

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК  
ІНСТИТУТ ОВОЧІВНИЦТВА І БАШТАННИЦТВА**

**БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ СПОСІБ ПОДОЛАННЯ ПОСТГАМНОЇ  
НЕСУМІСНОСТІ ПРИ МІЖВИДОВІЙ ГІБРИДИЗАЦІЇ  
ГАРБУЗА В КУЛЬТУРІ *IN VITRO***

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

**Харків, 2015**

**УДК 635.62:631.527:631.147**

До друку рекомендовано рішенням вченої ради Інституту овочівництва і баштанництва НААН, протокол № 14 від 28 жовтня 2015 р.

**Біотехнологічний спосіб подолання постгамної несумісності при міжвидовій гібридизації гарбуза в культурі *in vitro* (Методичні рекомендації)** / [Івченко Т. В., Корнієнко С. І., Колесник І. І. та ін.] – Х.: Плеяда, 2015. – 28 с.

**Авторський колектив:** Т.В. Івченко, С.І. Корнієнко, І.І. Колесник, Г.В. Мозговська, Т.І. Віцєня

В методичних рекомендаціях викладено питання створення і прискореного розмноження вихідного матеріалу для селекції сортів і гібридів гарбуза з використанням методів культури ізольованих тканин; вимоги до проведення лабораторних робіт, приготування поживних середовищ, які використовують для клонального розмноження, ембріокультури, зберігання колекцій *in vitro*.

Методичні рекомендації можуть бути використані фахівцями-біотехнологами під час проведення дослідницьких робіт з овочевими рослинами, селекціонерами, насіннярами, а також студентами, викладачами, аспірантами, які займаються створенням вихідного матеріалу для селекції і насінництва.

**Рецензенти:** Кондратенко С. І. , кандидат біол. наук,  
Сергієнко О. В., кандидат с.-г. наук

Відповідальні за випуск: Терьохіна Л.А., канд. с.-г. наук, с.н.с.  
Вітанов О.Д.

© Інститут овочівництва і баштанництва НААН, 2015

# ЗМІСТ

Стор.

Перелік умовних позначень і скорочень

Вступ

1. Ботаніко-біологічні і господарські характеристики рослин роду *Cucurbita* L.

2. Генофонд роду *Cucurbita* L.

3. Напрями селекції гарбуза та прийоми подолання несумісності при міжвидових схрещуваннях

4. Практична частина

4.1. Польові дослідження

4.2. Використання технології *in vitro* для розмноження міжвидових гібридів гарбуза

4.2.1. Стерилізація і садіння недорозвиненого насіння гарбуза

4.2.2. Розмноження рослин міжвидових гібридів гарбуза

в культурі *in vitro*

4.2.3. Адаптації пробіркових рослин гарбуза до умов *in vivo*

4.3. Детекція міжвидових гібридів

5. Методичні засади організації робіт в лабораторії біотехнології

5.1. Основні вимоги до лабораторії

5.2. Приготування штучних живильних середовищ

Бібліографія

Додатки

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

ІО<sub>ц</sub>К – Р-індолілоцтова кислота;

НО<sub>ц</sub>К – α-нафтилоцтова кислота;

ІО<sub>л</sub>К – індолілолійна кислота;

БАП – 6-бензиламінопурін;

MS – поживне середовище за Murashige, Skoog (1962);

B5 – поживне середовище за Gamborg та ін. (1968);

В<sub>1</sub> – вітамін тіаміну-НСІ;

В<sub>6</sub> – вітамін піридоксин –НСІ;

РР – вітамін, нікотинова кислота;

С – аскорбінова кислота;

В<sub>0</sub> – фолієва кислота;

ГК – гіберелова кислота

## ВСТУП

Розробка наукових основ раціонального використання генофонду рослин є необхідною умовою сталого розвитку людства.

Ефективність селекції, насамперед, залежить від генетичної різноманітності вихідного матеріалу, його мінливості, ступеня вивченості морфо-біологічних і господарських ознак, характеру їх успадкування.

Для багатьох важливих сільськогосподарських рослин, в тому числі і для гарбуза, міжвидова гібридизація є ефективним способом залучення цінних господарських ознак в селекційну практику. Але можливості міжвидових схрещувань обмежуються через існування бар'єрів несхрещуваності між різними видами роду *Cucurbita*, які ускладнюють отримання фертильних гібридів.

Для подолання існуючих бар'єрів несхрещуваності ефективним є комплексне поєднання селекційних і біотехнологічних методів на етапах запилення, запліднення і розвитку ембріонів. Культивування ізольованих зародків, як метод подолання постгамної несумісності, застосовується при отриманні міжвидових, міжродових гібридів у більш, ніж 30 видів рослин, в тому числі багатьох плодових, овочевих, декоративних, кормових і зернових культур. Такий підхід забезпечує можливість оптимізації всіх етапів з розмноження рослин в культурі ізольованих клітин *in vitro*, яке можливо проводити в контрольованих лабораторних умовах упродовж всього року, не залежно від сезону.

Розроблений в ІОБ НААН інтегрований підхід для подолання бар'єрів несхрещуваності гарбуза є ефективним інструментом, застосування якого в селекційній практиці дозволяє створювати нові генетичні джерела і донори для селекції гарбуза. Використання біотехнологічних методів сприяє суттєвому підвищенню і прискоренню ефективності селекційного процесу.

Однак, високий рівень генетичної детермінованості процесів розвитку рослинного матеріалу в культурі ізольованих клітин і тканин *in vitro* обумовлює необхідність проводити оптимізацію методичних прийомів для кожної окремої культури і її гібридної комбінації.

# 1. БОТАНІКО-БІОЛОГІЧНА І ГОСПОДАРСЬКА ХАРАКТЕРИСТИКА РОСЛИН РОДУ *CUCURBITA* L.

Гарбуз є однією з найбільш цінних сільськогосподарських культур. Його плоди і насіння є незамінними дієтичними і лікувальними продуктами у раціоні людини, а також цінною сировиною для виробництва дитячого харчування, соків, пюре, є якісними компонентами кормових раціонів у тваринництві. Лідуюче місце у виробництві гарбуза у світі займають країни Азії, такі як Китай, Індія і Корея (71%).

Гарбуз – однорічна трав'яниста рослина з довгим (до 15 м) сланким стеблом і потужною кореневою системою з високою сисною силою, що дозволяє використовувати вологу з глибоких горизонтів ґрунту і витримувати тимчасову посуху. Корінь стрижневий, сильно розгалужений, основна маса його розташовується у верхньому шарі ґрунту [1].

Підвищена вимогливість гарбуза до вологості ґрунту обумовлена дуже розвиненою листовою поверхнею (більше 30 м<sup>2</sup>), через яку випаровується велика кількість води. Транспіраційний коефіцієнт у гарбуза – 748 одиниць. Листки великі, без прилистків, з довгими черешками і грубим опушенням. Квітки роздільностатеві, однодомні, з сильним запахом, розпускаються рано вранці. Перші жіночі квітки починають цвісти на головному стеблі. Запилюються тільки комахами, в основному бджолами. У період цвітіння на рослині гарбуза може закладатися до 100 чоловічих квіток і 30 жіночих. Чоловічі квітки починають цвісти на 2–5 днів раніше, ніж жіночі [2].

Плід гарбуза – багатонасінна ягода різноманітної форми і забарвлення. М'якоть соковита, товста, забарвлення від світло-кремового до червоно-помаранчевого. Насіння велике, коротко- або видовженооформної форми, білого, кремового та жовтого кольору.

Гарбузи є гарним джерелом вуглеводів, жирів, білка, мінеральних солей та вітамінів. Дефіцит поживних речовин та, як наслідок, виникнення захворювань у людини можна попередити шляхом введення в щоденний раціон плодів гарбуза. Гарбузи завжди були і залишаються цінним дієтичним продуктом, який допомагає при захворюваннях печінки, нирок, жовчного міхура, екземи, опіках, гіпертонії та ін. Вживання соку гарбуза заспокоює нервову систему, втамовує спрагу, має легкий сечогінний ефект. Насіння гарбуза використовують як профілактичний засіб проти простатиту, воно покращує стан шкіри при вугровому висипу, допомагає вагітним жінкам впоратись із токсикозом. Віддавна гарбузове насіння це визнаний глистогінний засіб. У косметології гарбуз використовують у вигляді зволожуючих і поживних масок для шкіри обличчя і рук [3].

Залежно від виду і сорту плоди гарбуза містять 5 – 20% сухої речовини, 1,5–15%, вуглеводів, які представлені в основному полісахаридами. Гарбузи містять від 2,5 до 16% крохмалю, який під час зберігання переходить у розчинний цукор. Завдяки цьому плоди широко використовують на кондитерських фабриках для виготовлення цукатів та пастили. Характерною особливістю плодів гарбуза є низький вміст клітковини (0,3–1,2%), яка добре розварюється, не волокниста, а у вигляді поре легко засвоюється.

Білків у гарбузах мало (0,5–1,1%), проте вони багаті пектином (2,6–14,0%), який сприяє виведенню із організму людини холестерину. За вмістом протопектину гарбузи поступаються лише салату, перу цибулі, столовому буряку, квасолі [4].

Насіння гарбуза містить рослинну олію, багату за складом на вміст полінасичених жирних кислот. Найбільший інтерес для виробників представляють сорти голонасінного гарбуза. З 15–20 т плодів отримують 150–250 кг олії. Також в насінні містяться білки, фітостерини, каротиноїди, вітаміни, органічні кислоти, смоли, залізо, цинк, фосфор, магній [6].

Гарбузи – головне джерело каротину серед інших культур. Вміст цієї речовини від 16 до 38 мг/100 г сирого продукту. Каротину у гарбузах в 15 разів більше, ніж у кавунах, у 4 рази більше, ніж у дині. Чим яскравіше забарвлення м'якуша оранжево-жовтих сортів гарбуза, тим більше в ньому каротиноїдів. У столових середньо- та пізньостиглих сортах їх вміст у перші місяці зберігання підвищується. Для задоволення добової потреби дорослої людини у каротині необхідно з'їсти 50–60 г м'якоті, гарбузи є цінною сировиною для вітамінної промисловості, яка виготовляє концентрати із каротину [5].

Вітамінний склад плодів досить різноманітний. У м'якоті міститься тіамін (вітамін В – 0,04–0,06 мг/100 г), рибофлавін (вітамін В<sub>2</sub> – 0,03–0,06 мг/100 г), пантотенова кислота (вітамін В<sub>3</sub> – 0,2–0,4 мг/100 г), піридоксин (вітамін В<sub>6</sub> – 0,11–0,13 мг/100 г), фолієва кислота (вітамін В<sub>9</sub> – 4–19 мкг/100 г), нікотинова кислота (вітамін РР – 0,4–0,5 мг/100 г), аскорбінова кислота (вітамін С – 10,0–50,0 мг/100 г), метилметионін (вітамін U – 0,1мг/100 г), токоферол (вітамін Е) та вітамін D.

Багаті плоди гарбуза мінеральними солями, особливо калію (170–380 мг/100 г сирій речовини), заліза (0,4–0,8 мг), кальцію (м'якоть – 25–40 мг, насіння – 51 мг), фосфору (м'якоть – 25 мг, насіння – 1144 мг), натрію (4–14 мг), магнію (14 мг), міді (0,4–3,5 мг), кобальту (0,16 мг) [6].

Енергетична цінність 100 г плодів гарбуза наближається до капусти цвітної (121 кДж).

## 2. ГЕНОФОНД РОДУ *CUCURBITA* L.

**Рід Гарбуз (*Cucurbita* L.)** належить до родини Гарбузові (*Cucurbitaceae*). Він представлений п'ятьма культурними видами (*Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita mixta*, *Cucurbita ficifolia*) і шістнадцятьма дикорослими. В Україні, в основному, вирощують три види цього роду: гарбуз великоплідний – *Cucurbita maxima* Duch., гарбуз мускатний – *Cucurbita moschata* Duch. ex Poir., гарбуз звичайний – *Cucurbita pepo* L., які добре розрізняються за формою листків, плодів і насіння та практично не схрещуються між собою [2]. Більшість авторів дійшли висновку, що найбільш легко схрещуються між собою види мускатного та великоплідного гарбуза, натомість ці види важко схрестити із звичайним гарбузом [3].

**Гарбуз звичайний (*Cucurbita pepo* L.)** має ребристі стебла, покриті твердими і колючими шипами. Листя 5-лопатеві, з загостреними кінчиками. Квітки дзвонові з п'ятьма прямими зубцями, великі, поодинокі, одностатеві, жовті або помаранчеві. Чоловічі квітки – на довгих квітконіжках, жіночі – на коротких. Плоди досить великі, з твердою здерев'янілою екзодермою і вираженим рисунком.

Характерна особливість – дерев'яниста кора стиглих плодів. Плоди за формою бувають округлими, сплюснутими або еліпсоподібними. Одна з характерних видових ознак – ребристість плодоніжки. Насіння різного розміру, з чітким рубчиком, кремове. Цей вид включає і сорти, зовнішня оболонка насіння яких має вигляд плівки, так звані голонасінні. Маса 1000 шт. насіння – 180–230 г. Як баштанну, овочеву, кормову, декоративну і олійну культуру цей вид вирощують у Західній і Східній Європі, в Україні, Росії.

Вид *Cucurbita pepo* L. є найбільш широко розповсюдженим, і стародавнім. Гарбуз звичайний включає 4 підвиди: довгостебловий, кущовий, декоративний і дикоростучий. Сорти, які вирощують в Україні, відносяться до довгостеблового і кущового підвидів.

**Гарбуз великоплідний (*Cucurbita maxima* Duch.)** має циліндричні стебла довжиною до 5 м, з м'яким опушенням. Листки округло-ниркоподібні, слабокутасті. Чашолистки зростаються між собою, гострі. Пелюстки віночка зростаються між собою, з розширеними торочкуватими відігнутими краями. Кора м'яка, що сприяє зростанню плодів гігантських розмірів (рекорд у Книзі Гіннеса – 808 кг). За формою плоди переважно округлі і сплюснуті. Забарвлення найчастіше сіре однотонне, сіро-зелене, помаранчеве і червоне. Плоди виду легко відрізнити від інших за округлою



плодоніжкою. Насіння великоплідного гарбуза має два основних типи забарвлення – біле або жовто-кавове. У нього, на відміну від насіння звичайного і мускатного гарбуза, немає чіткого рубчика. Маса 1000 шт. насіння – 300–400 г. Гарбуз великоплідний споживають тільки в стиглому вигляді. Він більш холодостійкий і більш пізньостиглий видом, ніж звичайний гарбуз.

Гарбуз великоплідний найбільш космополітичний культурний вид. В середині виду розглядають 4 підвиди: старосвітський, американський, китайський і дикоростучий. В Україні вирощують сорти підвиду старосвітського гарбуза.

**Гарбуз мускатний (*Cucurbita moschata* Duch. ex Poir.)** має стебла з округлими гранями. Відрізняється від інших видів тонким стеблом, м'яким опушенням стебла і листків. Листки округло-ніркоподібні, 5–7-лопатеві, з верхньої сторони з білими плямами в кутах між жилками. Плодоніжка тверда, гладка, п'ятигранна, розширена до основи. Плоди різної форми, з м'якою корою (екзодермою) і плямистим малюнком. Насіння порівняно дрібне, кремово-сіре, з рубчиком, з характерною бахромчастою каймою. Маса 1000 шт. насіння – 130–200 г. Особливість плодів – високий вміст каротину. Це найбільш теплолюбний і пізньостиглий культурний вигляд, відносно стійкий до борошнистої роси та бактеріозу. У насінні міститься 30,5–45,9% олії. Мускатний гарбуз ділиться на шість підвидів з чіткою географічною локалізацією: туркестанський, північноамериканський, японський, індійській, мексиканський, колумбійський.

Знання географічної диференціації того чи іншого виду важливо для залучення в селекцію вихідного матеріалу з потрібними ознаками. Центр генетичної та ботанічної різноманітності роду *Cucurbita* – Америка. Болівія, південна частина Перу і північна Аргентина – центр походження *Cucurbita maxima*. Центр різноманітності *Cucurbita moschata* розташовується від столиці Мексики південніше через Центральну Америку, північну Колумбію і Венесуелу. Центр різноманітності *Cucurbita pepo* – північ Мексики.

### 3. НАПРЯМИ СЕЛЕКЦІЇ ГАРБУЗА ТА ПРИЙОМИ ПОДОЛАННЯ НЕСУМІСНОСТІ ПРИ МІЖВИДОВИХ СХРЕЩУВАННЯХ

В селекції гарбуза перспективними є три напрями досліджень. Перший - створення сортів столового типу з вмістом сухої речовини у плодах до 17% та урожайністю до 40,0 т/га на незрошуваних землях. Другий напрям – створення сортів мускатного гарбуза із урожайністю 100–110 т/га при зрошенні та вмістом каротину у плодах до 25 мг/100 г. Третій напрям – створення сортів з виходом товарного насіння 1,5–3,0 % і більше від маси плодів [7].

Також важливого значення набуває виведення кущових, напівкущових короткостеблових сортів і гібридів, що дозволить максимально механізувати обробіток ґрунту у промисловому виробництві.

Гарбуз це перехреснозапильна культура. У науковій літературі представлено чисельні данні щодо низької ефективності при проведенні міжвидових схрещувань гарбуза.

Більшість авторів дійшли висновку, що найбільш легко схрещуються між собою види мускатного та великоплідного гарбуза, натомість ці види важко схрестити зі звичайним гарбузом [8].

Отримання міжвидових гібридів між трьома культурними видами гарбуза *C. pepo*, *C. maxima* і *C. moschata* має практичний і теоретичний інтерес. У виду *C. maxima* є форми, що володіють високою цукристістю і ніжною м'якоттю, але пізньостиглі і маловрожайні. У виду *C. pepo* є дуже скоростиглі, але недостатньо цукристі форми. Окремі сорти виду *C. moschata* містять таку велику кількість каротину, якого немає в інших видів. Міжвидова гібридизація гарбуза дозволяє створювати скоростиглі багаті каротином і цукром сорти [9].

Результати міжвидової гібридизації серед видів роду *Cucurbita* та існуючі бар'єри несумісності детально проаналізовані в наукових роботах [10 - 13].

Інтрогресивну селекцію серед роду *Cucurbita* у першу чергу націлено на поліпшення таких господарських ознак як продуктивність і якість плодів. Також зроблено спроби підвищити стійкість рослин до шкідників і хвороб, модифікувати архітектоніку рослин та їх стать. Створені, в результаті селекційної роботи, міжвидові гібриди можуть бути цінними джерелами стійкості насамперед до вірусних і грибових захворювань.

Аналіз генеалогії сортів і гібридів гарбуза, як закордонної так і вітчизняної селекції свідчить, що гени, які контролюють важливі цінні господарські ознаки, знаходяться у зародковій плазмі віддалених і предкових форм, які у більшості випадків мають природні бар'єри несумісності з геномом культурних сортів. Методами традиційної селекції досягти оптимального поєднання врожайності, стійкості до несприятливих факторів середовища та високої якості плодів у одному генотипі важко. При міжвидовому запиленні у формуванні насінин існує кілька періодів, під час яких можуть виявлятися бар'єри природної несумісності [14, 15]. У багатьох випадках загибель гібридних зародків відбувається на середніх і пізніх стадіях ембріогенезу. Часто це є результатом відсутності ендосперму або його аномальний розвиток, що викликає голодування зародку і абортів плоду, що розвивається. Крім того, рослини гарбуза проявляють різку депресію інбридингу після двох поколінь самозапилення. У зв'язку з бар'єрами сексуальної несумісності, які виникають при міжродових та міжвидових схрещуваннях, за використання традиційних методів селекції її методами не вдається отримувати достатню кількість рослин міжвидових гібридів гарбуза [16].

Досить ефективним методом подолання цих бар'єрів є застосування біотехнологічних методів вирощування незрілих зародків віддалених гібридних форм у культурі *in vitro* [17-18]. У цьому випадку вирощування ізольованих зародків найбільш перспективно на штучних середовищах, які мають необхідні поживні речовини, які *in planta* зародок недотримує з тканин ендосперму [5]. Культура зародків в умовах *in vitro* або ембріокультура дає можливість отримати цінні гібридні рослини з нежиттєздатного, за звичайних умов культивування, насіння. Перепоною до широкого застосування ембріокультури є відсутність універсального поживного середовища, труднощі вирощування недорозвинених зародків. У зв'язку з цим, актуальними завданнями підвищення ефективності ембріокультури є розробка всіх складових елементів біотехнологічного способу подолання постгамної несумісності при міжвидовій гібридизації гарбуза.

## 4 ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

### 4.1. ПОЛЬОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ

**Агротехніка на дослідній ділянці.** Агротехніку на дослідній ділянці гібридизації підтримують відповідно до методики, представленої в монографії «Сучасні методи селекції овочевих і баштанних культур»[9]. Догляд за рослинами полягає в поливах, підживленнях і обробітках проти хвороб і шкідників. Для отримання розсади гарбуза насіння висівають в I декаді квітня у горщики об'ємом 500 см. Висівання насіння у польових умовах проводять в I–II декадах травня за схемою 200x40 см по дві насінини. Надалі залишають по одній рослині у лунках.

**Проведення щеплення.** У селекції гарбуза для отримання вихідних рослин для проведення міжвидової гібридизації використовують щеплення зближенням. Щеплення здійснюють у четвертій декаді квітня, першій декаді травня в тепличних умовах. Для щеплення використовують підщепи гарбуза, перший справжній лист яких досягнув довжини 2–3 см. Для отримання прищепи відповідного віку, його висівають на 3–4 доби пізніше підщепи.

На рослинах підщеп відповідної фази розвитку над сім'ядолею спеціальною голкою для проведення щеплення роблять орієнтований зверху вниз під кутом 90 градусів. Стебло прищепи, на 2 см нижче першого справжнього листка, скальпелем відрізають під кутом 45°. Підготовлений таким чином пагін прищепи вставляють в зроблений на підщепі отвір. Для поліпшення зростання щеплені рослини розміщують в теплиці в умовах високої вологості повітря за температури (25 °C). На швидкість зростання незмінно впливають температура (+ 24–28°C), вологість повітря (80–90%) і освітленість (200 Вт/м<sup>2</sup>). Через 5–10 діб скальпелем видаляють пагін підщепи, який знаходиться вище місця щеплення. Через 30 діб після проведення щеплення рослини гарбуза висаджують в польові умови для подальшого вирощування і запилення.

**Проведення схрещувань.** Схрещування проводять за схемою, яка передбачає штучне запилення різних видів гарбуза. Схрещування розпочинають проводити після утворення перших квіток.

Процес схрещування полягає у наступному. З вечора чоловічі і жіночі квітки, які будуть зацвітати на наступний день ізолюють шляхом фіксації пелюсток віночка м'яким шпагатом.

На наступний ранок (з 6 до 10 години) зрізують необхідні чоловічі квітки на рослині, яка буде запилювачем і обривають на ній

пелюстки навкруги колонки пиляків. Далі акуратно знімають шпагат на зафіксованій жіночій квітці, яка буде запліднена і проводять її запилення підготовленими пилюком чоловічої квітки за відповідно розробленою схемою схрещування. Після цього запилену квітку зразу ізолюють тим же шпагатом, а на квітконіжці розміщують жетон з даними про комбінацію схрещування і дату його проведення.

Для подолання несхрещуваності в деяких випадках застосовують процедуру травмування маточки або його декапітацію, яку проводять за 1–2 доби до цвітіння. Травмування проводять шляхом розсікання приймочки в декількох місцях. В наших дослідах за рахунок застосування наступних прийомів в залежності від комбінації схрещування і погодних умов вдалось отримати 96,4% плодів від схрещування в комбінаціях . схрещувань ♀ *C. maxima* (лінія Кр-РЛ) х ♂ *C. pepo* (сорт Маслянка); та 91,1% плодів від схрещування в комбінаціях ♀ *C. maxima* (лінія Кр-РЛ) х ♂ *C. moschata* (сорт Бальзам).

## **4.2. ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ *IN VITRO* ДЛЯ РОЗМНОЖЕННЯ ІНКОНГРУЕНТНИХ (САМОНЕСУМІСНИХ) ГІБРИДІВ ГАРБУЗА**

Ізоляцію і культивування насінневих (зиготичних) зародків на штучних поживних середовищах проводять на різних етапах їх розвитку залежно від особливостей культури і цілей експерименту. Розрізняють гетеротрофну фазу розвитку зародка, на якій він залежний від ендосперму і материнських тканин; і автотрофну фазу, на якій зародок здатний синтезувати необхідні для розвитку поживні речовини, використовуючи мінеральні солі і сахарозу живильного середовища.

Таким чином, чим менше розвинений зародок, тим багатшою компонентами повинна бути поживне середовище для його культивування. Основними етапами при культивуванні гібридних недорозвинених зародків є наступні:

I – стерилізації незрілого насіння;

II – висаджування ізольованих зародків оптимального віку на поживні середовища для росту і розмноження пробіркових рослин міжвидових гібридів гарбуза в культуру *in vitro*;

III – адаптація пробіркових рослин до умов *in vivo*.

#### **4.2.1. Стерилізація і садіння недорозвиненого гібридного насіння гарбуза на поживні середовища**

У дослідженнях із подолання несумісності між інконгруентними видами гарбуза використовують недозрілі плоди міжвидових гібридів гарбуза. Нами були використані плоди отримані в комбінаціях схрещувань ♀ *C. maxima* (лінія Кр-РЛ) x ♂ *C. pepo* (сорт Маслянка); та ♀ *C. maxima* (лінія Кр-РЛ) x ♂ *C. moschata* (сорт Бальзам), відокремлені від рослин через 25 та 30 діб після запилення.

Процедуру виділення, стерилізації і розміщення незрілих зародків на поживних середовищах для культивування проводять у наступній послідовності:

1) плоди гарбуза промивають водопровідною водою з миючим засобом, після чого із них видаляють насіння;

2) донорські об'єкти кожного зразка розміщують у марлевій одношаровій мішечки з етикетками, щоб запобігти втраті рослинного матеріалу;

3) виділене з плодів насіння в стерильних умовах ламінарного боксу занурюють у розчин гіпохлориту натрію з масовою часткою 1% на 40 хв., після чого дезінфікуючий розчин зливають, а рослинний матеріал промивають не менше 5-ти разів стерильною дистильованою водою;

4) у простерилізованих насінин скальпелем надрізають шкірку і видаляють насінневі зародки, які розміщують у пробірках на поверхні твердого поживного середовища для ініціації їх проростання, відповідно додатку А;

5) для культивування ізольованих тканин міжвидових гібридів гарбуза використовують поживні середовища, які містять макро- та мікроелементи за прописом MS [45], вітаміни, 3% сахарози, 0,7% агару та регулятори росту – 1 мг/л кінетину та 0,01 мг/л ІОцК;

6) висаджений на середовища матеріал для отримання проростків переносять у спеціально обладнану люмінесцентними лампами кімнату і культивують у темряві за температури від 22°C до 26°C впродовж тижня. Надалі матеріал розміщують в умовах освітлення за 16-годинного фотоперіоду та з інтенсивністю освітлення 2 клк 2–3 тижні. Температурний режим у світловій кімнаті регулюють за допомогою кондиціонера і контролюють термометром, інтенсивність освітлення контролюється люксометром.

#### 4.2.2. Розмноження рослин міжвидових гібридів гарбуза в культурі *in vitro*

Розмноження пробіркових рослин методами *in vitro* дозволяє отримувати великої кількості копій з мінімуму вихідного матеріалу генетично однорідного матеріалу та добирати рослинний матеріал з ознаками, що цікавлять дослідника.

При культивуванні гібридних зародків, виділених через 25 діб після запилення, на контрольному (безгормональному) варіанті середовища MS в комбінації схрещування *C. maxima* x *C. pepo* частота формування проростків в культурі *in vitro* складає 73,7% (табл. 1). У комбінації схрещування *C. maxima* x *C. moschata* – 66,2%.

**Таблиця 1. – Вплив строків ізоляції і складу модифікованого поживного середовища MS на розвиток зародків міжвидових гібридів гарбуза**

Комбінація схрещувань	Розмір зародків, мм	Поживне середовище			
		MS контроль (безгормональне)		MS + 0,1 мг/л кінетину та 0,01 мг/л ІОцК	
		Кількість висаджених насінин, шт.	Кількість пророслих насінин, %	Кількість висаджених насінин, шт.	Кількість пророслих насінин, %
через 25 діб після запилення					
$\begin{matrix} \oplus \\ \ominus \end{matrix} C. maxima \times C. pepo$	0,5–11	137	73,7	137	84,2
$\begin{matrix} \oplus \\ \ominus \end{matrix} C. maxima \times C. moschata$	0,2–0,6	137	66,2	137	76,3
через 30 діб після запилення					
$\begin{matrix} \oplus \\ \ominus \end{matrix} C. maxima \times C. pepo$	0,7–1,3	97	85,2	97	96,4
$\begin{matrix} \oplus \\ \ominus \end{matrix} C. maxima \times C. moschata$	0,4–0,9	97	80,1	97	91,1

На середовищі із додаванням 0,1 мг/л кінетину та 0,01 мг/л ІОцК в комбінації схрещування *C. maxima* x *C. pepo* вихід пророслих

насінин складає 84,2%, а у комбінації схрещування *C. maxima* x *C. moschata* – 76,3%

При культивуванні зародків впродовж 30 діб на безгормональному середовищі в комбінації схрещування *C. maxima* x *C. pepo* відсоток утворення гібридних рослин становить 85,2%, а у комбінації схрещування *C. maxima* x *C. moschata* – 80,1% (рис.1-2).

Максимальна частота формування проростків спостерігається на середовищі MS із додаванням 0,1 мг/л кінетину та 0,01 мг/л ІОцК. На цьому варіанті середовища проростає 96,4% гібридних зародків, отриманих від комбінацій схрещування *C. maxima* x *C. pepo* та 91,1% у комбінації схрещування *C. maxima* x *C. moschata*.



Рис. 1. Гібридні рослини гарбуза, отримані від схрещування: *C. maxima* (лінія Кр-РЛ) x *C. pepo* (сорт Маслянка)

Висаджені на живильне середовище зародки міжвидових гібридів через 3–4 доби культивування на поживному середовищі потовщуються, на 6–7 добу на них розпочинається утворення корінця, а через 9–10 діб настає активна фаза розвитку зародків – ріст гіпокотилу, розкриття сім'ядольних листків, які мають інтенсивно зелене забарвлення. Після одержання сформованих пробіркових рослин із насінневих зародків проводять їх клональне



мікророзмноження і депонування шляхом живцювання на твердому безгормональному поживному середовищі MS.



Рис. 2. Гібридні рослини гарбуза, отримані від схрещування:  
*C. maxima* (лінія Кр-РЛ) x *C. moschata* (сорт Бальзам)

Використання безгормонального середовища дозволяє запобігати виникненню аномальних рослин при подальшому розмноженні рослин міжвидових гібридів та забезпечує максимальну генетичну стабільності клонованого матеріалу. Гібридні пробіркові рослини гарбуза, отримані в комбінації схрещування *C. maxima* (лінія Кр-РЛ) x *C. pepo* (сорт Маслянка), мають інтенсивне зелене забарвлення та розсічені по краям листки.

У пагонів відмічено швидкий темп наростання вегетативної маси. З цієї причини живцювання пагонів проводять через кожні 14 діб. Одержані рослини-регенеранти з добре розвиненими листками висаджують під час останнього пасажу у пробірки на поживні середовища згідно з додатком А, на середовищі MS модифікованому ауксином ІОЛК у концентрації 0,5 мг/л. Рослини, які сформували від 3-х до 7-ми листків та п'ять і більше нормально розвинених корінців придатні для висаджування в ґрунт.

### 4.2.3. Адаптації пробіркових рослин гарбуза до умов *in vivo*

Для адаптації пробіркових рослин гарбуза використовують субстрат, який складається з торфу із кокогрунтом у співвідношенні 1:1 і характеризується високими показниками вологомісткості і повітрямісткості, за рахунок чого при адаптації коренева система пробіркових рослин знаходилася в умовах високої аерації, до якої рослини гарбуза дуже вибагливі.

З метою запобігання загибелі пробіркових рослин через їх надмірно високу транспірацію яка спостерігається завдяки різкому зниженню вологості в умовах *in vivo* регенеранти відмивають від агару, після чого рослини заливають на 2 години дистильованою водою. Відмитий регенерант занурюють у 0,2% розчин системного фунгіциду згідно з “Переліком пестицидів і агрохімікатів дозволених для використання в Україні” [21] і висаджують по 1-2 шт. в горшечки розміром 10 см x 15 см з субстратом.

Висаджені рослини-регенеранти поливають розчином марганцевокислого калію з масовою часткою 1%. Горшечки з рослинами накривають поліетиленовими мішечками розміром 10 см x 15 см і виставлять у зроблений з поліетиленової плівки бокс з кришкою, де витримують за вологості повітря 85%, температури – від 20°C до 22°C і освітленості – від 5 до 10 клк.

Рослини регулярно поливають дистильованою водою, щотижня підживлюють розчином, який містить  $\frac{1}{4}$  концентрації мінеральних солей Кнопу [22]. Підсихання ґрунтосуміші не допускається. Через три доби після висаджування рослин, поліетиленові мішечки знімають. Протягом наступних двох тижнів поступово відкривають кришку боксу.

Вирощують горшечкову розсаду пробіркових рослин протягом 40–60 діб. На субстраті з кокосового волокна і торфу приживлення рослин-регенерантів через 4 тижні становить від 85 до 90%.

Довжина пагонів становить  $15,5 \pm 1,2$  см, ширина листків -  $5,3 \pm 0,3$  см, довжина коренів –  $8,1 \pm 2,2$  см.

Оптимальними строками висаджування у відкритий ґрунту горшечкової розсади гарбуза є друга декада травня.



Рис. 3. Пробіркові рослини гарбуза через три тижні адаптації

Подальший догляд за рослинами у період вегетації загальноприйнятий для вирощування рослин гарбуза у ґрунтових умовах.

#### 4.3. ДЕТЕКЦІЯ МІЖВИДОВИХ ГІБРИДІВ

Для попередньої діагностики ефективності одержання міжвидових гібридів гарбуза використовують метод генетичного маркування. За маркерні ознаки використовують фенотипові ознаки, які візуально легко можна розрізнити. У гарбуза такими маркерними ознаками є наступні: форма і розмір листової пластинки, її опушення, форма і розмір черешків листків, кількість пагонів і їх довжина, форма квіток, їх розмір і наявність пилку, форма плодів, їх розмір, забарвлення, форма плодоніжки та інші.

Однією з вимог до маркерних ознак є їх ранній прояв. Найкращими маркерними ознаками у міжвидових гібридів є такі, які проявляються вже у фазі проростків. Найважливішою маркерною ознакою у міжвидових гібридів є колір листків і форма плодів. Так у гібрида *C. maxima* x *C. moschata* вони є однаковими за проявом з батьківською формою і мають темно зелений колір, тоді як у материнської форми гарбуза листки світло-зелені, з сильним опушенням.

## **5. МЕТОДИЧНІ ЗАСАДИ ОРГАНІЗАЦІЇ РОБІТ В ЛАБОРАТОРІЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ**

### **5.1. ОСНОВНІ ВИМОГИ ДО ЛАБОРАТОРІЇ**

Дослідження зі створення і розмноження вихідного селекційного матеріалу в культурі ізольованих тканин і клітин здійснюються за методичними рекомендаціями, викладеними в роботах Р. Г. Бутенко [23] та згідно з розробленою в ІОБ НААН методикою [21].

Практично всі методичні прийоми культури тканин *in vitro* засновані на трьох загальних принципах: ізолювання експланту (клітина, ділянка тканини, орган) від материнської рослини; розміщення експланту в контрольованих, ретельно дібраних умовах; збереження стерильності матеріалу, що вирощується.

Висаджують рослинний матеріал на поживні середовища безпосередньо у ламінарному боксі з горизонтальним потоком повітря. У маніпуляційній кімнаті, де знаходиться ламінарний бокс 2 рази на тиждень стіни і підлогу миють розчином хлораміну Б з масовою часткою 1%. Знезаражують повітря маніпуляційної кімнати і поверхні боксу за допомогою бактерицидних ламп протягом 30 хвилин з наступним протиранням робочої поверхні боксу розчином етилового спирту з масовою часткою 70 %. Інструменти і лабораторний посуд перед роботою дезинфікують у сушильній шафі за температури від 140 °С до 150 °С протягом 2 годин або автоклавують протягом 30 хвилин за тиску 1 атмосфера. Перед початком роботи у боксі руки дезинфікують розчином етилового спирту з масовою часткою 70 %. Під час робочого процесу і перед кожною операцією скальпелі і пінцети занурюють у розчин етилового спирту з масовою часткою 96 % і обпалюють у полум'ї спиртівки. Для культуральної роботи використовується обладнання, матеріали і реактиви, перелік яких викладено в методиці [21].

### **5.2. ПРИГОТУВАННЯ ШТУЧНИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ**

Для приготування штучного живильного середовища використовують маточні розчини мінеральних солей і вітамінів за прописом середовища MS, які готують відповідно до методики [21], і зберігають у холодильній камері за температури не вище ніж 4°C і не більше 30 дб.

Під час приготування штучного середовища в мірну колбу місткістю 1дм<sup>3</sup> мірним стаканом вливають по 50 см<sup>3</sup> розчину солей макроелементів, піпеткою додають по 1 см<sup>3</sup> розчину солей мікроелементів та по 5 см<sup>3</sup> розчину хелатного заліза. Додають розчини сахарози, вітамінів і стимуляторів росту. Склад і кількість для кожного середовища та виду овочевих рослин наведено у додатку А. Після введення до живильного середовища всіх компонентів за допомогою рН-метра встановлюють рН 5,8–5,9, використовують розчини гідроксиду калію та соляної кислоти, з молярною концентрацією 1 моль/дм<sup>3</sup>.

Якщо готують тверде поживне середовище, то у підігріте до температури 50– 60°C рідке поживне середовище додають розчинений агар-агар і доводять дистильованою водою до мітки. Підігріте живильне середовище розливають у пробірки або баночки і закривають кришками з фольги або ватно-марлевими пробками. При використанні рідких середовищ у пробірках розміщують місточки з фільтрувального паперу розміром 1см x 8 см. У колби місткістю 500 см<sup>3</sup> наливають дистильовану воду на 2/3 їх об'єму і закривають кришками з фольги.

*Стерилізація поживного середовища та дистильованої води.* Рідке та тверде поживне середовище та дистильовану воду стерилізують в автоклаві 25 хвилин за 1 атмосфери. Після стерилізації пробірки з живильним середовищем заносять у маніпуляційну кімнату, де і проводять висаджування рослинних об'єктів.

## БІБЛЮГРАФІЯ

1. Baggett J. R. Attempts of cross *Cucurbita moschata* and *C. pepo* L. / J. R. Baggett // Cucurbit Genet. Rep. - № 2, 2009. – P. 32-34.
2. Филов А. И. Тыквенные / А. И. Филов // Культурная флора СССР. – М. : Колос, 1982. – Т. 21. – С. 145-277.
3. Арасимович В. В. Биохимия арбуза, дыни и тыквы / В. В. Арасимович // Биохимия культурных растений. - М., 1938. - С. 257-348.
4. Белик В. Ф. Биологические основы культуры тыквенных (огурец, арбуз, дыня, тыква) : автореф. дисс. доктора биолог, наук / В. Ф. Белик. - Л., 1967. - 63 с.
5. Белик В. Ф. Бахчеводство / В. Ф. Белик. - М. : Колос, 1982. - 175 с.
6. Диденко В. П. Перспективный сорт мускатной тыквы Гиляя / В. П. Диденко, Т. В. Диденко // Баштанництво в Україні. – К. : Аграрна наука, 1994. – С. 61-64.
7. Житнева Н. Е. Мировой сортимент тыкв / Н. Е. Житнева // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. - Вып. 3. - 1930. - С. 157-207.
8. Юрина О. В. Селекция и семеноводство тыквенных культур / О. В. Юрина. - М. : Колос, 1966. – 224 с.
9. Колесник І. І. Нові сорти гарбуза селекції Дніпропетровської дослідної станції / І. І. Колесник, Л. І. Полівода // Овочівництво і баштанництво: Міжвідомч. тем. наук. зб. – Харків, 1999. – Вип. 44. – С. 111-112.
10. Robinson R. W., Boetter M. A. Gynoecious sex expression in *Cucurbita* resulting from an interspecific cross / R. W. Robinson, M. A. Boetter // Cucurbit Genetics Coop Rpt. - № 1, 2006. – P. 31-32.
11. Bemis W. P. Polyploid hybrids from the cross *Cucurbita moschata* / W. P. Bemis // J. Am. Soc. Hortic. Sci. - № 4, 2008. - P. 52-53.
12. Fukuan Z. The genotype and relationship between fruit ripeness and seed germinating within fruit in *Cucurbita moschata* / Z. Fukuan // Beijing Horticulture. - № 8, 2000. – P. 13-14.
13. Hassan A. M. Genetic behavior of some economic characters in Squashes (*Cucurbita sp.*) / A. M. Hassan, H. S Sherif // Annals of Agric Sci-Moshtohor. - № 2, 2001. – P.75-86.
14. Кобытев С. И. Опыт межвидовой гибридизации тыкв / С. И. Кобытев, Е. И. Лавринова // Изд. АН ТуркмССР. - № 6, 1996. - С. 65-69.

15. Козлова Ф. И. К межвидовой гибридизации дыни и тыквы / Ф. И. Козлова // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. - Т. 14. - 1995. - С. 89-93.

16. Тимин Н. И. Межвидовая гибридизация и ее использование в селекции овощных растений / Н. И. Тимин, И. В. Титова // Овощеводство. Состояние. Проблемы. Перспективы. - М., 2001. - С. 270-274.

17. Шевелуха В. С. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В. С., Калашникова Е. А., Воронин Е. С. и др.; Под ред. В. С. Шевелухи. Изд. 2-е перераб. и доп. - М. : Высшая школа, 2003. - 469 с.

18. Dumas R. Obtention of embryos and plants from in vitro culture of unfertilized ovules of *Cucurbita pepo* / R. Dumas // Proceedings of the International Symposium, 1985. - P. 95-97.

19. Сучасні методи селекції овочевих і баштанних культур / [За ред. Т. К. Горової, К. І. Яковенка]. - Х. : ІОБ УААН, 2001. - 644 с.

20. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures / Murashige T., Skoog F. // Plant Physiology. - 1962. - P. 473-497.

21. Клітинні технології створення вихідного селекційного матеріалу основних овочевих рослин в культурі *in vitro* (методичні рекомендації) / Корнієнко С. І., Кондратенко С. І., Мозговська Г. В. [та ін.]. - Х. : Плеяда, 2013. - 47 с.

22. Методика досліджень в культурі ізольованих тканин овочевих рослин / [Мірошніченко В. П., Сергієнко О. Ф., Івченко Т. В. та ін.]. - Мерефа : ІОБ УААН, 2004. - 25 с.

23. Бутенко Р. Г. Клеточные технологии в селекционном процессе / Р. Г. Бутенко // Мат. Всесоюзной конф. «Состояние и развитие с/х биотехнологии». - М., 1986. - С. 29-38.

Додаток А

**Мінеральний склад базових живильних середовищ для культури ізольованих тканин гарбуза**

Компонент	Мг/л
Солі мікроелементів	
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
$\text{KNO}_3$	1900
$\text{CaCl}_2$ б/в	333
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
Солі мікроелементів	
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2
$\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	24,1
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
KJ	0,83
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,85
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	37,25
Вітаміни	
B <sub>1</sub>	1
B <sub>6</sub>	1
PP	1
C	3
Регулятори росту, мг/л	
Ю <sub>ц</sub> К	
Ю <sub>л</sub> К	0,5
Органічні домішки	
Гліцин, мг/л	2
Мезоінозит, мг/л	100
Сахароза, г/л	30,0
Агар, г/л	7,0