

ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА CUCURBITACEAE



Шмыкова Н.А. – доктор с-х наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии
Химич Г.А. – старший научный сотрудник лаборатории селекции и семеноводства тыквенных культур
Коротцева И.Б. – кандидат с-х наук, зав. лабораторией селекции и семеноводства тыквенных культур
Домблидес Е.А. – кандидат с-х наук, зав. лабораторией биотехнологии

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
 «Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур» (ФГБНУ ВНИИССОК)
 143080, Россия, Московская обл., Одинцовский р-н, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д.14
 E-mail: vniissok@mail.ru

Технология получения удвоенных гаплоидов (DH (doubled haploid) - технологии) через андрогенез, гиногенез и партеногенез – один из способов генетического улучшения сельскохозяйственных растений. С помощью DH-технологии полностью гомозиготные растения можно получить в течение одного года, в отличие от классических методов селекции, при использовании которых процесс инбридинга занимает 6–12 лет. Для получения гаплоидов у представителей семейства Тыквенные (Cucurbitaceae) наиболее успешно разработаны технологии с использованием партеногенеза (опыление растений облученной пылью) и гиногенеза (культура неопыленных семяпочек in vitro). На эффективность DH-технологии влияют многочисленные факторы: условия выращивания донорных растений, их генотип, стадия развития мешка, состав питательной среды, условия культивирования. Оптимальное значение и комбинация этих факторов являются необходимым условием для успешного эмбриогенеза. В данной обзорной статье обобщен опыт зарубежных и российских ученых в области разработки технологии получения удвоенных гаплоидов тыквенных культур, показаны различные факторы, влияющие на процессы получения DH-растений, а также подходы, позволяющие повысить выход гаплоидов.

Ключевые слова: огурец (*Cucumis sativus* L.), тыква, кабачок (*Cucurbita* L.), DH-технологии, культура неопыленных семяпочек, эмбриогенез, удвоенные гаплоиды.

Основные проблемы, на решение которых направлены усилия современной селекции – это полноценное питание людей, их здоровье, источники энергии. В России значительную долю среди овощей составляют растения семейства Тыквенные (*Cucurbitaceae*). Наибольшее хозяйственное значение среди них имеют огурец, тыква, кабачок,

патиссон, дыня и арбуз. Плоды этих культур отличаются высокими вкусовыми и целебными свойствами. Их выращивают во всех регионах России, как в открытом, так и защищенном грунте. В условиях современного рынка потребительский спрос на овощную продукцию постоянно растет и меняется. Это создает необходимость наличия у селекционера генотипически раз-

нообразного и стабильного материала, который позволит быстро удовлетворять требования современного производства. В мировой практике широкое распространение имеют гибриды F_1 , которые отличаются от сортов высокой выравненностью и урожайностью, а также способствуют защите прав селекционеров и семеноводов. Создание гибридов требует использования



Рис. 1. Получение ДН-растений огурца в культуре неопыленных семяпочек. Проращивание семяпочки на среде МСм с 0,2 мг/л ТДЗ и 0,0001 мкМ эпибрасинолида (А). Развитие саженцев на без гормональной среде МС (Б). ДН-растения огурца (В).

гомозиготных родительских линий, получение которых традиционными методами трудоемкое и длительное (6-8 лет), что сильно тормозит селекционный процесс.

Для решения этой проблемы большое значение имеет альтернативный метод создания гомозиготных линий из удвоенных гаплоидов (ДН – doubled haploid). Из трех известных способов получения гаплоидов (андрогенез, гиногенез и партеногенез) у тыквенных культур наиболее успешно используется партеногенез.

По данным зарубежных исследователей с помощью партеногенеза можно получить 3-13 гаплоидов огурца на 1000 семян (Troung-Andre, 1988; Sauton, 1989; Przyborowski, Niemirowicz-Szczytt 1994; Caglar, Abak, 1999; Faris, Niemirowicz-Szczytt, 1999; Claveria et al., 2005; Xie et al., 2005). Для индукции партеногенеза у огурца, как правило, используют опыление женских цветков γ -облученной пылью с последующим выделением гаплоидных зародышей. Индуцированный партеногенез

также широко применяют при получении гаплоидов у другого представителя рода *Cucumis* – дыни (Ficcadenti et al., 1995; Taner et al., 2000; Lotfi et al., 2003; Sun et al., 2006; Lim, Earle, 2009).

Отличие гиногенеза от партеногенеза заключается в том, что культивируются *in vitro* неопыленные завязи (фрагменты завязей) или семяпочки на искусственных питательных средах. Получение гаплоидных растений в культуре неопыленных семяпочек является результатом перехода клеток зародышевого мешка с гаметофитного пути развития на спорофитный с образованием из них эмбриоидов или морфогенного каллуса. На процесс индукции гиногенеза влияет большое число факторов таких, как генотип растения, стадия развития женского гаметофита, состав питательных сред, условия выращивания донорных растений, поэтому исследования в области гиногенеза сосредоточены на изучении их влияния на выход ДН-растений. По литературным данным эффективность этих технологий следующая:

из 300 завязей огурца получается 240 эмбриоидов US Patent 5492827 (Dirk R., 1996); из 100 завязей – 7,1 эмбриоидов (Gemmes Juhans et al., 2002). Если учитывать, что в завязи огурца содержится 400-650 семяпочек в зависимости от сорта, то число получаемых ДН-растений несколько меньше, чем при партеногенезе. В зарубежных селекционных фирмах, несмотря на небольшой выход ДН-растений, такого типа технологии позволяют получать их в промышленных масштабах (Dirk, 1996).

Поиски способов повышения выхода ДН-растений в культуре неопыленных семяпочек проводятся учеными разных стран. Li с коллегами (2013) показали, что добавления нитрата серебра в питательную среду в концентрации 5-10 мг/л способствует побегообразованию у культивируемых семяпочек.

Во ВНИИ селекции и семеноводства разработана отечественная конкурентоспособная технология получения ДН-линий огурца в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* (рис. 1) (Шмыкова, Супрунова, 2009).

1. Регенерация растений огурца из неопыленных семяпочек огурца, культивируемых на модифицированной среде СВМ с тидиазурином и эпибрасинолидом

Сортообразец	Число культивируемых семяпочек/завязей	Число семяпочек, образовавших растение	Число растений, полученных из одной завязи
№3	2571 (10)	80	8,0 ± 2,4
№7	2593 (10)	30	3,0 ± 1,1
№13	2342 (10)	200	20,0 ± 4,6
№24	2601 (10)	60	6,0 ± 1,9



Рис. 2. Получение DH – растений тыквы в культуре неопыленных семян. Проращивание семян на среде МСм с 0,2 мг/л ТДЗ и 0,0001 мкМ эпибрасинолида (А). Развитие проростка гибрида № 100 на без гормональной среде МС (Б).

Применение для индукции гиногенеза 0,2 мг/л тидиазурина в сочетании с 0,0001 мкМ эпибрасинолида позволило повысить регенерационную способность семян. Полученные результаты превышали данные эксперимента, проведенного по методике Gemes Juhans с коллегами (2002) в несколько раз (3-20 раз в зависимости от образца) (табл. 1).

Вторым представителем семейства Тыквенные, имеющим большое хозяйственное значение, является род *Cucurbita* L. Для получения DH-растений различных представителей этого рода широко применяют партеногенез (Kurtar, 1999, 2009; Kurtar et al., 2002, Kurtar et al., 2009, Kurtar et al., 2010). Metwally с коллегами (1998a) и Shalaby (2007) сообщили об успешном использовании культуры неопыленных семян тыквы.

Во ВНИИ селекции и семеноводства проведены успешные исследования по получению DH-растений у представителей рода *Cucurbita* через культуру неопыленных семян (рис. 2). Донорные растения были представлены гибридами тыквы №100, 103, 104 и 112. Выделенные из завязей бутонов семяпочки помещали на питательную среду с минеральной основой МСм (Matsuda et al., 1984) с добавлением аминокислот (100мг/л пролина, 100 мг/л серина и 800 мг/л глутамина и витаминов по прописи NLN (Lichter, 1982), 30 г/л сахарозы, 7 г/л агар. Для индукции гиногенеза использовали два варианта регуляторов роста: первый вариант – 0,2 мг/л тидиазурина и 0,0001 мкМ эпибрасинолида, второй – 2,0 мг/л 2,4Д.

Гибриды тыквы различались по частоте индукции гиногенеза в зависимости от варианта среды. У гибрида №100 индукция гиногенеза происходила лишь на среде с 0,2 мг/л тидиазурина и 0,0001 мкМ эпибрасинолида, а у гибридов №103 и №112 – на среде с 2,0 мг/л 2,4Д, а гибриды №103 и №104 давали хороший результат на обеих средах. Максимальное число эмбриоидов, образовавшихся из одной завязи, было у гибрида №112 (9 штук), также хорошие результаты получены у гибрида №104 (6-7 штук эмбриоидов из одной завязи).

Культивирование семян кабачка проводили на среде того же состава, что и тыквы. В опытах использовали 6 сортов. Число вариантов индукционных сред было увеличено до 5. Они различались по содержанию регуляторов роста: 1 – 0,1 мг/л тидиазурина; 2 – 0,2 мг/л тидиазурина; 3 – 1,0 мг/л 2,4 Д; 4 – 2,0 мг/л 2,4 Д; 5 – 1,0 мг/л 2,4 Д и 1,0 мг/л кинетина. Сортабразцы проявили различную отзывчивость к индукции гиногенеза. Например, у образца №1 только одна неопыленная семяпочка проросла из 1220 штук культивируемых семян. У самого отзывчивого сортабразца проросло 69 штук семян из 1180 культивируемых. Эффективнее индукция гиногенеза происходила на средах с 1,0 мг/л 2,4 Д и 2,0 мг/л 2,4Д.



Рис. 3. Получение DH – растений кабачка в культуре неопыленных семян. А – проращивание семян кабачка сортабразца №2 на индукционной среде МСм с 1,0 мг/л 2,4 Д. Б – развитие проростка на безгормональной среде МС. В – развитие растения регенеранта на безгормональной среде МС.

Анализ зарубежного и отечественного опыта показывает перспективность разработок ДН-технологий получения удвоенных гаплоидов у растений семейства Тыквенные через культуру неопыленных семяпочек *in vitro*, внедрение которых в селекционный процесс позволит ускорить создание отечественных, конкурентоспособных гибридов огурца, тыквы, кабачка.

Наряду с гиногенезом встречаются единичные сообщения о положительных результатах при культивировании *in vitro* пыльников растений рода *Cucurbita* (Metwally et al., 1998b; Mohamed, Refaei, 2004;). В послед-

нее десятилетие также активизировались исследования в культуре пыльников огурца (Kumar et al., 2003, 2004; Song et al., 2007). Однако, при культивировании пыльников огурца, как показали наши исследования, происходит образование каллуса из соматических тканей стенок пыльника и связника (Suprunova, Shmykova, 2008). Это усложняет отбор истинных удвоенных гаплоидов. Результативных исследований культуры микроспор *in vitro* тыквенных культур на сегодняшний день нет, хотя именно это направление исследований является более привлекательным.

PROSPECTIVE OF DEVELOPMENT OF DOUBLED HAPLOID PLANTS OF CUCURBITACEAE FAMILY

Shmykova N.A., Khimich G.A.,
Korotseva I.B., Domblides E.A.

Federal State Budgetary Scientific Research Institution

«All-Russian Scientific Research Institute of vegetable breeding and seed production»

143080, Russia, Moscow region, Odintsovo district,
p. VNISSOK, Selectionnaya street, 14

E-mail: vniissok@mail.ru

Abstract

In this review, the experience of Russian and foreign scientists in field of development of technology of doubled haploids (DHs) of Cucurbitaceae crops is summarized. The different factors affected on the development of DH-plants and the ways of increasing of yield of double haploids are described in the article.

Keywords: cucumber (*Cucumis sativus* L.), pumpkin (*Cucurbita* L.), technology of doubled haploids, unpollinated ovule culture, embryogenesis.

Литература

Шмыкова Н.А., Супрунова Т.П. Индукция гиногенеза в культуре *in vitro* неопыленных семяпочек *Cucumis sativus* L. // Гавриш - 2009. - №4. - С.40-44.

Caylar G., Abak K. 1999. Progress in the production of haploid embryos, plant and double haploids in cucumber (*C. sativus* L.) by gamma irradiated pollen in Turkey. *Acta Hort.* Vol. 492. P. 317-322.

Claveria E., Garcia-Mas J., Dolcet-Sanjuan R. 2005. Optimization of cucumber doubled haploid line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos. *J. Amer. Hort. Sci.* Vol. 130(4). P. 555-560.

Dirk R. US Patent 5492827 – Metod for the production of double-gaploid cucumbers – 1996.

Faris N.M., Niemirowicz-Szczytt K. 1999. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) embryo development *in situ* after pollination with irradiated pollen. *Acta Biologica Cracoviensia.* Vol. 41. P. 111-118.

Ficcadenti N., Veronose P., Sesuli S. et al. Influence of genotype on induction of haploidy in *Cucumis melo* L. by using irradiated pollen. *J. Genet Breed.* 1995. Vol. 49. P. 359-364.

Gemes-Juhász A., Balogh P., Ferenczy A., Kristof Z. 2002. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* Gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Rep.* Vol. 21. P. 105-111.

Kumar H.J.A., Murthy H.N. 2004. Effect of sugars and aminoacids on androgenesis of *Cucumis sativus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* Vol. 78. P. 201-208

Kumar H.J.A., Murthy H.N., Pack K.J. 2003. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. *Scientia Hort.* Vol. 447. P. 623-624.

Kurtar E.S., Balkaya A. Production of *in vitro* haploid plants from *in situ* induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex. Lam) via irradiated pollen. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2010. DOI 10. 1007/s11240-010-9729-1.

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

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

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

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

Li J.W., Si S.W., Cheng J.Y., Li J.X., Liu J.Q. Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus* // *Biologia Plantarum* 2013. V. 57. P. 164-168.

Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*.//

Z. Pflanzenphysiol., 1982. V. 105. P. 427 - 434.

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

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

Masuda K., Kikuta Y., Okazawa Y.A. Revision of the medium for somatic embryogenesis in carrot suspension culture // *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 1981. V. 60. P. 183-193.

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

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

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

Przyborowski J., Niemirowicz-Szczytt K. Main factors affecting cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo development and haploid plant characteristics. // *Plant Breed* 1994. V. 112. P. 70-75.

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

Shalaby T. A. Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.) // *Scientia Horticulturae* 2007. V. 115. P. 1-6

Song H., Lou Q.-F., Luo X.-D., Joseph N. Wolukau J. N., Diao W.-P., Qian C.-T., Jin-Feng Chen J.-F. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.) // *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2007. V. 90. P. 245-254.

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

Suprunova T., Shmykova N. *In vitro* induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus* // *Cucurbitaceae* 2008. Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae. 21-24 may 2008 Avignon, France. P. 371-374.

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

Troung-Andre I *In vitro* haploid plants derived from pollination by irradiated pollen of cucumber. *Proc. Eucarpia Mett Cucurbit.* Avignon-Monfavet. France. 1988. P. 143-144.

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