

На правах рукописи

Соловьева Юлия Александровна

**«ИЗУЧЕНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА
УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ РАСТЕНИЙ РОДА *CUCURBITA* L.»**

Специальность: 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата сельскохозяйственных наук

Москва – 2024

Работа выполнена на кафедре ботаники, селекции и семеноводства садовых растений Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Научный руководитель

Монахос Сократ Григорьевич,

доктор сельскохозяйственных наук, профессор, зав. кафедрой ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет–МСХА имени К.А. Тимирязева»

Официальные оппоненты:

Домблидес Артур Сергеевич,

доктор сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией генетики и цитологии ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства»

Лазько Виктор Эдуардович,

кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией бахчевых и луковых культур ФГБНУ «Федеральный научный центр риса»

Ведущая организация

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

Защита состоится «25» декабря 2024 г. в 12:00 на заседании диссертационного совета 35.2.030.08, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет–МСХА имени К.А. Тимирязева», по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19, тел: 8 (499) 976-17-14.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте Университета www.timacad.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
доктор сельскохозяйственных наук

Вертикова Елена Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследований

Семейство растений Cucurbitaceae является одним из самых значимых в производстве сельскохозяйственной продукции. Из общего видового разнообразия рода *Cucurbita* L. в России в основном выращивают три культурных вида – тыква твердокорая (*Cucurbita pepo* L.), тыква крупноплодная (*Cucurbita maxima* Duch.) и тыква мускатная (*Cucurbita moschata* Duch.) (Гончаров А.В., 2005; Елацкова А.Г., 2005). Для создания коллекции стабильного генетически разнообразного селекционного материала, соответствующей условиям современной конъюнктуры рынка, при минимальных трудозатратах и потреблении ресурсов существует необходимость в ускорении селекционного процесса при помощи методов биотехнологии и молекулярной генетики (Gemes-Juhazs A. et al., 2002; Шмыкова Н.А. и др., 2015а, 2015b; Пивоваров В.Ф. и др., 2022). Производство F₁-гибридов при использовании методов классической селекции связано с длительным отбором в течение нескольких поколений инбридинга для получения родительских линий, занимающим у однолетних овощных культур от 6 до 8 лет при невозможности получения 100%-ных гомозиготных растений (Gemes-Juhazs A. et al., 2002; Шмыкова Н.А. и др., 2015b; Домблидес Е.А. и др., 2021). Применение ДН-технологий позволяет сократить данный этап до 1 года с получением 100%-ных гомозигот по всем генам, а также существенном снижении расхода ресурсов и трудозатрат. Применение ДН-технологий в селекции растений рода *Cucurbita* L. позволяет создавать оригинальные генетические формы посредством реализации потенциала гаметоклональной изменчивости и способствует значительному упрощению отбора растений за счет быстрой идентификации рецессивных аллелей генов. Кроме того, удвоенные гаплоиды находят применение в фундаментальных исследованиях (Mishra V.K. et al., 2014; Шмыкова Н.А. и др., 2015b; Домблидес Е.А. и др., 2016, 2019, 2021; Пивоваров В.Ф. и др., 2022). В настоящее время не существует универсальных протоколов производства удвоенных гаплоидов у представителей рода *Cucurbita* L., отличающихся высокой эффективностью (Badawi M.A. et al., 2008; Шмыкова Н.А. и др., 2015b; Kurtar E.S. et al., 2018; Домблидес Е.А. и др., 2019). Создание коллекции разнообразного материала связано с выявлением возможных источников контролирующих ценные признаки генов, идентификация которых в пределах вида часто невозможна, вследствие чего возникает необходимость изучения возможности интрогрессии признаков посредством отдаленной гибридизации. Одно из главных направлений селекции тыквенных культур – создание растений с женским и преимущественно женским типом цветения, позволяющих повышать

гибридность семян при сокращении применения ручного труда и обработок этиленпродуцентами, в связи с чем разработка протоколов получения удвоенных гаплоидов посредством индукции гиногенеза также приобретает актуальность (Чистяков А.А. и др., 2016; Кузьмин С.В., 2021).

Степень разработанности темы исследований

После обнаружения спонтанных гаплоидов представителей семейства Cucurbitaceae вопрос экспериментального получения удвоенных гаплоидов растений данного семейства приобрел актуальность среди отечественных и зарубежных ученых (Galazka J. et al., 2013; Домблides Е.А. и др., 2021). Впервые успешное получение удвоенных гаплоидов кабачка (*Cucurbita pepo* L.) в культуре изолированных семязачатков датируется 1985 годом (Chambonnet D. et al., 1985). Позднее, в 1988 году было опубликовано первое сообщение об отзывчивости *Cucurbita moschata* Duch. на индукцию гиногенеза, однако первые растения-регенеранты в культуре завязей были получены к 2015 году (Kwack S.N. et al., 1988; Min Z. et al., 2015). Первые удвоенные гаплоиды *C. moschata* Duch. и *Cucurbita maxima* Duch. посредством индукции партеногенеза и андрогенеза были получены в 2009 году (Kurtar E.S., 2009).

Цели и задачи исследования

Цель исследования – изучение влияния факторов на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков и изучение наследования типа цветения при отдаленной гибридизации растений рода *Cucurbita* L. (*C. pepo* L., *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch.).

Задачи:

- 1) Изучение влияния температурной предобработки завязей (32°C в течение 2 суток; 4°C в течение 2 суток) на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков;
- 2) Изучение влияния температурного (32°C в течение 2 суток; 32°C в течение 4 суток; 4°C в течение 2 суток; 4°C в течение 4 суток) и светового режимов (темновая культура; наличие 16-часового фотопериода) обработки культивируемых эксплантов на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков;
- 3) Изучение влияния типа экспланта (изолированные семязачатки; фрагменты завязи; мацерированные сегменты) на частоту индукции гиногенеза в культуре *in vitro*;
- 4) Изучение влияния компонентов индукционной питательной среды (тип среды – CBM, MS, B5, MSm; источник углеводов – сахароза, мальтоза; концентрация сахарозы – 30 г/л, 40 г/л, 50 г/л, 60 г/л; регуляторы роста – 2 мг/л 2,4-D, 0,2 мг/л TDZ; желирующие агенты – агар, фитогель; гидролизат казеина – 500 мг/л; маннитол – 50 мг/л; пантотенат кальция – 0,5 мг/л; аминокислотно-

пептидный состав – 800 мг/л глутамин + 100 мг/л серин + 30 г/л глутатион, 100 мг/л пролин + 100 мг/л серин + 800 мг/л глутамин, 800 мг/л глутамин + 100 мг/л серин + 100 мг/л пролин + 30 мг/л глутатион, 800 мг/л глутамин + 10 мг/л серин + 10 мг/л пролин + 9 мг/л глутатион) на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков;

5) Изучение наследования женского типа цветения при интрогрессии признака методом межвидовой гибридизации *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch.

Научная новизна

Впервые выявлено, что световой режим культивирования изолированных семязачатков во время термической обработки (32°C) оказывает разнонаправленный эффект на индукцию гиногенеза. Установлено, что использование 16-часового фотопериода способствует повышению частоты индукции гиногенеза кабачка (*C. pepo* L.), однако снижает частоту прямого эмбриогенеза тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.). У эксплантов тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) не выявлено статистически достоверной разницы при изменении режима темновой культуры на режим фотопериода 16/8 ч.

Впервые показано, что использование индукционной питательной среды В5 способствует повышению частоты прямого эмбриогенеза тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) в культуре изолированных семязачатков.

Впервые установлено, что замена агара (7 г/л) на фитогель (3,5 л/г), несмотря на снижение общей гиногенной отзывчивости, способствует увеличению частоты прямого эмбриогенеза кабачка (*C. pepo* L.) в культуре изолированных семязачатков.

Впервые для видов *C. pepo* L., *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch. показано, что добавление в индукционные питательные среды 500 мг/л гидролизата казеина способствует значительному повышению частоты индукции гиногенеза и частоты прямого эмбриогенеза в культуре изолированных семязачатков.

Впервые отмечено отсутствие реакции эксплантов кабачка (*C. pepo* L.) и тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) на изменение аминокислотного (800 мг/л глутамин, 10 и 100 мг/л серин, 10 и 100 мг/л пролин) и пептидного (9 и 30 г/л глутатион) состава индукционной питательной среды СВМ в культуре изолированных семязачатков.

Впервые показано, что иницирование осмотического стресса добавлением в состав индукционной питательной среды 50 г/л маннитола приводит к снижению частоты индукции гиногенеза кабачка (*C. pepo* L.) и

тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) в культуре изолированных семязачатков.

Впервые установлено, что 0,5 мг/л пантотената кальция в составе индукционной питательной среды способствует снижению частоты индукции гиногенеза кабачка (*C. pepo* L.) и тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) в культуре изолированных семязачатков.

Впервые выявлен доминантный характер наследования женского типа цветения при отдаленной гибридизации *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch., анализом характера цветения потомств от реципрокного скрещивания установлено влияние фактора цитоплазмы на проявление типа цветения.

Теоретическая и практическая значимость

1) В результате изучения влияния режимов предобработки завязей (32°C, 4°C в течение 48 час.), режимов обработки семязачатков в культуре *in vitro* (32°C, 4°C в течение 2 и 4 сут.) выявлена разнонаправленная реакция на индукцию гиногенеза семязачатков трех представителей рода *Cucurbita* L. (*C. pepo* L., *C. moschata* Duch., *C. maxima* Duch.), что указывает на высокую генотипспецифичность и слабую зависимость формирования эмбриокомпетентных семязачатков (яйцеклеток) от температурного фактора среды, что в свою очередь не позволяет использовать его в качестве надежного фактора регуляции/повышения гиногенной способности семязачатков трех исследованных видов рода *Cucurbita* L.

2) Установленное существенное влияние типа экспланта (фрагменты завязи, мацерированные сегменты, изолированные семязачатков) на частоту индукции гиногенеза и прямого эмбриогенеза кабачка (*C. pepo* L.) у 100% исследованных генотипов, свидетельствует о конкуренции соматических тканей завязи кабачка на питательной среде и о целесообразности использования в качестве эксплантов изолированные семязачатки и мацерированные сегменты.

3) Установленное положительное влияние на частоту индукции гиногенеза добавления ряда компонентов в состав индукционной питательной среды СВМ, в частности гидролизата казеина (500 мг/л), изменение концентрации сахарозы (40 г/л), исключение из состава среды пантотената кальция (0,5 мг/л), а также замена индукционной питательной среды на среду В5, позволяет модифицировать и усовершенствовать технологию производства удвоенных гаплоидов кабачка (*C. pepo* L.) в культуре изолированных семязачатков.

4) Установленный доминантный характер наследования женского типа цветения (ЖТЦ) и влияние цитоплазматического фактора на проявление типа цветения при отдаленной гибридизации *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch.

позволяют управляемо осуществлять межгеномную интрогрессию генов, контролирующих тип цветения, из генома *C. moschata* Duch. в геном *C. maxima* Duch. Созданные отдаленные гибриды *C. maxima* Duch. × *C. moschata* Duch. и *C. moschata* Duch. × *C. maxima* Duch. являются новым генетическим источником признака женский тип цветения и могут быть использованы в селекционных программах по созданию тыквы крупноплодной с ЖТЦ для обеспечения экономически эффективного гибридного семеноводства F₁-гибридов.

Методология и методы исследования

Теоретическая часть работы выполнена на основе детального анализа источников литературы и аналитического обобщения результатов проведенных ранее исследований, соответствующих цели и задачам диссертации. Экспериментальная часть работы выполнена с использованием стандартных и частных методов, обобщения полученных в ходе экспериментов данных и их статистического анализа при помощи дисперсионного анализа с использованием пакетов программ IBM SPSS Statistics.

Положения, выносимые на защиту

1) Температурная предобработка завязей, воздействие световым и температурным режимом на инкубируемые *in vitro* семязачатки имеет разнонаправленный эффект индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков растений рода *Cucurbita* L. (*C. pepo* L., *C. moschata* Duch., *C. maxima* Duch.).

2) Достоверное повышение частоты индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков растений *C. pepo* L. обеспечивается добавлением в индукционную питательную среду СВМ гидролизата казеина (500 мг/л), сахарозы (40 г/л), заменой индукционной питательной среды на среду В5.

3) Добавление в индукционную питательную среду СВМ пантотената кальция (0,5 мг/л), тидиазурона (0,2 мг/л), маннитола (50 мг/л), мальтозы (30 г/л) приводит к существенному снижению частоты индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков большинства образцов кабачка (*C. pepo* L.) и тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.).

4) Женский тип цветения имеет доминантный характер наследования при отдаленной гибридизации *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch., фактор цитоплазмы оказывает влияние на проявление типа цветения у межвидовых гибридов.

Степень достоверности

Высокая степень достоверности представленных в работе результатов исследования подтверждается широким спектром проведенных экспериментов, заложенных при условии достаточных объема выборки и количества

повторностей, а также статистической обработкой экспериментальных данных, полученных в ходе анализа результатов опытов.

Апробация результатов

Результаты работы доложены и обсуждены на 2-х международных и 2-х всероссийских конференциях:

1. 73-я Международная научно-практическая конференция, посвященная 180-летию со дня рождения М.К. Турского (Москва, 2020);
2. Всероссийская с международным участием научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 155-летию со дня рождения Н.Н. Худякова (Москва, 2021);
3. 21-я Всероссийская конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (Москва, 2021);
4. Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 180-летию со дня рождения К.А. Тимирязева (Москва, 2023).

Публикация результатов исследований

По материалам диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 3 в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 3 в сборниках докладов и тезисов, подана 1 заявка на выдачу патента на изобретение.

Личный вклад соискателя

Результаты проведенных теоретических и экспериментальных исследований получены соискателем лично. Автору также принадлежат разработка схем опытов, проведение экспериментов, сбор и анализ эмпирических данных, теоретическое обобщение результатов.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из основных разделов, включающих введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и заключение. Работа представлена на 141 страницах. В работе присутствуют 16 таблиц, 22 рисунка, 2 приложения. Библиографический список включает 163 источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве растительного материала использовали образцы *C. pero* L., *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch. из генетической коллекции ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева». Растения выращивали в условиях открытого и защищенного грунта. Ручной посев семян производили в начале весеннего периода в заполненные торфом горшки объемом 0,5 л на глубину 1-2 см. По мере необходимости производили поливы и внесение

комплексных подкормок. В мае растения пересаживали в открытый грунт и в грунтовые поликарбонатные теплицы.

Технология производства удвоенных гаплоидов

Изолирование и культивирование семязачатков производили в соответствии с методикой культивирования семязачатков тыквы (Шмыкова Н.А., 2011). Экспланты помещали на индукционную питательную среду СВМ (Gemes-Juhasz A. et al., 2002) с модификациями (положительное влияние отсутствия 0,5 мг/л пантотената кальция в составе среды на развитие семязачатков *in vitro* было отмечено и показано, в дальнейших экспериментах индукционную среду данного состава использовали в качестве контроля) в одноразовые чашки Петри диаметром 60 мм по 10 штук для дальнейшего культивирования при температуре 24°C и фотопериоде 16/8 час.

Для изучения факторов, оказывающих влияние на частоту индукции гиногенеза (ИГ) в культуре *in vitro*, проведена серия опытов. В качестве контроля во всех экспериментах использовали индукционную питательную среду СВМ (Gemes-Juhasz A. et al., 2002) с добавлением 2 мг/л 2,4-D, 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара. Опыты закладывали не менее чем в 6-кратной повторности (1 чашка Петри – одна повторность).

1) Изучение влияния предварительной температурной обработки завязей проведено с использованием 7 образцов *C. pepo* L., 3 образцов *C. moschata* Duch. Варианты опыта: контроль без предобработки завязей, тепловая (32°C) и холодовая (4°C) предобработка в течение 2 суток.

2) Изучение влияния температурного режима обработки культивируемых эксплантов проведено с использованием 10 образцов *C. pepo* L., 2 образцов *C. moschata* Duch. Варианты опыта: контроль без температурной обработки эксплантов, тепловая (32°C) обработка в течение 2 и 4 суток, холодовая (4°C) обработка в течение 2 и 4 суток.

3) Изучение влияния светового режима культивирования эксплантов во время термической обработки проведено с использованием 5 образцов *C. pepo* L., 2 образцов *C. maxima* Duch., 2 образцов *C. moschata* Duch. Варианты опыта: контроль в условиях темновой культуры, наличие 16-часового фотопериода.

4) Изучение влияния типа экспланта проведено с использованием 6 образцов *C. pepo* L. Варианты опыта: изолированные семязачатки (контроль), фрагменты завязи, мацерированные сегменты.

5) Изучение влияния типа индукционной питательной среды проведено с использованием 7 образцов *C. pepo* L., 3 образцов *C. maxima* Duch., 4 образцов *C. moschata* Duch. Варианты опыта: СВМ (Gemes-Juhasz A. et al.,

2002; контроль), MS (Murashige T. et al., 1962), B5 (Gamborg O.L. et al., 1968), MSm (Masuda K. et al., 1981).

6) Изучение влияния источника углеводов проведено с использованием 4 образцов *S. pero* L. Варианты опыта: СВМ с добавлением 30 г/л сахарозы (контроль), СВМ с добавлением 30 г/л мальтозы.

7) Изучение влияния концентрации сахарозы проведено с использованием 3 образцов *S. pero* L. Варианты опыта: СВМ с добавлением 30 г/л (контроль), 40 г/л, 50 г/л, 60 г/л сахарозы.

8) Изучение влияния желирующих агентов проведено с использованием 5 образцов *S. pero* L. Варианты опыта: СВМ с добавлением 7 г/л агара (контроль), СВМ с добавлением 3,5 г/л фитогеля.

9) Изучение влияния регуляторов роста проведено с использованием 5 образцов *S. pero* L. Варианты опыта: СВМ с добавлением 2 мг/л 2,4-D (контроль), СВМ с добавлением 0,2 мг/л TDZ.

10) Изучение влияния аминокислотно-пептидного состава проведено с использованием 4 образцов *S. pero* L., 1 образца *S. moschata* Duch. Варианты опыта: контроль без добавления аминокислот и пептидов, СВМ с добавлением 800 мг/л глутамина, 100 мг/л серина, 30 г/л глутатиона, СВМ с добавлением 100 мг/л пролина, 100 мг/л серина, 800 мг/л глутамина, СВМ с добавлением 800 мг/л глутамина, 100 мг/л серина, 100 мг/л пролина, 30 мг/л глутатиона, СВМ с добавлением 800 мг/л глутамина, 10 мг/л серина, 10 мг/л пролина, 9 мг/л глутатиона.

11) Изучение влияния гидролизата казеина проведено с использованием 6 образцов *S. pero* L., 3 образцов *S. maxima* Duch., 3 образцов *S. moschata* Duch. Варианты опыта: СВМ без добавления гидролизата казеина (контроль), СВМ с добавлением 500 мг/л гидролизата казеина.

12) Изучение влияния маннитола проведено с использованием 6 образцов *S. pero* L., 1 образца *S. maxima* Duch. Варианты опыта: СВМ без добавления маннитола (контроль), СВМ с добавлением 50 мг/л маннитола.

13) Изучение влияния пантотената кальция проведено с использованием 6 образцов *S. pero* L., 2 образцов *S. maxima* Duch. Варианты опыта: СВМ без добавления пантотената кальция (контроль), СВМ с добавлением 0,5 мг/л пантотената кальция.

На основе полученных данных проведен одно- и двухфакторный дисперсионный анализ (фактор А – генотип; фактор В – каждое из внешних воздействий в виде температурных режимов предобработки завязей и обработки эксплантов, светового режима во время термической обработки, типа экспланта, компонентов питательной среды) для установления влияния изучаемых факторов на частоту ИГ в пределах вида. Для изучения действия

фактора в пределах генотипа применяли попарное сравнение контрольных вариантов с вариантами, в средних значениях которых были выявлены существенные различия с контролем на 5%-ном уровне значимости, с использованием t-критерия Стьюдента. Растения-регенеранты адаптировали к условиям внешней среды по достижении ими фазы 1-2 настоящих листьев и развитой корневой системы при температуре воздуха 18°C, фотопериоде 16/8. Подсчет хромосом в клетках меристем корня проводили при помощи методики "Steam Drop" (Kirov I. et al., 2015). Для идентификации принадлежности генотипов растений к гомо- или гетерозиготам использовали оценку потомства от самоопыления регенерантов, полученных от образцов F₁-гибридов, по расщеплению в фенотипе.

Отдаленная гибридизация между *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch.

Отдаленную гибридизацию между *C. maxima* и *C. moschata* проводили с целью передачи признака «женский тип цветения» от идентифицированного гиноцийного растения F₁ Т (*C. moschata* Duch.) в геном *C. maxima* Duch. Для преодоления репродуктивных барьеров применяли опыление в бутонах за сутки до раскрытия цветка и методику embryo rescue с использованием протокола спасения зародышей растений рода *Cucurbita* L. при межвидовой гибридизации (Rakha M.T. et al., 2012). Сбор незрелых плодов проводили на 14 сутки после опыления. Экспланты помещали на питательную среду MS, дополненную 20 г/л сахарозы, 8 г/л агара, 0,1 мг/л Kin + 0,01 мг/л ИВА. В качестве контроля оставляли на растении по одной опыленной завязи на комбинацию.

РЕЗУЛЬТАТЫ

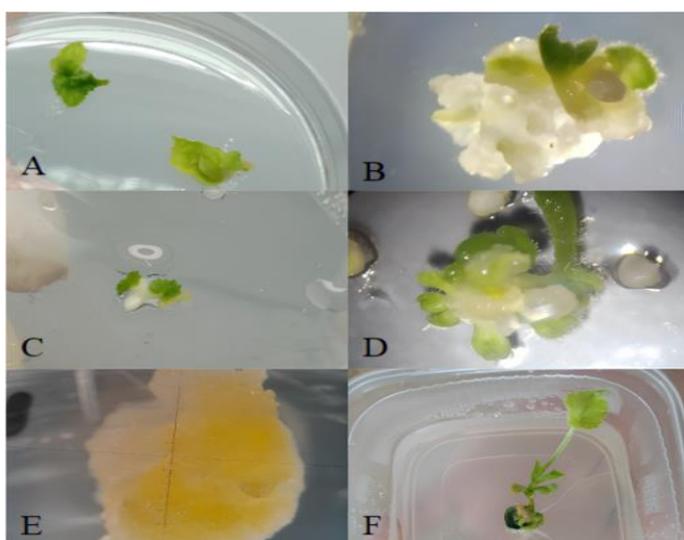


Рисунок 1 – Развитие эксплантов представителей рода *Cucurbita* L. в культуре *in vitro*: А – прямой и В - непрямой эмбриогенез *C. pepo* L., С – прямой и D - непрямой эмбриогенез *C. maxima* Duch.; Е – каллусогенез *C. moschata* Duch.; F – растение-регенерант *C. pepo* L.

Для оценки влияния внешних факторов на индукцию гиногенеза проводили подсчет образовавшихся структур с учетом частоты индукции гиногенеза (ИГ) (подсчет образованных посредством прямого эмбриогенеза и каллусогенеза структур) и частоты прямого эмбриогенеза (ПЭ). У образцов *C. pepo* L. и *C. maxima* Duch. наблюдали развитие регенерантов посредством прямого и непрямого эмбриогенеза. У *C. moschata* Duch. - интенсивное каллусообразование (рис. 1).

Изучение влияния температурной предобработки завязей на частоту индукции гиногенеза

При использовании тепловой (32°C) предобработки завязей в течение 2 суток у 57,1% образцов наблюдали снижение частоты ИГ при увеличении частоты ПЭ у такой же доли образцов. При использовании холодной (4°C) предобработки завязей в течение 2 суток у 42,9% образцов *S. perov* L. наблюдали увеличение частоты ИГ при увеличении частоты ПЭ у 28,6% образцов. У *S. moschata* Duch. не выявлено существенных различий в частоте ИГ при использовании холодной (4°C) предобработки завязей по сравнению с контролем, однако установлено негативное влияние тепловой (32°C) предварительной обработки при снижении частоты ИГ у 100% образцов.

Изучение влияния температурного и светового режимов обработки эксплантов на частоту индукции гиногенеза

Температурный режим обработки эксплантов. При применении температурной обработки (32°C) в течение 2 суток у 50% образцов *S. perov* L. наблюдали существенное снижение частоты ИГ при увеличении частоты ПЭ у 20% образцов; у образцов *S. moschata* Duch. не выявлено реакции на данный вариант термической обработки. При увеличении продолжительности воздействия на экспланты повышенными температурами (32°C) до 4 суток у 50% образцов *S. perov* L. наблюдали снижение частоты ИГ при увеличении частоты ПЭ у 40% образцов; у 50% образцов *S. moschata* Duch. наблюдали увеличение частоты ИГ. При воздействии на экспланты пониженными температурами (4°C) в течение 2 суток у 50% образцов *S. perov* L. наблюдали снижение частоты ИГ при увеличении и снижении частоты ПЭ у 30% образцов; у 50% образцов *S. moschata* Duch. наблюдали снижение частоты ИГ. При увеличении продолжительности воздействия на экспланты пониженными температурами (4°C) до 4 суток наблюдали существенное снижение частоты ИГ у 60% образцов и частоты ПЭ у 40% образцов *S. perov* L.; у 100% образцов *S. moschata* Duch. наблюдали существенное снижение частоты ИГ.

Световой режим культивирования эксплантов во время термической обработки. При наличии 16-часового фотопериода в условиях проведения термической обработки у 80% образцов *S. perov* L. выявлено значимое увеличение частоты ИГ, у 50% образцов *S. maxima* Duch. – снижение частоты ИГ и снижение частоты ПЭ у 100% образцов. У образцов *S. moschata* Duch. не выявлено статистически значимого влияния данного фактора на частоту ИГ.

Изучение влияния типа экспланта на частоту индукции гиногенеза

Установлено, что при культивировании фрагментов завязей значительно снижается частота ИГ у всех изученных образцов *S. perov* L. по сравнению с культурой изолированных семязачатков. Культивирование мацерированных

сегментов у 66,7% образцов *C. pero* L. не оказало влияния, а у 33,3% – снизило частоту ИГ, однако при этом выявлено значимое увеличение частоты индукции ПЭ у 66,7% образцов.

Изучение влияния компонентов индукционной питательной среды на частоту индукции гиногенеза

Тип питательной среды. Отмечено увеличение частоты ИГ *C. pero* L. при культивировании семязачатков на питательной среде В5 у 71,4% образцов при снижении частоты ПЭ у той же доли образцов. Питательная среда В5 не оказала влияния на частоту ИГ *C. maxima* Duch., однако выявлено значимое увеличение частоты ПЭ у 100% образцов. При культивировании семязачатков на индукционных средах MS и MSm у большинства образцов *C. pero* L. и *C. maxima* Duch. наблюдали отсутствие реакции или снижение частоты ИГ. Частота ИГ *C. moschata* Duch. достоверно снижалась у 75%, 50% и 75% образцов при использовании питательных сред MS, В5 и MSm соответственно по сравнению с контролем.

Источник углеводов. У 50% образцов *C. pero* L. выявлено отсутствие реакции на замену сахарозы (30 г/л) мальтозой (30 г/л). Однако у 50% образцов наблюдали значительное снижение частоты ИГ при культивировании на питательной среде с добавлением мальтозы.

Концентрация сахарозы. У 66,7% *C. pero* L. выявлено существенное увеличение частоты ИГ на питательной среде с содержанием сахарозы 40 г/л. При увеличении концентрации сахарозы в составе индукционной среды до 50 и 60 г/л наблюдали снижение частоты ИГ. Не выявлено существенных различий в частоте ПЭ при использовании различных концентраций сахарозы по сравнению с контролем, однако показано преимущество добавления в индукционную среду 40 г/л сахарозы по сравнению с 50 и 60 г/л.

Тип желирующего агента. Выявлена неоднозначность действия фитогеля в культуре изолированных семязачатков *C. pero* L. - у 80% образцов выявлено снижение частоты ИГ и увеличение частоты ПЭ при замене агара (7 г/л) фитогелем (3,5 г/л).

Регуляторы роста. Выявлено снижение частоты ИГ и частоты ПЭ у 80% образцов *C. pero* L. при культивировании на индукционной среде с добавлением TDZ (0,2 мг/л) по сравнению с 2,4-D (2 мг/л).

Аминокислотно-пептидный состав. Добавление комплексов аминокислот и пептидов в индукционную питательную среду не оказало статистически значимого влияния на частоту ИГ *C. pero* L. и *C. moschata* Duch.

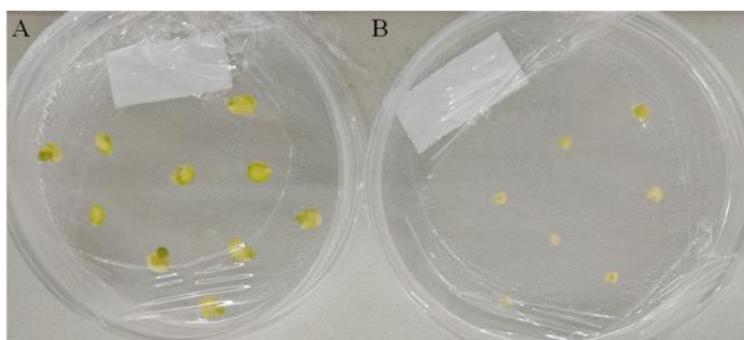


Рисунок 2 – Развитие изолированных семязачатков *C. maxima* Duch. в зависимости от наличия гидролизата казеина в составе питательной среды: А – СВМ + 500 мг/л гидролизата казеина; В – СВМ

Гидролизат казеина.

Установлено значимое увеличение частоты ИГ у 100% и частоты ПЭ у 66,7% образцов *C. pepo* L. при добавлении 500 мг/л гидролизата казеина в состав индукционной среды. У 66,7% образцов *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch. на питательной среде с добавлением гидролизата

казеина происходило значимое увеличение частоты ИГ при увеличении частоты ПЭ у 100% образцов *C. maxima* Duch. При добавлении в среды 500 мг/л гидролизата казеина рост и развитие семязачатков происходит более активно (рис. 2).

Маннитол. На питательной среде, дополненной маннитолом 50 мг/л, у 66,7% образцов *C. pepo* L. наблюдали снижение частоты ИГ при увеличении частоты ПЭ у 50% образцов; у линии *C. maxima* Duch. – достоверное снижение частоты ИГ.

Пантотенат кальция. На питательной среде с добавлением пантотената кальция 0,5 мг/л выявлено значимое снижение частоты ИГ у 66,7% и частоты ПЭ у 50% образцов *C. pepo* L. (табл. 1), у 100% образцов *C. maxima* Duch. – достоверное снижение частоты ПЭ.

Таблица 1 – Частота индукции гиногенеза в зависимости от наличия пантотената кальция в составе индукционной питательной среды, шт./ч.Петри

Генотип		Частота индукции гиногенеза*		Частота прямого эмбриогенеза*	
		– (контроль)	Ca пантотенат	– (контроль)	Ca пантотенат
Кабачок (<i>C. pepo</i> L.)	F ₁ Байкал	6,3a	3,3b	1,0a	0,3b
	F ₁ Балхаш	6,5a	4,0b	1,5a	0,7b
	F ₁ Марселла	8,4a	4,9b	0,7a	0,9a
	F ₁ Арал	2,2a	2,0a	0,7a	0,8a
	F ₁ Гарант	3,5a	7,2b	0,7a	0,7a
	F ₁ Отелло	4,2a	2,3b	1,2a	0,5b
	Средняя по варианту (x _j)	5,6	4,0	1,0	0,7
НСР ₀₅ A; B; AB		1,3; 0,5; 2,1		–; 0,3; –	

Примечание – В чашке Петри 10 семязачатков; *Значения в строке, отмеченные b, согласно t-критерию Стьюдента, имеют существенные различия на 5%-ном уровне значимости.

Межвидовая гибридизация *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch.



Рисунок 3 – Родительские компоненты и межвидовые гибриды: А – *C. maxima* Duch. (F₁ ОК); В – *C. moschata* Duch. (F₁ Т); С, D – *C. maxima* Duch. × *C. moschata* Duch.

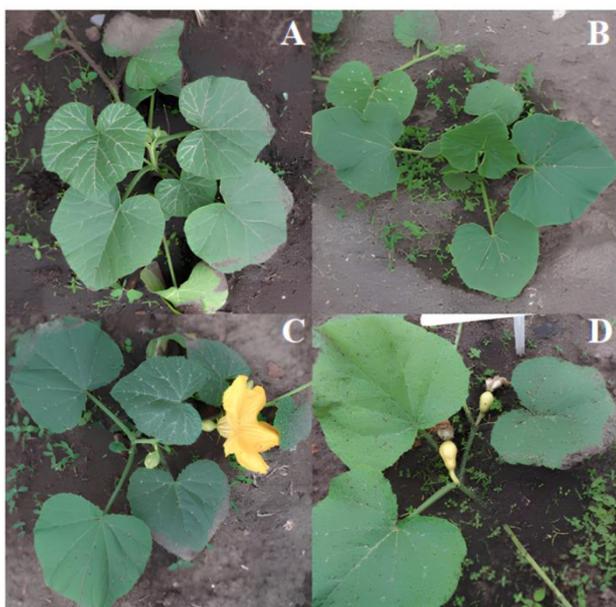


Рисунок 4 – Родительские компоненты и межвидовые гибриды: А – ♀ F₁ Т (*C. moschata* Duch.); В – ♂ Т-110 (*C. maxima* Duch.); С, D – *C. moschata* Duch. × *C. maxima* Duch.

использования для дальнейшей (*C. maxima* Duch.) на ЖТЦ.

От скрещивания *C. maxima* Duch. × *C. moschata* Duch. получены два межвидовых гибрида (рис. 3).

У межвидовых гибридов отсутствовали узлы с мужскими цветками. Формирование женских цветков отмечено с 1 узла. При обработке гибрида №2 нитратом серебра растение формировало мужские цветки, что указывает на проявление у межвидовых гибридов женского типа цветения с возможностью смещения пола.

От скрещивания *C. moschata* Duch. × *C. maxima* Duch. получили девять гибридных растений (рис. 4). У гибридов с 3-5 узла наблюдали преобладание женских цветков над мужскими. Однако ни одно гибридное растение не было полностью гиноцийным. Полученные данные свидетельствуют о наличии преимущественно женского типа цветения у межвидовых гибридов данной комбинации скрещивания.

Отмечено, что использование в качестве материнского компонента скрещивания *C. moschata* Duch. повышает частоту образования жизнеспособных гибридных семян. Пыльца всех изученных межвидовых гибридов хорошо окрашивалась ацетокармином, что свидетельствует о ее жизнеспособности с перспективой селекции тыквы крупноплодной

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1) Выявлена разнонаправленность реакции эксплантов представителей рода *Cucurbita* L. на изменение режимов предобработки завязей и обработки семязачатков в культуре *in vitro*:

– При использовании тепловой (32°C) предварительной обработки завязей кабачка (*C. pepo* L.) наблюдали снижение частоты индукции гиногенеза у 57,1% образцов, тогда как у 28,6% образцов данный показатель находился на уровне контроля, а у 14,3% – увеличился в 1,2 раза. При этом у 57,1% образцов также увеличилась частота прямого эмбриогенеза. При использовании холодной (4°C) предварительной обработки завязей у 42,9% образцов наблюдали увеличение, а у 28,6% образцов – снижение частоты индукции гиногенеза. При этом у 28,6% образцов также наблюдали увеличение, а у 14,3% – снижение частоты прямого эмбриогенеза. У 100% образцов тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) наблюдали снижение частоты формирования гиногенных структур при использовании тепловой предобработки завязей. Не выявлено значимой реакции семязачатков на применение холодной предварительной обработки.

– Применение различных режимов термической обработки свежееинокулированных на питательную среду *in vitro* эксплантов обладало разнонаправленным характером. При использовании температурной обработки при 32°C в течение 2 суток наблюдали снижение и увеличение частоты индукции гиногенеза у 50% и 20 % образцов кабачка (*C. pepo* L.). При увеличении экспозиции тепловой обработки до 4 суток наблюдали снижение и увеличение частоты индукции гиногенеза у 50% и 10% образцов соответственно. При этом варианты тепловой обработки эксплантов не оказали значимого влияния на частоту прямого эмбриогенеза. При использовании термической обработки при 4°C в течение 2 суток у 50% образцов кабачка (*C. pepo* L.) наблюдали снижение, а у 10% – увеличение частоты индукции гиногенеза. При этом у 30% образцов наблюдали снижение, а у 30% образцов – увеличение частоты прямого эмбриогенеза. При увеличении экспозиции холодной обработки эксплантов до 4 суток у 60% образцов наблюдали снижение, а у 10% образцов – увеличение частоты индукции гиногенеза. При этом наблюдали снижение и увеличение частоты прямого эмбриогенеза у 40% и 10% образцов соответственно. У образцов тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) не выявлена реакция эксплантов на применение термической обработки при 32°C в течение 2 суток. При увеличении экспозиции тепловой обработки наблюдали увеличение частоты формирования гиногенных структур у 50% образцов. Использование холодной обработки в

течение 2 и 4 суток привело к снижению частоты индукции у 50% и 100% образцов.

– Выявлена видовая разнонаправленность реакции изученных образцов на изменение светового режима культивирования эксплантов во время термической обработки (32°C). Использование 16-часового фотопериода повышало частоту индукции гиногенеза у 80% образцов и частоту прямого эмбриогенеза у 80% образцов кабачка (*C. pepo* L.) по сравнению с темновой культурой. У эксплантов тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) реакция на изменение светового режима была обратной, наблюдали значимое снижение частоты индукции гиногенеза у 50% и частоты прямого эмбриогенеза у 100% образцов. У образцов тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) не выявлено статистически значимых различий в частоте образования гиногенных структур при использовании различных режимов освещенности во время термической обработки.

2) Установлено, что использование в качестве экспланта фрагментов завязи кабачка (*C. pepo* L.) негативно влияет на отзывчивость семязачатков и частоту прямого эмбриогенеза у 100% исследованных генотипов. При инкубировании таких эксплантов на питательной среде наблюдается интенсивное каллусообразование и разрастание соматической ткани фрагментов, что приводит к угнетению развития гиногенных структур. В то же время культивирование мацерированных сегментов, значительно повышает частоту прямого эмбриогенеза у 66,7% образцов кабачка (*C. pepo* L.) по сравнению с использованием изолированных семязачатков.

3) Выявлено негативное или нейтральное влияние замены стандартной индукционной питательной среды СВМ на альтернативные среды В5, MS и MSm при культивировании изолированных семязачатков растений *Cucurbita* L., существенное снижение частоты индукции гиногенеза, частоты прямого эмбриогенеза или отсутствие влияния наблюдали у образцов кабачка (*C. pepo* L.), тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.), тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.). Исключением стало положительное воздействие питательной среды В5 на индукцию гиногенеза растений *Cucurbita*, где наблюдали существенное увеличение частоты образования гиногенных структур у 71,4% образцов кабачка (*C. pepo* L.) и увеличение частоты индукции прямого эмбриогенеза у 100% образцов тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.).

4) Показано отсутствие и статистически значимое снижение частоты индукции гиногенеза, частоты прямого эмбриогенеза при замене сахарозы (30 г/л) на мальтозу (30 г/л) той же концентрации. Вместе с этим, показано достоверное увеличение частоты индукции гиногенеза 66,7% образцов кабачка

(*C. pepo* L.) при культивировании изолированных семязачатков на питательной среде, содержащей 40 г/л сахарозы, в сравнении со стандартной средой, содержащей 30 г/л сахарозы. Повышение концентрации сахарозы до 50 г/л и 60 г/л в составе индукционной среды существенно не влияло и снижало частоту формирования гиногенных структур большинства изученных образцов (*C. pepo* L.), соответственно.

5) Выявлено отрицательное воздействие маннитола (50 мг/л) в индукционной питательной среде на частоту индукции гиногенеза у 66,7% образцов кабачка (*C. pepo* L.), при снижении частоты в целом по 6 генотипам в 1,4 раза (с 5,6 до 4,1 шт./ч.Петри) и в 1,7 раза у образца тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.), при этом отмечено его разнонаправленное влияние на частоту прямого эмбриогенеза генотипов кабачка.

б) Отмечено неоднозначное воздействие фитогеля в составе питательной среды на индукцию гиногенеза кабачка (*C. pepo* L.), при замене агара (7 г/л) на фитогель (3,5 г/л) преобладающее большинство (80%) образцов имели значимое снижение частоты образования гиногенных структур, однако такая же доля (80%) изученных образцов имела существенное увеличение частоты прямого эмбриогенеза.

7) Показано отрицательное воздействие TDZ (0,2 мг/л) в сравнении с 2,4-D (2 мг/л) на отзывчивость образцов и индукцию эмбриогенеза кабачка (*C. pepo* L.) в культуре изолированных семязачатков, частота формирования гиногенных структур и прямого эмбриогенеза достоверно снижались при замене 2,4-D на TDZ у 80% образцов.

8) Установлено положительное влияние гидролизата казеина на индукцию гиногенеза растений *Cucurbita* L.: добавление 500 мг/л гидролизата казеина в индукционную питательную среду СВМ существенно повышало частоту формирования гиногенных структур у 66,7% образцов кабачка (*C. pepo* L.), тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) и тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.). При этом показано, что добавление в среду аминокислот (800 мг/л глутамина, 10 и 100 мг/л серина, 9 и 30 г/л глутатиона, 10 и 100 мг/л пролина) в представленных экспериментальных комбинациях на индукцию гиногенеза кабачка (*C. pepo* L.) и тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) существенного влияния не оказывает.

9) Показано отрицательное влияние пантотената кальция (0,5 мг/л) на индукцию гиногенеза кабачка и тыквы крупноплодной при добавлении в индукционную питательную среду, выраженное в существенном снижении частоты индукции гиногенеза у 66,7% генотипов *C. pepo* L., и снижение частоты прямого эмбриогенеза у 50% и 100% образцов *C. pepo* L. и *C. maxima* Duch. соответственно.

10) В результате сравнительного анализа характера цветения, образования мужских и женских цветков, у межвидовых гибридов от реципрокного скрещивания *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch. установлен доминантный характер наследования женского типа цветения при отдаленной гибридизации и установлено влияние фактора цитоплазмы на проявление типа цветения, выявлены гиноцийный тип цветения у межвидовых гибридов в комбинации *C. maxima* Duch. × *C. moschata* Duch. и преимущественно женский тип цветения у гибридов в комбинации скрещивания *C. moschata* Duch. × *C. maxima* Duch.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации:

Работы в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ:

1. Соловьева, Ю.А. Изучение факторов индукции гиногенеза представителей рода *Cucurbita* L. / Ю.А. Соловьева, С.Г. Монахос // Картофель и овощи. – 2024. – № 5. – С. 36-40.

2. Соловьева, Ю.А. Факторы индукции эмбриогенеза в культуре изолированных семязачатков кабачка (*Cucurbita pepo* L.) / Ю.А. Соловьева, Е.В. Осминина, А.В. Вишнякова, А.А. Миронов, Г.Ф. Монахос, С.Г. Монахос // Достижения науки и техники АПК. – 2024. – Т. 38, № 6. – С. 16-21.

3. Чистяков, А.А. Создание F₁-гибридов кабачка на базе гиноцийных линий / А.А. Чистяков, Ю.А. Соловьева, Г.Ф. Монахос // Картофель и овощи. – 2023. – № 2. – С. 37-40.

Работы в прочих изданиях:

1. Осминина, Е.В. Изучение и оптимизация технологии создания удвоенных гаплоидов Cucurbitaceae в культуре изолированных семязачатков / Осминина Е.В., Соловьева Ю.А. // Сборник студенческих научных работ: в. 27, ч. II (Москва, 24-27 марта 2020 года). – 2020. – С. 322-325.

2. Осминина, Е.В. Эмбрио- и каллусогенез в культуре изолированных семязачатков *Cucurbita pepo* L. / Осминина Е.В., Соловьева Ю.А., Монахос С.Г. // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии: 21-ая Всероссийская конференция молодых ученых (Москва, 19-21 октября 2021 года). – 2021. – С. 100-101.

3. Соловьева, Ю.А. Биотехнологические методы ускорения производства F₁-гибридов представителей рода *Cucurbita pepo* L. / Соловьева Ю.А. // Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 180-летию со дня рождения К.А. Тимирязева: сборник статей (Москва, 05-07 июня 2023 года). – 2023. – С. 77-80.