этом у контрольного образца и его производной диплоидной формы этот показатель был идентичен. По показателю «Длина шипов» у ПЗ не наблюдалась корреляции. Это может говорить как о генотип специфичности данного показателя, так и недостаточности данных выборки. Для ответа на этот вопрос необходимо провести многофакторный опыт с включением в него нескольких генотипов и увеличением числа исследуемой выборки ПЗ. По показателю «Диаметр ПЗ» наблюдалась тенденция в наличии корреляции – чем выше уровень плоидности, тем больше диаметр пыльцевого зерна, однако, диаметр ПЗ у R₂ Голдкрэш ($\varnothing(4n) \times \sigma^{\circ}(2n)$) – 3n был значительно

меньше. Это объясняется тем, что в исследуемой выборке чаще встречались слаборазвитые ПЗ меньшего размера и реже – крупные, хорошо развитые.

Так же было проведено аналогичное изучение пыльцы биотехнологических линий патиссона с различным уровнем плоидности. К сожалению, для анализа не удалось получить триплоидные линии, однако, изучение имеющихся данных показало схожую тенденцию, что и у кабачка. Так, в исследуемой выборке, диаметр пыльцевых зерен Сани Делайт – 2n (контроль) составил $103,26 \pm 2,00 \text{ мкм}$, для линии R₁ (Сани Делайт) – 4n $135,54 \pm 0,78 \text{ мкм}$. При этом фертильность пыльцы для контроля Сани Делайт (2n) составила 59,54 %, в то время как для R₁ Сани Делайт (4n) она составила 83,69% что может быть объяснено повреждением пыльцы в условиях блочной теплицы при высоких температурах (рисунок 23, таблица 14).

Таблица 14 – Изучение пыльцы биотехнологических линий патиссона с различным уровнем плоидности

Плоидность	Диаметр ПЗ, μm	Фертильных ПЗ, %	Стерильных ПЗ, %
Сани Делайт - 2n (контроль)	$103,26 \pm 2,00$	59,54	40,46
R ₁ Сани Делайт - 4n	$135,54 \pm 0,78$	83,69	16,31

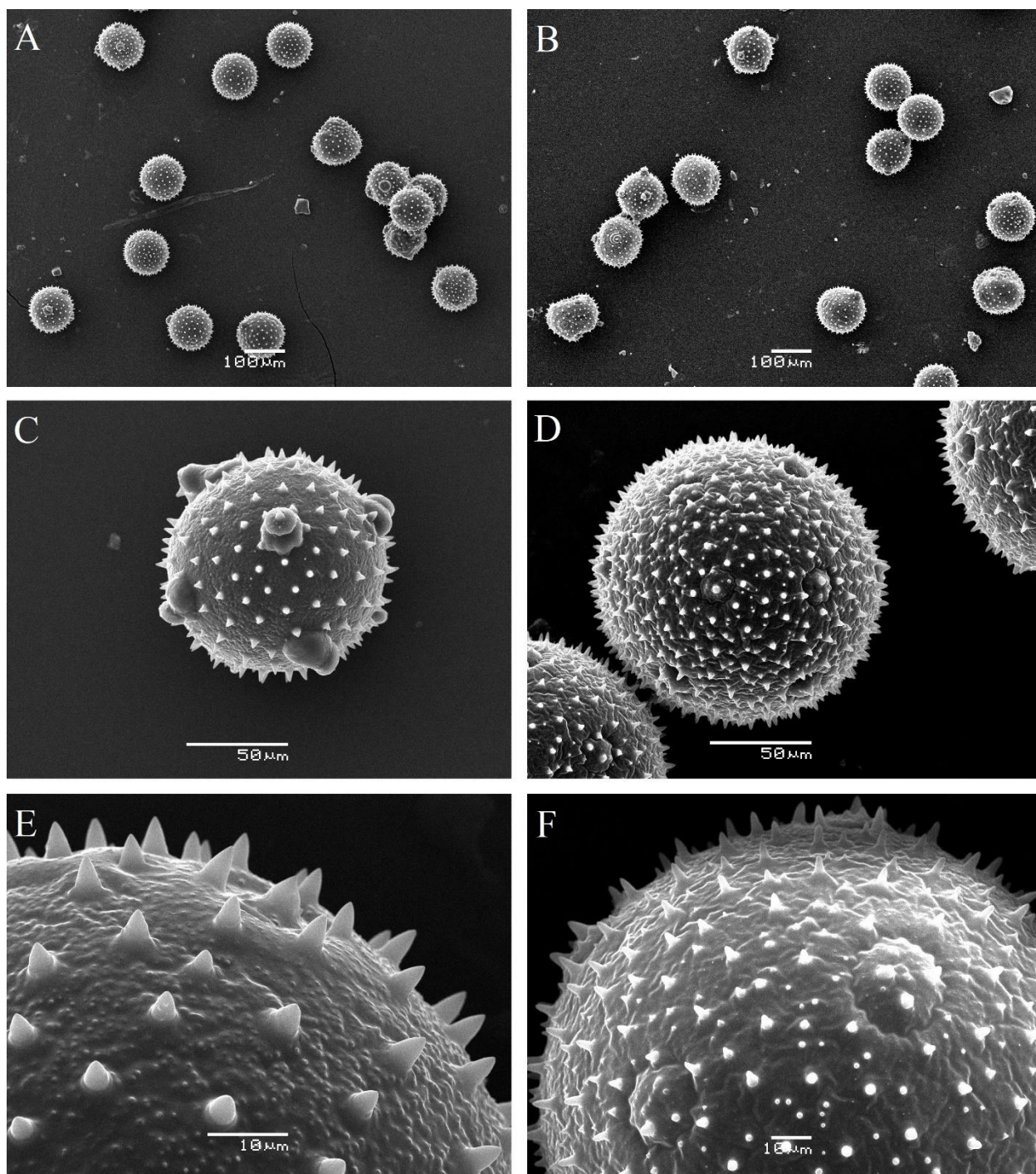


Рисунок 23 – Изображения пыльцевых зерен растений патиссона с разной ploидностью, полученные с использованием электронного сканирующего микроскопа JEOL, JSM-6380LA (Япония), средняя толщина напыления сплава Au-Pd 20nm: А, С, Е - Сани Делайт (2n), В, D, F - Сани Делайт (4n); А, В - общий вид, длина масштабной линейки (МЛ) 500μm; С, D – пыльцевое зерно, длина МЛ 50μm; Е, F – поверхность ПЗ, длина МЛ 10μm

При этом, несмотря на наблюдающуюся схожесть, пыльца кабачка и патиссона имеет различия. Так диаметр пыльцевых зерен диплоидного патиссона соответствует диаметру триплоидного кабачка, а тетраплоидная пыльца патиссона больше пыльцы кабачка аналогичного уровня ploидности.

Так, у диплоидных растений ($2n$) кабачка и патиссона диаметр ПЗ составлял $109,09 \pm 0,85$ мкм и $103,26 \pm 2,00$ мкм, соответственно, а у тетраплоидных ($4n$) – $148,13 \pm 0,25$ мкм и $135,54 \pm 0,78$ мкм. Так же, пыльцевые зерна отличаются между собой по строению экзины, а именно – элементам скульптуры, так, для патиссона было характерно шиповато-зернистая поверхность. У кабачка встречалась как столбчато-зернистая, так и столбчато-морщинистая поверхность пыльцевых зерен [3].

Таким образом впервые методом сканирующей электронной микроскопии были получены изображения и изучены морфометрические показатели пыльцевых зерен гиногенных линий кабачка и патиссона с различным уровнем пloidности и была выявлена зависимость между пloidностью растений и диаметром ПЗ.

3.9 SSR-анализ

Из всех полученных в 2022 г. растений-регенерантов была выделена ДНК для проведения молекулярного анализа с целью подтверждения гиногенного происхождения и подбора оптимального набора праймеров для оценки.

Из десяти протестированных микросателлитных локусов (CMTmC37, CMTmC27, CMTm76, CMTm61, CMTm155, CMTm154, CMTm186, CMTm233, CMTp102, CMTp158), только CMTm154 не определял генетические отличия между образцами исходных донорных растений *Cucurbita pepo* L., относящихся к subsp. *pepo* и к subsp. *ovifera*. Различия между донорными растениями и диплоидными формами, полученными в культуре неопыленных семян *in vitro*, были выявлены с использованием маркера CMTm61 и CMTmC27. При амплификации с маркером CMTm61 у донорных растений кабачка определялось четыре аллели, что соответствовало литературным данным, полученным ранее при разработке данного маркера [38]. Только у 70 % протестированных диплоидных образцов растений-регенерантов, полученных в культуре неопыленных

семяпочек *in vitro* было обнаружено присутствие всего одной аллели, что даёт основания предполагать наличие гомозиготного состояния по данному локусу и подтверждать гиногенное происхождение полученных растений. 30 % образцов имели набор аллелей, полностью соответствующий донорным исходным растениям (рисунок 24).

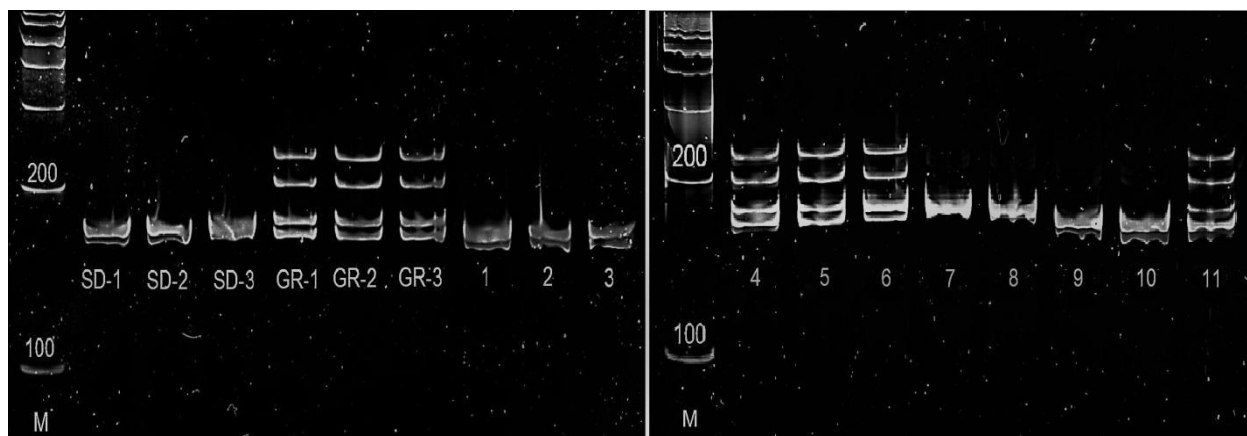


Рисунок 24 – Пример результатов амплификации ДНК из образцов донорных растений кабачка и патиссона (*Cucurbita pepo* L.) и полученных ДН-растений кабачка в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* с SSR-маркером CMTm61: SD-1, SD-2, SD-3 – растения исходного генотипа патиссона Сани Делайт, использующиеся в качестве донорных для получения женских цветков; GR-1, GR-2, GR-3 – растения исходного генотипа кабачка Голдкрэш, использующиеся в качестве донорных для получения женских цветков; 1-11 – диплоидные растения-регенеранты кабачка

С использованием маркера CMTmC27 также были обнаружены различия между донорными растениями кабачка и растениями, полученными в культуре неопылённых семяпочек *in vitro* (рисунок 25).

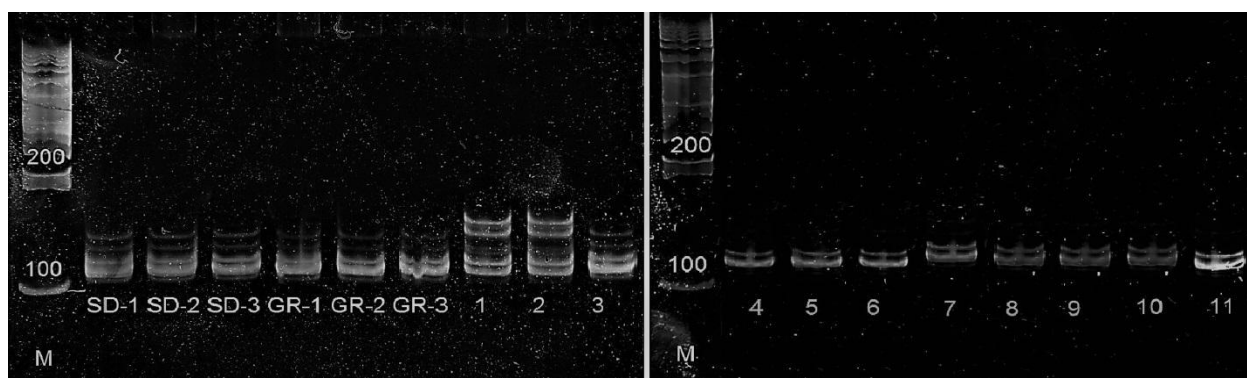


Рисунок 25 – Пример результатов амплификации ДНК из образцов донорных растений кабачка и патиссона (*Cucurbita pepo* L.) и полученных ДН-растений кабачка в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* с SSR-маркером CMTmC27: SD-1, SD-2, SD-3 – растения исходного генотипа патиссона Сани Делайт, использующиеся в качестве донорных для получения женских цветков; GR-1, GR-2, GR-3 – растения исходного генотипа кабачка Голдкрэш, использующиеся в качестве донорных для получения женских цветков; 1-11 – диплоидные растения – регенеранты кабачка

По литературным данным этот маркер должен генерировать одну аллель 101 п.н., а в нашем эксперименте мы наблюдали образование трех вариантов аллельного состава, причём образцы под номерами 1, 2 на рисунке 25 имели четыре аллели. Образцы 7, 8, 9, 10 имели набор из двух аллелей, отличный донорных растений, что может свидетельствовать о происхождении растений из гаплоидных клеток зародышевого мешка и предполагать гомозиготное состояние по данному локусу. Остальные образцы, представленные на рисунке 25, имели сходный набор аллелей с донорными растениями.

Таким образом, впервые с использованием микросателитных (SSR) маркеров было протестировано потомство, полученное в культуре неопыленных семяпочек кабачка и патиссона. Была показана эффективность использования этого типа молекулярных маркеров для подтверждения гиногенного происхождения полученных растений-регенрантов (истинных ДН-растений) и отделения растений, полученных в результате деления соматических клеток (микрклоны).

Полученные данные свидетельствуют о необходимости тестирования образовавшихся растений-регенрантов с использованием SSR-маркеров и данный этап технологии должен быть обязательно включен в протокол получения ДН-растений кабачка в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*.

3.10 Оценка линейного материала, полученного методами биотехнологии

В течение трех лет исследований был выделен и оценен линейный материал, полученный методами биотехнологии. Растения-регенранты сильно отличались по морфологии строения растения эпизодически образуя несколько главных побегов из одного корня. Отличалась и окраска плода, так на желтоплодных формах кабачка и патиссона могли встречаться черно-зеленые плоды или желто окрашенные плоды с крупными черно-зелеными

пятнами. Однако для кабачка, удалось отобрать пять линий, характеризующиеся ровной оранжевой окраской плодов, обладающих цилиндрической формой плода со сбегом к плодоножке и толщиной мякоти от 3 до 3,5 см. Для патиссона удалось выделить 7 линий цвет окраски которых варьирует от темно желтой до оранжевой. Плоды характеризуются тарельчатой формой и у пяти линий фестоны сглажены. По толщине мякоти выделилось две линии 3,5 и 4 см. Отобранный линейный материал, полученный методами биотехнологии, несмотря на то что нуждается в доработке, представляет селекционный интерес с целью получения желтоплодных скороспелых гибридов кабачка и патиссона (Таблица 15).

Кроме того, линейный материал, полученный методами биотехнологии, был проанализирован по признаку окраски плода. Так, процент линий с оранжевой и желтой окраской плодов показал наибольшее значение и составил 40,43 % и 39,36%, соответственно, зеленой – 4,26%, кремовой – 3,19%, остальные – 12,77% (рисунок 25).

Таблица 15 – Характеристика плода отобранных линий, полученных методами биотехнологии (неопыленные семяпочки) (Весенняя теплица, 2020-22 гг.)

Название сортообразца	Плод			Внутренне строение плода		
	цвет	форма	индекс с плода, см	толщина мякоти	цвет мякоти	камера
кабачок						
20/B ₀ X-2/2	оранжевая	овально-цилиндрической со сбегом	3,5	3-3,5	бледно-оранжевая	рыхлая
20/B ₀ 18	оранжевая	цилиндрическая со сбегом	3,5	2-2,5	бледно-оранжевая	плотная, волокнистая

Продолжение таблицы 15

21/X223	оранжево-зеленая	цилиндрическая со сбегом	3,5	3	желто-зеленая	слитная
21/X225	зелено-оранжевый	цилиндрическая со сбегом	4,5	1,5-2	бледно-оранжевая	плотная
21/X227	желто - оранжевая	цилиндрическая со сбегом	3,5	1,5-2	бледно-оранжевая	рыхлая
21/X229	оранжевая	овально-цилиндрический со сбегом	3,5	3-3,5	бледно-оранжевая	рыхлая
21/2X230	оранжевая	цилиндрическая со сбегом	3,5	2-2,5	бледно-оранжевая	рыхлая
21/X233	бледно-оранжевая	бочковидная	4,5	3	бледно-оранжевая	слитная
21-11-1/1	оранжевая	овальный	4,5	3	оранжевая	рыхлая
21-11-1/2	кремовая	овальный	4,5	2	кремово-желтая	плотная
патиссон						
21-106-1/16/1	темно-желтая	тарельчатый, фестоны сглажены	1,5	3	темно-желтая	сырая
21-106-1/15/2	желтая	тарельчатый, фестоны сглажены	1,5	3	оранжевая	рыхлая, сырая
21-106-1/16/3	бледно-оранжевая	тарельчатый, фестоны	1,5	3	-	плотная
21-106-1/16/3	темно-желтая	тарельчатый, фестоны	1,5	3	темно-оранжевая	рыхлая
21-106-1/10/2/2	бледно-желтая	тарельчатый, фестоны	1,5	4	оранжевая	рыхлая
21-106-1/17	бледно-зеленая	тарельчатый, фестоны сглажены	1,5	3,5	бледно-желтая	рыхлая, сырая
21-106-1/2	темно-желтая	тарельчатый, фестоны сглажены	1,5	3	темно-оранжевая	сырая

Продолжение таблицы 15

21-106-1/4/2	светло-оранжевая	тарельчатый, фестоны сглажены	1,5	3	оранжевая	рыхлая
21-150-1/1	оранжевая	тарельчатый, фестоны	1,5	2-2,5	светло-желтая	узкая

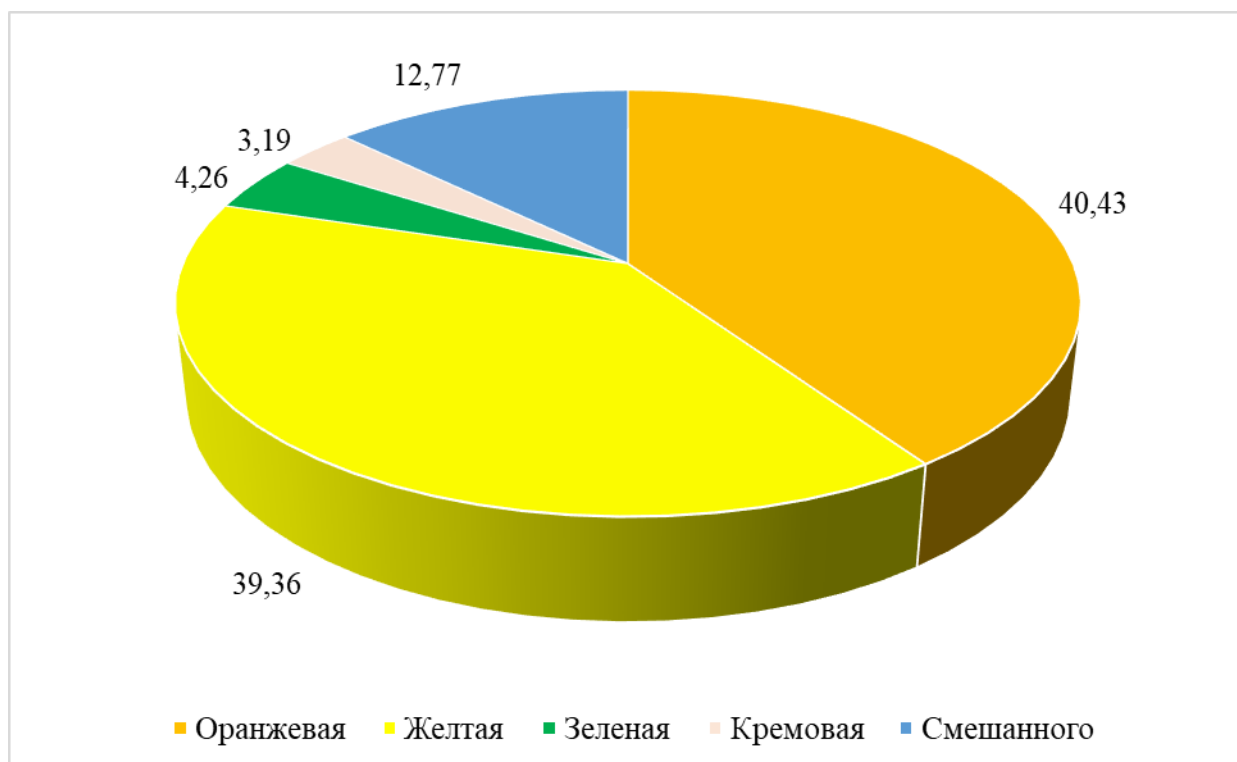


Рисунок 25 – Окраска плода линий, полученных методами биотехнологии, % (Весенняя теплица, 2020-22 гг.)

Проведенная иммунологическая оценка растений-регенерантов кабачка и патиссона в 2022 г. в условиях защищенного грунта выявила значительную вариабельность по показателю среднего бала поражения на уровне (коэффициент вариации) $V=29\%$. При этом выделилось потомство с минимальными показателями пораженности, так 5 линий из потомства Сани Делайт со степенью развития болезни 20% были отнесены группе слабовосприимчивых образцов. В группу средневосприимчивых генотипов вошли 40 % образцов со средней степенью развития болезни 34%, и 22 линии отнесены к сильно восприимчивым со степенью развития 53%. Для линий кабачка Голдкрэш оценка по показателю «балл поражения» также выявило среднюю вариабельность $V=12\%$. Разделение в группах устойчивости

произошло следующим образом: слабовосприимчивый 1 генотип со степенью развития болезни 25%, 5 генотипов – средневосприимчивые со средней степенью развития болезни 35% и 1 генотип – сильновосприимчивый со степенью развития болезни 51% (рисунок 26).

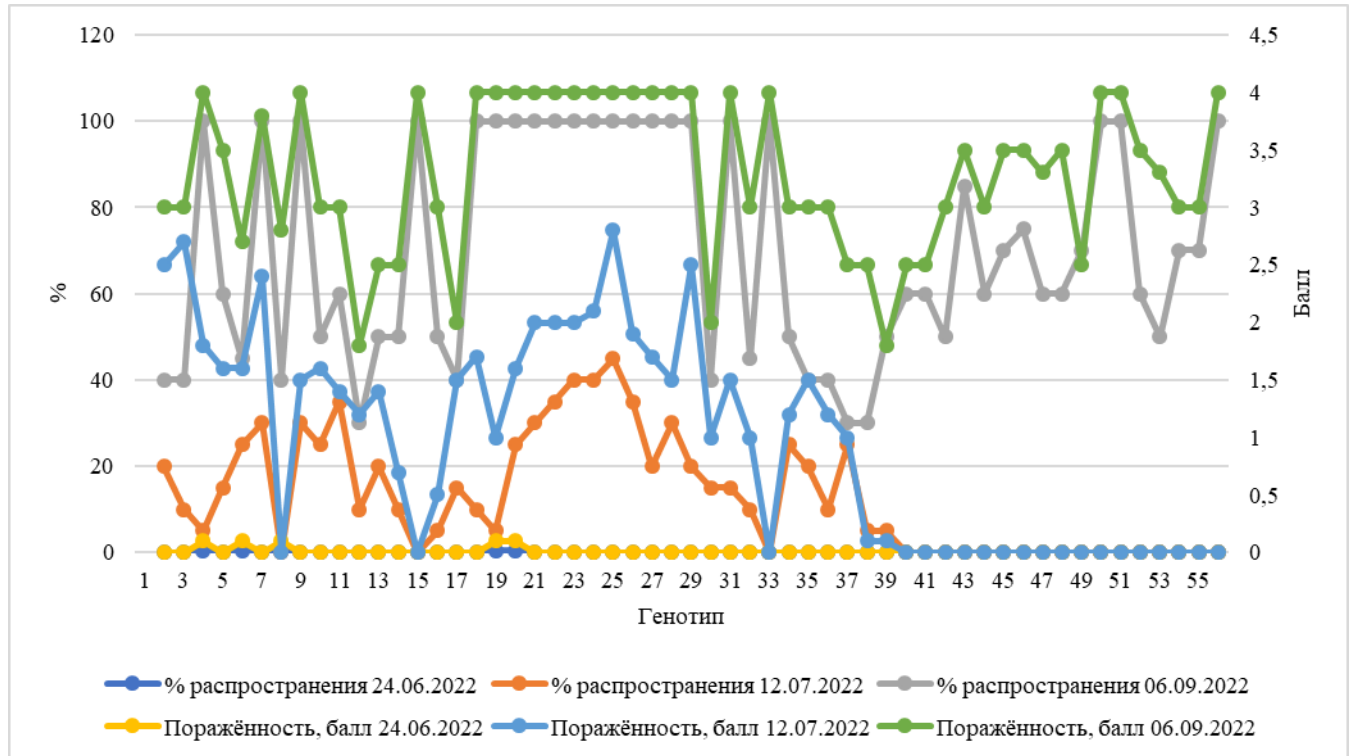


Рисунок 26 – Иммунологическая оценка перспективных селекционных образцов кабачка и патиссона в условиях защищённого грунта, 2022 г.

Изучение изолятов с поражённых листьев кабачка показало присутствие в анаморфной стадии возбудителей *Podosphaera xanthii* и единичные конидии *Erysiphe cichora cearum*, что свидетельствует о смешанной инфекции. В конце вегетационного периода были обнаружены только клейстотеции *Podosphaera xanthii*, плодовые тела второго возбудителя не были обнаружены, по-видимому, по причине невысокой доли в популяции (рисунок – 27).



Рисунок 27 – Фото возбудителей: А – Конидии *Podosphaera xanthii* с боковым прорастанием ростковой трубки; В – Конидии *Podosphaera xanthii* с фиброзиновыми тельцами, С – смешанная инфекция (*Podosphaera xanthii*, и единичные - *Erisiphe cichoracearum*) (Фотографии предоставлены научным сотрудником лаборатории молекулярно-иммунологических исследований ФГБНУ ФНЦО, канд. с.-х. наук, Слетовой М. Е.)

Поскольку сегрегация происходит одновременно с образованием удвоенных гаплоидов, а также с акклиматизацией у растений-регенерантов, то различия в устойчивости могут объясняться реакцией генотипов как на разные виды и расы возбудителя, которые присутствуют в патоконплексе, так и адаптацией к факторам внешней среды.

Симптомы мучнистой росы как на растениях-регенерантах, так и на их родительских формах были схожими, имея различия в интенсивности инфекционного процесса.

Кабачок восприимчив к нескольким расам и видам возбудителей настоящей мучнистой росы тыквенных культур. Поскольку устойчивость/толерантность к разным расам контролируется разными генами и зачастую носит полигенный рецессивный характер, то комплексная устойчивость даже к доминирующим расам может быть непростой селекционной задачей. Поэтому в отношении этого возбудителя наряду с селекцией необходимы агротехнические приемы, позволяющие снижать агрессивность и вирулентность, возбудителя.

Растения не редко развивают устойчивость к господствующим патогенам благодаря таким защитным мерам как апоптоз, модификациям и утолщениям клеточной стенки, модификациям листовой пластины, выработки некоторых биохимических веществ ингибирующей природы.

Возможно, что относительная устойчивость исследуемых образцов обусловлена повышенной выработкой веществ, замедляющих развитие вторичного мицелия, либо утолщением эпидермиса.

Создание ДН – линий остаётся востребованным инструментом для селекции. Однако в связи с высокой агрессивностью возбудителей настоящей мучнистой росы, возможностью смешанной инфекции, возможными сдвигами в патоккомплексе необходимо проводить иммунологическую оценку полученных гомозиготных линий на устойчивость к местным вредоносным представителям патоккомплекса.

3.11 Технология создания бессемянных плодов кабачка

Была изучена возможность применения схемы гибридных скрещиваний по Kihara [113] растений с диплоидным и тетраплоидным набором хромосом для получения бессемянных триплоидных гибридов. Эта схема впервые была успешно применена для получения бессемянных арбузов и широко используется во всем мире и в настоящее время. Сообщений о возможности использования данной схемы для других представителей семейства Cucurbitaceae нам не встречалось. Поскольку при использовании технологии получения удвоенных гаплоидов в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* в проведенных нами экспериментах достаточно часто в качестве побочного продукта образовывались тетраплоидные растения-регенеранты (около 30 %), то мы решили их использовать для создания триплоидных гибридов.

При скрещивании диплоидных и тетраплоидных растений кабачка, образование плодов происходило в большинстве случаев, когда в качестве женского компонента использовалась тетраплоидная линия (рисунок 28).

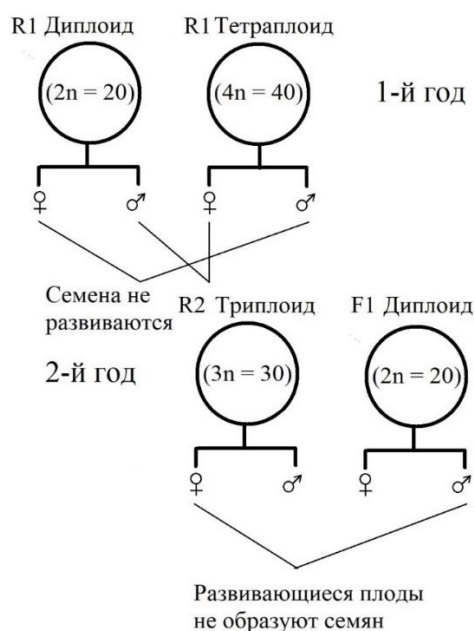


Рисунок 28 – Схема гибридных скрещиваний для получения бессемянного ($3n$) кабачка

В случае, когда женский диплоидный цветок опылялся пылью тетраплоидного растения, то лишь в одном из 10 проведенных скрещиваний на генотипе Голдкрэш удалось индуцировать развитие плода, однако полноценных семян из него выделить не удалось, все семена были рудимертанные, без зародыша внутри (рисунок 29). Полученные результаты были сходными с результатами, полученными Kihara на арбузе [113].



Рисунок 29 – Плоды, завязавшиеся от скрещиваний тетраплоидных и диплоидных растений кабачка: А – проведение скрещиваний между растениями разной плоидности; В – плод от скрещивания $\text{♀}2n \times \text{♂}4n$; С – плод от опыления $\text{♀}4n \times \text{♂}2n$

Полученные плоды отличались по внутреннему строению: толщине мякоти, окраске мякоти, плотности камеры. Так, например плод X223 характеризовался плотной камерой бледно-желтого цвета с толщиной мякоти около 2 см., окраска мякоти с одной стороны плода была оранжевой, с другой бледно-желтой. Плод X230 имел рыхлую камеру с толщиной мякоти 2 см., с темно-желтой окраской камеры и мякоти. Плод X233 характеризовался плотной камерой, толщиной мякоти 2,5-3 см, окраска мякоти и камеры была кремовая. Плод X237 имел бледно-зеленую окраску мякоти с оранжевой окантовкой толщиной 2 см., камера рыхлая, бледно желтая (рисунок 30).



Рисунок 30 – Селекционный материал, полученный от гибридных скрещиваний растений разной ploидности: А – X223 ($\text{♀}181 (4n) \times \text{♂}183 (2n)$); В – X230 ($\text{♀}182 (4n) \times \text{♂}183 (2n)$); С – X233 ($\text{♀}184 (4n) \times \text{♂}183 (2n)$); D – X237 ($\text{♀}183 (2n) \times \text{♂}182 (4n)$)

Из полученных семенных плодов, снятых с тетраплоидных растений, были выделены семена. Количество семян в таких плодах было меньше по сравнению с плодами от самоопыления тетраплоидных растений-регенерантов (около 50 семян/плод), диплоидных растений-регенерантов (около 100 семян/плод) и значительно меньше, чем от самоопыления исходного донорного диплоидного генотипа (200-400 семян/плод).

При высевании в грунт на следующий год семян, выделенных из плодов от скрещивания тетраплоидного и диплоидного образцов, были получены здоровые растения. Проведенный анализ на уровень ploидности подтвердил, что все полученные растения были триплоидными и имели набор хромосом $2n=3x=60$. Внешне полученные триплоидные растения

характеризовались более мелкими размерами листовой пластинки и цветков по сравнению с диплоидным исходным растением.

При опылении женских цветков на триплоидном растении диплоидной мужской пыльцой, наблюдалось развитие плодов (рисунок 32 С).

Кроме различий во внутреннем строении, плоды различались по количеству полноценных выделенных семян. Так из плода X223 было выделено 5 шт. семян, X230 – 46 шт., X233 – 18 шт., в плоде X237 семена отсутствовали (рисунок 31).

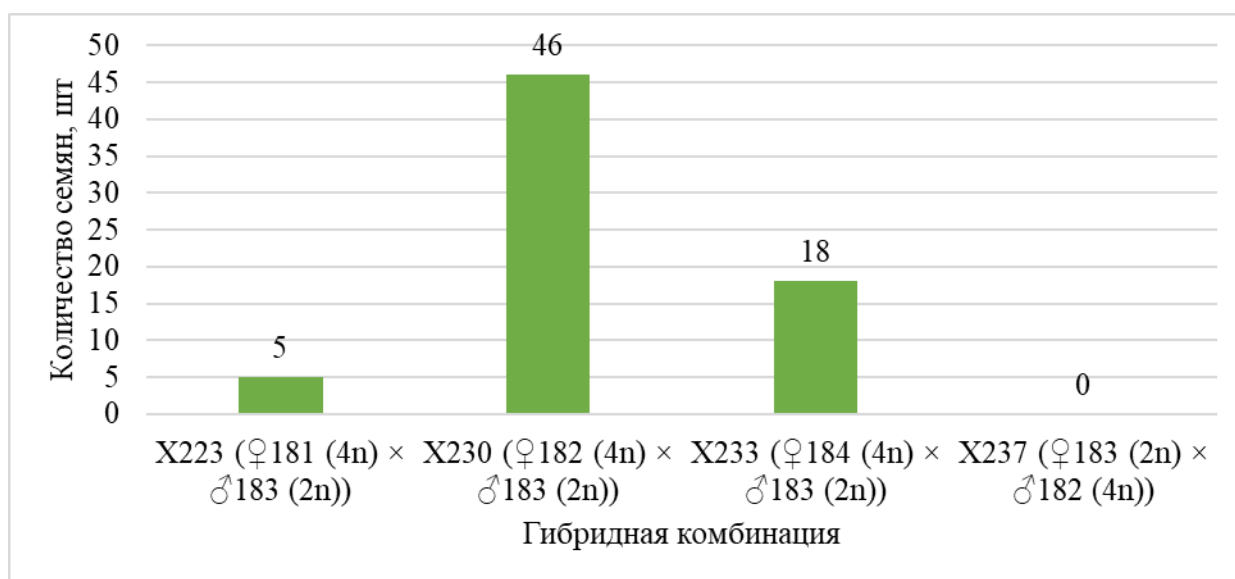


Рисунок 31 – Количество семян в плодах от гибридизации линий разного уровня ploidy ($\text{♀}4n \times \text{♂}2n$) и ($\text{♀}2n \times \text{♂}4n$), шт.

Полноценных семена у плода X237, полученного от скрещивания родительской линий $\text{♀}2n \times \text{♂}4n$ (качестве женского компонента скрещивания использовалась диплоидная линия), несмотря на его относительно крупный по сравнению с другими плодами размер, отсутствовали, все образовавшиеся и видимые на фото (рисунок 30 D) семена были рудиментарными и без зародыша.

В 2022 году на селекционный участок в одинаковых условиях были высажены как родительские формы гибридов, так и потомство гибридов для последующей оценки по уровню ploidy и хозяйственно ценным признакам. Методом проточной цитометрии было повторно подтверждено

развитие триплоидных растений из семян, выделенных из плодов от скрещиваний, проведенных в 2021 году, когда в качестве женского компонента скрещивания использовалась тетраплоидная форма, а в качестве опылителя диплоидная $\text{♀}4n \times \text{♂}2n$.

Три триплоидные линии были опылены исходным диплоидным образцом Голдкрэш (контроль). Образовавшиеся плоды на триплоидных растениях были меньше по размеру, по сравнению с плодами, образующимися от самоопыления как на контрольных диплоидных растениях, диплоидных гиногенных гомозиготных линиях и геногенных тетраплоидных линиях. Толщина мякоти у развившихся на триплоидном растении плодов была почти в 2 раза тоньше, а в семенной камере семян не наблюдалось (рисунок 32).



Рисунок 32 - Плоды кабачка разного уровня плоидности в разрезе. А – Голдкрэш (контрольное донорное растение); В – плод от самоопыления диплоидной гиногенной линии, полученной из Голдкрэш; С – плод от скрещивания триплоидной гибридной формы 2021 года с диплоидным донорным растением ($\text{♀} 3n (\text{♀}4n \times \text{♂}2n) \times \text{♂}2n$; D - плод от самоопыления тетраплоидной гиногенной линии, полученной из Голдкрэш ($4n$)

Таким образом, нам впервые удалось получить потомство от опыления между диплоидными и тетраплоидными гиногенными линиями кабачка и получить триплоидный бессемянный гибрид.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В качестве ген источников скороспелости для кабачка можно использовать генотипы – Фараон, F1 Желтый Банан, Русские Спагетти, Уголек, Якорь и Ролик; по форме плода - Фараон, Желтоплодный, Золотинка и Голдкрэш; Русские Спагетти и Уголек, по толщине мякоти, Якорь и Ролик. Для патиссона в качестве ген источников скороспелости можно использовать: сорт Диск, Чебурашка и Сани Делайт. Весь материал подходит в качестве ген источников по форме плода и толщине мякоти. По признаку оранжевой окраски коры: Сани Делайт, Копейка, НЛО оранжевый, F1 Солнечный Зайчик.

2. По результатам проведенных исследований была выявлена отзывчивость к гиногенному развитию у 30 из 42 изученных генотипов *C. pepo* и впервые были получены гомозиготные растения патиссона за один вегетационный период. Максимальный выход эмбрионов у образцов патиссона составил до 16 эмбрионов на 100 культивируемых семязпочек, а для генотипов кабачка – до 55 эмбрионов.

3. Среди адаптированных к условиям *ex vitro* гиногенных растений – регенерантов *C. pepo* было отмечено: диплоидов – 32,35%, триплоидов – 26,47%, тетраплоидов – 33,82%, октаплоидов – 4,41%, анеуплоидов – 2,94%. Гаплоиды (n) были обнаружены только среди растений в культуре *in vitro*.

4. По результатам оптимизации протокола проточной цитометрии клеточных ядер, было установлено два цитотипа для диплоидных образцов *C. pepo* с содержанием ДНК $2C = 1,07 \pm 0,03$ пг для образцов кабачка, относящихся к *subsp. pepo*, и второй цитотип $2C = 0,95 \pm 0,03$ пг для образцов патиссона, относящихся к *subsp. ovifera*.

5. Впервые с использованием сканирующего электронного микроскопа были получены изображения и изучены морфометрические показатели пыльцевых зерен гиногенных линий кабачка и патиссона с различным уровнем ploидности. Была выявлена зависимость между ploидностью растений и диаметром ПЗ. Так, у диплоидных растений ($2n$) кабачка и

патиссона диаметр ПЗ составлял $109,09 \pm 0,85$ мкм и $103,26 \pm 2,00$ мкм, соответственно, а у тетраплоидных ($4n$) – $148,13 \pm 0,25$ мкм и $135,54 \pm 0,78$ мкм.

6. Показано, что наиболее стабильным показателем абаксимального эпидермиса для идентификации плоидности образцов кабачка и патиссона, не зависящим от условий выращивания, является количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Для диплоидных образцов патиссона и кабачка он составляет в среднем от 9,41 до 11,31 шт, для триплоидных от 14,84 до 16,3 шт, а у тетраплоидных до 17,58 шт.

7. В результате оценки с использованием SSR маркеров 70% проанализированных растений-регенерантов кабачка генетически отличались от донорных растений, что подтвердило их гиногенное происхождение из гаплоидных клеток.

8. Впервые удалось получить потомство от опыления между диплоидными и тетраплоидными гиногенными линиями кабачка и получить триплоидный бессемянный гибрид.

9. Используя методы классической селекции, лучшими линейными формами кабачка, с оранжевой окраской плодов, цилиндрической формой плода со сбегом к плодоножке, без ребер были получены: I_4 Ясмин 21/194, с толщиной мякоти 2,5-3 см и I_4 Святозар 21/221 с толщиной мякоти 2,5 см. По срокам цветения женскими цветками особенно выделяется линия кабачка I_4 Святозар 21/221 цветение женскими цветками которого начиналось через 36 суток. Линии кабачка I_5 Святозар (22/E9) и I_5 Святозар (22/E10 при проведении иммунологической оценки показали наибольшую толерантность к патогенам мучнистой росы: поражение составило 2,5 балла, а распространение не превышало 50-60%.

Рекомендации по практическому применению результатов диссертационной работы

В 2022 г. сорт желтоплодного кабачка был передан на испытание в ГСИ под названием «Московское Кружево». Сорт – женского типа цветения, скороспелый, в плодоношение вступает на 41 сутки после полных всходов. Очень высокая завязываемость плодов. На растении одновременно завязывается 7-8 плодов массой 0,4-0,5 кг. Средняя урожайность плодов за 4 года исследований составила 73,8 т/га, 115,7% к стандарту Голдкрэш. Относительно устойчив к настоящей мучнистой росе. Растение разреженное, слабооблиственное, с мягким опушением черешка листа. Благодаря такому строению, на растениях облегчен ручной сбор.

Полученные классическими методами линии F₅ Ясмин и F₅ Святозар рекомендуется использовать при создании гетерозисных желтоплодных гибридов кабачка с комплектом хозяйственно ценных признаков.

В результате оценки по комплексу хозяйственно ценных признаков для кабачка было отобрано 10, а для патиссона 9 гомозиготных гиногенных линий, которые будут включены в селекционный процесс и переданы селекционерам.

Пропион-лакмоидный метод окраски хромосом показал свои преимущества для рутинного анализа на уровень ploидности у образцов *C. реро* и может быть рекомендован к включению в протоколы по получению ДН растений.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

DH – doubled haploid/удвоенный гаплоид;

2,4-D – 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid – (2,4-Д);

IAA – Indole-3-acetic acid (ИУК);

NAA – α -naphthaleneacetic acid (НУК);

TDZ – thidiazuron 1-Phenyl-3 (1,2,3 thiadiazol 5 yl) urea (тидiazурон);

КТ – Kinetin (кинетин);

SSR – Simple Sequence Repeat

BA – 6-Benzylaminopurine (БАП)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белик, В. Ф. Бахчеводство: для агрономических специальностей / В. Ф. Белик. - М.: Колос, 1982. - 175 с.
2. Белик, В. Ф. Кабачки и другие тыквенные : Приусадебное хозяйство / В. Ф. Белик. - М.: Сельская новь, 1997. - 46 с.
3. Бурмистров, А. Н. Медоносные растения и их пыльца / А. Н. Бурмистров. - Рипол Классик, 1990.
4. Вавилов, Н. И. О междуродовых гибридах дынь, арбузов и тыкв. (К проблеме о захождении видовых и родовых систематических признаков) / Н. И. Вавилов // Тр. по прикл. ботан. и селекции. - 1924. - Vol. 1925. - С. 3-35.
5. ГОСТ Р 53084-2008 (ЕЭК ООН FFV-41:2003) Кабачки свежие, реализуемые в розничной торговле. Технические условия. - М.: Стандартинформ, 2009. - 12 с
6. Гусев, А. М. Проявление пола в популяции овощных тыкв / А. М. Гусев. - М.: ТСХА, 1989. - 20-22 с.
7. Гуцалюк, Т. Г. От арбуза до тыквы / Т. Г. Гуцалюк // Алма-Ата: Алматы Китап. - 1989.
8. Домблидес, Е. А. Цитологическая оценка удвоенных гаплоидов кабачка (*Cucurbita Pepo* L.) / Е. А. Домблидес, Л. Ю. Кан, Г. А. Химич, И. Б. Коротцева, А. С. Домблидес // Овощи России. - 2018. - № 6. - С. 3-7.
9. Домблидес, Е. А. Получение удвоенных гаплоидов в культуре неопыленных семян кабачка (*Cucurbita pepo* L.) / Е. А. Домблидес, Н. А. Шмыкова, Т. В. Заячковская, Г. А. Химич, И. Б. Коротцева, Л. Ю. Кан, А. С. Домблидес // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты). - 2016. - С. 28-29.

10. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта / Б. А. Доспехов. - 1985.
11. Дютин, К. Е. Новые направления в селекции кабачка и патиссона / К. Е. Дютин, М. Е. Пучков. - 1996. - № 5. - С. 25.
12. Ермоленко, И. В. Биологические особенности и сроки уборки семенных плодов кабачка и тыквы / И. В. Ермоленко. - 1980. - 23 с.
13. Ермоленко, И. В. Кабачки / И. В. Ермоленко. - 1973. - Картофель и овощи. - №11.
14. Ермоленко, И. В. Фенотипическая изменчивость окраски семенных плодов патиссонов в зависимости от условий выращивания / И. В. Ермоленко. - 1974. - 68-71 с.
15. Кабачок — химический состав, пищевая ценность, БЖУ. [Электронный ресурс]. / FitAudit // - Режим доступа: <https://fitaudit.ru/food/121980>
16. Калягин, В. Н. Биология цветения и половые типы растений культивируемых видов тыквы (*Cucurbita* L.) / В. Н. Калягин. - Всесоюз. акад. с.-х. наук им. В. И. Ленина. Всесоюз. науч.-исслед. ин-т растениеводства им. Н. И. Вавилова, 1974.
17. Коротцева, И. Б. Основные направления и задачи селекции тыквенных культур / И. Б. Коротцева, Г. А. Химич // Овощи России. - 2015. - № 2. - С. 17-21.
18. Коротцева, И. Б. Направления работы и основные достижения лаборатории селекции и семеноводства тыквенных культур ВНИИССОК / И. Коротцева // Овощи России. - 2015. - № 3-4. - С. 54-57.
19. Литвинов, С. С. Методика полевого опыта в овощеводстве / С. С. Литвинов. - 2011.

20. Малецкий, С. И. Эпигеномная и эпипластомная изменчивость у гаплоидных и дигаплоидных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) / С. И. Малецкий, С. С. Юданова, Е. И. Малецкая // Сельскохозяйственная биология. - 2015. - № 5. - С. 579-589.
21. Методики испытаний на ООС [Электронный ресурс]. / «ФГБУ «Госсорткомиссия» // - Режим доступа: <https://gossortrf.ru/metodiki-ispytaniy-na-oos-2/>
22. Патиссон — химический состав, пищевая ценность, БЖУ. [Электронный ресурс]. / FitAudit // - Режим доступа: <https://fitaudit.ru/food/121974>
23. Паушева, З. П. Практикум по цитологии растений: по спец. «Агрономия» / З. П. Паушева. - Агропромиздат. - 1988. - 270 с.
24. Петриченко, В. Технология выращивания кабачка в южном регионе России и его переработка для использования в детском питании / В. Петриченко, С. Логинов, О. Туркина, М. Стукалов // Аграрная Россия. - 2015. - С. 19-21.
25. Пухальский, В. А. Практикум по цитологии и цитогенетике растений / В. А. Пухальский, А. А. Соловьев, Е. Д. Бадаева. - М.: Колос, 2007. - 198 с.
26. Скапцов, М. В. Проблемы стандартизации в проточной цитометрии растений / М. В. Скапцов, С. В. Смирнов, М. Г. Куцев, А. И. Шмаков // Turczaninowia. - 2016. - Т. 19. - № 3. - С. 120-122.
27. Слетова, М. Е. Видовой состав возбудителей настоящей мучнистой росы тыквенных культур / М. Е. Слетова // Овощи России. - 2022. - № 4. - С. 91-97.
28. Соколов, А. С. Особенности гибридного семеноводства бахчевых культур на основе материнских линий с различными типами мужской

стерильности: дис. ... кандидат с.-х. наук: 06.01.05 / Соколов Артем Сергеевич. - ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства», 2015. - 148 с.

29. Филов, А. И. Бахчеводство: для агрономических специальностей / А. И. Филов. - М.: Колос, 1969. - 263 с.

30. Фрукты и овощи. [Электронный ресурс]. / ФАО // - Режим доступа: - URL: <https://www.fao.org/3/cb2395en/online/src/html/fruit-and-vegetables.html>

31. Фурса, Т. Б. Селекция бахчевых культур: методические указания / Т. Б. Фурса. - Ленинград, ВИР : ВАСХНИЛ, ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова, 1988. - 78 с.

32. Чернявская, О. В. Изучение исходного материала и создание гетерозисных гибридов патиссона: дис. ... кандидат с.-х. наук: 06.01.05 / Чернявская Ольга Владимировна. - Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства, 2009. - 143 с.

33. Чистяков, А. А. Особенности селекции F1 гибридов кабачка / А. А. Чистяков, Г. Ф. Монахос // Картофель и овощи. - 2016. - Т. №6. - С. 39-40.

34. Шантасов, А. М. Особенности получения гибридных семян патиссона на основе использования линий с мужской стерильностью функционального типа / А. М. Шантасов, Г. К. Изтелеуова, А. С. Соколов, С. Д. Соколов // Аграрная наука—основа успешного развития АПК и сохранения экосистем. - 2012. - С. 122-124.

35. Шмыкова, Н. А. Индукция гиногенеза в культуре неопыленных семяпочек тыквы / Н. А. Шмыкова, Д. В. Шумилина, В. П. Кушнерёва, Г. А. Химич // Овощи России. - 2011. - № 1. - С. 28-31.

36. Aalders, L. E. Monoploidy in cucumbers / L. E. Aalders // Journal of Heredity. - 1958. - Vol. 49. - No 1. - Pp. 41-44.

37. Alexander, M. P. Differential Staining of Aborted and Nonaborted Pollen / M. P. Alexander // *Stain Technology*. - 1969. - Vol. 44. - No 3. - Pp. 117-122.
38. Aleza, P. Recovery and characterization of a *Citrus clementina* Hort. ex Tan.'Clemenules' haploid plant selected to establish the reference whole *Citrus* genome sequence / P. Aleza, J. Juárez, M. Hernández, J. A. Pina, P. Ollitrault, L. Navarro // *BMC Plant Biology*. - 2009. - Vol. 9. - No 1. - Pp. 1-17.
39. Anandhan, S. Variation in gynogenic potential for haploid induction in Indian short-day onions / S. Anandhan, A. A. Chavan, J. Gopal, S. R. Mote, P. V Shelke, K. E. Lawande // *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. - 2014. - Vol. 74. - No 4. - Pp. 526-528.
40. Arumuganathan, K. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry / K. Arumuganathan, E. D. Earle // *Plant Molecular Biology Reporter*. - 1991. - Vol. 9. - No 3. - Pp. 229-241.
41. Asadi, A. Production of Doubled Haploid Plants in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Through Anther Culture / A. Asadi, J. M. Seguí-Simarro // *Doubled Haploid Technology*. - Springer, 2021. - Pp. 71-85.
42. Asadi, A. Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.) / A. Asadi, A. Zebarjadi, M. R. Abdollahi, J. M. Seguí-Simarro // *Euphytica*. - 2018. - Vol. 214. - No 11. - Pp. 216.
43. Asahi, Y. Some factors affecting the chloroplast replication in the moss *Plagiomnium trichomanes* / Y. Asahi, S. Toyama // *Protoplasma*. - 1982. - Vol. 112. - Pp. 9-16.
44. Baktemur, G. Comparison of different methods for separation of haploid embryo induced through irradiated pollen and their economic analysis in melon (*Cucumis melo* var. *inodorus*) / G. Baktemur, H. Taşkin, S. Büyükalaca // *The Scientific World Journal*. - 2013. - Vol. 2013. - Pp. 1-8.

45. Baktemur, G. Effects of different genotypes and gamma ray doses on haploidization using irradiated pollen technique in squash / G. Baktemur, N. K. Yücel, H. Taşkin, S. Çömlekçioğlu, S. Büyükalaca // Turkish Journal of Biology. - 2014. - Vol. 38. - No 3. - Pp. 318-327.
46. Barow, M. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size / M. Barow, A. Meister // Plant, Cell & Environment. - 2003. - Vol. 26. - No 4. - Pp. 571-584.
47. Barow, M. Lack of correlation between AT frequency and genome size in higher plants and the effect of nonrandomness of base sequences on dye binding / M. Barow, A. Meister // Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology. - 2002. - Vol. 47. - No 1. - Pp. 1-7.
48. Bartoš, J. Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in Musa and Ensete (Musaceae): taxonomic implications / J. Bartoš, O. Alkhimova, M. Doleželová, E. De Langhe, J. Doležel // Cytogenetic and Genome Research. - 2005. - Vol. 109. - No 1-3. - Pp. 50-57.
49. Bartošová, Z. Using enzyme polymorphism to identify the gametic origin of flax regenerants / Z. Bartošová, B. Obert, T. Takac, A. Kormutak, A. Pretová // Acta Biol Cracov Bot. - 2005. - Vol. 47. - Pp. 173-178.
50. Belling, J. The Configurations and Sizes of the Chromosomes in the Trivalents of 25-Chromosome Daturas / J. Belling, A. F. Blakeslee // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 1924. - Vol. 10. - No 3. - Pp. 116-120.
51. Benepal, P. S. Nature and genetics of insect resistance in vegetable crops with particular reference to cucurbits / P. S. Benepal. - Kansas State University, 1967.

52. Bing, X. Improved conditions of in vitro culture of unpollinated ovules and production of embryonary sac plants in summer squash (*Cucurbita pepo* L.) / X. Bing, W. Xiufeng, F. Zhicheng // *Scientia Agricultura Sinica*. - 2006.
53. Blakeslee, A. F. A Haploid Mutant in the Jimson Weed, «*Datura stramonium*» / A. F. Blakeslee, J. Belling, M. E. Farnham, A. D. Bergner // *Science*. - 1922. - Vol. 55. - No 1433. - Pp. 646-647.
54. Bohanec, B. Ploidy determination using flow cytometry / B. Bohanec // *Doubled haploid production in crop plants*. - Springer, 2003. - Pp. 397-403.
55. Bouvier, L. Chromosome doubling of pear haploid plants and homozygosity assessment using isozyme and microsatellite markers / L. Bouvier, P. H. Guerif, M. Djulbic, C.-E. Durel, E. Chevreau, Y. Lespinasse // *Euphytica*. - 2002. - Vol. 123. - No 2. - Pp. 255-262.
56. Cao, H. Doubled haploid callus lines of Valencia sweet orange recovered from anther culture / H. Cao, M. K. Biswas, Y. Lü, M. H. Amar, Z. Tong, Q. Xu, J. Xu, W. Guo, X. Deng // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. - 2011. - Vol. 104. - No 3. - Pp. 415-423.
57. Chambonnet, D. Obtention of embryos and plants from in vitro culture of unfertilized ovules of *Cucurbita pepo* / D. Chambonnet, R. D. De Vaulx // *Cucurbit Genet Coop*. - 1985. - Vol. 8. - Pp. 66.
58. Chan, E. Improved androgenesis of interspecific potato and efficiency of SSR markers to identify homozygous regenerants / E. Chani, R. E. Veilleux, T. Boluarte-Medina // *Plant cell, tissue and organ culture*. - 2000. - Vol. 60. - No 2. - Pp. 101-112.
59. Chée, R. P. Optimizing embryogenic callus and embryo growth of a synthetic seed system for sweetpotato by varying media nutrient concentrations /

R. P. Chée, D. I. Leskovar, D. J. Cantliffe // Journal of the American Society For Horticultural Science. - 1992. - Vol. 117. - No 4. - Pp. 663-667.

60. Chen, J. Method for producing haploid, dihaploid and doubled haploid plants by isolated microspore culture / J. Chen, E. Vanek, M. Piepe // Patent Number: EP3328185B1 2020.

61. Chen, Y. Identification of microspore-derived plants in anther culture of flax (*Linum usitatissimum* L.) using molecular markers / Y. Chen, G. Hausner, E. Kenaschuk, D. Procnier, P. Dribnenki, G. Penner // Plant Cell Reports. - 1998. - Vol. 18. - No 1. - Pp. 44-48.

62. Choe, E. Improving in vivo maize doubled haploid production efficiency through early detection of false positives / E. Choe, C. H. Carbonero, K. Mulvaney, A. L. Rayburn, R. H. Mumm // Plant Breeding. - 2012. - Vol. 131. - No 3. - Pp. 399-401.

63. Comai, L. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling / L. Comai, K. Young, B. J. Till, S. H. Reynolds, E. A. Greene, C. A. Codomo, L. C. Enns, J. E. Johnson, C. Burtner, A. R. Odden // The Plant Journal. - 2004. - Vol. 37. - No 5. - Pp. 778-786.

64. Cornelis, M. P. V. D. Non-transgenic haploid inducer lines in cucurbits. / M. P. V. D., Cornelis // Patent Number: US20180317414A1. - 2017.

65. Danin-Poleg, Y. Development and characterization of microsatellite markers in Cucumis / Y. Danin-Poleg, N. Reis, G. Tzuri, N. Katzir // Theoretical and Applied Genetics. - 2001. - Vol. 102. - No 1. - Pp. 61-72.

66. d'Hooghvorst, I. Doubled Haploid Parthenogenetic Production of Melon 'Piel de Sapo' / I. d'Hooghvorst, O. Torrico, S. Nogués // Doubled Haploid Technology. - Springer, 2021. - Pp. 87-95.

67. Diao, W. P. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers / W. P. Diao, Y. Y. Jia, H. Song, X. Q. Zhang, Q. F. Lou, J. F. Chen // *Scientia Horticulturae*. - 2009. - Vol. 119. - No 3. - Pp. 246-251.
68. Dirks, R. Method for the production of double-haploid cucumbers. / R. Dirks // Patent Number: US5492827A. - 1996.
69. Domblides, E. A. Production of Doubled Haploids in cucumber / E. A. Domblides, S. N. Belov, A. V. Soldatenko, V. F. Pivovarov // *Vegetable crops of Russia*. - 2019. - Vol. 7132. - No 5. - Pp. 3-14.
70. Domblides, E. A. Obtaining doubled haploids of *Cucurbita pepo* L. / E. A. Domblides, A. S. Ermolaev, S. N. Belov. - 2021.
71. Domblides, E. A. Production of doubled haploid plants of Cucurbitaceae family crops through unpollinated ovule culture in vitro / E. A. Domblides, N. Shmykova, G. Khimich, I. Korotseva, L. Kan, A. Domblides, V. Pivovarov, A. Soldatenko // VI International Symposium on Cucurbits 1294. - 2019. - Pp. 19-28.
72. Dong, Y. Q. Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species / Y. Q. Dong, W. X. Zhao, X. H. Li, X. C. Liu, N. N. Gao, J. H. Huang, W. Y. Wang, X. L. Xu, Z. H. Tang // *Plant Cell Reports*. - 2016. - Vol. 35. - No 10. - Pp. 1991-2019.
73. Dumas de Vaulx, R. Obtention de plantes haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) apres pollinisation par *Cucumis ficifolius* A / R. Dumas de Vaulx // *Rich CR Acad Sci III-Vie*. - 1979. - Vol. 289. - Pp. 875-878.
74. Dunwell, J. M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation / J. M. Dunwell // *Plant Biotechnology Journal*. - 2010. - Vol. 8. - No 4. - Pp. 377-424.
75. Ebrahimzadeh, H. Production of Haploids in *Cucurbita pepo* L. through Parthenogenesis Induced by Gamma-Irradiated Pollen / ن. ا. ح. ي. ر. ب. ا. م. ا. گ. ش. ن. ا. د. ر. //

H. / 40 : 60 تشک دندش . سپ زا دشر هچهایگ یاه یرذب و ندیسر مناخگ ی تاقیقحت سیدرپ
Ebrahimzadeh, M. Lotfi, F. Ghanavati. - 2013. - Pp. 99-108.

76. Ebrahimzadeh, H. Parthenogenetic Haploid Plant Production in Styrian Pumpkin by Gamma Irradiated Pollen / H. Ebrahimzadeh, M. Lotfi, M. Sadat-Hosseini // International Journal of Horticultural Science and Technology. - 2021. - Vol. 8. - No 3. - Pp. 305-314.

77. FAOSTAT. [Электронный ресурс]. / ФАО // - Режим доступа: - URL: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>

78. Ficcadenti, N. Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato / N. Ficcadenti, S. Sestili, T. Pandolfini, C. Cirillo, G. L. Rotino, A. Spina // Molecular Breeding. - 1999. - Vol. 5. - No 5. - Pp. 463-470.

79. Gałazka, J. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits / J. Gałazka, K. Niemirowicz-Szczytt // Folia Horticulturae. - 2013. - Vol. 25. - No 1. - Pp. 67-78.

80. Garcia-Arias, F. Fertility recovery of anther-derived haploid plants in Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) / F. Garcia-Arias, E. Sánchez-Betancourt, V. Núñez // Agronomía Colombiana. - 2018. - Vol. 36. - No 3. - Pp. 201-209.

81. Gasmanova, N. Genome size variation of *Lotus peregrinus* at evolution canyon I microsite, Lower Nahal Oren, Mt. Carmel, Israel / N. Gasmanova, A. Lebeda, I. Doležalová, T. Cohen, T. Pavlíček, T. Fahima, E. Nevo // Acta Biologica Cracoviensia series Botanica. - 2007. - Vol. 49. - No 1. - Pp. 39-46.

82. Geiger, H. H. Doubled haploids in hybrid maize breeding. / H. H. Geiger, G. A. Gordillo // Maydica. - 2009. - Vol. 54. - No 4. - Pp. 485.

83. Gémes-Juhász, A. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on in vitro gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.) / A.

Gémes-Juhász, P. Balogh, A. Ferenczy, Z. Kristóf // Plant Cell Reports. - 2002. - Vol. 21. - No 2. - Pp. 105-111.

84. Gémesné Juhász, A. Haploid plant induction in zucchini (*cucurbita pepo* l. Convar. Giromontiina duch) and in cucumber (*cucumis sativus* l.) Lines through in vitro gynogenesis / A. Gémesné Juhász, G. Venczel, P. Balogh // Acta Horticulturae. - 1997. - No 447. - Pp. 623-626.

85. Gilissen, L. J. W. Development of polysomaty in seedlings and plants of *Cucumis sativus* L. / L. J. W. Gilissen, M. J. van Staveren, J. Creemers-Molenaar, H. A. Verhoeven // Plant Science. - 1993. - Vol. 91. - No 2. - Pp. 171-179.

86. Global Pumpkin Imports Peak at \$1.6B - News and Statistics [Электронный ресурс]. / IndexBox // - URL: <https://www.indexbox.io/blog/global-pumpkin-market-2021-key-insights/>

87. Górecka, K. Carrot Doubled Haploids / K. Górecka, D. Krzyżanowska, W. Kiszczak, U. Kowalska, R. Górecki // Advances in Haploid Production in Higher Plants. - Dordrecht : Springer Netherlands, 2009. - Pp. 231-239.

88. Groot, E. D. Triploid watermelon plants with a bush growth habit / E. D. Groot, E. Chiapparino // Patent Number: EP2 814 316B1. - 2021.

89. Harland, S. C. Plant Breeding: Present Position and Future Perspective. Cambridge: University Press. / S. C. Harland // Plant breeding: present position and future perspective. IIIrd Bateson Lecture. - 1955.

90. Harland, S. C. The genetical conception of the species / S. C. Harland // Biological Reviews. - 1936. - Vol. 11. - No 1. - Pp. 83-112.

91. Hayase H. Cucurbita-crosses. V. Occurrence of a haploid twin pair from a F1 progeny of *C. maximta* x *C. moschata*. / H. Hayase // *Ikushugaku zasshi*. - 1954. - Vol. 4. - No 2. - Pp. 115-121.
92. Ho, K. M. Mingo barley / K. M. Ho, G. E. Jones // *Canadian Journal of Plant Science*. - 1980. - Vol. 60. - No 1. - Pp. 279-280.
93. Höfer, M. Characterization of plant material obtained by in vitro androgenesis and in situ parthenogenesis in apple / M. Höfer, C. Grafe, A. Boudichevskaja, A. Lopez, M. A. Bueno, D. Roen // *Scientia horticulturae*. - 2008. - Vol. 117. - No 3. - Pp. 203-211.
94. Hofinger, B. J. Validation of doubled haploid plants by enzymatic mismatch cleavage / B. J. Hofinger, O. A. Huynh, J. Jankowicz-Cieslak, A. Müller, I. Otto, J. Kumlehn, B. J. Till // *Plant methods*. - 2013. - Vol. 9. - No 1. - Pp. 1-10.
95. Hooghvorst, I. Opportunities and Challenges in Doubled Haploids and Haploid Inducer-Mediated Genome-Editing Systems in Cucurbits / I. Hooghvorst, S. Nogués // *Agronomy*. - 2020. - Vol. 10. - No 9. - Pp. 1441.
96. Irikova, T. Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro / T. Irikova, S. Grozeva, V. Rodeva // *Acta physiologiae plantarum*. - 2011. - Vol. 33. - No 5. - Pp. 1559-1570.
97. Jankowicz-Cieslak J. Reverse-genetics by tilling expands through the plant kingdom / J. Jankowicz-Cieslak, O. A. Huynh, S. Bado, M. Matijevic, B. J. Till // *Emirates Journal of Food and Agriculture*. - 2011. - Pp. 290-300.
98. Kawano, M. Production of doubled-haploid (DH) selfed-progenies in 'Banpei-yu' pummelo [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] and its genetic analysis with simple sequence repeat markers / M. Kawano, M. Yahata, T. Shimizu, C. Honsho, T. Hirano, H. Kunitake // *Scientia Horticulturae*. - 2021. - Vol. 277. - Pp. 109782.

99. Keleş, D. Effect of pepper types on obtaining spontaneous doubled haploid plants via anther culture / D. Keleş, H. Pınar, A. Ata, H. Taşkın, S. Yıldız, S. Büyükalaca // HortScience. - 2015. - Vol. 50. - No 11. - Pp. 1671-1676.
100. Kernan, Z. Microspore embryogenesis and the development of a double haploidy protocol for cow cockle (*Saponaria vaccaria*) / Z. Kernan, A. M. R. Ferrie // Plant cell reports. - 2006. - Vol. 25. - No 4. - Pp. 274-280.
101. Kihara, H. Triploid watermelons / H. Kihara // Amer. Soc. Hort. Sci. Proc. - 1951. - Vol. 58. - Pp. 217-230.
102. Kiszczak, W. Production of Homozygous Carrot (*Daucus carota* L.) Plants by Anther Culture / W. Kiszczak, M. Burian, U. Kowalska, K. Górecka // Doubled Haploid Technology. - Springer, 2021. - Pp. 113-126.
103. Kiszczak, W. Production of Homozygous Red Beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) Plants by Ovule Culture / W. Kiszczak, M. Burian, U. Kowalska, K. Górecka, M. Podwyszyńska // Doubled Haploid Technology. - Springer, 2021. - Pp. 301-312.
104. Košmrlj, K. Haploid Induction in Hull-less Seed Pumpkin through Parthenogenesis Induced by X-ray-irradiated Pollen / K. Košmrlj, J. Murovec, B. Bohanec // Journal of the American Society for Horticultural Science. - 2013. - Vol. 138. - No 4. - Pp. 310-316.
105. Kurowska, M. TILLING-a shortcut in functional genomics / M. Kurowska, A. Daszkowska-Golec, D. Gruszka, M. Marzec, M. Szurman, I. Szarejko, M. Maluszynski // Journal of applied genetics. - 2011. - Vol. 52. - No 4. - Pp. 371-390.
106. Kurtar, E. S. Hıyara (*Cucumis sativus* L.) Anaç Olabilecek Ümitvar Kabak (*Cucurbita* spp.) Genotiplerinde Işınlanmış Polen Tekniği İle Dihaploidizasyon / E. S. Kurtar, A. Balkaya, M. Göçmen // Selcuk Journal of Agricultural and Food Sciences. - 2017. - Vol. 31. - No 1. - Pp. 34-41.

107. Kurtar, E. S. Evaluation of haploidization efficiency in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) through anther culture / E. S. Kurtar, A. Balkaya, D. Kandemir // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. - 2016. - Vol. 127. - No 2. - Pp. 497-511.
108. Kurtar, E. S. Induction of haploid embryo and plant regeneration via irradiated pollen technique in pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex. Poir) / E. S. Kurtar, A. Balkaya, M. Ozbakir, T. Ofluoglu // *African Journal of Biotechnology*. - 2009. - Vol. 8. - No 21. - Pp. 5944-5951.
109. Kurtar, E. S. Production of in vitro haploid plants from in situ induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via irradiated pollen / E. S. Kurtar, A. Balkaya // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. - 2010. - Vol. 102. - No 3. - Pp. 267-277.
110. Kurtar, E. S. Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.) / E. S. Kurtar, N. SarI, K. Abak // *Euphytica*. - 2002. - Vol. 127. - No 3. - Pp. 335-344.
111. Kurtar, E. S. Anther Culture in *Cucurbita* Species / E. S. Kurtar, M. Seymen // *Doubled Haploid Technology*. - Springer, 2021. - Pp. 111-121.
112. Kurtar, E. S. Dihaploidization in promising summer squash genotypes (*Cucurbita pepo* L.) via irradiated pollen technique / E. S. Kurtar, M. Seymen, A. N. Çetin, Ö. Türkmen // *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences*. - 2021. - Vol. 31. - No 1. - Pp. 42-51.
113. Kurtar, E. S. Gynogenesis in *Cucurbita* Species / E. S. Kurtar, M. Seymen // *Doubled Haploid Technology*. - Springer, 2021. - Pp. 123-133.
114. Kurtar, E. S. Induction of Parthenogenesis by Irradiated Pollen in *Cucurbita* Species / E. S. Kurtar, M. Seymen // *Doubled Haploid Technology*. - Springer, 2021. - Pp. 135-145.

115. Kurtar, E. S. An overview of doubled haploid plant production in Cucurbita species / E. S. Kurtar, M. Seymen, K. A. L. Ünal // Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi. - 2020. - Vol. 30. - No 3. - Pp. 510-520.
116. Lichter, R. Induction of Haploid Plants From Isolated Pollen of Brassica napus / R. Lichter // Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. - 1982. - Vol. 105. - No 5. - Pp. 427-434.
117. Lotfi, M. Detection of cucumber parthenogenic haploid embryos by floating of immature seeds in liquid medium / M. Lotfi, S. Salehi // IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae. - 2008. - Pp. 375-380.
118. Malik, A. A. Efficiency of SSR markers for determining the origin of melon plantlets derived through unfertilized ovary culture / A. A. Malik, C. Li, Z. Shuxia, C. Jin-feng // Horticultural Science. - 2011. - Vol. 38. - No 1. - Pp. 27-34.
119. Maluszynski, M. Doubled haploid production in crop plants: a manual / M. Maluszynski [и др.]. - Springer Science & Business Media, 2003.
120. Marie, D. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species / D. Marie, S. C. Brown // Biology of the Cell. - 1993. - Vol. 78. - No 1-2. - Pp. 41-51.
121. Masuda, K. A revision of the medium for somatic embryogenesis in carrot suspension culture / K. Masuda, Y. Kikuta, Y. Okazawa // Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University. - 1981. - Vol. 60. - No 3. - Pp. 183-193.
122. Metwally, E. I. Production of haploid plants from in vitro culture of unpollinated ovules of Cucurbita pepo / E. I. Metwally, S. A. Moustafa, B. I. El-Sawy, S. A. Haroun, T. A. Shalaby // Plant cell, tissue and organ culture. - 1998. - Vol. 52. - No 3. - Pp. 117-121.

123. Metwally, E. I. Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo* / E. I. Metwally, S. A. Moustafa, B. I. El-Sawy, T. A. Shalaby // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. - 1998. - Vol. 52. - No 3. - Pp. 171-176.
124. Min, Z. Studies of in vitro culture and plant regeneration of unfertilized ovary of pumpkin / Z. Min, H. Li, T. Zou, L. Tong, J. Cheng, X. Sun // *Chinese Bulletin of Botany*. - 2016. - Vol. 51. - No 1. - Pp. 74.
125. Mohamed, M. F. Enhanced Haploids Regeneration in Anther Culture of Summer Squash (*Cucurbita pepo* L.) / M. F. Mohamed, E. F. S. Refaei // *Cucurbit Genetics Cooperative Report*. - 2004. - Vol. 27. - No January 2004. - Pp. 57-60.
126. Monakhos, S. G. A relationship between ploidy level and the number of chloroplasts in stomatal guard cells in diploid and amphidiploid Brassica species / S. G. Monakhos, M. L. Nguen, A. V Bezbozhnaya, G. F. Monakhos // *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*. - 2014. - No 5 (eng).
127. Munyon, I. P. Origin of plantlets and callus obtained from chile pepper anther cultures / I. P. Munyon, J. F. Hubstenberger, G. C. Phillips // *In vitro cellular & developmental biology*. - 1989. - Vol. 25. - No 3. - Pp. 293-296.
128. Murashige, T. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiologia Plantarum*. - 1962. - Vol. 15. - No 3. - Pp. 473-497.
129. Murovec, J. Microsatellite marker for homozygosity testing of putative doubled haploids and characterization of *Mimulus* species derived by a cross-genera approach / J. Murovec, N. Stajner, J. Jakse, B. Javornik // *Journal of the American Society for Horticultural Science*. - 2007. - Vol. 132. - No 5. - Pp. 659-663.
130. Nelson, M. N. Microspore culture preferentially selects unreduced (2n) gametes from an interspecific hybrid of *Brassica napus* L. × *Brassica carinata*

Braun / M. N. Nelson, A. S. Mason, M.-C. Castello, L. Thomson, G. Yan, W. A. Cowling // Theoretical and applied genetics. - 2009. - Vol. 119. - No 3. - Pp. 497-505.

131. Niemirowicz-Szczytt, K. Preliminary data on haploid cucumber (*Cucumis sativus* L.) induction / K. Niemirowicz-Szczytt, R. Dumas de Vaulx // Cucurbit Genet Coop. - 1989. - Vol. 12. - Pp. 24-25.

132. Nitsch, C. Factors Favoring the Formation of Androgenetic Embryos in Anther Culture / C. Nitsch, B. Norreel. // Genes, Enzymes, and Populations : Basic Life Sciences / ред. A. M. Srb. - Boston, MA : Springer US, 1973. - Pp. 129-144.

133. Ochatt, S. J. Flow cytometry in plant breeding / S. J. Ochatt // Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology. - 2008. - Vol. 73. - No 7. - Pp. 581-598.

134. Ochatt, S. J. Ploidy level determination within the context of in vitro breeding / S. J. Ochatt, E. M. Patat-Ochatt, A. Moessner // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). - 2011. - Vol. 104. - No 3. - Pp. 329-341.

135. Olszewska, M. J. DNA endoreplication and increase in number of chloroplasts during leaf differentiation in five monocotyledonous species with different 2 C DNA contents / M. J. Olszewska, B. Damsz, E. Rabeda // Protoplasma. - 1983. - Vol. 116. - No 1. - Pp. 41-50.

136. Paris, H. S. A proposed subspecific classification for *Cucurbita pepo* / H. S. Paris // Phytologia (USA). - 1986.

137. Paris, H. S. Consumer-oriented exploitation and conservation of genetic resources of pumpkins and squash, *Cucurbita* / H. S. Paris // Israel Journal of Plant Sciences. - 2018. - Vol. 65. - No 3-4. - Pp. 202-221.

138. Paris, H. S. Germplasm enhancement of *Cucurbita pepo* (pumpkin, squash, gourd: Cucurbitaceae): progress and challenges / H. S. Paris // *Euphytica*. - 2016. - Vol. 208. - No 3. - Pp. 415-438.
139. Paris, H. S. Historical records, origins, and development of the edible cultivar groups of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) / H. S. Paris // *Economic Botany*. - 1989. - Vol. 43. - No 4. - Pp. 423-443.
140. Paris, H. S. The dominant Wf (white flesh) allele is necessary for expression of “white” mature fruit color in *Cucurbita pepo* / H. S. Paris // *Cucurbitaceae*. - 1995. - Vol. 94. - Pp. 219-220.
141. Pellicer, J. The Plant DNA C-values database (release 7.1): an updated online repository of plant genome size data for comparative studies / J. Pellicer, I. J. Leitch // *The New Phytologist*. - 2020. - Vol. 226. - The Plant DNA C-values database (release 7.1). - No 2. - Pp. 301-305.
142. Perera, P. I. P. Use of SSR markers to determine the anther-derived homozygous lines in coconut / P. I. P. Perera, L. Perera, V. Hoher, J.-L. Verdeil, D. M. D. Yakandawala, L. K. Weerakoon // *Plant cell reports*. - 2008. - Vol. 27. - No 11. - Pp. 1697-1703.
143. Pfosser, M. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines / M. Pfosser, E. Heberle-Bors, A. Amon, T. Lelley // *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. - 1995. - Vol. 21. - No 4. - Pp. 387-393.
144. Plant DNA C-values Database [Электронный ресурс]. / Royal Botanic Gardens, Kew // - Режим доступа: <https://cvalues.science.kew.org/>
145. Poole, C. F. Inheritance of new sex forms in *Cucumis melo* L. / C. F. Poole, P. C. Grimball // *Journal of Heredity*. - 1939. - Vol. 30. - No 1. - Pp. 21-25.

146. Possingham, J. V. Changes in chloroplast number per cell during leaf development in spinach / J. V. Possingham, W. Saurer // *Planta*. - 1969. - Vol. 86. - No 2. - Pp. 186-194.
147. Przyborowski, J. A. Haploidy in cucumber (*Cucumis sativus* L.) / J. A. Przyborowski. - 1996. - Pp. 91-98.
148. Rakha, M. T. Evaluation of regenerated strains from six 'Cucurbita' interspecific hybrids obtained through anther and ovule 'in vitro' cultures / M. T. Rakha, E. I. Metwally, S. A. Moustafa, A. A. Etman, Y. H. Dewir // *Australian Journal of Crop Science*. - 2012. - Vol. 6. - No 1. - Pp. 23-30.
149. Rayburn, A. L. C-band heterochromatin and DNA content in *Zea mays* / A. L. Rayburn, H. J. Price, J. Smith, J. R. Gold // *American Journal of Botany*. - 1985. - Vol. 72. - No 10. - Pp. 1610-1617.
150. Ribeiro, C. B. Haploid identification using tropicalized haploid inducer progenies in maize / C. B. Ribeiro, F. de C. Pereira, L. da Nóbrega, B. A. Rezende, K. O. das G. Dias, G. T. Braz, M. C. Ruy, M. B. Silva, G. Cenzi, V. H. Techio // *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. - 2018. - Vol. 18. - Pp. 16-23.
151. Sait, K. E. Production of callus mediated gynogenic haploids in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) / K. E. Sait, B. Ahmet, O. M. Ozbakir // *Czech journal of genetics and plant breeding*. - 2018. - Vol. 54. - No 1. - Pp. 9-16.
152. San Noeum, L. H. Haploides d'*Hordeum vulgare* L. par culture in vitro non fecondes. / L. H. San Noeum // *Ann. Amelior Plantes*. - 1976. - Vol. 26. - Pp. 751-754.
153. Sarı, N. Induction of parthenogenetic haploid embryos after pollination by irradiated pollen in watermelon / N. Sarı, K. Abak, M. Pitrat, J. C. Rode, R. D. Vaulx // *HortScience*. - 1994. - Vol. 29.

154. Sauton, A. Obtention de plantes haploïdes chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogénèse induite par du pollen irradié / A. Sauton, R. Dumas Vaulx // *Agronomie*. - 1987. - Vol. 7. - No 2. - Pp. 141-148.
155. Sauton, A. Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen / A. Sauton // *Cucurbit Genetics Coop.* - 1989. - Vol. 12. - Pp. 22-23.
156. Seguí-Simarro, J. M. Species with haploid or doubled haploid protocols / J. M. Seguí-Simarro, J. B. Moreno, M. G. Fernández, R. Mir // *Doubled Haploid Technology*. - Springer, 2021. - Pp. 41-103.
157. Shail, J. W. Anther and ovule culture of *Cucurbita* / J. W. Shail, R. W. Robinson // *Cucurbit Genet Coop.* - 1987. - Vol. 10. - Pp. 92.
158. Shalaby, T. A. Embryogenesis and plantlets regeneration from anther culture of squash plants (*Cucurbita pepo* L.) as affected by different genotypes / T. A. Shalaby // *J Agric Res Tanta Univ.* - 2006. - Vol. 32. - No 1. - Pp. 173-183.
159. Shalaby T. A. Factors affecting haploid induction through in vitro gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.) / T. A. Shalaby // *Scientia horticulturae*. - 2007. - Vol. 115. - No 1. - Pp. 1-6.
160. Sharma, S. Phenotypic characterization and nuclear microsatellite analysis reveal genomic changes and rearrangements underlying androgenesis in tetraploid potatoes (*Solanum tuberosum* L.) / S. Sharma, D. Sarkar, S. K. Pandey // *Euphytica*. - 2010. - Vol. 171. - No 3. - Pp. 313-326.
161. Shifriss, O. Genetics and origin of the bicolor gourds / O. Shifriss // *Journal of Heredity*. - 1955. - Vol. 46. - No 5. - Pp. 213-212.
162. Silva, H. A. da. Effect of ploidy level on guard cell length and use of stomata to discard diploids among putative haploids in maize / H. A. da Silva, C. A. Scapim, J. M. S. Vivas, A. T. do Amaral, R. J. B. Pinto, K. S. M. Mourão, R.

- M. Rossi, A. G. Baleroni // Crop Science. - 2020. - Vol. 60. - No 3. - Pp. 1199-1209.
163. Singh, R. J. Plant cytogenetics CRC Press / R. J. Singh // Boca Raton. - 2003.
164. Sinha, S. In vitro development of callus from anthers in *Luffa cylindrica* / S. Sinha, K. K. Jha, R. P. Roy // Current science. - 1979.
165. SiteSoft. Byulleteni o sostoyanii sel'skogo khozyaystva [Электронный ресурс] / Federal State Statistics Service // - Режим доступа: - URL: <https://rosstat.gov.ru/compendium/document/13277>
166. Slade, A. J. Development of high amylose wheat through TILLING / A. J. Slade, C. McGuire, D. Loeffler, J. Mullenberg, W. Skinner, G. Fazio, A. Holm, K. M. Brandt, M. N. Steine, J. F. Goodstal // BMC plant biology. - 2012. - Vol. 12. - No 1. - Pp. 1-17.
167. Snowdon, R. J. Cytogenetics and genome analysis in Brassica crops / R. J. Snowdon // Chromosome Research. - 2007. - Vol. 15. - No 1. - Pp. 85-95.
168. Song, H. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.) / H. Song, Q.-F. F. Lou, X.-D. D. Luo, J. N. Wolukau, W.-P. P. Diao, C.-T. T. Qian, J.-F. F. Chen // Plant cell, tissue and organ culture. - 2007. - Vol. 90. - No 3. - Pp. 245-254.
169. Suprunova, T. In vitro induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus* / T. Suprunova, N. Shmykova, M. Pitrat // Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae. - 2008. - Pp. 371-374.

170. Swaminathan, M. S. X-ray induced somatic haploidy in watermelon / M. S. Swaminathan, M. P. Singh // *Current Science*. - 1958. - Vol. 27. - No 2. - Pp. 63-64.
171. Takahira, J. Improvement in efficiency of microspore culture to produce doubled haploid canola (*Brassica napus* L.) by flow cytometry / J. Takahira, A. Cousin, M. N. Nelson, W. A. Cowling // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. - 2011. - Vol. 104. - No 1. - Pp. 51-59.
172. Tatum, T. C. Genome size variation in pumpkin (*Cucurbita* sp.) / T. C. Tatum, L. Nunez, M. M. Kushad, A. I. Rayburn // *Annals of Applied Biology*. - 2006. - Vol. 149. - No 2. - Pp. 145-151.
173. Thompson, K. F. Oil-seed rape / K. F. Thompson. - Cambridge, UK, 1972. - 94-96 c.
174. Till, B. J. Discovery of nucleotide polymorphisms in the *Musa* gene pool by Ecotilling / B. J. Till, J. Jankowicz-Cieslak, L. Sági, O. A. Huynh, H. Utsushi, R. Swennen, R. Terauchi, C. Mba // *Theoretical and applied genetics*. - 2010. - Vol. 121. - No 7. - Pp. 1381-1389.
175. Till, B. J. A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals / B. J. Till, T. Zerr, L. Comai, S. Henikoff // *Nature protocols*. - 2006. - Vol. 1. - No 5. - Pp. 2465-2477.
176. Truong-Andre, I. In vitro haploid plants derived from pollination by irradiated pollen on cucumber / I. Truong-Andre // *Eucarpia meeting on cucurbit genetics and breeding, Montfavet (France), 31 May-2 Jun 1988*. - INRA, 1988.
177. Value Added Other Marrow products export company and exporters in Russia. khozyaystva [Электронный ресурс] / Tridge // - Режим доступа: <https://www.tridge.com/intelligences/canned-other-marrow-products/RU/export>

178. Varshney, R. K. A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci / R. K. Varshney, T. C. Marcel, L. Ramsay, J. Russell, M. S. Röder, N. Stein, R. Waugh, P. Langridge, R. E. Niks, A. Graner // Theoretical and Applied Genetics. - 2007. - Vol. 114. - No 6. - Pp. 1091-1103.
179. Vaulx, R. D. de. Obtention Of Embryos And Plants From In Vitro Culture Of Unfertilized Ovules Of Cucurbita Pepo / R. D. de Vaulx, D. Chambonnet // Genetic Manipulation in Plant Breeding. - De Gruyter, 1986. - Pp. 295-298.
180. Waminal, N. E. Dual-color FISH karyotype analyses using rDNAs in three Cucurbitaceae species / N. E. Waminal, N.-S. Kim, H. H. Kim // Genes & Genomics. - 2011. - Vol. 33. - No 5. - Pp. 521-528.
181. Wang, S.-M. Recovery and characterization of homozygous lines from two sweet orange cultivars via anther culture / S.-M. Wang, H. Lan, H.-B. Cao, Q. Xu, C.-L. Chen, X.-X. Deng, W.-W. Guo // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). - 2015. - Vol. 123. - No 3. - Pp. 633-644.
182. Xiang, C. A high-density EST-SSR-based genetic map and QTL analysis of dwarf trait in Cucurbita pepo L. / C. Xiang, Y. Duan, H. Li, W. Ma, S. Huang, X. Sui, Z. Zhang, C. Wang // International journal of molecular sciences. - 2018. - Vol. 19. - No 10. - Pp. 3140.
183. Xue, G. R. Yu WY, Fei KW, Watermelon plants derived by in vitro anther culture / G. R. Xue, W. Y. Yu, K. W. Fei, H. N. Cui, R. X. Sun, X. GR // Plant Physiol Commun (CHN). - 1983. - Vol. 4. - Pp. 4-42.
184. Yuan, S. Study on the relationship between the ploidy level of microspore-derived plants and the number of chloroplast in stomatal guard cells in Brassica oleracea / S. Yuan, Y.-M. Liu, Z.-Y. Fang, L.-M. Yang, M. Zhuang, Y.-Y. Zhang, P.-T. Sun // Agricultural Sciences in China. - 2009. - Vol. 8. - No 8. - Pp. 939-946.

185. Zachleder, V. The effect of light on the number of chloroplast nucleoids in daughter cells of the alga *Scenedesmus quadricauda* / V. Zachleder, V. Cepák // *Protoplasma*. - 1987. - Vol. 138. - No 1. - Pp. 37-44.

186. Zachleder, V. Variations in chloroplast nucleoid number during the cell cycle in the alga *Scenedesmus quadricauda* grown under different light conditions / V. Zachleder, V. Cepák // *Protoplasma*. - 1987. - Vol. 141. - No 1. - Pp. 74-82.

187. Zhang, X. Triploid hybrid watermelon plants / X. Zhang. - 2007. - URL: [https://patents.google.com/patent/US7238866B2/en?q=\(triploid\)&oq=triploid+](https://patents.google.com/patent/US7238866B2/en?q=(triploid)&oq=triploid+) (дата обращения: 11.08.2023). - Текст : электронный.

188. Zhang, Z. Effects of sunlight and temperature on ultrastructure and functions of chloroplast of cucumber in solar greenhouse / Z. Zhang, Y. Guo, X. Ai, F. Zhang, Q. He, X. Sun, Z. Jiao // *Ying yong sheng tai xue bao* = The journal of applied ecology. - 2003. - Vol. 14. - No 8. - Pp. 1287-1290.

189. Zhu, L. Genome Wide Characterization, Comparative and Genetic Diversity Analysis of Simple Sequence Repeats in Cucurbita Species / L. Zhu, H. Zhu, Y. Li, Y. Wang, X. Wu, J. Li, Z. Zhang, Y. Wang, J. Hu, S. Yang // *Horticulturae*. - 2021. - Vol. 7. - No 6. - Pp. 143.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А – Краткие протоколы индукции гаплоидов *Cucurbita pepo* L. путем опыления облученной пылью

Генотип донорного растения	Источник излучени я / доза облучени я (Gy)	Возраст зародыша (недель после опыления)	Индукционная среда	Регенерационная среда	Температурный режим	Метод определени я плоидности	Идентифицированная плоидность	Литературные источники
Eskenderany, Acceste, Sakız, Urfa Yerli	25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 (Co 60)	4–5 недель	E20A + S 20 г/л + A 10 г/л + IAA 0,01 мг/л	E20A + S 20 г/л + A 10 г/л + IAA 0,01 мг/л	28 ± 1°C, Ph16/8, 3000 Lx	ППХ	H-43,7%, DH- 56,3%	[118]
-	25, 50, 75, 100, 200 (Co 60)	-	-	-	-	МА, ПЦ	H-38,6%, DH-61,4%	[76]
14 селекционны х образцов	150, 200, 300 (Co 60)	4–5 недель	CP + S 30 г/л + A 8 г/л + B12 0,08 мг/л + IAA 0,02 мг/л	-	25°C, Ph 16/8	-	H-11%, DH-89%	[81]
17 селекционны х образцов	150 (Co 60)	3-4 недели	MS + S 30 г/л + A 7 г/л + IAA 0,1 мг/л		26°C±1°C, Ph16/8, 3000 Lx	МА	H, DH	[115]

Продолжение приложения А

14 селекционных образцов	150 (Co 60)	3-4 недели	E20A + S 20 г/л + A 8 г/л + IAA 0,01 г/л	MS + S 30 г/л + A 7 г/л + IAA 0,1 мг/л + BAP1,0 мг/л	28°C±1°C, Ph16/8 5000 Lx	МА	Н, ДН	[121]
Gleisdorfer O'' lku''rbis, GL Opal, GL Maximal, Gleisdorfer Diamant, Beppo, Elite F1, Slovenska golica, Rumena golica, Yellow Long, Turkey #2, Naked Seed, White Acorn, Muscade de Provence	0, 50, 100, 150, 200, 300, 350 (X-ray)	4 недели	E20A + S 20 г/л + A 10 г/л + IAA 0,01 мг/л	E20A + S 20 г/л + A 10 г/л + IAA 0,01 мг/л	23°C, Ph16/8	ПЦ	Н, ДН, TrP, TeP	[114]

Примечания: б/г – безгормональная среда; Без х. о. – без холодной предобработки; с. – сутки; Ph – фотопериод; Pht – фитогель; А – агар; Амр - ампицилин; G – глюкоза; S – сахароза; FL - утром в день раскрытия цветка; FL – за сутки/ до распускания цветка; FL – за 2 суток до распускания цветка; С – индукционная питательная среда; ИМС – индукционная питательная среда для тыквенных; СВМ – базальная среда для огурца; ДН – (doubled haploid) Удвоенный гаплоид; Н – (haploid) гаплоид; М – (mixoploid) миксоплоид; AnP – (aneuploid) анеуплоид; TrP – (triploid) триплоид; TeP – (tetraploid) тетраплоид; ППХ – (chromosome counting) прямой подсчет хромосом; ПЦ – (flow cytometry) проточная цитометрия; ЦА – (counting chloroplasts in guard cells) цитологический анализ (количество хлоропластов в замыкающей клетках устьиц); МА – (morphological analysis) морфологический анализ

Приложение Б – Краткие протоколы индукции гаплоидов *Cucurbita pepo* L. в культуре пыльников *in vitro*

Генотип донорно го растения	Холодовая предобрабо тка	Индукцион ная среда (mg/l)	Условия культивиров ания до образования каллуса	Регенерац ионная среда	Условия регенера ции каллуса	Условия культивиров ания растений R0	Метод определе ния плоиднос ти	Идентифициров анная плоидность	Литератур ные источники
Eskandar ani	4°C - 4 с.	MS + S (30, 60, 90, 120, 150 г/л) + A 8 г/л + 2,4-D (0,1, 1,0, 2,5, 5) мг/л.	в темноте 35 °C в течение 7 с., далее в темноте 25 °C в течение 28 с.	MS + S 30 г/л + A 8 г/л + KT 0,05 мг/л + NAA 0,05 мг/л; MS 6/г	25 ± 1 °C, Ph 16/8, 1000 Lx, (4 недели);	25 °C, Ph16/8, 3000 Lx (4 недели)	ППХ	H-50%, DH-50%	[100]
Eskandar an	4°C - 4 с.	MS + S 100 г/л + A 8 г/л + 6 мг/л 2,4- Д	в темноте 35°C в течение 7 с., далее 4 недели 25°C	MS + S 30 г/л + A 8 г/л + KT 0,05 мг/л + NAA0,05 мг/л	25 °C, холодны й белый свет, Ph16/8 (4 недели)	MS + IBA 1 мг/л, 25°C, Ph16/8 (3000 Lx)	ППХ	H- 60%, DH -13%, AnP -17%	[129]

Межвидовые гибриды С.перо	4°C - 4 с.	MS + S (50, 120, 150 г/л) + 8 г/л А + 2,4-D (1,0, 5,0 мг/л)	в темноте при 35 °С в течение 7 с., далее 25 °С (пересадка на 5 неделе)	MS + КТ 0,05 мг/л + NAA 0,05 мг/л в течение 4 недель, далее MS б/г	25 ± 1 °С, Ph 16/8 (пересадка с отрезанием корней через 10 с)	MS б/г 4 недели; MS + NaCl 0,5 мг/л (10 с), MS + NaCl 0,5 мг/л (10 с)	ППХ	Н, DH	[86]
Eskenderany F1, Acceste F1, Sakiz, Urfa Yerli	Без х. о.	MS + S 120 г/л + А 7 г/л + 2,4-D 2 мг/л + BAP 0,5 мг/л	35 °С -7 с. в темноте; 26 °С, Ph 12/12, 1500 Lx (7 с) далее Ph16/8 (пересадка каждые 10 с)	MS + А 8 г/л + BAP 4 мг/л, NAA 0,05 мг/л	26 °С, Ph 12/12, 1500 Lx (7 с), 26 °С, Ph 16/8, 3000 Lx (3-5 недель)	MS + IAA 0,01 мг/л; 26 °С, Ph16/8, 3000 Lx	-	-	[119]
Arlika F 1, Eskandrani cv., E 82-110 F1, Giad F1, Rula F1, Queen F1, Yellow Bik F1	4°C - 4 с.	MS + 100 г/л S + А 8 г/л + 2,4-D 5 мг/л	в темноте 32°C в течение 7 с.; далее в темноте 25°C 4 недели	MS + 30 г/л S + КТ 0,05 мг/л + IAA 0,05 мг/л	25°C, 16/8 Ph, (3000 Lx), 4 недели; MS б/г (4 недели)	MS б/г, 25°C, Ph16/8	ППХ	Н - 48,3%, DH-51,7%	[163]

Примечания: б/г – безгормональная среда; Без х. о. – без холодной предобработки; с. – сутки; Ph – фотопериод; Pht – фитогель; А – агар; Amp - ампицилин; G – глюкоза; S – сахароза; FL - утром в день раскрытия цветка; FL – за сутки/ до распускания цветка; FL – за 2 суток до распускания цветка; С – индукционная питательная среда; IMC – индукционная питательная среда для тыквенных; CBM – базальная среда для огурца; DH – (doubled haploid) Удвоенный гаплоид; Н – (haploid) гаплоид; М – (mixoploid) миксоплоид; AnP – (aneuploid) анеуплоид; TrP – (triploid) триплоид; TeP – (tetraploid) тетраплоид; ППХ – (chromosome counting) прямой подсчет хромосом; ПЦ – (flow cytometry) проточная цитометрия; ЦА – (counting chloroplasts in guard cells) цитологический анализ (количество хлоропластов в замыкающей клетках устьиц); МА – (morphological analysis) морфологический анализ

Приложение В – Краткие протоколы индукции гаплоидов *Cucurbita pepo* L. в культуре неопыленных завязей/семяпочек *in vitro*

Генотип донорного растения	Стадия бутон а	Холодовая предобрабо тка	Индукцион ная среда	Условия культивирова ния семяпочек	Регенерацион ная среда	Условия культивирова ния растений R0	Метод определен ия плоиднос ти	Идентифицирова нная плоидность	Литератур ные источники
Ambassador, Black Beauty, Diamant, Greyzini, Opal, Tara, Tarmino	Fl; Fl-1; Fl-2	без х.о.	C + S 30г/л + A 8 г/л + 2,4 D 0,1 мг/л + КТ 0,1 мг/л	25 °C, Ph 12/12	C 6/г + S 30 г/л + A 8 г/л	25°C, Ph 12/12	ППХ, МА	DH, AnP	[184]
Eskandara ni	Fl-1	без х.о. без х.о., 4 °C - 2 с, 4 °C - 4 с, 4 °C - 8 с	MS + S 30 г/л + A 8 г/л + 2,4-D (0,1, 1,0, 5,0, 10 мг/л)	25±1 °C, Ph16/8 (4 недели)	MS 6/г	25 ± 1°C Ph 16/8 (3000 Lx)	ППХ	H-25%, DH-75%	[150]

Продолжение приложения В

-	Fl; Fl-1	без х. о.	N6 + S 30 г/л + A 8 г/л + 2,4-D + NAA + BAP	25°C Ph 14/10 (2000 lx)	N6 6/г + S 30 г/л /G 20 г/л + A 8 г/л	25°C Ph 14/10 (2000 Lx)	ЦА	Н, DH	[53]
MHTC77, Queen, Raad, Reveneu, Rosita, Rola, Yellow Bik	FL	без х.о.	MS + S (30, 60, 90 г/л) + A 8 г/л + 2,4 D 1 мг/л + KT 1 мг/л	4 °C(4,7,12 с); 32 °C(4,7,12 с.); 25°C; Ph 12/12 (пересадка каждые 4 нед.)	MS 6/г	25 °C, Ph 16/8 (3000 Lx)	ППХ	Н-65%, DH-35%	[163]
Межвидовые гибриды С.перо	FL – 1	без х.о.; 4 °C (7, 14 с.)	Ms + S 30 г/л + A 8 г/л + 2,4D 1, 5 мг/л; через 28с: MS 6/г. + S 30 г/л + A 8 г/л	25 °C ± 1 °C, Ph 16/8	MS 6/г + S 30 г/л + A 8 г/л (28с); MS 6/г. + S 30 г/л + A 8 г/л + NaCl 0,5 мг/л (10 с); MS 6.г. + S 30 г/л + A 8 г/л + NaCl 1 мг/л	25 °C, Ph 16/8 (пересадка с отрезанием корневой системы каждые 10 с.)	ППХ	Н-60%, DH-40%	[86]

Продолжение приложения В

22 селекционны х образца	FL	без х/о, 4 °С - 1с, 4 °С - 2с	IMC + S 30 г/л + A 8 г/л + Amp 200 мг/л + 2,4 D (1мг/л, 2 мг/л); IMC + S 30 г/л + A 8 г/л + Amp 200 мг/л + TDZ (0,02мг/л, 0,2 мг/л)	25 °С, Ph 16/8 (2500 Lx)	Ms 6./г. + S 20 г/л + Pht 3 г/л; CBM + S 20/г + Pht 3 г/л + NAA 0,2 мг/л + BAP 0,2 мг/л	25 °С, Ph 16/8 (2500 Lx)	ППХ, МА, ПЦ	Н, DH, TrP, TeP, AnP	[147]
-	FL	без х. о.	MS + S 20 г/л + A 8 г/л + 2,4-D 2,0 мг/л	35 °С 3с темн., 26 °С, Ph 12/12 (1500 Lx- 7 с), далее Ph 16/8 3–4 нед.	MS + S 20 г/л+ A 8 г/л 2,0 мг/л 2,4- D + 0,5 мг/л BAP; MS + 4,0 мг/л BAP + 0,05 мг/л NAA + 0,1 мг/л TDZ; MS + 0,01	26 °С Ph 16/8 (1500 Lx); 26°С, Ph 16/8 (3000 Lx) (пересадка каждые 7-14 с)	-	-	[119]

					мг/л IAA + 1,0 мг/л BAP				
--	--	--	--	--	----------------------------	--	--	--	--

Примечания: б/г – безгормональная среда; Без х. о. – без холодной предобработки; с. – сутки; Ph – фотопериод; Pht – фитогель; А – агар; Amp – ампицилин; G – глюкоза; S – сахароза; FL – утром в день раскрытия цветка; FL – за сутки/ до распускания цветка; FL – за 2 суток до распускания цветка; С – индукционная питательная среда; ИМС – индукционная питательная среда для тыквенных; СВМ – базальная среда для огурца; ДН – (doubled haploid) Удвоенный гаплоид; Н – (haploid) гаплоид; М – (mixoploid) миксоплоид; AnP – (aneuploid) анеуплоид; TrP – (triploid) триплоид; TeP – (tetraploid) тетраплоид; ППХ – (chromosome counting) прямой подсчет хромосом; ПЦ – (flow cytometry) проточная цитометрия; ЦА – (counting chloroplasts in guard cells) цитологический анализ (количество хлоропластов в замыкающей клетках устьиц); МА – (morphological analysis) морфологический анализ

Приложение Г – Показатели абаксимального эпидермиса у гаплоидных (n) и диплоидных (2n) растений рода *Cucurbita*, полученных при использовании ДН-технологий

Вид/литературный источник	Плоидность	Длина устьиц (μm)	Ширина устьиц (μm)	Индекс устьица (длина устьица/ширина устьица)	Плотность устьиц (число/мм ²)	Число хлоропластов
<i>C.maxima</i> Duch./[116] <i>C.moschata</i> Duch. /[116]	n	23.03	18.62	1.2*	409.8	7.49
	2n	32.27	22.08	1.5*	304.9	11.83
<i>C.maxima</i> Duch. /[117]	n	21.82	17.37	1.3	428.6	7.21
	2n	30.51	21.11	1.5	311.4	11.17
<i>C.moschata</i> Duch./ [107]	n	21.47	17.12	1.3*	407.3	7.93
	2n	30.13	20.08	1.5*	317.8	11.09
<i>C. pepo</i> L. /[118]	n	19.56	14.88	1.3*	402.6	7.09
	2n	29.69	19.75	1.5*	294.9	11.83
<i>C. pepo</i> L. /[68]	n	20.41	16.84	1.2*	435.1	-
	2n	32.24	21.67	1.5*	306.2	-
<i>C. pepo</i> var. ‘Styriaca’ /[77]	n	-	-	-	-	6.87
	2n	-	-	-	-	11.21

Примечание: - данные не представлены; *данные подсчитаны на основе представленных в публикации данных

Приложение Д – Среднемесячные климатические условия на территории ОПБ ФГБНУ ФНЦО 2019-2022 гг.

Месяц	2019		2020		2021		2022	
	Температура воздуха °С [высота: 2 м.]	Сумма осадков за 10 мин. мм [высота: 2 м.]	Температура воздуха °С [высота: 2 м.]	Сумма осадков за 10 мин. мм [высота: 2 м.]	Температура воздуха °С [высота: 2 м.]	Сумма осадков за 10 мин. мм [высота: 2 м.]	Температура воздуха °С [высота: 2 м.]	Сумма осадков за 10 мин. мм [высота: 2 м.]
Май	-	-	11,28±0,17	0,04±0,03	13,85±0,95	0,02±0,01	10,27±0,15	0,01±0,00
Июнь	-	-	18,90±0,20	0,03±0,01	22,78±1,56	0,00±0,00	18,64±0,18	0,01±0,00
Июль	17,85±0,12	0,01±0,00	18,10±±0,14	0,01±0,00	22,74±0,71	0,02±0,02	20,21±0,17	0,02±0,01
Август	16,75±0,06	0,01±0,00	17,27±0,15	0,01±0,00	19,13±0,50	0,00±0,00	22,35±0,18	0,00±0,00
Сентябрь	12,09±0,09	0,01±0,00	13,69±0,15	0,01±0,00	9,12±0,71	0,00±0,00	9,60±0,11	0,03±0,00

Приложение Е – Требуемые признаки кабачка и патиссона (модель сорта)

Признак	Кабачок	Патиссон
Раннеспелость, всходы-начало плодоношения, сут.	40-45	45-48
Габитус растения	слабооблиственный, короткий штаб; боковые побеги отсутствуют или 2-3 коротких.	короткий штаб и короткие боковые побеги.
Тип цветения	преимущественно женского типа цветения; 4-5 узлов с мужскими цветками, остальные женские.	преимущественно женского типа цветения; 6-7 узлов с мужскими цветками, остальные женские.
Форма плода	цилиндрическая с небольшим сбегом к плодоножке, отсутствие ребер.	дисковидная без фестонов.
Размер плода	в технической спелости длина плода – до 25 см., d – 4-6 см.	в технической спелости – для сетевых магазинов d – 8-12 см.
		для цельноплодного консервирования
		d – 4-6 см.
Кора, поверхность:	гладкая	гладкая
цвет	оранжевый, насыщенно-желтый до золотистого оттенка.	желтый, оранжевый.
Мякоть:		
толщина	2-3 см.	до 2,5-3 см
консистенция	однородная, плотная.	с маленькой семенной камерой, плотная.
Содержание сухого вещества, %	4-8	4-6
Урожайность	при многосборовой культуре 60-80 т/га	при многосборовой культуре 40 т/га

Приложение Ж – Характеристика лучших селекционных образцов кабачка и патиссона, полученных методами классической селекции (Гибридный питомник, открытый грунт, 2020-2022 гг.)

Селекционный образец	Плод			Внутренне строение плода		
	Окраска	Форма	Индекс плода, см	Толщина мякоти, см	Окраска мякоти	Камера
Голдкрэш	жёлто-оранжевая	цилиндрическая со сбегом	5,5	1,5-2,5	ярко- оранжевая	плотная
F ₁ (Ролик х Голдкрэш)	чёрно-зелёная	овальная	5,5	2	кремовая	рыхлая
F ₁ (Фараон х Сангрум)	оранжевая	цилиндрическая со сбегом	5,5	2	светло- оранжевая	рыхлая
F ₁ (J ₃ (Сангрум х Уголек)	чёрно-зелёная	цилиндрическая	5,5	2	кремовая	плотная
F ₁ (Чебурашка х Голдкрэш)	кремовая	овальная	5,5	2	белая	рыхлая
F ₁ (Русские Спагетти х Голдкрэш)	оранжевая	цилиндрическая	5,5	2	оранжевая	рыхлая, сухая
F ₁ (Русские Спагетти х Голдкрэш)	оранжевая	каплевидная	5,5	2,5	оранжевая	плотная
F ₂ (Якорь х Желтоплодный)	кремовая	овальная со сбегом	5,5	1,5	кремовая	сухая
F ₃ Ясмин	оранжевая	цилиндрическая со сбегом	5,5	2	ярко- оранжевая	рыхлая, сухая
F ₃ Ясмин	оранжевая	цилиндрическая со сбегом	5,5	2,5	желто- оранжевая	сухая
Сани Делайт	оранжевая	тарельчатая	2,5	3	ярко- оранжевая	4-х лопастная
F ₁ (Чебурашка х Сани Делайт)	кремовая	цилиндрическая со сбегом	2,5	2	бледно- кремовая	рыхлая, сырая

Продолжение приложения Ж

F ₁ (Сани Делайт х НЛО оранжевое)	чёрно-зелёная	тарельчатая	2,5	2	кремовая	сухая 3- лопастная
F ₁ (Сани Делайт х Сани Делайт)	кремовая	тарельчатая	2,5	3	белая	сырая, 4-х лопастная
F ₁ (Голдкрэш х Диск)	желтая	тарельчатая	2,5	3	желто- оранжевая	3-х лопастная, сухая
F ₁ (Чебурашках х Сани Делайт)	белая	тарельчатая	2,5	3	белая	4-х лопастная
F ₁ (Сани Делайт х Сани Делайт)	кремовая	тарельчатая	2,5	3,5	белая	сырая 4-х лопастная
F ₁ (Чебурашка х Сани Делайт)	желтая	тарельчатая	2,5	3,5	бледно- персиковая	сухая, 4-х лопастная
F ₂ "Б" (Нидерланды х Фараон) х Арал	оранжевая	узкая со сбегом	6	1,5	оранжевая	слитная
F ₂ Голдкрэш	оранжевая	узкая, изогнутая, со сбегом	6	1,5	оранжевая	плотная, слитная
F ₂ "Б" (Нидерланды х Фараон) х Арал	оранжевая	узкая	6	1,5	оранжевая	слитная
F ₂ "Б" (Нидерланды х Фараон) х Святозар	оранжевая	цилиндрическая	4,8	2,5	светло- желтая	плотная
F ₁ (Ролик х Zhang HU2 желт.)	кремово-зеленая	узкая со сбегом, ребра сглажены	5,4	2	светло- желтая	слитная
F ₁ (Ролик х Желтый Банан)	оранжевая	узкая	5,8	2,5	ярко- оранжевая	слитная
F ₁ (Русские Спагетти х Голдкрэш)	оранжевая	длинная со сбегом	5,4	2,5	оранжевая	слитная
F ₁ (Русские Спагетти х Желтый Банан)	оранжевая	цилиндрическая	3,5	2	оранжевая	плотная

Продолжение приложения Ж

F ₁ (Чебурашка х Сани Делайт)	бело-сливочная	фестоны	2,3	4,5-5	белая	сухая
F ₁ (Золотой Ключик х Святозар)	оранжевая	цилиндрическая	5,4	2	оранжевая	слитная
F ₁ (Сани Делайт х НЛО оранжевое)	оранжевая	коротко-каплевидная	2,8	2	светло-желтая	слитная
F ₃ (Голдкрэш х Диск)	белая, светло-коричневые вкрапления	дисковидная, фистоны	2,1	2,5-3	бледно-желтая	рыхлая
F ₃ (Голдкрэш х Диск)	желтая, черно-зеленая окантовка у плодоножки	дисковидная, фистоны, бородавчатость	2,3	3	желто-светло-зеленая	плотная
F ₃ (Голдкрэш х Диск)	светло-желтая, черно-зеленая окантовка у плодоножки	дисковидная, фистоны	2	3	желтая	плотная
F ₃ (Голдкрэш х Диск)	светло-зеленая и светло-оранжевая, сетчатая	дисковидная, фистоны	2,1	3	бледно-зеленая	рыхлая
F ₃ (Голдкрэш х Диск)	светло-зеленая, сетчатая	дисковидная, фистоны	2,2	3	желтая	плотная