

УДК 634.25:57.085.2

ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБА БЕСПЕРЕСАДОЧНОГО СОХРАНЕНИЯ *IN VITRO* МИКРОПОБЕГОВ ДВУХ СОРТОВ ПЕРСИКА

Наталия Николаевна Иванова, Татьяна Николаевна Кузьмина,
Наталья Васильевна Корзина

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН,
298648, Республика Крым, м.о. город-курорт Ялта,
тер. Никитский ботанический сад, здание 1, строение 1
E-mail: nnivanova2017@yandex.ru

Для сохранения *in vitro* ценных сортов персика эффективно культивирование растений при низких положительных температурах. Целью данного исследования было изучение влияния концентраций хлорхолинхлорида (ССС) добавляемого в питательную среду для длительного культивирования на жизнеспособность, физиологические и морфо-анатомические показатели микропобегов персика сортов Bailey и NemaGuard для последующей оптимизации условий длительного беспересадочного сохранения *in vitro* при пониженной положительной температуре. Верхушки микропобегов *in vitro* без листьев помещали на среду 1/4 Мурасиге – Скуга + 60,0 г/л сахарозы и 0,2–1,0 г/л СССР. Экспланты помещали в холодильные камеры при температуре 6°C. Жизнеспособность эксплантов по окончании 12 месяцев сохранения составила 89–99%. В целом вегетативные структуры у исследуемых сортов при депонировании и при субкультивировании характеризуются нормальным анатомическим строением. У растений в условиях депонирования было выявлено изменение толщины листовой пластинки, как за счет толщины эпидермы, так и мезофилла, при этом изменялась и плотность паренхимной ткани. Коэффициент палисадности существенно не изменялся. Хранившиеся микропобеги 2 сортов персика не имели дефектов развития и признаков оводнения или некроза и сразу же восстановили свой потенциал к пролиферации во время культивирования на среде Мурасиге – Скуга с 0,75 мг/л 6-БАП после депонирования. Наибольший процент отрастания (100%) получен у эксплантов, сохранявшихся на среде, дополненной 0,2–0,4 г/л СССР. Полученные результаты предполагают возможность увеличения времени сохранения эксплантов персика изучаемых сортов при пониженной положительной температуре.

Ключевые слова: *Prunus persica* (L.) Batsch.; эксплант; морфометрические параметры; депонирование *in vitro*; коэффициент палисадности

Введение

Традиционные методы сохранения растений включают содержание их в полевых условиях и контролируемых условиях ботанических садов и питомников (*ex situ*), а также генобанков *in vitro* (Engelmann, 2013; Bettoni et al., 2024; Gowthami et al., 2025). Основным препятствием сохранения *in situ* является наличие больших площадей, риск повреждения биотическими и абиотическими факторами среды. Применение методов биотехнологии позволяет избежать этих негативных факторов. Протоколы медленного роста *in vitro* широко используются в качестве резервных копий полевых коллекций для безопасного сохранения ценных видов. Сегменты и верхушки побегов *in vitro* используются в качестве источников эксплантов, которые могут быть среднесрочно законсервированы в соответствующих условиях. Обычно такие условия включают пониженное освещение и более низкие температуры (Иванова и др. 2023; 2024; Егорова и др., 2023). Также в среды часто добавляют вещества ингибиторы для снижения роста и повышения устойчивости побегов к низким температурам. Все это увеличивает временной интервал между субкультурами.

Успех использования способа сохранения зависит от длительности воздействия ингибирующего фактора до момента, когда он начнет негативно влиять на экспланты и от того как быстро могут быть восстановлены функции развития регенерантов после переноса в стандартные условия культивирования. Существующие способы

низкотемпературного хранения позволяют в плодоводстве сохранять ценные сорта растений в период низкого спроса на посадочный материал и быстро размножить их в случае необходимости.

В Никитском ботаническом саду ранее были разработаны приемы сохранения ряда видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур (Основы создания генобанка..., 2018). Результаты исследований показали, что единый протокол сохранения не всегда возможно применить ко всем видам растений и что существующие подходы часто требуют адаптации для различных сортов в пределах одного вида растений.

Культивирование растений в течение продолжительного время при низких температурах может вызывать физиологические изменения, которые выражаются в снижении интенсивности дыхания, обезвоживании клеток с последующим увяданием растений. Морфоструктурная и физиологическая трансформация вегетативных органов возможна при добавлении в питательную среду регуляторов роста (Bidabadi, Jain, 2020). Добавление в питательную среду ингибиторов роста оказывает воздействие на морфологию органов и способно индуцировать соматоклональные трансформации (Kumar, 1994). Морфофизиологические модификация являются адаптационными механизмами, формирующимися в условиях культуры *in vitro*. Однако, в некоторых случаях, они затрудняют процесс адаптации *in vivo* (Isah, 2015). Сопоставление морфо-анатомических признаков вегетативных структур позволяет выявить характер их изменения при различных условиях (Иванова и др., 2023; Manokari et al., 2021; Okello et al., 2021; Mani et al., 2023), что важно при выборе оптимальных условий их культивирования для получения растительного материала способного к успешной адаптации.

Целью данного исследования изучение влияния хлорхолинхлорида (ССС) в составе питательной среды на жизнеспособность, физиологические и морфо-анатомические показатели микропобегов двух сортов *Prunus persica* в процессе среднесрочного депонирования *in vitro*.

Объекты и методы исследования

Исследования выполнены в лаборатории морфогенеза и депонирования растений *in vitro* ФГБУН «НБС-ННЦ». Объектом для исследований служили микропобеги персика сортов Bailey и Nemaguard из коллекции *in vitro*.

В работе применяли общепринятые в биотехнологии методы исследований и разработанные нами (Бутенко, Основы создания генобанка..., 2018; Иванова и др., 2024). Экспланты (верхушки побегов без листьев длиной 1,0 см) сохраняли на питательной среде $\frac{1}{4}$ МС Murashige, Skoog 1962), которую дополняли 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0 г/ СССР. Среда содержала 60,0 г/л сахарозы. Контролем служила среда без СССР. рН среды доводили до 5,7 перед добавлением 9,0 г/л агара и автоклавировали при температуре 120 °С в течение 15 минут. Культуральные сосуды с эксплантами помещали на 12 месяцев в холодильные камеры с температурой $6 \pm 1^\circ\text{C}$, освещенностью $1,5 \text{ мкМ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$. В конце эксперимента определяли жизнеспособность, среднюю длину микропобегов и среднее число листьев/побег. После периода сохранения экспланты переносили в стандартные условия культивирования на среду МС, дополненную 0,75 мг/л 6-БАП, 0,025 мг/л ИМК и 0,1 мг/л ГК (Лесникова и др., 2007) для оценки эффективности сохранения и мониторинга их потенциала повторного роста. По окончании культивирования учитывали количество образовавшихся адвентивных побегов.

Для морфо-анатомической характеристики вегетативных органов растений контрольного варианта, а также микропобегов после депонирования на среде $\frac{1}{4}$ МС +

0,2 г/л CCC и первом субкультивировании брали листья и сегменты стебля из его срединной части. Срезы листовых пластинок получены из нативного материала с помощью замораживающего микротомы МЗ-2 (Точмедприбор). Для получения поперечных срезов стеблей и центральной жилки листа готовили постоянные препараты. Материал фиксировали в фиксаторе в F.A.A (formalin: acetic acid: alcohol 70 %) (Россия). Для обезвоживания материала использовали несколько смен изопропилового спирта, после чего его переводили в парафин. Инфильтрация растительного материала парафином проходила в течение суток. Срезы толщиной 10 μm делали на ротационном микротоме RMD-3000 (Россия). В качестве красителей использовали гематоксилин и алциановый синий. Анализ гистологических препаратов проводили с помощью микроскопа BX63 (Olympus, Япония) и подключенной к нему фотокамерой DP74 (Olympus, Япония). Морфометрические измерения были проведены в программном приложении cellSens Dimension 1.17 (Olympus, Япония).

Коэффициент палисадности определяли как отношение толщины столбчатой паренхимы к общей толщине мезофилла, выраженное в процентах. Для каждого варианта было проведено по 30 измерений.

Каждый эксперимент повторяли трижды и в каждой повторности культивировали 10 эксплантов. Обработку полученных данных выполняли с использованием методов дескриптивной статистики и программы STATISTICA for Windows 10.0 (StatSoft, Inc.). Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Результаты и их обсуждение

Культура *in vitro* в условиях замедленного роста считается наиболее эффективным способом длительного сохранения растительных объектов, так как при этом не происходит снижения или потери морфогенетического потенциала культуры, а также повышения вероятности генетических изменений при длительном субкультивировании (Bettoni et al., 2024). Проведенный мониторинг состояния эксплантов исследуемых сортов персика показал, что они оставались зелеными и жизнеспособными на протяжении всех 12 месяцев сохранения на всех вариантах среды $\frac{1}{4}$ МС (рис. 1). По окончании срока сохранения анализировали динамику морфометрических параметров депонируемых растений после 12 месяцев (табл. 1).

Жизнеспособность эксплантов составила 89-99 %. Длина побега и количество листьев незначительно отличались в зависимости от сорта (табл. 1, рис. 1).

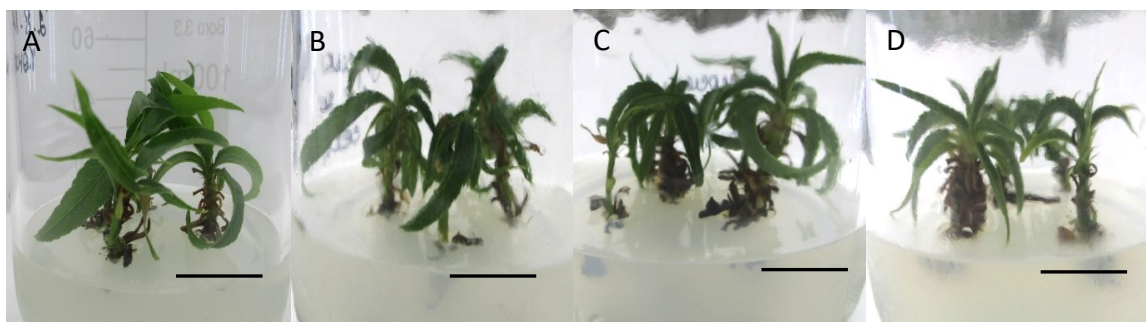


Рис. 1 Экспланты персика сорт NemaGuard после сохранения 12 месяцев на питательной среде $\frac{1}{4}$ МС с различными концентрациями CCC: А – 0,0 г/л; В – 0,4 г/л; С – 0,6 г/л и D – 0,8 г/л. Масштаб 1 см

Fig. 1 NemaGuard peach explants after 12 months of storage on $\frac{1}{4}$ MS culture medium with different CCC concentrations: A – 0.0 g/l; B – 0.4 g/l; C – 0.6 g/l; D – 0.8 g/l. Scale bar 1 cm

Таблица 1

Морфометрические показатели побегов персика после 12 месяцев сохранения на питательной среде ¼ МС с различными концентрациями CCC

Table 1

Morphometric parameters of peach shoots after 12 months of storage on ¼ MS culture medium with different CCC concentrations

Параметры / Parameters	Концентрация CCC, г/л / CCC concentration, g/l					
	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
сорт Bailey / Bailey cultivar						
длина побега, см/ shoot length, cm	1,27 ± 0,02	1,27 ± 0,04	1,37 ± 0,02	1,32 ± 0,03	1,28 ± 0,03	1,35 ± 0,02
количество листьев, шт./ amount of leaves	2,5 ± 0,28	3,0 ± 0,81	4,0 ± 0,57	4,20 ± 0,48	2,80 ± 0,37	3,25 ± 0,47
количество корней, шт./ amount of roots	0	0	0	0	0	04 0.4
жизнеспособ- ность, % /viability, %	89,0 ± 0,70	99,0 ± 0,63	99,0 ± 0,44	97,0 ± 0,63	95,7 ± 0,67	94,8 ± 0,58
сорт Nemaguard / Nemaguard cultivar						
длина побега, см/ shoot length, cm	1,73 ± 0,02	1,77 ± 0,02	1,57 ± 0,02	1,60 ± 0,02	1,40 ± 0,03	1,32 ± 0,02
количество листьев, шт. /amount of leaves	5,0 ± 0,52	5,25 ± 0,25	5,0 ± 0,36	5,5 ± 0,28	5,0 ± 0,81	3,25 ± 0,69
количество корней, шт. /amount of roots	0	0	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,24	0	0
жизнеспособ- ность, % /viability, %	98,2 ± 0,91	100 ± 0,0	100 ± 0,0	98,0 ± 0,63	95,0 ± 0,54	95,0 ± 0,54

Наблюдали гибель листьев в основании побега, однако это не оказало отрицательного влияния на восстановление побегов после депонирования. Хранившиеся микропобеги двух сортов персика были хорошего качества, без признаков оводнения или некроза, и сразу же восстановили свой потенциал пролиферации во время культивирования после депонирования (рис. 2).

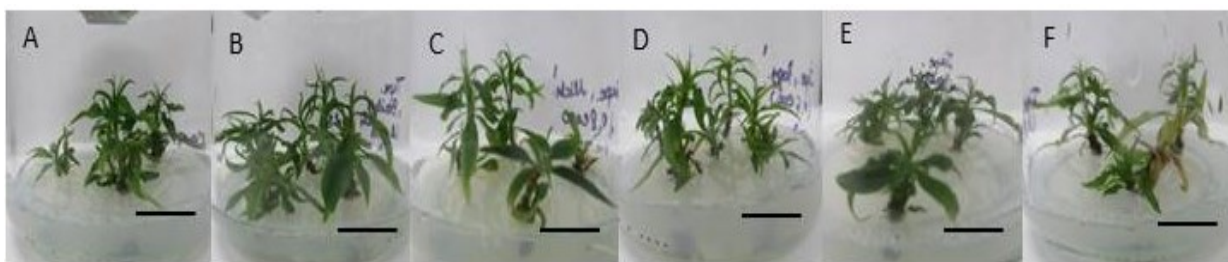


Рис. 2 Экспланты персика сорта Bailey в первом субкультивировании в стандартных условиях после 12 месяцев депонирования на средах с CCC: А – 0 г/л; В – 0,2 г/л; С – 0,4 г/л; D – 0,6 г/л; E – 0,8; F – 1,0 г/л. Масштаб 1 см

Fig. 2 Explants of the Bailey peach cultivar in the first subcultivation under standard conditions after 12 months of deposition on media with CCC: A – 0.0 g/l; B – 0.4 g/l; C – 0.6 g/l; D – 0.8 g/l. Scale bar 1 cm

В первом субкультивировании длина побегов после сохранения на различных вариантах среды МС была различной (рис. 3). Максимальное среднее значение длины

побега ($1,80 \pm 0,13$ см у сорта Bailey и $2,86 \pm 0,42$ см у сорта Nemaguard) и количества адвентивных побегов в первом пассаже получено на среде с $0,75$ мг/л 6-БАП после сохранения на среде с $0,4$ г/л CCC (рис. 3).

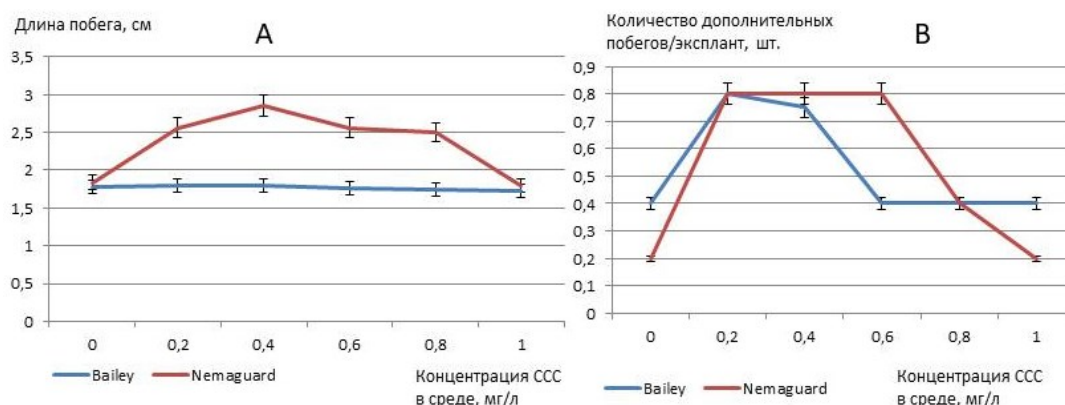


Рис. 3 Морфометрические показатели побегов персика после первого субкультивирования в стандартных условиях культивирования: А – длина побега, см; В – количество дополнительных побегов, шт.

Fig. 3 Morphometric parameters of peach shoots after the first subcultivation under standard cultivation conditions: A – shoot length, cm; B – No. of adventitious shoots formation

С увеличением концентрации CCC в среде наблюдали снижение этих показателей при возобновлении пролиферации. Однако через 40 сут. были получены нормально сформированные микропобеги независимо от варианта среды для сохранения. На протяжении 2-го и 3-го субкультивирования увеличивалось количество адвентивных побегов. Визуально не отмечено негативного влияния CCC в испытанных концентрациях на морфометрические показатели побегов.

Морфометрические данные листовых пластинок анализируемых образцов персика сортов Bailey и Nemaguard представлены в таблице 2.

Гистологический анализ вегетативных органов показал, что листовая пластинка у персика сорта Bailey в условиях культуры *in vitro* очень тонкая. Её толщина, в среднем, составляет 150 мкм. Мезофилл умеренный или многослойный (5–7 слоев). Столбчатая ткань представлена 2–3 слоями клеток. Губчатая хлоренхима плотная. При депонировании листовая пластинка становится тоньше, как за счет уменьшения размеров клеток столбчатой паренхимы, так и снижения количества слоев и их плотности губчатой хлоренхимы (рис. 4 а). В целом, коэффициент палисадности для листьев данного сорта варьирует от 30 до 50 % (в среднем, 41–42 %) и оценивается как средний (табл. 2). У сорта Bailey клетки адаксиальной эпидермы листа более крупные по сравнению с клетками абаксиальной эпидермы. При субкультивировании после депонирования отмечается снижение морфометрических различий листа по сравнению с контрольным вариантом. Центральная жилка листа представлена коллатеральным проводящим пучком, у которого сформированны флоэма и ксилема. В ряде случаев отмечается деструкция проводящих элементов (рис. 4 б). Стебель у сорта Bailey имеет 6–8 слоев коровой паренхимы. Паренхима коры и сердцевины в контроле представлена крупными клетками, в то время как при депонировании клетки паренхимы становятся мельче, а сама ткань плотнее. Проводящие пучки дифференцированы и содержат ксилемы и флоэму (рис. 4 в).

Таблица 2

Морфометрическая характеристика листовых пластинок
двух сортов персика в разных вариантах культивирования *in vitro*

Table 2

Morphometric characteristics of leaf blades
of two peach cultivars in different variants of *in vitro* cultivation

Сорт / Cultivar	Параметры листовой пластинки / Parameters of the leaf blade	Контроль / Control	Сохранение <i>in vitro</i> / Conservation <i>in vitro</i>	Культура <i>in vitro</i> / Culture <i>in vitro</i>
Bailey	Толщина листовой пластинки /Thickness of the leaf blade, μm	149,32 $\pm$ 1,94	121,33 $\pm$ 3,33	132,12 $\pm$ 3,27
	Толщина адаксиальной эпидермы /Thickness of the adaxial epidermis, μm	20,64 $\pm$ 1,47	16,27 $\pm$ 0,58	18,92 $\pm$ 0,90
	Общая толщина мезофилла / Total thickness of the mesophyll, μm	109,37 $\pm$ 4,48	89,57 $\pm$ 2,80	97,08 $\pm$ 3,57
	Палисадный мезофилл / Palisade mesophyll, μm	45,49 $\pm$ 4,17	36,77 $\pm$ 1,70	40,67 $\pm$ 1,76
	Губчатый мезофилл / Spongy mesophyll, μm	63,88 $\pm$ 5,77	52,80 $\pm$ 2,13	56,42 $\pm$ 2,70
	Коэффициент палисадности / Palisade coefficient, %	41,97 $\pm$ 1,47	41,21 $\pm$ 1,29	42,27 $\pm$ 1,31
	Толщина абаксиальной эпидермы / Thickness of the abaxial epidermis, μm	19,31 $\pm$ 1,61	15,49 $\pm$ 0,44	16,12 $\pm$ 0,53
Nema- guard	Толщина листовой пластинки / Thickness of the leaf blade, μm	102,55 $\pm$ 1,75	128,79 $\pm$ 4,91	109,57 $\pm$ 3,23
	Толщина адаксиальной эпидермы / Thickness of the adaxial epidermis, μm	16,25 $\pm$ 0,47	17,65 $\pm$ 0,47	16,19 $\pm$ 0,43
	Общая толщина мезофилла / Total thickness of the mesophyll, μm	72,15 $\pm$ 1,36	95,38 $\pm$ 3,08	78,56 $\pm$ 1,73
	Палисадный мезофилл / Palisade mesophyll, μm	33,16 $\pm$ 0,67	41,91 $\pm$ 1,26	33,99 $\pm$ 0,91
	Губчатый мезофилл/ Spongy mesophyll, μm	38,99 $\pm$ 1,27	53,47 $\pm$ 2,66	44,57 $\pm$ 1,35
	Коэффициент палисадности /Palisade coefficient, %	46,44 $\pm$ 1,51	44,71 $\pm$ 1,20	43,60 $\pm$ 0,94
	Толщина абаксиальной эпидермы / Thickness of the abaxial epidermis, μm	14,14 $\pm$ 0,43	15,76 $\pm$ 0,58	14,82 $\pm$ 0,38

Листовая пластинка персика сорта Nema-guard в культуре *in vitro* очень тонкая (100–135 мкм) (табл. 2). Мезофилл, как правило, образован 5 слоями клеток, из которых 2 слоя приходятся на столбчатую ткань. Губчатая паренхима рыхлая. По толщине столбчатая и губчатая ткани практически равны. У сорта Nema-guard было отмечено утолщение листовой пластинки, связанное с изменением параметров столбчатой и губчатой паренхимы (рис. 5a).

Коэффициент палисадности составил в 44-46%, наибольшие его значения отмечены в контрольном варианте. При субкультивировании обращается на себя внимание более плотное расположение клеток губчатой ткани. Клетки адаксиальной эпидермы более крупные, чем на абаксиальной. Центральная жилка содержит

сформированный проводящий пучок. Однако варианты различаются по количеству слоев колленхимы, окружающих ее. Проводящий пучок центральной жилки с адаксиальной стороны листа у контрольного варианта окружает пять слоев клеток, а с абаксиальной количество клеточных слоев достигает десяти. При депонировании толщина слоя колленхимы снижена и составляет 2-3 слоя с адаксиальной стороны и 3-7 слоев с абаксиальной (рис. 5 b). У растений при субкультивировании в стандартных условиях восстанавливается количество слоев мезофилла аналогично контрольному варианту.

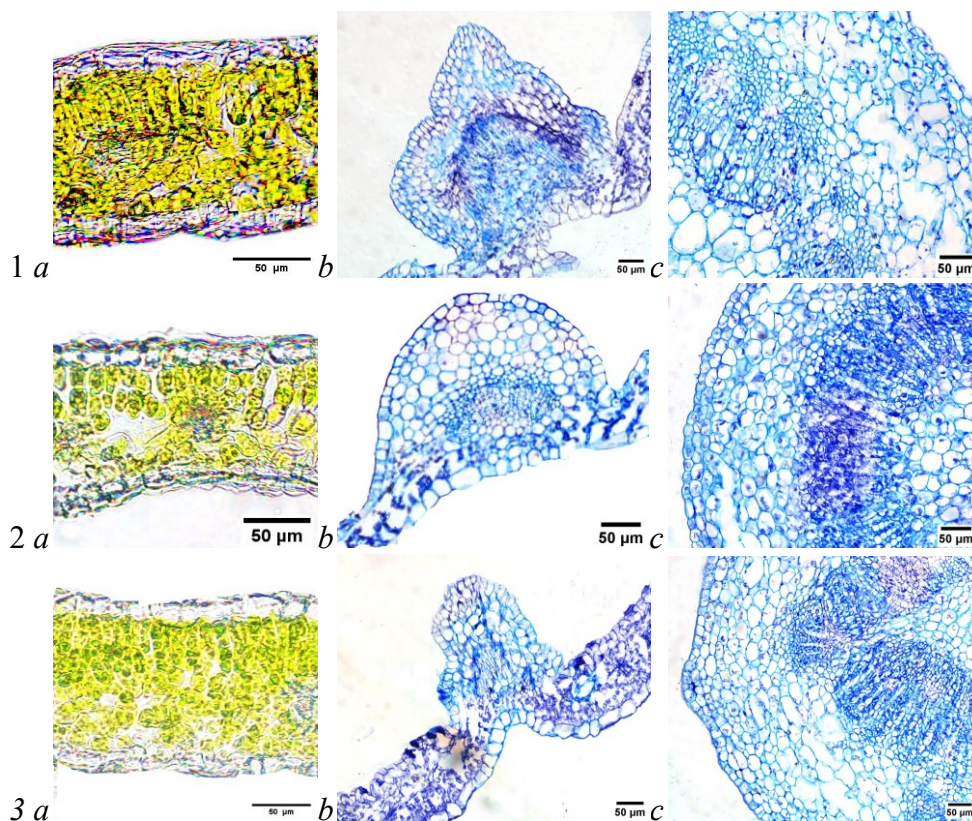


Рис. 4 Поперечные срезы срединной части листовой пластинки (a), листа в районе центральной жилки (b) и срезы стебля (c) персика сорта Bailey при различных условиях культивирования: 1 – контроль; 2 – депонирование; 3 – субкультивирование после депонирования. Масштаб: 50 µm

Fig. 4 Cross sections from the median region of the leaf blade (a), leaf in the area of the central vein (b) and stem sections (c) of the Bailey peach cultivar under different cultivation conditions: 1 – control; 2 – deposition; 3 – subcultivation after deposition. Scale bar 50 µm

Стебель у растений в контрольном варианте с хорошо развитой коровой паренхимой (8-10 слоев клеток) и сердцевинной. Проводящие пучки с четко выраженными элементами флоэмы и ксилемы. При депонировании отмечается увеличение проводящих пучков, а также массовые разрывы тканей в коровой паренхиме и между проводящими пучками. Морфо-анатомическая структура побегов при субкультивировании в большей степени соответствует контрольному варианту, однако, паренхима коры у них несколько толще, а клетки паренхимы сердцевинны крупнее (рис. 5 c).

Нашими исследованиями мы оптимизировали способ длительного сохранения с замедлением роста эксплантов персика применительно к изучаемым сортам. Применение низкой положительной температуры и использование осмотиков и

ретардантов в среде позволило увеличить период безопасного сохранения *in vitro* до 12 месяцев.

При сохранении культур побегов при низких температурах происходит снижение метаболической активности, которая обеспечивает надежную сохранность эксплантов и приводит к снижению кинетики роста. Согласно литературным данным оптимальная температура сохранения колеблется от 2 до 6 °C для декоративных, плодовых, эндемичных видов и от 8 до 15 °C – для тропических и субтропических видов (Benelli et al., 2022).

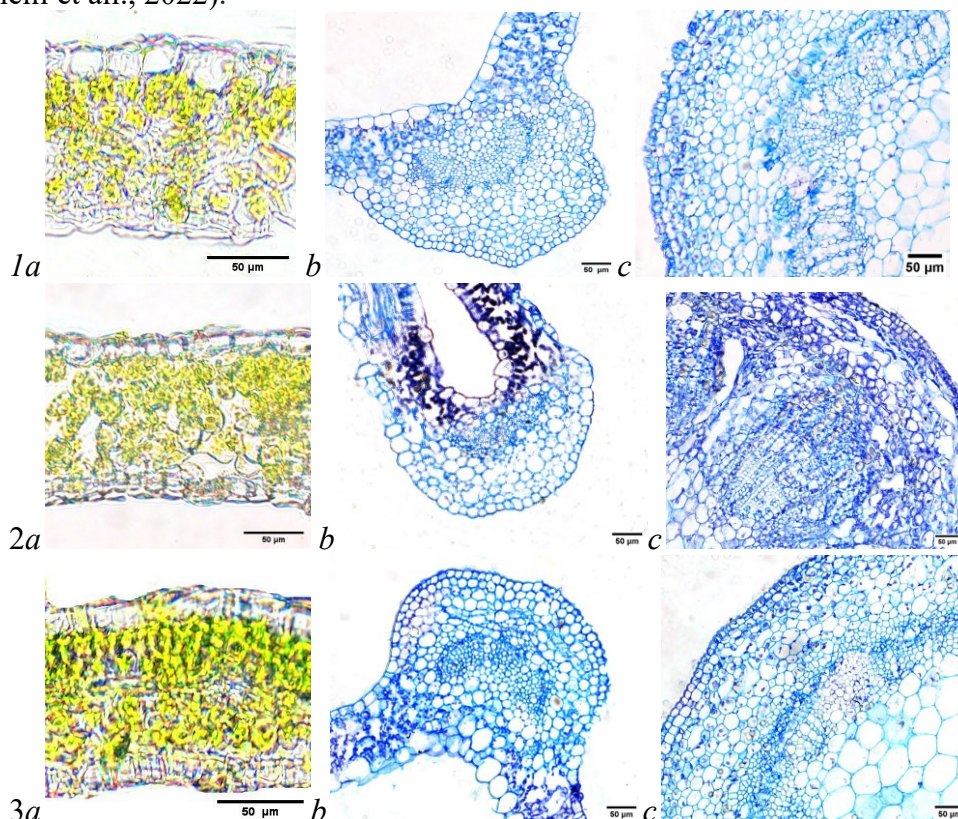


Рис. 5 Поперечные срезы срединной части листовой пластинки (a), листа в районе центральной жилки (b) и срезы стебля (c) персика сорта Nemaguard при различных условиях культивирования: 1 – контроль; 2 – депонирование; 3 – субкультивирование после депонирования. Масштаб: 50 µm

Fig. 5 Cross sections from the median region of the leaf blade (a), leaf in the area of the central vein (b) and stem sections (c) of the Nemaguard peach cultivar under different cultivation conditions: 1– control; 2 – deposition; 3 – subcultivation after deposition. Scale bar 50 µm

Так микропобеги *Prunus* spp. (Turdiyev, Kovalchuk, 2020), *Ficus carica* (Arbeloa 2017), *Fragaria* spp. (Иванова и др, 2023; Lukoševičiute, Rugienius, 2012) сохранялись при температуре 4-6 °C в течение 12 месяцев на средах с регуляторами роста. При этом жизнеспособность эксплантов составила 99-100 %. У эксплантов *Ziziphus jujuba* (Sota, Kongjika, 2014) 78,6% оставались жизнеспособными после 10 месяцев депонирования при температуре 4 °C. Реакция на условия хранения обычно связана с различной устойчивостью растений к низким температурам. Экспланты исследуемых сортов персика показали устойчивость к дефициту питательных веществ и осмотическому стрессу.

Применение ретардантов, являющихся активными эндогенными ингибиторами роста останавливает рост культуры *in vitro*, но при этом не снижает жизнеспособность микрорастений. Наличие в составе среды жасмоновой кислоты (1,0 г/л) при температуре 3-6 °C позволило поддерживать жизнеспособность клоновых подвоев

яблонь в течение 4 лет (Бьядовский, 2018). Введение в состав среды 0,2 г/л ССС способствовало сохранению жизнеспособности (94-100 %) у эксплантов инжира сортов Никитский 800 и Сабруция Розовая, розы эфиромасличной сортов Кооператорка и Фестивальная, розы садовой сортов Алиска и Наталья Муравская, хризантемы садовой сортов Bigoudi Red и Rezone Sten Dark (Иванова, Гребенникова, 2025). Оптимальные концентрации ретардантов являются видоспецифичными и могут изменяться в зависимости от температуры сохранения.

Морфо-анатомические характеристики были получены при исследовании побегов и листьев после хранения 12 месяцев в условиях медленного роста. Наличие изменений морфометрических параметров вегетативных органов растений в условиях культуры *in vitro* выявлено у различных культур (Иванова и др., 2023; Shekhawat, Manokari, 2018). Отмеченный у исследуемых сортов персика характер трансформации листовой пластинки и стебля при депонировании и последующем субкультивировании микропобегов свидетельствует о проявлении у них адаптивной реакции на условия культивирования, которые не оказывают необратимых изменений в их структуре. Это подтверждает эффективность предложенного способа сохранения *in vitro* эксплантов персика сортов Bailey и Nemaguard.

Выводы

Результаты наших исследований показали эффективность беспересадочного сохранения микропобегов изучаемых сортов персика в культуре *in vitro* при температуре 6°C в течение 12 месяцев. Жизнеспособность эксплантов после 12 месяцев хранения составила 89-99% в зависимости от концентрации ССС в питательной среде ¼ МС. При этом побеги получены при депонировании *in vitro* в течение 12 месяцев на среде ¼ МС, дополненной 0,2 или 0,4 г/л ССС.

При введении в питательную среду осмотически активных веществ и ретардантов наблюдались морфоструктурные трансформации вегетативных органов микропобегов, носящие адаптивный характер. Модификации листовых пластинок, выраженные в изменениях, главным образом, толщины и плотности мезофилла, не оказали кардинального влияния на коэффициент палисадности, что свидетельствует о сохранении уровня их фотосинтетического потенциала.

Восстановление способности к пролиферации отмечено в первом субкультивировании в стандартных условиях на среде МС, дополненной 0,75 мг/л 6-БАП: 100 % эксплантов оказались способны к росту основного и образованию дополнительных побегов.

Полученные результаты предполагают возможность продления срока сохранения эксплантов персика изучаемых сортов при пониженной положительной температуре.

Благодарности/Acknowledgements

Работа выполнена в рамках темы Госзадания ФГБУН «НБС-НИЦ» FNNS-2025-0003 на базе Уникальной научной установки "ФИТОБИОГЕН".

Литература / References

Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебн. пособие. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
[Butenko R.G. Biology of higher plant cells and biotechnology based on them. Moscow: FBK-PRESS, 1999. 160 p.]

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. [Bjadovskiy 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. 5:30–37. DOI: 10.31676/0235-2591-2018-5-30-37 (In Russian)].

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

[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. DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-1-64-75. (In Russian)]

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.

[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. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-483-493. (In Russia)]

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.

[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. 2(38):53–66. EDN: UPRRPG. DOI: 10.5281/zenodo.12178658. (In Russian)]

Иванова Н.Н., Лесникова-Седошенко Н.П., Корзина Н.В. Клональное микроразмножение и сохранение земляники садовой сорта 'Крымчанка 87' *in vitro* // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. 2023. Т. 146:134–141. DOI: 10.36305/0513-1634-2023-146-134-141.

[Ivanova N.N., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Korzina N.V. Some aspects of clonal *in vitro* micropropagation and preservation of strawberries of the garden cultivar 'Krymchanka 87' // Bulletin of the State Nikitsky Botanical Gardens. 2023. 146:124–141. <https://doi.org/10.36305/0513-1634-2023-146-134-141>. (In Russian)]

Иванова Н.Н., Гребенникова О.А. Динамика изменения биохимических показателей микропобегов в условиях депонирования *in vitro* // Таврический вестник аграрной науки. 2025. № 1 (41). С. 90–102. EDN: NLKJNO. DOI: 10.5281/zenodo.15147590.

[Ivanova N.N., Grebennikova O.A. Dynamics of changes in biochemical parameters of plants under *in vitro* deposition conditions // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2025. 1(41):90–102. EDN: NLKJNO. DOI: 10.5281/zenodo.15147590. (In Russian)]

Лесникова-Седошенко Н.П., Митрофанова О.В., Смыков А.В., Горина В.М. Применение биотехнологических методов в получении селекционных форм персика (*Prunus persica* (L.) Batch) и абрикоса (*Prunus armeniaca* L.) // Труды Гос. Никит. ботан. сада. 2007. Т. 128. С. 33–40.

[Lesnikova-Sedoshenko N.P., Mitrofanova O.V., Smykov A.V., Gorina V.M. Using of biotechnology methods for obtaining of peach (*Prunus persica* (L.) Batch) and apricot (*Prunus armeniaca* L.) selection forms // Works of the State Nikit. Botan. Gard. 2007. 128:33-40. (In Russian)]

Основы создания генобанка in vitro видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур: коллективная монография / под общ. ред. И.В. Митрофановой. Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2018. 260 с.

DOI: 10.32514/978-5-907118-87-4

[*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. (In Russian)].

Arbeloa A., Marín J.A., Andreu P., García E., Lorente P. *In vitro* conservation of fruit trees by slow growth storage // Acta Horticulture. 2017. Vol. 1155. P. 101–106. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1155.13.

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.

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. P. 3188. DOI: 10.3390/plants11233188.

Bidabadi S.S., Jain S.M. Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration // Plants. 2020. Vol. 9. P. 702. DOI: 10.3390/plants9060702.

Engelmann F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity // Resources. 2013. Vol. 2. P. 73–95. DOI: 10.3390/resources2020073.

Gowthami R., Agrawal A., Chander S., Pandey R., Sharma N., Gupta S., Srivastava V., Malhotra E., Bansal S., Malik S., Mahendru-Singh S., Singh G. *In vitro* genebank of India for safe conservation of horticultural plant diversity: four decades of milestones // 3 Biotech. 2025. Vol. 15(1). P. 11. DOI: 10.1007/s13205-024-04177-2.

Kumar A. Somaclonal variation. *Potato genetics*. Wallingford: CAB International, 1994. P. 197–212.

Lukoševičiute V., Rugienius R., Staniene G., Blažyte A., Gelvonauskiene 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.

Mani M., Mathiyazhagan C., Dey A., Faisal M., Alatar A.A., Alok A., Shekhawat M.S. Micro-morpho-anatomical transitions at various stages of *in vitro* development of *Crinum malabaricum* L. Lehak and Yadav: a critically endangered medicinal plant // Plant Biology. 2023. Vol. 25(1). P. 142-151. DOI: 10.1111/plb.13464.

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.

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

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

Okello D., Yang S., Komakech R., Rahmat E., Chung Y., Gang R., Kim Y-G, Omujal F., Kang Y. 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.

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.

Sota V., Kongjika E. Slow growth *in vitro* conservation of *Zizyphus jujuba* Mill. // *Poljoprivreda i Sumarstvo*. 2014. Vol. 60. P. 27-37.

Turdiyev T.T., Kovalchuk I.Y., Kabylbekova B.Z., Chukanova N.I., Frolov S.N. *In vitro* germplasm cold storage of fruit and berry plants of Kazakhstan // *Eurasian Journal of Biosciences*. 2020. Vol. 1219. P. 1213–1219.

Статья поступила в редакцию 15.01.2026 г.

Ivanova N.N., Kuzmina T.N., Korzina N.V. Optimization of non-stop storage method *in vitro* microshoots of two peach cultivars // *Plant Biology and Horticulture: theory, innovation*. 2026. № 1 (178). P. 109-120

Cultivating plants at low positive temperatures is effective for *in vitro* preservation of valuable peach cultivars. The aim of this study was to investigate the effect of chlorocholine chloride (CCC) concentrations added to the culture medium for long-term cultivation on the viability, physiological, and morpho-anatomical parameters of microshoots of peach cultivars Bailey and Nemaguard for subsequently optimization of conditions for long-term *in vitro* preservation at low positive temperatures. Leafless microshoot apices were placed *in vitro* on 1/4 MS medium + 60.0 g/l sucrose and 0.2-1.0 g/l CCC. The explants were placed in refrigerated chambers at 6°C. Explant survival after 12 months of storage was 89-99%. Overall, the vegetative structures of the studied cultivars were anatomically formed during deposition and subcultivation. In plants exposed to deposition conditions, changes in leaf blade thickness were observed, due to both epidermal and mesophyll thickness, while parenchymal tissue density also changed. The palisade ratio did not change significantly. Stored microshoots of the two peach cultivars were of good quality, with no signs of hydration or necrosis, and immediately restored their proliferation potential when cultured on MS medium with 0.75 mg/l 6-BAP after storage. The highest percentage of regrowth (100%) was obtained for storage of explants storage on medium supplemented with 0.2-0.4 g/l CCC. Obtained results suggest the possibility of increasing the deposition time of peach explants of the studied cultivars at lower positive temperatures.

Key words: *Prunus persica* (L.) Batsch.; explant; morphometric parameters; *in vitro* deposition; palisade coefficient