

Научная статья

УДК 581.143.6:57.083

DOI: 10.30901/2658-6266-2025-3-05



Оптимизация протоколов *in vitro* для сортов арбуза *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai селекции ВИР

А. В. Иноземцева¹, А. Я. Евлаш³, А. Г. Елацкова², Е. К. Хлесткина^{1,3}, Н. А. Швачко¹

¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

²Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Кубанская опытная станция – филиал ВИР, Краснодарский край, Россия

³Научно-технологический университет «Сириус», Центр генетики и наук о жизни, Краснодарский край, Россия

Автор, ответственный за переписку: Швачко Наталия Альбертовна n.shvachko@vir.nw.ru

Актуальность. *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai – важная бахчевая культура. Эффективность применения методов культивирования *in vitro* ограничена генотип-специфичной реакцией эксплантов на состав питательных сред, что требует оптимизации протоколов для коммерчески значимых сортов. **Материалы и методы.** Исследовано девять сортов арбуза селекции ВИР. Использовали модификации питательной среды МС для введения в культуру *in vitro*, различные комбинации фитогормонов БАП, НУК, ИУК, 2,4-Д и ТДЗ для укоренения, каллусообразования и регенерации. Статистический анализ выполнен с использованием точного теста Фишера ($p<0,05$).

Результаты и обсуждение. Безгормональные питательные среды обеспечили до 88% введения в культуру *in vitro* жизнеспособных эксплантов. На средах с НУК укоренение достигало 70-88%. Оптимальная индукция каллуса (до 100%) наблюдалась на среде с 0,5 мг/л БАП и 0,1 мг/л 2,4-Д, регенерация – на среде с 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК. **Заключение.** Оптимизированы этапы культивирования эксплантов *in vitro* для различных сортов арбуза, что обеспечивает высокую эффективность введения в культуру, каллусообразования и регенерации, создавая основу для последующих биотехнологических исследований.

Ключевые слова: Cucurbitaceae, каллусогенез, органогенез, арбуз, коллекция ВИР

Благодарности: Работа выполнена в рамках темы НИР № 0481-2022-0007 «Выявление новых генетических маркеров селекционно значимых свойств и новых аллельных вариантов хозяйствственно ценных генов в генофонде культурных растений и их диких родичей при помощи геномных и постгеномных технологий».

Для цитирования: Иноземцева А.В., Евлаш А.Я., Елацкова А.Г., Хлесткина Е.К., Швачко Н.А. Оптимизация протоколов *in vitro* для сортов арбуза *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai селекции ВИР. *Биотехнология и селекция растений.* 2025;8(3):7-18. DOI: 10.30901/2658-6266-2025-3-05

Прозрачность финансовой деятельности: Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы.

© Иноземцева А.В., Евлаш А.Я., Елацкова А.Г., Хлесткина Е.К., Швачко Н.А., 2025

Original article

DOI: 10.30901/2658-6266-2025-3-05

Optimization of *in vitro* protocols for VIR cultivars of watermelon *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai

Anastasiia V. Inozemtseva¹, Anastasia Ya. Evlash³, Anna G. Elatskova², Elena K. Khlestkina^{1,3}, Nataliya A. Shvachko¹

¹N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

²N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), Kuban Experiment Station – Branch of VIR, Krasnodar Region, Russia

³Sirius University of Science and Technology, Research Center for Genetics and Life Sciences, Krasnodar Region, Russia

Corresponding author: Nataliya A. Shvachko, n.shvachko@vir.nw.ru

Background. *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai is an important cucurbit crop. The efficiency of *in vitro* methods is limited by the genotype-specific response of explants to culture media composition, which necessitates protocol optimization for commercially important cultivars.

Materials and methods. Nine watermelon cultivars bred at VIR were studied. The research used modified MS culture media for introducing explants into *in vitro* culture, as well as various combinations of phytohormones (BAP, NUK, IUK, 2,4-D, and TDZ) for rooting, callus formation, and regeneration. Statistical analysis was performed using Fisher's exact test ($p<0.05$). **Results.** Hormone-free culture media ensured the introduction of up to 88% of viable explants into *in vitro* culture. On the NAA-supplemented media, rooting reached 70-88%. Optimal callus induction (up to 100%) was observed on the medium with 0.5 mg/L BAP and 0.1 mg/L 2,4-D, while regeneration was most effective on the medium with 1 mg/L BAP and 0.1 mg/L NAA. **Conclusion.** The stages of *in vitro* explant cultivation for various watermelon cultivars have been optimized, ensuring highly efficient introduction into culture, callus formation, and regeneration, thus creating a basis for subsequent biotechnological research.

Keywords: Cucurbitaceae, callusogenesis, organogenesis, watermelon, VIR collection

Acknowledgements: the work was carried out within the framework of the Research Project No. 15H 0481-2022-0007 “Identifying new genetic markers of significant traits for breeding and new allelic versions of agronomically important genes in the genetic diversity of cultivated plants and their wild relatives using genomic and postgenomic technologies”.

For citation: Inozemtseva A.V., Evlash A.Ya., Elatskova A.G., Khlestkina E.K., Shvachko N.A. Optimization of *in vitro* protocols for VIR cultivars of watermelon *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2025;8(3):7-18. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2025-3-05

Financial transparency: The authors have no financial interest in the presented materials or methods. The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employers.

© Inozemtseva A.V., Evlash A.Ya., Elatskova A.G., Khlestkina E.K., Shvachko N.A., 2025

Введение

Арбуз *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai – одна из наиболее значимых бахчевых культур, ценимых за высокую пищевую и диетическую ценность. В последние годы культура тканей и клеточная биотехнология рассматриваются как перспективные инструменты для ускоренной селекции и генетической модификации арбуза. Данная культура является сложным объектом для регенерации *in vitro* из-за высокой генотипической вариабельности, низкой частоты каллусообразования и побегообразования (Compton, Gray, 1993a; Wang et al., 2013). Однако для многих представителей семейства Cucurbitaceae уже описаны эффективные схемы стерилизации, каллусогенеза и органогенеза (Venkatachalam et al., 2018; Hamdeni et al., 2022).

На начальной стадии введения растений в культуру *in vitro* большинство исследователей используют среду Мурасиге-Скуга (МС; англ. Murashige and Skoog medium, MS), обеспечивающую условия для стабильно-го прорастания и введения эксплантов в асептическую культуру (Murashige, Skoog, 1962; Krug et al., 2005). Для индукции каллуса наибольшее распространение получил синтетический ауксин 2,4-дихлорфеноксиусусная кислота (2,4-Д) в концентрации 0,5-2,5 мг/л, особенно при использовании семядольных эксплантов (Sultana, Bari, 2003; Khatun et al., 2010). Ряд работ демонстрирует возможность получения эмбриогенного каллуса и последующей регенерации побегов (Dong, Jia, 1991; Compton, Gray, 1993b, однако эффективность этих подходов значительно варьирует в зависимости от генотипа исследуемых растений (Compton, Gray, 1993a; Liu et al., 2024).

Для индуцирования побегообразования применяют высокие концентрации цитокининов, прежде всего 6-бензиламинопурина (БАП) в диапазоне 1-2 мг/л, часто в комбинации с низкими дозами ауксинов, таких как 1-нафтилусусная, иначе α -нафтилусусная, кислота (НУК) или индолилусусная кислота (ИУК) (Compton, Gray, 1993b; Li et al., 2011). Укоренение регенерантов обычно проводят на базовой или половинной МС, в которую добавляют НУК, индолилмасляную кислоту (ИМК) или синтетическое производное фенилмочевины, стимулирующее цитокинез у растений – тиодизурон (N-фенил-N'-(1,2,3-тиадиазол-5-ил)мочевина, (ТДЗ) в концентрации 0,1-0,5 мг/л (Yalcin-Mendia et al., 2003; Badr-Elden et al., 2012).

Несмотря на накопленные данные, остаются неясными вопросы выбора оптимальных сред для разных сортов арбуза, эффективности длительного поддержания каллусных линий и влияния типа экспланта на регенерационный потенциал. Особенно недостаточно сведений о сравнении нескольких сортов в едином эксперименте на широком наборе сред.

Выбор девяти сортов арбуза *C. lanatus* был обусловлен

как их коммерческой востребованностью, так и широким фенотипическим разнообразием. Среди отобранных сортов есть раннеспелые ('Подарок Солнца', 'Сюрприз'), среднеранние ('Ольгинский', 'Красавчик'), среднеспелые ('Адам', 'Благодатный', 'Чарльстон грэй' - Приложение/Supplement¹), среднепоздний сорт 'Чёрный принц' и поздний – 'Святослав'. Эти сорта различаются по форме плода, окраске и рисунку коры, цвету мякоти, длине плетей и устойчивости к биотическим/абиотическим стрессам, что подтверждено данными изучения коллекции ВИР (Tekhanovich et al., 2012; Tekhanovich et al., 2019).

Настоящая работа направлена на оптимизацию условий введения в культуру *in vitro*, каллусообразования, укоренения и регенерации различных сортов арбуза, относящихся к коллекции ВИР. В отличие от большинства опубликованных работ, сосредоточенных на единичных генотипах, в данном исследовании проведено систематическое сравнение нескольких часто используемых искусственных сред для культивирования *in vitro* ряда сортов с различным генетическим фоном. Это позволило выявить как общие закономерности, так и генотип-специфичные особенности ответа на регуляторы роста. Такой подход даёт практическую основу для дальнейших работ по трансформации и редактированию генома арбуза.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования в данной работе были использованы девять сортов арбуза из коллекции ВИР. Все сорта культивируются в условиях Кубанской опытной станции и имеют высокие оценки качества, они являются засухоустойчивыми, устойчивыми к фузариозному увяданию и антракнозу. Среди выбранных сортов представлены образцы, отличающиеся по габитусу растения, форме плода, цвету и рисунку коры, окраске мякоти и срокам созревания (табл. 1). Для этапа введения в культуру *in vitro* использовали зрелые семена, а для укоренения – семядоли асептически культивированных проростков. Для каждого варианта среди эксперимент выполняли в трёх повторностях. В каждой повторности использовали по 8-10 эксплантов (в зависимости от сорта). В таблицах приведены суммарные значения, полученные в трёх независимых опытах. Все показатели: введение в культуру, каллусообразование, укоренение и регенерацию – оценивали через 4-6 недель после закладки опыта.

Семена предварительно освобождали от перикарпа, после чего обрабатывали по многоступенчатому протоколу, в основу которого были положены процедуры, использованные другими исследователями (Murashige, Skoog, 1962; Compton, Gray, 1993a; Krug et al., 2005), но с определёнными модификациями:

¹ Приложение доступно в онлайн версии статьи/ The Supplement is available in the online version of the paper: DOI: 10.30901/2658-6266-2025-3-05

- Предварительно семена замачивали в теплой дистиллированной воде 36°C, 40 мин;
- Предварительная обработка Tween-20 1 капля (~20 µl на 100 мл воды) в течение 5 мин;
- Моющее средство (Fairy) в течение 20 мин на шейкере при 180 об/мин

- Промывка водопроводной водой 5 раз
- 10% раствор NaOCl на шейкере при 180 об/мин в течение 15 мин;
- Промывка стерильной дистиллированной водой (15×);
Очищенные семена помещали по одному в пробирки на соответствующие среды (табл. 2).

Таблица 1. Сорта, использованные в данной работе

Table 1. Cultivars used in this study

Номер каталога ВИР/ VIR Cat. No.	Название сорта/ Cultivar name	Происхождение/ Origin	Срок созревания/ Ripening time	Тип растения/ Plant type	Цвет мякоти/ Flesh color	Форма плода/ Fruit shape	Цвет и рисунок коры/ Rind color and pattern
к-5402	‘Подарок Солнца’	Россия	Ранний	КП	Густо-розовая	Шаровидная	Ярко-Желтый
к-5429	‘Сюрприз’	Россия	Ранний	КП	Желтая	Шаровидная	Светло-зеленый фон с черно-зелеными узкими полосами
к-5090	‘Ольгинский’	Россия	Среднеранний	ПЛ	Густо-розовая и малиновая	Тупоэллиптическая	Темно-зеленый
к-5667	‘Красавчик’	Россия	Среднеранний	ПЛ	Густо-розовая и малиновая	Шаровидная	Светло-зеленый фон с темно-зелеными широкими полосами
к-4128/ 8954475*	‘Charleston Gray’ 133 / ‘Чарльстон грэй’*	United States/ Россия*	Среднеспелый*	ПЛ/ СПЛ*	Розово-красная*	Цилиндрическая*	Фон белесый, без рисунка, пятнистость очень слабая*
к-5426	‘Благодатный’	Россия	Среднеспелый	ПЛ	Густо-розовая	Шаровидная	Светло-зеленый фон с узкими черно-зелеными полосами
к-5591	‘Адам’	Россия	Среднеспелый	ПЛ	Густо-розовая	Шаровидная	Светло-зеленый фон с черно-зелеными средней ширины полосами
к-5425	‘Чёрный принц’	Россия	Среднепоздний	ПЛ	Малиновая	Цилиндрическая	Темно-зеленый
к-5428	‘Святослав’	Россия	Поздний	К	Малиновая	Шаровидная	Светло-зеленый фон с широкими, размытыми темно-зелеными полосами

Примечания: ПЛ – плетистое (длинноплетистое) растение; СПЛ – среднеплетистое; КП – короткоплетистое; К – кустовое. Сроки созревания (группы спелости): ранние – 65-70 дней; среднеранние – 71-80 дней; среднеспелые – 81-85 дней; среднепоздние – 86-95 дней; поздние – более 95 дней; * - см. Приложение

Notes: PL – vining (long-vine) plant; SPL – medium-vine; KП – short-vine; K – bushy. Ripening period (maturity groups): early – 65-70 days; mid-early – 71-80 days; mid-ripening – 81-85 days; mid-late – 86-95 days; late – over 95 days; * - see the Supplement

Условия проращивания: 25 ± 2°C, фотопериод 16 ч свет / 8 ч темнота, длительность культивирования 5-47 суток в зависимости от сорта. После появления семядолей 90% проростков переводили на укоренение, оставшиеся 10 % – на индукцию каллуса.

Для анализа частоты успешного введения эксплантов в культуру *in vitro*, укоренения побегов, индукции каллусообразования и регенерации использовали точный тест Фишера, который корректно применяется для категориальных данных с малым числом наблюдений (≤ 24 на вариант). Для каждой питательной среды подсчитывали количество успешных и неуспешных случаев для каждого сорта, после чего выполняли попарные сравнения между средами. Данный тест позволяет достоверно оценивать различия между двумя или более категориями при небольших выборках и бинарных исходах (успех/

неуспех), где применение χ^2 -критерия может быть некорректным. Критический уровень статистической значимости *p* принимали равным 0,05 (*p*=0,05). Статистическая обработка данных выполнена в среде Python 3.11 (библиотека SciPy 1.11).

Результаты

Введение в культуру *in vitro* и поддержание в культуре образцов арбуза. Введение арбуза в культуру *in vitro* проходило через ряд стандартных стадий, включая проращивание семян в стерильных условиях, получение проростков с семядолями и корешками, стадию роста побегов. Визуализация этих этапов представлена на рисунке 1 (1a-1b).

Таблица 2. Основные питательные среды, применённые на каждом этапе протокола культивирования *in vitro* для арбуза *Citrullus lanatus*

Table 2. Main culture media used at each stage of the *in vitro* cultivation protocol for watermelon *C. lanatus*

Этап/ Stage	Среды/ Culture media	Литература/ Reference
Прорастание	МС	Murashige, Skoog, 1962
	½ МС	
	МС + 2 мг/л 6-БАП	
	МС + 0,5 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л ИУК	
Индукция каллуса	МС + 0,5 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л 2,4-Д	Wang et al., 2013
	МС + 2 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л 2,4-Д	
	МС + 0,5 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л ТДЗ	
	МС + 1,0 мг/л 2,4-Д	
Регенерация	МС + 0,5 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л НУК	Compton, Gray, 1993a
	МС + 2 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л НУК	
	МС + 1 мг/л 6-БАП + 0,2 мг/л НУК	
	МС + 2 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л 2,4-Д	
Укоренение	МС + 1 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л НУК	Sultana, Bari, 2003
	МС + 2 мг/л 6-БАП + 1 мг/л НУК	
	МС + 0,1 мг/л НУК	
	МС + 0,2 мг/л НУК	
	МС + 0,5 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л НУК	Sultana, Bari, 2003

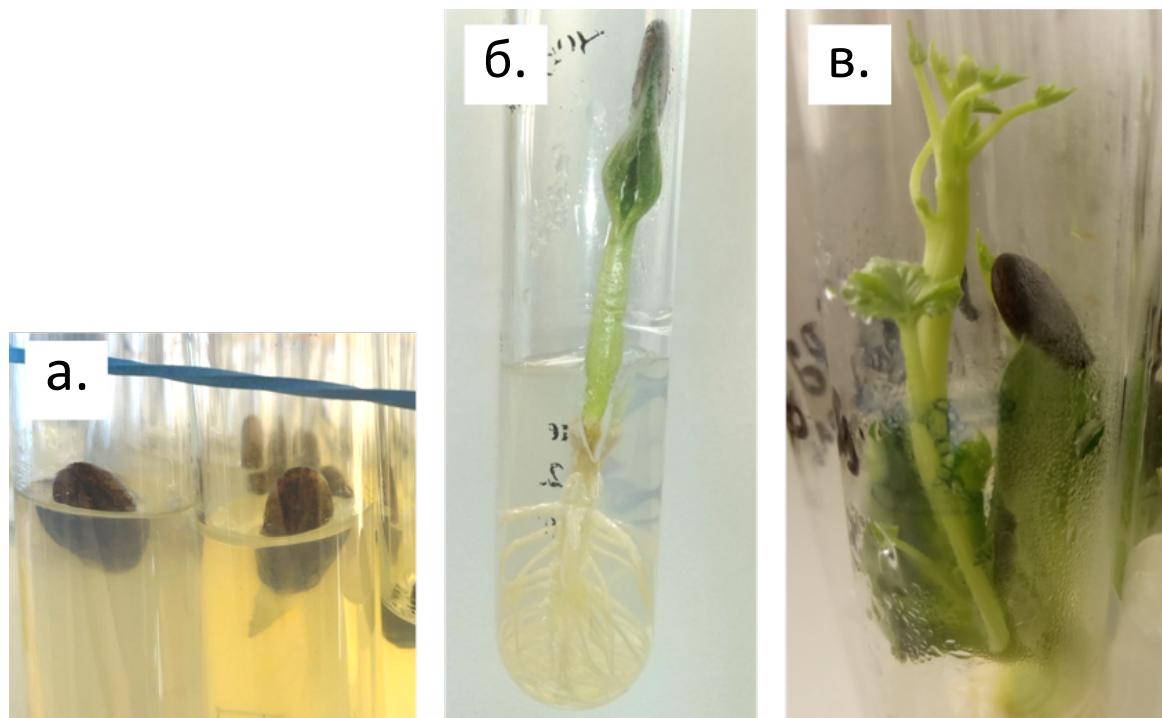


Рис. 1. Процесс введения *Citrullus lanatus* в культуру *in vitro*

а. – семена на начальной стадии культивирования; б. – развитие семядолей, формирование корневой системы; в – активный рост и удлинение стебля

Fig. 1. The process of introducing *C. lanatus* into *in vitro* culture

а. – seeds at the initial cultivation stage; б. – development of cotyledons and formation of the root system; в – active stem growth and elongation

Эффективность введения эксплантов арбуза в культуру *in vitro* значительно варьировала в зависимости от состава питательной среды, качества семян и генотипа. Среды $\frac{1}{2}$ МС (75%) и МС (69,9%) оказались значительно эффективнее, чем МС + 2 мг/л БАП (30,1%) и МС + 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИУК (32,9%) ($p < 0,001$). Среда $\frac{1}{2}$ МС обеспечила наилучшие результаты для большинства сортов, включая ‘Подарок Солнца’, ‘Сюр-

приз’ и ‘Красавчик’ (88%). Напротив, добавление 2 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) резко снижало прорастание у всех сортов, за исключением сорта ‘Святослав’, у которого этот показатель достигал 58%. Среда с 0,5 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИУК вызывала ещё более выраженное подавление прорастания у большинства генотипов, результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Оценка эффективности введения эксплантов арбуза в культуру *in vitro* на различных средах

Table 3. Evaluated effectiveness of introducing watermelon explants into *in vitro* culture on different media

Название сорта/ Cultivar name	Состав питательных сред/ Culture media composition			
	$\frac{1}{2}$ МС	МС	МС + 2 мг/л БАП	МС + 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИУК
‘Подарок Солнца’	21 (88%)	21 (88%)	11 (46%)	4 (17%)
‘Чёрный принц’	17 (71%)	16 (67%)	4 (17%)	18 (75%)
‘Ольгинский’	20 (83%)	18 (75%)	2 (8%)	3 (12%)
‘Сюрприз’	21 (88%)	21 (88%)	17 (71%)	16 (67%)
‘Чарльстон грэй’	20 (83%)	17 (71%)	2 (8%)	6 (25%)
‘Святослав’	11 (46%)	11 (46%)	14 (58%)	0 (0%)
‘Благодатный’	20 (83%)	17 (71%)	4 (17%)	4 (17%)
‘Адам’	11 (46%)	9 (38%)	0 (0%)	9 (38%)
‘Красавчик’	21 (88%)	21 (88%)	11 (46%)	11 (46%)

Примечания: указано число успешно проросших семян из 24 помещённых на питательную среду; в скобках – процент, рассчитан как $(\text{успешно}/24) \times 100$

Notes: The number denotes the seeds that successfully germinated out of 24 placed on the culture medium; in parentheses is the percentage calculated as $(\text{successful}/24) \times 100$

Когда проростки достигали 2-4 см в высоту, их переносили на питательную среду для поддержания и стимуляции корнеобразования (табл. 4).

Укоренение культивируемых в асептических условиях проростков наблюдалось на всех тестируемых средах, однако его эффективность сильно зависела как от состава среды, так и от генотипа. Наибольшая частота укоренения отмечена на МС + 0,1 мг/л НУК (77,2 %) и МС + 0,5 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК (70,4 %), которые статистически значимо превосходят остальные ($p < 0,01$).

На средах с ИУК укоренение проростков происходит значительно хуже. Особенно низкие показатели зафиксированы для сред с высоким содержанием БАП (МС + 2 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИУК), где в большинстве случаев

наблюдалось либо отсутствие корней, либо избыточное развитие стебля и побегов без корнеобразования (рис. 2). Так, у сортов ‘Чарльстон грэй’ и ‘Ольгинский’ не удалось добиться укоренения ни на одной из сред с ИУК. У некоторых сортов (например, ‘Подарок Солнца’, ‘Красавчик’) проростки формировали каллус в основании побега вместо полноценной корневой системы.

Наряду с этим, у нескольких сортов (например, ‘Чёрный принц’, ‘Красавчик’) хорошие результаты корнеобразования были достигнуты и на средах с комбинацией БАП + НУК в средней концентрации (МС + 0,5 мг/л, БАП + 0,5 мг/л НУК), где степень укоренения достигала 75-80%.

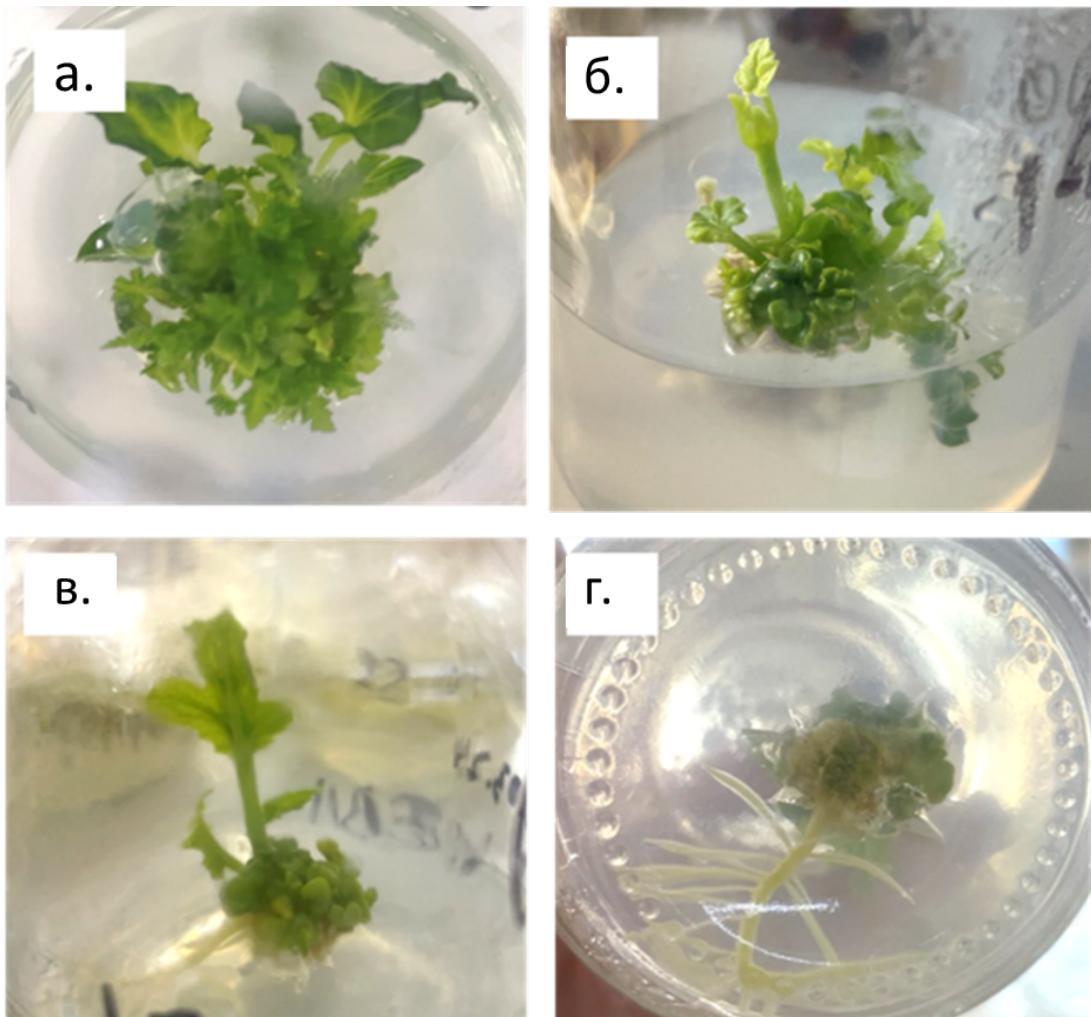


Рис. 2. Индукция корнеобразования у проростков арбуза *Citrullus lanatus* на средах с различными комбинациями регуляторов роста
 а., б. – проростки на среде МС + 2 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИУК;
 в., г. – проростки на среде МС + 0,1 мг/л НУК

Fig. 2. Root induction in watermelon *C. lanatus* seedlings on media with different combinations of growth regulators

а.,б. – seedlings on MS medium supplemented with 2 mg/L BAP and 0.1 mg/L IAA;
 в.,г. – seedlings on MS medium supplemented with 0.1 mg/L NAA

Каллусогенез. Каллусообразование оценивали у восьми сортов арбуза ('Адам' на каллус не закладывали) (табл. 5) с использованием четырёх вариантов питательных сред (см. табл. 2). Данные приведены как «число успешных эксплантов/ общее число эксплантов (% индукции)». Среда МС + 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л 2,4-Д (72,6%) показала лучшие результаты по сравнению с МС + 2 мг/л БАП + 0,1 мг/л 2,4-Д (56,0%, $p = 0,036$) и МС + 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л ТДЗ (50,0%, $p = 0,004$). Наиболее эффективной оказалась среда МС + 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л 2,4-Д: частота индукции каллуса превы-

шала 80% у 'Подарка Солнца' (83%), 'Чёрного принца' (83%), 'Сюрприза' (81%) и 'Красавчика' (83%). Среда МС + 1,0 мг/л 2,4-Д также показала хорошую эффективность 62%-88% у сортов 'Благодатный', 'Ольгинский', 'Сюрприз', 'Красавчик', 'Подарок солнца', 'Черный принц', 'Чарльстон грэй'. Комбинации с ТДЗ или повышенным БАП обеспечивали индукцию каллуса в 56-75% случаев у сортов с высокой отзывчивостью и лишь в 38% у сортов со средней отзывчивостью ('Ольгинский', 'Благодатный'). Самый низкий отклик (12%) продемонстрировал сорт 'Святослав'.

Таблица 4. Оценка укоренения побегов арбуза (*Citrullus lanatus*) на различных средах**Table 4. Evaluation of root formation in watermelon (*C. lanatus*) shoots on different culture media**

Название сорта/ Cultivar name	Состав питательных сред/ Culture media composition				
	МС + 2 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИУК	МС + 0,5 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК	МС + 0,1 мг/л ИУК	МС + 0,1 мг/л НУК	МС + 2 мг/л БАП + 0,1 мг/л НУК
‘Подарок Солнца’	9% (1/11)	80% (8/10)	10% (1/10)	70% (7/10)	80% (8/10)
‘Чёрный принц’	70% (7/10)	80% (8/10)	30% (3/10)	80% (8/10)	80% (8/10)
‘Ольгинский’	0% (0/8)	75% (6/8)	14% (1/7)	88% (7/8)	75% (6/8)
‘Сюрприз’	7% (1/14)	54% (7/13)	15% (2/13)	69% (9/13)	62% (8/13)
‘Чарльстон грэй’	0% (0/9)	75% (6/8)	13% (1/8)	88% (7/8)	88% (7/8)
‘Святослав’	0% (0/7)	57% (4/7)	0% (0/8)	83% (5/6)	0% (0/8)
‘Благодатный’	0% (0/7)	63% (5/8)	0% (0/7)	75% (6/8)	0% (0/9)
‘Адам’	0% (0/5)	80% (4/5)	0% (0/5)	80% (4/5)	0% (0/6)
‘Красавчик’	50% (6/12)	75% (9/12)	18% (2/11)	73% (8/11)	82% (9/11)

Примечания: в скобках указано число укоренившихся побегов/общее число побегов, посаженных на данную среду.

Процент рассчитан как (укоренившиеся \div общее) $\times 100$

Notes: The number of rooted shoots/total number of shoots planted on a given medium is in parentheses.

The percentage calculated as (rooted \div total) $\times 100$

Таблица 5. Индукция каллусообразования на эксплантах из семядолей арбуза**Table 5. Induction of callus formation on explants from watermelon cotyledons**

Название сорта/ Cultivar name	Состав питательных сред/ Culture media composition			
	МС + 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л 2,4-Д	МС + 2 мг/л БАП + 0,1 мг/л 2,4-Д	МС + 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л ТДЗ	МС + 1,0 мг/л 2,4-Д
‘Подарок Солнца’	10/12 (83%)	8/12 (67%)	7/12 (58%)	9/12 (75%)
‘Чёрный принц’	10/12 (83%)	8/12 (67%)	7/12 (58%)	9/12 (75%)
‘Ольгинский’	4/8 (50%)	3/8 (38%)	3/8 (38%)	5/8 (62%)
‘Сюрприз’	13/16 (81%)	10/16 (62%)	9/16 (56%)	11/16 (69%)
‘Чарльстон грэй’	8/8 (100%)	6/8 (75%)	5/8 (62%)	7/8 (88%)
‘Красавчик’	10/12 (83%)	8/12 (67%)	7/12 (58%)	9/12 (75%)
‘Святослав’	2/8 (25%)	1/8 (12%)	1/8 (12%)	2/8 (25%)
‘Благодатный’	4/8 (50%)	3/8 (38%)	3/8 (38%)	5/8 (62%)

Примечания: число эксплантов, образовавших каллус/общее число эксплантов на данной среде; процент вычислен как (каллус \div общее) $\times 100$

Notes: Number of explants that formed callus/total number of explants on a given medium; percentage calculated as (callus \div total) $\times 100$

В процессе эксперимента производили чередование гормональных и безгормональных сред для каллусных культур с интервалом 30-45 дней, чтобы поддерживать жизнеспособность тканей. Всего было проведено до 12-14 пассажей в течение 7-9 месяцев. Самая высокая жизнеспособность наблюдалась у сортов ‘Красавчик’ и ‘Чёрный принц’: каллус оставался плотным, светло зеленым и активно наращивал массу в течение всего периода (до 9 месяцев). У сортов ‘Ольгинский’ и ‘Святослав’ уже к 4-5-му субкультивированию отмечалось пожелтение каллуса и замедление его роста. В случае пожелтевшего каллуса применяли МС, дополненную 0,1 мг/л ТДЗ

и 0,5 мг/л БАП: уже через 2-3 недели наблюдалось восстановление зеленого пигмента (рис. 3).

Органогенез каллусной ткани у различных сортов арбуза на питательных средах. Получение жизнеспособных растений из недифференцированных каллусных клеток является необходимым этапом для многих биотехнологических методик, используемых для ускорения селекции. В данном исследовании была изучена способность эксплантов растений арбуза, принадлежащих разным сортам, к регенерации на средах с различными комбинациями цитокининов и ауксинов, таких как БАП, НУК и 2,4-Д (рис. 4).

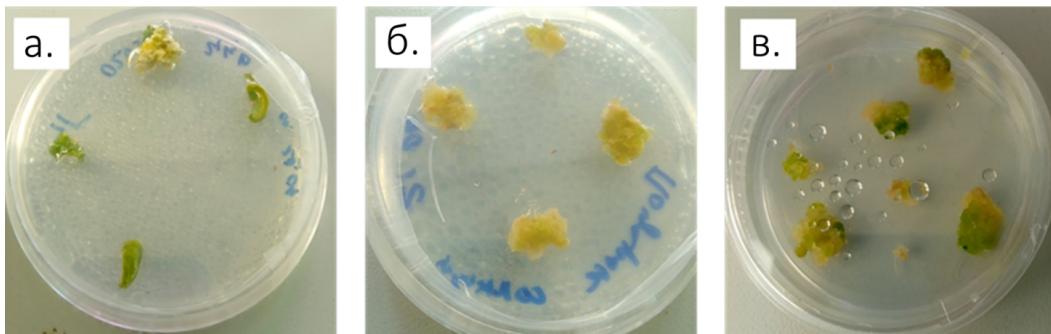


Рис. 3. Этапы формирования каллуса у сорта арбуза ‘Подарок солнца’

- а. – индукция каллусообразования на среде МС + 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л 2,4-Д (21 день культивирования),
 б. – рыхлый жёлтый каллус после перенесения на безгормональную МС (35 дней после пересадки),
 в. – реактивация пожелтевшего каллуса на среде МС + 0,1 мг/л ТДЗ (7 дней после пересадки)

Fig. 3. Stages of callus formation in watermelon ‘Podarok solntsa’

- a. – callus induction on MS + 0.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L 2,4-D (21 days of cultivation),
 b. – loose yellow callus after transfer to hormone-free MS (day 35),
 c – reactivation of yellowed callus on MS + 0.1 mg/L TDZ (day 7 after transfer)

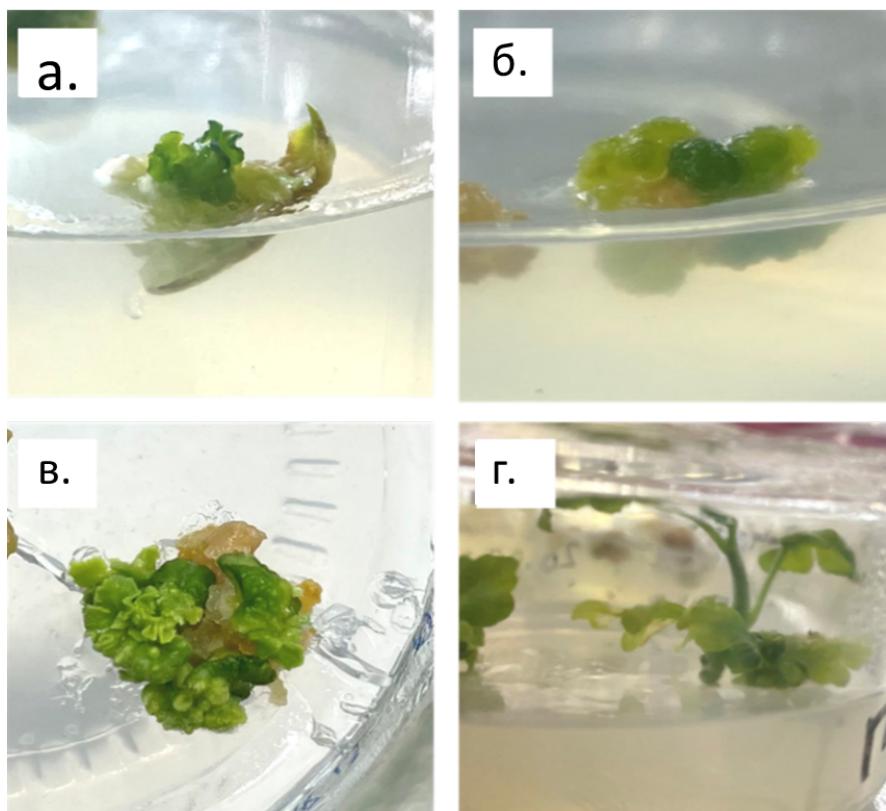


Рис. 4. Регенерация побегов из каллуса сорта арбуза ‘Черный принц’ на среде МС + 2 мг/л БАП + 0,2 мг/л НУК

- а., б. – начальная стадия регенерации;
 в. – формирование первых листьев полноценного побега (24 день после пересадки);
 г. – общий вид регенеранта на поздних стадиях (30 дней и более после пересадки)

Fig. 4. Regeneration of shoots from callus of watermelon ‘Cherniy prince’ on MS + 2 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA

- a., b. – initial stage of regeneration;
 c. – formation of the first leaves of a fully developed shoot (day 24 after transfer);
 d. – overall view of regeneration at later stages (30 and more days after transfer)

На этапе регенерации из каллуса было испытано пять цитокинин-ауксиновых комбинаций. МС + 2 мг/л БАП + 0,2 мг/л НУК (87,5%) и МС + 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л НУК (75%) обеспечили наибольшую частоту регенерации; среда МС + 2 мг/л БАП + 0,1 мг/л 2,4-Д (25 %) была

статистически менее эффективна ($p = 0,041$). Наиболее универсальным оказался вариант культуральной среды МС + 2 мг/л БАП + 0,1 мг/л НУК – побеги формировались у 6 из 8 оценённых сортов (табл. 6).

Таблица 6. Регенерация из каллуса на различных средах у сортов арбуза
Table 6. Regeneration from callus on various media in watermelon cultivars

Название сорта/ Cultivar name	Состав питательных сред/ Culture media composition				
	МС + 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л НУК	МС + 2 мг/л БАП + 0,1 мг/л НУК	МС + 2 мг/л БАП + 0,1 мг/л 2,4-Д	МС + 1 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК	МС + 2 мг/л БАП + 0,2 мг/л НУК
‘Подарок Солнца’	+	–	+	+	+
‘Чёрный принц’	–	+	–	–	+
‘Ольгинский’	+	+	–	–	+
‘Сюрприз’	+	+	–	+	+
‘Чарльстон грэй’	–	–	+	–	+
‘Красавчик’	+	–	–	+	+
‘Святослав’	+	–	–	–	–
‘Благодатный’	+	–	–	–	+

Примечания: + успешная регенерация, – отсутствие регенерантов

Notes: “+” signifies successful regeneration; “–” signifies the absence of regenerants

У таких сортов как ‘Подарок Солнца’, ‘Сюрприз’ и ‘Красавчик’ регенерация происходила на всех проверенных средах, тогда как сорта ‘Чёрный принц’ и ‘Чарльстон грэй’ ответили только на повышенное содержание БАП (2 мг/л). Сорт ‘Святослав’ дал побеги исключительно при низком содержании БАП (0,5 мг/л), в случае сорта ‘Благодатный’ требовалось повышение концентрации НУК (0,2 мг/л).

Обсуждение

Разработанные нами протоколы введения арбуза в культуру *in vitro* демонстрируют эффективность, сравнимую с результативностью уже опубликованных протоколов. Различия в эффективности введения в культуру *in vitro*, каллусообразования и регенерации между питательными средами связаны с различным физиологическим действием регуляторов роста. Цитокинины (БАП) стимулируют деление клеток и формирование каллуса, что особенно выражено на средах с низким содержанием синтетического ауксина 2,4-Д. Напротив, высокое содержание цитокининов может угнетать морфогенез у некоторых сортов. НУК способствовала эффективному укоренению побегов, тогда как ИУК в тех же концентрациях была значительно менее результативной, что согласуется с данными литературы о её меньшей стабильности и слабом стимулирующем эффекте у бахчевых культур. Различия в реакции на регуляторы роста между сортами отражают генотип-специфичную чувствительность

к регуляторам роста, что неоднократно отмечалось для культур Cucurbitaceae (Compton, Gray, 1993a; Krug et al., 2005).

В настоящем исследовании для индукции каллусообразования и регенерации мы использовали среды МС с добавлением БАП в концентрации от 0,5 мг/л до 2 мг/л в сочетании с НУК (0,1-0,5 мг/л) или 2,4-Д (0,1 мг/л). Нами получены высокие показатели (до 100 %) на среде МС + 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л 2,4-Д так же, как и в работах других исследователей (Wang et al. 2013), которые рекомендовали питательную среду с БАП и 2,4-Д для индукции образования каллуса у эксплантов арбуза в условиях *in vitro*. В ряде работ по культивированию представителей семейства Cucurbitaceae в асептических условиях отмечена эффективность цитокининов для стимулирования органогенеза, что подтверждается и в настоящем исследовании: регенерация происходила у большинства сортов на средах с БАП (0,5-2,0 мг/л) и НУК (0,1-0,2 мг/л). В отличие от исследования, в котором использовали МС + 2 мг/л БАП как универсальную среду для микреклонального размножения (Wang et al., 2013), в нашей работе выявлена высокая сортоспецифичная чувствительность к гормональному составу, особенно на этапе поддержания растений в условиях *in vitro* и на стадии корнеобразования. Например, на средах с ИУК укоренение было значительно ниже, чем на средах с НУК, что согласуется с данными других исследователей, полученными для культуры тыквенных (Abdollahi et al., 2016). Проведённое нами исследование продемонстрировала

ло, что эффективность введения в культуру и регенерации у арбуза в значительной степени определяется сочетанием состава питательной среды и генотипа растения. Это может говорить о различиях в гормональной регуляции морфогенеза у отдельных сортов, определяющих их разную отзывчивость на состав питательной среды. Системный анализ реакций различных сортов позволил выделить наиболее универсальные и наиболее чувствительные к составу среды генотипы, что открывает возможности для модификации методики с учётом конкретного генетического фона и последующего использования этих схем в программах по трансформации.

Таким образом, предложенные протоколы питательных сред не только подтверждают результаты предыдущих исследований, но и уточняют эффективные концентрации регуляторов роста для устойчивой индукции органогенеза и каллусообразования у различных сортов арбуза, различающихся генотипически.

Заключение

Проведенное исследование позволило успешно адаптировать и модифицировать протоколы для введения в культуру *in vitro*, каллусогенеза и регенерации растений арбуза *Citrullus lanatus* девяти сортов селекции ВИР. Полученные результаты подтверждают значимость подбора оптимального гормонального состава питательных сред, поскольку была выявлена сортоспецифичная реакция растений на сочетание ауксинов и цитокининов, что оказывает решающее влияние на эффективность процессов культивирования.

Таким образом, результаты исследования вносят вклад в понимание гормональных основ введения в культуру *in vitro*, каллусогенеза и регенерации эксплантов арбуза. Полученные данные позволяют расширить базу знаний о генотип-специфичных реакциях сортов и облегчают дальнейшую оптимизацию процедур, необходимых для успешного применения биотехнологических методов в селекции и сохранении генофонда арбуза. Практическое значение данных результатов заключается в создании основ для более эффективных протоколов получения жизнеспособных растений арбуза. Кроме того, установленные оптимальные условия культивирования могут быть применены для сохранения ценных генотипов в *in vitro* коллекциях и повышения воспроизводимости результатов биотехнологических разработок. Полученные знания могут быть использованы при разработке систем генетической трансформации и редактирования генома CRISPR/Cas, ускоряющих селекционные программы.

References/Литература

Abdollahi M.R, Najafi S, Sarikhani H, Moosavi S.S. Induction and development of anther-derived gametic embryos in cucumber

(*Cucumis sativus* L.) by optimizing the macronutrient and agar concentrations in culture medium. *Turkish Journal of Biology*. 2016;40(3):571-579. DOI: 10.3906/biy-1502-55

Badr-Elden A.M., Nower A.A., Ibrahim I.A., Ibrahim M.K., & Elaziem T.M. Minimizing the hyperhydricity associated with *in vitro* growth and development of watermelon by modifying the culture conditions. *African Journal of Biotechnology*. 2012;11(35):8705-8717. DOI: 10.5897/AJB11.4276

Compton M.E., Gray D.J. Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid, and tetraploid watermelon. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1993a;118(1):151-157. DOI: 10.21273/JASHS.118.1.151

Compton M.E., Gray D.J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledons of watermelon. *Plant Cell Reports*. 1993b;12(2):61-65. DOI: 10.1007/BF00241935

Dong J.Z., Jia S.R. High-efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad). *Plant Cell Reports*. 1991;9(10):559-562. DOI: 10.1007/BF00232331

Hamdeni I., Louhaichi M., Slim S., Boulila A., Bettaieb T. Incorporation of organic growth additives to enhance *in vitro* tissue culture for producing genetically stable plants. *Plants*. 2022;11(22):3087. DOI: 10.3390/plants11223087

Khatun M.M., Hossain M.S., Khalekuzzaman M., Rownaq A., Rahman M. *In vitro* plant regeneration from cotyledon and internodes derived callus in watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.). *International Journal of Sustainable Crop Production*. 2010;5(4):25-29.

Krug M.G.Z., Stipp L.C.L., Rodriguez A.P.M., Mendes B.M.J. *In vitro* organogenesis in watermelon cotyledons. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2005;40(9):861-865. DOI: 10.1590/S0100-204X2005000900004

Li J., Li X.M., Qin Y.G., Tang Y., Wang L., Ma C., Li H.X. Optimized protocol for plant regeneration of watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.). *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(48):9760-9765. DOI: 10.5897/AJB11.550

Liu C., Guo Y., Li H., Fan Y., Wang J., Liu J., Zhang H. Establishment of a shoot-tip regeneration system of watermelon. *HortScience*. 2024;59(9):1419-1421. DOI: 10.21273/HORTSCI8094-24

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Sultana R.S., Bari M.A. Effect of different plant growth regulators on direct regeneration of watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.). *Plant Tissue Culture*. 2003;13(2):173-177.

Tekhanovich G.A., Yelatskova A.G., Yelatskov Y.A. The role of VIR's global collection of cucurbitaceous crops in plant breeding. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2012;169:289-294. [in Russian] (Теханович Г.А., Елацкова А.Г., Елацков Ю.А. Роль мировой коллекции бахчевых культур ВИР в селекции. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2012;169:289-296.)

Tekhanovich G.A., Elatskova A.G., Elatskova Yu.A. Genetic sources for breeding bushy and short-vine watermelon cultivars. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2019;180(2):89-94. [in Russian] (Теханович Г.А., Елацкова А.Г., Елацкова Ю.А. Генетические источники для селекции кустовых и короткоклоптистых сортов арбуза. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2019;180(2):89-94). DOI: 10.30901/2227-8834-2019-2-89-94

Venkatachalam P., Jinu U., Sangeetha P., Geetha N., Sahi S.V. High-frequency plant regeneration from cotyledonary node explants of *Cucumis sativus* L. 'Green Long' via adventitious shoot organogenesis and assessment of genetic fidelity by RAPD-PCR. *3 Biotech*. 2018;8(1):60. DOI: 10.1007/s13205-018-1083-8

Wang X., Shang L., Luan F. A highly efficient regeneration system for watermelon (*Citrullus lanatus*). *Pakistan Journal of Botany*. 2013; 45(1):145-150.

Yalcin-Mendia N.Y., Ipek M., Kacan H., Curuk S., Sari N., Cetiner S., Gaba V. A histological analysis of regeneration in watermelon. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 2003;12(2):75-79. DOI: 10.1007/BF03263176

Информация об авторах

Анастасия Вадимовна Иноземцева, аспирант, младший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, a.inozemtseva@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0009-0005-8881-8791>

Анастасия Ярославовна Евлаш, младший научный сотрудник, Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, 354340 Россия, Краснодарский край, Федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., 1, evlash-nastja@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0246-8929>

Анна Генриховна Елацкова, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Кубанская опытная станция – филиал ВИР, 352183 Россия, Краснодарский край, п. Ботаника, ул. Центральная, 2, elatskova.a@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9735-8700>

Елена Константиновна Хлесткина, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, директор, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44; Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, 354340 Россия, Краснодарский край, Федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., 1, director@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

Наталья Альбертовна Швачко, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, и.о. заместителя директора по научно-организационной работе, и.о. заведующего, лаборатория постгеномных исследований, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, n.shvachko@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1958-5008>

Information about the authors

Anastasiiia V. Inozemtseva, Postgraduate Student, Junior Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, a.inozemtseva@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0009-0005-8881-8791>

Anastasia Ya. Evlash, Junior Researcher, Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, 1, Olimpiysky Avenue, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, 354340 Russia, evlash-nastja@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0246-8929>

Anna G. Elatskova, Cand. Sci. (Agriculture), Senior Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), Kuban Experiment Station, Station – Branch of VIR, 2, Tsentralnaya Street, Botanika Settlement, Krasnodar Region, 352183 Russia, elatskova.a@yandex.ru, <https://orcid.org/0000 0001 9735 8700>

Elena K. Khlestkina, Dr. Sci. (Biology), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia; Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, 1, Olimpiysky Avenue, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, 354340 Russia, khlest@bionet.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

Nataliya A. Shvachko, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Acting Deputy Director for Scientific and Organizational Work, Acting Head, Laboratory of Postgenomic Research, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, n.shvachko@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1958-5008>

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 20.06.2025; одобрена после рецензирования 25.08.2025; принятая к публикации 22.09.2025.
The article was submitted on 20.06.2025; approved after reviewing on 25.08.2025; accepted for publication on 22.09.2025.