

ФАКТОРЫ ИНДУКЦИИ ГИНОГЕНЕЗА ОГУРЦА (*CUCUMIS SATIVUS* L.) В КУЛЬТУРЕ СЕМЯЗАЧАТКОВ

Е.В. ОСМИНИНА, А.В. ВИШНЯКОВА, Я.Т. ЭЙДЛИН, Э.Р. МУРЗИНА,
А.А. МИРОНОВ, Д.Д. ЛИСОВАЯ, С.Г. МОНАХОС

(Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева)

Повышение эффективности технологии производства удвоенных гаплоидов является актуальной задачей в целях расширения возможностей фундаментальных исследований и повышения темпов селекции коммерческих F1-гибридов. В данном исследовании изучено влияние компонентов индукционной питательной среды, гидролизата казеина 250 мг/л, 500 мг/л, глутатиона 10 мг/л, сочетания регуляторов роста TDZ 0,04 мг/л, 2,4-D0,15 мг/л на гиногенную отзывчивость огурца в культуре неоплодотворенных семязачатков. У 2 образцов показано повышение частоты гиногенной индукции семязачатков более чем в 2 раза при культивировании на индукционной питательной среде, дополненной 250 мг/л гидролизата казеина. Добавление в питательную среду 10 мг/л глутатиона способствует повышению частоты гиногенной индукции семязачатков в 1,5–2 раза у 3 образцов из 6. Сочетание регуляторов роста TDZ 0,04 мг/л, 2,4-D0,15 мг/л повышает частоту гиногенной индукции семязачатков в 1,5–2 раза у 2 образцов из 6. Установлено, что культивирование фрагментов завязи огурца на питательной среде, дополненной 0,5 мг/л нутресцина, приводит к резкому снижению частоты гиногенной индукции семязачатков. Полученные данные о влиянии компонентов индукционной питательной среды в культуре семязачатков могут быть использованы для оптимизации технологии производства удвоенных гаплоидов огурца.

Ключевые слова: *огурец, Cucumis sativus L., гиногенез, удвоенные гаплоиды, культура семязачатков, частота гиногенной индукции.*

Введение

В настоящее время селекция сельскохозяйственных растений тесно связана с применением современных биотехнологических методов. Биотехнологические методы позволяют значительно ускорить создание новых коммерческих F1-гибридов и повысить эффективность селекционного процесса. F1-гибриды отличаются от сортов рядом преимуществ: высокая однородность, устойчивость к биотическим и абиотическим факторам, высокая урожайность, защита растительного материала от нелегального семеноводства [5].

Огурец (*Cucumis sativus* L.) является наиболее экономически важной культурой среди всех видов семейства *Cucurbitaceae*. По данным FAOSTAT за 2021 г., Россия заняла 6 место в мире по посевным площадям, занимаемыми огурцами, – более 38 тыс. га. По показателю урожайности Российская Федерация находится на 46 месте. Значительное повышение урожайности овощных культур, в том числе огурца, обеспечивается за счет создания новых коммерческих F1-гибридов, обладающих комплексом хозяйственно-ценных признаков. Однако время создания F1-гибридов огурца с использованием классических методов селекции занимает более 6 лет.

Для производства семян F1-гибридов требуются чистые гомозиготные родительские линии, создание которых сопряжено с рядом временных, трудовых и финансовых затрат. Значительно уменьшить сроки создания чистых линий помогает один из биотехнологических методов – технология создания удвоенных гаплоидов (DH) [2]. Использование данной технологии позволяет избегать процесса

принудительного самоопыления и сократить время на создание чистых гомозиготных линий с более чем четырех лет до одного года у однолетних культур [3, 14].

Помимо использования в селекционном процессе, ДН-технологии находят применение в фундаментальных исследованиях [1]. Технология создания удвоенных гаплоидов имеет важное значение для исследований в области генетики и эмбриологии растений, позволяет изучать генетические взаимодействия, процессы эмбрионального развития и мутагенеза [11, 14, 24].

В основе технологии создания удвоенных гаплоидов лежит стимулирование перехода мужского или женского гаметофита с гаметофитного пути развития на спорофитный за счет различных индуцирующих факторов с последующим образованием эмбриоидов или морфогенного каллуса.

Для производства удвоенных гаплоидов огурца используют: гаплоидный партеногенез, индуцируемый опылением инактивированной облучением пыльцой; андрогенез, культивируя микроспоры или пыльники *in vitro*; гиногенез, культивируя завязи или семязачатки *in vitro* [11].

Технология создания удвоенных гаплоидов на основе гиногенеза состоит из последовательных этапов:

1. Выращивание и подготовка донорных растений, изоляция и поверхностная стерилизация завязей за 1–2 дня до цветения.
2. Инокуляция изолированных семязачатков на питательную среду *in vitro* и стимулирование перехода яйцеклетки с гаметофитного пути развития на спорофитный за счет различных индуцирующих факторов.
3. Оценка уровня пloidности растений-регенерантов с последующим удвоением хромосом выделенных гаплоидных растений.
4. Оценка гомо-, гетерозиготности растений-регенерантов с использованием молекулярных маркеров с целью исключения клонов из диплоидных тканей семязачатка или фрагмента завязи.
5. Адаптация и укоренение растений удвоенных гаплоидов в почвенном субстрате и производство семян линий удвоенных гаплоидов.

Существующие протоколы производства гиногенных удвоенных гаплоидов огурца обладают низкой эффективностью и нуждаются в оптимизации с целью повышения частоты эмбриогенеза. По результатам исследований, частота эмбриогенеза варьируется от 0,12 до 18,4 эмбриоидов на завязь [14, 16]. Один из лучших результатов зафиксирован у Diao et al. (2009). Согласно их данным частота образования эмбриоидов в культуре семязачатков огурца составила 89,4% [10].

На индукцию гиногенеза влияет ряд требующих изучения факторов – таких, как генотип донорного растения, условия выращивания и подготовки донорных растений, тип экспланта, стадия развития экспланта, тип питательной среды и ее компоненты, температурная обработка [16, 17].

Цель исследований: изучение влияния компонентов питательной среды (гидролизат казеина, глутатион, TDZ и 2,4-D, путресцин) на частоту гиногенной индукции семязачатков огурца (*Cucumis sativus* L.) в культуре семязачатков.

Материал и методы исследований

Растительный материал и условия его выращивания. В качестве донорных растений использовали 3 коммерческих F1-гибрида (F1 Спринт, F1 Дружный, F1 Добрыня) и 3 селекционные гибридные комбинации (№ 13, № 21, № 26). F1 Спринт – раннеспелый пчелоопыляемый гибрид, преимущественно женского типа цветения, устойчивый к оливковой пятнистости, вирусу огуречной мозаики (ВОМ), мучнистой росе (МР) и ложной мучнистой росе (ЛМР); F1 Дружный – раннеспелый,

партенокарпический гибрид женского типа цветения, устойчивый к кладоспориозу, ВОМ, МР; F1 Добрыня – среднеранний, партенокарпический гибрид женского типа цветения, устойчивый к кладоспориозу, ВОМ, МР.

Посев производили в кассеты 8 × 8, наполненные торфяным субстратом (Агробалт, Россия), заправленным комплексными минеральными удобрениями N120, P2O5 80, K2O 140, Mg 30, Ca 170 мг/л, Cu 9, Mn 40, Zn 9, Co 0,001 мг/кг, pH (H2O) 5,5–6,6 в третьей декаде июля. Через 30 суток рассаду высаживали в необогреваемую пленочную теплицу с естественным освещением в фазе 3 настоящих листьев. Через 4–5 суток растения подвязывали к вертикальной шпалере. Ослепление и удаление боковых побегов не производили; осуществляли удаление усов. Полив осуществляли по мере необходимости. Корневые подкормки аммиачной селитрой (содержание общего азота – 34,4%) осуществляли каждую неделю.

Культура семязачатков. Отбор завязей осуществляли спустя 2 недели после распускания первого цветка на растении за сутки до раскрытия бутона в стадии ярко окрашенного венчика.

Культивирование семязачатков осуществляли согласно методике (Diao, W. P., 2009) с модификациями. С завязей удаляли околоцветник и трихомы, промывали под проточной водой. Поверхностную стерилизацию проводили в ламинарном боксе в растворе 70%-ного этанола в течение 60 с, затем завязи помещали в раствор 2%-ного гипохлорита натрия с добавлением 1–2 капель Tween 20 в течение 10 мин с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде в течение 1, 5, 10 мин.

Семязачатки в составе дисков толщиной 1–2 мм, нарезанных скальпелем из завязей, инокулировали пинцетом на твердую индукционную питательную среду в чашки Петри 100 × 20 мм, по одной завязи на чашку. Количество фрагментов зависело от величины завязи образца и варьировало от 15 до 30 шт. В качестве повторности использовали одну чашку Петри. Для каждого изучаемого фактора было использовано не менее 7 повторностей.

В качестве индукционной питательной среды использовали МС (Murashige T., Skoog F., 1962), дополненную 3%-ной сахарозой, 0,8%-ным агаром (Sigma-Aldrich, Германия), 0,04 мг/л тидиазурона (TDZ) (Sigma-Aldrich, Германия), 10 мг/л нитрата серебра. Данную индукционную питательную среду использовали в качестве контроля. Тидиазурон растворяли в 1 мл 1 М КОН, доводили бидистиллированной водой до концентрации 1 мг/мл, стерилизовали фильтрованием, добавляли после автоклавирования в питательную среду, охлажденную до температуры 60°C. Нитрат серебра добавляли после автоклавирования питательной среды; pH среды – 5,8 до автоклавирования.

К индукционной питательной среде добавляли изучаемые компоненты. Изучали влияние на частоту индукции гиногенного развития семязачатков компонентов индукционной питательной среды:

- 1) гидролизат казеина – 250 мг/л, 500 мг/л;
- 2) глутатион – 10 мг/л (Sigma-Aldrich, Германия);
- 3) сочетание регуляторов роста TDZ 0,04 мг/л, 2,4-D0,15 мг/л (Sigma-Aldrich, Германия);
- 4) путресцин – 0,5 мг/л (Sigma-Aldrich, Германия).

Экспланты инкубировали при температуре 35°C в темноте в течение 3 суток, далее – при температуре 25°C и 16-часовом фотопериоде.

Через 2 недели семязачатки переносили на регенерационную питательную среду МС, дополненную 3%-ной сахарозой, 0,8%-ным агаром, 1,5 мг/л 6-ВАР (Alfa Aesar, Германия). 6-ВАР разводили при помощи 1 мл 1 М КОН, доводили бидистиллированной водой до концентрации 1 мг/мл, стерилизовали при помощи фильтрстерилизации. Уровень pH среды – 5,8 до автоклавирования. Пересадку на свежую питательную среду осуществляли каждые 2 недели.

Статистический анализ данных. Частоту гиногенной индукции оценивали через 30 суток культивирования семязачатков на питательной среде. К индукции гиногенного развития семязачатков относили зеленые, увеличенные в размерах в 2 раза и более, выступающие на поверхности диска завязи семязачатки. Частоту гиногенной индукции определяли как число гиногенно развившихся семязачатков на завязь. Статистический анализ данных проводили с помощью теста Манна-Уитни на 5%-ном уровне значимости ($P < 0,05$) с использованием программного пакета R Studio.

Результаты и их обсуждение

Гиногенное развитие семязачатков наблюдали на всех вариантах питательных сред в среднем через неделю после инокуляции. Семязачатки увеличивались в размерах в 2 раза и более, изменяли цвет с белого на зеленый и выступали на поверхности поперечного среза завязи (рис. 1А). Неотзывчивые образцы не формировали увеличенных семязачатков (рис. 1Б). Через 2 недели культивирования у всех изучаемых образцов на поверхности дисков завязей формировались клетки каллуса.

Гиногенное развитие семязачатков наблюдали с большей частотой при непосредственном контакте с питательной средой, с нижней стороны диска завязи огурца. Некоторые семязачатки отделялись от окружающих тканей диска завязи, что в последующем приводило к некрозу тканей или формированию каллуса с последующим некрозом (рис. 1В). В ранних исследованиях также было показано, что морфогенные структуры образуются только при культивировании семязачатков в составе дисков завязей. При этом идентифицировать происхождение морфогенных структур не удалось [4].

Формирование морфогенных структур и далее формирование органов из культивируемых семязачатков наблюдали через 30–60 суток от начала культивирования в зависимости от генотипа (рис. 1Г, 1Д). Прямой эмбриогенез не наблюдали ни на одном из образцов ни в одном из вариантов опыта включая контроль. Эмбриониды формировались из каллуса (рис. 1Е).

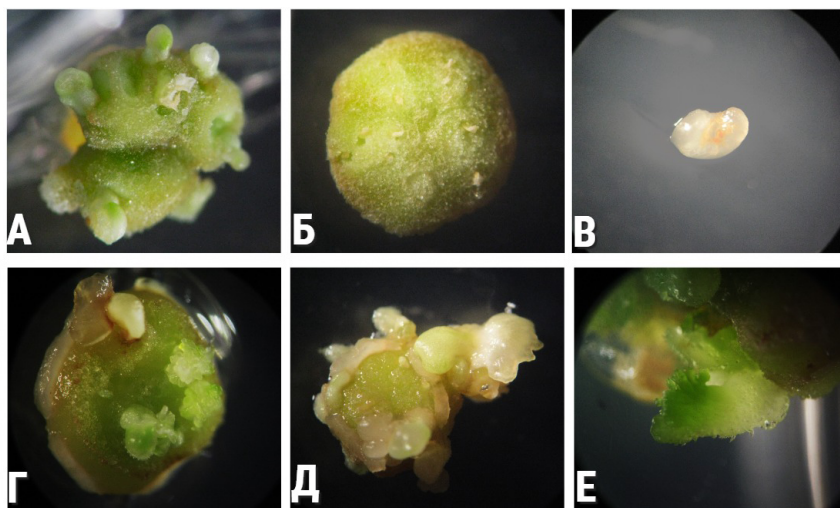


Рис. 1. Вариации гиногенного развития в культуре семязачатков огурца: А) гиногенно развивающиеся семязачатки; Б) диск завязи с неотзывчивыми семязачатками; В) семязачаток, спонтанно отделившийся от диска завязи; Г) морфогенные структуры, сформированные из семязачатков; Д) органогенный каллус и органогенез; Е) эмбрионид, сформированный из каллуса

Изучение влияния гидролизата казеина на частоту гиногенной индукции огурца в культуре семязачатков. При культивировании поперечных срезов завязи огурца на индукционной питательной среде с добавлением 250 мг/л гидролизата казеина наблюдали статистически достоверное повышение среднего числа гиногенно развивающихся семязачатков у 2 из 6 образцов (F1 Спринт, № 21) по сравнению с эксплантами, культивируемыми на питательной среде без добавления гидролизата казеина (контроль). Наблюдали положительную тенденцию увеличения среднего числа гиногенно развивающихся семязачатков при культивировании на питательной среде с добавлением 250 мг/л гидролизата казеина у 2 из 6 образцов (F1 Дружный, F1 Добрыня). Гибридная комбинация № 26 показала достоверное уменьшение среднего числа семязачатков при культивировании поперечных фрагментов на питательной среде, содержащей 250 мг/л гидролизата казеина, по сравнению со средой без гидролизата казеина (табл. 1).

При культивировании поперечных срезов завязи огурца на индукционной питательной среде, дополненной 500 мг/л гидролизата казеина, не отметили достоверных различий на 5%-ном уровне значимости у 5 из 6 образцов. Наблюдали тенденцию снижения среднего числа гиногенно развивающихся семязачатков при культивировании на питательной среде, дополненной 500 мг/л гидролизата казеина, по сравнению с питательной средой без гидролизата казеина у 2 из 6 образцов. Гибридная комбинация № 26 показала достоверное снижение среднего числа индуцированных семязачатков при культивировании поперечных срезов на питательной среде, дополненной 500 мг/л гидролизата казеина, по сравнению с питательной средой без гидролизата казеина (табл. 1).

Из представленных данных следует, что добавление в индукционную питательную среду гидролизата казеина 500 мг/л менее эффективно по сравнению с питательной средой при добавлении 250 мг/л гидролизата казеина. Частота индукции гиногенеза при культивировании эксплантов на питательной среде, дополненной 500 мг/л гидролизата казеина, повышается незначительно либо снижается по сравнению со средой с добавлением 250 мг/л гидролизата казеина. Гибрид F1 Спринт сформировал большее число гиногенно развивающихся семязачатков (44,8 шт/завязь при культивировании семязачатков на среде с 250 мг/л гидролизата казеина) и меньшее (33 шт/завязь) – на среде с 500 мг/л гидролизата казеина. Пониженная концентрация гидролизата казеина (250 мг/л) способствует повышению частоты гиногенной индукции у отдельных образцов.

Таблица 1

Влияние гидролизата казеина в концентрации 250 мг/л на частоту гиногенной индукции семязачатков огурца, шт/завязь

Образец	Без добавления гидролизата казеина	Гидролизат казеина, 250 мг/л	Гидролизат казеина, 500 мг/л
F1 Спринт	14,8 а	44,8 b	33,0 а
F1 Дружный	22,5 а	32,6 а	34,4 а
F1 Добрыня	32,5 а	34,3 а	37,0 а
№ 13	21,8 а	21,5 а	12,8 а
№ 21	10,9 а	26,8 b	7,5 а
№ 26	31,1 а	16,0 b	13,5 b

Примечание. Значения в строке, отмеченные одинаковыми строчными буквами (а), согласно U-критерию Манна-Уитни не имеют существенного различия на 5%-ном уровне значимости ($P \leq 0,05$).

Изучение влияния глутатиона на частоту гиногенной индукции огурца в культуре семязачатков. Согласно данным таблицы 2 частота гиногенной индукции достоверно различается при культивировании на питательной среде, дополненной 10 мг/л глутатиона, и без добавления глутатиона у 3 из 6 образцов. Так, гибридная комбинация № 13 сформировала 54,7 шт/завязь гиногенно развивающихся семязачатков на питательной среде, дополненной 10 мг/л глутатиона, и 21,8 шт/завязь на питательной среде без глутатиона. Гибридная комбинация № 21 на питательной среде с глутатионом сформировала 31,4 шт/завязь гиногенно развивающихся семязачатков, на питательной среде без глутатиона – 10,9 шт/завязь семязачатков соответственно. Образец F1 Спринт на питательной среде с глутатионом сформировал 26,0 шт/завязь гиногенно развивающихся семязачатков, на питательной среде без глутатиона – 14,8 шт/завязь соответственно. Наблюдалась тенденция увеличения частоты образования гиногенно развивающихся семязачатков у 3 из 6 образцов (F1 Дружный, F1 Добрыня, № 26).

Изучение влияния регуляторов роста TDZ и 2,4-D на частоту гиногенной индукции огурца в культуре семязачатков. У 2 из 6 образцов, F1 Спринт и № 21, отмечена тенденция увеличения числа гиногенно развивающихся семязачатков на индукционной питательной среде, дополненной 0,04 мг/л TDZ и 0,15 мг/л 2,4-D, по сравнению с питательной средой, дополненной только TDZ (0,04 мг/л) (табл. 3). Образцы F1 Добрыня и F1 Дружный показали снижение числа гиногенно развивающихся семязачатков при культивировании на индукционной питательной среде, дополненной сочетанием регуляторов роста TDZ и 2,4-D. Сочетание регуляторов роста 0,04 мг/л TDZ и 0,15 мг/л 2,4-D оказывают существенное влияние на частоту гиногенной индукции в культуре семязачатков огурца у 2 из 6 образцов по сравнению с питательной средой, дополненной только 0,04 мг/л TDZ.

Изучение влияния путресцина в индукционной питательной среде на частоту гиногенной индукции огурца в культуре семязачатков. При культивировании дисков завязей огурца на питательной среде, дополненной 0,5 мг/л путресцина, и без него частота гиногенной индукции достоверно различается (табл. 4). Наблюдали статистически значимое снижение числа гиногенно развивающихся семязачатков при культивировании эксплантов на питательной среде, дополненной путресцином, у всех образцов. Гибриды F1 Спринт и F1 Добрыня не формировали гиногенно развивающихся семязачатков на питательной среде, дополненной 0,5 мг/л путресцина. Диски завязей не формировали каллус на поверхности среза, изменяли цвет с зеленого на бледно-желтый.

Таблица 2

Влияние глутатиона в концентрации 10 мг/л на частоту гиногенной индукции в культуре семязачатков огурца, шт/завязь

Образец	Без добавления глутатиона	Глутатион, 10 мг/л
F1 Спринт	14,8 а	26,0 b
F1 Дружный	22,5 а	33,0 а
F1 Добрыня	32,5 а	34,3 а
№ 13	21,8 а	54,7 b
№ 21	10,9 а	31,4 b
№ 26	31,1 а	49,6 а

Примечание. Значения в строке, отмеченные одинаковыми строчными буквами (а), согласно U-критерию Манна-Уитни не имеют существенного различия на 5%-ном уровне значимости ($P \leq 0,05$).

Таблица 3

**Влияние регуляторов роста 0,04 мг/л TDZ и 0,15 мг/л 2,4-D
на частоту гиногенной индукции в культуре семязачатков огурца, шт/завязь**

Образец	0,04 мг/л TDZ	TDZ 0,04 мг/л и 2,4-D 0,15 мг/л
F1 Спринт	14,8 а	33,0 а
F1 Дружный	22,5 а	22,1 а
F1 Добрыня	32,5 а	16,8 а
№ 13	21,8 а	44,1 b
№ 21	10,9 а	15,8 а
№ 26	31,1 а	54,6 b

Примечание. Значения в строке, отмеченные одинаковыми строчными буквами (а), согласно U-критерию Манна-Уитни не имеют существенного различия на 5%-ном уровне значимости ($P \leq 0,05$).

Таблица 4

**Влияние путресцина в концентрации 0,5 мг на частоту гиногенной индукции
в культуре семязачатков огурца, шт/завязь**

Образец	Без добавления путресцина	Путресцин, 0,5 мг/л
F1 Спринт	14,8 а	0 b
F1 Дружный	22,5 а	2,7 b
F1 Добрыня	32,5 а	0 b
№ 13	21,8 а	7,25 b
№ 21	10,9 а	3,4 b
№ 26	31,1 а	5,8 b

Примечание. Значения в строке, отмеченные одинаковыми строчными буквами (а), согласно U-критерию Манна-Уитни не имеют существенного различия на 5%-ном уровне значимости ($P \leq 0,05$).

Обсуждение. Использование в питательных средах органических компонентов, в том числе гидролизата казеина, широко практикуется в различных биотехнологических методах. Гидролизат казеина является источником аминокислот, и в меньшей степени – фосфатов, витаминов, микроэлементов. Некоторые исследователи пришли к выводу о том, что гидролизат казеина может быть более эффективным в культуре клеток и тканей, чем аминокислоты [12]. Как правило, гидролизат казеина используют при создании удвоенных гаплоидов в культуре пыльников у таких культур, как ячмень, кукуруза, рис [19, 20, 25].

Y. Zhu с соавт. (2019) использовал индукционную питательную среду, дополненную 600 мг/л гидролизата казеина, для индукции гиногенеза в культуре семязачатков арбуза [27]. D. Skalova с соавт. (2010) отметил положительный эффект добавления 1 г/л гидролизата казеина в питательную среду, используемую для технологии спасения зародышей при отдаленной гибридизации видов рода *Cucumis* [18]. Согласно данным N. Ahmad, M. Anis (2005) использование 200 мг/л гидролизата казеина значительно повысило количество пазушных побегов при микроклональном размножении огурца [6].

Результаты исследований показали, что добавление в индукционную питательную среду гидролизата казеина в концентрации 250 мг/л повысило частоту гиногенной индукции в 2 раза и более у 2 из 6 образцов. Повышение концентрации гидролизата казеина до 500 мг/л является менее эффективным и снижает число гиногенно развивающихся семязачатков по сравнению с питательной средой, дополненной 250 мг/л.

Один из возможных ограничивающих факторов, влияющих на регенерацию в культуре клеток и тканей, – окислительный стресс, возникающий вследствие повреждения клеток активными формами кислорода. Минимизировать отрицательное влияние свободных радикалов и абиотического стресса могут антиоксиданты: аскорбиновая кислота, глутатион, мелатонин и др. Глутатион является одним из наиболее часто используемых антиоксидантов, может влиять на активность ферментов при метилировании ДНК, а также увеличивать частоту эмбриогенеза и темпы регенерации [8]. Согласно данным Żur et al. (2019) и Zieliński et al. (2020) добавление глутатиона в питательную среду позволило повысить частоту эмбриогенеза у ржи и тритикале [28, 29]. A. Zeng и соавт. (2017) отметили значительное увеличение частоты образования эмбриоидов у брокколи при культивировании изолированных микроспор на питательной среде, дополненной 20 мг/л глутатиона [26].

В наших исследованиях отмечено повышение частоты гиногенной индукции в культуре семязачатков огурца у 3 из 6 изученных образцов в 1,5–2 раза при добавлении в индукционную питательную среду 10 мг/л глутатиона.

Регуляторы роста в составе питательной среды являются одними из основных факторов, влияющих на эффективность технологии создания удвоенных гаплоидов. Для индукции гиногенеза огурца наиболее часто используется тидиазурон (TDZ) в различных концентрациях [3, 9, 16]. Ряд исследователей отмечает, что сочетание ауксинов и цитокининов в различных соотношениях повышает частоту эмбриогенеза в культуре семязачатков огурца. По данным P.A. Tantasawat с соавт. (2015), наиболее высокую частоту эмбриогенеза наблюдали при использовании индукционной питательной среды, дополненной 1 мг/л TDZ и 1 мг/л 6-BAР [21]. M. Golabadi и соавт. (2017) отметили, что частота эмбриогенеза повышается при добавлении в индукционную питательную среду 1,5 мг/л 2,4-D и 1 мг/л кинетина [15]. G. Vaktemur с соавт. (2022) в своем исследовании отметил, что сочетание регуляторов роста кинетина (1,5 мг/л) и 2,4-D (0,15 мг/л) способствует значительному повышению частоты образования эмбриоидов и проростков [7].

В результате наших исследований отмечено, что сочетание регуляторов роста 0,04 мг/л TDZ и 0,15 мг/л 2,4-D в индукционной питательной среде повышает частоту гиногенной индукции у 2 из 6 образцов в 1,5–2 раза.

Полиамины связаны со многими важными клеточными процессами – такими, как деление клеток, синтез белка, репликация ДНК, реакция на абиотический стресс, регуляция ризогенеза и эмбриогенез. Полиамины выступают в качестве ингибитора синтеза этилена. Согласно многочисленным исследованиям для создания удвоенных гаплоидов на основе гиногенеза у огурца в индукционную питательную

среду добавляют нитрат серебра для снижения скорости синтеза этилена [10, 15, 16]. М. Thiruvengadam и соавт. (2013) отметили увеличение частоты соматического эмбриогенеза у *Momordica dioica Roxb. ex. Willd* при добавлении в питательную среду 0,5 μM путресцина [23]. Сочетание регуляторов роста и полиаминов (спермидин, спермин и путресцин) в различных концентрациях в составе питательной среды способствовало повышению темпов регенерации *Cucumis anguria L.* [22]. М.Н. Erol (2019) исследовал влияние полиаминов спермидина и путресцина на частоту эмбриогенеза в культуре изолированных семязачатков огурца в концентрациях 40, 80, 120, 160, 200 μM и сочетания спермидина и путресцина в соотношении 1:1 в различных концентрациях. Частота образования эмбриоидов в его исследовании сильно варьировала в зависимости от образца [13].

В нашем исследовании было отмечено, что использование индукционной питательной среды, дополненной 0,5 мг/л путресцина, значительно снижает частоту гиногенной индукции в культуре семязачатков огурца. У некоторых образцов совсем не наблюдалось формирование гиногенно развивающихся семязачатков. Можно предположить, что сочетание путресцина и нитрата серебра (AgNO_3), выступающих в качестве ингибиторов этилена, оказывает сильное ингибирующее действие на эмбриогенез в культуре семязачатков огурца.

Выводы

В исследованиях установлено влияние компонентов индукционной питательной среды на частоту гиногенной индукции в культуре семязачатков огурца. Добавление в питательную среду гидролизата казеина в концентрации 250 мг/л повышает частоту гиногенной индукции более чем в 2 раза у 2 из 6 образцов. Повышение концентрации гидролизата казеина приводит к снижению числа гиногенно развивающихся семязачатков. Добавление в питательную среду 10 мг/л глутатиона повышает частоту гиногенно развивающихся семязачатков в 1,5–2 раза у 3 из 6 образцов. Сочетание регуляторов роста 0,04 мг/л TDZ и 0,15 мг/л 2,4-D позволяет повысить частоту индукции гиногенного развития семязачатков в 1,5–2 раза у 2 из 6 образцов. Добавление в индукционную питательную среду 0,5 мг/л путресцина резко снижает частоту гиногенной индукции в культуре семязачатков огурца у всех образцов.

Полученные данные могут быть применены для оптимизации технологии создания удвоенных гаплоидов огурца в культуре семязачатков с целью повышения частоты индукции гиногенеза.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением 075–15–2023–220 на поддержку программы развития университета «Приоритет-2030».

Библиографический список

1. Вишнякова А.В., Александрова А.А., Монахов С.Г. Факторы прямого прорастания микроспорогенных эмбриоидов *Brassica Napus L.* // Известия ТСХА. – 2022. – № 6. – С. 43–53.
2. Григолава Т.Р., Вишнякова А.В., Сеницына А.А. и др. Методические подходы создания удвоенных гаплоидов сахарной и столовой свеклы (*Beta vulgaris L.*) // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25, № 3. – С. 276–283.

3. Домблides Е.А., Шмыкова Н.А., Белов С.Н. и др. Получение ДН-растений огурца (*Cucumis sativus* L.) в культуре неопыленных семян in vitro // Овощи России. – 2019. – № 6. – С. 3–9.
4. Осминина Е.В., Моначос С.Г. Особенности индукции гиногенеза в культуре изолированных семязачатков и фрагментов завязи *Cucumis sativus* L. // Материалы Международной научной конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 135-летию со дня рождения А.Н. Костякова (г. Москва, 6–8 июня 2022 г.). – М.: РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2022. – Т. 2. – С. 301–304.
5. Шмыкова Н.А., Химич Г.А., Коротцева И.Б., Домблides Е.А. Перспективы получения удвоенных гаплоидов растений семейства Cucurbitaceae // Овощи России. – 2015. – № 3–4. – С. 28–31.
6. Ahmad N., Anis M. In Vitro Mass Propagation of *Cucumis sativus* L. from Nodal Segments // Turkish Journal of Botany. – 2005. – Vol. 29, № 3. – Pp. 237–240.
7. Baktemur G., Keles D., Kara E. et al. Effects of Genotype and Nutrient Medium on Obtaining Haploid Plants through Ovary Culture in Cucumber // Molecular Biology Reports. – 2022. – Vol. 49, № 6. – Pp. 5451–5458.
8. Bednarek P.T., Orłowska R., Mankowski D.R. et al. Glutathione and Copper Ions as Critical Factors of Green Plant Regeneration Efficiency of Triticale In Vitro Anther Culture // Frontiers in Plant Science. – 2022. – Vol. 13. – Art. 926305. DOI: 10.3389/fpls.2022.926305.
9. Deng Y., Tang B., Zhou X. et al. Direct Regeneration of Haploid or Doubled Haploid Plantlets in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) through Ovary Culture // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2020. – Vol. 142, № 2. – Pp. 253–268.
10. Diao W.P., Jia Y.Y., Song H. et al. Efficient Embryo Induction in Cucumber Ovary Culture and Homozygous Identification of the Regenetants Using SSR Markers // Scientia Horticulturae. – 2009. – Vol. 119, № 3. – Pp. 246–251.
11. Dong Y.Q., Zhao W.X., Li X.H. et al. Androgenesis, Gynogenesis, and Parthenogenesis Haploids in cucurbit species // Plant Cell Reports. – 2016. – Vol. 35. – Pp. 1991–2019.
12. Elmeier K.E.S. Factors Regulating somatic embryogenesis in plants // Somatic Embryogenesis and Gene Expression. – New Delhi: Narosa Publ., 2013. – Pp. 56–81.
13. Erol M.H., Sari N. The Effect of Ovule-ovary Culture and Spermidine-putrescine Applications on Haploid Embryo Induction of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) // Alatarim. – 2019. – Vol. 18, № 2. – Pp. 108–117.
14. Gemes-Juhasz A., Balogh P., Ferenczy A., Kristof Z. Treatment on In Vitro Gynogenesis Induction in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) // Effect of Optimal Stage of Female Gametophyte and Heat Plant Cell Reports. – 2002. – Vol. 21. – Pp. 105–111.
15. Golabadi M., Ghanbari Y., Keighobadi K., Ercisli S. Embryo and Callus Induction by Different Factors in Ovary Culture of Cucumber // Journal of Applied Botany and Food Quality. – 2017. – Vol. 90. – Pp. 68–75. DOI: 10.5073/JABFQ.2017.090.010.
16. Li J.W., Si S.W., Cheng J.Y. et al. Thidiazuron and Silver Nitrate Enhanced Gynogenesis of Unfertilized Ovule Cultures of *Cucumis sativus* // Biologia Plantarum. – 2013. – Vol. 57, № 1. – Pp. 164–168.
17. Shalaby T.A. Factors Affecting Haploid Induction through In Vitro Gynogenesis in Summer Squash (*Cucurbita pepo* L.) // Scientia Horticulturae. – 2007. – Vol. 115, № 1. – Pp. 1–6. DOI: 10.1016/j.scienta.2007.07.008.
18. Skalova D., Ondrej V., Dolezalova I. et al. Polyploidization Facilitates Biotechnological In Vitro Techniques in the Genus *Cucumis* // BioMed Research International. – 2010. – Vol. 2010. – Art. 475432. DOI: 10.1155/2010/475432.

19. *Sriskandarajah S., Sameri M., Lerceteau-Köhler E., Westerbergh A.* Increased Recovery of green doubled haploid plants from barley anther culture // *Crop Science*. – 2015. – Vol. 55, № 6. – Pp. 2806–2812. DOI: 10.2135/cropsci2015.04.0245.
20. *Tang F.* In Vitro Production of Haploid and Doubled Haploid Plants from Pollinated Ovaries of Maize (*Zea mays*) // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2006. – Vol. 84. – Pp. 233–237.
21. *Tantasawat P.A., Sorntip A., Poolsawat O. et al.* Evaluation of Factors Affecting Embryo-like Structure and Callus Formation in Unpollinated Ovary Culture of Cucumber (*Cucumis sativus*) // *International Journal of Agriculture and Biology*. – 2015. – Vol. 17, № 3. – Pp. 613–618. <https://doi.org/10.17957/ijab.17.3.14.257>.
22. *Thiruvengadam M., Chung I.M.* Phenolic Compound Production and Biological Activities from In Vitro Regenerated Plants of Gherkin (*Cucumis anguria* L.) // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2015. – Vol. 18, № 4. – Pp. 295–301.
23. *Thiruvengadam M., Rekha K.T., Jayabalan N. et al.* Effect of Exogenous Polyamines Enhances Somatic Embryogenesis via Suspension Cultures of Spine Gourd (*Momordica dioica* Roxb. ex. Willd.) // *Australian Journal of Crop Science*. – 2013. – Vol. 7, № 3. – Pp. 446–453.
24. *Wędzony M., Forster B.P., Żur I. et al.* Progress in Doubled Haploid Technology in Higher Plants // *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. – 2009. – Pp. 1–33.
25. *Lee S.Y., Lee J.H., Kwon T.O.* Selection of Salt-tolerant Doubled Haploids in Rice Anther Culture // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2003. – Vol. 74. – Pp. 143–149.
26. *Zeng A., Song L., Cui Y., Yan J.* Reduced Ascorbate and Reduced Glutathione Improve Embryogenesis in Broccoli Microspore Culture // *South African Journal of Botany*. – 2017. – Vol. 109. – Pp. 275–280. DOI: 10.1016/j.sajb.2017.01.005.
27. *Zhu Y., Sun D., Deng Y.* Regeneration of double haploid plants from unpollinated ovary cultures of watermelon // *Research Square*. – 2019. – URL: <https://www.researchsquare.com/article/rs-4797/v1/> (дата обращения: 12.02.2024). DOI: 10.21203/rs.2.14098/v1.
28. *Zieliński K., Krzewska M., Żur I. et al.* The Effect of Glutathione and Mannitol on Androgenesis in Anther and Isolated Microspore Cultures of Rye (*Secale cereale* L.) // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2020. – Vol. 140, № 3. – Pp. 577–592. DOI: 10.1007/s11240-019-01754-9.
29. *Żur I., Dubas E., Krzewska M. et al.* Glutathione Provides Antioxidative Defence and Promotes Microspore-derived Embryo Development in Isolated Microspore Cultures of Triticale (\times *Triticosecale* Wittm.) // *Plant Cell Reports*. – 2019. – Vol. 38. – Pp. 195–209. DOI: 10.1007/s00299-018-2362-x.

FACTORS AFFECTING GYNOGENESIS INDUCTION IN CUCUMBER (*CUCUMIS SATIVUS* L.) THROUGH OVARY CULTURE

E.V. OSMININA, A.V. VISHNYAKOVA, Y.T. EYDLIN, E.R. MURZINA,
A.A. MIRONOV, D.D. LISOVAYA, S.G. MONAKHOS

(Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy)

Improving the efficiency of doubled haploid technology is an urgent task to expand the possibilities of fundamental research and to increase the selection rate of commercial F1 hybrids. This study investigated the effect of the components of the induction nutrient medium:

casein hydrolyzate (250 mg/l and 500 mg/l), glutathione (10 mg/l), a combination of growth regulators TDZ (0.04 mg/l) and 2,4-D (0.15 mg/l) on the gynogenic response of cucumber in unfertilized ovules culture. The results showed that the addition of 250 mg/l of casein hydrolyzate to the induction medium resulted in a more than twofold increase in the frequency of gynogenic ovules in two samples. The addition of 10 mg/l of glutathione to the induction medium helps to increase the frequency of gynogenic ovules by 1.5 to 2 times in 3 out of 6 samples. The results showed that cultivation of cucumber ovary fragments on the induction medium supplemented with 0.5 mg/l of putrescine leads to decrease in frequency of gynogenic ovules. The obtained data on the influence of the components of the induction medium in the culture of ovules can be used to optimize the technology for the production of doubled haploids in cucumber.

Keywords: cucumber, *Cucumis sativus* L., gynogenesis, doubled haploids, ovule culture, frequency of gynogenic induction.

References

1. Vishnyakova A.V., Aleksandrova A.A., Monakhos S.G. Factors of direct germination of microspore derived embryos of *Brassica napus* L. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy (TAA)*. 2022;1(6):43–53. (In Russ.) <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2022-6-43-53>
2. Grigolava T.R., Vishnyakova A.V., Sinitsyna A.A., Voronina A.V. et al. Methodological approaches for producing doubled haploids in sugar beet and red beet (*Deta vulgaris* L.). *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(3):276–283. (In Russ.) <https://doi.org/10.18699/VJ21.031>
3. Domblides E.A., Shmykova N.A., Belov S.N., Korotseva I.B., Soldatenko A.V. DH-plant production in culture of unpollinated ovules of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Vegetable crops of Russia*. 2019;(6):3–9. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-6-3-9>
4. Osminina E.V., Monakhos S.G. Peculiarities of gynogenesis induction in culture of isolated seed bracts and ovary fragments of *Cucumis sativus* L. *Mezhdunarodnaya nauchnaya konferentsiya molodykh uchyonykh i spetsialistov, posvyashchyonnaya 135-letiyu so dnya rozhdeniya A.N. Kostyakova. June 06–08, 2022*. Moscow, Russia: Russian State Agrarian University-Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev, 2022;2:301–304. (In Russ.)
5. Shmykova N.A., Khimich G.A., Korotseva I.B., Domblides 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>
6. Ahmad N., Anis M. In vitro mass propagation of *Cucumis sativus* L. from nodal segments. *Turkish journal of botany*. 2005;29(3):237–240.
7. Baktetur G., Keles D., Kara E., Yıldız S., Taskın H. Effects of genotype and nutrient medium on obtaining haploid plants through ovary culture in cucumber. *Molecular Biology Reports*. 2022;49(6):5451–5458.
8. Bednarek P.T., Orłowska R., Mankowski D.R., Zimny J. et al. Glutathione and copper ions as critical factors of green plant regeneration efficiency of triticale in vitro anther culture. *Frontiers in Plant Science*. 2022;13:926305. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.926305>
9. Deng Y., Tang B., Zhou X., Fu W. et al. Direct regeneration of haploid or doubled haploid plantlets in cucumber (*Cucumis sativus* L.) through ovary culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2020;142(2):253–268.

10. Diao W.P., Jia Y.Y., Song H., Zhang X.Q. et al. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. *Scientia Horticulturae*. 2009;119(3):246–251.
11. Dong Y.Q., Zhao W.X., Li X.H., Liu X.C. et al. Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. *Plant Cell Reports*. 2016;35:1991–2019.
12. Elmeer K.E.S. Factors regulating somatic embryogenesis in plants. In: *Somatic embryogenesis and gene expression*. New Delhi, India: Narosa Publishing House, 2013:56–81.
13. Erol M.H., Sari N. The effect of ovule-ovary culture and spermidine-putrescine applications on haploid embryo induction of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Alatarim*. 2019;18(2):108–117.
14. Gemes-Juhasz A., Balogh P., Ferenczy A., Kristof Z. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on in vitro gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Reports*. 2002;21:105–111.
15. Golabadi M., Ghanbari Y., Keighobadi K., Ercisli S. Embryo and callus induction by different factors in ovary culture of cucumber. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2017;90:68–75 <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2017.090.010>
16. Li J.W., Si S.W., Cheng J.Y., Li J.X. et al. Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus*. *Biologia Plantarum*. 2013;57(1):164–168.
17. Shalaby T.A., Skalova D., Ondrej V., Dolezalova I. et al. Factors affecting haploid induction through in vitro gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). *Scientia Horticulturae*. 2007;115(1):1–6. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.07.008>
18. Skalova D., Ondrej V., Dolezalova I., Navratilova B., Lebeda A. Polyploidization facilitates biotechnological in vitro techniques in the genus *Cucumis*. *BioMed Research International*. 2010;2010:475432. <https://doi.org/10.1155/2010/475432>
19. Sriskandarajah S., Sameri M., Lerceteau-Köhler E., Westerbergh A. Increased recovery of green doubled haploid plants from barley anther culture. *Crop Science*. 2015;55(6):2806–2812. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.04.0245>
20. Tang F. In vitro production of haploid and doubled haploid plants from pollinated ovaries of maize (*Zea mays*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2006;84:233–237.
21. Tantasawat P.A., Sorntip A., Poolsawat O. et al. Evaluation of factors affecting embryo-like structure and callus formation in unpollinated ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus*). *International Journal of Agriculture and Biology*. 2015;17(3):613–618. <https://doi.org/10.17957/ijab.17.3.14.257>
22. Thiruvengadam M., Chung I.M. Phenolic compound production and biological activities from in vitro regenerated plants of gherkin (*Cucumis anguria* L.). *Electronic Journal of Biotechnology*. 2015;18(4):295–301.
23. Thiruvengadam M., Rekha K.T., Jayabalan N. et al. Effect of exogenous polyamines enhances somatic embryogenesis via suspension cultures of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb. ex. Willd.). *Australian Journal of Crop Science*. 2013;7(3):446–453.
24. Wędzony M., Forster B.P., Żur I. et al. Progress in doubled haploid technology in higher plants. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. 2009:1–33.
25. Yeob Lee S., Ho Lee J., Oh Kwon T. Selection of salt-tolerant doubled haploids in rice anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003;74:143–149.
26. Zeng A., Song L., Cui Y., Yan J. Reduced ascorbate and reduced glutathione improve embryogenesis in broccoli microspore culture. *South African Journal of Botany*. 2017;109:275–280. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.01.005>

27. Zhu Y., Sun D., Deng Y. Regeneration of double haploid plants from unpollinated ovary cultures of watermelon. *Research Square*. 2019. <https://doi.org/10.21203/rs.2.14098/v1>
28. Zieliński K., Zieliński K., Krzewska M. et al. The effect of glutathione and mannitol on androgenesis in anther and isolated microspore cultures of rye (*Secale cereale* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2020;140(3):577–592. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01754-9>
29. Žur I., Dubas E., Krzewska M. et al. Glutathione provides antioxidative defence and promotes microspore-derived embryo development in isolated microspore cultures of triticale (\times *Triticosecale* Wittm.). *Plant Cell Reports*. 2019;38:195–209. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2362-x>

Сведения об авторах

Осминина Екатерина Васильевна, ассистент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976–41–71; e-mail: e.osminina@rgau-msha.ru

Вишнякова Анастасия Васильевна, канд. с.-х. наук, доцент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976–41–71; e-mail: a.vishnyakova@rgau-msha.ru

Эйдлин Яков Тарасович, ассистент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976–41–71; e-mail: ya.eidlin@rgau-msha.ru

Мурзина Эльвира Рафаэлевна, ассистент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976–41–71; e-mail: e.murzina@rgau-msha.ru

Миронов Алексей Александрович, канд. с.-х. наук, доцент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976–41–71; e-mail: a.mironov@rgau-msha.ru

Лисовая Дарья Дмитриевна, ассистент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976–41–71; e-mail: d.lisovaya@rgau-msha.ru

Монахос Сократ Григорьевич, д-р с.-х. наук, профессор, заведующий кафедрой ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976–41–71; e-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru

Information about the authors

Ekaterina V. Osminina, Assistant at the Department of Botany, Plant Breeding and Seed Technology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; e-mail: e.osminina@rgau-msha.ru)

Anastasiya V. Vishnyakova, CSc (Agr), Associate Professor at the Department of Botany, Plant Breeding and Seed Technology, Russian State Agrarian University – Moscow

Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; e-mail: a.vishnyakova@rgau-msha.ru)

Yakov T. Eydlin, Assistant at the Department of Botany, Plant Breeding and Seed Technology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; e-mail: ya.eidlin@rgau-msha.ru)

Elvira R. Murzina, Assistant at the Department of Botany, Plant Breeding and Seed Technology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; e-mail: e.murzina@rgau-msha.ru)

Aleksey A. Mironov, CSc (Agr), Associate Professor, Associate Professor at the Department of Botany, Plant Breeding and Seed Technology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; e-mail: a.mironov@rgau-msha.ru)

Daria D. Lisovaya, Assistant at the Department of Botany, Plant Breeding and Seed Technology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; e-mail: d.lisovaya@rgau-msha.ru)

Sokrat G. Monakhos, DSc (Agr), Professor, Head of the Department Botany, Plant Breeding and Seed Technology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; phone: (499) 976–41–71; E-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru)