

# ИНДУКЦИЯ ГИНОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ НЕОПЫЛЕННЫХ СЕМЯПОЧЕК ТЫКВЫ



**Шмыкова Н.А.** – доктор с.-х. наук, зав. лаб. биотехнологии

**Шумилина Д.В.** – кандидат биол. наук, с.н.с. лаб. биотехнологии

**Кушнерёва В.П.** – кандидат с.-х. наук, зав. лаб. селекции и семеноводства тыквенных культур

**Химич Г.А.** – с.н.с. лаб. селекции и семеноводства тыквенных культур

**В статье показана перспектива использования культуры неопыленных семяпочек *in vitro* для получения удвоенных гаплоидов тыквы. Семяпочки 5 гибридов культивировали на питательной среде СВМ. Для индукции гиногенеза использовали два варианта регуляторов роста: первый 0,2 мг/л тидиазурина в сочетании с 0,0001 мкМ эпибрассинолида, второй – 2 мг/л 2,4Д. Частота образования эмбрионов зависела от варианта сред и сортообразца. Максимальное число эмбрионов, образующееся из неопыленных семяпочек одной завязи составляло 6-9 штук.**

**Ключевые слова:** культура неопыленных семяпочек, гиногенез, гаплоиды тыквы

В современной селекции одной из важнейших задач является быстрое достижение константности селекционного материала. Наиболее остро эта проблема возникает при создании гетерозисных гибридов, для которых требуются гомозиготные линии с высокой комбинационной способностью. Обычно линии получают путем длительного инбридинга (5 – 10 поколений).

В 1921 году Бергнер обнаружил первые гаплоидные растения дурмана обыкновенного, а через три года Блейсли и Беллинг (Blakeslee, Belling, 1924) впервые предложили использовать такие растения в селекции. Ими было отмечено, что гаплоидия дает «... быстрый метод превращения гетерозиготной формы в чистую линию».

Гаплоидное же состояние генома в отличие от диплоидного позволяет обнаружить редкие рецессивные аллели, а получение удвоенных гаплоидов из микроспор и клеток зародышевого мешка – реализовать гаметоклональную изменчивость в индивидуальных растениях.

Экспериментальное получение удвоенных гаплоидов у представителей семейства Cucurbitaceae широко изучается зарубежными учеными (Caglar, Abak, 1999; Dryanovska, 1985; Metwally et al., 1998; Ficcadenti et al., 1995; Gursoz et al., Lim, Earle, 2009; Lotfi et al., 2003; Sary et al., 1999; Sauton, 1988, 1989; Sun et al.,

2006; Taner et al., 2000; Xie et al., 2005). Из трех известных способов получения гаплоидов (андрогенез, гиногенез и партеногенез) у тыквы наиболее успешно используется партеногенез. Для индукции его применяется облученная пыльца (Kurtar, 1999, 2009; Kurtar et al., 2002, Kurtar et al., 2009, Kurtar et al., 2010). Имеются единичные сообщения о положительных результатах при культивировании *in vitro* пыльников и неопыленных семяпочек тыквы (Metwally et al., 1998a; Metwally et al., 1998b; Mohamed, Refaei, 2004;).

Получение гаплоидных растений в культуре *in vitro* неопыленных семяпочек является результатом перехода клеток зародышевого мешка с гаметофитного пути развития на спорофитный с образованием из них эмбриоидов или морфогенного каллуса. На процесс индукции гиногенеза влияет большое число факторов таких, как генотип растения, стадия развития женского гаметофита, состав питательных сред, условия выращивания донорных растений.

**Цель наших исследований:** оптимизировать условия индукции гиногенеза в культуре неопыленных семяпочек тыквы для получения гомозиготных линий и расширения спектра формообразовательного процесса с последующей разработкой отечественной технологии.

**Задачи:**

1. Подобрать фазу развития экспланта;
2. Подобрать питательные среды для индукции гиногенеза у тыквы;
3. Подобрать состав питательных сред для регенерации побегов.

**Материалы и методы исследования**

В качестве исходного материала для индукции гиногенеза использовали бутоны селекционных сортов тыквы лаборатории селекции и семеноводства тыквенных культур ВНИИССОК №100 №103, №104, №109 и №112 за 1-2 суток до цветения, по аналогии с культурой неопыленных семяпочек огурца *in vitro* (Шмыкова, Супрунова, 2009). Стерилизацию бутонов проводили 0,1% раствором сулемы в течение 10 минут с последующим многократным промыванием стерильной дистиллированной водой. Для индукции гиногенеза использовали модифицированную среду CBM (Gemés Juhasz et al., 2002) в сочетании с различными регуляторами роста:

1. 0,1 – 0,2 мг/л ТДЗ с 0,0001 мкМ эпибрасинолида
2. 2 мг/л 2,4Д

На втором этапе регенерации использовали среды MC (Murashige, Skoog, 1962) без гормонов с 0,3 % фитогеля.

**Результаты**

Для индукции гиногенеза минеральный состав питательной среды, витамины и добавки аминокислот подбирали по аналогии с культурой неопыленных семяпочек огурца (Шмыкова, Супрунова, 2009). При составлении вариантов опытов использовали эффективное сочетание регуляторов роста, полученное нами для гиногенеза у огурца – первый вариант. Второй вариант – по литературным данным (Metwally et al., 1998a). Авторы этой работы использовали от 0,1 мг/л до 10 мг/л 2,4Д.

При культивировании *in vitro* семяпочки тыквы быстро увеличиваются в

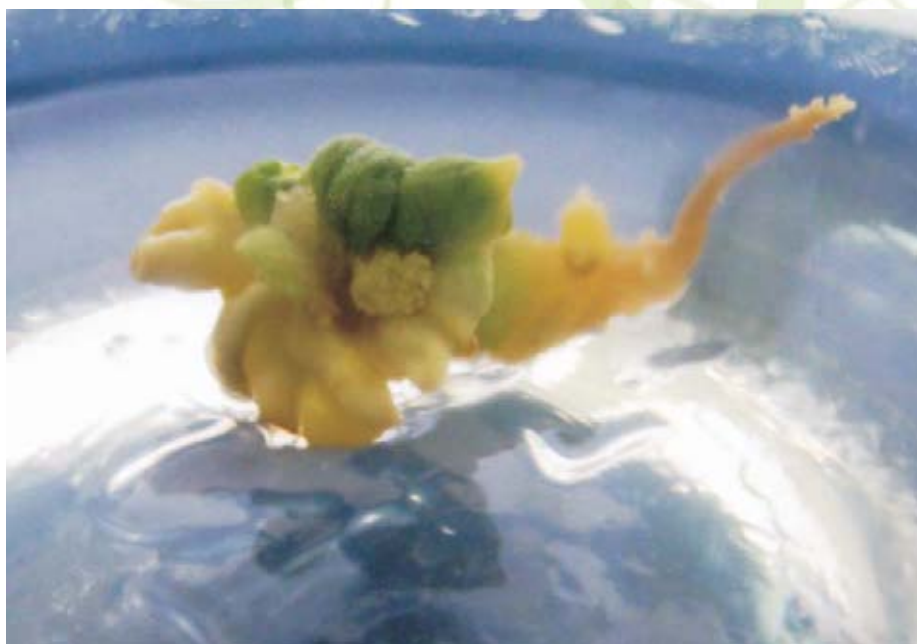


Рис. 1. Аномальный проросток, развивающийся из семяпочки тыквы на индукционной среде CBM (0,2 мг/л ТДЗ и 0,0001 мкМ эпибрасинолида)

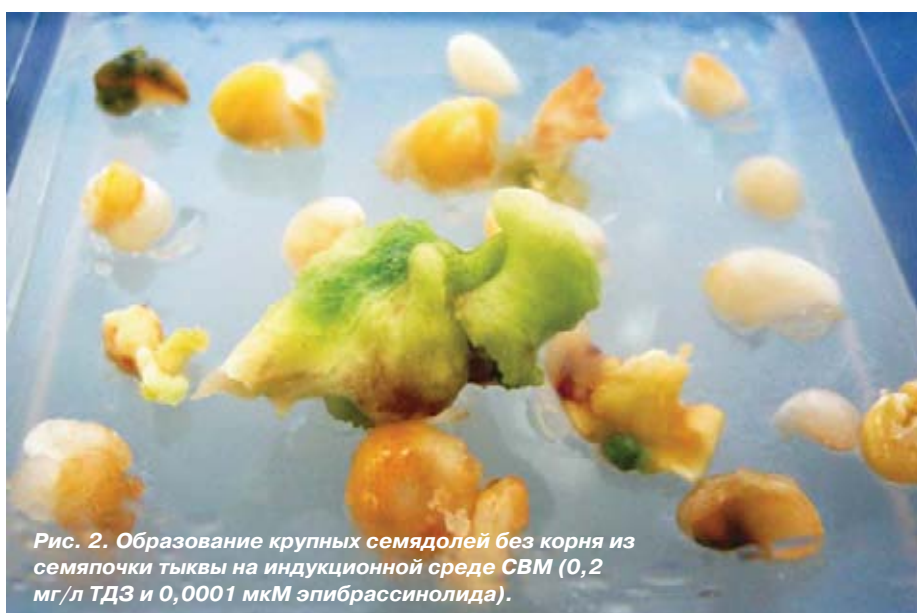


Рис. 2. Образование крупных семядолей без корня из семяпочки тыквы на индукционной среде CBM (0,2 мг/л ТДЗ и 0,0001 мкМ эпибрасинолида).

Рис.3. Развитие проростка гибрида № 100 на безгормональной среде MS после индукции гиногенеза на среде СВМ (0,2 мг/л ТДЗ и 0,0001 мкМ эпибрасинолида).



Рис. 4. Развитие проростка гибрида № 104 на безгормональной среде MS после индукции гиногенеза на среде СВМ (0,2 мг/л ТДЗ и 0,0001 мкМ эпибрасинолида).

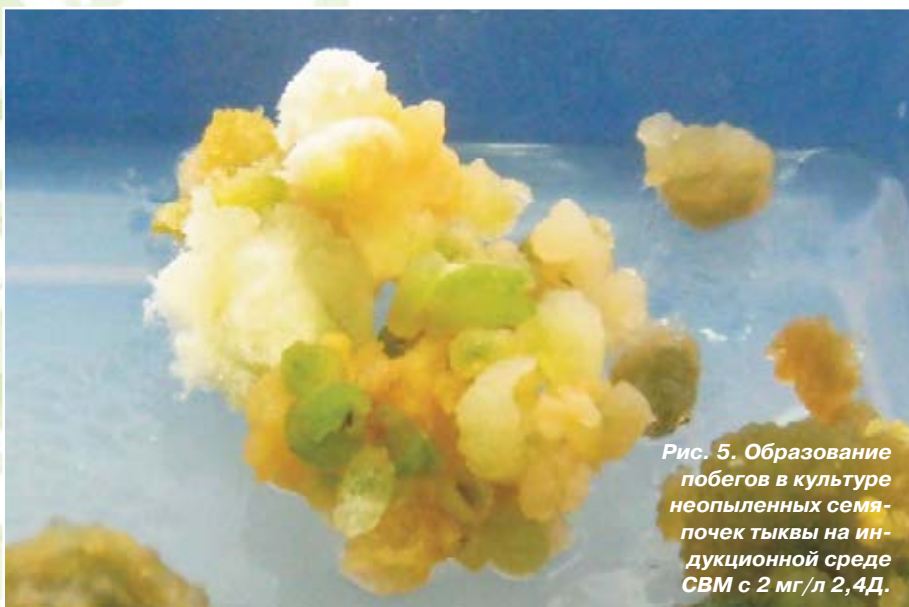


Рис. 5. Образование побегов в культуре неопыленных семяпочек тыквы на индукционной среде СВМ с 2 мг/л 2,4Д.

размерах (в 4-5 раз) в течение первого месяца, при этом между вариантами проявляются большие морфологические различия. В первом варианте большинство семяпочек внутри остаются пустыми, между наружными интегументами образуется щель, через которую видны почти прозрачные внутренние интегументы и зародышевый мешок. Образование каллуса не наблюдается. Проростки развиваются из закрытых семяпочек, первоначально появляются мощный, сильно утолщенный корень со слабыми зачатками семядолей (рис.1) или крупные семядоли без корня (рис. 2). При переносе на безгормональную питательную среду у проростков, как первого, так и второго типа, развивается точка роста побега, и образуются корни нормальной толщины (рис.3, 4, соответственно).

Во втором варианте почти все семяпочки внутри заполнены плотной тканью, из которой при переносе на безгормональную среду происходит образование побегов с последующим образованием корней (рис. 5, 6) и дальнейшим развитием полноценных растений (рис.7).

Гибриды различались по частоте индукции гиногенеза в зависимости от варианта среды (табл.1). У гибрида №100 индукция гиногенеза происходила лишь на среде с 0,2 мг/л ТДЗ и

### Литература

1. Шмыкова Н.А., Супрунова Т.П. Индукция гиногенеза в культуре in vitro неопыленных семяпочек *Cucumis sativus* L. // Гавриш – 2009. - №4. – С.40-44.
2. Blakeslee A.F., Belling J. Chromosomal mutations in the Jion weed, *Datura stramonium* // J. Heredity. – 1924. – Vol. 15. – P. 195 – 206.
3. Caglar G., Abak K., Progress in the production of haploid embryos, plant and double haploids in cucumber (*C. sativus* L.) by gamma irradiated pollen in Turkey. // Acta Hort., 1999. - Vol. 492. - P. 317-322.
4. Dryanovska O.A. Induced callus in vitro from ovaries and anthers of species from the Cucurbitaceae family. // C.R. Acad. Bulgar. Sci. - 1985. - 38. – P. 1243-1244.
5. Gemes Juhasz, 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. – Vol. 21. – P. 105-111.
6. Ficcidenti N., Veronose P., Sesuli S. et al. Influence of genotype on induction of haploidy in *Cucumis melo* L. by using



Рис. 6. Образование корней у побегов тыквы, полученных на индукционной среде СВМ с 2 мг/л 2,4Д, при переносе на безгормональную среду MS.



Рис. 7. Развитие растения-регенеранта тыквы, гибрид № 109, полученного на индукционной среде СВМ с 2 мг/л 2,4Д, при переносе на безгормональную среду MS.

0,0001 мкМ брассинолида, а у гибридов №103 и №112 на среде с 2,0 мг/л 2,4Д, а гибриды №109 и №104 давали хороший результат на обеих средах. Максимальное число эмбриоидов, образовавшихся из одной завязи, было у гибрида №112 (9 штук), также хорошие результаты получены у гибрида №104 (6-7 штук эмбриоидов из одной завязи).

#### Закключение

Полученные положительные результаты свидетельствуют о том, что изучение гиногенеза у тыквы перспективно, и это в дальнейшем позволит разработать эффективную методику получения удвоенных гаплоидов.

**Частота индукции гиногенеза в культуре *in vitro* неопыленных семяпочек гибридов тыквы на разных средах**

| № гибрида | Число эмбриоидов (шт/завязь)                      |                           |
|-----------|---|---------------------------|
|           | Среда СВМ с 0,2 мг/л ТДЗ и 0,0001мкМ брассинолида | Среда СВМ с 2,0 мг/л 2,4Д |
| 100       | 3   | 0                         |
| 103       | 0   | 1                         |
| 104       | 6   | 7                         |
| 109       | 3   | 6                         |
| 112       | 0   | 9                         |

irradiated pollen. // J. Genet Breed. 1995. – Vol. 49. – P. 359-364.

7. Gursoz N., Abak K., Pirat M., Rode J.C., Dumas de Vaulx R. Obtention of haploid plants induced by irradiated pollen in watermelon (*Citrullus lanatus*). // Cucurbit Genetic Coop. 1991. – Vol. 14. – P. 109-110.

8. Kurtar E.S. Research on the effects of genotypes and growing seasons on in situ haploid embryo induction and in vitro plant obtention via irradiated pollen in squash. / PhD Thesis, University of Cukurova, 1999.

9. Kurtar E.S. Influence of gamma irradiated pollen viability, germinability and fruit and seed-set of pumpkin and winter squash. // Afr J Bio. – 2009. – 8. – P. 6918-6926.

10. Kurtar E.S., Sari N., Abak K. Obtention of haploid embryo and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). // Euphytica, 2002. – Vol. 127. – P. 335-344.

11. Kurtar E.S., Balkaya A., Ozbakir M., Ofluoglu T. Induction of haploid embryo and plant regeneration via irradiated pollen technique in pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex. Poir). // Afr J Bio. – 2009. – 8. – P. 5944- 5951.

12. Kurtar E.S., 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. Organ Cult. 2010. DOI 10. 1007/s11240-010-9729-1.

13. Lim W., Earle E.D. Enhanced recovery of doubled haploid lines from parthenogenetic plants of melon (*Cucumis melo* L.). // Plant Cell Rep., 2009. – Vol. 98. – P. 351-356.

14. Lotfi M., Alan A.R., Henning M.J., Jahn M.M., Earle E.D. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. // Plant Cell Rep., 2003. – Vol. 21. – P. 1121- 1128.

15. Metwally E. A., Moustafa S.A., El-Sawy B.I., Haroun S.A., Shalaby T.A. Production of haploid from in vitro culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo*. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 1998a. – Vol 52. – P. 117-121.

16. Metwally E. A., Moustafa S.A., El-Sawy B.I., Haroun S.A., Shalaby T.A. Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo*. // Plant Cell Tiss. Organ Cult., 1998b. – Vol 52. – P. 171-176.

17. Mohamed M.F., Refaei E.F.S. Enhanced haploid regeneration in anther culture of summer squash *Cucurbita pepo* L. Cucurbit Genetics Cooperative Report. /2004. – Vol. 27. – P.57-60

18. Murashige I., Skoog F.A. A reused medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia plan-

tarum., 1962. – Vol.15. – N 3. – P. 473-497.

19. Sary N., Abak K., Pirat M. Comparison ploidy level screening methods in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai). // Scientia Hort., 1999. – Vol. 82. – P. 265-277.

20. Sauton A. Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskmelon, *Cucumis melo* L. // Sci Hort., 1988. – V.35. – P. 71-75.

21. Sauton A. Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen. // Cucurbit Genetics Cooperative Report, 1989. – Vol. 12. – P. 22-23.

22. Sun Y., Mei S., Peng J. et al. Induced haploid plants after pollination by irradiated pollen in *Cucumis melo* L. // Hubei Agr Sci., 2006. – Vol. 4. – P. 98-100.

23. Taner K.Y., Yanmaz R., Kunter B. The effects of irradiation dose and harvest period on haploid plant formation via irradiated pollen in snake cucumber (*Cucurbita melo var flexuosus* Naud.) // IIIrd National Vegetable Culture Symp. Isparta-Turkey, 2000. – P. 177-181.

24. Xie M., Zhao J., He H., Wu A., Cai R. Induced haploid plants after pollination by irradiated pollen in *Cucumis sativus* L. // J. Shanghai Jiaotong Univ (Agr sci.), 2005. – N2. – P. 45-49.