

А.С. Нұртаза<sup>1,2</sup>, Д.А. Дюсембекова<sup>1</sup>, А.А. Какимжанова<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Национальный центр биотехнологии, Нур-Султан, Казахстан

<sup>2</sup>Евразийский национальный университет имени Л.Н.Гумилева, Нур-Султан, Казахстан

\*Автор для корреспонденции: kakimzhanova@biocenter.kz

## Оптимизация протокола среднесрочного хранения исчезающего вида *Malus niedzwetzkyana*

**Аннотация.** Сохранение биоразнообразия требует эффективных методов *ex situ* для хранения генетического материала растений вне естественной среды обитания. Такой подход позволит сохранить ценные, эндемичные и исчезающие виды растений в течение долго времени. Одним из широко используемых методов является среднесрочное хранение в культуре *in vitro*. В нашей работе описаны результаты среднесрочного хранения микроклонально размноженных побегов исчезающего и эндемичного вида яблони Недзвецкого. *In vitro* сохранение было реализовано с помощью осмотических агентов в составе питательной среды. Для этого были изучены условия культивирования: температура (4°C и 24°C) и фотопериод (16/8 и выращивание в темноте), состав питательных сред для замедления роста (сахароза, маннитол, PVP, абсцизовая кислота). Результаты исследований показали, что оптимальным условием для среднесрочного хранения побегов является питательная среда QL с добавлением 3% или 6% сахарозы при стандартных условиях (24°C, фотопериод 16/8). Оптимизированный протокол позволил сохранить экспланты яблони Недзвецкого в течение 2-х месяцев без повторного культивирования. Более того, этап восстановления эксплантов проходил быстро, в течение только одного пассажа.

**Ключевые слова:** яблоня Недзвецкого, *Malus niedzwetzkyana*, сохранение биоразнообразия, культура *in vitro*, среднесрочное хранение, осмотические агенты, абсцизовая кислота.

DOI: 10.32523/2616-7034-2022-139-2-107-122

### Введение

Казахстан отличается богатым биоразнообразием и имеет глобальное и региональное значение из-за его географического положения между Северной Европой, Азией и Ближним Востоком. Большая территория, разнообразные почвенно-климатические условия, разнообразие экосистем, а также наличие эндемичных, редких и исчезающих видов флоры, имеющих международное значение, являются причиной богатых генетических ресурсов страны. Флора Казахстана насчитывает около 6000 видов сосудистых растений, относящихся к 161 семейству [1].

Сотни видов этих растений в Казахстане имеют экономическую ценность, например, в качестве лекарств (1400 видов), корма для скота (1028 видов) и в пищевой промышленности (около 500 видов) [2]. Эти растения распределены на 29 основных флористических провинций. Например, горные экосистемы занимают всего 7% территории страны, но каждая горная система представляет собой отдельную флористическую провинцию [3]. Например, площадь зарослей дикой яблони в горах Алатау составляет около 11 тысяч га, где сосредоточены самые крупные ресурсы дикорастущих яблонь в мире [4]. В Каратау было перечислено не менее 180 эндемичных видов. Стоит отметить, что 12% растений являются эндемичными для Казахстана и многие из них находятся в статусе редких и находящихся под угрозой исчезновения. Одним из таких эндемичных и исчезающих видов, впервые найденных в горах, является яблоня Недзвецкого [3].

Яблоня Недзведского - дикий мелкоплодный вид, который в природе обитает в горных лесах Тянь-Шаня. Это дерево высотой 6-8 м [4]. Яблоня светолюбива, но переносит затенение, отличается значительной морозоустойчивостью, стойкостью против высоких летних температур, нетребовательна к почве и устойчива к вредителям [5, 6, 7]. Также вид признан родственником одомашненных культурных яблонь и является важным генофондом для селекции и интродукции [8].

Однако в настоящее время яблоня Недзведского находится под угрозой исчезновения, обусловленного почти полным отсутствием естественного семенного возобновления, перекрестного опыления, хозяйственной деятельностью человека, выпасом скота, отсутствием защитных и лесовосстановительных мер [9]. В настоящее время яблоня Недзведского является редким и исчезающим видом, который занесен в Красную книгу Казахстана [10] и в Международный Красный лист [11], в связи с этим и сохранение и воспроизводство этого ценного вида – остростоящая задача.

Сохранение такого ценного генетического материала растений может осуществляться методами *in situ* и *ex situ*. В первом случае виды сохраняются в их естественной среде обитания с помощью методов сохранения среды обитания и управления экосистемами [12]. Для этого используются природные парки, заповедники, ботанические сады и памятники природы, тем самым создаются благоприятные условия для роста и размножения растений в естественных местах происхождения [13, 14]. Так, в Кыргызстане были собраны семена 59 деревьев яблони Недзведского и заложены 4 минипитомника для реинтродукции этого вида [9]. Чаще яблоню можно встретить в городах или отдельных ботанических садах, но в очень небольшом количестве [15, 16]. Более того, исследования показали, что у существующих экземпляров в естественной среде присутствует генетическая эрозия, которая происходит в процессе опыления с другими видами. Таким образом, теряются исходные генетические формы. Были обнаружены деревья с разными морфологическими характеристиками листьев и плодов. Плоды отличались по вкусу, консистенции, срокам созревания, интенсивности окраски мякоти, кожуры, форме кроны, кроне и облиственности [9]. Чаще яблоню Недзведского можно встретить в городах или отдельных ботанических садах, но в очень небольшом количестве [15, 16]. В Казахстане яблоня Недзведского произрастает в Жонгар-Алатауском государственном национальном природном парке [17], в Главном ботаническом саду Алматы (в виде плодовых генотипов), в помологическом саду Алматы, в Астанинском ботаническом саду и парках города Нур-Султан маленькими популяциями. Однако работ по восстановлению вида опубликовано не было и численность продолжает сокращаться. Яблоня Недзведского находится в статусе очень редкого вида, особи которого спорадически распределены фрагментарными популяциями [18].

Эти данные ясно демонстрируют необходимость применения методов *ex situ* для сохранения и восстановления вида. Более того, защита и охрана материала не обеспечивают восстановление и размножение растений [19]. А поскольку популяции яблони Недзведского уязвимы и ресурсы маточного материала ограничены, важно внедрять экономически и экологически эффективные стратегии сохранения в рамках существующих экземпляров. Это позволит максимизировать шансы на выживание и сохранение вида.

Метод *ex situ* сохраняет биологические материалы в искусственных условиях с возможностью их повторного введения в их естественную среду обитания. Это обеспечит гарантию от случайной потери генетических ресурсов [12]. Одним из таких эффективных методов сохранения генетического материала растений является культура *in vitro*.

Культура *in vitro* – это культивирование органов растений или целых растений на искусственной питательной среде [20]. Это позволяет хранить материал в культуре *in vitro* длительное время. Сохранение зародышевой плазмы растений *in vitro* реализуется путем создания условий для медленного роста, что обеспечивает кратко-/среднесрочное хранение.

Среднесрочное хранение предполагает сохранение культур в условиях, ограничивающих рост на искусственной питательной среде. Темп роста культур может ограничиваться различными методами, включая понижение температуры, снижение интенсивности света, или манипуляции с культуральной средой путем добавления веществ, изменяющих осмотическое давление или ингибирующих рост [21]. Среднесрочное хранение позволяет сохранить клоны в течение нескольких месяцев или лет (в зависимости от вида) в асептических условиях, не требуя частой пересадки. В общей практике для среднесрочного хранения широко используются осмотические агенты, абсцизовая кислота (АБК), низкая температура и культивирование в темноте. В качестве осмотических агентов используют сахарозу, маннит и сорбитол [22].

Использование осмотических агентов признано эффективным методом для замедления роста растений в культуре *in vitro*. Они снижают метаболическую активность растений, не влияя на жизнеспособность, а также увеличивают срок хранения различных видов растений [23]. В исследованиях подбора условий для хранения эксплантов *Mandevilla moricandiana* сорбитол и глюкоза положительно способствовали развитию растений. Были получены низкая скорость размножения в период медленного роста и высокий уровень размножения при дальнейшем восстановлении эксплантов [24].

Также, для среднесрочного хранения широко используется абсцизовая кислота [22]. Гормон служит сигналом и ответом на многие стрессовые факторы и повышает устойчивость к ним [25, 26]. Абсцизовая кислота считается ингибитором роста растений и используется в качестве замедлителя роста в культуре тканей растений [27].

Также модификация условий выращивания эксплантов в период среднесрочного хранения является результативным способом. Так, для хранения побегов *Olea europaea* эффективным был признан метод хранения побегов при температуре 4°C или в полной темноте. Это позволило получить 80-90% жизнеспособных эксплантов после 8 месяцев хранения [28]. Хотя у разных генотипов винограда снижение температуры до 10°C приводило к гибели и 20°C были оптимальной температурой для длительного поддержания и дальнейшего размножения [29].

Для среднесрочного хранения яблони были разработаны разные протокола. Например, для *Malus domestica* и *Malus sieversii* использовали среду МС с 3% сахарозой и выращивали при 4°C. Экспланты сохраняли свою жизнеспособность в течение 21 месяца [30]. *Malus pumila* × *Gala* культивировали на среде МТ с БАП 0,5 мг/л и НУК 0,05 мг/л с добавлением 2% сахарозы и 2% маннитола, интервал повторного культивирования составил 12 месяцев [31]. Экспланты *Malus pumila* × *Moscatella* для среднесрочного хранения культивировали на безгормональной среде ½ MS при 4°C в темноте. Такие же условия подошли для *Malus pumila* × *Starkspur* (½ MS при 4°C в темноте), где через 18 месяцев 90% растительного материала сохранили свою жизнеспособность [32].

Несмотря на опубликованные работы по среднесрочному хранению яблони, исследований очень мало. Работы по изучению среднесрочного хранения яблони Недзвецкого отсутствуют, и этот вопрос требует изучения. Целью исследования являлась разработка среднесрочного хранения побегов яблони Недзвецкого. Так, в нашей работе были оптимизированы условия культивирования, использование осмотических агентов и абсцизовой кислоты для разработки технологии среднесрочного хранения побегов в культуре *in vitro* яблони Недзвецкого.

### Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали *in vitro* побеги однолетних побегов яблони Недзвецкого. Побеги были получены по ранее разработанному протоколу микроклонального размножения [33]. Растительный материал был собран в городе Нур-Султан, Казахстан.

Питательную среду QL готовили по стандартному протоколу [34] с добавлением 30 гр. сахарозы и 7 гр. агара. Осмотические агенты маннитол и PVP (поливинилпирролидон) добавляли до стерилизации питательной среды. Абсцизовую кислоту добавляли после стерилизации питательной среды, предварительно простерилизовав с помощью мембранного фильтра, размер пор 0,20 мкм. Используемые реагенты были приобретены у Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Для всех питательных сред pH устанавливали на значении 5.8 до автоклавирования при 121 °C в течение 20 минут.

Для разработки среднесрочного хранения в культуре *in vitro* побегов было изучено влияние осмотических агентов, светового и температурного режимов. В качестве контроля была использована среда для микроклонального размножения побегов яблони Недзвецкого. Это позволит сравнить скорость развития в стандартных условиях и скорость развития растений на исследуемых вариантах. Для этого были выбраны следующие варианты: I вариант (контроль) – среда QL с 3% сахарозой; БАП 0,5 мг/л; ГК 1,0 мг/л и ИМК 0,01 мг/л (культивирование при 24°C, фотопериод 16/8); II вариант – среда QL с 3% сахарозой (культивирование при 24°C, фотопериод 16/8); III вариант – среда QL с 6% сахарозой (культивирование при 24°C, фотопериод 16/8); IV вариант – среда QL с 9% сахарозой (культивирование при 24°C, фотопериод 16/8); V вариант – среда QL с 12% сахарозой (культивирование при 24°C, фотопериод 16/8); VI вариант – среда QL с 3% сахарозой (культивирование при 4°C, фотопериод 16/8); VII вариант – среда 1/2 QL с 3% сахарозой (культивирование при 4°C, в темноте); VIII вариант – среда QL с 2% сахарозой, 2% маннитол (культивирование при 4°C, фотопериод 16/8); IX вариант – среда QL с 7% сахарозой, 1% PVP (культивирование при 4°C, фотопериод 16/8); X вариант – среда QL с 3% сахарозой и абсцизовой кислотой (АБК) 10 мг/л (культивирование при 24°C, фотопериод 16/8). Фенологические замеры проводили на 60-й день культивирования.

Результаты эксперимента были протестированы дисперсионным анализом, и значимые различия были отобраны с использованием апостериорного теста Тьюки в SPSS 23.0 (IBM Inc., Нью-Йорк, США). Данные выражены как среднее значение ± стандартная ошибка.

### Результаты и обсуждение

Основной задачей технологии среднесрочного хранения являются подбор оптимальных условий культивирования (температура и фотопериод), состав питательных сред для замедления роста [35]. Однако применение ингибиторов роста сопряжено с некоторыми проблемами: 1 - аномальный рост растений и трудности в последующей регенерации; 2 - развитие новых устойчивых линий; 3 - возможные генетические изменения [36]. Следовательно, необходим индивидуальный подход при выборе условий, замедляющих рост для смягчения, указанных выше проблем. Основная цель защиты зародышевой плазмы растений с использованием культуры *in vitro* состоит в том, чтобы сохранить генетическую целостность и ограничить количество пассажей, не подвергая опасности растительный материал [37].

Наиболее распространенным методом, используемым в культуре *in vitro*, является снижение температуры, но с избеганием обморожения эксплантов [38]. Например, семена *Hibiscus moscheutos* были успешно сохранены при 5°C в течение 36 месяцев [39], а побеги фитонии при 4°C в течение 3 месяцев [40]. Также изменение источника углерода оказывает заметное влияние на скорость роста [36], снижая водный потенциал воды в клетках. Осмотические агенты, такие как маннитол, сахароза и сорбит относятся к числу широко используемых веществ. Добавление осмотических агентов в питательную среду эффективно замедляет рост и увеличивает время жизнеспособного хранения разных видов растений в культуре *in vitro* [41]. Поиск эффективных условий для разных видов растений продолжается и общепринятый протокол отсутствует. Например, для среднесрочного хранения эксплантов *Drimiopsis kirkii*

использовали альгинат натрия [42]. Экспланты *Metrosideros excels* (36 месяцев) и *Photinia × fraseri* (4 месяца) хранили в темноте при 4-10°C [43]. Работ по среднесрочному хранению яблони мало. Первая работа по сохранению *Malus domestica* Borkh в условиях *in vitro* была опубликована в 1979 году, где экспланты хранили при 1°C - 4°C в течение 12 месяцев [44]. Дополнительные исследования указывают на аналогичный успех с другими видами *Malus* и сортов со сроком хранения от 9 месяцев до 3,5 лет, где также снижали температуру хранения эксплантов до 4°C [45].

В настоящее время для сохранения исчезающих и эндемичных видов Казахстана среднесрочное хранение яблони требует изучения, в особенности такого ценного и редкого вида, как яблоня Недзвецкого. Так, в нашем исследовании для среднесрочного хранения побегов были изучены питательные среды (QL и ½ QL), замедлители роста (сахароза, маннитол, PVP и абсцизовая кислота), световой (культивирование в темноте) и температурный режимы (24°C и 4°C).

Результаты исследований показали, что для яблони Недзвецкого оптимальным условием для среднесрочного хранения микропобегов является культивирование на питательную среду QL с 3% или 6% сахарозой (II и III варианты) (таблица 1, рисунок 1). Присутствовал незначительный прирост: 0,18 см в высоту и 1,65 шт листьев на варианте II; 0,48 см в высоту и 0,8 шт листьев на варианте III. У эксплантов не наблюдалось внешних изменений, они имели сочный зеленый цвет. Микропобеги остановили рост, но сохранили свою жизнеспособность (таблица 1, рисунок 1).

Использование сахарозы в более высокой концентрации показало более худшие результаты. На варианте IV (9% сахароза) зафиксировано уменьшение количества листьев (-0,05 шт), высота побегов почти не увеличилась (+0,05 см). Однако несмотря на отсутствие роста, что было задачей в нашем исследовании, листья эксплантов внешне выглядели хуже. Экспланты имели менее насыщенный зеленый цвет (таблица 1, рисунок 1). При использовании 12% сахарозы (вариант V) были получены схожие результаты с вариантом IV. Экспланты выглядели слабее, чем при использовании 3% или 6% сахарозы. Наблюдалась отрицательная динамика по исследуемым параметрам (-0,14 см в высоту и -0,95 шт листьев) (таблица 1, рисунок 1). В других исследованиях культивирование эксплантов с 90 или 120 г/л сахарозой показало положительный результат у *Chlorophytum borivilianum*. Также авторами отмечена 100% регенерация при повторном культивировании в стандартных условиях. Экспланты сохраняли свою жизнеспособность до 4-х месяцев [46].

У варианта VIII наблюдалось снижение высоты побегов (-0,07 см) и количества листьев (-1,80 шт). Растения были ослаблены, имели бледно-зеленый цвет (таблица 1, рисунок 1). Так, добавление осмотического агента маннитол не подошло для хранения побегов яблони Недзвецкого. Также опубликованы другие исследования, которые подтверждают негативный эффект маннитола на растения. Добавление в питательную среду маннитола способствовало высокой смертности, низкому росту и коэффициенту размножения в период восстановления. Также высокая концентрация маннитола может вызывать гибель растений [47]. Другие исследования подтверждают неэффективность маннитола при среднесрочном хранении *Hancornia speciosa* [48] и *Macrosyphonia velame* [24]. У *Mandevilla velutina* процесс восстановления проходил медленнее и был получен низкий коэффициент размножения [49]. Хотя в других исследованиях авторами был достигнут положительный результат при хранении эксплантов, исчезающих видов растений рода *Turbini carpus*. Успешное использование маннитола для среднесрочного хранения было продемонстрировано на *Malus pumila* cv Gala. Была получена 100%-ная регенерация после 12 месяцев хранения [31]. Использование PVP (вариант IX) показало результат хуже. Растения были слабые, при повторном культивировании листья опадали, и дальнейшее восстановление растений было невозможным. Уменьшились высота побегов -0,26 см и количество листьев -2,35 шт (таблица 1, рисунок 1).

Таблица 1

Влияние условий для среднесрочного хранения побегов яблони Недзвецкого

Вариант	День 1		День 50		Прирост	
	Высота побега, см	Кол-во листьев, шт	Высота побега, см	Кол-во листьев, шт	Высота побега, см	Кол-во листьев, шт
I – QL с 3% сахарозой; БАП 0,5 мг/л; ГК 1,0 мг/л и ИМК 0,01 мг/л (24°C, фотопериод 16/8)	1,45±0,02	5,05±0,18	2,98±0,06	16,20±0,65	1,53	11,15
II – QL с 3% сахарозой (24°C, фотопериод 16/8)	1,44±0,03	4,95±0,20	1,62±0,03*	6,60±0,30*	0,18	1,65
III – QL с 6% сахарозой (24°C, фотопериод 16/8)	1,55±0,04	5,65±0,21	2,03±0,08*	6,45±0,25*	0,48	0,8
IV – QL с 9% сахарозой (24°C, фотопериод 16/8)	1,56±0,03	4,95±0,15	1,61±0,04*	4,90±0,18*	0,05	-0,05
V – QL с 12% сахарозой (24°C, фотопериод 16/8)	1,40±0,03	5,55±0,22	1,26±0,04*	4,60±0,15*	-0,14	-0,95
VI – 1/2 QL с 3% сахарозой (4°C, фотопериод 16/8)	1,37±0,04	4,40±0,17	1,11±0,03*	3,80±0,19*	-0,26	-0,6
VII – 1/2 QL с 3% сахарозой (в 4°C, в темноте)	1,47±0,03	5,90±0,20	1,34±0,02*	4,00±0,24*	-0,13	-1,9
VIII – QL с 2% сахарозой, 2% маннитола (4°C, фотопериод 16/8)	1,61±0,03	5,65±0,21	1,54±0,02*	3,85±0,23*	-0,07	-1,8
IX – QL с 7% сахарозой, 1% PVP (4°C, фотопериод 16/8)	1,40±0,03	5,95±0,26	1,14±0,03*	3,60±0,23*	-0,26	-2,35
X – QL с 10 мг/л АБК (24°C, фотопериод 16/8)	1,46±0,03	5,50±0,24	1,43±0,03*	3,55±0,22*	-0,03	-1,95

Примечание – \*. Средняя разница значима на уровне 0,05

Снижение температуры до +4°C было неэффективным для среднесрочного хранения побегов яблони Недзвецкого. Экспланты были слабые, наблюдалось изменение формы листовой пластинки. На варианте VI замечено уменьшение высоты (-0,26 см) и количества листьев (-0,6 шт). Экспланты были бледно-зеленого цвета. Листья слабые. Культивирование при +4°C и в условиях темноты (вариант VII) еще более уменьшило количество листьев (-1,9 шт) (таблица 1). Стебель и листья начинали желтеть (рисунок 1). Хотя для *Malus pumila* cv *Moscatella* эти условия позволили хранить экспланты в течение 12 месяцев, с последующей 100% регенерацией [32]. Хранение эксплантов при +4°C было успешно применено для *Malus domestica* и *Malus sieversii*. Побеги сохраняли свою жизнеспособность в течение 21 месяца [30].

Относительно средние результаты, полученные на вариантах VI и VII связаны с составом среды (таблица 1, рисунок 1). В средах отсутствовали осмотические агенты, содержание сахарозы было стандартным (30 гр/л). Положительный эффект, также можно связать с отсутствием экзогенных гормонов в среде. Например, при среднесрочном хранении исчезающего *Centaureium rigualii* побеги были культивированы на безгормональную среду МС в стандартных условиях (24°C, фотопериод 16/8), где жизнеспособность сохранялась до 20 месяцев [50].

Использование абсцизовой кислоты показало среднее значение. Наблюдалось уменьшение

высоты побегов на -0,03 см, и количество листьев уменьшилось на -1,95 шт. Растения были бледные, листья мелкие (таблица 1, рисунок 1). Хотя для *Taraxacum ripeniscum* использование абсцизовой кислоты было оптимальным вариантом. Материал хранили до 9 месяцев [51]. Экспланты *Vitis heuflana* хранили до 12 месяцев с последующей 48%-ной регенерацией [52]. Эффективность абсцизовой кислоты зависит от генотипа. Например, сорт ТМ-6 показал положительные результаты при наличии абсцизовой кислоты в среде. Обратный результат был получен у сорта «Грушовка Верненская», где микропобеги благополучно хранились без добавления этого гормона [30]. Авторами подтверждается, что низкий уровень БАП и абсцизовой кислоты приводит к наихудшему хранению яблони, тогда как при добавлении только БАП экспланты успешно хранились до 14 месяцев [32].

В целом, из результатов видно, что выбранные варианты условий приостанавливали рост побегов яблони Недзвецкого. Относительно контрольного варианта, где была использована стандартная среда для мультипликации, все 9 вариантов имели значительную разницу. Так, на варианте I (контроль) был получен наибольший прирост по высоте (1,53 см) и количеству листьев (11,15), на других вариантах таких высоких значений не наблюдалось (таблица 1, рисунок 1).



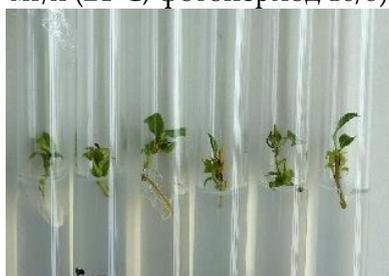
I – QL с гормонами БАП 0,5 мг/л; ГК 1,0 мг/л и ИМК 0,01 мг/л (24°C, фотопериод 16/8)



II – QL с 3% сахарозой (24°C, фотопериод 16/8)



III – QL с 6% сахарозой (24°C, фотопериод 16/8)



IV – QL с 9% сахарозой (24°C, фотопериод 16/8)

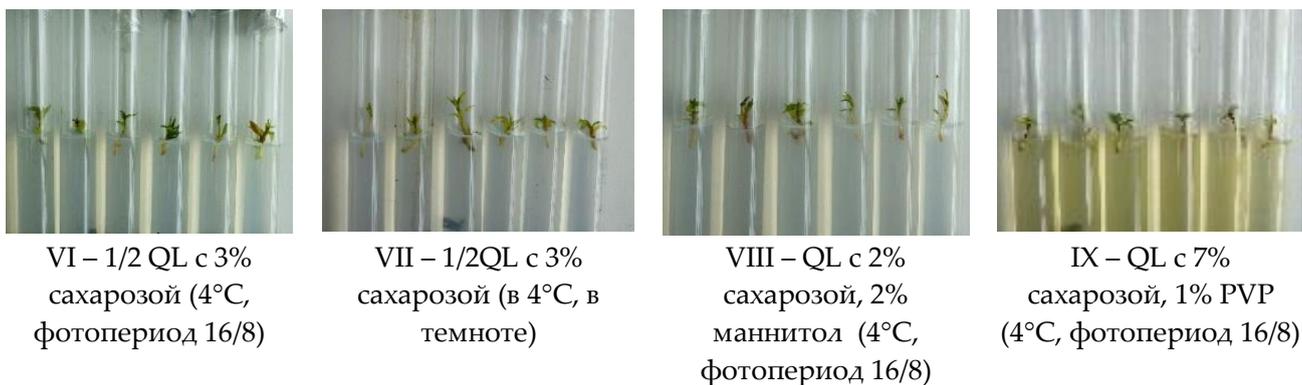


V – QL с 12% сахарозой (24°C, фотопериод 16/8)



X – QL с 10 мг/л АБА (24°C, фотопериод 16/8)

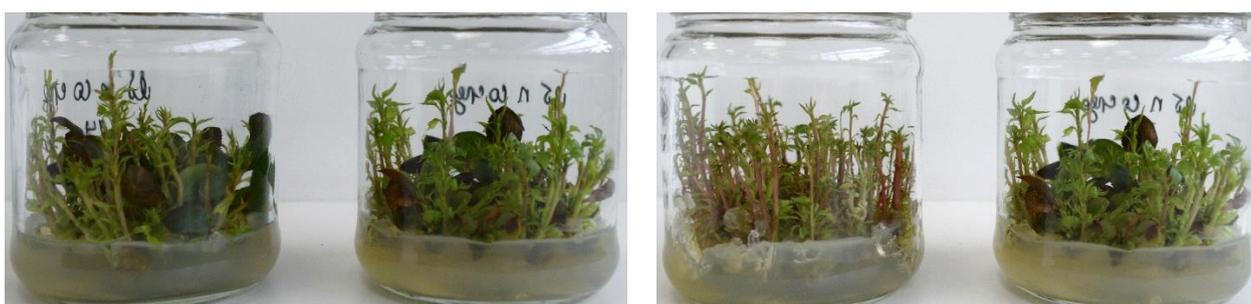
а – Исследуемые варианты среднесрочного хранения при стандартных условиях культивирования (24°C, фотопериод 16/8)



б - Исследуемые варианты среднесрочного хранения при 4°C

**Рисунок 1. Подбор оптимальных условий для медленного роста побегов яблони Недзвецкого**

Период восстановления после среднесрочного хранения растений является важным индикатором успеха протокола. После пересадки эксплантов на стандартную среду растения должны вернуться к оптимальному росту *in vitro* для дальнейшего микроклонального размножения по мере необходимости. В нашем исследовании экспланты вернули способность к размножению дополнительных побегов. После пересадки на среду мультипликации через 35 дней были образованы новые дополнительные побеги. На рисунке 2 показано восстановление после среднесрочного хранения микропобегов на среде QL с добавлением 6% сахарозы. Так, оптимизированные условия среднесрочного хранения яблони Недзвецкого не требуют дорогостоящих регуляторов роста, что является экономически выгодным методом. Эти результаты подтверждают эффективность выбранного протокола. Изучение литературы по восстановлению эксплантов после среднесрочного хранения яблони показали, что для дальнейшего размножения необходимое количество пассажей было 3. Однако количество и сроки пересадки различались в зависимости от генотипа и культуры [53].



**Рисунок 2. Восстановление микропобегов яблони Недзвецкого после среднесрочного хранения**

### Заключение

Таким образом, для среднесрочного хранения в культуре *in vitro* побегов яблони Недзвецкого наиболее оптимальным условием является среда QL с добавлением 3% или 6% сахарозы при стандартных условиях культивирования при 24°C, фотопериод 16/8. Побеги приостановили рост, размножение и сохранили свою жизнеспособность в течение двух месяцев. Более того, побеги после среднесрочного хранения отличались от побегов со стандартной среды, которые размножались в течение 6 пассажей. Количество размноженных побегов было меньше в три раза, но они имели более насыщенный зеленый цвет, развитые листья и утолщенный стебель. Также оптимизированный протокол позволит сократить расходы на лабораторные реагенты.

**Финансирование.** Данная исследовательская работа была выполнена в рамках научно-исследовательской работы по научно-технической программе «Создание биобанка редких и исчезающих видов флоры и фауны Казахстана для сохранения биоразнообразия» на 2021-2022 годы».

### Список литературы

1. Gemedjjeva N., Jaime, Teixeira da Silva A., Ryabushkina N. Representation of Endemics in Floristic Subprovinces of Kazakhstan //The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology. – 2010. – Vol. 4. – P. 56-63.
2. Grudzinskaya L.M., Tazhkulova N. Introductory valuation of plants in the Apiaceae Lindl. family //Fundamental and applied botany problems at the start of the 21st century: all-Russian conference. – Petrozavodsk, 2008. – P. 217-220.
3. Ryabushkina N., Gemedjjeva N., Kobaisy M., Cantrell C.L. Brief review of Kazakhstan flora and use of its wild species //Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology. – 2008. – Vol. 2(2). – P. 64-71.
4. Ромаданова Н.В., Кушнаренко С.В. Биотехнология получения безвирусных саженцев яблони //Вестник Карагандинского университета. Серия: Биология. Медицина. География. – 2021. – Т. 103(3). – С. 102-118.
5. Яременко Л.М. Биологические особенности декоративных видов рода яблоня (*Malus* Mill.) и перспективы их использования: автореф. дис. канд. биол. наук. – Киев, 1964. – 3 с.
6. Janick J. Horticultural reviews: wild apple and fruit trees of central Asia //John Wiley & Sons. – 2003. – Vol. 29. – P. 33-97.
7. Джангалиев А.Д. Дикая яблоня Казахстана. – Алма-Ата: Наука, 1977. – 246 с.
8. Соломатин Н.М., Соломатина Е.А., Сорокопудов В.Н. Оценка плодов красномякотных гибридов яблони для производства компотов //Плодоводство и ягодоводство России. – 2017. – Т. 51. – С. 312-317.
9. Шалпыков К.Т., Бирченкоу гч Л., Тургунбаев К.Т., Кенжебаев С.К., Лазьков Г.А., Долотбаков А.К., Акуналиев Т.А., Бейшенбеков М.А. Формовое разнообразие яблони Недзвецкого (*Malus niedzwetzkyana* Dieck.) в орехово-плодовых лесах Южного Кыргызстана //Материалы Международной научно-практической конференции «Сохранение и устойчивое использование биоразнообразия плодовых культур и их диких сородичей». – Бишкек, 2011. – С. 25-28.
10. Red Book. Wild species of flora of the USSR in need of protection. – Leningrad: Nauka, 1975.
11. International Union for Conservation of Nature: The IUCN red list of threatened species. [Electron. resource] – URL: <http://www.iucnredlist.org/search/> (дата обращения: 20.02.2022).
12. Ruta C., Lambardi M., Ozudogru E.A. Biobanking of vegetable genetic resources by *in vitro* conservation and cryopreservation //Biodiversity and Conservation. – 2020. – P. 1-38.

13. Байтулин И.О. К проблеме сохранения хозяйственно-ценных редких видов растений //Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. – 2008. – Т. 1. – С. 3-7.
14. Gonzalez-Benito M.E., Martín C. In vitro preservation of Spanish biodiversity //In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. – 2011. – Vol. 47. – P.46-54.
15. Богачева И.А. Сообщества насекомых-филлофагов зеленых насаждений Екатеринбурга на разных видах растений родов *Malus*, *Padus*, *Salix* //Вестник Удмуртского университета. Серия «Биология. Науки о Земле». – 2014. – Т. 4. – С. 56-61.
16. Газиев М.А., Асадулаев З.М., Абдуллатипов Р.А. Интродукция и эколого-морфологическая оценка рода *Malus* Mill на Гунибском плато //Известия Дагестанского государственного педагогического университета. Естественные и точные науки. – 2011. – Т. 2. – С. 11-16.
17. Флора Жонгар-Алатауского государственного национального природного парка. [Электрон. ресурс] – URL: [www.sarkan-zhongaralatau-kz.online/](http://www.sarkan-zhongaralatau-kz.online/) (дата обращения: 28.02.2022).
18. International Union for Conservation of Nature: Current population trend. [Electron. resource]. – URL: <https://www.iucnredlist.org/species/63477/12681555#population/> (дата обращения: 28.02.2022).
19. Krishnan P.N., Decruse S.W., Radha R.K. Conservation of medicinal plants of Western Ghats, India and its sustainable utilization through in vitro technology //In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2011. – Vol. 47(1). – P. 110-122.
20. Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций: Стандарты генных банков для генетических ресурсов растений для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства. [Электрон. ресурс] – URL: <https://www.fao.org/3/i3704r/i3704r.pdf> (дата обращения: 28.02.2022)
21. Engelman F. Management of field and in vitro germplasm collections // Proceedings of a Consultation Meeting. –Cali, Colombia, 1999.
22. Chauhan R., Singh V., Quraishi A. In vitro conservation through slow-growth storage //In Synthetic seeds. – 2019. – P. 397-416.
23. Bekheet S.A. In vitro conservation of date palm germplasm //Date palm biotechnology. – Springer, Dordrecht, 2011. – P. 337-360.
24. Cordeiro S.Z., Simas N.K., Henriques A.B., Sato A. In vitro conservation of *Mandevilla moricandiana* (Apocynaceae): short-term storage and encapsulation–dehydration of nodal segments //In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2014. – Vol. 50(3). – P. 326-336.
25. Gopal J., Chamail A., Sarkar D. In vitro production of microtubers for conservation of potato germplasm: effect of genotype, abscisic acid, and sucrose //In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. – 2004. – Vol.40. – P. 485-490.
26. Tahtamouni R.W., Shibli R.A., Al-Abdallat A.M., Al-Qudah T.S., Younis L., Al-Baba H., Al-Ruwaiei H. In vitro conservation and cryopreservation of medicinal and aromatic plants: a review //Jordan Journal of Agricultural Sciences. – 2015. – Vol. 11(1). – P. 147-167.
27. Rai M.K., Shekhawat N.S., Gupta A.K., Phulwaria M., Ram K., Jaiswal U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress //Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2011. – Vol. 106(2). – P. 179-190.
28. Lambardi M., Benelli C., De Carlo A., Fabbri A., Grassi S., Lynch P.T. Medium-and long-term in vitro conservation of olive germplasm (*Olea europaea* L.) //IV International Symposium on Olive Growing 586. – Valenzano, Italy, 2000. – P. 109-112.
29. Silva R.C., Luis Z.G., Scherwinski-Pereira J.E. Short-term storage in vitro and large-scale propagation of grapevine genotypes //Pesquisa Agropecuária Brasileira. – 2012. – Vol. 47(3). – P. 344-350.

30. Kovalchuk I., Lyudvikova Y., Volgina M., Reed B.M. Medium, container and genotype all influence in vitro cold storage of apple germplasm //Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2009. – Vol. 96(2). – P. 127-136.
31. Hao Y.J., Deng X.X. Genetically stable regeneration of apple plants from slow growth //Plant cell, tissue and organ culture. – 2003. – Vol. 72(3). – P. 253-260.
32. Negri V., Tosti N., Standardi A. Slow-growth storage of single node shoots of apple genotypes //Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2000. – Vol. 62(2). – P. 159-162.
33. Nurtaza A., Magzumova G., Yessimseitova A., Karimova V., Shevtsov A., Silayev D., Kakimzhanova A. Micropropagation of the endangered species *Malus niedzwetzkyana* for conservation biodiversity in Kazakhstan //In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2021. – Vol. 57(6). – P. 965-976.
34. Quoirin M., Lepoivre P. Improved media for in vitro culture of *Prunus* Sp //Acta Hort. – 1977. – Vol. 78. – P. 437-442. doi.org/10.17660/ActaHortic.1977.78.54.
35. Tahtamouni R.W., Shibli R.A., Ajlouni M.M. Growth responses and physiological disorders in wild pear (*Pyrus syriaca* Boiss) during slow-growth in vitro preservation on osmostressing media //Plant Tissue Culture. – 2001. – Vol. 11(1). – P. 15-23.
36. Rajasekharan P.E., Sahijram L. In vitro conservation of plant germplasm //Plant biology and biotechnology. – Springer, New Delhi, 2015. – P. 417-443.
37. Moges A.D., Karam N.S., Shibli R.A. Slow growth in vitro preservation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl) shoot tips //Adv Hort. Sci. – 2003. – Vol. 17. – P. 1-8.
38. Gull I., Noreen A., Aslam M.S., Abbas Z., Athar M.A. Effect of gelling matrix composition, storage conditions and capsule breakage on germination of *Rosa indica* synthetic seeds //Journal of Animal & Plant Sciences. – 2019. – Vol. 29(1). – P. 109-116.
39. West T.P., Ravindra M.B., Preece J.E. Encapsulation, cold storage, and growth of *Hibiscus moscheutos* nodal segments //Plant cell, tissue and organ culture. – 2006. – Vol. 879(3). – P. 223-231.
40. Ozden-Tokatli Y., De Carlo A., Gumusel F., Pignattelli S., Lambardi M. Development of encapsulation techniques for the production and conservation of synthetic seeds in ornamental plants //Propagation of ornamental plants. – 2008. – Vol. 8(1). – P. 17-22.
41. Ekinci H., Çiftçi Y.Ö., Nadarajan J. Medium-and long-term conservation of ornamental plants using synthetic seed technology //Synthetic seeds. – Springer, Cham, 2019. – P. 259-281.
42. Haque S.M., Ghosh B. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed Production-a Biotechnological Approach for True-to-Type Propagation and In Vitro Conservation of an Ornamental Bulbaceous Plant *Drimiopsis kirkii* Baker //Applied biochemistry and biotechnology. – 2014. – Vol. 172(8). – P. 4013-4024.
43. Benelli C., Micheli M., De Carlo A. An improved encapsulation protocol for regrowth and conservation of four ornamental species //Acta Societatis Botanicorum Poloniae. – 2017. – Vol. 86(3). – P. 3559.
44. Lundergan C., Janick J. Low temperature storage of in vitro apple shoots [Germplasm preservation] //HortScience. – 1979. – P. 514.
45. Reed B.M., Chang Y. Medium-and long-term storage of in vitro cultures of temperate fruit and nut crops //Conservation of plant genetic resources in vitro. – 1997. – Vol. 1.
46. Chauhan R., Keshavkant S., Jadhav S.K., Quraishi A. In vitro slow-growth storage of *Chlorophytum borivilianum* Sant. et Fernand: a critically endangered herb //In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2016. – Vol. 52(3). – P. 315-321.
47. Silva T.L., Scherwinski-Pereira J.E. In vitro conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions //Pesquisa Agropecuária Brasileira. – 2011. – Vol. 46. – P. 384-389.

48. Sá A.J., Lédo A.S., Lédo C.A.S. Conservação in vitro de mangabeira da região nordeste do Brasil //Ciência Rural. – 2011. – Vol. 41. – P. 57-62.
49. Biondo R., Souza A.V., Bertoni B.W., Soares A.M., França S.C., Pereira A.M.S. Micropropagation, seed propagation and germplasm bank of *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson //Scientia Agricola. – 2007. – Vol. 64(3). – P. 263-268.
50. Sarasan V., Cripps R., Ramsay M.M. Conservation in vitro of threatened plants—progress in the past decade //In vitro Cellular & Developmental Biology–Plant. – 2016. – Vol. 42(3). – P. 206–214.
51. Kamińska M., Tretyn A., Trejgell A. Effect of jasmonic acid on cold-storage of *Taraxacum pinnatum* encapsulated shoot tips //Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2018. – Vol. 135(3). – P. 487-497.
52. Pan X., Zhang W.E., Li X. In vitro conservation of native Chinese wild grape (*Vitis heyneana* Roem. & Schult) by slow growth culture //Vitis. – 2014. – Vol. 53(4). – P. 207-214.
53. Arbeloa A., Marín J.A., Andreu P., García E., Lorente P. In vitro conservation of fruit trees by slow growth storage //VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants 1155. – 2015. – P. 101-106.

**А.С. Нұртаза<sup>1,2</sup>, Д.А. Дюсембекова<sup>1</sup>, А.А. Какимжанова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ұлттық биотехнология орталығы, Нұр-Сұлтан, Қазақстан

<sup>2</sup>Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан Қазақстан

### **Жойылып бара жатқан *Malus niedzwetzkyana* орта мерзімді сақтау хаттамасын оңтайландыру**

**Аңдатпа.** Биоәртүрлілікті сақтау өсімдіктердің генетикалық материалын табиғи ортадан тыс сақтау үшін *ex situ* тиімді әдістерін қажет етеді. Бұл тәсіл құнды, эндемикалық және жойылып бара жатқан өсімдік түрлерін ұзақ уақыт сақтайды. Кеңінен қолданылатын әдістердің бірі - *in vitro* мәдениетінде орта мерзімді сақтау. Мақалада Недзвецкий алма ағашының жойылып бара жатқан және эндемикалық түрлеріу микроклональды көбейтілген өркенін орта мерзімді сақтау нәтижелері сипатталған. *In vitro* сақтау қоректік орта құрамындағы осмотикалық агенттердің көмегімен жүзеге асырылды. Ол үшін өсіру шарттары зерттелді: температура (4°C және 24°C) және фотопериод (16/8 және қараңғыда өсіру), өсуді баяулататын қоректік ортаның құрамы (сахароза, маннитол, PVP, абсцис қышқылы). Зерттеу нәтижелері өркенді орта мерзімді сақтаудың оңтайлы шарты стандартты жағдайларда (24°C, фотопериод 16/8) 3% немесе 6% сахароза қосылған QL қоректік ортасы екенін көрсетті. Оңтайландырылған хаттама Недзвецкий алма ағашының экспланттарын 2 ай бойы қайта өсіруге мүмкіндік берді. Сонымен қатар, экспланттарды қалпына келтіру кезеңі тез өтті, тек бір пассаж кезінде.

**Түйін сөздер:** Недзвецкий алма ағашы, *Malus niedzwetzkyana*, биоәртүрлілікті сақтау, *in vitro* мәдениеті, орта мерзімді сақтау, осмотикалық агенттер, абсцис қышқылы.

**A.S. Nurtaza<sup>1,2</sup>, D.A. Dyussebekova<sup>1</sup>, A.A. Kakimzhanova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>National Center for Biotechnology, Nur-Sultan, Kazakhstan

<sup>2</sup>L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan

### **Optimization of the medium-term storage protocol for the endangered *Malus niedzwetzkyana***

**Abstract.** The conservation of biodiversity requires efficient *ex situ* methods for the storage of plant genetic material outside the natural habitat. This approach allows for the preservation of valuable, endemic, and endangered plant species for a long time. One widely used method is medium-term storage in *in vitro* culture. In our work, we describe the results of medium-term storage of microclonally

propagated shoots of an endangered and endemic species of the *Malus niedzwetzkyana*. *In vitro* preservation was realized with the help of osmotic agents in the nutrient medium. For this, there were studied the cultivation conditions such as temperature (4°C and 24°C) and photoperiod (16/8 and growing in the dark), and the composition of nutrient media to slow growth (sucrose, mannitol, PVP, abscisic acid). The research results showed that the optimal condition for medium-term storage of shoots is the QL nutrient medium with the addition of 3% or 6% sucrose under standard conditions (24°C, photoperiod 16/8). The optimized protocol made it possible to preserve *Malus niedzwetzkyana* explants for 2 months without recultivation. Moreover, the stage of explant recovery was fast, during only one passage.

**Keywords:** *Malus niedzwetzkyana*, biodiversity conservation, *in vitro* culture, medium-term storage, osmotic agents, abscisic acid.

## References

1. Gemedjiewa N., Jaime, Teixeira da Silva A., Ryabushkina N. Representation of Endemics in Floristic Subprovinces of Kazakhstan, *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 4, 56-63 (2010).
2. Grudzinskaya L.M., Tazhkulova N. Introductory valuation of plants in the *Apiaceae* Lindl. Family, *Fundamental and applied botany problems at the start of the 21st century: all-Russian conference*, Petrozavodsk, 217-220 (2018).
3. Ryabushkina N., Gemedjiewa N., Kobaisy M., Cantrell C.L. Brief review of Kazakhstan flora and use of its wild species, *Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2(2), 64-71 (2008).
4. Romadanova N.V., Kushnarenko S.V. Biotehnologija poluchenija bezvirusnyh sazhencev jabloni. *Vestnik Karagandinskogo universiteta. Serija: Biologija. Medicina. Geografija* [Biotechnology for obtaining virus-free seedlings of apple trees. *Bulletin of Karaganda University. Series: Biology. The medicine. Geography*], 103(3), 102-118 (2015). [in Russian]
5. Jaremenko L.M. *Biologicheskie osobennosti dekorativnyh vidov roda jablonja (Malus Mill.) i perspektivy ih ispol'zovaniya: avtoref. dis. kand. biol. Nauk* [Biological features of ornamental species of the genus apple tree (*Malus* Mill.) and prospects for their use: Abstract of the dissertation of the candidate of biological sciences] (Kyiv, 1964. 3 p.). [in Russian]
6. Janick J. *Horticultural reviews: wild apple and fruit trees of central Asia*, John Wiley & Sons, 29, 33-97 (2003).
7. Dzhangaliev A.D. *Dikaja jablonja Kazahstana [Wild apple tree of Kazakhstan]* (Alma-Ata: Science, 1977, 246 p.). [in Russian]
8. Solomatina N.M., Solomatina E.A., Sorokopudov V.N. *Ocenka plodov krasnomjakotnyh gibridov jabloni dlja proizvodstva kompotov, Plodovodstvo i jagodovodstvo Rossii* [Evaluation of the fruits of red-fleshed apple hybrids for the production of compotes, Fruit growing and berry growing in Russia], 51, 312-317 (2017). [in Russian]
9. Shalpykov K.T., Birchenough L., Turgunbaev K.T., Kenzhebaev S.K., Laz'kov G.A., Dolotbakov A.K., Akunaliyev T.A., Bejshenbekov M.A. *Formovoe raznoobrazie jabloni Nedzveckogo (Malus niedzwetzkyana Dieck.) v orehovo-plodovyh lesah Juzhnogo Kyrgyzstana, Materialy Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii «Sohranenie i ustojchivoe ispol'zovanie bioraznoobrazija plodovyh kul'tur i ih dikih sorodichej»*, Bishkek [Form diversity of the Nedzvetzky apple tree (*Malus niedzwetzkyana* Dieck.) in the walnut-fruit forests of Southern Kyrgyzstan, Proceedings of the International Scientific and Practical Conference "Conservation and sustainable use of the biodiversity of fruit crops and their wild relatives", Bishkek], 25-28 (2011). [in Russian]
10. *Red Book. Wild species of flora of the USSR in need of protection* (Leningrad, Nauka, 1975).
11. International Union for Conservation of Nature: The IUCN red list of threatened species. [Electronic resource]. Available at: <http://www.iucnredlist.org/search/> (Accessed: 20.02.2022).

12. Ruta C., Lambardi M., Ozudogru E.A. Biobanking of vegetable genetic resources by in vitro conservation and cryopreservation, *Biodiversity and Conservation*, 1, 1-38 (2020).
13. Bajtulin I.O. K probleme sohraneniya hozjajstvenno-cennyh redkih vidov rastenij, *Izvestija NAN RK. Serija biologicheskaja i medicinskaja* [To the problem of conservation of economically valuable rare plant species, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series biological and medical*], 1, 3-7 (2008). [in Russian]
14. Gonzalez-Benito M.E., Martín C. In vitro preservation of Spanish biodiversity, *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*, 47, 46-54 (2011).
15. Bogacheva I.A. Soobshhestva nasekomyh-fillofagov zelenyh nasazhdenij Ekaterinburga na raznyh vidah rastenij rodov *Malus*, *Padus*, *Salix*, *Vestnik Udmurtskogo universiteta. Serija «Biologija. Nauki o Zemle»* [Phyllophagous insect communities of Yekaterinburg green spaces on different plant species of the genera *Malus*, *Padus*, *Salix*, *Bulletin of the Udmurt University. Series "Biology. Earth Sciences"*], 4, 56-64 (2014).
16. Gaziev M.A., Asadulaev Z.M., Abdullatipov R.A. Introdukcija i jekologo-morfologicheskaja ocenka roda *Malus* Mill na Gunibskom plato, *Izvestija Dagestanskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta. Estestvennye i tochnye nauki*. [Introduction and ecological and morphological assessment of the genus *Malus* Mill on the Gunib Plateau, *Bulletin of the Dagestan State Pedagogical University. Natural and exact sciences.*], 2, 11-16 (2001). [in Russian]
17. Flora Zhongar-Alatauskogo gosudarstvennogo nacional'nogo prirodnoho parka [Flora of Zhongar-Alatau State National Natural Park]. [Electronic resource] – Available at: [www.sarkan-zhongaralatau-kz.online/](http://www.sarkan-zhongaralatau-kz.online/) (Accessed: 28.02.2022). [in Russian]
18. International Union for Conservation of Nature: Current population trend. [Electronic resource]. Available at: <https://www.iucnredlist.org/species/63477/12681555#population/> (Accessed: 28.02.2022).
19. Krishnan P.N., Decruse S.W., Radha R.K. Conservation of medicinal plants of Western Ghats, India and its sustainable utilization through in vitro technology, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(1), 110-122 (2011).
20. Prodovol'stvennaja i sel'skohozjajstvennaja organizacija Obedinennyh Nacij: Standarty gennyh bankov dlja geneticheskikh resursov rastenij dlja proizvodstva prodovol'stviya i vedenija sel'skogo hozjajstva [Food and Agriculture Organization of the United Nations: Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture.]. [Electronic resource]. Available at: <https://www.fao.org/3/i3704r/i3704r.pdf/> (Accessed: 28.02.2022). [in Russian]
21. Engelmann F. Management of field and in vitro germplasm collections, *Proceedings of a Consultation Meeting (Cali, Colombia, 1999)*.
22. Chauhan R., Singh V., Quraishi A. In vitro conservation through slow-growth storage, *Synthetic seeds*, 397-416 (2019).
23. Bekheet S.A. In vitro conservation of date palm germplasm, *Date palm biotechnology* (Springer, Dordrecht, 2011, P. 337-360).
24. Cordeiro S.Z., Simas N.K., Henriques A.B., Sato A. In vitro conservation of *Mandevilla moricandiana* (*Apocynaceae*): short-term storage and encapsulation–dehydration of nodal segments, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(3). 326-336 (2014).
25. Gopal J., Chamail A., Sarkar D. In vitro production of microtubers for conservation of potato germplasm: effect of genotype, abscisic acid, and sucrose, *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 40, 485-490 (2004).
26. Tahtamouni R.W., Shibli R.A., Al-Abdallat A.M., Al-Qudah T.S., Younis L., Al-Baba H., Al-Ruwaiei H. In vitro conservation and cryopreservation of medicinal and aromatic plants: a review, *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 11(1), 147-167 (2015).

27. Rai M.K., Shekhawat N.S., Gupta A.K., Phulwaria M., Ram K., Jaiswal U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(2), 179-190 (2011).
28. Lambardi M., Benelli C., De Carlo A., Fabbri A., Grassi S., Lynch P.T. Medium-and long-term in vitro conservation of olive germplasm (*Olea europaea* L.), IV International Symposium on Olive Growing 586, Valenzano, Italy, 109-112 (2000).
29. Silva R.C., Luis Z.G., Scherwinski-Pereira J.E. Short-term storage in vitro and large-scale propagation of grapevine genotypes, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(3), 344-350 (2012).
30. Kovalchuk I., Lyudvikova Y., Volgina M., Reed B.M. Medium, container and genotype all influence in vitro cold storage of apple germplasm, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96(2), 127-136 (2009).
31. Hao Y.J., Deng X.X. Genetically stable regeneration of apple plants from slow growth, *Plant cell, tissue and organ culture*, 72(3), 253-260 (2003).
32. Negri V., Tosti N., Standardi A. Slow-growth storage of single node shoots of apple genotypes, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62(2), 159-162(2000).
33. Nurtaza A., Magzumova G., Yessimseitova A., Karimova V., Shevtsov A., Silayev D., Kakimzhanova A. Micropropagation of the endangered species *Malus niedzwetzkyana* for conservation biodiversity in Kazakhstan, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 57(6). 965-976 (2021).
34. Quoirin M., Lepoivre P. Improved media for in vitro culture of *Prunus* Sp, *Acta Horti*, 78, 437-442 (1977).
35. Tahtamouni R.W., Shibli R.A., Ajlouni M.M. Growth responses and physiological disorders in wild pear (*Pyrus syriaca* Boiss) during slow-growth in vitro preservation on osmostressing media, *Plant Tissue Culture*, 11(1), 15-23 (2001).
36. Rajasekharan P.E., Sahijram L. In vitro conservation of plant germplasm, *Plant biology and biotechnology* (Springer, New Delhi, 2015., P. 417-443).
37. Moges A.D., Karam N.S., Shibli R.A. Slow growth in vitro preservation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl) shoot tips, *Adv Horti Sci.*, 17, 1-8 (2003).
38. Gull I., Noreen A., Aslam M.S., Abbas Z., Athar M.A. Effect of gelling matrix composition, storage conditions and capsule breakage on germination of *Rosa indica* synthetic seeds, *Journal of Animal & Plant Sciences*, 29(1), 109-116 (2019).
39. West T.P., Ravindra M.B., Preece J.E. Encapsulation, cold storage, and growth of *Hibiscus moscheutos* nodal segments, *Plant cell, tissue and organ culture*, 879(3), 223-231 (2006).
40. Ozden-Tokatli Y., De Carlo A., Gumusel F., Pignattelli S., Lambardi M.. Development of encapsulation techniques for the production and conservation of synthetic seeds in ornamental plants *Propagation of ornamental plants*, 8(1), 17-22 (2008).
41. Ekinci H., Çiftçi Y.Ö., Nadarajan J. Medium-and long-term conservation of ornamental plants using synthetic seed technology, *Synthetic seeds*. (Springer, Cham, 2019, P. 259-281).
42. Haque S.M., Ghosh B. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed Production—a Biotechnological Approach for True-to-Type Propagation and In Vitro Conservation of an Ornamental Bulbaceous Plant *Drimiopsis kirkii* Baker, *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(8), 4013-4024 (2014).
43. Benelli C., Micheli M., De Carlo A. An improved encapsulation protocol for regrowth and conservation of four ornamental species, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 86(3), 3559 (2017).
44. Lundergan C., Janick J. Low temperature storage of in vitro apple shoots [Germplasm preservation], *HortScience*, 514 (1979).
45. Reed B.M., Chang Y. Medium-and long-term storage of in vitro cultures of temperate fruit and nut crops, *Conservation of plant genetic resources in vitro*, 1, (1997).

46. Chauhan R., Keshavkant S., Jadhav S.K., Quraishi A. In vitro slow-growth storage of *Chlorophytum borivillianum* Sant. et Fernand: a critically endangered herb, *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52(3), 315-321 (2016).
47. Silva T.L., Scherwinski-Pereira J.E. In vitro conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46, 384-389 (2011).
48. Sá A.J., Lédo A.S., Lédo C.A.S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil, *Ciência Rural*, 41, 57-62 (2011).
49. Biondo R., Souza A.V., Bertoni B.W., Soares A.M., França S.C., Pereira A.M.S. Micropropagation, seed propagation and germplasm bank of *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson, *Scientia Agricola*, 64(3), 263-268 (2007).
50. Sarasan V., Cripps R., Ramsay M.M. Conservation in vitro of threatened plants—progress in the past decade, *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(3), 206-214 (2016).
51. Kamińska M., Tretyn A., Trejgell A. Effect of jasmonic acid on cold-storage of *Taraxacum pieninicum* encapsulated shoot tips, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 135(3), 487-497 (2018).
52. Pan X., Zhang W.E., Li X. In vitro conservation of native Chinese wild grape (*Vitis heyneana* Roem. & Schult) by slow growth culture, *Vitis*, 53(4), 207-214 (2014).
53. Arbeloa A., Marín J.A., Andreu P., García E., Lorente P. In vitro conservation of fruit trees by slow growth storage, VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants 1155, 101-106 (2015).

#### **Сведения об авторах:**

**Нуртаза А.С.** – научный сотрудник лаборатории биотехнологии и селекции растений Национального центра биотехнологии, Кургальжинское шоссе, 13/5, Нур-Султан, Казахстан.

**Дюсембекова Д.А.** – научный сотрудник лаборатории биотехнологии и селекции растений Национального центра биотехнологии, Кургальжинское шоссе, 13/5, Нур-Султан, Казахстан.

**Какимжанова А.А.** – д.б.н., доцент, зав. лабораторией биотехнологии и селекции растений Национального центра биотехнологии, Кургальжинское шоссе, 13/5, Нур-Султан, Казахстан.

**Nurtaza A.S.** – researcher of the laboratory of biotechnology and plant breeding, National Center for Biotechnology, 13/5, Kurgalzhynskoye road, Nur-Sultan, Kazakhstan.

**Dyussebekova D.A.** – researcher of the laboratory of biotechnology and plant breeding, National Center for Biotechnology, 13/5, Kurgalzhynskoye road, Nur-Sultan, Kazakhstan.

**Kakimzhanova A.A.** – doctor of biological sciences, associated professor, head of the laboratory of biotechnology and plant breeding, National Center for Biotechnology, 13/5, Kurgalzhynskoye road, Nur-Sultan, Kazakhstan.