Обзор / Review

https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-4-11-26
УДК 631.523:575.224.234:635.621

**Е.А. Домблидес,
А.С. Ермолаев, С.Н. Белов**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный научный центр овощеводства" (ФГБНУ ФНЦО)
143072, Россия, Московская область, Одинцовский район, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д.14

Финансирование: «Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-316-90053»

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов: Все авторы в равной доле участвовали в написании статьи.

Для цитирования: Домблидес Е.А., Ермолаев А.С., Белов С.Н. Получение удвоенных гаплоидов *Cucurbita pepo* L. *Овощи России.* 2021;(4):11-26. https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-4-11-26

Поступила в редакцию: 20.07.2021
Принята к печати: 20.08.2021
Опубликована: 25.08.2021

**Elena A. Domblides,
Alexey S.Ermolaev, Sergey N. Belov**

Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Scientific Vegetable Center (FSBSI FSVC)
14, Selectsionnaya str., VNIISSOK, Odintsovo district, Moscow region, Russia, 143072

Funding: The reported study was funded by RFBR, project number 20-316-90053

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

Authors' Contribution: All authors contributed equally to the writing of the article.
For citations: Domblides E.A., Ermolaev A.S., Belov S.N. Obtaining doubled haploids of *Cucurbita pepo* L. *Vegetable crops of Russia.* 2021;(4):11-26. (In Russ.) https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-4-11-26

Received: 20.07.2021
Accepted for publication: 20.08.2021
Accepted: 25.08.2021

Получение удвоенных гаплоидов *Cucurbita pepo* L.

Резюме

Удвоенные гаплоиды уже около 100 лет используются во всем мире в селекционных программах и фундаментальных исследованиях как ценный гомозиготный материал. Вид *Cucurbita pepo* L. представлен огромным многообразием форм, включает высокопродуктивные овощные культуры и имеет широкое распространение в мире. Несмотря на большую экономическую значимость, создание эффективных протоколов, обеспечивающих стабильное получение удвоенных гаплоидов у этого вида остается актуальной задачей. Получение DH-растений представляет интерес не только по причине ускорения селекционного процесса, но и за счет реализации огромного потенциала гаметоклональной изменчивости, заложенной у этого высоко полиморфного вида. В обзоре рассмотрены основные использующиеся технологии получения удвоенных гаплоидов у овощных культур *C. pepo*: партеногенез *in situ* стимулированный обработанной/облученной пыльцой, гиногенез *in vitro* (культура неопыленных семяпочек *in vitro*) и андрогенез *in vitro* (культура пыльников/микроспор *in vitro*). Представлен анализ исследований, проведенных с начала открытия гаплоидных растений до современных достижений и оценки перспектив в области получения DH растений. Рассмотрены основные критические факторы, влияющие на эффективность каждой из технологий и ее отдельных этапов. Представлена разработанная технология получения удвоенных гаплоидов кабачка с использованием культуры неопыленных семяпочек *in vitro*, позволяющая получать до 55 эмбриоидов на 1 культивируемую завязь (28 эмбриоидов/100 культивируемых семяпочек). Для внедрения гаплоидных технологий в селекционный процесс необходимо полученные растения-регенеранты оценивать на уровень плоидности. Использование прямого подсчета хромосом в апикальных клетках может представлять определенную сложность у этого вида ввиду большого их количества (2n=40) и их малого размера. В зависимости от уровня оснащения лаборатории определение плоидности с использованием проточной цитометрии клеточных ядер и подсчета количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц в эпителии абаксиальной стороны листа, может быть более удобными методами. В обзоре рассмотрены перспективы использования молекулярных маркеров для оценки на гомозиготность при DH-технологиях, в том числе и у *C. pepo*.

Ключевые слова: *Cucurbita pepo* L., DH-растения, партеногенез, гиногенез, андрогенез, гомозиготные линии, SSR-маркеры

Obtaining doubled haploids of *Cucurbita pepo* L.

Abstract

Doubled haploids have been widely used worldwide in breeding programs and fundamental research as valuable homozygous material for about 100 years. The species *Cucurbita pepo* L. are represented by a huge variety of forms, include highly productive vegetable crops and have a wide distribution in the world. Despite the great economic importance, the creation of effective protocols to ensure stable production of doubled haploids in this species remains an urgent task. DH plants are of interest not only because of the acceleration of the breeding process, but also because of the realization of the huge potential of gametoclonal variability inherent in this highly polymorphic species. In this review, we analyzed the main technologies used for obtaining doubled haploids in vegetable crops of *C. pepo*: parthenogenesis in situ stimulated by treated/irradiated pollen, gynogenesis *in vitro* (unpollinated ovule culture *in vitro*) and androgenesis *in vitro* (anther/microspore culture *in vitro*). An analysis is presented of the research carried out from the beginning of the discovery of haploid plants to the current advances and evaluation of the prospects in the field of DH plant production. The main critical factors influencing the efficiency of each technology and its individual steps are considered. The developed technology of doubled haploids obtaining using non-pollinated ovary culture *in vitro* is presented. This technology allows to obtain up to 55 embryoids per one cultivated ovary (28 embryoids/100 cultivated ovules) To introduce haploid technologies into the breeding process it is necessary to evaluate the obtained plants for ploidy level. The use of direct counting of chromosomes in apical cells may present a certain difficulty in this species due to their large number (2n=40) and their small size. Depending on the level of laboratory equipment, ploidy determination using flow cytometry of cell nuclei and counting the number of chloroplasts in stomatal guard cells in the epidermis of the abaxial side of the leaf may be more convenient methods. The prospects for the use of molecular markers for assessment for homozygosity in DH technologies used, including *C. pepo*, are discussed in the review.

Keywords: *Cucurbita pepo* L., DH-plants, parthenogenesis, gynogenesis, androgenesis, homozygous lines, SSR-markers

Введение

Cucurbita pepo L. объединяет однолетние травянистые растения, принадлежащие к Семейству *Cucurbitaceae* Juss, роду *Cucurbita* L. и имеет широкое распространение в мире ввиду большой экономической значимости. К этому виду относятся кабачок, патиссон, и сама тыква, плоды которой употребляют только в зрелом виде, и она имеет длительный срок хранения. Кабачок и патиссон зачастую называют летними овощными тыквами, и в англоязычной литературе они известны под общим названием «summer squash». Это сезонные и высокопродуктивные овощные культуры, которые часто используют в пищу в виде незрелых плодов через несколько дней после цветения, задолго до того, как плоды достигнут фазы биологической спелости. В переработку на икру идут более зрелые плоды кабачка и патиссона [1–3].

Наиболее ценными представителями вида *C. pepo* L. с точки зрения производства овощной продукции являются тыквы и кабачки. Согласно последним данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций за 2019 год, тройку стран лидеров по количеству произведенной продукции тыкв, кабачков и патиссонов (культуры не разграничены статистикой) составляют: Китай – 8,3 млн т., Украина – 1,3 млн т, Россия – 1,1 млн т. По возделываемым площадям лидируют Китай (материковая часть) – 450,6 тыс. га, Камерун – 176,1 тыс. га и Турция – 126,2 тыс. га. Всего в мире за 2019 год посевные площади, занятые под тыквенными культурами, составили около 1 539 023 га, с которых было собрано 22 900 826 т продукции. Посевные площади только под тыквами, кабачками и патиссонами составили 19,4% от общей площади, занятой под тыквенными культурами, урожай с них составил 9,6% от общего [FAOSTAT].

Основной мировой тенденцией в производстве овощей является использование гибридов F_1. Помимо проявляющегося эффекта гетерозиса производство гибридных семян позволяет защищать авторские права производителей селекционно-семеноводческой продукции. Самыми крупными мировыми производителями семян овощей являются такие компании, как Semenis (дочерняя компания транснациональной корпорации Bayer), Syngenta (дочерняя компания китайской госкорпорации ChemChina), Rijk Zwaan Zaadteelt en Zaadhandel BV (Нидерланды). Исходя из отчетов, представленных в открытых источниках, ассортимент семян тыквенных культур данных компаний состоит исключительно из гибридных форм.

На 2021 год в Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию в Российской Федерации, зарегистрировано 290 сортов и гибридов *C. pepo* L., оригинаторство 24 из которых принадлежит ФГБНУ ФНЦО, занимающегося селекцией тыквенных культур уже более 100 лет. 44% селекционных достижений культур данного вида составляют гибриды.

Небольшое количество гибридов и превалирование над ними сортов в российской селекции тыквенных культур свидетельствует об отсутствии у селекционеров возможности внедрять технологии, позволяющие быстро создавать родительские линии для гибридов F_1. В связи с этим выровненный линейный материал приобретает особую ценность в селекционном процессе. Линии должны обладать комплексом хозяйственно ценных признаков: устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам внешней среды, женским типом цветения, высокими вкусовыми и технологическими качествами. Данные признаки тяжело совместить в одном образце, но при помощи методов биотехнологии можно ускорить селекционный процесс.

Создание выровненной по хозяйственно ценным признакам линии методами классической селекции может быть достигнуто только за счет проведения искусственного самоопыления (инцухтов) в течение 7-10 лет, но и в этом случае нельзя достигнуть полной гомозиготности. Для растений, относящихся к виду *C. pepo*, несмотря на наличие достаточно крупных цветков, с которыми легко проводить скрещивания, процесс искусственного самоопыления трудоемок ввиду особенностей культуры. У этого вида цветки раздельнополые, и достаточно тяжело подобрать мужские и женские цветки одного возраста. Все скрещивания необходимо проводить вручную и индивидуально изолировать каждый цветок. Все эти моменты обуславливают большие временные и трудовые затраты, необходимые для создания новых чистых линий и гибридных комбинаций F_1. Использование технологий получения удвоенных гаплоидов (DH-технологии) позволяет создать 100% гомозиготную линию в течение 1-2 лет, что в свою очередь многократно повышает эффективность селекционного процесса. Кроме того, конъюгация и кроссинговер хромосом в профазе I мейоза, их случайное расхождение в анафазе I и сочетание в микроспорах и мегаспорах, значительно повышают число классов расщепления. Каждый удвоенный гаплоид является отдельным генотипическим и фенотипическим образцом с уникальным сочетанием гомозиготных аллелей. Наиболее ценные «исключительные» генотипы возникают с небольшой частотой, в связи с чем особенно важно повышать эффективность технологий, увеличивая выход удвоенных гаплоидов.

Получение удвоенных гаплоидов у *C. pepo* весьма актуально не только по причине ускорения селекционного процесса, но и за счет реализации значительного потенциала гаметоклональной изменчивости, заложенной у этого вида. Вид *C. pepo* отличается огромным многообразием форм. В связи с большой амплитудой изменчивости, присущей виду, A.N.Duchesne называл его *Cucurbita polymorpha*. Н.И. Вавилов отмечал, что в пределах *C. pepo* L. имеются формы, легко скрещивающиеся между собой и в то же время отличающиеся примерно в 1000 раз по массе плодов [5]. Вид характеризуется огромнейшим разнообразием формы плода (от круглой до очень длинной или до плоской) и окраски (зеленой, оранжевой, желтой, белой). При этом интенсивность окраски также сильно варьирует от яркой до бледной, окраска – от почти черной до почти белой. Цветовые узоры на плоде могут включать продольные полосы различной ширины и пятнистость, сетчатость, а также иметь сложный двухцветный узор, так что на поверхности одного плода может присутствовать сразу четыре цвета [3].

Среди вида *C. pepo* L. было выделено восемь групп, принадлежащих к двум подвидам (subsp. pepo и subsp. texana), отчетливо различающихся по форме плода и выращивающихся для кулинарных целей, которые в англоязычной литературе получили следующие названия: pumpkin, scallop, acorn, crookneck, straightneck, cocozelle, vegetable marrow, zucchini [6,7].

Проведенное молекулярное исследование генетического разнообразия рода *Cucurbita* с использованием SSR

маркеров показало, что *C. pepo* L. содержит, безусловно, наибольшую генетическую изменчивость среди видов, относящихся к этому роду. Paris в 2016 году в своей работе представил наиболее полную характеристику вида *C. pepo* L., отражающую все генетическое разнообразие [3].

Получение генетически стабильных (100% гомозиготных) удвоенных гаплоидных (DH) линий за одно поколение может значительно ускорить селекционный процесс. Кроме того, поскольку у гаплоидов и удвоенных гаплоидов все гены находятся в гомозиготном состоянии, все рецессивные признаки у таких растений хорошо видны, так как они не маскируются под действием доминантных аллелей. Селекционеру удобно проводить отбор желаемых генотипов, фиксировать мутации и проводить скрининг уже в первом поколении. Кроме того, отбор на гаплоидном уровне может позволить исключить генотипы, обладающие нежелательными мутациями [8]. Полученные гомозиготные DH-растения могут напрямую стать новыми сортами или ценными родительскими линиями для получения гибридных растений F_1 [9]. Наличие DH-линий в большом количестве повышает эффективность селекционных программ, в связи с чем очень желательны надежные протоколы индукции гаплоидов для создания гомозиготных линий.

Исследования по получению удвоенных гаплоидов и их использованию для решения фундаментальных и практических задач уже проводятся в мире в течение 100 лет. На данный момент протоколы производства удвоенных гаплоидов уже описаны для 384 видов. Они разработаны путем применения различных *in vivo* и *in vitro* гаплоидных технологий, таких как опыление облученной пыльцой, межвидовые и внутривидовые скрещивания, скрещивание с естественно или искусственно полученными линиями гаплоидных индукторов, культура неопыленных завязей или семяпочек *in vitro* и культура изолированных пыльников или микроспор *in vitro* [10]. Для культур, относящихся к семейству *Cucurbitaceae*, большая часть протоколов разработана для огурца и дыни, в то время как для культур, относящихся к такому экономически значимому виду как *C. pepo*, их количество невелико, в связи с чем их разработка является крайне актуальной.

История открытия гаплоидов и первые гаплоиды у культур семейства *Cucurbitaceae*

Первые два гаплоидных покрытосеменных растения, для которых было получено цитологическое подтверждение, были обнаружены у дурмана обыкновенного (*Datura stramonium* L.) при проведении опытов с применением холодовой обработки для индукции хромосомных нарушений [11,12]. Однако, опираясь на сведенья Harland [13], можно предположить, что гаплоиды были впервые описаны несколько ранее на хлопке сорта Man Cotton, образующем относительно многочисленные пары близнецов в семенах [14]. Вскоре за этим последовали аналогичные открытия гаплоидов и у других видов, например, *Nicotiana tabacum* [15], *Triticum compactum* [16], *Lucopersicum esculentum* [17]. Список видов, у которых обнаруживались гаплоиды, стремительно пополнялся, многие ученые, занимающиеся генетикой и селекцией достаточно быстро поняли перспективность этого открытия, появилось большое количество научных работ, связанных с гаплоидией, и первые обзорные публикации [18,19]. На возможность получения гомозиготных линий путем удвоения хромосом еще в 30-е годы XX века указали в своих работах многие отечественные и зарубежные ученые [20–24], но разработка методики и практическое ее использование для ускоренного создания гомозиготных диплоидных линий были осуществлены лишь в 1949 году [25]. Chase признан одним из первых, кто включил гаплоиды в программу селекции, в данном случае путем индукции гаплоидов в кукурузе через партеногенез и с последующим удвоением их хромосомного набора [26]. Основной прорыв гаплоидных технологий произошел после открытия процесса андрогенеза, когда было показано, что гаплоидные растения могут быть получены из изолированных пыльников в культуре *in vitro* [27,28].

Несмотря на то, что открытие гаплоидных форм произошло в начале XX века, только через тридцать лет удалось обнаружить гаплоиды в семействе *Cucurbitaceae*. Первое упоминание об обнаружении гаплоидных близнецовых зародышей в семенах, полученных от межвидовых скрещиваний *C. maxima* x *C. moschata*, произошло в работе Hayase, вышедшей в 1954 году. Автору удалось не только подробно описать выращенные из близнецовых зародышей растения, но и получить кариологическое подтверждение гаплоидного набора хромосом. В работе отмечалось, что эти растения формировали женские цветки в большом количестве, в то время как мужские цветки либо вообще не образовывались (в полевых условиях), либо их можно было обнаружить (в условиях теплицы), но при этом пыльники в них были пустыми белого или коричневого цвета. При опылении женских цветков нормальной пыльцой различных диплоидных растений происходило завязывание плодов, однако семян в них не было [29].

В 1958 году L.E. Aalders, проводя опыты с семенами огурца *Cucumus sativus* L., обнаружил, что при помещении в воду большая часть семян огурца тонет, а другая часть остается на поверхности воды. При извлечении зародышей из плавающих на поверхности воды семян и помещении их на питательную среду в культуре *in vitro*, ему удалось обнаружить и вырастить гаплоиды. Всего им было получено 13 моноплоидных растений (термин «monoploids» автор использовал в своих статьях), но только восемь из них удалось довести в теплице до цветущего состояния [30]. Несмотря на произведенные обработки колхицином и образующиеся плоды, получить семян от самоопыления в этом исследовании так и не удалось. Способ выделения 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 [31,32].

Гаплоидные растения также удалось получить у дыни в потомстве от межвидового скрещивания *Cucumis melo* L. (2n = 2x = 24) с *Cucumis ficifolius* A. Rich (2n = 4x = 48). При этом количество обнаруженных гаплоидов было крайне низким (до трех гаплоидных зародышей на 1000 семян) и зависело от генотипа и сезона [33].

Низкий уровень спонтанного образования гаплоидов в природных популяциях у культур семейства *Cucurbitaceae* (менее одного гаплоидного зародыша на тысячу семян) (Aalders, 1958) способствовал проведению исследований по индукции гаплоидии с использованием различных химических и физических факторов и биотехнологических методов *in vitro*. Однако по сравнению с другими сельскохозяйственными культурами, для которых уже в 70-х годах XX века были созданы сорта с

использованием DH-линий (сорт рапса (*Brassica napus*) Maris Haplona [34], сорт Mingo у ячменя (*Hordeum vulgare*) в 1980 году [35] и т.п.), сообщения об успешном получении гаплоидов в этом семействе были крайне малочисленными.

Использование рентгеновских лучей (X-лучи) в качестве мутагенного фактора широко использовалось учеными в 50-60-х годах XX века. В 1958 году при проведении опытов по облучению семян арбуза рентгеновскими лучами (48,000 r) было получено диплоидное растение, у которого одна из ветвей была гаплоидной. Листья и цветки на гаплоидной плети были меньшего размера, а стебель и лепестки были тоньше. Получить плод на этой ветви не удалось, несмотря на предпринятые попытки опыления [36]. Это одна из первых работ по индуцированному получению гаплоидов у культур семейства *Cucurbitaceae*.

Первые исследования по индукции андрогенеза в семействе *Cucurbitaceae* были проведены на Luffa cylindrica в 1979 году [37]. Пыльники, выделенные из бутонов длиной от 1 до 4 см, культивировали на питательной среде MS. Авторы протестировали большое количество разнообразных регуляторов роста в различных сочетаниях, добавленных в индукционную питательную среду, в результате чего удалось добиться образования белозеленого каллуса в растрескивающихся пыльниках. Цитологические исследования показали, что часть микроспор при культивировании переходила на спорофитный путь развития. Проведенные эксперименты по индукции органогенеза из полученного каллуса при его субкультивировании на различных питательных средах не увенчались успехом, и получить растения не удалось.

В 1983 году было сообщено о получении первого гаплоидного растения арбуза в культуре изолированных пыльников *in vitro*, однако при пересадке в грунт это растение погибло [38].

С тех пор как San Noeum в 1976 году получил первые гаплоидные растения в культуре неоплодотворенных завязей/семяпочек *in vitro* у ячменя *Hordeum vulgare* [39], работы по культивированию женского гаметофита были продолжены и на других сельскохозяйственных культурах. Первое сообщение об успешном получении удвоенных гаплоидов в семействе *Cucurbitaceae* было сделано Dumas de Vaulx R. и Chambonnet D. в 1985 году [40]. Авторам удалось индуцировать гиногенное развитие и получить растения *C. pepo* L. в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*. В своей работе авторы изучили влияние стадии развития женского гаметофита на образование эмбриодов у семи коммерческих гибридов F_1 (Ambassador, Black Beauty, Diamant, Greyzini, Opal, Tara, Tarmino). Наилучшие результаты были получены из семяпочек, извлеченных из женских цветков, находящихся на стадии за один день до распускания цветка. Максимальный выход составил 4,3 эмбриоида на 100 культивируемых семяпочек. При этом было отмечено, что из одной семяпочки могло образовываться сразу несколько эмбриоидов. Всего в теплицу было высажено более 50 растений, большинство из которых имели диплоидный набор хромосом, однако встречались миксоплоиды, анеуплоиды, полиплоиды. При этом отмечалось, что фенотипы полученных в культуре неопыленных семяпочек диплоидных растений отличались от гибридных растений-доноров, и, кроме того, индивидуальные растения отличалось между собой. Потомство, полученное от самоопыления диплоидных растений-регенерантов при высадке на следующий год и оценке по морфологическим признакам, выглядело достаточно выровненным. Все это свидетельствовало о гаметофитном происхождении полученных растений [40,41].

Работы по индукции гаплоидии при культивировании неопыленных завязей/семяпочек в дальнейшем продолжились и на других культурах семейства *Cucurbitaceae* [42–46].

Одной из самых популярных технологий получения гаплоидов в семействе *Cucurbitaceae* является технологии спасения партенокарпических зародышей, индуцированных опылением γ-облученной пыльцой. Впервые об успешном получении гаплоидов при опылении пыльцой, обработанной Co^{60}, было сообщено для дыни *Cucumis melo* L. [47], а впоследствии эта технология была применена на огурце [48–50]. Значительно позже появились сообщения об использовании этой технологии у видов, относящихся к роду *Cucurbita*: для кабачка *C. pepo* [51], тыквы мускатной *C. moschata* [52] и тыквы крупноплодной *C. maxima* [53].

Основные достижения по получению удвоенных гаплоидов у культур семейства *Cucurbitaceae* были освещены в ряде обзоров [54–58] и опубликованы в виде протоколов, в том числе и в вышедшей в 2021 году книге «Doubled Haploid Technology» под редакцией Jose M. Segui-Simarro [10,59–63].

Современное состояние исследований по получению удвоенных гаплоидов *C. pepo*. L.

Для получения удвоенных гаплоидов у культур *C. pepo* L. обычно используют три различных метода: партеногенез in situ стимулированный обработанной/облученной пыльцой, гиногенез *in vitro* (культура неопыленных семяпочек *in vitro*) и андрогенез *in vitro* (культура пыльников/микроспор *in vitro*) [56,64]. При партеногенезе in situ индукция развития гаплоидного партеногенетического эмбриоида происходит из яйцеклетки под воздействием *in vivo* опыления облученной пыльцой. В качестве источника облучения пыльцы чаще всего применяют γ-лучи (γ-облучение), используя ^{60}Co и ^{137}Cs, либо *X*-лучи (рентгеновское облучение). Впоследствии, через 3-4 недели образовавшийся эмбриоид извлекается из семени и помещается на питательную среду в условия *in vitro*, для прорастания и развития во взрослое растение. При андрогенезе и гиногенезе, изолированные пыльники или семяпочки из неопыленных завязей культивируют на индукционной питательной среде в условиях *in vitro*. В этих случаях под воздействием различных индуцирующих факторов (температурные обработки, регуляторы роста растений и т.п.), происходит переключение программы развития мужского/женского гаметофита на спорофитный путь развития. Формирование взрослого растения при этом возможно как за счет прямого эмбриогенеза (этот путь более предпочтительный), так и через промежуточную стадию – образование каллуса. Поскольку во всех трех способах процесс происходит в гаплоидных клетках, то первоначально формирующейся эмбриоид или каллус будет иметь гаплоидный набор хромосом. На втором этапе под воздействием определенных факторов/агентов происходит удвоение хромосом, и образующийся организм приобретает диплоидный набор хромосом с гомозиготным состоянием аллелей.

У каждого из этих методов при использовании их для тыквенных культур имеются свои преимущества и ограничения, которые были освещены в ряде обзоров [55–57]. Для эффективного внедрения гаплоидных технологий в селекционный процесс необходимо добиваться увеличения выхода удвоенных гаплоидов, воспроизводимости разрабатываемых методик, что невозможно сделать без тщательной отработки всех этапов технологии. Полученные растения-регенеранты необходимо в дальнейшем обязательно исследовать на уровень плоидности и на гомозиготность.

Партеногенез

Первые работы на *C. pepo*. L., целью которых было получить гаплоидные растения методами опыления облученной пыльцой, были начаты Kurtar, Sari, Abak в 2002 году [51] и продолжаются до настоящего времени [65] (табл. 1). За все время было изучено около 60 генотипов *C. pepo*. L. В большинстве экспериментах в качестве источника γ-облучения использовали Co^{60}, ввиду легкости его применения, хорошей проникающей способности в ткани и индукции высокой скорости мутации при низкой летальность по сравнению с другими видами облучения. Только в исследовании Koɐmrlj et al., проведенном на тыкве голосемянной *C. pepo* ssp. *pepo* var. *styriaca* [8], сообщалось об успешном использовании *X*-излучения (рентгеновское облучение). Облучению обычно подвергали либо мужские цветки (часто после удаления чашелистиков и лепестков) [66], либо заранее изолированные пыльники [8,51,62,65]. Обязательным условием являлась строгая изоляция женского цветка за сутки до распускания и сразу после опыления, чтобы избежать нежелательных опылений. Известно, что одним из важнейших факторов, определяющих успех этой технологии, будет правильно подобранная доза облучения (Гр мин$^{-1}$). На практике оптимальной чаще всего оказывается критическая доза или полулетальная доза (LD50, то есть доза для ингибирования прорастания 50% пыльцы) [56]. Дозы облучения не должны быть такими высокими, чтобы полностью ингибировать прорастание пыльцевых трубок, но в то же время они должны быть достаточно высокими, чтобы нарушать нормальное оплодотворение и препятствовать образованию диплоидных гибридных эмбриоидов. Авторы проводили эксперименты с различными дозами облучения в диапазоне от 25 Гр [51,67] до 400 Гр [51] для γ-облучения и от 50 до 350 Гр для X-облучения. Оптимальная доза в разных исследования значительно колебалась в зависимости от генотипа и составляла 50 Гр [51,65],150 Гр [65–67] и 200 Гр [8]. При использовании рентгеновского излучения было отмечено, что завязы-

Таблица 1. Краткие протоколы индукции гаплоидов Cucurbita pepo L. путем опыления облученной пыльцой.
Table 1. Concise protocols of Cucurbita pepo L. haploid induction through pollination with irradiated pollen

Генотип дон. раст-я/ Genotype of donor plant	Источник излучения / доза облучения (Gy) / Radiation source / radiation dose (Gy)	Возраст зародыша (недель после опыления) / Embryo (weeks after pollination)	Индукционная среда / Induction medium	Рег. среда / Regeneration medium	Температурный режим / Temperature regime	Метод определения плоидности/ Method for ploidy determination	Идентифицированная плоидность/ Identified ploidy	Литературные источники/ References
Eskenderany, Acceste, Sakız, Urfa Yerli	25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 (Co^{60})	4–5 недель	E20A + S 20 г/л + A 10 г/л + IAA 0,01 мг/л	E20A + S 20 г/л + A 10 г/л + IAA 0,01 мг/л	28 ± 1°C, Ph16/8, 3000 Lx	ППХ	H-43,7%, DH- 56,3%	Kurtar et al., 2002 [51]
Gleisdorfer O¨lku¨rbis, GL Opal, GL Maximal, Gleisdorfer Diamant, Beppo, Elite F_1, Slovenska golica, Rumena golica, Yellow Long, Turkey #2, Naked Seed, White Acorn, Muscade de Provence	0, 50, 100, 150, 200, 300, 350 (X-ray)	4 недели	E20A + S 20 г/л + A 10 г/л + IAA 0,01 мг/л	E20A + S 20 г/л + A 10 г/л + IAA 0,01 мг/л	23°C, Ph16/8	ПЦ	H, DH, TrP, TeP	Košmrlj K, Murovec J, Bohanec B, 2013 [8]
-	25, 50, 75, 100, 200 (Co^{60})	-	-	-	-	МА, ПЦ	H-38,6%, DH-61,4%	Ebrahimzadeh et al., 2013 [67]
14 селекционных образцов	150, 200, 300 (Co^{60})	4–5 недель	CP + S 30 г/л + A 8 г/л + B12 0,08 мг/л + IAA 0,02 мг/л	-	25°C, Ph 16/8	-	H-11%, DH-89%	Baktemur et al., 2014 [66]
17 селекционных образцов	150 (Co^{60})	3-4 недели	MS + S 30 г/л + A 7 г/л + IAA 0,1 мг/л	-	26°C±1°C, Ph16/8, 3000 Lx	МА	H, DH	Kurtar et al., 2017 [68]
14 селекционных образцов	150 (Co^{60})	3-4 недели	E20A + S 20 г/л + A 8 г/л + IAA 0,01 г/л	MS + S 30 г/л + A 7 г/л + IAA 0,1 мг/л + BAP1,0 мг/л	28°C±1°C, Ph16/8 5000 Lx	МА	H, DH	Kurtar et al., 2021 [62]

ваемость плодов значительно снижалась при 200 Гр, тогда как при 100 Гр наблюдалось снижение образования зародышей. Также интересным представлялся обнаруженный факт, что образование тетраплоидных зародышей коррелировало с повышенным уровнем излучения, используемого для пыльцевых зерен [8].

Вторым важным моментом технологии будет определить, на какой стадии необходимо изолировать образовавшийся партеногенетический зародыш и сколько дней от опыления должно пройти. Этот показатель также может варьировать в зависимости от генотипа донорного растения и использующейся питательной среды для «спасения зародыша». В опубликованных исследованиях возраст плода, из которого извлекали зародыш, составлял от 3-4 недель после опыления [67,68] до 4-5 недель [8,51,68]. В плодах более длительного срока созревания – 5-6 недель увеличивался процент некротических эмбриоидов коричневого и черного цвета. Поскольку самым трудозатратным в этой технологии будет процесс извлечения зародышей из семян, то этому этапу уделяется особенное место. При рассмотрении экономической эффективности (трудозатраты, затраченное время, микробные загрязнения, сохранность эмбриоидов) наилучшими методами считается «посев семян непосредственно в питательную среду» и «осмотр семян под флуоресцентным источником света» [32]. Наиболее распространенный метод, применяемый у тыквенных культур, — это проверка серии семян одно за другим под стереомикроскопом. Именно этот метод применяли и для *C. pepo* L. Стадия развития, на которой находились зародыши при извлечении их из семян, могла быть от глобулярной до семядольной, что также влияло на последующее развитие зародыша во взрослое растение-регенерант и на конечный выход гаплоидов и удвоенных гаплоидов. Было отмечено, что из эмбриоидов на глобулярной стадии развития развивались только гаплоидные растения (2n = 20), тогда как из зародышей на семядольной стадии развития развивались диплоиды (2n = 40). Из эмбриоидов на стадии торпеды и из сердцевидных зародышей могло образоваться до 53,8% и 23,1% гаплоидных растений соответственно [51,66]. Хотелось бы отметить, что образование диплоидных растений не всегда будет связано с процессом спонтанной диплоидизации первоначально гаплоидных эмбриоидов. В работе Košmrlj et al. [8], при проверке полученных диплоидных растений с использованием SSR-маркеров было показано, что все они являются зиготическими зародышами.

В качестве индукционных питательных сред, на которые помещали незрелые зародыши, использовали среды E20A [8,51,68] и MS [69] с добавлением IAA (0,01 мг / л) [65] и среда CP [70] дополненная витамином B12 (0,08 мг/л) и IAA (0,02 мг / л) [66]. Kurtar et al., [65] в 2021 году модифицировал питательную E20A, увеличив содержание Na_2EDTA и $FeSO_4*7H_2O$ в 2 раза и снизив концентрацию агара с 10 г/л до 8 г/л. В качестве регенерационной питательной среды в дальнейшем использовали E20A[51], и MS с добавлением IAA (0,01 мг / л) и BAP (0,01 мг/л) [67].

Режим культивирования в разных протоколах мог несколько варьировать по температуре от 23°C [8], 25°C [68], 26°C [65,67] и до 28°C [51,62]. Культивирование во всех случаях проводили на свету при 16-часовом фотопериоде и интенсивности освещенности от 3000 люкс [51,65] до 5000 люкс [67]. Максимальный выход по этой технологии был получен Kurtar et al. в 2021 году [65]. Авторам удалось получить 64 семенника, из которых было выделено 7034 семени с 521 зародышем. Всего регенерировано 144 растения, из которых 28 – гаплоидных, 77 – диплоидных и 6 – миксплоидных растений. Среднее количество семян на один семенник/завязь составило 110 штук, а количество образовавшихся зародышей на одну завязь – 8 шт. Полученный результат является хорошим достижением, но учитывая большую генотипспецифичность, для массового включения этой технологии в селекционные программы его еще нужно улучшать.

Андрогенез

Число публикаций, в которых сообщается об успешной индукции андрогенеза у *C. pepo* L. крайне ограничено [44,63,71–73], впрочем, как и для всех представителей семейства *Cucurbitaceae*. Первое упоминание об исследовании, в котором сообщалось об успешном получении нескольких гаплоидных растений *C. pepo* было проведено Shail JW, Robinson RW в 1987 году [74]. На данный момент нет ни одного сообщения об использовании культуры изолированных микроспор для этого вида, хотя именно эта технология является наиболее перспективным способом получения удвоенных гаплоидов, поскольку отсутствие соматических тканей в культуре *in vitro* позволяет не ставить под сомнение происхождение полученных растений. Хорошо известно, что на индукцию андрогенеза влияют многие факторы, такие как генотип, условия роста донорных растений, стадия развития микроспор, использующиеся предварительные температурные обработки, состав индукционной и регенерационной питательной среды, условия культивирования и субкультивирования.

Сорт Eskandrani оказался относительно отзывчивым к андрогенезу и использовался практически во всех опубликованных протоколах [71–73] в качестве исходного материала. В 2006 году [73] в исследования были включены и другие генотипы (Arlika F_1, E 82-110 F_1, Giad F_1, Rula F_1, Queen F_1, Yellow Bik F_1), среди которых наибольшая отзывчивость к андрогенезу была выявлена у образца Yellow Bik F_1.

Все исследователи использовали мужские цветочные бутоны, собранные рано утром. Оптимальный размер бутонов, содержащий пыльники с микроспорами на средней или поздней стадии развития, для этого вида составляет 9-10 мм (длина) и 4–6 мм (ширина). Плотно закрытые бутоны с такими параметрами бутонов отбирают для введения в культуру *in vitro* и выделяют из них пыльники.

Поскольку мужские бутоны кабачка имеют опушение и более чувствительные к температурной обработке покровные ткани, по сравнению с женскими бутонами и партенокарпными плодами, то использовать стерилизацию 96% спиртом с последующим краткосрочным обжиганием для этой технологии не подходит. Во всех исследованиях по андрогенезу рекомендовалось проводить ступенчатую стерилизацию материала с использованием 70% водного раствора этанола и 5,2% гипохлорита натрия.

Хорошо известно, что для перехода микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития необходимо использовать индуцирующие стрессовые факторы. Чаще всего с этой целью используют разнообраз-

Таблица 2. Краткие протоколы индукции гаплоидов Cucurbita pepo L. в культуре пыльников in vitro
Table 2. Concise protocols of Cucurbita pepo L. haploid induction through anther culture in vitro

Генотип дон. раст-я/ Genotype of donor plant	Холодовая предобработка/ Cold pretreatment	Индукционная среда/ Induction medium (mg/l)	Условия культивирования до образования каллуса / Cultivation conditions before callus formation	Рег.среда/ Regeneration medium	Условия регенерации каллуса / Callus regeneration conditions	Условия культ-я растений R_0/ Cultivation conditions for R_0 plants	Метод определения плоидности/ Method for ploidy determination	Идентифицированная плоидность/ Identified ploidy	Литературные источники/ References
Eskandarani	4°C - 4 с.	MS + S (30, 60, 90, 120, 150 г/л) + A 8 г/л + 2,4-D (0,1, 1,0, 2,5, 5) мг/л.	в темноте 35 °C в течение 7 с., далее в темноте 25 °C в течение 28 с.	MS + S 30 г/л + A 8 г/л + КТ 0,05 мг/л + NAA 0,05 мг/л; MS б/г	25 ± 1 °C, Ph 16/8 , 1000 Lx, (4 недели);	25 °C, Ph16/8, 3000 Lx (4 недели)	ППХ	H-50%, DH-50%	Metwally et al., 1998a [71]
Eskandarani	4°C - 4 с.	MS + S 100 г/л + A 8 г/л + 6 мг/л 2,4-Д	в темноте 35°C в течение 7 с., далее 4 недели 25°C	MS + S 30 г/л + A 8 г/л + КТ 0,05 мг/л + NAA0,05 мг/л	25 °C, холодный белый свет, Ph16/8 (4 недели);	MS + IBA 1 мг/л, 25°C, Ph16/8 (3000 Lx)	ППХ	H- 60%, DH -13%, AnP -17%	Mohamed, Refaei, 2004 [72]
Arlika F_1, Eskandrani cv., E 82-110 F_1, Giad F_1, Rula F_1, Queen F_1, Yellow Bik F_1	4°C - 4 с.	MS + 100 г/л S + A 8 г/л + 2,4-D 5 мг/л	в темноте 32°C в течение 7 с.; далее в темноте 25°C 4 недели	MS + 30 г/л S + КТ 0,05 мг/л + IAA 0,05 мг/л	25°C, 16/8 Ph, (3000 Lx), 4 недели; MS б/г (4 недели)	MS б/г, 25°C, Ph16/8	ППХ	H - 48,3%, DH-51,7%	T.A. Shalaby, 2006 [73]
Межвидовые гибриды *C.pepo*	4°C - 4 с.	MS + S (50, 120, 150 г/л) + 8 г/л A + 2,4-D (1,0, 5,0 мг/л)	в темноте при 35 °C в течение 7 с., далее 25 °C (пересадка на 5 неделе)	MS + КТ 0,05 мг/л + NAA 0,05 мг/л в течение 4 недель, далее MS б/г	25 ± 1 °C, Ph 16/8 (пересадка с отрезанием корней через 10 с)	MS б/г 4 недели; MS + NaCl 0,5 мг/л (10 с), MS + NaCl 0,5 мг/л (10 с)	ППХ	H, DH	Rakha et al., 2012 [44]
Eskenderany F_1, Acceste F_1, Sakiz, Urfa Yerli	Без х. о.	MS + S 120 г/л + A 7 г/л + 2,4-D 2 мг/л + BAP 0,5 мг/л	35 °C -7 с. в темноте; 26 °C, Ph 12/12, 1500 Lx(7 с) далее Ph16/8 (пересадка каждые 10 с)	MS + A 8 г/л + BAP 4 мг/л, NAA 0,05 мг/л	26 °C, Ph 12/12, 1500 Lx (7 с), 26 °C, Ph 16/8, 3000 Lx (3-5 недель)	MS + IAA 0,01 мг/л ; 26 °C, Ph16/8, 3000 Lx	-	-	Kurtar E.S., Seymen M. (2021) [63]

ные предобработки и обработки пониженными и повышенными температурами, либо сочетание контрастных температурных режимов культивирования [75]. Впервые об успешном использовании предварительной холодовой обработки было сообщено в 1973 году при культивировании пыльников дурмана [76], и в последующем она использовалась при андрогенезе у многих культур. Во всех опубликованных для *C. pepo* исследованиях рекомендовалось также использовать холодовую предобработку бутонов при 4°C в течение 4 суток (табл. 2).

Все исследователи в качестве индукционной питательной среды использовали агаризованную среду MS [69] с различными концентрациями сахарозы: от 30 г/л до 150 г/л [71]. Концентрации сахарозы, оптимальные для индукции каллусообразования у культивируемых пыльников, находились в достаточно широком диапазоне от 90 до 150 г/л [44,63].

Культивировать пыльники рекомендуется в темноте при использовании обработки повышенной температурой в течение 7 дней при 350С [71,72] или 32°С [73], а затем при 25°С (табл. 2).

Metwally et al. [71] получил максимальный выход при использовании индукционной среды с добавлением сахарозы в концентрации 150 г/л в сочетании с 2,4-D в концентрации 5 мг/л. Всего удалось получить в этом варианте опыта 19,3 растения или 30 растений на 100 пыльников. Во время исследования был проведен подсчет хромосом у 20 полученных растений-регенерантов, из которых 10 были диплоидными, а 10 – гаплоидными.

Исследования Mohamed, Refaei по изучению влияния сезонного фактора на выход андрогенных растений [72] показали, что максимальный выход растений-регенератов был получен из пыльников, высеянных в ноябре, что превышало в два раза число у высеянных в марте и составило 260 растений на 100 пыльников. Анализ уровня плоидности показал, что 60% образовавшихся в культуре пыльников растений были гаплоидными, 23% – диплоидными и 17% – анеуплоидными.

Shalaby [73] было отмечено, что самым отзывчивым к каллусообразованию генотипом оказался Yellow Bik F_1, у которого наблюдали самый высокий процент образования эмбриогенного каллуса – 38,7%, а количество регенерированных растений на каллус составило 8,9 шт. В общем количестве полученных и проанализированных на уровень плоидности растений 48,3% оказались гаплоидными, а 51,7% – диплоидными.

Существенный прорыв в получении удвоенных гаплоидов при использовании мужского гаметофита у вида *C.*

Таблица 3. Краткие протоколы индукции гаплоидов Cucurbita pepo L. в культуре неопыленных завязей/семяпочек in vitro
Table 3. Concise protocols of Cucurbita pepo L. haploid induction through unpollinated ovary/ovule culture in vitro

Генотип дон. раст-я/ Genotype of donor plant	Стадия бутона /Bud Stage	Холодовая предобр-ка/ Cold pre-treament	Индукционная среда/ Induction medium	Условия культ-я семяпочек/ Conditions for the cultivation of ovules	Рег. среда/ Regeneration medium	Условия культ-я растений R_0/ Cultivation conditions for R_0 plants	Метод определения плоидности/ Method for ploidy determination	Идентифици-рованная плоидность/ Identified ploidy	Литературные источники/ References
Ambassador, Black Beauty, Diamant, Greyzini, Opal, Tara, Tarmino	FI; FI-1; FI-2	без х.о.	C + S 30г/л + A 8 г/л + 2,4 D 0,1 мг/л + КТ 0,1 мг/л	25 °C, Ph 12/12	C б/г + S 30 г/л + A 8 г/л	25°C, Ph 12/12	ППХ, МА	DH, AnP	Dumas de Valux, Chambonnet, 1986 [41]
Eskandarani	FI-1	без х.о. без х.о., 4 °C - 2 с, 4 °C - 4 с, 4 °C - 8 с	MS + S 30 г/л + A 8 г/л + 2,4-D (0,1, 1,0, 5,0, 10 мг/л)	25±1 °C, Ph16/8 (4 недели)	MS б/г	25 ± 1°C Ph 16/8 (3000 Lx)	ППХ	H-25%, DH-75%	Metwally et al., 1998b [77]
-	FI; FI-1	без х. о.	N6 + S 30 г/л + A 8 г/л + 2,4-D + NAA + BAP	25°C Ph 14/10 (2000 lx)	N6 б/г + S 30 г/л /G 20 г/л + A 8 г/л	25°C Ph 14/10 (2000 Lx)	ЦА	H, DH	Xie et al., 2006 [82]
МНТС77, Queen , Raad, Reveneu, Rosita, Rola , Yellow Bik	FL	без х.о.	MS + S (30, 60, 90 г/л) + A 8 г/л + 2,4 D 1 мг/л + КТ 1 мг/л	4 °C(4,7,12 с); 32 °C(4,7,12 с.); 25°C; Ph 12/12 (пересадка каждые 4 нед.)	MS б/г	25 °C, Ph 16/8 (3000 Lx)	ППХ	H-65%, DH-35%	Shalaby, 2007 [73]
Межвидовые гибриды *C.pepo*	FL - 1	без х.о.; 4 °C (7, 14 с.)	Ms + S 30 г/л + A 8 г/л + 2,4D 1, 5 мг/л; через 28с: MS б/г. + S 30 г/л + A 8 г/л	25 °C ± 1 °C, Ph 16/8	MS б/г + S 30 г/л + A 8 г/л (28с); MS б/г. + S 30 г/л + A 8 г/л + NaCl 0,5 мг/л (10 с); MS б.г. + S 30 г/л + A 8 г/л + NaCl 1 мг/л	25 °C, Ph 16/8 (пересадка с отрезанием корневой системы каждые 10 с.)	ППХ	H-60%, DH-40%	Rakha et al, 2012 [44]
22 селекционных образца	FL	без х/о, 4 °C - 1с, 4 °C - 2с	IMC + S 30 г/л + A 8 г/л + Amp 200 мг/л + 2,4 D (1мг/л, 2 мг/л); IMC + S 30 г/л + A 8 г/л + Amp 200 мг/л + TDZ (0,02мг/л, 0,2 мг/л)	25 °C, Ph 16/8 (2500 Lx)	Ms б./г. + S 20 г/л + Pht 3 г/л; CBM + S 20/г + Pht 3 г/л + NAA 0,2 мг/л + BAP 0,2 мг/л	25 °C, Ph 16/8 (2500 Lx)	ППХ, МА, ПЦ,	H, DH, TrP, TeP, AnP	Domblides et al., 2020 [80]
-	FL	без х. о.	MS + S 20 г/л + A 8 г/л + 2,4-D 2,0 мг/л	35 °C 3с темн., 26 °C, Ph 12/12 (1500 Lx- 7 с), далее Ph 16/8 3–4 нед.	MS + S 20 г/л+ A 8 г/л 2,0 мг/л 2,4-D + 0,5 мг/л BAP; MS + 4,0 мг/л BAP + 0,05 мг/л NAA + 0,1 мг/л TDZ; MS + 0,01 мг/л IAA + 1,0 мг/л BAP	26 °C Ph 16/8 (1500 Lx); 26°C, Ph 16/8 (3000 Lx) (пересадка каждые 7-14 с)	-	-	Kurtar, Seymen, 2021 [59]

Примечания:
б/г – without plant growth regulators – безгормональная среда;
Без х. о. – without cold pretreatment – без холодовой предобработки;
с. – day – сутки;
Ph – photoperiod – фотопериод;
Pht – phytogel – фитогель;
A – agar – агар;
Amp - ampicilline – ампицилин;
G -glucose – глюкоза;
S -sucrose – сахароза;
FL – (morning of the flowering/anthesis day) -утром в день раскрытия цветка;
FL – 1 (1 day before flowering) – за сутки до распускания цветка;
FL – 2 (2 day before flowering) – за 2 суток до распускания цветка;
C – induction medium C – индукционная питательная среда С [41];
IMC – (Induction Medium for Cucurbitacea) [80];
CBM – (Cucumber Basal medium) [Gemes-Juhasz et al, 2002];
DH – doubled haploid – Удвоенный гаплоид;
H – haploid – Гаплоид;
M – mixoplid – Миксоплоид;
AnP – aneuploid – Анеуплоид;
TrP – triploid – Триплоид;
TeP – tetraploid – Тетраплоид;
ППХ – chromosome counting – Прямой подсчет хромосом;
ПЦ – flow cytometry – проточная цитометрия;
ЦА – counting chloroplasts in guard cells – Цитологический анализ (количество хлоропластов в замыкающей клетках устьиц);
МА – Morfological analysis – морфологический анализ

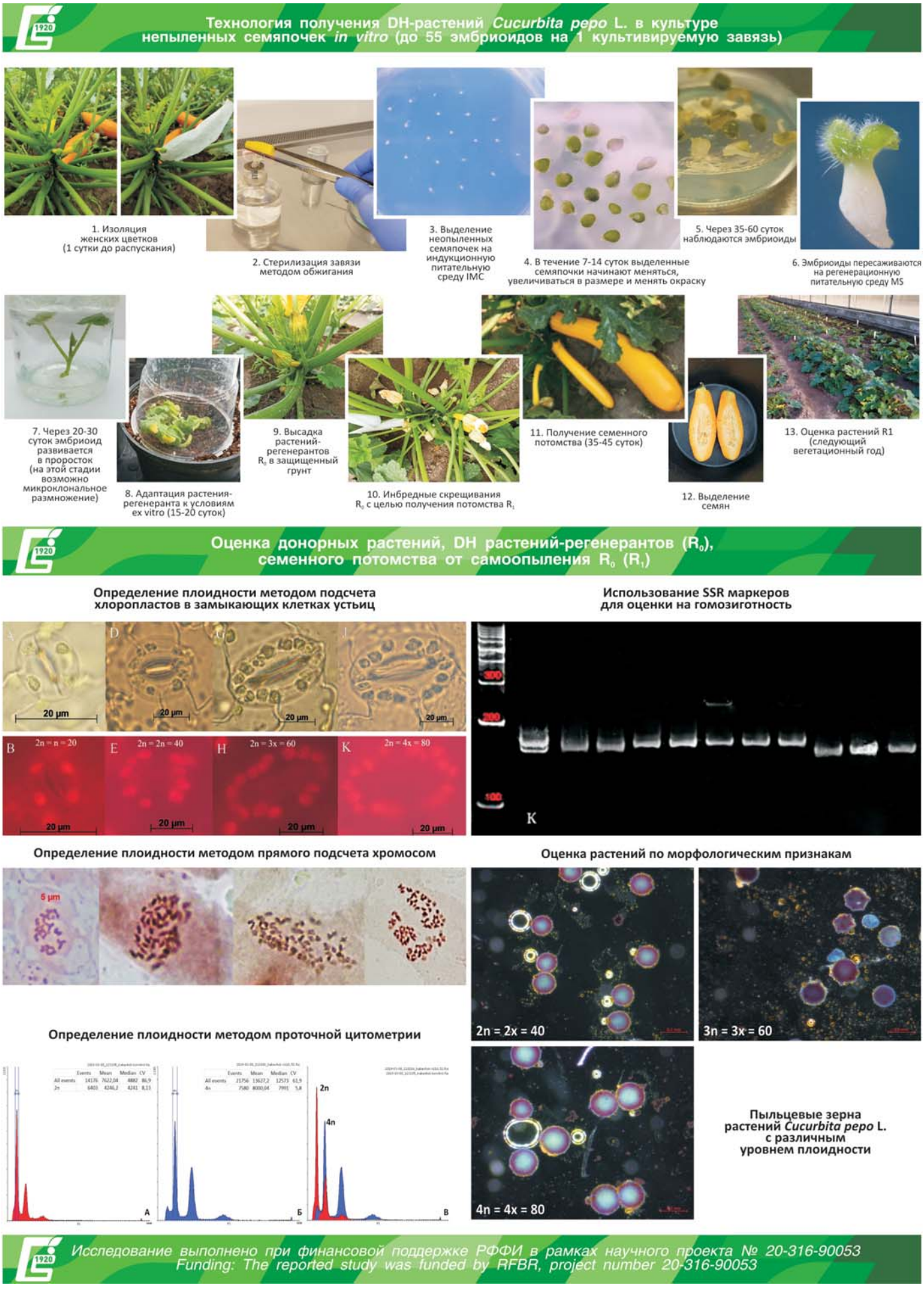

Рис. Получение DH растений в культуре неопыленных семяпочек in vitro у Cucurbita pepo L.
Fig. Production of doubled haploid plants through unpollinated ovule culture in vitro in Cucurbita pepo L.

pepo может быть достигнут только при разработке протокола культуры изолированных микроспор и при обязательном включении этапа оценки полученных растений-регенерантов с использованием молекулярных маркеров.

Гиногенез

Технология получения растений-регенерантов в культуре неопыленных семяпочек включает 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 включают регенерацию растений и их укоренение в культуре *in vitro*. Четвертый этап – это адаптация растений к условиям *in vivo* и пятый – самоопыление полученных растений-регенерантов R_0 и получение семенного потомства. На каждый этап будут влиять свои критические факторы. Краткие протоколы, собранные на основе опубликованных статей, представлены в таблице 3.

На первом этапе одним из критических факторов является стадия развития зародышевого мешка. У тыквенных культур зародышевый мешок образуется по Polygonium-типу, полностью созревает и готов к оплодотворению через несколько часов после раскрытия цветка. Оптимальной стадией для введения в культуру *in vitro* будет почти зрелый зародышевый мешок. Часть исследователей считает, что вводить в культуру необходимо семяпочки, выделенные из бутонов, находящихся в стадии за 1 сутки до опыления [77,78] (табл.3), другая же часть предполагает, что бутоны необходимо изолировать с вечера, а рано утром срывать. По данным нашей лаборатории, для всех изученных тыквенных культур оптимальным будет предварительно заизолированный полураскрывшийся бутон [79,80].

Изучение влияния предобработки завязей низкими положительными температурами в течение 1-14 суток показало, что для *C. pepo* такой тип предобработки не эффективен [44, 77, 80], в то время как температурная обработка 40С уже выделенных и помещенных на индукционную питательную среду семяпочек может оказывать положительное влияние на индукцию гиногенеза [78].

Для *C. pepo* оптимальным является культивирование выделенных семяпочек, а не кусочков завязи (ovarian sliced), что достаточно часто практикуется у других тыквенных культур [56]. Семяпочки у кабачка и патиссона достаточно крупные по сравнению с огурцом, их легче и быстрее выделять, они меньше травмируются, в то время как фрагменты завязи достаточно крупные, и каллусообразование в них происходит достаточно интенсивно в окружающих семяпочку соматических тканях, подавляя гиногенное развитие.

Выделенные семяпочки оптимально сразу помещать на свет и культивировать при 25°С. Однако в исследовании Shalaby (78) и в протоколе , опубликованном в 2021 году [59] выделенные семяпочки рекомендовалось культивировать в темноте при повышенных температурах 320С и 350С в течении нескольких суток для индукции гиногенного развития (табл. 3). В качестве основы индукционных питательных сред были использованы разнообразные питательные среды: среда С, разработанная ранее для перца [41]; среда MS [77] [78]; среда N6 [82] и среда IMC [80,81].

Для культур рода Cucurbita критичным будет пятый этап технологии (этот же этап будет присутствовать при получении удвоенных гаплоидов с использованием партеногенеза in situ и андрогенеза). У растений, имеющих раздельнополые цветки, после культуры *in vitro* достаточно часто бывает трудно добиться одновременного распускания мужского и женского цветка, чтобы провести самоопыление, в связи с этим рекомендуется на этапе регенерации проводить клональное микроразмножение, чтоб получить как можно больше растений одного генотипа для проведения последующих скрещиваний [80,83].

Об эффективности созданной технологии обычно судят по выходу гаплоидов/удвоенных гаплоидов на 1 культивируемую завязь или числу полученных растений из 1 завязи. Хотя нам кажется, что более правильным было бы учитывать количество полученных растений-регенерантов R0 (линий)/на число культивируемых семяпочек. В первом исследовании по получению удвоенных гаплоидов, проведенном с использованием культуры неопыленных семяпочек, был достигнут результат – 4,3 эмбриоида на 100 культивируемых семяпочек [41]. Shalaby [78] в 2007 году сообщил о успешном получении гиногенных растений кабачка, при этом он привел данные о 48.8% отозвавшихся семяпочек и 15 растений, полученных на одну чашку Петри, в которой содержится 25 семяпочек. Metwally et al. [71] приводят сведенья о наилучшем результате, полученном на кабачке сорта Eskandari – 11 регенерированных растений на 100 культивируемых завязей. В нашей лаборатории после оптимизации технологии (рис. 1) нам удалось достичь максимального урожая эмбриоидов 55 шт. на 1 культивируемую завязь. В связи с представленным выше, полученные нами данные могут считаться очень успешными, а разработанная нами среда IMC [80] и этапы технологии – достаточно эффективными для индукции гиногенеза у культур, относящихся к виду *C. pepo*.

Определение плоидности полученных растений-регенерантов

Оценить полученные растения-регенеранты на уровень плоидности – крайне важный этап технологии, поскольку для успешного включения полученных растений в селекционный процесс необходимо получить потомство от самоопыления, что невозможно будет сделать у гаплоидных и триплоидных форм без перевода их на повышенный уровень плоидности. Миксоплоидные формы без стабилизации уровня плоидности, также должны выбраковываться.

Плоидность полученных растений-регенерантов можно определить несколькими способами:

- прямым подсчетом хромосом (микроскопирование цитологических препаратов). Этот метод широко используется в течение многих лет, несмотря на сложность получения качественного препарата [84]. Как правило, кончики молодых, развивающихся корней, считаются наиболее удобным материалом для хромосомных наблюдений, как альтернативу можно использовать начинающие развиваться цветочные почки или листья [85,86]. Для получения качественных препаратов приходится применять разнообразные холодовые обработки фикси-

рованного материала, либо образцы обрабатывают антимикротрубочковыми агентами для деполимеризации митотических веретен, предотвращения сегрегации хромосом и увеличения их конденсации, и лишь затем окрашивают ДНК-красителями для визуализации [87]. Прямой подсчет хромосом является наиболее надежным методом определения уровня плоидности [88], однако этот метод требует много времени, а также оборудованной для этого лаборатории, квалифицированной рабочей группы, технически сложен и подвержен ошибкам, особенно у видов с маленькими и нечеткими хромосомами, такими как у представители рода Brassica [89,90] и рода *Cucurbita* [91].

- методом проточной цитометрии клеточных ядер (определение содержания количества хроматина в ядрах клеток). Это относительно простой и крайне быстрый, позволяющий за рабочие сутки проанализировать несколько сотен образцов, метод, требующий незначительное количество анализируемого материала. К преимуществам также относится возможность проводить исследование на любой стадии развития растения *in vitro* и *in vivo*, даже когда проростки находятся на ранних стадиях роста [92]. Кроме того, проточная цитометрия - единственный метод, который дает подробную информацию о существовании миксоплоидных тканей и их пропорциях в исследуемом генотипе [88]. В основе метода лежит окрашивание клеток ДНК-специфическим флуоресцентным красителем и последующая их детекция, подсчет и сортировка с использованием лазера [93]. Несмотря на то, что быстрая обработка образцов сделала метод проточной цитометрии наиболее эффективным, точным и удобным подходом для определения уровня плоидности регенерантов, его применение во многих лабораториях все еще ограничено из-за высокой стоимости оборудования и более высокой стоимости каждого анализа [94].

- по комплексу косвенных морфологических признаков абаксимального эпидермиса листа (включает в себя количество замыкающих клеток устьиц в поле зрения микроскопа, расположенных на абаксимальной стороне листа; размер этих устьиц; число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц [75, 94]. При этом наблюдается корреляция: чем меньше количество устьиц в поле зрения микроскопа, тем больше длина и ширина устьица, тем выше уровень плоидности. Эффективность данного метода была отмечена для разных культур: *Brassica* spp. [94,95], *Solanum tuberosum* L. [96], *Capsicum annuum* L. [97], *Physsalis peruviana* L. [98], *Beta vulgaris* [99]. Определение плоидности растений по числу хлоропластов в замыкающих клетках устьиц является самым легким, быстрым, дешевым и применяется в практической селекции растений уже более 50 лет [100]. К числу недостатков можно отнести: возможно проводить анализ только на адаптированных к условиям *ex vitro* растениях; оцениваемые растения должны быть выращены при одинаковых условиях.

- фенотипическая сравнительная оценка растений. Гаплоидные растения обычно имеют более мелкие цветки, аномальное развитие завязей, нерегулярное и неравномерное развитие пыльников, более мелкие листья [90,96,98,101].

Каждый из способов отличается по себестоимости расходных материалов, стоимости необходимого оборудования, времени получения результата для одного образца.

Несмотря на то, что все эти способы определения плоидности употреблялись в немногочисленных опубликованных протоколах для *C. pepo* L., подробного описания методик нам не удалось найти. В литературе практически не встречаются качественные фотографии метафазных хромосом у гаплоидных, диплоидных, триплоидных, тетраплоидных растений кабачка, ввиду большого их количества у этого вида (2n=40) и их мелкого размера. Крайне мало информации о референсных значениях показателей у растений с различным уровнем плоидности для использования протоколов по проточной цитометрии клеточных ядер и количеству хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (табл. 1, 2, 3).

Использование молекулярного анализа для оценки происхождения/гомозиготности растений, полученных с использованием DH-технологий

Несмотря на разработанные многообещающие подробные протоколы получения DH–растений, образование удвоенных гаплоидов не происходит в 100% случаев. Скорость производства DH может варьировать в зависимости от вида и используемого метода. Например, линии, индуцирующие образование гаплоидов у кукурузы, показывают уровень образования гаплоидных эмбриоидов от 8 до 10%, в то время как все другие полученные особи являются нежелательными продуктами обычного оплодотворения [102]. Вне зависимости от выбранной технологии получения DH-растений особенно тщательно необходимо исследовать растения-регенеранты с диплоидным набором хромосом. Несмотря на наличие достаточного количества работ, в которых было показано, что спонтанная диплоидизация может происходить на очень ранних стадиях эмбриогенеза [103], необходимо понимать, что часть образующихся растений-регенерантов, несущих диплоидный набор хромосом, может происходить из соматической ткани донорного/материнского растения, а не из гаметофитных (гаплоидных) клеток. Особенно это нужно учитывать при использовании методов культивирования пыльников и неопыленных завязей/семяпочек [104,105]. Подтверждение того, что полученные растения действительно гаплоидны или являются удвоенными гаплоидами, необходимо, чтобы избежать нежелательной гетерозиготности и расщепления в потомстве при последующих самоопылениях и скрещиваниях. Тщательный анализ предполагаемых гаплоидов/удвоенных гаплоидов особенно важен при разработке новых методов и передаче полученных растений в селекционные лаборатории. Отсутствие подтверждения гомозиготности полученных растений-регенерантов может добавить годы дополнительных усилий к исследовательским и селекционным проектам [106]. Отличить спонтанные удвоенные гаплоиды (DH) от соматических диплоидов с помощью проточной цитометрии и цитогенетических наблюдений не возможно, поскольку они содержат одинаковое количество ядер и хромосом [107]. Идентификация гомозиготного удвоенного гаплоида по морфологическим характеристикам представляется достаточно трудоемкой и малоэффективной процедурой вследствие влияния условий окружающей среды на морфологические признаки [108], хотя о таких исследованиях достаточно часто сообщает-

ся [96,109], в том числе и для культур семейства *Cucurbitaceae* [110]. Использование молекулярных маркеров является хорошей альтернативой и эффективным методом, позволяющим проводить тестирование большого количества спонтанных удвоенных гаплоидов или гомозиготных растений на ранних стадиях развития.

Методы молекулярного скрининга для проверки гомозиготности могут быть применены к большинству сельскохозяйственных культур. По сравнению с изоферментным анализом, который также используют в протоколах получения DH-растений [111–115], молекулярные маркеры основаны на последовательностях генома, в связи с чем более удобны и надежны для анализа на гомозиготность. SSR маркеры (Simple Sequence Repeat), представляющие собой микросателлиты (короткие последовательности ядерной ДНК, состоящие из тандемно повторяющихся нуклеотидных единиц длиной 1–5 нуклеотидов), являются наиболее широко используемыми ДНК-маркерами для подтверждения гаметического происхождения при использовании DH-технологий [56,116,117]. SSR довольно распространены в геномах эукариот и широко используются для генетического анализа из-за их кодоминантности, мультиаллельной природы, воспроизводимости, обширного охвата генома и легкости обнаружения [118].

Aleza et al. при использовании технологии индукции партеногенеза при опылении облученной пыльцой получили гаплоидные и DH-растения клементинов, у которых затем подтвердили наличие единичных аллелей, специфичных для материнского растения, с использованием анализа 52 SSR-маркеров [119].

При использовании 43 SSR-маркеров, которые были гетерозиготными у донорной линии апельсина Valencia, подтвердили гомозиготность и удвоение гаплоидов в линиях, полученных в культуре изолированных пыльников. Кроме того, анализ удвоенных гаплоидов с помощью CAPS маркеров (cleaved amplified polymorphic sequence) и последующее секвенирование целевых областей подтвердил гомозиготное аллельное состояние двух генов (LCYE и LCYB), участвующих в биосинтезе каротиноидов у полученных DH- растений *Citrus sinensis* L. [118].

Аналогичное исследование было проведено Wang et al. (2015), в котором был индуцирован андрогенез с помощью культуры пыльников *in vitro* у сладкого апельсина «Rohde Red» и получено два DH-растения. Авторы подтвердили, что эти два DH-растения обладают лишь одним аллелем в каждом из 43 протестированных маркеров SSR [120].

Генетический анализ пяти гаплоидных растений *Citrus maxima* (Burm.) Merr. с использованием 32 SSR-маркеров был проведен с целью подтверждения их гиногенетического происхождения и изучения генетического разнообразия. В результате проведенного анализа было показано, что все гаплоидные растения обладали только одним из аллелей. Также было подтверждено, что гаплоидное растение (BX1) и его удвоенный гаплоид (BX1-DH) имеют абсолютно одинаковые SSR-аллели. Исследование 30 растений, полученных от самоопыления DH-растений, показало точно такие же SSR-аллели, что и у исходного удвоенного гаплоида. В результате было доказано, что самоопыленные DH-потомства могут поддерживать точно такие же аллели, что и их родитель [121].

SSR-маркеры успешно использовались для идентификации гомозиготных спонтанных двойных гаплоидов у кокосовой пальмы *Cocos nucifera* L. [122], масличной пальмы *Elaeis guineensis* [75], груши *Pyrus communis* L. [111], ячменя *Hordeum vulgare* L. [106,123], Mimulus [124], картофеля *Solanum tuberosum* L. [96,125], перца *Capsicum annuum* L. [126] и межвидовых гибридов рода Brassica [127].

Еще одним интересным подходом для оценки на гомозиготность полученного в результате использования DH-технологий растений-регенерантов будет использование EcoTILLING. Известно, что методы ферментативного расщепления несовпадения для обнаружения полиморфизма в гетеродуплексных молекулах ДНК (Enzymatic mismatch cleavage methods for polymorphism discovery in heteroduplexed DNA molecules) широко применялись в проектах обратной генетики TILLING (от англ. Targeting Induced Local Lesions in Genomes – введение индуцированных локальных повреждений в геномах) [128,129]. Этот подход выгоден тем, что с небольшими изменениями его можно применить к большинству видов. Кроме того, он позволяет обнаружить полиморфизм не только у диплоидных, но и у полиплоидных видов [130–132]. Для анализа используется ряд ферментов, которые могут вызывать двухцепочечные разрывы, что позволяет применять при детекции результатов недорогие агарозные гели. Стратегия обнаружения множественных типов естественных полиморфизмов в природных популяциях «multiple types of natural polymorphisms in natural populations» впервые была описана при изучении различных природных экотипов у *Arabidopsis*, в связи с чем она и получила название «EcoTILLING» [133]. Использование этого метода позволяет легко оценить у большого количества генотипов нуклеотидное разнообразие и потерю гетерозиготности без использования дорогостоящего секвенирования ДНК. Этот подход был успешно использован для оценки девяти предположительно DH растений-регенерантов ячменя, полученных в культуре изолированных микроспор. Авторы протестировали 26 ампликонов, ранее разработанных для TILLING с использованием самоизвлекаемой однонитевой нуклеазы и стандартных агарозных гелей. 11 из 26 протестированных праймеров позволили однозначно определить гетерозиготность в гибриде F_1 (использовался в качестве донорного растения для получения DH в культуре изолированных микроспор) и потерю гетерозиготности у полученных растений-регенерантов, имеющих диплоидный набор хромосом. Путем параллельного тестирования ранее разработанных SSR-маркеров в этом же исследовании было показано, что только три из 33 отобранных ранее SSR-маркеров подходили для скрининга этих же образцов. Это позволило авторам предположить, что подходы к ферментативному расщеплению несовпадений могут быть более эффективными, чем скрининг на основе SSR, даже у видов с хорошо разработанными маркерами [106]. Данный подход в дальнейшем может быть использован и на других видах.

У культур семейства *Cucurbitaceae* также имеются сообщения об успешном использовании SSR-маркеров для оценки растений-регенерантов, полученных в культуре изолированных пыльников огурца [134] и неопыленных завязей/семяпочек дыни [116] и огурца *Cucumis sativus* L. [107].

Diao et al. использовали микросателлитные маркеры (SSR) для анализа гомозиготности диплоидных растений, полученных в культуре неопыленных завязей огурца. Из 33

проанализированных диплоидных растений 17 (51,5%) были идентифицированы как удвоенные гаплоиды. Для анализа было отобрано 7 SSR пар праймеров (CMAG59, CMGA104, CMCTT144, CMTC47, CMAT141, CMCCA145, CMTC123), которые изначально были разработаны на основе геномной библиотеки дыни [127], и выявляли гетерозиготное состояние у материнских/донорных растений. Три пары праймеров (CMAG59, CMGA104 и CMCTT144) могли также и различать разные линии (Jinlv, Biyu и Jinchun) на которых проводилось исследование [107].

В исследовании, проведенном Malik et al. [116] в 2011 на дыне (*Cucumis melo* L.), было протестировано 23 пары SSR-праймеров, из которых было отобрано шесть (CMCT158, CMAT141, CMCCA145, CMGA172, CMCT505 и CSGTT15b), выявляющих гетерозиготность донорных растений, из которых в культуре неопыленных завязей были получены растения-регенеранты, имеющие диплоидный набор хромосом. Все регенерированные проростки оказались гомозиготными и имели гаметофитное происхождение с последующей спонтанной диплоидизацией. Примечательно, что одна пара праймеров (CMGA172) у донорного растения амплифицировала 4 аллеля, в то время как у гиногенных проростков можно было наблюдать только два из них. Таким образом, частично гетерозиготных растений, гомозиготных по этому локусу, обнаружено не было. Выбрав этот локус первым для анализа неизвестных диплоидов, возможно эффективно выявить гетерозиготы за одну амплификацию. Ранее Perera et al. [122] также пришли к выводу, что одной пары праймеров с разделяющим аллелем в родительском доноре достаточно для дифференцировки популяции, поскольку все проанализированные проростки произошли от одного и того же родителя-донора.

Микросателлитные праймеры оказались удобными для оценки растений, полученных не только в культуре изолированных неопыленных завязей/семяпочек, но и в культуре изолированных пыльников огурца. Из 15 протестированных SSR-праймеров два (CMAG59 и CMCTT144) оказались полиморфными и, следовательно, полезными для идентификации DH среди популяции растений [134]. Как и ожидали авторы, согласно оригинальному описанию Danin-Poleg et al. [135], растения-доноры имели три полосы амплификации для CMAG59, тогда как растения, полученные из пыльников, представили одну/две (для DH) или три исходные полосы (для соматических регенерантов). Для CMCTT144 растения-доноры представляли две полосы, а растения, производные от пыльников, представляли только одну (для DH) или две исходные полосы (для соматических регенерантов). Среди 47 диплоидных растений, полученных органогенезом из каллусов Beta Alpha F_1, 19% были соматическими диплоидами, тогда как 81% были удвоенными гаплоидами (DH), что также подтвердило высокий уровень возникновения спонтанной диплоидизации на ранних стадиях андрогенеза.

Нам удалось обнаружить только одно исследование по применению микросателлитных маркеров в виде *C. pepo* для оценки полученных растений-регенерантов. Диплоидные растения были получены при использовании технологии партеногенетического развития, стимулированного опылением X-облученной пыльцой цветков тыквы голосемянной *Cucurbita pepo* ssp. pepo var. *Styriaca.* Из протестированых 23 SSR-маркеров, было отбрано шесть (CMTp80, CMTp88, CMTp125, CMTp142, CMTp235 и CMTp245), амплифицирующих несколько дискретных аллелей. Молекулярный анализ был проведен на 253 подтвержденных методом проточной цитометрии диплоидных растениях-регенерантах, полученных из плодов трех разных генотипов. Чтобы различать диплоиды зиготического происхождения и спонтанно удвоенные гаплоиды (DHs), их аллельный состав сравнивали с аллельным составом родительских растений; 245 (96,8%) образцов показали гетерозиготность по первым двум протестированным локусам, тогда как восемь были гомозиготными по обоим тестируемым локусам. Проведенный дальнейший углубленный SSR анализ показал, что все полученные диплоидные растения являются зиготическими зародышами, а не образовались в результате спонтанной диплоидизации [8].

Появившиеся в последнее время публикации по изучению генетического разнообразия C.pepo с использованием молекулярных маркеров, большое количество разработанных праймеров и построенная генетическая карта этого вида [136,137], не оставляет сомнения, что в ближайшее время в протоколы получения удвоенных гаплоидов у различных разновидностей *C.pepo* будет обязательно включен этап тестирования с использованием, молекулярных маркеров, поскольку только с его помощью можно подтвердить происхождение полученных растений-регенерантов.

Заключение

Современные селекционные программы у тыквенных культур невозможно ускорить без использования гомозиготных линий, созданных с использованием DH-технологий. В настоящий момент все усилия направлены на разработку эффективных технологий получения DH-растений. Существенно удалось улучшить выход удвоенных гаплоидов *C.pepo* при использовании технологии культивирования неопыленных семяпочек *in vitro*, а технологию культивирования микроспор только предстоит еще разработать. Кроме того, необходимо учитывать, что выход удвоенных гаплоидов даже внутри одного вида может сильно различаться в значительной степени по неизвестным причинам, а многие виды и генотипы так и остаются неотзывчивыми. Решить эту проблему возможно позволят появившиеся в последнее время новые подходы с использованием методов редактирования генома CRISPR/Cas9, направленные на получение линий гаплоиндукторов. Появившееся сообщение о том, что модификации центромер-специфичного варианта гистона H3 (CENH3) вызывают элиминацию генома у *Arabidopsis thaliana* [138], предполагает, что целевые мутации в CENH3, индуцированные редактированием генома, смогут приводить к продукции линий гаплоидных индукторов и ускорять селекцию, в том числе и у овощных культур, относящихся к виду *C.pepo.*

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);
KT – Kinetin (кинетин);
SSR – Simple Sequence Repeat
BA – 6-Benzylaminopurine (БАП)

Об авторах:
Елена Алексеевна Домблидес – кандидат с.-х. наук, зав. лаб. репродуктивной биотехнологии в селекции с.-х. растений, edomblides@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-2695-190X
Алексей Станиславович Ермолаев – младший научный сотрудник лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений, AlexeyErmolaev@vniissok.ru, https://orcid.org/0000-0002-7433-5271
Сергей Николаевич Белов – младший научный сотрудник лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений, belov@vniissok.ru, https://orcid.org/0000-0002-4387-9153

About the authors:
Elena A. Domblides – Cand. Sci. (Agriculture), Head of Laboratory of Reproductive Biotechnology in Crop Breeding, edomblides@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-2695-190X
Alexey S. Ermolaev – Junior Researcher of Laboratory of Reproductive Biotechnology in Crop Breeding, AlexeyErmolaev@vniissok.ru, https://orcid.org/0000-0002-7433-5271
Sergey N. Belov – Junior Researcher of Laboratory of Reproductive Biotechnology in Crop Breeding, belov@vniissok.ru, https://orcid.org/0000-0002-4387-9153

• Литература / References

1. Paris H.S. Summer squash: history, diversity, and distribution. HortTechnology. 1996;6(1):6–13.
2. Paris H.S. Summer squash. *Vegetables I.* 2008. p. 351–379.
3. Paris H.S. Germplasm enhancement of *Cucurbita pepo* (pumpkin, squash, gourd: *Cucurbitaceae*): progress and challenges. *Euphytica.* 2016;208(3):415–438.
4. FAOSTAT. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QV Дата обращения: [17.05.2021]
5. Вавилов Н.И. О междуродовых гибридах дынь, арбузов и тыкв.(К проблеме о захождении видовых и родовых систематических признаков). *Тр. по прикл. ботан. и селекции.* 1924;1925:3–35. [Vavilov NI. On intergeneric hybrids of melons, watermelons and pumpkins (On the problem of the occurrence of species and generic systematic characters). *Tr. by app. nerd. and selection.* 1924; 1925:3–35. (In Russ.)]
6. Paris H.S. A proposed subspecific classifiaction for *Cucurbita pepo*. *Phytologia (USA).* 1986.
7. Paris H.S. Historical records, origins, and development of the edible cultivar groups of *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). *Economic Botany.* 1989;43(4):423–443.
8. Košmrlj K, Murovec J., Bohanec B. Haploid induction in hull-less seed pumpkin through parthenogenesis induced by X-ray-irradiated pollen. *Journal of the American Society for Horticultural Science.* 2013;138(4):310–316. https://doi.org/10.21273/JASHS.138.4.310
9. Germana MA. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant cell reports.* 2011;30(5):839–857.
10. Seguí-Simarro J.M., Moreno J.B., Fernández M.G., Mir R. Species with haploid or doubled haploid protocols. *Doubled Haploid Technology.* 2021. p. 41–103.
11. Blakeslee A.F., Belling J., Farnham M.E., Bergner A.D.. A haploid mutant in the jimson weed, '"*Datura Stramonium*". *Science.* 1922;55(1433): 646–647. https://doi.org/10.1126/science.55.1433.646
12. 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.* 1924;10(3): 116–120. https://doi.org/10.1073/pnas.10.3.116
13. Harland S.C., Harland S.C. Plant Breeding: Present Position and Future Perspective. . 15 pp. Cambridge: University Press. *Plant breeding: present position and future perspective. IIIrd Bateson Lecture.* 1955.
14. Harland SC. The genetical conception of the species. *Biological Reviews.* 1936;11(1):83–112. https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1936.tb00498.x
15. 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):121–124. https://doi.org/10.1073/pnas.10.4.121
16. Gaines EF, Aase HC. A haploid wheat plant. *American Journal of Botany.* 1926;13(6):373. https://doi.org/10.2307/2435439
17. Lindstrom E.W. A haploid mutant in the Tomato*. *Journal of Heredity.* 1929;20(1):23–30. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a103092
18. Kimber G., Riley R. The relationships of the diploid progenitors of hexaploid wheat. *Canadian Journal of Genetics and Cytology.* 1963;5(1):83–88. https://doi.org/10.1139/g63-012
19. Хохлов С., Гришина Е., Зайцева М., Тырнов В., Малышева-Шишкинская Н. Гаплоидия у покрытосеменных растений. 1970. 13 с. [Khokhlov S, Grishina E, Zaitseva M, Tyrnov B, Malysheva-Shishkinskaya H. Haploidy in angiosperms. 1970. 13 p. (In Russ.)]
20. Карпеченко Г.Д., Щавинская С.А. О половом обособлении тетраплоидных гибридов *Raphanus* × *Brassica*. *Тр. Всесоюз. съезда по генетике, селекции, семеноводству и племенному животноводству.* 1930;(2):267–276. [Karpechenko G.D., Shavinskaya S.A. Sexual isolation of *Raphanus* × *Brassica tetraploid hybrids. All-Union. Congress on genetics, breeding, seed production and livestock breeding.* 1930;(2):267-276. (In Russ.]
21. Навашин С.Г. Об изменении числа и морфологических признаков хромосом у межвидовых гибридов. *Тр. по прикл. ботан. и селекции.* 1927;17(3):121–150. [Navashin SG. On the change in the number and morphological characteristics of chromosomes in interspecific hybrids. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding.* 1927;17(3):121-150. (Шт Russ.)]
22. Вавилов Н.И. *Генетика на службе социалистического земледелия.* 1932. [Vavilov N.I. *Genetics at the service of socialist agriculture.* 1932. (In Russ.)]
23. Карпеченко ГД. Экспериментальная полиплоидия и гаплоидия. *Теоретические основы селекции растений.* 1935;1: 398–434. [Karpechenko G.D. Experimental polyploidy and haploidy. *Theoretical foundations of plant breeding.* 1935;(1):398-434. (In Russ.)]
24.Иванов М.А. Экспериментальное получение гаплоидов у Nicotina rustica (со специальным рассмотрением гаплоидии у цветковых растений). *Изв. биол.-геогр. научн.-иссл. института при Восточно-Сибирском гос. университете.* 1937;3(4): 56–71. [Ivanov MA. Experimental production of haploids in *Nicotina rustica* (with special consideration of haploidy in flowering plants). *Izv. biol.-geogr. scientific research Institute at the East Siberian State. university.* 1937;3(4):56–71. (In Russ.)]
25. Chase S.S. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize, and in its component single cross hybrids and inbred lines. *Genetics.* 1949;34(3):328. https://doi.org/10.1093/genetics/34.3.328
26. Chase S.S. Monoploids in maize. *Heterosis.* 1952; 389–399.
27. Guha S., Maheshwari S.C. *in vitro* production of embryos from anthers of Datura. *Nature.* 1964;204(4957):497–497. https://doi.org/10.1038/204497a0
28. Guha S., Maheshwari S.C. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of datura *in vitro*. *Nature.* 1966;212(5057): 97–98. https://doi.org/10.1038/212097a0
29. Hayase H. *Cucurbita*-crosses. V. Occurrence of a haploid twin pair from a F_1 progeny of C. maximta x *C. moschata*. *Ikushugaku zasshi.* 1954;4(2): 115–121. https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.4.115
30. Aalders L.E. Monoploidy in cucumbers. *Journal of Heredity.* 1958;49(1): 41–44. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106762
31. Lotfi M., Salehi S. Detection of cucumber parthenogenic haploid embryos by floating of immature seeds in liquid medium. *IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae.* 2008. p. 375–380. https://w3.avignon.inra.fr/dspace/handle/2174/234
32. Baktemur G, Taşkin H, Büyükalaca S. Comparison of different methods for separation of haploid embryo induced through irradiated pollen and their economic analysis in melon (*Cucumis melo* var. inodorus). *The Scientific World Journal.* 2013;2013: 1–8. https://doi.org/10.1155/2013/529502
33. Dumas de Vaulx R. Obtention de plantes haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) apres pollinisation par Cucumis ficifolius A. *Rich CR Acad Sci III-Vie.* 1979;(289): 875–878.
34. Thompson KF. *Oil-seed rape.* 1972.
35. Ho K.M., Jones G.E. Mingo barley. *Canadian Journal of Plant Science.* 1980;60(1): 279–280.
36. Swaminathan M.S., Singh M.P. X-ray induced somatic haploidy in watermelon. *Current Science.* 1958;27(2):63–64.
37. Sinha S., Jha K.K., Roy R.P. *In vitro* development of callus from anthers in Luffa cylindrica. *Current science.* 1979.
38. Xue G.R., Yu W.Y., Fei K.W., Cui H.N., Sun R.X., GR X.. Yu W.Y., Fei K.W., Watermelon plants derived by *in vitro* anther culture. *Plant Physiol Commun (CHN).* 1983;(4): 4–42.
39. San Noeum LH. Haploides d, *Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* non fecondes. *Ann. Amelior Plantes.* 1976;(26):751–754.
40. Chambonnet D., De Vaulx R.D. Obtention of embryos and plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules of *Cucurbita pepo*. *Cucurbit Genet Coop.* 1985;(8):66.
41. De Vaulx R.D., Chambonnet D. Obtention Of Embryos And Plants From *In Vitro* Culture Of Unfertilized Ovules Of *Cucurbita Pepo*. *Genetic Manipulation in Plant Breeding.* 1986. p. 295–298. https://doi.org/10.1515/9783110871944-048
42. Dirks R. *Patent Number:* 5,492,827. 1996. p. 1243–1244.
43. Gémesné Juhász A., Venczel G., Balogh P. Haploid plant induction in zucchini (*cucurbita pepo* l. Convar. Giromontiina duch) and in cucumber (cucumis sativus l.) Lines through *in vitro* gynogenesis. *Acta Horticulturae.* 1997;(447):623–626. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.447.124
44. Rakha M.T., Metwally E.I., Moustafa S.A., Etman A.A., Dewir Y.H. Evaluation of regenerated strains from six'*Cucurbita*'interspecific hybrids obtained through anther and ovule'*in vitro*'cultures. *Australian Journal of Crop Science.* 2012;6(1):23–30.
45. Min Z., Li H., Zou T., Tong L., Cheng J., Sun X. Studies of *in vitro* cul-

ture and plant regeneration of unfertilized ovary of pumpkin. *Chinese Bulletin of Botany.* 2016;51(1):74.
46. Sait K.E., Ahmet B., Ozbakir O.M. Production of callus mediated gynogenic haploids in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.). *Czech journal of genetics and plant breeding.* 2018;54(1):9–16.
47. Sauton A., Vaulx R.D., Dumas Vaulx R. Obtention de plantes haploïdes chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenèse induite par du pollen irradié. *Agronomie.* 1987;7(2):141–148. https://doi.org/10.1051/agro:19870209
48. Truong-Andre I. *In vitro* haploid plants derived from pollination by irradiated pollen on cucumber. *Eucarpia meeting on cucurbit genetics and breeding, Montfavet (France), 31 May-2 Jun* 1988. 1988.
49. Sauton A. Haploid gynogenesis in Cucumis sativus induced by irradiated pollen. *Cucurbit Genetics Coop.* 1989;(12):22–23.
50. Niemirowicz-Szczytt K., Dumas de Vaulx R. Preliminary data on haploid cucumber (*Cucumis sativus* L.) induction. *Cucurbit Genet Coop.* 1989;(12):24–25.
51. Kurtar ES, Sarl N, Abak K. Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). *Euphytica.* 2002;127(3):335–344. https://doi.org/10.1023/A:1020343900419
52. 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). *African Journal of Biotechnology.* 2009;8(21):5944–5951.
53. 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, Tissue and Organ Culture (PCTOC).* 2010;102(3):267–277. https://doi.org/10.1007/s11240-010-9729-1
54. Przyborowski J.A. Haploidy in cucumber (*Cucumis sativus* L.). 1996. p. 91–98. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1858-5_6
55. Gałązka J., Niemirowicz-Szczytt K. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. *Folia Horticulturae.* 2013;25(1): 67–78. https://doi.org/10.2478/fhort-2013-0008
56. Dong Y.Q., Zhao W.X., Li X.H., Liu X.C., Gao N.N., Huang J.H., et al. Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. *Plant Cell Reports.* 2016;35(10): 1991–2019. https://doi.org/10.1007/s00299-016-2018-7
57. 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. https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-5-3-14
58. Hooghvorst I, Nogués S. Opportunities and Challenges in Doubled Haploids and Haploid Inducer-Mediated Genome-Editing Systems in Cucurbits. *Agronomy.* 2020;10(9):1441. https://doi.org/10.3390/agronomy10091441
59. Kurtar ES, Seymen M. Gynogenesis in *Cucurbita* Species. *Doubled Haploid Technology.* 2021. p. 123–133. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1331-3_8
60. d'Hooghvorst I, Torrico O, Nogués S. Doubled Haploid Parthenogenetic Production of Melon 'Piel de Sapo'. *Doubled Haploid Technology.* 2021. p. 87–95. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1331-3_5
61. Asadi A., Seguí-Simarro J.M. Production of Doubled Haploid Plants in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Through Anther Culture. *Doubled Haploid Technology*. 2021. p. 71–85. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1331-3_4
62. Kurtar E.S, Seymen M. Induction of Parthenogenesis by Irradiated Pollen in *Cucurbita* Species. *Doubled Haploid Technology.* 2021. p. 135–145. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1331-3_9
63. Kurtar E.S., Seymen M. Anther Culture in *Cucurbita* Species. *Doubled Haploid Technology.* 2021. p. 111–121. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1331-3_7
64. Kurtar E.S., Seymen M., Ünal K.AL. An overview of doubled haploid plant production in *Cucurbita* species. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi.* 2020;30(3):510–520.
65. Kurtar E.S., Seymen M., Çetın A.N., Türkmen Ö. Dihaploidization in promising summer squash genotypes (*Cucurbita pepo* L.) via irradiated pollen technique. *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences.* 2021;31(1):42–51. https://doi.org/10.29133/yyutbd.800475
66. Baktemur G., Yücel N.K., Taşkin H., ÇÖmlekçioğlu S., Büyükalaca S. Effects of different genotypes and gamma ray doses on haploidization using irradiated pollen technique in squash. *Turkish Journal of Biology.* 2014;38(3):318–327. https://doi.org/10.3906/biy-1309-5
67. Ebrahimzadeh H., Lotfi M., Ghanavati F. Production of Haploids in *Cucurbita pepo* L . through Parthenogenesis Induced by Gamma-Irradiated Pollen هاي بذري و رسيدن گلخانه تحقيقاتي پرديس ابوريحان دانشگاه تهران و د ر كشت شدند . پس از رشد گياهچه 2013;60(40):99–108.
68. KURTAR ES, BALKAYA A, GÖÇMEN M. Hıyara (*Cucumis sativus* L.) Anaç Olabilecek Ümitvar Kabak (*Cucurbita* spp.) Genotiplerinde Işınlanmış Polen Tekniği İle Dihaploidizasyon. *Selcuk Journal of Agricultural and Food Sciences.* 2017;31(1):34–41. https://doi.org/10.15316/sjafs.2017.4
69. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum.* 1962;15(3):473–497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
70. Chée R.P., Leskovar D.I., Cantliffe D.J. Optimizing embryogenic callus and embryo growth of a synthetic seed system for sweetpotato by varying media nutrient concentrations. *Journal of the American Society For Horticultural Science.* 1992;117(4):663–667.
71. Metwally E.I., Moustafa S.A., El-Sawy B.I., Shalaby T.A. Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 1998;52(3):171–176. https://doi.org/10.1023/A:1005908326663
72. Mohamed M.F., Refaei E.F.S. Enhanced Haploids Regeneration in Anther Culture of Summer Squash (*Cucurbita pepo* L.). *Cucurbit Genetics Cooperative Report.* 2004;27(January 2004):57–60.
73. Shalaby T.A. Embryogenesis and plantlets regeneration from anther culture of squash plants (*Cucurbita pepo* L.) as affected by different genotypes. *J Agric Res Tanta Univ.* 2006;32(1):173–183.
74. Shail J.W., Robinson R.W. Anther and ovule culture of *Cucurbita*. *Cucurbit Genet Coop.* 1987;(10):92.
75. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal.* 2010;8(4):377–424. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x
76. Nitsch C., Norreel B. Factors favoring the formation of androgenetic embryos in anther culture. *Genes, Enzymes, and Populations.* 1973. p. 129–144.
77. Metwally E.I., Moustafa S.A., El-Sawy B.I., Haroun S.A., Shalaby T.A. Production of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo*. *Plant cell, tissue and organ culture.* 1998;52(3):117–121.
78. Shalaby T.A. Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). *Scientia horticulturae.* 2007;115(1):1–6.
79. Шмыкова Н.А., Супрунова Т.П. Индукция гиногенеза в культуре *in vitro* неопыленных семяпочек *Cucumis sativus* L . *Гавриш.* 2009; 40–44. [Shmykova N.A., Suprunova T.P. Induction of gynogenesis *in vitro* culture of non-pollinated ovules of *Cucumis sativus* L. *Gavrish.* 2009; 40–44. (In Russ.)]
80. Domblides, E., Shmykova, N., Khimich, G., Korotseva, I., Kan, L., Domblides, A., Pivovarov, V. and Soldatenko, A. Production of doubled haploid plants of *Cucurbitaceae* family crops through unpollinated ovule culture *in vitro*. *Acta Hortic.* 2020;(1294):19-28. DOI: 10.17660/ActaHortic.2020.1294.4 https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1294.4
81. Домблидес Е.А., Шмыкова Н.А., Заячковская Т.В., Химич Г.А., Коротцева И.Б., Кан Л.Ю., et al. Получение удвоенных гаплоидов в культуре неопыленных семяпочек кабачка (*Cucurbita pepo* L.). *Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты).* 2016. p. 28–29. [Domblides E.A., Shmykova N.A., Zayachkovskaya T.V., Khimich G.A., Korotseva I.B., Kan L.Yu., et al. Obtaining doubled haploids in the culture of non-pollinated vegetable marrow (*Cucurbita pepo* L.). *Biotechnology as a tool for the conservation of plant biodiversity (physiological, biochemical, embryological, genetic and legal aspect.* 2016. p. 28–29. (In Russ.)]
82. Bing X., Xiufeng W., Zhicheng F. Improved conditions of *in vitro* culture of unpollinated ovules and production of embryonary sac plants in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). *Scientia Agricultura Sinica.* 2006;.
83. Andersen S.B., Christiansen I., Farestveit B. Carrot (Daucus carota L.): *In Vitro* Productionof Haploids and Field Trials. 1990. p. 393–402. https://doi.org/10.1007/978-3-642-61499-6_20 [6th November 2020]
84. Ribeiro C.B., Pereira F. de C., Nóbrega L. da, Rezende B.A., Dias K.O. das G., Braz G.T., et al. Haploid identification using tropicalized haploid inducer progenies in maize. *Crop Breeding and Applied Biotechnology.* 2018;(18):16–23.
85. Maluszynski M., Kasha K., Forster B.P., Szarejko I. *Doubled haploid production in crop plants: a manual.* 2003.
86. Ochatt S.J., Patat-Ochatt E.M., Moessner A.. Ploidy level determination within the context of *in vitro* breeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC).* 2011;104(3):329–341.
87. Singh R.J. Plant cytogenetics CRC Press. *Boca Raton.* 2003.
88. Bohanec .B. Ploidy determination using flow cytometry. Doubled haploid production in crop plants. 2003. p. 397–403.
89. Snowdon R.J. Cytogenetics and genome analysis in *Brassica* crops. *Chromosome Research.* 2007;15(1):85–95.
90. Takahira J., Cousin A., Nelson M.N., Cowling W.A. Improvement in efficiency of microspore culture to produce doubled haploid canola (*Brassica napus* L.) by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC).* 2011;104(1):51–59.
91. Домблидес Е.А., Кан Л.Ю., Химич Г.А., Коротцева И.Б., Домблидес А.С. Цитологическая оценка удвоенных гаплоидов кабачка (*Cucurbita pepo* L.). *Овощи России.* 2018;(6):3-7. https://doi.org/10.18619/2072-9146-2018-6-3-7 [Domblides E.A., Kan L.Yu., Khimich G.A., Korotseva I.B., Domblides A.S. Cytological assessment of doubled haploids in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). *Vegetable crops of Russia.* 2018;(6):3-7. (In Russ.) https://doi.org/10.18619/2072-9146-2018-6-3-7]

92. Ochatt S.J. Flow cytometry in plant breeding. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2008;73(7):581–598.
93. Bartoš J., Alkhimova O., Doleželová M., De Langhe E., Doležel J. Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in Musa and Ensete (*Musaceae*): taxonomic implications. *Cytogenetic and Genome Research*. 2005;109(1–3):50–57.
94. Monakhos S.G., Nguen M.L., Bezbozhnaya A.V, Monakhos G.F. A relationship between ploidy level and the number of chloroplasts in stomatal guard cells in diploid and amphidiploid *Brassica species*. *Сельскохозяйственная биология*. 2014;(5 (eng)).
95. Yuan S., Liu Y-M., Fang Z-Y., Yang L-M., Zhuang M., Zhang Y-Y., et al. Study on the relationship between the ploidy level of microspore-derived plants and the number of chloroplast in stomatal guard cells in Brassica oleracea. Agricultural Sciences in China. 2009;8(8):939–946.
96. Sharma S., Sarkar D., Pandey S.K. Phenotypic characterization and nuclear microsatellite analysis reveal genomic changes and rearrangements underlying androgenesis in tetraploid potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Euphytica*. 2010;171(3):313–326.
97. Irikova T., Grozeva S., Rodeva V. Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) *in vitro*. *Acta physiologiae plantarum*. 2011;33(5):1559–1570. https://doi.org/10.1007/s11738-011-0736-6
98. Garcia-Arias F., Sánchez-Betancourt E., Núñez V. Fertility recovery of anther-derived haploid plants in Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Agronomía Colombiana*. 2018;36(3):201–209.
99. Малецкий СИ, Юданова СС, Малецкая ЕИ. Эпигеномная и эпипластомная изменчивость у гаплоидных и дигаплоидных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). Сельскохозяйственная биология. 2015;(5). [Maletsky SI, Yudanova SS, Maletskaya EI. Epigenomic and epiplastomic variability in haploid and dihaploid sugar beet plants (*Beta vulgaris* L.). *Agricultural biology*. 2015; (5)(In Russ.)].
100. Ahmadi B. Ebrahimzadeh H. *In vitro* androgenesis: Spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants. *Plant cell reports*. 2020;39(3):299–316.
101. Höfer M., Grafe C., Boudichevskaja A., Lopez A., Bueno M.A., Roen D.. Characterization of plant material obtained by *in vitro* androgenesis and in situ parthenogenesis in apple. *Scientia horticulturae*. 2008;117(3):203–211.
102. Geiger H.H., Gordillo G.A.. Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica*. 2009;54(4):485.
103. Ficcadenti N., Sestili S., Pandolfini T., Cirillo C., Rotino G.L., Spena A. Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato. *Molecular Breeding*. 1999;5(5):463–470.
104. Munyon I.P., Hubstenberger J.F., Phillips G.C. Origin of plantlets and callus obtained from chile pepper anther cultures. *In vitro cellular & developmental biology*. 1989;25(3):293–296.
105. Suprunova T., Shmykova N., Pitrat M. *In vitro* induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of Cucumis sativus. *Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae*. 2008; 371–374. https://w3.avignon.inra.fr/dspace/handle/2174/233
106. Hofinger B.J., Huynh O.A., Jankowicz-Cieslak J., Müller A., Otto I., Kumlehn J., et al. Validation of doubled haploid plants by enzymatic mismatch cleavage. *Plant methods*. 2013;9(1):1–10.
107. Diao W.P., Jia Y.Y., Song H., Zhang X.Q., Lou Q.F., Chen J.F. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenetants using SSR markers. *Scientia Horticulturae*. 2009;119(3):246–251. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.08.016
108. Chen Y., Hausner G., Kenaschuk E., Procunier D., Dribnenki P., Penner G.. Identification of microspore-derived plants in anther culture of flax (*Linum usitatissimum* L.) using molecular markers. *Plant Cell Reports*. 1998;18(1):44–48.
109. Kernan Z., Ferrie A.M.R. Microspore embryogenesis and the development of a double haploidy protocol for cow cockle (*Saponaria vaccaria*). *Plant cell reports*. 2006;25(4):274–280.
110. Song H., Lou Q-F.F., Luo X-DD., Wolukau J.N., Diao W-PP., Qian C-TT., et al. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant cell, tissue and organ culture*. 2007;90(3):245–254. https://doi.org/10.1007/s11240-007-9263-y
111. Bouvier L., Guerif P.H., Djulbic M., Durel C-E., Chevreau E., Lespinasse Y. Chromosome doubling of pear haploid plants and homozygosity assessment using isozyme and microsatellite markers. *Euphytica*. 2002;123(2):255–262.
112. Bartošová Z., Obert B., Takac T., Kormutak A., Pretová A. Using enzyme polymorphism to identify the gametic origin of flax regenerants. *Acta Biol Cracov Bot*. 2005;(47):173–178.
113. Górecka K., Krzyżanowska D., Kiszczak W., Kowalska U., Górecki R.. Carrot Doubled Haploids. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. 2009. p. 231–239. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_20
114. Kiszczak W., Burian M., Kowalska U., Górecka K., Podwyszyńska M. Production of Homozygous Red Beet (*Beta vulgaris* L. subsp. vulgaris) Plants by Ovule Culture. *Doubled Haploid Technology*. 2021. p.301–312.
115. Kiszczak W., Burian M., Kowalska U., Górecka K.. Production of Homozygous Carrot (*Daucus carota* L.) Plants by Anther Culture. *Doubled Haploid Technology*. 2021. p. 113–126.
116. Malik A.A, Li C., Shuxia Z., Jin-feng C., Cui L.I., Zhang S., et al. Efficiency of SSR markers for determining the origin of melon plantlets derived through unfertilized ovary culture. *Horticultural Science*. 2011;38(1):27–34. https://doi.org/10.17221/47/2010-hortsci
117. Anandhan S., Chavan A.A., Gopal J., Mote S.R., Shelke P.V., Lawande K.E. Variation in gynogenic potential for haploid induction in Indian short-day onions. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2014;74(4):526–528.
118. Cao H., Biswas MK., Lü Y., Amar M.H., Tong Z., Xu Q., et al. Doubled haploid callus lines of Valencia sweet orange recovered from anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2011;104(3):415–423.
119. Aleza P., Juárez J., Hernández M., Pina J.A., Ollitrault P., Navarro L. Recovery and characterization of a Citrus clementina Hort. ex Tan.'Clemenules' haploid plant selected to establish the reference whole Citrus genome sequence. *BMC Plant Biology*. 2009;9(1):1–17.
120. Wang S-M., Lan H., Cao H-B., Xu Q., Chen C-L., Deng X-X., et al. Recovery and characterization of homozygous lines from two sweet orange cultivars via anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2015;123(3):633–644.
121. Kawano M., Yahata M., Shimizu T., Honsho C., Hirano T., Kunitake H. Production of doubled-haploid (DH) selfed-progenies in 'Banpeiyu'pummelo [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] and its genetic analysis with simple sequence repeat markers. *Scientia Horticulturae*. 2021;(277):109782.
122. Perera P.I.P., Perera L., Hocher V., Verdeil J-L., Yakandawala D.M.D, Weerakoon LK. Use of SSR markers to determine the anther-derived homozygous lines in coconut. *Plant cell reports*. 2008;27(11):1697–1703.
123. Varshney R.K., Marcel T.C., Ramsay L., Russell J,. Röder M.S., Stein N., et al. A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theoretical and Applied Genetics*. 2007;114(6):1091–1103.
124. Murovec J., Stajner N., Jakse J., Javornik B.. Microsatellite marker for homozygosity testing of putative doubled haploids and characterization of Mimulus species derived by a cross-genera approach. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2007;132(5):659–663.
125. Chani E., Veilleux R.E., Boluarte-Medina T. Improved androgenesis of interspecific potato and efficiency of SSR markers to identify homozygous regenerants. *Plant cell, tissue and organ culture*. 2000;60(2):101–112.
126. Keleş D., Pınar H., Ata A., Taşkın H., Yıldız S., Büyükalaca S. Effect of pepper types on obtaining spontaneous doubled haploid plants via anther culture. *HortScience*. 2015;50(11):1671–1676.
127. Nelson M.N., Mason A.S., Castello M-C., Thomson L., Yan G., Cowling W.A. Microspore culture preferentially selects unreduced (2n) gametes from an interspecific hybrid of *Brassica napus* L.× *Brassica carinata* Braun. *Theoretical and applied genetics*. 2009;119(3):497–505.
128. Jankowicz-Cieslak J., Huynh O.A., Bado S., Matijevic M., Till B.J. Reverse-genetics by tilling expands through theplant kingdom. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2011; 290–300.
129. Till B.J., Zerr T., Comai L., Henikoff S. A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals. *Nature protocols*. 2006;1(5):2465–2477.
130. Till B.J., Jankowicz-Cieslak J., Sági L., Huynh O.A., Utsushi H., Swennen R., et al. Discovery of nucleotide polymorphisms in the Musa gene pool by Ecotilling. *Theoretical and applied genetics*. 2010;121(7):1381–1389.
131. Slade A.J., McGuire C., Loeffler D., Mullenberg J., Skinner W., Fazio G, et al. Development of high amylose wheat through TILLING. *BMC plant biology*. 2012;12(1):1–17.
132. Kurowska M, Daszkowska-Golec A, Gruszka D, Marzec M, Szurman M, Szarejko I, et al. TILLING-a shortcut in functional genomics. *Journal of applied genetics*. 2011;52(4):371–390.
133. Comai L., Young K., Till B.J., Reynolds S.H., Greene E.A., Codomo C.A., et al. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *The Plant Journal*. 2004;37(5): 778–786.
134. Asadi A, Zebarjadi A., Abdollahi M.R., Seguí-Simarro J.M. Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica*. 2018;214(11):216. https://doi.org/10.1007/s10681-018-2297-x
135. Danin-Poleg Y., Reis N., Tzuri G., Katzir N. Development and characterization of microsatellite markers in Cucumis. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001;102(1):61–72.
136. Xiang C., Duan Y., Li H., Ma W., Huang S., Sui X., et al. A high-density EST-SSR-based genetic map and QTL analysis of dwarf trait in *Cucurbita pepo* L. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(10):3140.
137. Zhu L., Zhu H., Li Y., Wang Y., Wu X., Li J. et al. Genome Wide Characterization, Comparative and Genetic Diversity Analysis of Simple Sequence Repeats in *Cucurbita* Species. *Horticulturae*. 2021;7(6):143.
138. Ravi M., Chan S.W.L. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature*. 2010;464(7288):615–618.