

ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ КАБАЧКА (*CUCURBITA PEPO* L.)



CYTOLOGICAL ASSESSMENT OF DOUBLED HAPLOIDS IN SUMMER SQUASH (*CUCURBITA PEPO* L.)

Домблдес Е.А.* – зав. лабораторией биотехнологии, кандидат с.-х. наук
<https://orcid.org/0000-0002-2695-190X>

Кан Л.Ю. – с.н.с. лаборатории генетики и цитологии, кандидат с.-х. наук
<https://orcid.org/0000-0001-7902-503X>

Химич Г.А. – с.н.с. лаборатории селекции тыквенных культур

Коротцева И.Б. – зав. лабораторией селекции тыквенных культур, кандидат с.-х. наук

Домблдес А.С. – зав. лабораторией генетики и цитологии, кандидат с.-х. наук
<https://orcid.org/0000-0002-5617-9498>

ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства»
143072, Россия, Московская обл.,
Одинцовский р-н, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д. 14

*E-mail: Edombldes@mail.ru

Dombldes E.A. – Ph.D. in Agriculture, Head of Laboratory of Biotechnology
<https://orcid.org/0000-0002-2695-190X>

Kan L.Yu. – Ph.D. in Agriculture, Senior Researcher, Laboratory of Genetics and Cytology
<https://orcid.org/0000-0001-7902-503X>

Khimich G.A. – Senior Researcher,
Laboratory Cucurbits Crop Breeding and Seed Production

Korotseva I.B. – Ph.D. in Agriculture, Head
of Laboratory Cucurbits Crop Breeding and Seed Production

Dombldes A.S. – Ph.D. in Agriculture, Head of Laboratory of Genetics and Cytology
<https://orcid.org/0000-0002-5617-9498>

FSBSI Federal Scientific Vegetable Center
Selectionaya St. 14, VNISSOK, Odintsovo region,
Moscow oblast, 143072, Russia

*E-mail: Edombldes@mail.ru

Из девяти отозвавшихся в культуре неопыленных семяпочек образцов кабачка в 2015-2017 годах было получено 147 новых генотипов. Для оценки уровня пloidности полученных растений-регенерантов *R0* кабачка необходимо проводить цитологический анализ. Малый размер митотических хромосом и их относительно большое количество в роде *Cucurbita* делает их трудными для точного подсчета, даже несмотря на то, что они, как правило, хорошо разделены. В результате проведенной работы была подобрана оптимальная методика окрашивания хромосом кабачка с использованием модернизированного нами пропионно-лактоидного метода. При приготовлении давленных препаратов использовали меристемы стебля и кончиков корней. Кабачок оказался трудным в цитологическом плане объектом ввиду малой частоты митозов и небольшого числа метафаз с хорошим разбором хромосом. В результате удалось получить микрофотографии хромосом кабачка *C. pepo* subsp. *brevicaulis* var. *giraumons Duch* и отдаленного гибрида (селекционный образец №37) между кабачком сорта Корнишонный и твердокорой тыквой *C. pepo* subsp. *longicaulis* Greb. var. *pepo*, а также полученных из них удвоенных гаплоидов. Несмотря на достаточно мелкие размеры (около 2 мкм), хромосомы на полученных микрофотографиях достаточно четко видны. Практически все проанализированные растения-регенеранты, успешно прошедшие этап адаптации к условиям *in vivo*, оказались удвоенными гаплоидами $2n = 40$ и в последующем успешно завязали семена при самоопылении. Около 20% из проанализированных растений R_0 были миксогаплоидами, предположительно гаплоидных растений было 7%.

Ключевые слова: кабачок (*Cucurbita pepo* L.), DH-растения, хромосомный анализ, культура неопыленных семяпочек *in vitro*, гиногенез, гаплоиды кабачка, цитологическая оценка, пропионно-лактоидный метод анализа хромосом.

Для цитирования: Домблдес Е.А., Кан Л.Ю., Химич Г.А., Коротцева И.Б., Домблдес А.С. ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ КАБАЧКА (*CUCURBITA PEPO* L.). Овощи России. 2018;(6):3-7. DOI:10.18619/2072-9146-2018-6-3-7

Введение

Кабачок относится к виду *C. pepo*, который отличается огромным многообразием форм. В связи с большой амплитудой изменчивости, присущей виду, Дюшен называл его *Cucurbita polymorpha*. Н.И. Вавилов отдавал пальму первенства этому виду, сравнивая его со всеми изученными видами диких и культурных растений, за макроскопичность варьирующих признаков. Он отмечал, что «...в пределах *C. pepo* L. мы имеем формы, легко скрещивающиеся между собой и в тоже время отличающиеся примерно в 1000 раз по

147 new forms were obtained only from nine responsive unpollinated ovules of summer squash in 2015-2017. The cytological analysis is used to estimate the level of ploidy in regenerated plants R_0 . The small size of mitotic chromosomes and large number in *Cucurbita* genus make it difficult to count them even though they are well separated. As a result of analysis the optimal method of chromosome staining has been chosen with the use of modified propiono-lactoid cytological technique. The rootlet tips and apical meristems were used to make smear preparations. As it was shown the summer squash was a difficult species as a cytological object because of low mitosis frequency and low number of metaphase plates with well scattered chromosomes. The photos of chromosomes in squash *C. pepo* subsp. *brevicaulis* var. *giraumons Duch*; distant hybrid (breeding accession N37) between variety 'Cornishon' and winter squash *C. pepo* subsp. *longicaulis* Greb. var. *pepo* and doubled haploid plants produced from them were made. In spite of the small size 2 μ m the chromosomes observed were clearly seen. Nearly all regenerated plants that had been analyzed passed well the adaptation *in vivo* and occurred to be a doubled haploids ($2n = 2x=40$). The seed progeny was then obtained through self-pollination. About 20% of plants R_0 analyzed were mixploids and supposedly only 7% were haploids.

Keywords: summer squash (*Cucurbita pepo* L.), DH-plants, chromosome analysis, culture of unpollinated ovules *in vitro*, gynogenesis, haploids of summer squash, cytological assessment, propiono-lactoid chromosome analysis

For citation: Dombldes E.A., Kan L.Yu., Khimich G.A., Korotseva I.B., Dombldes A.S. CYTOLOGICAL ASSESSMENT OF DOUBLED HAPLOIDS IN SUMMER SQUASH (*CUCURBITA PEPO* L.). Vegetable crops of Russia. 2018;(6):3-7. (In Russ.) DOI:10.18619/2072-9146-2018-6-3-7

весу плодов. Плоды некоторых декоративных тыкв не превышают размеров куриного яйца, и даже меньше, тогда как при тех же условиях можно вырастить формы *C. pepo* до 3 пудов весом. Трудно представить себе большее разнообразие форм, окрасок, вегетативных признаков, формы плода.» (Вавилов, 1925). В связи с этим, получение удвоенных гаплоидов у этой культуры весьма актуально не только по причине ускорения селекционного процесса, но и за счет реализации значительного потенциала гаметоклональной изменчивости, заложенной у этого вида.

В России исследования по получению удвоенных гаплоидов тыквенных культур в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦО (ранее ВНИИССОК) ведутся с 2008 года и уже достигнуты определенные успехи (Suprunova, Shmykova, 2008; Шмыкова, Супрунова, 2009; Шмыкова и др., 2011; Шмыкова и др., 2015; Домблидес и др., 2016; Domblides et al., 2017). Необходимо для определения пloidности проводить цитологический анализ полученных в культуре неопыленных семязпочек растений-регенерантов. Однако на этом этапе исследователи встречаются с определенными затруднениями. Хромосомы растений семейства Cucurbitaceae отличаются исключительно мелкими размерами, что затрудняет их подсчет. Еще в 1925 году Н.И. Вавилов в своей работе «О междуродовых гибридах дынь, арбузов и тыкв», опираясь на сведения, предоставленные профессором Левитским Г.А., описал кариотипы основных тыквенных культур, где для *C. pepo* количество хромосом варьировало от 40–42 до 44–46 (Вавилов, 1925) (рис.1). Малый размер митотических хромосом и их относительно большое количество в роде *Cucurbita* делает трудным их точный подсчет, даже несмотря на то, что они, как правило, хорошо разделены. Долгое время существовали разногласия между исследователями в количестве хромосом у различных представителей этого рода. Whitaker в 1933 году опубликовал работу, в которой привел данные кариотипического анализа материнских клеток микроспор 12 видов семейства Cucurbitaceae. Для *C. pepo* var. *orange gourd* гаплоидный набор хромосом был определен $n = 20$, и была представлена иллюстрация, где хромосомы были зарисованы в виде точек (Whitaker, 1933) (рис.2). Позже Whitaker and Davis (1962), Varghese (1973), Jeffrey (1980), Metwally et al. (1996) сообщили, что несмотря на то, что о цитологии рода *Cucurbita* мало известно, поскольку его цитологические исследования крайне затруднительны, все виды имеют диплоидный набор хромосом $2n = 40$. Для огурца *Cucumis sativus*, относящегося к другому роду семейства Cucurbitaceae и имеющему практически в три раза меньше набор хромосом ($2n = 14$), проводились исследования по кариотипическому анализу с использованием C- banding технологии, где подробно описаны размеры и приведены особенности каждой пары митотических хромосом (Chen et al., 1998). Нам не встретилось качественных иллюстраций кариотипического анализа представителей рода *Cucurbita*. В большинстве случаев на опубликованных фото были представлены сгустки хроматина в виде точек в клетке.

В связи с описанными выше трудностями большинство исследователей предпочитают использовать для определения пloidности растений метод проточной цитометрии либо косвенные методы (подсчет числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц, размер устьиц, количество устьиц на 1 мм²) (Kurtar ES, Balkaya A., 2010).

Цель этого исследования заключалась в цитологической оценке растений-регенерантов кабачка *Cucurbita pepo* L., полученных в культуре неопыленных семязпочек in vitro и подбор оптимальной методики окрашивания хромосом.

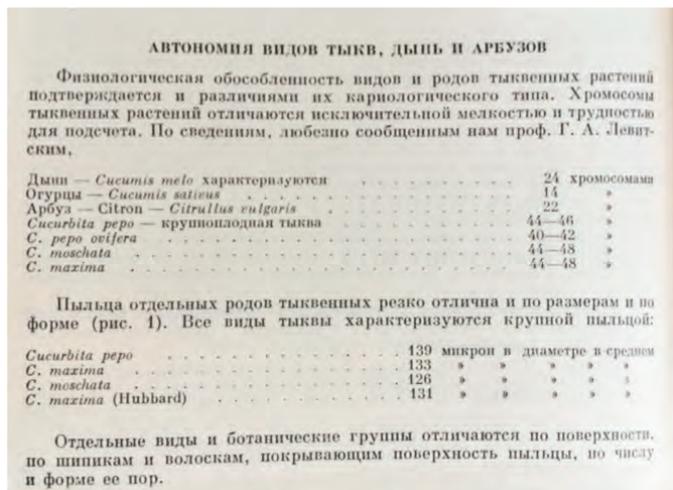


Рис. 1. Фото из статьи Вавилова Н.И. «О междуродовых гибридах дынь, арбузов и тыкв», 1925. Fig.1. Photo from article of Vavilov N.I. 'Intergeneric hybrids of melons, watermelons and squashes', 1925.

Материалы и методы

Растительный материал и условия выращивания донорных растений

В работе использовали селекционные образцы кабачка из коллекции лаборатории тыквенных культур ФГБНУ ФНЦО. Донорные растения выращивали в 2015-2016 годах в Московской области в пленочных теплицах и в условиях открытого грунта.

Культура неопыленных семязпочек. Получение гиногенных растений кабачка проводили по методике, разработанной в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦО (ВНИИССОК) (Шмыкова и др., 2015).

Выращивание растений-регенерантов

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

Подсчет числа хромосом с использованием пропионо-лакмоидного метода

Цитологическое исследование проводили путем приготовления давленных препаратов меристемы стебля и кончиков корней растений, корешков проростков, используя модифицированный нами пропионо-лакмоидным метод (Соловьева, 1982) окрашивания хромосом (Домблидес и др., 2016).

Препараты просматривали с помощью микроскопа Zeiss Scope.A1, оснащенного камерой Digital Camera Power Shot G10 Canon. Обработку изображений проводили с помощью программы Axio Vision, версия 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany).

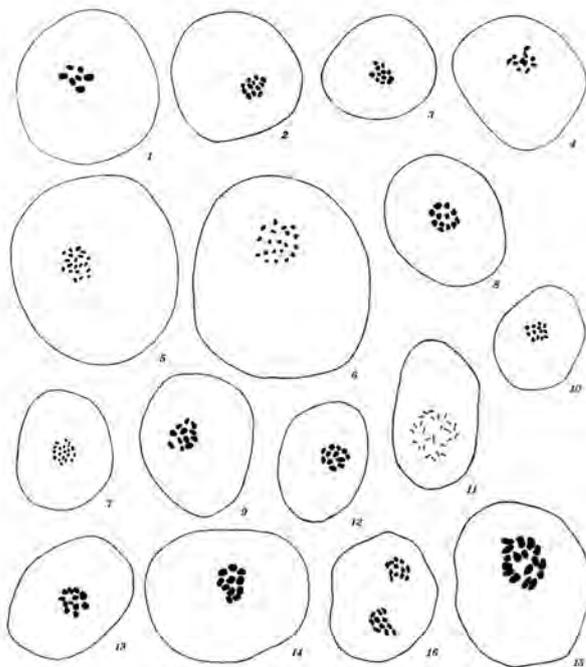


Рис. 2. Иллюстрация кариотипического анализа материнских клеток микроспор 12 видов семейства Cucurbitaceae (по Whitaker, 1933). Fig.2. Illustration of karyotype analysis of mother cells of microspore in 12 species of Cucurbitaceae (no Whitaker, 1933).

Результаты

В результате проведенной работы из 9 отозвавшихся в культуре неопыленных семяпочек образцов *C. pepo* в 2015-2017 годах было получено 147 новых генотипов, из которых при последующей регенерации развилось 346 растений-регенерантов. На этапе адаптации к условиям *in vivo* потери составили 25%. В дальнейшем потери наблюдались в связи с тем, что не всегда удавалось получить потомство от самоопыления у растений – регенерантов R₀ (Домблides и др., 2018). Причиной этого служили как физиологические особенности цветения этой культуры (неодновременное распускание мужских и женских цветков), так и нарушение пloidности полученных в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* растений. Проведение цитологической оценки у этой культуры представляло определенные трудности в связи с мелкими размерами хромосом. Поскольку в литературе мы не смогли найти оптимальной методики для окраски хромосом у этой культуры, то нами было апробировано несколько методик с использованием ацетокармина (Паушева, 1988) и флуоресцентного красителя 4',6-Диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорида (DAPI) (Пухальский и др., 2007). Оптимальной оказалась модернизированная нами методика окрашивания хромосом в меристемных клетках с использованием пропион-лакмоида, успешно применяемая при цитологическом анализе различных объектов овощных культур (Кан, 2008; Тимин и др., 2013). При приготовлении давленных препаратов использовали меристемы стебля и кончиков корней.

Кабачок оказался трудным в цитологическом плане объектом ввиду малой частоты митозов и небольшого числа метафаз с хорошим разбросом хромосом. В результате исследований удалось получить микрофотографии хромо-

сом кабачка *C. pepo* subsp. *brevicaulis* var. *giraumons* Duch и отдаленного гибрида (селекционный образец №37) между кабачком сорта Корнишонный и твердокорой тыквой *C. pepo* subsp. *longicaulis* Greb. var. *pepo*, а также полученных из них удвоенных гаплоидов (рис.3). Несмотря на достаточно мелкие размеры (около 2 мкм), хромосомы достаточно четко видны и отличаются от опубликованных другими авторами клеток, где за хромосомы принимаются темноокрашенные точки.

Практически все проанализированные растения-регенеранты, успешно прошедшие этап адаптации к условиям *in vivo*, оказались удвоенными гаплоидами $2n = 2x = 40$ и в последующем успешно завязали семена при самоопылении.

Около 20% из проанализированных растений R₀ оказались миксополидами, то есть в меристемах этих растений одновременно присутствовали диплоидные и полиплоидные клетки (рис.4).

Доля предположительно гаплоидных растений составляла 7% от общего числа полученных растений-регенерантов, однако получить качественные фото их хромосом нам не удалось. Достаточно часто такие растения образовывали бутоны, находясь еще в культуральных сосудах (рис. 5), они были более мелкого размера, плохо укоренялись и адаптировались к условиям *in vivo*. Трудность проведения цитологической оценки у этих растений также была связана с очень мелкими размерами клеток и самих растений-гаплоидов, а также малым количеством активно делящихся меристем. Кроме того, растения были ослабленными и при отщипывании для анализа кончиков корней и пазушных меристем часто погибали, в связи с чем невозможно было провести повторный анализ.

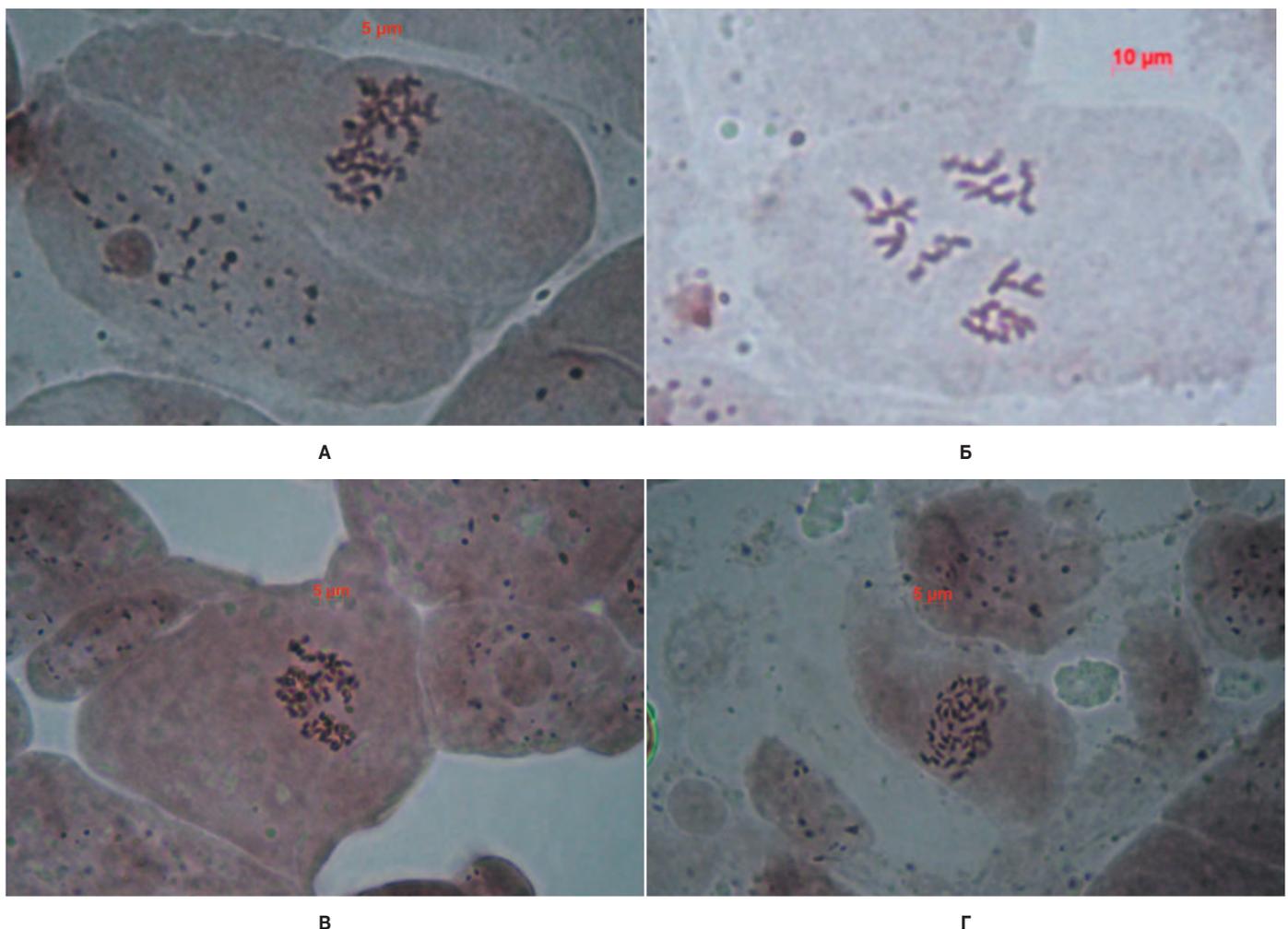


Рис. 3. Метафазы кабачка *C. pepo* subsp. *brevicaulis* var. *giraumons* Duch (А) и отдаленного гибрида (селекционный образец №37) между кабачком сорта Корнишонный и твердокорой тыквой *C. pepo* subsp. *pepo* var. *pepo* (В), а также полученных из них удвоенных гаплоидов (Г, Д).

Fig. 3. Metaphase plate of *C. pepo* subsp. *brevicaulis* var. *giraumons* Duch (A) and distant hybrid (breeding accession N37) between 'Comisony' and winter squash *C. pepo* subsp. *pepo* var. *pepo* (B) and produced from them doubled haploids (G, D).

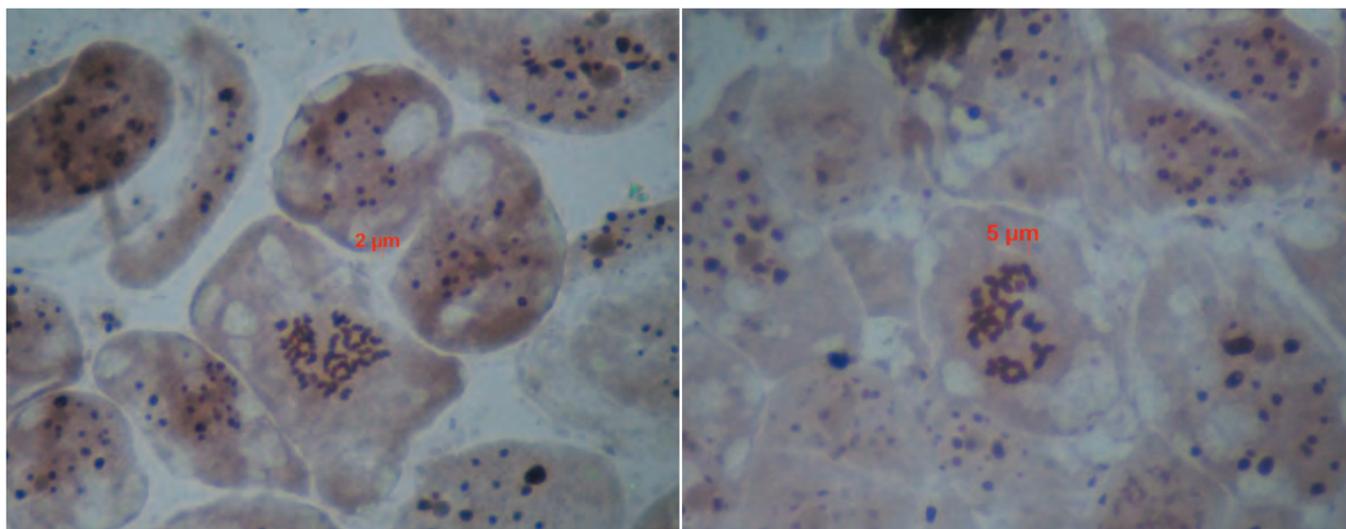


Рис.4. Метафазы в меристемах миксопloidных растений.
Fig.5. Metaphase plates in meristems of mixploid plants.



А



Б



В



Г

Рис.5. Внешний вид гаплоидного (А, Б) и DH-растения кабачка (В, Г), находящегося на одинаковых фазах развития.
Fig.5. Haploid plants (А, Б) and DH-plants of summer squash (В, Г) at same stages of development

В результате проведенной работы нами была подобрана оптимальная методика окрашивания хромосом кабачка с использованием пропионно-лактоидного метода. Проведенный цитологический анализ полученных растений регенерантов показал, что 7% из них были гаплоидными, около 20% из проанализированных растений R_0 оказались миксолоидами, а остальные были удвоенными гаплоидами ($2n = 2x = 40$).

Впервые были получены микрофотографии хромосом кабачка *C. pepo* subsp. *brevicaulis* var. *giraumons* Duch и его отдаленного гибрида с твердокорой тыквой *C. pepo* subsp. *longicaulis* Greb. var. *pepo*, а также полученных из них удвоенных гаплоидов.

● Литература

1. Вавилов Н.И. (1925) О межродовых гибридах дынь, арбузов и тыкв. Труды по прикладной ботанике и селекции. Т.14. Вып. 1. С.1-35.
2. Домблидес Е.А., Шмыкова Н.А., Заячковская Т.В., Химич Г.А., Коротцева И.Б., Кан Л.Ю., Домблидес А.С. Получение удвоенных гаплоидов в культуре неопыленных семязачек кабачка (*Cucurbita pepo* L.). В сборнике: Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты). Материалы VII Международной научно-практической конференции, посвященной 30-летию отдела биотехнологии растений Никитского ботанического сада. 2016. С.28-29.
3. Домблидес Е.А., Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Заячковская Т.В., Минейкина А.И., Козарь Е.В., Ахраменко В.А., Шевченко Л.Л., Кан Л.Ю., Бондарева Л.Л., Домблидес А.С. Технология получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор семейства капустные. ФГБНУ «Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур». Москва, 2016.
4. Домблидес Е.А., Шмыкова Н.А., Химич Г.А., Коротцева И.Б., Домблидес А.С. ОБРАЗОВАНИЕ АНОМАЛЬНЫХ ЦВЕТКОВ В ПОТОМСТВЕ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ КАБАЧКА (*CUCURBITA PEPO* L.). Овощи России. 2018;(5):13-17. DOI:10.18619/2072-9146-2018-5-13-17
5. Кан Л.Ю. Цитологические исследования в селекционной работе на основе межвидовой гибридизации в роде *Allium* L. «Хромосомы и эволюция». Симпозиум памяти Г.А.Левитского. Санкт-Петербург, 2008. С.53-55.
6. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – Изд. 4-е, перераб. и доп. – Москва: Агропромиздат, 1988. 271 с.
7. Пухальский В.А., Соловьев А.А., Бадаева Е.Д., Юрцев В.Н. Практикум по цитологии и цитогенетике растений. М.: Изд-во "КолосС". 2007.
8. Соловьёва Л.В. Практикум по цитологии плодовых растений. – М.: Изд-во МГУ, 1982. – 54 с.
9. Тимин Н.И., Пышная О.Н., Агафонов А.Ф., Мамедов М.И., Титова И.В., Кан Л.Ю., Логунова В.В., Романов В.С., Шмыкова Н.А., Тимина Л.Т., Гуркина Л.К., Джос Е.А., Супрунова Т.П., Кривошеев С.М., Енгальчева И.А. Межвидовая гибридизация овощных растений (*Allium* L. – лук, *Daucus* L. – морковь, *Capsicum* L. – перец). Москва, 2013.
10. Шмыкова Н.А., Супрунова Т.П. Индукция гиногенеза в культуре *in vitro* неопыленных семязачек *Cucumis sativus* L. Гавриш. 2009. № 4. С.40-44.
11. Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Кушнерёва В.П., Химич Г.А. Индукция гиногенеза в культуре неопыленных семязачек тыквы. Овощи России. 2011. №1 (10). С.28-31.
12. Шмыкова Н.А., Химич Г.А., Коротцева И.Б., Домблидес Е.А. (2015) Перспективы получения удвоенных гаплоидов растений семейства *Cucurbitaceae*. Овощи России. 2015;(3-4):28-31 <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2015-3-4-28-31>
13. Chen, J., Staub, J. E., & Jiang, J. (1998). Genetic Resources and Crop Evolution, 45(4), 301–305. doi:10.1023/a:1008603608879
14. Dombliides E.A., Shmykova N.A., Shumilina D.V., Zayachkovskaya T.V., Vjurtts T.S., Kozar E.V., Kan L.Yu., Romanov V.S., Dombliides A.S., Pivovarov V.F., Soldatenko A.V. Biotechnological approaches for breeding programs in vegetable crops. Agrosym 2017. Book of proceedings. 2017. P.452-460.
15. Jeffrey C. (1980). A review of the *Cucurbitaceae*. Botanical Journal of the Linnean Society, 81(3), 233–247. doi:10.1111/j.1095-8339.1980.tb01676.
16. Kurtar E.S., Balkaya A. (2010) 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 Org Cult 102(3):267–277.
17. Metwally E.I., Haroun S.A., El-Fadly G.A. (1996) Interspecific cross between *Cucurbita pepo* L. and *Cucurbita martinii* through *in vitro* embryo culture. Euphytica 90: 1–7.
18. 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.
19. Varghese B.M. (1973) Studies on the cytology and evolution of south Indian *Cucurbitaceae*. Ph.D. Thesis Kerala Univ., India.
20. Whitaker, T.W. (1933). Cytological and Phylogenetic Studies in the *Cucurbitaceae*. Botanical Gazette, 94(4), 780–790. doi:10.1086/334347
21. Whitaker T.W., Davis G.N. (1962) Cucurbits. Interscience Pub., Inc., New York.

● References

1. Vavilov N.I. Intergeneric hybrids of melons, watermelons and squashes. Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. V.14 (1). P.1-35.
2. Dombliides E.A., Shmykova N.A., Zayachkovskaya T.V., Khimich G.A., Korotseva I.B., Kan L.Y. and Dombliides A.S. Doubled haploid plant production from *in vitro* culture of unpollinated ovules of summer squash (*Cucurbita pepo* L.). Proceedings of the VII International Scientific and Practical Conference «Biotechnology as an Instrument for Plant Biodiversity Conservation (physiological, biochemical, embryological, genetic and legal aspects)», devoted to the 30th anniversary of Biotechnology Department in Nikita Botanical Gardens Yalta, Crimea, Russia September, 25 October, 01, 2016. *Simferopol: PP «ARIAL»*, 2016. 352 p.
3. Dombliides E.A., Shmykova N.A., Shumilina D.V., Zayachkovskaya T.V., Mineykina A.I., Kozar E.V., Akhramenko V.A., Shevchenko L.L., Kan L.Yu., Bondareva L.L., Dombliides A.S. Technology of doubled haploid plant production through isolated microspore cultivation in *Brassicaceae* family. Federal State Budgetary Scientific Research Institution «All-Russian Scientific Research Institute of vegetable breeding and seed production», Moscow, 2016 (In Russ.).
4. Dombliides E.A., Shmykova N.A., Khimich G.A., Korotseva I.B., Dombliides A.S. DEVELOPMENT OF ABNORMAL FLOWERS IN GENERATION OF DOUBLED HAPLOIDS OF SUMMER SQUASH (*CUCURBITA PEPO* L.). Vegetable crops of Russia. 2018;(5):13-17. (In Russ.) DOI:10.18619/2072-9146-2018-5-13-17
5. Kan L.Yu. Cytological studies in breeding work based on interspecific hybridization in the *Allium* genus. "Chromosomes and evolution". Symposium in memory of G.A. Levitsky. St. Petersburg, 2008. P.53-55.
6. Pausheva Z.P. Laboratory manual on plant cytology / Z.P. Pausheva. Ed. 4th, pererabot. and add. Moscow: Agropromizdat, 1988. 271 p.
7. Puhalsky V.A., Soloviev A.A., Badaeva E.D., Yurtsev V.N. Workshop on cytology and plant cytogenetics. M.: Publishing house "Kolos-s". 2007.
8. Solovyova L.V. Laboratory manual on the fruit plant cytology. M.: Publishing House of Moscow State University, 1982. 54 p.
9. Timin N.I., Pyshnaya O.N., Agafonov A.F., Mamedov M.I., Titova I.V., Kan L.Yu., Logunova V.V., Romanov V.S., Shmykova N.A., Timina L.T., Gurkina L.K., Suprunova T.P., Krivosheev S.M., Engalycheva I.A. Interspecific hybridization in onion (*Allium* L.), carrot (*Daucus* L.), and pepper (*Capsicum* L.). Moscow, 2013.
10. Shmykova N.A., Suprunova T.P. (2009) An induction gynogenesis in culture *in vitro* not-pollinated seedbuds of *Cucumis sativus* L. Gavrish, 2009, 4: 40-44.
11. Shmykova N.A., Shumilina D.V., Kushnerova V.P., Khimich G.A. Gynogenesis induction in culture of unpollinated ovules of pumpkin. Vegetable crops of Russia. 2011. №1 (10). P.28-31. (In Russ.)
12. Shmykova N.A., Khimich G.A., Korotseva I.B., Dombliides E.A. Prospective of development of doubled haploid plants of *Cucurbitaceae* family. Vegetable crops of Russia. 2015;(3-4):28-31. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2015-3-4-28-31>
13. Chen, J., Staub, J. E., & Jiang, J. (1998). Genetic Resources and Crop Evolution, 45(4), 301–305. doi:10.1023/a:1008603608879
14. Dombliides E.A., Shmykova N.A., Shumilina D.V., Zayachkovskaya T.V., Vjurtts T.S., Kozar E.V., Kan L.Yu., Romanov V.S., Dombliides A.S., Pivovarov V.F., Soldatenko A.V. Biotechnological approaches for breeding programs in vegetable crops. Agrosym 2017. Book of proceedings. 2017. P.452-460.
15. Jeffrey C. (1980). A review of the *Cucurbitaceae*. Botanical Journal of the Linnean Society, 81(3), 233–247. doi:10.1111/j.1095-8339.1980.tb01676.
16. Kurtar E.S., Balkaya A. (2010) 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 Org Cult 102(3):267–277.
17. Metwally E.I., Haroun S.A., El-Fadly G.A. (1996) Interspecific cross between *Cucurbita pepo* L. and *Cucurbita martinii* through *in vitro* embryo culture. Euphytica 90: 1–7
18. 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.
19. Varghese B.M. (1973) Studies on the cytology and evolution of south Indian *Cucurbitaceae*. Ph.D. Thesis Kerala Univ., India.
20. Whitaker, T.W. (1933). Cytological and Phylogenetic Studies in the *Cucurbitaceae*. Botanical Gazette, 94(4), 780–790. doi:10.1086/334347
21. Whitaker T.W., Davis G.N. (1962) Cucurbits. Interscience Pub., Inc., New York.