

Обзор / Review

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-5-3-14>
УДК 635.63:631.523:575.224.234

Домблидес Е.А.*,
Белов С.Н.,
Солдатенко А.В.,
Пивоваров В.Ф.

ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства»
143072, Россия, Московская обл., Одинцовский р-н, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д. 14
*E-mail: Edomblides@mail.ru

Ключевые слова: огурец (*Cucumis sativus* L.), DH-растения, культура неопыленных семян *in vitro*, гиногенез, партеногенез, андрогенез, гаплоиды огурца, гомозиготные линии.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Домблидес Е.А., Белов С.Н., Солдатенко А.В., Пивоваров В.Ф. Получение удвоенных гаплоидов огурца (*Cucumis sativus* L.). Овощи России. 2019;(5):3-14.
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-5-3-14>

Поступила в редакцию: 22.09.2019
Принята к печати: 12.10.2019
Опубликована: 25.10.2019

Elena A. Domblides,
Sergey N. Belov,
Alexey V. Soldatenko,
Victor F. Pivovarov

Federal State Budgetary Scientific Institution
Federal Scientific Vegetable Center (FSBSI FSVC)
14, Seleccionnaya str., Odintsovo district,
Moscow region, Russia, 143072
*E-mail: Edomblides@mail.ru

Keywords: *Cucumis sativus* L., DH-plant, isolated microspore cultivation *in vitro*, gynogenesis, parthenogenesis, androgenesis, homozygous lines.

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

For citation: 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/10.18619/2072-9146-2019-5-3-14>

Received: 22.09.2019
Accepted for publication: 12.10.2019
Accepted: 25.10.2019

Получение удвоенных гаплоидов огурца (*Cucumis sativus* L.)



РЕЗЮМЕ

Разработка и внедрение клеточных технологий существенно изменили селекционный процесс у сельскохозяйственных растений во всем мире. Производство чистых линий у сельскохозяйственных культур, особенно у перекрестноопыляемых растений, таких как огурец (*Cucumis sativus* L.), требует больших временных и трудовых затрат, а также и достаточных финансовых вложений. В связи с этим использование удвоенных гаплоидов (DH-растений) для получения полностью гомозиготных линий в течение одного года представляет большой интерес для современной селекции, в том числе у этой культуры. Важнейшим фактором, препятствующим использованию DH-растений в селекции огурца, является отсутствие эффективного способа их производства в больших масштабах. В обзоре представлены исторические факты и рассмотрены три основных способа получения удвоенных гаплоидов огурца: партеногенеза *in situ* (опыление неполноценной (облученная или обработанная химическими веществами) пыльцой); андрогенеза (культуры пыльников/микроспор *in vitro*); гиногенеза (культура неопыленных семян *in vitro*). Произведен сравнительный анализ публикаций с учетом эффективности используемых технологий, выявлены критические факторы, влияющие на выход гаплоидных и удвоенных гаплоидных растений, указаны преимущества и ограничения каждой из технологий.

Ключевые слова: (*Cucumis sativus* L.), DH-растения, культура микроспор *in vitro*, гиногенез, партеногенез, андрогенез, гаплоиды огурца, гомозиготные линии.

Production of Doubled Haploids in cucumber

ABSTRACT

Implementation of cell technologies has essentially improved the plant breeding process in agricultural crops in the world. The production of pure lines in cultivated crops, particularly among cross-pollinated species such as cucumber (*Cucumis sativus* L.) requires much time, labor and expense. Thus, the use of DH-plants for production of fully homozygous lines for one year becomes a very promising method for near cucumber breeding program. The major factor limiting the wide use of DH is a lack of effective protocol for large-scale plant production. In this review the historical facts with description of three main methods of DH-plant production were presented. By now these three methods have been such as parthenogenesis *in situ* induced by pollination with irradiated or chemically treated pollen; androgenesis *in vitro* including anther and isolated microspore cultivation *in vitro*; gynogenesis through ovule cultivation *in vitro*. Comparative analysis of published data with regard to the efficiency of the technology for DH-plant production was shown as well as advantages and limitations of each technology were described.

Keywords: *Cucumis sativus* L., DH-plant, isolated microspore cultivation *in vitro*, gynogenesis, parthenogenesis, androgenesis, homozygous lines.

Введение

Огурец (*Cucumis sativus* L.) является однолетним травянистым растением, принадлежащим к семейству тыквенных (*Cucurbitaceae* Juss) к роду *Cucumis* L. Согласно последним данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций (FAOSTAT 2017), огурец занимает 6-е место по посевной площади, 3-е – по производству, 4-е – по урожайности среди всех овощей, выращиваемых в мире, что составляет 28,7% от общего объема производства овощей в мире. Среди сельскохозяйственных культур семейства *Cucurbitaceae* на огурец приходится 52,2% всех убираемых площадей и 78,6% от общего производства продукции тыквенных культур в мире. В России огурец входит в пятерку самых выращиваемых культур, как в открытом, так и в защищенном грунте. По данным 2018 года, из 543,6 тыс. га, занятых под овощными культурами, огурец занимал 44,3 тыс. га. Урожайность огурца может быть значительно увеличена за счет использования гибридов, так как они демонстрируют высокий уровень гетерозиса – превосходство в продуктивности по сравнению с их родителями (инбредными / чистыми линиями) (Muluallem, Abate, 2016).

В случае *C. sativus* L. традиционные методы размножения часто требуют 6–8 лет самоопыления, чтобы получить инбредные родительские линии (Gémes Juhász et al., 2002). Использование гаплоидных технологий существенно повышает скорость селекции у этой культуры. Для получения полностью гомозиготной линии с использованием DH-технологии требуется не более одного года. Кроме того, селекционеры могут оценивать линии удвоенных гаплоидов (DH-линии) с большей скоростью, точностью и достоверностью, поскольку все гены у DH-растений находятся в гомозиготном состоянии, и рецессивные признаки видны, а не маскируются под действием доминантных генов. Гаплоидные и удвоенные гаплоидные растения также удобно использовать в генетических и фундаментальных исследованиях (Dong et al., 2016; Can et al., 2019). Например, Lofli и др. (2003) использовали гаплоидные и удвоенные гаплоидные растения в селекции для создания дыни с множественной устойчивостью к вирусным болезням. Gonzalo et al. (2005) использовали популяцию DH-линий для построения генетической карты дыни. Производство DH-растений является важным этапом в недавно разработанной технологии обратной селекции (Reverse breeding), где полученные рекомбинантно-инбредные популяции могут быть подвергнуты скринингу с помощью молекулярных маркеров, чтобы идентифицировать популяции с комплементарными комбинациями хромосом и дать возможность восстановить первоначального гетерозиготного родителя путем гибридизации двух DH-индивидуумов (Dirks et al., 2009). На определенных стадиях развития удвоенные гаплоиды могут использоваться в качестве удобных мишеней для индукции мутаций и трансформации, а также в качестве моделей для изучения регуляции клеточного цикла растений, деления клеток и этапов раннего эмбриогенеза.

Историческая справка об обнаружении гаплоидов и применения их в селекции. История удвоенных гаплоидов (Doubled Haploids – DHs) началась с обнаружения двух спорофитных гаплоидных растений *Datura stramonium* L. (дурман обыкновенный), о которых было сообщено в 1922 году в виде небольшого специального сообщения «A haploid mutant in the Jimson weed, «*Datura stramonium*»» в журнале «Science» (Blakeslee et al., 1922). В 1924 году Blakeslee A. F. и Belling J. выпустили уже большую статью, в которой представили фото гаплоидного растения, схему его образования, а также сообщили о возможности получения из него гомозиготной линии. В этой статье впервые делается вывод о практическом использовании гаплоидов, поскольку они предоставляют новый материал для ускоренного преобразования гетерогенного селекционного материала в чистую линию (Blakeslee, Belling, 1924). Вскоре за этим последовали аналогичные открытия гаплоидов у других видов, например, *Nicotiana tabacum* (Clausen, Mann, 1924), *Triticum compactum* (Gains, Aase, 1926), *Lycopersicon esculentum* (Lindstrom, 1929). В 1932 году была получена первая гомо-

зиготная линия томата, получившая коммерческое название "Supreme Marglobe" (Morisson, 1932). Многие ученые, занимающиеся генетикой растений, и селекционеры заинтересовались этим открытием и поняли перспективность его использования, возросло количество публикаций по гаплоидии (Карпеченко, 1935; Иванов, 1937; Kostoff, 1942). Так в 1932 году Н.И. Вавилов писал «...надлежит уделить особое внимание методике получения полиплоидных форм (амфидиплоидов и гаплоидов), изучению количественных и качественных различий у полиплоидов, наследственности признаков у полиплоидных форм и, наконец, разработке методики получения гомозиготных растений путем удвоения хромосом у гаплоидных, диплоидных и других форм» (Вавилов, 1932). Эти слова легли в качестве предисловия к монографии, написанную коллективом сотрудников кафедры генетики и дарвинизма Саратовского университета «Гаплоидия у покрытосеменных растений». Это была одна из первых в научной литературе крупных работ по гаплоидии, после одноименного обзора Kimber G. и Riley R., выпущенного в 1963 году (Kimber, Riley, 1963), где рассматривались генетические закономерности возникновения гаплоидов, их классификация, распространение, методы выявления и получения, результаты собственных исследований, а также вопросы генотипических и фенотипических изменений и экспериментальный мутагенез при переходе на гаплоидный уровень. В этой же работе был приведен самый полный на тот момент список видов (152 вида и 10 гибридных комбинаций), у которых были установлены гаплоиды, и обширная библиография по гаплоидии (Хохлов и др., 1970).

Большой интерес к гаплоидам повлек за собой организацию и проведение Первого международного симпозиума «Haploids in Higher Plants», который состоялся в Гуэлфе (Канада) в 1974 году (Kasha, 1974). В начале 1970-х был создан с использованием DH-линий сорт рапса (*Brassica napus*) Maris Naplona (Thompson, 1972), за ним последовало создание сорта Mingo у ячменя (*Hordeum vulgare*) в 1980 году (Ho, Jones, 1980).

Основные этапы технологий получения DH-растений, их преимуществ и трудности, с которыми сталкиваются исследователи, базовые протоколы более чем для 200 видов сельскохозяйственных растений освещены в ряде опубликованных обзоров (Maluszynski et al., 2003; Forster et al., 2007; Turaev et al., 2009; Dunwell, 2010; Germana, 2011). Список видов, у которых получены гаплоиды и удвоенные гаплоиды, постоянно пополняется, появляются новые обзорные публикации, посвященные гаплоидии, проводятся генетические и фундаментальные исследования на DH-линиях, создаются новые сорта и гибриды на основе линий удвоенных гаплоидов, в том числе и у овощных культур семейства *Cucurbitaceae*, куда относится и огурец.

Первые сообщения об обнаружении гаплоидов в семействе Cucurbitaceae (Тыквенные). Несмотря на то, что с момента описания первых гаплоидов в 1922 году, интерес к этой теме у генетиков и селекционеров резко возрос, и одно за другим стали появляться сообщения о спонтанном и индуцированном получении гаплоидов у различных сельскохозяйственных культур, первые сообщения об обнаружении гаплоидов в семействе *Cucurbitaceae* появились лишь в 50-х годах прошлого века и были крайне немногочисленными.

Первая публикация датируется 1954 годом, когда были обнаружены гаплоидные близнецовые зародыши в семенах, полученных от межвидовых скрещиваний *C. maxima* x *C. moschata*. Полученные из этих зародышей растения имели гаплоидный набор хромосом, что было подтверждено цитологическим анализом. По морфологическим признакам растения выглядели несколько меньше, чем диплоидная родительская форма. Также было отмечено, что мужские цветки при культивировании в поле отсутствовали и образовывались только в теплице. При этом пыльники в них были пустыми, белого или коричневого цвета. Женские же цветки формировались в изобилии и при опылении их нормальной пыльцой различных диплоидных растений завязывали плоды, однако семян в них обнаружить не удалось

(Hayase, 1954). Аналогичным способом впоследствии гаплоидные растения были получены у дыни при скрещивании *Cucumis melo* L. ($2n = 2x = 24$) с *Cucumis ficifolius* A. Rich ($2n = 4x = 48$), однако наблюдаемый уровень гаплоидии был низким, максимально можно было обнаружить до трех гаплоидных зародышей на 1000 семян. Однако эти показатели сильно зависели от генотипа и времени года (Dumas de Vaulx, 1979).

В 1958 году Aalders опубликовал статью, в которой описал изобретенный им простой метод обнаружения спонтанных гаплоидов (в своих статьях автор использовал термин – моноплоид (monoploids)) огурца. Он обнаружил, что диплоидные семена обычно тонут в воде, а вот из плавающих на поверхности семян можно извлечь зародыши, имеющие гаплоидное число хромосом. Впервые 13 гаплоидных растений огурца были получены им из эмбриоидов, извлеченных из нормальных флотирующих/плавающих в воде семян, при использовании технологии спасения зародышей в культуре *in vitro*. Для оценки уровня плоидности растений огурца он использовал фиксатор «Уксусный спирт» с последующим 20-ти минутным окрашиванием в горячем ацетокармине, а также использовал оценку с использованием размера замыкающих клеток устьиц листа (в эксперименте она составила 15,67 мкм для гаплоидных и 21,59 мкм для диплоидных растений). Только восемь растений из 13 смогли вырасти в теплице до цветущего состояния и перенести обработку точек роста водным раствором колхицина. Основной проблемой, с которой столкнулся автор в последующем, это получение потомства от самоопыления. У гаплоидов после обработки колхицином крайне редко образовывались мужские цветки с нормально сформированными пыльниками. За все время на растениях образовалось только четыре полноценных мужских цветка, но в силу отсутствия одновременно раскрывшихся женских цветков на растении (даже при хранении мужского цветка в холодильнике в течение 3 суток) для нормального опыления смогли использовать только один мужской цветок, давший начало двум плодам. Однако ни в одном из плодов, вызревших и внешне не отличающихся от нормальных, семена обнаружить не удалось. Несмотря на то, что в этом исследовании не удалось получить потомство от самоопыления гаплоидных растений, эта работа стала отправной точкой для дальнейших исследований по гаплоидии в семействе *Cucurbitaceae*. В этой работе были вскрыты основные проблемы, характерные для этого семейства и предложены некоторые пути их возможного решения. Способ отделения гаплоидов из флотирующих на поверхности воды семян, предложенный Aalders, до сих пор успешно используется с различными модификациями, как у огурца, так и у других культур семейства Тыквенные (Lofti, Salehi, 2008; Baktemur et al., 2013).

Известно, что гаплоиды самопроизвольно образуются у огурца с очень низкой частотой: на тысячу семян обычно образуется менее одного гаплоидного зародыша (Aalders 1958). Эта частота встречается у многих растений, но ее недостаточно для применения в селекционных программах, в связи с этим стали предприниматься попытки по индукции образования гаплоидов с применением различных химических и физических факторов и биотехнологических методов *in vitro*.

Одним из популярных в то время направлений было использование рентгеновских лучей (X-лучи) для индуцирования различных мутаций у растений. В 1958 году была опубликована работа, в которой описывалось образование у арбуза одной гаплоидной плети на растении, выращенном из семени, которое подверглось рентгеновскому облучению 48000 Р (48,000 r), в то время как остальные плети у растения были диплоидными. Листья и цветки на гаплоидной плети были меньшего размера, а стебель и лепестки были тоньше. Несмотря на предпринятые попытки опыления, получить плод на этой ветви не удалось (Swaminathan, Singh, 1958).

Современное состояние исследований по получению удвоенных гаплоидов огурца. Основные достижения по получению удвоенных гаплоидов у огурца за послед-

ние 30 лет были освещены в ряде обзоров (Przyborowski, 1996; Gałazka, Niemirowicz-Szczytt 2013; Dong et al., 2016).

В настоящее время гаплоидные и удвоенные гаплоидные растения в семействе *Cucurbitaceae* получают при использовании:

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

У каждого из этих способов есть свои преимущества и ограничения.

Партеногенез. В основе этой технологии получения удвоенных гаплоидов лежит индуцированный партеногенез *in situ*. Как правило, применяют опыление женских цветков облученной пыльцой с последующим выделением и помещением в культуру *in vitro* гаплоидных зародышей, образовавшихся за счет партеногенеза из яйцеклетки. В качестве источника облучения пыльцы чаще всего применяют γ -лучи (γ -облучение), используя в качестве источника облучения ^{60}Co и облучение ^{137}Cs (цезий использовался только в опытах с дыней (Lim, Earle, 2008; Lofti et al., 2003; Dal et al., 2016)), либо X-лучи (рентгеновское облучение). Имеется лишь одно сообщение об успешном использовании X-лучей в дозе 300 Гр. для индукции гаплоидов у огурца (Antos et al., 2001). Наибольшее распространение у культур семейства *Cucurbitaceae* получило использование γ -облучения с использованием ^{60}Co , поскольку его легко применить, оно обеспечивает благоприятное проникновение в ткани, индуцирует высокую скорость мутации и имеет низкую летальность по сравнению с другими видами облучения (Kurtar and Balkaya, 2010). Было доказано, что облучение является эффективным для индуцирования образования гаплоидов у тыквенных культур, но выход эмбриоидов остается нестабильным и зависит от влияния различных факторов, таких как генотип, сезон введения в культуру, условия окружающей среды и дозы облучения (Ficcadenti et al., 1995). Еще одним недостатком этого метода является и то, что исследователю приходится работать с источником излучения и требуется дополнительное оснащение оборудованием биотехнологических лабораторий.

Об успешном образовании гаплоидных эмбриоидов и растений при использовании технологии спасения партенокарпических зародышей, индуцированных опылением γ -облученной пыльцой у тыквенных культур, впервые было сообщено для дыни (Sauton & Dumas de Vaulx, 1987), а впоследствии она была применена и на огурце (Truong-Andre, 1988; Sauton, 1989; Niemirowicz-Szczytt & Dumas de Vaulx, 1989; Cagalar, Abak, 1999; Sztangret-Wisniewska et al., 2006; Smiech et al., 2008; Gałazka et al., 2015). Суммарные данные по использованию этого метода для получения удвоенных гаплоидов огурца представлены в таблице 1.

Облучению обычно подвергают либо мужские цветки (часто после удаления чашелистиков и лепестков), либо заранее изолированные пыльники. Обязательным условием является строгая изоляция женского цветка за сутки до распускания и сразу после опыления, чтобы избежать нежелательных скрещиваний. Одним из важнейших факторов, определяющих успех технологии, будет правильно подобранная доза облучения. На практике оптимальной чаще всего оказывается критическая доза или полулетальная доза (LD_{50} , то есть доза для ингибирования прорастания 50% пыльцы) (Dong et al., 2016). Дозы облучения не должны быть такими высокими, чтобы полностью ингибировать прорастание пыльцевых трубок, но в тоже время они должны быть достаточно высокими, чтобы нарушать нормальное оплодотворение и препятствовать образованию диплоидных гибридных эмбриоидов. В исследованиях чаще всего используют дозы облучения γ -лучами от 100 до 500 Гр., более высокие дозы оказываются не эффективными и приводят к снижению индукции образования гаплоидов огурца. В большинстве исследований оптимальной оказалось облучение от 100 до 300 Гр (Przyborowski, Niemirowicz-Szczytt 1994; Niemirowicz-Szczytt et al. 1995; Faris et al. 1999; Lofti, Salehi, 2008; Gałazka et al., 2015).

Через 3-5 недель после опыления облученной пылью плоды огурца созревали, и из образовавшихся семян можно было извлечь зародыши. Способ обнаружения и выделение гаплоидных эмбрионов также является важным этапом технологии. Наиболее распространенный метод – это проверка серии семян один за другим под стереомикроскопом. Эффективным способом обнаружения эмбрионов является применение рентгеновской радиографии семян – например, в семенах дыни и огурца, полученных при опылении женских цветков облученной пылью, сформировавшиеся гаплоидные эмбрионы могли быть определены с помощью рентгеновских лучей (Savin et al., 1988; Sauton, 1989; Deunff, Sauton, 1994; Claveria et al., 2005; Dolcet-Sanjuan et al., 2006). Однако использование дополнительного рентгеновского излучения снижает жизнеспособность образовавшихся зародышей и требует оснащения лаборатории дополнительным оборудованием. Lofti M. и Salehi S. в 2008 году провели исследование на образцах дыни, в котором сравнили трудозатраты по четырем основным методам, использующимся для обнаружения зародышей: «проверка серии семян один за другим под стереомикроскопом», «прямой посев семян в питательные среды», «осмотр семян под флуоресцентным источником света», «плавающие семена на жидких средах» и «плавающие семена на жидких средах после поверхностной стерилизации». При рассмотрении экономической эффективности (трудозатраты, затраченное время, микробные загрязнения, сохранность эмбрионов) наилучшими методами оказались «посев семян непосредственно в питательную среду CP (Chee et al., 1992)» и «осмотр семян под флуоресцентным источником света» (Baktemur et al., 2013).

Стадия развития, на которой находились зародыши при извлечении их из семян, могла быть от глобулярной до семязольной, что также влияло на последующее развитие зародыша во взрослое растение-регенерант и на конечный выход гаплоидов и удвоенных гаплоидов. Есть мнение, что низкая частота образования гаплоидных проростков может быть объяснена присутствием в семенах незрелых зародышей (Sauton, Dumas de Vaulx 1987), а также отсутствием эндосперма в семенах (Sauton, 1989). В то же время, эмбриологические исследования, проведенные на семенах огурца, выделенных из плодов, развившихся после опыления облученной пылью, выявили одновременное присутствие в них эндосперма и эмбрионов на ранних стадиях развития; однако эндосперм не был типичным и выглядел недоразвитым (Przyborowski, 1996). Также отмечалось, что у гаплоидных зародышей огурца семядоли могли быть различного размера, либо у зародыша могла присутствовать только одна из них (Faris et al., 1999). В связи с этим, без помещения таких незрелых и недоразвитых зародышей в питательную среду (технология спасения зародышей *in vitro*), получить проростки из них было бы невозможно. Sagalar G. и Abak K. (1999c) отмечали в своих исследованиях, что эмбрионы на сердцевидной стадии развития обладают наибольшей регенерационной способностью при помещении в культуру *in vitro*, по сравнению с более ранними стадиями развития зародыша, и именно эта стадия является оптимальной.

Состав питательной среды также влиял на успешное развитие эмбриона. Для культивирования недозрелых эмбрионов тыквенных культур, извлеченных из семян, на первом этапе обычно используются среды: CP (Chee et al. 1992), среда E20A (Sauton, Dumas de Vaulx 1987), среда MS (Murashige, Skoog 1962) или среда N6 (Chu et al. 1975). Для эмбрионов огурца наилучшие результаты были получены при использовании среды E20A. Sagal и Abak (1999c) в своих исследованиях отмечали, что гаплоидные зародыши огурца на среде E20A хорошо развиваются в проростки и могут быть легко клонированы. Claveria et al. (2005) добились очень хороших результатов (83% эмбрионов превратились в растения) при использовании среды E20H8, дополненной 0,011 мг/л IAA и 2,5 мг/л AgNO₃.

Большинство исследователей для успешного клонирования и укоренения образовавшиеся побеги огурца в фазе 5-7 листьев переносили на безгормональную среду MS. Для

размножения использовали черенкование побегов на сегменты, содержащие по одному междоузлию, которые также культивировали на среде MS (Przyborowski and Niemirowicz-Szczytt, 1994).

Анализ публикаций показал, что выход гаплоидов может зависеть и от сезона закладки опытов. Было отмечено, что летний сезон гораздо более благоприятен для развития гаплоидного зародыша, чем весна (Przyborowski and Niemirowicz-Szczytt, 1994). Çagalar и Abak (1999b, c) обнаружили, что большее количество гаплоидных растений огурца было получено из эмбрионов, культивируемых с мая по сентябрь, а наибольшее количество гаплоидных растений было получено в июне и июле. Точно также наибольшее образование партеногенных зародышей огурца было индуцировано опылением в период с мая по июль, в другие же месяцы выход гаплоидов был более нестабильным (Claveria et al. 2005).

Оценить эффективность разработанного метода можно по количеству полученных гаплоидных и удвоенных гаплоидных растений в пересчете на один использованный в исследовании плод/завязь. В своих исследованиях на огурце Sauton (1989) получил в среднем 0,9 гаплоидных эмбрионов на плод (завязь). Przyborowski и Niemirowicz-Szczytt (1994) смогли получить до 1,2 эмбрионов, а Çagalar G. и Abak K. (1999b) до 4,8 эмбриона/завязь. Galazka G. et al. (2015) разработали детальный протокол (от опыления до готовой ДН-линии) и смогли получить удвоенные гаплоидные растения от всех включенных в исследование образцов, однако выход оказался недостаточно высоким и составил от 0,19 до 0,59 эмбрионов на плод.

Технология получения удвоенных гаплоидов огурца с использованием опыления облученной пылью считается наиболее разработанной, удобной и обеспечивающей стабильный выход ДН-линий, по сравнению с технологиями получения в культуре пыльников/микроспор и неопыленных семяпочек *in vitro* (Gałazka, Niemirowicz-Szczytt 2013). Однако в последнее время большая часть исследований по получению удвоенных гаплоидов огурца посвящена изучению процессов андрогенеза и гиногенеза и разработке эффективных протоколов с использованием этих методов (Шмыкова и др., 2015; Dong et al., 2016).

Андрогенез. Под андрогенезом понимают способность мужского гаметофита под воздействием индуцирующих факторов в культуре *in vitro* переходить с гаметофитного пути развития на спорофитный с образованием эмбриона или андрогенного каллуса, из которых впоследствии возможна регенерация гаплоидных/удвоенных гаплоидных растений. Впервые на возможность массового получения гаплоидов при культивировании гаплоидных клеток и тканей растения с последующей регенерацией из них взрослых гаплоидных растений указал в 1949 году Chase S. и Troits B. (Chase, Troits, 1949). А в 1964 году из молодых пыльников с 2-3х клеточной пылью в культуре *in vitro* у двух видов дурмана (*Datura innoxia* и *Datura stramonium*) были получены эмбрионы, которые в дальнейшем дифференцировались в зародыши с двумя семядолями. Из этих зародышей впоследствии образовались проростки с гаплоидным числом хромосом (Guha, Maheshwari, 1964, 1966, 1967). После этих удачных экспериментов были предприняты попытки получения гаплоидов в культуре пыльников и у других видов. Eun J.S. и Bak H.B. в 1974 году сообщили об индукции каллуса в культуре изолированных пыльников огурца, но регенерировать растения им так и не удалось (Eun, Bak, 1974). В последующих немногочисленных исследованиях результат также ограничивался лишь получением каллуса из пыльников огурца (Lazarte, Sasser 1982; Dryanovska, 1985). Огурец считается плохо отзывчивой к андрогенезу культурой. И только в последнее время количество успешных работ по андрогенезу у тыквенных культур значительно увеличилось, и было изучено большое количество факторов (генотип, оптимальная стадия развития мужского гаметофита, температурные предобработки, состав питательной среды, ее консистенция (жидкая или твердая), оптимальное сочетание регуляторов роста, положение пыльника на питательной среде, температурный и световой

режим культивирования) способных повлиять на эффективность этого процесса (Kumar et al., 2003, 2004; Ashok Kumar and Murthy, 2004; Song et al., 2007; Zhan et al., 2009; Rakha et al., 2012; Hamidvand et al., 2013; Abdollahi et al., 2015, 2016; Kurtar et al., 2016; Asadi et al., 2018; Amirian et al., 2019). Однако выход растений-регенерантов остается достаточно низким и очень сильно зависит от генотипа донорного растения (Abdollahi et al., 2016; Kumar & Murthy, 2004; Kumar et al., 2003; Song et al., 2007). Наилучший достигнутый результат для культуры пыльников составил 3 эмбриоида на 1 культивируемый пыльник и 0.93 ДН-растения/пыльник (Song et al., 2007). На наш взгляд, наибольшее количество факторов, способных повлиять на индукцию андрогенеза в культуре пыльников путем прямого и непрямого эмбриогенеза, было изучено в исследовании Asadi et al. (2018). Авторы апробировали на двух генотипах десять различных протоколов, опубликованных для семейства *Cucurbitaceae*, после чего им удалось разработать свой собственный детальный протокол для образца «Betta Alpha» и получить до 5,34 ДН-растений на 100 культивируемых пыльников. Дальнейшая модификация этой технологии привела к тому, что в 2019 году был достигнут результат для культуры пыльников огурца, составивший для образца «Dastgerdi» 1,81 эмбриоид на 1 культивирующийся пыльник (Amirian et al., 2019).

Чаще всего при культивировании пыльников происходит образование каллуса, а случаи прямого эмбриогенеза встречаются достаточно редко (Ashok Kumar, Murthy, 2004; Asadi et al., 2018). Song H. et al. (2007) отмечали регенерацию эмбриоидов только из каллуса. При этом цвет и структура этого каллуса могли быть различными. Кроме того, при культивировании пыльников достаточно часто образование каллуса происходит из соматических тканей стенок пыльника (из низкодифференцированных клеток эндотелия) и связника (Kumar et al., 2003; Ashok Kumar, Murthy, 2004; Song et al., 2007; Suprunova, Shmykova, 2008; Asadi et al., 2018), что значительно усложняет отбор истинных гаплоидов. Пыльники огурца имеют несимметричную форму и важно правильно расположить их на питательной среде, чтобы уменьшить вероятность образования каллуса из соматических тканей (Asadi et al., 2018). Включение в протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре пыльников огурца обязательного этапа оценки с использованием молекулярных маркеров является необходимостью. Только использование SSR маркеров позволило отделить истинные ДН-растения от диплоидных, образовавшихся из соматических тканей пыльника (Asadi et al., 2018; Amirian et al., 2019).

Культура изолированных микроспор является наиболее перспективным способом получения удвоенных гаплоидов. Эта технология достаточно проста в исполнении, экономически эффективна и обеспечивает большой выход ДН-растений при оптимизации технологии под конкретный вид и генотип. Отсутствие соматических тканей в культуре микроспор *in vitro* позволяет не ставить под сомнение происхождение полученных растений. Однако у тыквенных культур эта технология на данный момент еще слабо разработана, и имеются лишь единичные работы по индукции и образованию эмбриоидов в культуре микроспор *in vitro* (Suprunova, Shmykova, 2008; Chen et al., 2008; Zhan et al., 2009; Chen et al., 2018). Так, например, при использовании этой технологии в лаборатории биотехнологии ВНИИССОК (сейчас ФГБНУ ФНЦО), после подробного изучения процесса микроспорогенеза огурца, в 2008 году удалось достичь образования каллуса в культуре микроспор *in vitro*, причем цитологические наблюдения показали, что деления начинались в вегетативной клетке (Suprunova, Shmykova, 2008). В этом же году Chen et al. (2008) запатентовали метод получения изолированной культуры микроспор огурца (Patent CN 101317548), однако из опубликованных данных невозможно было сделать вывод об эффективности этой технологии. В 2009 году было опубликовано исследование, в котором сообщалось об успешном получении 14 растений при использовании культуры изолированных микроспор *in vitro*. В этом исследовании эффективность техно-

логии для образца сорта «Changchun Mici» составила до 21,7 эмбриоида на чашку Петри (Zhan et al., 2009). Другие же исследователи, несмотря на использование в исследовании трех генотипов огурца, восемь вариантов жидких питательных сред, различных вариантов плотности суспензии микроспор, различных вариантов холодных предобработок и обработок повышенными температурами, так и не смогли индуцировать деления в культуре микроспор (Kielkowska, Havey, 2011). Chen et al. в 2018 году получили патент «Метод получения гаплоидных, дигаплоидных и удвоенных гаплоидных растений в культуре изолированных микроспор семейства *Cucurbitaceae*» (Patent US2018/0213736). Предложенная технология, по заявлению авторов, в отличие от предыдущих технологий, не является генотип-специфичной. В патенте описано успешное получение 40 растений, 17 и 19 из которых были удвоенными гаплоидами и октоплоидами, соответственно, в то время как гаплоидных растений авторам обнаружить не удалось.

Краткие протоколы по использованию андрогенеза для получения гаплоидных и удвоенных гаплоидных растений представлены в таблице 2.

Первоначально для индукции процесса андрогенеза необходимо определить оптимальную стадию для введения в культуру *in vitro*. Подробное описание процесса микроспорогенеза у огурца и соотношение этих стадий с параметрами бутона было проведено в исследовании Suprunova, Shmykova (2008). Большинство авторов отмечали, что бутончики огурца, содержащие микроспоры от средней до поздней одноядерной вакуолизированной стадии развития, были оптимальными. Размер бутончиков необходимо подбирать индивидуально для каждого образца (Ashok Kumar, Murthy, 2004; Song et al., 2007; Suprunova, Shmykova, 2008; Asadi et al., 2018; Amirian et al., 2019).

В большинстве опубликованных исследований проводится изучение факторов, влияющих на индукцию андрогенеза у огурца. Известно, что микроспорам нужен сигнал для перехода от гаметофитного к спорофитному пути. Чаще всего для этих целей используется холодная предварительная обработка бутончиков или температурная обработка повышенными температурами пыльников/микроспор сразу после введения в культуру *in vitro*, в том числе и у тыквенных культур. Во многих экспериментах благоприятное влияние на андрогенез оказывала предварительная холодная температурная обработка бутончиков при температурном режиме 4°C (Kumar et al., 2003, 2004; Song et al., 2007), однако ее продолжительность в разных исследованиях варьировала. Kumar et al. (2003) указали, что оптимальной была холодная предварительная обработка бутончиков в течение 2-3 суток, а при увеличении ее продолжительности до 4, 5 или 7 суток, эмбриогенный потенциал резко снижался. Также в проведенных исследованиях было отмечено, что холодоустойчивые образцы хорошо реагируют на холодную предобработку, тогда как образцы огурца, предназначенные для выращивания в умеренных широтах, лучше реагировали на обработку повышенными температурами (Song et al., 2007). Достаточно часто используют комбинацию холодной и последующей высокотемпературной обработки 32...35°C (табл. 2).

Состав питательной среды также оказывает огромное влияние на успех технологии. Многие исследователи использовали среду MS в качестве основы индукционной среды для культуры пыльников *in vitro* (Song et al., 2007; Abdollahi et al., 2015, 2016). Только Suprunova и Shmykova (2008) использовали среду MSm (Masuda et al., 1981). Для культуры микроспор огурца в качестве индукционной среды используют среду NLN (Lichter, 1982) (Suprunova and Shmykova, 2008; Zhan et al., 2009). Интересно, что среды NLN и B5 не показывали значительных различий по индукции эмбриоидов для культуры микроспор огурца (Zhan et al., 2009). В культуре пыльников огурца наблюдались различия между сортами при культивировании на средах MS с измененной концентрацией макроэлементов (половинной, полной, 1,5-кратной и двукратной). Максимальное количество эмбриоидов (1,26 и 1,23 эмбриоида/пыльник) было получено на среде MS с полной и половинной концентрацией мак-

розэлементов, в то время как двукратное увеличение в среде макроэлементов приводило к увеличению каллусогенеза (Abdollahi et al., 2016).

Большое влияние на индукцию будут оказывать регуляторы роста, присутствующие в питательной среде. Эмбриоиды и морфогенные каллусы получают в культуре пыльников или микроспор на питательных средах, содержащих различные концентрации 6-бензиламинопурина (БАП/ВАР), 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д/2,4-Д) и кинетина (КТ). За андрогенезом следует стадия дифференцировки, для которой не желательна присутствие в питательной среде 2,4-Д, поэтому в питательные среды обычно добавляют (различные варианты по концентрации и соотношению между собой) БАП, 1-нафталинуксусной кислоты (НУК/НАА) и КТ (Kumar & Murthy, 2004; Kumar et al., 2003; Song et al., 2007; Abdollahi et al., 2016; Asadi et al., 2018).

Несмотря на определенные успехи, достигнутые в последнее время при разработке технологии получения удвоенных гаплоидов огурца в культуре пыльников и микроспор, о массовом применении этих технологий пока речи не идет. Кроме того, использование культуры пыльников и микроспор имеет ограничения, поскольку проблематично использовать андрогенез для женских растений огурца (гиноцидные формы), а также в связи с тем, что селекция тыквенных культур, в первую очередь, направлена на создание форм с женским типом цветения, закрепленным генетически. Однако полученные в 2019 году данные позволяют делать оптимистичные выводы по использованию андрогенеза для получения ДН-растений огурца. Предложенная авторами технология включала обработку донорных растений (в том числе, и гиноцидные формы) при выращивании нитратом серебра (AgNO_3) и гиббереллиновой кислотой (ГК/GA₃). Обработка этими веществами вызывали не только образование мужских цветков у гиноцидных образцов, но и увеличивали образование андрогенных каллусов и эмбриоидов. Было отмечено, что количество мужских цветков у растений, обработанных ГК, было в три раза меньше, чем у растений, обработанных AgNO_3 , однако пыльники растений, обработанных ГК, производили больше эмбриогенных каллусов и эмбриоидов у гиноцидных форм (Amirian et al., 2019).

Гиногенез. Наибольшей популярностью в последнее время в семействе *Cucurbitaceae* пользуется получение удвоенных гаплоидов в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*. В основе этой технологии лежит гиногенез. Отличие гиногенеза от индуцированного партеногенеза заключается в том, что в культуру вводят неопыленные завязи (фрагменты завязи) или выделенные семяпочки, а не неполноценные зародыши, выделенные из семян. При культивировании на искусственных питательных средах гаплоидные клетки зародышевого мешка переходят с гаметофитного пути развития на спорофитный с образованием из них эмбриоидов (прямой эмбриогенез) или морфогенного каллуса, из которого в последующем образуется растение (непрямой эмбриогенез). Chambonnet D. и Dumas de Vaulx R. (1985) впервые получили в культуре неоплодотворенных семяпочек *in vitro* гаплоидные растения кабачка, и с этого времени гиногенез является альтернативным источником получения удвоенных гаплоидов у овощных культур семейства *Cucurbitaceae* (Dong et al., 2016). На процесс индукции гиногенеза влияет большое число факторов: генотип растения, условия выращивания донорного растения, стадия развития женского гаметофита, состав питательной среды, стрессовые обработки. При использовании культуры неопыленных семяпочек, так же, как и культуры пыльников, всегда остается открытым вопрос: из каких тканей (соматических или гаметофитных) произошло образование эмбриоида/каллуса, что требует в дальнейшем проведение анализа выравненности полученного потомства. Регенерацию диплоидных растений из клеток нуцеллуса и интегументов наблюдали в культуре неопыленных семяпочек риса (Кюо, 1982) и табака (Wu and Chen, 1982), а аналогичных работ для тыквенных культур нам не встречалось, тем не менее, использование молекулярных маркеров

поможет отделить истинных удвоенных гаплоидов от диплоидов, образовавшихся из соматических тканей.

Впервые упоминание о получении удвоенных гаплоидов с помощью неопыленных семяпочек огурца было зарегистрировано в виде патента в 1996 году от компании Nuhmes Zaden BV, в котором Robert Dirks подробно описал процесс гиногенеза для этой культуры (US Patent 5492827). Дальнейшее изучение процесса гиногенеза было исследовано Gemes Juhász A. и др. (1997), в ходе которого были успешно получены гаплоидные растения. Краткие протоколы по использованию метода культуры неопыленных семяпочек *in vitro* (гиногенеза) у огурца представлены в таблице 3.

Чаще всего технология получения растений-регенерантов в культуре неопыленных семяпочек включает в себя пять основных этапов. Первый этап – индукция эмбриогенеза, обеспечивающая переход клеток зародышевого мешка с гаметофитного пути развития на спорофитный с образованием эмбриоидов или морфогенного каллуса. Второй и третий этап включает регенерацию растений и их укоренение в культуре *in vitro*. Четвертый этап – это адаптация растений к условиям *in vivo* и пятый – самопыление полученных растений-регенерантов R₀ и получение семенного потомства. На каждый этап будут влиять свои критические факторы. Изучение этих факторов позволяет оптимизировать технологию под конкретный вид и генотип.

На первом этапе одним из критических факторов является стадия развития зародышевого мешка. У тыквенных культур зародышевый мешок образуется по Polygonium-типу, он полностью созревает и готов к оплодотворению через несколько часов после раскрытия цветка. Оптимальной стадией для введения в культуру *in vitro* является почти зрелый зародышевый мешок за 6 часов до распускания цветка (Gemes Juhász et al., 2002). Li et al. (2013) изучали влияние стадии развития завязи огурца при введении его в культуру *in vitro*, они установили, что лучшее время для введения эксплантата в культуру – за один сутки до распускания цветка, в случае если сбор был проведен раньше на 12 часов, то разница в количестве отозвавшихся семяпочек может достигать девяти раз. В связи с этим бутоны необходимо изолировать с вечера, а рано утром срывать. Для большинства тыквенных культур оптимальным будет полураскрывшийся бутон (Шмыкова, Супрунова, 2009; Шмыкова и др., 2015; Domblides et al., 2019).

При создании технологии получения удвоенных гаплоидов огурца используют два разных способа введения в культуру *in vitro*. В первом случае молодая завязь огурца после поверхностной стерилизации разрезалась продольно (Gemes 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 помещались на индукционную питательную среду, и только после трех-четырех недель культивирования развившиеся семяпочки (либо образовавшийся из них каллус и эмбриоиды) извлекали и пересаживали на свежую питательную среду для последующей регенерации из них растений. Во втором случае семяпочки сразу выделяли из молодой завязи огурца и помещали на индукционную питательную среду (Шмыкова, Супрунова, 2009; Plarung et al., 2014a,b; Tantasawat et al., 2015; Шмыкова и др., 2015; Domblides et al., 2019).

Оптимальный состав питательной среды является одним из важнейших компонентов, обеспечивающих успех технологии получения удвоенных гаплоидов. Обычно в технологии используют две питательные среды – индукционная питательная среда и регенерационная питательная среда. В качестве индукционных сред применяют разные питательные среды. Среда Miller (Miller, 1963) с добавками была использована Dirks в 1996, а среда CLC (Chee et al., 1992) первоначально использовал в своих исследованиях Gemes Juhász A. (1997). Специально для тыквенных культур позднее им была разработана индукционная среда CBM (Cucumber Basal Medium) (Gemes Juhász et al., 2002), которую успешно использовали большое количество исследовательских групп (Suprunova, Shmykova, 2008; Li et al., 2013;

Ozcan et al., 2017). При культивировании семян тыквенных культур часто использовали и питательную среду MS в своих исследованиях в качестве основы для индукции гиногенеза (Diao et al., 2009; Moqbeli et al., 2013; Tantasawat et al., 2015; Sorntip et al., 2017). Suprunova, Shmykova (2008) использовали в своих исследованиях среду МСм (Masuda et al., 1981). В лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦО была разработана питательная среда IMC (Induction Medium for *Cucurbitaceae*), которая была успешно использована для огурца (Шмыкова и др., 2015; Domblides et al., 2019). Состав этой питательной среды значительно отличается от среды CBM и MS. Эта среда содержит повышенное содержание KNO_3 (2496,3 мг/л), увеличенное содержание никотиновой кислоты (5 мг/л), а также обогащенный аминокислотный состав.

Большое значение для индукции гиногенеза будут иметь использующиеся регуляторы роста растений (цитокинины, ауксины) и разнообразные добавки в составе индукционной среды. Большинство исследований было сделано о влиянии добавления тидиазурона в индукционную питательную среду (Suprunova and Shmykova, 2008; Diao et al., 2009; Li et al., 2013; Moqbeli et al., 2013; Ozcan et al., 2017). Впервые тидиазурон TDZ при гиногенезе в культуре неопыленных семян огурца применили в своих исследованиях (Gémes Juhász et al., 1997; 2002), отметив что TDZ повышает скорость развития и формирования зародыша. Suprunova and Shmykova, 2008 изучили как влияют концентрации TDZ: 0,02 мг/л, 0,1 мг/л, 0,2 мг/л и пришли к выводу, что для каждого сорта необходимо подбирать, свое количество цитокинина. Для двух генотипов огурца подошла концентрация 0,2 мг/л, а для одного – 0,1 мг/л, при этом они отметили, что при отсутствии в индукционной среде CBM хелата железа ($(FeSO_4 \cdot x H_2O, Na_2EDTA)$ семян с любой концентрации TDZ не развиваются. Diao et al. (2009) изучили концентрации 0,01 мг/л, 0,02 мг/л и 0,04 мг/л TDZ, и отметили, что для всех изученных генотипов оптимальной оказалась концентрация 0,04 мг/л, а при отсутствии TDZ зародыш не развился совсем. Изучая концентрации TDZ 0,03 мг/л, 0,05 мг/л, 0,07 мг/л и 0,09 мг/л (Li et al., 2013) также получили разные данные, один генотип лучше отозвался на концентрацию 0,03 мг/л, а другой – на 0,07 мг/л, при этом все концентрации TDZ показали результат выше, чем у контроля. Эти результаты подтверждают выводы Suprunova and Shmykova (2008). Moqbeli et al. (2013) и Ozcan et al., (2017) также изучили влияние пониженных концентраций тидиазурона от 0,01 до 0,04 мг/л и подтвердили выводы сделанные ранее, что для каждого генотипа необходима своя концентрация TDZ, в их работах лучше всего на индукцию эмбрионов повлияли концентрации 0,03 мг/л и 0,04 мг/л.

Чаще всего в качестве дополнительной добавки в индукционную питательную среду использовали нитрат серебра ($AgNO_3$) (Diao et al., 2009; Li et al., 2013). Diao et al., 2009 отметил, что использование $AgNO_3$ в концентрации 10 мг/л ускоряло появление и развитие эмбрионов. В экспериментах Li et al. (2013) оптимальной оказалась концентрация 5 мг/л для одного генотипа и 10 мг/л – для другого генотипа, более же высокие и более низкие концентрации не оказывали значимого влияния на индукцию и развитие эмбрионов. В своих исследованиях Sorntip et al. (2017) экспериментировал с различными добавками (поливинил-пирролидон (PVP), кокосовое молоко, банановый экстракт, томатный экстракт) в индукционные и регенерационные питательные среды. Было отмечено, что PVP удаляет фенольные соединения, и за счет этого каллус дольше остается зеленым и не требует постоянного пересадок. В средах без PVP каллус достаточно быстро становился коричневым и черным. А вот добавление кокосового молока, бананового экстракта, томатного экстракта в индукционную среду приводило к снижению количества образовавшихся эмбрионов. Sorntip et al. (2017) также использовали в одной из своих индукционных сред 0,02 мг/л триаконтанола (TRIA) и 1 мг/л триидобензойной кислоты (TIBA), однако добавление их в питательную среду не вызвало положительного эффекта, а наоборот, снижало процент образования эмбрионов и каллуса.

Следующим важным фактором были условия культивирования и использования температурной обработки. Культивирование семян в первые две недели можно проводить как на свету, так и в темноте. Для индукции эмбриогенеза у огурца эффективно применять температурную обработку в течение 7-10 дней при 32°C в темноте и лишь затем переносить на свет и 25°C (Domblides et al., 2019).

После индукции гиногенеза и успешного образования из неопыленных семян эмбрионов или каллуса, образовавшиеся структуры необходимо переносить на регенерационные питательные среды. Этот этап во многом схож с аналогичными этапами при андрогенезе и партеногенезе. В качестве среды для регенерации чаще всего используется регенерационная среда CBM (Gémes Juhász et al., 2002; Suprunova and Shmykova, 2008; Moqbeli et al., 2013;) или среда MS (Gémes Juhász et al., 1997; Suprunova and Shmykova, 2008; Diao et al., 2009; Tantasawat et al., 2015; Sorntip et al., 2017). В случае прямого эмбриогенеза и образования хорошо сформированного эмбриоида можно использовать безгормональные питательные среды (Gémes Juhász et al., 1997; Li et al., 2013), но такое у огурца происходит не часто, по сравнению с другими тыквенными культурами, и тогда необходимо вводить в питательные среды регуляторы роста. Чаще всего для этих целей используют ауксины и цитокинины в различном соотношении. Gémes Juhász et al. (2002), Suprunova and Shmykova (2008) использовали в своих средах 0,05 мг/л НУК и 0,2 мг/л БАП. Moqbeli et al. (2013) использовали концентрацию 0,05 мг/л НУК и 1,5 мг/л БАП. Suprunova and Shmykova (2008) использовали также только НУК 0,04 мг/л и 0,2 мг/л, а Diao et al. (2009) использовали только БАП в концентрации 0,3 мг/л и 1,5 мг/л.

Об эффективности созданной технологии обычно судят по выходу гаплоидов/удвоенных гаплоидов на 1 культивируемую завязь или числу полученных растений из 1 завязи. Так, в опубликованном патенте US Patent 5492827 эффективность разработанной технологии составляет 240 эмбрионов из 300 завязей огурца (то есть 0,8 эмбрионов на 1 завязь) (Dirk, 1996), в исследованиях Gemes-Juvaz et al. (2002) на огурце максимально она составляет 18,4 эмбриода и 7,1 растения на 100 культивированных завязей (то есть 0,18 эмбрионов и 0,07 растений на 1 культивируемую завязь). 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 эмбрионов с частотой 12,4% (0,12 эмбрионов на 1 культивируемую завязь). Другие исследователи смогли получить до 9 эмбрионов и одного растения огурца из 18 культивируемых завязей, что составит 0,5 эмбрионов и 0,05 растений на 1 культивируемую завязь (Ozcan 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; Domblides et al., 2019). Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования технологии получения удвоенных гаплоидов в культуре неопыленных семян *in vitro*.

Заключение

Важнейшим фактором, препятствующим использованию гаплоидов в селекции огурцов (*Cucumis sativus* L.), является отсутствие эффективного способа их производства в больших масштабах. Разработка эффективной системы производства удвоенных гаплоидов и ее дальнейшее применение в программах селекции тыквенных культур может сократить время, необходимое для получения гомозиготной линии, а также обеспечить селекционера разнообразным линейным материалом, необходимым для создания новых высокоурожайных гибридов с комплексом хозяйственно ценных признаков. Большое количество исследо-

ваний, появившихся в последние годы по получению удвоенных гаплоидов в культуре неопыленных семян и, особенно, культуре пыльников и микроспор, позволяет надеяться, что скоро будет создана перспективная технология получения удвоенных гаплоидов огурца. Основная проблема, которую необходимо решить, для всех трех технологий, это как эффективно перевести полученные растения из гаплоидов в удвоенные гаплоиды. Основными успешными подходами в данном направлении, как нам видится, будет не использование обработок колхицином, а стимулирование вторичного эмбриогенеза на ранних стадиях развития образовавшихся эмбриоидов, за счет которого происходит достаточно часто спонтанное удвоение, либо использование листовых эксплантов гаплоидных растений для повторной регенерации из них растений. Также в связи с физиологическими особенностями огурца у растений после культуры *in vitro* достаточно часто бывает трудно добиться одновременного распускания мужского и женского цветка, чтобы провести самоопыление, в связи с этим необходимо

на этапе регенерации проводить клональное размножение, чтоб получить как можно больше растений одного генотипа, а также использовать обработки различными стимуляторами, например, нитратом серебра и гиббериллиновой кислотой.

Список сокращений/Abbreviations:

- DH – doubled haploid-удвоенный гаплоид;
- 2,4-D – 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid – (2,4-Д);
- IAA – Indole-3-acetic acid (ИУК);
- NAA – α -naphthaleneacetic acid (НУК);
- TDZ – thidiazuron 1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea (тидиазурон);
- КТ – Kinetin (кинетин);
- ВАР – 6-Benzylaminopurine (БАП);
- PVP – Polyvinylpyrrolidone (ПВП);
- TRIA – Triacantanol – 1-Триаоктанол;
- TIBA – 2,3,5-Triiodobenzoic acid – 2,3,5-Трийодбензойная кислота

Таблица 1. Краткие протоколы по использованию метода опыления облученной пылью (γ -облучение, 60Co) завязей огурца (партеногенез *in situ*)

Table 1. Concise protocols for the use of pollination of cucumber ovaries with irradiated pollen (γ -ray, 60Co) (parthenogenesis *in situ*)

Доза облучения/ Radiation doze	Время года/ Time of the year	Возраст растения, недели/ Developmental stage, weeks	Индукционная среда (мг/л)/ Induction medium (mg/l)	Регенерационная среда/ Regeneration medium	Методы оценки растений/ Plant evaluation	Идентифицирующая плоидность полученных растений/ Plant ploidy identified	Литературный источник/ References
300 - 1000 Гр						H, M	Sauton, 1989
300 Гр			E20		Метод Фельгина	DH, H	Niemirowicz-Szczytt, Dumas de Vaulx, 1989
300 Гр	Лето	3–5	E20A	MS	ЦА, МО, ППХ	DH, H, M	Przyborowski, Niemirowicz-Szczytt, 1992
300 Гр	Лето					H	Caglar, Abak, 1996 a
200 Гр,	Весна	4	MS + 0,01 мг/л IAA+3% сахара	MS	ППХ	DH, H	Deunff, Sauton, 1994
300 Гр	Лето		E20A			DH, H	Caglar, Abak, 1999 a,b,c
100, 200 Гр		3–5	E20A	1/2 MS	ППХ	DH, H	Faris, Niemirowicz-Szczytt, 1999
250, 500 Гр		3–5	E20H8 + 0,011 мг/л IAA + 2,54 мг/л AgNO ₃	E20H8 + 0,011 мг/л IAA + 2,54 мг/л AgNO ₃	ПЦ, ММС	DH, H	Claveria et al., 2005
100-400 Гр		2–35	MS	MS +0,2 мг/л ВАР+ 3% сахара	МО, ПП, ПС	DH, H, M	Lei et al., 2006
250, 500 Гр			E20H8 + 0,06 мкм/л IAA + 15 мкм/л STS		ПЦ, ММС	DH, H, M	Dolcet-Sanjuan et al., 2006
300 Гр		3–5	E20A	MS	ММС	DH, H	Smiech et al., 2008
250 Гр		21–23	E20A	E20A			Lofti, Salehi, 2008
300 Гр		5-6 недель	E20A	½ MS + 1,5 мг/л 2,4-D		DH, H	Galazka et al., 2015

Примечание: ППХ – Прямой подсчет хромосом; ММС – Использование молекулярных маркеров (SSR, RAPD, ALFP); ЦА – Цитологический анализ (в том числе размер устьиц, количество хлоропластов в замыкающей клетках, длина замыкающих клеток); МО – Морфологическое описание; ПП – Показатели пыльцы; ПС – Прорастание семян; DH – Удвоенный гаплоид; H – Гаплоид; M – Миксоплоид.

Таблица 2. Краткие протоколы по использованию метода культуры пыльников и микроспор *in vitro* (андрогагенеза) у огурца
 Table 2. Concise protocols for the use of anther and microspore cultivation *in vitro* (androgenesis) in cucumber

Метод/ Method	Стадия цвете- ния	Холодовая предобработка/ Cold pretreatment	Обработка повышенной температу- рой/ Heat shock	Индукционная среда / Induction medium (mg/l)	Регенерационная среда/ Regeneration medium	Методы оценки растений	Идентифи- цированная плодность полученных растений	Литературный источник/ References
КП	СПОС	4°C в течение 2 дней	32°C в течение 1 дня	B5 + 0,44 мг/л 2,4-D + 0,23 мг/л ВАР	B5 + 0,06 мг/л КТ + 0,055 мг/л NAA	ППХ	ДН,Н	Kumar et al., 2003, 2004, Kumar, Murthy, 2004
КП	СПОС	4°C в течение 2-3 дней		B5 + 0,442 мг/л 2,4-D + 0,225 мг/л ВАР + 5% сахароза		ППХ	Н	Xie et al., 2005
КП	СПОС	4°C	33°C в течение 1 часа	MS + 1,0 мг/л ВАР + 1,1 мг/л КТ + 0,5 мг/л 2,4-D + 3% сахароза	MS + 0,5 мг/л ВАР + 6% сахароза	ППХ, ММС	ДН,Н	Song et al., 2007
КП	ПОС		35°C в течение 72 часов	MSm + 2,0 мг/л 2,4-D + 1,0 мг/л ВАР + 8% сахароза	MS + 0,2 мг/л ВАР + 0,05 мг/л NAA + 2% сахароза			Suprunova, Shmykova, 2008
КМ	ПОС		22°C	NLN + 10% сахароза + 2,0 мг/л 2,4-D				Suprunova, Shmykova 2008
КМ		4°C в те- чение 2 дней		NLN + 0,5 мг/л 2,4-D + 0,2 мг/л ВАР + 13% сахароза, рН=5,8	MS+0,2 мг/л ВАР + 3% сахароза + 0,8% агар. рН=5,8	ППХ, ММС, ПЦР	ДН	Chen et al. 2008 (patent)
КМ	ПОС	4°C в те- чение 2-3 дней	33°C в течение 1 дня	NLN+ 0,5 мг/л 2,4-D+ 0,2 мг/л ВАР + 13% сахароза	MS + 0,2 мг/л ВАР + 3% сахароза	ППХ	ДН,Н	Zhan et al., 2009
КП	СПОС		25 °C в течение 4 дней	MS + 0,44 мг/л 2,4-D + 0,23 мг/л ВАР + 0,37 мг/л КТ + 2,5% сахароза	MS + 3,0 мг/л ВАР + 0,1 мг/л NAA + 3% сахароза	ППХ	ДН,Н	Hamidvand et al., 2013
КП	СПОС		25°C	MS + 0,5 мг/л 2,4-D + 1,0 мг/л ВАР + 1,15 мг/л КТ + 3% сахароза	MS + 0,1 мг/л NAA + 30мг/л ВАР + 3% сахароза	ППХ	ДН,Н	Abdollahi et al., 2016
КП	СПОС	4 °C в те- чение 2 дней	35°C в течение 1 часа потом 25°C 20 дней	MS + 3% сахароза + 0,8 агар	MS + 0,05 и 0,1мг/л NAA (0,05 и 0,1 мг/л) и ВАР (3,4 мг/л) + агар MS + ВАР (0,68- 0,91 мг/л)	ММС, ПЦ	Т, ДН	Asadi et al., 2018
КМ		4°C в те- чение 2 дней		NLN + 0,5 мг/л 2,4-D + 0,2 мг/л ВАР + 13% сахароза, рН=5,8				
КМ		4°C до 4 дней	0...33°C, от 24 до 72 часа	1) MS-B5 + 30-170 г/л угле- воды + 10 мг/л SAHA + 0,5 мг/л 2,4-D + 0,2 мг/л ВАР + 0,5-50 мг/л PAA + 10-100 мг/л активированный уголь На 7-10 день добавление 100 мг/л путрисицина 2) На глобулярной стадии перенос эмбрионов на двухслойную среду: Нижний слой: MS-B5 + 30- 120 г/л углеводы + 7 г/л агар + 100 мг/л путрисицин + 0,5 мг/л 2,4-D + 0,2 мг/л ВАР + 1-5 г/л активирован- ный уголь Верхний слой: MS - B5 + 30-170 г/л углеводы + 10 мг/л SAHA + 100 мг/л пут- рисицин + 0,5 мг/л 2,4-D + 0,2 мг/л ВАР + 0,5-50 мг/л PAA + 10-100 мг/л активи- рованный уголь	1/2 MS-B5 + 30- 120 г/л углеводы + 7 г/л агар + 0,5-2 мг/л ВАР	ППХ, ММС, ПЦР	ДН, ТН,Т, А	Chen et al. 2018 (patent)
КП	ПН	4°C в те- чение 2 дней	25±1°C - 20 дней	MS + 7 г / л агар, 4% саха- роза, 4,52 мкМ/л - 2,4-D, 4,44 мкМ/л ВАР, 1,16 мкМ/л - КТ, аминокислоты: Arg, Asp, Cys и Gln по 0,5 мМ каждая, рН: 5,7 ± 0,1. MS + NAA - 1,08 мкМ/л, 4,44 ВАР, 7,5 г/л - агар и 8,5% - сахароза	MS + 2,22 мкМ/л ВАР + 6% сахароза.	ММС, ЦА	ДН, Н	Amirian et al., 2019

Примечание: КП - Культура пыльников; КМ - Культура микроспор; ПОС - Поздняя одноядерная стадия; СПОС - Среднепоздняя одноядерная стадия; ПН - Поздней неядерная стадия; ПЦ - Проточная цитометрия; ППХ - Прямой подсчет хромосом; ММС использованием молекулярных маркеров (SSR, RAPD, ALFP); ЦА - Цитологический анализ (в том числе размер устьиц, количество хлоропластов в замыкающей клетках, длина замыкающих клеток); ДН - Удвоенный гаплоид; Н - Гаплоид; М - Миксоплоид, Т - Триплоид ТН - Тетраплоид, А - Анеуплоид

Таблица 3. Краткие протоколы по использованию метода культуры неопыленных семязпочек *in vitro* (гиногенеза) у огурца
 Table 3. Concise protocols for the use of unipollinated ovule cultivation *in vitro* (gynogenesis) in cucumber

Эксплантат/ Explant	Стадия развития цветка/ developmental stage of flower	Обработка повышенной температурой/ heart shock	Индукционная среда / Induction medium (mg/l)	Регенерационная среда/ Regeneration medium	Методы оценки растений	Идентифи- цированная плоидность полученных растений	Литературный источник/ References
Фрагменты завязи	1-3 дня до раскрытия цветка	27°C	Среда Miller + орг. добавки по Fujii + 0,1 mM FeEDTA+ 3% саха- роза + 9 мг/л витамин B1 + 0,79 мг/л BAP + агар. pH 5,8	безгормональная индукционная среда		DH, H	Dirks, 1996 (patent)
Фрагменты завязи	Во время раскрытия		1) CCL + 4% сахараза + 0,02 мг/л TDZ (10 суток) 2) CCL + 4% сахараза + 0,05 мг/л NAA + 0,2 мг/л BAP 3) CCL + 4% сахараза + 0,02 мг/л NAA + 0,04 мг/л BAP	MS+3% сахараза	ППХ	H	Gemes- Juhasz et al., 1997
Фрагменты завязи	За 6 часов до раскрытия цветка	35°C в течение 2-4 дней	CBM + 4% сахараза + 0,02 мг/л TDZ	CBM+3% сахараза +0,05 мг/л NAA+ 0,2 мг/л BAP	ППХ, ПЦ	DH, H, M	Gemes- Juhasz et al., 2002
Семязпочки	6 часов до раскрытия цветка	22°C	Msm + 5% сахараза + 0,2 мг/л TDZ + 0,2 мг/л BAP	Msm + 3% сахараза+ 0,05 мг/л NAA+ 0,2 мг/л BAP			Suprunova,S hmykova, 2008
Семязпочки	Полуоткрытый бутона	22...24°C	1) MСm + 0,1/ 0,2 мг/л TDZ + 5% сахараза + 0,7% агар 2) CBM + 1/2 хелата железа ((FeSO4X 7H2O– 13,9 мг/л и Na2ЭДТА – 18,6 мг/л) + 0,02/0,2 мг/л TDZ + 5% сахараза + 0,7% агар	Msm или CBM+ 0,4 мг/л BAP + 0,02 мг/л NAA 3% сахараза			Супрунова, Шмыкова, 2009
Фрагменты завязи	1 день до раскрытия цветка	35°C 3 дня, затем 25°C	MS + 3% сахараза + 0,04 мг/л TDZ	MS + 0,3 мг/л BAP	ППХ, ПЦ	DH, H, T	Diao et al., 2009
Фрагменты завязи	Во время раскрытия цветка	35°C 4 дня в темноте	CBM + 4% сахараза + 0,03-0,07 мг/л TDZ	CBM + 3% сахараза+ 0,05 мг/л NAA + 0,2 мг/л BAP	ПЦ	DH, H, M	Li et al., 2013
Фрагменты завязи	1 день до раскрытия цветка	35°C 3 дня	MS + :0; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 мг/л TDZ + 3% сахараза MS+1,5 мг/л GA3	MS + 0,05 мг/л NAA + 1,5 мг/л BAP	ППХ	DH, H	Moqbeli et al., 2013
Семязпочки	1 день до раскрытия цветка	25°C	CBM + 5,0 мг/л AgNO ₃	MS + 2,0 мг/л + BAP + 1,0 мг/л IAA	ЦА, ППХ	DH, H	Plapung et al. (2014a,b)
Семязпочки	1 день до раскрытия цветка	35°C в течение 3 дней	MS + 1,0 мг/л TDZ + 1,0 мг/л BAP	MS + 0,2 мг/ л BAP + 0,05 мг/л NAA	ЦА		Tantasawat et al., 2015
Фрагменты завязи	1 день до раскрытия цветка	35°C в течение 4 дней, потом 25°C	MS +1,5 мг/л 2,4-D + 4 мг/л BAP + 3% сахаразы + 0,8% агар. pH=5,8				Golabadi et al., 2017
Фрагменты завязи	1 день до раскрытия цветка	27 ± 2°C	MS+1 мг/л TDZ+1 мг/л BAP+800 мг/л Gln+30 г/л - сахара- зы + 3 г/л - гелита, pH 5,7	1) D2: MS + 0,05 мг/л NAA + 0,2 мг/л BAP + 0,02 мг/л TRIA + 100 мг/л Pro + 20 мг/л + 2 мг/л AgNO ₃ + 3 г/л гелита; pH 5,7 2) MST3 +:MS + 0,05 мг/л IBA + 1 мг/л TDZ + 0,5 мг/л GA3 + 0,02 мг/л TRIA + 1,38 г/л Pro + 30,7 мг/л глутатиона + 2 мг/л AgNO ₃ +100 мл/л коко- совой воды + 50 г/л томатов + 30 г/л сахаразы + 3 г/л гелита + 0,1 мг/л ABA + 10 г/л PVP + 50 г/л банана; pH 5,7	ППХ, ПЦ	DH, H, T	Sornitip et al., 2017
Фрагменты завязи	1 день до раскрытия цветка	35°C в течение 3 дней, в темноте, потом 25°C в течение 2 дней	CBM + 1,0 г / л КТ +0,1 мг/л + 0,037 г/л FENAEDTA	CBM + 0,05 мг/л NAA + 0,2 мг/л BAP			Ozsan et al., 2017
Семязпочки	Полуоткрытый бутона	32°C в течение 7-10 дней в темноте	IMC (Induction medium for Cucurbitaceae)+ 0,02/ 0,2 мг/л TDZ+ 0,0001 мкМ/л epibrassi- nolid	MS + 2% сахараза + 3 г/л фитогель	ППХ, ПЦ, МО, ЦА	H, DH, M	Domblides et. al, 2019

Примечание: ППХ - Прямой подсчет хромосом; ПЦ - Проточная цитометрия; МО - Морфологическое описание; ЦА - Цитологический анализ (в том числе размер устьиц, количество хлоропластов в замыкающей клетках, длина замыкающих клеток); DH - Удвоенный гаплоид; H - Гаплоид; M - Миксоплоид; T - Тетраплоид.

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>

Белов Сергей Николаевич – м.н.с. лаб.

репродуктивной биотехнологии в селекции с.-х. растений <https://orcid.org/0000-0002-4387-9153>

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

Пивоваров Виктор Федорович – академик РАН, доктор с.-х. наук, проф. <https://orcid.org/0000-0001-9522-8072>

About the authors:

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

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

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

Victor F. Pivovarov – Academician of the RAS, Dr. Sci. (Agriculture) <https://orcid.org/0000-0002-2695-190X>

● **Литература / References**

- Вавилов НИ. Генетика на службе социалистического земледелия. Колос. 1932; 32-56 /Vavilov NI. Genetics in the service of socialist agriculture. Kolos. 1932;32-56 (In Russ.)
- Иванов МА. Экспериментальное получение гаплоидов у *Nicotiana glauca* (со специальным рассмотрением гаплоидии у цветковых растений). Изв. биол.-геогр. научн.-иссл. института при Восточно-Сибирском гос. университете. 1937;3(4):71-56. / Ivanov MA. Experimental production of haploids in *Nicotiana glauca* L. *Genetica*. 1937;20:295-397 (In Russ.)
- Карпеченко ГД. Экспериментальная полиплоидия и гаплоидия. Теоретические основы селекции растений. 1935;1:397-434/Karpechenko GD. Experimental polyploidy and haploidy. *Theoretical Foundations of Plant Breeding*. 1935;1:397-434. (In Russ.)
- Хохлов СС, Гришина ЕВ, Зайцева МИ., Тырнов ВС, Малышева-Шихинская НА, Гаплоидия у покрытосеменных растений. Изд. Саратовского университета. 1970;13/ Khokhlov SS, Grishina EV, Zaijeva MI., Tyrnov VC, Malysheva-Shishinskaya NA, Haploidy in angiosperms. Ed. *Saratov University*. 1970;13 (In Russ.)
- 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/10.18619/2072-9146-2015-3-4-28-31> /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/10.18619/2072-9146-2015-3-4-28-31>
- Супрунова НА, Шмыкова ТП. Индукция гиногенеза в культуре *in vitro* неопыленных емязпочек *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.)
- Aalders LE. Monoploidy in Cucumbers. *J. Heredity*. 1958;49(1):41-44.
- Abdollahi MR, Najafi S, Sari khani H, Moosavi SS. Induction and development of anther-derived gametic embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by optimizing the macronutrient and agar concentrations in culture medium. *Turk J Biol*. 2016; 40:1-10.
- Amirian R, Hojati Z, Azadi P. Male flower induction significantly affects androgenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 2019.
- Antos M, Bułat E, Zawislak E. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploids induction with use of X-rays. *Folia Hort*. 2001;13(1A):81-84.
- Asadi A, Zebajadi A, Abdollahi MR, Segun-Simarro JM. Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica*. 2018;11:214,216.
- Baktemur G, Taskin H, Вьюкаласа S. Comparison of different methods for separation of haploid embryo induced through irradiated pollen and their economic analysis in melon (*Cucumis melo var. inodorus*). *Sci World J*. 2013;10:1-7.
- Belling J, Blakeslee AF. The configurations and sizes of the chromosomes in the trivalents of 25-chromosome *Daturas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1924;10(3):116.
- Blakeslee A, Belling J, Farnham ME, Berger AD. A haploid mutant in *Datura stramonium*. *Science*. 1922;55:646-647.
- Caglar G, Abak K. In situ haploid embryo induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.) after pollination by irradiated pollen. *Turk J Agric For*. 1999a;23(EK1):63-72.
- 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.
- Caglar G, Abak K. Progress in the production of haploid embryos, plants and doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by gamma irradiated pollen in Turkey. *Acta Hort*. 1999c;492:317-322.
- Can H, Kal U, Ozyigit I, Paksoy M, Turkmen O. Construction, characteristics and high throughput molecular screening methodologies in some special breeding populations: a horticultural perspective. *Journal of Genetics*. 2019;98(3).
- Chambonnet D, Dumas De Vaulx R. Obtention of embryos and plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules of *Cucurbita pepo*. *Cucurbit genetics*. 1985;Coop Rep 8:66.
- Chase SS, Troits B. Culture of haploids cell. *M. Gen. Coop. N*. L. 1949;33:130.
- Chee RP, Leskovar DI, Cantliffe DJ. Optimizing embryogenic callus and embryo growth of a synthetic seed system for sweet potato by varying media nutrient concentrations. *J Am Soc Hortic Sci*. 1992;117:663-667.
- Chen J, Zhan Y, Qian C, Lou Q. Cultivation method for isolated microspore of cucumber. *Nanjing Agricultural University*. 2008. Patent no CN 101317548.
- Chen J., Vanek E., Pieper M. Method for producing haploid, dihaploid and doubled haploid plants by isolated microspore culture. US2018/0213736A1
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Chen H, Yin KC, Chu CY, Bi FY. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *J Sci China Math*. 1975;18(5):659-668.
- Clausen RE, Mann MC. Inheritance in *Nicotiana Tabacum*: V. The Occurrence of Haploid Plants in Interspecific Progenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1924;10(4):121-4.
- Claveria E, Garcia-Mas J, Dolcet-Sanjuan R. Optimization of cucumber doubled haploid line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos. *J Am Soc Hortic Sci*. 2005;130(4):555-560.
- Dal B, Sari N, Solmaz I. Effect of different irradiation sources and doses on haploid embryo induction in Altinbas (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*) melons. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 2016;40:552-559.
- Deunff EL, Sauton A. Effect of parthenocarpy on ovule development in cucumber (*Cucumis sativus* L.) after pollination with normal and irradiated pollen. *Sex Plant Reprod*. 1994;7(4):221-228.
- 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. *Sci Hortic*. 2008; 119(3):246-251.
- Dirks R. Method for the production of double-haploid cucumbers. 1996. United States Patent No. 5,492,827.
- Dirks R, Van Dun K, De Snoo CB, Van Den Berg M, Lelivelt CL, Voermans W, Van Der Zeeuw, E. Reverse breeding: A novel breeding approach based on engineered meiosis. *Plant Biotechnology Journal*. 2009;7:837-845.
- Dolcet-Sanjuan R, Claveria E, Garcia-Mas J. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) dihaploid line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos. *Acta Hort*. 2006; 725(2):837-844.
- Domblides EA, Shmykova NA, Khimich GA, Korotseva IB, Kan LYu, 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.
- Dong YQ, Zhao WX, Li XH, Liu XC, Gao NN, Huang JH, Wang WY, Xu XL, Tang ZH. Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucumber species. *Plant Cell Rep*. 2016;35:1991-2019.
- Dryanovska OA. Induced callus *in vitro* from ovaries and anthers of species from the *Cucurbitaceae* family. *C R Acad Bulg Sci*. 1985;38:1243-1244.
- Dumas de Vaulx R. Obtention de plantes haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) apres pollinisation par *Cucumis ficifolius* A. *Rich C R Acad Sci III-Vie*. 1979;289:875-878.
- Dunwell JM. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol J*. 2010;8:377-424.
- Eun, JS, Bak HB. Studies on the anther culture of *Cucumis sativus*: Histological studies on the diploid. *Kor J Plant Tissue Culture*. 1974; 2(1):17-22.
- Faris NM, Niemirowicz-Szczytt K. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) embryo development *in situ* after pollination with irradiated pollen. *Acta Biol*. 1999;41:111-118.
- Ficcadenti N, Sestili S, Annibali S, Di Marco M, Schiavi M. *In vitro* gynogenesis to induce haploid plants in melon *Cucumis melo* L. *Genet Breed*. 1999;53:255-257.
- Forster BP, Heberle-Bors E, Kasha KJ, Touraev A. The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Sci*. 2007;12(8):368-375.
- Gains EF, Aase HC. A haploid wheat plant. *Armer. Jour. Bot*. 1926;13:373-385.

38. Gałazka J, Niemirowicz-Szczytt K. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. *Folia Hort.* 2013;25(1):67–78.
39. 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.
40. Gemes-Juhasz 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.). *Plant Cell Rep.* 2002;21(2):105–111.
41. Gemes-Juhasz A, Venczel G, Balogh P. Haploid plant induction in zucchini (*Cucurbita pepo* L. convar. giromontina Duch) and in cucumber (*Cucumis sativus* L.) lines through *in vitro* gynogenesis. *Acta Hort.* 1997;447:623–625.
42. Germana MA. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep.* 2011;30(5):839–857.
43. Gonzalo MJ, Olivier M, Garcia-Mas J, Monfort A, Dolcet-Sanjuan R, Katzir N. Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). *TAG.* 2005;110:802-811.
44. Guha S, Maheshwari SC. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature.* 1966;212:97-98.
45. Guha S, Maheshwari SC. Development of embryoids from pollen grains of *Datura in vitro*. *Phytomorphology.* 1967;17(1-4):454-461.
46. Guha S, Maheshwari SC. *In vitro* production of embryos from anther of *Datura*. *Nature.* 1964; 204:497.
47. Hamidvand Y, Abdollahi MR, Chaichi M, Moosavi SS. The effect of plant growth regulators on callogenesis and gametic embryogenesis from another culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Int J Agric Crop Sci.* 2013;5(10):1089.
48. Hayase H. Studies on *Cucurbita* crosses. V. The occurrence of twin plants with a haploid chromosome number in the F₁ of *C. maxima* x *C. moschata*. *Jap. Jour. Breed.* 1954; 4:115-121.
49. HO KM, JONES GE. Mingo barley. *Canadian Journal of Plant Science.* 1980;60(1): 279-280.
50. Kasha, KJ. Haploids in higher plants. *International Symposium on Haploids in Higher Plants.* 1974.
51. Kielkowska A, Havey MJ. *In vitro* flowering and production of viable pollen of cucumber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC).* 2012;109(1):3-82.
52. Kimber G, Riley R. The relationship of diploid progenitors of hexaploid wheat. *Canad. Jour. Genet. and Cytol.* 1963; 5:83-88.
53. Kostoff D. The problem of haploidy. (Cytogenetic studies in Nicotina haploids and their bearing on some other cytogenetic problems. *Bib. Genet.* 1942; 13:1-148.
54. Ashok Kumar HG, Murthy HN, Paek KY. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. *Sci Hort.* 2003; 98(3):213–222.
55. Ashok Kumar HG, Murthy HN. Effect of sugars and amino acids on androgenesis of *Cucumis sativus*. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 2004; 78(3):201–208.
56. Ashok Kumar HG, Ravishankar BV, Murthy HN The Influence of Polyamines on Androgenesis of *Cucumis sativus* L. *Eur J Hort. Sci.* 2004; 69(5):201–205.
57. Kuo CS. The preliminary studies on culture of unfertilized ovaries of rise *in vitro*. *Acta Bot. Sin.* 1982; 24, 33-38. [in Chinese with English abstract]
58. Kurtar ES, Balkaya A, Kandemir D. Evaluation of haploidization efficiency in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) through anther culture. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 2016;127(2):497–511.
59. Kurtar ES, Balkaya A. Production of *in vitro* haploid plants from *in situ* induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via irradiated pollen. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2010;102(3): 267-277.
60. Lazarte JE, Sasser CC. Asexual embryogenesis and plantlet development in anther culture of *Cucumis sativus* L. *HortScience.* 1982;17:88.
61. Li JW, Si SW, Cheng JY, Li JX, Liu JQ. Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus*. *Biol Plant.* 2013;57(1):164–168.
62. Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z Pflanzenphysiol.* 1982;105:427–434.
63. Lim W, Earle ED. Effect of *in vitro* and *in vivo* colchicine treatments on pollen production and fruit recovery on melon plants obtained after pollination with irradiated pollen. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 2008;95(1):115–124.
64. Lindstrom E.W. A haploid mutant in the tomato. *J. Heredity.* 1929;20:23-30.
65. Lofti M, Alan AR, Henning MJ, Jahn MM, Earle ED. Production of haploid and double haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Rep.* 2003; 21(11):1121–1128
66. Lofti M, Salehi S. Detection of cucumber parthenogenic haploid embryos by floating the immature seeds in liquid medium. *Proceeding of IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae* 2008; 375–380.
67. Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I. Doubled haploid production in crop plants: a manual. *Kluwer Academic.* 2003.
68. 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.
69. Miller CO. Kinetin and Kinetin-Like Compounds. Modern Methods of Plant Analysis. *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Springer Berlin Heidelberg;* 1963;194–202.
70. Moqbeli E, Peyvast G, Hamidoghly Y, Olfati JA. *In vitro* cucumber haploid line generation in several new cultivars. *AsPac J Mol Biol Biotechnol.* 2013;21(1):18–25.
71. Morisson G. The occurrence and use of haploid plants in tomato with special reference to the variety Marglobe. *Proc. VI. Int. Cong. Genet.* 1932;2:137.
72. Mulualem T, Abate M. Heterotic Response in Major Cereals and Vegetable Crops. *International Journal of Plant Breeding and Genetics. Science Alert.* 2016;10(2):69–78.
73. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum,* 1962;15:473–497.
74. Niemirowicz-Szczytt K, Dumas de Vaulx R. Preliminary data on haploid cucumber (*Cucumis sativus* L.) induction. *Cucurbit Genetics Coop.* 1989;12:24-25.
75. Niemirowicz-Szczytt K, Faris NM., Nikolova V, Rakoczy-Trojanowska M, Malepszy S. Optimization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid production and doubling. *Cucurbitaceae.* 1995;94:169-171.
76. Ozsan T., Gozen V. and Onus A. Cucumber Gynogenesis: Effects of 8 Different Media on Embryo and Plant Formation. *International Journal of Agriculture Innovations and Research.* 2017;6(2):419-422.
77. Przyborowski JA and Niemirowicz-Szczytt K. Main factors affecting cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo development and haploid plant characteristics. *Plant Breeding.* 1994;112:70-75.
78. Przyborowski JA. Haploidy in cucumber (*Cucumis sativus* L.). In: *In vitro* haploid production in higher plants. *Kluwer Academic Publishers.* 1996.
79. Rakha M, Metwally E, Moustafa S, Etman A, Dewir Y. Evaluation of regenerated strains from six *Cucurbita* interspecific hybrids obtained through anther and ovule *in vitro* cultures. *Aust J Crop Sci.* 2012;6(1):23–30
80. Sauton A. Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen. *Cucurbit Genetics Coop.* 1989; 12:22-23.
81. Sauton A. Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskmelon, *Cucumis melo* L. *Sci. Hort.* 1988;35(1-2):71-75.
82. Sauton A., Dumas de vaulx R. Production of haploid plants in melon (*Cucumis melo* L.) As a result of gynogenesis induced by irradiated pollen. *Agronomie.* 1987;7:141-147.
83. Savin F, Decombe le-courour M, Hallard J. 1988. The x-ray detection of haploid embryos arisen in muskmelon (*Cucumis melo* L.) Seeds and resulting from a parthenogenetic development induced by irradiated pollen. *Cucurbit genetics coop.* 1988;11:36-42.
84. Smiech M, Sztangret-Wisniewska J, Galecka T, Korzeniewska A, Marzec L, Kolakowska G, Piskurewicz U, Niemirowicz-Szczytt K. Potential use of RAPD markers in characteristics of cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploids and double-haploids. *Acta Soc Bot Pol.* 2008; 77(1):29–34.
85. 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.
86. 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.
87. Suprunova T, Shmykova N. *In vitro* induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus*. In: Pitrat M (ed) *Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae.* 2008;371–374.
88. Swaminathan MS, Singh MP. X-ray induced somatic haploidy in watermelon. *Current Sci.* 1958;27,2:63-64.
89. Sztangret-Wisniewska J, Galecka T, Korzeniewska A, Marzec I, Kolakowska G, Piskurewicz U. Characteristics of double-haploid cucumber (*Cucumis sativus* L.) Lines resistant to downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*). *Proc. Cucurbitaceae* 2006;515-526.
90. 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 Agric Biol.* 2015;17(3):613–618/
91. Touraev A, Forster BP, Jain SM, editors. *Advances in Haploid Production in Higher Plants.* Springer Netherlands; 2009; <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4>
92. Truong-Andre I. *In vitro* haploid plants derived from pollination by irradiated pollen of cucumber. *Proceedings of eucarpia meeting on cucurbit genetics and breeding.* Avignon Monfavet. 1988;143–144/
93. Wu BJ, Chen KC. Cytological and embryological studies on haploid plant production from cultured unpollinated ovaries of *Nicotiana tabacum* L. *Acta Bot. Sin.* 1982; 24: 125-129. [in Chinese with English abstract].
94. Zhan Y, Chen JF, Malik AA. Embryo induction and plant regeneration of cucumber (*Cucumis sativus* L.) through microspore culture. *Acta Hort. Sin.* 2009;36(2):221–226/