УДК: 635.63: 631.527: 631.544

МЕТОД ВИРОЩУВАННЯ АПОМІКТИЧНОГО НАСІННЯ СЕЛЕКЦІЙНО-ЦІННИХ ГЕНОТИПІВ ОГІРКА ПОСІВНОГО (*Cucumis sativus* L.)

С. І. КОНДРАТЕНКО[1], кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник

О. П. САМОВОЛ[1], доктор сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник

О. В. СЕРГІЄНКО[1], кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник

П. Г. ДУЛЬНЄВ[2], кандидат хімічних наук, старший науковий співробітник

Т. М. ЗАМИЦЬКА[1], лаборант

[1] ***Інститут овочівництва і баштанництва НААН України***

E-mail: ovoch.iob@gmail.com

[2] ***Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України***

E-mail: users@bpci.kiev.ua

Анотація. *Наведено результати досліджень з розробки методу індукції росту та формування апоміктичного насіння огірка посівного (Cucumis sativus L.). Встановлено, що на ініціацію росту апоміктичного насіння суттєвий вплив має реакція лінійного генотипу огірка. Виділено 3 селекційно-цінні лінії партенокарпічного типу, у яких впродовж 2-х років (2016-2017 рр.) вдалося стабільно отримувати повністю виповнене апоміктичне насіння з високими посівними якостями на рівні 84-92 % за умов пророщування у горщиковій розсаді. Встановлено, що за кількістю сформованого насіння апоміктичний метод розмноження значно поступається (у 12-22 рази) традиційному методу розмноження, який ґрунтується на інцухтуванні лінійного матеріалу. Але з селекційної точки зору цінність апоміктичного насіння є набагато вищою, оскільки вирощені з нього рослини є потенційними диплоїдними гомозиготами.*

Ключові слова: *огірок, партенокарпічна лінія, апоміктичний агент, апоміктичне насіння, дисперсійний аналіз*

Актуальність. На теперішній час у сортовій і гібридній селекції огірка використовується досить трудомісткий за кількістю операцій та часовою тривалістю спосіб генетичної стабілізації селекційного матеріалу, який ґрунтується на проведенні примусового самозапилення сортолінійних популяцій та їх наступному генетичному аналізі на гомозиготність [1]. Оскільки огірок є перехреснозапильною культурою досягти абсолютного вирівнювання ліній

вищевказаним способом практично не можливо. Тому для підвищення результативності селекційного процесу існує нагальна потреба у розробці більш ефективних та прискорених способів генетичної стабілізації селекційно-цінного матеріалу. З експериментальної практики відомий біотехнологічних метод прискореного створення гомозиготних форм огірка, які одержують з гаплоїдних регенерантів [2-4]. Даний спосіб передбачає культивування ізольованих пиляків на штучних поживних середовищах *in vitro* [2]. Недоліком цього методу є те, що утворення регенерантів методом прямого чи непрямого ембріогенезу (через проходження стадії калюсогенезу) може відбуватись із соматичних клітин пиляка, які мають диплоїдний набір хромосом і не забезпечують гомозиготності отриманого матеріалу. На відміну від вищевказаного способу використання індукованого апоміксису практично виключає помилкові результати і гарантує 100 % одержання диплоїдних гомозигот. У наших дослідженнях, проведених протягом 2016-2017 років випробувалися різні варіанти одержання апоміктичного насіння огірка, запропоновані в літературі для інших видів рослин. Зокрема, проводилися досліди, у яких передбачалася обробка незапліднених жіночих квіток водною сумішшю регуляторів росту (гібереліну та цитокініну) за рекомендаціями Курбатова [5]. Проте, такий варіант обробки стимулював у всіх досліджених селекційно-цінних генотипів огірка виключно партенокарпічний ріст плодів без формування фізіологічно повноцінного, виповненого насіння.

Мета – розробити альтернативний спосіб генетичної стабілізації селекційно-цінних генотипів огірка посівного (*Cucumis sativus* L.) за рахунок запропонованого методу вирощування апоміктичного насіння.

Методи. Для одержання апоміктичного насіння у гермафродитних або гіномоноеноційних форм рослин огірка, заздалегідь, за добу до розкриття, ізолювали жіночі квітки пергаментними ізоляторами. Наступної доби з жіночих квіток видаляли пергаментні ізолятори і піддавали обробці за розробленою авторами статті методикою [6], у відповідності до якої спочатку на приймочки квіток наносили пилок, взятий з чоловічих квіток рослин люфи циліндричної (*Luffa cylindrical* (L.) M. Roem. родини *Cucurbitaceae*), яка є несумісною з видом *Cucumis*

sativus L. Потім за допомогою мікропіпетки на приймочки жіночих квіток наносили 10-30 мкл апоміктичного агенту, який складався з водної суміші регуляторів росту – гіберелової кислоти ($ГК_3$), синтетичного аналогу цитокініну (БАП) та препарату вітчизняного виробництва Д-1СЛ, синтезованому в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України [6].

Оброблені вищевказаним способом жіночі квітки огірка ізолювали від решти пергаментними ізоляторами на 2 доби – достатній період часу, після якого приймочки жіночих квіток втрачали здатність до сприйняття пилку від рослин свого виду. Для одержання апоміктичного насіння використовували добре розвинуті рослини огірка з уже сформованим третім або четвертим міжвузлям. Після зняття ізоляторів проводили спостереження за динамікою росту насіннєвих плодів до їх повного визрівання.

Запропонований спосіб одержання апоміктичного насіння був апробований на селекційно-цінних зразках огірка партенокарпічного типу селекції Інституту овочівництва і баштанництва НААН протягом 2016-2017 років. Як об’єкти досліджень використовувалися лінії партенокарпічного типу – [F_5I_5 Голубчик], [F_6I_5 Кузнечик], [$F_{10}I_5$ Маринда] і $F_8I_6N_{11}$. Наприкінці репродуктивної фази розвитку рослин проводився облік насіннєвої продуктивності рослин вищевказаних ліній за різних варіантів формування насіннєвого матеріалу – шляхом комбінованої обробки незапліднених жіночих квіток чужорідним пилком і апоміктичним агентом та шляхом інцухтування (контрольний варіант). Дослід проводився в умовах скляної теплиці без обігріву. Експериментальні зразки рослини огірка отримували розсадним способом за загальноприйнятою методикою [1].

Результати. Узагальнені дані за результатами проведених біотестів запропонованого методу апоміктичної обробки жіночих квіток огірка зведені у таблиці 1. Серед 4-х лінійних генотипів, у яких проводилася дана обробка виявлено повністю сформоване насіння у плодах рослин, похідних від 3 ліній – $F_8I_6N_{11}$ (156 повністю виповнених насінин, зібраних з 14 плодів), [$F_{10}I_5$ Маринда] (166 насінин, зібраних з 10 плодів) і [F_5I_5 Голубчик] (130 насінин, зібраних з 10 плодів) (табл. 1). Згідно одержаних даних у контрольному варіанті досліду, де

1. Кількість сформованого апоміктичного насіння у плодах рослин ліній огірка, які виявилися сприйнятливими на комбіновану обробку незапліднених жіночих квіток апоміктичним агентом та пилком люфи циліндричної (*Luffa cylindrical* (L.) M. Roem.) **(2016-2017 рр.)**

Зразок	Метод розмноження	Кількість сформованих насіннєвих плодів, шт.	Загальна кількість сформованого насіння, шт.		Кількість насіння, сформованого у насіннєвих плодах, шт.		Вага 1000 шт. насінин, г
			виповнене	не виповнене	виповнене	не виповнене	
Лінія [F_5I_5 Голубчик]	інцухтування (контроль)	10	2810	59	281,22	5,91	32,21
	апоміктична обробка	10	130	380	13,04	38,12	18,24
	$НІР_{0,05}$		-	-	45,16	8,56	3,12
Лінія [$F_{10}I_5$ Маринда]	інцухтування (контроль)	10	1983	58	198,31	5,83	36,55
	апоміктична обробка	10	166	188	16,60	18,81	28,90
	$НІР_{0,05}$		-	-	34,62	6,24	13,16
Лінія $F_8I_6N_{11}$	інцухтування (контроль)	14	3281	186	234,36	13,29	25,01
	апоміктична обробка	14	156	225	11,4	16,07	29,44
	$НІР_{0,05}$		-	-	38,93	7,88	9,19

проводилось розмноження відібраних ліній методом інцухтування, показник “кількість виповненого насіння” варіював в межах 198,31 ÷ 281,22 шт. При цьому середня кількість невиповненого насіння варіювала в межах 5,83 ÷ 13,29 шт. За співвідношенням невиповнене насіння складало 2,92 ÷ 5,67 % від загальної кількості вирощеного насіння трьох досліджених ліній.

Як свідчать дані таблиці 1, сформоване апоміктичне насіння завжди суттєво, статистично достовірно, поступалося за кількістю від насіння, яке було утворене внаслідок інцухтування. Зокрема, за показником “середня кількість виповненого насіння” дана перевага для лінії [F_5I_5 Голубчик] становила 22,08 рази, для лінії [$F_{10}I_5$ Маринда] – 11,95 рази і лінії $F_8I_6N_{11}$ – 20,57 рази. Привертає на себе увагу, також, експериментальний факт кількості невиповненого насіння, яке було одержане за різних методів розмноження. А саме, у варіанті досліду з використанням апоміктичного методу розмноження даний відсоток є набагато вищим і складав для лінії [F_5I_5 Голубчик] – 74,51 %, лінії [$F_{10}I_5$ Маринда] – 57,11 % і лінії $F_8I_6N_{11}$ – 59,06 %. Але, не зважаючи на це, менша кількість повноцінно сформованого апоміктичного насіння має набагато цінніший для селекційної роботи генетичний матеріал, оскільки, вирощені з них рослини є потенційними диплоїдними гомозиготами з максимальним проявом генетичної стабілізації вихідного матеріалу, одержаного протягом одного покоління. На противагу, метод інцухтування дає можливість досягти неповного генетичного вирівнювання селекційного матеріалу на протязі 5-6 поколінь.

Результати біотестів запропонованого методу одержання апоміктичного насіння були піддані статистичній обробці з застосуванням двохфакторного дисперсійного аналізу. При цьому, як результативні, використовувалися послідовно три ознаки: “кількість виповненого насіння”; “кількість невиповненого насіння”; “вага 1000 шт. насінин”. Відповідно, фактор А відображав реакцію ліній огірка, у яких вдалося отримати апоміктичне насіння (3 градації), фактор В – різні методи розмноження (2 градації). Основні результати дисперсійного аналізу зведені у таблицях 2-4, де відображені розрахунки оцінки впливу кожного з досліджених факторів на результативні ознаки.

Як свідчать дані таблиці 2 на прояв ознаки “середня кількість виповненого насіння” статистично достовірною (на рівні значущості $p < 0,05$) виявилася дія усіх досліджених факторів та їх взаємодія. Найбільш суттєвим виявився фактор В (85,74 %), тобто застосовані методи розмноження. При цьому фактор А, за своїм впливом істотно поступався (1,78 %).

2. Оцінка впливу на прояв ознаки “кількість виповненого насіння” відібраних лінійних генотипів огірка (фактор А) та різних методів їх розмноження (фактор В)

Джерело варіації	Девіати	Ступінь свободи	Дисперсія	$F_{факт.}$	$F_{теор.}$. ($p < 0,05$)	Вплив фактору η, %
Фактор А	15714,08	2,0	7857,04	5,15	3,20	1,78
Фактор В	758700,13	1,0	758700,13	496,90	4,10	85,74
Взаємодія факторів АВ	18619,36	2,0	9309,68	6,10	3,20	2,10

За даними таблиці 3 на прояв ознаки “кількість невиповненого насіння” статистично достовірною (на рівні значущості $p < 0,05$), також, виявилася дія усіх досліджених факторів, але найбільш суттєвою була їх взаємодія (30,07 %). Тобто на прояв даної ознаки мала істотний вплив не тільки генетична реакція ліній огірка, але й застосовані методи їх розмноження. Вплив фактору В, тобто методу розмноження, також, виявився вагомим (27,61 %).

Аналіз дії факторів на прояв ознаки “вага 1000 шт. насінин” засвідчив статистично достовірно лише взаємодію факторів А і В (14,58 %). Окремо взяті фактори істотного значення не мали (табл. 4).

Вирощене апоміктичне насіння з усіх досліджених лінійних генотипів огірка відзначалося високою схожістю на рівні 84-92 % за умов проростання у горщиковій розсаді. Одержані рослини-апомікти кожної лінії відзначалися дружністю достигання і не мали аномальних відхилень у процесу органогенезу за період проходження вегетативної і репродуктивної фаз розвитку на рівні рослин, які розмножувалися традиційним методом інцухтування. Таким чином, результати варіаційного і дисперсійного аналізу підтверджують високу ефективність

запропонованого нами методу вирощування апоміктичного насіння огірка і можуть бути рекомендовані для впровадження у селекційну практику.

3. Оцінка впливу на прояв ознаки "кількість невиповненого насіння" відібраних лінійних генотипів огірка (фактор А) та різних методів їх розмноження (фактор В)

Джерело варіації	Девіати	Ступінь свободи	Дисперсія	$F_{факт.}$	$F_{теор.}$. ($p < 0,05$)	Вплив фактору η, %
Фактор А	1106,43	2,0	553,22	8,81	3,20	10,54
Фактор В	2898,15	1,0	2898,15	46,13	4,10	27,61
Взаємодія факторів АВ	3156,70	2,0	1578,35	25,12	3,20	30,07

4. Оцінка впливу на прояв ознаки "вага 1000 шт. насінин" відібраних лінійних генотипів огірка (фактор А) та різних методів їх розмноження (фактор В)

Джерело варіації	Девіати	Ступінь свободи	Дисперсія	$F_{факт.}$	$F_{теор.}$. ($p < 0,05$)	Вплив фактору η, %
Фактор А	566,82	2,0	283,41	3,0	3,20	7,51
Фактор В	379,56	1,0	379,56	4,02	4,10	5,03
Взаємодія факторів АВ	1100,70	2,0	550,35	5,83	3,20	14,58

Висновки і перспективи. Встановлено можливість індукції росту незапліднених насіннєвих зародків огірка за рахунок екзогенної стимуляції росту, яка досягається тим, що на приймочки незапилених жіночих квіток спочатку наносять пилок, взятий від рослин люфи циліндричної (*Luffa cylindrical* (L.) M. Roem.), яка є несумісною з видом *Cucumis sativus* L., а потім на приймочки жіночих квіток наносять апоміктичний агент, який складається з водної суміші регуляторів росту – $ГК_3$, БАП та препарату вітчизняного виробництва Д-1СЛ. Встановлено, що на ініціацію росту апоміктичного насіння суттєвий вплив має реакція генотипу рослини. Серед чотирьох досліджених ліній виділено три, сприйнятливі на запропоновану апоміктичну обробку – [F_5I_5 Голубчик], [$F_{10}I_5$ Маринда] і $F_8I_6N_{11}$. За

два роки досліджень від трьох ліній одержане апоміктичне насіння загальною кількістю 452 шт. Встановлено, що на прояв ознаки “кількість виповненого насіння” найбільш суттєвим був фактор, пов'язаний зі методом розмноження (сила впливу η = 85,74 %), на прояв ознаки “вага 1000 шт. насінин” виявлено тільки статистично достовірну взаємодію двох факторів – реакції генотипу і методу розмноження (η = 14,58 %). Таким чином, у проведених дослідженнях підтверджено високу ефективність запропонованого методу вирощування апоміктичного насіння, широке впровадження якого у селекційну практику дозволить прискорити у 2-4 рази генетичну стабілізацію вихідного матеріалу за рахунок заміни методу інцухтування на апоміктичне розмноження.

Список використаних джерел

1. Лісіцин В. М., Плужнікова Л. Є., Марченко О. З., Гаус Є. Г., Непорожня Є. А. Огірок (*Cucumis sativus* L.) / В. М. Лісіцин. *Сучасні методи селекції овочевих і баштанних культур*. Харків, 2001. С. 311-362.

2. Шмыкова Н. А. Разработка системы биотехнологических методов, направленных на ускорение селекционного процесса овощных культур : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра с.-г. наук : 03.00.20. Москва, 2006. 48 с.

3. Effect of optimal stage 569 of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.) / Gemes-Juhasz A. et. al. *Plant Cell Rep*. 2002. V. 21. P. 105–111.

4. Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus* / L i J.W. et. al. *Biologia Plantarum*. 2013. V. 57(1). P. 164–168.

5. Способ получения гомозиготных диплоидов сельскохозяйственных культур : пат. 2035134 Российская Федерация : МПК А01Н 1/04, А 01N 43/40, 61/00. № 4928829/13 ; заявл. 23.01.91 ; опубл. 20.05.95, Бюл. № 14.

6. Селекція овочевих рослин: теорія і практика / Кравченко В. А. та ін. ; за ред. В.А. Кравеченка і З. Д. Сича. Вінниця, 2013. 364 с.

References

1. Lisitsin, V. N. (2001). Ogirok (*Cucumis sativus* L.) [Cucumber (*Cucumis sativus* L.)]. Modern methods of breeding of vegetable and melon cultures. Kharkiv, 311-362.

2. Shmikova, N. A. (2006). Razrabotka sistemi biotehnologicheskih metodov, napravlennih na uskoreniye selektsionnogo protcessa ovoshnih kultur [Development of a system of biotechnological methods aimed at accelerating the breeding process of vegetable crops]. Moscow, 48.

3. Gemes-Juhasz, A. (2002). Effect of optimal stage 569 of female gametophyte and heat treatment on in vitro gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell Rep., 21, 105-111.

4. J. W., Li, S. W., Si, Cheng, J. Y., Li, J. X., Liu, J. Q. (2013). Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus*. Biologia Plantarum, 57(1), 164-168.

5. Kurbatov V. G. (1995). Method for obtaining homozygous diploids of crops. The patent of the Russian Federation for invention. A01H 1/04, A 01N 43/40, 61/00. № 4928829/13; declared 23.01.1991; published 20.05.1995, № 14.

6. Kondratenko, S. I., Kravchenko, V. A., Sich, Z. D., Korniyenko, S. I., Gorova, T. K., Zhuk, O. Ya. (2013). Selectsiya ovochevih roslin: teoriya i praktika [Breeding of vegetable plants: theory and practice]. Vinnitsa, LLC "Nilan-LTD", 364.

МЕТОД ВЫРАЩИВАНИЯ АПОМИКТИЧЕСКИХ СЕМЯН СЕЛЕКЦИОННО-ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ ОГУРЦА ПОСЕВНОГО (CUCUMIS SATIVUS L)

С. И. Кондратенко, А. П. Самовол, О. В. Сергиенко, П. Г. Дульнєв, Т. Н. Замицкая

Аннотация. *Приведены результаты исследований по разработке метода индукции роста и формирования апомиктических семян огурца посевного (Cucumis sativus L.). Установлено, что на инициацию роста апомиктических семян существенное влияние имеет реакция линейного генотипа огурца. Выделено три селекционно-ценные линии партенокарпического типа, у которых в течение 2-х лет (2016-2017 гг.) удалось стабильно получать полностью выполненные апомиктические семена с высокими посевными качествами на уровне 84-92% при проращивании в горшечных рассаде. Установлено, что по количеству сформированных семян апомиктический метод размножения значительно уступает (в 12-22 раза) традиционному методу размножения, основанному на инцухтировании линейного материала. Однако с селекционной точки зрения ценность апомиктических семян намного выше, поскольку выращенные из них растения являются потенциальными диплоидными гомозиготами.*

Ключевые слова: *огурец, партенокарпическая линия, апомиктический агент, апомиктические семена, дисперсионный анализ.*

GROWING'S METHOD OF APOMICTIC SEEDS OF CUCUMBER'S (*CUCUMIS SATIVUS* L.) VALUABLE GENOTYPES FOR BREEDING PURPOSES

S. I. Kondratenko, O. P. Samovol, O. V. Sergienko, P. G. Dulnev, T. N. Zamitskaya

Abstract. *The results of studies on the development of a method for induction of growth and the formation of apomictic seeds of a cucumber seed (Cucumis sativus L.) are presented. It was established that the initiation of growth of apomictic seeds the reaction of*

the linear genotype of a cucumber has a significant effect. Three valuable lines of parthenocarpic type for breeding purposes have been singled out, in which, within 2 years (2016-2017), it was possible to consistently obtain fully-made apomictic seeds with high seeding qualities at a level of 84-92 % when germinated in potted seedlings. It has been established that the apomictic method of reproduction is considerably inferior (by 12-22 times) to the traditional method of reproduction, based on the inbreeding of linear material, according to the number of seeds formed. Nevertheless, for breeding goals the value of apomictic seeds is much higher, because the plants grown from them are the potential diploid homozygotes.

Key words: *cucumber, parthenocarpic line, apomictic agent, apomictic seeds, variance analysis*