

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 582.998.2:57.085.2
EDN: RSM MRT
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-483-493



Влияние состава питательной среды на сохранение жизнеспособности и генетической стабильности эксплантов хризантемы садовой при депонировании *in vitro*

Н.Н. Иванова✉, В.А. Цюпка, Н.В. Корзина

ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Российская Федерация

Аннотация. Для сохранения *in vitro* ценных сортов хризантемы садовой перспективно культивирование растений при низких положительных температурах. Целью данного исследования было изучение влияния концентраций хлорхолинхлорида в специализированной среде на жизнеспособность, физиологические и морфо-анатомические показатели растений хризантемы сортов Excel, Sheer Purple, William Seward, а также их генетическую стабильность после 12 месяцев депонирования в условиях генобанка *in vitro*. Верхушки микропобегов *in vitro* без листьев помещали на среду 1/4 Мурасиге – Скуга + 60,0 г/л сахарозы и 0,2–0,8 г/л хлорхолинхлорида. Экспланты сохраняли в холодильных камерах при температуре 4 °С. После 12 месяцев сохранения наблюдали снижение кинетики роста по мере увеличения концентрации хлорхолинхлорида в среде. Жизнеспособность эксплантов снижалась с 96 до 91% с ростом концентрации хлорхолинхлорида. Эффективный фотохимический квантовый выход фотосистемы II снизился более чем в два раза при депонировании по сравнению с контролем. Был выявлен ряд гистологических особенностей листьев депонируемых в генобанке *in vitro* эксплантов: у листовых пластинок уменьшались толщина листа и плотность мезофилла, деградировала палисадная ткань, отмечена высокая степень регуляции транспирации. С помощью SSR- и ISSR-анализа показано, что микропобеги исследуемых сортов хризантемы после депонирования *in vitro* идентичны исходным растениям. Проведенные исследования показали, что наличие в среде 0,6–0,8 г/л хлорхолинхлорида снижает кинетику роста эксплантов при сохранении высокой жизнеспособности и генетической стабильности.

Ключевые слова: *Chrysanthemum × morifolium* Ramat., эксплант, морфометрические параметры, депонирование *in vitro*, ISSR-анализ

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Министерства образования и науки Российской Федерации FNNS-2022-0002. Исследования осуществлены на оборудовании уникальной научной установки «Научный центр биотехнологии, геномики и депонирования растений» («ФИТОБИОГЕН») ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН» (г. Ялта, Российская Федерация).

Для цитирования: Иванова Н.Н., Цюпка В.А., Корзина Н.В. Влияние состава питательной среды на сохранение жизнеспособности и генетической стабильности эксплантов хризантемы садовой при депонировании *in vitro* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 483–493. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-483-493. EDN: RSM MRT.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Effect of growth medium composition on the viability and genetic stability of *Chrysanthemum × morifolium* Ramat. explants under *in vitro* cold storage conditions

Natalya N. Ivanova✉, Valentina A. Tsiupka, Natalia V. Korzina

Order of the Red Banner Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center RAS,
Yalta, Russian Federation

© Иванова Н.Н., Цюпка В.А., Корзина Н.В., 2023

Abstract. Cultivation of plants at low positive temperatures is promising for the *in vitro* preservation of valuable *Chrysanthemum × morifolium* Ramat. varieties. The study aims to examine the effect of chlorocholine chloride concentrations in a specialized medium on the viability and the physiological and morpho-anatomical parameters of chrysanthemum plants (Excel, Sheer Purple, and William Seward varieties), as well as their genetic stability after 12 months of cold storage under *in vitro* gene bank conditions. *In vitro* microshoot tips (without leaves) were placed on a 1/4 Murashige and Skoog medium supplemented with 60.0 g/L sucrose and 0.2–0.8 g/L chlorocholine chloride. The explants were stored in cooling chambers at a temperature of 4 °C. After 12 months of preservation, a reduction was observed in growth kinetics with increasing concentration of chlorocholine chloride in the medium. The viability of explants decreased from 96 to 91% at higher concentrations of chlorocholine chloride. The effective photochemical quantum yield of photosystem II decreased more than twice under cold storage conditions as compared to the control. Several histological features were identified in the leaves of *in vitro* explants cold-stored in the gene bank: decreased in leaf thickness and mesophyll density in leaf blades, degradation of palisade tissue, and a high degree of transpiration regulation. The SSR and ISSR analyses were used to show that the microshoots of the examined chrysanthemum varieties were identical to the original plants following *in vitro* cold storage. The conducted studies revealed that the presence of 0.6–0.8 g/L chlorocholine chloride in the medium reduces the growth kinetics of explants while maintaining their high viability and genetic stability.

Keywords: *Chrysanthemum × morifolium* Ramat., explant, morphometric parameters, *in-vitro* cold storage, ISSR analysis

Funding. Ministry of Education and Science of the Russian Federation supported the work (State task FNNS-2022-0002). Unique equipment of the “Scientific Center for Biotechnology, Genomics and Plant Deposition” (FITOBIOGEN) of Nikita Botanical Gardens (Yalta, Russian Federation) was used for the research.

For citation: Ivanova N.N., Tsiupka V.A., Korzina N.V. Effect of growth medium composition on the viability and genetic stability of *Chrysanthemum × morifolium* Ramat. explants under *in vitro* cold storage conditions. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):483-493. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-483-493. EDN: RSM MRT.

ВВЕДЕНИЕ

Хризантема (*Chrysanthemum × morifolium* Ramat.) является популярной декоративно-цветочной культурой. В настоящее время методы биотехнологии позволяют быстро размножить новые селекционные сорта и формы хризантемы, оздоровить от патогенов и сохранить генофонд ценных растений. Одним из наиболее перспективных путей сохранения биоразнообразия растений в настоящее время является создание медленно растущих коллекций *in vitro* [1–5]. В качестве основного подхода при этом рассматривается создание таких условий культивирования, при которых снижается скорость обменных процессов и используется минимальное количество питательных веществ, что позволяет эксплантам находиться в состоянии покоя длительное время при сохранении физиологической стабильности [6–8]. Это достигается путем снижения температуры культивирования и интенсивности освещения, а также повышения концентрации осмотиков, введения в состав питательной среды ретардантов [3, 9–13]. Повышенная концентрация сахарозы в питательной среде задерживает рост клеток, не вызывая токсического эффекта, и может быть использована для поддержания культур в состоянии покоя в течение длительного периода [14]. Ретарданты способны затормаживать рост растений. Они вызывают укорачивание и утолщение побега, расширение листовой пластинки [6–8]. Большое значение имеют тип и физиологическое состояние экспланта, размер культурального сосуда для хранения [3], а также система мониторинга, которая позволяет контролировать качество сохраняемых растительных образцов. При появлении негативных признаков в процессе депонирования экспланты переносят на свежие питательные среды для индукции побегообразования, а затем снова помещают на хранение *in vitro* [15].

В то же время низкие температура и интенсивность освещения имеют физиологические последствия, такие как потеря клетками воды, уменьшение дыхания, увядание, что влияет на безопасность длительного сохранения эксплантов. Ингибиторы роста меняют морфологию растений и иногда могут индуцировать метилирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [16] и соматональные вариации [17]. Для мониторинга стабильности и целостности растений, культивируемых *in vitro*, исследователи использовали морфо-анатомические, молекулярные и биохимические признаки [18]. Анатомические особенности очень важны и играют ключевую роль в идентификации растений [19–22]. В ряде работ отражена возможность использования фотосинтетических параметров для определения функционального состояния растений при культивировании и сохранении их *in vitro* [23–26].

Целью данного исследования было изучение влияния концентраций хлорохлинхлорида (ССС) в специализированной среде на жизнеспособность, физиологические и морфо-анатомические показатели растений хризантемы садовой сортов Excel, Sheer Purple, William Seward, а также их генетическую стабильность после 12 месяцев депонирования в условиях генобанка *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В экспериментах по клональному микроразмножению в качестве эксплантов использовали верхушки побегов крупноцветковой *Chrysanthemum × morifolium* Ramat. сортов Excel, Sheer Purple, William Seward из коллекции ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН». Для закладки эксплантов хризантемы на сохранение при низкой положительной температуре применяли

методы, разработанные в лаборатории морфогенеза и депонирования растений *in vitro* [11].

Стерильные меристемы культивировали на среде Мурасиге – Скуга (МС) [27], дополненной 0,75 мг/л кинетина (Sigma, США), 2,5 мг/л сульфата аденина и 0,25 мг/л α-нафтилуксусной кислоты (Sigma, США). Питательные среды содержали 30,0 г/л сахарозы (Panreac, Испания) и 9,0 г/л агара (Panreac, Испания) [28].

Для депонирования использовали микропобеги растений, культивируемых *in vitro* в течение 10 месяцев. В стерильных условиях верхушки микропобегов длиной 1,0 см без листьев помещали на среду 1/4 МС, дополненную ССС (BASF, Германия) (0,0 г/л; 0,2 г/л; 0,4 г/л; 0,6 г/л; 0,8 г/л), 60 г/л сахарозы и 9 г/л агар-агара. Контролем служила среда 1/4 МС, дополненная 60 г/л сахарозы. Питательные среды автоклавировали при 120 °С в течение 15 мин в стерилизаторе LAC 5060S (Daihan Labtech, Южная Корея). Депонирование *in vitro* проводили при температуре 4±1 °С. Культуральные сосуды с эксплантами сохраняли в холодильных камерах марки Liebherr FKvsl 4113 (Австрия). Интенсивность освещения составляла 1,25 мкМ×м⁻²×с⁻¹. Растительный материал оценивали через 12 месяцев культивирования с помощью качественных и количественных характеристик эксплантов: длина микропобега, окраска экспланта, количество адвентивных микропобегов, количество листьев на микропобеге, количество корней первого порядка на микропобег, общая длина корней и жизнеспособность.

Для оценки функционального состояния ассимилирующих тканей сохраняемых растений проводили исследования параметров фотосинтетической активности. Измерения флуоресценции хлорофилла осуществляли на переносном импульсном флуориметре MINI-PAM II, (HeinzWalz, Германия). Микропобеги перед измерениями показателей флуоресценции адаптировали к темноте в течение 30 мин [29]. В ходе экспериментов регистрировали следующие показатели: F_0 – нулевой, фоновый уровень флуоресценции; F_m – максимальная флуоресценция, F_s – стационарный уровень флуоресценции, свидетельствующий об установлении стабильного

и наиболее интенсивного уровня фотосинтеза; F_0' и F_m' – минимальный и максимальный уровни флуоресценции на свету. В работе использовали следующие расчетные коэффициенты: переменная флуоресценция $F_v = F_m - F_0$, максимальный фотохимический квантовый выход фотосистемы II (ФС II) F_v/F_m' , а также коэффициент спада флуоресценции $Rfd = (F_m - F_s) / F_s$. Эффективный фотохимический квантовый выход ФС II рассчитывали по формуле $Y(II) = (F_m' - F_s) / F_m'$.

Для проведения морфо-анатомического анализа листовых пластинок и побегов хризантемы использовали растения сорта William Seward, сохраняемые на среде 1/4 МС, дополненной 0,2 или 0,8 г/л ССС, а также на среде контроля. Срезы органов растений изготавливали из свежего материала на замораживающем микротоме МЗ-2 («Точмедприбор», Украина), окрашивали раствором метиленового синего и исследовали при помощи светового микроскопа Olympus CX41 (Olympus, Япония), оснащенного цифровой камерой SC 50 (Olympus, Германия).

Оценку генетической стабильности сохраняемого материала проводили с использованием SSR- и ISSR-маркеров. Геномную ДНК выделяли из листьев сохраняемых эксплантов и листьев растений, культивируемых *in vitro*, с применением цетилтриметиламмония бромида (2×ЦТАБ) с добавлением 2%-го поливинилпирролидона [30]. Качество и количество полученной ДНК оценивали на нанофотометре NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия). Амплификацию проводили с применением набора BioMaster HS-Taq PCR (Биолабмикс, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Полимеразную цепную реакцию проводили в термоциклере C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Сингапур). Для изучения влияния длительного хранения эксплантов при низкой положительной температуре на генетическую стабильность изучаемых сортов хризантемы использовали четыре пары микросателлитных праймеров и два межмикросателлитных маркера серии UBC (табл. 1). Условия реакции были следующими: 1) начальная денатурация ДНК при 95 °С (5 мин); 2) 35 циклов по 30 с

Таблица 1. SSR- и ISSR-праймеры для постановки полимеразной цепной реакции

Table 1. SSR and ISSR primers used for polymerase chain reaction

Название праймера	Мотив	Нуклеотидная последовательность	T_m , °С	Ссылка на источник
JH30	(CA) ₈	F: GGTGAGGTGCAGAACAAGGATA R: ACCAGATTGGAATGAAACGAAA	53	Y. Zhang, et al., 2013 [31]
KNUCRY-59	(CA) ₅	F: CGGTCCTCTCAGCCTTATTG R: GGTGTGTGTGTGAAGGTGCT	57	A.A. Khaing, et al., 2013 [32]
KNUCRY-85	(CA) ₄	F: GACCAACAAAACGGAATGCT R: GTTGTCGTCGTTGGCTAGT	50	
KNUCRY-98	(AC) ₄	F: TCACATCACATCACTGCAA R: TGTGTGTGAGGGACACATGA	55	
UBC 824	(TC) ₈ G	TCTCTCTCTCTCTCG	52	J.A. Rocha, et al., 2014 [33]
UBC 843	(CT) ₈ RA	CTCTCTCTCTCTCTRA (R = A, G)	53	

при 95 °С, 1 мин при температуре отжига праймеров (Tm) (см. табл. 1), 1 мин при 72 °С; 3) окончательная элонгация при 72 °С (5 мин). Амплифицированные фрагменты анализировали с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле с буфером, содержащим смесь трис(гидроксиметил)аминометана, борной кислоты и этилендиаминтетрауксусной кислоты при 100 В в течение 1–1,5 ч с использованием универсального источника питания PowerPacTM (Bio-Rad, Сингапур). Агарозный гель визуализировали с помощью системы гельдокументации E-box (Vilber Lourmat, Франция).

Для статистической обработки полученных результатов использовали программное приложение Statistica 10.0.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные ранее исследования показали возможность 12-месячного сохранения эксплантов хризантемы некоторых сортов при низкой положительной температуре и наличии в питательной среде 60 г/л сахарозы и 0,2 г/л ССС [11, 34]. При этом наблюдалось заметное снижение кинетики роста у исследуемых сортов по сравнению с контролем при сохранении высокой жизнеспособности эксплантов. Однако многие побеги хризантемы и после 12 месяцев депонирования на питательной среде с 60 г/л сахарозы и 0,2 г/л ССС сильно вытягивались. Для дальнейшего снижения кинетики роста при сохранении морфогенетического потенциала проведены исследования по увеличению концентрации ССС в питательной среде на фоне стабильной концентрации сахарозы.

Скрининг депонируемых в течение 12 месяцев культур показал, что при концентрации ССС 0,2–0,8 г/л и сахарозы 60 г/л количество жизнеспособных эксплантов у растений хризантемы находилось в пределах 91–96%. Наблюдали замедление роста эксплантов в 2 раза по сравнению с контролем с увеличением концентрации

ССС. Так, длина адвентивных побегов снижалась с ростом концентрации ССС от 2,52 до 1,52 см у сорта Excel, от 2,96 до 1,38 см у сорта Sheer Purple и от 1,98 до 1,20 см у сорта William Seward (табл. 2, рис. 1).

Побеги и листья в течение всего периода сохранения на всех вариантах сред с ССС имели зеленую окраску, интенсивность которой незначительно усиливалась с ростом концентрации ССС.

Наблюдали появление отдельных участков с антоциановой окраской побега, что является физиологическим ответом эксплантов на длительное воздействие низкой положительной температуры. Образование корней происходило только на среде 1/4 МС, дополненной 0,2 г/л ССС. Одновременно отмечали и наличие 1–2 укороченных адвентивных микропобегов. Ни в одном из вариантов опыта не происходило формирование каллуса в основании побегов, что весьма важно для исключения самоклональной изменчивости при длительном сохранении.

Анализ морфометрических показателей изучаемых сортов хризантемы показал, что с увеличением концентрации ССС в среде до значений 0,6 и 0,8 г/л замедлялись рост побегов и образование листьев. При этом наблюдали незначительное снижение жизнеспособности эксплантов, что сопровождалось пожелтением и опадением листьев или отмиранием верхушек побегов.

Оценка флуоресценции хлорофилла в ФС II использовалась в ряде исследований для определения скорости фотосинтеза у различных растений, включая *Triticum turgidum* L. [25], *Prunus. africana* [23] и *Pseudotsuga menziesii* [35]. Более низкие значения максимального фотохимического квантового выхода ФС II при депонировании растений хризантемы *in vitro* (табл. 3) могут быть связаны со структурными изменениями фотосинтезирующих тканей, а также снижением ассими-

Таблица 2. Морфометрические характеристики эксплантов хризантемы садовой после 12 месяцев депонирования (размер исходного экспланта 1,0 см)

Table 2. Morphometric characteristics of garden chrysanthemum explants after 12-months deposition (initial explant size 1.0 cm)

Концентрация хлорхолинхлорида, г/л	Длина побега, см	Количество листьев в побеге, шт.	Количество корней в побеге, шт.	Длина корней, см	Жизнеспособность, %
Сорт Excel					
Контроль	2,60±0,05	5,20±0,20	0,00	0,00	98,00±0,26
0,2	2,52±0,16	5,20±0,48	0,60±0,40	0,70±0,40	96,40±0,27
0,4	1,90±0,04	4,60±0,40	0,00	0,00	95,70±0,33
0,6	1,60±0,07	4,20±0,20	0,00	0,00	93,40±0,40
0,8	1,52±0,08	3,40±0,40	0,00	0,00	91,20±0,39
Сорт Sheer Purple					
Контроль	3,50±0,40	7,0±0,44	0,00	0,00	97,90±0,38
0,2	2,96±0,02	7,40±0,40	1,20±0,58	0,81±0,31	96,40±0,31
0,4	1,78±0,20	4,80±0,86	0,00	0,00	92,80±0,43
0,6	1,66±0,10	5,40±0,40	0,00	0,00	92,80±0,44
0,8	1,38±0,14	4,20±0,66	0,00	0,00	91,10±0,43
Сорт William Seward					
Контроль	6,60±0,40	7,40±0,40	0,00	0,00	96,80±0,24
0,2	1,98±0,25	6,60±0,92	0,80±0,20	0,83±0,32	96,70±0,21
0,4	1,64±0,97	5,60±0,40	0,00	0,00	94,09±0,67
0,6	1,62±0,25	5,20±0,48	0,00	0,00	93,18±0,38
0,8	1,20±0,03	1,80±0,37	0,00	0,00	91,54±0,31

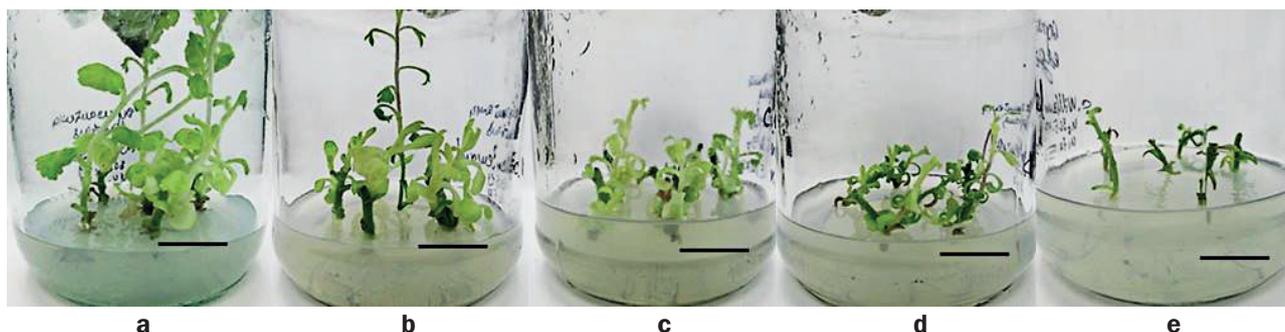


Рис. 1. Экспланты хризантемы садовой сорта William Seward после 12 месяцев депонирования при температуре 4 °С на среде 1/4 Мурасиге – Скуга: а – контроль; б – 0,2 г/л хлорхолинхлорида; с – 0,4 г/л хлорхолинхлорида; д – 0,6 г/л хлорхолинхлорида; е – 0,8 г/л хлорхолинхлорида (масштаб 1 см)

Fig. 1. William Seward chrysanthemum garden explants after 12-month deposition at 4 °C on 1/4 MS medium: a – control; b – 0.2 g/l CCC; c – 0.4 g/l CCC; d – 0.6 g/l CCC; e – 0.8 g/l CCC (scale 1 cm)

ляции под действием ретардантов. Выявлено снижение коэффициента спада флуоресценции, особенно у растений сорта Sheer Purple (см. табл. 3), однако уровень значений хлорофилл-дефицитных участков листьев растений, несущих признаки повреждения фотосинтетической системы, а также растений, потеря хлорофилла у которых вызвана осенним пожелтением или воздействием внешних неблагоприятных факторов, достигнут не был [36].

В нашем эксперименте эффективный фотохимический квантовый выход ФС II в контрольных условиях был приближен к значениям максимального фотохимического квантового выхода (см. табл. 3) и снижался более чем в 2 раза при депонировании. Определено, что концентрация CCC статистически достоверно не влияла на значение максимального фотохимического квантового выхода. При этом граница сублетального уровня по всем исследованным параметрам достигнута не была [26]. Таким образом, подобранные условия депонирования соответствуют сохранению фотосистемы в витальном состоянии, снижая ассимиляционные процессы. Лучшее жизнеспособное состояние и пластичность в регуляции фотосинтетических процессов установлено для хризантемы садовой сорта William Seward.

По данным наблюдений за морфологическими изменениями обнаружено, что листья в контроле имели характерную для хризантемы форму, при сохранении растений форма листа изменялась: упрощалась, становилась более линейной. Аналогичные наблюдения были сделаны авторами М.С. Шекхават и М. Манокари, которые отметили, что полученные *in vitro* растения обладают более мелкими листьями, более тонкими стеблями и корнями [26]. При применении невысокой концентрации CCC листья становились толще (125 мкм), а мезофилл – рыхлым с довольно большими межклетниками (рис. 2, табл. 4). Толщина губчатого мезофилла увеличилась до 110 мкм. Полученные данные согласуются с данными Д. Окелло с соавторами для *Aspilia africana* (Pers.), полученной *in vitro* из ткани листа [21]. При сохранении растений на среде 1/4 MS с добавлением 0,8 г/л CCC снижалась толщина как всего листа, так и покровных тканей и палисады. Количество слоев тканей не изменилось: был получен один слой палисадного мезофилла и три слоя губчатого. Эти структурные аномалии обусловлены не соматональными вариациями, а, скорее, стрессовой реакцией полученных *in vitro* растений на условия культивирования [26]. Отмечены изменения в морфологии, длине и плотности распределения трихом:

Таблица 3. Динамика параметров фотосинтетической активности фотосистемы II некоторых сортов хризантемы садовой при различных условиях депонирования *in vitro*

Table 3. Dynamics of photosystem II photosynthetic activity for some varieties of chrysanthemum garden under different conditions of deposition *in vitro*

Сорт	Концентрация хлорхолинхлорида, г/л				
	контроль	0,2	0,4	0,6	0,8
Максимальный фотохимический квантовый выход фотосистемы II					
Sheer Purple	0,56±0,03	0,41±0,01	0,34±0,02	0,31±0,03	0,34±0,02
Excel	0,58±0,02	0,44±0,02	0,35±0,02	0,40±0,02	0,31±0,03
William Seward	0,62±0,04	0,48±0,02	0,36±0,04	0,32±0,04	0,36±0,06
Коэффициент спада флуоресценции					
Sheer Purple	2,14±0,12	2,09±0,03	1,59±0,11	1,64±0,22	1,43±0,16
Excel	3,16±0,10	2,94±0,12	2,18±0,08	2,03±0,09	2,09±0,23
William Seward	3,07±0,18	2,16±0,16	2,05±0,20	2,74±0,18	2,51±0,29
Эффективный фотохимический квантовый выход фотосистемы II					
Sheer Purple	0,52±0,04	0,22±0,08	0,15±0,03	0,14±0,02	0,15±0,01
Excel	0,49±0,03	0,26±0,06	0,15±0,01	0,24±0,04	0,16±0,02
William Seward	0,60±0,01	0,39±0,13	0,21±0,06	0,22±0,04	0,24±0,02

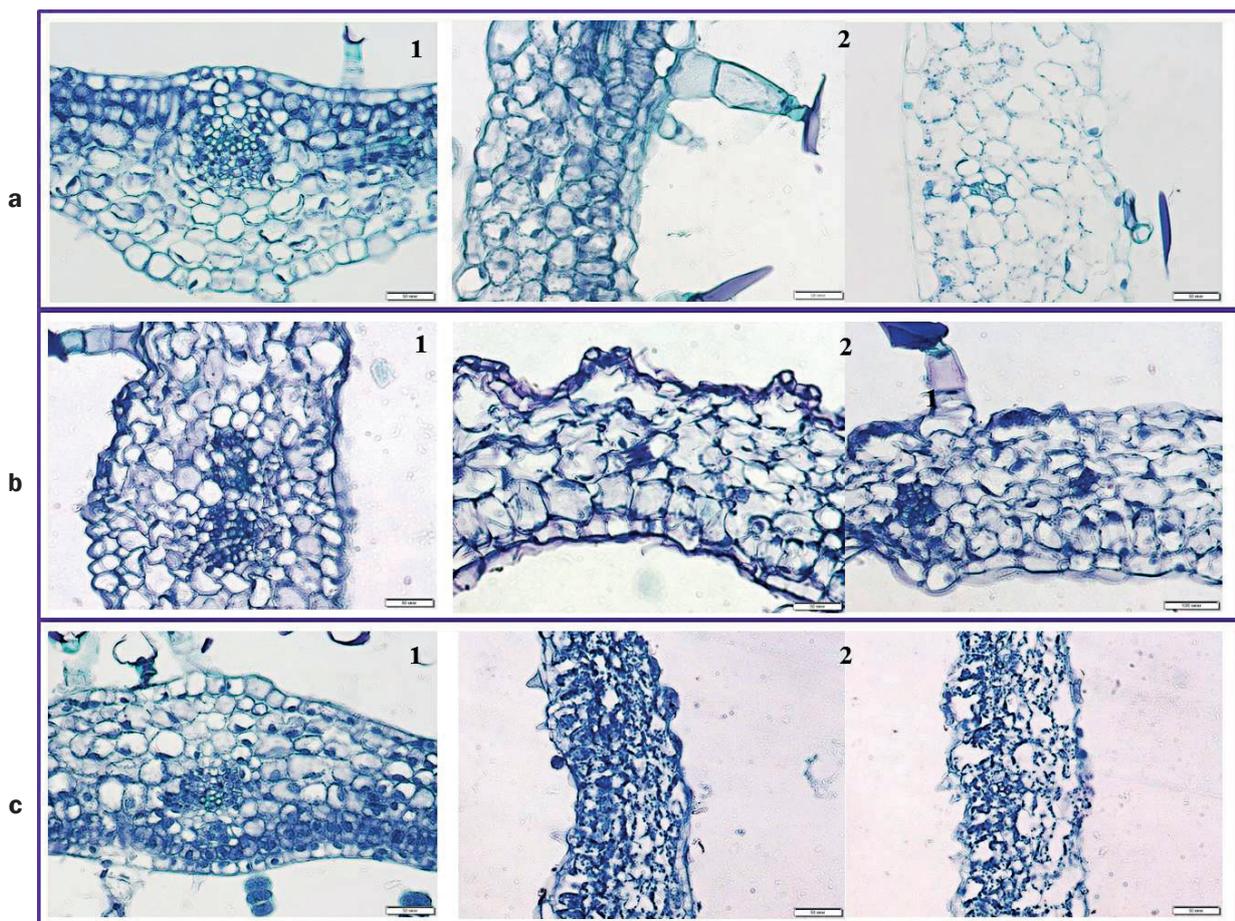


Рис. 2. Структура листьев хризантемы садовой сорта William Seward при депонировании *in vitro*: а – контроль, б – с использованием 0,2 г/л хлорхолинхлорида, с – с использованием 0,8 г/л хлорхолинхлорида; 1 – поперечный срез центральной жилки листа, 2 – срез средней части листа

Fig. 2. Structure of William Seward chrysanthemum garden leaves when deposited *in vitro*: а – control, б – using 0.2 g/l, с – using 0.8 g/l; 1 – cross section of the leaf central vein, 2 – section of the leaf middle part

Таблица 4. Основные показатели анатомической структуры листа хризантемы садовой сорта William Seward при депонировании *in vitro* ($M \pm SE$)

Table 4. Main parameters of the anatomical structure of William Seward chrysanthemum garden leaves when deposited *in vitro* ($M \pm SE$)

Показатель анатомической структуры	Концентрация хлорхолинхлорида, г/л		
	контроль	0,2	0,8
Толщина листовой пластины, мкм	190±6	208±6	153±5
Толщина адаксиальной эпидермы, мкм	23±1	27±1	13±0,5
Толщина палисадного мезофилла, мкм	42±6	51±3	39±7
Толщина губчатого мезофилла, мкм	69±3	110±15	85±10
Толщина абаксиальной эпидермы, мкм	18±2	17±1	9±3
Длина трихом, мкм	72±9	86±12	43±14
Расстояние между трихомами, мкм	103±26	125±12	78±24

при концентрации ССС 0,8 г/л появлялось большое количество мелких 1–3-клеточных простых и головчатых волосков. Побеги имели идентичную структуру, за исключением большей закладки спящих почек (рис. 3).

Основной задачей при создании коллекции *in vitro* является сохранение генотипа исходных образцов. При вегетативном размножении и размножении клона увеличивается количество митотических делений клеток, что может увеличивать накопление мутаций. Согласно

разработанной исследователями стратегии, генетическая идентификация сортовой и внутрисортовой клональной вариативности может быть осуществлена поэтапно с использованием нескольких типов молекулярных маркеров [37]. AFLP-, SAMPL-, M-AFLP- и ISSR-маркеры помогают выявлять внутрисортовую генетическую вариативность и характеризовать клоны с различными морфологическими и фенологическими признаками. Для выявления генетической стабильности при депонировании *in vitro*

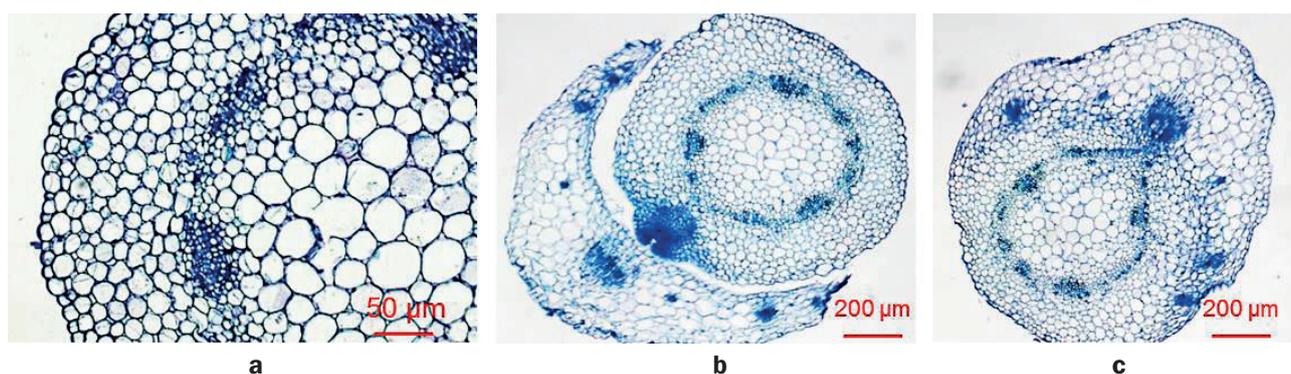


Рис. 3. Срезы побегов хризантемы садовой сорта William Seward при депонировании *in vitro*: а – контроль; б – на среде 1/4 Мурасиге – Скуга + 0,2 г/л хлорхолинхлорида; с – на среде 1/4 Мурасиге – Скуга + 0,8 г/л хлорхолинхлорида

Fig. 3. Slices of the shoots of William Seward chrysanthemum garden when deposited *in vitro*: а – control; б – 1/4 MS + 0.2 g/l CCC; с – 1/4 MS + 0.8 g/l CCC

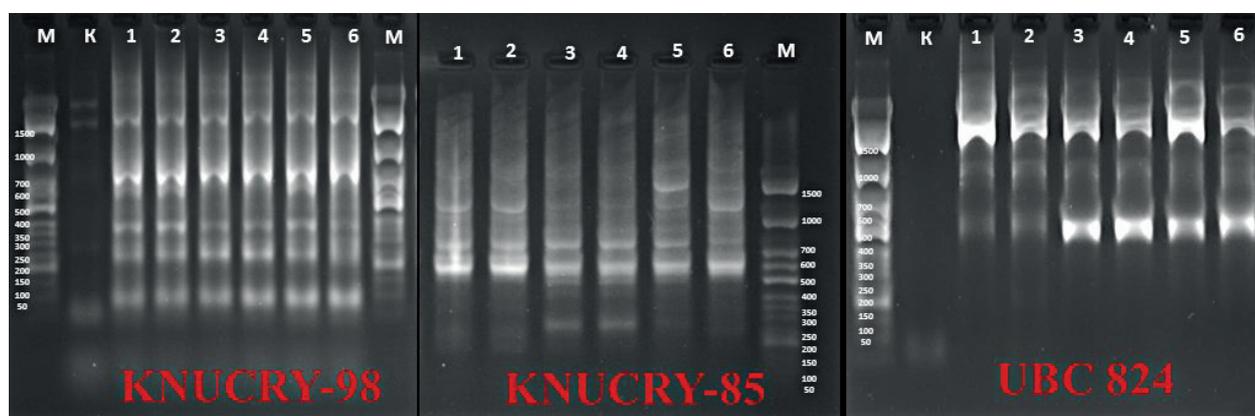


Рис. 4. Электрофорреграммы результатов SSR- и ISSR-анализа культивируемых *in vitro* растений хризантемы садовой и депонируемых микропобегов этих сортов: 1 – сорт Excel на депонировании, 2 – сорт Excel *in vitro*; 3 – сорт Sheer Purple на депонировании, 4 – сорт Sheer Purple *in vitro*; 5 – сорт William Seward на депонировании, 6 – сорт William Seward *in vitro*; М – маркер Step 50, К – отрицательный контроль

Fig. 4. Electrophoregrams of the results SSR and ISSR analysis of cultivated *in vitro* chrysanthemum plants and deposited microshoots of these cultivars: 1 – cultivar Excel on deposit, 2 – cultivar Excel *in vitro*; 3 – cultivar Sheer Purple on deposit, 4 – cultivar Sheer Purple *in vitro*; 5 – cultivar William Seward on deposit, 6 – cultivar William Seward *in vitro*; M – marker Step 50, K – negative control

мы провели сравнительный SSR- и ISSR-анализ участков геномной ДНК растений трех сортов хризантемы садовой в культуре *in vitro* и микрорастений этих сортов после 12 месяцев депонирования *in vitro* при низкой положительной температуре (рис. 4). Микросателлитные маркеры были подобраны из серий для оценки межсортового полиморфизма хризантемы [31, 32]. В результате анализа, выполненного с шестью маркерами, детектировано от одного до шести амплифицированных фрагментов размером от 220 до 1800 п.н. Наиболее информативными маркерами оказались KNUCRY-98, KNUCRY-85 и UBC-824. Всего идентифицировано 20 продуктов амплификации для сорта William Seward и по 23 фрагмента для сортов Excel и Sheer Purple. При анализе электрофорреграмм амплифицированных фрагментов генетических различий между растениями в культуре *in vitro* и сохраняемыми *in vitro* растениями не обнаружено. SSR- и ISSR-профили депонируемых растений полностью идентичны по количеству и длине ампликонов растениям исходных сортов в культуре *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наших исследований показали возможность беспересадочного сохранения микропобегов и микрорастений изучаемых сортов хризантемы садовой в культуре *in vitro* в течение 12 месяцев. Использование CCC в концентрации 0,6 и 0,8 г/л в питательной среде 1/4 МС позволило снизить кинетику роста побегов в 2–3 раза при сохранении высокой жизнеспособности (91–92%). Применение осмотиков и ретардантов в среде способствовало возникновению структурных и функциональных перестроек, направленных на снижение ассимиляционных процессов. Закладка множественных боковых почек у депонируемых *in vitro* микропобегов также свидетельствовала о высоком морфогенном потенциале изученных сортов хризантемы после сохранения. Оптимизированная система депонирования *in vitro* обеспечивает сохранение генотипа исходных образцов, что подтверждено результатами SSR- и ISSR-анализа по трем информативным маркерам (KNUCRY-98, KNUCRY-85 и UBC-824).

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Sarasan V., Cripps R., Ramsay M., Atherton C., McMichen M., Prendergast G., et al. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 2006. Vol. 42, no 3. P. 206–214. DOI: 10.1079/IVP2006769.
2. Paunesca A. Biotechnology for endangered plant conservation: a critical overview // Romanian Biotechnological Letters. 2009. Vol. 14, no. 1. P. 4095–4103.
3. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 2011. Vol. 47, no. 1. P. 5–16. DOI: 10.1007/s11627-010-9327-2.
4. Watt M.P., Thokoane N.L., Mycock D., Blakeway F. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2000. Vol. 61. P. 161–164. DOI: 10.1023/A:1006447506869.
5. Молканова О.И., Коновалова Т.Ю. Ширнина И.В., Крахмалева И.Л., Ахметова Л.Р., Королева О.В. [и др.]. Методологические основы сохранения растений в генетическом банке *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. 2019. Т. 58. С. 253–258. DOI: 10.31676/2073-4948-2019-58-253-258. EDN: AUUSLC.
6. Ivanova N.N., Tsiupka V.A., Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V. Rare and endemic plant species of Mountain Crimea flora: a morphogenic response to conservation in the gene bank *in vitro* // Turczaninowia. 2022. Т. 25. N 1. С. 24–30. DOI: 10.14258/turczaninowia.25.1.3. EDN: EEPQZI.
7. Panis B., Nagel M., Van den Houwe I. Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in *in vitro* collections and/or in liquid nitrogen // Plants. 2020. Vol. 9, no. 12. P. 1634. DOI: 10.3390/plants9121634.
8. Benson E., Harding K., Debouck D., Dumet D., Escobar R., Mafla G., et al. Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops. Global Public Goods Phase 2. Part 1. Project landscape and general status of clonal crop *in vitro* conservation technologies. Rome: System-Wide Genetic Resources Programme, 2011. 86 p.
9. Bell R.L., Reed B.M. *In vitro* tissue culture of pear: advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation // Acta Horticulturae. 2002. Vol. 596. P. 412–418. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.596.66.
10. Lambardi M., De Carlo A. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees // Micropropagation of woody trees and fruits / eds S.M. Jain, K. Ishii. Dordrecht: Springer, 2003. P. 815–840.
11. Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур: кол. монография / под общ. ред. И.В. Митрофановой. Симферополь: ИТ «Ариал», 2018. 260 с. EDN: YQVBFZ.
12. Тевфик А.Ш., Митрофанова И.В. Особенности получения и сохранения *Canna × hybrida hort* ex Backer в условиях *in vitro* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т. 7. N 3. С. 99–109. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-3-99-109. EDN: ZQJUJR.
13. Егорова Н.А., Загорская М.С., Абдурашитов С.Ф. Особенности длительного сохранения мяты сортов Ажурная и Бергамотная в коллекции *in vitro* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 1. С. 64–75. DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-1-64-75. EDN: UDQENT.
14. Дорошенко Н.П., Куприкова А.С., Пузырнова В.Г. Влияние сахарозы на замедление роста и сохранение растений винограда в коллекции *in vitro* // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2017. N 46. С. 33–48. Режим доступа: <https://journal.kubansad.ru/pdf/17/04/04.pdf> (дата обращения: 19.06.2023). EDN: YZJXNP.
15. Engelmann F, Engles J.M.M. Technology and strategies for ex situ conservation // Managing Plant Genetic Diversity: proceedings of an International conference (Kuala Lumpur, 12–16 June 2000). DOI: 10.1079/9780851995229.0089.
16. Harding K. The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth // Plant Cell Tissue and Organ Culture. 1994. Vol. 37. P. 31–38. DOI: 10.1007/BF00048114.
17. Kumar A. Somaclonal variation // Potato genetics / eds J.E. Bradshaw, G.R. Mackay. Wallingford: CAB International, 1994. P. 197–212.
18. Sonibare M.A., Adeniran A.A. Comparative micro-morphological study of wild and micropropagated *Dioscorea bulbifera* Linn. // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2014. Vol. 4, no. 3. P. 176–183. DOI: 10.1016/S2221-1691(14)60228-8.
19. Manokari M., Priyadharshini S., Shekhawat M.S. Microstructural and histochemical variations during *in vitro* to *in vivo* plant developments in *Aloe vera* (L.) Burm.f (Xanthorrhoeaceae) // Industrial Crops Products. 2021. Vol. 160. P. 113162. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.113162.
20. Manokari M., Priyadharshini S., Shekhawat M.S. Micro-structural stability of micropropagated plants of *Vitex negundo* L. // Microscopy and Microanalysis. 2021. Vol. 27, no. 3. P. 626–634. DOI: 10.1017/s1431927621000283.
21. Okello D., Yang S., Komakech R., Rahmat E., Chung Y., Gang R., et al. An *in vitro* propagation of *Aspilia africana* (Pers.) C. D. Adams, and evaluation of its anatomy and physiology of acclimatized plants // Frontiers in Plant Science. 2021. Vol. 12. P. 704896. DOI: 10.3389/fpls.2021.704896.
22. Mani M., Mathiyazhagan C., Dey A., Faisal M., Alatar A.A., Alok A., et al. Micro-morpho-anatomical transitions at various stages of *in vitro* development of *Crinum malabaricum* Lekhak and Yadav: a critically endangered medicinal plant // Plant Biology. 2023. Vol. 25, no. 1. P. 142–151. DOI: 10.1111/plb.13464.
23. Komakech R., Kim Y.-G., Kim W.J., Omujal F., Yang S., Moon B.C., et al. A micropropagation protocol for the endangered medicinal tree *Prunus africana* (Hook. f.) Kalkman: genetic fidelity and physiological parameter assessment // Frontiers in Plant Science. 2020. Vol. 11. P. 548003. DOI: 10.3389/fpls.2020.548003.
24. Brailko V.A., Mitrofanova O.V., Smykova N.V., Mitrofanova I.V. Some morphological and physiological features of chrysanthemum under *in vitro* culture // Acta Horticulturae. 2018. Vol. 1201. P. 607–612. DOI: 10.17660/ActaHortic.2018.1201.81.
25. Moustaka J., Ouzounidou G., Sperdouli I., Moustakas M. Photosystem II is more sensitive than Photosystem I to Al³⁺ induced phytotoxicity // Materials. 2018. Vol. 11, no 9. P. 1772. DOI: 10.3390/ma11091772.
26. Shekhawat M.S., Manokari M. Micromorphological and anatomical evaluation of *in vitro* and field transferred plants of *Coccinia indica* // Agricultural

Research. 2018. Vol. 7. P. 135–144. DOI: 10.1007/s40003-018-0326-6.

27. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15, no. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

28. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Смыкова Н.В. Оздоровление и размножение *in vitro* перспективных сортов и гибридных форм хризантемы садовой селекции Никитского ботанического сада // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. 2021. N 138. С. 92–100. DOI: 10.36305/0513-1634-2021-138-92-100. EDN: IXUSZ.

29. Stirbet A., Govindjee. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2011. Vol. 104, no. 1-2. P. 236–257. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010.

30. Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components // *Plant Molecular Biology Reporter*. 1997. Vol. 15. P. 8–15. DOI: 10.1007/BF02772108.

31. Zhang Y., Wang C., Ma H., Dai S. Assessing the genetic diversity of chrysanthemum cultivars with microsatellites // *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2013. Vol. 138, no. 6. P. 479–486. DOI: 10.21273/JASHS.138.6.479.

32. Khaing A.A., Moe K.T., Hong W.J., Park C.S., Yeon K.H., Park H.S., et al. Phylogenetic relationships of chrysanthemums in Korea based on novel SSR markers //

Genetics and Molecular Research. 2013. Vol. 12, no. 4. P. 5335–5347. DOI: 10.4238/2013.November.7.8.

33. Rocha J.A., Vasconcelos S., da Silva F.M.M., Melo A.J., Silva M.F.S., de Miranda J.A.L., et al. ISSR primer selection for genetic variability analyses with *jaborandi* (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew., Rutaceae) // *Forest Research*. 2014. Vol. 3, no. 3. P. 1000126. DOI: 10.4172/2168-9776.1000126.

34. Митрофанова И.В., Иванова Н.Н., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П. Особенности депонирования хризантемы садовой в условиях *in vitro* // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. 2019. N 131. С. 110–117. DOI: 10.25684/NBG.boolt.131.2019.15. EDN: JZOSSS.

35. Perks M.P., Monaghan S., O'Reilly C., Osborne B.A., Mitchell D.T. Chlorophyll fluorescence characteristics, performance and survival of freshly lifted and cold stored Douglas fir seedlings // *Annals of Forest Science*. 2001. Vol. 58, no. 3. P. 225–235. DOI: 10.1051/forest:2001122.

36. Lichtenthaler H.K., Babani K. Light Adaptation and Senescence of the Photosynthetic Apparatus. Changes in Pigment Composition, Chlorophyll Fluorescence Parameters and Photosynthetic Activity // *Chlorophyll a fluorescence. Advances in photosynthesis and respiration* / eds G.C. Papageorgiou, Govindjee. Dordrecht: Springer, 2004. Vol 19. P. 713–736.

37. Meneghetti S., Calò A., Bavaresco L. A strategy to investigate the intravarietal genetic variability in *Vitis vinifera* L. for clones and biotypes identification and to correlate molecular profiles with morphological traits or geographic origins // *Molecular Biotechnology*. 2012. Vol. 52. P. 68–81. DOI: 10.1007/s12033-011-9475-6.

REFERENCES

1. Sarasan V., Cripps R., Ramsay M., Atherton C., McMichen M., Prendergast G., et al. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2006;42(3):206-214. DOI: 10.1079/IVP2006769.

2. Paunesca A. Biotechnology for endangered plant conservation: a critical overview. *Romanian Biotechnological Letters*. 2009;14(1):4095-4103.

3. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2011;47(1):5-16. DOI: 10.1007/s11627-010-9327-2.

4. Watt M.P., Thokoane N.L., Mycock D., Blakeway F. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2000;61:161-164. DOI: 10.1023/A:1006447506869.

5. Molkanova O.I., Konovalova T.Y., Shirnina I.V., Krakhmaleva I.L., Akhmetova L.R., Koroleva O.V., et al. Methodological bases of plant conservation in genebank *in vitro*. *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii = Pomiculture and small fruits culture in Russia*. 2019;58:253-258. (In Russian). DOI: 10.31676/2073-4948-2019-58-253-258. EDN: AUUSLC.

6. Ivanova N.N., Tsiupka V.A., Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V. Rare and endemic plant species of Mountain Crimea flora: a morphogenic response to conservation in the gene bank *in vitro*. *Turczaninowia*. 2022;25(1):24-30. DOI: 10.14258/turczaninowia.25.1.3. EDN: EEPQZI.

7. Panis B., Nagel M., Van den Houwe I. Challenges and prospects for the conservation of crop genetic

resources in field genebanks, in *in vitro* collections and/or in liquid nitrogen. *Plants*. 2020;9;12:1634. DOI: 10.3390/plants9121634.

8. Benson E., Harding K., Debouck D., Dumet D., Escobar R., Mafla G., et al. *Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops. Global Public Goods Phase 2. Part 1. Project landscape and general status of clonal crop in vitro conservation technologies*. Rome: System-Wide Genetic Resources Programme; 2011, 86 p.

9. Bell R.L., Reed B.M. *In vitro* tissue culture of pear: advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation. *Acta Horticulturae*. 2002;596:412-418. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.596.66.

10. Lambardi M., De Carlo A. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. In: Jain S.M., Ishii K. (eds). *Micropropagation of woody trees and fruits*. Dordrecht: Springer; 2003, p. 815-840.

11. Mitrofanova I.V. *Fundamentals of in vitro genebank creation of species, cultivars and forms in ornamental, aromatic and fruit crops*. Simferopol: IT "Arial"; 2018, 260 p. (In Russian). EDN: YQBBFZ.

12. Tefvik A.Sh., Mitrofanova I.V. *In vitro* derivation and storage characteristics of *Canna × Hybrida hort. ex backer*. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2017;7(3):99-109. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-3-99-109. EDN: ZQJUIP.

13. Yegorova N.A., Zagorskaya M.S., Abdurashytov S.F. Features of long-term preservation of Azhurnaya and Bergamotnaya mint cultivars in an *in vitro* collection. *Izvestiya*

Vuzov. *Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(1):64-75. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-1-64-75. EDN: UDQENT.

14. Doroshenko N., Kuprikova A., Puzyrnova V. Effect of sucrose on retardation of growth and preservation of grape plants in the collection *in vitro*. *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit growing and viticulture of South Russia*. 2017;46:33-48. Available from: <https://journal.kubansad.ru/pdf/17/04/04.pdf> [Accessed 19th June 2023]. (In Russian). EDN: YZJXNP.

15. Engelmann F, Engles J.M.M. Technology and strategies for ex situ conservation. In: *Managing Plant Genetic Diversity: proceedings of an International conference*. 12–16 June 2000, Kuala Lumpur. DOI: 10.1079/9780851995229.0089.

16. Harding K. The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1994;37:31-38. DOI: 10.1007/BF00048114.

17. Kumar A. Somaclonal variation. In: Bradshaw J.E., Mackay G.R. (eds). *Potato genetics*. Wallingford: CAB International; 1994, p. 197-212.

18. Sonibare M.A., Adeniran A.A. Comparative micro-morphological study of wild and micropropagated *Dioscorea bulbifera* Linn. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014;4(3):176-183. DOI: 10.1016/S2221-1691(14)60228-8.

19. Manokari M., Priyadharshini S., Shekhawat M.S. Microstructural and histochemical variations during *in vitro* to *in vivo* plant developments in *Aloe vera* (L.) Burm.f (Xanthorrhoeaceae). *Industrial Crops Products*. 2021;160:113162. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.113162.

20. Manokari M., Priyadharshini S., Shekhawat M.S. Micro-structural stability of micropropagated plants of *Vitex negundo* L. *Microscopy and Microanalysis*. 2021;27(3):626-634. DOI: 10.1017/s1431927621000283.

21. Okello D., Yang S., Komakech R., Rahmat E., Chung Y., Gang R., et al. An *in vitro* propagation of *Aspilia africana* (Pers.) C. D. Adams, and evaluation of its anatomy and physiology of acclimatized plants. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12:704896. DOI: 10.3389/fpls.2021.704896.

22. Mani M., Mathiyazhagan C., Dey A., Faisal M., Alatar A.A., Alok A., et al. Micro-morpho-anatomical transitions at various stages of *in vitro* development of *Crinum malabaricum* L. *Plant Biology*. 2023;25(1):142-151. DOI: 10.1111/plb.13464.

23. Komakech R., Kim Y.-G., Kim W.J., Omuja F., Yang S., Moon B.C., et al. A micropropagation protocol for the endangered medicinal tree *Prunus africana* (Hook. f.) Kalkman: genetic fidelity and physiological parameter assessment. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11:548003. DOI: 10.3389/fpls.2020.548003.

24. Brailko V.A., Mitrofanova O.V., Smykova N.V., Mitrofanova I.V. Some morphological and physiological features of chrysanthemum under *in vitro* culture. *Acta Horticulturae*. 2018;1201:607-612. DOI: 10.17660/ActaHortic.2018.1201.81.

25. Moustaka J., Ouzounidou G., Sperdouli I., Moustakas M. Photosystem II is more sensitive than Photosystem I to Al³⁺ induced phytotoxicity. *Materials*. 2018;11(9):1772. DOI: 10.3390/ma11091772.

26. Shekhawat M.S., Manokari M. Micromorphological and anatomical evaluation of *in vitro* and field transferred plants of *Coccinia indica*. *Agricultural Research*. 2018;7:135-144. DOI: 10.1007/s40003-018-0326-6.

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

28. Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Smykova N.V. *In vitro* cleaning up and micro-propagation of perspective chrysanthemum cultivars and new hybrid forms of the Nikita Botanical Gardens' breeding. *Byulleten' Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada = Bulletin of the State Nikitsky Botanical Gardens*. 2021;138:92-100. (In Russian). DOI: 10.36305/0513-1634-2021-138-92-100. EDN: IXTUSZ.

29. Stirbet A., Govindjee. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2011;104(1-2):236-257. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010.

30. Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1997;15:8-15. DOI: 10.1007/BF02772108.

31. Zhang Y., Wang C., Ma H., Dai S. Assessing the genetic diversity of chrysanthemum cultivars with micro-satellites. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2013;138(6):479-486. DOI: 10.21273/JASHS.138.6.479.

32. Khaing A.A., Moe K.T., Hong W.J., Park C.S., Yeon K.H., Park H.S., et al. Phylogenetic relationships of chrysanthemums in Korea based on novel SSR markers. *Genetics and Molecular Research*. 2013;12(4):5335-5347. DOI: 10.4238/2013.November.7.8.

33. Rocha J.A., Vasconcelos S., da Silva F.M.M., Melo A.J., Silva M.F.S., de Miranda J.A.L., et al. ISSR primer selection for genetic variability analyses with jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew., Rutaceae). *Forest Research*. 2014;3(3):1000126. DOI: 10.4172/2168-9776.1000126.

34. Mitrofanova I.V., Ivanova N.N., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P. Features of deposition of garden chrysanthemum under *in vitro* conditions. *Byulleten' Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada = Bulletin of the State Nikitsky Botanical Gardens*. 2019;(131):110-117. (In Russian). DOI: 10.25684/NBG.boolt.131.2019.15. EDN: JZOSSS.

35. Perks M.P., Monaghan S., O'Reilly C., Osborne B.A., Mitchell D.T. Chlorophyll fluorescence characteristics, performance and survival of freshly lifted and cold stored Douglas fir seedlings. *Annals of Forest Science*. 2001;58(3):225-235. DOI: 10.1051/forest:2001122.

36. Lichtenthaler H.K., Babani K. Light Adaptation and Senescence of the Photosynthetic Apparatus. Changes in Pigment Composition, Chlorophyll Fluorescence Parameters and Photosynthetic Activity. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (eds). *Chlorophyll a fluorescence. Advances in photosynthesis and respiration*. Dordrecht: Springer; 2004, vol. 19, p. 713-736.

37. Meneghetti S., Calò A., Bavaresco L. A strategy to investigate the intravarietal genetic variability in *Vitis vinifera* L. for clones and biotypes identification and to

correlate molecular profiles with morphological traits or geographic origins. *Molecular Biotechnology*. 2012;52:68-81. DOI: 10.1007/s12033-011-9475-6.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Иванова Наталия Николаевна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени
Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр РАН»,
298648, Республика Крым, г. Ялта,
ул. Никитский спуск, 52,
Российская Федерация,
✉ nnivanova2017@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7628-9646>

Цюпка Валентина Анатольевна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени
Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр РАН»,
298648, Республика Крым, г. Ялта,
ул. Никитский спуск, 52,
Российская Федерация,
valentina.brailko@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3853-0210>

Корзина Наталья Васильевна,
к.б.н., заведующий лабораторией,
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени
Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр РАН»,
298648, Республика Крым, г. Ялта,
ул. Никитский спуск, 52,
Российская Федерация,
natali.korz@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5220-5700>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 23.06.2023.
Одобрена после рецензирования 18.09.2023.
Принята к публикации 31.10.2023.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Natalya N. Ivanova,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Order of the Red Banner Nikita Botanical
Gardens – National Scientific Center RAS,
52, Nikitskiy Spusk, Yalta, 298648,
Crimea Republic, Russian Federation,
✉ nnivanova2017@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7628-9646>

Valentina A. Tsiupka,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Order of the Red Banner Nikita Botanical
Gardens – National Scientific Center RAS,
52, Nikitskiy Spusk, Yalta, 298648,
Crimea Republic, Russian Federation,
valentina.brailko@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3853-0210>

Natalia V. Korzina,
Cand. Sci. (Biology), Head of the Laboratory,
Order of the Red Banner Nikita Botanical
Gardens – National Scientific Center RAS,
52, Nikitskiy Spusk, Yalta, 298648,
Crimea Republic, Russian Federation,
natali.korz@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5220-5700>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 23.06.2023.
Approved after reviewing 18.09.2023.
Accepted for publication 31.10.2023.