

Оригинальные статьи / Original articles

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-6-3-9>  
УДК 635.53:573.6

Домблидес Е.А.<sup>1\*</sup>,  
Шмыкова Н.А.<sup>2</sup>,  
Белов С.Н.<sup>1</sup>,  
Коротцева И.Б.<sup>1</sup>,  
Солдатенко А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный научный центр овощеводства" (ФГБНУ ФНЦО) 143072, Россия, Московская область, Одинцовский район, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д. 14  
\*E-mail: Edomblides@mail.ru

<sup>2</sup> ООО "Ифар" (Инновационные фармакологические разработки) Россия, Томск

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Домблидес Е.А., Шмыкова Н.А., Белов С.Н., Коротцева И.Б., Солдатенко А.В. Получение ДН-растений огурца (*Cucumis sativus* L.) в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*. Овощи России. 2019;(6):3-9. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-6-3-9>

**Поступила в редакцию:** 12.11.2019  
**Принята к печати:** 18.11.2019  
**Опубликована:** 25.11.2019

Elena A. Domblides<sup>1\*</sup>,  
Natalya A. Shmykova<sup>2</sup>,  
Sergey N. Belov<sup>1</sup>,  
Irina B. Korotseva<sup>1</sup>,  
Alexey V. Soldatenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Scientific Vegetable Center (FSBSI FSVC) 14, Selectsionnaya str., VNISSOK, Odintsovo district, Moscow region, Russia, 143072  
\*E-mail: Edomblides@mail.ru

<sup>2</sup> LLC 'IPHAR' Tomsk, Russia

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**For citation:** Domblides E.A., Shmykova N.A., Belov S.N., Korotseva I.B., Soldatenko A.V. DH-plant production in culture of unpollinated ovules of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Vegetable crops of Russia*. 2019;(6):3-9. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-6-3-9>

**Received:** 12.11.2019  
**Accepted for publication:** 18.11.2019  
**Accepted:** 25.11.2019

# Получение ДН-растений огурца (*Cucumis sativus* L.) в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*



## РЕЗЮМЕ

**Актуальность.** Приоритетным направлением в селекции огурца (*Cucumis sativus* L.) является создание гибридов F<sub>1</sub>, которые отличаются от сортов высокой урожайностью, выравненностью растений по срокам созревания, размерам и качеству продуктивных органов. Целью данного исследования являлась оптимизация условий индукции гиногенеза в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* для расширения спектра формообразования и ускоренного создания гомозиготных линий.

**Материалы и методы.** В исследование были включены восемь перспективных коллекционных образцов огурца лаборатории селекции и семеноводства тыквенных культур ФГБНУ ФНЦО. В ходе экспериментов использовали протокол получения удвоенных гаплоидов для культур семейства *Cucurbitaceae* в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*, разработанный в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦО. Для индукции гиногенеза использовали питательную среду ИМС с 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара, 200 мг/л ампициллина и 0,2 мг/л тидиазурана (ТДЗ).

**Результаты.** Оптимальным для введения в культуру является полураскрывшийся бутон или цветок в утренние часы. Наибольшее количество эмбриоподобных структур у изученных генотипов образуется из бутонов с размером завязи 2,1-2,6 см. Нахождение в стерилизующем растворе гипохлорита натрия в течение 15 минут способствует размягчению стенок завязи, в результате чего семяпочки удаётся извлекать более легко и менее травматично. Повреждение семяпочки при выделении ее из завязи ингибирует гиногенез. Индуцировать образование эмбриоидов и каллуса удалось у всех восьми включенных в исследование образцов огурца, а получить полноценные растения только из шести образцов. Всего было получено 26 растений. Максимальная индукция гиногенеза наблюдалась у образца "1810" и составляла 63,1%. Максимальное количество растений – 12 штук было получено у образца "1763", а у образца "1807" наблюдался наибольший выход растений от числа индуцированных семяпочек – 7,7%.

**Ключевые слова:** Огурец (*Cucumis sativus* L.), ДН-растения, культура неопыленных семяпочек *in vitro*, гиногенез, гаплоиды огурца, гомозиготные линии

# DH-plant production in culture of unpollinated ovules of cucumber (*Cucumis sativus* L.)

## ABSTRACT

**Relevance.** The development of F<sub>1</sub> hybrids distinguishing it from cultivars by high productivity, plant uniformity in ripening date, fruit sizes and quality is the promising trend in breeding program in cucumber (*Cucumis sativus* L.). The aim of the study was to optimize the gynogenesis induction condition in culture of unpollinated ovules *in vitro* in order to broad the generation of new breeding forms and to accelerate homozygous line production.

**Materials and methods.** Eight promising cucumber accessions from Laboratory of Cucurbit Breeding and Seed Production (FSBSI FSVC) were taken for the study. The protocol developed in Laboratory of Biotechnology (FSBSI FSVC) for production of doubled haploid in Cucurbitaceae family was used in the experiment. The medium IMC with 30 g/L sucrose and 7g/L agar supplemented with 200 mg/L ampicillin and 0.2 mg/L thidiazuron (TDZ) was applied to induce gynogenic development.

**Results.** The half-open bud or flower was shown to be the most suitable to be taken as an explant for cultivation. Highest number of embryo-like structures in all accessions developed from ovaries 2.1-2.6 cm long. Exposure to sterilization solution of sodium hypochlorite for 15 min made ovary wall softer and ovules can be then easily extracted without traumatizing. The traumatized ovule resulted in inhibited gynogenic development. Embryooids and calli had developed in all studied cucumber accessions, but well-formed plants were only obtained in six accessions. In total 26 plants were produced. The maximum gynogenesis induction equal to 63.1% was achieved in accession 1810. Maximum number of plant produced was twelve in accession 1763, but the greatest plant outcome 7.7% of the ovules with induced gynogenesis was observed in accession 1807.

**Keywords:** cucumber, *Cucumis sativus* L., DH-plants, culture of unpollinated ovules *in vitro*, gynogenesis, haploids of cucumber, homozygous lines.

**Введение**

Огурец (*Cucumis sativus* L.), принадлежащий к семейству тыквенных (*Cucurbitaceae*), является одним из наиболее широко культивируемых и экономически важных овощей. Использование теплиц в производстве овощей сделало огурец одной из основных овощных культур и способствовало замещению сортов гибридами, как за рубежом, так и в России. В современной селекции овощных культур сформировалось и получило приоритетное направление создание гибридов F<sub>1</sub>, которые отличаются от сортов высокой урожайностью, выравниваемостью растений по срокам созревания, размером и качеством продуктивных органов. Основой селекционного процесса при создании гибридов является выведение родительских линий, в результате скрещивания которых получают гибридные семена. Для ускорения селекционного процесса и создания полностью гомозиготных родительских линий в течение одного года необходимо использование биотехнологических методов получения удвоенных гаплоидов (DH-растений). Экспериментально получить удвоенные гаплоиды огурца можно тремя способами:

1. при использовании индуцированного партеногенеза *in situ* (опыление неполноценной (облученная или обработанная химическими веществами) пыльцой);
2. андрогенеза (культуры пыльников/микроспор *in vitro*);
3. гиногенеза (культура неопыленных семяпочек *in vitro*).

Основные достижения по получению удвоенных гаплоидов у огурца за последние 30 лет были освещены в ряде обзоров, где разбираются основные преимущества и ограничения каждого из методов (Przyborowski, 1996; Gałazka, Niemirowicz-Szczytt, 2013; Dong et al., 2016; Домблидес и др., 2019).

Эффективность этих методов невысокая, при этом всегда надо учитывать, что генотип донорного растения для всех трех технологий будет играть определяющую роль. В природе гаплоиды самопроизвольно образуются у огурца с очень низкой частотой: на тысячу семян обычно образуется менее одного гаплоидного зародыша (Aalders, 1958), при этом известно, что в одной завязи содержится от 300 до 650 семяпочек. С помощью партеногенеза максимально можно получить до 4,8 гаплоидных эмбрионов/завязь (Çagalar, Abak, 1999b). А для большинства генотипов при опылении завязей γ-облученной пыльцой выход составляет от 0,19 до 1,2 эмбриоида на плод (Przyborowski, Niemirowicz-Szczytt, 1994; Gałazka et al., 2015). Наилучший достигнутый результат для культуры пыльников составил до 3 эмбриоида на 1 культивируемый пыльник и 0,93 DH-растения/пыльник (Song et al., 2007). При использовании гиногенеза *in vitro* результаты несколько ниже, в опубликованном патенте US Patent 5492827 эффективность разработанной технологии составляет 240 эмбриоидов из 300 завязей огурца (то есть 0,8 эмбриоидов на 1 завязь) (Dirks, 1996). Однако этот достаточно низкий выход не мешает в зарубежных селекционных компаниях получать удвоенные гаплоиды огурца по этой технологии в промышленных масштабах. Большинство же исследований, связанных с использованием культуры неопыленных семяпочек *in vitro*, носят только экспериментальный характер, и полученный результат возможно повторить лишь на определенных генотипах огурца. Diao et al., 2009 сообщили, что смогли добиться на огурце наибольшего процента индукции гиногенеза в семяпочках (89,4%) и максимального процента регенерации (9,0%). При этом им удалось получить из 366 культивируемых завязей 33 растения, что составляет 0,09 растений на 1 завязь. Li et al., (2013) сообщили об образовании эмбриоидов с частотой 12,4% (0,12 эмбриоидов на 1 культивируемую завязь. Другие исследователи смогли получить до 9 эмбриоидов и одно растение огурца из 18 культивируемых завязей, что составит 0,5 эмбриоидов и 0,05 растений на 1 культивируемую завязь (Ozsap et al., 2017). Наилучший результат был получен в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦО (ВНИИССОК), где удалось достичь индукции гиногенеза у одного из образцов до 62,9% (Шмыкова, Супрунова, 2009) и получить до 20 растений из одной завязи (Шмыкова и др., 2015; Домблидес и др., 2019; Domblides et al., 2019). Однако применительно к другим генотипам

выход удвоенных гаплоидов оставался значительно ниже, и разработанная технология нуждалась в дальнейшей модификации.

**Целью данного исследования** является оптимизация условий индукции гиногенеза в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* у генотипов огурца из коллекции лаборатории селекции и семеноводства тыквенных культур ФГБНУ ФНЦО для создания гомозиготных линий и расширения спектра формообразования.

**Материалы и методы исследования**

**Растительный материал и условия выращивания донорных растений.** В работе использовали селекционные образцы огурца из коллекции лаборатории тыквенных культур ФГБНУ ФНЦО. Донорные растения выращивали в 2018-2019 годах в условиях вегетационной камеры при 23°C и фотопериоде 16 ч день/8 ч ночь, освещенности 9 тыс. люкс.

Женские бутоны, находящиеся на стадии 1 сутки до распускания цветка, с вечера изолировали с использованием колпачка из пергаментной бумаги и на следующий день рано утром срывали в фазе полураскрывшегося цветка. Сбор бутонов и закладку опытов производили с середины февраля по середину сентября, с растений, возраст которых не превышал 10 недель.

**Стерилизация эксплантов.** С женских бутонов удаляли околоцветник и промывали под струей водопроводной воды с коммерческим моющим средством «АОС» в течение 5 минут. Поверхностную стерилизацию проводили 30 с в 96% этаноле, затем в течение 15 мин в 50% водном растворе коммерческого препарата «Белизна» с добавлением Твина-20 (1 капля на 100 мл), с последующим трехкратным промыванием в течение 10 мин в стерильной дистиллированной воде. Завязи помещали на стерильную влажную фильтровальную бумагу и сохраняли в стерильных условиях в стеклянных чашках Петри диаметром 11 см.

**Культура неопыленных семяпочек.** После стерилизации завязи разрезали скальпелем и выделяли семяпочки с помощью препаровальных игл под стереомикроскопом Carl Zeiss при x10 увеличении в стерильном ламинарном боксе.

Для индукции гиногенеза использовали питательную среду IMC (Induction Medium for Cucurbitaceae – разработанная в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦО (ВНИИССОК)) с минеральной основой МСм (Masuda et al., 1981) с добавлением аминокислот (100 мг/л пролина, 100 мг/л серина, 800 мг/л глутамина) и витаминов прописи среды NLN (Lichter, 1982) 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара, 200 мг/л ампициллина и 0,2 мг/л тидиазурона (ТДЗ). Культивирование проводили на стеллажах с люминесцентными лампами при 25°C и фотопериоде 16 ч день/8 ч ночь, освещенности 3,5 тыс. люкс.

**Получение растений-регенерантов.** Нормально развитые образовавшиеся эмбриоиды переносили на безгормональную среду МС (Murashige and Skoog, 1962) с 2% сахарозой и 3 г/л фитогеля. Эмбриоподобные структуры зеленого цвета, образовавшиеся из семяпочек, переносили на регенерационную среду СВМ (Gemes-Juhasz et al., 2002), дополненную источником железа (FeSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O – 27,8 мг/л и Na<sub>2</sub>ЭДТАх2 H<sub>2</sub>O – 37,3 мг/л), с 2% сахарозой, 3 г/л фитогеля, 0,05 мг/л НУК и 0,2 мг/л БАП, а через 5-6 недель, после формирования точек роста и нормально развитых побегов, для укоренения помещали на безгормональную среду МС с 2% сахарозой и 3 г/л фитогеля. Культивирование проводили на стеллажах с люминесцентными лампами при 25°C и фотопериоде 16 ч день/8 ч ночь, освещенности 3,5 тыс. люкс.

**Выращивание растений-регенерантов.** Растения с нормально развитыми листьями и корневой системой переносили в вегетационные сосуды, заполненные смесью торфа и перлита (7:3), накрывали перфорированными пластиковыми стаканчиками для адаптации растений к условиям *in vivo*. Выращивали растения-регенеранты в климатической камере при режиме 25°C круглосуточно, 16 ч день/8 ч ночь, освещение 9000 люкс.

**Статистический анализ.** Обработку экспериментальных данных проводили с использованием общепринятых



математико-статистических методов с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel и Statistika 6.0

### Результаты

**Подбор оптимального режима поверхностной стерилизации эксплантов.** Для исследования использовались образцы огурца, выращенные в вегетационной камере. На первом этапе работы необходимо было добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. В связи с этим большое значение при отработке методики получения удвоенных гаплоидов имел этап стерилизации. Традиционно в нашей лаборатории мы используем 96% этанол и раствор гипохлорита натрия для стерилизации растительных эксплантов, подбирая для каждой культуры время воздействия и концентрацию. В последнее время для этих же целей мы стали использовать и противомикробные препараты, а именно  $\beta$ -лактамы антибиотики. Антибиотики достаточно часто используют для стерилизации растительных эксплантов (Okkel, Pederson, 1988; Simmonds, Grainger, 1993; Lin et al., 1995; Grewal et al., 2006; Yu, Wei, 2008). Однако спектр действия используемых в культуре *in vitro* антибиотиков чрезвычайно широк и ограничивается не только их стерилизующей функцией. В литературе имеются сведения как о положительном влиянии антибиотиков на рост культивируемых тканей и морфогенез (Данилова, Долгих, 2004; Meng et al., 2014; Grzebelus, Skor, 2014), так и об их фитотоксическом действии (Pollock et al., 1983). Исследования в нашей лаборатории показали, что введение антибиотиков в состав питательной среды способствует не только угнетению роста инфекции, но и большему образованию эмбриоидов в культуре микроспор *in vitro*. При этом для капусты белокочанной использование в среде ампициллина увеличивало выход эмбриоидов в некоторых генотипах (Минейкина, 2018), а для моркови столовой наилучшие результаты были получены при использовании цефотаксима (Вюртц и др., 2017). В предварительных исследованиях нами было определено влияние добавления в состав питательной среды ампициллина по сравнению с цефотаксимом для индукции гиногенеза у культур семейства *Cucurbitaceae* в культуре неопыленных семян *in vitro* (неопубликованные данные).

В результате серии опытов был подобран эффективный режим ступенчатой поверхностной стерилизации с использованием 96% этанола и 50% водного раствора коммерческого препарата «Белизна», который оказался эффективным и в сочетании с добавлением в питательную среду ампициллина в концентрации 200 мг/л обеспечил 100% выход неинфицированных жизнеспособных эксплантов.

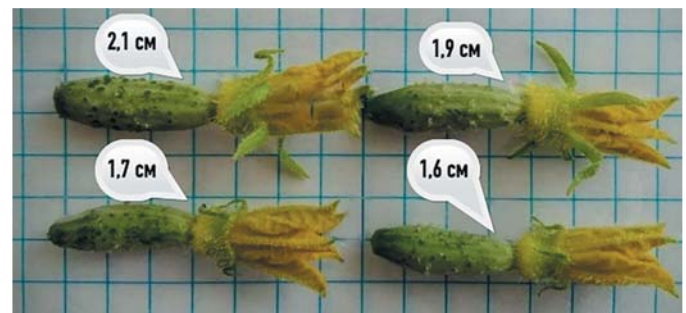
Также было отмечено, что для получения стерильной культуры, для образцов, выросших в вегетационной камере, достаточно стерилизации в водном растворе коммерческого препарата «Белизна» в течение 5-7 мин, однако более длительное нахождение в стерилизующем растворе (до 15 мин) способствует размягчению стенок завязи, в результате чего семяпочки удается извлекать более легко и без травмирования. Увеличение времени нахождения завязей в

Таблица 1. Индукция гиногенеза при различном режиме стерилизации бутонов огурца \*  
Tables 1. Gynogenesis induction in different modes of ovary sterilization\*

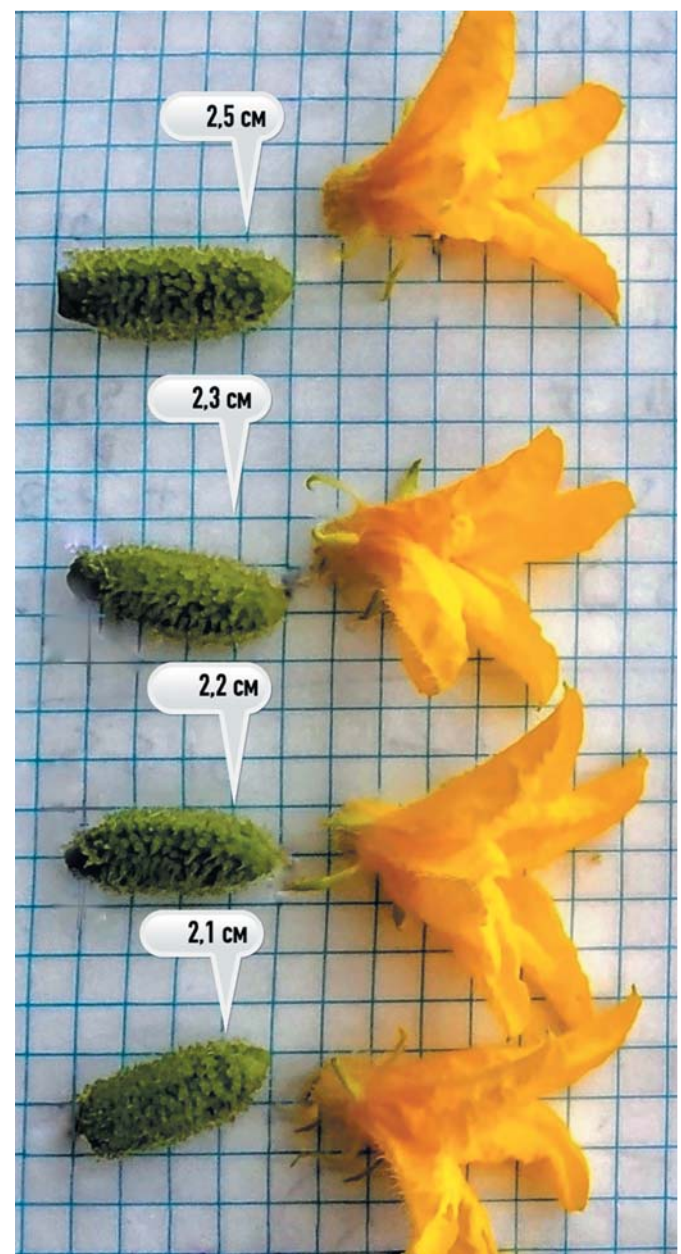
Сортообразец	Доля индуцированных семяпочек, %	
	время стерилизации 7 минут	время стерилизации 15 минут
"1697/10"	35,5±1,5	33,7±1,6
"1763"	34,3±1,8	37,8±2,9
"1811"	27,2±6,2	32,1±7,7

\*опыт проведен в трехкратной повторности  
\*experiment carried out in the triple replication

стерилизующем растворе с гипохлоритом натрия, при последующем трехкратном промывании в большом объеме стерильной дистиллированной воды, не оказывало токсического воздействия на индукцию гиногенеза (табл. 1).



А



Б

Рис. 1. Размер завязи бутонов огурца из разных узлов индивидуального растения  
Fig. 1. Cucumber ovary sizes from different nodes of individual plant

Примечание: А. группа бутонов женских цветков с завязями маленького размера; Б. группа полуотпустившихся женских цветков с завязями большого размера  
Note: А. Female ovaries of small size; Б. Half-open female flowers with large ovaries

**Оптимальная стадия развития женского гаметофита для индукции гиногенеза.** Одним из критических факторов, влияющих на индукцию гиногенеза, является правильная идентификация оптимальной стадии развития женского гаметофита для введения в культуру *in vitro*. У культур семейства Cucurbitaceae зародышевый мешок образуется по *Polygonium*-типу. Мегаспорогенез или первые этапы мегagamетогенеза начинаются за 3-4 дня до распускания цветка. Зародышевый мешок полностью созревает и готов к оплодотворению через несколько часов после раскрытия цветка. По литературным данным, оптимальной стадией для введения в культуру *in vitro* является почти зрелый, либо полностью зрелый зародышевый мешок. Gémes Juhász et al. (2002), проводившие цитологическое изучение развития зародышевого мешка огурца, считают, что оптимальным является время за 6 часов до распускания цветка, в это время зародышевый мешок обычно восьмиядерный, хотя иногда встречаются и четырехядерные мешки. Li et al. (2013) изучали влияние стадии развития завязи огурца при введении в культуру *in vitro*. Было установлено, что лучшее время для введения экспланта в культуру - за одни сутки до распускания цветка, в случае если сбор был проведен раньше на 12 часов, то происходит снижение количества отозвавшихся семяпочек почти в девять раз. Ориентироваться на фазу развития, используя такой показатель, как время распускания цветка, очень сложно, так как у огурца цветки обычно распускаются до 11 часов дня и, следовательно, период за шесть часов до распускания цветка это 5 часов утра. Несколько сместить время распускания можно, используя для выращивания донорных растений климатическую камеру с регулируемым фотопериодом. По данным лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦО, для большинства тыквенных культур оптимальным является полураскрывшийся бутон или цветок в утренние часы (Шмыкова, Супрунова, 2009; Шмыкова и др., 2015; Domblides et al., 2019). В связи с этим бутоны необходимо изолировать с вечера, а рано утром срывать.

Размер завязи полураскрывшегося бутона в пределах одного генотипа и даже растения может варьировать. Этот показатель будет отличаться у бутонов, расположенных в разных узлах на растении (рис. 1), и зависеть от количества женских бутонов, образовавшихся в одном узле. Проведенные нами исследования показали, что из бутонов большего размера, количество образовавшихся эмбриопо-

добных структур будет выше (табл. 2). Возможно, это связано с тем, что в более крупных бутонах семяпочки тоже будут большего размера, следовательно, их несколько проще извлекать без травмирования. По нашим наблюдениям, даже незначительное травмирование семяпочки ингибирует гиногенез.

Следует отметить, что при оптимальном размере бутона общий выход эмбриоподобных структур у большинства генотипов составил в среднем около 30% от общего числа семяпочек. При меньших размерах завязи этот показатель у трех из четырех изученных генотипов был ниже почти в два раза, исключение составил образец «1808», у которого и при размерах завязи 1,6-2,0 см он составлял 30,4%.

**Способ введения в культуру *in vitro*.** При создании технологии получения удвоенных гаплоидов огурца обычно используется два разных способа введения в культуру *in vitro*. В первом случае молодая завязь огурца после поверхностной стерилизации разрезается продольно (Gémes Juhász et al., 2002; Li et al., 2013; Tantasawat et al., 2015; Sorntip et al., 2017; Ozsan et al., 2017) или поперечно (Diao et al., 2008; Moqbeli et al., 2013; Ozsan et al., 2017) на фрагменты, которые сразу же помещают на индукционную питательную среду, и только после трех-четырех недель культивирования развившиеся семяпочки (либо образовавшийся из них каллус и эмбриониды) извлекают и пересаживают на свежую питательную среду для последующей регенерации из них растений. Во втором случае, семяпочки сразу выделяют из молодой завязи огурца и помещают на индукционную питательную среду (Шмыкова, Супрунова, 2009; Plarung et al., 2014 a,b; Tantasawat et al., 2015; Шмыкова и др., 2015; Domblides et al., 2019).

Проведенные нами исследования показали, что при введении в культуру *in vitro* фрагментов завязи большая часть семяпочек травмируется и не способна в дальнейшем формировать эмбриоподобные структуры. Кроме того, происходит быстрое разрастание соматических тканей, которые сдавливают развивающиеся семяпочки (рис. 2). Получить эмбриониды при введении в культуру фрагментов завязей нам не удалось.

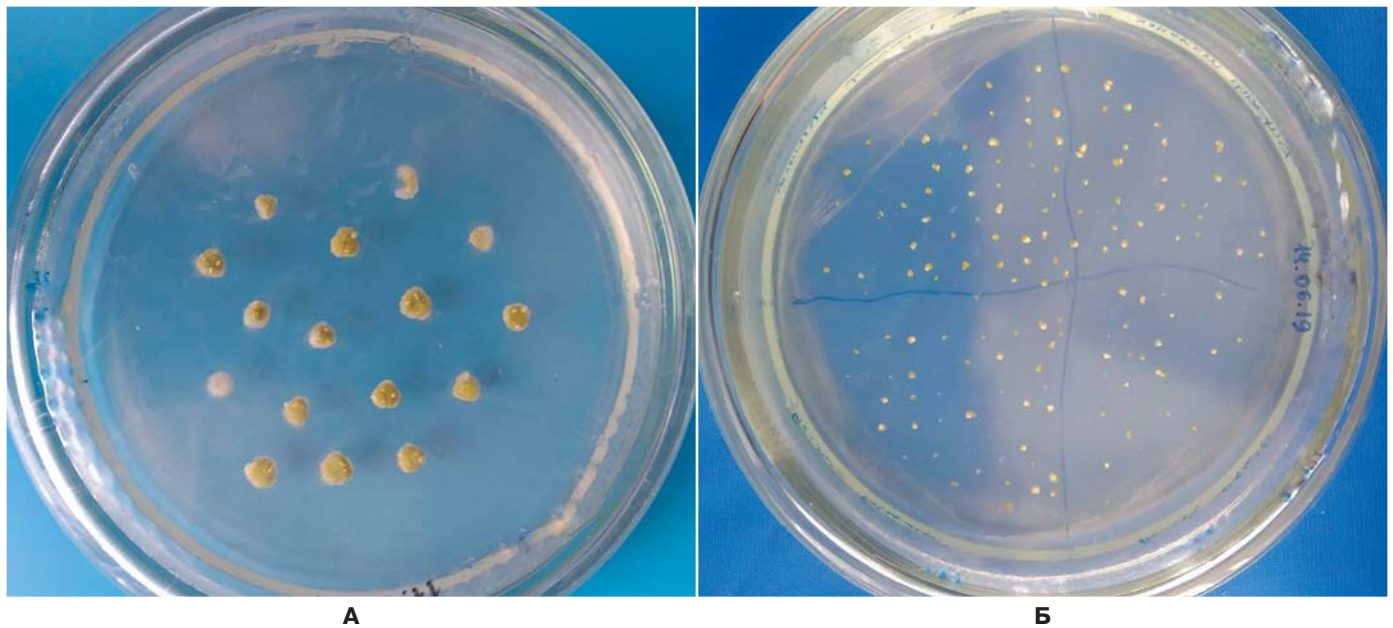
Выделение семяпочек из завязи сразу после этапа стерилизации представляет собой достаточно трудоемкий процесс, требующий определенных навыков. Подготовленный специалист выделяет в среднем 50 семяпочек за 40-60 мин. При этом особенно важно правильно

**Таблица 2. Индукция гиногенеза в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*, выделенных из завязей разного размера**  
**Table 2. Gynogenesis induction in culture of unpollinated ovules *in vitro* extracted from ovaries of different sizes**

Генотип	Размер завязи, см	Выделенных семяпочек*, шт	Количество индуцированных семяпочек всего, шт	Среднее количество образовавшихся эмбриоподобных структур/на одну чашку Петри, шт
«1808»	1,6-2,0	250	76	15,2
	2,1-2,6	250	98	19,6
НСР <sub>05</sub>				6,01
«1809»	1,7-2,0	250	32	6,4
	2,1-2,6	250	78	15,6
НСР <sub>05</sub>				4,32
«1810»	1,6-2,0	250	24	4,8
	2,1-2,6	250	56	11,2
НСР <sub>05</sub>				2,98
«1811»	1,7-2,0	250	44	8,8
	2,1-2,5	250	82	16,4
НСР <sub>05</sub>				6,68

\*5 чашек Петри по 50 семяпочек в каждой для каждого варианта  
 \*5 petri dish contain 50 each ovules for the each variant





**Рис.2.** Культивирование фрагментов завязи огурца и выделенных семяпочек на питательной среде в чашке Петри диаметром 10 см (14 суток культивирования).  
**Fig.2.** Growth of cucumber ovary parts and extracted ovules on the nutrition medium in petri dish (10 cm.) after 14 days of cultivation

разрезать завязь, так, чтобы при последующем выделении не травмировать семяпочки. Несмотря на сложности, только этот способ введения в культуру мы считаем эффективным.

**Эффективность получения удвоенных гаплоидов.** Генотип является одним из важнейших факторов, определяющих выход удвоенных гаплоидов по разработанной методике. Нам удалось оптимизировать основные этапы технологии и получить растения-регенеранты R0 в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* (рис.3). Отзывчивость образцов огурца, включенных в исследование в 2018-2019 году, значительно отличалась при использовании разработанной нами технологии (табл.3). Индуцировать образование эмбриоидов и эмбриогенного каллуса удалось у всех восьми включенных в исследование образцов огурца, а

получить полноценные растения только из шести образцов. Максимальная индукция гиногенеза наблюдалась у образца "1810" и составляла 63,1%, однако регенерировать полноценные растения у этого образца не удалось. Максимальное количество растений – 12 штук было получено у образца "1763", а у образца "1809" наблюдался наибольший выход растений в пересчете на 10 культивируемых завязей – 20 шт.

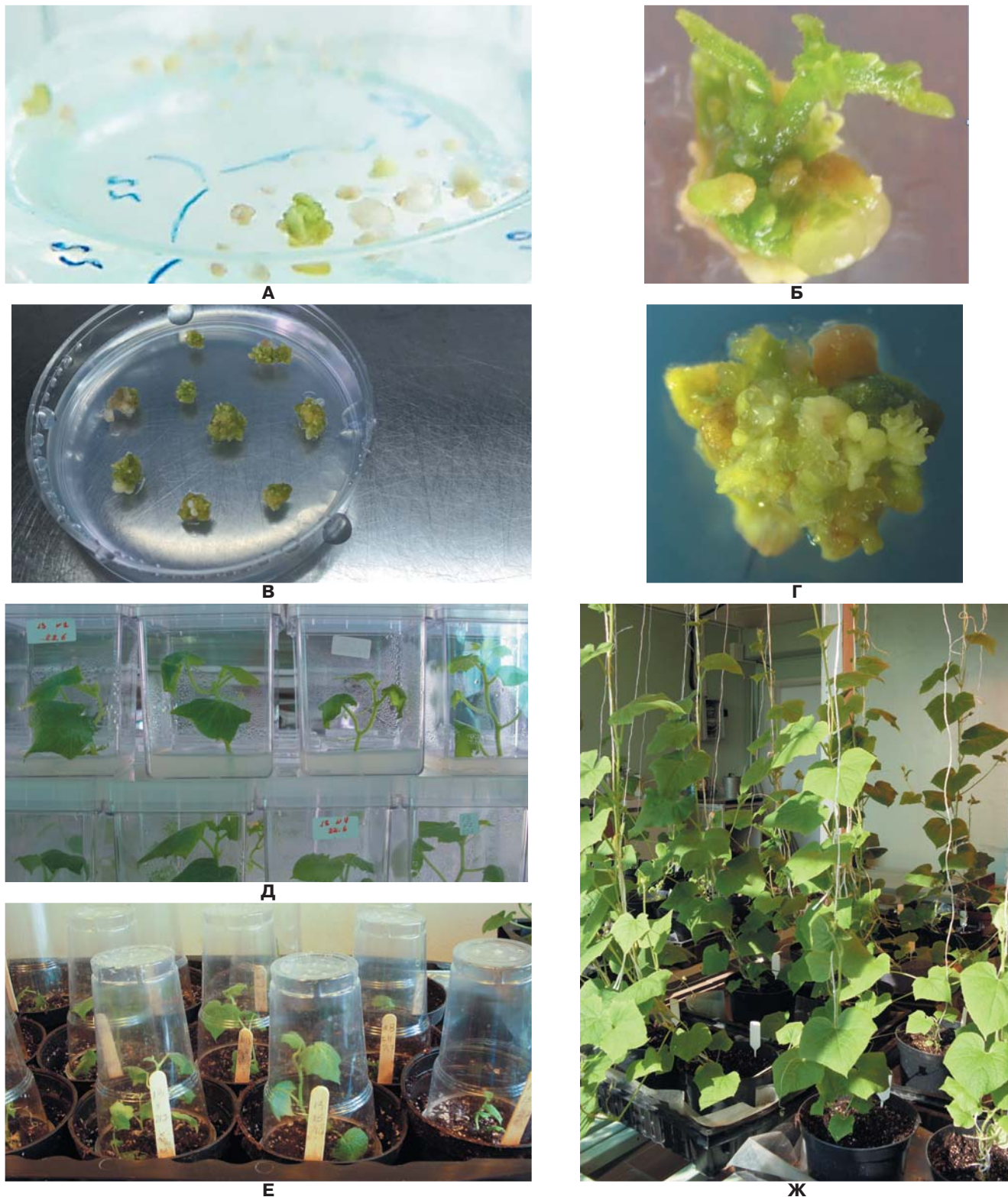
#### Заключение

При использовании индукционной питательной среды ИМС, разработанной специально для культур семейства Cucurbitaceae в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦО, нам удалось достичь индукции гиногенеза у всех включен-

**Таблица 3.** Отзывчивость различных сортообразцов огурца  
**Table 3.** Response of different cucumber accessions

Сортообразец	Количество завязей, шт	Выделенных семяпочек, шт	Количество индуцированных семяпочек, шт	Доля индуцированных семяпочек, %	Количество полученных растений, шт	Выход растений от числа индуцированных семяпочек, %	Выход растений/ на 10 завязей, шт
"1697/10"	5	386	131	33,6 ± 4,2c	3	2,3	7
"1763"	10	1212	468	37,0 ± 5,1c	12	2,6	12
"1806"	3	163	20	16,7 ± 10,4ab	0	0,0	0
"1807"	3	280	26	9,5 ± 1,2a	2	7,7	7
"1808"	4	349	236	60,4 ± 15,4d	3	1,3	8
"1809"	2	100	53	55,4 ± 19,6cd	4	7,5	20
"1810"	4	214	131	63,1 ± 18,9cd	0	0,0	0
"1811"	5	362	147	42,2 ± 12,1cd	2	1,4	4
НСР <sub>0,5</sub>				14,2			

Примечание: значения с одинаковыми буквами существенно не отличались при  $P \leq 0,05$   
 Note: the means with same letters have no significant difference at  $P \leq 0,05$



**Рис. 3. Получение растений-регенерантов R0 в культуре неопыленных семяпочек in vitro.**  
**А.** индукция гиногенеза через 4 недели культивирования на индукционной среде IMC с 3% сахарозой, 3 г/л фитогеля, 200 мг/л ампициллина и ТДЗ 0,2 мг/л.;  
**Б.** образование побега из индуцированной семяпочки;  
**В.** индуцированные семяпочки на регенерационной среде CBM с 2% сахарозой, 3 г/л фитогеля, 0,05 мг/л НУК и 0,2 мг/л БАП;  
**Г.** вторичный эмбриогенез из индуцированных семяпочек на регенерационной среде;  
**Д.** укоренение образовавшихся побегов на безгормональной среде MC с 2% сахарозой;  
**Е.** адаптация растений-регенерантов к условиям in vivo;  
**Ж.** растения-регенеранты R0  
**Fig. 3. Production of plants (R0) through culture of unpollinated ovules in vitro.**  
**A.** Gynogenic induction after 4 weeks of cultivation on the IMC medium with 3% sucrose, 3 g/L phytogel, 200 mg/L, ampicillin and 0.2 mg/L thidiazuron (TDZ);  
**B.** Shoot formation from induced ovule;  
**B.** Ovules with induced gynogenesis on regeneration medium CBM with 2% sucrose, 3 g/L phytogel, 0.05 mg/L NAA and 0.2 mg/L BAP;  
**Г.** Secondary embryogenesis from ovules with gynogenic development on the regeneration medium;  
**Д.** Root formation on the MS medium with 2% sucrose and without growth regulators;  
**E.** Adaptation of regenerated plants to in vivo condition;  
**Ж.** Regenerated plants (R0)



ных в исследование образцов. Основная проблема, с которой мы столкнулись, - это низкая регенерационная способность. При регенерации достаточно часто наблюдалось образование витрифицированных побегов и формирование растений с сильно укороченными междоузлиями. Использование безгормональной регенерационной среды не решало данную проблему. В нашем исследовании из 1212 индуцированных семяпочек, развились до полноценного растения, только 26, таким образом выход растений от числа индуцированных семяпочек у изученных образцов составил 2,1 %. Из двух сортообразцов получить растений нам так и не уда-

лось (образцы "1806" и "1810"), несмотря на то что у образца "1810" наблюдалась максимальная индукция гиногенеза. Регенерационная способность отличалась у различных сортообразцов и максимально составляла 7,7%. Дальнейшая оптимизация этапа регенерации позволит значительно увеличить выход удвоенных гаплоидов при использовании культуры неопыленных семяпочек *in vitro*. С практической точки зрения настоящие результаты, несмотря на различия между сортообразцами, являются многообещающими, потому что эмбрионная способность может быть эффективно увеличена с учетом описанных подходов.

#### Об авторах:

**Домблидес Елена Алексеевна** – кандидат с.-х. наук, зав. лаб. репродуктивной биотехнологии в селекции с.-х. растений, <https://orcid.org/0000-0002-2695-190X>

**Шмыкова Наталья Анатольевна** – начальник отдела ОФР, доктор с.-х. наук, проф. по специальности биотехнология

**Белов Сергей Николаевич** – м.н.с. лаб. репродуктивной биотехнологии в селекции с.-х. растений, <https://orcid.org/0000-0002-4387-9153>

**Коротцева Ирина Борисовна** – кандидат с.-х. наук, зав. лаб. селекции и семеноводства тыквенных культур, <https://orcid.org/0000-0001-5108-3289>

**Солдатенко Алексей Васильевич** – доктор с.-х. наук, проф. РАН, главный н.с., директор, <https://orcid.org/0000-0002-9492-6845>

#### About the authors:

**Elena A. Domblides** – Cand. Sci. (Agriculture), Head of Laboratory of Reproductive Biotechnology in Crop Breeding, <https://orcid.org/0000-0002-2695-190X>

**Natalya A. Shmykova** – Dr. Sci. (Agriculture), Director of OFR Department, Professor in Biotechnology

**Sergey N. Belov** – Junior Researcher of Laboratory of Reproductive Biotechnology in Crop Breeding, <https://orcid.org/0000-0002-4387-9153>

**Irina B. Korotseva** – Cand. Sci. (Agriculture), Head of Laboratory Cucurbits Crop Breeding and Seed Production, <https://orcid.org/0000-0001-5108-3289>

**Alexey V. Soldatenko** – Dr. Sci. (Agriculture), <https://orcid.org/0000-0002-9492-6845>

#### • Литература / References

1. Вюртц ТС, Домблидес ЕА, Шмыкова НА, Федорова МИ, Кан ЛЮ, Домблидес АС. Получение DH-растений в культуре микроспор моркови. *Овощи России*. 2017;(5):25-30. <https://doi.org/10.18619/2017-9146-2017-5-25-30> [Vjurts T.S., Domblides E.A., Shmykova N.A., Fedorova M.I., Kan L.J., Domblides A.S. PRODUCTION OF DH-PLANTS IN CULTURE OF ISOLATED MICROSPORE IN CARROT. *Vegetable crops of Russia*. 2017;(5):25-30. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2017-9146-2017-5-25-30>]
2. Домблидес ЕА, Белов СН., Солдатенко АВ., Пивоваров В.Ф. Получение удвоенных гаплоидов огурца (*Cucumis sativus* L.). *Овощи России*. 2019;(5):3-14 <https://doi.org/10.18619/2017-9146-2019-5-3-14>. [Domblides E.A., Belov S.N., Soldatenko A.V., Pivovarov V.F. Production of Doubled Haploids in cucumber. *Vegetable crops of Russia*. 2019;(5):3-14. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2017-9146-2019-5-3-14>]
3. Минейкина АИ. Создание исходного материала капусты белокочанной с использованием современных методов селекции: автореферат диссертации кандидата сельскохозяйственных наук. 2018;118. [Mineykina AI. Creation of the source material of white cabbage using modern selection methods: abstract of the dissertation of the candidate of agricultural sciences. 2018;118. (In Russ.)]
4. Супрунова НА, Шмыкова ТП. Индукция гиногенеза в культуре *in vitro* неопыленных семяпочек *Cucumis sativus* L. Гавриш. 2009;4:40-44. [Shmykova N.A., Suprunova T.P. (2009) An induction gynogenesis in culture *in vitro* not-pollinated seedbuds of *Cucumis sativus* L. Gavrish. 2009;4:40-44. (In Russ.)]
5. Шмыкова Н.А., Химич Г.А., Коротцева И.Б., Домблидес Е.А. Перспективы получения удвоенных гаплоидов растений семейства *Cucurbitaceae*. *Овощи России*. 2015;(3-4):28-31. <https://doi.org/10.18619/2017-9146-2015-3-4-28-31> [Shmykova N.A., Khimich G.A., Korotseva I.B., Domblides E.A. Prospective of development of doubled haploid plants of *Cucurbitaceae* family. *Vegetable crops of Russia*. 2015;(3-4):28-31. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2017-9146-2015-3-4-28-31>]
6. Данилова С.А., Долгих Ю.И. Стимуляция регенерации растений в культуре тканей кукурузы под действием антибиотика цефотаксима. Физиология растений. 2004;51(4):621-625. [Danilova SA, Dolgikh YI. The stimulatory effect of the antibiotic cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2004;51:559-562. (In Russ.)]
7. Aalders LE. Monoploidy in Cucumbers. *J. Heredity*. 1958;49(1):41-44.
8. Caglar G, Abak K. Obtention of *in vitro* haploid plants from *in situ* induced haploid embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Turk J Agric For*. 1999b;23(3):283-290.
9. Diao WP, Jia YY, Song H, Zhang XQ, Lou QF, Chen JF. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. *SciHortic*. 2008; 119(3):246-251.
10. Dirks R. Method for the production of double-haploid cucumbers. United States Patent. 1996. No. 5, 492,827.
11. Domblides EA, Shmykova NA, Khimich GA, Korotseva IB, Kan LY, Ermolaev AS, Belov SN, Korotseva KS, Domblides AS, Pivovarov VF, Soldatenko AV. Production of doubled haploid plants of Cucurbitaceae family crops through unpollinated ovule culture *in vitro*. VI International Symposium on Cucurbits. 2019; June 30/July 4, p.51.
12. Dong YQ, Zhao WX, Li XH, Liu XC, Gao NN, Huang JH, Wang WY, Xu XL, Tang ZH. Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. *Plant Cell Rep*. 2016;35:1991-2019.
13. Gałazka J, Niemirowicz-Szczytt K. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. *FoliaHort*. 2013;25(1):67-78.
14. Gałazka J, Słomnicka R, Gyrál-Radziszewska K, Niemirowicz-Szczytt K. Follination to DH-lines - verification and optimisation of protocol for production of double haploids in cucumber. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*. 2015;14(3):81-92.
15. Gemes-Juhász A, Balogh P, Ferenczy A, Kristof Z. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *PlantCellRep*. 2002;21(2):105-111.
16. Grewal D, Gill R, Gosal SS. Influence of antibiotic cefotaxime on somatic embryogenesis and plant regeneration in indica rice. *Biotechnology Journal*. 2006;1:1158-1162.
17. Grzebelus E, Skop L. Effect of  $\beta$ -lactam antibiotics on plant regeneration in carrot protoplast cultures. *In vitro Cell. Dev. Biol.* – Plant. 2014;50:568-575.
18. Li JW, Si SW, Cheng JY, Li JX, Liu JQ. Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus*. *BiolPlant*. 2013;57(1):164-168.
19. Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z Pflanzenphysiol*. 1982;105:427-434.
20. Lin JJ, Assad-Garcis N, Kuo J. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissue by *Agrobacterium tumefaciens* Cell. *Plant Sci*. 1995;109:171-177.
21. Matsuda K, Kikuta Y, Okazawa YA. Revision of the Medium for Somatic Embryogenesis in Carrot Suspension Culture. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ*. 1981;60:183-193.
22. Meng Q, Liu Z, Zhang Y, Liu C, Ren F, Feng H. Effects of antibiotics on *in vitro*-cultured cotyledons. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 2014;50:436-441.
23. Moqbeli E, Peyvast G, Hamidoghli Y, Olfati JA. *In vitro* cucumber haploid line generation in several new cultivars. *Aspac J molbiolbiotechnol*. 2013;21(1):18-25.
24. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15:473-497.
25. Okkels FT, Pedersen MG. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. *Acta Hort*. 1988;225:199-207.
26. Ozsan T, Gozen V, Onus A. Cucumber Gynogenesis: Effects of 8 Different Media on Embryo and Plant Formation. *International J. of Agriculture Innovations and Research*. 2017;6(2): 419-422.
27. Plapung P, Khamsukdee S, Potapohn N, Smitamana P. Screening for cucumber mosaic resistant lines from the ovule culture derived double haploid cucumbers. *Am J Agric Biol Sci*. 2014a; 9(3):261-269.
28. Plapung P, Khamsukdee S, Smitamana P. Development of cucumber lines resistant to Cucumber mosaic virus by ovule culture. *Int J Agric Technol*. 2014b;10(3):733-741
29. Pollock K, Barfield DG, Shields R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant Cell Rep*. 1983;2:36-39.
30. Przyborowski JA, Niemirowicz-Szczytt K. Main factors affecting cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo development and haploid plant characteristics. *PlantBreeding*. 1994;112:70-75.
31. Przyborowski JA. Haploidy in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *In vitro* haploid production in higher plants. Kluwer Academic Publishers.1996.
32. Simmonds JA, Grainger JL. The toxicity of antibiotics to protoplast cultures of *Triticum aestivum* L. *Plant Science*. 1993;89(2):209-214.
33. Song H, Lou QF, Luo XD, Wolukau JN, Diao WP, Qian CT, Chen JF. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Tiss Org Cult*. 2007; 90(3):245-254.
34. Sorntip A, Poolsawat O, Kativat C, Tantasawat PA. Gynogenesis and doubled haploid production from unpollinated ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Canadian Journal of Plant Science*. 2017;98(2):353-361.
35. Tantasawat PA, Sorntip A, Poolsawat O, Chaowiset W, Pornbungkerd P. Evaluation of factors affecting embryo-like structure and callus formation in unpollinated ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus*). *Int J AgricBiol*. 2015;17(3):613-618.
36. Yu Y, Wei ZM. Influences of cefotaxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos. *Biologia Plantarum*. 2008;52:553-556.