

РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* РАСТЕНИЙ ПАРТЕНОКАРПИЧЕСКОГО ОГУРЦА

Папихин Р.В.¹

кандидат с.-х. наук,

и. о. начальника НЦ биотехнологии и селекции

ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ,

г. Мичуринск, Россия

Муратова С.А.²

кандидат биол. наук,

зав. лаб. биотехнологии

ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ,

г. Мичуринск, Россия

Аннотация. Предложен протокол введения в культуру *in vitro* растений партенокарпического огурца. В качестве биологических объектов выбраны гибриды партенокарпического огурца: Мартин F₁, Раис F₁, Кадет F₁, Кураж F₁. Для стерилизации семян использовали 0,1% раствор сулемы (HgCl₂) и раствор гипохлорита натрия («Белизна» в разведении водой 1:1). Для 100% стерильности эксплантов с сохранением их жизнеспособности свыше 90% достаточно применение гипохлорита натрия («Белизна») в разведении водой 1:1, при экспозиции стерилизации 15 минут.

Ключевые слова: партенокарпический огурец, культура *in vitro*, стерилизующий препарат.

¹Папихин Р.В. parom10@mail.ru

²Муратова С.А., smuratova@yandex.ru

Значительное место в разработке приоритетных направлений науки занимает метод культуры растительных клеток, тканей и органов. В настоящее время, методы *in vitro* используются для решения различных задач, таких как клональное микроразмножение, индукция каллусогенеза и тканевая селекция, разработка методов ускоренного получения гомозиготных линий для гетерозисной селекции с использованием андро- и гиногенеза, соматический эмбриогенез, использование различных систем молекулярно-генетического анализа и т.д. Растительная ткань в клеточной культуре является основным объектом генетической трансформации при помощи *Agrobacterium tumefaciens* или электропорации.

Использование культуры *in vitro* для получения растений-регенерантов лежит в основе усовершенствования коммерчески значимых сортов овощных растений. Используя среды, содержащие токсины патогенных микроорганизмов, осмотически активные вещества или соединения, относящиеся к группе поллютантов (например, тяжелые металлы) можно получать клеточные линии, а затем и растения, активно растущие в присутствии селективного фактора. Решение таких проблем, как морозостойкость, устойчивость к бактериозам, грибным и вирусным заболеваниям, повышение лежкости плодов можно значительно ускорить с помощью методов современной биотехнологии при условии наличия определенной методологической базы.

Современные научные разработки дают возможность получить высокоэффективные партенокарпические линии огурца в культуре ткани «*in vitro*» с помощью метода клонального микроразмножения. Во многих высокоразвитых странах национальные коллекции поддерживают и обновляют именно таким путем. Разработка методов клонального микроразмножения позволяет включить в систему размножения лучшие образцы, обеспечить генетическую однородность всего культивируемого материала, решить проблему слабого развития корневой системы семенного огурца. С применением методов тканевой селекции и генетической инженерии

появляется возможность обеспечить получение форм, устойчивых к основным заболеваниям сельскохозяйственных культур. Выведение и внедрение в практику устойчивых к болезням сортов и гибридов овощных культур является эффективным путем получать гарантированные урожаи, снизить себестоимость продукции и повысить ее биологическую ценность [1-5].

Возможность проведения опытов в строго контролируемых условиях, вне зависимости от сезона, с требуемым количеством повторностей в достаточно краткие сроки, делает культуру *in vitro* удобным модельным объектом для улучшения перспективных генотипов современными методами биотехнологии, что в конечном итоге будет способствовать увеличению урожайности огурца и улучшению качества и стабильности урожая.

Таким образом, целью работы являлось отработка методов введения в стерильную культуру партенокарпического огурца защищенного грунта.

Объекты и методы исследования

В качестве растительных объектов были выбраны наиболее востребованные в тепличных хозяйствах гибриды партенокарпического огурца: Мартин F₁, Раис F₁, Кадет F₁, Кураж F₁,

Для стерилизации семян использовали 0,1% раствор сулемы (HgCl₂) и отечественный коммерческий препарат гипохлорита натрия «Белизна» в разведении водой 1:1. Экспозиция стерилизации от 10 до 25 мин. После стерилизации семена трижды промывали стерильной дистиллированной водой и помещали по одному в пробирки с 7-8 мл питательной среды.

Для культивирования растений *in vitro* на этапе введения использовали минеральную основу питательной среды MS (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением 30 г/л сахарозы, 100 мг/л мезоинозитола, 8 г/л агара. В среду добавляли регуляторы роста растений: 6-бензиламинопурин (6-БАП) - 0,25-0,5 мг/л и ауксин- α-нафтилуксусную кислоту (НУК) или β-индолилуксусную кислоту (ИУК) в концентрации 0,05-0,1 мг/л комплекс витаминов по Мурасиге-Скугу.

Культивировали экспланты при $t=24\pm 1^{\circ}\text{C}$ и 16 ч. день/ 8 ч. ночь фотопериоде.

Результаты исследований

Первым этапом, предваряющим любые работы с культурой ткани, является стерилизация растительных объектов, которая состоит из нескольких последовательных шагов. Полная стерильность исходного материала - необходимое условие нормального развития эксплантов в культуре *in vitro*.

Эффективность введения в культуру зависит от многих факторов, наиболее важны из которых: тип стерилизующего вещества и время обработки; видовые и сортовые особенности растений; тип используемого экспланта; возраст и качество растительного материала; сезон проведения работ.

В настоящее время разработано и активно используется множество схем стерилизации, адаптированных к специфике культуры и типу экспланта. Выбор стерилизатора и экспозиции стерилизации определяется, прежде всего, типом экспланта. Для обеззараживания поверхности эксплантов чаще всего используют растворы хлорсодержащих веществ или соединений ртути.

Как показали результаты исследований, семена овощных культур, предназначенные для посева в производственные теплицы, и прошедшие предварительное протравливание фунгицидными препаратами представляют собой прекрасный объект для введения в стерильную культуру. При всех выбранных режимах обработки разными стерилизующими агентами стерильность растительного материала составляла 100%.

Предварительные опыты на семенах огурца МартинF₁, характеризующихся хорошей прорастающей способностью в условиях теплицы показали, что в ряде случаев возможно снижение жизнеспособности исходных эксплантов в результате применения жестких режимов стерилизации (табл. 1).

Таким образом, для дальнейшей работы предпочтительно применение малотоксичного для человека коммерческого препарата гипохлорита натрия («Белизна») в разведении водой 1:1, при экспозиции стерилизации 15 мин.

Стерильность введенного материала составляла 100%, при этом прорастаемость семян существенно отличалась в зависимости от генотипа (рис. 1).

Таблица 1.

Влияние типа стерилизатора и режима стерилизации на выход стерильных жизнеспособных эксплантов огурца

Форма	Стерилизатор	Экспозиция	Экспланты, %	
			стерильные	жизнеспособные
МартинF ₁	Сулема 0,1 % Тритон X 100	10 минут	100	88,0
	Сулема 0,1 % Тритон X 100	15 минут	100	76,0
	Р-р «Белизна» 1: 1	15 минут	100	96,0
	Р-р «Белизна» 1:1	25 минут	100	92,0

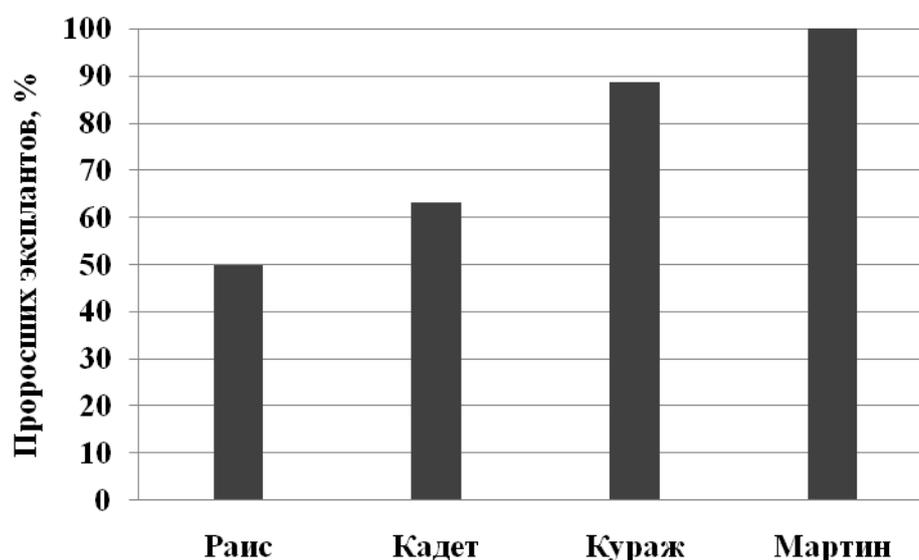


Рисунок 1. Прорастание семян разных форм партенокарпического огурца на питательной среде МС с 0,5 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л НУК.

Как показали наблюдения, развитие семян было неодновременным (рис. 2, 3). Через неделю культивирования эксплантов на среде введения были: непроросшие семена, семена только с зародышевым корешком, семена только с зародышевым стебельком, вполне развитые проростки.

Культура была полностью стерильной, и проростки развивались сходным образом при использовании разных типов стерилизатора. Скорость роста побегов во многом определялась температурой и уровнем освещения. При оптимальных условиях развития формировались крепкие проростки с темно-зелеными листьями.

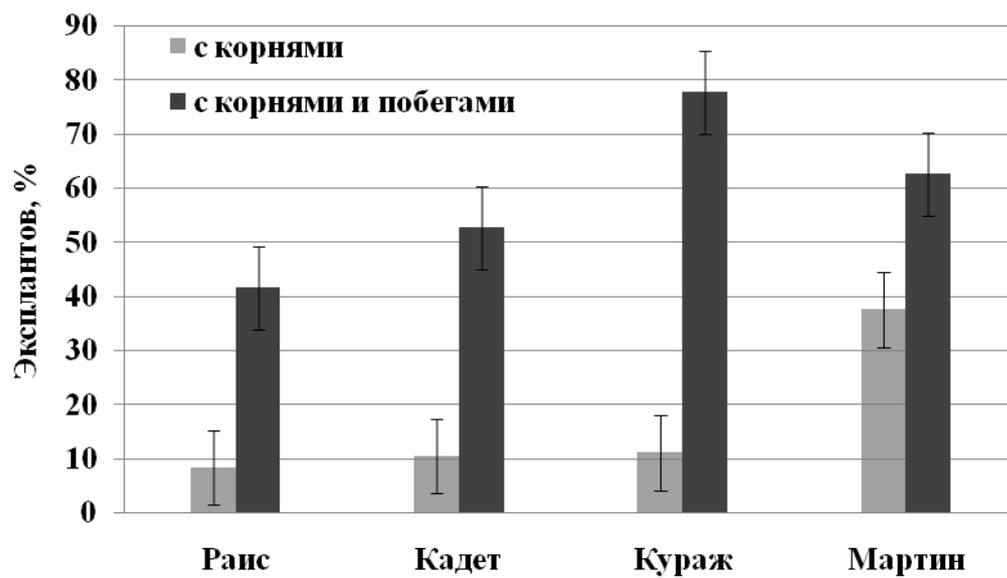
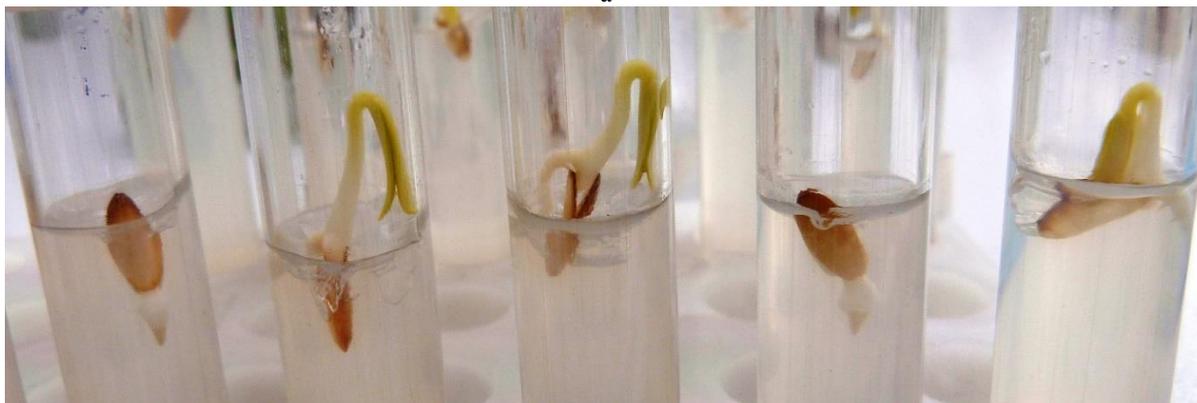


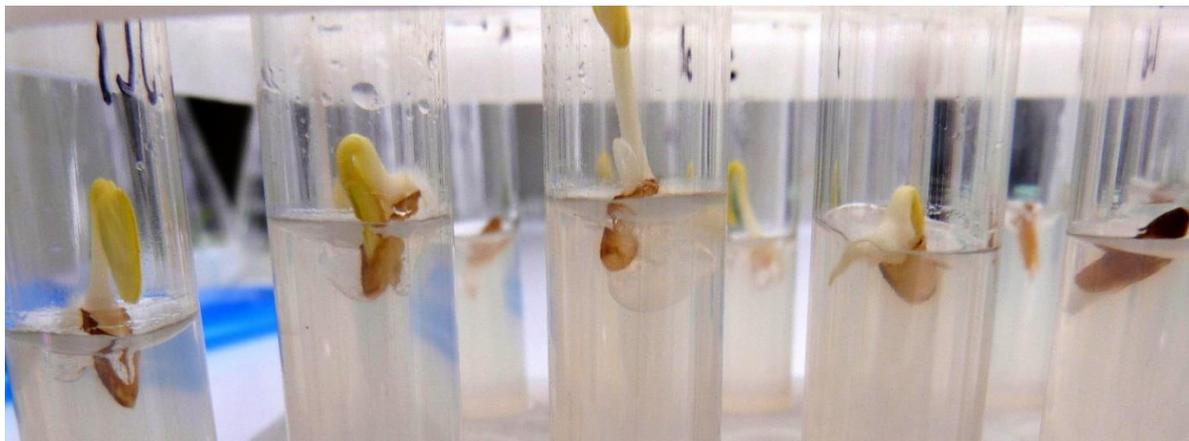
Рисунок 2. Развитие семян F₁ партенокарпического огурца на этапе введения.



а



б



В

Рисунок 3. Развитие семян F₁ партенокарпического огурца на питательной среде МС с 0,5 мг/л 6-БАП и 0,05 мг/л ИУК:а-Кадет; б- Кураж; в- Мартин.

Выводы

Таким образом, семена партенокарпического огурца, прошедшие предварительное протравливание фунгицидными препаратами являются прекрасными объектами для введения в культуру ткани.

В силу того, что стерильность эксплантов равна 100% даже при использовании менее жёсткой цитотоксической нагрузке стерилизующего агента, достаточно применение малотоксичного для человека коммерческого препарата гипохлорита натрия («Белизна») в разведении водой 1:1, при экспозиции стерилизации 15 минут.

Список литературы

1. Неуймин, Д.С. Инновационная активность как фактор развития конкурентной среды в садоводстве Тамбовской области / Д.С. Неуймин // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. 2010. № 2. С. 161-165.
2. Неуймин, Д.С. Обоснование направлений социально-экономического развития сельских территорий Тамбовской области / Д.С. Неуймин // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. 2012. № 4. С. 143-146.
3. Неуймин, Д.С. Конкуренетоспособность сельскохозяйственных предприятий / Д.С. Неуймин, М.В. Романов // Вестник Сумского национального аграрного университета. – 2013. – № 12. – С. 250-255.

4. Неуймин, Д.С. Актуальные вопросы развития рынка овощей защищенного грунта / Д.С. Неуймин // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания, 2015. №4. С. 107-114.

5. Неуймин, Д.С. Особенности государственной поддержки и регулирования рынков сельскохозяйственной продукции в условиях импортозамещения / Д.С. Неуймин, А.В. Бекетов, В.А. Кувшинов, А.И. Трунов// Достижения науки и техники АПК. 2016. Т. 30. № 5. С. 12-15.

DEVELOPMENT OF AN *IN VITRO* CULTURE INTRODUCTION PROTOCOL
PARTHENOCARPCIC CUCUMBER PLANTS

Papikhin R.V.³

Candidate of agricultural sciences. Head of the Scientific Center for Biotechnology
and Breeding,

Michurinsk State Agrarian University,

Michurinsk, Russia.

Muratova S.A.⁴

Candidate of biological sciences, Head. Lab. Biotechnology,

Michurinsk State Agrarian University,

Michurinsk, Russia

Annotation. A protocol for introducing parthenocarpic cucumber in «in vitro» culture of plants was proposed. As biological objects, parthenocarpic cucumber hybrids: Martin F1, Rais F1, Cadet F1, Courage F1 were chosen. For sterilization of seeds a 0.1% solution of mercuric chloride (HgCl₂) and a solution of sodium hypochlorite (“Whiteness” in dilution with water 1: 1) were used. For 100% sterility of explants with preservation of their viability over 90%, use of sodium hypochlorite (“Whiteness”) in dilution with water 1: 1 is sufficient, and 15 minutes sterilization exposure.

Key words: parthenocarpic cucumber, in vitro culture, sterilizing preparation.

³Papikhin R.V., parom10@mail.ru

⁴Muratova S.A., smuratova@yandex.ru