

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В СЕЛЕКЦИИ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР (к 95-летию ВНИИССОК)***Н.А. ШМЫКОВА, Т.П. СУПРУНОВА, В.Ф. ПИВОВАРОВ**

Устойчивое наращивание конкурентоспособной сельскохозяйственной продукции при сокращении потребления ресурсов и затрат возможно за счет ускорения селекционного процесса. В связи с этим актуальное значение приобретают новейшие биотехнологические подходы и молекулярно-генетические методы. Клональное микроразмножение, андрогенез, гиногенез, генетическая трансформация широко применяются в сельскохозяйственных программах для расширения спектра формообразования, создания константных линий, ускорения процесса селекции (J.M. Dunwell, 2010). Методы андро- и гиногенеза дают возможность реализовать гаметоклональную изменчивость в индивидуальных растениях, обнаруживать редкие рецессивные аллели, создавать уникальные формы (Т. Winkelmann с соавт., 2006). Один из способов получения исходного селекционного материала — межвидовая гибридизация, позволяющая передавать полезные признаки (например, устойчивость к биотическим и абиотическим стрессорам) от диких видов растений к культурным и расширять спектр генетической изменчивости (R. Najjar с соавт., 2007). Преодоление проблем несовместимости при отдаленной гибридизации возможно за счет биотехнологических приемов. Использование молекулярно-генетических маркеров, выявляющих генетическое разнообразие на уровне ДНК, позволяет контролировать перенос хозяйственно ценных генов от одного организма к другому, проводить генотипирование, картирование и маркирование генов. Благодаря маркер-вспомогательной селекции можно подойти к решению таких практических задач, как поддержание генетических коллекций, подбор родительских форм для скрещивания, составление родословных сортов, их паспортизация и сертификация, защита интеллектуальной собственности селекционеров. Настоящий обзор посвящен 95-летию со дня основания Всероссийского НИИ селекции и семеноводства овощных культур (ВНИИССОК, Московская обл.). Обобщены результаты работы ВНИИССОК в области биотехнологии, молекулярной генетики и их практического использования в селекции овощных культур. С помощью методов отдаленной гибридизации в институте созданы новые сорта лука (Изумрудный, Сигма, Золотые Купола, Цепариус), салата (Изумрудный, Творец, Алекс, Коралл, Малахит), физалиса (Лакомка, Десертный). Ведутся исследования по вовлечению диких видов баклажана в селекцию, а также по межвидовой гибридизации моркови. Разработана технология создания исходного материала перца, устойчивого к вирусным заболеваниям. Активно разрабатываются способы культивирования тканей и клеток *in vitro*. Предложена технология клонального микроразмножения, позволяющая размножать растения капусты белокочанной с мужской стерильностью в неограниченных количествах. Технология клонального микроразмножения баклажана и перца легла в основу эмбриокультуры по спасению зародышей при межвидовой гибридизации. Оптимизировано культивирование пыльников моркови, благодаря чему созданы удвоенные гаплоидные сортообразцы. Разработана отечественная технология получения удвоенных гаплоидных линий перца через культуру пыльников (микроспор). Оптимизирован базовый протокол культуры микроспор рапса и созданы удвоенные гаплоидные линии капусты китайской, брокколи и капусты белокочанной. Разработаны методы получения удвоенных гаплоидов в культуре неопыленных семян моркови, лука, огурца, кабачка, тыквы, свеклы столовой. Для изучения вариабельности геномов, генотипирования сортов и линий, определения чистоты гибридного потомства у овощных культур используется ISSR-, IRAP-, AFLP- и SSR-маркирование.

Ключевые слова: межвидовая гибридизация, клональное микроразмножение, андрогенез, гиногенез, молекулярное маркирование.

Грибовская овощная селекционная опытная станция, основанная в 1920 году, в 1971 году преобразована во Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур (ВНИИССОК). В течение 95 лет здесь шло последовательное становление селекции овощных культур на научную основу в тесном взаимодействии с развитием биологических наук во всем мире. Еще в начале прошлого века в своих трудах Н.И. Вавилов отмечал,

* Часть работ поддержаны грантами ГК № 1282/13, ГК № 566/13 Министерства сельского хозяйства РФ, ГК № 16.M04.11.0004, ГК № 14.M04.12.0013 Министерства образования и науки РФ, грантом РФФИ 08-04-13513-офи_ц.

что селекция как наука представляет собой синтез данных многих дисциплин, она взаимосвязана с генетикой, систематикой, эмбриологией, цитологией, экологией, биохимией, физиологией и технологией (1). На Грибовской станции уже через 10 лет после основания появились новые лаборатории теоретического профиля: лаборатория физиологии и биохимии (тогда же начаты исследования устойчивости растений к болезням) — в 1931 году, цитологии — в 1933, защиты растений — в 1943, генетики и цитологии (на базе лаборатория цитологии) — в 1972 году.

Важнейший метод обогащения генофонда растений — отдаленная гибридизация, посредством которой ценные признаки передаются от диких видов культурным. В мировой селекционной практике этому направлению уделяется большое внимание. За последние 20 лет от 60 диких видов в сорта различных сельскохозяйственных культур передано около 100 полезных признаков (2). В результате работ по отдаленной гибридизации, начатых на Грибовской овощной опытной селекционной станции в 1930-е годы, были созданы первые формы межвидовых гибридов лука между *Allium cepa*, *A. fistulosum*, *A. vavilovii*, *A. oschaninii*, *A. schoenoprasum*, *A. nutans* (3-6). На их основе получены сорта Изумрудный, Сигма, Золотые Купола, Цепариус, обладающие высокой устойчивостью к пероноспорозу и стабильно высокой урожайностью (7-9). Использование межвидовой гибридизации представителей рода *Lactuca* позволило выделить оригинальные формы с новыми морфологическими признаками и устойчивостью к альтернариозу, на основе которых созданы сорта салата Изумрудный, Творец, Алекс, Коралл, Малахит (10). От межвидовой гибридизации физалиса овощного *Physalis longifolium* (безалкалоидная мелкоплодная форма) и *Ph. angulata* (крупноплодная низкоалкалоидная форма) во ВНИИССОК получены сорта Лакомка и Десертный, характеризующиеся устойчивостью к абиотическим стрессорам, высоким содержанием сахаров, витамина С, пектина, отсутствием горечи (11-12). В исследованиях по вовлечению диких видов баклажана в селекцию (для передачи устойчивости к абиотическим стрессорам) с помощью метода эмбриокультуры *in vitro* получены межвидовые гибриды между *Solanum melongena* L., *S. integrifolium* L. и *S. aethiopicum* L., потомство оценено по морфологическим и хозяйственно ценным признакам, отобраны перспективные образцы (13, 14).

С использованием межвидовой гибридизации разработана технология создания исходного материала перца, устойчивого к вирусным заболеваниям. В гибридизацию были вовлечены виды *Capsicum annuum* L., *C. frutescens* L. и *C. chinense* L. При этом применялись как классические методы селекции и оценки полученного материала, так и биотехнологические (культивирование *in vitro* изолированных зародышей для преодоления несовместимости) и современные молекулярно-генетические подходы (молекулярный контроль на наличие R-генов резистентности у диких видов и межвидовых гибридов с помощью RGA-маркирования). В результате созданы линии перца, толерантные к вирусу бронзовости томата (TSWV): Л-(Здоровье × *C. frutescens*); Л-(Здоровье × *C. chinense*); Л-[Чаймс × (*C. annuum* × *C. frutescens*)]; Л-(*C. annuum* × *C. chinense*); Л-[*C. annuum* × *C. frutescens*] × Здоровье] (15) (работы поддержаны грантом ГК № 1282/13 Министерства сельского хозяйства РФ — МСХ РФ). Исследования по межвидовой гибридизации моркови ведутся во ВНИИССОК последние 20 лет. Среди гибридного потомства от комбинаций скрещиваний *Daucus carota* × *D. hispidifolius*, *D. carota* × *D. gigidium*, *D. carota* × *D. carota* ssp. *libanotifolia* и др. выделены формы с новым сочетанием высокой устойчивости к альтернариозу, интенсивно-оранжевым корнеплодом и другими признаками культурной моркови (10).

Создание и оценка межвидовых гибридов невозможны без цитогене-

нетических исследований, которые проводятся во ВНИИССОК с привлечением высокоэффективных способов диагностики гибридных форм (флуоресцентная геномная *in situ* гибридизация — genomic *in situ* hybridization, GISH; fluorescence *in situ* hybridization — FISH) (16, 17).

В современной селекции одна из важнейших задач — быстрое достижение константности селекционного материала, что особенно актуально при создании гетерозисных гибридов, для которых требуются гомозиготные линии с высокой комбинационной способностью. Обычно такие линии получают при длительном инбридинге (в течение 5-10 поколений), но современные биотехнологические подходы позволяют сократить этот процесс почти вдвое. Из методов клеточных технологий наиболее востребованы клональное микроразмножение, андрогенез, гиногенез, генетическая трансформация, которые применяются в сельскохозяйственных программах для расширения спектра формообразования, создания константных линий с заданными признаками, ускорения селекции (18).

Методы андро- и гиногенеза позволяют реализовать гаметоκлональную изменчивость в индивидуальных растениях, обнаруживать редкие рецессивные аллели, создавать уникальные формы. Клональное микроразмножение при условии высоких коэффициентов размножения и сохранении генетической стабильности может быть включено в селекционный процесс и занимает значимое место в мировой практике растениеводства (19). В селекции овощных культур это особенно важно для поддержания растений с мужской стерильностью или самонесовместимостью.



Биотехнологические методы, используемые при создании сортов сельскохозяйственных растений во Всероссийском НИИ селекции и семеноводства овощных культур (Московская обл.)

Во ВНИИССОК с конца 1980-х годов активно развиваются технологии культивирования тканей и клеток *in vitro* (рис.), начало которым положили работы по получению безвирусного посадочного материала чеснока в меристемной культуре (20). Использование оздоровленного чеснока в качестве посадочного материала способствует увеличению урожайности (максимальный прирост — 70 %) и широко применяется во всем мире (21). Безвирусный посадочный материал стахиса и якона также был получен через меристемную культуру (с термообработкой) и клональное микроразмножение (с использованием антибиотиков) (22, 23).

Число овощных культур, на которых в институте проводятся биотехнологические исследования, со временем увеличивалось. Совершенствовались методы клеточных технологий. Был оптимизирован способ клонального микроразмножения капусты цветной с использованием прифло-

ральных меристем (24). В мировой практике первые исследования по клональному микроразмножению капустных культур приходится на начало 1970-х годов, однако достичь высокого коэффициента размножения в пробирке не удалось. Только в последнее десятилетие были разработаны эффективные методы клонального микроразмножения капусты китайской, брокколи и рапса (25-27). В лаборатории биотехнологии ВНИИССОК предложена технология клонального микроразмножения, позволяющая размножать растения капусты белокочанной с мужской стерильностью в неограниченных количествах (28) (грант ГК № 566/13 МСХ РФ). Клональное микроразмножение может стать основой многих клеточных технологий. Так, у баклажана и перца разработанная нами технология клонального микроразмножения (29, 30) легла в основу эмбриокультуры по спасению зародышей при межвидовой гибридизации (31).

Получение удвоенных гаплоидов (ДН-технологии) позволяет быстро создавать гомозиготные линии и ускорить селекционный процесс. К 2010 году в мировой практике с помощью ДН-методов получены около 300 сортов (32). Однако на овощных культурах прием оказался менее эффективным, поэтому сейчас они стали объектами экспериментов по индукции гаплоидного эмбриогенеза (18, 33, 34). Первые удвоенные гаплоидные растения моркови и капусты белокочанной в культуре пыльников были получены в лаборатории биотехнологии ВНИИССОК в начале 1990-х годов (35, 36). Цитология эмбриогенеза в культуре пыльников моркови выявила закономерности образования эмбриоидов из микроспор; показано, что изменение пloidности начинается на ранних этапах формирования первичных эмбриоидов (37). Позднее культивирование пыльников моркови оптимизировали, были созданы удвоенные гаплоидные сортообразцы различного происхождения — НИИОХ 336, Витаминная, Московская зимняя А-515, Лосиноостровская 13, Леандр, Шантанэ 2461, Напе, Рондо, гибриды F₁ Каратан, Калисто и др. Полученные растения-регенеранты обладают гаметоклональной изменчивостью, подтвержденной морфологическим и молекулярно-генетическим анализами (38).

В настоящее время в лаборатории биотехнологии совершенствуются способы получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор для различных овощных культур. Разработана отечественная технология создания удвоенных гаплоидных линий перца через культуру пыльников (микроспор) (39), на основе которой получены удвоенные гаплоиды разных сортов и межвидовых гибридов (40). Эта технология не уступает лучшим зарубежным аналогам для острого перца (41, 42). Работа была поддержана грантом Министерства образования и науки РФ (Минобрнауки РФ) ГК № 16.М04.11.0004 и продолжена при финансировании Минобрнауки РФ (грант ГК № 14.М04.12.0013). Созданы первые гибриды перца сладкого (Натали, Гусар) с участием удвоенных гаплоидных линий.

За рубежом активно развиваются технологии получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор овощных капустных культур (43-48). В лаборатории биотехнологии ВНИИССОК оптимизирован базовый протокол культуры микроспор рапса и созданы удвоенные гаплоидные линии капусты китайской (49), брокколи (линия БР 1-1) и капусты белокочанной, вовлеченные в создание гетерозисных гибридов.

Несмотря на многочисленные попытки получить удвоенные гаплоиды в культуре пыльников моркови (50-54), успехи в разработке технологии культивирования микроспор этой важной овощной культуры были достигнуты только в последние годы (55, 56). В нашем институте разрабатывается технология получения ДН-растений в культуре микроспор мор-

кови и выращены растения-регенеранты.

Для создания гаплоидных растений в селекции используется и женский гаметофит. Культивирование неопыленных завязей и семян в *in vitro* позволяет получать гаплоиды в случаях, когда культура пыльников или микроспор не дает положительных результатов. Иногда это единственный способ выделить ДН-линии (например, у растений с цитоплазматической мужской стерильностью) (57). Наиболее разработаны методики культивирования неопыленных семян лука (58-60), огурца (61, 62), свеклы столовой (63), тыквы (64), кабачка (65). Во ВНИИССОК подобные исследования ведутся на протяжении последних 20 лет. Существуют технологии получения удвоенных гаплоидов в культуре неопыленных семян для моркови, лука, огурца, кабачка, тыквы, свеклы столовой (37, 66-69). По эффективности выхода удвоенных гаплоидных растений огурца разработанная в лаборатории методика превосходит зарубежные аналоги в несколько раз (68) (поддержано грантом РФФИ 08-04-13513-офи_ц).

В лаборатории биотехнологии также выполняется генетическая трансформация растений. В сотрудничестве с учеными филиала Института биоорганической химии РАН (г. Пущино) получены трансгенные растения моркови с генами *GUS*, дефензина *Rs* и тауматина II, выявлена экспрессия гена тауматина II в листьях и корнеплодах, отобраны семьи трансгенных растений, устойчивые к патогену *Fusarium avenaceum* (70).

За последние десятилетия благодаря значительному прогрессу в молекулярной генетике исследована физическая и функциональная организация геномов у многих сельскохозяйственных культур. Технологии молекулярного маркирования позволяют контролировать перенос хозяйственно ценных генов от одного организма к другому, способны ускорять и оптимизировать селекционный процесс (71). Системы молекулярного маркирования овощных культур начали разрабатываться во ВНИИССОК в 1990-х годах одновременно с мировым развитием ДНК-технологий. Если на начальном этапе для идентификации внутри- и межвидового полиморфизма использовали только RAPD-маркеры (random amplified polymorphic DNA) на томате, баклажане и луке (72-75), то в настоящее время во ВНИИССОК применяется ISSR- (inter-simple sequence repeat), IRAP- (inter-retrotransposon amplified polymorphisms), AFLP- (amplified fragment length polymorphism) и SSR-маркирование (simple sequence repeat) для изучения вариативности геномов, генотипирования сортов (линий), определения чистоты гибридного потомства у томата, капусты, лука, петрушки, баклажана, перца и других овощных культур (76-81). Для поддержания и совершенствования коллекции сортов, охраны авторских прав, контроля подлинности сортового материала и сертификации семян составлены молекулярно-генетические паспорта сортов перца на основе мультилокусного маркирования (82). Показана возможность использования данных молекулярно-генетического анализа (AFLP и SSR) при подборе пар для получения гибридов с высоким эффектом гетерозиса, выделены перспективные гетерозисные гибридные комбинации перца сладкого с комплексом основных хозяйственно ценных признаков (83).

Во ВНИИССОК разработка и применение ДНК-маркеров для овощных культур носят в основном прикладной характер и направлены на идентификацию генетических доноров хозяйственно ценных признаков, один из которых — цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС), широко используемая для создания гибридов на стерильной основе. С помощью молекулярных SCAR-маркеров (sequence characterized amplified regions) идентифицированы митохондриальные гены *coxII* и *atp6*, отвечающие за ЦМС, у образцов перца сладкого селекции ВНИИССОК и межвидовых гибридов

Capsicum frutescens и *C. chinense* , полученных через эмбриокультуру (84).

Скрининг образцов лука репчатого из коллекции ВНИИССОК с помощью ПЦР-маркеров на митохондриальные гены *orfA501* и *cob* позволил идентифицировать образцы со стерильной и фертильной цитоплазмой, а также определить типы стерильной цитоплазмы (S- или T-плазмотип), которые фенотипически не различаются (85). Выделенные образцы лука репчатого со стерильным S-плазмотипом рекомендованы для получения гибридов на основе ЦМС, поскольку система мужской стерильности у луков более проста в наследовании и устойчива в различных условиях окружающей среды (86). С использованием мультиплексной ПЦР идентифицирован тип стерильности у капусты белокочанной, брокколи, пекинской, редиса и дайкона, подобрана система праймеров, позволяющая выделять растения с типом цитоплазмы *Ogura*, *Ogu-NWSUAF*, *nap*, *pol*, *cam*, *rad*. Обнаружен новый подтип стерильной цитоплазмы *Ogura* у капусты белокочанной на основе расшифровки нуклеотидной последовательности *orf138* (87).

Косвенный отбор на основе методов молекулярного маркирования делает возможным детектирование желаемых аллелей и гаплотипов уже на ранних стадиях развития растения, что существенно сокращает и упрощает селекционный процесс (88). Примером практического использования этого подхода стали маркеры для гена *pun1*, отвечающего за остроту плодов перца (*C. annuum* L.) (89). Скрининг расщепляющейся популяции от скрещивания сладкого и острого перцев, выполненный с помощью этого маркера, позволил уже на стадии проростка отобрать генотипы с желаемой комбинацией аллелей *Pun1/Pun1* (90).

Таким образом, результаты теоретических исследований по биотехнологии и молекулярной генетике, наряду с традиционными методами, используются для ускоренного решения селекционных задач, создания качественно новых сортов и гетерозисных гибридов овощных культур, сочетающих высокую продуктивность и качество с комплексной устойчивостью к наиболее опасным болезням, вредителям, абиотическим стрессорам.

ФГБНУ Всероссийский НИИ селекции
и семеноводства овощных культур,
143080 Россия, Московская обл., Одинцовский р-н.,
пос. ВНИИССОК, ул. Селекционная, 14,
e-mail: shmykovanat@mail.ru

Поступила в редакцию
19 марта 2015 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2015, V. 50, № 5, pp. 561-570

BIOTECHNOLOGIES AND MOLECULAR METHODS IN VEGETABLE CROP BREEDING (to 95th Anniversary of VNISSOK)

N.A. Shmykova, T.P. Suprunova, V.F. Pivovarov

All-Russian Research Institute of Vegetable Breeding and Seed Production, Federal Agency of Scientific Organizations, 14, ul. Selektionnaya, pos. VNISSOK, Odintsovo Region, Moscow Province, 143080 Russia, e-mail shmykovanat@mail.ru

Acknowledgements:

Supported in part by grants GK № 1282/13, GK № 566/13 of Ministry of Agriculture of the Russian Federation, GK № 16.M04.11.0004, GK № 14.M04.12.0013 of Ministry of Education and Science of the Russian Federation, and Russian Foundation for Basic Research (grant 08-04-13513-ofi_c)

Received March 19, 2015

doi: 10.15389/agrobiology.2015.5.561eng

Abstract

The resource consumption and costs for an increased agricultural production can be lowered only due to effective breeding for which biotechnologies and molecular genetics provide powerful tools. Among them, tissue cultures, clonal micropropagation, androgenesis, gynogenesis, and genetic transformation are widely used to obtain diversified forms and homozygous constant lines, and to speed up breeding process (J.M. Dunwell, 2010). Androgenesis and gynogenesis involve individual gametoclonal variability, rare recessive alleles, and unique genetic recombinations into breeding (T. Winkelmann et

al., 2006). An interspecific hybridization is a way to develop initial breeding material. Due to it, novel traits (for example, resistance to biotic and abiotic stresses) can be transferred from wild species to cultivated crops, and the range of genetic variability expands (R. Hajjar et al., 2007). An interspecific hybridization incompatibility can be overcome by biotechnological methods, too. Molecular markers are helpful for detecting DNA changes and desired genes' introgression from one genotype to another, for germplasm fingerprinting, gene mapping, etc. Marker-assisted selection is a powerful facility to maintain germplasm collections, to plan crosses, to predict useful gene combination, and to protect varieties and hybrids authenticity. In the review we summarized the results on biotechnology, molecular genetics and their practical use in All-Russian Research Institute of Vegetable Breeding and Seed Production (Moscow Province). In particular, onion (Izumrudnii, Sigma, Zoloty Kupola, Tseparius), salad (Izumrudnii, Tvoets, Aleks, Korall, Malakhit), and physalis (Lakomka, Desertnii) varieties were recently obtained by distant hybridization. Carrot and wild aubergine are involved into interspecific crossings, and pepper plants as sources of resistance to viral infection are selected. Microclonal protocol has been developed for unlimited in vitro propagation of male sterile cabbage. Clonal micropropagation and in vitro cultivation were used to provide embryo viability under interspecific hybridization. A novel protocol developed for in vitro cell cultivation made it possible to create double haploids in carrot and pepper. Due to optimized conditions, double haploids in rape, Chinese cabbage, broccoli and white cabbage were selected. Double haploids of carrots, onion, cucumber, pumpkin, sugar beet, etc., were derived from in vitro cultivated seed-bud without pollination. In this, the ISSR, IRAP, AFLP и SSR markers are involved to assess genome variability and genotyping in vegetable crops.

Keywords: interspecific hybridization, clonal micropropagation, androgenesis, gynogenesis, molecular markers.

REFERENCES

1. Vavilov N.I. *Izbrannye sochineniya. Genetika i selektsiya* [Selected works. Genetics and breeding]. Moscow, 1966.
2. Hajjar R., Hodgkin T. The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*, 2007, 156: 1-13 (doi: 10.1007/s10681-007-9363-0).
3. Krivenko A.A. *Biologicheskii zhurnal*, 1937, 4(3): 289-297.
4. Ershov I.I., Abrakhina Yu.V. *Byulleten' Glavnogo botanicheskogo sada*, 1966, 61: 16-19.
5. Titova I.V., Timin N.I., Yur'eva N.A. *Doklady VASKHNIL*, 1983, 8: 190-195.
6. Shevchenko G.S., Polumordvinova I.V. *Sistema tsitologicheskogo kontrolya pri odalenoj gibrizatsii lukov. V sb.: Nauchnye trudy po selektsii i semenovodstvu. Tom 1* [In: Breeding and seed production. V. 1]. Moscow, 1995: 104-110.
7. Pivovarov V.F., Ershov I.I., Agafonov A.F. *Lukovye kul'tury* [Cultivated onions]. Moscow, 2001.
8. Timin N.I., Agafonov A.F., Shmykova N.A., Titova I.V., Kan L.Yu., Logunova V.V., Gurkina L.K., Romanov V.S. *Mezhvidovaya gibrizatsiya v rode Allium L. i ee ispol'zovanie v selektsii (metodicheskie rekomendatsii)* [Interspecific hybridization in *Allium L.* plant breeding: manual]. Moscow, 2007.
9. Timin N.I., Kan L.Yu., Romanov V.S., Agafonov A.F., Shmykova N.A. V sbornike: *Novye i netraditsionnye rasteniya i perspektivy ikh ispol'zovaniya* [In: New and unconventional plants: perspectives for use]. Moscow, 2007: 269-272.
10. Timin N.I., Pyshnaya O.N., Agafonov A.F., Mamedov M.I., Titova I.V., Kan L.Yu., Logunova V.V., Romanov V.S., Shmykova N.A., Timina L.T., Gurkina L.K., Suprunova T.P., Krivosheev S.M., Engalycheva I.A. *Mezhvidovaya gibrizatsiya ovoshchnykh rastenii (Allium L. — luk, Daucus L. — morkov', Capsicum L. — perets)* [Interspecific hybridization in onion (*Allium L.*), carrot (*Daucus L.*), and pepper (*Capsicum L.*)]. Moscow, 2013.
11. Skvortsova R.V., Kondrat'eva I.Yu. *Sorta tomata i ovoshchnogo fizalisa dlya otkrytogo grunta selektsii VNISSOK* [Tomato and physalis varieties of VNISSOK for open ground cultivation]. Moscow, 2000.
12. Kondrat'eva I.Yu., Engalychev M.R. *Ovoshchi Rossii*, 2013, 3: 64-65.
13. Verba V.M., Mamedov M.I., Pyshnaya O.N., Suprunova T.P., Shmykova N.A. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2010, 5: 66-71.
14. Mamedov M.I., Pyshnaya O.N., Shmykova N.A., Verba V.M., Dzhos E.A., Suprunova T.P. *Ovoshchi Rossii*, 2012, 2: 10-21.
15. Bunin M.S., Mamedov M.I., Pyshnaya O.N., Shmykova N.A., Suprunova T.P., Engalycheva I.A., Dzhos E.A. *Mezhvidovaya gibrizatsiya v rode Capsicum L. i ee ispol'zovanie v selektsii (metodika)* [Interspecific hybridization among *Capsicum L.* plants in breeding: methods]. Moscow, 2008.
16. Khrustaleva L.I., Kan L.Yu., Kirov I.V., Sal'nik A.A. *Izvestiya TSKHA*, 2010, 4: 12-21.

17. Budylin M.V., Kan L.Yu., Romanov V.S., Khrustaleva L.I. *Genetika*, 2014, 50(4): 443-451.
18. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol. J.*, 2010, 8: 377-424 (doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x).
19. Winkelmann T., Geier T., Preil W. Commercial in vitro plant production in Germany in 1985-2004. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2006, 86(3): 319-327 (doi: 10.1007/s11240-006-9125-z).
20. Tyukavin G.B. V sbornike: *Selektsiya ovoshchnykh kul'tur* [In: Vegetable crop breeding]. Moscow, 1989, vypusk 28: 116-119.
21. Nagakubo T., Takaichi M., Oeda K. Micropropagation of *Allium sativum* L. (garlic). In: *Biotechnology in agriculture and forestry. V. 39. High-tech and micropropagation V / Y.P.S. Bajaj* (ed.). Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1997: 4-19.
22. Tyukavin G.B., Kononkov P.F. *Materialy II Mezhdunarodnogo cimpoziuma «Novye i netraditsionnye rasteniya i perspektivy ikh prakticheskogo ispol'zovaniya»* [Proc. II Int. Symp. «New and unconventional plants: prospects of practical use»]. Pushchino, 1997, tom 4: 502-505.
23. Tyukavin G.B., Kononkov P.F. *Materialy II Mezhdunarodnogo cimpoziuma «Novye i netraditsionnye rasteniya i perspektivy ikh prakticheskogo ispol'zovaniya»* [Proc. II Int. Symp. «New and unconventional plants: prospects of practical use»]. Pushchino, 1997, tom 4: 508-510.
24. Ibragimov I.A. *Razrabotka tekhnologii klonal'nogo mikrorazmnozheniya tsvetnoi kapusty. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii* [Development of clone micropropagation protocol for cauliflower]. Moscow, 1991.
25. Yang W., Jizhe C., Cuiling L. Strategies in establishing effective regeneration system of Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32(4): 701-703.
26. Zenkteler M., Zenkteler E., Dostatnia I. Somatic embryogenesis from broccoli stigmas in tissue culture. *Acta Biologica Cracoviensis Series Botanica*, 2006, 48(2): 121-125.
27. Guo Y.-D., Niemalo T., Tulisalo U., Pulli S. Maintenance of male sterile germplasm in *Brassica rapa* by in vitro propagation. *Agricultural and Food Science in Finland*, 2000, 9: 231-238.
28. Bunin M.S., Shmykova N.A. *Ispol'zovanie biotekhnologicheskikh metodov dlya polucheniya iskhodnogo selektsionnogo materiala kapusty* [Biotechnological methods of production parental plants' pool in cole breeding]. Moscow, 2004.
29. Verba V.M., Mamedov M.I., Pyshnaya O.N., Shmykova N.A. *Vestnik RASKHN*, 2010, 6: 57-59.
30. Shmykova N.A. *Razrabotka sistemy biotekhnologicheskikh metodov, napravlennykh na uskorenienie selektsionnogo protsessa ovoshchnykh kul'tur. Avtoreferat doktorskoi dissertatsii* [Interspecific hybridization among *Capsicum* L. plants in breeding: techniques]. Moscow, 2006.
31. Verba V.M. *Razrabotka elementov tekhnologii, napravlennoi na rasshirenie geneticheskogo raznoobraziya baklazhana pri selektsii na kachestvo. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii* [Techniques of increasing genetic diversity in eggplant breeding for quality. PhD Thesis]. Moscow, 2011.
32. Tuvesson S., Dayteg C., Hagberg P., Manninen O., Tanhuanpaa P., Tenhola-Roininen T., Kiviharju E., Weyen J., Forster J., Schondelmayer J., Lafferty J., Marn M., Fleck A. Molecular markers and doubled haploids in European plant breeding. *Euphytica*, 2007, 158: 305-312 (doi: 10.1007/s10681-006-9239-8).
33. Ferrie A.M.R. Current status of doubled haploids in medicinal plants. In: *Advances in haploid production in higher plants* / A. Touraev, B.P. Forster, S.M. Jain (eds.). Heidelberg: Springer, 2009.
34. Ferrie A.M.R., Caswell K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2011, 104(3): 301-309 (doi: 10.1007/s11240-010-9800-y).
35. Taganov B.O. *Razrabotka laboratornoi tekhnologii polucheniya androgennykh rastenii morkovi in vitro. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii* [Laboratory method for androgenic carrot plants in vitro production. PhD Thesis]. Moscow, 1991.
36. Semova N.Yu. *Razrabotka laboratornoi tekhnologii polucheniya androgennykh rastenii belokhannoi kapusty s ispol'zovaniem kul'tury pyl'nikov. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii* [Laboratory method for white cabbage androgenic plants production using anther in vitro culture. PhD Thesis]. Moscow, 1992.
37. Tyukavin G.B., Shmykova N.A., Monakhova M.A. *Fiziologiya rastenii*, 1999, 46(6): 876-883.
38. Tyukavin G.B., Suprunova T.P., Shmykova N.A., Domblides A.S., Dorokhov D.B., Klygina T.E. V sbornike: *Ovoshchevodstvo — sostoyanie, problemy i perspektivy: Nauchnye trudy (k 70-letiyu VNIIO). Tom 1* [In: Olericulture: state, challenges and prospects (to 70th Anniversary of VNIIO. V. 1]. Moscow, 2001: 157-161.
39. Shmykova N.A., Pyshnaya O.N., Shumilina D.V., Suprunova T.P., Dzhos E.A., Mamedov M.I. *Poluchenie udvoennykh gaploidnykh linii pertsy (Capsicum annuum L.) cherez kul'turu pyl'nikov/mikrospor in vitro (Metodicheskie rekomendatsii)* [Protocol for production of doubled haploid pepper (*Capsicum annuum* L.) lines derived from anther/microspore in vitro culture: manual]. Moscow, 2012.
40. Shmykova N.A., Pyshnaya O.N., Shumilina D.V., Dzhos E.A. *Doklady*

41. Supena E.D., Suharsono S., Jacobsen E., Custers J.B. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, 2006, 25: 1-10 (doi: 10.1007/s00299-005-0028-y).
42. Kim M.Z., Park E.J., Harn C.H., In D.S., Jung M. Method for plant production from embryos obtained by microspore culture of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Patent KR 20090070753, 2009.07.01.
43. Takahata Y., Keller W.A. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Plant Sci.*, 1991, 74: 235-242 (doi: 10.1016/0168-9452(91)90051-9).
44. Zhang W., Fu Q., Dai X.G., Bao M.Z. The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration. *Sci. Horticult.*, 117(1): 69-72 (doi: 10.1016/j.scienta.2008.03.023).
45. Winarto B., Teixeira da Silva J.A. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2011, 107: 305-315 (doi: 10.1007/s11240-011-9981-z).
46. Yuan S.X., Su Y.B., Liu Y.V., Fang Z.Y., Yang L.M., Zhuang M., Zhang Y.Y., Sun P.T. Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2012, 110: 69-76 (doi: 10.1007/s11240-012-0131-z).
47. Kim J., Lee S.S. Identification of monogenic dominant male sterility and its suppressor gene from an induced mutation using a broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) microspore culture. *Hort. Environ. Biotechnol.*, 2012, 53(3): 237-241 (doi: 10.1007/s13580-012-0091-6).
48. Gu H., Zhao Z., Sheng X., Yu H., Wang J. Efficient doubled haploid production in microspore culture of loose-curd cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Euphytica*, 2014, 195: 467-475 (doi: 10.1007/s10681-013-1008-x).
49. Shumilina D.V., Shmykova N.A., Bondareva L.L., Suprunova T.P. *Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaya*, 2015, 4: 1-8.
50. Andersen S.B. Anther culture in carrot. *Hereditas Suppl.*, 1985, 3(12): 132.
51. Hu K.L., Matsubara S., Murakami K. Haploid plant production in carrot (*Daucus carota* L.). *J. Japan. Hort. Sci.*, 1993, 62(3): 561-565.
52. Adamus A., Michalik B. Anther culture in carrot (*Daucus carota* L.). *Folia Horticulturae Suppl.*, 2003, 1: 47-49.
53. Nowakowska M., Kozik E.U., Nowak N. Evaluation of phenotypic uniformity of androgenic R₁ population of carrot derived by anther culture technique. *Folia Horticulturae*, 2006, 18(2): 77-86.
54. Gorecka K., Cvikrova M., Kowalska U., Eder J., Szafranska K., Gorecki R., Janas K.M. The impact of Cu treatment on phenolic and polyamine levels in plant material regenerated from embryos obtained in anther culture of carrot. *Plant Physiol. Biochem.*, 2007, 45(1): 54-61 (doi: 10.1016/j.plaphy.2006.12.007).
55. Gorecka K., Kowalska U., Krzyzanowska D., Kiszczak W. Obtaining carrot (*Daucus carota* L.) plants in isolated microspore cultures. *J. Appl. Genet.*, 2010, 51: 141-147 (doi: 10.1007/BF03195722).
56. Li J.-R., Zhuang F.-Y., Ou C.-G., Hu H., Zhao Z.-W., Mao J.-H. Microspore embryogenesis and production of haploid and doubled haploid plants in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2013, 112: 275-287 (doi: 10.1007/s11240-012-0235-5).
57. Chen J.F., Cui L., Malik A.A., Mbiru K.G. In vitro haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2011, 104: 311-319 (doi: 10.1007/s11240-010-9874-6).
58. Campion B., Azzimonti M.T., Vicini E., Schiavi M., Falavigna A. Advance in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through in vitro gynogenesis. *Plant Sci.*, 1992, 86: 97-104 (doi: 10.1016/0168-9452(92)90183-M).
59. Bohanec B. Double-haploid onions. In: *Allium Crop Science — Recent Advances* /H.D. Rabanowich, L. Currah (eds.). London, CABI, 2002.
60. Sulistyarningsih E., Aoyagi Y., Tashiro Y. Flower bud culture of shallot (*Allium cepa* L. *aggregatum* group) with cytogenetic analysis of resulting gynogenic plants and somaclones. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2006, 86: 249-255 (doi: 10.1007/s11240-006-9114-2).
61. 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 Rep.*, 2002, 21: 105-111 (doi: 10.1007/s00299-002-0482-8).
62. Li J.W., Si S.W., Cheng J.Y., Li J.X., Liu J.Q. Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus*. *Biologia Plantarum*, 2013, 57(1): 164-168 (doi: 10.1007/s10535-012-0269-x).
63. Michalik B., Baranski R. In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovules of red beet. *Proc. XIII Eucarpia Congr. «Reproductive Biology and Plant Breeding»*. France, 1992: 193-194.
64. Mohamed M.F., Refaei E.F.S. Enhanced haploid regeneration in anther culture of summer squash *Cucurbita pepo* L. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 2004, 27: 57-60.
65. Shalaby T.A. Factors affecting haploid induction through in vitro gynogenesis in summer

- squash (*Cucurbita pepo* L.). *Sci. Hort.*, 2007, 115: 1-5 (doi: 10.1016/j.scienta.2007.07.008).
66. Shmykova N.A. V sbornike: *Nauchnye trudy po selektsii i semenovodstvu* [In: Plant breeding and seed production: scientific bases]. Moscow, 1995: 164-170.
 67. Shmykova N.A., Khimich G.A., Korottseva I.B., Domblides E.A. *Ovoshchi Rossii*, 2015, 3-4(28-29): 28-31.
 68. Shmykova N.A., Suprunova T.P. Induktsiya ginogeneza v kul'ture in vitro neopylen-nykh semyapochek *Cucumis sativus* L. *Gavrish*, 2009, 4: 40-44.
 69. Shmykova N.A., Shumilina D.V., Kushnerova V.P., Khimich G.A. *Ovoshchi Rossii*, 2011, 1(10): 28-31.
 70. Tyukavin G.B. *Osnovy biotekhnologii morkovi* [Basic carrot plant biotechnologies]. Moscow, 2007.
 71. Suprunova T.P. *Identifikatsiya variabel'nosti genoma tomata s pomoshch'yu markerov na osnove DNK. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii* [DNA markers used to identify genome variability in tomato plants. PhD Thesis]. Moscow, 1997.
 72. Kochieva E.Z., Suprunova T.P. *Genetika*, 1999, 35(10): 1386-1389.
 73. Kochieva E.Z., Suprunova T.P., Semenova S.K. *Genetika*, 1999, 35(8): 1165-1168.
 74. Dorokhov D.B., Lapteva M.N. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 1997, 5: 22-28.
 75. Balashova I.T., Suprunova T.P., Ursul N.A., Pivovarov V.F., Vedadevage S.P.K., Guzhov V.L. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 2008, 3: 62-71.
 76. Domblides E.A., Domblides A.S., Bondareva L.L., Startsev V.I. *Materialy II Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii «Sovremennye tendentsii v selektsii i semenovodstve ovoshchnykh kul'tur; traditsii i perspektivy»* [Proc. II Int. Symp. «Recent trends in vegetable plants' breeding and seed production; traditions and prospects»]. Moscow, 2010: 214-223.
 77. Domblides A.S., Domblides E.A., Kan L.Yu., Romanov V.S. *Ovoshchi Rossii*, 2011, 3: 24-27.
 78. Domblides A.S., Domblides E.A., Kharchenko V.A., Potekhin G.A. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16: Biologiya*, 2010, 4: 25-28.
 79. Mamedov M.I., Pishnaya O.N., Suprunova T.P., Verba V.M., Shmykova N.A. Development and analysis of interspecific hybrids among three species of the genus of *Solanum*. *Proc. XV EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant*. Italy, 2013: 525-529.
 80. Snigir' E.A., Pyshnaya O.N., Kochieva E.Z., Ryzhova N.N. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 2013, 1: 53-60 (doi: 10.15389/agrobiology.2013.1.53rus, doi: 10.15389/agrobiology.2013.1.53eng).
 81. Snigir' E.A. *Ispol'zovanie molekulyarnykh markerov dlya analiza polimorfizma genoma pertsy i optimizatsii selektsionnogo protsessa. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii* [Analysis of genetic polymorphism and breeding optimization in pepper plants assisted by molecular markers. PhD Thesis]. Moscow, 2013.
 82. Snigir' E.A., Kochieva E.Z., Mamedov M.I., Suprunova T.P., Shmykova N.A., Pyshnaya O.N. *Ovoshchi Rossii*, 2012, 4(17): 25-28.
 83. Suprunova T.P., Pyshnaya O.N., Shmykova N.A., Dzhos E.A. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 2009, 3: 60-67.
 84. Suprunova T.P., Logunov A.N., Logunova V.V., Agafonov A.F. *Ovoshchi Rossii*, 2011, 4: 20-21.
 85. Havey M.J. Diversity among male-sterility-inducing and male-fertile cytoplasm of onion. *Theor. Appl. Genet.*, 2000, 101: 778-782 (doi: 10.1007/s001220051543).
 86. Domblides E.A., Domblides A.S., Zayachkovskaya T.V., Bondareva L.L. *Materialy VI Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii «Biotekhnologiya kak instrument sokhraneniya raznoobraziya rastitel'nogo mira»* [Proc. VI Int. Conf. «Biotechnology as a tool for floral biodiversity conservation»]. Yalta, 2014: 164-165.
 87. Francia E., Tacconi G., Crosatti C., Barabaschi D., Bulgarelli D., Dall'Aglio E., Valè G. Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2005, 82: 317-342 (doi: 10.1007/s11240-005-2387-z).
 88. Stewart C.J., Kang B.C., Liu K., Mazourek M., Moore S.L., Yoo E.Y., Kim B.D., Jahn M.M. The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *Plant J.*, 2005, 42: 675-688 (doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02410.x).
 89. Suprunova T., Pishnaya O., Dzhos E., Mamedov M. Practical use of molecular markers of pungency in breeding program of pepper (*Capsicum annum* L.). *Proc. European Plant Genetic Resources Conference, EUCARPIA «Pre-breeding — fishing in the gene pool»*. Sweden, Alnarp, 2013: 67.
 90. Collard B.C.Y., Mackill D.J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 2008, 363: 557-572 (doi: 10.1098/rstb.2007.2170).