

Оригинальная статья / Original article

УДК 634:45:57.085.2

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-712-721>

Клональное микроразмножение и сохранение в условиях *in vitro* двух сортов хурмы восточной (*Diospyros kaki thunb.*)

© И.В. Митрофанова, Н.Н. Иванова, Т.Н. Кузьмина, С.Ю. Хохлов

Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр РАН, г. Ялта, Республика Крым, Российская Федерация

Резюме: Цель исследования – усовершенствование способа регенерации микропобегов хурмы восточной сортов Сувенир Осени и Южная Красавица селекции Никитского ботанического сада и оптимизация условий для беспересадочного 12-месячного депонирования хурмы восточной в условиях *in vitro* с целью дальнейшего создания генобанка ценных субтропических сельскохозяйственных культур. Исследования по введению эксплантов в культуру *in vitro* и регенерации микропобегов хурмы проводили в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений ФГБУН Ордена Трудового Красного Знамени «Никитский ботанический сад» – Национальный научный центр РАН. Для регенерации микропобегов использовали среду Мурасиге и Скуга (МС) с регуляторами роста – 6-бензилапинопурином (БАП) и 3-(1,2,3-тиадиазолин-5)-1-фенилмочевина (ТДЗ). Для сохранения *in vitro* сегменты микропобегов помещали на питательную среду ¼ нормы МС, дополненную сахарозой и хлорхолинхлоридом (ССС). Культуральные сосуды помещали в холодильные камеры с низкой положительной температурой (4–14 °С). В ходе экспериментов установлена индуцирующая роль БАП (2–4 мг/л) в питательной среде МС на этапе индукции побегообразования, что обеспечивало стабильную прямую регенерацию микропобегов из вегетативных почек хурмы восточной. Максимальное число нормальных микропобегов без видимых изменений получено на среде МС, дополненной 4 мг/л БАП: 2,0±0,4 шт. – у сорта Сувенир Осени, 2,7±0,4 шт. – у сорта Южная Красавица. Средняя длина микропобегов достигала 1,90±0,04 см для сорта Сувенир Осени и 3,1±0,07 см – для сорта Южная Красавица. Наличие в среде МС ТДЗ способствовало формированию микропобегов путем непрямого органогенеза в культуре высечек листа исследуемых сортов. Частота побегообразования из высечек листа достигала 65–79 % через 6 недель культивирования на средах с 1,1 и 1,7 мг/л ТДЗ. Различия морфогенетического потенциала эксплантов прослеживались на протяжении всех этапов развития. Данные гистологических исследований каллуса подтверждают наличие пролиферативно активных клеток, которые дают начало меристемам микропобегов. Показана стабилизирующая роль 60,0 г/л сахарозы и 0,2–0,4 г/л СССР в среде ¼ МС при температуре сохранения 8–10 °С на жизнеспособность эксплантов хурмы в течение 12 месяцев.

Ключевые слова: *Diospyros kaki*, микроразмножение, *in vitro*, органогенез, депонирование

Благодарности: Работа была выполнена в рамках Госзадания № 0829-2019-0038 ФГБУН «Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН».

Информация о статье: Дата поступления 11 апреля 2019 г.; дата принятия к печати 25 ноября 2019 г.; дата онлайн-размещения 30 декабря 2019 г.

Для цитирования: Митрофанова И.В., Иванова Н.Н., Кузьмина Т.Н., Хохлов С.Ю. Клональное микроразмножение и сохранение в условиях *in vitro* двух сортов хурмы восточной (*Diospyros kaki thunb.*) // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. N. 4. С. 712–721. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-712-721>

In vitro cloned micropropagation and conservation for two cultivars of *Diospyros kaki* (*Diospyros kaki* Thunb.)

© Irina V. Mitrofanova, Natalya N. Ivanova,
Tatyana N. Kuzmina, Sergey Yu. Khokhlov

The Labor Red Banner Order Nikitsky Botanical Gardens –
National Scientific Center of the RAS, Yalta, the Republic of the Crimea, Russian Federation

Abstract: The study is aimed at improving the microsprout regeneration method for the 'Suvenir Oseni' and 'Yuzhnaya Krasavitsa' *Diospyros kaki* (persimmon) cultivars of the Nikitsky Botanical Gardens. The breeding of and optimising the conditions for non-stop 12-month in vitro deposition of kaki persimmon was carried out for the purpose of creating a gene bank of valuable subtropical crops. The explanting of in vitro culture and the regeneration of persimmon microsprouts was carried out in the laboratory of plant biotechnology and virology of the "Nikitsky Botanical Gardens" National Scientific Centre RAS. For regeneration of microsprouts, Murashige and Skoog medium (MSO) containing 6-benzylaminopurine (BAP) and 3-(1,2,3-Thiadiazolin-5)-1-phenylurea (TDZ) growth regulators was used. In order to ensure in vitro preservation, microsprout segments were placed in a nutrient medium composed by ¼ of normal MS, sucrose and chlorocholinechloride (CCC). The culture vessels were placed in refrigerators to maintain a low positive temperature (4–14 °C). In the course of the experiments, the inducing role of BAP (2–4 mg/L) in the MS nutrient medium at the induction stage of spout formation was established to ensure stable direct regeneration of microsprouts from the vegetative burgeons of kaki persimmon. The maximum number of normal microsprouts having no visible changes was obtained in MS medium having a BAP concentration of 4 mg/L and equal to 2.0 ± 0.4 and 2.7 ± 0.4 pcs. for the 'Suvenir Oseni' and 'Yuzhnaya Krasavitsa' cultivars, respectively. The average length of microsprouts reached 1.90 ± 0.04 cm for the 'Suvenir Oseni' cultivar, while, for 'Yuzhnaya Krasavitsa', this value was equal to 3.1 ± 0.07 cm. The presence of TDZ in the MS medium facilitated the formation of microsprouts through indirect organogenesis in the leaf cutting culture of the studied cultivars. The frequency of spout formation from leaf cuttings reached 65–79 % following 6 weeks of cultivation on media with 1.1 and 1.7 mg/L concentration of TDZ. Differences in the morphogenetic potential of explants were traced throughout all stages of development. Data from histological callus studies confirm the presence of proliferatively active cells giving rise to microsprout meristems. The concentration of 60.0 g/L and 0.2–0.4 g/L for sucrose and CCC, respectively, contained in ¼ MS medium was shown to stabilise the viability of persimmon explants at a storage temperature of 8–10 °C for 12 months.

Keywords: *Diospyros kaki*, micropropagation, in vitro, organogenesis, deposition

Acknowledgments: The study was carried out as a part of the State assignment no. 0829-2019-0038 for Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS.

Information about the article: Received April 11, 2019; accepted for publication November 25, 2019; available online December 30, 2019.

For citation: Mitrofanova IV., Ivanova NN., Kuzmina TN, Khokhlov SYu. In-vitro cloned micropropagation and conservation for two cultivars of *Diospyros kaki* (*Diospyros kaki* Thunb.). *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2019;9(4):000–000. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-712-721>

ВВЕДЕНИЕ

Никитский ботанический сад – одно из старейших научных учреждений, широко известное за пределами современной России. Его сотрудниками за многие годы была собрана уникальная коллекция хурмы восточной (*Diospyros kaki* Thunb.), состоящая из 120 сортов и перспективных форм [1]. Почвенно-климатические условия южного берега Крыма оказались вполне пригодными для успешной акклиматизации этой субтропической культуры.

Плоды хурмы полезны, питательны, пригодны для употребления в свежем виде или после технологической переработки. Мякоть зрелых плодов содержит целый ряд витаминов, каротиноидов, микро- и макроэлементов, а также органические соединения йода, кальция и железа [2].

Традиционные методы вегетативного размножения плодовых культур довольно трудоемки и в недостаточной степени эффективны. Современные биотехнологии растений

позволяют получить необходимое количество генетически стабильных оздоровленных регенерантов [3]. Разработаны способы регенерации отдельных сортов хурмы из вегетативных почек, высечек листьев и культивируемого каллуса в условиях *in vitro* [4–6]. В исследованиях установлена зависимость регенерационной способности эксплантов отдельных сортов хурмы восточной от сроков изоляции, способа стерилизации, наличия регуляторов роста в питательной среде [7, 8].

Использование методов культуры ткани и органов позволяет решать такие задачи, как массовое размножение видов, сортов и форм и последующее создание медленно растущих коллекций [9, 10]. Создание коллекций растений *in vitro* является одной из составляющих частей стратегии охраны биологического разнообразия растений¹ [11–13].

Целью данной работы было усовершенствование способа регенерации микропобегов хурмы восточной сортов Сувенир Осени и Южная Красавица селекции Никитского ботанического сада, последующая оптимизация условий для беспересадочного 12-месячного депонирования хурмы восточной в условиях *in vitro* в рамках создания генобанка ценных субтропических плодовых культур.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом для биотехнологических исследований послужили 2 сорта хурмы восточной – Сувенир Осени и Южная Красавица, произрастающие в коллекции Никитского ботанического сада. В условия *in vitro* были введены вегетативные почки изучаемых сортов хурмы.

Исследования по введению эксплантов в культуру *in vitro* и регенерации микропобегов хурмы восточной проводили в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН» с применением различных биотехнологических методов² [14–16]. Вегетативные почки хурмы стерилизовали 1 мин в 70 %-м этаноле, 15 мин в растворе, содержащем 0,3–0,4 % Cl_2 (Дез ТАБ, Китай), затем в 1 %-м растворе Thimerosal (Sigma, США) с добавлением 2–3 капель детергента Tween 20 (Sigma, США). После каждого реагента экспланты промывали 3 раза стерильной дистиллирован-

ной водой. Все операции выполняли с помощью пинцетов, скальпелей и одноразовых стерильных лезвий (Medec Instrument Group Co., Германия). Для стерилизации инструментов использовали стерилизатор Tau Quartz 500 (Италия).

Изолированные вегетативные почки помещали на среду МС (Murashige, Skoog, 1962) [17], дополненную 30 г/л сахарозы и 10 г/л агар-агара (Panreac, Испания), а также регуляторами роста: 1,0–5,0 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 0,7–2 мг/л зеатина и 0,1–0,3 мг/л β -индолил-3-масляной кислоты (ИМК) (Sigma, США). pH питательной среды до значения 5,7 доводили 1 н. раствором NaOH (pH/Ion meter S220 Mettler Toledo AG, Швейцария). Питательные среды автоклавировали при 120 °С в течение 5 мин в автоклаве/стерилизаторе LAC 5060S (Daihan Labtech, Южная Корея). Регуляторы роста вводили в среды после автоклавирования в стерильных условиях бокса биологической безопасности SC2 («ESCO», Сингапур) с помощью стерильных фильтров Millex-GP (Германия).

Для оздоровления от вирусной инфекции применяли вироцид рибавирин (виразол, 1-бета-D-рибофуранозил-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) (Sigma, США), введенный непосредственно в питательную среду в концентрации 10 мг/л. Экспланты культивировали на стеллажах при температуре 24 ± 1 °С в 16-часовом фотопериоде и интенсивности освещения $37,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$.

Высечки листьев размером 1×1 см помещали на среду МС с добавлением 0,2; 0,6; 1,1; 1,7 и 2,2 мг/л 3-(1,2,3-тиадиазолин-5)-1-фенилмочевин – ТДЗ (Duchefa Biochemie, Голландия). Контрольной была среда МС без ТДЗ. Экспланты культивировали на стеллаже в стандартных условиях и в отсутствие освещения при 25 ± 1 °С в термостате MIR 254 (SANYO, Япония).

Для депонирования в качестве исходных эксплантов использовали сегменты микропобегов исходных растений размером 1,0–1,5 см. В экспериментах применяли модифицированную питательную среду $\frac{1}{4}$ нормы МС. В состав среды были включены макро- и микроэлементы (Sigma, США), витамины (Sigma, США), 0,2–0,4 г/л хлорхолинхлорида ССС (BASF, Германия), 60 г/л сахарозы и 10 г/л агар-агара. Контролем служила среда $\frac{1}{4}$ МС без ингибиторов роста. Стаканчики закрывали стерильной пищевой фольгой толщиной 14 мкм («Саянская», Россия), сверху изолировали герметизирующей пленкой Parafilm M (Bemis, США). Экспланты помещали в холодильные камеры марки Liebcherr FKvsl 4113 (Австрия) с интенсивностью освещения $1,25\text{--}3,75 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ при температуре 4, 6, 8, 10, 12 и 14 °С. При введении эксплантов на депонирование записывали основные показатели: генотип, дату закладки на депонирование, размер экспланта (длину,

¹ Международная программа ботанических садов по охране растений / под ред. И. Смирнова, В.Л. Тихоновой; пер. на рус. яз. Ю. Лисиной. М.: Междунар. совет ботан. садов по охране растений. Botanic Gardens Conservation International. 2000. 57 с.

² Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.

количество междоузлий), температуру депонирования, питательную среду, концентрацию ингибиторов роста. Растительный материал фиксировали через 6 месяцев культивирования. Проводили оценку сохраняемого растительного материала по таким показателям, как длина микропобега, окраска экспланта, количество адвентивных микропобегов, количество листьев на микропобеге, количество корней на микропобеге, длина корня, жизнеспособность. Эти показатели определяли кинетику роста растений.

Для проведения гистологического анализа каллусные структуры фиксировали в растворе F.A.A. (formalin : acetic acid : alcohol 70 % – 7 : 7 : 100). Для обезвоживания материала использовали водные растворы этилового спирта и изопропиловый спирт. В качестве промежуточной среды при заливке объектов в парафин применяли ксилол. Период инфильтрации парафином составлял 5–7 суток [18]. Серийные парафиновые срезы толщиной 10 μ m делали на ротационном полуавтоматическом микротоме RMD-3000 (ООО «МедТехникаПоинт», Россия). Постоянные препараты окрашивали гематоксилином и алциановым синим [19]. Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа AxioScope A.1 (Zeiss, Германия) со встроенной системой анализа изображений AxioCamERc5s (Zeiss, Германия) и программного приложения AxioVision Rel. 4.8.2. (Zeiss, Германия).

Всю обработку данных осуществляли с помощью программы Statistica for Windows, 6.0

(StatSoft, Inc. 1984–2001).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Максимальное количество эксплантов, регенерировавших микропобеги, получали в декабре–феврале. На питательной среде МС с уменьшенной вдвое концентрацией азота через 6 недель культивирования наблюдали формирование розетки листьев, затем – микропобега. Установлено, что изолированные вегетативные почки хурмы изучаемых сортов имели различный морфогенетический потенциал. На 4-й неделе культивирования наблюдали выдвижение 1–3 листьев у эксплантов сорта Южная Красавица, в то время как у эксплантов сорта Сувенир Осени – 1 листа. Различие морфогенетического потенциала эксплантов прослеживалось на протяжении всех этапов развития.

В ходе экспериментов было изучено влияние БАП на индукцию побегообразования изучаемых сортов хурмы восточной из закрытых вегетативных почек в условиях *in vitro*. Известно, что наиболее эффективным для клонального микроразмножения хурмы является применение зеатина на этапе индукции побегообразования и массового размножения [5, 14]. Часто на этапе введения эксплантов используют БАП, а зеатин применяют для удлинения и формирования адвентивных микропобегов [7].

В вариантах среды МС с 1,0–2,0 мг/л БАП для двух сортов среднее количество микропобегов на эксплант составляло $1,4 \pm 0,3$ шт. для сорта Сувенир Осени и $1,7 \pm 0,3$ – для сорта Южная Красавица (рис. 1).

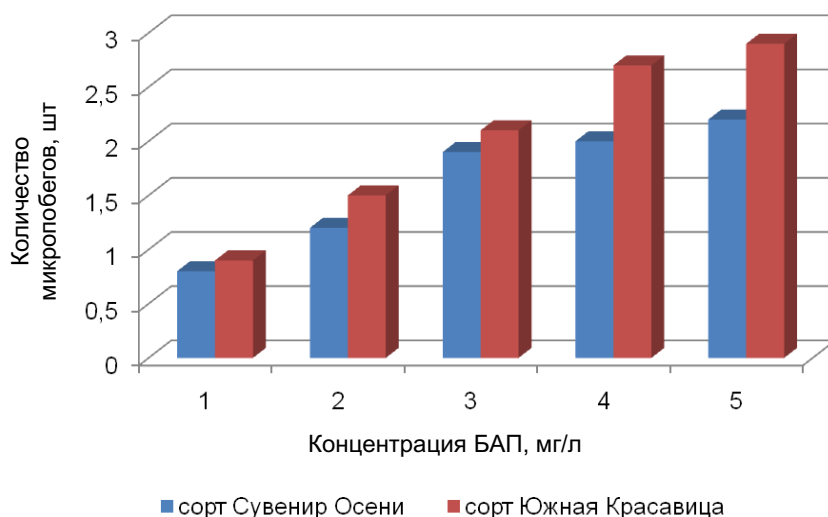


Рис. 1. Влияние концентраций БАП в среде МС на количество микропобегов / эксплант у двух сортов хурмы в условиях *in vitro* на этапе индукции побегообразования

Fig. 1. Effect of BAP concentrations in MS medium on the number of microshoots / explant in two persimmon cultivars at the stage of the shoot formation induction under *in vitro* conditions

Максимальное число нормально развитых микропобегов получено на среде МС, дополненной 4 мг/л БАП: $2,0 \pm 0,4$ шт. – у сорта Сувенир Осени, $2,7 \pm 0,4$ шт. – у сорта Южная Красавица. Средняя длина микропобегов достигала $1,90 \pm 0,04$ см для сорта Сувенир Осени и $3,1 \pm 0,07$ см – для сорта Южная Красавица. Увеличение концентрации БАП до 5 мг/л незначительно увеличивало количество микропобегов, однако большая часть из них была оводненной.

Для удлинения побеги субкультивировали на среду МС, дополненную 0,8–1 мг/л зеатина. Средняя длина микропобегов через 4 недели культивирования достигала 2,5–3,0 см. Дальнейшее микрочеренкование в условиях *in vitro* позволило увеличить количество микропобегов.

Для определения основных факторов, спо-

собствующих непрямой регенерации микропобегов в культуре листовых эксплантов 2-х сортов хурмы восточной в условиях *in vitro*, было изучено влияние ТДЗ в питательной среде. Выявлено, что каллусообразование на среде МС, дополненной 1,1 и 1,7 мг/л ТДЗ, активнее происходило в термостате. Дальнейшее культивирование при температуре 24 ± 1 °С, 16-ти часовом фотопериоде и интенсивности освещения $37,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ приводило к формированию на его поверхности шарообразных структур, из которых в последствии развивались микропобеги. Представленные результаты согласуются с данными, полученными для сортов хурмы Никитская Бордовая и Золотистая [4, 20]. Частота побегообразования из высечек листа достигала 65–79 % через 6 недель культивирования на средах с 1,1 и 1,7 мг/л ТДЗ (рис. 2).

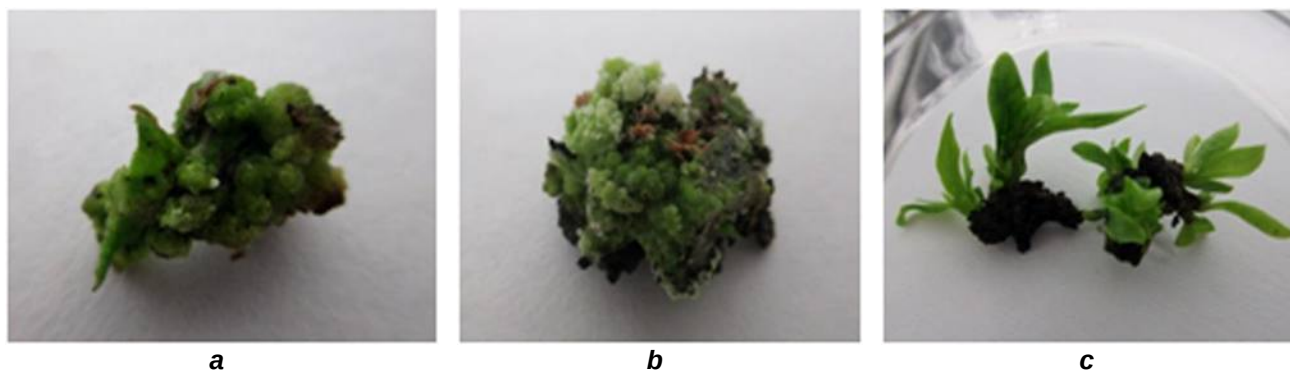


Рис. 2. Морфогенный каллус хурмы восточной:
a – сорт Сувенир Осени; b – сорт Южная Красавица, c – регенерация
микропобегов из каллуса у сорта Сувенир Осени (масштаб 1 см)

Fig. 2. Persimmon morphogenic callus: a – cultivar Suvenir Oseni;
b – cultivar Yuzhnaya Krasavitsa, c – microshoot regeneration
in the cultivar Suvenir Oseni (scale 1 cm)

Гистологический анализ каллусов сортов хурмы Южная Красавица и Сувенир Осени показал, что они представлены плотными скоплениями паренхимных клеток со слабо выраженными цитоплазмой и ядерными структурами. Клетки с более плотной цитоплазмой и отчетливо выраженными ядрами наблюдали на периферии структур, при этом во внешних слоях каллусных структур также располагались клетки с утолщенными стенками и цитоплазмой, насыщенной включениями вторичных метаболитов. Зоны пролиферативных клеток отмечены как на периферических слоях каллусов, так и в толще паренхимных клеток. В то же время меристематически активные клетки, расположенные на внешних слоях каллусной структуры, как правило, дают начало микропобегам, что наиболее характерно для сорта Южная Красавица. Кроме того, у исследуемых сортов выявлены случаи образования глобулярных структур, типичных для ранних стадий эмбриогенеза (рис. 3).

Другим путем реализации морфогенеза, отмеченным для данных сортов, является гистогенез проводящих элементов, сопровождающийся поляризацией клеток, утолщением клеточных стенок и последующей их перфорацией.

В первом пассаже получено 4 микропобега / эксплант у сорта Сувенир Осени, 5 – у сорта Южная Красавица. Микропобеги отделяли и субкультивировали на среде МС, дополненной 0,8–1 мг/л зеатина. Присутствие в среде МС 0,2 мг/л, 0,6 мг/л и 2,2 мг/л ТДЗ способствовало формированию неморфогенного каллуса. На среде без цитокинина не наблюдали признаков морфогенеза.

Возможности создания генобанка культур *in vitro* для длительного хранения ценных плодовых растений является одной из основных задач биотехнологии. Большое значение в культуре тканей и органов имеет разработка условий длительного сохранения пробирочных растений *in vitro* как резервного банка ценных видов, сортов и форм различных культур¹ [11, 12, 15, 21, 22].

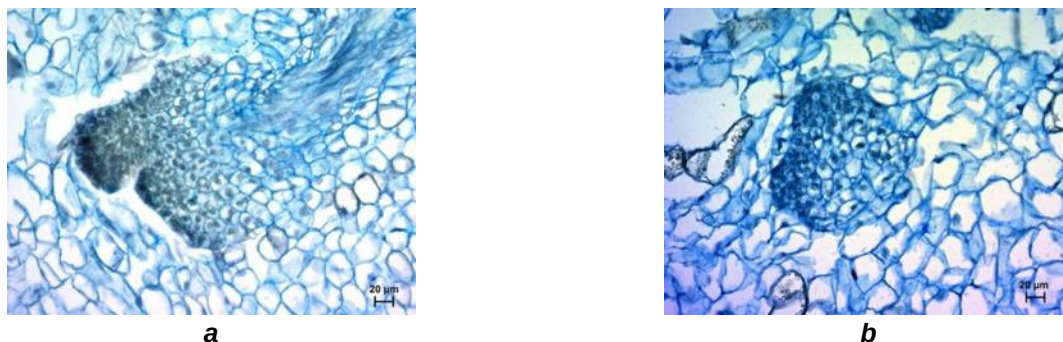


Рис. 3. Фрагменты поперечных срезов каллусов хурмы сортов Южная Красавица (а) и Сувенир Осени (б) с морфогенными структурами

Fig. 3. Fragments of persimmon calluses cross sections with the morphogenic structures of the cultivars Yuzhnaya Krasavitsa (a) and Suvenir Oseni (b)

Серьезным препятствием для сохранения растений при нормальной температуре (20–26 °C) является старение эксплантов или потеря жизнеспособности, что происходит в результате многократных субкультивирований. При длительном депонировании большое значение имеет определение оптимального уровня температуры, при котором замедляются метаболические процессы растений *in vitro* и ограничивается скорость их роста [9, 10, 23, 24].

На эффективность сохранения растительного материала в условиях *in vitro* влияет ряд факторов. Различные методические приемы не должны вызывать необратимых изменений или повреждения материала, необходимо обеспечивать возможность последующего культивирования растительного материала в стандартных условиях с высокими количественными показателями.

Для изменения кинетики роста в наших исследованиях было использовано комплексное влияние низкой положительной температуры и наличия в питательной среде осмоти-

ков и ретардантов. Предварительные исследования позволили установить оптимальные концентрации ССС в питательной среде $\frac{1}{4}$ нормы МС – 0,2–0,4 г/л, способствующие минимализации роста растений при сохранении их жизнеспособности [14]. Проведенный скрининг депонируемых в течение 6 месяцев культур показал, что при концентрации ССС 0,2–0,4 г/л, сахарозы 60 г/л и температуре 4–6 °C жизнеспособность эксплантов у растений хурмы находилась в пределах 30–68 %. Сегменты побегов имели зелено-коричневую или коричневую окраску, было отмечено отсутствие их роста. При температуре 8–14 °C наблюдали замедление роста эксплантов в 1,5 раза по сравнению с контролем, при этом они оставались зелеными и образовывали 1–2 листочка.

Увеличение времени сохранения *in vitro* эксплантов хурмы восточной сортов Южная Красавица и Сувенир Осени до 12 месяцев позволило установить значения температуры (8–10 °C), при которых жизнеспособность эксплантов оставалась на уровне 80 % (рис. 4).



Рис. 4. Жизнеспособность эксплантов хурмы восточной после 12 месяцев сохранения на питательной среде $\frac{1}{4}$ МС, дополненной 0,2 г/л ССС и 60 г/л сахарозы в генобанке *in vitro* при различной температуре

Fig. 4. Viability of persimmon explants after 12 months of preservation on $\frac{1}{4}$ MS culture medium, supplemented with 0,2 g/L CCC and 60 g/L sucrose in the *in vitro* genebank at different temperatures

Отмечено снижение кинетики роста в 2 раза по сравнению с контролем. Наряду с этим наблюдали появление бурой окраски и выделение продуктов окисления полифенолов в питательную среду (окрашивание среды в светло-коричневый цвет). Увеличение температуры до 12 и 14 °С способствовало резкому снижению жизнеспособности эксплантов вследствие интенсивного выделения продуктов окисления полифенолов, некрозу ткани и дальнейшей гибели эксплантов. Низкие положительные температуры (4 и 6 °С) также оказались неэффективными для 12-месячного сохранения эксплантов изучаемых сортов хурмы восточной в условиях генобанка *in vitro*.

Проведенное тестирование депонируемых эксплантов по морфо-биологическим признакам на питательной среде для индукции регенерационных процессов указывало на сохранение морфогенетического потенциала и способности к регенерации микропоголов у 80 % эксплантов после 12 месяцев сохранения при температуре 8–10 °С.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований

выявлены два основных пути регенерации микропоголов хурмы восточной сортов Су-венир Осени и Южная Красавица в условиях *in vitro*. Показано, что наличие в питательной среде МС 4 мг/л БАП обеспечивало стабильную прямую регенерацию в культуре вегетативных почек. Выявлены сортовые различия морфогенетического потенциала исходных эксплантов. Присутствие в среде МС 1,1 и 1,7 мг/л ТДЗ способствовало непрямому органогенезу в культуре высечек листьев. Гистологический анализ подтвердил наличие меристематически активных клеток, расположенных на внешних слоях каллусной структуры, как правило, дающих начало микропоговам.

Разработаны методические подходы сохранения растительного материала *in vitro* в условиях замедленного роста с целью создания генобанка ценных субтропических плодовых культур. Показана стабилизирующая роль сахарозы и ССС в среде ¼ нормы МС, а также оптимальной температуры сохранения (8–10 °С) на жизнеспособность эксплантов двух сортов хурмы восточной в течение 12 месяцев депонирования.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Хохлов С.Ю. Оценка сортов хурмы в коллекции Никитского сада // Сборник научных трудов ГНБС. 2015. Т. 140. С. 206–221.
2. Yonemori K., Sugiura A., Yamada M. Persimmon genetics and breeding // Plant breeding reviews. 2000. Vol. 19. P. 191–225.
3. Bhojwani S.S., Dantu P.K. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. (New Delhi, Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer), 2013, 309 p. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>.
4. Иванова Н.Н., Митрофанова И.В., Браилко В.А., Кузьмина Т.Н., Хохлов С.Ю. Биотехнологические приемы размножения хурмы восточной // Экосистемы. 2017. Вып. 11 (41). С. 60–67.
5. Kochanova Z., Onus N., Brindsa J. Adventitious shoot regeneration from dormant buds of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cv. Hachiya // Journal of Agrobiology. 2011. Vol. 28. N 2. P. 113–118. <https://doi.org/10.2478/v10146-011-0012-9>
6. Liu Y., Ma J., Tang X., Song C. Study on the adventitious shoot regeneration of persimmon leaves // Hubei Agri Sciences. 2006. Vol. 45. P. 618–621.
7. Иванова Н.Н., Митрофанова И.В., Хохлов С.Ю. Особенности введения эксплантов хурмы восточной в условия *in vitro* // Бюллетень ГНБС. 2016. N 119. С. 45–51.
8. Иванова Н.Н., Митрофанова И.В., Хохлов С.Ю. Различные пути регенерации растений *Diospyros kaki* Thunb. сорта Золотистая в условиях *in vitro* // Бюллетень ГНБС. 2016. Вып. 120. С. 24–30.
9. Плаксина Т.В., Пищева Г.Н. Биотехнология в селекции, размножении и сохранении растений // Бюллетень Ботанического сада-института ДВО РАН. 2014. Вып. 12. С. 22–30.
10. Molkanova O., Egorova D., Mitrofanova I. Preservation Characteristics of Valuable Plant Species in *In Vitro* Genebanks at Russian Botanical Gardens // In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 2018. Vol. 58. Suppl. 1. P. 46. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9927-9>
11. Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции Центрального сибирского ботанического сада // Вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. N 4. С. 564–572.
12. Molkanova O., Shirnina I., Mitrofanova I. Conservation and micropropagation of rare and endemic species in genpool collection of the Russian Federation // Journal of Biotechnology. 2018. Vol. 280. P. S83–S84. <https://doi.org/10.1016/j.biotech.2018.06.274>
13. Sarasan W., Cripps G., 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. N 3. P. 206–214. <https://doi.org/10.1079/IVP2006769>
14. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур: монография. Киев: Аграрна наука, 2011. 344 с.
15. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // In Vitro Cellular and Development Biology – Plant. 2011.

Vol. 47. N 1. P. 5–16 <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>

16. Kyte L., Kleyn J., Scoggins H., Bridgen M. Plants from test tubes: An introduction of micropropagation. 4th ed. Portland, Oregon: Timber Press, 2013. 274 p.

17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15. Issue 3. P. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

18. Кузьмина Т.Н. Генезис микроспорангия *Jasminum officinale* L. (Oleaceae) // Бюллетень ГНБС. 2017. N 124. С. 103–109.

19. Жинкина Н.А., Воронова О.Н. К методике окраски эмбриологических препаратов // Ботанический журнал. 2000. Т. 85. N 6. С. 168–171.

20. Иванова Н.Н., Митрофанова И.В., Кузьмина Т.В., Хохлов С.Ю. Регенерация микропобегов в культуре высечек листьев хурмы восточной // Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира: материалы Международной научной конферен-

ции, посвящ. 85-летию Центрального ботанического сада НАН Беларуси (г. Минск, 6–8 июня 2017 г.). В 2 ч. Ч. 2. Минск: Медисонт, 2017. С. 209–212.

21. Молканова О.И., Коновалова Л.Н., Стахеева Т.С. Формирование генетического банка *in vitro* плодовых и ягодных культур в ГБС РАН // Плодоводство и ягодоводство в России. 2016. Т. XXXIV. С. 197–200.

22. Conservation of plant genetic resources in vitro: General aspects / Razdan M.K., Cocking E.C. (eds.). Enfield, NH: Science Publishers, Inc.; 1997. 314 p.

23. 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. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-3-99-109>

24. 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. Issue 2. P. 161–164.

REFERENCES

1. Khokhlov SYu. Assessment of persimmon varieties in the Nikitsky Garden collection. *Sbornik nauchnykh trudov GNBS*. 2015;140:206–221. (In Russian)

2. Yonemori K, Sugiura A, Yamada M. Persimmon genetics and breeding. *Plant breeding reviews*. 2000;19:191–225.

3. Bhojwani SS, Dantu PK. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. New Delhi, Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer; 2013, 309 p. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>

4. Ivanova NN, Mitrofanova IV, Brailko VA, Kuzmina TN, Khokhlov SYu. Biotechnological methods of the Persimmon propagation. *Ekosistemy = Ecosystem*. 2017;11:60–67. (In Russian)

5. Kochanova Z, Onus N, Brindsa J. Adventitious shoot regeneration from dormant buds of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cv. Hachiya. *Journal of Agrobiology*. 2011;28(2):113–118. <https://doi.org/10.2478/v10146-011-0012-9>

6. Liu Y, Ma J, Tang X, Song C. Study on the adventitious shoot regeneration of persimmon leaves. *Hubei Agri Sciences*. 2006;45:618–621.

7. Ivanova NN, Mitrofanova IV, Khokhlov SYu. Features of the introduction of east persimmon explants *in vitro*. *Byulleten' GNBS*. = Bulletin of State Nikitsky Botanical Garden. 2016;119:45–51. (In Russian)

8. Ivanova NN, Mitrofanova IV, Khokhlov SYu. Various regeneration ways of *Diospyros kaki* Thunb. cultivar “Zolotystaya” *in vitro*. *Byulleten' GNBS*. = Bulletin of State Nikitsky Botanical Garden. 2016;120:24–30. (In Russian)

9. Plaksina TV, Pishcheva GN. Biotechnology in plant breeding, reproduction and conservation.

Byulleten' Botanicheskogo cada-instituta DVO RAN. = Bulletin of Botanical Garden-Institute FEB RAS. 2014;12:22–30. (In Russian)

10. Molkanova O, Egorova D, Mitrofanova I. Preservation Characteristics of Valuable Plant Species in *In Vitro* Genebanks at Russian Botanical Gardens. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2018;58(1):46. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9927-9>

11. Novikova TI, Nabieva AYU, Poluboyarova TV. Preservation of rare and useful plants in the collection of the Central Siberian Botanical Garden. *Informatsionnyi Vestnik VOGiS*. = Information Bulletin of Vavilov State Institute of Genetics and Breeding. 2008;12(4):564–572. (In Russian)

12. Molkanova O, Shirnina I, Mitrofanova I. Conservation and micropropagation of rare and endemic species in genpool collection of the Russian Federation. *Journal of Biotechnology*. 2018;280: S83–S84. <https://doi.org/10.1016/j.biotech.2018.06.274>

13. Sarasan W, Cripps G, 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. <https://doi.org/10.1079/IVP2006769>

14. Mitrofanova IV. *Somatic embryogenesis and organogenesis as the basis of biotechnology for obtaining and preserving perennial garden crops*. Kiev: Agrarna nauka; 2011. 344 p. (In Russian)

15. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular and Development Biology – Plant*. 2011;47(1):5–16. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>

16. Kyte L, Kleyn J, Scoggins H, Bridgen M.

Plants from test tubes: An introduction of micropropagation. 4th ed. Portland, Oregon: Timber Press; 2013. 274 p.

17. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3): 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

18. Kuzmina TN. Genesis of microsporangium of *Jasminum officinale* L. (Oleaceae). *Byulleten' GNBS*. = Bulletin of State Nikitsky Botanical Garden. 2017;124:103–109. (In Russian)

19. Zhinkina NA, Voronova ON. To the technique of staining embryological preparations. *Botanicheskii zhurnal*. = Botanical journal. 2000;85(6): 168–171. (In Russian)

20. Ivanova NN, Mitrofanova IV, Kuz'mina TV, Khokhlov SYu. Regeneratsiya mikropobegov v kul'ture vysechek list'ev khurmy vostochnoi = Regeneration of microtuning in the culture of carvings of east persimmon leaves. In: *Rol' botanicheskikh sadov i dendrariy v sokhranении, izuchenii i ustoychivom ispol'zovanii raznoobraziya rastitel'nogo mira: materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii, posvyashchennoi 85-letiyu Tsentral'nogo botanicheskogo sada NAN Belarusi* = The role of botanical gardens and arboreturns in

the conservation, study and sustainable use of plant diversity: Proceedings of the International Scientific Conference dedicated to the 85th anniversary of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. Part 2. 6–8 June 2017, Minsk. Minsk: Medisont; 2017. P. 209–212. (In Russian)

21. Molkanova OI, Konovalova LN, Stakheeva TS. Formation of an in vitro genetic bank for fruit and berry crops at the GBS RAS. *Plodovodstvo i yagodovodstvo v Rossii*. = Pomiculture and small fruits culture in Russia. 2016;44:197–200. (In Russian)

22. *Conservation of plant genetic resources in vitro: General aspects*. Razdan MK, Cocking EC. (eds.) Enfield, NH: Science Publishers, Inc.; 1997. 314 p.

23. Tefik ASH, Mitrofanova IV. 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) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-3-99-109>

24. Watt MP, Thokoane NL, Mycock D, Blakey F. In vitro storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2000;61(2):161–164.

Критерии авторства

Митрофанова И.В., Иванова Н.Н., Кузьмина Т.Н., Хохлов С.Ю. выполнили экспериментальную работу, на основании полученных результатов провели обобщение и написали рукопись. Митрофанова И.В., Иванова Н.Н., Кузьмина Т.Н., Хохлов С.Ю. имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Митрофанова Ирина Вячеславовна, д.б.н., главный научный сотрудник, заведующая отделом биологии развития растений, биотехнологии и биобезопасности, Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, 298648, г. Ялта, ул. Никитский спуск, 52, Республика Крым, Российская Федерация, ✉e-mail: irimitrofanova@yandex.ru

Contribution

Irina V. Mitrofanova, Natalya N. Ivanova, Tatyana N. Kuzmina, Sergey Yu. Khokhlov carried out the experimental work, on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. Irina V. Mitrofanova, Natalya N. Ivanova, Tatyana N. Kuzmina, Sergey Yu. Khokhlov have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict of 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.

AUTHORS' INDEX

Irina V. Mitrofanova, Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher, Head of Plant Developmental Biology, Biotechnology and Biosafety Department, The Labor Red Banner Order Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS, 52, Nikitskiy spusk, Yalta 298648, The Republic of the Crimea, Russian Federation, ✉e-mail: irimitrofanova@yandex.ru

Иванова Наталия Николаевна,
к.б.н., старший научный сотрудник
лаборатории биотехнологии
и вирусологии растений,
Ордена Трудового Красного Знамени
Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр РАН,
298648, г. Ялта, ул. Никитский спуск, 52,
Республика Крым, Российская Федерация,
e-mail: nnivanova2017@yandex.ru

Кузьмина Татьяна Николаевна,
к.б.н., старший научный сотрудник
лаборатории биохимии, физиологии
и репродуктивной биологии растений,
Ордена Трудового Красного Знамени
Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр РАН,
298648, г. Ялта, ул. Никитский спуск, 52,
Республика Крым, Российская Федерация,
e-mail: tnkuzmina@rambler.ru

Хохлов Сергей Юрьевич,
к.с.-х.н., заведующий лабораторией
южных плодовых
и орехоплодных культур,
Ордена Трудового Красного Знамени
Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр РАН,
298648, г. Ялта, ул. Никитский спуск, 52,
Республика Крым, Российская Федерация,
e-mail: ocean-10@mail.ru

Natalya N. Ivanova,
Cand. Sci. (Biology),
Senior Researcher,
Plant Biotechnology and Virology Laboratory,
The Labor Red Banner Order Nikita Botanical
Gardens – National Scientific Center of the RAS,
52, Nikitskiy spusk, Yalta 298648,
The Republic of the Crimea,
Russian Federation,
e-mail: nnivanova2017@yandex.ru

Tatyana N. Kuzmina,
Cand. Sci. (Biology),
Senior Researcher,
Plant Biochemistry, Physiology
and Reproductive Biology Laboratory,
The Labor Red Banner Order Nikita Botanical
Gardens – National Scientific Center of the RAS,
52, Nikitskiy spusk, Yalta 298648,
The Republic of the Crimea,
Russian Federation,
e-mail: tnkuzmina@rambler.ru

Sergey Yu. Khokhlov,
Cand. Sci. (Agriculture),
Head of South Fruit and Nut Cultures,
The Labor Red Banner Order Nikita Botanical
Gardens – National Scientific Center of the RAS,
52, Nikitskiy spusk, Yalta 298648,
The Republic of the Crimea,
Russian Federation,
e-mail: ocean-10@mail.ru