

УДК 634:45:57.085.2

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ РАЗМНОЖЕНИЯ ХУРМЫ ВОСТОЧНОЙ

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

Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Ялта, Республика Крым, Россия, nnivanova2017@yandex.ru

В статье представлены результаты использования методов биотехнологии в размножении двух сортов *Diospyros kaki* Thunb. Выявлена индуцирующая роль БАП в питательной среде МС на этапе индукции побегообразования, обеспечивающая стабильную прямую регенерацию микропобегов из вегетативных почек хурмы. Показано, что наличие в среде МС ТДЗ способствовало формированию микропобегов путем непрямого органогенеза в культуре высечек листа. Приведены данные гистологических исследований каллуса. Выявлены структурные и метаболические особенности вегетативных органов двух сортов хурмы на этапе регенерации микропобегов *in vitro*.

Ключевые слова: *Diospyros kaki*, вегетативная почка, высечка листа, каллус, адвентивные микропобеги.

ВВЕДЕНИЕ

Родина хурмы восточной (*Diospyros kaki* Thunb.) – Северный и Центральный Китай. В Никитский ботанический сад (НБС) хурма восточная завезена в конце 19 века. Плоды ценнейшей субтропической культуры хурмы богаты витаминами, полифенольными веществами и органическими соединениями, содержат до 25,9% сахаров. Сок хурмы обладает бактерицидными свойствами в отношении кишечной палочки и золотистого стафилококка (Казас и др., 2012). Недостаточная эффективность традиционных способов размножения этой культуры (древесное черенкование, прививка) требует новых подходов. Использование биотехнологических методов в размножении растений позволяет получать генетически однородный растительный материал (Bhojwani, Dantu, 2013).

Первые работы по микроразмножению хурмы проведены еще в 80-90-х годах прошлого столетия (Соорег, Cohen, 1985; Митрофанова и др., 1998). Применение метода эмбриокультуры в селекции хурмы позволило ускорить создание сорта Россиянка (Здруйковская-Рихтер, 2003). В дальнейшем были разработаны способы регенерации отдельных сортов хурмы из вегетативных почек *in vitro* (Tetsumura et al., 2001; Liu et al., 2006; Kochanova et al., 2011). Получена регенерация микропобегов некоторых сортов хурмы восточной из вегетативных почек, высечек листьев и культивируемого каллуса в условиях *in vitro* (Mitrofanova, Mitrofanova, 2004; Иванова и др., 2016а; Иванова и др., 2017). Установлена зависимость регенерационной способности эксплантов отдельных сортов хурмы восточной от сроков их введения, режима стерилизации, состава питательной среды и условий культивирования (Иванова и др., 2016б).

Цель наших исследований – выявить возможные пути регенерации микропобегов хурмы восточной перспективных сортов Золотистая и Никитская Бордовая (ВТОРОЕ СЛОВО с большой буквы? Уточните) селекции Никитского ботанического сада (НБС) из вегетативных почек и высечек листа. Определить морфоанатомические и физиологические особенности листьев микропобегов двух сортов хурмы восточной в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В биотехнологические исследования были включены 2 сорта хурмы восточной – Золотистая и Никитская Бордовая, выращиваемые в генофондовой коллекции НБС. Сорт Золотистая – гибрид от скрещивания сортов Триумф и Украинка. Крона полушаровидная, высота 2,5 м. Листья зеленые, яйцевидные, средней величины. Плоды округлые, массой 146–291 г. Никитская Бордовая – отобранный сеянец от свободного опыления сорта Россиянка. Крона дерева округлопирамидальная. Листья плотные, сверху темно-зеленые,

снизу – зеленые, широкоовальной формы. Плоды плоскоокруглой формы, массой 130–150 г (Казас и др., 2012). В условия *in vitro* были введены вегетативные почки изучаемых сортов хурмы восточной.

Исследования по введению эксплантов в культуру *in vitro* и регенерации микропобегов хурмы проводили в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений НБС с применением различных биотехнологических методов (Бутенко, 1999; Митрофанова, 2011; Kyte et al., 2013). Вегетативные почки хурмы стерилизовали 1 мин в 70 % этаноле, 15 мин в растворе, содержащем 0,3–0,4 % Cl_2 (Дез ТАБ), затем в 1 % растворе Thimerosal с добавлением 2–3 капель детергента Tween 20. После каждого реагента экспланты промывали 3 раза стерильной дистиллированной водой. Изолированные вегетативные почки с удаленными покровными чешуями культивировали на модифицированной нами среде МС (Murashige, Skoog, 1962). Для индукции регенерации микропобегов в питательную среду вводили регуляторы роста: цитокинины – 1,0–5,0 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) или 0,7–2,0 мг/л зеатина и ауксин – 0,1–0,3 мг/л β -индолил-3-масляной кислоты (ИМК), 30 г/л сахарозы и 10 г/л агар-агара. Для оздоровления от вирусной инфекции применяли вирицид рибавирин (виразол, 1-бета-D-рибофуранозил-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид), введенный непосредственно в питательную среду в концентрации 10 мг/л. Экспланты культивировали на стеллажах при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 16-часовом фотопериоде и интенсивности освещения $37,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$.

Листья хурмы отделяли от микропобегов, культивируемых *in vitro*, разрезали на квадраты с центральной жилкой и черешком листа (0,8 x 0,8 см) и помещали на среду МС. В экспериментах использовали тидиазурон (ТДЗ, Sigma, США) в концентрациях 0,2; 0,6; 1,1; 1,7 и 2,2 мг/л. Контрольной была среда МС без цитокинина. Одну часть эксплантов культивировали на стеллаже в культуральной комнате с 16-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения $37,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$, другую – в отсутствии освещения при $25 \pm 1^\circ\text{C}$ в термостате MIR 254 (SANYO, Япония).

Морфогенные структуры фиксировали в смеси Карнуа (96 % этиловый спирт, хлороформ, уксусная кислота в соотношении 6:3:1). После фиксации материал переносили в 70 % водный раствор этилового спирта. Для его обезвоживания использовали растворы этилового, бутилового спирта и ксилола с постепенным повышением их концентрации, а в последующем материал пропитывали парафином. Парафиновые срезы делали на ротационном микротоме марки МРТУ толщиной 10–15 мкм, в зависимости от размеров объекта. Их окрашивали метилгрюнпиронином и алциановым синим (Шевченко, Чеботарь, 1992). Анализ постоянных препаратов проводили методом светлопольной микроскопии на микроскопе AxioScope A.1 (Zeiss, Германия). Микрофотографии получены с помощью системы анализа изображения AxioCamERc5s и цифровой фотокамеры Olympus SP-350. Для анализа изображений использовали программное приложение AxioVisionRel. 4.8.2.

Морфометрические измерения проводили в 10-кратной повторности, для изучения структуры листовых пластинок готовили временные препараты (Паушева, 1990). Материал анализировали с помощью микроскопов Jenaval (Carl Zeiss, Германия) и AxioScope A.1 (Zeiss, Германия). Определяли показатели водного режима листьев регенерантов: общее содержания воды и ее фракционный состав (Лишук, 1991). Оценку фотосинтетической активности проводили с помощью измерения параметров индукции флуоресценции хлорофилла (Stirbet, Govindjee, 2011). Всю обработку данных осуществляли с помощью программы STATISTICA for Windows, 6.0 (StatSoft, Inc. 1984-2001).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Максимальное количество жизнеспособных эксплантов (почки в состоянии покоя), регенерировавших микропобеги отмечали в январе-феврале. При используемом способе стерилизации уровень контаминации составил 15–20 %. Жизнеспособность эксплантов у двух исследуемых сортов достигала 75–80 %. На модифицированной питательной среде МС с уменьшенной вдвое концентрацией азота, наблюдали активное разрастание почек,

формирование микропобегов и листьев, а также образование плотного светло-зеленого морфогенного каллуса в основании микропобега.

Рядом исследователей были протестированы различные регуляторы роста для индукции регенерации микропобегов хурмы *in vitro*: зеатин (Liu et al., 2006), зеатин в комбинации с ИУК (Tetsumura et al., 2001), БАП (Mitrofanova, Mitrofanova, 2004), БАП и ИМК (Иванова и др., 2016а; Mitrofanova et al., 2017а). В наших экспериментах на этапе индукции побегообразования были использованы БАП и ИМК. Зеатин применяли на этапе собственно микроразмножения.

Выявлено, что изолированные вегетативные почки хурмы сортов Золотистая и Никитская Бордовая обладали высоким морфогенетическим потенциалом. На 4 неделе культивирования наблюдали выдвижение 1–2 листьев (рис. 1). Для оценки влияния регулятора роста БАП, его концентраций в среде МС на морфогенетический потенциал изучаемых генотипов хурмы восточной в условиях *in vitro* проанализировано число микропобегов/эксплант и их длина. В результате проведенных исследований получен различный морфогенетический ответ у 2 сортов хурмы (табл. 1). Одновременно с развитием основного побега отмечали формирование 1–2 адвентивных почек в плотном каллусе, который образовывался в основании побега.

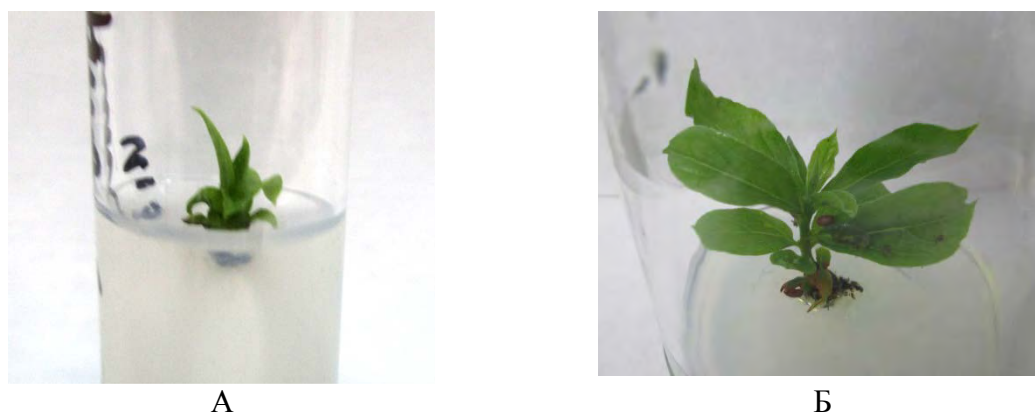


Рис. 1. Регенерация микропобегов хурмы восточной сорта Никитская Бордовая на среде МС, дополненной БАП

А – развитие вегетативной почки; Б – микропобег.

Особенно интенсивно морфогенный каллус формировался в основании микропобегов сорта Никитская Бордовая. В вариантах с 1,0–2,0 мг/л БАП для двух генотипов среднее количество микропобегов на эксплант составляло $1,2 \pm 0,3$ шт. для сорта Никитская Бордовая и $1,3 \pm 0,3$ для сорта Золотистая.

Таблица 1

Влияние концентраций БАП в среде МС на количество микропобегов/эксплант и длину микропобега у двух сортов хурмы в условиях *in vitro* на этапе индукции побегообразования

БАП, мг/л	Количество микропобегов/эксплант, шт.		Длина микропобега, см	
	сорт Золотистая	сорт Никитская Бордовая	сорт Золотистая	сорт Никитская Бордовая
1,0	$0,9 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$0,84 \pm 0,05$	$0,84 \pm 0,06$
2,0	$1,3 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,3$	$1,40 \pm 0,04$	$1,36 \pm 0,07$
3,0	$1,7 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$	$1,68 \pm 0,12$	$1,61 \pm 0,07$
4,0	$1,9 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,3$	$1,76 \pm 0,15$	$1,70 \pm 0,05$
5,0	$2,0 \pm 0,6$	$1,9 \pm 0,5$	$1,96 \pm 0,07$	$1,88 \pm 0,07$

Средняя длина микропобегов достигала $1,40 \pm 0,04$ см для сортов Золотистая и $1,36 \pm 0,07$ см для сорта Никитская Бордовая. В процессе исследований установлено, что оптимальные значения концентраций регуляторов роста на этапе введения вегетативных почек составляли 4,0–5,0 мг/л БАП и 0,2 мг/л ИМК. При этом средняя длина побегов сортов Золотистая и Никитская Бордовая достигала $1,96 \pm 0,07$ см и $1,88 \pm 0,07$ см.

Для удлинения побеги субкультивировали на среде МС, дополненную 0,7–1,0 мг/л зеатина (рис. 2).



Рис. 2. Микропобеги хурмы восточной сорта Золотистая на среде МС, дополненной 0,7–1,0 мг/л зеатина

Коэффициент размножения через 4 недели культивирования на среде для удлинения равнялся 2,0. Средняя длина микропобегов достигала 2,0–2,6 см. Дальнейшее микрочеренкование в условиях *in vitro* позволило получить более чем 4-х кратное увеличение коэффициента размножения через 6–8 недель культивирования.

Ряд исследователей сообщали о получении растений из каллуса, формирующегося на листовых эксплантах (Tao et al., 1988; Kochanova et al., 2011; Митрофанова, 2011; Иванова и др., 2017; Mitrofanova et al., 2017a; Mitrofanova et al., 2017b;). Для определения основных факторов, индуцирующих органогенез в культуре листьев хурмы в условиях *in vitro* нами изучено влияние различных концентраций ТДЗ в среде на регенерационный потенциал высечек листа двух сортов хурмы. Выявлено, что наиболее интенсивно каллусообразование происходило в области листового черешка. Морфогенный каллус образовывался при наличии в составе среды 1,1 и 1,7 мг/л ТДЗ.

Реализация морфогенетического потенциала исходных эксплантов зависела от условий культивирования. На свету каллус был компактный, серо-зеленый. Однако каллусообразование активнее начиналось в отсутствии освещения, при этом формировался светло-серый, лишенный пигментации каллус. При переносе каллуса на свет в течение недели отмечали интенсивное окрашивание его в ярко-зеленый цвет. На его поверхности появлялись шаровидные, блестящие структуры диаметром 2–3 мм, из которых впоследствии формировались микропобеги. Частота непрямого органогенеза из высечек листа достигала 80–84 % через 6 недель культивирования на средах с 1,1 и 1,7 мг/л ТДЗ. Увеличение продолжительности культивирования эксплантов свыше 6 недель стимулировало регенерацию микропобегов из морфогенного каллуса хурмы (рис. 3).

Гистологический анализ морфогенного каллуса хурмы сорта Никитская Бордовая показал, что каллус образован паренхимными клетками со слабовыраженной цитоплазмой и мелким ядром. На периферии каллусных структур паренхимные клетки расположены более рыхло, чем в их центре. В толще паренхимных клеток отмечены зоны мелких клеток с густой цитоплазмой и относительно крупным ядром, характерными для пролиферативно активных клеток, которые дают начало меристемам микропобегов (рис. 4). Наряду с этим

наблюдали зоны гистогенеза проводящих элементов, сопровождающиеся поляризацией клеток с последующим утолщением и перфорацией их клеточных стенок.

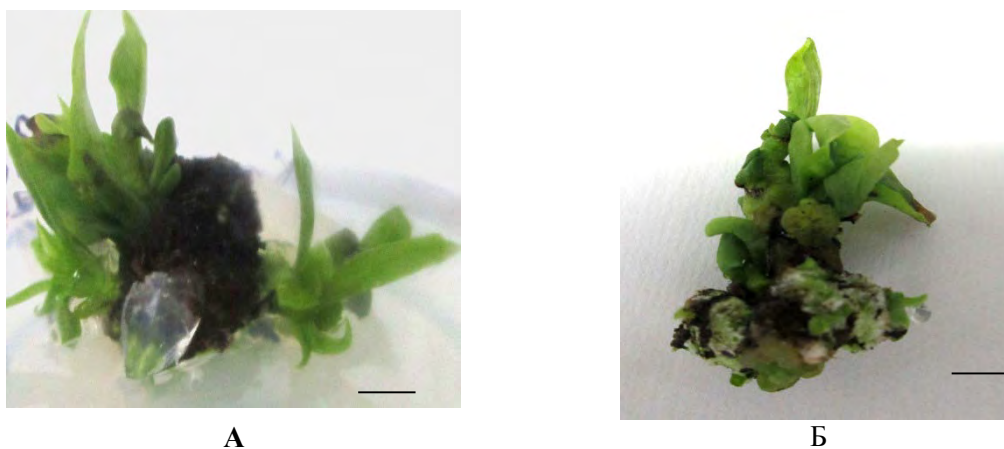


Рис. 3. Непрямая регенерация микропобегов хурмы восточной
А – сорт Золотистая; Б – сорт Никитская Бордовая (масштабный отрезок – 1 см).

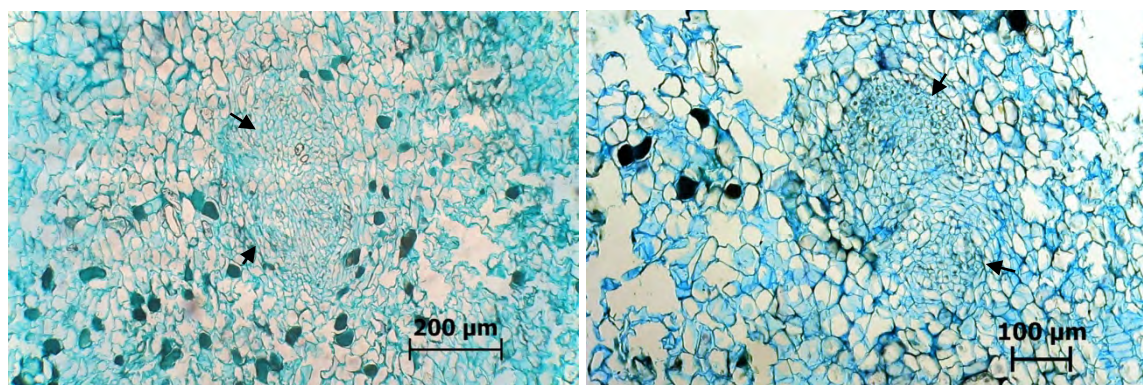


Рис. 4. Поперечные срезы каллусных структур хурмы сорта Никитская Бордовая
Стрелками указаны зоны меристематически активных клеток.

В первом пассаже получено 10 микропобегов /эксплант у сорта Золотистая, 4–6 – у сорта Никитская Бордовая. При повторных пассажах количество микропобегов сорта Золотистая достигало 20 шт./эксплант. Дальнейшее субкультивирование проводили на среде МС, дополненной 0,7–1,0 мг/л зеатина.

Наличие в среде МС 0,2 мг/л и 2,2 мг/л ТДЗ способствовало активному каллусообразованию. Однако полученный каллус был неморфогенным. На среде МС, содержащей 0,2 мг/л ТДЗ через 2 недели культивирования экспланты некротизировали и погибали. На контрольной среде без цитокинина не отмечено признаков развития эксплантов.

Начато изучение морфо-анатомических и физиологических особенностей микропобегов 2-х сортов хурмы при субкультивировании в условиях *in vitro* и получены первые результаты исследований (Brailko et al., 2017a; Brailko et al., 2017b). Выявлены структурные и метаболические особенности вегетативных органов двух сортов хурмы на этапе регенерации микропобегов *in vitro* (рис. 5, 6). Форма листа – овально-ланцетная, 1,6–2,8 см

длиной. Листовые пластинки сортов хурмы тонкие (126–145 мкм толщиной), амфистоматические.

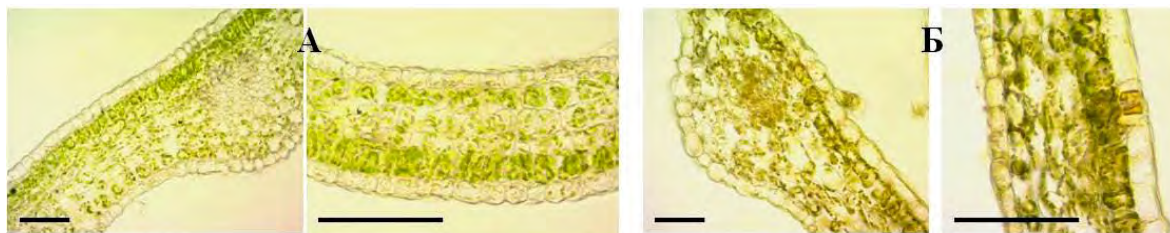


Рис. 5. Структура листовых пластинок двух сортов хурмы восточной в культуре *in vitro* А – сорт Золотистая; Б – сорт Никитская Бордовая; масштабный трезок – 100 мкм.

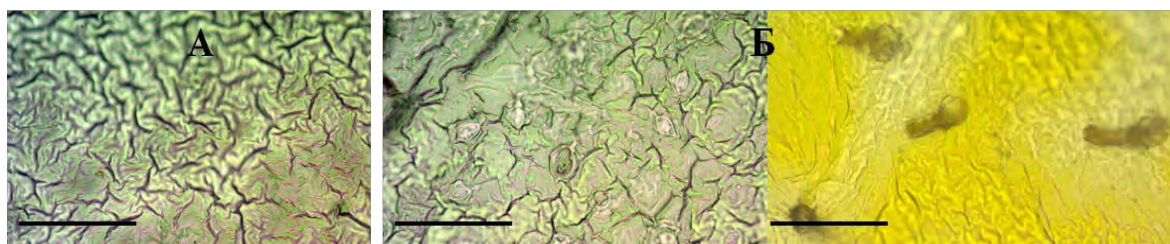


Рис. 6. Слелки покровных тканей листовых пластин хурмы восточной сорта Никитская Бордовая, культивируемых *in vitro* А – адаксиальный эпидермис; Б – абаксиальный эпидермис; масштабный трезок – 100 мкм.

Мезофилл дифференцирован, коэффициент палисадности низкий – 0,33. Эпидерма покрыта простыми 1–2-клеточными волосками 167–303 мкм длиной, устьица аномоцитного типа (80–106 уст/мм²). Оводненность листьев высокая – 83–91 %, на долю связанной воды приходится 14–28 % (выше водоудерживающая способность у регенерантов сорта Никитская Бордовая). Оба сорта фотосинтезируют активно: $(F_m - F_{st})/F_m = 0,54 - 0,60$ отн. ед.

Проведенный анализ позволяет оценить изученные сорта хурмы восточной как высоко адаптивные, перспективные для сохранения и культивирования в условиях *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изучен морфогенетический потенциал 2-х сортов хурмы восточной и показаны пути прямой и непрямой регенерации микропобегов. Выявлена индуцирующая роль БАП (4,0–5,0 мг/л) в питательной среде МС на этапе индукции побегообразования, обеспечивающая стабильную прямую регенерацию микропобегов из вегетативных почек хурмы. Показано, что наличие в питательной среде МС 1,1 и 1,7 мг/л ТДЗ вызывало формирование адвентивных почек и микропобегов в морфогенном каллусе в культуре высечек листа путем непрямого органогенеза. Гистологический анализ морфогенного каллуса хурмы сорта Никитская Бордовая показал наличие зон активно пролиферирующих клеток, которые дают начало меристемам микропобегов. Выявлены структурные и метаболические особенности вегетативных органов двух сортов хурмы на этапе регенерации микропобегов *in vitro*. Проведенный анализ позволил оценить изученные сорта хурмы как высоко адаптивные, перспективные для сохранения в генобанке и культивирования в условиях *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-50-00079.

Список литературы

- Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособ. – М.: ФГК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
- Здрийковская-Рихтер А. И. Эмбриокультура изолированных зародышей, генеративных структур и получение новых форм растений – Симферополь, Крым: Фарм-Трейддинг, 2003. – 368 с.
- Иванова Н. Н., Митрофанова И. В., Хохлов С. Ю. Особенности введения эксплантов хурмы восточной в условия *in vitro* // Бюллетень Никитского ботанического сада. – 2016а. – Вып. 119. – С. 45–51.
- Иванова Н. Н., Хохлов С. Ю., Митрофанова И. В. Различные пути регенерации растений *Diospyros kaki* Thunb. сорта Золотистая в условиях *in vitro* // Бюллетень Никитского ботанического сада. – 2016б. – Вып. 120. – С. 24–30.
- Иванова Н. Н., Митрофанова И. В., Кузьмина Т. Н., Хохлов С. Ю. Регенерация микропобегов в культуре высечек листьев хурмы восточной // Матер. Междунар. научн. конф. «Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира», посвященной 85-летию Центрального ботанического сада НАН Беларуси, 6–8 июня 2017 г, Минск. – 2017. – С. 209–212.
- Казас А. Н., Литвинова Т. В., Мязина Л. Ф. и др. Субтропические плодовые и орехоплодные культуры: научно-справочное издание – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2012. – 304 с.
- Лищук А. И. Методика определения водоудерживающей способности к обезвоживанию листьев плодовых культур. Физиологические и биофизические методы в селекции плодовых культур: методические рекомендации. М.: ГНБС, 1991. – С. 33–36.
- Митрофанова И. В., Казас А. Н., Хохлов С. Ю. Особенности клонального микроразмножения хурмы // Бюллетень Никитского ботанического сада. – 1998. Вып. 80. – С. 153–158.
- Митрофанова И. В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур – К: Аграрна наука, 2011. – 344 с.
- Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1990. – 283 с.
- Шевченко С. В., Чеботарь А. А. Особенности эмбриологии маслины европейской (*Olea europaea*) // Цитолого-эмбриологические исследования высших растений. – Ялта, 1992. – Т. 133. – С. 52–61.
- Bhojwani S. S., Dantu P. K. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. (New Delhi, Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer), 2013. – 309 p. DOI 10.1007/978-81-322-1026-9
- Brailko V., Ivanova N., Mitrofanova I. *In Vitro* Morphogenetic Capacity of Persimmon Microshoots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. – 2017a. – Vol. 53. – P. 52 <http://dx.doi.org/10.1007/s11626-017-0156-z>.
- Brailko V. A., Mitrofanova I. V., Ivanova N. N., Mitrofanova O. V. Morphological, anatomical and physiological features of *in vitro* regenerants in various persimmon and common fig cultivars // Systems Biology and Bioinformatics. Abstracts of the Ninth International Young Scientists School SBB. – Yalta, Russia, 25-30 June, 2017. – Novosibirsk.: ICG SB RAS, 2017b – P. 17–18.
- Cooper P. A., Cohen D. Micropropagation of Japanese persimmon *Diospyros kaki* // Comb. Proc. Int. Plant Prop Soc. – 1985. – Vol. 34. – P. 118–124.
- Kyte L., Kley J., Scoggins H., Bridgen M. Plants from Test Tubes: An introduction of Micropropagation, 4th edn Portland, OR, US: Timber Press, 2013. – 274 p.
- Kochanov Z., Onus N., Brindza 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. 10.2478/v10146-011-0012-9 <http://joa.zf.jcu.cz>; <http://versita.com/science/agriculture/joa>.
- Liu Y., Ma J., Tang X., Song C. Study on the adventitious shoot regeneration of persimmon leaves // Hubei Agri Sci. – 2006. – Vol. 45 – P. 618–621.
- Mitrofanova I. V., Mitrofanova O. V. Development of recipient system of woody subtropical plants *in vitro* // Acta Univ. Latviensis Biol. – 2004. – Vol. 676. – P. 189–196.
- Mitrofanova I., Ivanova N., Kuzmina T. Microshoots regeneration from different types of persimmon explants *in vitro* // Production and Establishment of Micropropagated Plants (PEMP Brasil). Abstracts of 7th International Symposium. Larvas, Brasi, 24-28 April, 2017. – Larvas-UFLA. Brazil, 2017a. – P. 45.
- Mitrofanova I., Ivanova N., Kuzmina T., Khokhlov S. Features of microshoots *in vitro* regeneration from various explants in three persimmon cultivars // Pomegranate and Minor Mediterranean Fruits. Book of Abstracts of IV International Symposium. Elche, Spain, 18-22 September, 2017. – Valencia: IVIA, 2017b. – P. 21.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. Vol. 15, N3. – P. 473–497. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Naval M. M., Llacer G., Badenes M. L., Giordan E. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of the persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cv. «Rojo Brillante» // Acta Hort – 2009. – Vol. 833. – P. 183–186 10.17660/ActaHortic.2009.833.29.
- Stirbet A., Govindjee J. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2011. – Vol 104. – P. 236–257. 10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010.
- Tao R., Murayama H., Moriguchi K., Sugiura A. Plant regeneration from callus cultures derived from primordial leaves of adult persimmon // Hort Science – 1988. – Vol. 23. – P. 1055–1056.
- Tetsumura T. Effect of types of cytokinin used *in vitro* shoot proliferation of persimmon on the subsequent rooting of shoots // Acta Hort. – 1997. – Vol. 436. – P. 143–148. 10.17660/ActaHortic. 1997.436.15.

Ivanova N. N., Mitrofanova I. V., Brailko V. A., Kuzmina T. N., Khokhlov S. Yu. Biotechnological methods of the Persimmon propagation // Ekosystemy. 2017. Iss. 11 (41). P. 60–67.

The article presents the results of biotechnological methods usage in the propagation of two *Diospyros kaki* Thunb. cultivars. The inducing effect of BAP in MS culture medium at the stage of shoot formation induction, providing permanent direct microshoot regeneration from vegetative buds of the persimmon, was revealed. It was demonstrated that TDZ presented in MS medium promoted microshoot formation via indirect organogenesis under the leaf cuttings culture. The data of callus histological studies is presented. Vegetative organs structural and metabolic special features at the stage of microshoot regeneration *in vitro* in two persimmon cultivars were revealed.

Key words: *Diospyros kaki*, vegetative bud, leaf cutting, callus, adventive microshoots.

Поступила в редакцию 15.09.2017