

УДК 634.45:57.085.2

ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ ЭКСПЛАНТОВ ХУРМЫ ВОСТОЧНОЙ В УСЛОВИЯ IN VITRO**Наталья Николаевна Иванова, Сергей Юрьевич Хохлов,
Ирина Вячеславовна Митрофанова**Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Республика Крым, г.Ялта, пгт Никита
invitro-plant@mail.ru

Разработаны способы получения асептической культуры хурмы в условиях *in vitro* для закрытых почек в период покоя и почек в период активного роста побегов. Установлены концентрации реагентов, время воздействия и последовательность применения. Определены оптимальные сроки отбора исходного растительного материала хурмы. Выявлены особенности развития первичных эксплантов изучаемых сортов хурмы на этапе введения в условия *in vitro* на различных базовых питательных средах. Показано влияние регуляторов роста в питательной среде на регенерацию микропобегов хурмы.

Ключевые слова: *Diospyros kaki*; эксплант; морфогенез; регенерация; микропобег

Введение

Родина восточной хурмы (*Diospyros kaki* Thunb.) – Северный и Центральный Китай. В Никитский ботанический сад хурма восточная завезена в конце XIX века, где была заложена небольшая плантация сортами, полученными из Франции. В коллекции Никитского ботанического сада насчитывается 82 сорта и 3 вида. Плоды хурмы богаты витаминами и полифенольными веществами. Хурма – полигамно-двудомное растение, дающее ягоды в результате партенокарпии или опыления и оплодотворения. Плоды имеют высокую пищевую ценность, могут быть терпкими или нет в зависимости от растворимости танинов и их содержания в период созревания [4]. Спрос на субтропические культуры значительно опережает предложения производства. Однако развитие южного садоводства сдерживают инфекционные болезни, которые вызывают ухудшение физиологического состояния растений хурмы и тем самым наносят значительный экономический ущерб [15, 17]. Разработка биотехнологических методов оздоровления и клонального микроразмножения садовых растений – наиболее эффективный путь использования методов клеточной и геномной инженерии, который позволяет улучшить качественные показатели выращиваемых сортов и видов, повысить коэффициент их размножения.

Первые исследования по культуре ткани хурмы привели к формированию проростков из каллуса, полученного из незрелых зародышей [3, 21]. Позже образование вегетативных почек было индуцировано в каллусе из камбия взрослых деревьев [11], получена прямая регенерация из почек [6]. Однако массовое размножение через культуру *in vitro* никогда не применялось для *D. kaki* [20]. Наряду с этим лимитирующими факторами культивирования являются сложность введения в условия *in vitro* многих сортов хурмы восточной, что проявлялось в потемнении ткани, низкой способности к укоренению микрочеренков и низкой приживаемости при адаптации *in vivo*.

Цель наших исследований – выявить морфогенетический потенциал эксплантов хурмы на начальных этапах культивирования, получить асептическую культуру и

изучить особенности развития первичных эксплантов растений сортов Мечта, Никитская Бордовая и Южная Красавица.

Объекты и методы исследования

Объекты исследования – сорта хурмы восточной (*Diospyros kaki* Thunb.): Мечта, Никитская Бордовая и Южная Красавица. Многолетние растения, до 12-15 м высотой. Листья овальные, крупные, цельнокрайние, перед опадением краснеют. Деревья двудомные или полигамные. Цветки трех типов: мужские (тычиночные), женские (пестичные), обоеполые – проявляются на побегах текущего года. Плод – крупная мясистая ягода, сильно варьирующая по всем признакам: размерам, форме, цвету кожицы, консистенции и цвету мякоти [4].

Для введения в культуру *in vitro* хурмы использовали одревесневшие черенки со спящими и полураскрытыми почками; отросшие верхушки побегов; вегетативные почки вызревших побегов текущего года. Отбирали почки типичной формы, крупные, без повреждений. Растительный материал разрезали на узловыe сегменты длиной 2-3 см. Введение почек хурмы в течение всего периода развития (с января по ноябрь) дало возможность определить оптимальные сроки отбора первичных эксплантов и подобрать состав питательной среды для индукции побегообразования.

В работе придерживались общепринятых и разработанных в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений методов [5, 7, 19]. Стерилизацию инструментов, фольги, посуды осуществляли в горячевоздушном стерилизаторе STERICELLS (Чехия).

Для поверхностной стерилизации эксплантов в качестве стерилизующих агентов были использованы 70-96%-ный раствор этанола (C_2H_5OH), 1%-ный раствор Thimerosal («Merk», Германия), 2,0-4%-ный раствор гипохлорита натрия ($NaClO$ «Sigma», США), 0,08%-ный раствор нитрата серебра ($AgNO_3$, «Sigma», США) и 0,15-0,3%-ный раствор препарата «Дез ТАБ» (действующие вещества: трихлоризоциануровая кислота ($C_3O_3N_3Cl_3$) ТХЦК-45%, натриевая соль дихлоризоциануровой кислоты Na-соль ДХЦК-20%, «Медпроминвест», Украина) и их комбинации. Время экспозиции зависело от генотипа, происхождения, типа и размера экспланта. Стерилизацию сегментов побега с почками проводили в несколько этапов. Для снижения первичной контаминации побеги с почками предварительно ополаскивали в мыльном растворе, промывая в водопроводной и дистиллированной воде, и протирали 96%-ным этиловым спиртом. В качестве контроля использовали обработку растительного материала 70%-ный раствор этилового спирта.

В экспериментах были использованы модифицированные питательные среды: MS (Murashige, Skoog) [16], WPM (Woody Plant Medium – McCown, Lloyd, 1980) [13], B5 (Gamborg, Eveleigh) [9] и QL (Quoirin, Lepoivre, 1977) [18]. Для регуляции процессов морфогенеза в питательные среды вводили регуляторы роста растений: зеатин, 6-бензиламинопурин (БАП), индоллил-3-масляную кислоту (ИМК) («Sigma», США) в различных концентрациях и сочетаниях. При проведении хемотерапии *in vitro* использовали рибавирин в концентрации 5-10 мг/л. pH питательной среды доводили с помощью 0,1 н. раствора HCl и 0,1 н. раствора KOH до 5,7 перед автоклавированием (условия автоклавирования питательных сред: давление 0,7-0,8 атм., температура 120 °C в течение 20 мин в автоклаве / стерилизаторе LAC 5060S (фирмы DAINAN LABTECH, Южная Корея). Все исследования проводили в асептических условиях в боксе биологической безопасности второго класса SC2 (фирма ESCO, Сингапур). Колбы и пробирки с эксплантами содержали в культуральной комнате с 14-16-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения 2-3 клк при температуре 24-25 °C.

Субкультивирование эксплантов проводили через 3-4 недели. Каждую серию опытов выполняли трижды в десятикратной повторности. Учитывали регенерационную способность культивируемых эксплантов для каждого генотипа (частота индукции микропобегов и число вновь полученных микропобегов на эксплант), а также среднее значение удлинения регенерантов. Всю обработку данных осуществляли с помощью программы STATISTICA for Windows, 6.0 (StatSoft, Inc. 1984-2001).

Результаты и обсуждение

Вегетативные почки используются в качестве первичного экспланта для индукции регенерации растений и получения генетически однородного растительного материала [1, 2, 5, 6]. Основным требованием при введении исходного экспланта в условия *in vitro* является отсутствие фитопатогенов, что достигается поверхностной стерилизацией одним или несколькими реагентами. В ряде научных публикаций [2, 5, 8, 10] представлены сведения о приемах стерилизации различных культур. Проведенные нами исследования показали, что в процессе стерилизации происходит значительное повреждение растительных тканей и это в дальнейшем приводит к потере жизнеспособности эксплантов. Часто необходимо для каждой культуры, а иногда и сорта подбирать наименее токсичные и эффективные реагенты, последовательность их применения и время воздействия на растительные ткани.

Для получения асептической культуры хурмы нами было изучено действие различных стерилизующих реагентов, их концентраций и экспозиций в течение всего времени отбора исходного растительного материала (с января по ноябрь).

С апреля по июнь регенерационная активность эксплантов была низкая (рис. 1).

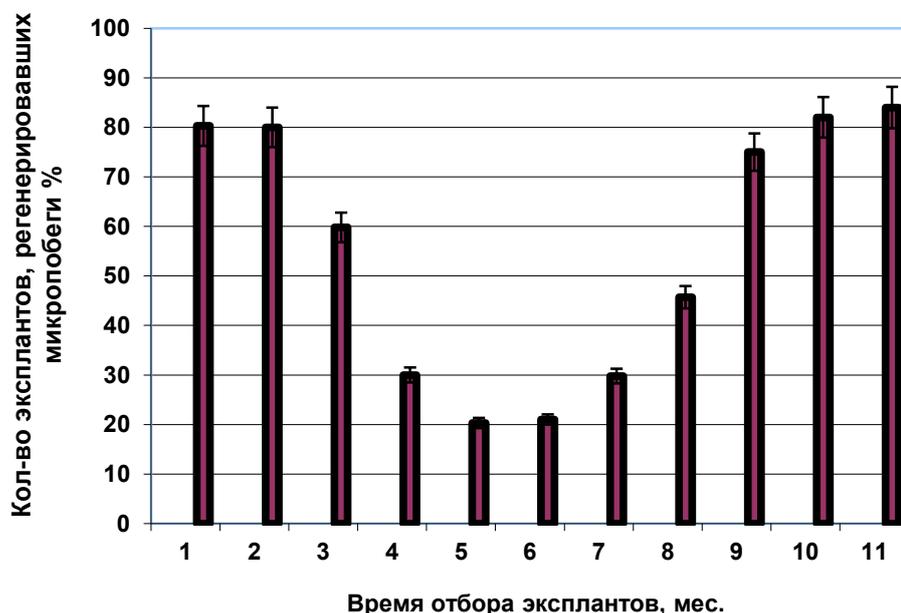


Рис. 1 Зависимость регенерационного потенциала вегетативных почек хурмы от времени отбора первичных эксплантов

Максимальное количество жизнеспособных эксплантов, регенерировавших микропобеги, было получено в январе-феврале (закрытые почки) и в сентябре-ноябре (вегетативные почки молодых вызревших побегов). Проведено сравнительное изучение различных способов стерилизации, учитывая в экспериментах количество

инфицированных, потемневших и развившихся почек (табл. 1). При использовании 70%-ного раствора этилового спирта (контроль) уровень контаминации достигал 98%.

Как видно из таблицы 1, для закрытых почек, изолированных в феврале-марте, оптимальной оказалась ступенчатая стерилизация, путем погружения растительного материала в 70%-ный этанол, а затем в 1%-ный раствор Thimerosal и 0,08%-ный раствор нитрата серебра. После каждого реагента экспланты промывали в стерильной дистиллированной воде. Данный способ стерилизации позволил получить до 80% эксплантов, свободных от контаминации. При этом в дальнейшем 50% эксплантов не изменяли окраску и проявляли способность к морфогенезу.

Таблица 1

Результаты стерилизации различными способами закрытых вегетативных почек хурмы

Способ стерилизации	Время стерилизации, мин	Количество вегетативных почек, %		
		инфицированных	некротизировавшихся	развившихся
70 % p-p C ₂ H ₅ OH (контроль)	15	98,0 ± 7,8	2,0 ± 0,3	0,0
96 % p-p C ₂ H ₅ OH 1% p-p Thimerosal	1 10	75,0 ± 6,7	23,0 ± 4,1	2,0 ± 0,3
70 % p-p C ₂ H ₅ OH 2% p-p NaClO	1 18	67,0 ± 7,0	27,0 ± 3,2	6,0 ± 2,6
70 % p-p C ₂ H ₅ OH 4% p-p NaClO	1 18	50,0 ± 4,0	45,0 ± 4,2	5,0 ± 2,0
70 % p-p C ₂ H ₅ OH 2% p-p NaClO 1% p-p Thimerosal	1 10 10	40,0 ± 6,2	50,0 ± 5,4	10,0 ± 0,3
70 % p-p C ₂ H ₅ OH 4% p-p NaClO 1% p-p Thimerosal	1 10 10	25,0 ± 4,4	60,0 ± 0,9	15,0 ± 2,3
70 % p-p C ₂ H ₅ OH 0,3% p-p Дез ТАБ	1 15	40,0 ± 6,2	55,0 ± 4,9	5,0 ± 0,98
70 % p-p C ₂ H ₅ OH 0,3% p-p Дез ТАБ 1% p-p Thimerosal	1 10 10	30,0 ± 2,4	66,0 ± 7,1	4,0 ± 1,1
70 % p-p C₂H₅OH 1% p-p Thimerosal 0,08% p-p AgNO₃	1 10 6	20,0 ± 1,3	30,0 ± 4,1	50,0 ± 5,4

Использование 2%-ного раствора гипохлорита натрия в качестве стерилизующего вещества не способствовало значительному снижению уровня контаминации. В этом случае количество инфицированных эксплантов составляло 67%. Обработка растительного материала 4%-ым раствором гипохлорита натрия в течение 18 мин также оказалась мало эффективной. Кроме того, основную часть составляла скрытая инфекция, которая проявлялась через 2-3 недели культивирования. Увеличение экспозиции стерилизации вызывало потемнение тканей уже на вторые сутки культивирования, что в дальнейшем приводило к гибели экспланта. Дополнительное применение 1%-ного раствора Thimerosal увеличивало выход стерильных (60-75%), однако при этом отмечали малое количество развившихся эксплантов (10-15%).

Для раскрытых почек и сегментов зеленых вызревших побегов оптимальным оказалось применение 70%-ного этанола 1 мин, медицинского дезинфектора Дез ТАБ (0,3%-ого активного хлора в растворе) 8-15 мин и 1%-ного раствора Thimerosal 10 мин. Уровень контаминации составил 15-20% [14]. У изолированных жизнеспособных, стерильных эксплантов в дальнейшем активно развивались микропобеги.

В процессе изучения морфогенетических потенций вегетативных почек хурмы 3-х исследуемых сортов на этапе введения в культуру *in vitro* испытывали различные питательные среды, содержащие минеральные соли по прописи МС, В5, WPM и QL, дополненные БАП и зеатином. Проведенные эксперименты показали, что в течение 10-15 суток от начала культивирования на всех испытываемых средах почки оставались зелеными и увеличивались. Однако в дальнейшем большая часть эксплантов на питательной среде QL темнела и развитие прекращалось. На питательных средах В5 и WPM почки развивались в течение 27-30 суток, формировали розетку из 1-2 листочков, затем развитие прекращалось. На модифицированной питательной среде МС с уменьшенной вдвое концентрацией азота, наблюдали активное разрастание почки, формирование побега и листьев, образование плотного морфогенного каллуса в базальной части микропобега. Это обусловило использование ее в качестве основы для дальнейших исследований.

Известно, что на этапе введения в условия *in vitro* происходит выделение полифенолов на месте среза экспланта [11, 12]. Высокое их содержание в тканях хурмы восточной, включая пазушные почки вызывало потемнение и окисление среды, а также отмирание тканей при введении в культуру *in vitro*. Для снижения отрицательного воздействия на растительные ткани полифенолов в качестве антиоксиданта на этапе введения в условия мы использовали аскорбиновую кислоту в концентрации 50 мг/л, а также помещали изолированные экспланты в условия низкой освещенности или проводили частые пассажи эксплантов на свежеприготовленные среды, что несколько снижало ингибирующее действие фенолов и способствовало повышению жизнеспособности эксплантов, при этом повышая затратную часть эксперимента.

В асептических условиях вегетативные почки вместе с микрощитком отделяли от побега материнского растения. Затем удаляли чешуи и примордиальные листья. Индукцию развития эксплантов осуществляли на модифицированной питательной среде МС, дополненной БАП или зеатином при pH 5,7. Для оздоровления от вирусной инфекции нами проведено испытание вироцида – рибавирина путем добавления его различных концентраций в питательные среды с последующим введением первичных эксплантов в условия пробирки.

В результате установлено, что рибавирин в концентрации – 5-10 мг/л на этапе индукции развития первичных эксплантов оказывал противовирусное действие. Наряду с этим введение рибавирина в питательную среду замедляло развитие эксплантов по сравнению со средой без вироцида на 5-6 суток.

Эксперименты показали, что испытанные нами регуляторы роста оказывали различное влияние на рост основного микропобега и активацию пазушных почек, которое наблюдали в течение первого пассажа (рис. 2). Выявлены различия в концентрации цитокининов в питательной среде в зависимости от времени введения исходных эксплантов в условия *in vitro*. Так, для закрытых вегетативных почек, изолированных в период покоя, оптимальная концентрация БАП на этапе введения эксплантов составляла 1,0-2,0 мг/л (табл. 2). Одновременно с развитием основного побега было отмечено формирование 1-2 почек в плотном каллусе, который формировался в основании побега. У развивающихся почек на 3 неделе культивирования наблюдали выдвижение листьев.

Низкие концентрации БАП (0,3-0,5 мг/л) не способствовали активной регенерации микропобегов. В основании экспланта происходило образование рыхлого каллуса, который тормозил индукцию побегообразования. На питательной среде МС, дополненной 0,8-1,5 мг/л БАП формировалось до $2,5 \pm 0,3$ микропобегов на эксплант.

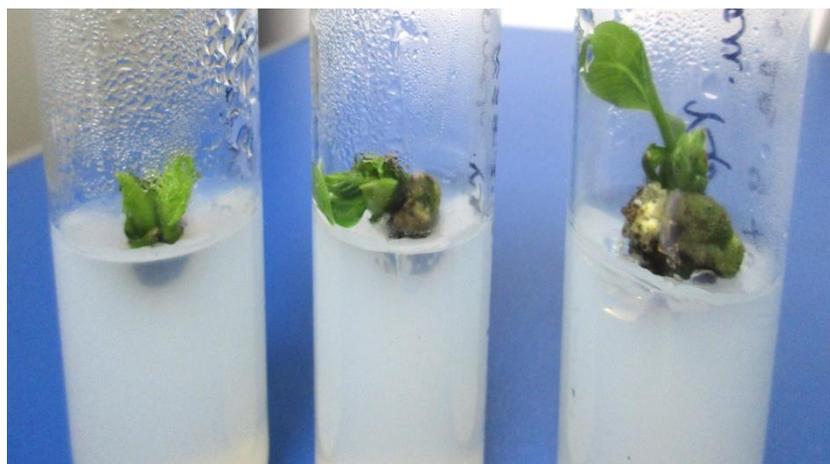


Рис. 2 Индукция развития первичного экспланта хурмы сорт Южная Красавица на питательной среде МС, дополненной БАП и рибавирином

Для вегетативных почек молодых побегов низкие концентрации БАП оказались также малоэффективными. Максимальное количество нормально сформированных микропобегов $2,8 \pm 0,4$ было получено на питательной среде, дополненной 1,0-1,5 мг/л БАП. Дальнейшее повышение концентрации БАП на этапе введения в условия *in vitro* до 2,0 мг/л позволило получить $3,0 \pm 0,3$ микропобегов на эксплант. Однако при этом у части эксплантов наблюдали развитие укороченных оводненных микропобегов с крупными листьями, не характерных для исследуемых сортов.

Таблица 2

Влияние концентрации БАП и зеатина на регенерацию микропобегов из вегетативных почек хурмы в культуре *in vitro*

Концентрация цитокинина, мг/л	Среднее количество микропобегов/ на изолированную почку	
	закрытые почки	почки молодых побегов
Контроль*	$0,3 \pm 0,02$	$0,2 \pm 0,01$
БАП		
0,3	$0,6 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,2$
0,5	$1,0 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,3$
0,8	$1,1 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,2$
1,0	$2,0 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,3$
1,5	$2,5 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,4$
2,0	$2,7 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3$
зеатин		
0,3	$0,7 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,3$
0,5	$1,2 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,3$
0,8	$1,7 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$
1,0	$2,4 \pm 0,4$	$2,5 \pm 0,2$
1,5	$2,6 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,3$

Примечание *Контроль – питательная среда без цитокинина

При концентрации зеатина в питательной среде 0,3-0,5 мг/л получено в среднем $0,7 \pm 0,2$ и $1,2 \pm 0,3$ микропобега на эксплант. Увеличение концентрации до 1,0-1,5 мг/л позволило получить в среднем до $2,4 \pm 0,4$ и $2,6 \pm 0,3$ микропобегов хурмы на эксплант.

В процессе выполнения эксперимента установлена зависимость морфогенетических реакций органов и тканей от генотипа растения. Экспланты сортов Мечта, имеющие более крупные почки размером 0,5 см развивались на 5-7 суток быстрее, чем экспланты сортов Никитская Бордовая и Южная Красавица (размер почки

0,3 см). Через 4 недели у отдельных сортов микропобег достигал 0,6-0,8 см, а на 8-й неделе – 2-2,5 см с 3-4 междоузлиями (рис. 3). Одновременно с развитием главного побега было отмечено формирование 1-2 адвентивных почек в основании микропобега.



Рис. 3 Микропобеги хурмы сорт Мечта на питательной среде МС, дополненной БАП: а) после 4 недель культивирования; б) после 8 недель культивирования

Дальнейшее субкультивирование микропобегов и микрочеренков на свежеприготовленные среды способствовало их росту и закладке адвентивных почек. Полученные микропобеги визуально не имели морфологических изменений.

Выводы

Таким образом, в процессе исследований разработаны приемы получения асептической культуры эксплантов хурмы на основе ступенчатой стерилизации с использованием 70%-ного этанола, 1%-ого Thimerosal, 0,08%-ного раствора нитрата серебра и 0,3%-ного раствора препарата Дез ТАБ, что позволило получить стерильные жизнеспособные экспланты для введения в условия *in vitro*. Определены оптимальные сроки отбора первичных эксплантов хурмы 3 сортов для введения в условия *in vitro*: закрытые вегетативные почки в период покоя (январь-февраль), а также почки ювенильных побегов (сентябрь-ноябрь). Установлены особенности индукции морфогенеза вегетативных почек в условиях *in vitro* и подобраны оптимальные концентрации регуляторов роста (зеатина и БАП) в питательной среде МС для индукции развития и регенерации микропобегов.

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

Список литературы

1. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений: учебник. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2002. – 232 с.
2. Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур // Сб. науч. труд. Никит. ботан. сада. – 1997. – Т. 119. – 200 с.
3. Здруйковская-Рихтер А.И. Эмбриокультура изолированных зародышей, генеративных структур и получение новых форм растений. – Симферополь: Крым-Фарм-Трейдинг, 2003. – С. 290-292.
4. Казас А.Н., Литвинова Т.В., Мязина Л.Ф. Синько Л.Т., Хохлов С.Ю., Чернобай И.Г., Шишкина Е.Г. и др. Субтропические плодовые и орехоплодные культуры: научно-справочное издание. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2012. – С. 172-191.
5. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.

6. Митрофанова И.В., Казас А.Н., Хохлов С.Ю. Особенности клонального микроразмножения хурмы // Бюлл. Гос. Никит. ботан. сада. – 1998. – Вып. 80. – С. 153-158.
7. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Сб. науч. труд. Никит. ботан. сада. – 1999. – Т. 118. – С. 189-199.
8. Brown D.C.W., Thorpe T.A. Plant regeneration by organogenesis // Cell culture and somatic cell genetics of plants. III. / Ed. I.K. Vasil. – Oriando: Florida: Acad. Press Inc., 1986. – P. 49–65.
9. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – V. 46, N 5. – P. 417-421.
10. Christianson M.I. Warnik D.A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process // HortSci. – 1988. – Vol. 23, N 3. – P. 515–519.
11. Cooper P.A., Cohen D. Micropropagation of Japanese persimmon *Diospyros kaki* // Comb. Proc. Int. Plant. Prop. Soc. – 1984. – Vol. 34. – P. 118-124.
12. Jain S.M., Ishii K. *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. – Netherlands: Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers, 2003. – 852 p.
13. Lloyd G., McGown B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture // Proc. Inter. Plant Prop. Soc. – 1980. – Vol. 30. – P. 421-427.
14. Mitrofanova I., Ivanova N. Biotechnological approaches of persimmon explants introduction to *in vitro* culture // Abstract Book of II. Intl. Plant Breeding Cong-ress and Eucar-pia – Oil and Protein Crops Section Conf. (November 1-5, 2015, Antalya, Turkey). Antalya, 2015. – P. 119.
15. Mitrofanova I., Mitrofanova O., Chirkov S., Lesnikova Sedoshenko N., Chelombit S. Detection and Identification of Plum Pox Virus of *Prunus* species in Crimea // Jornal Agriculture & Forestry. – 2015. – Vol. 61 (4). – P. 194-204.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V.15, N 3. – P. 473-497.
17. Nakaune R., Nakano M. Identifikation of a new Apocaviroid from Japanese persimmon // *Ann Phytopathological Soc Jpn.* – 1994. – N 60. – P. 739.
18. Quoirin M., Lepoivre P. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus* / M.Quoirin, P.Lepoivre // *Acta Hort.* – 1977. – № 78. – P. 437-442.
19. Thorpe T.A., Harry I.S Application of tissue culture to horticulture // *Acta Hort.* – 1997. – N 447. – P. 39–49.
20. Yamado M. Persimmon propagation, orchard planting, training and pruning in Japan // *Adv. Hortic Sci* – 2008. – Vol. 4. – P. 269-273.
21. Yokoama T., Takeuchi M. The induction and formation of organs cultures from twigs of mature Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) // *J. Jpn. Soc. Hortic Sci.* – 1981 – Vol. 49. – P. 557-562.

Статья поступила в редакцию 14.03.2016 г.

Ivanova N.N., Khokhlov S.Yu., Mitrofanova I.V. Special features of *Diospyros kaki* Thunb. explants introduction *in vitro* // *Bull. of the State Nikit. Botan. Gard.* – 2016. – № 119. – P. 44 – 51.

Establishment techniques of *in vitro* aseptic culture for *Diospyros kaki* closed buds during dormancy period and buds while active shoot growth were developed in terms of the research. Concentration of favorable reagents, their treating time and sequence of application were found out as well. The most advantageous terms for yielding of *Diospyros kaki* starting material were determined in this way. Special features of initial explants` development were revealed while introduction *in vitro* conditions applying various basic nutrient mediums. Impact of plant growth regulators on regeneration of *Diospyros kaki* microshoots in nutrient medium was demonstrated in this work.

Key words: *Diospyros kaki*; explants; morphogenesis; regeneration; microshoot.