На правах рукописи

ОСМИНИНА ЕКАТЕРИНА ВАСИЛЬЕВНА

СОЗДАНИЕ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ ПАРТЕНОКАРПИЧЕСКОГО ОГУРЦА С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И КЛАССИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

4.1.2 Селекция, семеноводство и биотехнология растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Москва – 2024

Работа выполнена в кафедре ботаники, селекции и семеноводства садовых растений Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Научный руководитель	Монахос Сократ Григорьевич, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, заведующий кафедрой ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»
Официальные оппоненты:	Пышная Ольга Николаевна, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, главный научный сотрудник, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства»
	Курина Анастасия Борисовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, и.о. зав. лабораторией селекции и клеточных технологий ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова»
Ведущая организация	ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

Защита состоится «26 декабря» в 14:00 на заседании диссертационного совета 35.2.030.08, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет–МСХА имени К.А. Тимирязева», по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19, тел: 8 (499) 976-17-14.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте Университета www.timacad.ru.

Автореферат разослан «___»_____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор сельскохозяйственных наук _____ Е.А. Вертикова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Гетерозисные гибриды, активно использующиеся в современной практике сельского хозяйства, отличаются высокой скороспелостью, дружным созреванием, улучшенной регулярностью формирования товарной продукции и высокой урожайностью (Gałązka J., Niemirowicz-Szczytt K., 2013). Одним из биотехнологических методов, способствующих существенному сокращению времени на создание чистых линий, является технология создания удвоенных гаплоидов (DH). (Dong Y.Q. et al., 2016, Домблидес Е.А., 2019). DH-технологии также находят широкое применение в фундаментальных исследованиях (Murovec and Bohanec 2011, Dong et al., 2016). Существующие опубликованные протоколы производства удвоенных гаплоидов огурца путем гиногенеза требуют дополнительной модификации и оптимизации для возможности использования технологии создания удвоенных гаплоидов в рутинном производстве коммерческих F1-гибридов (Shalaby T.A., 2007; Li J.W. et al., 2013).

Интенсификация селекционного процесса может быть достигнута за счет использования гиноцийных линий с сильным проявлением женского пола в двухлинейной схеме создания F1-гибридов партенокарпического огурца на базе моноцийных линий (Шамшина А. В., 2004, Коротцева И. Б., Кочеткова Л. А., 2018). Следовательно, возникает необходимость в оценке материнских линий партенокарпического огурца на женский тип цветения и выявление линий, обладающих сильными аллелями гена *F* (Пыженков В.И., 1981), для упрощения селекционного процесса и гибридного семеноводства.

Пероноспороз – заболевание, приводящее к значительному снижению урожайности у огурца, является одним из наиболее распространенных. Создание F1-гибридов, высоко устойчивых к данному заболеванию, осложняется полигенным характером наследования. К настоящему времени большая часть F1-гибридов и сортов являются неустойчивыми к ложной мучнистой росе (Коротцева И. Б., 2020). При этом существующие F1-гибриды, обладающие устойчивостью к пероноспорозу, в основном являются пчелоопыляемыми. Таким образом, возникает необходимость в создании партенокарпических F1-гибридов огурца, обладающих высокой устойчивостью к ложной мучнистой росе.

Актуальность темы исследования и ее разработанность. Многочисленные исследования, посвященные анализу процесса гиногенеза, были проведены несколькими научными группами (Gemes-Juhasz et al., 1997, Diao et al., 2009, Moqbeli E. et al., 2013, Li J. W. et al., 2013, Tantasawat P. A. et

al., 2015, Golabadi M. et al., 2017, Домблидес Е.А. и др., 2019, Deng Y. et al., 2020). Несмотря на обширные исследования в этой области, эффективность протоколов до сих пор остается недостаточной. Изучение технологии создания удвоенных гаплоидов огурца путем гиногенеза является необходимым для повышения частоты эмбриогенеза.

Согласно многочисленным исследованиям, наследование пола у огурца контролируется взаимодействием 2 основных генов: *F*, *M*. Пыженков В.И. (1981) впервые предположил наличие множественного аллелизма гена *F*, контролирующего при взаимодействии с геном *M* проявление женского пола. Оценка материнских линий на женский тип цветения по силе аллелей гена *F* позволяет выявить линии с сильной выраженностью женского пола с целью дальнейшего их использования в двухлинейной схеме создания F1-гибридов огурца.

Ложная мучнистая роса (пероноспороз) является наиболее вредоносным заболеванием огурца в условиях открытого грунта и в теплицах в осеннем культурообороте. В результате поражения возбудителем снижение урожайности у огурца может достигать более 40 % (Черненко В.Л. и др., 2014, Тимошенко Н.Н., 2016). В настоящее время большинство сортов и гибридов огурца демонстрируют недостаточную устойчивость к ложной мучнистой росе. Это обусловливает необходимость активного поиска источников устойчивости к пероноспорозу для создания новых коммерческих F1-гибридов.

Цель исследования: изучение факторов, влияющих на частоту эбмриогенеза технологии создания удвоенных гаплоидов при помощи гиногенеза, оценить гиноцийные линии партенокарпического огурца по аллельному составу гена *F*, оценить гибридные комбинации по устойчивости к ложной мучнистой росе.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Изучить влияние типа экспланта на частоту эмбриогенеза в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца;
2. Изучить влияние стадии развития экспланта на частоту эмбриогенеза в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца;
3. Изучить влияние компонентов индукционной питательной среды: гидролизата казеина (250 мг/л, 500 мг/л), сахара (глюкоза 3 %), глутатиона (10 мг/л), сочетания регуляторов роста TDZ и 2,4-D на частоту эмбриогенеза в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца;

4. Изучить генетическую коллекцию линий партенокарпического огурца по степени проявления гиноцийности, дифференцировать линии по аллелям гена F;

5. Оценить комбинационную способность гиноцийных линий партенокарпического огурца, содержащих «сильные» алелли гена *F*, по основным хозяйственно-ценным признакам;

6. Изучить устойчивость новых гибридных комбинаций партенокарпического огурца к ложной мучнистой росе, выделить перспективные с комплексом экономически значимых признаков.

Научная новизна. Впервые установлено, что замена 3 % сахарозы в индукционной питательной среде MS на 3 % глюкозу значимо повышает частоту эмбриогенеза в 5-6 раз у образцов огурца с низкой эмбриогенной способностью.

Впервые показано, что изоляция и инокуляция на индукционную питательную среду MS экспланта из завязи отобранной в стадии полураскрытого цветка значимо более, чем в 2 раза, повышает частоту эмбриогенеза в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей у образцов огурца, отличающихся низкой эмбриогенной способностью.

Впервые выявлено, что использование антиоксиданта глутатиона в концентрации 10 мг/л в индукционной питательной среде повышает частоту формирования эмбриоидов в 1,5-2 раза в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца.

Впервые установлено, что добавление гидролизата казеина в индукционную питательную среду в концентрации 250 мг/л повышает частоту эмбриогенеза в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца более, чем в 2 раза (с 10,9 до 26,8 эмбр./завязь) у не менее чем половины образцов.

Впервые выявлено, что добавление в индукционную питательную среду регуляторов роста TDZ и 2,4-D (концентрация 0,04 и 0,15 мг/л соответственно) повышает частоту формирования эмбриоидов в 1,5-2,0 раза в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца.

Впервые показано, что дифференциация материнских гиноцийных линий по аллельному состоянию гена F при анализе гибридных комбинаций, полученных от скрещивания гиноцийной линии с моноцийной, позволяет выявить линии с высокой выраженностью женского пола для создания F1-гибридов огурца.

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате изучения влияния типа экспланта на эффективность технологии создания

удвоенных гаплоидов на основе гиногенеза отмечено, что использование в качестве экспланта поперечных фрагментов завязи приводит к формированию эмбриоидов и морфогенных структур, тогда как использование в качестве экспланта изолированных семязачатков способствует гиногенному развитию семязачатков, но не приводит к формированию морфогенных структур и дальнейшей регенерации в культуре изолированных семязачатков огурца. При этом установлено, что использование в качестве экспланта завязи, отобранной во время цветения, повышает частоту формирования эмбриоидов более, чем в 2 раза в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца у образцов, отличающихся низкой эмбриогенной способностью

Установленный положительный эффект на частоту индукции гиногенеза варьированием компонентами индукционной питательной среды MS, в частности добавлением глюкозы (3 %), антиоксиданта глутатиона (10 мг/л), органического компонента гидролизата казеина (250 мг/л), регуляторов роста TDZ и 2,4-D (0,04 и 0,15 мг/л соответственно), отрицательный эффект при добавлении ингибитора этилена путресцина демонстрируют возможность существенного влияния отдельных компонентов питательной среды и их совокупности на индукцию эмбриогенеза, свидетельствует о необходимости изучения и поиска оптимального состава питательной среды для использования в рутинном производстве линий удвоенных гаплоидов огурца.

Выявленная миксоплоидность тканей, культивируемых *in vitro* растений-регенерантов огурца, с эквивалентным содержанием 2n и 4n клеток, может свидетельствовать об агрессивном воздействии компонентов среды на ткани огурца, приводящему к нарушению деления клеток и полиплоидизации.

Выявленные и продемонстрированные возможности надежной дифференциации гиноцийных линий по «силе» аллелей гена F, определяющего женский тип цветения, на основе гибридологического анализа при с использованием в качестве тестера моноцийной линии, позволяет использовать данный инструмент в практической селекции. Линии, обладающие сильными аллелями гена F Руб6, S20-1(II)бн, Кибр2-6, Руб3, Мадр1-639 могут быть использованы в качестве материнского компонента в практических селекционных программах по созданию партенокарпических F1-гибридов огурца.

Из 7 новых перспективных гибридных комбинаций Руб6 х Феникс1, (Пасхц)3х1)05 х РубМ, Сф1 х РубМ, Пас2-1111(18)18 х РубМ, Z1(II)6 х РубМ, В1(II)1 х РубМ, Бейок1-8 х Феникс1 рекомендованных для станционного испытания в результате изучения комплекса хозяйственно-ценных признаков, будут отобраны кандидаты для передачи на Государственное сортоиспытание;

вместе с этим выделены генотипы, гибридные комбинации Z1(II)бн2-1 х Феникс1, Бейок1-8 х Феникс1, Зел 1-64 х Феникс1 и Сф1 х Феникс1, сочетающие высокую продуктивность и высокую устойчивость к пероноспорозу, и представляющие ценный материал для создания инбредных линий.

Установлена реализуемость создания высокопродуктивных и высокоустойчивых к пероноспорозу F1-гибридов партенокарпического огурца вследствие отсутствия зависимости в проявлении эффектов ОКС линий огурца по признакам общая продуктивность и устойчивость к пероноспорозу (r = 0,05). При этом выделены две родительские линии Руб6 и (Пасхц)3х1)05 лучшие по совокупности проявления признака женский тип цветения, высоких и средних эффектов ОКС по общей продуктивности, масса плодов, число плодов, имеющие наибольшие значения эффектов ОКС по баллу поражения пероноспорозом.

Методология и методы исследования. Теоретические исследования основаны на аналитическом обобщении опубликованных научных исследований. Экспериментальные исследования проведены с использованием стандартных и частных методик и последующей статистической обработкой данных. Полностью методология описана в главе «Материалы и методы».

Положения, выносимые на защиту:

1. Добавление в индукционную питательную среду MS гидролизата казеина (250 мг/л), глутатиона (10 мг/л), регуляторов роста TDZ и 2,4-D (0,04 и 0,15 мг/л соответственно) достоверно повышает частоту формирования эмбриоидов в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца.

2. Замена 3 % сахарозы в индукционной питательной среде MS на 3 % глюкозу и использование завязей, отобранных во время цветения в стадии полураскрытого цветка для изоляции эксплантa, значимо повышает частоту эмбриогенеза в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей у образцов огурца с низкой эмбриогенной способностью.

3. Оценка проявления женского типа цветения потомств линий партенокарпического огурца при скрещивании с моноцийными линиями позволяет дифференцировать линии по аллельному состоянию гена F и выявить линии с аллелями, обеспечивающими высокую степень гиноцийности.

4. Создание высокопродуктивных и высокоустойчивых к пероноспорозу F1-гибридов партенокарпического огурца реализуемо вследствие отсутствия генетической зависимости в проявлении эффектов ОКС

линий огурца по признакам общая продуктивность и устойчивость к пероноспорозу.

Степень достоверности и апробация результатов исследований. Достоверность исследований подтверждается обширными экспериментальными исследованиями, выбором необходимого количества повторностей и объема выборки при закладке опытов, а также статистической обработкой полученных экспериментальных данных.

Апробация результатов. Основные положения диссертационной работы доложены, обсуждены и одобрены на: Международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 135-летию со дня рождения А.Н. Костякова (г. Москва, 2022); XXII Всероссийской международной конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева (г. Москва, 2022); Международной научной конференции «Проблемы селекции – 2022» (г. Москва, 2022).

Публикация результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано пять печатных работ, в том числе две в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Личный вклад соискателя. Результаты экспериментальных исследований получены соискателем лично. Соискателю принадлежат разработка программы исследования и проведение экспериментов, теоретическое обобщение полученных результатов.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 125 страницах и состоит из введения, 3 глав, включая обзор литературы, условия, материалы и методику проведения исследований, анализ результатов исследований, выводов, рекомендаций производству, списка использованной литературы, приложения. Библиографический список включает 142 наименования, в том числе 98 на иностранном языке. Работа иллюстрирована 23 таблицами и 16 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Место выполнения исследования. Работа выполнена в 2021-2024 годах на кафедре ботаники, селекции и семеноводства садовых растений и в лаборатории генетики, селекции и биотехнологии овощных культур ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Изучение влияния факторов индукции гиногенеза огурца

Растительный материал. В качестве растительного материала (растений-доноров изолированных семязачатков) использовали 12 образцов

огурца: 8 коммерческих F1-гибридов и 1 линию, 3 селекционные гибридные комбинации, предоставленных ООО «Селекционная станции имени Н.Н. Тимофеева».

Условия выращивания растений-доноров изолированных семязачатков. Растения-доноры, используемые для культуры изолированных семязачатков и культуры фрагментов завязей *in vitro*, выращивали в условиях защищенного грунта. Посев производили в несколько сроков: вторая-третья декада апреля и третья декада июля. Через 30 суток в фазе 3-4 настоящих листьев растения высаживали в пленочную теплицу с естественным освещением.

Культура изолированных семязачатков, культура семязачатков в составе фрагментов завязей. Инокулирование и культивирование изолированных семязачатков и семязачатков в составе фрагментов завязей проводили согласно методикам Домблидес Е.А., 2019 и Diao, W. P., 2009 с модификациями.

Для изучения факторов, влияющих на частоту эмбриогенеза в культуре изолированных семязачатков и семязачатков в составе фрагментов завязей проведена серия опытов. Опыты закладывали не менее, чем в 5-кратной повторности.

1. Изучение влияния типа эксплантa проводили с использованием 2 образцов огурца. Культивирование изолированных семязачатков и семязачатков в составе фрагментов завязей проводили согласно методике Домблидес Е.А. (2019) и Diao W. P. (2009) с модификациями.
2. Изучение влияния стадии развития эксплантa проводили с использованием 4 образцов огурца. Культивирование семязачатков проводили согласно методике Diao, W. P. (2009) с модификациями. Влияние стадии развития завязи на частоту эмбриогенеза изучали при изоляции: завязей во время цветения в стадии полураскрытого цветка; контроль - завязь за сутки до раскрытия цветка в фазе ярко-окрашенного венчика.
3. Изучение компонентов индукционной питательной среды проводили с использованием 9 образцов огурца. Культивирование семязачатков проводили согласно методике Diao, W. P. (2009) с модификациями. Влияние компонентов индукционной питательной среды на частоту эмбриогенеза изучали при добавлении: MS + 250 мг/л, 500 мг/л гидролизата казеина; MS + 3 % глюкоза; MS +Глутатион 10 мг/л; MS + Сочетание регуляторов роста TDZ 0,04 мг/л, 2,4-D 0,15 мг/л; MS + Путресцин 0,5 мг/л. Контроль MS + 3 % сахароза, 0,8 % агар, 0,04 мг/л TDZ, 10 мг/л нитрат серебра.

Оценку частоты эмбриогенеза осуществляли через 30 суток после инокулирования на питательную среду. Частоту эмбриогенеза определяли, как число сформированных эмбриоидов на завязь.

Оценку уровня плоидности полученных растений-регенерантов проводили до адаптации растений к нестерильным условиям, в культуре *in vitro* с использованием проточного цитометра.

Оценка генетической коллекции линий огурца по степени проявления гиноцийности по «силе» аллелей гена *F*. Для оценки генетической коллекции огурца с различным проявлением выраженности женского пола по силе аллелей гена *F* проводили скрещивание по методу топкросс 23 гиноцийных материнских линий с отцовскими образцами-тестерами линией Феникс1 и линией РубМ и получали гибридные потомства.

Гибридные комбинации оценивали на проявление женского пола в условиях открытого и защищенного грунта. Для оценки аллельного состояния гена *F* определяли среднее количество узлов с мужскими цветками для каждой гибридной комбинации, ранжировали гибридные комбинации по числу узлов с мужскими цветками и определяли аллели гена *F* материнских гиноцийных линий.

Изучение устойчивости новых гибридных комбинаций партенокарпического огурца к ложной мучнистой росе. Для оценки устойчивости к пероноспорозу использовали гибридные комбинации, полученные при скрещивании 23 гиноцийных линий с линией Феникс1, устойчивой к ложной мучнистой росе. Полученные гибридные комбинации оценивали по устойчивости к пероноспорозу в открытом грунте на естественном инфекционном фоне в 2023-2024 гг. Посев гибридных комбинаций осуществляли в первой декаде июля в 2023 году, в 2024 – в конце третьей декады июня. Опыт заложили рандомизированным методом по 8 растений в двухкратной повторности в 2023 году, в трехкратной повторности в 2024 году.

Оценку гибридных комбинаций на устойчивость к ложной мучнистой росе проводили по 10-балльной шкале, выраженной в процентной доле поражения поверхности листа от его общей площади (S.F. Jenkins и T.C. Wehner, 1983).

Статистическая обработка. Оценку существенности различий влияния факторов на частоту эмбриогенеза в культуре *in vitro* провели с помощью теста Манна-Уитни на 5 %-ом уровне значимости ($P<0,05$). Оценку существенности различий частоты эмбриогенеза между изучаемыми образцами огурца, гибридными комбинациями и вариантами по ОКС по хозяйственно-ценным

признакам проводили при помощи однофакторного дисперсионного анализа. Расчет ОКС в системе топкросс проводили по (Бунин и др., 2011).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение влияния различных факторов на частоту индукции гиногенеза

Изучение влияния типа эксплантa на частоту индукции гиногенеза. При культивировании изолированных семязачатков огурца согласно методике Домблидес Е.А. (2019) на питательной среде IMC отметили формирование видимых структур, что соответствует сформированному эмбриоиду согласно данным Deng Y. (2020). Через 2 месяца культивирования на питательной среде отмечали некроз тканей семязачатков у всех образцов. При культивировании семязачатков в составе поперечных фрагментов завязей по методике Diao, W. P., 2009 формирование эмбриоидов наблюдали через 1 неделю после инокуляции на твердую питательную среду MS (Murashige T., Skoog F., 1962). Неотзывчивые образцы не формировали эмбриоиды (рис 1А, 1Б). Через 30-90 суток от начала культивирования в зависимости от образца наблюдали развитие каллусной ткани, морфогенных структур и органов из эмбриоидов (рис. 1Г, 1Д, 1Е). Через 100-120 суток от начала культивирования наблюдали формирование листьев и побегов с короткими междоузлиями. Полученные растения-регенеранты укореняли в торфяном субстрате и адаптировали. Анализ уровня плоидности культивируемых растений-регенерантов показал, что полученные растения являются миксоплоидами.

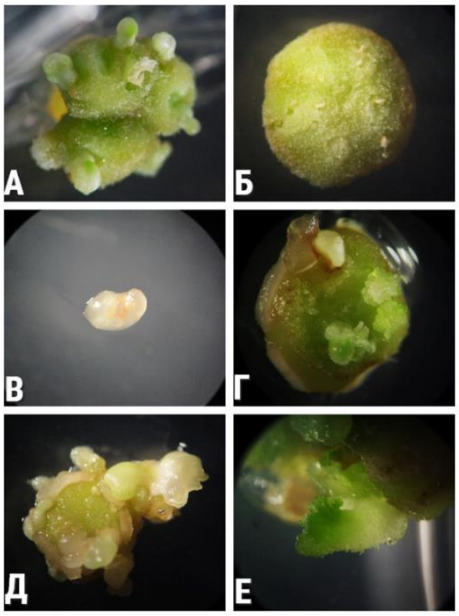

Рисунок 1 – Вариации гиногенного развития в культуре фрагментов огурца: А) Сформированные эмбриоиды на поверхности поперечного среза завязи огурца; Б) Диск завязи с неотзывчивыми семязачатками; В) Эмбриоид, спонтанно отделившийся от диска завязи; Г) Морфогенные структуры, сформированные из эмбриоидов; Д) Органогенный каллус и органогенез; Е) Прямое прорастание эмбриоидов

Изучение влияния генотипа донорного растения на частоту эмбриогенеза в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца. В результате оценки влияния генотипа на отзывчивость в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца было отмечено, что все исследуемые образцы являются отзывчивыми. В группу высокотзывчивых

выделен 1 из 10 образцов (10%), в группу среднеотзывчивых – 4 из 10 (40 %), остальные 5 из 10 образцов (50%) - в группу низкоотзывчивых.

Изучение влияния гидролизата казеина на частоту эмбриогенеза в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца. При культивировании фрагментов завязей на индукционной питательной среде, дополненной 500 мг/л гидролизата казеина, не наблюдали значимых различий на 5 %-ном уровне значимости по частоте эмбриогенеза по сравнению с питательной средой без гидролизата казеина у всех генотипов за исключением № 26. При культивировании поперечных фрагментов завязей на питательной среде, дополненной 250 мг/л гидролизата казеина отмечали статистически достоверное повышение частоты эмбриогенеза у 2 образцов из 6 (F1 Спринт, № 21) по сравнению с эксплантами, культивируемыми на питательной среде без добавления гидролизата казеина (контроль).

Изучение влияния сахаров в индукционной питательной среде на частоту эмбриогенеза. При изучении влияния сахаров на частоту эмбриогенеза было отмечено значимое повышение (более, чем в 5 раз) среднего числа эмбриоидов при использовании в качестве источника

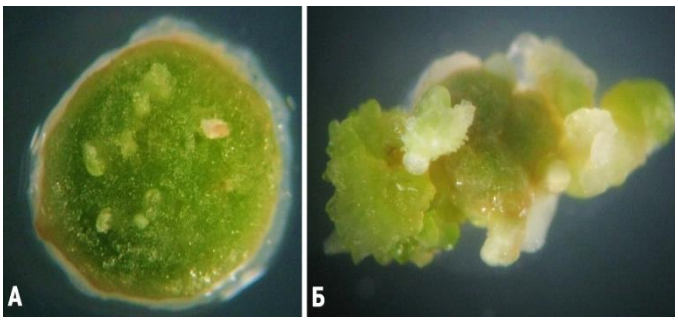

Рисунок 2 – Эмбриогенез в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца на индукционной питательной среде MS (образец F1 Лист): А) с добавлением сахарозы 3 %; Б) с добавлением 3 % глюкозы

углеводов 3 %-ной глюкозы у 2 низкоотзывчивых образцов Феникс1 и F1 Лист (рис. 2). Образование морфогенных структур наблюдали только у генотипов, культивируемых на питательной среде, дополненной 3 %-ной сахарозой, кроме низкоотзывчивых образцов. Генотипы Феникс1 и F1 Лист формировали морфогенные структуры только при использовании индукционной питательной среды с добавлением 3 %-ной глюкозы.

Изучение влияния стадии развития экспланта на частоту эмбриогенеза. При изучении влияния стадии развития экспланта отмечено, статистически значимое повышение среднего числа сформированных эмбриоидов при использовании завязи, отобранной во время цветения, более, чем в 2 раза у 2 низкоотзывчивых образцов Феникс1 и F1 Лист. Значимого влияния на частоту эмбриогенеза в культуре *in vitro* для остальных образцов не выявлено.

Изучение влияния глутатиона на частоту индукции гиногенеза. При изучении влияния глутатиона в концентрации 10 мг/л в индукционной

питательной среде отмечено значимое повышение частоты эмбриогенеза у 3 образцов из 6. У остальных образцов не наблюдали достоверного повышения частоты эмбриогенеза при культивировании эксплантов на питательной среде, дополненной глутатионом.

Изучение влияния сочетания регуляторов роста TDZ и 2,4-D на частоту индукции гиногенеза. При изучении влияния сочетания регуляторов роста 0,04 мг/л TDZ и 0,15 мг/л 2,4-D в индукционной питательной среде отмечено значимое повышение частоты эмбриогенеза в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца у 2 образцов из 6 по сравнению с питательной средой, дополненной только TDZ (№ 13, № 26). Не наблюдали достоверного изменения частоты эмбриогенеза у остальных образцов при сочетании регуляторов роста TDZ и 2,4-D.

Изучение влияния путресцина на частоту индукции гиногенеза.

При изучении влияния ингибитора этилена путресцина (0,5 мг/л) отмечено статистически значимое снижение числа сформированных эмбриоидов при культивировании эксплантов на питательной среде, дополненной путресцином у всех образцов. Образцы F1 Спринт и F1 Добрыня не формировали эмбриоиды на питательной среде с добавлением путресцина.

Оценка проявления женского типа цветения и других экономически ценных признаков

Оценка аллельного состояния гена *F* материнских линий партенокарпического огурца. Линии D18, Sv3506, Бк1-8, Z1(II)бн2-1, M43, Сф1, Пас2-1111(18)18, Z1(II)6, B1(II)1, Пасхц)3х1)05, Sa2-81, S20(II)42, Зел1-64, Км1, Пасхц)3х4)06(15) являются доминантными гомозиготами по гену *F*. Гибридные комбинации, полученные от скрещивания данных линий с моноцийной формой промежуточный тип цветения при выращивании в защищенном грунте, при выращивании в открытом грунте – женский тип цветения. Согласно исследованиям Пыженкова В.И. (1981), промежуточный тип цветения характерен для гомозигот *FF*.

Материнские линии Пв2-151, LS24-13, 264(13) являются гетерозиготами Ff. При скрещивании данных линий (*Ff*) с моноцийным растением линии Феникс1 (*ff*) отмечено расщепление 1:1. При выращивании гибридных комбинаций в защищенном грунте половина растений обладала мужским типом цветения, половина – промежуточным.

Материнские линии Руб6, S20-1(II)бн, Кибр2-6, Руб3, Мадр1-639 предположительно могут являться гомозиготами с сильными аллелями *F'F'* или *F''F''*. При скрещивании этих линий с моноцийным линией Феникс1 было отмечено, что большая часть растений не формировала мужские цветки, а

остальные растения имели единичные мужские цветки при выращивании в защищенном грунте. При выращивании этих гибридных потомств в открытом грунте доля растений с женским типом цветения была больше.

Оценка хозяйственно-ценных признаков гибридных комбинаций и ОКС линий в условиях защищенного грунта. Две родительские линии Руб6 и Пасхц)3х1)05 лучших по совокупности проявления гиноцийности (женский тип цветения), высоких и средних эффектов ОКС по признакам, общая продуктивность, масса плодов, число плодов, имели наибольшие значения эффектов ОКС по баллу поражения ложной мучнистой росой, это позволит создать на их основе высокопродуктивные F1-гибриды, однако они не будут отличаться высокой устойчивостью к пероноспорозу (табл. 1). При этом необходимо отметить, что создание высокопродуктивных и высокоустойчивых к пероноспорозу F1-гибридов партенокарпического огурца достижимо вследствие отсутствия корреляции (r = 0,05) между ОКС линий по признаку общая продуктивность и ОКС линий по признаку устойчивость к пероноспорозу.

Таблица 1 – ОКС по основным хозяйственно-ценным признакам при скрещивании в системе топкросс с отцовским компонентом Феникс1

Генотип	ОКС по продукти вности, г	ОКС по числу побегов 1-го порядка ветвления, шт.	ОКС массе плода, г	ОКС по числу плодов, шт.	ОКС по поражению ложной мучнистой росой, балл
Руб6	612	-1,2	4,5	7,2	2,9
Руб3	460	-5,4	-1,1	6,5	0,6
Кибр2-6	363	8,7	7,7	3,5	-0,2
Пасхц)3х1)05	242	5,9	4,8	2,6	-1,1
Sv3506	212	-0,5	8,3	1,7	1,0
Сф1	210	2,4	2,4	2,6	-0,9
Z1(II)6	72	2,9	11,2	-0,3	-1,5
Z1(II)бн2-1	42	0,3	21,4	-1,8	-1,5
Зел1-64	-66	-7,5	-8,7	0,8	-1,2
M43	-70	-6,1	3,7	-1,1	0,8
S20-1(II)бн	-97	8,1	3,6	-1,4	-1,5
LS24-13	-205	-1,6	8,3	-3,2	-0,1
Бейок1-8	-210	3,1	-1,6	-2,3	-1,8
Мадр1-639	-226	-8,4	-2,7	-2,3	1,9
Пасхц)3х4)06(15)	-227	-3,7	2,5	-2,9	1,5
264(13)	-437	-2,5	-14,2	-4,1	0,3
Пв2-151	-520	14,7	-11,2	-5,7	0,8
$НСР_{05}$	176,8	3,1	4,8	1,6	-

В результате изучения комплекса хозяйственно-ценных признаков, определяющих продуктивность растений партенокарпического огурца,

выделены 6 новых перспективных гибридных комбинаций Руб6 х Феникс1, (Пасхц)3х1)05 х РубМ, Сф1 х РубМ, Пас2-1111(18)18 х РубМ, Z1(II)6 х РубМ, В1(II)1 х РубМ, рекомендованных для проведения станционного испытания.

Оценка устойчивости к пероноспорозу и продуктивности гибридных комбинаций и ОКС линий огурца. Для селекции высокопродуктивных F1-гибридов партенокарпического огурца с устойчивостью к пероноспорозу в качестве исходного материала для создания инбредных линий при испытании в условиях открытого грунта отобраны гибридные комбинации (Z1(II)бн2-1 х Феникс1, Бейок1-8 х Феникс1, Зел 1-64 х Феникс1 и Сф1 х Феникс1), сочетающие высокую продуктивность и высокую устойчивость к пероноспорозу (рис. 3А, 3Б, 3В).

Рисунок 3 – Проявление симптомов поражения пероноспорозом образцов огурца на естественном инфекционном фоне: А) Устойчивый стандарт, линия Феникс1, Б) Устойчивая гибридная комбинация Бейок1-8 х Феникс1, В) Восприимчивый стандарт F1 Хоббит

В результате изучения комплекса хозяйственно-ценных признаков, определяющих продуктивность растений партенокарпического огурца, при оценке в условиях открытого грунта выделены 6 новых перспективных гибридных комбинаций Руб6 х Феникс1, (Пасхц)3х1)05 х РубМ, Сф1 х РубМ, Пас2-1111(18)18 х РубМ, Z1(II)6 х РубМ, В1(II)1 х РубМ, рекомендуемых для проведения станционного испытания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что замена 3 % сахарозы в индукционной питательной среде MS на 3 % глюкозу значимо повышает частоту эмбриогенеза по крайней мере в 5 раз, с 7,8 до 50,3 эмбр./завязь в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей у образцов огурца, отличающихся низкой эмбриогенной способностью; частота эмбриогенеза образцов с высокой эмбриогенной способностью значимо не изменяется, за исключением одного из 4-х высокотзывчивых образцов, проявившего значимое снижение частоты эмбриогенеза с 85,9 до 38 эмбр./завязь.

2. Показано, что использование завязей, отобранных во время цветения в стадии полураскрытого цветка для изоляции эксплантa значимо более, чем в 2 раза повышает частоту эмбриогенеза в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей у образцов огурца, отличающихся низкой эмбриогенной способностью (с 7,8 до 37,8 эмбр./завязь), при этом значимого влияния на частоту эмбриогенеза в культуре *in vitro* для остальных образцов не выявлено.

3. Показано, что добавление в индукционную питательную среду MS антиоксиданта глутатиона в количестве 10 мг/л достоверно повышает частоту формирования эмбриоидов в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца в 1,5-2 раза для 3 из 6 образцов (50 %) (с 21,8 до 54,7 эмбр./завязь у образца № 13), частота эмбриогенеза остальных образцов при добавлении глутатиона значимо не изменяется по сравнению с индукционной питательной средой без глутатиона.

4. Установлено, что использование индукционной питательной среды MS, дополненной ингибитором этилена, путресцином 0,5 мг/л, значимо снижает частоту эмбриогенеза в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца или не приводит к формированию эмбриоидов у всех образцов.

5. Выявлено, что добавление гидролизата казеина в концентрации 250 мг/л в индукционную питательную среду MS значимо повышает частоту эмбриогенеза в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца у 2 из 6 образцов более, чем в 2 раза с 10,9 до 26,8 эмбр./завязь, у трех из шести образцов не отмечено значимого влияния фактора, у 1 из 6 образцов - снижение частоты эмбриогенеза. При этом добавление в индукционную питательную среду 500 мг/л гидролизата казеина частота эмбриогенеза значимо не различается по сравнению с контрольной питательной средой у всех образцов, за исключением одного образца, проявившего значимое снижение частоты эмбриогенеза с 31,1 до 13,5 эмбр./завязь.

6. Установлено, что добавление в индукционную питательную среду регуляторов роста TDZ и 2,4-D в количестве 0,04 и 0,15 мг/л, соответственно, значимо повышает частоту формирования эмбриоидов по меньшей мере в 1,5-2,0 раза в культуре семязачатков в составе фрагментов завязей огурца у 2 из 6 образцов (с 21,8 до 44,1 эмбр./завязь, с 31,1 до 54,6 эмбр./завязь), частота эмбриогенеза остальных образцов при добавлении одновременно TDZ и 2,4-D значимо не изменялась.

7. Анализом уровня плоидности листьев растений-регенерантов выявлена миксоплоидность тканей, культивируемых *in vitro* растений; в

сравнении с диплоидным стандартом установлено присутствие в эквивалентном количестве клеток, содержащих 2n и 4n наборы хромосом.

8. Показано, что дифференциация гиноцийных линий по аллельному состоянию гена *F* при анализе гибридных комбинаций от скрещивания гиноцийной линии с моноцийной, позволяет выявить линии с высокой выраженностью женского пола для создания F1-гибридов огурца. При оценке линий на женский тип цветения по силе аллелей гена *F* выделены 5 линий, обладающих сильными аллелями гена *F*: Руб6, S20-1(II)бн, Кибр2-6, Руб3, Мадр1-639. Данные линии рекомендованы для дальнейшего использования в качестве материнского компонента в селекции F1-гибридов партенокарпического огурца.

9. При изучении устойчивости к ложной мучнистой росе новых гибридных комбинаций проведена дифференциация по группам устойчивости, выделены гибридные комбинации, отличающиеся высоким уровнем устойчивости к ложной мучнистой росе: Пасхц)3х1)05 х Феникс1, Сф1 х Феникс1, S20-1(II)бн х Феникс1, Z1(II)бн2-1 х Феникс1, Зел1-64 х Феникс1, Бейок1-8 х Феникс1. Выявлена гибридная комбинация Бейок1-8 х Феникс1, сочетающая в себе высокий уровень устойчивости к ложной мучнистой росе на уровне устойчивых стандартов, линии Феникс1 и гибрида F1 Спринт, и высокую общую продуктивность, значимо превышающую значение общей продуктивности стандартов, линии Феникс1 и гибрида F1 Спринт.

10. Установлено, что создание высокопродуктивных и высокоустойчивых к пероноспорозу F1-гибридов партенокарпического огурца достижимо вследствие отсутствия корреляции (r = 0,05) между ОКС по признаку общая продуктивность и ОКС по признаку устойчивость к пероноспорозу линий. Однако при этом отмечено, что две родительские линии Руб6 и (Пасхц)3х1)05 лучшие по совокупности проявления гиноцийности, высоких и средних эффектов ОКС по признакам, общая продуктивность, масса плодов, число плодов, имели наибольшие значения эффектов ОКС по баллу поражения пероноспорозом.

11. В результате изучения комплекса хозяйственно-ценных признаков, определяющих продуктивность растений партенокарпического огурца, при оценке в условиях открытого и защищенного грунта выделены 7 новых перспективных гибридных комбинаций Руб6 х Феникс1, (Пасхц)3х1)05 х РубМ, Сф1 х РубМ, Пас2-1111(18)18 х РубМ, Z1(II)6 х РубМ, В1(II)1 х РубМ, Бейок1-8 х Феникс1 рекомендованных для проведения станционного испытания; в качестве исходного материала для создания инбредных линий

выделены гибридные комбинации (Z1(II)бн2-1 х Феникс1, Бейок1-8 х Феникс1, Зел 1-64 х Феникс1 и Сф1 х Феникс1), сочетающие высокую продуктивность и высокую устойчивость к пероноспорозу.

Рекомендации производству

1. Изменение состава индукционной питательной среды MS при добавлении гидролизата казеина (250 мг/л), глутатиона (10 мг/л), регуляторов роста TDZ и 2,4-D (0,04 и 0,15 мг/л соответственно), глюкозы (3 %) и использование завязей, отобранных во время цветения в стадии полураскрытого цветка для изоляции эксплантa, обеспечивающих максимальную частоту эмбриогенеза, рекомендованы для оптимизации технологии производства линий удвоенных гаплоидов огурца при реализации селекционных программ.

2. Инбредные родительские линии Руб6 и Пасхц)3х1)05 рекомендованы для включения в селекционные программы по созданию высокопродуктивных F1-гибридов партенокарпического огурца.

3. 7 новых перспективных гибридных комбинаций Руб6 х Феникс1, (Пасхц)3х1)05 х РубМ, Сф1 х РубМ, Пас2-1111(18)18 х РубМ, Z1(II)6 х РубМ, В1(II)1 х РубМ, Бейок1-8 х Феникс1, сочетающие высокую продуктивность и высокую устойчивость к пероноспорозу, рекомендованны для проведения станционного испытания.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Осминина, Е. В. Оценка материнских линий огурца (*Cucumis sativus* L.) на женский тип цветения по силе аллелей гена *F* / Е. В. Осминина, С. Г. Монахос // Картофель и овощи. – 2024. – № 4. – С. 36-40. – DOI 10.25630/PAV.2024.34.66.007. – EDN OQNODV.

2. Осминина Е. В. и др. Факторы индукции гиногенеза огурца (*Cucumis sativus* L.) в культуре семязачатков // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2024. – Т. 1. – №. 3. – С. 63-77.

Работы, опубликованные в прочих изданиях:

1. Осминина, Е. В. Особенности индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков и фрагментов завязи *Cucumis sativus* 1 / Е. В. Осминина, С. Г. Монахос // Материалы Международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 135-летию со дня рождения А.Н. Костякова: сборник статей, Москва, 06–08 июня 2022 года. Том 2. – Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2022. – С. 301-304. – EDN KTAIRR.

2. Осминина, Е. В. Факторы индукции эмбриогенеза в культуре фрагментов завязей *Cucumis sativus* l / Е. В. Осминина, С. Г. Монахос // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии: Сборник тезисов докладов XXII Всероссийской международной конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева, Москва, 07–09 декабря 2022 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 2022. – С. 95-97. – DOI 10.48397/ARRIAB.2022.22.XXII.056. – EDN GEOGKV.

3. Осминина, Е. В. Особенности влияния компонентов питательной среды на индукцию гиногенеза *Cucumis sativus* l / Е. В. Осминина, С. Г. Монахос // Проблемы селекции - 2022: Тезисы докладов международной научной конференции, Москва, 12–15 октября 2022 года. – Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2022. – С. 106. – EDN YXXMNS.