



МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ – МСХА имени К.А.
ТИМИРЯЗЕВА
(ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева)

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Научный руководитель
д.с.-х.н. Монахос Сократ Григорьевич

Москва – 2024

Оглавление

Введение	7
1. Обзор литературы.....	16
1.1. Ботаническое описание и биологические особенности растений рода <i>Cucurbita</i> L.....	16
1.2. Морфологические видовые особенности	19
1.2.1. <i>Cucurbita maxima</i> Duch.	19
1.2.2. <i>Cucurbita moschata</i> Duch.	20
1.2.3. <i>Cucurbita pepo</i> L.....	21
1.3. Биология цветения.....	23
1.4. Хозяйственное значение	24
1.5. Основные направления селекции тыквы (<i>Cucurbita</i> L.).....	25
1.6. Отдаленная гибридизация.....	26
1.6.1. Получение межвидовых гибридов <i>Cucurbita</i> L.....	27
1.6.2. Спасение зародышей	30
1.7. Технология получения удвоенных гаплоидов	32
1.8. Факторы, оказывающие влияние на индукцию гиногенеза	34
1.8.1. Термическая обработка	35
1.8.2. Световой режим культивирования эксплантов во время термической обработки.....	38
1.8.3. Тип экспланта	39
1.8.4. Компоненты питательной среды	41
1.8.4.1. Тип питательной среды	41
1.8.4.2. Источник углеводов	43
1.8.4.3. Концентрация сахарозы	44
1.8.4.4. Регуляторы роста	45
1.8.4.5. Желирующие агенты	49
1.8.4.6. Гидролизат казеина	50
1.8.4.7. Маннитол	51
1.8.4.8. Пантотенат кальция	52

1.8.4.9. Аминокислотно-пептидный состав	54
2. Материалы и методы.....	58
2.1. Место проведения исследования.....	58
2.2. Растительный материал.....	58
2.3. Условия выращивания донорных растений	58
2.4. Технология создания удвоенных гаплоидов.....	59
2.4.1. Изолирование и культивирование эксплантов	59
2.4.2. Изучение влияния температурной предобработки завязей на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	60
2.4.3. Изучение влияния температурного и светового режимов обработки культивируемых эксплантов на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	61
2.4.4. Изучение влияния типа экспланта на частоту индукции гиногенеза в культуре <i>in vitro</i>	62
2.4.5. Изучение влияния компонентов индукционной питательной среды на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков.....	62
2.4.5.1. Изучение влияния типа индукционной питательной среды на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков.....	62
2.4.5.2. Изучение влияния источника углеводов на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	63
2.4.5.3. Изучение влияния концентрации сахарозы на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	64
2.4.5.4. Изучение влияния желирующих агентов на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	64
2.4.5.5. Изучение влияния регуляторов роста на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	65
2.4.5.6. Изучение влияния аминокислотно-пептидного состава на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	65
2.4.5.7. Изучение влияния гидролизата казеина на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	66

2.4.5.8. Изучение влияния маннитола на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	66
2.4.5.9. Изучение влияния пантотената кальция на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	67
2.4.6. Анализ уровня ploидности	67
2.4.7. Оценка потомства от самоопыления для выявления гомо- и гетерозигот	68
2.5. Отдаленная гибридизация между видами <i>C. maxima</i> Duch. и <i>C. moschata</i> Duch.	69
2.5.1. Реализация межвидовой гибридизации.....	69
2.5.2. Спасение зародышей	69
2.5.3. Культивирование родительских форм и межвидовых гибридов и оценка гибридных растений	70
3. Результаты	71
3.1. Получение удвоенных гаплоидов представителей <i>Cucurbita</i> L.....	71
3.1.1. Изучение влияния температурной предобработки завязей на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	74
3.1.2. Изучение влияния температурного режима обработки культивируемых эксплантов на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	76
3.1.3. Изучение влияния светового режима культивирования эксплантов во время термической обработки на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	79
3.1.4. Изучение влияния типа экспланта на частоту индукции гиногенеза в культуре <i>in vitro</i>	81
3.1.5. Изучение влияния компонентов индукционной питательной среды на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков.....	84
3.1.5.1. Изучение влияния типа индукционной питательной среды на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков.....	84

3.1.5.2. Изучение влияния источника углеводов на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	87
3.1.5.3. Изучение влияния концентрации сахарозы на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	88
3.1.5.4. Изучение влияния желирующих агентов на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	89
3.1.5.5. Изучение влияния регуляторов роста на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	90
3.1.5.6. Изучение влияния аминокислотно-пептидного состава на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	92
3.1.5.7. Изучение влияния гидролизата казеина на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	93
3.1.5.8. Изучение влияния маннитола на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	96
3.1.5.9. Изучение влияния пантотената кальция на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков	97
3.1.6. Изучение генотипспецифической реакции в культуре изолированных семязачатков	99
3.2. Оценка растений-регенерантов.....	101
3.2.1. Анализ уровня плоидности	101
3.2.2. Морфологическая оценка потомства от самоопыления регенерантов	102
3.3. Межвидовая гибридизация <i>C. maxima</i> Duch. и <i>C. moschata</i> Duch.	103
3.3.1. Спасение зародышей	103
3.3.2. Получение межвидовых гибридов.....	107
3.3.3. Морфологические признаки межвидовых гибридов	109
3.3.4. Особенности формирования мужских и женских цветков у полученных гибридов	111
3.3.5. Определение жизнеспособности пыльцы межвидовых гибридов	114
Заключение	115

Список сокращений.....	120
Библиографический список.....	121
Приложения.....	140

Введение

Актуальность исследований

Семейство растений Cucurbitaceae является одним из самых значимых в производстве сельскохозяйственной продукции. По данным FAOSTAT за 2022 год в России представители рода *Cucurbita* L. занимают пятое место по площадям, занятым под посев, среди прочих овощных культур. Из общего видового разнообразия рода *Cucurbita* L. в России в основном выращивают три культурных вида – тыква твердокорая (*Cucurbita pepo* L.), к которому относятся кабачок, голосемянная тыква, патиссон и крукнек, тыква крупноплодная (*Cucurbita maxima* Duch.) и тыква мускатная (*Cucurbita moschata* Duch.) (Гончаров А.В., 2005; Елацкова А.Г., 2005).

Современная конъюнктура рынка характеризуется ростом и изменчивостью потребительского спроса на овощную продукцию, что требует от селекционера наличия стабильного генетически разнообразного селекционного материала, позволяющего своевременно реагировать на изменение условий современного производства. Для создания коллекции материала, соответствующей условиям постоянного увеличения объемов производства при минимальных затратах и потреблении ресурсов, появляется необходимость в ускорении процесса селекции. Достижению этой цели способствует применение методов биотехнологии и молекулярной генетики, значительно сокращающих сроки выполнения этапов селекционного процесса (Gemes-Juhazs A. et al., 2002; Шмыкова Н.А. и др., 2015а, 2015b; Пивоваров В.Ф. и др., 2022).

В мировой практике приобрела широкое распространение гетерозисная селекция в связи с наличием у F₁-гибридов определенных преимуществ по сравнению с сортами. Характерными чертами F₁-гибридов являются высокая степень выровненности и урожайности, а также – обеспечение защиты авторских прав селекционера. Сложный процесс создания F₁-гибридов подразумевает использование родительских гомозиготных линий, получение которых методами классической селекции связано с длительным отбором в течение нескольких поколений инбридинга. Таким образом, этап получения родительских линий

однолетних овощных культур занимает от 6 до 8 лет. Кроме того, данному процессу сопутствуют значительные ресурсо- и трудозатраты в совокупности с невозможностью получения 100%-ных гомозиготных растений (Gemes-Juhazs A. et al., 2002; Шмыкова Н.А. и др., 2015b; Домблидес Е.А. и др., 2021).

Один из путей значительного ускорения селекционного процесса состоит в сокращении сроков получения чистых линий посредством применения ДН-технологий. Использование технологий производства удвоенных гаплоидов позволяет сократить этап создания родительских линий до 1 года при возможности получения 100%-ных гомозигот по всем генам, а также существенном снижении расхода ресурсов и трудозатрат. Также необходимо отметить, что род растений *Cucurbita* L. обладает огромным разнообразием форм и признаков. При использовании в селекции методов получения удвоенных гаплоидов возможно создание оригинальных генетических форм посредством реализации гаметоклональной изменчивости и значительное упрощение отбора растений за счет быстрой идентификации рецессивных аллелей генов. Кроме того, удвоенные гаплоиды находят применение в фундаментальных исследованиях в качестве картирующих популяций, мишеней для индукции мутаций, моделей для изучения клеточного цикла растений (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).

На индукцию гиногенеза и развитие растений в культуре *in vitro* оказывает влияние множество внешних факторов, детальное изучение которых необходимо для создания оптимальной технологии. В настоящее время не существует универсальных протоколов производства удвоенных гаплоидов у представителей рода *Cucurbita* L., отличающихся высокой эффективностью, в связи с чем существующие технологии подлежат оптимизации (Badawi M.A. et al., 2008; Шмыкова Н.А. и др., 2015b; Kurtar E.S. et al., 2018; Домблидес Е.А. и др., 2019).

Для создания коллекции генетически разнообразного материала необходимо изучение возможных источников генов, контролируемых ценные признаки. Часто источники генов невозможно идентифицировать в пределах вида,

в связи с чем возникает необходимость изучения возможности интрогрессии признаков посредством отдаленной гибридизации.

Одним из главных направлений селекции тыквенных культур является создание растений с женским и преимущественно женским типом цветения. Использование гиноцийных растений в селекции F₁- гибридов в качестве материнских компонентов позволяет повышать гибридность семян при сокращении применения ручного труда и обработок этиленпродуцентами (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; Домблидес Е.А. и др., 2021). Из всех известных способов получения удвоенных гаплоидов представителей рода *Cucurbita* L. наиболее часто используемым является индукция партеногенеза при помощи облученной пыльцы (Kurtar E.S. et al., 2002, Kurtar E.S., 2009, Kurtar E.S. et al., 2010). Также имеются единичные случаи положительных результатов при культивировании *in vitro* пыльников и неопыленных семязачатков *Cucurbita* L. (Metwally E.I. et al., 1998a; Metwally E.I. et al., 1998b; Mohamed M.F. et al., 2004; Шмыкова Н.А. и др., 2015).

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 тыквы мускатной (*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 тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) и тыквы крупноплодной (*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, M5m; 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 глутамина + 100 мг/л серина + 30 г/л глутатиона, 100 мг/л пролина + 100 мг/л серина + 800 мг/л глутамина, 800 мг/л глутамина + 100 мг/л серина + 100 мг/л пролина + 30 мг/л глутатиона, 800 мг/л глутамина + 10 мг/л серина + 10 мг/л пролина + 9 мг/л глутатиона) 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 инициирование 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 семязачатки) 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 (прил. Б).

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.

1. Обзор литературы

1.1. Ботаническое описание и биологические особенности растений рода *Cucurbita* L.

Род растений *Cucurbita* L. относится к большому семейству *Cucurbitaceae* L., объединяющему дикорастущие и культивируемые виды. Семейство включает около 30 видов растений, используемых в культуре, которые подразделяются на 9 родов. В основном, представители семейства распространены в тропических и субтропических областях. В условиях умеренного климата семейство представлено, главным образом, культурными растениями (Сергиевская Е.В., 1998; Тараканов Г.И. и др., 2002; Лудилов В.А. и др., 2007).

Виды, составляющие род *Cucurbita* L., делятся на две группы в соответствии с различными климатическими условиями и жизненными циклами – ксерофиты (многолетние растения, адаптированные к засушливым условиям) и мезофиты (как правило, однолетние растения, произрастающие в более влажных климатических условиях) (Vemis W.P. et al., 1963; Whitaker T.W. et al., 1964).

В соответствии с Г. Круг род *Cucurbita* L. включает 10 видов растений, 5 из которых являются культивируемыми. Согласно Прохорову И.А. к роду *Cucurbita* L. относятся 16 дикорастущих и 5 культурных видов. Однако, на территории РФ, в основном, возделываются 3 вида: тыква твердокорая (*C. pepo* L.), тыква крупноплодная (*C. maxima* Duch.) и тыква мускатная (*C. moschata* Duch.) (Прохоров И.А. и др., 1988; Круг Г., 2000; Тараканов Г.И., 2002).

Разновидности тыквы твердокорой, отличающиеся скороспелостью, выделяют в отдельную группу летних тыкв. К ним относятся кабачок (*C. pepo* subsp. *pepo* var. *giramontina* L.), патиссон (*C. pepo* subsp. *pepo* var. *ovifera* L.) и крукнек (*C. pepo* subsp. *pepo* var. *giraumonas* L.) (Тараканов Г.И. и др., 2002).

Род *Cucurbita* L., главным образом, представлен однолетними травянистыми растениями, имеющими лиановидную или кустовидную форму.

Растения характеризуются моноподиальным типом ветвления. Точка роста главного стебля продолжает делиться на протяжении всего вегетационного периода, тогда как побеги и цветоносы развиваются из пазушных почек (Тараканов Г.И. и др., 2002; Стрелец В.Д. и др., 2013).

Культурные виды также отличаются хорошо развитой, мощной корневой системой стержневого типа. Главный корень может проникать на глубину до 2-3 метров, тогда как основная масса боковых корней, способных разрастаться в стороны до 4-10 метров, располагается на глубине 10-40 см. Также, возделывание на влажных почвах и окучивание способствуют образованию на плетях придаточных корней, которые могут проникать на глубину до 20 см. Кроме сильно развитой массы корней, интенсивности получения влаги и питательных веществ из почвы способствует большое количество корневых волосков (Стрелец В.Д. и др., 2013).

Листья четко разделяются на низовые, срединные и верховые. Низовые и верховые листья характеризуются небольшой длиной и слабой рассеченностью. Функция срединных и верховых листьев состоит в защите цветков от внешних факторов. Среди других культурных растений представители рода *Cucurbita* L. отличаются наращиванием большой площади листовой поверхности. Также, растения обладают высокой побегообразовательной способностью (Сергиевская Е.В., 1998; Тараканов Г.И. и др., 2002; Эдельштейн В.И., 1962).

Плоды тыквы представляют из себя многосемянную ложную ягоду (тыквину), имеющую кору. Форма плодов крупноплодной и обыкновенной тыквы округлая с серой и желто-оранжевой окраской поверхности. Мякоть имеет яично-желтый или красновато-желтый оттенок. Семена, находящиеся в семенных полостях плодов, содержат до 50% масла от всей массы ядра. Масса 1000 семян 190-220 г (Тараканов Г.И. и др., 2002; Лудилов В.А. и др., 2007; Стрелец В.Д. и др., 2013).

Отношение к факторам внешней среды обусловлено ареалом происхождения культурных видов. С этим связаны различия в требованиях к условиям окружающей среды для нормального роста и развития растений.

Тыква относится к теплолюбивым культурам. Самым требовательным к температуре видом из трех культивируемых является тыква мускатная. Тыква твердокорая менее всего подвержена влиянию пониженных температур. Семена растений рода *Cucurbita* L. начинают прорастать при установлении постоянной температуры почвы на глубине заделки семян 9,5°C - 13,7°C. Оптимальная температура, при которой процесс прорастания происходит значительно быстрее, 33-35°C. Наиболее благоприятная температура для роста и развития растения 25-30°C. Оплодотворение эффективнее происходит в диапазонах температур утром 18-20°C, днем 20-25°C. Оптимальная сумма положительных температур за период вегетации должна составлять от 2300°C 3000°C (Стрелец В.Д. и др., 2013).

Как и все бахчевые, тыква относится к засухоустойчивым овощным культурам. Однако по сравнению с ними она более влаголюбива. Это обусловлено тем, что тыква развивает мощный ассимиляционный аппарат, который испаряет много влаги. Это также объясняется тем, что у тыквы в течение всего вегетационного периода наблюдается интенсивный рост. Транспирационный коэффициент равен 834. Наиболее благоприятным для получения хороших урожаев является поддержание 80% ПВ в период до формирования плодов и 70% ПВ в период их развития (Стрелец В.Д. и др., 2013).

Тыква является светолюбивой культурой. Недостаток солнечного освещения в результате затенения сорняками или загущения посевов снижает ассимиляцию, задерживает цветение и образование женских цветков, что в конечном итоге отрицательно сказывается на качестве и количестве урожая. Представители рода относятся к растениям короткого светового дня и лучше развиваются при 10-12 часовом дне (Стрелец В.Д. и др., 2013).

Тыква предъявляет повышенные требования к плодородию почв. Лучшими почвами для ее нормального роста и развития считаются черноземы, легкие суглинки и супеси. Неблагоприятное воздействие на рост тыквы оказывают почвы с повышенной кислотностью (Стрелец В.Д. и др., 2013).

1.2. Морфологические видовые особенности

1.2.1. *Cucurbita maxima* Duch.

Вид *C. maxima* Duch. представлен длинноплетистыми, короткоплетистыми и кустовыми формами. Стебель цилиндрический. Крупные зеленые листья имеют жесткое опушение и округлую, почковидную, пятиугольную форму. Крупные цветки имеют пятидольную чашечку значительно более короткого размера, чем ярко-желтый колокольчиковидный венчик, состоящий из 5-6 сросшихся до половины и отогнутых наружу в верхней части широких округлых лепестков. Светло-желтые спиралеобразные пыльники срастаются в одну короткую цилиндрическую или коническую колонку. Трех- пятираздельное желтое рыльце обладает крупным размером. Завязь нижняя, однако некоторые сорта чалмовидной тыквы имеют полунижнюю завязь. В соответствии с видовым названием тыква крупноплодная обладает плодами самого крупного размера среди других культурных видов. Плоды имеют шаровидную или сплюснутую форму со слабосегментированной, бугристой или гладкой поверхностью и белой, серой, зеленой, розовой или красной окраской. Кора плодов мягкая, иногда затвердевающая к началу созревания. Толстая плодоножка имеет цилиндрическую и коническую форму. Мякоть обладает разнообразной окраской (кремовая, желтая, оранжевая) и консистенцией (слабоволокнистая, рыхлая, плотная). Крупные, реже мелкие, гладкие семена покрыты обычной или утолщенной кожурой без выраженного бокового ободка. Цвет семян белый, кремовый или светло-коричневый (Лудилов В.А. и др., 2007).

Согласно классификации, предложенной А.И. Филовым, вид *C. maxima* Duch. представлен 4 подвидами – старосветский (subsp. *maxima*), американский (subsp. *americana* Filov), китайский (subsp. *turbancurbitis* Metzg.), дикорастущий (subsp. *andrea* (Naud.) Filov). Данная классификация основана на изменчивости, обусловленной географическим фактором. Подвиды различаются по фенотипическим признакам, силе роста, продолжительности вегетации. Возделываемые в России формы относятся к разновидностям старосветского подвида – сероплодная (var. *maxima*), мамонтовая (var. *jaune*), зимняя

(var. *hiberna*). Крупные серо-зеленые плоды сероплодной разновидности по форме варьируют от слабосплюснутых до шаровидных и имеют гладкую или слабосегментированную поверхность. Мягкая или кожистая кора покрывает рыхлую или среднеплотную мякоть, обладающую разнообразной окраской от кремовой до светло-оранжевой. Крупные гладкие плоды мамонтовой разновидности со слабосегментированной поверхностью имеют неправильно-шаровидную или слабосплюснутую форму и серую, розовую или красную окраску. Семенная камера крупная. Мякоть чаще рыхлой консистенции обладает средней толщиной и окраской от кремовой до светло-оранжевой. Средние сплюснутые плоды зимней разновидности отличаются бугристой и глубокосегментированной поверхностью, а также темно-зеленой или темно-серой окраской. Семенная камера небольшая. Толстая сладкая мякоть оранжевого цвета имеет высокоплотную консистенцию (Лудилов В.А. и др., 2007).

1.2.2. *Cucurbita moschata* Duch.

Растения *C. moschata* Duch. относятся к длинноплетистым формам. Характерная черта вида – тонкий округло-граненый стебель. Почковидные или пятиугольные листья со слабой рассеченностью имеют зеленую, чаще с белой пятнистостью по жилкованию, окраску. Листья и стебли обладают мягким опушением. Крупный светло-оранжевый колокольчиковидный цветок с отогнутыми заостренными лепестками венчика имеет длинную цилиндрическую колонку пыльников и рыльце оранжевого цвета. Завязь нижняя. Крупные, реже мелкие, плоды обладают удлинено-цилиндрической, овальной или сплюснутой формой. Их окраска варьирует от темно-зеленой и зеленой до розовато-коричневой с темно-оранжевым или бурым оттенком к моменту полного созревания, с сетчатым или пятнистым рисунком. Поверхность плода гладкая или слабосегментированная, с мягкой, кожистой или плотной корой. Твердая, граненая, довольно тонкая плодоножка расширена к месту прикрепления плода. Семенная камера длинноплодных форм располагается в верхнем конце плода. Светло-бежевые средние и мелкие семена имеют витой или ворсистый ободок (Лудилов В.А. и др., 2007).

Вид *C. moschata* Duch. образован шестью эколого-географически обособленными подвидами – туркестанский (subsp. *moschata*), североамериканский (subsp. *borealiamericana* Filov), мексиканский (subsp. *mexicana* (Zhit.) Filov), колумбийский (subsp. *columbiana* (Zhit.) Filov), японский (subsp. *japonica* (Zhit.) Filov), индийский (subsp. *indica* (Zhit.) Filov). Отечественный ассортимент относится к туркестанскому и североамериканскому подвидам. Растения эллипсовидной разновидности (var. *ovalis*), относящейся к североамериканскому подвиду, обладают крупными овальными плодами и скороспелостью по сравнению с растениями, имеющими перехватки (Лудилов В.А. и др., 2007).

1.2.3. *Cucurbita pepo* L.

Согласно классификации морфобиотипов, предложенной Таракановым Г.И. (1987), представители подвидов *C. pepo* L. разделяются на несколько категорий в зависимости от фенотипических признаков (Тараканов Г.И. и др., 1987).

Подвиды различаются по типам роста, при определении принадлежности к которым руководствуются показателями длины главного побега. При кустовом типе роста длина главной плети не превышает половины диаметра габитуса. Для полукустового типа свойственна длина главного побега, не превышающая диаметр габитуса. Плеть может выходить за пределы куста во второй половине периода вегетации растений. К полуплетистому типу роста относятся подвиды с длиной главной плети, составляющей 2-3 диаметра габитуса. Плетистые формы характеризуются продолжением роста главного побега, длина которого превышает 3 диаметра куста, в течение всего периода вегетации. Отличительной чертой плетистых форм является позднее плодоношение и сравнительно небольшое количество женских цветков на главном побеге (Тараканов Г.И. и др., 1987).

Ветвление также является важным признаком в определении типа роста растений. По типу ветвления представители вида *C. pepo* L. подразделяются на неветвящиеся (одностебельные), поздноветвящиеся (формирование боковых побегов происходит после окончания первой волны плодоношения, во второй

половине периода вегетации) и ветвящиеся (степень ветвления определяется в баллах) (Тараканов Г.И. и др., 1987).

Представители вида различаются по характеру роста главного побега. Формы, имеющие равномерный характер роста главной плети, отличаются и равномерностью в плодоношении. Формы с волнообразным ростом характеризуются дружным формированием раннего урожая, но неравномерностью плодоношения. Обычно в условиях средней полосы наблюдают не более трех волн роста за период вегетации. Формы с ограниченным ростом главного побега пользуются наибольшим интересом для селекции в связи с возможностью индуцированного влияния на рост и плодоношение гибридов, обусловленным закономерностями ограничений (Тараканов Г.И. и др., 1987).

Отличительной чертой *C. pepo* L. считают высокую степень ребристости и колючее шиловидное опушение стебля, черешка, плодоножки. Стебель резко граненый, бороздчатый. Лист пятиугольный, часто имеющий сильную рассеченность на доли разного размера. Цветок крупный, желтого цвета, с прямыми заостренными лепестками венчика. Рыльце пестика и короткая коническая колонка пыльников имеют оранжевую окраску. Завязь нижняя. Короткоовальные, короткоцилиндрические, реже удлинненно-цилиндрические и округлые плоды обладают крупным, но мельче плодов других культурных видов, размером. Окраска варьирует от темно-зеленой у незрелых плодов до оранжевой с пятнистым или полосатым рисунком у зрелых плодов. Плод отличается ребристой поверхностью, в особенности в области плодоножки, и твердой деревянистой корой при созревании. Резкограненая, слабо расширенная в месте прикрепления плода плодоножка толстая или средней толщины. Мякоть, в отличие от мякоти других видов, характеризуется большей волокнистостью, окраска от кремовой до светло-оранжевой. Светло-кремовые семена обладают средним и мелким, редко крупным, размером и выраженным боковым ободком (Лудилов В.А. и др., 2007).

Согласно Лудилову В.А. (2007) вид *C. pepo* L. составляют четыре подвида – длиноплетистый (subsp. *pepo*), кустовой (subsp. *brevicaulis* Greb.), декоративный (subsp. *polymorpha* Duch.), дикорастущий (subsp. *texana* (A. Grey) Filov). В России

сорта и гибриды относятся к подвидам длинноплетистый и кустовой (Лудилов В.А. и др., 2007).

Длинноплетистый подвида представлен двумя разновидностями - овальная (*var. pero*) и сплюснутоплодная (*var. complanatus*). Плоды растений *var. pero* имеют овальную или короткоовальную форму плода с ребристой поверхностью и ярко-желтой или оранжевой окраской, часто с полосатым рисунком. Семенная камера характеризуется большим размером. Мякоть обладает средней плотностью, от кремового до оранжевого цвета. Крупные и среднего размера плоды *var. complanatus* имеют слабо- или среднесплюснутую форму с гладкой или слабосегментированной поверхностью оранжевого цвета со светло-коричневым рисунком (Лудилов В.А. и др., 2007).

Кустовой подвида включает разновидность крупноплодную (*var. solediformis*), кабачок (*var. giraumon* Duch.) и патиссон (*var. melopepo* (L.) Filov). Овальные, цилиндрические или шаровидные плоды *var. solediformis* имеют желтую или оранжевую окраску с пятнистым или полосатым рисунком (Лудилов В.А. и др., 2007).

1.3. Биология цветения

Род *Cucurbita* L. представлен перекрестноопыляющимися однодомными растениями. Основными опылителями являются пчелы. Нектарники расположены у основания пестика и тычинок. Наиболее интенсивное выделение нектара происходит в утреннее время, 7-10 часов. Раскрытие цветков происходит с 5 до 7 утра в зависимости от погодных условий. Опыление в основном завершается в первой половине дня, причем наибольшая степень завязываемости плодов наблюдается при опылении в ранние часы. Также благоприятными для оплодотворения являются температура 18-25°C и относительная влажность воздуха 40-50%. Цветок находится в раскрытом состоянии в течение 1 суток (Фурса Т.Б. и др., 1985; Стрелец В.Д. и др., 2013).

Существует прямая корреляция между скоростью закладки генеративных органов и скороспелостью. У *C. pero* закладка генеративных органов происходит в фазе первого настоящего листа, у *C. maxima* – чаще в фазе двух, реже одного

или пяти настоящих листьев, у *C. moschata* – в фазе трех-пяти настоящих листьев (Фурса Т.Б. и др., 1985).

Также существует обратная корреляция между высотой закладки первого узла с женским цветком и скороспелостью растения. У *C. pepo* первые женские цветки закладываются в 3-11 узлах, у *C. maxima* в 7-16 узлах, у *C. moschata* в 12-16 узлах. Отношение женских цветков на растении к мужским варьирует в зависимости от видовой и сортовой принадлежности, а также от внешних условий. Короткий световой день, пониженные температуры и высокая влажность способствуют образованию женских цветков и наоборот. Контролировать количество женских и мужских цветков также можно при помощи химических веществ. Для образования женских цветков применяют обработки этрелом, а для образования мужских цветков – нитратом серебра (Фурса Т.Б. и др., 1985; Стрелец В.Д. и др., 2013).

1.4. Хозяйственное значение

По определению профессора А.И. Филова (1969) бахчеводством называется отрасль сельского хозяйства, в задачу которой входит возделывание арбузов дынь и тыкв. Таким образом, к бахчевым культурам относят арбуз, дыню, патиссон и тыкву. Бахчевые культуры имеют высокое пищевое значение, которое определяется высоким содержанием сахаров. Высокое содержание полисахаридов, представленных клетчаткой и пектином, объясняет отсутствие ощущения сладости при употреблении плодов в пищу. Однако общее содержание сахаров в плодах может достигать 12%. Высокая пищевая ценность плодов тыквенных культур содержат необходимые для человека элементы питания (органические соли, углеводы, витамины и т. д.). Содержащиеся в составе пектиновые вещества обладают способностью выводить из организма вредные для него соединения. Отличительной чертой тыквы из всех тыквенных культур является наличие крахмала в плодах. Также плоды тыквы содержат большое количество каротина, витаминов, таких как G, B₁, B₂, PP и E. По содержанию каротина плоды тыквы превосходят плоды моркови. Минеральные вещества представлены высоким содержанием солей калия, фосфора и кальция.

Микроэлементы представлены соединениями меди и кобальта (Филов А.И., 1969; Шмыкова Н.А. и др., 2015; Домблides Е.А. и др., 2016, 2021).

По данным FAOSTAT за 2022 год в Российской Федерации представители рода *Cucurbita* L. занимают пятое место по площадям, занятым под посев, и седьмое место по количеству произведенной продукции среди прочих овощных культур.

1.5. Основные направления селекции тыквы (*Cucurbita* L.)

Одним из основных направлений селекции является создание гибридов кустового или полукустового типа с короткой главной плетью для обеспечения возможности механизированной уборки. Гибриды кустового типа за счет ограниченности роста требуют меньшей площади питания, вследствие чего появляется возможность размещения большего количества растений на 1 га и обеспечения значительного повышения продуктивности. Донорами этого признака среди культурных видов могут быть представители *C. pepo* L. Из дикорастущих представителей рода дикая кустовая форма тыквы крупноплодной также может быть использована в селекции в качестве донора признака короткой главной плети (Квасников Б.В., 1955; Коротцева И.Б., 2013; Никулина Т.М., 2019; Гончаров А.В., 2020).

Также перспективным направлением селекции является создание гибридов, обладающих высоким качеством плодов для использования в пищевой промышленности, как в переработанном, так и свежем виде. Существенное значение имеет содержание в плодах сухого вещества, углеводов, каротина, сахаров, крахмала и витаминов. К важным качествам также относится порционность плодов (Квасников Б.В., 1955; Коротцева И.Б. и др., 2013; Никулина Т.М. и др., 2019; Якимова О.В. и др., 2020).

Не менее важными направлениями являются создание гибридов, обладающих различными сроками зрелости, и создание гибридов, плоды которых пригодны к длительным срокам хранения. Лежкость плодов, оказывающая непосредственное влияние на транспортабельность, зависит от плотности мякоти

и химического состава (в частности, содержания пектиновых веществ) (Квасников Б.В., 1955; Коротцева И.Б. и др., 2013; Якимова О.В. и др., 2020).

Одним из актуальных направлений селекции представителей рода *Cucurbita* L. является создание гибридов, обладающих гиноцичностью или преимущественно женским типом цветения. Использование гибридов такого типа в качестве материнских растений позволяет сократить применение ручного труда, а также применение этиленпродуцентов (Кузьмин С.В., 2021; Чистяков А.А. и др., 2023).

1.6. Отдаленная гибридизация

Современные гибриды тыквы должны соответствовать потребностям рынка, то есть обладать ценными качествами, позволяющими сохранять конкурентоспособность. В соответствии с современной моделью в список главных задач селекции входит создание гибридов, обладающих кустовым типом роста, преимущественно женским типом цветения, устойчивостью к основным биотическим и абиотическим факторам, высоким содержанием сухого вещества, сахара, каротина и крахмала в плодах (Ситникова О.И. и др., 2010; Коротцева И.Б. и др., 2013; Гончаров А.В. и др., 2020).

Среди представителей одного вида растений часто бывает невозможно идентифицировать доноров для передачи генов, контролирующих хозяйственно ценные признаки. Однако ценные формы, обладающие желаемыми качествами, можно обнаружить среди представителей близкородственных культурных видов и родов, а также среди дикорастущих форм, имеющих высокую адаптивность к биотическим и абиотическим факторам. В таких случаях при выполнении селекционных задач необходимо применение отдаленной гибридизации, значимость которой обусловлена рекомбинацией генетического материала с последующим получением форм, обладающих комплексом признаков от различных источников. Потомство, получаемое в результате отдаленных скрещиваний, характеризуется высокой степенью полиморфизма. У гибридов первого поколения в большинстве случаев выражен эффект гетерозиса. В дальнейшей работе формы следующих поколений приобретают стабильность,

связанную с большим количеством беккроссов (Дютин К.Е., 2000; Ситникова О.И. и др., 2010; Першина Л.А. и др., 2016).

Сложности, возникающие в процессе отдаленной гибридизации, обусловлены проявлением барьеров несовместимости, в зависимости от уровня проявления подразделяемые на презиготические и постзиготические. Презиготические барьеры несовместимости связаны с нескрещиваемостью, являющейся результатом эколого-географических или генетических факторов, таких как различия в ареале обитания, сроках цветения, реакции на изменения светового дня. К генетическим факторам относят прогамную несовместимость, проявляемую в виде реакций препятствования прорастанию пыльцы (подавления прорастания пыльцы, снижения скорости и смене направления роста, а также разрушения пыльцевых трубок), возникающих в тканях ральца, столбика или завязи, и сингамную несовместимость, связанную с нарушениями двойного оплодотворения. Для преодоления барьеров нескрещиваемости используют синхронизацию цветения при помощи воздействия абиотическими стрессами, регуляцию внешних условий при проведении скрещивания, опыление смесью пыльцы, обработки пестика и пыльцы фитогормонами, декапитацию пестиков, изменение ploидности родительских компонентов, опыление *in vitro*, методы посредника и вегетативного сближения. Проявление постзиготических барьеров заключается в несовместимости эндосперма и зародыша, приводящей к его гибели, а также в нежизнеспособности и стерильности гибридов. Для преодоления барьеров данного типа используют технологию спасения зародышей, изменение уровня ploидности гибридных растений (Ситникова О.И., 2008; Першина Л.А. и др., 2016; Пухальский В.А., 2019; Rogo U. et al., 2023).

1.6.1. Получение межвидовых гибридов *Cucurbita L.*

В 1960 году была проведена работа по отдаленной гибридизации между *C. pepo L.* и *C. maxima Duch.* при помощи свободного опыления. Автор отметил низкую степень завязываемости плодов и отсутствие в них жизнеспособных семян. В исследовании установлено оптимальное время (7 утра за сутки до раскрытия цветка) опыления в бутонах, способствующее повышению его

эффективности. Гибридные зародыши культивировали *in vitro* при помощи технологии embryo rescue (Hayase H., 1960).

В 1974 году было проведено исследование по получению межвидовых анеуплоидов *C. moschata* Duch. и *C. foetidissima*. На начальном этапе исследования автор произвел гибридизацию между триплоидом *C. foetidissima* и диплоидом *C. moschata*. Завязавшиеся плоды имели цилиндрическую форму, как у *C. moschata*, однако меньшего размера (как у *C. foetidissima*). Из 68 образовавшихся плодов было получено только 12 жизнеспособных семян. Для преодоления несовместимости зародыша и эндосперма применяли технологию спасения зародышей. В возрасте 4 настоящих листьев гибридные растения пересаживали в теплицу, однако ни одно растение не выжило к моменту определения уровня ploидности (Curlango Limon F.G., 1974).

При проведении работы по отдаленной гибридизации между видами *C. moschata* Duch. и *C. foetidissima* (1977) была отмечена проблема завязываемости плодов, для преодоления которой использовали различные регуляторы роста. С применением регуляторов роста от 56 опылений было получено 9 плодов (6 у *C. foetidissima* и 3 у *C. moschata*). Однако полученные плоды характеризовались полным отсутствием жизнеспособных семян (El Fahal El A.M.A., 1977).

В исследовании Rakoczy-Trojanowska M. (1986) сообщается, что при скрещивании *C. pere* и *C. maxima* эффективнее использовать *C. maxima* качестве материнского, а *C. pere* – в качестве отцовского компонента. При скрещивании *C. maxima* × *C. pere* было получено в среднем 36,3 семени нормальной формы и размера на плод, из них 14 семян имели зародыш. При скрещивании *C. pere* × *C. maxima* было получено 11 семян с плода, 2,3 из которых имели зародыш (Rakoczy-Trojanowska M. et al., 1986).

Лудилов В.А. в 1966 году осуществил отдаленные скрещивания между *C. maxima*, *C. pere* и *C. moschata* при помощи обычной гибридизации и гибридизации с использованием вегетативного сближения. Автор отмечает, что при использовании *C. moschata* в качестве материнского компонента

завязываемость плодов выше, но количество гибридных семян в плодах ниже, чем при обратных скрещиваниях. Реципрокные скрещивания между *C. pero* и *C. maxima* мало отличались по завязываемости плодов, количеству плодов с семенами и количеству семян на один плод. Согласно данному исследованию, образцы гибридного происхождения скрещиваются лучше негибридных, особенно эффективно их применение в качестве отцовского компонента. Сообщается, что предварительное вегетативное сближение оказалось эффективным только при скрещиваниях *C. maxima* и *C. moschata*, причем эффективность скрещивания увеличивается и при использовании сближения только для одного из компонентов. В скрещиваниях *C. maxima* и *C. moschata* с *C. pero* межвидовая прививка способствовала увеличению степени завязываемости плодов, однако плоды характеризовались отсутствием в них семян (Лудилов В.А., 1966).

В работе Plader W. et al. (1994) отмечается, что при отдаленной гибридизации *C. maxima* с *C. ficifolia* и *C. foetidissima* завязывание плодов наблюдали только при использовании *C. maxima* в качестве материнского компонента. Количество завязавшихся плодов было примерно одинаковым при скрещивании *C. maxima* с обоими видами, однако при гибридизации с *C. foetidissima* образовалось значительно больше семян. Доля развившихся в растения при помощи embryo rescue зародышей варьировала от 47,6% в скрещивании *C. maxima* × *C. ficifolia* до 53,4% в скрещивании *C. maxima* × *C. foetidissima* (Plader W. et al., 1994).

Ситникова О.И. (2008) в работе по преодолению несовместимости при межвидовой гибридизации для создания исходной коллекции *C. maxima* отмечает, что применение таких приемов, как декапитация пестиков, вегетативное сближение и опыление бутонов за сутки до раскрытия цветка, способствует получению плодов от скрещиваний *C. maxima* × *C. moschata*, *C. maxima* × *C. pero* и *C. maxima* × *C. ficifolia*, в которых при контрольной гибридизации завязываемость плодов не наблюдалась. Семена, полученные от скрещивания *C. maxima* × *C. moschata* характеризовались снижением степени всхожести.

Семена от скрещиваний *C. maxima* × *C. pepo* и *C. maxima* × *C. ficifolia* отличались отсутствием всхожести (Ситникова О.И., 2008).

Rakha M.T. (2012) в работе по отдаленной гибридизации видов *Cucurbita* L. сообщает, что эффективность скрещиваний *C. pepo* с *C. ficifolia* и *C. martinii* в высокой степени зависела от генотипа *C. pepo*. Традиционная техника опыления не обладала высокой эффективностью. Только при скрещивании 1 из 10 изученных образцов *C. pepo* с *C. ficifolia* и *C. martinii* наблюдали завязывание плодов, однако жизнеспособных семян получено не было (Rakha M.T. et al., 2012).

В работе Uretsky J. (2012) отмечено, что эффективность отдаленной гибридизации *C. maxima* и *C. moschata* в высокой степени зависела от генотипа *C. maxima*, использованного в качестве материнского компонента. Среди семян, полученных из образовавшихся плодов, наблюдали семена с развитыми покровами, однако лишенные зародышей, а также семена без эндосперма, но с хорошо развитым зародышем. Скарификация при помощи лезвия оказала благоприятное воздействие на всхожесть гибридных семян (Uretsky J., 2012).

Zhang Q. (2012) проводит исследование по получению промежуточных межвидовых линий между *C. pepo*, *C. maxima* и *C. moschata*. При помощи различных техник множественного опыления и сближения видов было получено 9 межвидовых гибридов, сочетающих в себе признаки родительских видов (Zhang Q. et al., 2012).

1.6.2. Спасение зародышей

Постзиготические барьеры несовместимости возникают в различных тканях и проявляются на разных этапах развития от раннего эмбриогенеза до воспроизводства потомства. Часто встречаются случаи конфликта зародыша и эндосперма, приводящие к нежизнеспособности образовавшихся эмбрионов. Решить данную проблему возможно при помощи биотехнологического метода *embryo rescue*, состоящего в извлечении зародышей из незрелых семян *in vitro* и помещении их на питательные среды для дальнейшего культивирования (Rogo U. et al., 2023).

Развитие зародышей *in vitro* контролируется множеством факторов, включая генотип, состав питательной среды и внешние условия культивирования. Видо- и генотипспецифичность овощных культур не позволяют создать универсальный протокол технологии спасения зародышей. В связи с этим необходимо производить подбор оптимального состава питательных сред и условий инкубирования эксплантов в культуре *in vitro* (Rogo U. et al., 2023).

Лудилов В.А. (1966) отмечает, что оптимальной питательной средой для культивирования гибридных зародышей *C. moschata* и *C. pepo* является среда Уайта (White Ph.R., 1954) с дрожжевым экстрактом. Из 28 семян, полученных от скрещивания *C. moschata* и *C. pepo*, было получено 23 растения. Из 30 семян, полученных от скрещивания *C. maxima* и *C. pepo*, было получено 11 гибридных растений (Лудилов В.А., 1966).

В работе по отдаленной гибридизации, проведенной Hayase H. (1960), для культивирования зародышей межвидовых гибридов используют питательную среду Кнопа (Knop W., 1865), дополненную 10 г/л агара и 20 г/л сахарозы.

Curlango Limon F.G. (1974) для спасения незрелых зародышей использует питательную среду, описанную Рэндольфом (Randolph L.F. et al., 1943), однако большинство полученных гибридных зародышей не развились до адаптации вследствие контаминации питательной среды, а выжившие и адаптированные к условиям *in vivo* растения погибли до установления уровня ploидности (Curlango Limon F.G., 1974).

Racoczy-Trojanowska M. (1986) для преодоления несовместимости *C. maxima* и *C. pepo* использует культивирование незрелых зародышей на питательных средах MS (Murashige T. et al., 1962) с различными модификациями. Большая часть зародышей развили настоящие листья на среде MS с добавлением 250 мг/л эдамина и 15 г/л сахарозы. В исследовании установлен оптимальный возраст завязи (21-25 суток после опыления) для изоляции незрелых зародышей на питательные среды (Racoczy-Trojanowska M. et al., 1986).

Plader W. (1994) для спасения зародышей, образовавшихся от скрещиваний *C. maxima* с *C. ficifolia* и *C. foetidissima*, использует питательную среду MS

(Murashige T. et al., 1962) с добавлением 250 мг/л эдамина, 7 г/л агара и 30 г/л сахарозы. Период от опыления цветков до сбора завязавшихся плодов с последующей изоляцией зародышей составляет 40-45 дней (Plader W. et al., 1994).

Ситникова О.И. (2010) определила оптимальный возраст зародышей *C. maxima* × *C. moschata* для изоляции на питательные среды, составляющий 30 суток от опыления. Для культивирования зародышей *in vitro* использовали питательные среды MS (Murashige T. et al., 1962) и Sh-2 (Поляков А.В. и др., 1998) с добавлением 1 мг/л 6-BAР и 0,05 мг/л NAA. При помощи технологии спасения зародышей было получено 89 гибридных растений (Ситникова О.И. и др., 2010).

Сбор плодов для спасения зародышей *C. martinezii* × *C. pepo* и *C. ficifolia* × *C. pepo* в исследовании Rakha M.T. (2012) осуществляют через 14 суток после опыления. Питательная среда MS (Murashige T. et al., 1962) содержит 0,1 мг/л Kin, 0,01 мг/л IAA и 8 г/л агара. Через 4 недели культивирования при температуре 25°C и 16-часовом фотопериоде экспланты пересаживали на безгормональную среду MS на 4 недели. После растения адаптировали к условиям внешней среды (Rakha M.T. et al., 2012).

1.7. Технология получения удвоенных гаплоидов

Удвоенный гаплоид – это организм, образовавшийся из генеративной клетки посредством удвоения гаплоидного набора хромосом. Такие организмы являются чистыми, или гомозиготными, линиями, которые используют в селекции растений в качестве родительских компонентов при получении F₁-гибридов. Интерес селекции к ДН-растениям обусловлен их гомозиготностью, а, следовательно, наибольшей эффективностью отбора и передачи желаемых признаков потомству (Шмыкова Н.А. и др., 2015b; Chen J.F. et al., 2018; Воронина А.В. и др., 2023).

Существует несколько способов получения ДН-растений: индукция гиногенеза (культура изолированных семязачатков, культура завязей), индукция андрогенеза (культура изолированных микроспор, культура пыльников), индукция партеногенеза (использование опыления донорных растений облученной пылью, применение метода гаплоиндуктора). Каждая из технологий

имеет свои достоинства и недостатки (Dong Y.Q. et al., 2016; Колесникова Е.О. и др., 2021; Домблидес Е.А. и др., 2021).

Индукция гиногенеза – это способ получения удвоенных гаплоидов из клеток женского гаметофита. Процесс получения гиногенных гаплоидов с использованием культуры изолированных семязачатков и фрагментов завязи отличается большой трудоемкостью и временными затратами. Также, к неоспоримым недостаткам технологии относится регенерация большого количества растений-клонов донорного, так как помимо генеративных клеток на питательные среды помещается большое количество соматической ткани, из которой образуется каллус с последующим развитием регенерантов. Следовательно, при использовании гиногенеза необходима последующая идентификация гомо- и гетерозиготных растений среди полученных растений-регенерантов (Dong Y.Q. et al., 2016; Колесникова Е.О. и др., 2021).

Индукция андрогенеза – это способ получения ДН-растений из клеток мужского гаметофита. Культура изолированных микроспор наиболее перспективна, так как обладает рядом преимуществ, главным из которых является отсутствие регенерации растений-клонов вследствие введения в культуру генеративных клеток. Использование культуры пыльников технологически несколько проще, однако, влечет за собой риск образования клонов, как в случае культуры завязей (Dong Y.Q. et al., 2016; Колесникова Е.О. и др., 2021).

Частные случаи партеногенеза (опыление облученной пылью и использование гаплоиндуктора) также успешно применяются на практике многими исследователями. Под гаплоиндуктором понимают растение, неродственное донорному, или родственное, обычно дикорастущее, но нескрещиваемое с ним. В обоих случаях опыляют донорное растение *in situ*, но оплодотворения не происходит (Dong Y.Q. et al., 2016; Колесникова Е.О. и др., 2021).

Отмечено, что впервые в культуре *in vitro* были получены удвоенные гаплоиды *Datura stramonium* в 1922 году. Затем, в 1964 году была разработана технология получения удвоенных гаплоидов *Datura innoxia* посредством индукции

андрогагенеза в культуре пыльников. Впервые удвоенные гаплоиды кабачка (*C. pepo* L.) были получены в 1985 году. Первое сообщение об отзывчивости тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) на индукцию гиногагенеза датируется 1988 годом, однако первые растения-регенеранты в культуре завязей были получены в 2015 году. Первые ДН-растения тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) и тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) посредством индукции андрогагенеза и партеногагенеза с использованием облученной пыльцы были получены в 2009 году (Blakelsee A.F. et al., 1922; Chambonnet D. et al., 1985; Kwack S.N. et al., 1988; Kurtar E.S., 2009; Kurtar E.S. et al., 2010; Kurtar E.S. et al., 2016; Min Z. et al., 2016; Kurtar E.S. et al., 2018; Zou T. et al., 2020; Домблидес Е.А. и др., 2021).

Экспериментальное получение удвоенных гаплоидов у представителей семейства Cucurbitaceae широко изучается зарубежными учеными (Dryanovska O.A., 1985; Sauton A., 1988, 1989; Metwally E.I. et al., 1998b; Caglar G. et al., 1999; Ficcadenti N. et al., 1999; Sary N. et al., 1999; Taner K.Y. et al., 2000; Gursoz N. et al., 1991; Lotfi M. et al., 2003; Xie M. et al., 2005; Sun Y. et al., 2006; Lim W. et al., 2009). Из всех способов получения гаплоидов (индукция андрогагенеза, гиногагенеза и партеногагенеза) у тыквы (*Cucurbita* L.) наиболее эффективным считается индукция партеногагенеза при помощи опыления облученной пыльцой (Kurtar E.S. et al., 2002; Kurtar E.S., 2009; Kurtar E.S. et al., 2010). Также имеются единичные случаи положительных результатов при культивировании *in vitro* пыльников и неопыленных семязачатков (Metwally E.I. et al., 1998b; Mohamed M.F. et al., 2004; Шмыкова Н.А. и др., 2015b).

1.8. Факторы, оказывающие влияние на индукцию гиногагенеза

На индукцию гиногагенеза оказывает влияние множество факторов, среди которых главными являются стадия развития женского гаметофита, режим обработки эксплантов, состав питательной среды, а также генотип, возраст и условия культивирования донорных растений (Badawi M.A. et al., 2008; Шмыкова Н.А. и др., 2015b; Dong Y.Q. et al., 2016; Chen J.F. et al., 2018; Zou T. et al., 2020; Kurtar E.S. et al., 2020; Домблидес Е.А. и др., 2021; Воронина А.В. и др., 2023).

На процесс индукции гиногенеза в культуре неопыленных семязачатков влияет большое число факторов. К ним относятся: генотип растения, стадия развития женского гаметофита, состав питательных сред, условия выращивания донорных растений. С учетом воздействия этих факторов исследования в области гиногенеза сосредоточены на изучении их влияния на выход ДН-растений (Шмыкова Н.А. и др., 2015; Dong Y.Q. et al., 2016; Kurtar E.S. et al., 2020; Домблидес Е.А. и др., 2021).

1.8.1. Термическая обработка

Для достижения индуцированного перехода клеток зародышевого мешка с гаметофитного пути развития на спорофитный необходимо применять различные виды шоков, самым распространенным из которых является температурный. Многими исследованиями подтверждается высокая эффективность тепловой или холодной обработок эксплантов для индукции эмбриогенеза у различных овощных культур.

Домблидес Е.А. с соавторами (2016) в результате проведенного исследования по изучению факторов, оказывающих влияние на индукцию гиногенеза кабачка (*C. pepo* L.), выявили закономерность образования большего числа эмбриоидов при использовании термического шока (4°C) в течение 1-2 суток (Домблидес Е.А. и др., 2016).

Полученные Kwack S.N. (1988) результаты сравнения влияния холодových обработок (5°C и 10°C) в течение 2-5 суток на индукцию эмбриогенеза тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) показали преимущество применения температурного шока при 5°C в течение 2 суток (Kwack S.N. et al., 1988).

Metwally E.I. с соавторами (1998) и Badawi M.A. с соавторами (2008) независимо провели эксперимент по экспозиции предварительной холодной обработки (0; 2; 4; 8 суток) завязей кабачка (*C. pepo* L.). В итоге было выявлено отрицательное воздействие термического шока на индукцию гиногенеза в культуре изолированных семязачатков. Наибольшее количество эмбриоидов было получено при отсутствии обработки эксплантов низкими положительными температурами (Metwally E.I. et al., 1998b; Badawi M.A. et al., 2008).

Shalaby T. в 2007 году проводит сравнение влияния повышенных (32°C) и пониженных (4°C) температур при различной экспозиции (0, 4, 7 суток) и приходит к выводу, что наибольшим эффектом индукции эбриогенеза кабачка (*C. pepo* L.) обладают обработки при 4 и 32°C в течение 4 суток, причем шок, индуцированный повышенными температурами, инициировал больший эмбриогенный ответ (Shalaby T.A., 2007).

Badawi M.A. с соавторами (2008) также провели исследование, направленное на сравнение оказываемых на индукцию гиногенеза кабачка (*C. pepo* L.) эффектов повышенных (35°C) и пониженных (4°C) температур при разной экспозиции (0, 4, 8, 16 суток). Анализ данных показал, что наиболее благоприятное воздействие на прорастание эмбриоидов оказывала обработка при 35°C в течение 16 суток. Однако инициирование каллусогенеза лучше всего происходило при 35°C в течение 4 суток (Badawi M.A. et al., 2008).

Результаты исследования Min Z. (2016) по регенерации эмбриоидов из изолированных семязачатков тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) подтверждают рациональность применения обработки повышенными температурами (35°C). Оптимальная экспозиция в опыте составляла 5 суток (Min Z. et al., 2016).

Многими исследованиями подтверждается эффективность применения термической обработки эксплантов при получении удвоенных гаплоидов представителей других видов семейства Cucurbitaceae. Например, Gemes-Juhasz A. (2002) изучает влияние различных температур на индукцию гиногенеза огурца (*Cucumis sativus* L.) и приходит к выводу, что наиболее благоприятная температура инициирования развития эмбриоидов составляет 35°C (Gemes-Juhasz A. et al., 2002).

Diao W.P. (2009) и Moqbeli E. (2013) независимо установили оптимальную экспозицию температурной обработки эксплантов (3 суток), показавшую преимущество по сравнению с обработкой в течение 0, 2 и 4 суток и оказавшую наиболее благоприятное воздействие на процент образования эмбриоидов в культуре фрагментов завязей огурца (*C. sativus* L.) (Diao W.P. et al., 2009; Moqbeli E. et al., 2013).

Tantasawat P.A. с соавторами (2015) при изучении эмбрио- и каллусогенеза в культуре завязей огурца (*C. sativus* L.) получили обратные результаты по предварительной температурной обработке эксплантов. Они выяснили, что воздействие повышенной температуры (35°C) в течение 3 суток значительно снижало процент образования эмбриоидов, однако не оказывало влияния на степень индукции каллусогенеза (Tantasawat P.A. et al., 2015).

Результаты исследования Golabadi M. (2017) свидетельствуют о благоприятном эффекте повышенной температуры (35°C) в течение 4 суток, способствующей образованию эмбриоидов в культуре фрагментов завязей огурца (*C. sativus* L.) (Golabadi M. et al., 2017).

Термическая обработка (35°C в течение 3 суток) эксплантов арбуза (*Citrullus lanatus* L.) оказала отрицательное воздействие на индукцию каллусогенеза в культуре фрагментов завязей (Isak M.A. et al., 2022).

Majeed H. с соавторами (2023) провели сравнительный анализ влияния различных температурных обработок эксплантов (35°C и 4°C в течение 3 суток) на индукцию каллусогенеза в культуре фрагментов завязей огурца (*C. sativus* L.) с отсутствием термошока (25°C). Результаты показали отсутствие значимых различий по частоте каллусогенеза при использовании различных температурных обработок (64%, 60% и 61% соответственно) (Majeed H. et al., 2023).

Metwally E.I. et al. (1998), изучив различные экспозиции холодовой (4°C) предобработки завязей *C. pepo* L., сообщают о более высокой частоте индукции эмбриогенеза в культуре изолированных семязачатков при отсутствии воздействия на завязи пониженной температуры (Metwally E.I. et al., 1998b).

Ермолаев А.С. (2021) с коллегами выявили отсутствие эффективности предварительной холодовой обработки (4°C) завязей кабачка (*C. pepo* L.) перед изолированием семязачатков и помещением их на питательные среды. Воздействие пониженных положительных температур в течение 1-2 суток снижало процент индукции эмбриогенеза (Ермолаев А.С. и др., 2021).

Golabadi M. (2017) и Ngoc L.T.K. (2018) производят инкубирование семязачатков огурца (*C. sativus* L.) на питательных средах после холодовой

обработки завязей в течение 1 суток (Golabadi M. et al., 2017; Ngoc L.T.K. et al., 2018).

1.8.2. Световой режим культивирования эксплантов во время термической обработки

Min Z. с соавторами (2016) сообщают об успешной обработке эксплантов тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) при температуре 35°C в течение 5 суток, проведенной в условиях отсутствия освещения во время индукции гиногенеза *in vitro* (Min Z. et al., 2016).

Kurtar E.S. (2018) также производит температурную обработку (35°C в течение 3 суток) семязачатков тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) и мускатной (*C. moschata* Duch.) при отсутствии освещения (Kurtar E.S. et al., 2018).

Сравнительная оценка влияния различных температурных обработок эксплантов огурца (*C. sativus* L.) при индукции гиногенеза, проведенная Gemes-Juhasz A. (2002), Tantasawat P.A. (2015) и Ozsan T. (2017), показала эффективность применения в условиях отсутствия освещенности (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; Tantasawat P.A. et al., 2015; Ozsan T. et al., 2017).

Ngoc L.T.K. (2018) производит четырехнедельную индукцию гиногенеза огурца (*C. sativus* L.) посредством инкубирования семязачатков на питательных средах при температуре 24±2°C в темноте (Ngoc L.T.K. et al., 2018).

При индукции гиногенеза арбуза (*C. lanatus* L.) Zhu Y.C. с соавторами (2018) инкубируют экспланты в темноте (первые 5 суток при температуре 35°C, следующие 10 суток при температуре 25°C) с последующим переносом чашек Петри в условия присутствия освещения (Zhu Y.C. et al., 2018).

В своей дальнейшей работе по регенерации растений из неопыленных семязачатков арбуза (*C. lanatus* L.) Zhu Y.C. с соавторами (2019) подтверждают эффективность применения двухнедельной темновой культуры при индукции гиногенеза (Zhu Y.C. et al., 2019).

Nitwatthanakul N. (2020) использует четырехдневную темновую культуру для культивирования эксплантов дыни (*Cucumis melo* L.) во время индукции гиногенеза (Nitwatthanakul N. et al., 2020).

Isak M.A. (2022) при изучении факторов индукции эмбриогенеза в культуре фрагментов завязей арбуза (*C. lanatus* L.) применяет трехдневную темновую культуру после инкубирования эксплантов на питательных средах (Isak M.A. et al., 2022).

Nyirahabimana F. (2024) также производит инкубирование фрагментов завязей огурца (*C. sativus* L.) на питательных средах с первичной термической обработкой в течение 3 суток в темноте (Nyirahabimana F. et al., 2024).

Исследователи, оценивающие степень влияния различных обработок на индукцию гиногенеза у представителей семейства Cucurbitaceae, не проводят сравнительную оценку влияния световой и темновой культур во время начала культивирования эксплантов.

Гизатуллина А.Т. с коллегами (2019) изучали влияние режима освещенности на развитие эксплантов картофеля (*Solanum tuberosum* L.). В течение первых двух недель экспланты культивировали в условиях длинного дня. Далее проводили сравнительную оценку культивирования при отсутствии освещения и при коротком световом дне (8/16 ч) в течение 10 недель. При использовании режима короткого дня наблюдали значительное увеличение микроклубней по сравнению с полным отсутствием света (Гизатуллина А.Т. и др., 2019).

1.8.3. Тип экспланта

Ермолаев А.С. (2021) и Домблидес Е.А. (2021) в работах по изучению факторов и оптимизации этапов технологии создания удвоенных гаплоидов кабачка (*C. pepo* L.) сообщают об эффективности использования в качестве экспланта двух общепринятых типов – изолированные семязачатки и фрагменты завязей. В большом количестве соматической ткани, присутствующем в инкубируемых фрагментах завязи, происходит индукция каллусогенеза, подавляющего развитие гиногенных структур (Ермолаев А.С. и др., 2021; Домблидес Е.А. и др., 2021).

Большинство исследователей при создании удвоенных гаплоидов представителей рода *Cucurbita* L. посредством индукции гиногенеза используют в

качестве экспланта неопыленные изолированные семязачатки (Kwack S.N. et al., 1988; Metwally E.I. et al., 1998b; Shalaby T.A., 2007; Badawi M.A. et al., 2008; Шмыкова Н.А. и др., 2011; Домблides Е.А. и др., 2016; Савенко Е.Г. и др., 2016; Kurtar E.S. et al., 2018; Zou T. et al., 2020; Ермолаев А.С. и др., 2022).

Min Z. с коллегами (2016) в работе по изучению условий культивирования и регенерации *in vitro* растений из неопыленных семязачатков тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) используют в качестве экспланта фрагменты завязи и мацерированные в растворе гипохлорита натрия фрагменты завязи. Фотографии культивируемых эксплантов свидетельствуют о том, что большое количество соматической ткани фрагментов завязи подавляет развитие гиногенных структур из семязачатков, тогда как при использовании мацерированных фрагментов клетки соматической ткани отмирают, не препятствуя развитию гиногенных структур (Min Z. et al., 2016).

При получении удвоенных гаплоидов других представителей семейства Cucurbitaceae исследователи также используют различные типы эксплантов. Например, многие работы посвящены созданию гомозиготных линий огурца (*C. sativus* L.) *in vitro* при помощи культивирования неопыленных изолированных семязачатков (Домблides Е.А. и др., 2019; Белов С.Н., 2022).

Однако высокую эффективность применительно к индукции гиногенеза огурца (*C. sativus* L.) показало использование в качестве экспланта фрагментов завязи (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; Li J.W. et al., 2013; Plapung P. et al., 2014; Tantasawat P.A. et al., 2015; Ozsan T. et al., 2017; Sorntip A. et al., 2017; Ngoc L.T.K. et al., 2018; Demirel E. et al., 2021; Nyirahabimana F. et al., 2024).

В работе по изучению факторов эмбрио- и каллусогенеза огурца (*C. sativus* L.) Diao W.P. (2009) и Aslibeigi A. (2022) также используют продольно нарезанные фрагменты завязи толщиной около 1 мм, а Moqbeli E. (2013), Golabadi M. (2017) и Asadi A. (2019) инкубируют поперечно нарезанные фрагменты толщиной 1 мм (Diao W.P. et al., 2009; Moqbeli E. et al., 2013; Golabadi M. et al., 2017; Asadi A. et al., 2019; Aslibeigi A. et al., 2022).

Сообщается о способе культивирования эксплантов дыни (*C. melo* L.) и огурца (*C. sativus* L.) посредством предварительного деления завязей на фрагменты толщиной 2-3 мм (Isak M.A. et al., 2022; Majeed H. et al., 2023).

При получении удвоенных гаплоидов дыни (*C. melo* L.) Ficcadenti N. с коллегами (1999) также культивируют экспланты *in vitro* посредством разрезания завязи на фрагменты толщиной 1-2 мм (Ficcadenti N. et al., 1999).

Способ индукции гиногенеза для получения гаплоидных растений арбуза (*C. lanatus* L.), описанный в работе Zhu Y.C. (2018), подразумевает использование в качестве эксплантов фрагментов завязей толщиной 1 мм (Zhu Y.C. et al., 2018).

В работе по изучению факторов индукции гиногенеза арбуза (*C. lanatus* L.) Nitwatthanakul N. с соавторами (2020) также используют неопыленные фрагменты завязей (Nitwatthanakul N. et al., 2020).

1.8.4. Компоненты питательной среды

1.8.4.1. Тип питательной среды

Питательная среда – это используемый для культивирования изолированных клеток и тканей, а также микроорганизмов, субстрат, состоящий из микро- и макроэлементов, витаминов, углеводов, регуляторов роста. В состав некоторых питательных сред входят различные добавки, такие как аминокислоты, гидролизат казеина, кокосовое молоко и т.д. Для повышения эффективности усвоения растительными клетками железа, в состав большинства сред также входит этилдиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) или ее натриевая соль. Для приготовления твердых питательных сред используют различные желирующие агенты, такие как агар-агар и фитогель (Шевелуха В.С. и др., 2008).

Разные исследователи используют различные составы питательных сред для получения удвоенных гаплоидов. Например, Е.Н. Васильченко (2020) в своей работе по созданию гомозиготных линий сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) использует питательную среду Гамборга (Gamborg O.L. et al., 1968) различной консистенции (твердую и жидкую) для индукции гиногенеза и регенерации индуцированных семязачатков (Васильченко Е.Н. и др., 2020).

Многие исследователи в качестве индукционной питательной среды для получения удвоенных гаплоидов тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) и мускатной (*C. moschata* Duch.) используют MS (Murashige T. et al., 1962; Kwack S.N. et al., 1988; Min Z. et al., 2016; Kurtar E.S. et al., 2018).

Шмыкова Н.А. (2011) в качестве индукционной питательной среды для культивирования изолированных семязачатков тыквы использует CBM (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; Шмыкова Н.А. и др., 2011).

Сообщается об успешном получении удвоенных гаплоидов кабачка (*C. pepo* L.) посредством индукции гиногенеза при использовании индукционных питательных сред с минеральной основой MS (Murashige T. et al., 1962; Metwally E.I. et al., 1998; Shalaby T.A., 2007; Badawi M.A. et al., 2008; Домблидес Е.А. и др., 2016).

Савенко Е.Г. (2016) сообщает о способе индукции гиногенеза тыквы на питательной среде с минеральной основой MSm (Masuda K. et al., 1981, 1958). Для стимулирования регенерации растений из эксплантов использовали питательную среду MS (Murashige T. et al., 1962; Савенко Е.Г. и др., 2016).

Домблидес Е.А. (2018) и Ермолаев А.С. (2022) производят индукцию гиногенеза кабачка (*C. pepo* L.) с последующим получением растений-регенерантов на жидкой и агаризованной питательной среде ИМС (Домблидес Е.А. и др., 2018; Ермолаев А.С. и др., 2022).

Домблидес Е.А. с коллегами (2019) и Белов С.Н. (2022) также используют питательную среду ИМС для индукции гиногенеза огурца (*C. sativus* L.) (Домблидес Е.А. и др., 2019; Белов С.Н., 2022).

Gemes-Juhasz A. (2002), Li J.W. (2013), Ozsan T. (2017) и Ngoc L.T.K. (2018) при реализации технологии создания удвоенных гаплоидов огурца (*C. sativus* L.) методом гиногенеза используют питательную среду CBM (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; Li J.W. et al., 2013; Ozsan T. et al., 2017., Ngoc L.T.K. et al., 2018).

Chen J.F. (2018) при изучении доли спонтанного и индуцированного удвоения хромосомного набора растений-регенерантов огурца (*C. sativus* L.)

использует в культуре неопыленных семязачатков питательную среду В5 (Gamborg O.L. et al., 1968; Chen J.F. et al., 2018).

Большинство исследований свидетельствуют об успешном применении питательной среды MS (Murashige T. et al., 1962) для получения удвоенных гаплоидов огурца (*C. sativus* L.) посредством индукции гиногенеза в культуре фрагментов завязей и изолированных семязачатков (Diao W.P. et al., 2009; Moqbeli E. et al., 2013; Plapung P. et al., 2014; Tantasawat P.A. et al., 2015; Golabadi M. et al., 2017; Sorntip A. et al., 2017; Asadi A. et al., 2019; Demirel E. et al., 2021; Aslibeigi A. et al., 2022; Baktumur G. et al., 2022; Majeed H. et al., 2023).

Сообщается об успешном применении питательной среды MS (Murashige T. et al., 1962) для получения удвоенных гаплоидов дыни (*C. melo* L.) посредством индукции гиногенеза (Ficcadenti N. et al., 1999; Nitwatthanakul N. et al., 2020).

Индукцию гиногенеза арбуза (*C. lanatus* L.) также проводят с использованием индукционной питательной среды MS (Murashige T. et al., 1962; Zhu Y.C. et al., 2018; Zou T. et al., 2018; Isak M.A. et al., 2022).

1.8.4.2. Источник углеводов

Углеводы являются источником энергии для изолированных эксплантов, чаще всего не имеющих способности к автотрофному питанию. Кроме того, важная функция углеводов состоит в регуляции осмотического давления, определяющего способность клеток поглощать воду из питательного раствора (Шевелуха В.С. и др., 2008; Матушкина О.В. и др., 2018).

На разных культурах были проведены сравнительные исследования по эффективности источника углеводов. Наиболее распространенным и эффективно применяемым в качестве источника углеводов является сахароза, но в использовании других сахаров также были выявлены преимущества.

Согласно А.И. Здруйковской-Рихтер (1979) многие авторы проводили исследования, связанные с подбором лучшего источника углеводов в составе питательных сред, и пришли к выводу о том, что эффективнее всего использовать сахарозу (Здруйковская-Рихтер А.И., 1979).

В работе по индукции андрогенеза подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) Е.Е. Костина (2016) с соавторами выявили наибольшую эффективность сахарозы по сравнению с мальтозой в составе питательных сред (Костина Е.Е. и др., 2016).

Несмотря на то, что сахароза является наиболее часто используемым источником углеводов в составе питательных сред, многие исследователи в своих экспериментах выявили преимущества замены сахарозы на мальтозу (Orshinsky V.R. et al., 1990; Дьячук Т.И. и др., 2003).

Представленные данные в исследовании О.В. Хомяковой (2010) по селекции тритикале (\times *Triticosecale* Wittm. & A. Camus) на основе клеточных биотехнологий свидетельствуют о том, что мальтоза не оказала положительного влияния на индукцию андрогенеза, но обработка результатов выявила достоверное положительное влияние на регенерацию (Хомякова О.В. и др., 2010).

Анализ данных в работе Dobrova Н.О. (2015) по изучению влияния сахаров на каллусообразование и регенерацию растений пшеницы (*Triticum* L.) также показал, что наибольший процент регенерантов был получен при добавлении в питательные среды мальтозы (Dobrova Н.О. et al., 2015).

1.8.4.3. Концентрация сахарозы

Одна из важнейших функций сахаров в составе питательных сред заключается в регуляции осмотического давления, играющего решающую роль в водопоглощающей способности клеток. В связи с этим существует необходимость подбора оптимальной концентрации сахарозы для нормального роста и развития эксплантов.

Существуют исследования в области гиногенеза у представителей тыквенных культур, результаты которых обнаруживают обратную корреляционную связь между увеличением концентрации сахарозы и степенью индукции семязачатков (Shalaby Т.А., 2007; Ермолаев А.С. и др., 2022). Изучение влияния различных концентраций сахарозы на индукцию гиногенеза растений рода *Cucurbita* L. показало, что оптимальной является концентрация 30 г/л (Kwack S.N. et al., 1988; Shalaby Т.А., 2007; Ермолаев А.С. и др., 2022).

1.8.4.4. Регуляторы роста

Регуляторы роста участвуют в процессах деления и дедифференцировки клеток. Основное отличие регуляторов роста от фитогормонов заключается в их происхождении. Образование фитогормонов происходит в одних частях растения для транспортировки в другие, тогда как получение регуляторов роста осуществляется посредством синтеза микроорганизмами или химического синтеза. Однако синтезированные растениями гормоны также можно отнести к регуляторам роста, которые подразделяются на несколько групп: ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая кислота, этилен, брассиностероиды и фузикоцины. Также известна группа негормональных регуляторов роста, к которым относятся фенольные ингибиторы и синтетические регуляторы роста (Шевелуха В.С. и др., 2008; Кузнецов В.В. и др., 2005; Третьяков Н.Н. и др., 2005; Воронина А.В. и др., 2023).

В исследовании Н.А. Шмыковой (2011) по получению удвоенных гаплоидов тыквы методом гиногенеза авторы используют два варианта регуляторов роста в составе питательной среды CBM (Gemes-Juhasz A. et al., 2002): 0,1 – 0,2 мг/л TDZ с 0,0001 мкМ эпибрассинолида; 2 мг/л 2,4-Д, причем второй вариант показал наилучшие результаты у большинства исследованных образцов (Шмыкова Н.А. и др., 2011).

В процессе сравнения эффективности регуляторов роста при получении удвоенных гаплоидов кабачка (*C. pepo* L.) было установлено, что питательные среды с добавлением 2,4-Д обладают большим потенциалом стимулирования развития семязачатков по сравнению с питательными средами с добавлением TDZ (Домблидес Е.А. и др., 2016).

Результаты исследования по влиянию различных регуляторов роста (2 мг/л 2,4-Д; 0,2 мг/л TDZ; 0,8 мг/л 2,4-Д + 1,2 мг/л NAA) на индукцию гиногенеза кабачка (*C. pepo* L.) свидетельствуют о том, что большинство изученных образцов проявляли отзывчивость на питательной среде с добавлением 2,4-Д (Ермолаев А.С. и др., 2022).

Результаты эксперимента по сравнению влияния повышенной концентрации 2,4-D (5 мг/л) с комплексом ауксина (1 мг/л 2,4-D) и цитокинина (1 мг/л Kin) на индукцию гиногенеза кабачка (*C. pepo* L.) показали наибольшую эффективность высокой концентрации 2,4-D (Badawi M.A. et al., 2008).

Min Z. с соавторами (2016) в работе по изучению факторов индукции гиногенеза тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) использовали несколько вариантов регуляторов роста и их комбинаций в составе питательных сред. Согласно полученным результатам наибольшей эффективностью обладали питательные среды с добавлением 2,4-D (4 мг/л) + NAA (0,5 мг/л) + 6-BAР (1 мг/л), а также среды, дополненные TDZ (0,04 мг/л). Причем вариант использования TDZ показал самый высокий процент индукции (Min Z. et al., 2016).

В исследовании по изучению влияния абиотических факторов на каллусо- и эмбриогенез тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) в процессе создания удвоенных гаплоидов использовали 2,4-D в составе питательной среды для образования и созревания каллусной ткани. Далее изучали эффект комбинации регуляторов роста в инициировании образования эмбриоидов из клеток каллуса. В результате установлено, что использование пониженных концентраций TDZ (0,05 мг/л и 0,1 мг/л) в комплексе с 6-BAР (4 мг/л) и NAA (0,05 мг/л) оказывает стимулирующее действие на эмбриогенез у всех исследованных образцов растений (Kurtar E.S. et al., 2018).

Исследование Zou T. (2020) относительно индукции гиногенеза тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.), тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) и межвидовых гибридов подтверждает эффективность применения 6-BAР (1 мг/л) для стимулирования прорастания семязачатков в культуре *in vitro* (Zou T. et al., 2020).

Савенко Е.Г. и др. (2016) в работе по оптимизации технологии создания удвоенных гаплоидов тыквы отмечают, что оптимальная концентрация 2,4-D, при которой наблюдается наибольший процент образования эмбриоидов из

семязачатков, составляет 1 мг/л по сравнению с 2 мг/л 2,4-D (Савенко Е.Г. и др., 2016).

В ходе эксперимента Metwally E.I. (1998) по использованию различных концентраций 2,4-D (0,1 мг/л, 1 мг/л, 5 мг/л) в составе питательной среды для производства удвоенных гаплоидов кабачка (*C. pepo* L.) выявлено получение наилучшего результата при добавлении 1 и 5 мг/л 2,4-D (Metwally E.I. et al., 1998b).

В процессе исследования Majeed H. et al. (2023), посвященного изучению факторов индукции гиногенеза в культуре фрагментов завязей огурца (*C. sativus* L.), сравнивали эффективность использования TDZ с комплексом ауксина (2,4-D) и цитокинина (Kin) в различных концентрациях для образования каллуса. Также изучали влияние различных концентраций регуляторов роста в комбинации ауксина (NAA) и цитокинина (6-BAР) на индукцию эмбриогенеза. Полученные результаты свидетельствуют о том, что TDZ оказал наилучшее влияние на индукцию каллусогенеза, а для регенерации растений из клеток каллуса эффективнее использовать комбинацию 1 мг/л NAA + 3 мг/л 6-BAР (Majeed H. et al., 2023).

Nitwatthanakul N. (2020) также изучает влияние различных концентраций ауксина (NAA) и цитокинина (6-BAР) в комплексе на индукцию гиногенеза дыни (*C. melo* L.). В результате эксперимента выявлены наиболее эффективные концентрации регуляторов роста, составляющие 0,4 мг/л и 0,2 мг/л соответственно (Nitwatthanakul N. et al., 2020).

В работе Baktetur G. (2022) по установлению влияния факторов на индукцию гиногенеза огурца (*C. sativus* L.) получились результаты, противоположные результатам Majeed H. (2023). Наибольший процент образования эмбриоподобных структур наблюдали при использовании питательной среды, содержащей 2,4-D и Kin, по сравнению с питательной средой, дополненной TDZ (Baktetur G. et al., 2022).

Li J.W. et al. (2013) приводят данные по влиянию тидиазурина и нитрата серебра в технологии получения удвоенных гаплоидов огурца (*C. sativus* L.)

посредством индукции гиногенеза. В качестве индукционной среды использовали CBM (Gemes-Juhasz et al., 2002) с добавлением TDZ в различных концентрациях (0,03; 0,05; 0,07 и 0,09 мг/л). Наилучшие результаты получились при использовании индукционной среды с добавлением 0,03-0,07 мг/л TDZ (Li J.W. et al., 2013).

Ozsan T. (2017) и Ngoc L.T.K. (2018) независимо друг от друга установили оптимальную концентрацию TDZ (0,03 мг/л), при которой наблюдали наиболее высокий процент индукции гиногенеза огурца (*C. sativus* L.) (Ozsan T. et al., 2017; Ngoc L.T.K. et al., 2018).

Diao W.P. (2009) и Moqbeli E. (2013) также при проведении независимых исследований обнаружили положительную корреляцию между добавлением в питательные среды TDZ и эффективностью индукции гиногенеза огурца (*C. sativus* L.), причем наиболее значимое влияние на эмбриогенез оказала концентрация TDZ 0,04 мг/л (Diao W.P. et al., 2009; Moqbeli E. Et al., 2013).

Asadi A. с соавторами (2019) также проводили сравнительную оценку влияния различных концентраций TDZ на эффективность культуры изолированных семязачатков огурца (*C. sativus* L.) и установили оптимальное содержание регулятора роста в составе питательной среды (0,08 мг/л) для индукции развития эмбриоподобных структур и формирования эмбриоидов (Asadi A. et al., 2019).

Aslibeigi A. (2022) в процессе изучения факторов, оказывающих влияние на индукцию гиногенеза огурца (*C. sativus* L.), выявляет наличие высокой эффективности добавления в питательные среды ИВА в комплексе с Kin для инициирования эмбриогенеза и регенерации растений из каллусных клеток (Aslibeigi A. et al., 2022).

Zhu T. с соавторами (2018) выполнили работу по изучению влияния комплексов регуляторов роста в различных концентрациях TDZ (0; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 мг/л), NAA (0; 0,5; 1; 1,5; 2 мг/л), 6-BAР (0; 0,5; 1; 1,5; 2 мг/л), Kin (0; 0,5; 1; 1,5; 2 мг/л) на индукцию гиногенеза арбуза (*C. lanatus* L.). Анализ полученных данных показал, что наибольшим эффектом увеличения семязачатков

обладали питательные среды с добавлением 0,04 и 0,08 мг/л TDZ, 0,5 мг/л NAA, 1,5 мг/л 6-BAР, 0-0,5 мг/л Kin (Zhu T. et al., 2018).

При изучении факторов индукции гиногенеза огурца (*C. sativus* L.) в культуре изолированных семязачатков Tantasawat P.A. et al. (2015) установили оптимальные концентрации комбинаций регуляторов роста в составе питательных сред. Результаты показали, что оптимальным составом для индукции семязачатков и формирования каллуса обладала питательная среда, дополненная 6-BAР (2 мг/л), IAA (0,5 мг/л), GA (1 мг/л) и путресцином (32 мг/л). Однако наибольшим эффектом формирования эмбриоподобных структур обладала среда, содержащая TDZ (1 мг/л) и 6-BAР (1 мг/л) (Tantasawat P.A. et al., 2015).

В работе Васильченко Е.Н. (2020) наибольшую отзывчивость на индукцию партеногенеза показали семязачатки свеклы (*B. vulgaris* L.), помещенные на питательные среды с добавлением гиббереллиновой кислоты (GA), так как ее присутствие в составе среды способствовало прямой регенерации эмбриоидов с образованием первичного корешка и семядольных листьев. Добавление в питательные среды 6-BAР привело к формированию каллуса. При его пересадке на среды с добавлением кинетина и 2,4-D образовывались регенеранты путем гемморизогенеза (Васильченко Е.Н. и др., 2020).

1.8.4.5. Желирующие агенты

Самым распространенным желирующим агентом в составе различных питательных сред для разных культур является агар. Однако многими исследованиями доказана эффективность заменителей агара в качестве желирующих агентов. Большинство исследователей рекомендуют использовать в культуре изолированных семязачатков представителей семейства Cucurbitaceae гелеобразователи агар и фитогель (Shalaby T.A., 2007; Шмыкова Н.А. и др., 2015; Kurtar E.S. et al., 2018; Домблидес Е.А. и др., 2019).

В процессе изучения влияния различных желирующих агентов на эффективность микрклонального размножения винограда (*Vitis vinifera* L.) использовали пшеничный, кукурузный и картофельный крахмал в качестве заменителей агара. Установлено, что наибольшие рост и развитие растений, а

также активность ризогенеза происходит на питательной среде с добавлением кукурузного крахмала (Зеленянская Н.Н. и др., 2010).

Результаты исследования, посвященного микроклональному размножению яблони (*Malus domestica* Borkh.), также указывают на низкую эффективность агара по сравнению с аналогом, в качестве которого использовали картофельный крахмал (Беседина Е.Н. и др., 2015).

Согласно результатам исследования Т.Р. Григолова (2021) по созданию удвоенных гаплоидов столовой свеклы (*B. vulgaris* L.) посредством индукции гиногенеза агар в составе индукционной питательной среды показал наихудшее влияние на выход индуцированных проростков. Эффективнее всего для получения растений-регенерантов оказалось использование питательных сред с добавлением фитогеля в качестве желирующего агента (Григолова Т.Р. и др., 2021).

Исследованием Белова С.Н. (2022) по влиянию различных гелеобразователей на индукцию гиногенеза огурца (*C. sativus* L.) показано, что фитогель обладает способностью стимулирования скорости развития семязачатков. Однако при использовании агара развитие семязачатков происходит более равномерно, что приводит к более высокой частоте индукции гиногенеза (Белов С.Н., 2022).

В результате некоторых работ установлено, что применение в качестве желирующего агента фитогеля в составе питательной среды приводит к увеличению способности клеток к поглощению воды и минеральных солей, а также снижению степени витрификации (Buah J.N. et al., 1999).

1.8.4.6. Гидролизат казеина

Гидролизаты казеина являются растворами, состоящими из смеси аминокислот и пептидов, которые получают посредством гидролиза белка казеина при помощи температурной или ферментативной обработки. Гидролиз казеина сопровождается разрывом пептидных связей с образованием ди- и трипептидов и свободных аминокислот, что приводит к повышению степени усвоения организмом белковых продуктов (Остроумов Л.А. и др., 2013).

Чаще всего гидролизат казеина используют в микробиологии в качестве компонента питательной среды для бактерий. Однако многими исследованиями также доказана эффективность применения гидролизата казеина в работе с культурой клеток и тканей растений.

Янковская М.Б. и др. (2011) и Савенко Е.Г. и др. (2017) при изучении факторов, оказывающих влияние на коэффициент микроклонального размножения лимонника китайского (*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill) и интенсивности морфогенеза каллуса подсолнечника (*H. annuus* L.) в культуре *in vitro* соответственно, пришли к выводу, что добавление в питательные среды 250 мг/л гидролизата казеина способствует значительному повышению степени побегообразования в культуре *in vitro* и увеличивает морфогенетический потенциал каллуса (Янковская М.Б. и др., 2011 Савенко Е.Г. и др., 2017).

Результаты исследования Сидорова и др. (2009) показали, что оптимальный состав питательной среды, инициирующий морфогенез ячменя (*Hordeum vulgare* L.), содержит 1000 мг/л гидролизата казеина (Сидоров Е.А. и др., 2009).

Согласно результатам, полученным Чистовой А.В. (2017) при изучении возможных факторов оптимизации технологии получения удвоенных гаплоидов моркови (*Daucus carota* L.), добавление в питательные среды 400 мг/л гидролизата казеина способствует повышению частоты эмбрио- и каллусогенеза (Чистова А.В., 2017).

1.8.4.7. Маннитол

Маннитол является разновидностью многоатомных спиртов, изомером сорбита, обычно получаемой в промышленности из фруктозы посредством ее гидрирования на никелевом катализаторе. Маннит также возможно получить с помощью восстановления маннозы. В Китае распространенным способом производства маннитола является биосинтез из водорослей. Также к альтернативным способам получения маннитола относится ферментация микроорганизмами, известная как метаболический путь превращения фруктозы в маннит (Kearsley M.W., 2006; Lawson P., 2007; Ghoreishi S.M. et al., 2009).

Маннитол приобрел широкое применение в медицине и фармакологии. В биотехнологии его применяют в приготовлении маннитолово-солевого агара для культивирования различных штаммов бактерий. Также установлено эффективное использование маннитола в культуре растительных клеток и тканей у представителей различных семейств растений.

Согласно Stoop (1996) виды растений, метаболизирующих маннитол, имеют некоторые преимущества. К ним относятся повышенная устойчивость растений к солевому и осмотическому стрессу и ответная реакция на биотические и абиотические факторы (Stoop J.M.H. et al., 1996).

Путем изучения механизмов поглощения маннитола высшими растениями установлено ингибирующее действие вещества на водопоглощение корневой системой. Также присутствие высоких концентраций маннитола в питательных средах приводит к подавлению роста и обезвоживанию тканей корневой и надземной частей растения. Таким образом, маннитол обладает потенциалом использования в качестве вещества, инициирующего осмотический стресс, для индукции эмбриогенеза в культуре *in vitro* (Kozinka V. et al., 1965).

Согласно результатам, полученным Орловым П.А. и др. (2008) в ходе изучения факторов индукции эмбриогенеза пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и тритикале (\times *Triticosecale* Wittm. & Camus), культивирование пыльников в растворах маннитола повышает частоту эмбриогенеза пшеницы (*T. aestivum* L.) (Орлов П.А. и др., 2008).

Ким Ю.Ц. и др. (2010) в исследовании соматического эмбриогенеза женьшеня (*Panax ginseng* L.) установлено, что добавление маннитола в питательные среды подавляет образование соматических эмбриоидов (Ким Ю.Ц. и др., 2010).

1.8.4.8. Пантотенат кальция

Кальция пантотенат (D- (+), α , γ -диокси- β , β -диоксибутирил – β -аланин) является производной пантотеновой кислоты (витамин B5) и представляет собой белый кристаллический порошок (Мехтиханов С.Д. и др., 2019).

Пантотеновая кислота является дипептидом, состоящим из остатков β -аланина и пантоевой кислоты. При попадании в организм вещество преобразуется в пантенин, входящий в состав кофермента А, который играет важную роль в процессах окисления и ацетилирования, а также принимает участие в метаболизме белков, жиров и углеводов (Новгородова О.Т., 2020).

В5 участвует в обмене аминокислот, жиров, углеводов, синтезе жирных кислот, способствует усвоению организмом других витаминов, нормализации липидного обмена и активированию окислительно-восстановительных процессов (Новгородова О.Т., 2020).

Витаминный состав некоторых питательных сред для культуры клеток и тканей растений (CBM (Gemes-Juhazs A. et al., 2002), BDS (Dunstan D.I. et al., 1977)) характеризуется наличием пантотената кальция.

Поляков А.В. (1998) рекомендует добавлять пантотенат кальция (4 мг/л) в питательные среды, предназначенные для культивирования пыльников льна (*Linum usitatissimum* L.) (Поляков А.В. и др., 1998).

Результаты работы Макарова С.С. (2019) по изучению влияния состава питательной среды на продуктивность микроклонального размножения ежевики (*Rubus* subgen. *Rubus* L.) показали, что изучаемые показатели в виде интенсивности прироста побегов на среде с добавлением витаминов, включая пантотенат кальция, почти в 2 раза превышали контрольные показатели, полученные на среде без добавления витаминов (Макаров С.С., 2019).

При изучении факторов микроклонального размножения картофеля (*S. tuberosum* L.) Тустубаева Ш.Т. с соавторами (2018) сравнивают процент выхода микроклубней вследствие применения двух методик. Исследователи приходят к выводу, что культивирование на питательной среде, содержащей пантотенат кальция (1 мг/л), показало наименьшее число образованных микроклубней (Тустубаева Ш.Т. и др., 2018).

Результаты проведенного Ромадановой Н.В. (2017) подбора оптимального состава питательной среды для микроклонального размножения барбариса илийского (*Berberis iliensis* L.) и цельнокрайнего (*Berberis integerrima* L.)

свидетельствуют о благоприятном воздействии питательных сред, имеющих в составе пантотенат кальция (2 мг/л), на регенерацию побегов *in vitro* (Ромаданова Н.В. и др., 2017).

1.8.4.9. Аминокислотно-пептидный состав

Из всего разнообразия аминокислот в клетках живых организмов в основном встречаются аминокарбоновые кислоты. Аминокислоты представляют собой группу органических веществ, молекулы которых содержат аминные и карбоксильные группы. Также известно определение, согласно которому аминокислоты являются производными карбоновых кислот, один или несколько атомов которых заменены на аминные группы. Аминокислоты в клетках живых организмов играют роль структурных элементов белков и других соединений, источников образования биогенных аминов и родственных соединений, медиаторов и нейромедиаторов, метаболитов. Белковые (протеиногенные) аминокислоты в процессе биосинтеза в рибосомах, контролируемого иРНК, включаются в состав белков, сопровождая их созревание (Wagner I. et al., 1983; Смирнов В.А. и др., 2007; Azad S., 2017).

Многие исследователи применяют различные комбинации аминокислот в составе питательных сред для повышения эффективности технологии получения удвоенных гаплоидов у представителей семейства растений Cucurbitaceae.

Домблides Е.А. (2016), Савенко Е.Г. (2016) и Ермолаев А.С. (2022) в питательные среды для индукции гиногенеза у представителей рода растений *Cucurbita* L. добавляют комплекс аминокислот по протоколу NLN (Lichter R., 1982) (100 мг/л пролина, 100 мг/л серина, 800 мг/л глутамин) (Домблides Е.А. и др., 2016; Савенко Е.Г. и др., 2016; Ермолаев А.С. и др., 2022).

Для получения удвоенных гаплоидов огурца (*C. sativus* L.) Домблides Е.А. (2019) и Белов С.Н. (2022) также используют в составе питательной среды комплекс аминокислот по протоколу NLN (Lichter R., 1982) (Домблides Е.А. и др., 2019; Белов С.Н., 2022).

Tantasawat P.A. (2015) и Sorntip A. (2018) добавляют в индукционные питательные среды для производства удвоенных гаплоидов огурца (*C. sativus* L.) глутамин в концентрации 800 мг/л (Tantasawat P.A. et al., 2015; Sorntip A. et al.).

Протокол питательной среды NLN-13 (Lichter R., 1982), разработанный для производства удвоенных гаплоидов брокколи методом культивирования изолированных микроспор, имеет в составе комплекс аминокислот разных концентраций (100 мг/л серина, 800 мг/л глутамина, 30 мг/л глутатиона).

Питательная среда, разработанная Поляковым А.В. (1998) для культивирования пыльников льна (*L. usitatissimum* L.), содержит 25 мг/л глутамина, 2 мг/л глицина, 250 мг/л аспарагина, 125 мг/л серина (Поляков А.В. и др., 1998).

Серин (α -амино- β -оксипропионовая кислота) – белковая L-аминокислота, имеющая большое значение для метаболизма организмов. Серин содержится в фосфолипидах, брадикиnine, каллидине, принимает участие в образовании активного центра некоторых протеолитических ферментов, синтезе сфингозина, этаноламина, холина. Аминокислота является донором формильных групп, участвующих в синтезе аденина и гуанина, а также источником образования глицина и углеводов. Растения образуют серин из глицина в процессе фотосинтеза (Стручкова И.В. и др., 2016).

Глицин (α -аминоуксусная кислота) – белковая L-аминокислота, принимающая участие в биосинтезе порфиринов, содержащихся в гемоглобине, хлорофилле и герминовых ферментах. Также участвует в образовании пуринов, трипептида глутатиона, креатина, холина, гликохолевых кислот (Стручкова И.В. и др., 2016).

Глутамин представляет собой амид глутаминовой (α -аминоглутаровой) кислоты. В организмах животных и растений глутамин играет роль транспортной формы азота. Аминокислота является источником синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований, никотиновой кислоты (Стручкова И.В. и др., 2016).

Пролин (пирролидин- α -карбоновая кислота) – белковая L-аминокислота, содержащаяся в белках семян злаков, коллагене, эластине, ряде антибиотиков

(Стручкова И.В., 2016). Результаты исследования Сергеевой Л.Е. (2011) показали, что содержание свободного пролина в клетках табака (*Nicotiana tabacum* L.) является маркерным признаком ответной реакции на стресс. А вследствие экспериментов Wang R. (2006) установлено наличие прямой корреляции между устойчивостью к засолению и содержанием свободного пролина в клетках растений тыквы. Duncan D.R. и др. (1985) обнаружили повышение степени индукции эмбрионного каллуса кукурузы (*Zea mays* L.) на питательных средах с добавлением пролина (Duncan D.R. et al., 1985; Wang R. et al., 2006; Сергеева Л.Е. и др., 2011; Стручкова И.В. и др., 2016).

Глутатион (γ -глутамил-цистеинил-глицин) представляет из себя трипептид, имеющий γ -пептидную связь между карбоксильной группой боковой цепи и цистеином, а также пептидную связь между карбоксильной группой остатка цистеина и глицином. Является одним из основных тиолсодержащих соединений, синтезируемых практически в любых эукариотических клетках. В клетках растительных организмов глутатион принимает участие в процессах, отвечающих за ответную реакцию на стрессовые факторы. Мартиросян Л.Ю. (2022) обнаружил, что добавление глутатиона в питательные среды оказывает положительное воздействие на прирост массы клеток каллуса и стимулирование морфогенеза при культивировании эксплантов кок-сагыза (*Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin). Изучение влияния антиоксидантов в составе питательной среды на развитие растений малины (*Rubus idaeus* L.) в культуре *in vitro* показало, что использование 65-130 мг/л глутатиона в составе питательной среды значительно повышало жизнеспособность эксплантов (Калинина Е.В. и др., 2014; Haynes W.M., 2016; Мартиросян Л.Ю. и др., 2022; Соловых Н.В., 2023).

Нестерова А.Н. (2021) отмечает, что добавление в питательные среды пищевого протеина, содержащего серин, пролин, глутаминовую кислоту, глицин и другие аминокислоты, приводит к повышению степени роста и развития растений картофеля (*S. tuberosum* L.) *in vitro* (Нестерова А.Н. и др., 2021).

Согласно Чистовой А.В. (2014) питательная среда с добавлением 500 мг/л глутамина и 100 мг/л серина оказала положительное влияние на отзывчивость пыльников моркови (*D. carota* L.) в культуре *in vitro* (Чистова А.В. и др., 2014).

Курбангалиевой Т.А. (2020) установлено, что повышение концентрации пролина и, особенно, глутамина в составе питательной среды способствует повышению жизнеспособности каллуса душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.) и стимулирует образование из его клеток эмбриоидов (Курбангалиева Т.А., 2020).

Изучение процесса морфогенеза картофеля (*S. tuberosum* L.) в условиях *in vitro* показало наличие положительного эффекта добавления глутаминовой кислоты в питательные среды на рост растений (Федорова Л.Н. и др., 2019).

2. Материалы и методы

2.1. Место проведения исследования

Работа выполнена в 2020-2024 годах на базе кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений института садоводства и ландшафтной архитектуры ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, г. Москва.

2.2. Растительный материал

В качестве донорных растений для индукции гиногенеза использовали образцы из генетической коллекции ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева», представленные коммерческими гибридами, сортами и селекционными линиями.

Тыква твердокорая (*C. pepo* L.):

– Селекционные линии: Др-4, Др-8, S, S6, S7, Анг S, N19ДРр-5хД48.

– Гибриды F₁: F₁ Ангелина, F₁ Марселла, F₁ Байкал, F₁ Балхаш, F₁ Арал, F₁ Отелло, F₁ Гарант.

Тыква крупноплодная (*C. maxima* Duch.):

– Селекционные линии: К-182, К-183, Т-110-240, Т-110-243, Т-110-8, Т-110-12, Т-110-13-1, Т-110-13-2, Т-110-13-3, Т-110-2(11)1, Т-110-2(11)3, Т-110-2(11)6, Т-110(11)(11).

– Гибриды F₁: F₁ Орэнж Колон, F₁ Свит Коб.

Тыква мускатная (*C. moschata* Duch.):

– Сорт: Ромашка.

– Селекционные линии: Ц-20-2016; Ц-20-5.

– Гибриды F₁: F₁ Тиана, F₁ Хавана.

Для реализации межвидовой гибридизации в качестве родительских компонентов использовали F₁ Т (*C. moschata* Duch.), F₁ ОК (*C. maxima* Duch.) и Т-110 (*C. maxima* Duch.).

2.3. Условия выращивания донорных растений

Донорные растения выращивали в условиях открытого и защищенного грунта. Ручной посев семян производили в начале весеннего периода (март-апрель) в горшки объемом 0,5 л, заполненные увлажненным субстратом,

представленным сфагновым торфом. Глубина посева семян составляла 1-2 см. По мере необходимости производили поливы и внесение комплексных подкормок 100-120 мг/л N, 120-220 мг/л P₂O₅, 140-240 мг/л K₂O. В мае растения пересаживали в открытый грунт и в грунтовые поликарбонатные теплицы. Длинноплетистые формы размещали по схеме 100x140, кустовые – по схеме 70x120.

2.4. Технология создания удвоенных гаплоидов

2.4.1. Изолирование и культивирование эксплантов

Изолирование и культивирование семязачатков производили в соответствии с методикой культивирования изолированных семязачатков тыквы (Шмыкова Н.А. и др., 2011).

Сбор завязей проводили за 1-2 суток до распускания цветка. В отдельных экспериментах применяли предварительную температурную обработку завязей перед изолированием семязачатков.

Стерилизацию завязей осуществляли в 2%-ном растворе гипохлорита натрия с добавлением Tween-20 в течение 10 минут, предварительно промывая завязи водопроводной водой. После стерилизации завязи подвергали трехкратному промыванию в дистиллированной автоклавированной воде в течение 5, 10 и 15 минут в стерильных условиях ламинарного бокса FasterFlow FAST H12.

Завязи, сильно различающиеся по размеру в зависимости от генотипа, в условиях ламинарного бокса вскрывали скальпелем, используя стерильные матрасики. Изолированные семязачатки помещали на индукционную питательную среду в одноразовые чашки Петри диаметром 60 мм. Одну чашку Петри, содержащую 10 семязачатков, принимали за одну повторность опыта. Опыты закладывали не менее чем в 6-кратной повторности.

В отдельных экспериментах чашки Петри инкубировали в темноте в климатической камере Binder KBF 115 в течение 4 суток с поддержанием температуры 32°C. Затем чашки с эксплантами переносили в световую комнату и культивировали при температуре 24°C и фотопериоде 16/8 час. Через месяц

культивирования экспланты перемещали на регенерационную безгормональную питательную среду CBM (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А) с модификациями (положительное влияние отсутствия 0,5 мг/л пантотената кальция в составе среды на развитие семязачатков *in vitro* было отмечено и показано в начальных опытах, в дальнейших экспериментах индукционную среду данного состава использовали в качестве контроля) с последующей ежемесячной пересадкой на свежую питательную среду.

В среднем в течение двух месяцев начинали появляться первые эмбриониды и эмбриоподобные структуры или морфогенный каллус, которые пересаживали в заполненные на четверть питательной средой MS (Murashige T. et al., 1962; прил. А) полипропиленовые автоклавируемые контейнеры.

Полученные сформированные растения-регенеранты адаптировали к условиям внешней среды по достижении ими фазы 1-2 настоящих листьев и развитой корневой системы в пластиковые горшки объемом 0,5 л в климатической комнате при температуре воздуха 18°C, фотопериоде 16/8. Растениям в течение первых 3-4 дней создавали условия повышенной влажности, накрывая горшки полипропиленовыми контейнерами, на этапе формирования новых корневых волосков.

2.4.2. Изучение влияния температурной предобработки завязей на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Изучение влияния температурного режима предобработки завязей проводили с использованием климатических камер Binder KBF 115. Опыты заложили на образцах кабачка (*C. pepo* L.) F₁ Марселла, F₁ Байкал, F₁ Балхаш, F₁ Арал, F₁ Отелло, F₁ Гарант, N19ДРр-5хД48 и образцах тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) Ромашка, F₁ Тиана, F₁ Хавана с использованием питательной среды CBM (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А).

Сбор завязей проводили за 1-2 суток до раскрытия цветка и помещали в полипропиленовые контейнеры, предварительно создав в них условия повышенной влажности при помощи влажной салфетки. Затем контейнеры ставили в климатические камеры с различными температурными режимами.

Через 2 суток завязи промывали, проводили поверхностную стерилизацию с последующим изолированием и культивированием семязачатков, применяя стандартную технологию.

Варианты опыта:

- 1) Контроль без предобработки;
- 2) 32°C;
- 3) 4°C.

2.4.3. Изучение влияния температурного и светового режимов обработки культивируемых эксплантов на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Экспланты после помещения на питательные среды подвергали термической обработке при различных режимах. Эксперименты проводили, используя образцы кабачка (*C. pepo* L.) F₁ Марселла, F₁ Байкал, F₁ Балхаш, F₁ Арал, F₁ Отелло, F₁ Гарант, F₁ Ангелина, Анг S, S7, S, образцы тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) F₁ Тиана, Ромашка, образцы тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) T-110-2(11)6, T-110(11)(11). Опыт закладывали при использовании питательной среды СВМ (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А).

Для установления влияния фактора наличия или отсутствия освещения при термической обработке в первые дни культивирования семязачатков на частоту индукции гиногенеза чашки Петри помещали в климатические камеры (32°C) при условиях отсутствия освещения и наличия 16-часового фотопериода.

Варианты опыта:

- 1) Контроль без обработки;
- 2) 32°C в течение 2 суток;
- 3) 32°C в течение 4 суток;
- 4) 4°C в течение 2 суток;
- 5) 4°C в течение 4 суток.

После термической обработки эксплантов чашки Петри помещали в световую комнату для дальнейшего культивирования.

2.4.4. Изучение влияния типа экспланта на частоту индукции гиногенеза в культуре *in vitro*

Изучение влияния типа экспланта осуществляли на примере 6 образцов *C. pepo* L. – F₁ Байкал, F₁ Балхаш, F₁ Отелло, F₁ Гарант, S7, N19ДРр-5хД48. Эксперимент проводили с использованием питательной среды СВМ (Gemesis-Juhász A. et al., 2002; прил. А). В качестве контроля рассматривали изолированные семязачатки.

Изучаемые типы экспланта:

- 1) Изолированные семязачатки;
- 2) Фрагменты завязи;
- 3) Мацерированные сегменты.

Фрагменты завязи получали после сбора завязей и их поверхностной стерилизации в 2%-ном растворе гипохлорита натрия. В стерильных условиях ламинарного бокса завязи разрезали на поперечные фрагменты толщиной ≈1 мм.

Для получения мацерированных сегментов завязи после сбора разрезали на поперечные фрагменты толщиной ≈1 мм, после чего производили их стерилизацию в 2%-ном растворе гипохлорита натрия с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде в условиях ламинарного бокса.

2.4.5. Изучение влияния компонентов индукционной питательной среды на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

2.4.5.1. Изучение влияния типа индукционной питательной среды на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Закладку опыта по выявлению влияния различных типов питательной среды на индукцию гиногенеза проводили, используя образцы кабачка (*C. pepo* L.) F₁ Марселла, F₁ Байкал, F₁ Балхаш, F₁ Арал, F₁ Отелло, F₁ Гарант, S7, образцы тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) Ромашка, F₁ Тиана, F₁ Хавана, Ц-20-2016 и образцы тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) F₁ Свит Коб, T110-2(11)1, T-110-240.

В качестве контрольной индукционной питательной среды использовали разработанную для тыквенных культур среду СВМ (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А) с добавлением 2 мг/л 2,4-Д, 30 г/л сахарозы и 7 г/л агара. рН среды до автоклавирования 5,8.

Использовали следующие варианты питательных сред на минеральной основе MS (Murashige T. et al., 1962; прил. А), В5 (Gamborg O.L. et al., 1968; прил. А), MSm (Masuda K. et al., 1981; прил. А):

- 1) СВМ + 2 мг/л 2,4-D + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара;
- 2) MS + 2 мг/л 2,4-D + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара;
- 3) В5 + 2 мг/л 2,4-D + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара;
- 4) MSm + 2 мг/л 2,4-D + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара.

2.4.5.2. Изучение влияния источника углеводов на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Влияние различных источников углеводов в культуре изолированных семязачатков изучали, выбрав для сравнения сахарозу и мальтозу в равных концентрациях. Вариант питательной среды с добавлением сахарозы (30 г/л), стандартно применяемой в связанных с культурой клеток и тканей растений исследованиях, рассматривали в качестве контроля. Изучали реакцию семязачатков кабачка (*C. pepo* L.) на добавление в индукционную питательную среду мальтозы (30 г/л), как показанного рядом исследований по культивированию растительного материала *in vitro* эффективного заменителя сахарозы (Orshinsky V.R. et al., 1990; Дьячук Т.И. и др., 2003). Опыт проводили на образцах кабачка (*C. pepo* L.) Анг S, F₁ Ангелина, S и S7 при использовании индукционной питательной среды СВМ (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А).

Варианты опыта:

- 1) СВМ + 2 мг/л 2,4-D + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара;
- 2) СВМ + 2 мг/л 2,4-D + 30 г/л мальтозы + 7 г/л агара.

2.4.5.3. Изучение влияния концентрации сахарозы на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

В целях изучения влияния разных концентраций сахарозы на индукцию эмбриогенеза и выход регенерантов использовали образцы кабачка (*C. pepo* L.) F₁ Арал, F₁ Отелло, F₁ Гарант. Семязачатки культивировали на индукционной питательной среде СВМ (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А).

В качестве контроля использовали вариант индукционной среды, содержащей 3% сахарозы, как показанный одним из лучших вариантов концентрации в большинстве проведенных исследований относительно индукции гиногенеза тыквенных культур. Также рядом исследований отмечено наличие отрицательной корреляции между увеличением концентрации сахарозы и степенью отзывчивости семязачатков на индукцию гиногенеза (Kwack S.N. et al., 1988; Shalaby T., 2007; Ермолаев А.С. и др., 2022).

Варианты опыта:

- 1) СВМ + 2 мг/л 2,4-D + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара;
- 2) СВМ + 2 мг/л 2,4-D + 40 г/л сахарозы + 7 г/л агара;
- 3) СВМ + 2 мг/л 2,4-D + 50 г/л сахарозы + 7 г/л агара;
- 4) СВМ + 2 мг/л 2,4-D + 60 г/л сахарозы + 7 г/л агара.

2.4.5.4. Изучение влияния желирующих агентов на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

На образцах кабачка (*C. pepo* L.) S, S7, Анг S, F₁ Ангелина, F₁ Марселла производили проверку эффективности использования различных типов желирующих агентов в составе индукционной питательной среды СВМ (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А). В качестве контрольного типа желирующего агента в составе индукционной питательной среды СВМ (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А) использовали агар, пользующийся наибольшей популярностью в связанных с культивированием растительных эксплантов исследованиях. В качестве перспективного источника для замены агара изучали фитогель (3 г/л) и его влияние на индукцию гиногенеза кабачка (*C. pepo* L.) и частоту прямого эмбриогенеза в культуре изолированных семязачатков.

Варианты опыта:

- 1) СВМ + 2 мг/л 2,4-D + 50 г/л сахарозы + 7 г/л агара;
- 2) СВМ + 2 мг/л 2,4-D + 50 г/л сахарозы + 3 г/л фитогеля.

2.4.5.5. Изучение влияния регуляторов роста на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Изучали влияние различных регуляторов роста в составе индукционных питательных сред на индукцию гиногенеза в культуре изолированных семязачатков. Сравнение характера воздействия ауксинов и цитокининов в составе индукционной питательной среды СВМ (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А) на индукцию гиногенеза у представителей растений рода *Cucurbita* L. проводили с использованием 5 образцов *C. pepo* L. (F₁ Ангелина, F₁ Марселла, Анг S, S7, S). Рядом исследований подтверждается эффективность использования в составе питательной среды ауксина 2,4-D (Шмыкова Н.А. и др., 2011; Домблидес Е.А. и др., 2016), выбранного в качестве контроля. Однако также отмечена эффективность применения цитокинина TDZ в технологии получения удвоенных гаплоидов представителей тыквенных культур (Min Z. et al., 2016; Majeed H. et al., 2023). Для эксперимента выбрали сравнение действия ауксина 2,4-D и цитокинина TDZ в составе питательной среды СВМ (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А) в оптимальных для растений рода *Cucurbita* L. концентрациях:

- 1) СВМ + 2 мг/л 2,4-D + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара;
- 2) СВМ + 0,2 мг/л TDZ + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара.

2.4.5.6. Изучение влияния аминокислотно-пептидного состава на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Выявляли эффект добавления в индукционную питательную среду СВМ (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А) различных комбинаций аминокислот и пептидов, используя образцы кабачка (*C. pepo* L.) F₁ Байкал, F₁ Арал, F₁ Отелло, F₁ Гарант и образцы тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) Ромашка:

- 1) СВМ, контроль без добавления аминокислот и пептидов;
- 2) СВМ + 800 мг/л глутамина + 100 мг/л серина + 30 г/л глутатиона;

3) СВМ + 100 мг/л пролина + 100 мг/л серина + 800 мг/л глутамина;
4) СВМ + 800 мг/л глутамина + 100 мг/л серина + 100 мг/л пролина + 30 мг/л глутатиона;

5) СВМ + 800 мг/л глутамина + 10 мг/л серина + 10 мг/л пролина + 9 мг/л глутатиона.

2.4.5.7. Изучение влияния гидролизата казеина на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Изучали эффективность применения гидролизата казеина (500 мг/л) в составе индукционной питательной среды СВМ (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А), как источника усвоения белков и свободных аминокислот, на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков. Опыт проводили, используя образцы кабачка (*C. pepo* L.) F₁ Байкал, F₁ Балхаш, F₁ Марселла F₁ Арал, F₁ Отелло, F₁ Гарант, образцы тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) F₁ Орэнж Колон, Т-110-13-2, Т-110-2(11)1, образцы тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) Ц-20-5, Ромашка и F₁ Хавана. Стандартный вариант индукционной питательной среды СВМ (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А) подразумевает отсутствие гидролизата казеина в составе.

Варианты опыта:

1) СВМ + 2 мг/л 2,4-D + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара;
2) СВМ + 2 мг/л 2,4-D + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара + 500 мг/л гидролизата казеина.

2.4.5.8. Изучение влияния маннитола на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Влияние добавления в питательную среду СВМ (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А) маннитола, как вещества-инициатора осмотического стресса, на индукцию гиногенеза изучали с использованием образцов кабачка (*C. pepo* L.) F₁ Байкал, F₁ Балхаш, F₁ Марселла F₁ Арал, F₁ Отелло, F₁ Гарант и образца тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) Т-110-2(11)1. Отсутствие маннитола в составе индукционной питательной среды рассматривали в качестве контроля.

Варианты опыта:

- 1) СВМ + 2 мг/л 2,4-D + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара;
- 2) СВМ + 2 мг/л 2,4-D + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара + 50 мг/л

маннитола.

2.4.5.9. Изучение влияния пантотената кальция на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Согласно протоколу питательной среды СВМ (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А) 0,5 мг/л пантотената кальция входит в состав витаминного стока. Однако результаты, получаемые различными исследователями при культивировании растительных клеток и тканей *in vitro*, носят противоречивый характер (Ромаданова Н.В. и др., 2017; Тустубаева Ш.Т. и др., 2018). В качестве контроля в опыте рассматривали индукционную среду СВМ (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А) без добавления пантотената кальция. Изучали эффективность присутствия пантотената кальция в составе индукционной среды СВМ с использованием образцов кабачка (*C. pepo* L.) F₁ Байкал, F₁ Балхаш, F₁ Марселла F₁ Арал, F₁ Отелло, F₁ Гарант и образцов тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) Т-110-2(11)1, Т-110-2(11)3.

- 1) СВМ + 2 мг/л 2,4-D + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара;
- 2) СВМ + 2 мг/л 2,4-D + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара + 0,5 мг/л Са

пантотената.

2.4.6. Анализ уровня плоидности

Плоидность растений-регенерантов устанавливали прямым подсчетом числа хромосом в клетках меристем корня при помощи методики "Steam Drop". Для ее реализации у растений-регенерантов отбирали кончики корня, помещали их в фиксирующий раствор 96%-ного этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1. Пробирки с отобранными корнями на сутки оставляли в холодильной камере. Затем растительный материал промывали под водопроводной водой в течение 15 минут, на предметном стекле при помощи скальпеля отделяли меристемы и помещали их в 30 мкл раствора смеси ферментов и оставляли на 1 ч 20 мин на водяной бане при температуре 37°C. Далее пробирки с меристемами многократно встряхивали для их измельчения. В

полученный раствор добавляли 600 мкл дистиллированной воды, перемешивали и центрифугировали в течение 45 секунд при 10000 rpm, после чего удаляли надосадочную жидкость. В пробирку добавляли 600 мкл чистого этанола, перемешивали и повторно центрифугировали в течение 30 секунд при 11000 rpm, снова удаляя надосадочную жидкость. Затем готовили суспензию клеток, добавляя в пробирки 20-100 мкл чистого этанола, 10 мкл помещали на предметное стекло для дальнейшей работы, а оставшуюся часть суспензии хранили в морозильной камере. Спустя несколько секунд, необходимых для подсыхания спирта и появления на поверхности менисков клеток, после помещения капли суспензии на предметное стекло добавляли каплю фиксирующего раствора и оставляли на несколько секунд. Когда слой фиксатора, подсыхая, утончался, предметное стекло размещали над паром водяной бани при температуре 55°C в течение 3-5 секунд стеклом вниз. Затем высушенные препараты окрашивали при помощи красителя Гимза (4%-ный раствор, 20 минут), промывали в дистиллированной воде и оставляли готовые препараты сушиться под вытяжкой (Пухальский В.А., 2007; Kirov I. et al., 2014).

Далее для подсчета числа хромосом препараты подвергали исследованию при помощи микроскопа Carl Zeiss Axio Lab A1 при увеличении $\times 40$. Для установления уровня ploидности подсчет числа хромосом производили в 5 делящихся клетках для каждого из изучаемых образцов.

2.4.7. Оценка потомства от самоопыления для выявления гомо- и гетерозигот

Для идентификации принадлежности генотипов растений-регенерантов, полученных от культивирования эксплантов образцов F₁-гибридов, к гомо- или гетерозиготам использовали морфологический анализ потомства от самоопыления регенерантов и сравнение с родительскими формами.

В год адаптации растений к условиям внешней среды производили самоопыление и получение семян. В следующий сезон семена, полученные от самоопыления регенерантов, и семена родительских форм высевали на опытных участках.

Оценку проводили по расщеплению в фенотипе потомства по основным морфологическим признакам, включая окраску плодов. Линии, имеющие расщепление в потомстве, являются потомством от самоопыления клонов исходного донорного растения. Однородные линии без расщепления по фенотипическим характеристикам, обладающие рецессивными признаками, имеют гаплоидную природу. Также обращали внимание на степень проявляемой инбредной депрессии.

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

2.5.1. Реализация межвидовой гибридизации

Отдаленную гибридизацию между видами *C. maxima* и *C. moschata* проводили с целью передачи признака «женский тип цветения» от идентифицированного при оценке гибрида F₁ Т (*C. moschata* Duch.) гиноцийного растения, в геном тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.). В качестве компонентов скрещивания, относящихся к *C. maxima*, использовали гибрид F₁ ОК и селекционную линию Т-110.

Для преодоления репродуктивных барьеров применяли опыление в бутонах за сутки до раскрытия цветка и биотехнологическую методику *embryo rescue*.

Производили следующие комбинации скрещиваний:

- 1) ♀ *C. maxima* (F₁ ОК) × ♂ *C. moschata* (F₁ Т);
- 2) ♀ *C. moschata* (F₁ Т) × ♂ *C. maxima* (Т-110).

2.5.2. Спасение зародышей

Технологию «*embryo rescue*» осуществляли с использованием протокола спасения зародышей растений рода *Cucurbita* L. при межвидовой гибридизации (Rakha M.T. et al., 2012). Сбор незрелых плодов проводили в возрасте 14 суток после опыления.

Стерилизацию завязей и извлечение недозревших семян реализовали по аналогии с методикой индукции гиногенеза. Экспланты помещали на питательную среду MS, дополненную 20 г/л сахарозы, 8 г/л агары, 0,1 мг/л Kin + 0,01 мг/л IBA (Rakha M.T. et al., 2012).

В качестве контроля оставляли на растении по одной опыленной завязи на комбинацию.

2.5.3. Культивирование родительских форм и межвидовых гибридов и оценка гибридных растений

Посев семян производили в рассадной теплице в середине мая в горшки с торфяным субстратом объемом 0,5 л. Через три недели растения пересаживали в грунтовую пленочную теплицу.

Спустя месяц после посева семян с образованием как минимум трех полноценных узлов начали проводить учет половых признаков цветков.

Для изучения характера наследования женского типа цветения было получено и высажено потомство F₂ Т (*C. moschata* Duch.).

С целью уточнения видовой принадлежности полученных гибридов в конце июля были посеяны семена и в конце августа высажены в грунт пленочной теплицы растения родительских компонентов скрещиваний для сравнения их морфологических признаков с фенотипами гибридов.

Схема посадки растений в теплице 120×60 см, в открытом грунте 140×50 см. В течение периода вегетации растений производили подкормки азофоской из расчета 30 г на растение.

На двух межвидовых гибридах проводили обработку нитратом серебра (0,7 г/л) точек роста в районе 9 и 13 узлов с целью получения мужских цветков для использования в дальнейшей селекции. Жизнеспособность пыльцы гибридных растений исследовали при помощи окрашивания ее ацетокармином с использованием микроскопа Carl Zeiss Axio LAB A1 (×10).

3. Результаты

3.1. Получение удвоенных гаплоидов представителей *Cucurbita* L.

Сбор завязей производили утром за сутки до начала цветения. На рисунке 1 изображены донорное растение и завязь представителей трех культурных видов *Cucurbita* L. – тыквы твердокорой (кабачок) (*C. pepo* L.), тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) и тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.).

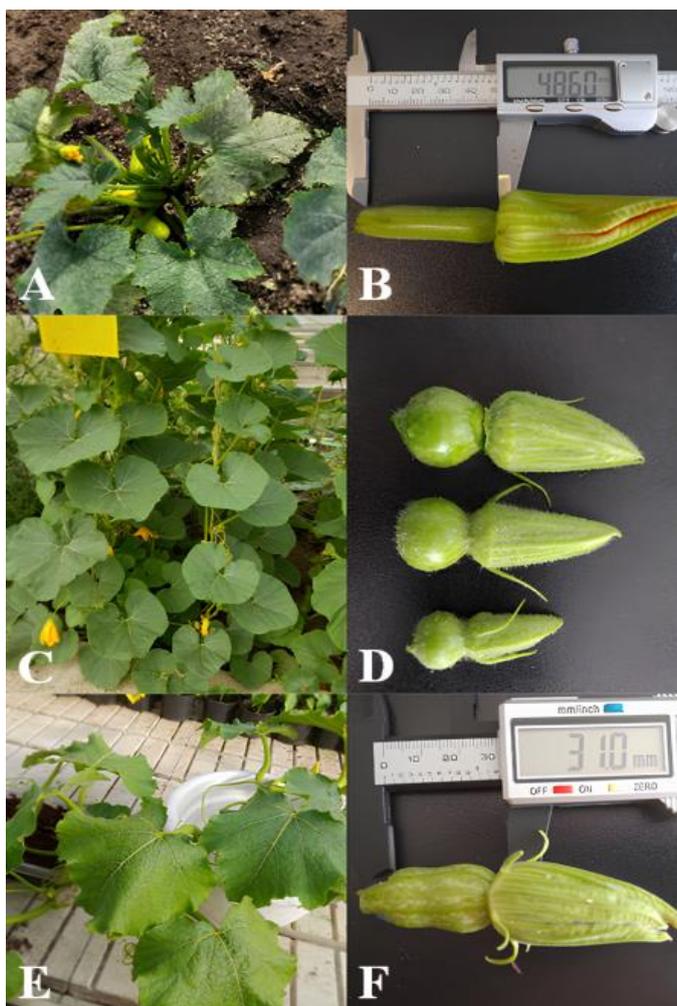


Рисунок 1 – Растение и завязь представителей рода *Cucurbita* L.: А, В – *C. pepo* L.; С, D – *C. maxima* Duch.; Е, F – *C. moschata* Duch.

Для оценки влияния внешних факторов на индукцию гиногенеза проводили подсчет образовавшихся структур на разных вариантах опыта с учетом двух показателей – частота индукции гиногенеза (подсчет образованных при помощи прямого эмбриогенеза и каллусогенеза структур) и частота прямого эмбриогенеза. У эксплантов тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) наблюдали интенсивное

каллусообразование, однако не удалось осуществить индукцию эмбриогенеза ни у одного из изученных образцов.

На рисунке 2 изображены развивающиеся экспланты представителей рода растений *Cucurbita* L. в разных стадиях развития.

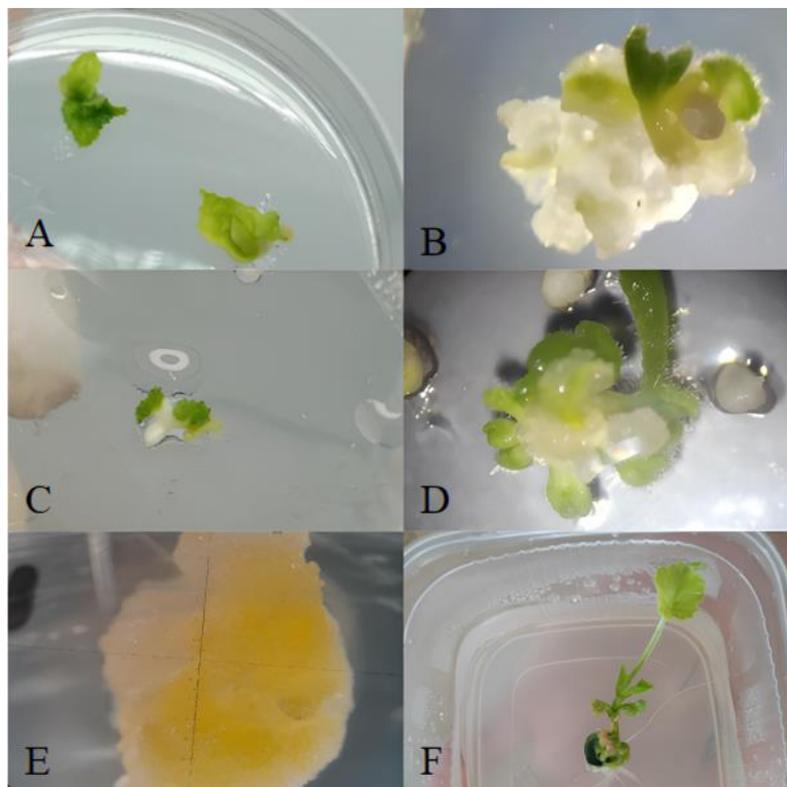


Рисунок 2 – Развитие эксплантов представителей рода *Cucurbita* L. в культуре *in vitro*: А – прямой эмбриогенез *C. pepo* L.; В – непрямой эмбриогенез *C. pepo* L.; С – прямой эмбриогенез *C. maxima* Duch.; D – непрямой эмбриогенез *C. maxima* Duch.; Е – каллусогенез *C. moschata* Duch.; F – пересаженное в контейнер растение-регенерант *C. pepo* L.

Растения-регенеранты с хорошо развитой корневой системой адаптировали к условиям внешней среды в возрасте 1-2 настоящих листьев. На рисунке 3 изображены растения-регенеранты представителей рода *Cucurbita* L. в процессе их адаптации к условиям внешней среды.



Рисунок 3 – Адаптация растений-регенерантов к условиям внешней среды: А – готовое к адаптации растение-регенерант *C. maxima* Duch.; В – растения-регенеранты *C. pepo* L. в горшках с торфом, накрытые пластиковыми контейнерами; С – акклиматизированное растение-регенерант *C. pepo* L.

На основе полученных экспериментальных данных проведен одно- и двухфакторный дисперсионный анализ для установления влияния изучаемых факторов на частоту индукции гиногенеза в пределах вида. Один из факторов в исследовании – генотип донорного растения (фактор А). В качестве второго фактора рассматривали каждый из внешних воздействий в виде температурных режимов предобработки завязей и обработки эксплантов, светового режима во время термической обработки, типа экспланта, компонентов питательной среды (фактор В). Для изучения характера воздействия фактора на индукцию гиногенеза в пределах конкретных генотипов применяли попарное сравнение вариантов опытов, в средних значениях которых были выявлены существенные различия с контролем на 5%-ном уровне значимости, с контрольным вариантом с

использованием t-критерия Стьюдента. Результаты представлены в таблицах со средними количествами образовавшихся структур (шт./ч.Петри) на каждом из вариантов опытов.

3.1.1. Изучение влияния температурной предобработки завязей на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Режимы предварительной обработки завязей изучали с использованием 7 образцов *C. pepo* L. и 3 образцов *C. moschata* Duch. В таблице 1 представлены средние частоты индукции гиногенеза и прямого эмбриогенеза (шт./ч.Петри) в зависимости от режима предварительной обработки.

Таблица 1 – Частота индукции гиногенеза в зависимости от режима предварительной обработки завязей, шт./ч.Петри

Генотип		Частота индукции гиногенеза*			Частота прямого эмбриогенеза*		
		– (контроль)	32°C 2 сут	4°C 2 сут	– (контроль)	32°C 2 сут	4°C 2 сут
Кабачок (<i>C. pepo</i> L.)	F ₁ Байкал	7,9a	6,0b	5,8b	0,7a	1,5b	1,3a
	F ₁ Балхаш	9,1a	8,0b	8,4b	1,0a	1,8b	1,6b
	F ₁ Марселла	6,8a	8,3b	8,2b	0,9a	1,9b	1,1a
	F ₁ Арал	3,0a	2,5a	5,7b	0,3a	2,0b	1,2b
	F ₁ Гарант	5,5a	5,5a	8,7a	0,5a	0,8a	0,5a
	F ₁ Отелло	6,0a	3,5b	9,2b	1,2a	1,3a	0,3b
	N19ДРр-5хД48	4,0a	3,0b	3,7a	1,8a	1,7a	2,0a
	Средняя по варианту (x _j)	6,5	5,6	7,2	0,9	1,6	1,2
	НСР ₀₅ А	1,3			0,6		
	НСР ₀₅ В	0,7			0,3		
	НСР ₀₅ АВ	2,7			1,4		
Т. мускатная (<i>C. moschata</i> Duch.)	Ромашка	4,9a	2,0b	3,6	–		
	F ₁ Тиана	3,2a	1,4b	2,7			
	F ₁ Хавана	3,4a	1,1b	2,9			
	Средняя по варианту (x _j)	3,8	1,5	2,9			
		НСР ₀₅ А	–				
	НСР ₀₅ В	1,0					
	НСР ₀₅ АВ	–					

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

В результате анализа установлено существенное влияние режимов предварительной температурной обработки завязей на частоту индукции гиногенеза и прямого эмбриогенеза в культуре изолированных семязачатков кабачка (*C. pepo* L.). При использовании предварительной обработки завязей повышенными температурами (32°C) в течение 2 суток у 4 из 7 образцов наблюдали снижение частоты формирования гиногенных структур (от 1,1 до 1,7 раза у образцов F₁ Балхаш и F₁ Отелло соответственно), тогда как у 2 из 7 образцов частота индукции гиногенеза оставалась на уровне контроля, а у образца F₁ Марселла – увеличивалась в 1,2 раза. Частота прямого эмбриогенеза при использовании данного режима у 3 из 7 образцов оставалась на уровне контроля, а у 4 из 7 образцов наблюдали увеличение данного показателя от 1,8 до 6,7 раза у образцов F₁ Балхаш и F₁ Арал соответственно. При воздействии на завязи пониженными температурами (4°C) в течение 2 суток у 2 из 7 образцов кабачка (*C. pepo* L.) наблюдали отсутствие реакции, у 3 из 7 образцов – увеличение частоты индукции гиногенеза от 1,2 до 1,9 раза, а у образцов F₁ Балхаш и F₁ Байкал – снижение данного показателя в 1,1 и 1,4 раза соответственно. Частота прямого эмбриогенеза при использовании данного режима предварительной обработки завязей у 4 из 7 образцов оставалась на уровне контроля, у образцов F₁ Арал и F₁ Балхаш наблюдали увеличение данного показателя в 4 и 1,6 раза соответственно, а у образца F₁ Отелло частота прямого эмбриогенеза снизилась в 4 раза.

У тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) не выявлено существенных различий в частоте индукции гиногенеза при использовании холодной (4°C) предобработки завязей по сравнению с контролем, однако установлено негативное влияние тепловой (32°C) предварительной обработки на формирование гиногенных структур. При этом у 3 из 3 образцов наблюдали существенное снижение частоты индукции гиногенеза (от 2,3 раза у образца F₁ Тиана до 3,1 раза у образца F₁ Хавана).

На рисунке 4 изображены развивающиеся семязачатки *C. pepo* L. после применения различных режимов предварительной термической обработки завязей.

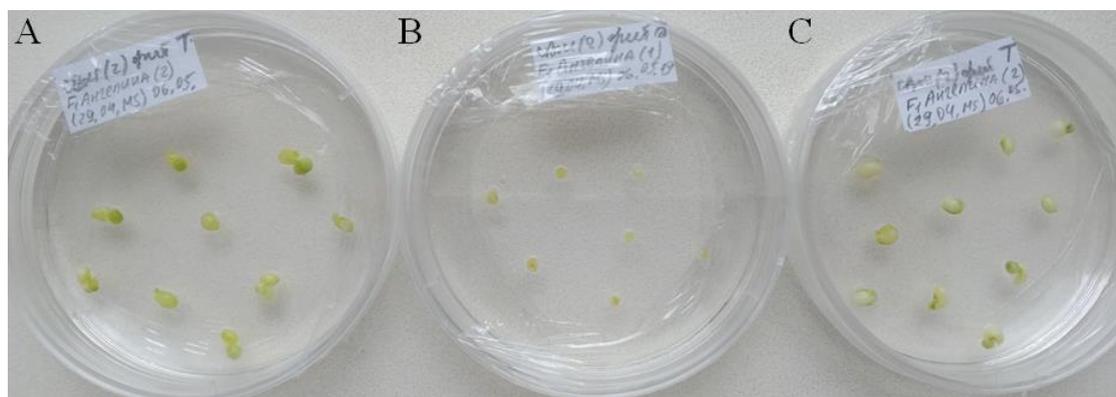


Рисунок 4 – Развитие изолированных семязачатков *C. pepo* L. при использовании различных режимов предварительной термической обработки завязей: А – отсутствие предобработки; В – 32°C, 2 суток; С – 4°C, 2 суток

Применение тепловой (32°C) предобработки завязей в течение 2 суток замедляло дальнейший рост эксплантов в культуре *in vitro*, тогда как при использовании холодной (4°C) предобработки завязей развитие семязачатков происходило интенсивнее.

3.1.2. Изучение влияния температурного режима обработки культивируемых эксплантов на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Для установления влияния режима температурной обработки эксплантов на частоту индукции гиногенеза использовали 10 образцов *C. pepo* L. и 2 образца *C. moschata* Duch. В таблице 2 представлены средние частоты индукции гиногенеза и прямого эмбриогенеза (шт./ч.Петри) в зависимости от режима обработки эксплантов.

Таблица 2 – Частота индукции гиногенеза в зависимости от режима температурной обработки эксплантов, шт./ч.Петри

Генотип		Частота индукции гиногенеза*					Частота прямого эмбриогенеза*				
		– (контроль)	32°С 2 сут	32°С 4 сут	4°С 2 сут	4°С 4 сут	– (контроль)	32°С 2 сут	32°С 4 сут	4°С 2 сут	4°С 4 сут
Кабачок (<i>C. pepo</i> L.)	F ₁ Байкал	6,3a	8,1b	4,5b	8,3b	4,4b	1,2a	1,0	1,0	0,9a	0,5b
	F ₁ Балхаш	5,5a	6,0a	3,0b	0,0b	6,1a	1,6a	1,1	0,5	0,0b	1,4a
	F ₁ Марселла	6,9a	8,6b	7,0a	4,5b	5,8b	1,0a	0,7	0,7	0,7a	0,7a
	F ₁ Арал	3,0a	1,5b	3,3a	2,5a	2,3a	0,3a	0,5	1,0	1,0b	1,5b
	F ₁ Гарант	6,5a	2,5b	3,7b	5,0a	2,8b	0,5a	0,7	1,3	1,3b	0,7a
	F ₁ Отелло	5,0a	6,3a	5,3a	5,2a	7,0b	1,2a	1,8	1,5	1,3a	1,5a
	F ₁ Ангелина	6,7a	3,3b	3,7b	2,7b	1,7b	1,5a	1,3	2,2	1,2a	0,2b
	Анг S	6,0a	3,3b	5,3a	2,0b	2,2b	2,0a	1,0	2,7	0,3b	0,7b
	S7	1,7a	2,3a	3,8b	1,7a	1,2a	0,3a	1,5	1,5	1,0b	0,3a
	S	5,2a	2,3b	1,8b	1,3b	0,8b	2,7a	0,7	1,5	0,5b	0,3b
	Средняя по варианту (x _j)	5,4	4,7	4,2	3,4	3,6	1,2	1,0	1,3	0,8	0,8
	НСР ₀₅ A	1,2					0,6				
	НСР ₀₅ B	0,7					0,4				
	НСР ₀₅ AB	2,9					1,4				
Т. мускатная (<i>C.</i> <i>moschata</i> Duch.)	Ромашка	5,9a	5,2	6,2a	1,7b	4,2b	–				
	F ₁ Тиана	2,7a	1,1	5,3b	2,0a	0,2b					
	Средняя по варианту (x _j)	4,1	3,4	5,8	1,8	2,2					
	НСР ₀₅ A	0,7									
	НСР ₀₅ B	1,7									
	НСР ₀₅ AB	2,7									

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

В ходе анализа данных выявлено значимое снижение частоты индукции гиногенеза кабачка (*C. pepo* L.) при использовании различных режимов температурной обработки эксплантов по сравнению с контролем. При применении тепловой обработки (32°C) в течение 2 суток у 5 из 10 образцов кабачка (*C. pepo* L.) наблюдали существенное снижение частоты образования гиногенных структур (от 1,8 до 2,6 раза у образцов Анг S и F₁ Гарант соответственно). Частота индукции гиногенеза у 3 из 10 образцов оставалась на уровне контроля, тогда как у образцов F₁ Байкал и F₁ Марселла наблюдали увеличение показателя в 1,3 и 1,2 раза соответственно. При увеличении воздействия на экспланты повышенными температурами (32°C) до 4 суток у 5 из 10 образцов кабачка (*C. pepo* L.) наблюдали снижение частоты индукции гиногенеза от 1,4 до 2,9 раза (у образцов F₁ Байкал и S). При этом у 4 из 10 образцов наблюдали отсутствие реакции эксплантов на увеличение экспозиции температурной обработки, а у образца S7 наблюдали увеличение частоты индукции гиногенеза в 2,2 раза. Варианты тепловой обработки семязачатков не оказали существенного влияния на частоту прямого эмбриогенеза. При воздействии на экспланты пониженными температурами (4°C) в течение 2 суток у 5 из 10 образцов кабачка (*C. pepo* L.) наблюдали значимое снижение частоты индукции гиногенеза до 4 раз (у образца S), тогда как у 4 из 10 образцов число сформировавшихся гиногенных структур оставалось на уровне контроля, а у образца F₁ Байкал – увеличилось в 1,3 раза. Частота прямого эмбриогенеза при использовании данного режима у 4 из 10 образцов кабачка (*C. pepo* L.) оставалась на уровне контроля, у 3 из 10 образцов наблюдали существенное снижение (до 6,7 раза у образца Анг S), а у 3 из 10 образцов – увеличение данного показателя до 3,3 раза. При увеличении воздействия на экспланты пониженными температурами (4°C) до 4 суток у 6 из 10 образцов кабачка (*C. pepo* L.) наблюдали существенное снижение частоты индукции гиногенеза (от 1,2 до 6,5 раза у образцов F₁ Марселла S). У 3 из 10 образцов наблюдали отсутствие реакции эксплантов на увеличение экспозиции термической обработки (4°C), тогда как у образца F₁ Отелло частота образования гиногенных структур увеличилась в 1,4 раза. Частота прямого

эмбриогенеза при использовании данного режима температурной обработки у 5 из 10 образцов кабачка (*C. pepo* L.) оставалась на уровне контроля, тогда как у 4 из 10 образцов наблюдали снижение (от 2,4 до 9 раз у образцов F₁ Байкал и S соответственно), а у образца F₁ Арал – увеличение данного показателя в 5 раз.

У тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) установлено отсутствие значимой реакции эксплантов на режим тепловой (32°C) обработки в течение 2 суток. У образца Ромашка также наблюдали отсутствие реакции эксплантов на использование режимов обработки повышенными температурами (32°C) в течение 4 суток, однако при температурной обработке при 4°C в течение 2 и 4 суток наблюдали снижение частоты формирования гиногенных структур в 3,5 и 1,4 раза соответственно. У образца F₁ Тиана выявлено отсутствие реакции эксплантов на воздействие пониженными (4°C) температурами в течение 2 суток. При увеличении экспозиции термической обработки при 32°C до 4 суток наблюдали существенное увеличение частоты индукции гиногенеза в 2 раза, а при увеличении экспозиции термической обработки при 4°C до 4 суток – существенное снижение частоты образования гиногенных структур в 13,5 раза.

3.1.3. Изучение влияния светового режима культивирования эксплантов во время термической обработки на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Для определения характера воздействия режима освещенности во время термической обработки на индукцию гиногенеза использовали 5 образцов *C. pepo* L., 2 образца *C. maxima* Duch. и 2 образца *C. moschata* Duch. В таблице 3 представлены средние частоты индукции гиногенеза и прямого эмбриогенеза (шт./ч.Петри) в зависимости от режима освещенности во время термической обработки эксплантов в культуре изолированных семязачатков.

Таблица 3 – Частота индукции гиногенеза в зависимости от режимов освещенности во время термической обработки, шт./ч.Петри

Генотип		Частота индукции гиногенеза*		Частота прямого эмбриогенеза*	
		16-часовой фотопериод	– (контроль)	16-часовой фотопериод	– (контроль)
Кабачок (<i>C. pepo</i> L.)	F ₁ Байкал	7,7b	6,3a	1,9b	1,1a
	F ₁ Балхаш	7,9b	6,4a	1,9b	0,9a
	F ₁ Арал	4,0b	2,7a	1,0a	1,3a
	F ₁ Гарант	8,2b	5,7a	1,2b	0,2a
	F ₁ Отелло	7,8a	7,3a	1,8b	0,5a
	Средняя по варианту (x _j)	7,3	5,8	1,6	0,8
	НСР ₀₅ A НСР ₀₅ B НСР ₀₅ AB	1,2 0,5 –		0,8 0,4 –	
Т. крупноплодная (<i>C. maxima</i> Duch.)	T110(11)(11)	4,7b	7,0a	1,0b	2,3a
	T110-2(11)6	5,2a	6,2a	1,3b	2,5a
	Средняя по варианту (x _j)	4,9	6,6	1,2	2,4
	НСР ₀₅ A НСР ₀₅ B НСР ₀₅ AB	– 1,2 –		– 0,7 –	
Т. мускатная (<i>C. moschata</i> Duch.)	Ромашка	5,2	4,6	–	
	Ц-20-5	1,4	1,2		

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

В результате анализа данных выявлено значимое влияние светового режима термической обработки на частоту образования гиногенных структур кабачка (*C. pepo* L.). При этом наблюдали существенное увеличение частоты индукции гиногенеза (до 1,5 раза у F₁ Арал) у 4 из 5 образцов в условиях проведения термической обработки при наличии 16-часового фотопериода. У 4 из 5 образцов также наблюдали увеличение частоты прямого эмбриогенеза от 1,7 до 6 раз.

Реакция эксплантов тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) на изменение режима освещенности оказалась противоположной. Частота индукции гиногенеза при наличии 16-часового фотопериода у образца T110-2(11)6 оставалась на уровне контроля, тогда как данный показатель у образца T110(11)(11) снизился в

1,5 раза. Также условия 16-часового периода во время термической обработки привели к снижению частоты прямого эмбриогенеза у образцов T110-2(11)6 и T110(11)(11) в 1,9 и 2,3 раза соответственно.

У образцов тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) не выявлено статистически значимых различий в частоте образования гиногенных структур в условиях темновой культуры и применения 16-часового фотопериода.

На рисунке 5 изображены развивающиеся изолированные семязачатки кабачка (*C. pepo* L.) после использования различных режимов освещенности во время термической обработки.

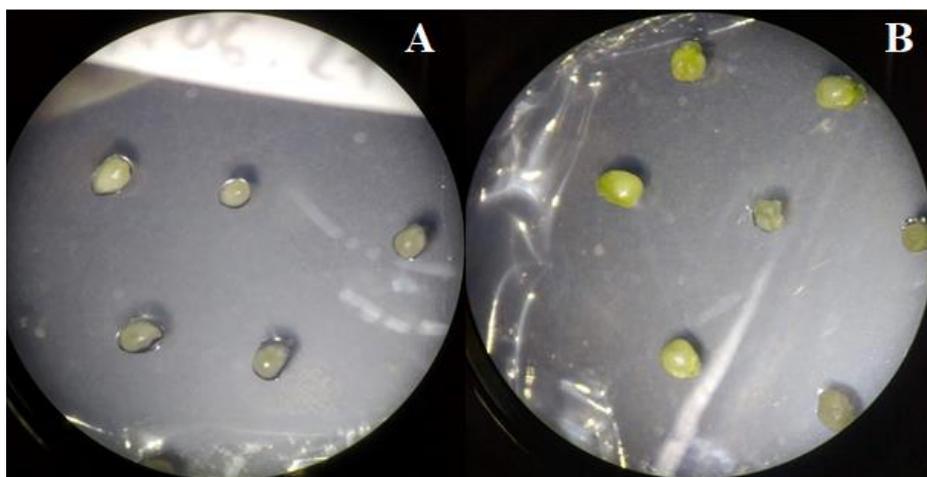


Рисунок 5 – Развитие изолированных семязачатков *C. pepo* L. при различных условиях освещенности во время термической обработки: А – при отсутствии освещения; В – при наличии 16-часового фотопериода

При проведении тепловой обработки эксплантов в условиях темновой культуры в течение 4 суток семязачатки кабачка (*C. pepo* L.) развиваются медленнее, выглядят менее жизнеспособными, чем при наличии 16-часового фотопериода.

3.1.4. Изучение влияния типа экспланта на частоту индукции гиногенеза в культуре *in vitro*

Для определения влияния типа экспланта на индукцию гиногенеза использовали 6 образцов *C. pepo* L. В качестве повторности рассматривали завязь. В таблице 4 представлены средние частоты индукции гиногенеза и прямого эмбриогенеза (шт./ч.Петри).

Таблица 4 – Частота индукции гиногенеза в зависимости от типа экспланта, шт./ч.Петри

Генотип	Частота индукции гиногенеза*			Частота прямого эмбриогенеза*		
	Изолированные семязачатки (контроль)	Фрагменты завязи	Мацерированные сегменты	Изолированные семязачатки (контроль)	Фрагменты завязи	Мацерированные сегменты
F ₁ Байкал	83,8a	14,4b	72,2b	17,6a	2,6b	27,0b
F ₁ Балхаш	77,6a	18,2b	76,0a	16,8a	3,4b	29,2b
F ₁ Отелло	57,2a	10,4b	48,6b	15,8a	1,6b	18,6a
F ₁ Гарант	54,8a	11,4b	51,0a	9,6a	2,6b	17,4b
S7	29,8a	5,2b	30,0a	5,4a	1,0b	12,2b
N19ДРр- 5хД48	22,4a	2,8b	21,6a	7,6a	0,6b	6,6a
Средняя по варианту (x _j)	54,3	10,4	49,9	12,1	2,0	18,5
НСР ₀₅ А		6,9			5,1	
НСР ₀₅ В		3,9			2,9	
НСР ₀₅ АВ		14,8			10,8	

*Примечание – В качестве повторности рассматривали одну завязь; *Значения в строке, отмеченные буквой b, согласно t-критерию Стьюдента, имеют существенные различия с контролем (a) на 5%-ном уровне значимости.*

В результате проведенного анализа установлено, что использование варианта культивирования фрагментов завязи значительно снижает частоту индукции гиногенеза (от 4,3 раза у образца F₁ Балхаш до 8 раз у образца N19ДРр-5хД48), а также частоту прямого эмбриогенеза (от 3,7 раза у образца F₁ Гарант до 12,7 раза у образца N19ДРр-5хД48) по сравнению с культурой изолированных семязачатков. Культивирование фрагментов завязи привело к существенному снижению частоты индукции гиногенеза у всех изученных образцов кабачка (*C. pepo* L.).

Культивирование мацерированных сегментов не оказало влияния на частоту образования гиногенных структур у 4 из 6 образцов кабачка (*C. pepo* L.). У образцов F₁ Байкал и F₁ Отелло наблюдали достоверно меньшее по сравнению с контролем число сформировавшихся гиногенных структур (в 1,2 раза). Однако также выявлено значимое увеличение частоты индукции прямого эмбриогенеза у 4 из 6 образцов (от 1,5 до 2,3 раза). У образцов F₁ Отелло и N19ДРр-5хД48 не выявлено различий в степени индукции прямого эмбриогенеза при использовании изолированных семязачатков и мацерированных сегментов.

На рисунке 6 изображены экспланты разных типов – изолированные семязачатки, фрагменты завязи и мацерированные сегменты.

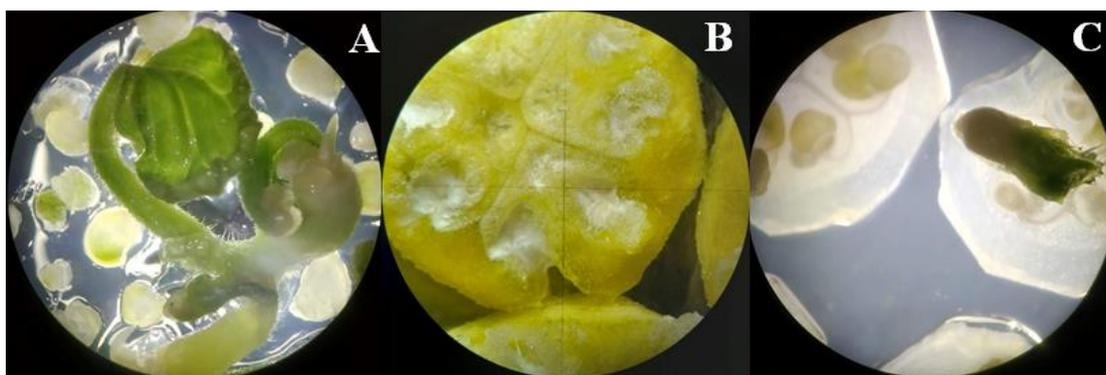


Рисунок 6 – Развитие эксплантов на питательной среде: А – изолированные семязачатки; В – фрагменты завязи; С – мацерированные сегменты

При использовании фрагментов завязи вследствие большого количества соматической ткани происходит интенсивное разрастание и каллусообразование, препятствующее развитию гиногенных структур. Использование в качестве экспланта мацерированных сегментов способствует увеличению частоты прямого

эмбриогенеза вследствие разрушения клеток ткани завязи и повреждения оболочки семязачатка.

3.1.5. Изучение влияния компонентов индукционной питательной среды на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

3.1.5.1. Изучение влияния типа индукционной питательной среды на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Для установления влияния типа питательной среды на индукцию гиногенеза использовали 7 образцов *C. pepo* L., 3 образца *C. maxima* Duch., 4 образца *C. moschata* Duch. В качестве контрольного типа питательной среды для культивирования семязачатков во время индукции гиногенеза использовали разработанную для тыквенных культур среду CBM (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А). Альтернативно изучали влияние типов питательных сред MS (Murashige T. et al., 1962; прил. А), B5 (Gamborg O.L. et al., 1968; прил. А) и MSm (Masuda K. et al., 1981; прил. А) на отзывчивость эксплантов в культуре изолированных семязачатков представителей рода *Cucurbita* L. В таблице 5 представлены средние частоты индукции гиногенеза и прямого эмбриогенеза (шт./ч.Петри) при использовании различных вариантов питательных сред.

Таблица 5 – Частота индукции гиногенеза в зависимости от типа индукционной питательной среды, шт./ч.Петри

Генотип		Частота индукции гиногенеза*				Частота прямого эмбриогенеза*			
		СВМ (контроль)	MS	B5	MSm	СВМ (контроль)	MS	B5	MSm
Кабачок (<i>C. pepo</i> L.)	F ₁ Байкал	6,0a	6,9	7,5b	6,0a	1,6a	1,3a	0,5b	0,6b
	F ₁ Балхаш	6,4a	6,4	9,4b	0,4b	0,8a	1,8b	0,2b	0,1b
	F ₁ Марселла	7,5a	6,7	9,2b	7,6a	1,5a	0,6b	1,2a	1,1a
	F ₁ Гарант	4,7a	5,2	6,7b	5,7a	0,5a	0,8a	1,5b	1,3b
	F ₁ Отелло	4,8a	6,2	6,8b	6,5b	2,0a	0,7b	0,7b	0,8b
	F ₁ Арал	5,8a	3,3	2,8b	6,3a	1,3a	1,2a	0,7b	1,3a
	S7	7,5a	6,8	5,3b	4,7b	2,2a	0,3b	1,3b	0,7b
	Средняя по варианту (x _j)	6,2	6,1	7,1	5,1	1,4	1,0	0,8	0,8
	НСР ₀₅ A	1,3				–			
НСР ₀₅ B	0,9				0,4				
НСР ₀₅ AB	3,2				1,3				
Т. крупноплодная (<i>C. maxima</i> Duch.)	F ₁ Свит Коб	6,9a	2,4b	7,0	6,3	1,5a	0,8	2,4b	0,9
	T110-2(11)1	4,5a	2,5b	1,3	2,4	1,2a	1,3	2,0b	1,3
	T-110-240	2,2a	2,4a	1,6	3,1	0,7a	0,6	1,3b	0,3
	Средняя по варианту (x _j)	4,5	2,4	3,6	3,9	1,1	0,8	1,9	0,8
	НСР ₀₅ A	0,8				0,5			
НСР ₀₅ B	1,0				0,6				
НСР ₀₅ AB	2,2				–				
Т. мускатная (<i>C. moschata</i> Duch.)	Ромашка	4,9a	2,7b	3,0b	5,5a	–			
	F ₁ Тиана	5,8a	0,9b	0,7b	0,9b				
	F ₁ Хавана	2,0a	0,6b	1,6a	0,4b				
	Ц-20-2016	5,5a	5,9a	4,7a	3,2b				
	Средняя по варианту (x _j)	4,6	2,5	2,5	2,6				
	НСР ₀₅ A	0,8							
НСР ₀₅ B	0,8								
НСР ₀₅ AB	1,9								

Примечание – В чашке Петри 10 семячатков; *Значения в строке, отмеченные буквой *b*, согласно *t*-критерию Стьюдента, имеют существенные различия с контролем (*a*) на 5%-ном уровне значимости.

В результате анализа не выявлено различий в частоте индукции гиногенеза при культивировании эксплантов кабачка (*C. pepo* L.) на индукционной среде MS по сравнению с контролем, однако отмечено существенное снижение частоты прямого эмбриогенеза у 3 из 7 образцов (до 7,3 раза у образца F₁ Арал) и увеличение данного показателя у 1 из 7 образцов (в 2,3 раза). Среда B5 оказала лучшее влияние на индукцию гиногенеза, чем контрольная среда CBM. При культивировании семязачатков на питательной среде B5 у 5 из 7 образцов наблюдали существенное увеличение частоты индукции гиногенеза (от 1,2 до 1,5 раза) при снижении данного показателя у 2 из 7 образцов. Также использование среды данного состава привело к снижению частоты прямого эмбриогенеза у 5 из 7 образцов (от 1,7 до 3,2 раза у F₁ Арал и F₁ Байкал соответственно), у 1 из 7 образцов наблюдали увеличение данного показателя в 3 раза. При использовании индукционной среды MSm наблюдали снижение частоты прямого эмбриогенеза наблюдали у 4 из 7 образцов кабачка (*C. pepo* L.) (от 2,5 до 8 раза у образцов F₁ Арал и F₁ Балхаш соответственно), у образца F₁ Гарант данный показатель увеличился в 2,6 раза. Частота индукции гиногенеза при использовании MSm оставалась на уровне контроля у 4 из 7 образцов, у 2 из 7 образцов наблюдали снижение (до 16 раз), а у 1 образца – увеличение данного показателя в 1,4 раза.

При культивировании семязачатков тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) на индукционных средах B5 и MSm не выявлено значимых различий в частоте индукции гиногенеза по сравнению с контролем. Также не выявлено существенных различий в частоте прямого эмбриогенеза при использовании MS и MSm по сравнению с контролем. Питательная среда B5 оказала положительное воздействие на частоту прямого эмбриогенеза у 3 из 3 образцов, существенно увеличив данный показатель (от 1,7 до 1,9 раза) соответственно.

Частота индукции гиногенеза у образцов тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) достоверно снижалась при использовании всех вариантов питательных сред по сравнению с контролем. Существенно меньшей частотой индукции гиногенеза обладали 3 из 4 изученных образцов на питательной среде MS (от 1,8 до 6,4 раза образцы Ромашка и F₁ Тиана соответственно), 2 из 4 – на питательной

среде B5 (от 1,6 до 8,3 раза у образцов Ромашка и F₁ Тиана соответственно), 3 из 4 – на питательной среде MSm (от 1,7 до 6,4 раза образцы Ц-20-2016 и F₁ Тиана соответственно).

3.1.5.2. Изучение влияния источника углеводов на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Для установления характера воздействия источника углеводов на индукцию гиногенеза использовали 4 образца *C. pepo* L. В таблице 6 представлены средние частоты формирования гиногенных структур и прямого эмбриогенеза (шт./ч.Петри) в зависимости от источника углеводов в составе индукционной питательной среды CBM (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А).

Таблица 6 – Частота индукции гиногенеза в зависимости от источника углеводов в составе индукционной питательной среды, шт./ч.Петри

Генотип		Частота индукции гиногенеза*		Частота прямого эмбриогенеза*	
		Сахароза (контроль)	Мальтоза	Сахароза (контроль)	Мальтоза
Кабачок (<i>C. pepo</i> L.)	F ₁ Ангелина	6,0a	0,7b	2,5a	0,3b
	Анг S	5,2a	2,3b	2,3a	1,0b
	S7	3,0a	1,8a	1,2a	0,8a
	S	3,2a	2,7a	1,5a	1,3a
	Средняя по варианту (x _j)	4,3	1,9	1,9	0,9
	НСП ₀₅ A НСП ₀₅ B НСП ₀₅ AB	– 1,3 –	– – –	– 0,6 –	– – –

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

В результате анализа данных установлен общий негативный эффект замены сахарозы на мальтозу. При этом у 2 из 4 образцов кабачка (*C. pepo* L.) выявлено отсутствие существенного изменения как частоты индукции гиногенеза, так и частоты прямого эмбриогенеза при замене сахарозы мальтозой. Однако у образцов F₁ Ангелина и Анг S наблюдали значительное снижение числа образованных гиногенных структур при культивировании на питательной среде с

добавлением мальтозы. Частота индукции гиногенеза и частота прямого эмбриогенеза у образца F₁ Ангелина сократились в 8,6 и 8,3 раза соответственно, а у образца Анг S данные показатели снизились в 2,3 раза.

3.1.5.3. Изучение влияния концентрации сахарозы на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Влияние изменения концентрации сахарозы в составе питательной среды на индукцию гиногенеза изучали с использованием 3 образцов *C. pepo* L. В таблице 7 представлены средние частоты формирования гиногенных структур и прямого эмбриогенеза (шт./ч.Петри) в зависимости от концентрации сахарозы в составе питательной среды.

Таблица 7 – Частота индукции гиногенеза в зависимости от концентрации сахарозы в составе индукционной питательной среды, шт./ч.Петри

Генотип		Частота индукции гиногенеза*				Частота прямого эмбриогенеза*			
		30 г/л (контроль)	40 г/л	50 г/л	60 г/л	30 г/л (контроль)	40 г/л	50 г/л	60 г/л
Кабачок (<i>C. pepo</i> L.)	F ₁ Арал	5,0a	4,3a	4,5	3,2b	0,8	1,3	0,7	0,3
	F ₁ Гарант	3,5a	7,8b	5,0	3,5a	1,0	1,7	1,2	1,2
	F ₁ Отелло	6,3a	8,3b	7,5	3,5b	1,7	1,5	1,5	0,8
	Средняя по варианту (x _j)	4,9	6,8	5,7	3,4	1,2	1,6	1,0	0,8
	НСР ₀₅ A	1,0				0,5			
	НСР ₀₅ B	1,3				0,6			
НСР ₀₅ AB	2,8				–				

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

В результате анализа данных у 2 из 3 образцов кабачка (*C. pepo* L.) выявлено существенное увеличение частоты индукции гиногенеза на питательной среде с 4%-ным содержанием сахарозы (в 2,2 и 1,3 раза у образцов F₁ Гарант и F₁ Отелло соответственно). У образца F₁ Арал число сформировавшихся структур на среде с 4%-ной концентрацией сахарозы оставалось на уровне контроля. Культивирование семязачатков на питательной среде с 50 г/л сахарозы существенно не отличалось от контроля. Использование индукционной среды с 6% сахарозы в составе привело к снижению частоты индукции гиногенеза у 2 из 3

образцов (в 1,6 и 1,8 раза у образцов F₁ Арал и F₁ Отелло соответственно). Таким образом, 4%-ная концентрация сахарозы повышает частоту образования гиногенных структур кабачка (*C. pepo* L.). При дальнейшем увеличении концентрации сахарозы частота индукции гиногенеза постепенно снижается. Дисперсионным анализом не выявлено существенных различий в частоте прямого эмбриогенеза 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.

3.1.5.4. Изучение влияния желирующих агентов на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Изучение альтернативных желирующих агентов в составе питательной среды проводили с использованием 5 образцов *C. pepo* L. В таблице 8 представлены средние частоты индукции гиногенеза и прямого эмбриогенеза (шт./ч.Петри) в зависимости от желирующего агента в составе питательной среды.

Таблица 8 – Частота индукции гиногенеза в зависимости от желирующего агента в составе индукционной питательной среды, шт./ч.Петри

Генотип		Частота индукции гиногенеза*		Частота прямого эмбриогенеза*	
		Агар (контроль)	Фитогель	Агар (контроль)	Фитогель
Кабачок (<i>C. pepo</i> L.)	F ₁ Ангелина	5,8a	3,8b	1,7a	3,0b
	F ₁ Марселла	2,8a	3,0a	1,0a	2,2b
	Анг S	7,2a	5,2b	2,2a	3,3b
	S7	5,3a	4,0b	1,7a	2,0a
	S	5,3a	3,7b	1,2a	3,0b
	Средняя по варианту (x _i)	5,3	3,9	1,5	2,7
HCP ₀₅ A		1,3		1,0	
HCP ₀₅ B		0,5		0,5	
HCP ₀₅ AB		—		—	

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

Результаты, представленные в таблице 8, указывают на неоднозначность действия фитогеля в культуре изолированных семязачатков кабачка (*C. pepo* L.). В результате анализа полученных данных выявлено снижение частоты индукции гиногенеза у 4 из 5 образцов (от 1,3 до 1,5 раза у образцов S7 и F₁ Ангелина соответственно) на индукционной среде с добавлением фитогеля. Однако у 4 из 5 образцов наблюдали существенное увеличение частоты прямого эмбриогенеза (от 1,5 до 2,5 раз у образцов Анг S и S соответственно) при замене агара (7 г/л) фитогелем (3,5 г/л).

На рисунке 7 изображены изолированные семязачатки кабачка (*C. pepo* L.) на питательной среде с добавлением различных желирующих агентов.

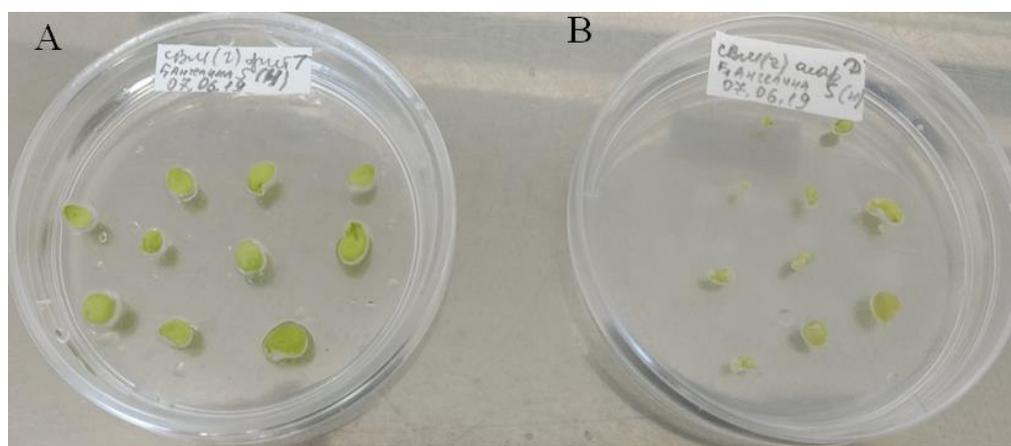


Рисунок 7 – Развитие изолированных семязачатков *C. pepo* L. при использовании различных желирующих агентов: А – фитогель; В – агар

На индукционной среде с добавлением агара в первые недели культивирования развитие эксплантов происходит заметно медленнее, чем на среде с добавлением фитогеля. Несмотря на то, что число образовавшихся гиногенных структур выше при использовании агара, добавление в среды в качестве желирующего агента фитогеля приводит к увеличению частоты прямого эмбриогенеза.

3.1.5.5. Изучение влияния регуляторов роста на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Сравнение характера воздействия ауксинов и цитокининов в составе индукционной питательной среды СВМ (Gemes-Juhász A. et al., 2002; прил. А) на индукцию гиногенеза у представителей растений рода *Cucurbita* L. проводили с

использованием 5 образцов *C. pepo* L. В таблице 9 представлены средние частоты индукции гиногенеза и прямого эмбриогенеза (шт./ч.Петри) в зависимости от регулятора роста в составе питательной среды.

Таблица 9 – Частота индукции гиногенеза в зависимости от регулятора роста в составе индукционной питательной среды, шт./ч.Петри

Генотип		Частота индукции гиногенеза*		Частота прямого эмбриогенеза*	
		2,4-D (контроль)	TDZ	2,4-D (контроль)	TDZ
Кабачок (<i>C. pepo</i> L.)	F ₁ Ангелина	6,3a	2,3b	2,3a	0,7b
	F ₁ Марселла	1,7a	0,5b	1,3a	0,2b
	Анг S	5,2a	4,5a	2,0a	2,0a
	S7	3,3a	0,7b	1,7a	0,3b
	S	3,2a	2,2a	1,5a	0,7b
	Средняя по варианту (x _j)	3,9	2,0	1,8	0,8
	НСП ₀₅ A НСП ₀₅ B НСП ₀₅ AB	2,3 1,0 –		1,0 0,4 –	

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

В результате анализа полученных данных показано преимущество использования в составе индукционной питательной среды 2,4-D по сравнению с TDZ. При этом выявлено снижение частоты индукции гиногенеза у 4 из 5 образцов кабачка (*C. pepo* L.) (от 2,7 до 4,7 раза у образцов F₁ Ангелина и S7 соответственно) при культивировании на индукционной среде с добавлением тидиазурана. Частота прямого эмбриогенеза также существенно снизилась у 4 из 5 образцов (от 2,1 до 6,5 раз у образцов S и F₁ Марселла соответственно) при использовании питательных сред, содержащих цитокинин.

На рисунке 8 изображены развивающиеся изолированные семязачатки *C. pepo* L. при использовании различных регуляторов роста.

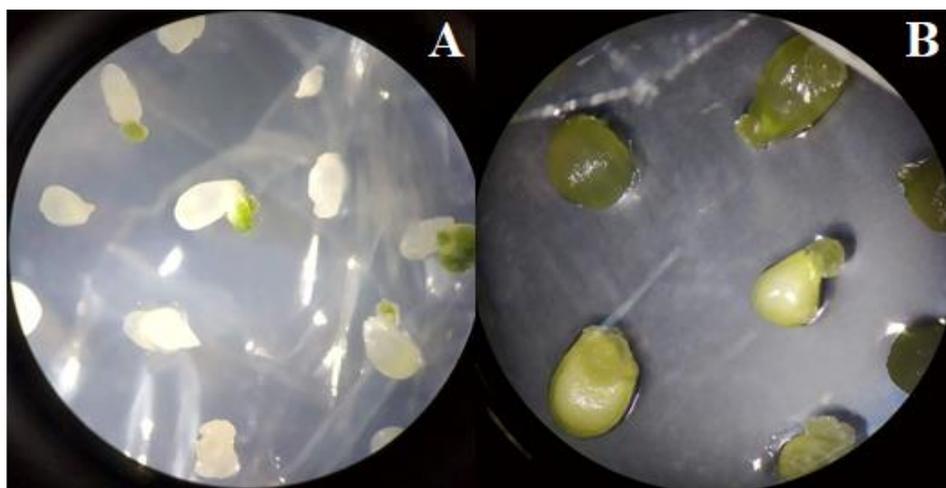


Рисунок 8 – Развитие изолированных семязачатков *C. pepo* L. при использовании различных регуляторов роста: А – TDZ (0,2 мг/л); В – 2,4-D (2 мг/л)

При добавлении в индукционную среду тидиазурона (0,2 мг/л) рост и развитие семязачатков менее интенсивны, чем при добавлении в среды 2,4-D (2 мг/л).

3.1.5.6. Изучение влияния аминокислотно-пептидного состава на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Для изучения влияния различных аминокислотно-пептидных комплексов в составе индукционной питательной среды использовали 4 образца *C. pepo* L. В таблице 10 представлены средние частоты формирования гиногенных структур и прямого эмбриогенеза (шт./ч.Петри) в зависимости от комплекса аминокислот в составе питательной среды. Изученные аминокислотно-пептидные составы: контроль без добавления аминокислот (1), 800 мг/л глутамина + 100 мг/л серина + 30 г/л глутатиона (2), 100 мг/л пролина + 100 мг/л серина + 800 мг/л глутамина (3), 800 мг/л глутамина + 100 мг/л серина + 100 мг/ пролина + 30 мг/л глутатиона (4), СВМ + 800 мг/л глутамина + 10 мг/л серина + 10 мг/л пролина + 9 мг/л глутатиона (5).

Таблица 10 – Частота индукции гиногенеза в зависимости от комплекса аминокислот в составе индукционной питательной среды, шт./ч.Петри

Генотип		Частота формирования гиногенных структур*					Частота прямого эмбриогенеза*				
		1 (контроль)	2	3	4	5	1 (контроль)	2	3	4	5
Кабачок (<i>C. pepo</i> L.)	F ₁ Байкал	6,1	8,2	7,4	7,0	9,1	0,6	0,6	0,8	0,3	0,2
	F ₁ Арал	5,3	3,5	2,3	1,8	2,5	1,2	0,5	0,8	1,0	0,7
	F ₁ Гарант	6,2	4,7	7,3	6,5	4,7	1,2	1,2	0,5	0,5	1,3
	F ₁ Отелло	5,5	3,0	5,2	4,8	4,2	1,5	1,2	1,2	1,2	1,2
Т. мускат- ная (<i>C.</i> <i>moschata</i> Duch.)	Ромашка	4,9	5,5	5,3	4,0	3,0	–				

*Примечание – В чашке Петри 10 семязачатков.

Согласно результатам дисперсионного анализа, проведенного на основе полученных в ходе эксперимента данных, добавление комплексов аминокислот и пептидов в индукционную питательную среду не оказало статистически значимого влияния на частоту индукции гиногенеза кабачка (*C. pepo* L.) и тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.), а также на частоту прямого эмбриогенеза кабачка (*C. pepo* L.).

3.1.5.7. Изучение влияния гидролизата казеина на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Для проведения эксперимента использовали 6 образцов *C. pepo* L., 3 образца *C. maxima* Duch., 3 образца *C. moschata* Duch. В таблице 11 представлены средние частоты образования гиногенных структур и прямого эмбриогенеза (шт./ч.Петри) в зависимости от наличия гидролизата казеина в составе индукционной питательной среды.

Таблица 11 – Частота индукции гиногенеза в зависимости от наличия гидролизата казеина в составе индукционной питательной среды, шт./ч.Петри

Генотип		Частота индукции гиногенеза*		Частота прямого эмбриогенеза*	
		– (контроль)	Гидролизат казеина	– (контроль)	Гидролизат казеина
Кабачок (<i>C. pepo</i> L.)	F ₁ Байкал	6,3a	8,0b	1,0a	1,2a
	F ₁ Балхаш	6,5a	7,6b	1,5a	2,2b
	F ₁ Марселла	8,4a	9,1b	0,7a	1,5b
	F ₁ Арал	2,2a	3,5b	0,7a	0,8a
	F ₁ Гарант	3,5a	8,0b	0,7a	1,5b
	F ₁ Отелло	4,2a	5,7b	1,2a	2,3b
	Средняя по варианту (x _j)	5,6	7,3	1,0	1,6
	НСР ₀₅ A	1,1		0,7	
	НСР ₀₅ B	0,4		0,3	
	НСР ₀₅ AB	1,8		–	
Т. крупноплодная (<i>C. maxima</i> Duch.)	F ₁ Орэнж Колон	5,6a	7,4b	1,8a	3,0b
	T-110-13-2	6,0a	5,9a	1,6a	2,6b
	T-110-2(11)1	4,5a	6,7b	1,2a	2,5b
	Средняя по варианту (x _j)	5,5	6,7	1,6	2,8
		НСР ₀₅ A	–		–
	НСР ₀₅ B	1,1		0,5	
	НСР ₀₅ AB	–		–	
Т. мускатная (<i>C. moschata</i> Duch.)	Ромашка	7,0a	8,6b	–	
	F ₁ Хавана	1,6a	4,0b		
	Ц-20-5	1,1a	0,9a		
	Средняя по варианту (x _j)	3,4	4,2		
		НСР ₀₅ A	1,0		
	НСР ₀₅ B	0,7			
	НСР ₀₅ AB	1,8			

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

В результате анализа полученных данных установлено значимое увеличение частоты индукции гиногенеза у всех образцов кабачка (*C. pepo* L.) (от 1,1 до 2,3 раза) при добавлении 500 мг/л гидролизата казеина в состав индукционной среды. У 4 из 6 образцов также наблюдали существенное увеличение частоты прямого эмбриогенеза (от 1,5 до 2,1 раза), тогда как у 2 из 6 образцов данный показатель находился в пределах контрольной отметки.

У образцов тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) F₁ Орэнж Колон и Т-110-2(11)1 на питательной среде с добавлением гидролизата казеина происходило значимое увеличение частоты индукции гиногенеза (в 1,3 и 1,5 раза соответственно) и частоты прямого эмбриогенеза (в 1,7 и 2,1 раза соответственно). Число индукции гиногенеза у образца Т-110-13-2 оставалось на уровне контроля, а частота прямого эмбриогенеза увеличивалась в 1,6 раза при добавлении в индукционные среды гидролизата казеина.

У 2 из 3 образцов тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) наблюдали существенное увеличение числа образовавшихся гиногенных структур при добавлении гидролизата казеина (в 1,2 и 2,4 раза у образцов Ромашка и F₁ Хавана соответственно). Данный показатель у образца Ц-20-5 не отличался от контрольного уровня.

На рисунке 9 изображены развивающиеся изолированные семязачатки *C. maxima* Duch. при наличии и отсутствии гидролизата казеина в составе индукционной питательной среды.

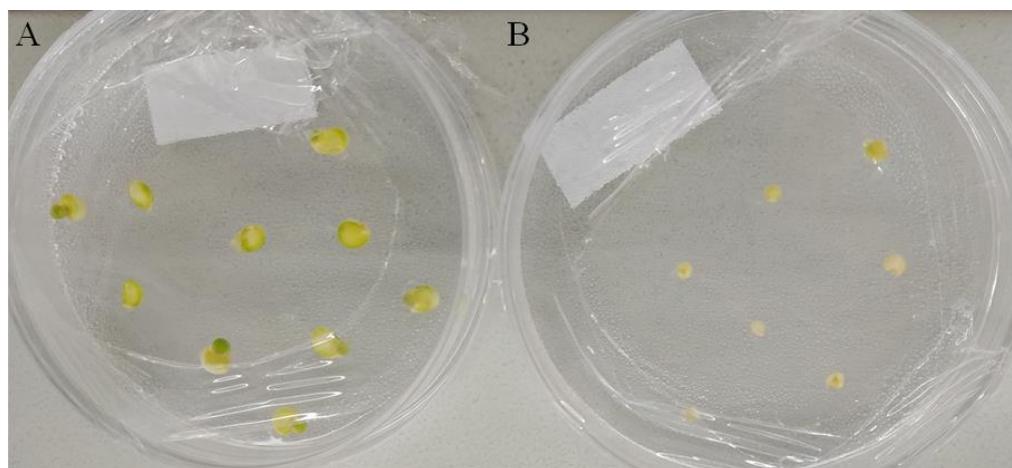


Рисунок 9 – Развитие изолированных семязачатков *C. maxima* Duch. в зависимости от наличия гидролизата казеина в составе питательной среды: А – СВМ + 500 мг/л гидролизата казеина; В – СВМ

При добавлении в индукционную среду 500 мг/л гидролизата казеина рост и развитие семязачатков происходит более активно, чем на питательной среде без добавления гидролизата казеина.

3.1.5.8. Изучение влияния маннитола на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачтков

Влияние добавления в питательную среду CBM (Gemes-Juhasz A. et al., 2002; прил. А) маннитола, как вещества-инициатора осмотического стресса, на индукцию гиногенеза изучали с использованием 6 образцов *C. pepo* L. В таблице 12 представлены средние частоты индукции гиногенеза и прямого эмбриогенеза (шт./ч.Петри) в зависимости от наличия маннитола в составе индукционной питательной среды.

Таблица 12 – Частота индукции гиногенеза в зависимости от наличия маннитола в составе индукционной питательной среды, шт./ч.Петри

Генотип		Частота индукции гиногенеза*		Частота прямого эмбриогенеза*	
		– (контроль)	Маннитол	– (контроль)	Маннитол
Кабачок (<i>C. pepo</i> L.)	F ₁ Байкал	6,3a	3,9b	1,0a	0,3b
	F ₁ Балхаш	6,5a	4,4b	1,5a	0,9b
	F ₁ Марселла	8,4a	5,3b	0,7a	1,6b
	F ₁ Арал	2,2a	0,8b	0,7a	1,8b
	F ₁ Гарант	3,5a	5,5b	0,7a	1,3b
	F ₁ Отелло	4,2a	4,2a	1,2a	1,3a
	Средняя по варианту (x _j)	5,6	4,1	1,0	1,2
		НСР ₀₅ A	1,3		0,4
	НСР ₀₅ B	0,5		0,6	
	НСР ₀₅ AB	2,1		0,1	
Т. крупноплодная (<i>C. maxima</i> Duch.)	T110-2(11)1	4,5	2,7	1,2	0,3
	НСР ₀₅	1,7		0,8	

Примечание – В чашке Петри 10 семязачтков; *Значения в строке, отмеченные буквой b, согласно t-критерию Стьюдента, имеют существенные различия с контролем (a) на 5%-ном уровне значимости.

Результаты анализа указывают на разнонаправленность оказываемого на экспланты кабачка (*C. pepo* L.) воздействия маннитола. У 4 из 6 образцов наблюдали снижение частоты индукции гиногенеза (от 1,5 до 2,8 раза у образцов F₁ Балхаш и F₁ Арал соответственно), тогда как отзывчивость 1 из 6 образцов оставалась на уровне контроля, а частота индукции гиногенеза образца F₁ Гарант возросла в 1,6 раза. У 2 из 6 образцов при добавлении маннитола

существенно снизилась частота прямого эмбриогенеза (в 1,7 и 3,3 раза у образцов F₁ Балхаш и F₁ Байкал), а у 3 из 6 образцов, наоборот, возросла (от 1,9 до 2,6 раза).

У линии тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) на питательной среде, дополненной маннитолом, выявлено достоверное снижение частоты индукции гиногенеза в 1,7 раза и снижение частоты прямого эмбриогенеза в 4 раза.

3.1.5.9. Изучение влияния пантотената кальция на частоту индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков

Эксперимент проводили с использованием 6 образцов *C. pepo* L. и 2 образцов *C. maxima* Duch. В таблице 13 представлены средние частоты индукции гиногенеза и прямого эмбриогенеза (шт./ч.Петри) в зависимости от наличия пантотената кальция в составе индукционной питательной среды.

Таблица 13 – 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 НСР ₀₅ B НСР ₀₅ AB	1,3 0,5 2,1		– 0,3 –	
Т. крупноплодная (<i>C. maxima</i> Duch.)	T110-2(11)1	4,5	5,3	1,7a	0,5b
	T-110-2(11)3	7,7	6,2	1,5a	0,2b
	Средняя по варианту (x _j)			1,6	0,3
	НСР ₀₅ A НСР ₀₅ B НСР ₀₅ AB	–		– 0,6 –	

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

В ходе анализа полученных данных выявлено значимое снижение частоты индукции гиногенеза у 4 из 6 образцов кабачка (*C. pepo* L.) (от 1,6 до 1,9 раза) при культивировании на индукционной среде с добавлением пантотената кальция. Частота индукции гиногенеза у образца F₁ Арал оставалась на уровне контроля, тогда как у образца F₁ Гарант данный показатель увеличился в 2,1 раза. У 3 из 6 образцов также наблюдали снижение частоты прямого эмбриогенеза (от 2,1 раза у образца F₁ Балхаш до 3,3 раза у образца F₁ Байкал) при условии наличия пантотената кальция в составе среды. Частота прямого эмбриогенеза других образцов соответствовала контрольным значениям.

Дисперсионный анализ данных не выявил наличия статистически значимых различий в частоте индукции гиногенеза тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) на питательных средах, содержащих и не содержащих пантотенат кальция. Однако установлено достоверное снижение частоты прямого эмбриогенеза у всех образцов (в 3,4 и 7,5 раза у образцов T110-2(11)1 и T-110-2(11)3 соответственно) на питательной среде с добавлением пантотената кальция.

На рисунке 10 изображены развивающиеся изолированные семязачатки *C. pepo* L. при наличии и отсутствии пантотената кальция в составе индукционной питательной среде.

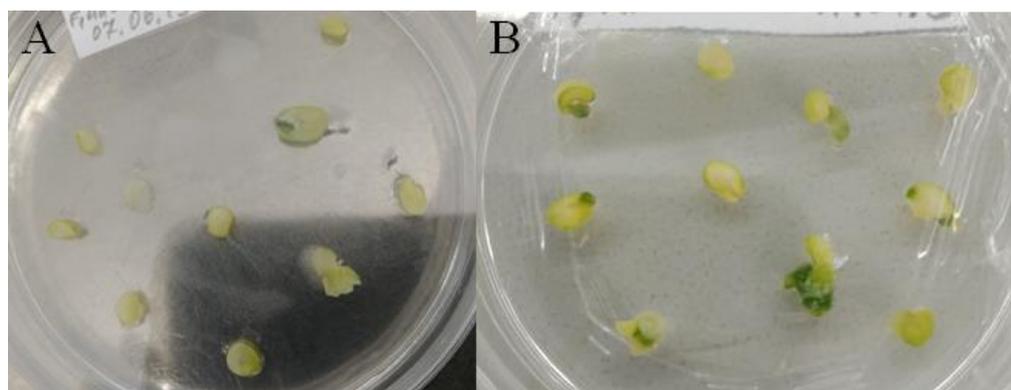


Рисунок 10 – Развитие изолированных семязачатков *C. pepo* L. в зависимости от наличия пантотената кальция в составе питательной среды: А – СВМ + 0,5 мг/л пантотената кальция; В – СВМ

При добавлении в среды 0,5 мг/л пантотената кальция рост семязачатков происходит медленнее, семязачатки выглядят менее развитыми по сравнению с семязачатками, культивируемыми на среде без пантотената кальция.

3.1.6. Изучение генотипспецифической реакции в культуре изолированных семязачатков

Для оценки влияния фактора генотипа на отзывчивость эксплантов в культуре изолированных семязачатков использовали однофакторный дисперсионный анализ данных, полученных от культивирования на контрольных вариантах опытов. В таблице 14 представлены средние частоты индукции гиногенеза (шт./ч.Петри) у представителей рода – *C. pepo* L., *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch.

В результате проведенного анализа установлено, что генотип донорного растения влияет на отзывчивость изолированных семязачатков у представителей всех изученных видов. Приведенные в таблице данные указывают на различия реакции эксплантов на культивирование в условиях *in vitro*. Доля влияния фактора генотипа на частоту формирования гиногенных структур составила 73%, 75% и 69% для *C. pepo* L., *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch. соответственно.

Таким образом, все образцы растений были условно разделены на группы:

– *C. pepo* L.: неотзывчивые (Др-4, Др-8 и S6), низкоотзывчивые (S7, S и N19ДРр-5хД48), отзывчивые (F₁ Отелло, F₁ Гарант, F₁ Арал, F₁ Ангелина, F₁ Байкал и F₁ Балхаш) и высокоотзывчивые (Анг S и F₁ Марселла);

– *C. maxima* Duch.: неотзывчивые (Т-110-12, К-182 и К-183), низкоотзывчивые (Т-110-8, Т-110-240, Т-110-243), отзывчивые (Т-110-2(11)1, F₁ Свит Коб, F₁ Орэнж Колон, Т-110-13-2, Т-110(11)(11), Т-110-2(11)6) и высокоотзывчивые (Т-110-13-1, Т-110-13-3, Т-110-2(11)3);

– *C. moschata* Duch.: низкоотзывчивые (F₁ Хавана, Ц-20-5) и отзывчивые (Ромашка, F₁ Тиана, Ц-20-2016).

Таблица 14 – Частота индукции гиногенеза образцов растений рода *Cucurbita* L., шт./ч.Петри

Кабачок (<i>C. pepo</i> L.)		Т. крупноплодная (<i>C. maxima</i> Duch.)		Т. мускатная (<i>C. moschata</i> Duch.)	
Генотип	Частота формирования гиногенных структур	Генотип	Частота формирования гиногенных структур	Генотип	Частота формирования гиногенных структур
F ₁ Байкал	6,3	F ₁ Орэнж колон	5,8	Ромашка	6,5
F ₁ Балхаш	6,4	F ₁ Свит Коб	5,2	F ₁ Тиана	5,8
F ₁ Марселла	7,5	Т-110-240	2,2	F ₁ Хавана	1,9
F ₁ Арал	5,8	Т-110-243	2,4	Ц-20-2016	5,5
F ₁ Гарант	5,3	Т-110-8	1,6	Ц-20-5	1,1
F ₁ Отелло	4,8	Т-110-12	0,9	НСР ₀₅	2,1
S7	3,0	Т-110-13-1	7,1		
Анг S	7,2	Т-110-13-2	6,0		
F ₁ Ангелина	6,0	Т-110-13-3	7,3		
S	3,2	Т-110-2(11)1	4,5		
N19ДРр-5хД48	3,3	Т-110-2(11)3	7,7		
S6	0,3	Т-110-2(11)6	6,2		
Др-4	0,1	Т-110(11)(11)	6,3		
Др-8	0,5	К-182	0,8		
НСР ₀₅	2,9	К-183	0,7		
–		НСР ₀₅	2,5		

Примечание – в чашке Петри 10 семязачатков

3.2. Оценка растений-регенерантов

При культивировании эксплантов в условиях *in vitro* наблюдали проблемы регенерации, коррелирующие с генотипом и условиями выращивания донорных растений. Данный вопрос необходимо изучить отдельно. В дальнейшем также происходили сложности адаптации, большинство растений погибали при помещении в условия внешней среды вследствие поражения грибковыми заболеваниями, заражения торфа вредителями и т.д., не достигнув стадии, во время которой возможно произвести анализ уровня ploидности.

У тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) не образовалось ни одного регенеранта, из эксплантов на питательных средах формировалась только каллусная ткань. У тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) частота формирования эмбриоидов в целом была ниже, чем у кабачка (*C. pepo* L.). Регенерировавшие растения тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) оценивали по потомству от самоопыления.

3.2.1. Анализ уровня ploидности

Подсчет числа хромосом в меристемах корня оказался неэффективным применительно к растениям, культивируемым на питательной среде в условиях *in vitro*.

Хромосомы представителей рода *Cucurbita* L. отличаются мелким размером, что создает трудности при их подсчете. На рисунке 11 изображены хромосомы растительных организмов, различающихся по уровню ploидности.

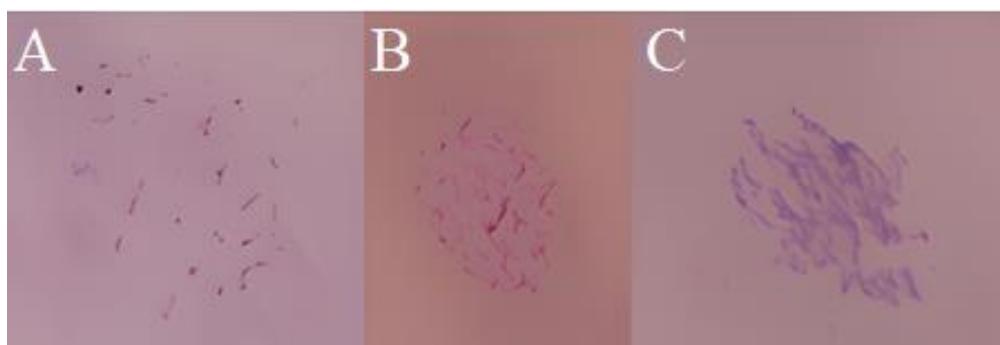


Рисунок 11 – Хромосомы представителей рода *Cucurbita* L. с различным уровнем ploидности: А – гаплоид; В – диплоид; С – тетраплоид

Большинство изученных растений были диплоидными (70%), наблюдали небольшой процент гаплоидов (10%) и тетраплоидов (20%).

3.2.2. Морфологическая оценка потомства от самоопыления регенерантов

Большинство растений, особенно имеющих гаплоидное число хромосом, погибли при адаптации. Однако часть регенерантов были успешно адаптированы и подвергнуты самоопылению. Некоторые растения отличались слабой степенью завязываемости плодов и семян.

Суть метода состоит в оценке потомства, полученного от самоопыления растений-регенерантов, по морфологическим признакам. Если в потомстве наблюдается расщепление по фенотипическим характеристикам, растение-регенерант имело гетерозиготный геном.

На рисунке 12 изображены плоды потомства растений-регенерантов *C. pepo* L. от самоопыления.



Рисунок 12 – Плоды потомства растений-регенерантов *C. pepo* L. от самоопыления: А, В – плоды М 1, различающиеся по окраске; С – плоды Анг 1, различающиеся по окраске

У потомства от самоопыления большинства изученных растений кабачка (*C. pepo* L.) наблюдали расщепление по морфологическим признакам.

На рисунке 13 изображены растения потомства от самоопыления регенерантов *C. maxima* Duch.



Рисунок 13 – Растения потомства от самоопыления регенерантов *C. maxima* Duch.: А – растение с преимущественно женским типом цветения; В – растение с преимущественно мужским типом цветения

У регенерантов тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) потомство четко расщепилось на популяции по типу цветения – часть растений с преимущественно женским, часть с преимущественно мужским типом.

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

3.3.1. Спасение зародышей

Отдаленную гибридизацию проводили с целью передачи признака женского типа цветения от идентифицированного растения F₁ Т (*C. moschata* Duch.) в геном тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.). На рисунке 14 изображено идентифицированное при оценке растений F₁ Т, обладающее женским типом цветения.



Рисунок 14 – Растение F₁ T, обладающее женским типом цветения

В первых 7 узлах идентифицированного растения не образуются цветки. Начиная с 8 узла все образующиеся цветки – женские.

При реализации отдаленной гибридизации между видами *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch. использовали методику спасения незрелых зародышей с целью предотвращения летальности, вызванной репродуктивными барьерами. Однако на всех сроках развития завязи в недозревших плодах наблюдали либо полное отсутствие образовавшихся семян, либо по 1-4 недоразвитых семени на плод. При извлечении таких семян из плодов отмечено отсутствие зародышей в большей части из них.

На рисунке 15 изображена завязь *C. moschata* Duch., опыленная пылью *C. maxima* Duch., в возрасте 14 суток после опыления.



Рисунок 15 – Изолированная завязь *C. moschata* Duch., опыленная пылью *C. maxima* Duch. (14 суток после опыления)

В качестве контроля оставляли на растении по одной опыленной завязи на комбинацию. На рисунке 16 изображена опыленная пылью *C. maxima* Duch. завязь *C. moschata* Duch., оставленная на растении в качестве контроля.



Рисунок 16 – Завязь *C. moschata* Duch. на растении, опыленная пылью *C. maxima* Duch. (21 сутки после опыления)

На рисунке 17 изображены плоды, полученные в скрещиваниях *C. moschata* Duch. и *C. maxima* Duch., в разрезе.



Рисунок 17 – Плоды, полученные в скрещиваниях *C. moschata* Duch. и *C. maxima* Duch., в разрезе: А – плод *C. moschata* Duch. от опыления пылью *C. maxima* Duch., характеризующийся полным отсутствием семян; В – плод *C. maxima* Duch. от опыления пылью *C. moschata* Duch.

На рисунке видно полное отсутствие семенной камеры в плоде *C. moschata* Duch. от опыления пылью *C. maxima* Duch. В плоде *C. maxima* Duch. от опыления пылью *C. moschata* Duch. присутствует некоторое количество жизнеспособных семян.

На рисунке 18 изображены развивающиеся из эксплантов гибридные проростки *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch.

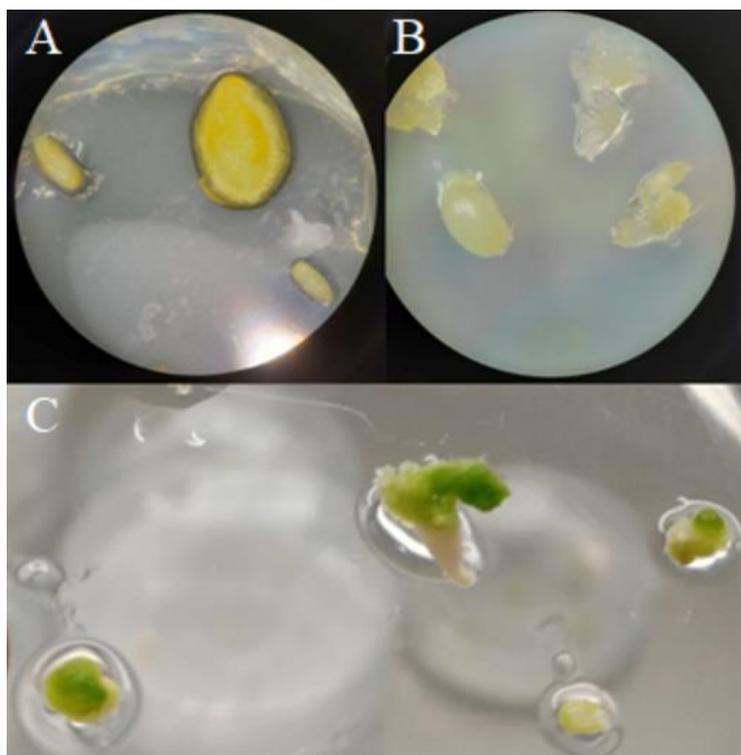


Рисунок 18 – Развивающиеся гибридные растения из тычиночек на питательной среде: А – инкубированные на питательной среде экспланты; В – экспланты, образующие каллусную ткань; С – гибридный проросток

Возникла сложность идентификации гибридного зародыша, вследствие чего на питательные среды помещали тычиночки, предварительно производя небольшие надрезы на их оболочке.

3.3.2. Получение межвидовых гибридов

В результате межвидовой гибридизации видов *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch. были получены жизнеспособные гибридные растения.

На рисунке 19 изображены родительские компоненты *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch., используемые в межвидовых скрещиваниях, и гибридные растения.



Рисунок 19 – Родительские компоненты и гибридные растения от межвидовых скрещиваний: А – ♀ F₁ ОК (*C. maxima* Duch.); В – ♂ F₁ Т (*C. moschata* Duch.); С, D – гибридные растения, полученные от скрещивания ♀ *C. maxima* Duch. × ♂ *C. moschata* Duch.

От скрещивания ♀ *C. maxima* Duch. (F₁ ОК) × ♂ *C. moschata* Duch. (F₁ Т) получили два гибридных растения.

На рисунке 20 изображены родительские компоненты и гибридные растения, полученные от скрещиваний *C. moschata* Duch. и *C. maxima* Duch., обладающие признаками обоих родительских видов.

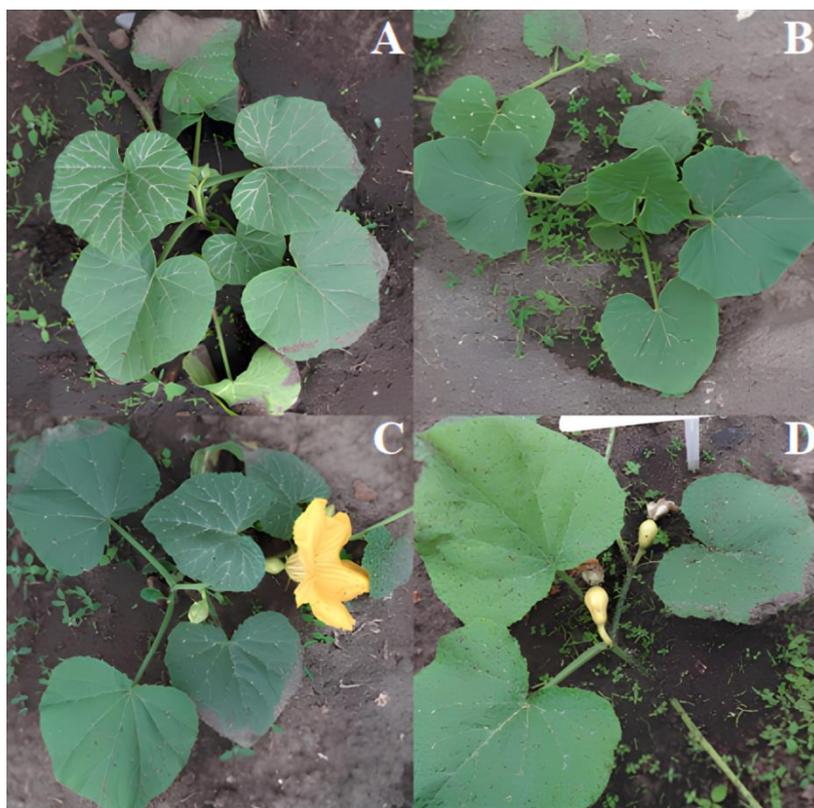


Рисунок 20 – Родительские компоненты и гибридные растения от скрещивания *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch.: А – ♀ F₁ Т (*C. moschata* Duch.); В – ♂ Т-110 (*C. maxima* Duch.); С, D – гибридные растения, полученные от скрещивания ♀ *C. moschata* Duch. × ♂ *C. maxima* Duch.

От скрещивания ♀ *C. moschata* Duch. (F₁ Т) × ♂ *C. maxima* Duch. (Т-110) получили девять гибридных растений.

Также можно сделать вывод о том, что использование в качестве материнского компонента скрещивания тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.) повышает частоту образования жизнеспособных семян.

3.3.3. Морфологические признаки межвидовых гибридов

Для идентификации видовой принадлежности полученных растений проводили сравнительную оценку родительских форм с гибридными по основным видовым морфологическим признакам. Сравнительные характеристики видов и гибридов представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Сравнительная характеристика родительских форм и полученных гибридов по видовым морфологическим признакам

Генотип	Номер растения	Признаки					
		Форма стебля	Окраска стебля	Форма листовой пластинки	Величина листовой пластинки	Пятнистость листовой пластинки	Плодоножка
<i>C. maxima</i> Duch. (F ₁ ОК)		Округло-граненый	Светло-зеленая	Сердцевидная	Средняя	–	Цилиндрическая
<i>C. moschata</i> Duch. (F ₁ T)		Округло-граненый	Светло-зеленая	Пятиугольная	Крупная	Средняя	Граненая
<i>C. maxima</i> Duch. (T-110)		Цилиндрический	Светло-зеленая	Сердцевидная	Крупная	–	Цилиндрическая
♀ <i>C. maxima</i> Duch. (F ₁ ОК) × ♂ <i>C. moschata</i> Duch.	1	Цилиндрический	Светло-зеленая	Почковидная	Средняя	Слабая	Граненая
	2	Округло-граненый	Желто-оранжевая	Пятиугольная	Очень крупная	Слабая	Граненая
♀ <i>C. moschata</i> Duch. × ♂ <i>C. maxima</i> Duch. (T-110)	1	Цилиндрический	Светло-зеленая	Почковидная	Очень крупная	–	Граненая
	2	Округло-граненый	Темно-зеленая	Почковидная	Средняя	–	Граненая
	3	Округло-граненый	Светло-зеленая	Почковидная	Крупная	–	Граненая
	4	Цилиндрический	Светло-зеленая	Почковидная	Средняя	Слабая	Граненая
	5	Цилиндрический	Светло-зеленая	Почковидная	Крупная	Слабая	Граненая
	6	Цилиндрический	Светло-зеленая	Почковидная	Очень крупная	–	Граненая
	7	Цилиндрический	Светло-зеленая	Почковидная	Средняя	Слабая	Граненая
	8	Цилиндрический	Светло-зеленая	Почковидная	Крупная	–	Граненая
	9	Цилиндрический	Светло-зеленая	Почковидная	Средняя	–	–

На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что гибридные растения сочетали морфологические признаки, характерные для фенотипов обоих родительских видов. Таким образом, в результате проведенной сравнительной оценки установлено, что полученные гибридные растения являются межвидовыми гибридами между *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch.

3.3.4. Особенности формирования мужских и женских цветков у полученных гибридов

Данные, представленные в таблице 16, определяют закономерности формирования мужских и женских цветков у гибридных растений и родительских компонентов. Также проводили оценку характера образования цветков у растений, полученных в результате самоопыления гибрида F₁ T, в популяции которого было идентифицировано растение с женским типом цветения.

Таблица 16 – Особенности формирования мужских и женских цветков

Генотип	Номер растения	Узлов на главном стебле, шт.			Число ♀ цветков на 1 ♂	Номер узла с первым ♂ цветком	Номер узла с 1 ♀ цветком
		♀	♂	Всего			
<i>C. moschata</i> Duch. (F ₁ T)	1	23	0	30	23,0	–	8
<i>C. maxima</i> Duch. (F ₁ ОК)	1	2	13	15	0,2	1	12
	2	5	29	35	0,2	1	17
<i>C. maxima</i> Duch. (T-110)	1	2	16	18	0,1	1	9
	2	4	10	14	0,4	1	12
<i>C. moschata</i> Duch. (F ₂ T)	1	6	12	19	0,5	2	8
	2	7	16	25	0,4	2	16
	3	10	10	20	1,0	2	8
	4	3	14	17	0,2	1	7
	5	2	16	20	0,1	3	15
	6	4	22	27	0,2	2	12
	7	1	21	23	0,1	2	17
	8	8	11	20	0,7	2	7
	9	1	18	20	0,1	2	19
	10	2	17	20	0,1	2	15

Продолжение таблицы 16

Генотип	Номер растения	Узлов на главном стебле, шт.			Число ♀ цветков на 1 ♂	Номер узла с первым ♂ цветком	Номер узла с 1 ♀ цветком
		♀	♂	Всего			
<i>C. moschata</i> Duch. (F ₂ T)	11	0	16	18	0	3	–
	12	0	21	21	0	1	–
	13	2	20	23	0,1	2	16
	14	1	19	21	0,1	2	21
	15	3	15	19	0,2	2	10
	16	1	16	18	0,1	2	15
	17	0	17	19	0	3	–
	18	0	16	18	0	3	–
	19	2	16	19	0,1	3	15
	20	2	15	19	0,1	2	14
	21	2	17	20	0,1	2	13
	22	1	19	23	0,1	4	20
<i>C. maxima</i> Duch. (F ₁ ОК) × <i>C. moschata</i> Duch.	1	16	0	16	16	–	1
	2	44	16*	60	2,8	5	1
<i>C. moschata</i> Duch. × <i>C. maxima</i> Duch.	1	30	22	52	1,4	1	2
	2	27	5	33	5,4	2	4
	3	21	6	27	3,5	1	4
	4	17	3	20	5,6	1	3
	5	52	9	61	5,8	1	3
	6	40	13	54	3,1	2	3
	7	11	4	16	2,8	4	3
	8	17	5	23	3,4	2	3
	9	16	9	27	1,8	2	5

*Растение №2 обладало абсолютной гиноцийностью, некоторое количество мужских цветков появилось вследствие обработки точки роста нитратом серебра с целью получения пыльцы для дальнейшей селекции.

У обоих гибридов, полученных от комбинации скрещивания *C. maxima* Duch. (F₁ ОК) × *C. moschata* Duch. (F₁ T), наблюдали полное отсутствие формирования узлов с мужскими цветками. Во всех узлах, начиная с первого, формировались только женские цветки. Растение №2 имеет некоторое количество

мужских цветков вследствие обработки точки роста нитратом серебра с целью получения пыльцы для дальнейшей селекции. Следовательно, полученные гибридные растения обладали женским типом цветения.

У всех девяти гибридов, полученных от комбинации скрещивания *C. moschata* Duch. (F₁ T) × *C. maxima* Duch. (T-110), наблюдали значительное преобладание количества женских цветков над мужскими, в отличие от родительских форм тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.). Однако ни одно гибридное растение не было полностью гиноцийным. Основная часть растений формировала первый женский цветок в третьем узле. В целом среди гибридов максимально позднее формирование первого женского цветка происходило в пятом узле. Полученные данные свидетельствуют о наличии преимущественно женского типа цветения у межвидовых гибридов данной комбинации скрещивания.

На рисунке 21 изображены гибридные растения, полученные от скрещиваний *C. moschata* Duch. и *C. maxima* Duch.



Рисунок 21 – Межвидовые гибриды *C. moschata* Duch. и *C. maxima* Duch.: А – гиноцийное растение, полученное от комбинации скрещивания *C. maxima* Duch.

× *C. moschata* Duch.; В – растение, полученное от комбинации скрещивания *C. moschata* Duch. × *C. maxima* Duch. с преимущественно женским типом цветения

Гибриды, полученные от скрещивания *C. maxima* Duch. × *C. moschata* Duch., характеризовались полной гиноцийностью. Женские цветки у данных гибридов образовывались, начиная с первого узла. Гибриды, полученные от скрещивания *C. moschata* Duch. × *C. maxima* Duch., обладали преимущественно женским типом

цветения. У гибридного растения, изображенного на рисунке 21В, формирование женских цветков начиналось с пятого, а мужских – со второго узла.

3.3.5. Определение жизнеспособности пыльцы межвидовых гибридов

Степень жизнеспособности пыльцы определяли при помощи ее окрашивания ацетокармином с последующим микроскопированием. На рисунке 22 изображена пыльца гибридных растений, полученных от скрещиваний *C. moschata* Duch. и *C. maxima* Duch.

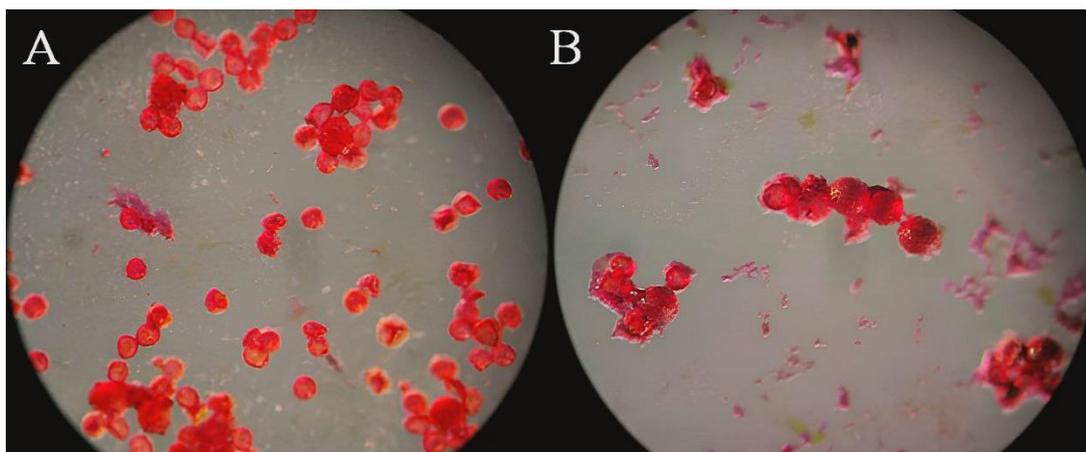


Рисунок 22 – Пыльца межвидовых гибридов, окрашенная ацетокармином: А – пыльца растения, полученного от комбинации скрещивания *C. moschata* Duch. × *C. maxima* Duch.; В – пыльца растения, полученного от комбинации скрещивания *C. maxima* Duch. × *C. moschata* Duch.

Пыльца всех изученных межвидовых гибридов хорошо окрашивалась ацетокармином, что свидетельствует о ее жизнеспособности. Наличие жизнеспособной пыльцы позволяет в перспективе использовать полученные межвидовые гибриды для дальнейшей селекции тыквы крупноплодной на женский тип цветения.

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 сокращений

ЖТЦ – женский тип цветения;

сут – сутки;

шт./ч.Петри – штук в чашке Петри;

ДН – удвоенный гаплоид;

2,4-D – 2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота;

TDZ – тидиазурон;

6-BAР – 6-Бензиламинопурин;

NAA – нафтилуксусная кислота;

GA – гибберелловая кислота;

IAA – индолилуксуная кислота;

IBA – индолилмасляная кислота;

Kin – кинетин;

rpm – оборотов в минуту.

Библиографический список

1. Белов, С.Н. Влияние различного гелеобразующего агента в составе питательной среды на индукцию гиногенного развития неопыленных семян огурца (*Cucumis sativus* L.) / С.Н. Белов // Овощи России. – 2022. – № 5. – С. 15-23.
2. Беседина, Е.Н. Стимуляторы роста нового поколения и альтернативные структурообразователи питательных сред. Эффективность адаптации микрорастений подвоев яблони *ex vitro* / Е.Н. Беседина, Л.Л. Бунцевич // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2015. – Т. 35., № 05. – С. 1-24.
3. Васильченко, Е.Н. Особенности формирования гаплоидных регенерантов сахарной свеклы в культуре *in vitro* / Е.Н. Васильченко, Т.П. Жужжалова, Т.Г. Ващенко, О.А. Землянухина, Н.А. Карпеченко, О.А. Подвигина // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2017. – Т. 3., № 54. – С. 57-66.
4. Воронина, А.В. Основы биотехнологии садовых культур: уч. пособие / А.В. Воронина, А.В. Вишнякова, Р.А. Комахин, С.Г. Монахос. – Москва, 2023. – 139 с.
5. Гизатуллина, А.Т. Особенности формирования микроклубней картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Невский в асептической культуре *in vitro* / А.Т. Гизатуллина, З. Сташевски, Е.А. Гимаева, Г.Ф. Сафиуллина // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. – 2019. – Т. 161., № 3. – С. 375-384.
6. Гончаров, А.В. Видовые и сортовые особенности формирования урожая тыквы, кабачка и патиссона в условиях Московской области: дис. на соиск. ученой степ. канд. с.-х. наук: 06.01.06, 03.00.12 / А.В. Гончаров // М. – 2005. – 230 с.
7. Гончаров, А.В. Сортимент кабачка, патиссона, тыквы, арбуза, дыни в Российской Федерации / А.В. Гончаров, Ф.Б. Мусаев, М.М. Тареева // Аграрная наука. – 2020. – № 4. – С. 67-71.
8. Григолава, Т.Р. Влияние гелеобразователя питательной среды на эмбрио- и каллусогенез в культуре изолированных семязачатков свеклы столовой

(*Beta vulgaris* L.) / Т.Р. Григолова, А.В. Вишнякова, О.Н. Зубко, С.Г. Монахос, Г.Ф. Монахос // Известия ТСХА. – 2021. – № 6. – С. 32-41.

9. Домблидес, Е.А. Образование аномальных цветков в потомстве удвоенных гаплоидов кабачка (*Cucurbita pepo* L.) / Е.А. Домблидес, Н.А. Шмыкова, Г.А. Химич, И.Б. Коротцева, А.С. Домблидес // Овощи России. – 2018. – № 5. – С. 13-17.

10. Домблидес, Е.А. Получение удвоенных гаплоидов в культуре неопыленных семяпочек кабачка (*Cucurbita pepo* L.) / Е.А. Домблидес, Н.А. Шмыкова, Т.В. Заячковская, Г.А. Химич, И.Б. Коротцева, Л.Ю. Кан, А.С. Домблидес // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (Физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты): сб. ст. VII Международной научно-практической конференции, посвященной 30-летию отдела биотехнологии растений Никитского ботанического сада (Симферополь, 25 сент. - 01 окт. 2016 г.). – Симферополь: Ариал, 2016. – С. 28-29.

11. 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.

12. Домблидес, Е.А. Получение ДН-растений огурца (*Cucumis sativus* L.) в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* / Е.А. Домблидес, Н.А. Шмыкова, С.Н. Белов, И.Б. Коротцева, А.В. Солдатенко // Овощи России. – 2019. – № 6. – С. 3-9.

13. Дьячук, Т.И. Культура зародышей и пыльников как методы создания исходного материала для селекции тритикале / Т.И. Дьячук, О.В. Хомякова, С.В. Столярова, Ю.В. Итальянская, Н.Ф. Сафронова, Л.П. Медведева // Зональные особенности научного обеспечения сельскохозяйственного производства: сб. ст. Региональной научно-практической конференции (Саратов, 26-27 февр. 2009 г.). – Саратов: Новый ветер, 2009. – С. 246-251.

14. Дютин, К.Е. Генетика и селекция бахчевых культур: монография / К.Е. Дютин. – М.: Россельхозакадемия, 2000. – 231 с.

15. Елацкова, А.Г. Разнообразие морфобиотипов овощных тыкв и возможности их использования в селекции: автореф. на соиск. ученой степ. канд. с.-х. наук: 06.01.06, 06.01.05 / А.Г. Елацкова // М. – 2005. – 25 с.
16. 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.
17. 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: сб. тез. докладов 21-ой Всероссийской молодежной научной конференции. Конференция посвящается памяти академика РАСХН Г.С. Муромцева (Москва, 19-21 окт. 2021 г.). – Москва, 2021. – С. 103-105.
18. Здруйковская-Рихтер, А.О. Культура зародышей *in vitro* и получение новых форм растений: дис. на соиск. ученой степ. доктора биологических наук: 03.00.05 / А.О. Здруйковская-Рихтер // Ялта. – 1979. – 536 с.
19. Зеленианская, Н.Н. Эффективные желирующие компоненты для размножения винограда *in vitro* / Н.Н. Зеленианская, Л.В. Джабурия, Н.И. Теслюк // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2010. – Т. 5., № 4. – С. 53-57.
20. Калинина, Е.В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, М.Д. Новичкова // Успехи биологической химии. – 2014. – Т. 54. – С. 299-348.
21. Квасников, Б.В. Овощные и бахчевые культуры: монография / Б.В. Квасников // под ред. Б.В. Квасникова. – Москва: Сельхозгиз, 1955. – 559 с.
22. Ким, Ю.Ц. Соматический эмбриогенез двух новых сортов *Panax ginseng*, *Yun-Poong* и *Chun-Poong* / Ю.Ц. Ким, М.К. Ким, Д.С. Шим, Р.К. Пулла, Д.Ч. Янг // Физиология растений. – 2010. – Т. 57., № 2. – С. 297-303.

23. Колесникова, Е.О. Биотехнологии гаплоидов как инструмент создания селекционного материала сахарной свеклы / Е.О. Колесникова, Е.И. Донских, Р.В. Бердников // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25, № 8. – С. 812-821.
24. Коротцева, И.Б. Основные направления и задачи селекции тыквенных культур / И.Б. Коротцева, Г.А. Химич // Овощи России. – 2013. – № 2. – С. 17-21.
25. Костина, Е.Е. Морфогенетический потенциал короткостебельных линий подсолнечника в культуре соматических тканей *in vitro* / Е.Е. Костина, Ю.В. Лобачев, О.В. Ткаченко // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 2. – С. 267.
26. Круг, Г. Овощеводство: уч. пособие / Г. Круг, пер. с нем. В.И. Леунова. – М.: КолосС, 2000. – 576 с.
27. Кузнецов, В.В. Физиология растений: уч. пособие / В.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева // под ред. Л.И. Захватовой. – М.: Высшая школа, 2005. – 736 с.
28. Кузьмин, С.В. Линии женского типа цветения как основа новых высокопродуктивных F₁ гибридов кабачка / С.В. Кузьмин // Овощи России. – 2021. – № 6. – С. 71-75.
29. Курбангалиева, Т.А. Культивирование и изучение каллусогенеза растения душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.) в условиях *in vitro* / Т.А. Курбангалиева // Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Summer Debates: abstracts of the 2nd International Scientific and Practical Internet Conference (Dnipro, Aug. 17-18, 2020). – Dnipro, 2020. – С. 257-259.
30. Лудилов, В.А. Апробация бахчевых культур: справ. пособие / В.А. Лудилов, Ю.А. Быковский // под ред. С.С. Литвинова. – М.: РАСХН, ВНИИО, 2007. – 184 с.
31. Лудилов, В.А. Межвидовая гибридизация тыкв и отдаленные прививки в семействе Cucurbitaceae: автореф. на соиск. ученой степ. канд. с.-х. наук. – Краснодар, 1966. – 22 с.

32. Макаров, С.С. Влияние минерально-витаминного комплекса на клональное микроразмножение ежевики / С.С. Макаров // Проблемы. Суждения. Краткие сообщения. – 2019. – Т. 1., № 54. – С. 115-199.

33. Мартиросян, Л.Ю. Влияние экзогенного глутатиона на регенерационный потенциал каллусных тканей *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin / Л.Ю. Мартиросян, Н.А. Рубцова, Л.А. Смурова, Ю.Ц. Мартиросян, К.М. Зинатуллина, А.В. Лобанов, О.Т. Касаикина // Химическая безопасность. – 2022. – Т. 6., № 1. – С. 198-207.

34. Матушкина, О.В. Роль углеводов при клональном микроразмножении садовых растений / О.В. Матушкина, И.Н. Пронина // Плодоводство и ягодоводство России. – 2018. – Т. 54. – С. 106-110.

35. Мехтиханов, С.Д. Количественное определение кальция пантотената в многокомпонентных витаминных лекарственных препаратах / С.Д. Мехтиханов, Н.Б. Ханмурзаева, А.М. Шемшединова, Б.И. Шапиев, Д.П. Бабаева, З.М. Магомедова // Известия ДГПУ. – 2019. – Т. 13., № 1. – С. 29-34.

36. Нестерова, А.Н. Микрклональное размножение картофеля в условиях *in vitro* / А.Н. Нестерова, А.З. Платонова // Комплексные вопросы науки и образования: сб. ст. Внутривузовской научно-практической конференции, посвященной 65-летию Высшего аграрного образования Республики Саха (Якутия) и Всероссийской студенческой научно-практической конференции с международным участием в рамках «Северного форума – 2021» (Якутск, 27 сент. - 12 нояб. 2021 г.). – Якутск, 2021. – С. 524-530.

37. Никулина, Т.М. Создание конкурентоспособных сортов тыквы для Нижнего Поволжья / Т.М. Никулина, Д.П. Курунина // Овощи России. – 2019. – № 4. – С. 54-57.

38. Новгородова, О.Т. Витамин В5 (Пантотеновая кислота, пантотенат кальция) / О.Т. Новгородова. URL: <https://infourok.ru/vitamin-b5-pantotenovaya-kislota-pantotenat-kalciya-4722619.html> (дата обращения 07.10.2023).

39. Орлов, П.А. Факторы, определяющие эффективность индукции пыльцевого эмбриогенеза у пшеницы и тритикале / П.А. Орлов, О.И. Зайцева,

Е.В. Антоненко // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: сб. науч. трудов III Международной конференции к 50-летию Отдела биохимии и биотехнологии растений (Минск, 14-16 мая 2008 г.). – Минск, 2008. – С. 204-208.

40. Остроумов, Л.А. Оценка состава и физико-химических свойств ферментативных гидролизатов казеина / Л.А. Остроумов, О.О. Бабич, И.С. Милентьева // Вестник Восточно-Сибирского государственного университета технологий и управления. – 2013. – Т. 1., № 40. – С. 82-85.

41. Першина, Л.А. Межвидовая несовместимость при отдаленной гибридизации растений и возможности ее преодоления / Л.А. Першина, Н.В. Трубачеева // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т. 20, № 4. – С. 416-425.

42. Пивоваров, В.Ф. Современные тенденции развития селекции овощных и бахчевых культур / В.Ф. Пивоваров, А.В. Солдатенко, О.Н. Пышная, Л.К. Гуркина, Е.В. Пинчук // Овощи России. – 2022. – № 3. – С. 5-15.

43. Поляков, А.В. Патент РФ № RU2120741C1, МПК А01Н4/00. Питательная среда для культивирования пыльников льна: заявлено 27.06.1996: опубликовано: 27.10.1998 / Поляков, А.В., Пролетова Н.В. – 6 с.

44. Прохоров, И.А. Практикум по селекции и семеноводству овощных и плодовых культур: уч. пособие / И.А. Прохоров, С.П. Потапов. – М.: Агропромиздат, 1988. – 319 с.

45. Пухальский, В.А. Введение в генетику: уч. пособие / В.А. Пухальский. – М.: ИНФРА-М, 2019. – 224 с.

46. Пухальский, В.А. Практикум по цитологии и цитогенетике растений: уч. пособие / В.А. Пухальский, А.А. Соловьев, Е.Д. Бадаева, В.Н. Юрцев // под ред. И.А. Фроловой. – М.: КолосС, 2007. – 198 с.

47. Ромаданова, Н.В. Оптимизация микрклонального размножения барбариса / Н.В. Ромаданова, И.А. Махмутова, Л.Н. Карашолакова, А.А. Христенко, С.В. Кушнарченко // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. – 2017. – №2. – С. 1-8.

48. Савенко, Е.Г. Оптимизация метода гиногенеза в культуре неопыленных семян тыквы / Е.Г. Савенко, В.А. Глазырина, О.В. Якимова, В.Э. Лазько, И.И. Супрун, Ж.М. Мухина, Л.А. Шундрин // Рисоводство. – 2016. – Т. 3-4., № 32-33. – С. 75-78.
49. Савенко, Е.Г. Разработка метода для культивирования подсолнечника *in vitro* / Е.Г. Савенко, С.В. Гаркуша, Ж.М. Мухина, В.А. Глазырина, Л.А. Шундрин, Е.Е. Шпилова // Рисоводство. – 2017. – Т. 3., № 36. – С. 58-65.
50. Сергеева, Л.Е. Содержание свободного пролина как показатель жизнедеятельности клеточной культуры *Nicotiana tabacum* L. при стрессе / Л.Е. Сергеева, Л.И. Бронникова, Е.Н. Тищенко // Биотехнология. – 2011. – Т. 4., № 4. – С. 87-94.
51. Сергиевская, Е.В. Систематика высших растений. Практический курс: уч. пособие / Е.В. Сергиевская // под. ред. Ю.А. Сандулова. – СПб: Лань, 1998. – 448 с.
52. Сидоров, Е.А. Индуцированный морфогенез и регенерация *in vitro* растений ячменя отечественных сортов / Е.А. Сидоров, М.А. Чернобровкина, А.Н. Николаева, П.Н. Харченко, С.В. Долгов // Сельскохозяйственная Биология. – 2009. – № 3. – С. 73-78.
53. Ситникова, О.И. Преодоление барьеров несовместимости тыквы *Cucurbita maxima* L. / О.И. Ситникова, А.В. Поляков, О.Ф. Шарафова // Биотехнология. – 2010. – № 4. – С. 34-43.
54. Ситникова, О.И. Преодоление несовместимости при межвидовой гибридизации для создания исходного селекционного материала тыквы (*C. maxima* L.): автореф. на соиск. ученой степ. канд. с.-х. наук. – Москва, 2008. – 24 с.
55. Смирнов, В.А. Аминокислоты и полипептиды: учеб. пособие, ч.1 / В.А. Смирнов, Ю.Н. Климочкин. – Самара: Самарский государственный технический университет, 2007. – 110 с.

56. Соловых, Н.В. Влияние антиоксидантов на эффективность введения в культуру *in vitro* красной малины / Н.В. Соловых // International journal of humanities and natural sciences. – 2023. – V. 8-2, № 83. – P. 17-20.
57. Стрелец, В.Д. Тыква – стратегическая культура: монография / В.Д. Стрелец, А.В. Гончаров, Ф.Н. Рыкалин. – М.: Изд. РГАУ-МСХА, 2013. – 102 с.
58. Стручкова, И.В. Аминокислоты: уч.-метод. пособие / И.В. Стручкова, А.А. Брилкина. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2016. – 32 с.
59. Тараканов, Г.И. Морфобиотипы *Cucurbita pepo* L. и их использование в селекции и производстве / Г.И. Тараканов, А.М. Гусев, С.А. Андриевская // Известия ТСХА. – 1987. – № 6. – С. 105-121.
60. Тараканов, Г.И. Овощеводство: уч. пособие / Г.И. Тараканов, В.Д. Мухин, К.А. Шуин, Н.В. Борисов, В.В. Климов, М.А. Никифоров, В.А. Скачко, И.Г. Тараканов, М.С. Холодецкий // под ред. Г.И. Тараканова и В.Д. Мухина. – М.: КолосС, 2002. – 472 с.
61. Третьяков, Н.Н. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений: уч. пособие / Н.Н. Третьяков, Е.И. Кошкин, Н.М. Макрушин, А.С. Лосева, Н.В. Пильщикова, Н.Н. Новиков, Т.В. Карнаухов // под ред. А.С. Максимовой. – М.: КолосС, 2005. – 656 с.
62. Тустубаева, Ш.Т. Применение технологии получения микроклубней картофеля *in vitro* для оригинального семеноводства / Ш.Т. Тустубаева, Г.Н. Кузьмина, А.М. Акзамбек // Актуальные научные исследования в современном мире. – 2018. – Т. 1., № 33. – С. 33-39.
63. Федорова, Л.Н. Особенности развития процесса морфогенеза микрорастений картофеля в условиях *in vitro* / Л.Н. Федорова, Ю.Н. Федорова, А.В. Ялович // Научно-технический прогресс в сельскохозяйственном производстве: сб. докладов XIV Международной научно-практической конференции (Великие Луки, 11-12 апреля 2019 г.). – Великие Луки: Великолукская гос. с/х академия, 2019. – С. 69-74.

64. Филов, А.И. Бахчеводство: уч. пособие / А.И. Филов // под ред. А.И. Филова. – М.: Колос, 1969. – 236 с.
65. Фурса, Т.Б. Руководство по апробации бахчевых культур: справ. пособие / Т.Б. Фурса, М.И. Малинина, З.Д. Артюгина и др. // под ред. В.Ф. Дорофеева. – М.: Агропромиздат, 1985. – 181 с.
66. Хомякова, О.В. Гаплоидия в культуре пыльников пшенично-ржаных амфидиплоидов / О.В. Хомякова, Т.И. Дьячук, С.В. Столярова, Ю.В. Итальянская, Н.Ф. Сафронова, Л.П. Медведева // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова. – 2010. – Т. 3., № 20. – С. 64-69.
67. Чистова, А.В. Влияние температурной предобработки на эффективность эмбрио- и каллусогенеза в культуре пыльников моркови (*Daucus carota* L.) / А.В. Чистова, С.Г. Монахос // Известия ТСХА. – 2014. – № 4. – С. 125-131.
68. Чистова, А.В. Оптимизация состава питательной среды для получения удвоенных гаплоидов моркови в культуре изолированных микроспор / А.В. Чистова // Научно-технический прогресс в сельскохозяйственном производстве: сб. докладов XII Международной научно-практической конференции молодых ученых, в 2-х томах (Великие Луки, 13-14 апреля 2017 г.). – Великие Луки: Великолукская гос. с/х академия, 2017. – Т. 1. – С. 68-70.
69. Чистяков, А.А. Проявление пола у кабачка / А.А. Чистяков, Г.Ф. Монахос // Картофель и овощи. – 2016. – № 1. – С. 39-40.
70. Чистяков, А.А. Создание F₁-гибридов кабачка на базе гиноцидных линий / А.А. Чистяков, Ю.А. Соловьева, Г.Ф. Монахос // Картофель и овощи. – 2023. – № 2. – С. 37-40.
71. Шевелуха, В.С. Сельскохозяйственная биотехнология: уч. пособие / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.З. Кочиева и др. // под ред. В.С. Шевелухи. – М.: Высшая школа, 2008. – 710 с.
72. Шмыкова, Н.А. Биотехнологические и молекулярно-генетические методы в селекции овощных культур (к 95-летию ВНИИССОК) / Н.А. Шмыкова,

Т.П. Супрунова, В.Ф. Пивоваров // Сельскохозяйственная биология. – 2015а. – Т. 50, № 5. – С. 561-570.

73. Шмыкова, Н.А. Индукция гиногенеза в культуре неопыленных семян тыквы / Н.А. Шмыкова, Д.В. Шумилина, В.П. Кушнерева, Г.А. Химич // Овощи России. – 2011. – № 1. – С. 28-31.

74. Шмыкова, Н.А. Перспективы получения удвоенных гаплоидов растений семейства Cucurbitaceae / Н.А. Шмыкова, Г.А. Химич, И.Б. Коротцева, Е.А. Домблдес // Овощи России. – 2015b. – № 3. – С. 28-31.

75. Эдельштейн, В.И. Овощеводство: уч. пособие / В.И. Эдельштейн // под ред. В.И. Эдельштейна. – М.: Сельхозиздат, 1962. – 440 с.

76. Якимова, О.В. Оценка и характеристика хозяйственно ценных признаков линий тыквы мускатной и крупноплодной порционного размера / О.В. Якимова, В.Э. Лазько // Овощи России. – 2020. – № 5. – С. 49-53.

77. Янковская, М.Б. Сохранение и размножение ценных форм ягодных и декоративных растений методами биотехнологии / М.Б. Янковская, Д.Г. Шорников, С.А. Муратова, Н.В. Соловых // Вестник Иркутской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – Т. 44., № 4. – С. 160-166.

78. Asadi, A. Production of cucumber doubled haploid plants via ovule culture / A. Asadi, A. Zebarjadi, M.R. Abdollahi // Plant Productions (Scientific Journal of Agriculture). – 2019. – V. 42., № 1. – P. 77-88.

79. Aslibeigi, A. *In vitro* ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.) for haploid plant production / A. Aslibeigi, R. Haddad, G. Garoosi, S.M. Hossaini // Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding. – 2022. – V. 11., № 1. – P. 87-98.

80. Azad, S. Amino acids: its types and uses / S. Azad // International Journal of Advanced Biochemistry Research. – 2017. – V. 1., № 1. – P. 10-13.

81. Badawi, M.A. Large scale production of haploid plants by unpollinated ovules culture in squash (*Cucurbita pepo* L.) / M.A. Badawi, E.I. Metwally, S.S. Taha, M.O. Arafah // Journal of Agricultural Science of Mansoura University. – 2008. – V. 33., № 7. – P. 4981-4992.

82. Baktemur, G. Effects of genotype and nutrient medium on obtaining haploid plants through ovary culture in cucumber / G. Baktemur, D. Keles, E. Kara, S. Yildiz, H. Taskin // *Molecular Biology Reports*. – 2022. – V. 49. – P. 5451-5458.
83. Bemis, W.P. Interspecific hybridization within the genus *Cucurbita* L., fruit set, seed and embryo development / W.P. Bemis, J.M. Nelson // *Journal of the Arizona Academy of Sciences*. – 1963. – V. 2., № 3. – P. 104-107.
84. Blakeslee, A.F. A haploid mutant in the jimson weed, "*Datura stramonium*" / A.F. Blakeslee, J. Belling, M.E. Farnham, A.D. Bergner // *Science*. – 1922. – V. 16., № 55(1433). – P. 646-647.
85. Buah, J.N. Effects of different types and concentrations of gelling agents on the physical and chemical properties of media and the growth of banana (*Musa* spp.) *in vitro* / J.N. Buah, Y. Kawamitsu, S. Sato, S. Murayama // *Plant Production Science*. – 1999. – V. 2., № 2. – P. 138-145.
86. Caglar, G. *In situ* haploid embryo induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.) after pollination by irradiated pollen / G. Caglar, K. Abak // *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. – 1999. – V. 23., № 7. – P. 63-72.
87. Chambonnet, D. Obtenion of embryos and plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules of *Cucurbita pepo* / D. Chambonnet, R.D. De Vault // *The Cucurbit Genetics Cooperative*. – 1985. – V. 8:66., № 24. – P. 294.
88. Chen, J.F. *In vitro* haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture / J.F. Chen, L. Cui, A.A. Malik, K.G. Mbira // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2010. – V. 104. – P. 311-319.
89. Curlango Limon, F.G. Interspecific aneuploids in the genus *Cucurbita*: thesis for the degree of master of sciences / F.G. Curlango Limon. – The University of Arizona, 1974 – 31 p.
90. Demirel, E. Obtaining haploid embryo and plant by gynogenesis in some cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars and types / E. Demirel, A.N. Onus // *International Journal of Agriculture and Wildlife Science*. – 2021. – V. 7., № 3. – P. 360-367.

91. Diao, W.P. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers / W.P. Diao, Y.Y. Jia, X.Q. Zhang, Q.F. Lou, J.F. Chen, H. Song // *Scientia Horticulturae*. – 2009. – V. 119, № 3. – P. 246-251.
92. Dobrova, H.O. Methodological aspects of obtaining of durum wheat double haploids by wide hybridization / H.O. Dobrova, I.S. Zambriborsh, O.L. Shestopal // *Studia Biologica*. – 2014. – V. 8., № 3-4. – P. 127-136.
93. 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. – V. 8., № 11. – P. 1083.
94. Dong, Y.Q. Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species / Y.Q. Dong, W.X. Zhao, X.H. Li, X.C. Liu, N.N. Gao, J.H. Huang, W.Y. Wang, X.L. Xu, Z.H. Tang // *Plant Cell Reports*. – 2016. – № 35. – P. 1991-2019.
95. Dryanovska, O.A. Induced callus *in vitro* from ovaries and anthers of species from the Cucurbitaceae family / O.A. Dryanovska // *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*. – 1985. – V. 38., № 9. – P. 1243-1244.
96. Duncan, D.R. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes / D.R. Duncan, M.E. Williams, B.E. Zehr, J.M. Widholm // *Planta*. – 1985. – V. 165. – P. 322-332.
97. Dunstan, D.I. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa* / D.I. Dunstan, K.C. Short // *Physiologia Plantarum*. – 1977. – V. 41, № 1. – P. 70-72.
98. El Fahal, A.M.A. Interspecific hybridization and amphidiploidy between *Cucurbita moschata* Duch. Ex Poir and *Cucurbita foetidissima* HBK: dis. for the degree of doctor of philosophy with a major in horticulture / A.M.A. El Fahal. – The University of Arizona, 1977. – 57 p.
99. Ficcadenti, N. *In vitro* gynogenesis to induce haploid plants in melon *Cucumis melo* L. / N. Ficcadenti, S. Sestili, S. Annibali, M. Di Marco, M. Schiavi // *Journal of Genetics and Breeding*. – 1999. – V. 53., № 3. – P. 255-257.

100. Gamborg, O.L. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley / O.L. Gamborg, Eveleigh D.E. // Canadian Journal of Biochemistry. – 1968. – V. 46, № 5. – P. 417-421.
101. Gemes-Juhasz, A. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.) / A. Gemes-Juhasz, P. Balogh, A. Ferenczy, Z. Kristof // Plant Cell Reports. – 2002. – V. 21. – P. 105-111.
102. Ghoreishi, S.M. Innovative strategies for engineering mannitol production / S.M. Ghoreishi, R. Gholami // Trends in Food Science and Technology. – 2009. – V. 20., № 6–7. – P. 263–270.
103. Golabadi, M. Embryo and callus induction by different factors in ovary culture of cucumber / M. Golabadi, Y. Ghanbari, K. Keighobadi, S. Ercisli // Journal of applied botany and food quality. – 2017. – Vol. 90. – P. 68-75.
104. Gursoz, N. Obtention of haploid plants induced by irradiated pollen in watermelon (*Citrullus lanatus*) / N. Gursoz, K. Abak, M. Pitrat, J.C. Rode, R. Dumas de Vault // The Cucurbit Genetics Cooperative. – 1991. – V. 14. – P. 109-110.
105. Hayase, H. Cucurbita-crosses. XIII, Utilization of bud pollination in obtaining interspecific hybrids of *C. pepo* × *C. maxima* / H. Hayase // Japanese Journal of Breeding. – 1961. – № 11. – P. 277-284.
106. Haynes, W.M. Handbook of Chemistry and Physics (97th ed.): book / W.M. Haynes, D.R. Lide, T.J. Bruno // ed. by W.M. Haynes. – Boca Raton: CRC Press, 2016. – 2670 p.
107. Isak, M.A. Evaluation of factors affecting embryo-like structure and callus formation in unpollinated ovary culture of watermelon (*Citrullus lanatus*) / M.A. Isak, H. Majeed, H. Yetisir, O. Simsek // International Journal of Agricultural and Natural Sciences. – 2022. – V. 15., № 3. – P. 319-335.
108. Kearsley, M.W. Sorbitol and Mannitol / M.W. Kearsley, R.C. Deis // Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology. – Oxford, 2006. – P. 249 – 261.

109. Kirov, I. An easy “SteamDrop” method for high quality plant chromosome preparation. / I. Kirov, M.G. Divashuk, K.V. Laere, A. Soloviev, L. Khrustaleva // *Molecular Cytogenetics*. – 2014. – V. 7. – P. 21.
110. Knop W. Quantitative utersuchungenüber den ernährungsprozeb der pflanze / W. Knop // *Landw. Versuchssat*. – 1865. – V. 7. – P. 93.
111. Kozinka, V. The uptake of mannitol by higher plants / V. Kozinka, S. Klenovska // *Biologia Plantarum*. – 1965. – V. 7. – P. 285-292.
112. Kurtar, E.S. Evaluation of haploidization efficiency in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) through anther culture / E.S. Kurtar, A. Balkaya, D. Kandemir // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2016. – V. 127. – P. 497–511.
113. Kurtar, E.S. Influence of gamma irradiation on pollen viability, germination ability, and fruit and seed-set of pumpkin and winter squash / E.S. Kurtar // *African Journal of Biotechnology*. – 2009. – V. 8., № 24. – P. 6918-6926.
114. Kurtar, E.S. Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.) / E.S. Kurtar, N. Sari, K. Abak // *Euphytica*. – 2002. – V. 127. – P. 335-344.
115. Kurtar, E.S. Production of callus mediated gynogenic haploids in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) / E.S. Kurtar, A. Balkaya, M. Ozbakir Ozer // *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. – 2018. – V. 54., № 1. – P. 9-16.
116. Kurtar, E.S. Production of *in vitro* haploid plants from *in situ* induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via irradiated pollen / E.S. Kurtar, A. Balkaya // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2010. – V. 102. – P. 267-277.
117. Kwack, S.N. Somatic embryogenesis in cultured unfertilized ovules of *Cucurbita moschata* / S.N. Kwack, K. Fujieda // *Journal of Japanese Society for Horticultural Science*. – 1988. – V. 57., № 1. – P. 34-42.
118. Lawson, P. Mannitol / P. Lawson // *Sweeteners*. – Blackwell Publishing Ltd, 2007. – P. 219-225.

119. Li, J.W. Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus* / J.W. Li, S.W. Si, J.Y. Cheng, J.X. Li, J.Q. Liu // *Biologia Plantarum*. – 2013. – V. 57., № 1. – P. 164-168.
120. Lichter, R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* in liquid culture medium / R. Lichter // *Z Pflanzenphysiol*. – 1982. – V. 105. – P. 229-237.
121. Lim, W. Effect of *in vitro* and *in vivo* colchicine treatments on pollen production and fruit set of melon plants obtained by pollination with irradiated pollen / W. Lim, E.D. Earle // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2008. – V. 95., № 1. – P. 115–124.
122. Lotfi, M. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance / M. Lotfi, A.R. Alan, M.J. Henning, M.M. Jahn, E.D. Earle // *Plant Cell Reports*. – 2003. – V. 21., № 11. – P. 1121-1128.
123. Majeed, H. Role of different parameters in the formation of embryo-like structure and callus through ovary culture in cucumber (*Cucumis sativus* L.) / H. Majeed, M. Abak, H. Yetisir, O. Simsek // *International Journal of Agriculture and Natural Sciences*. – 2023. – V. 16., № 1. – P. 90-106.
124. Masuda, K. A revision of the medium for somatic embryogenesis in carrot suspension culture / K. Masuda, Y. Kikuta, Y. Okazawa // *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University*. – 1981. – V. 60, № 3. – P. 183-193.
125. Metwally, E.I. Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo* / E.I. Metwally, S.A. Moustafa, B.I. El-Sawy, T.A. Shalaby // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1998a. – V. 52., № 3. – P. 171-176.
126. Metwally, E.I. Production of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo* / E.I. Metwally, S.A. Moustafa, B.I. El-Sawy, S.A. Haroun, T.A. Shalaby // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1998b. – №52. – P.117-121.

127. Min, Z. Studies of *in vitro* culture and plant regeneration of unfertilized ovary of pumpkin / Z. Min, H. Li, T. Zou, L. Tong, J. Cheng, X. Sun // Plant Cell Reports. – 2016. – V. 21., № 1. – P. 1121-1128.
128. Mohamed, M.F. Enhanced haploids regeneration in anther culture of summer squash (*Cucurbita pepo* L.) / M.F. Mohamed, E.F.S. Refaei // Cucurbit Genetics Cooperative Report. – 2004. – V. 27. – P. 57-60.
129. Moqbeli, E. *In vitro* cucumber haploid line generation in several new cultivars / E. Moqbeli, E. Moqbeli, Gh. Peyvast, Y. Hamidoghli, J.A. Olfati // Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. – 2013. – V. 21., № 1. – P. 18-25.
130. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Scoog // Physiologia Plantarum. – 1962. – V. 15, № 3. – P. 473-497.
131. Ngoc, L.T.K. Shoots formation from gynogenesis *Cucumis sativus* L. / L.T.K. Ngoc, N.T.D. Phuong // Ho Chi Minh City Open University Journal of Science. – 2018. – V. 8., № 1. – P. 53-59.
132. Nitwatthanakul, N. Effect of induction media on callus formation in unpollinated ovule culture of three melon cultivars / N. Nittwatthanakul, A. Tiraumphon // ISHS Acta Horticulturae 1285: XXX International Horticultural Congress IHC2018: II International Symposium on Micropropagation and *In Vitro* Technologies (Istanbul, August 12-16, 2018). – Istanbul, 2018. – 290 p.
133. Nyirahabimana, F. Haploid induction through ovary culture in cucumber / F. Nyirahabimana, I. Solmaz // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2024. – V. 60. – P. 122-130.
134. Orshinsky, B.R. Improved embryoid induction and green shoot regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose / B.R. Orshinsky, L.J. McGregor, G.I.E. Johnson, P. Hucl, K.K. Kartha // Plant Cell Reports. – 1990. – V. 9., № 7. – P. 365-369.

135. Ozsan, T. Cucumber gynogenesis: effects of 8 different media on embryo and plant formation / T. Ozsan, V. Gozen, A.N. Onus // International Journal of Agriculture Innovations and Research. – 2017. – V. 6., № 2. – P. 419-422.
136. Plader, W. Obtaining of hybrids within the family Cucurbitaceae by *in vitro* culture of immature embryos. III. Characteristics of hybrids of *Cucurbita maxima* × *C. ficifolia* and *C. maxima* × *C. foetidissima* / W. Plader, M. Rakoczy-Trojanowska // Genetica Polonica. – 1994. – V. 35., № 1-2. – P. 11-22.
137. Plapung, P. Development of cucumber lines resistant to Cucumber mosaic virus by ovule culture / P. Plapung, S. Khumsukdee, P. Smitamana // Journal of Agricultural Technology. – 2014. – V. 10., № 3. – P. 733-741.
138. Rakha, M.T. Production of *Cucurbita* interspecific hybrids through cross pollination and embryo rescue technique / M.T. Rakha, E.I. Metwally, S.A. Moustafa, A.A. Etman, Y.H. Dewir // World Applied Sciences Journal. – 2012. – V. 20., № 10. – P. 1366-1370.
139. Rakoczy-Trojanowska, M. Obtaining of hybrids within the family Cucurbitaceae by *in vitro* culture of immature embryos I. Characteristics of hybrids from *Cucurbita maxima* × *Cucurbita pepo* / M. Rakoczy-Trojanowska, S. Malepszy // Genetica Polonica. – 1986. – V. 27., № 3-4. – P. 259-272.
140. Randolph, L.F. Factors influencing the germination of Iris seed and the relation of inhibiting substances to embryo dormancy / L.F. Randolph, L.G. Cox // Proceedings of the American Society for Horticultural Science. – 1943. – V. 43. – P. 284-300.
141. Rogo, U. Embryo rescue in plant breeding / U. Rogo, M. Fambrini, C. Pugliesi // Plants. – 2023. – V. 12. – P. 3106.
142. Sary, N. Comparison ploidy level screening methods in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai) / N. Sary, K. Abak, M. Pirat // Scientia Horticulturae. – 1999. – V. 82. – P. 265-277.
143. Sauton, A. Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskmelon, *Cucumis melo* L. / A. Sauton // Scientia Horticulturae. – 1988. – V. 35. – P. 71-75.

144. Sauton, A. Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen / A. Sauton // Cucurbit Genetics Cooperative Report. – 1989. – V. 12. – P. 22-23.
145. Shalaby, T.A. Factors affecting haploid induction through in vitro gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.) / T.A. Shalaby // Scientia Horticulturae. – 2007. – V. 115. – P. 1-6.
146. Skalova, D. Optimizing culture for in vitro pollination and fertilization in *Cucumis sativus* and *C. melo* / D. Skalova, B. Navratilova, V. Ondrej, A. Lebeda // Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica. – 2010. – V. 52., № 1. – P. 111-115.
147. Sorntip, A. Gynogenesis and doubled haploid production from unpollinated ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.) / A. Sorntip, O. Poolsawat, C. Kativat // Canadian Journal of Plant Science. – 2018. – V. 98., № 2. – P. 353-361.
148. Stoop, J.M.H. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress / J.M.H. Stoop, J.D. Williamson, D.M. Pharr // Trends in Plant Science. – 1996. – V. 1., № 5. – P. 139-144.
149. Sun, Y. Induced haploid plants after pollination by irradiated pollen in *Cucumis melo* L. / Y. Sun, S. Mei, J. Peng, L. Zhang, Q. Nie, H. Zeng, N. Du // Hubei Agricultural Sciences. – 2006. – V. 4. – P. 98-100.
150. Taner, K.Y. The effects of irradiation dose and harvest period on haploid plant formation via irradiated pollen in snake cucumber (*Cucumis melo* var. *flexuosus* Naud.) / K.Y. Taner, R. Yanmaz, B. Kunter // Proc. of the IIIrd National Vegetable Culture Symposium. – Isparta, 2000. – P. 177-181.
151. Tantasawat, P.A. Evaluation of factors affecting embryo-like structure and callus formation in unpollinated ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus*) / P.A. Tantasawat, A. Sorntip, O. Poolsawat, W. Chaowiset, P. Pornbungkerd // International Journal of Agriculture and Biology. – 2015. – V. 17., № 3. – P. 613-618.
152. Uretsky, J. Development and evaluation of interspecific *Cucurbita maxima* × *Cucurbita moschata* hybrids for processing squash: thesis for the degree of master of sciences / J. Uretsky. – The University of New Hampshire, 2012. – 116 p.
153. Wagner, I. New naturally occurring amino acids / I. Wagner, H. Musso // Angewandte Chemie International Edition. – 1983. – V. 22., № 11. – P. 816-828.

154. Wang, R. Effects of NaCl stress on cation contents in seedlings of two pumpkin varieties / R. Wang, W. Song, J. Liang, G.L. Chen, G.Y. Lu, W.X. Li // *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*. – 2006. – V. 32., № 1. – P. 94-98.
155. Whitaker, T.W. Evolution in the genus *Cucurbita* / T.W. Whitaker, W.P. Bemis // *Evolution*. – 1964. – V. 18., № 4. – P. 553-559.
156. White, Ph.R. The cultivation of animal and plant cells: book / Ph.R. White. – New York: The Ronald Press Company, 1954. – 239 p.
157. Winkelmann, T. Commercial *in vitro* plant production in Germany in 1985-2004 / T. Winkelmann, T. Geier, W. Preil // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2006. – V. 86. – P. 319-327.
158. Xie, B. Improved conditions of *in vitro* culture of unpollinated ovules and production of embryonary sac plants in summer squash (*Cucurbita pepo* L.) / B. Xie, X.F. Wang, Z.C. Fan // *Scientia Agricultura Sinica*. – 2006. – V. 39., № 1. – P. 132-138.
159. Xie, M. Induced haploid plants after pollination by irradiated pollen in *Cucumis sativus* L. / M. Xie, J. Zhao, J. Pan, H. He, A. Wu, R. Cai // *Journal of Shanghai Jiao Tong University*. – 2005. – № 2. – P. 45-49.
160. Zhang, Q. Development of advanced interspecific-bridge lines among *Cucurbita pepo*, *C. maxima*, and *C. moschata* / Q. Zhang, E. Yu, A. Medina // *HortScience*. – 2012. – V. 47., № 4. – P. 452-458.
161. Zhu, Y.C. Effects of medium addition on ovule enlargement of watermelon non-pollinated ovary / Y.C. Zhu, D.X. Sun, Y. Deng, W.H. Li, G.L. An, Y.Y. Li, W.J. Si, J.P. Liu // *International Journal of Agriculture and Biology*. – 2018. – V. 20., № 10. – P. 2312-2318.
162. Zou, T. Efficient induction of gynogenesis through unfertilized ovary culture with winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) / T. Zou, X. Chu, S. Liang, H. Yang, X. Sun, H. Song, L. Tong, S. Gong // *Scientia Horticulturae*. – 2020. – V. 264., № 3. – P. 109152.
163. Zou, T. Haploid induction via unfertilized ovary culture in watermelon / T. Zou, H.N. Su, Q. Wu, X.W. Sun // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2018. – V. 135., № 3. – P. 179-187.

Приложения
Приложение А

Таблица А – Составы питательных сред

Компоненты, мг/л		CBM		MS	B5	MSm	Va, мл
Stock 1	NH ₄ NO ₃	450		1650	–	412,5	50
	KNO ₃	950		1900	2500	2496,3	
	CaCl ₂ ×2H ₂ O	160		440	150	332,2	
	KH ₂ PO ₄	75		170	–	170	
	CaNO ₃ ×4H ₂ O	25		–	–	–	
	NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O	19		–	150	–	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	17,5		–	134	–	
	KCl	3,5		–	–	–	
Stock 2	H ₃ BO ₃	4		6,2	3	6,2	5
	MnSO ₄ ×4H ₂ O	20		22,3	10	24,1	
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	4		8,6	2	10,6	
	KI	0,7		0,83	2,5	0,83	
	Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,2		0,25	0,3	0,25	
	CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,016		0,025	0,025	0,025	
	CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,016		0,025	0,025	0,025	
Stock 3	MgSO ₄ ×7H ₂ O	185		370	250	370	10
Stock 4	FeSO ₄ ×7H ₂ O	27,8		27,8	30	27,8	10
	Na ₂ ЭДТА×2H ₂ O	37,3		37,3	36	37,3	
Stock 5		Индукция	Регенерация				1
	Thiamine × HCl	1	1,5	0,1	10	3	
	Glycine	0,1	0,2	2	–	–	
	Nicotinic acid	1	1,5	0,5	1	5	
	Pyridoxine × HCl	2	3	0,5	1	0,5	
	Biotin	0,05	1	–	–	–	
	Inositol	80	100	100	100	100	
	Ascorbic acid	–	20	–	–	–	
	L-Proline	–	100	–	–	–	

