

EDN UPRRPG

DOI 10.5281/zenodo.12178658

УДК 504.73.57.085.2

Иванова Н. Н., Корзина Н. В., Цюпка В. А., Челомбит С. В.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ СОХРАНЕНИЯ *IN VITRO* НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ГЕНЕТИЧЕСКУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ САДОВЫХ РАСТЕНИЙ

ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный
научный центр РАН»

Реферат. Сохранение *in vitro* является доступным инструментом для защиты биологического разнообразия растений. Одним из наиболее перспективных путей сохранения биоразнообразия растений в настоящее время является создание медленно растущих коллекций *in vitro*. Цель работы – изучение влияния состава среды и температуры на сохранение жизнеспособности и генетической стабильности исследуемых генотипов растений *in vitro* при длительном депонировании. В исследованиях использовали верхушки микропобегов розы садовой сорта Наталья Муравская (*Rosa* sp.), земляники садовой сорта Белый Швед (*Fragaria* × *ananassa* Dushesne), инжира сорта Наиранийший Фиолетовый (*Ficus carica* L.). Экспланты депонировали *in vitro* при температуре 4, 6, 8 и 10 °C на среде ¼ Мурасиге и Скуга, дополненной хлорхлинхлоридом (ССС) в различных концентрациях. На основе анализа полученных данных нами определены оптимальная температура и концентрация СССР в питательной среде и разработаны условия среднесрочного сохранения *in vitro* сортов изучаемых генотипов. Установлено, что введение в состав среды 0,2–0,4 г/л СССР при температуре 6 °C и 8 °C способствовало 97–100 % сохранению эксплантов розы, земляники и инжира в течение 12 месяцев соответственно. В процессе депонирования наблюдали образование листьев, дополнительных побегов и корней. При этом добавление СССР снижало ростовые процессы в сравнении с контролем. После депонирования отделяли верхушки побегов и переносили на среды для размножения в стандартных условиях культивирования. Показано, что после первого субкультивирования 100 % эксплантов регенерировали микропобеги. С помощью ISSR-анализа выявлено, что микропобеги розы садовой после хранения *in vitro* полностью идентичны исходным растениям. Проведенные исследования показали эффективность используемых условий для хранения *in vitro* эксплантов исследуемых генотипов и подтвердили генетическую стабильность растений после 12 месяцев депонирования на примере розы садовой.

Ключевые слова: *Rosa* sp., *Fragaria* × *ananassa* Dushesne, *Ficus carica* L., сохранение *in vitro*, кинетика роста, ретардант, ISSR-анализ.

Для цитирования: Иванова Н. Н., Корзина Н. В., Цюпка В. А., Челомбит С. В. Влияние условий сохранения *in vitro* на жизнеспособность и генетическую стабильность садовых растений // Таврический вестник аграрной науки. 2024. № 2(38). С. 53–66. EDN: UPRRPG. DOI: 10.5281/zenodo.12178658.

For citation: Ivanova N. N., Korzina N. V., Tsyupka V. A., Chelombit S. V. Influence of *in vitro* preservation on viability and genetic stability of garden plants // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2024. No. 2(38). P. 53–66. EDN: UPRRPG. DOI: 10.5281/zenodo.12178658.

Введение

Сохранение генетических ресурсов растений с помощью современных биотехнологий является доступным инструментом для защиты биологического разнообразия растений. В зависимости от требуемой продолжительности хранения используются различные методы сохранения *in vitro*. Одним из наиболее перспективных путей сохранения биоразнообразия растений в настоящее время является создание медленно растущих коллекций *in vitro* [1–7]. Методы длительного сохранения *in vitro* используются для широкого спектра декоративных, плодовых, эфиромасличных, редких исчезающих видов растений и сельскохозяйственных культур. В настоящее время используют коллекции, где хранение растительного материала происходит в стандартных условиях культивирования, и коллекции, где растения находятся в состоянии замедленного роста. Хранение в стандартных условиях происходит на питательных средах, дополненных регуляторами роста, и требует пересадки на свежие среды для микроразмножения и роста растений так как происходит потеря питательных веществ, и это приводит к утрате их жизнеспособности.

Большое влияние на увеличение длительности депонирования оказывают компоненты питательных сред. Обычно концентрация углеводов, минералов, регуляторов роста модифицируется в среде для уменьшения скорости деления клеток, а значит, ограничивает развитие побегов и образование каллуса [8, 9]. Как правило, культуру побегов многих растений сохраняют на среде одного и того же состава (макроэлементы, микроэлементы и витамины), которую используют для пролиферации в стандартных условиях культивирования. Среди сред наиболее часто используются: среда Мурасиге и Скуга (МС) [9], растительная среда Lloyd, McCown (WPM) [10], среда Driver и Kuniyuki (DKW) [11]. Эти среды применяют с полной или пониженной концентрацией их солей. При этом наилучшие результаты получены при наличии в среде регуляторов роста, таких как 6-бензиламинопурина (6-БАП), отдельно или в сочетании с индол-3-масляной кислотой (ИМК), нафтилуксусной кислотой (НУК) или гибберелловой кислотой в различных концентрациях в пределах от 0,05 мг/л до 1,0 мг/л [12]. Для замедления роста микрорастений *in vitro* и сохранения жизнеспособности в среды добавляют органические вещества, обладающие осмотической активностью, такие как маннит, сорбит, дульцит, высокие концентрации сахарозы [13–15]. Так введение в питательную среду 0,45 % маннита или дульцита способствовало сохранению эксплантов земляники при стандартной температуре в течение года [14]. Использование маннита в качестве осмотика увеличивало срок сохранения *Vitis heuflera* в условиях медленного роста по сравнению с сахарозой. Наилучшая выживаемость (47,8 %) была получена в конце 12 месяцев хранения на среде MS с добавлением 10 г/л маннита по сравнению с 40 г/л сахарозы [15].

Эффективным методом снижения скорости роста является хранение культур побегов при низких температурах. При этом происходит снижение метаболической активности, такой как дыхание, потеря воды и производство этилена. Это приводит к снижению кинетики роста растений и поддержанию жизнеспособности [16, 17]. Известно, что оптимальная температура депонирования для декоративных, плодовых, эндемичных видов растений находится в интервале от 2 до 6 °C, а для тропических и субтропических видов – от 8 до 15 °C [17, 18]. При этом часто растения сохраняют при низкой интенсивности света или в полной темноте. Так, 11 видов плодовых растений сохранялись при 4 °C в темноте в течение 12 месяцев с самой высокой выживаемостью (100 %) у *Prunus* spp. [19] и *Fragaria* spp. [20]. Сохранение эксплантов мяты в течение одного года проводили в отсутствии

освещения при температуре 4–6 °C [21]. Культивирование при температуре 7 °C способствовало сохранению растений эндемика Западного Саяна *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) [22].

Наряду с низкой температурой для сохранения растений используют вещества-ретарданты: абсцизовая кислота (АБК), хлорхолинхлорид (ССС), гидразид малеиновой кислоты, жасмоновая кислота и другие. Они являются активными эндогенными ингибиторами роста. Введение их в состав питательной среды останавливает рост культуры *in vitro*, при этом не снижает жизнеспособность микрорастений. Добавление в состав среды 1,0 мг/л жасмоновой кислоты при температуре 3–6 °C позволило сохранить жизнеспособность клоновых подвоев яблонь в течение 48 месяцев [23]. Исследователи описывают результаты длительного депонирования при комплексном использовании пониженной температуры и СССР в питательной среде для хризантемы садовой [24], розы садовой [25], сирени [26], редких и эндемичных видов растений Горного Крыма [27].

Показателем эффективности длительного депонирования растений при низкой температуре и наличии в среде СССР является восстановление ростовых процессов по возвращении растений в стандартные условия культивирования. Так, в ряде публикаций описывается формирование дополнительных побегов, не имеющих морфологических отклонений, при субкультивировании на свежую питательную среду с регуляторами роста после депонирования [12, 14, 17, 21, 26, 27].

Известно, что длительное культивирование тканей и органов на искусственных питательных средах может вызывать соматическую изменчивость [17, 28]. В связи с этим, важным аспектом при использовании биотехнологий культивирования и сохранения растений *in vitro* является проверка генетической стабильности размножаемых и депонируемых хозяйственно ценных генотипов.

Как указывают многие исследователи, генетическая идентификация сортовой и внутрисортовой клональной вариабельности может быть осуществлена поэтапно с использованием нескольких типов молекулярных маркеров [21, 26, 27]. Показано, что различные AFLP, SAMPL, M-AFLP и ISSR маркеры помогают выявлять внутрисортовую генетическую вариабельность и характеризовать клоны с различными морфологическими и фенологическими признаками.

Цель исследований – изучение влияния состава среды и температуры на сохранение жизнеспособности и генетической стабильности изучаемых генотипов растений *in vitro* при длительном депонировании.

Материалы и методы исследований

Исследования выполнены в лаборатории морфогенеза и депонирования растений *in vitro* ФГБУН «НБС-ННЦ» в 2022–2023 гг. по общепринятым в биотехнологии методикам, а также разработанными нами [13, 29]. В биотехнологических исследованиях по сохранению растительного материала использовали микропобеги *in vitro* земляники садовой (*Fragaria × ananassa* Dushesne, Rosaceae) сорт Белый Швед, розы садовой (*Rosa* sp., Rosaceae) сорт Наталья Муравская и инжира (*Ficus carica* L., Moraceae) сорт Наиранный Фиолетовый. В качестве исходных эксплантов служили верхушки побегов длиной 0,5 и 0,8 см, которые помещали на среду для сохранения. При этом выбранные исходные побеги не имели признаков физиологических нарушений, таких как оводнение, некроз верхушки, деграция хлорофилла. На этапе депонирования использовали питательную среду ¼ МС, дополненную сахарозой и СССР (BASF, Германия).

В процессе исследований изучали влияние температуры и концентраций ретарданта в среде на физиологическую стабильность и ростовые процессы

эксплантов при длительном культивировании в условиях пониженной температуры. Для определения значения оптимальной температуры сохранения экспланты помещали на среду $\frac{1}{4}$ МС + 60,0 г/л сахарозы + 0,2 г/ССС и выставляли на 12 месяцев в холодильные камеры LIEBHERR FKvsl 4113 (Австрия) с температурой 4, 6, 8 или 10 °С.

Для изучения влияния концентрации СССР в среде на физиологическую стабильность эксплантов в состав среды $\frac{1}{4}$ МС + 60,0 г/л сахарозы добавляли 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 г/л СССР. Банки с эксплантами помещали в холодильники при оптимальной для каждого вида температуре: роза садовая и земляника садовая – 6 °С, инжир – 8 °С. В течение срока депонирования определяли число жизнеспособных растений, осуществляли оценку общего состояния растений, которая включала состояние листьев и побегов, образование корней, адвентивное побегообразование, изменение окраски питательной среды.

По завершении 12 месяцев депонирования оценивали способность эксплантов к органогенезу при культивировании на питательной среде с регуляторами роста в стандартных условиях. На этапе собственно микроразмножения в качестве эксплантов использовали верхушки микропобегов длиной 1,0 см с почкой (роза и инжир) или укороченный микропобег земляники садовой. Экспланты помещали на среду МС, дополненную 30,0 г/л сахарозы и регуляторами роста: 0,5 мг/л 6-БАП (6-бензиламинопурина) для розы садовой и земляники садовой и 0,75 мг/л для инжира. Экспланты в культуральных сосудах содержали в фитокапсуле при температуре 24 ± 1 °С, 16-часовом фотопериоде и интенсивности освещения $37,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Период культивирования составлял 45 суток. Измеряли длину побегов, количество листьев, корней, количество дополнительных побегов. Все опыты проводили в трехкратной повторности, в каждой из которых было по 10 эксплантов.

Оценку генетической стабильности культивируемого в различных условиях (*ex situ* и *in vitro*) материала розы садовой проводили с использованием пяти ISSR-маркеров (таблица 1).

Таблица 1 – ISSR-праймеры для постановки ПЦР

Название праймеров	Нуклеотидная последовательность	Флуоресцентная метка	Tm, °С	Ссылка на источник
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	R6G	55	Werner et al., 2015
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	FAM	55	
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	TAMRA	55	
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	ROX	55	
UBC 815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	TAMRA	55	

Геномную ДНК выделяли из листьев с применением цетилтриметиламмоний бромида (2×ЦТАБ) с добавлением 2 %-го поливинилпирролидона (ПВП) [30]. Качество и количество полученной ДНК оценивали на спектрофотометре NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия). Амплификацию проводили с применением набора BioMaster HS-Taq PCR (Биолабмикс, Российская Федерация) в соответствии с протоколом производителя на термоциклере C1000™ ThermalCycler (Bio-Rad, Сингапур). Условия реакции были следующими: 1) начальная денатурация ДНК при 95 °С (5 мин); 2) 35 циклов 30 с при 95 °С, 1 мин при 55 °С, 1 мин при 72 °С; 3) окончательная элонгация при 72 °С (5 мин). Амплифицированные фрагменты анализировали с помощью генетического анализатора НАНОФОР 05 (Синтол, Россия), используя размерный стандарт СД-600.

Результаты и их обсуждение

В НБС-ННЦ разработан способ сохранения *in vitro* растений декоративных и плодовых субтропических культур [13], который был взят нами за основу проведения исследований по выявлению влияния температуры сохранения и концентрации ретарданта (ССС) в питательной среде на снижение кинетики роста и сохранение физиологической стабильности эксплантов изучаемых генотипов растений. Полученные данные показали, что в течение 12 месяцев на питательной среде при температурах 4, 6, 8 и 10 °С удалось поддерживать устойчивое жизнеспособное состояние сохраняемых эксплантов при низкой интенсивности ростовых процессов (рисунок 1). Установлены значения оптимальных температур депонирования *in vitro*, при которых в течение 12 месяцев сохранялась физиологическая стабильность эксплантов и снижалась кинетика роста.

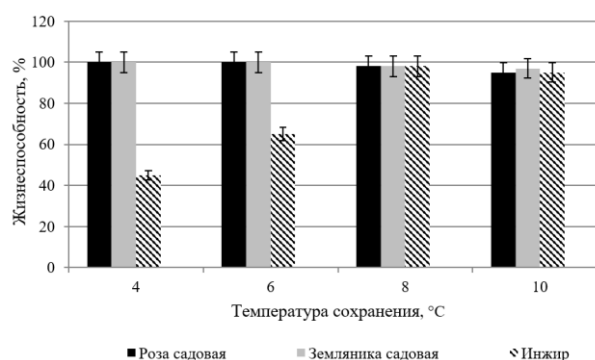


Рисунок 1 – Жизнеспособность эксплантов розы, земляники и инжира после 12 месяцев сохранения в условиях генобанка *in vitro* при температуре 4, 6, 8 и 10 °С

Визуальная оценка эксплантов розы и земляники, культивируемых при температуре 4 и 6 °С показала, что количество жизнеспособных эксплантов на протяжении 12 месяцев составляло 100 %. Средняя длина побега у розы по окончании 12 месяцев депонирования достигала 1,03–1,46 см, среднее количество листьев/побег 1,88–2,63 шт. (таблица 2, рисунок 2). Отмечали образование единичных корней длиной 0,3–0,4 см.

Таблица 2 – Морфометрические показатели эксплантов розы, земляники и инжира после 12 месяцев депонирования при температуре 4, 6, 8 и 10 °С

Т, °С	Среда	Длина побега, см	Количество листьев/побег, шт.	Количество дополнительных побегов/экспл., шт.	Количество корней/побег, шт.
Роза садовая, сорт Наталья Муравская					
4	контроль	1,14 ± 0,03	2,88 ± 0,13	0,88 ± 0,13	1,14 ± 0,03
	0,2 г/л СССР	1,03 ± 0,02	1,88 ± 0,29	0,25 ± 0,25	1,03 ± 0,02
6	контроль	1,55 ± 0,02	3,0 ± 0,0	0	1,55 ± 0,02
	0,2 г/л СССР	1,46 ± 0,04	2,63 ± 0,26	0,5 ± 0,27	1,46 ± 0,04
Земляника садовая, сорт Белый					
4	контроль	0,74 ± 0,01	1,50 ± 0,27	1,38 ± 0,18	3,25 ± 0,25
	0,2 г/л СССР	0,71 ± 0,02	1,25 ± 0,16	0,75 ± 0,31	3,38 ± 0,18
6	контроль	0,98 ± 0,02	2,13 ± 0,13	1,0 ± 0,0	2,63 ± 0,26
	0,2 г/л СССР	0,81 ± 0,01	1,90 ± 0,16	0,50 ± 0,19	3,88 ± 0,29
Инжир, сорт Наиранийший Фиолетовый					
8	контроль	1,10 ± 0,03	0,88 ± 0,13	0,0	0,0
	0,2 г/л СССР	0,92 ± 0,02	0,50 ± 0,19	0,0	0,0
10	контроль	0,95 ± 0,02	1,76 ± 0,30	0,0	0,0
	0,2 г/л СССР	0,91 ± 0,03	1,0 ± 0,19	0,0	0,0

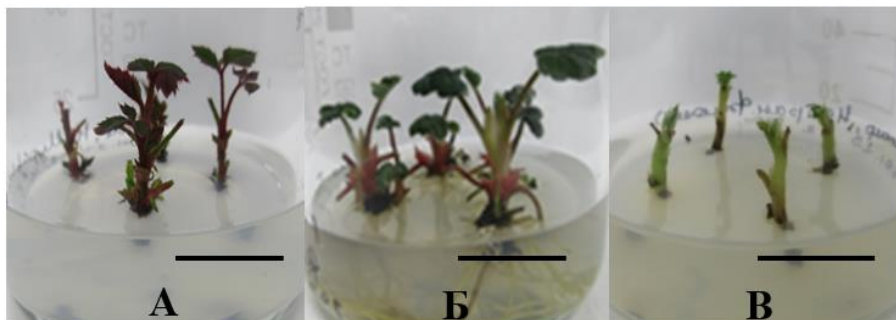


Рисунок 2 – Экспланты растений после 12 месяцев депонирования при различной температуре на среде $\frac{1}{4}$ МС + 60,0 г/л сахарозы + 0,2 г/л ССС

Примечание. А – 4 °С роза садовая, Б – 6 °С земляника садовая, В – 8 °С инжир. Масштаб 1 см.

У эксплантов земляники при температуре 4 и 6 °С также наблюдали незначительный рост побегов (0,73 см и 0,81 см), образование листьев в количестве 1,5–2,13 шт./побег, единичных дополнительных побегов и корней у всех эксплантов (см. таблицу 2, рисунок 2).

Однако, для эксплантов инжира сорта Наиранный Фиолетовый температура 4 °С и 6 °С оказалась неэффективной: отмечали резкое снижение физиологической стабильности. Наблюдали появление на побеге отдельных участков коричневого цвета, некроз тканей и выделение фенолов в питательную среду, что снижало жизнеспособность эксплантов.

Депонирование эксплантов розы и земляники при 8 °С и 10 °С незначительно снижало их жизнеспособность, которая составила 95,23 % и 97,47 % соответственно. При этом у эксплантов розы происходило отмирание и опадение листьев, ухудшение внешнего вида растений. Растения земляники образовывали мелкие листья на коротких черешках, количество корней составляло 5,38–6,38 шт., а их длина достигала 4,0–5,0 см. Наблюдали интенсивное выделение фенолов в среду. Все это способствовало снижению жизнеспособности эксплантов при увеличении времени депонирования и влияло на способность к последующему органогенезу.

Экспланты инжира при температуре 8 °С и 10 °С на протяжении времени депонирования сохраняли зеленую окраску. Жизнеспособность – 95,30 % и 98,40 %. Среднее количество листьев составило 0,50–1,0 шт./побег, корни отсутствовали (см. таблицу 2). Незначительное потемнение среды отмечали при 10 °С. Таким образом по результатам эксперимента были выбраны значения оптимальной температуры для эксплантов розы и земляники 6 °С, и для эксплантов инжира 8 °С.

Известно, что наряду с низкой положительной температурой наличие в среде ретардантов снижает интенсивность ростовых процессов и позволяет значительно увеличить время депонирования растительных объектов и сохранить физиологическую стабильность [24–27]. Экспланты розы, земляники и инжира культивировали в течение 12 месяцев на среде $\frac{1}{4}$ МС + 60,0 г/л сахарозы + 0,2–1,0 г/л ССС при оптимальной температуре сохранения для каждого генотипа: роза и земляника 6 °С; инжир 8 °С.

Установлено, что жизнеспособность эксплантов розы садовой по окончании депонирования *in vitro* составляла 99,13–100 % на всех вариантах питательной среды. Растения имели зеленую окраску. Наибольшее число листьев и единичные корни получены на среде, дополненной 0,4 г/л ССС (таблица 3). С увеличением

концентрации ССС в питательной среде до 0,8 и 1,0 г/л ССС наблюдали замедление роста побега, образование единичных листьев. Побеги оставались зелеными, однако их диаметр увеличился.

Все экспланты земляники также оставались жизнеспособными (97,40 и 100,0 %) на протяжении сохранения на всех вариантах среды. При этом длина побега с увеличением концентрации ССС уменьшалась в среднем с 0,75 до 0,58 см, среднее количество листьев – от 2,25 до 1,25 шт./побег. Образование адвентивных побегов и корней отмечали на всех вариантах питательной среды (см. таблицу 3).

Таблица 3 – Морфометрические показатели эксплантов розы, земляники и инжира после 12 месяцев депонирования на среде ¼ МС, дополненной 0,0–1,0 г/л ССС

Параметр	Концентрация ССС, г/л					
	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Роза садовая сорта Наталья Муравская						
Жизнеспособность, %	100,0	100,0	100,0	99,13 ± 0,44	100,0	100,0
Длина побега, см	1,62 ± 0,02	1,55 ± 0,02	1,55 ± 0,02	1,50 ± 0,03	1,46 ± 0,02	1,42 ± 0,03
Количество листьев/побег, шт.	1,13 ± 0,13	2,75 ± 0,16	1,88 ± 0,35	1,13 ± 0,35	0,25 ± 0,16	0,25 ± 0,16
Количество корней/побег, шт.	0	0	0,25 ± 0,16	0	0	0
Земляника садовая сорта Белый Швед						
Жизнеспособность, %	100,0	100,0	100,0	100,0	97,40 ± 0,31	97,20 ± 0,29
Длина побега, см	0,98 ± 0,02	0,75 ± 0,02	0,73 ± 0,02	0,70 ± 0,02	0,63 ± 0,02	0,58 ± 0,01
Количество листьев/побег, шт.	3,0 ± 0,0	2,25 ± 0,25	2,50 ± 0,26	2,50 ± 0,27	1,75 ± 0,37	1,25 ± 0,26
Количество адвентивных побегов/экспл., шт.	0,75 ± 0,25	0,88 ± 0,13	1,0 ± 0,0	0,50 ± 0,19	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
Количество корней, шт.	5,1 ± 0,19	3,0 ± 0,19	3,63 ± 0,32	3,13 ± 0,13	3,38 ± 0,26	4,0 ± 0,33
Длина корня, см	3,38 ± 0,18	3,75 ± 0,16	3,25 ± 0,16	1,93 ± 0,29	1,03 ± 0,15	0,59 ± 0,03
Инжир сорта Наирнаннейший Фиолетовый						
Жизнеспособность, %	70,0 ± 1,33	97,38 ± 0,82	97,75 ± 0,56	95,75 ± 0,49	99,50 ± 0,33	99,38 ± 0,42
Длина побега, см	1,40 ± 0,03	1,29 ± 0,02	1,25 ± 0,02	1,15 ± 0,02	1,15 ± 0,02	1,16 ± 0,02
Количество листьев/побег, шт.	0,5 ± 0,19	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,75 ± 0,16	0,88 ± 0,13	0,75 ± 0,16

С ростом концентрации ССС уменьшались размеры листа, длина черешка, окраска менялась от темно-зеленой к светло-зеленой. Растения выглядели угнетенными, но при этом сохраняли физиологическую стабильность.

Жизнеспособность эксплантов инжира на протяжении 12 месяцев также оставалась высокой на всех вариантах питательной среды 95,75–99,75 %. Окраска побегов в основном была зеленая, однако наблюдали и участки коричневого цвета. С увеличением концентрации ССС уменьшалась средняя длина микропобегов от 1,40 до 1,0 см (см. таблицу 3). Наличие в среде 0,8–1,0 г/л ССС способствовало минимизации роста, сохранению зеленой окраски эксплантов, отсутствию фенолов в среде. Таким образом, добавление в среду ретарданта способствовало сохранению жизнеспособности эксплантов исследуемых генотипов и увеличивало период беспересадочной культуры.

После 12 месяцев депонирования жизнеспособные микропобеги переносили на питательную среду с регуляторами роста для каждого генотипа и помещали в стандартные условия культивирования для оценки морфогенетического потенциала. Анализ морфометрических параметров проводили после 45 суток культивирования. После первого субкультивирования 100 % эксплантов образовывали дополнительные микропобеги. Они имели насыщенный зеленый цвет, хорошо развитые листья. Однако процесс адвентивного образования замедлялся на 7–10 суток по сравнению со стандартными условиями. Установлена зависимость количества адвентивных побегов от концентрации ССС в среде для сохранения. Так среднее количество адвентивных побегов без морфологических отклонений у розы

садовой 4,0–4,25 шт./побег получено после депонирования на среде $\frac{1}{4}$ МС+60,0 г/л сахарозы + 0,2 и 0,4 г/л ССС соответственно (рисунок 3).

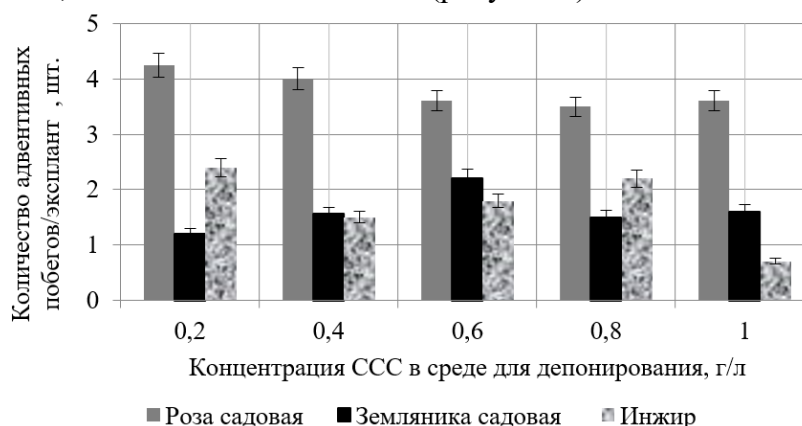


Рисунок 3 – Влияние концентрации ССС в среде при депонировании эксплантов розы, земляники и инжира в течение 12 месяцев на адвентивное побегообразование в стандартных условиях культивирования

Побеги были зеленые, с листьями и черешками нормальной морфологии. Полученные в первом пассаже после сохранения на среде с 0,6; 0,8 и 1,0 г/л ССС микропобеги отличались более светлой окраской мелких листьев на коротких черешках. Для земляники максимальное количество дополнительных побегов (2,0 шт./побег) получено после сохранения на среде, дополненной 0,6 г/л ССС (см. рисунок 3). Однако побеги были оводненными. После депонирования на среде с 0,8 и 1,0 г/л ССС растения в первом пассаже имели разные по форме листья – круглые и рассеченные, темно зеленые и светло зеленые с различной длиной черешков. Побеги инжира также отличались друг от друга в зависимости от концентрации ССС в среде для депонирования. Так, максимальное количество микропобегов без морфологических отклонений получено после депонирования на среде $\frac{1}{4}$ МС, дополненной 0,2 г/л ССС. В остальных вариантах опыта полученные побеги были оводненными с удлинненными междоузлиями.

На основании полученных данных были рекомендованы температура и концентрация ССС в среде для сохранения жизнеспособности при депонировании и последующего размножения в стандартных условиях культивирования. Так, для эксплантов розы садовой сорта Наталья Муравская и земляники садовой сорта Белый Швед оптимальная температура сохранения составила 6 °С, концентрация ССС – 0,2–0,4 г/л; для эксплантов инжира сорта Наиранный Фиолетовый – 8 °С, концентрация ССС – 0,2 г/л.

Основной задачей при выращивании и мультипликации растений *in vitro* является сохранение генотипа исходных образцов. При вегетативном размножении и размножении клона увеличивается количество митотических делений клеток, что может увеличивать накопление мутаций. Это может привести к увеличению уровня генетического разнообразия [17, 28, 31, 32], что в свою очередь может повлечь потерю сортового фенотипа.

В результате анализа, выполненного с пятью маркерами, детектировано от 6 до 14 амплифицированных фрагментов размером от 71 до 735 п.н. Наиболее информативными маркерами оказались UBC 808, UBC 810 и UBC 811. Всего идентифицировано 47 фрагментов для образцов розы сорта Наталья Муравская в каждом из условий культивирования (рисунок 4).

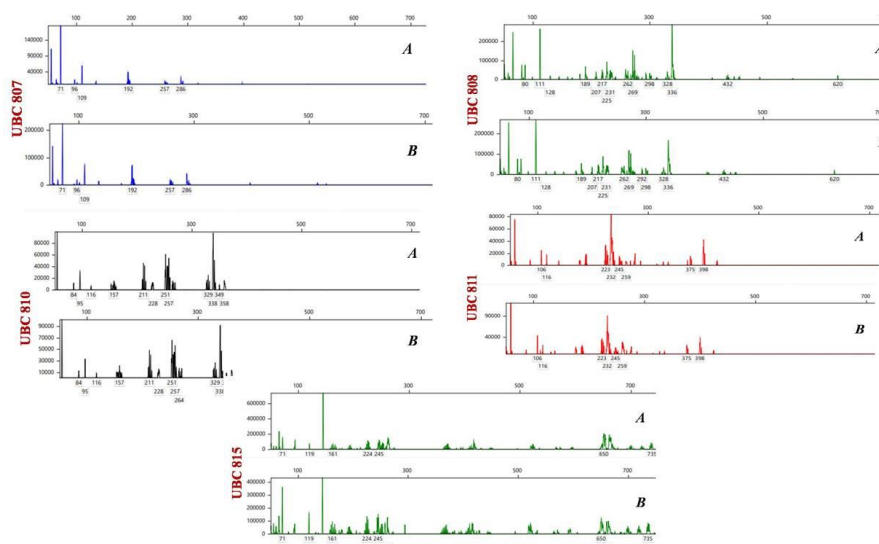


Рисунок 4 – Результаты капиллярного электрофореза розы садовой сорта Наталья Муравская по 5 ISSR маркерам

Примечание. А – образец *ex situ*, В – образец *in vitro*.

При анализе электрофореграмм амплифицированных фрагментов генетических различий между материнскими растениями (*ex situ*) и размножаемыми в культуре *in vitro* не обнаружено. ISSR-профили изученных растений полностью идентичны по количеству и длине ампликонов растениям исходных сортов.

В настоящее время протоколы депонирования представлены для многих видов растений. Комплексное использование низкой температуры и наличие осмотиков и ретардантов в питательной среде позволяют сохранить физиологическую и генетическую стабильность растений [17, 21, 23, 27]. Однако встречаются данные, что применение питательных сред, содержащих высокие концентрации ССС, приводит к физиологическим изменениям, снижает регенерационный потенциал на последующих этапах микроразмножения и может приводить к генетическим нарушениям. Так, повышение концентрации ССС в среде приводило к полному или частичному повреждению эксплантов и дальнейшему снижению регенерационного потенциала двух сортов розы [25]. Наши исследования подтвердили влияние концентрации ССС в среде на качество полученных растений после первого субкультивирования на среде с регуляторами роста. После 12 месяцев сохранения все экспланты в первом пассаже образовывали адвентивные микропобеги. Однако у побегов исследуемых культур, депонируемых на среде с 0,6; 0,8 и 1,0 г/л ССС, отмечали наличие удлинения междоузлий, пожелтение листьев, уменьшение диаметра побегов, изменение формы листа. Для снижения возникновения негативных последствий при последующем после длительного депонирования клональном микроразмножении рекомендовано использование низких (0,2–0,4 г/л) концентраций ССС.

Выводы

Установлено, что растения розы садовой, земляники садовой и инжира изучаемых сортов можно сохранять в течение 12 месяцев при температуре 6 и 8 °С на среде ¼ МС, дополненной 0,2 и 0,4 г/л ССС. Жизнеспособность эксплантов по окончании депонирования составила 97–100 %. После первого субкультивирования 100 % эксплантов сохранили способность к адвентивному побегообразованию на средах с регуляторами роста в стандартных условиях культивирования. Полученные

микророботы не имели морфологических отклонений после депонирования при используемых нами температуре и концентрации ССС в среде.

Данные проведенного ISSR-анализа свидетельствуют о сохранении генетической стабильности после 12 месяцев депонирования (на примере розы садовой сорта Наталья Муравская) и о возможности использования приведенного способа для сохранения и последующего размножения растений.

Литература

1. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2011. No. 47. P. 5–16. DOI: 10.1007/s11627-010-9327-2.
2. Bettoni J. C., Wang M.-R., Wang Q.-C. *In vitro* regeneration, micropropagation and germplasm conservation of horticultural plants // *Horticulturae*. 2024. Vol. 10. Art. No. 45. DOI: 10.3390/horticulturae10010045.
3. Ruta C., Lambardi M., Ozudogru E. Biobanking of vegetable genetic resources by *in vitro* conservation and cryopreservation // *Biodiversity and Conservation*. 2020. Vol. 29. P. 3495–3532. DOI: 10.1007/s10531-020-02051-0.
4. Cruz-Cruz C.A., Gonzalez-Arnan M.T., Engelmann F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity // *Resources*. 2013. No. 2. P. 73–95. DOI: 10.3390/resources2020073.
5. Kulak V., Longboat S., Brunet N.D., Shukla M., Saxena P. *In vitro* technology in plant conservation: relevance to biocultural diversity // *Plants*. 2022. Vol. 11. Art. No. 503. DOI: 10.3390/plants11040503.
6. 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. Art. No. 1634. DOI: 10.3390/plants9121634.
7. Plant biotechnology: principles and applications // Ed. by Abidin M. Z., Kiran U., Kamaluddin, Ali A. Singapore: Springer Nature, 2017. 392 p. DOI: 10.1007/978-981-10-2961-5.
8. Lambardi M., Ozudogru E. A. Advances in the safe storage of micropropagated woody plants at low temperature // *Acta Hort.* 2013. Vol. 988. P. 29–42. DOI: 10.17660/ActaHortic.2013.988.2.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. No. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
10. Lloyd G., McCown B. H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // *Combined Proceedings, International Plant Propagator's Society*. 1980. Vol. 30. P. 421–427.
11. Driver J. A., Kuniyuki A. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock // *HortScience*. 1984. Vol. 19. P. 507–550. DOI: 10.21273/HORTSCI.19.4.507.
12. Дорошенко Н. П. Пузырнова В. Г. Способ создания коллекции генофонда винограда *in vitro* // *Международный научно-исследовательский журнал*. 2022. Вып. 5(119). С. 44–50. DOI: 10.23670/IRJ.2022.119.5.007.
13. Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур: коллективная монография // Под общ. ред. Митрофановой И. В. Симферополь: Ариал, 2018. 260 с. DOI: 10.32514/978-5-907118-87-4.
14. Князева И. В., Сорокопудов В. Н., Сорокопудова О. А. Комплексная оценка влияния питательной среды и температуры на сохранение земляники садовой *in vitro* // *Вестник КрасГАУ*. 2020. № 7. С. 47–55. DOI: 10.36718/1819-4036-2020-7-47-55.
15. Pan X. J., Zhang W. E., Li X. *In vitro* conservation of native Chinese wild grape (*Vitis heyneana* Roem. & Schult.) by slow growth culture // *Vitis*. 2014. Vol. 53 (4). P. 207–214.
16. Rajasekharan P. E., Sahijram L. *In vitro* conservation of plant germplasm // In book: *Plant Biology and Biotechnology. Volume II: Plant Genomics and Biotechnology* / Ed. by Bahadur B., Venkat Rajam M., Sahijram L., Krishnamurthy K. V. New Delhi: Springer, 2015. P. 417–443. DOI: 10.1007/978-81-322-2283-5_22.
17. Benelli C., Tarraf W., Izgu T., De Carlo A. *In vitro* conservation through slow growth storage technique of fruit species: an overview of the last 10 years // *Plants*. 2022. Vol. 11 (23). Art. No. 3188. DOI: 10.3390/plants11233188.
18. Lambardi M., De Carlo A. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. // In book: *Micropropagation of Woody Trees and Fruits* / Ed. by Jain S. M., Ishii K. Dordrecht: Springer, 2003. P. 815–840. DOI: 10.1007/978-94-010-0125-0_28.
19. Gianni S., Sottile F. *In vitro* storage of plum germplasm by slow growth // *Hortic. Sci.* 2015. Vol. 42. P. 61–69. DOI: 10.17221/186/2014-HORTSCI.

20. Lukoševičiute V., Rugienius R. Staniene G., Blažyte A., Gelvonauskienė D., Bendokas V., Gelvonauskis B., Sasnauskas A., Stanys V., Bobinas Č. Low temperature storage of *Fragaria sp.* and *Pyrus sp.* genetic resources *in vitro* // *Zemdirbyste*. 2012. Vol. 99. P. 125–130.
21. 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. № 1. С. 64–75. DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-1-64-75.
22. Мурасева Д. С., Звягина Н. С., Новикова Т. И., Дорогина О. В. Сохранение эндемика Западного Саяна *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) в коллекции *in vitro* // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017. Т. 21. № 5. С. 554–560. DOI: 10.18699/VJ17.272.
23. Бьядовский И. А. Влияние жасмоновой кислоты и пониженной температуры на возможность длительного хранения клоновых подвоев яблони в культуре *in vitro* // *Садоводство и виноградарство*. 2018. Т. 5. С. 30–37. DOI: 10.31676/0235-2591-2018-5-30-37.
24. 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. № 4. С. 483–493. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-483-493.
25. Соболева Е. В. Особенности депонирования представителей рода *Rosa L.* в культуре *in vitro* // *Международный журнал прикладных наук и технологий «Integral»*. 2021. № 4. DOI: 10.24412/2658-3569-2021-10069. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-deponirovaniya-predstaviteley-roda-rosa-l-v-kulture-in-vitro> (дата обращения 22.04.2024).
26. Молканова О. И., Королева О. В., Крахмалева И. Л. Концепция формирования коллекции представителей рода *Syringa L.* в культуре *in vitro* // *Достижения науки и техники АПК*. 2020. Т. 34. № 9. С. 30–34. DOI: 10.24411/0235-2451-2020-10906.
27. 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. Vol. 25 (1). P. 24–30. DOI: 10.14258/turczaninowia.25.1.3.
28. Рябушкина Н. А. Клональная и микроклональная изменчивость растений // *Биотехнология. Теория и практика*. 2014. № 2. С. 17–27. DOI: 10.11134/btp.2.2014.3.
29. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
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. Werner E. T., Soares T. C. B., Gontijo A. B. P. L., Souza Neto J. D., do Amaral J. A. T. Genetic stability of micropropagated plants of *Crambe abyssinica* Hochst using ISSR markers // *Genet. Mol. Res.* 2015. Vol. 14 (4). P. 16450–16460. DOI: 10.4238/2015.December.9.16.
32. Божидар Т. Н., Волосевич Н. Н., Кухарчик Н. В. Анализ генетической стабильности растений голубики сорта Duke, полученных в культуре *in vitro* // *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук*. 2015. Т. 2. С. 60–63.

References

1. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2011. No. 47. P. 5–16. DOI: 10.1007/s11627-010-9327-2.
2. Bettoni J. C., Wang M.-R., Wang Q.-C. *In vitro* regeneration, micropropagation and germplasm conservation of horticultural plants // *Horticulturae*. 2024. Vol. 10. Art. No. 45. DOI: 10.3390/horticulturae10010045.
3. Ruta C., Lambardi M., Ozudogru E. Biobanking of vegetable genetic resources by *in vitro* conservation and cryopreservation // *Biodiversity and Conservation*. 2020. Vol. 29. P. 3495–3532. DOI: 10.1007/s10531-020-02051-0.
4. Cruz-Cruz C.A., Gonzalez-Arno M.T., Engelmann F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity // *Resources*. 2013. No. 2. P. 73–95. DOI: 10.3390/resources2020073.
5. Kulak V., Longboat S., Brunet N.D., Shukla M., Saxena P. *In vitro* technology in plant conservation: relevance to biocultural diversity // *Plants*. 2022. Vol. 11. Art. No. 503. DOI: 10.3390/plants11040503.
6. 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. Art. No. 1634. DOI: 10.3390/plants9121634.
7. Plant biotechnology: principles and applications // Ed. by Abidin M. Z., Kiran U., Kamaluddin, Ali A. Singapore: Springer Nature, 2017. 392 p. DOI: 10.1007/978-981-10-2961-5.

8. Lambardi M., Ozudogru E. A. Advances in the safe storage of micropropagated woody plants at low temperature // *Acta Hort.* 2013. Vol. 988. P. 29–42. DOI: 10.17660/ActaHortic.2013.988.2.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. No. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
10. Lloyd G., McCown B. H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // Combined Proceedings, International Plant Propagator's Society. 1980. Vol. 30. P. 421–427.
11. Driver J. A., Kuniyuki A. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock // *HortScience*. 1984. Vol. 19. P. 507–550. DOI: 10.21273/HORTSCI.19.4.507.
12. Doroshenko N. P., Puzyrnova V. G. Method for creating grape gene pool collection *in vitro* // *Mezhdunarodnyj nauchno-issledovatel'skiy zhurnal* (International Research Journal). 2022. No. 5 (119). P. 44–50. DOI: 10.23670/IRJ.2022.119.5.007.
13. Fundamentals of *in vitro* genebank creation of species, cultivars and forms in ornamental, aromatic and fruit crops // Ed. by Mitrofanova I. V. Simferopol: Arial, 2018. 260 p. DOI: 10.32514/978-5-907118-87-4.
14. Knyazeva I. V., Sorokopudova O. A., Sorokopudov V. N. Integrated assessment of the influence of nutrient environment and the temperature on the conservation of garden strawberry *in vitro* // *Bulletin of KSAU*. 2020. Vol. 7. P. 47–55. DOI: 10.36718/1819-4036-2020-7-47-55.
15. Pan X. J., Zhang W. E., Li X. *In vitro* conservation of native Chinese wild grape (*Vitis heyneana* Roem. & Schult) by slow growth culture // *Vitis*. 2014. Vol. 53 (4). P. 207–214.
16. Rajasekharan P. E., Sahijram L. *In vitro* conservation of plant germplasm // In book: *Plant Biology and Biotechnology. Volume II: Plant Genomics and Biotechnology* / Ed. by Bahadur B., Venkat Rajam M., Sahijram L., Krishnamurthy K. V. New Delhi: Springer, 2015. P. 417–443. DOI: [10.1007/978-81-322-2283-5_22](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_22).
17. Benelli C., Tarraf W., Izgu T., De Carlo A. *In vitro* conservation through slow growth storage technique of fruit species: an overview of the last 10 years // *Plants*. 2022. Vol. 11 (23). Art. No. 3188. DOI: 10.3390/plants11233188.
18. Lambardi M., De Carlo A. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. // In book: *Micropropagation of Woody Trees and Fruits* / Ed. by Jain S. M., Ishii K. Dordrecht: Springer, 2003. P. 815–840. DOI: 10.1007/978-94-010-0125-0_28.
19. Gianni S., Sottile F. *In vitro* storage of plum germplasm by slow growth // *Hortic. Sci.* 2015. Vol. 42. P. 61–69. DOI: 10.17221/186/2014-HORTSCI.
20. Lukoševičiute V., Rugienius R. Staniene G., Blažyte A., Gelvonauskienė D., Bendokas V., Gelvonauskis B., Sasnauskas A., Stanys V., Bobinas Č. Low temperature storage of *Fragaria sp.* and *Pyrus sp.* genetic resources *in vitro* // *Zemdirbyste*. 2012. Vol. 99. P. 125–130.
21. 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 // *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022. Vol. 12(1). P. 64–75. DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-1-64-75.
22. Muraseva D. S., Zvyagina N. S., Novikova T. I., Dorogina O. V. Conservation of the West Sayan endemic *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) in *in vitro* collection // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017. Vol. 21(5). P. 554–560. DOI: 10.18699/VJ17.272.
23. Bjadovski I. A. Effect of jasmonic acid and reduced temperature on the possibility of long-term storage of apple clonal rootstocks *in vitro* // *Horticulture and viticulture*. 2018. Vol. 5. P. 30–37. DOI: 10.31676/0235-2591-2018-5-30-37.
24. 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 // *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023. Vol. 13 (4). P. 483–493. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-483-493.
25. Soboleva E. V. Features of depositing representatives of the genus *Rosa* L. under *in vitro* conditions // *International Journal of Applied Sciences and Technologies «Integral»*. 2021. No. 4. DOI: 10.24412/2658-3569-2021-10069. [Electronic resource]. Access point: <https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-deponirovaniya-predstaviteley-roda-rosa-l-v-kulture-in-vitro> (reference's date 22.04.2024).
26. Molkanova O. I., Koroleva O. V., Krakhmaleva I. L. The concept of forming a collection of representatives of the genus *Syringa* L. in *in vitro* culture // *Achievements of Science and Technology of AIC*. 2020. Vol. 34 (9). P. 30–40. DOI: 10.24411/0235-2451-2020-10906.
27. 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. Vol. 25 (1). P. 24–30. DOI: 10.14258/turczaninowia.25.1.3.

28. Ryabushkina N. A. Clonality and somaclonal variations in plants // Biotechnology. Theory and practice. 2014. Vol. 2. P. 17–27. DOI: 10.11134/btp.2.2014.3.
29. Butenko R. G. Biology of higher plant cells *in vitro* and biotechnology based on them. Moscow: FBK-PRESS, 1999. 160 p.
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. Werner E. T., Soares T. C. B., Gontijo A. B. P. L., Souza Neto J. D., do Amaral J. A. T. Genetic stability of micropropagated plants of *Crambe abyssinica* Hochst using ISSR markers // Genet. Mol. Res. 2015. Vol. 14 (4). P. 16450–16460. DOI: 10.4238/2015.December.9.16.
32. Bozhydai T. N., Volosevich N. N., Kukharchik N. V. Analysis of the genetic stability of *in vitro* propagated blueberry (cv. Duke) // Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian Series (Vesci Nacyânal'naj akademii navuk Belarusi. Seryâ agrarnyh navuk). 2015. Vol. 2. P. 60–63.

UDC 504.73.57.085.2

Ivanova N. N., Korzina N. V., Tsyupka V. A., Chelombit S. V.

INFLUENCE OF *IN VITRO* PRESERVATION ON VIABILITY AND GENETIC STABILITY OF GARDEN PLANTS

Summary. *In vitro* preservation is an affordable tool for protecting plant biological diversity. Nowadays, various methods of *in vitro* preservation are used. Currently, one of the most promising ways to preserve plant biodiversity is the creation of slow-growing *in vitro* collections. The aim of our work was to study the influence of the cultural medium composition and temperature on the preservation of viability and genetic stability of the researched plant genotypes *in vitro* during long-term deposition. In the research, microshoot tips of garden rose cv. 'Natalia Muravskaya' (*Rosa* sp.), garden strawberry cv. 'Bely Shved' (*Fragaria* × *ananassa Dushesne*), and fig cv. 'Nayranneishy Fioletovy' (*Ficus carica* L.) were used. Explants were deposited *in vitro* at temperatures of 4, 6, 8 and 10° C on ¼ Murashige and Skoog medium supplemented with chlorocholin chloride (CCC) in various concentrations. Based on the analysis of the data obtained, we determined the optimal temperature and concentration of CCC in the culture medium and developed conditions for medium-term *in vitro* preservation of the cultivars of the studied genotypes. It was found that the addition of 0.2–0.4 g/L of CCC into the medium at a temperature of 6°C and 8°C contributed to 97–100 % preservation of explants of roses, strawberries and figs for 12 months, respectively. During preservation, the development of leaves, adventitious shoots and roots was observed. At the same time, the addition of CCC reduced growth processes in comparison with the control. After deposition, the microshoot tips were separated and transferred to culture media under standard cultivation conditions. It was shown that after the first subcultivation, 100 % of explants regenerated microshoots. Using ISSR analysis, it was revealed that garden rose microshoots after *in vitro* storage are completely identical to the original plants. The conducted studies have shown the effectiveness of the conditions used for *in vitro* storage of explants of the studied genotypes and confirmed the genetic stability of plants after 12 months of deposition using the example of garden rose.

Keywords: *Rosa* sp., *Fragaria* × *ananassa Dushesne*, *Ficus carica* L., *in vitro* preservation, growth kinetics, retardant, ISSR analysis.

Иванова Наталия Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории морфогенеза и депонирования растений *in vitro*, «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН»; 298648 Россия, Республика Крым, Ялта, Никита, Никитский спуск, 52; e-mail: npivanova2017@yandex.ru.

Корзина Наталья Васильевна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией морфогенеза и депонирования растений *in vitro*, «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский

ботанический сад – Национальный научный центр РАН»; 298648 Россия, Республика Крым, Ялта, Никита, Никитский спуск, 52; e-mail: natali.korz@yandex.ru.

Цюпка Валентина Анатольевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории геномики растения и биоинформатики, «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН»; 298648 Россия, Республика Крым, Ялта, Никита, Никитский спуск, 52; e-mail: valentina.brailko@yandex.ru.

Челомбит Светлана Викторовна, младший научный сотрудник лаборатории морфогенеза и депонирования растений *in vitro*, «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН»; 298648 Россия, Республика Крым, Ялта, Никита, Никитский спуск, 52; e-mail: chelombit@inbox.ru.

Ivanova Natalia Nikolaevna, Cand. Sc. (Biol.), senior researcher of the Laboratory of morphogenesis and deposition of plants *in vitro*, Federal State Funded Institution of Science “The Labor Red Banner Order Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”; 52, Nikitsky Spusk, Nikita, Yalta, 298648, Republic of Crimea, Russia; e-mail: nnivanova2017@yandex.ru.

Korzina Natalia Vasilievna, Cand. Sc. (Biol.), head of the Laboratory of morphogenesis and deposition of plants *in vitro*, Federal State Funded Institution of Science “The Labor Red Banner Order Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”; 52, Nikitsky Spusk, Nikita, Yalta, 298648, Republic of Crimea, Russia; e-mail: natali.korz@yandex.ru

TsyupkaValentima Anatolievna, Cand. Sc. (Biol.), senior researcher of the Laboratory of plant genomics and bioinformatics, Federal State Funded Institution of Science “The Labor Red Banner Order Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”; 52, Nikitsky Spusk, Nikita, Yalta, 298648, Republic of Crimea, Russia; e-mail: valentina.brailko@yandex.ru.

Chelombit Svetlana Viktorovna, junior researcher of the Laboratory of morphogenesis and deposition of plants *in vitro*, Federal State Funded Institution of Science “The Labor Red Banner Order Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”; 52, Nikitsky Spusk, Nikita, Yalta, 298648, Republic of Crimea, Russia; e-mail: chelombit@inbox.ru.

Исследования выполнены в рамках госзадания Министерства образования и науки Российской Федерации FNNS-2022-0002 «Изучить биотехнологические особенности регенерации плодовых, декоративных, эфиромасличных культур и эндемичных растений с целью сохранения, выделения и получения перспективных сортов и форм. Разработать методологические подходы молекулярно-генетических исследований растений на основе singl-cell технологий» на оборудовании уникальной научной установки «Научный центр биотехнологии, геномики и депонирования растений» («ФИТОБИОГЕН»).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

Дата поступления в редакцию – 10.05.2024.

Дата принятия к печати – 23.05.2024.