




ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO ЭНДЕМИЧНОГО, ИСЧЕЗАЮЩЕГО ВИДА *AMYGDALUS LEDEBOURIANA* ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ

Исламова С.С.¹, Нуртаза А.С.^{1,3} , Дюсембекова Д.А.^{1,3} , Нармахан К.Н.^{1,2}, Садакова Б.Д.⁴, Серкебаев А.С.⁴, Какимжанова А.А.^{1,3} 

¹ТОО «Национальный центр биотехнологии», 010000, Казахстан, Астана, Кургальжинское шоссе, 13/5

²НАО «Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилёва», 010000, Казахстан, Астана, ул. К. Сатпаева, 2

³ТОО «Greenlab», 010000, Казахстан, Астана, Кургальжинское шоссе, 13/5

⁴РГУ «Государственный национальный природный парк «Тарбагатай»

*kakimzhanova@biocenter.kz

АБСТРАКТ

В статье представлены результаты исследований по сохранению редкого исчезающего вида растений миндаля Ледебуря (*Amygdalus ledebouriana*) в условиях *in vitro*. Этот вид миндаля отличается высокой устойчивостью к засухе и низким температурам, а также плоды обладают значительной пищевой ценностью. Ранее не проводились исследования по микроклональному размножению миндаля Ледебуря. Авторами данной работы подобраны эффективная стерилизация и введение эксплантов миндаля Ледебуря в культуру *in vitro*, в качестве стерилизующего агента выбран 9% раствор перекиси водорода с режимом стерилизации 5 мин, где жизнеспособность эксплантов достигла до 75%. Также для мультипликации оптимизирован состав питательной среды QL с добавлением БАП 0,25 мг/л, который позволил получить 7,24 новых побега на эксплант. В настоящее время микроклонально размножено 400 микропобегов. Создана коллекция в культуре *in vitro* трех популяций исчезающего вида миндаля Ледебуря.

Ключевые слова: культура *in vitro*, *Amygdalus ledebouriana*, питательная среда QL, микроклональное размножение, стерилизующие агенты, микропобеги.

ВВЕДЕНИЕ

Растения имеют большое значение для природного баланса, но всё чаще оказываются под воздействием неблагоприятных факторов [1]. В условиях глобальных изменений окружающей среды и разрушения природных местообитаний сохранение биоразнообразия становится одной из первостепенных задач. Утрата растительных видов не только снижает флористическое разнообразие, но и ведет к необратимой потере генофонда, что обусловлено изменением среды обитания, антропогенным воздействием, нерациональным использованием ресурсов, вырубкой лесов, загрязнением и климатическими изменениями [2].

Эндемичные растения играют важную роль в изучении истории флоры и растительности различных регионов, поскольку они являются неотъемлемой частью биоразнообразия и служат индикаторами территорий с высокой природной ценностью, что подтверждается возросшим в последние годы научным интересом и увеличением количества исследований в этой области [3]. Согласно данным современных ботанических исследований, в Казахстане насчитывается около 451 эндемичного вида сосудистых растений [4]. Среди них особый интерес представляют редкие и локально распространенные виды, такие как миндаль Ледебуря (*Amygdalus ledebouriana*) из рода *Prunus*, семейства *Rosaceae*. Данный эндемичный кустарник встречается в пределах ГНПП «Тарбагатай», где образует обширные заросли и полосы в центральной части южного склона хребта Тарбагатай [5].

Впервые *Amygdalus ledebouriana* Schltldl. обнаружен и описан немецким ботаником Шлехтендалем, а первые сведения были опубликованы в 1854 году в издании *Abhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft zu Halle*

(том 2) [6]. *Amygdalus ledebouriana* произрастает в степях, горах, плато и речных долинах, встречаясь в юго-западном Алтае, на хребте Тарбагатай и в Джунгарском Алатау. Его характерный признак проявляется у генеративных растений в фазе плодоношения и выражается в полуоткрытых плодах с косточкой, имеющей наклонно оттянутое основание [7]. *Amygdalus ledebouriana* преимущественно размножается вегетативно, дополняя половое размножение, цветет с апреля по май, а плоды созревают с июня по июль. Также данный вид миндаля является важным как культурным, так и дикорастущим видом, широко применяемым в озеленении городов Казахстана, а изолированные эндемичные популяции представляют интерес для изучения генетического разнообразия [5]. *Amygdalus ledebouriana* отличаются высокой устойчивостью как к засухе, так и к низким температурам. Плоды обладают значительной пищевой ценностью и представляют интерес для исследований, направленных на возможное медицинское применение. Кроме того, миндаль Ледебуря рассматривается как перспективный источник для получения карликовых подвоев плодовых культур, а также как ценный материал для селекции устойчивых гибридных сортов миндаля [8].

В настоящее время *Amygdalus ledebouriana* включен в «Красную книгу Казахской ССР» как редкий и находящийся под угрозой исчезновения вид, а также внесен в «Красную книгу Центральной Азии», «Красную книгу Республики Казахстан» и Красный список МСОП со статусом *Endangered* (EN), что подчеркивает его высокую природоохранную значимость [9,10,11,12]. Сокращение естественных популяций *Amygdalus ledebouriana* связано с деградацией местообитаний, частыми засухами, изменением пожарного режима, сукцессией, выпасом скота

и урбанизацией [13]. В целях сохранения этого редкого и исчезающего вида Постановлением Правительства Республики Казахстан в 2018 году был создан Государственный национальный природный парк «Тарбагатай» (Восточно-Казахстанская область, Урджарский район) [5]. Однако, несмотря на предпринятые усилия по сохранению природы, биоразнообразие продолжает сокращаться, и даже увеличение площади охраняемых территорий не приводит к существенному росту числа охраняемых видов. Поэтому сохранение растительных ресурсов становится одной из приоритетных задач современности. Новые биотехнологические методы представляют собой перспективное направление в сельском хозяйстве, так как позволяют преодолеть ограничения традиционного размножения растений [14].

Стратегии сохранения биоразнообразия включают различные подходы, в том числе методы *in situ* и *ex situ*. Методы *in situ* обеспечивают защиту видов и экосистем в их естественной среде обитания путем создания и расширения заповедников, национальных парков и охраняемых территорий для ограничения антропогенного воздействия. В то же время методы *ex situ* направлены на сохранение видов и их генетических ресурсов за пределами природных мест обитания [15].

Наиболее популярным методом является микроклональное размножение [16]. Метод микроклонального размножения позволяет быстро и массово производить растения в короткие сроки, независимо от вегетационного периода. Это особенно важно для получения здорового посадочного материала, свободного от болезней и вредителей [17]. Данный метод основан на стимуляции развития меристем у растения и обеспечивает возможность получения генетически однородных растений, которые на промышленном уровне называются регенерантами [18]. А также позволяет контролировать различные заболевания растений, такие как вирусные, грибковые и бактериальные инфекции [19]. Метод микроклонального размножения позволяет хранить материал в культуре *in vitro* длительное время. Технология культивирования тканей *in vitro* является важным методом для размножения и сохранения как культивируемых, так и диких видов [1].

Метод микроклонального размножения широко применяется для вегетативного размножения различных видов рода *Prunus*, включая дикие и культурные формы миндаля. В ряде исследований данный подход доказал свою эффективность при размножении родственных видов миндаля, таких как *Prunus dulcis*, *Prunus webbii*, *Prunus scoraria* и других, характеризующихся высокой ценностью в селекции и сохранении генетического разнообразия. Например, успешно разработаны протоколы *in vitro* размножения *Prunus dulcis* (миндаль обыкновенный), позволяющие получать здоровый посадочный материал и

сохранять ценные генотипы [20]. Для дикого вида *Prunus webbii* разработаны методы микроклонального размножения и *in vitro* сохранения с применением замедленного роста [21].

Несмотря на наличие многочисленных исследований по микроклональному размножению различных видов миндаля, в отношении *Amygdalus ledebouriana* такие работы практически отсутствуют, что указывает на необходимость дальнейшего изучения этого вида. Целью исследования было оптимизировать условия стерилизации эксплантов, введение в культуру *in vitro*, микроклональное размножение для сохранения данного вида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

В качестве объекта исследования был использован растительный материал миндаля Ледебуря (*Amygdalus ledebouriana*) (рис. 1, 2). Сбор образцов проводился в Ур-



Рисунок 1. Миндаль Ледебуря

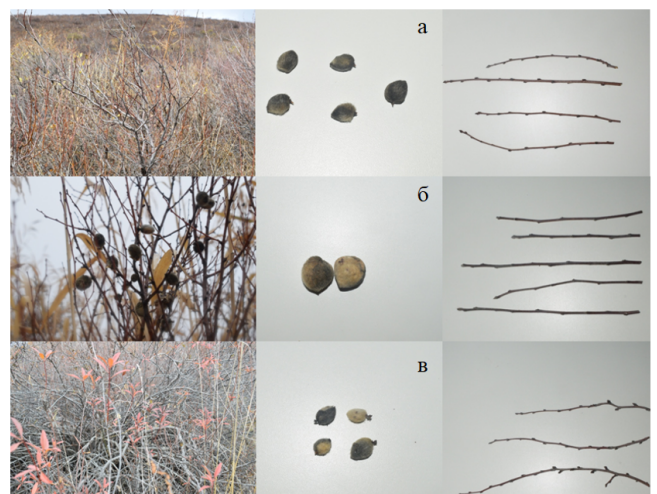


Рисунок 2. Плоды и однолетние побеги миндаля Ледебуря: а — Pop 1, б — Pop 2, в — Pop 3

Таблица 1. GPS-координаты 3-х популяций миндаля Ледебуря на территории Государственного национального природного парка «Тарбагатай»

Популяции	Координаты - Долгота	Координаты - Широта	Координаты - Высота над ур. м.
Pop 1	E081°48'316''	N47°13'719''	в. у.- 1073 м.
Pop 2	E081°47'795''	N47°11'409''	в. у.- 801 м.
Pop 3	E081°44'278''	N47°07'975''	в. у.- 581 м.



Рисунок 3. Карта, сделанная с помощью Google maps Earth, с указанием GPS-координат трёх популярных миндаля Ледебур

джарском районе Абайской области, на территории Государственного национального природного парка «Тарбагатай» (рис. 3, табл. 1). На всех этапах исследования экспланты выращивали в культуральных сосудах, размещённых в фактостатной комнате с установленным светодиодным освещением SMD 5050 60 led/m, фотопериод составил 16/8, при температуре, поддерживаемой в пределах 24–26 °С.

Стерилизация и введение эксплантов в культуру in vitro.

Для инициации культуры *in vitro* использовались пазушные почки однолетних побегов. Для стерилизации эксплантов исследована эффективность различных концентраций растворов перекиси водорода. Основным этапом стерилизации проводился в стерильных условиях ламинарного бокса. Для подбора оптимальной концентрации перекиси водорода были изучены 3 варианта стерилизации: I — 6% H₂O₂, II — 9% H₂O₂, III — 12% H₂O₂, время экспозиции 5 минут. После стерилизации экспланты тщательно промывали стерильной дистиллированной водой и высушивали на стерильной фильтровальной бумаге. Для оценки эффективности стерилизации экспланты культивировали на питательной среде Murashige & Skoog (MS) без фитогормонов. На каждый вариант исследования было высажено по 20 эксплантов.

Регенерация основного побега.

После получения жизнеспособных эксплантов была изучена эффективность различных регуляторов роста растений — 6-бензиламинопурина (БАП), кинетин (КТ), тиазурина (ТДЗ) — для регенерации основного побега в условиях *in vitro*. Для этого была использована питательная среда MS. Таким образом, были изучены следующие варианты: I — контроль (среда MS безгормональная); II — БАП в концентрации 0,75 мг/л; III — КТ 0,75 мг/л; IV — ТДЗ 0,75 мг/л. На каждом варианте исследования культивировалось по 25 эксплантов, наблюдение за ростом и развитием проводилось в течение 21 дня.

Микроклональное размножение.

После получения основного побега в культуре *in vitro* было проведено исследование по микроклональ-

ному размножению. Для этого были выбраны питательные среды: Driver & Kuniyuki Walnut (DKW), MS, Woody Plant Medium (WPM) и Quoirin and Lepoivre (QL) и регулятор роста растений БАП в различных концентрациях. В результате были изучены следующие варианты: I — DKW безгормональная; II — DKW с БАП 0,1 мг/л; III — DKW с БАП 0,25 мг/л; IV — DKW с БАП 0,5 мг/л; V — MS безгормональная; VI — MS с БАП 0,1 мг/л; VII — MS с БАП 0,25 мг/л; VIII — MS с БАП 0,5 мг/л; IX — WPM безгормональная; X — WPM с БАП 0,1 мг/л; XI — WPM с БАП 0,25 мг/л; XII — WPM с БАП 0,5 мг/л; XIII — QL безгормональная; XIV — QL с БАП 0,1 мг/л; XV — QL с БАП 0,25 мг/л; XVI — QL с БАП 0,5 мг/л. На каждый вариант исследования было культивировано по 25 эксплантов, наблюдение проводилось в течение 21 дня.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Стерилизация и введение эксплантов в культуру in vitro.

Обработка эксплантов с целью стерилизации перед введением в культуру *in vitro* является ключевым этапом, определяющим успешность последующего культивирования. Одним из решающих факторов является выбор стерилизующего агента, который должен эффективно подавлять контаминацию при минимальном повреждении тканей. Применение перекиси водорода в качестве стерилизующего агента уже описано в ряде исследований, включая работу с представителями семейства *Rosaceae* [22,23]. В литературе также описаны альтернативные методы стерилизации эксплантов семейства *Rosaceae*, в частности, с применением соединений ртути (например, сулемы), которые обладают высокой антимикробной активностью [13,24,25]. Однако из-за их токсичности и затруднённого обращения в лабораторных условиях, в данной работе была выбрана перекись водорода как более доступный, экологически безопасный и практичный стерилизующий агент. В связи с этим в рамках настоящей работы была изучена эффективность разных концентраций перекиси водорода для стерилизации пазушных почек миндаля Ледебур.

Как видно из результатов (табл. 2), высокая контамина-

Таблица 2. Результаты стерилизации эксплантов миндаля Ледебура

Вариант	Инфицированность эксплантов		Некроз эксплантов		Жизнеспособность эксплантов	
	шт	%	шт	%	шт	%
I – 6% H ₂ O ₂	17	85	-	0	3	15
II – 9% H ₂ O ₂	4	20	1	5	15	75
III – 12% H ₂ O ₂	3	15	11	55	6	30

нация наблюдалась на I-м варианте. Инфицированность наблюдалось у 17 эксплантов из 20, что составило 85%. Процент жизнеспособности эксплантов составило только 15%. Увеличение концентрации перекиси водорода до 12% (III вариант) привело к некрозу у большей части эксплантов до 55%. У 3 эксплантов наблюдалась контаминация и только 6 эксплантов сохранили свою жизнеспособность. Наиболее эффективным способом стерилизации в данном исследовании был раствор 9% перекиси водорода (II вариант). 15 эксплантов из 20 были стерильными и сохранили жизнеспособность (75%), что значительно превышает показатели других вариантов. Рост патогенной микрофлоры наблюдался только у 4-х эксплантов, 1 эксплант получил ожог, что составило всего 5%.

Таким образом, выбор 9% раствора перекиси водорода обусловлен не только его эффективностью, но и доступностью, что делает его предпочтительным вариантом для стерилизации эксплантов миндаля Ледебура в условиях *in vitro*. Была получена высокая степень жизнеспособности эксплантов до 75% и низкий уровень контаминации.

Регенерация основного побега.

На начальных этапах микроклонального размножения одним из важных факторов является подбор оптимальных регуляторов роста растений, обеспечивающих эффективную регенерацию основного побега. Известно, что ответ эксплантов на фитогормоны во многом определяется как видом растения, так и его генотипическими особенностями, в связи с чем универсального протокола для всех представителей рода *Prunus* не существует. В ряде работ, посвящённых культивированию различных сортов миндаля, наиболее часто применяются цитокинины ТДЗ и БАП, продемонстрировавшие высокую морфогенетическую активность. Например, у *Prunus serotina* БАП стимулировал высокочастотную индукцию побегов при минимальных концентрациях, без проявления витрификации [26]. Подобную положительную реакцию на БАП выявили при исследовании каллусогенеза у *Prunus ledebouriana*, где использование этого фитогормона способствовало формированию активно пролиферирующего каллуса [27]. Таким образом, высокая эффективность БАП подтверждена как при каллусогенезе, так и

при прямом органогенезе у данного вида.

Полученные результаты показали, что регенерация микропобегов *Amygdalus ledebouriana in vitro* значительно зависит от типа используемого цитокинина. Наиболее благоприятный морфогенетический ответ был зафиксирован на среде с БАП в концентрации 0,75 мг/л (табл. 3). Экспланты на этом варианте демонстрировали активную индукцию побегов с типичной морфологией — с хорошо выраженной апикальной меристемой и последующим развитием листьев. Эти данные согласуются с исследованиями, проведёнными на других представителях рода *Prunus*, в которых БАП также обеспечивал эффективную регенерацию *in vitro*.

На среде с КТ с аналогичной концентрацией (0,75 мг/л) было зафиксировано формирование побегов с атипичной структурой — регенерация зачастую начиналась с уже развёрнутых листьев, минуя стадию формирования апикальной меристемы (рис. 4). Это может свидетельствовать о смещении направления морфогенеза в сторону органогенеза с приоритетным развитием листьев, что является нежелательным при микроклональном размножении. Похожие наблюдения зафиксированы в работе с *Prunus domestica* и *Morus alba*, где КТ демонстрировал низкую морфогенетическую активность по сравнению с другими цитокининами, а побеги, сформированные при высоких концентрациях КТ, были морфологически аномальны [28]. Низкие концентрации КТ (0,04 мг/л) способствовали высокой частоте каллусообразования у *Prunus ledebouriana*, что свидетельствует о его эффективности в индукции каллуса данного вида [27].

Что касается среды с ТДЗ, её использование сопровождалось выраженными признаками витрификации побегов: ткани имели водянистую консистенцию, наблюдалось укорочение междоузлий и утолщение побегов. Эти фенотипические проявления характерны для реакции растений на избыток ТДЗ, о чём сообщается в ряде исследований. Так, при работе с гибридом *Prunus persica* × *Prunus amygdalus* (подвой GF677) отметили, что высокие концентрации ТДЗ вызывают гипергидратацию и образование плотных, нефункциональных побегов [29]. Аналогичные эффекты наблюдались и в экспериментах у абрикоса

Таблица 3. Влияние гормонального состава на регенерацию основного побега на 21-ый день культивирования

Вариант	Кол-во побегов, шт	Высота побегов, см	Кол-во листьев, шт
I – MS безгормональная	1,00±0,00	0,90±0,05	2,72±0,23
II — MS с БАП 0,75 мг/л	1,48±0,10*	1,14±0,05*	3,96±0,19*
III — MS с КТ 0,75 мг/л	1,28±0,09*	0,90±0,06	2,60±0,16
IV — MS с ТДЗ 0,75 мг/л	1,00±0,00	1,18±0,05*	5,32±0,26*

*Примечание. Средняя разница значительна на уровне 0,05. Данные выражены в виде средних ± стандартной ошибки.

(*Prunus armeniaca*), где высокий уровень ТДЗ привел к морфологическим нарушениям, несмотря на частичную индукцию побегов [30]. В то время как, Серафимович и соавторы (2020), напротив, показали положительное влияние ТДЗ на приживаемость и регенерацию эксплантов миндаля Ледебура, способствуя активному формированию побегов [31].

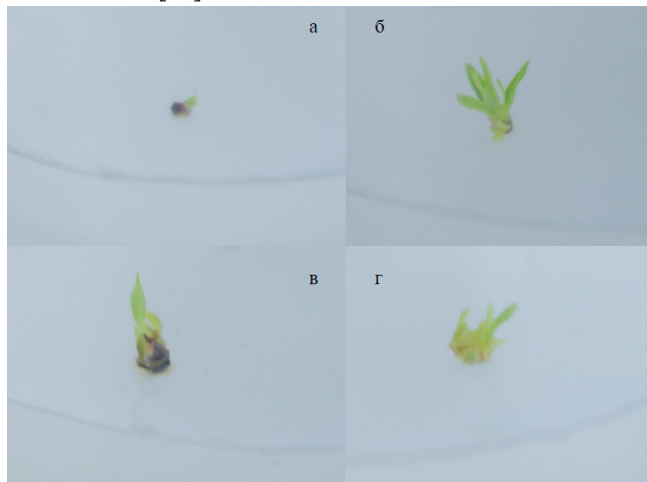


Рисунок 4. Влияние гормонального состава на регенерацию основного побега: а – MS безгормональная; б – MS с БАП 0,75 мг/л; в – MS с КТ 0,75 мг/л; г – MS с ТДЗ 0,75 мг/л.

Таким образом, результаты исследования подтверждают, что использование БАП для регенерации основного побега из пазушной почки миндаля Ледебура является наиболее оптимальным вариантом. Так, для введения в культуру *in vitro* питательная среда MS с добавлением БАП 0,75 мг/л является эффективным гормональным сочетанием. Полученные побеги были использованы для оптимизации питательной среды для микроклонального размножения.

Микроклональное размножение.

Микроклональное размножение редкого, исчезающего вида миндаля Ледебура, представляет собой сравнительно сложную задачу. Наиболее активно микроклональное размножение разработано для культурных форм миндаля, таких как *Prunus amygdalus* [32], *Prunus padus* [33], а также гибридов и других представителей рода *Prunus* [34]. Однако, *Amygdalus ledebouriana* остаётся практически неизученным в этом аспекте, что затрудняет разработку эффективных протоколов для его *in vitro* размножения и сохранения.

Одним из важнейших факторов, определяющих успешность микроклонального размножения, является

выбор питательной среды, поскольку её состав оказывает прямое влияние на общее морфологическое состояние *in vitro* растений. Однако, критическую роль в процессе органогенеза играют регуляторы роста растений, от типа и концентрации которых зависит скорость мультипликации, частота регенерации, а также качество и жизнеспособность полученных побегов. В связи с этим, в рамках нашего исследования изучены различные составы питательных сред, таких как DKW, MS, WPM и QL, и влияние цитокинина БАП в разных концентрациях (0,1-0,5 мг/л) с целью оптимизации условий для *in vitro* культивирования *Amygdalus ledebouriana*.

По результатам данного исследования эффективность микроклонального размножения *Amygdalus ledebouriana* существенно варьирует в зависимости от типа используемой питательной среды и концентрации цитокинина БАП. Сравнительная оценка питательных сред показала, что наибольшую эффективность продемонстрировала среда QL (табл. 4, рис. 5,6). Вариант с добавлением 0,25 мг/л БАП (вариант XV) показал наилучшие результаты: среднее количество побегов составило 7,24 шт, высота побегов — 1,98 см, количество листьев — 29,48 шт. Экспланты отличались выраженной зелёной окраской, плотной структурой тканей, физиологически нормальной формой листьев. Также для микроклонального размножения черешни (*Prunus avium*) использовалась питательная среда QL, которая обеспечила стабильное побегообразование, что подчёркивает её пригодность для представителей рода *Prunus* [35]. Несмотря на то, что вариант с концентрацией БАП 0,5 мг/л на той же среде (вариант XVI) дал чуть более высокое количество побегов (7,76 шт), их морфология была нарушена: наблюдалась гипергидратация, что снижает пригодность побегов и делает их менее желательными для размножения.

На питательной среде MS также наблюдалась активная пролиферация побегов, однако, интенсивность размножения была ниже по сравнению со средой QL. В частности, при добавлении 0,25 мг/л БАП (вариант VII) среднее количество побегов составило 4,28, средняя высота побегов — 1,64 см, а число листьев достигало 20,24. При увеличении концентрации БАП до 0,5 мг/л (вариант VIII) кратность побегообразования возрастала до 5,28, однако, в этих условиях наблюдались характерные признаки витрификации побегов. Несмотря на то, что для миндаля Ледебура эффективность среды MS уступала QL, полученные результаты подтверждают её пригодность для микроклонального размножения других представителей рода *Prunus* [32].

Таблица 4. Оптимизация питательной среды для микроклонального размножения миндаля Ледебура

Вариант	День 1			День 21 (прирост)		
	Кол-во побегов, шт	Высота побегов, см	Кол-во листьев, шт	Кол-во побегов, шт	Высота побегов, см	Кол-во листьев, шт
I — DKW безгормональная	1,00±0,00	0,90±0,05	5,32±0,22	1,00±0,00	1,06±0,04	5,96±0,27
II — DKW с БАП 0,1 мг/л	1,00±0,00	0,87±0,04	5,28±0,22	2,08±0,18	1,00±0,05	11,88±0,91*

III — DKW с БАП 0,25 мг/л	1,00±0,00	0,87±0,04	5,28±0,22	1,96±0,20	1,47±0,06*	9,56±0,97
IV — DKW с БАП 0,5 мг/л	1,00±0,00	0,87±0,04	5,28±0,22	4,24±0,27*	1,46±0,06*	20,72±1,41*
V — MS безгормональная	1,00±0,00	0,90±0,05	5,28±0,22	1,00±0,00	0,97±0,05	5,68±0,19
VI — MS с БАП 0,1 мг/л	1,00±0,00	0,87±0,04	5,28±0,22	2,20±0,17	0,99±0,06	12,56±1,01*
VII — MS с БАП 0,25 мг/л	1,00±0,00	0,87±0,04	5,28±0,22	4,28±0,34*	1,64±0,06*	20,24±1,57*
VIII — MS с БАП 0,5 мг/л	1,00±0,00	0,87±0,04	5,28±0,22	5,28±0,41*	1,82±0,06*	24,88±1,62*
IX — WPM безгормональная	1,00±0,00	0,90±0,05	5,28±0,22	1,00±0,00	0,93±0,05	5,32±0,21
X — WPM с БАП 0,1 мг/л	1,00±0,00	0,87±0,04	5,28±0,22	1,36±0,10	1,05±0,06	8,28±0,83
XI — WPM с БАП 0,25 мг/л	1,00±0,00	0,87±0,04	5,28±0,22	1,88±0,16	1,47±0,06*	9,32±0,82
XII — WPM с БАП 0,5 мг/л	1,00±0,00	0,87±0,04	5,28±0,22	5,12±0,31*	1,69±0,05*	24,20±1,58*
XIII — QL безгормональная	1,00±0,00	0,89±0,05	5,20±0,21	1,00±0,00	1,08±0,06	5,68±0,24
XIV — QL с БАП 0,1 мг/л	1,00±0,00	0,87±0,04	5,28±0,22	1,96±0,09	1,30±0,04	11,44±0,79*
XV — QL с БАП 0,25 мг/л	1,00±0,00	0,87±0,04	5,28±0,22	7,24±0,55*	1,98±0,06*	29,48±1,31*
XVI — QL с БАП 0,5 мг/л	1,00±0,00	0,87±0,04	5,28±0,22	7,76±0,42*	1,76±0,06*	29,20±1,04*

*Примечание. Средняя разница значительна на уровне 0,05. Данные выражены в виде средних ± стандартной ошибки.

Среда DKW оказалась менее эффективной: максимальные значения по побегообразованию наблюдались при 0,5 мг/л БАП (вариант IV) и составили 4,24 шт побега, но высота побегов осталась невысокой (1,46 см), а количество листьев — 20,72 шт. Побеги были мелкими, а общее развитие растений замедленным. Между тем в ряде других работ DKW демонстрировала высокую эффективность. В частности, у *Prunus padus* среда DKW показала хорошие результаты при микроклональном размножении [33], а также успешно применена для размножения подвоя Mygobalan 29C — гибрида, также относящегося к роду *Prunus* [34].

В данном исследовании среда WPM оказалась наименее пригодной: при концентрации БАП 0,5 мг/л (вариант XII) экспланты демонстрировали признаки витрификации, скручивание листьев и водянистость тканей. Однако, в других исследованиях для подвоя карликовой черешни наиболее эффективными питательными средами считались WPM и DKW [36].

Как видно из результатов, эффективность питательной среды зависит от видовой специфики, и полученные данные подчеркивают необходимость индивидуального подбора условий для редких и слабоизученных видов, таких как *Amygdalus ledebouriana*, поскольку в научной литературе практически отсутствуют исследования, посвящённые именно этому виду.

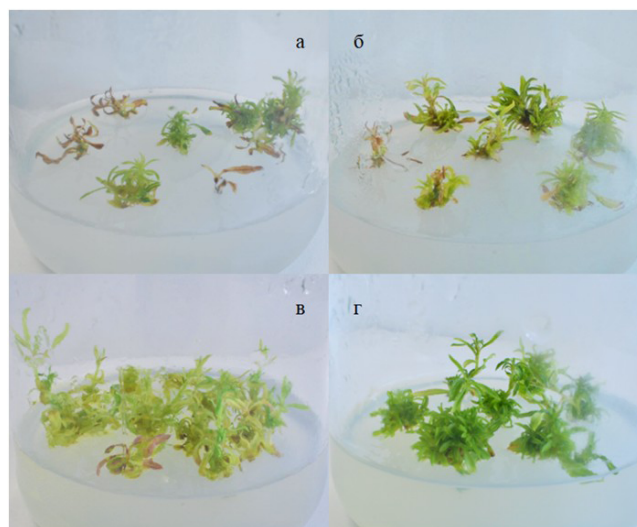


Рисунок 5. Подбор питательной среды для миндаля Ледебур: а – DKW с БАП 0,25 мг/л; б – MS с БАП 0,25 мг/л; в – WPM с БАП 0,25 мг/л; г – QL с БАП 0,25 мг/л.

Во всех контрольных вариантах, не содержащих БАП (I, V, IX, XIII), развитие эксплантов было слабо выраженным: количество побегов оставалось на уровне 1,00 шт, прироста практически не наблюдалось. Это подтверждает необходимость цитокининового стимулирования для запуска процессов пролиферации *in vitro*.

Таким образом, эффективной питательной средой для

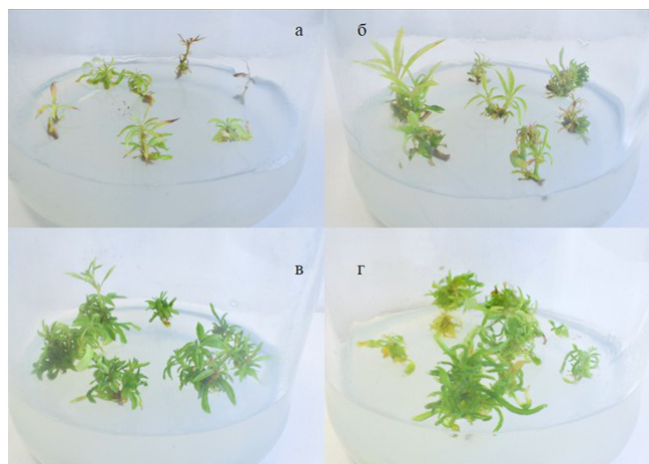


Рисунок 6. Влияние различных концентраций БАП на микроклональное размножение миндаля Ледебур: а – QL безгормональная; б – QL с БАП 0,1 мг/л; с – QL с БАП 0,25 мг/л; д – QL с БАП 0,5 мг/л.

микроклонального размножения миндаля Ледебур является QL с добавлением БАП 0,25 мг/л, где образовано 7,24 шт новых побега на эксплант. В результате исследований 400 микропобегов микроклонально размножены для сохранения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследований в мире, связанные с микроклональным размножением дикорастущего исчезающего вида миндаля Ледебур, занесенного в Красную книгу Казахстана, не проводились. Таким образом, в результате нашей работы разработана технология в культуре *in vitro* по сохранению и воспроизводству миндаля Ледебур. Оптимизирован протокол микроклонального размножения побегов в культуре *in vitro*. На основе этой работы микроклонально размножены 400 побегов для сохранения. Создана коллекция в культуре *in vitro* трёх популяций исчезающего вида миндаля Ледебур.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках проекта AP23489861 «Разработка биотехнологии *in vitro* и криосохранения эндемичного, исчезающего вида миндаля Ледебур (*Amygdalus ledebouriana*) для сохранения биоразнообразия» на 2023-2026 годы при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kulak V., et al. *In vitro* technology in plant conservation: Relevance to biocultural diversity // *Plants*. – 2022. – Т. 11, № 4. – С. 503.
2. Myers N., et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities // *Nature*. – 2000. – Т. 403, № 6772. – С. 853–858.
3. Tojibaev K.S., et al. An annotated checklist of endemic vascular plants of the Tian-Shan Mountains in Central Asian countries // *Phytotaxa*. – 2020. – Т. 464, № 2. – С. 117–158.
4. Kubentayev S.A., et al. Revised checklist of endemic vascular plants of Kazakhstan // *PhytoKeys*. – 2024. – Т. 238. – С. 241.

5. Orazov A., et al. Plant height variation and genetic diversity between *Prunus ledebouriana* (Schlecht.) Y.Y. Yao and *Prunus tenella* Batsch based on using SSR markers in East Kazakhstan // *PeerJ*. – 2024. – Т. 12. – С. e16735.

6. Schlechtendal D.F.L. von. *Abhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft zu Halle*. – 1854. – Т. 2. – С. 201–238.

7. Orazov A., et al. Flora accompanying *Prunus ledebouriana* (Schltdl.) Y.Y. Yao in the Tarbagatai State National Park in Kazakhstan // *International Journal of Biology and Chemistry*. – 2021. – Т. 14, № 1. – С. 21–34.

8. Guan Y., et al. Age structure and dynamic analysis of *Amygdalus ledebouriana* population in Xinjiang, China // *Chinese Journal of Plant Ecology*. – 2023. – Т. 47, № 7. – С. 967.

9. Быков Б.А. Красная книга Казахской ССР (редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных и растений). – Алма-Ата: Наука, 1981. – Т. 2. – С. 100–101.

10. Иствуд А., Лазков Г., Ньютон А. Красная книга древесных растений Центральной Азии. – *Fauna and Flora International*, 2009.

11. Байтулин И.О. Красная книга Казахстана (растения). – Астана, 2014.

12. The IUCN Red List of Threatened Species. *Amygdalus ledebouriana*. – 2007.

13. Romadanova N.V., et al. Geobotanical Study and Preservation of Rare and Endangered Rosaceae Species // *Plants*. – 2025. – Т. 14, № 10. – С. 1526.

14. Ковальчук И.Ю., Волгина М.А., Насибулина А.Х. Использование клонального микроразмножения в селекции плодовых и ягодных культур // Ускорение размножения посадочного материала плодово-ягодных культур с использованием биотехнологических методов: сб. науч. тр. – Алма-Ата: КАСХН, 1991. – С. 6–14.

15. Singh V. Biodiversity Conservation // *Textbook of Environment and Ecology*. – Singapore: Springer, 2024. – С. 225–236.

16. Sharma N., et al. Strategies for successful acclimatization and hardening of *in vitro* regenerated plants: Challenges and innovations in micropropagation techniques // *Plant Sci. Today*. – 2023. – Т. 10. – С. 90–97.

17. Ekinci H., et al. Optimization of Micropropagation of ARDA® (*[Prunus dulcis × Prunus persica] × Prunus amygdalus*) Rootstock in *In Vitro* Conditions // *Applied Fruit Science*. – 2025. – Т. 67, № 1. – С. 26.

18. Закирова А.З., Сю Т.Ю. Микроклональное размножение травянистых растений // *Студенческая наука – аграрному производству*. – 2022. – С. 45–51.

19. Григорьева Л.В., Гиченкова О.Г., Куликова Н.А. Современные способы размножения ягодных культур // *Приоритетные векторы развития промышленности и сельского хозяйства*. – 2018. – С. 40–43.

20. Boonprakob U., Byrne D.H., Kamo K. *In vitro* shoot regeneration and rooting of almond (*Prunus dulcis*) // *Scientia Horticulturae*. – 2001. – Т. 88, № 3. – С. 237–247.

21. Koubouris G.C., Metzidakis I., Vasilakakis M. Micropropagation of wild almond (*Prunus webbii*) through

axillary shoot proliferation // Acta Horticulturae. – 2015. – Т. 1083. – С. 341–346.

22. Nurtaza A., et al. Micropropagation of the endangered species *Malus niedzwetzkyana* for conservation biodiversity in Kazakhstan // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. – 2021. – С. 1–12.

23. Kakimzhanova A., et al. An efficient micropropagation system for the vulnerable wild apple species, *Malus sieversii*, and confirmation of its genetic homogeneity // Erwerbs-Obstbau. – 2023. – Т. 65, № 4. – С. 621–632.

24. Meghwal P.R., Sharma H.C., Singh S.K. Effect of surface sterilizing agents on *in vitro* culture establishment of guava (*Psidium guajava* L.) // Journal of Applied Horticulture. – 2000. – Т. 2, № 2. – С. 94–95.

25. Турдиев Т., и др. Микрклональное размножение миндаля обыкновенного (*Prunus dulcis* Mill.) для восстановления регрессирующих популяций // Izdenister Natigeler. – 2024. – № 3 (103). – С. 178–187.

26. Liu X., et al. Adventitious shoot regeneration and rooting of *Prunus serotina* *in vitro* cultures // HortScience. – 2008. – Т. 41, № 1. – С. 193–196.

27. Orazov O.K., et al. Callus induction and phytochemical potential of *Prunus ledebouriana* *in vitro* // Biodiversitas Journal of Biological Diversity. – 2022. – Т. 23, № 2. – С. 963–968.

28. Borkowska B., Litwinczuk W. Activity of thidiazuron in *in vitro* shoot cultures of *Prunus* sp. and *Morus alba* // Biologia Plantarum. – 1993. – Т. 35, № 1. – С. 63–67.

29. Arab M.M., Shekafandeh A. Effects of thidiazuron and other growth regulators on regeneration of GF677 (*Prunus persica* × *Prunus amygdalus*) rootstock // Acta Horticulturae. – 2016. – Т. 1130. – С. 119–124.

30. Perez-Tornero O., Burgos L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2000. – Т. 63, № 2. – С. 133–141.

31. Серафимович М.В., Кириллов В.Ю., Стихарева Т.Н. Влияние состава питательной среды на приживаемость эксплантов миндаля Ледебуровского (*Amygdalus ledebouriana* Schlecht.) в культуре *in vitro* // Вестник университета Шакарима. Серия технические науки. – 2020. – № 3 (91). – С. 289–293.

32. Rugini E., Verma D.C. Micropropagation of difficult-to-propagate almond (*Prunus amygdalus*, Batsch) cultivar // Plant Science Letters. – 1983. – Т. 28, № 3. – С. 273–281.

33. Hammatt N. Micropropagation of fastigate bird cherry (*Prunus padus* L.) and adventitious shoot formation from leaves // Journal of Horticultural Science. – 1993. – Т. 68, № 6. – С. 975–981.

34. Shabani Z., et al. Effect of media and plant growth regulators in micropropagation of Myrobalan 29C rootstock // Journal of Horticulture and Forestry. – 2015. – Т. 7. – С. 57–64.

35. Matt A., Jehle J.A. *In vitro* plant regeneration from leaves and internode sections of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) // Plant Cell Reports. – 2005. – Т. 24, № 8. – С. 468–476.

36. Fallahpour M., Miri S.H., Bouzari N. *In vitro* propagation of ‘Gisela 5’ rootstock as affected by mineral composition of media and plant growth regulators // Journal of Horticultural Research. – 2015. – Т. 23, № 1. – С. 57–64.

OPTIMIZATION OF *IN VITRO* MICROPROPAGATION PROTOCOL OF THE ENDEMIC, ENDANGERED SPECIES *AMYGDALUS LEDEBOURIANA* FOR CONSERVATION

Islamova S.S.¹, Nurtaza A.S.^{1,3}, Dyussebekova D.A.^{1,3}, Narmakhan K.N.^{1,2}, Sadakova B.D.⁴, Serkebayev A.S.⁴, Kakimzhanova A.A.^{1,3*}

¹ LLP «National center for biotechnology», 010000, Kazakhstan, Astana, Qorgalzhyn highway, 13/5

² Non-Commercial JSC «L.N. Gumilyov Eurasian National University», 010000, Kazakhstan, Astana, Satpayev str., 2

³ LLP «Greenlab», 010000, Kazakhstan, Astana, Qorgalzhyn highway, 13/5

⁴ RSI «State National Natural Park «Tarbagatay»

*kakimzhanova@biocenter.kz

ABSTRACT

The article presents the results of a study on the *in vitro* conservation of the rare and endangered species *Amygdalus ledebouriana*. This almond species is noted for its high resistance to drought and low temperatures, as well as the nutritional value of its fruits. Prior to this study, no research had been conducted on the micropropagation of *Amygdalus ledebouriana*. In the present work, the authors developed an effective protocol for explant sterilization and establishment *in vitro* culture. A 9% hydrogen peroxide solution applied for 5 minutes was selected as the most suitable sterilizing agent, ensuring up to 75% explant viability. For shoot multiplication, the QL nutrient medium supplemented with 0.25 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP) was optimized, resulting in an average of 7.24 shoots per explant. To date, 400 microshoots have been successfully propagated. An *in vitro* collection has been established from three natural populations of *Amygdalus ledebouriana*.

Keywords: *Amygdalus ledebouriana*, *in vitro*, QL nutrient medium, micropropagation, sterilizing agent, microshoots.

ЭНДЕМИКАЛЫҚ, ЖОЙЫЛЫП БАРА ЖАТҚАН *AMYGDALUS LEDEBOURIANA* ТҮРІН САҚТАУ МАҚСАТЫНДА *IN VITRO* ЖАҒДАЙЫНДА МИКРОКЛОНАЛДЫ КӨБЕЙТУ ПРОТОКОЛЫН ОҢТАЙЛАНДЫРУ

Исламова С.С.¹, Нұртаза А.С.^{1,3}, Дюсембекова Д.А.^{1,3}, Нармахан Қ.Н.^{1,2}, Садакова Б.Д.⁴, Серкебаев А.С.⁴, Какимжанова А.А.^{1,3*}

¹ ЖШС «Ұлттық биотехнология орталығы», 010000, Қазақстан, Астана, Қорғалжын тас жолы, 13,5

² КеАҚ «Л.Н. Гумилёв атындағы Еуразия ұлттық университеті», 010000, Қазақстан, Астана, Қ.Сәтбаев көшесі, 2

³ ЖШС «Greenlab», 010000, Қазақстан, Астана, Қорғалжын тас жолы, 13,5

⁴ РММ «Тарбағатай» мемлекеттік ұлттық табиғи паркі»

*kakimzhanova@biocenter.kz

ТҮЙІН

Мақалада сирек кездесетін және жойылып бара жатқан *Amygdalus ledebouriana* өсімдігінің *in vitro* жағдайында сақталуына бағытталған зерттеу нәтижелері келтірілген. Бадамның бұл түрі құрғақшылық пен төмен температураға төзімділігімен ерекшеленеді, сонымен қатар, оның жемістері жоғары тағамдық құндылыққа ие. Осыған дейін жойылып кету қаупі бар *Amygdalus ledebouriana* бадам түрін микроклоналды көбейту бойынша зерттеулер жүргізілмеген. Осы жұмыста авторлар Ледебура бадамының экспланттарын *in vitro* жағдайына енгізу үшін тиімді зарарсыздандыру әдісін таңдады. Стерильдеу агенті ретінде 9% сутегі асқын тотығы ерітіндісі 5 минуттық өңдеу режимімен қолданылып, экспланттардың өміршеңдігі 75%-ға дейін жетті. Сонымен қатар, көбейту үшін құрамына 0,25 мг/л БАП қосылған QL қоректік ортасы оңтайландырылып, бір экспланттан орта есеппен 7,24 жаңа микроөркен алынды. Қазіргі уақытта 400 өркен микроклоналды жолмен көбейтілді. Сонымен, жойылып бара жатқан Ледебура бадамы түрінің үш популяциясынан *in vitro* коллекциясы жасалды.

Кілт сөздер: *in vitro*, *Amygdalus ledebouriana*, QL қоректік ортасы, микроклоналды көбейту, стерильдеу агенті, микроөркен.