

На правах рукописи

А. Ермолаев

Ермолаев Алексей Станиславович

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

Специальность: 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений
(сельскохозяйственные науки)

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО)

Научный руководитель: Домблидес Елена Алексеевна, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений, ФГБНУ ФНЦО

Официальные оппоненты: Калашникова Елена Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К. А. Тимирязева»

Артемьева Анна Майевна, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, и.о. зав. отделом генетических ресурсов овощных и бахчевых культур, ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова» (ВИР)

Ведущая организация: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ)

Защита состоится 22 ноября 2023 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.248.01, созданного на базе ФГБНУ «Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства» по адресу: 115598, г. Москва, ул. Загорьевская, д.4, тел.: 8(495)329-53-88

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства», на официальном сайте <https://vstisp.org> и на сайте ВАК при Минобрнауки РФ <https://vak.minobrnauki.gov.ru>

Отзывы в двух экземплярах, заверенные печатью, направлять по адресу: ул. Загорьевская, д. 4, г. Москва, 115598, тел. 8-495-329-53-88, e-mail: dissovet@vstisp.org

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.248.01,
кандидат биологических наук

Келина Анна Викторовна

Общая характеристика работы

Актуальность. 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 рамках импортозамещения и решения задач, определенных в 2020 г. в «Доктрине продовольственной безопасности Российской Федерации», 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. Технологии получения удвоенных гаплоидов (ДН-технологии) уже достаточно давно используются передовыми селекционными компаниями для увеличения выхода новых рекомбинантных гомозиготных форм, которые включают в качестве исходного материала (родительских линий) при создании новых гибридов и сортов. Культура неопыленных семяпочек *in vitro* является одной из наиболее перспективных востребованных ДН-технологий, применяемых для овощных культур семейства Cucurbitaceae. Преимуществом этой технологии помимо качества получаемых ДН-линий, является ее безопасность и относительно низкая себестоимость за счет сокращения временных и трудовых затрат. Для создания эффективной технологии необходимо изучить факторы, влияющие на гиногенез кабачка и патиссона и провести оптимизацию основных этапов. Это 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 результатов исследования. Впервые, в России, с использованием биотехнологических методов получены гиногенные линии кабачка

и патиссона разного уровня ploидности, 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 семян кабачка и патиссона. Была показана эффективность использования этого типа молекулярных маркеров для подтверждения гиногенного происхождения 9 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 ploидности. Получены микрофотографии хромосом кабачка и патиссона у растений разного уровня ploидности, которые будут представлять интерес для других исследователей, работающих с данными культурами.

Теоретическая и практическая значимость. Усовершенствования элементов технологии получения ДН-растений в культуре неопыленных семян *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 стерилизации с 5% гипохлоритом натрия) до 1 минуты для получения эксплантов со 100 % отсутствием контаминации и без потери эмбриогенного потенциала семян.

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

Подобраны два SSR-маркера (СМТm61 и СМТmC27), которые могут быть использованы для оценки происхождения полученных растений-регенерантов кабачка в культуре неопыленных семян *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 (*Podosphaera xanthii*).

Полученное семенное потомство растений-регенерантов кабачка и патиссона с желтой окраской коры и комплексом хозяйственно полезных признаков, различной ploидности, будет включено в дальнейший селекционный процесс и может служить объектами для генетических исследований.

Методология и методы исследования. Методология 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. Эксперименты проведены с использованием стандартных методик с различными модификациями и подробно представлены в разделе «Материалы и методы».

Положения, выносимые на защиту:

1. Новые генетические источники кабачка и патиссона по: скороспелости, высокой насыщенности женскими цветками, насыщенно желтой окраске плода и другим хозяйственно ценным признакам, которые могут быть использованы в селекции на эти признаки.

2. Усовершенствованна технология получения ДН-растений кабачка и патиссона 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 семяпочек *in vitro*, различной ploидности.

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

Степень достоверности и апробация 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: VI Международном Симпозиуме по тыквенным культурам / VI International Symposium on Cucurbits (2019 г., Бельгия, г. Гент); XXI 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 12 «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 странице 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 источников, из них – 154 иностранных авторов.

Благодарности. Автор выражает огромную благодарность научному руководителю канд. с.-х. наук Домблідес Е.А., зав. лаборатории селекции и семеноводства тыквенных культур канд. с.-х. наук Коротцовой И.Б., с.н.с. Химич Г.А., канд. с.-х. наук Кан Л.Ю., канд. биол. наук Широковой А.В., канд. с.-х. наук Слетовой М.Е., д-ру с.-х. наук Домблідес А.С. за помощь в выполнении работы, а также всем сотрудникам ФГБНУ ФНЦО.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы приведены сведения о народно-хозяйственном значении кабачка и патиссона, систематике вида *Cucurbita pepo* L., современном состоянии селекции кабачка и патиссона в России и мире, о гаплоидных технологиях, используемых для ускорения селекционного процесса у культур семейства Cucurbitaceae и отдельно для вида *C. pepo* L., о факторах, влияющих на получение удвоенных гаплоидов в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*; о методах идентификации плоидности и об использовании молекулярных маркеров для подтверждения происхождения растений-регенерантов из гаплоидных клеток.

2. МАТЕРИАЛЫ И 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. Было изучено 42 селекционных образца кабачка и патиссона, имеющих различное происхождение. Материал выращивался в Московской области в условиях пленочной теплицы и открытого грунта по общепринятой технологии.

Оценка материала по комплексу хозяйственно ценных признаков и получение семенного потомства. Самоопыление, скрещивания, хранение плодов, выделение и хранение семян, оценку материала по комплексу хозяйственно ценных признаков проводили согласно общепринятым методикам.

Влияние фазы развития цветка. Заранее заизолированные пергаментными колпачками завязи (за 2 суток до распускания, за 1 сутки и полностью раскрывшийся цветок), срывали с растения, стерилизовали, выделяли семяпочки и помещали на индукционную среду ИМС (Ермолаев, Домблидес, 2022).

Влияние типа стерилизации. Поверхностную стерилизацию завязей проводили: 1. ступенчатой стерилизацией с использованием 5% гипохлорита натрия; 2. краткосрочным обжиганием после обработки 96% спиртом.

Влияние холодной предобработки. Неопыленные завязи срывали в день раскрытия цветка и помещали в холодильник (+4°C) на 1 или 2 суток, после чего завязи стерилизовали и выделяли из них семяпочки.

Оптимизация состава питательной среды для индукции гиногенеза. Влияние концентрации сахарозы на эмбриогенез (20 г/л, 40 г/л, 60 г/л, 80 г/л) изучали на агаризованной (7 г/л агара) и жидкой среде ИМС с 0,2 мг/л Z на генотипе F₁ Голдкрэш и с.о 228. На 30 генотипах кабачка и патиссона было изучено влияние регуляторов роста (2 мг/л 2,4 Д; 0,2 мг/л TDZ; 0,8 мг/л 2,4 D и 1,2 мг/л НУК) на среде ИМС с 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара, 100 мг/л ампициллина.

Получение растений-регенерантов. Нормально развитые эмбриониды переносили на безгормональную среду MS с 2% сахарозой и 3 г/л фитогеля. Аномальные эмбриоподобные структуры переносили на 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 побегов, их помещали для укоренения на б/г среде MS с 2% сахарозой и 3 г/л фитогеля.

Адаптация к условиям *ex vitro* и выращивание растений-регенерантов. Растения-регенеранты с корневой системой переносили в вегетационные сосуды, заполненные смесью торфа и перлита (7:3), накрывали на 7 дней перфорированными стаканчиками для адаптации к условиям *ex vitro*.

Определение плоидности растений-регенерантов проводили методами: проточной цитометрии клеточных ядер, подсчета числа хромосом с использованием пропионо-лакмоидного метода окраски, на основе морфометрических параметров абаксиального эпидермиса.

SSR-анализ. Для осуществления SSR-анализа было отобрано 10 микросателлитных локусов разработанных для *C. pepo* L. (СМТmС37, СМТmС27, СМТm76, СМТm61, СМТm155, СМТm154, СМТm186, СМТm233, СМТр102, СМТр158). Выделение ДНК проводили на основе СТАВ метода с использованием набора реагентов Сорб-ГМО-Б (Синтол, Россия). ПЦР проводили в объеме 25 µl, включая 1x ПЦР буфер Б, 2,5 mM MgCl₂, 0,25 mM каждого dNTP, 0,3 µM каждого праймера, 1,5 единиц Taq ДНК-полимеразы (Синтол, Россия) и 3 µl раствора ДНК. Размеры амплифицированных фрагментов определяли в сравнении с маркером молекулярных масс GeneRuler100 bp plus DNA ladder («Thermo Fisher Scientific», США).

Исследование пыльцы с помощью электронного сканирующего микроскопа. Пыльцевые зерна изучали на сканирующем электронном микроскопе

JEOL, JSM-6380LA. На алюминиевых рабочих столиках с углеродным скотчем при ускоряющем напряжении 20 кВ; IB-3 Ion Coater и нанесенном напылением слое золота (Au) толщиной 20 нм. Работа проводилась в Межкафедральной лаборатории электронной микроскопии (МЛЭМ) Биологического факультета МГУ.

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

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

В лаборатории селекции и семеноводства тыквенных культур ФГБНУ ФНЦО, в соответствии с потребностями рынка и запросов производителей овощей, была разработана наиболее востребованная модель сорта кабачка и патиссона (таблица 1). Работа велась по гос. заданию FNRN-2019-0065.

Таблица 1 – Требуемые признаки кабачка и патиссона (модель сорта)

Признак	Кабачок	Патиссон
всходы, сут.	40-45	45-48
габитус растения	слабо-облиственный, 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 и размер плода	цилиндрическая с небольшим сбегом к плодоножке, отсутствие ребер; в технической спелости длина плода – до 25 см., диаметр – 4-6 см.	дисковидная; в технической спелости диаметр – 8-12 см.; для цельноплодного консервирования – 4-6 см.
кора	гладкая; оранжевая, насыщенно-желтого или золотистого оттенка	гладкая; желтая или оранжевая
мякоть, строение	толщина 2-3 см.; однородная, плотная	толщина 2,5-3 см.; однородная, плотная
сухое вещество, %	4-8	4-6
урожайность	при многосборовой культуре 60-80 т/га	при многосборовой культуре 40-60 т/га

В качестве стандарта, по раннеспелости, были выбраны районированные, белоплодные сорта кабачка Ролик и Якорь, а по основным хозяйственно ценным признакам – желтоплодный гибрид голландской селекции F₁ Голдкрэш. 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. По форме плода наиболее соответствовали модели сорта: Фараон, Ясмин, Желтоплодный, Золотинка, Уголек и F₁ Голдкрэш. Все изучаемые

коллекционные образцы, кроме Русские Спагетти и Уголек, имели тонкую (1,5 см) мякоть.

Для патиссона в качестве стандарта, по раннеспелости, был выбран сорт отечественной селекции Диск, по основным хозяйственно ценным признакам – желтоплодный гибрид голландской селекции F₁ Сани Делайт. По срокам цветения женскими цветками, к раннеспелым, можно отнести: Чебурашка и F₁ Сани Делайт. Все образцы можно отнести к группе преимущественно смешанного типа цветения. По толщине мякоти значимых различий не наблюдалось. По форме плода все генотипы соответствовали модели сорта.

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.

В результате проводимых отборов, скрещиваний и последующих самоопылений было отобрано 1₃ лучших линейных форм кабачка и патиссона. Из них оранжевой окраской коры отличались образцы кабачка: 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 патиссона: I₃ Сани Делайт 22/E23. Отобранные оранжево плодные линии характеризуются цилиндрической формой плода со сбегом к плодоножке и гладкой поверхностью, без ребер. По толщине 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 у которой начиналось уже через 36 суток после всходов. Следует отметить, что линии: I₄ Ясмин 21/194, I₄ Ясмин 21/196, I₄ Ясмин 21/198, I₄ Ясмин 21/199, I₄ Ясмин 21/206, I₄ Ясмин 22/E5 показывали дружное цветение. Линия I₄ Святозар 21/221 отличалась наибольшей толерантностью к поражению настоящей мучнистой росой (*Podospheera xanthii*). При оценке линий по показателю урожайности, ни одна из выше указанных не смогла превзойти контроль F₁ Голдкрэш, однако, линия I₅ Святозар 22/E10 превзошла показатели стандарта кабачка Фараон на 2,6 кг и составила 80,58% от контрольных значений F₁ Голдкрэш.

3.2. Оптимизация этапов технологии получения удвоенных гаплоидов ***C. перо* в культуре неопыленных семян *in vitro***

Оптимальная стадия развития женского гаметофита. Проведенные на двух генотипах эксперименты с бутонами разной степени раскрытия цветка (2 суток до распускания (FL-2), 1 сутки (FL-1) и полностью раскрывшийся цветок (FL)) показали, что оптимальной стадией для индукции гиногенеза будет – FL. Для генотипов F₁ Голдкрэш и F₁ Камили было получено 17,3% и 12,0% индуцированных семян из бутонов в стадии FL (таблица 2), из которых впоследствии развились эмбриониды. В четыре раза меньше эмбрионидов было получено из бутонов на стадии (FL-1) и полное отсутствие гиногенного развития отмечали при введении в культуру

бутонов на стадии FL-2. Именно из бутонов на стадии FL, содержащих семяпочки со зрелым зародышевым мешком, получены эмбриониды у 30 генотипов.

Таблица 2 – Влияние фазы развития цветка на индукцию гиногенного развития

Генотип (фактор А)	Стадия бутона (фактор В)	Эмбрионидов, шт. /на чашку Петри	Индуцированных семяпочек, %	Двухфакторный дисперсионный анализ: факторы/доля влияния фактора, %
F ₁ Голдкрэш	FL-2	0 ^c	0 ^c	фактор А ** /2,6 фактор В ***/81,3 фактор А × фактор В */2,6 случайные факторы/ 13,5
	FL-1	1,1 ^b	4,4 ^b	
	FL	4,3 ^a	17,3 ^a	
F ₁ Камили	FL-2	0 ^b	0 ^b	
	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. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Дункана (MRT). *, **, *** – значимо на уровне 0.05, 0.01, 0.001 соответственно.

Стерилизация завязи методом обжигания. Был оптимизирован этап стерилизации и предложен вариант с краткосрочным обжиганием завязи после обработки 96% спиртом. Это позволяет сократить временные затраты с 50 минут (при ступенчатой стерилизации с использованием 5% раствора гипохлорита натрия) до 1 минуты для получения эксплантов со 100% отсутствием контаминации и без потери эмбриогенного потенциала семяпочек (таблица 3).

Таблица 3 – 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
F ₁ 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. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Дункана (MRT). *, **, *** – значимо на уровне 0.05, 0.01, 0.001 соответственно; NS = не значимо. В чашку Петри высаживалось 25 семяпочек; с.о. – селекционный образец.

Влияние холодной предобработки. Проведенные в 2020-2022 гг. эксперименты по изучению влияния холодной предобработки завязей кабачка в течение 1-2 суток при +4°C на восьми генотипах показали, что обработка завязей холодом значительно снижала образование эмбрионидов и оказалась неэффективной. Только у одного из восьми изученных генотипов наблюдалось образование эмбрионидов после двух суток холодной обработки, но и для этого генотипа отмечалось существенное снижение количества индуцированных семяпочек при использовании холодной обработки (таблица 4).

Таблица 4 – Влияние холодной предобработки завязей на индукцию гиногенеза

Генотип	Количество индуцированных семян, шт/чашку Петри		
	2 суток холода	1 сутки холода	Без холода
Голдкрэш	1,3 с	3,5 b	13,7 а
с.о. 228	0 b	1,0 b	13,3 а
Фараон	0 b	0,5 b	6,3 а
с.о 51	0 b	0,7 b	4,7 а
Камили F1	0 b	0 b	2,3 а
с.о. 278	0 b	0,7 b	6,8 а
с.о 125	0 b	0 b	2,0 а
с.о 1	0 b	0 b	1,3 а

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого опыта. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Дункана (MRT).

Оптимальный состав питательной среды для получения удвоенных гаплоидов в культуре неопыленных семян *in vitro*. В результате тестирования наиболее часто используемых питательных сред (MS, CBM, IMC) для индукции гиногенеза в культуре неопыленных семян кабачка и патиссона наилучшие результаты были получены на среде IMC, разработанной в ФГБНУ ФНЦО. Среда содержит повышенное содержание KNO_3 (2496,3 мг/л), увеличенное содержание никотиновой кислоты (5 мг/л) и обогащенный аминокислотный состав.

Эксперимент по влиянию различной концентрации сахарозы на эмбриогенез (20 г/л, 40 г/л, 60 г/л, 80 г/л) проведен на двух генотипах F₁ Голдкрэш и с.о 228. При культивировании семян как на агаризованных, так и на жидких питательных средах образование эмбрионов через 45 суток происходило только на средах с концентрацией сахарозы 20 г/л и 40 г/л. Отмечалась разница в изменении размеров культивируемых семян уже после 7 дней культивирования (семена на питательных средах с сахарозой 20 г/л были в 1,4 раза меньше, чем на питательных средах с сахарозой 80 г/л) (рисунок 1).

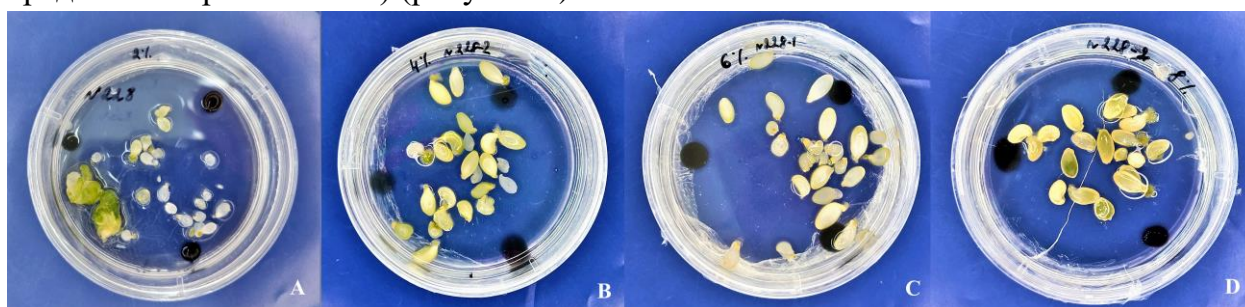


Рисунок 1 – Изучение влияния концентрации сахарозы в жидкой питательной среде IMC с 0,2 мг/л TDZ на индукцию эмбриогенеза у с.о. 228 (45 суток культивирования). А – сахароза 20 г/л; В – сахароза 40 г/л; С – сахароза 60 г/л; D – сахароза 80 г/л

На 30 генотипах было изучено влияние на эмбриогенез наиболее часто используемых для индукции гиногенеза у *C. pepo* регуляторов роста (2 мг/л 2,4 D; 0,2 мг/л TDZ; 0,8 мг/л 2,4 D и 1,2 мг/л НУК). Для девяти генотипов образование эмбрионов происходило только на среде с добавлением 2 мг/л 2,4 D; для восьми генотипов на среде с 0,2 мг/л TDZ; для четырех на среде с 0,8 мг/л 2,4 D и 1,2 мг/л

НУК; восемь генотипов отзывались как на питательной среде с 2 мг/л 2,4 D, 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 D и 1,2 мг/л НУК. Было отмечено, что первые эмбриониды на среде с 2 мг/л 2,4 D появлялись через 5 недель культивирования, а на среде с 0,2 мг/л TDZ и на среде с 0,8 мг/л 2,4 D и 1,2 мг/л НУК появляются через 6-7 недель. Использование питательной среды с 2 мг/л 2,4 D для большинства генотипов оказалось более эффективным и позволяло получить большее количество эмбрионидов. Проведенный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что и фактор генотипа (31%), и фактор используемых регуляторов роста (5%), а также взаимодействие факторов (57%) оказывают существенное влияние на эмбриогенез.

Оптимизировав этапы технологии (рисунок 2), индукцию гиногенного развития удалось достичь у 30 из 42 изученных генотипов *C. pepo* и впервые были получены гомозиготные растения патиссона за один вегетационный период.



Рисунок 2 – Этапы технологии получения ДН-растений *Cucurbita pepo* L. в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*: А, В – изоляция женского цветка колпачком из пергаментной бумаги за сутки до раскрытия; С – стерилизация завязи методом краткосрочного обжигания; D – выделение неопыленных семяпочек; E – образование эмбрионидов на 35-60 сутки; F – эмбрионид; G – регенерация проростка из эмбриоида; H, I – адаптация растений-регенерантов к условиям *ex vitro*; J, K – самоопыление R₀; L – развитие плода до фазы биологической спелости; M – оценка внутреннего строения плода; N – оценка в полевых условиях ДН-линии

Максимальный выход эмбрионов у отдельных генотипов кабачка – 13,7 эмбрионов на чашку Петри, что в пересчете на 100 культивируемых семяпочек составит до 55 шт. У образцов патиссона этот показатель оказался ниже – до 4 эмбрионов на чашку Петри (16 эмбрионов/100 культивируемых семяпочек).

3.3. Оценка полученного материала на уровень ploидности

На основе трех методов (проточной цитометрии, прямого подсчета хромосом и по параметрам абаксиального эпидермиса) среди проанализированных растений-регенерантов кабачка и патиссона, успешно прошедших этап адаптации к условиям *ex vitro*, 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*.

Анализ растений-регенерантов с использованием проточной цитометрии клеточных ядер. Было выявлено четыре варианта ploидности для растений-регенерантов: диплоиды, тетраплоиды, триплоиды и октаплоиды.

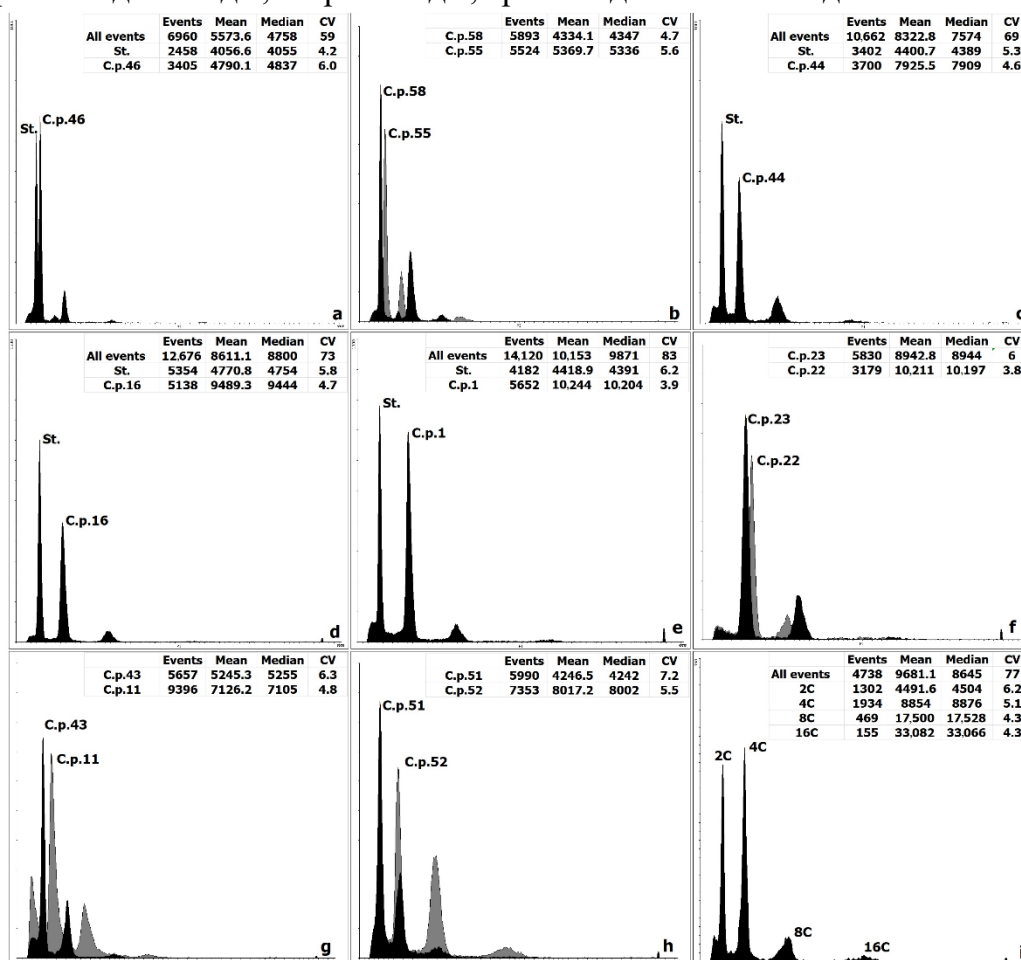


Рисунок 3 – Примеры гистограмм *C. pepo* (внутренняя стандартизация): (а) стандарт (*Ficus benjamina* $2C=0,90$ пг) и диплоидный образец с цитотипом $2C=1,07$ пг; (б) комбинированная гистограмма диплоидов с цитотипами $2C=1,07$ пг и $2C=0,95$ пг; (с) стандартный и триплоидный образец с цитотипом $2C=1,62$ пг; (д) стандартный и тетраплоидный образец с цитотипом $2C=1,84$ пг; (е) стандартный и тетраплоидный образец с цитотипом $2C=2,08$ пг; (ф) объединенная гистограмма тетраплоидов с цитотипами $2C=1,84$ пг и $2C=2,08$ пг; (г) объединенная гистограмма диплоида и триплоида с цитотипами $2C=1,08$ пг и $2C=1,50$ пг; (h) объединенная гистограмма тетраплоида и октаплоида с цитотипами $2C=2,08$ пг и $2C=3,61$ пг; (и) пример эндополиплоидии

Для диплоидных образцов было определено 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. 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. 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 3). Для трех образцов выявлен октаплоидный цитотип $2C=3,61\pm 0,04$ пг. Цитотипы с уменьшенным содержанием ДНК были характерны для образцов патиссона.

Кариологический анализ растений-регенерантов кабачка. *S. pepo* оказался трудным в цитологическом плане объектом ввиду большого количества хромосом ($2n=2x=40$), мелкого их размера (около 2 мкм), малой частоты митозов и небольшого числа метафаз с хорошим разбросом хромосом. При использовании пропион-лакмоидного способа окраски (не требует предварительной фиксации) были получены микрофотографии гаплоидных, диплоидных, триплоидных и тетраплоидных клеток из растений-регенерантов кабачка и патиссона (рисунок 4).

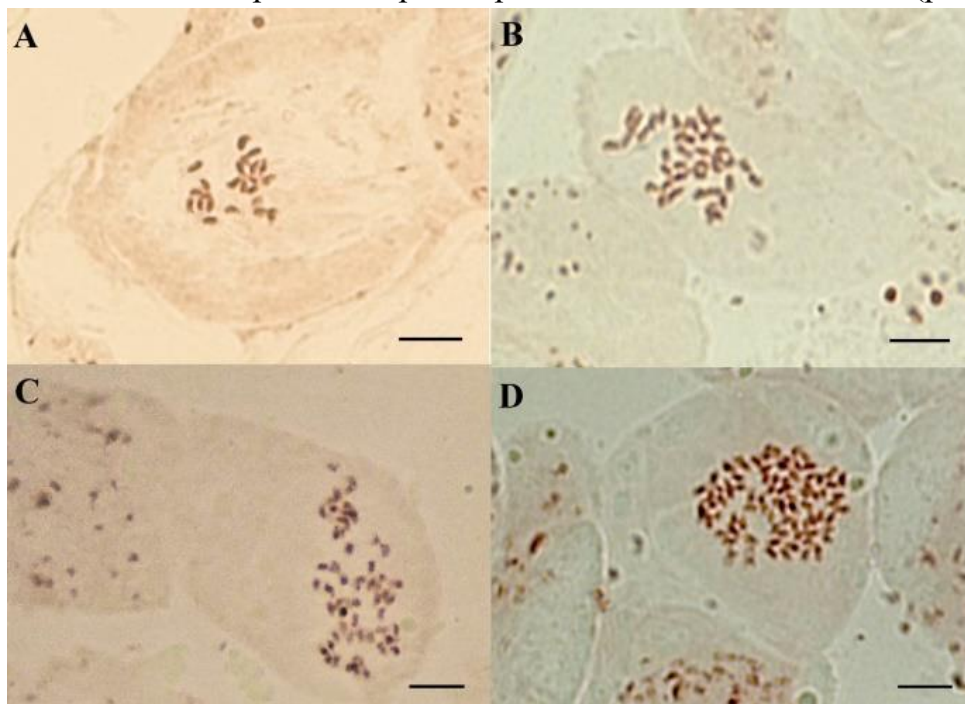


Рисунок 4 – Метафазы в меристемах растений-регенерантов кабачка разного уровня плоидности: А – гаплоид ($2n=x=20$); В – диплоид ($2n=2x=40$); С – триплоид ($2n=3x=60$); D – тетраплоид ($2n=4x=80$); масштабная линейка = 10 μ m

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 встречаются в окрашенных меристемных клетках *S. pepo* и не связаны с уровнем плоидности, их количество совершенно разное даже в близлежащих клетках одного препарата. Плоидность всех этих растений полностью совпала с уровнем плоидности, определенным с использованием метода проточной цитометрии. Для растений, находящихся еще в

культуре *in vitro* можно было отметить миксоплоидию, когда в одном препарате обнаруживались клетки разного уровня ploидности 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.

Показатели абаксиального эпидермиса у *C. pepo*. Были изучены показатели абаксиального эпидермиса у контрольных образцов кабачка (F₁ Голдкреш, Фараон, Якорь) и патиссона (F₁ Сани Делайт, Диск, Чебурашка), выращенных в условиях открытого грунта и пленочной теплицы. Наблюдалась существенная разница между растениями одного генотипа, выращенных в разных условиях (таблица 5, рисунок 5). Показатель SL у растений, выращенных в теплице, был больше в 1,2 раза, а SD 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 абаксиального эпидермиса (SL и SD) для идентификации ploидности растений, возможно использовать только для растений, выращенных в одинаковых условиях. Длина (SL) и ширина (SW) замыкающих клеток устьиц у патиссона была меньше, в то время как плотность устьиц (SD) была больше.

Таблица 5 – Параметры абаксиального эпидермиса донорных растений *C. pepo*, выращенных в разных условиях

Параметр	Условия выращивания (фактор В)	Фактор А		Двухфакторный дисперсионный анализ
		subsp. <i>ovifera</i>	subsp. <i>pepo</i>	
SL (µm)	поле	20.00 b ² /B ³	24.96 b/A	фактор А ^{1***} , фактор В ^{***} , фактор А × фактор В ns
	теплица	25.25 a/B	30.41 a/A	
SW (µm)	поле	15.91 b/B	17.96 b/A	фактор А ^{***} , фактор В ^{***} , фактор А × фактор В ns
	теплица	18.59 a/B	20.06 a/A	
SI (SL/ SW)	поле	1.26 b/B	1.39 b/A	фактор А ^{***} , фактор В ^{***} , фактор А × фактор В ns
	теплица	1.36 a/B	1.51 a/A	
SD (кол-во/мм ²)	поле	550.55 a/A	446.89 a/B	фактор А ^{***} , фактор В ^{***} , фактор А × фактор В ^{***}
	теплица	275.50 b/A	276.10 b/A	
CN	поле	10.81 a/A	11.11 a/A	фактор А ns, фактор В ns, фактор А × фактор В ns
	теплица	10.71 a/A	10.28 a/A	

Примечание: представленные в таблице значения являются средними; ¹ *, **, ***: значимо при 5%, 1% и 0,1% уровне значимости соответственно, ns - не значимо. Значения с одинаковой строчной буквой² в столбцах (сравнение между всеми условиями выращивания в пределах одного показателя и генотипа) и заглавной буквой³ 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 тестом Дункана (MRT). SL – длина устьиц; SW – ширина устьиц; SI – индекс устьиц (длина устьица/ширина устьица); SD – плотность устьиц; CN – количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц

Не было выявлено существенной разницы по количеству хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (CN) у растений, выращенных в разных условиях.

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 шт. Показатель CN оказался самым стабильным и именно его можно рекомендовать к использованию для идентификации плоидности.

Растения-регенеранты кабачка и патиссона, полученные в культуре неопыленных семян *in vitro*, выращивались в теплице. Соотнеся полученные данные (таблица 6) с данными, полученными при анализе проточной цитометрии клеточных ядер и прямого подсчета хромосом, можно было заключить, что для диплоидных образцов патиссона и кабачка CN составляет в среднем от 9,41 до 11,31 шт., а у тетраплоидных до 17,58 шт. У триплоидных образцов, наблюдалось очень большое варьирование всех показателей абаксиального 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 кабачка и патиссона составил 14,84 шт. и 16,3 шт., соответственно. По показателям SL, SD и CN группы растений с диплоидным, триплоидным и тетраплоидным уровнем плоидности достоверно отличались.

Таким образом, показатели абаксиального 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.

Таблица 6 – Показатели абаксиального эпидермиса у растений-регенерантов кабачка (*C. pepo* subsp. *pepo*) и 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 (кол-во/ на mm^2)	CN
<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>					
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
<i>C. pepo</i> subsp. <i>ovifera</i>					
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 тестом Дункана (MRT). SL – длина устьиц; SW – ширина устьиц; SI – индекс устьиц (длина устьица/ширина устьица); SD – плотность устьиц; CN – количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц

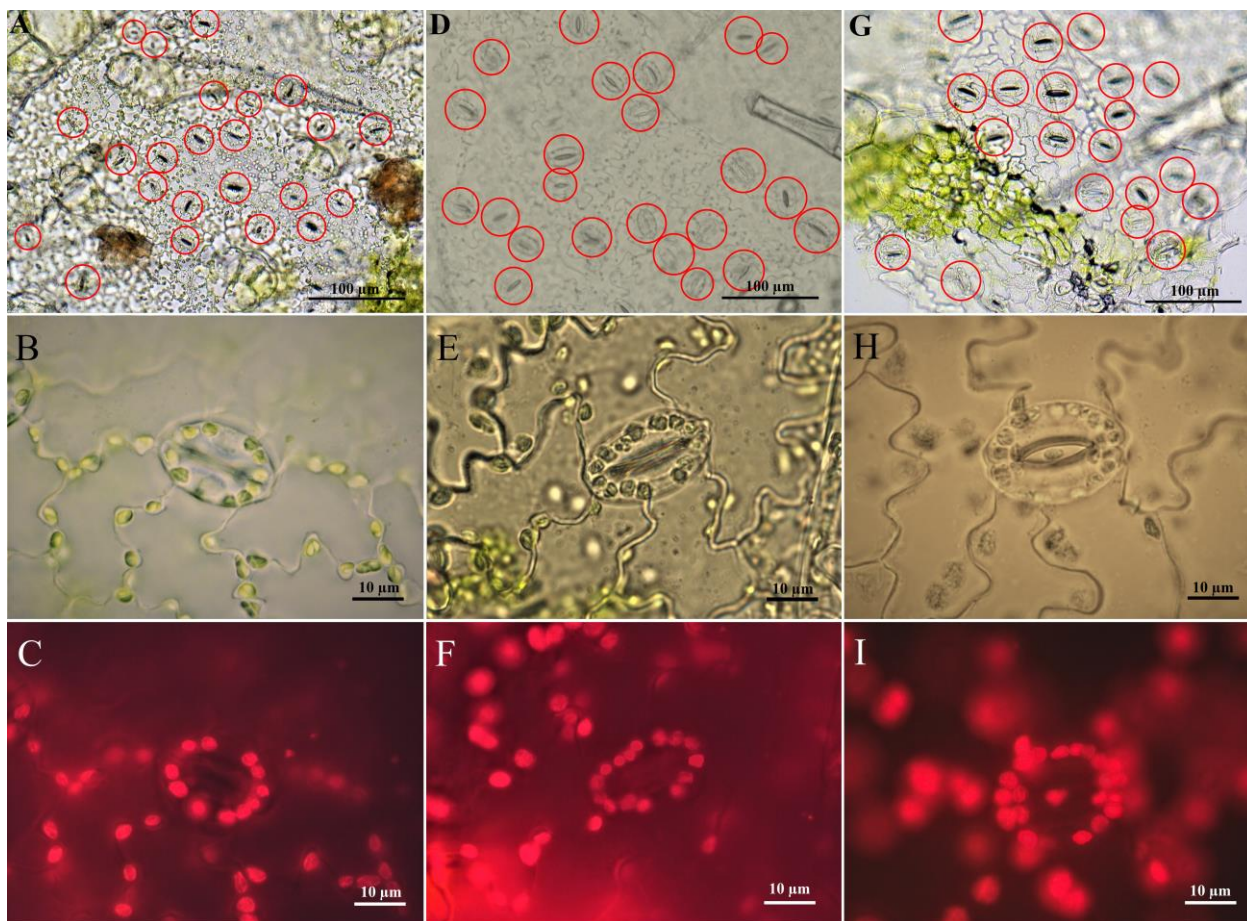


Рисунок 5 – Эпидермис абаксиальной поверхности листьев растений-регенерантов кабачка разной ploидности, полученных в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*;
 A, B, C – растение с диплоидным набором хромосом; D, E, F – с триплоидным набором хромосом;
 G, H, I – с тетраплоидным набором хромосом

3.4. Оценка морфологических признаков пыльцы кабачка и патиссона

С использованием сканирующего электронного микроскопа было проведено изучение морфологических особенностей пыльцевых зерен (ПЗ) у растений-регенерантов кабачка (из генотипа F₁ Голдкрэш) и патиссона (из генотипа F₁ Сани Делайт) с разным уровнем ploидности, полученных в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* (рисунок 6) и выращенных в одинаковых условиях с контрольными исходными генотипами. ПЗ тетраплоидных растений кабачка и патиссона имели в 1,3-1,4 раза больший диаметр по сравнению с контрольными донорными генотипами и диплоидными ДН-линиями (таблица 7). У патиссона диаметр ПЗ был меньше. 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. Наибольшее число ПЗ с нарушениями развития (недоразвитых, не разделившихся, деформированных) наблюдалось у триплоидных растений кабачка (у патиссона 3n растения отсутствовали), при этом в поле зрения микроскопа у них преимущественно присутствовали мелкие ПЗ, но встречались и крупные, по размеру больше похожие на ПЗ тетраплоидных растений. Фертильность пыльцы для контроля F₁ Голдкрэш

(2n) и R₁ Голдкрэш (2n) составляла 95-100%; для триплоидных она не превышала 15,56%, для тетраплоидных растений (4n) – 84,21%.

Таблица 7 – Морфологические параметры пыльцы кабачка у растений с различным уровнем плоидности

Плоидность	Диаметр пор, μm	Длина шипов, μm	Диаметр ПЗ, μm
F ₁ Голдкрэш – 2n (контроль)	16,83±0,41 b	5,52±0,19	112,20±1,16 b
R ₁ Голдкрэш – 2n	16,69±0,58 b	7,19±0,22	109,09±0,85 b
Гибрид между ДН-линиями из F ₁ Голдкрэш (♀(4n) × ♂(2n)) – 3n	19,32±0,83 a	6,92±0,16	103,08±1,54 ab
R ₁ Голдкрэш – 4n	21,32±0,62 a	6,99±0,25	148,13±0,25 a

В таблице приведены средние±SE. Варианты, отмеченные одной и той же буквой, не имеют значимых различий с вероятностью 95% согласно тесту Дункана (MRT)

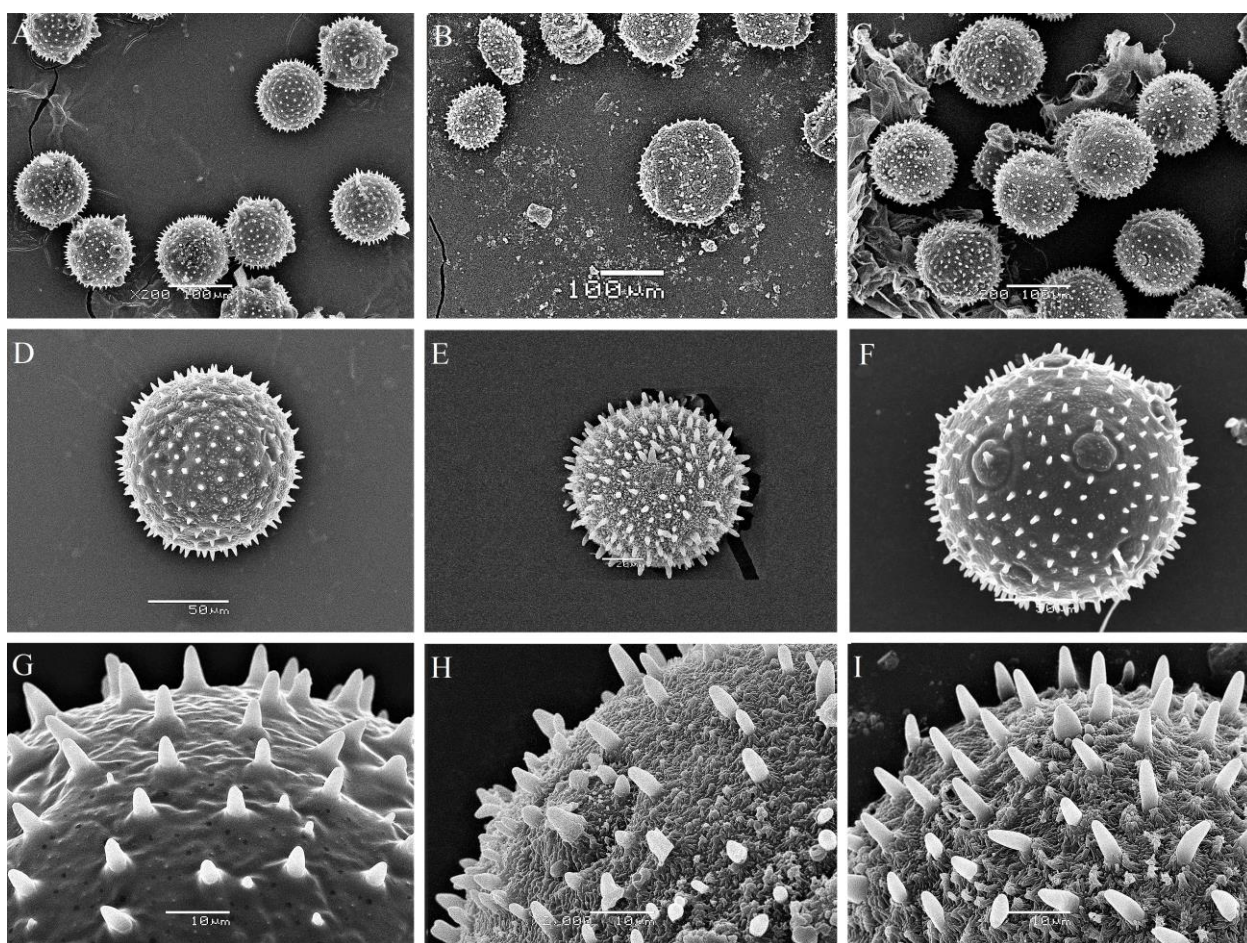


Рисунок 6 – Изображения пыльцевых зерен растений кабачка с разной плоидностью, полученные с использованием электронного сканирующего микроскопа JEOL, JSM-6380LA (Япония), средняя толщина напыления сплава Au-Pd 20nm: А, D, G – диплоид (2n); В, Е, Н – триплоид (3n); С, F, I – тетраплоид (4n)

3.5. SSR-анализ

Из десяти протестированных микросателлитных локусов (СМТmС37, СМТmС27, СМТm76, СМТm61, СМТm155, СМТm154, СМТm186, СМТm233, СМТр102, СМТр158), только СМТm154 не определял генетические отличия между образцами исходных донорных растений кабачка и патиссона, относящихся к subsp. *peru* и к subsp. *ovifera*. Различия между донорными растениями кабачка и

диплоидными формами, полученными в культуре неопыленных семян *in vitro*, были выявлены с использованием маркера СМТm61 и СМТmC27. Так, например, при амплификации с маркером СМТm61 у донорных растений кабачка F₁ Голдкрэш определялось четыре аллели, что соответствовало литературным данным, полученным ранее при разработке данного маркера (рисунок 7) и только у 70 % протестированных диплоидных образцов растений-регенерантов, полученных из F₁ Голдкрэш в культуре неопыленных семян *in vitro*, было обнаружено присутствие всего одной аллели (160 п.н. или 180 п.н.), что даёт основания предполагать наличие гомозиготного состояния по данному локусу и подтверждать гиногенное происхождение полученных растений. Полученные данные свидетельствуют о необходимости тестирования образовавшихся растений-регенерантов с использованием SSR-маркеров и данный этап технологии должен быть обязательно включен в протокол получения ДН-растений кабачка в культуре неопыленных семян *in vitro*.

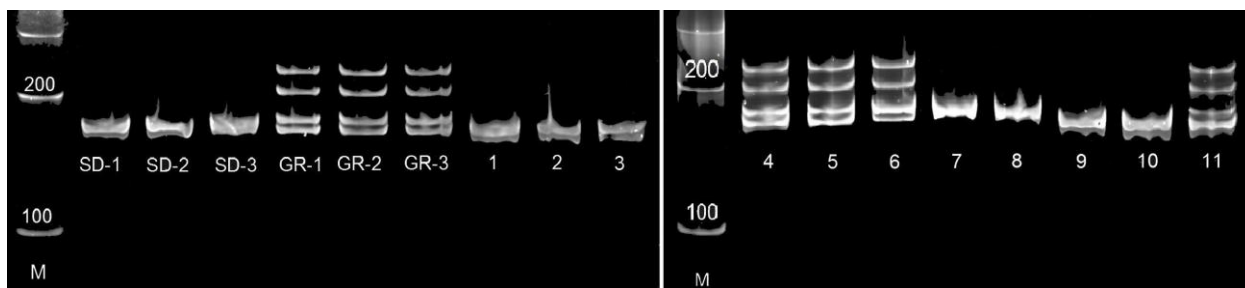


Рисунок 7 – Пример результатов амплификации ДНК из образцов донорных растений кабачка и патиссона (*Cucurbita pepo* L.) и полученных ДН-растений кабачка в культуре неопыленных семян *in vitro* с SSR-маркером СМТm61: SD-1, SD-2, SD-3 – донорные растения патиссона F₁ Сани Делайт; GR-1, GR-2, GR-3 – донорные растения кабачка F₁ Голдкрэш; 1-11 – диплоидные растения-регенеранты, полученные из кабачка F₁ Голдкрэш

3.6. Оценка линейного материала, полученного методами биотехнологии

В течение трех лет исследований был выделен и оценен по хозяйственно-ценным признакам линейный материал, полученный методами биотехнологии. Было выделено пять ДН-линий кабачка, характеризующихся 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 семь ДН-линий, цвет окраски которых варьирует от темно желтой до оранжевой. Плоды характеризуются тарельчатой формой и у пяти линий фестоны сглажены. По толщине мякоти (3,5 и 4 см) выделилось две ДН-линии. 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.

3.7. Иммунологическая оценка растений-регенерантов

Проведенная иммунологическая оценка растений-регенерантов кабачка и патиссона в 2022 г. в условиях защищенного грунта выявила значительную вариабельность по показателю среднего бала поражения с коэффициентом вариации V=29%. Было выделено пять ДН-линий из потомства F₁ Сани Делайт со степенью

развития болезни 20%, которые были отнесены к 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 ДН-линий кабачка F₁ Голдкрэш оценка по показателю «балл поражения» также позволила выявить 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%. Изучение изолятов с поражённых листьев кабачка показало присутствие в анаморфной стадии возбудителей *Podosphaera xanthii* и единичные конидии *Erysiphe cichoracearum*, что свидетельствует о смешанной инфекции. (рисунок 8).

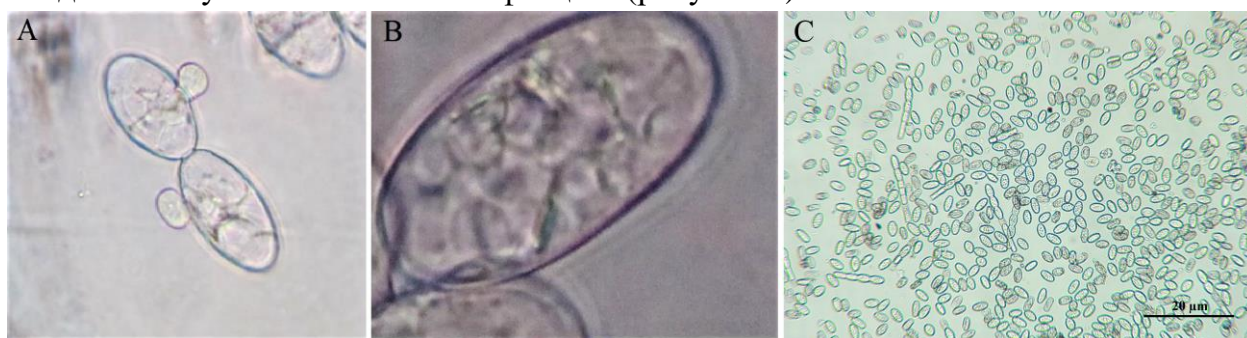


Рисунок 8 – Фото возбудителей: А – Конидии *Podosphaera xanthii* с боковым прорастанием ростковой трубки; В – Конидии *Podosphaera xanthii* с фиброзиновыми тельцами, С – смешанная инфекция (*Podosphaera xanthii*, и единичные – *Erysiphe cichoracearum*)

3.8. Технология создания бессемянных плодов кабачка

Была изучена возможность использования на кабачке схемы гибридных скрещиваний, разработанной Н. Kihara в 1951 г. для получения бессемянных триплоидных гибридов арбуза (рисунок 9).

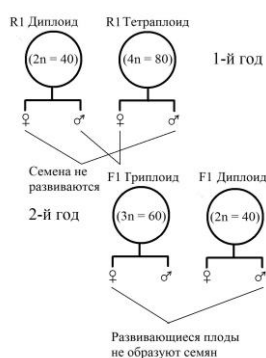


Рисунок 9 – Схема гибридных скрещиваний для получения бессемянного триплоидного (3n) кабачка

Тетраплоидные и диплоидные формы для этого эксперимента были получены в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* из желтоплодного коммерческого гибрида F₁ Голдкрэш. При скрещивании диплоидных и тетраплоидных растений кабачка, образование плодов происходило в большинстве случаев, когда в качестве женского компонента использовалась тетраплоидная линия. Лишь в одном из 10 проведенных скрещиваний в случае, когда женский диплоидный цветок опылялся пыльцой тетраплоидного растения, удалось индуцировать развитие плода, однако

полноценных семян из него выделить не удалось, все семена были с тонкой оболочкой, без эндосперма и с рудиментарным зародышем (рисунок 10).



Рисунок 10 – Плоды, завязавшиеся от скрещиваний тетраплоидных и диплоидных растений кабачка: А – опыление женского цветка на тетраплоидном растении ($\text{♀}4n$) пыльцой мужского цветка с диплоидного растения ($\text{♂}2n$); В – плод от скрещивания $\text{♀}2n \times \text{♂}4n$; С – плод от скрещивания $\text{♀}4n \times \text{♂}2n$

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 F_1 Голдкрэш (200-400 семян/плод). Проведенный анализ на уровень ploidy растений, выросших из этих семян в следующем году, подтвердил, что все они были триплоидными ($2n=3x=60$) и характеризовались более мелкими размерами листовой пластинки и цветков по сравнению с контрольными диплоидными растениями F_1 Голдкрэш. При опылении женских цветков на триплоидном растении пыльцой диплоидного образца F_1 Голдкрэш, наблюдалось развитие плодов. Образовавшиеся плоды на триплоидных растениях были меньше по размеру, в сравнении с плодами, образующимися от самоопыления как на контрольных диплоидных растениях, диплоидных гиногенных гомозиготных линиях и гиногенных тетраплоидных линиях. Толщина мякоти у развившихся на триплоидном растении плодах была почти в 2 раза тоньше, а в семенной камере семян не наблюдалось (рисунок 11).



Рисунок 11 – Плоды кабачка разного уровня пloidности в разрезе: А – F₁ Голдкрэш (контроль); В – плод от самоопыления диплоидной гиногенной линии, полученной из F₁ Голдкрэш; С – плод от скрещивания триплоидной гибридной формы с диплоидным донорным растением ($\text{♀ } 3n (\text{♀ } 4n \times \text{♂ } 2n) \times \text{♂ } 2n$); D - плод от самоопыления тетраплоидной гиногенной линии, полученной из F₁ 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 генетических источников скороспелости для кабачка можно использовать генотипы – Фараон, F₁ Желтый Банан, Русские Спагетти, Уголек, Якорь и Ролик; по форме плода – Фараон, Желтоплодный, Золотинка и F₁ Голдкрэш; Русские Спагетти и Уголек, по толщине мякоти, Якорь и Ролик. Для патиссона в качестве генетических источников скороспелости можно использовать: сорт Диск, Чебурашка и F₁ Сани Делайт. Весь материал подходит в качестве генетических источников по форме плода и толщине мякоти. По признаку оранжевой окраски коры: F₁ 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 *S. perov* и впервые были получены гомозиготные растения патиссона за один вегетационный период. Максимальный выход эмбриоидов у образцов патиссона составил до 16 эмбриоидов на 100 культивируемых семязпочек, а для генотипов кабачка – до 55 эмбриоидов.

3. Среди адаптированных к условиям *ex vitro* гиногенных растений-регенерантов *S. perov* 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 *S. perov* с содержанием ДНК $2C=1,07\pm 0,03$ пг для образцов кабачка, относящихся к *subsp. perov*, 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 абаксиального эпидермиса для идентификации ploидности 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: I₄ Ясмин 21/194, с толщиной мякоти 2,5-3 см и I₄ Святозар 21/221 с толщиной мякоти 2,5 см. По срокам цветения женскими цветками особенно выделяется линия кабачка I₄ Святозар 21/221 цветение женскими цветками которого начиналось через 36 суток. Линии кабачка I₅ Святозар (22/E9) и I₅ 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 F₁ 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 I₄ Ясмин 21/194 и I₄ Святозар 21/221 рекомендуется использовать при создании гетерозисных желтоплодных гибридов кабачка с комплексом 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 плоидности у образцов *C. pepo* и может быть рекомендован к включению в протоколы по получению ДН-растений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ:

1. Домблидес, Е.А. Получение удвоенных гаплоидов *Cucurbita pepo* L. / Е.А.Домблидес, **А.С.Ермолаев**, С.Н.Белов // Овощи России. - 2021. - № 4. - С. 11-26. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-4-11-26>.

2. Ермолаев, А.С. Оптимизация этапов технологии получения удвоенных гаплоидов кабачка (*Cucurbita pepo* L.) в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* / **А.С.Ермолаев**, Е.А.Домблидес // Овощи России. - 2022. - № 5. - С.5-14. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2022-5-5-14>.

3. Химич, Г.А. Сигнальная окраска молодых листьев кабачка при отборе растений с двухцветными плодами / Г.А.Химич, И.Б.Коротцева, **А.С.Ермолаев** // Овощи России. - 2021. - № 1. - С. 43-46. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-1-43-46>.

Публикации в международных базах научного цитирования:

4. Domblides, E. Efficient methods for evaluation on ploidy level of *Cucurbita pepo* L. regenerant plants obtained in unpollinated ovule culture *in vitro* / E.Domblides, **A.Ermolaev**, S.Belov, L.Kan, M.Skaptsov, A.Domblides // Horticulturae. - 2022. - Vol. 8. - No 11. - Pp. 1083. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8111083> (WoS, Scopus).

Прочие издания и материалы конференций:

5. Ермолаев, А.С. Различия особенностей пыльцы и опушения черешков листьев как маркерные признаки плоидности растений гиногенных линий кабачка *in vitro* / **А.С.Ермолаев**, А.В. Широкова, Е.А.Домблидес // Генетические ресурсы растений для генетических технологий: к 100-летию Пушкинских лабораторий ВИР: Материалы Всероссийской научно-практической конференции, г. Санкт-Петербург, 22–23 июня 2022 г.: тезисы докладов: научное электронное издание / под редакцией Ю. В. Ухатовой, Е. А. Соколовой; Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова. - Санкт-Петербург: ВИР, 2022. - 233 с. ISBN 978-5-907145-84-9, DOI 10.30901/978-5-907145-84-9

6. Ермолаев, А.С. Совершенствование технологии получения удвоенных гаплоидов кабачка (*Cucurbita pepo* L.) в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* / **А.С.Ермолаев**, Е.А.Домблидес // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии: сборник тезисов докладов 21-ой Всероссийской молодежной научной конференции. Конференция посвящается памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева. - М.: ФГБНУ ВНИИСБ, 2021. - С. 103-105. ISBN 978-5-6047415-9-7, DOI: 10.48397/ARRIAB.2021.21.XXI.060

Патенты на изобретения и селекционные достижения:

Подано заявление на допуск селекционного достижения к использованию «сорт кабачка Московское кружево» (дата регистрации 15.11.2022, № заявки 87650/7755192).