

ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЖИМА ДЕПОНИРОВАНИЯ АСЕПТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР *IN VITRO* РЕДКОГО И ЭНДЕМИЧНОГО ВИДА *ALLIUM IVASCZENKOWAE*Тагиманова Д. <sup>ID</sup>, Райзер О. <sup>ID</sup>, Нагметова Г. <sup>ID</sup>, Хапилина О. <sup>ID</sup>

Национальный центр биотехнологии, Кургальжинское шоссе 13/5, Астана, 010000

\* Correspondence: tagds@mail.ru

## АННОТАЦИЯ

Оптимизация метода среднесрочного хранения редких, исчезающих и лекарственных видов растений в условиях *in vitro* с использованием современных подходов биотехнологии является актуальной задачей. В качестве исходного материала были использованы асептические микрорастения *Allium ivasczenkoe* (Лук Иващенко). Культивирование микрорастений проводили на питательных средах, дополненных в разных сочетаниях повышенной концентрацией сахарозы, маннитом, хлорхолинхлоридом, АБК и БАП при различных температурных и световых режимах депонирования. Динамика выживаемости *A. ivasczenkoe* изменялась в зависимости от режимов культивирования. В ходе эксперимента наиболее лучшие результаты были достигнуты при выращивании асептических культур в течение 9 месяцев при умеренно пониженной положительной температуре и низкой интенсивности освещения (режим 2) на питательных средах с внесением ретарданта ССС 120 мг/л и концентрацией сахарозы 60г/л и (В-1) и среде МС содержащей 0,5 мг/л БАП и 3 г/л маннита (МСВМ). Данный режим депонирования позволил удлинить период между пересадками, а также сохранить жизнеспособность микрорастений *A. ivasczenkoe* от 60 до 80%. Полученные данные позволяют оптимизировать режим среднесрочного хранения *Allium ivasczenkoe* в условиях *in vitro* для массового получения редких видов луковичных растений в целях восстановления, воспроизводства и сохранения численности ценного генофонда и природных популяций, создания генных банков *in vitro*, реинтродукции и зелёного строительства.

**Ключевые слова:** культура *in vitro*, *Allium ivasczenkoe*, микрорастения, редкий вид, депонирование, биоразнообразие, эксплант, ингибиторы роста.

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из современных биотехнологических методов сохранения ценных генетических ресурсов вне их естественной среды обитания (*ex situ*) является создание и продолжительное поддержание культуры микрорастений *in vitro*.

Используя метод длительного хранения (депонирование) в условиях *in vitro*, подбираются оптимальные условия, при которых можно увеличить промежуток времени между пересадками, за счёт изменения ростовой динамики культур в сторону замедления, сохраняя при этом их высокую жизнеспособность.

Сохранение в условиях замедленного роста представляет собой эффективный метод для сохранения генетического фонда растений, который позволяет поддерживать биологический материал в течение периода от нескольких месяцев до 2-3 лет, без необходимости пересадки в питательную среду [1]. Снижение интенсивности роста достигается путем изменения состава среды и условий культивирования. Эти изменения включают в себя адаптацию минерального состава среды, уровня углеводов, регулирование концентрации или комбинаций ростовых регуляторов, добавление веществ с осмотической активностью, а также снижение положительных температур и интенсивности освещения [2].

Для контроля ростовых процессов растений применяют разнообразные методы. Одним из них является выращивание растений при низких положительных температурах и низкой интенсивности освещения, что существенно замедляет физиологические процессы растений. Дополнительные стратегии включают в себя введение компонентов, которые поддерживают оптимальный

осмотический ресурс питательной среды, такие как сорбит, маннит, повышенные уровни сахарозы и подобные. Кроме того, используют ретарданты, способствующие замедлению роста культур, такие как поливинилпирролидон, абсцизовая кислота, хлорхолинхлорид и аналогичные вещества. Еще одним методом является уплотнение состава питательной среды путем повышения концентрации агара и добавления активированного угля [3].

Абсцизовая кислота (АБК) является одним из наиболее эффективных естественных эндогенных ингибиторов роста. Ее воздействие на гормональную регуляцию физиологических процессов в инкубационных средах обладает существенной силой [4].

Следует также отметить наличие данных о применении другого регулятора роста - хлорхолинхлорида (ССС). ССС ингибирует синтез гибберелинов, при их недостатке происходит замедление ростовых процессов, особенно на стадии развития. Присутствие ССС в составе питательной среды увеличивает концентрацию ингибиторов роста вследствие изменения состава эндогенных биологически активных соединений [5].

Исследования, проведенные на растениях родов *Lonicera*, *Chrysanthemum* и *Crepis*, подтверждают уменьшение скорости роста эксплантов при использовании сред с повышенным содержанием сахарозы. [6, 7, 8]. Для многих изученных редких и исчезающих видов были выявлены оптимальные условия сохранения *in vitro*, включающие в себя использование питательной среды с половинной концентрацией солей МС ( $\frac{1}{2}$  МС), дополненной гормоном бензиламинопурином (БАП) и сниженной температуре (3-7°C), а также выделены оптимальные типы эксплантов (фрагменты побегов, содержащие один-два метамера, почки возобновления, пазушные лу-

ковички и их сегменты).

Представители рода *Allium L.* - многолетние травянистые растения, относящиеся к подсемейству Луковые (*Alliaceae*) в семействе амариллисовые (*Amaryllidaceae*). Род *Allium L.* является одним из крупнейших родов растений во флоре Казахстана, включая в себя 140 видов, из которых 21 вид встречается на территории Казахского Алтая, Сауро-Манрака и Зайсанской котловины [9].

Среди семейства растений *Allium* выделяется значительное количество редких видов, включая эндемики и реликты, которые представляют интерес для научного сообщества с целью проведения исследований для сохранения биоразнообразия.

Одним из них является *Allium ivasczenkoae*, редкий вид, численность которого активно уменьшается. На сегодняшний день известно всего три небольших популяции вида, занимающие незначительные территории [10]. Поэтому для сохранения этого ценного вида необходимо принимать меры государственной защиты.

Для решения проблемы исчезновения данного вида в местах его естественного обитания необходимо применять современные методы биотехнологии, одним из ключевых аспектов которых является поддержание долгосрочной жизнеспособности пробирочных растений, а также их отдельных органов.

Наиболее распространенные стратегии сохранения растений *in vitro*, используемые в биотехнологии, включают в себя поддержание растений в активных условиях роста, долгосрочное депонирование и криоконсервацию культур [11]. Эти методы позволяют минимизировать необходимость в больших земельных площадях для выращивания материнских растений и их размножения, а также исключают потребность в регулярном уходе за растениями, что способствует предотвращению заболеваний и сохранению генетического материала. Кроме того, они предоставляют возможность восстановления популяции охраняемых видов растений через создание искусственных популяций в их естественной среде обитания и способствуют получению стерильных экземпляров редких и эндемичных видов растений, избегая выемки из природных мест обитания и тем самым, не нарушая естественного фитоценоза. [12, 13, 14].

В дополнение к вышеупомянутому, существует ряд

Таблица 1. Состав питательных сред для оптимизации режимов культивирования

Среда	Сахароза, г/л	БАП, мг/л	ССС, мг/л	АБК, мг/л	Маннит, г/л
В-1	6	-	120	-	-
В-2	2	-	120	-	-
В-3	6	-	-	5	-
В-4	2	-	-	5	-
МСВМ	3	0,5	-	-	3

Таблица 2. Последовательности iPBS праймеров

ID	Последовательность 5'-3'	Температура отжига, °C
2238	ACCTAGCTCATGATGCCA	60.0
2239	ACCTAGGCTCGGATGCCA	58.0
2252	TCATGGCTCATGATACCA	54.0
2401	AGTTAAGCTTTGATACCA	52.0

трудностей, связанных с обеспечением генетической однородности линий-регенерантов из-за возникновения соматических вариаций при проведении культивирования *in vitro*. Для решения данной проблемы в зависимости от технической оснащенности исследовательских групп используют различные маркерные системы – RAPD, SSR, ISSR, iPBS [15, 16]. Использование современных молекулярно-генетических маркеров позволяет установить генетическую однородность клонированных растений.

Нерегулируемый сбор луковиц и цветущих побегов *Allium ivasczenkoae* может привести к исчезновению этого редкого вида, поэтому необходима разработка новых эффективных биотехнологических методов для его сохранения. Основной целью нашего исследования является разработка эффективной системы сохранения редкого вида *A. ivasczenkoae* в коллекции *in vitro*, а также оценка генетической стабильности регенерантов после проведения депонирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали стерильные микрорастения *A. ivasczenkoae* (12-15 мм), полученные на среде МС с различным сочетанием цитокининов.

Для среднесрочного хранения *A. ivasczenkoae* использовали питательные среды МС и уменьшенный вдвое состав этой же среды, без фитогормонов, дополненные сахарозой в концентрации 2% и 6%. В качестве ингибитора роста использовали хлорхолинхлорид (ССС) в концентрации 120 мг/л, абсцизовая кислота (АБК) 5 мг/л, БАП 0,5 мг/л, маннит 3 г/л (таблица 1).

Экстракцию ДНК проводили из 3-5 дневных стерильных проростков лука, с использованием СТАВ-буфера. Количественное определение концентрации ДНК определяли спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра NanoDrop1000 (Thermo Scientific).

В исследовании использовали iPBS праймеры для выявления степени генетической стабильности депонированных микрорастений *A. ivasczenkoae*. В качестве контроля использовали растения из природных популяций вида. В таблице 2 представлены последовательности используемых праймеров.

Реакцию ПЦР проводили в объеме 10 мкл реакционной смеси, включающей 2 мкл ДНК, Master Mix Plan Direct 5 мкл, 1 мкл праймера (5 мМ), 1 мкл MQ. Режим амплификации был следующим: предварительная денатурация при 98°C в течение 3 минут, затем 35 циклов: 98°C – 15 с, температура отжига праймеров 52-60°C – 30с., 72°C – 1 минута, 72°C – 2 минуты. Полученные продукты амплификации визуализировали в 1,5% агарозном геле в 1х TBE.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

У растений *A. ivasczenkoae* при длительном хранении наблюдали обводнение чешуй луковец, некроз и отмирание побегов. В течении всего процесса культивирования в базальной части луковицы наблюдалось появление отдельных адвентивных побегов. Длительность хранения была ограничена не только жизнеспособностью микро-растений, но и уменьшением объема питательной среды вследствие ее истощения, что требовало постоянного мониторинга и управления уровнем питательной среды в культурных сосудах (рисунок 1).

С момента помещения эксплантов луковичных растений на различные питательные среды их развитие происходило неравномерно. В течение первого месяца культивирования эксплантов наблюдали формирование из них полноценных растений на большинстве апробированных средах. Наиболее интенсивный рост стеблей, формирование листьев, сильно развитой корневой системы продолжались еще и в последующие два месяца культивирования.

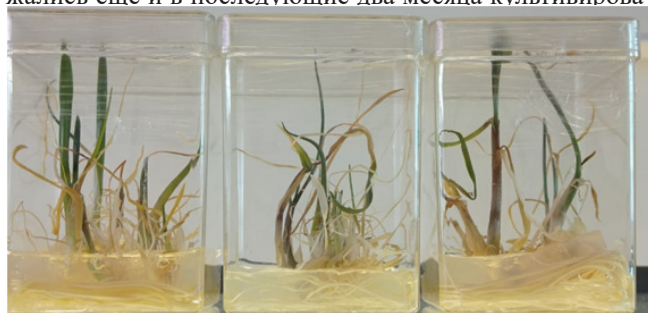


Рисунок 1. Депонирование *A. ivasczenkoae* на среде MCBM

Затем рост главных стеблей минимизировался либо прекращался.

По истечении 9 месяцев непрерывного культивирования среднее количество стеблей на всех вариантах среды варьировало от 1,0 до 3,2 шт. на эксплант; количество листьев на одно растение 1,4-3,9 шт., максимальная длина листьев - 13,3 см, минимальное значение - 5,3 см. Количество и длина корней варьировали от 5,3 до 11 шт. и от Таблица 3. Динамика роста и развития редкого и эндемичного вида лука *A. ivasczenkoae* на различных вариантах среды в течении 9 месяцев

3,1 до 13,7 см соответственно.

Было отмечено, что наибольший коэффициент размножения (3,2 побега на эксплант) при отсутствиях аномалий после 9 месяцев хранения культуры, был на среде MCBM и В-1. Данные по динамике роста и развития редкого и эндемичного вида лука *A. ivasczenkoae* представлены в таблице 3.

Контролем служили экспланты, которые культивировали при стандартных условиях на среде МС без добавления ингибиторов роста. Были учтены такие морфобиологические показатели, как количество, длина корней и листьев на различных вариантах питательных сред. Количество листьев увеличилось от 0,23 до 0,6 штук. Увеличение данного показателя отмечено на всех вариантах среды, кроме среды В-2, количество листьев осталось неизменным в течении всего периода депонирования - 0,7 шт. На всех вариантах длина корней увеличилась от 0,02 до 6,8 см, увеличение длины листьев варьировало от 0,26 до 4,35 см. Отмечается, что на варианте В-2 заметно увеличилась длина листьев по сравнению с другими вариантами и контролем, однако несмотря на это изменение, длина корней сохранилась на уровне первого пассажа. Следует отметить, что прирост количества корней был отмечен только на варианте среды В-1 и MCBM (3,0 и 0,75 шт. соответственно). Увеличение диаметра луковиц отмечено на варианте В-1 и В-2 (0,2 и 0,1 см. соответственно).

После анализа результатов были определены варианты питательной среды В-1 и MCBM, поскольку именно на этих вариантах была выявлена наиболее выраженная динамика роста и развития органогенеза.

После депонирования в выбранных режимах (В-1 и MCBM) микро-растения пересаживали на свежие питательные среды МС без ингибиторов роста. Этот период представляет собой значимый показатель эффективности применяемого протокола. После пересадки на стандартные среды микро-растения успешно прошли процесс регенерации, возобновления роста и развития, а также продемонстрировали высокую ризогенную активность. Морфогенетические показатели растений, депонированных на среде В-1 составили до 95,2%, на варианте MCBM - 88,8%. Микро-растения *A. ivasczenkoae* проявляли высокую жизнеспособность, это подтверждается их интенсивной частотой регенерации – активным образованием стеблей и корней. Растения с вариантом В-2 показали снижение морфогенетических показателей - 72,2%. Активный рост корней и стеблей не был зафиксирован. У микро-растений *A. ivasczenkoae*, культивируемых на средах В-3 и В-4 отмечено снижение процесса регенерации, после пересадки их в нормальные климатические условия

Вид	Вариант среды	Количество, шт.		Длина, см		Диаметр луковиц, см
		корней	листьев	корней	листьев	
<i>A. ivasczenkoae</i>	В-1	+3,0	+0,25	+1,57	+0,26	+0,2
	В-2	-	-0,7	-1,42	+4,35	+0,1
	В-3	-	+0,55	+0,62	+0,62	-
	В-4	-	+0,23	+0,02	+0,29	-
	МСВМ	+0,75	+0,6	+6,8	+0,85	-
	МС (контроль)	-	+0,25	-	+1,44	-

вия. Показатели регенерационной активности составили – 14,3% и 12,7% соответственно. У растений отмечено проявление признаков ослабления: уменьшение количества листьев и бледно-зеленый окрас, корнеобразование не наблюдалось. Также отмечали эксплантаты с признаками некроза, хлороза, усыхания, выраженных в полной степени либо частично, погибшие эксплантаты.

Таким образом, для длительного хранения в культуре *in vitro* редкого исчезающего вида *A. ivasczenkoae* наиболее оптимальным является вариант среды В-1 и МСВМ. На данном варианте микрорастения приостановили рост, размножение и при этом сохранили жизнеспособность после перевода их в нормальные условия культивирования, побеги имели насыщенный зеленый цвет, наблюдалось образование новых луковичек.

Из анализа литературных данных известно, что на длительное культивирование растений кроме веществ, обладающих высокой осмотической активностью, ретардантов и органических соединений существенную роль оказывает температурный и световой режим хранения [17, 18, 19, 20].

В ходе исследования были проанализированы различные температурные и световые режимы депонирования микрорастений *A. ivasczenkoae* с целью замедления их роста и обеспечения длительного хранения. Результаты эксперимента представлены в таблице 4.

Динамика выживаемости *A. ivasczenkoae* изменялась в зависимости от режимов культивирования. Через 9 месяцев депонирования выживаемость пробирочных растений при режиме 1 (контроль) составила 20%, режиме 2 - 60-80%, режиме 3 - 30-50%. В ходе эксперимента наиболее лучшие результаты были достигнуты при выращивании асептических культур в течение 9 месяцев при умеренно пониженной положительной температуре и низкой интенсивности освещения (режим 2) на питательных средах с внесением ретарданта ССС 120 мг/л и концентрацией сахарозы 60г/л и (В-1) и среде МС содержащей 0,5 мг/л БАП и 3 г/л маннита (МСВМ). Данный режим депонирования позволил удлинить период между пересадками, а также сохранить жизнеспособность микрорастений *A. ivasczenkoae* от 60 до 80% (рисунок 2).

В результате использования методов, направленных на снижение температуры культивирования, снижение концентрации минеральных компонентов в питательной среде, с добавлением повышенной концентрации саха-

розы, хлорхолинхлорида и БАП, нам удалось увеличить период беспересадочного субкультивирования до 9 меся-



Рисунок 2. Депонирование асептических культур *A. ivasczenkoae* при пониженной положительной температуре и слабой интенсивности освещения

цев редкого и исчезающего вида *A. ivasczenkoae*.

Сразу после пересадки на стандартные среды микрорастения успешно прошли процесс регенерации, возобновления роста и развития, и проявили высокую способность к образованию корней. Далее провели укоренение и адаптацию пробирочных растений к условиям *ex vitro* (рисунок 3, 4).

Использование смеси торфа и песка в качестве субстрата способствовало стимуляции ростовых процессов. На этом субстрате было замечено появление новых листьев и активный рост имеющихся. В то время как при использовании смеси торфа и перлита в соотношении 2:1, не наблюдалось образования новых листьев, и в некоторых случаях растения начинали гнить. Следовательно, наиболее оптимальным субстратом для адаптации растений *A. ivasczenkoae* является смесь торфа и песка в соотношении 2:1, что способствует получению большого числа успешно акклиматизированных растений.

Сохранение генетической стабильности популяций является важной задачей при создании коллекций *in vitro*. С целью оценки генетической стабильности растений при депонировании *in vitro* проведен iPBS-анализ геномной

Таблица 4. Жизнеспособность микрорастений при различных световых и температурных режимах на разных питательных средах

Генотип	Вариант среды	Режим	Длительность хранения культур, месяцы		
			3	6	9
<i>A. ivasczenkoae</i>	В-1	26°C, 16/8 ч, 2,0 клк	50	40	20
		4°C, 6/18 ч, 0,5 клк	90	85	80
		4°C, темнота	80	60	50
	МСВМ	26°C, 16/8 ч, 2,0 клк	50	50	20
		4°C, 6/18 ч, 0,5 клк	100	70	60
		4°C, темнота	80	40	30

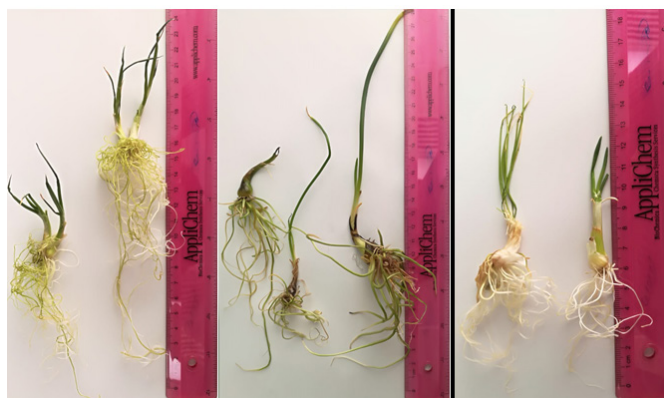


Рисунок 3. Растения редкого и эндемичного вида *A. ivasczenkoae*

ДНК материнских растений и депонированных микро-растений *A. ivasczenkoae*. В iPBS-анализе использовали четыре специфических праймера, что позволило получить амплифицированные фрагменты размером от 600 до 3000 п.н. (рисунок 5).

*A. ivasczenkoae* с праймером 2239

Температура отжига праймеров варьировала в диапазоне от 52 до 60°C. При детекции амплифицированных участков полиморфизм iPBS-ПЦР-фрагментов не выявлен. В результате полученные данные показали, что iPBS профили ДНК микропобегов после депонирования в течении 9 месяцев *in vitro* при низкой положительной температуре были полностью идентичны по количеству и длине ампликонов между материнскими растениями и микро-растениями *in vitro A. ivasczenkoae*.

В результате iPBS-анализа установлено, генетическое соответствие между материнскими растениями и микро-растениями, которые находились на длительном хранении. Отсутствие различий в характере полос в анализируемых образцах для конкретного праймера указывает на стабильность генетических характеристик как у материнских растений, так и у растений, размноженных *in vitro* и сохраненных в течении продолжительного периода времени.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Метод депонирования растений *in vitro* характеризуется ингибированием вегетативной активности хранимого материала и является наиболее распространенным способом хранения. Длительное хранение культур происходит при температуре 4°C, при пониженной освещенности или в темноте, на питательной среде с добавлением ингиби-

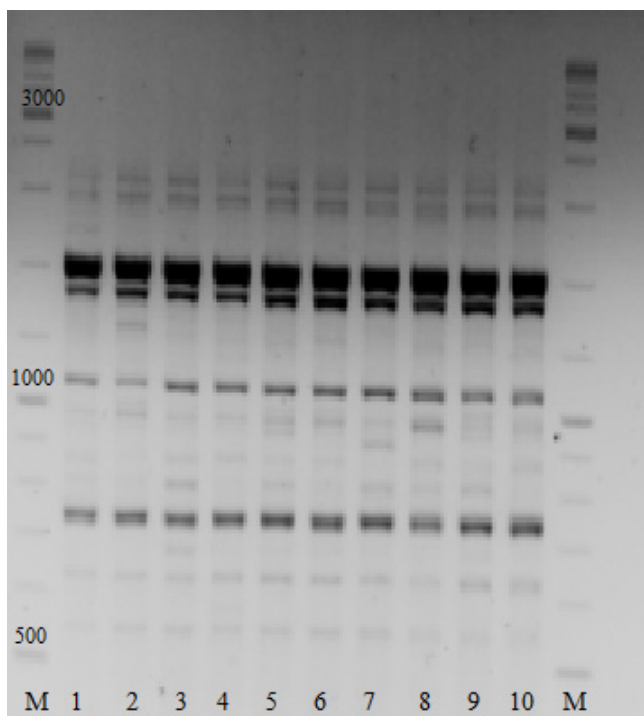


Рисунок 5. Результаты амплификации ДНК микрорастений (манит, сорбит, абсцизовая кислота), а также при уменьшении концентрации сахарозы в среде.

В наших экспериментах для длительного хранения микро-растений *A. ivasczenkoae* в качестве ингибиторов роста использовали хлорхолинхлорид (ССС) в концентрации 120 мг/л, абсцизовая кислота (АБК) 5 мг/л, БАП 0,5 мг/л, маннит 3 г/л, а также увеличивали содержание сахарозы от 20 до 60 г/л. Наиболее доступными способами создания коллекций растений *in vitro*, находящихся в состоянии замедленного роста, являются снижение температуры культивирования и уменьшение концентрации минеральных компонентов среды [21]. Нами установлено, что оптимальное сочетание условий культивирования (низкие положительные температуры, уменьшение состава минеральных солей в среде, увеличенный процент сахарозы, введение хлорхолинхлорида и маннита) позволяет увеличить период пересадки растений и их жизнеспособность.

Основным методом оценки эффективности хранения культур *in vitro* в условиях замедленного роста является способность к регенерации и возобновления нормального роста и развития в стандартных климатических условиях. Активное побегообразование у *A. ivasczenkoae* после длительного хранения можно объяснить естественными физиологическими процессами, которые происходят в тка-



Рисунок 4. Растения *A. ivasczenkoae* в условиях *ex vitro* на различных субстратах

нях растения в осенне-зимние месяцы. При смене режима температуры от 4°C до +23±2 °C происходит активация процесса морфогенеза.

Идентификация генетического соответствия проведена с использованием iPBS-анализа, основанного на использовании консервативных областей последовательностей PBS сайтов ретротранспозонов, для подтверждения генетической стабильности регионов геномной ДНК материнских растений и соответствующих регенерантов. Установлено отсутствие генетической изменчивости у регенерантов, депонированных в течение 9 месяцев. Таким образом, длительное депонирование не приводит к возникновению соматональной изменчивости и может использоваться для создания коллекций *in vitro* с целью сохранения биоразнообразия флоры.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований выявлено, что наилучшим вариантом для длительного культивирования *in vitro* редкого и исчезающего вида *A. ivasczenkoeae* является вариант среды В-1 и МСВМ, на данных вариантах микрорастения не только приостанавливали свой рост и размножение, но и сохраняли жизнеспособность после перевода в обычные условия культивирования, имели ярко зеленую окраску, а также наблюдалось формирование новых луковичек. Также было выявлено, что на длительное культивирование растений, существенную роль оказывает температурный и световой режим хранения. Лучшие результаты были получены при использовании режима 2 (4°C, 6/18 ч, 0,5 клк).

В ходе исследований особенностей среднесрочного хранения растений *in vitro* мы смогли увеличить период беспересадочного культивирования до 9 месяцев, применяя доступные методы замедления ростовых процессов, такие как снижение положительных температур культивирования и повышения процента содержания концентрации сахарозы в среде и добавление хлорхолинхлорида, маннита. Проведенный iPBS-анализ подтвердил генетическое соответствие материнских растений и регенерантов, полученных после депонирования. Эти данные позволяют рекомендовать указанные методы для хранения *in vitro* ценных лекарственных луковичных.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан в рамках грантового проекта № AP19574647 «Разработка современных биотехнологий для сохранения биоразнообразия эндемичных видов *Tulipa sp.* Северного и Центрального Казахстана».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Salgotra, R. K., Chauhan, B. S. Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources // *Genes*. – 2023. Vol.14, No. 1. – P.174-182. doi.org/10.3390/genes14010174
2. Молканова, О. И., Горбунов, Ю. Н., Ширнина, И. В., Егорова, Д. А. Применение биотехнологических методов для сохранения генофонда редких видов

растений // *Ботанический журнал*. – 2020. – №105(6). – С.610-619. doi.org/10.31857/S0006813620030072

3. Radomir, A., Stan, R., Florea, A., Ciobotea, C., Negru, M., Neblea, M., Sumedrea, D. Overview of the Success of In Vitro Culture for Ex Situ Conservation and Sustainable Utilization of Endemic and Subendemic Native Plants of Romania // *Sustainability*. – 2023. – Vol.15. – P.2581. doi.org/10.3390/su15032581

4. Kumar, S., Shah, S., Vimala, Y., Jatav, H., Ahmad, P., Chen, Y., Abscisic acid: Metabolism, transport, crosstalk with other plant growth regulators, and its role in heavy metal stress mitigation // *Frontiers in Plant Science*. – 2022. Vol.13, No.1. – P.972856. doi.org/10.3185/S0006813620030072

5. Шабанова, Е., Внукова, И., Машкина, С. Влияние модификаций состава питательных сред на эффективность длительного хранения *in vitro* клонов тополя и осины // *Вестник Воронежского государственного университета*. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2020. – №.1. – С. 42-49.

6. Орлова, Н. Особенности депонирования некоторых сортов *Lonicera caerulea L.* в культуре *in vitro* // *АгроЭкоИнфо: электронный научно-производственный журнал*. – 2022. – №.2. – С.11-15.

7. Митрофанова, И. Особенности депонирования хризантемы садовой в условиях *in vitro* // *Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада*. – 2019. – №.131. – С.110-117.

8. Митрофанова, И., Иванова, Н., Митрофанова О. Сохранение растений редких эндемиков флоры горного Крыма *Crepis purpurea (willd.) M. Bieb.* и *Scrophularia aexilis popl.* В условиях генобанка *in vitro* // *Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада*. – 2020. – №.136. – С.14-23.

9. Котухов, Ю., Данилова, А., Ануфриева, О. Конспекты луков (*Allium L.*) Казахского Алтая, Саур-Манрака и Зайсанской котловины. – 2011. – №17. – С.3-33.

10. Котухов, Ю. Лук Иващенко (*Allium ivasczenkoeae Kotuch.*) – Редкий исчезающий вид флоры Казахстана // Юбилейная редакционная коллегия. – 2008. – 135 с.

11. Cordeiro, S. *In vitro* conservation of *Mandevilla moricandiana (Apocynaceae)*: short-term storage and encapsulation–dehydration of nodal segments // *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. – 2014. – Vol.50. – P. 326-336.

12. Reed, B. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools // *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. – 2011. – Vol.47. – P.1-4.

13. Tandon, P. Prospects of plant conservation biotechnology in India with special reference to northeastern region // *Biodiversity: Status and Prospects*. New Delhi, India: Norasa Publishing House. – 2005. – P.79-91.

14. Leung, D.W.M. Plant biotechnology helps quest for sustainability: With emphasis on climate change and endangered plants // *Climate change and sustainable development*. Louisville: Linton Atlantic Books. – 2010. – P.247-250.

15. Chirumamilla, P., Gopu, C., Jogam, P. Highly efficient rapid micropropagation and assessment of genetic fidelity of regenerants by ISSR and SCoT markers of *Solanum*

khastianum Clarke // Plant Cell. – 2021. – Vol.144. – P.397-407. doi.org/10.1007/s11240-020-01964-6

16. Qahtan, A., Faisal, M., Alatar, A., Abdel-Salam, E., Callus-Mediated High-Frequency Plant Regeneration, Phytochemical Profiling, Antioxidant Activity and Genetic Stability in *Ruta chalepensis* L. // Plants. – 2022. – Vol.11, No.1614. doi.org/10.3390/plants11121614

17. Catană, R., Mitoi, E., Helepciuc, F., Holobiuc I. In vitro conservation under slow growth conditions of two rare plant species from *Caryophyllaceae* Family // Electronic Journal of Biology. – 2010. – Vol. 6(4). – P. 86-91.

18. Marković, M. Breaking the dormancy of snake's head fritillary (*Fritillaria meleagris* L.) in vitro bulbs – Part 1: Effect of GA3, GA inhibitors and temperature on fresh weight, sprouting and sugar content // Plants. – 2020. – Vol. 9(11), No.1449. doi:10.3390/plants9111449

19. Srivastava, V., Bhatt, K., Agrawal A. In vitro medium-term conservation of *Garcinia indica*: a tropical recalcitrant seeded fruit tree of India. In *Vitro* Cell.Dev.Biol. // Plant. – 2022. – Vol.58, – P.876–887. doi.org/10.1007/s11627-022-10288-3

20. Juan-Vicedo, J., Serrano-Martínez, F., Cano-Castillo, M., Casas, J.L. In Vitro Propagation, Genetic Assessment, and Medium-Term Conservation of the Coastal Endangered Species *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Cupressaceae) from Adult Trees // Plants. – 2022. – Vol.11, – P.187-193. doi.org/10.3390/plants11020187

21. Coelho, N., Gonçalves, S., Romano, A. Endemic plant species conservation: Biotechnological approaches // Plants. – 2020. – Vol.9, No.3. – P.345-356. doi.org/10.3390/plants9030345

## REFERENCES

1. Salgotra, R. K., Chauhan, B. S. Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources // Genes. – 2023. Vol.14, No. 1. – P.174-182. doi.org/10.3390/genes14010174

2. Molkanova, O. I., Gorbunov, Ju. N., Shirmina, I. V., Egorova, D. A. Primenenie biotekhnologicheskikh metodov dlja sohraneniya genofonda redkih vidov rastenij // Botanicheskij zhurnal. – 2020. – No.105(6). – S.610-619. DOI: 10.31857/S0006813620030072

3. Radomir, A., Stan, R., Florea, A., Ciobotea, C., Negru, M., Neblea, M., Sumedrea, D. Overview of the Success of In Vitro Culture for Ex Situ Conservation and Sustainable Utilization of Endemic and Subendemic Native Plants of Romania // Sustainability. – 2023. – Vol.15. – P.2581. doi.org/10.3390/su15032581

4. Kumar, S., Shah, S., Vimala, Y., Jatav, H., Ahmad, P., Chen, Y., Abscisic acid: Metabolism, transport, crosstalk with other plant growth regulators, and its role in heavy metal stress mitigation // Frontiers in Plant Science. – 2022. - Vol.13, No.1. – P. 972856. doi.org/10.31857/S0006813620030072

5. Shabanova, E. A., Vnukova, N. I., Mashkina, O. S. Vlijanie modifikacij sostava pitatel'nyh sred na jeffektivnost' dlitel'nogo hraneniya in vitro klonov topolja i osiny // Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Himija. Biologija. Farmacija. – 2020. –

№.1. – S. 42-49.

6. Orlova, N. D. Osobennosti deponirovaniya nekotorykh sortov *Lonicera caerulea* L. v kul'ture in vitro // AgroJekoInfo: jelektronnyj nauchno-proizvodstvennyj zhurnal. – 2022. – №.2. – S.11-15.

7. Mitrofanova, I. V. Osobennosti deponirovaniya hrizantemy sadovoj v uslovijah in vitro // Bjulleten' Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada. – 2019. – №.131. – S.110-117.

8. Mitrofanova, I. V., Ivanova, N. N., Mitrofanova, O. V. Sohranenie rastenij redkih jendemikov flory gornogo Kryma *Crepis purpurea* (willd.) M. Bieb.) i *Scrophularia axilis* popl. V uslovijah genobanka in vitro // Bjulleten' Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada. – 2020. – №.136. – S.14-23.

9. Kotuhov, Ju.A., Danilova, A. N., Anufrieva, O.A. Konspekty lukov (*Allium* L.) Kazahstanskogo Altaja, Sauro-Manraka i Zajsanskoj kotloviny. – 2011. – №17. – S.3-33.

10. Kotuhov, Ju. A. Luk Ivashhenko (*Allium ivasczenkoae* Kotuch.)– Redkij ischezajushhij vid flory Kazahstana // Jubilejnaja redakcionnaja kollegija. – 2008. – 135 s.

11. Cordeiro, S.Z. In vitro conservation of *Mandevilla moricandiana* (*Apocynaceae*): short-term storage and encapsulation–dehydration of nodal segments // *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. – 2014. – Vol.50. – P. 326-336.

12. Reed, B.M. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools // *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. – 2011. – Vol.47. – P.1-4.

13. Tandon, P. Prospects of plant conservation biotechnology in India with special reference to northeastern region // Biodiversity: Status and Prospects. New Delhi, India: Norasa Publishing House. – 2005. – P.79-91.

14. Leung, D.W.M. Plant biotechnology helps quest for sustainability: With emphasis on climate change and endangered plants // Climate change and sustainable development. Louisville: Linton Atlantic Books. – 2010. – P.247-250.

15. Chirumamilla, P., Gopu, C., Jogam P. et al. Highly efficient rapid micropropagation and assessment of genetic fidelity of regenerants by ISSR and SCoT markers of *Solanum khasianum* Clarke // Plant Cell. – 2021. – Vol.144. – P.397-407. https://doi.org/10.1007/s11240-020-01964-6

16. Qahtan, A., Faisal, M., Alatar, A., Abdel-Salam, E., Callus-Mediated High-Frequency Plant Regeneration, Phytochemical Profiling, Antioxidant Activity and Genetic Stability in *Ruta chalepensis* L. // Plants. – 2022. – Vol.11, No.1614. doi.org/10.3390/plants11121614

17. Catană, R., Mitoi, E., Helepciuc, F., Holobiuc, I. In vitro conservation under slow growth conditions of two rare plant species from *Caryophyllaceae* Family // Electronic Journal of Biology. – 2010. – Vol. 6(4). – P. 86-91.

18. Marković, M. Breaking the dormancy of snake's head fritillary (*Fritillaria meleagris* L.) in vitro bulbs – Part 1: Effect of GA3, GA inhibitors and temperature on fresh weight, sprouting and sugar content // Plants. – 2020. – Vol. 9(11), No.

1449. doi:10.3390/plants9111449

19. Srivastava, V., Bhatt, K., Agrawal, A. *In vitro* medium-term conservation of *Garcinia indica*: a tropical recalcitrant seeded fruit tree of India. *In Vitro Cell.Dev.Biol. // Plant.* – 2022. – Vol.58. – P.876–887. doi.org/10.1007/s11627-022-10288-3

20. Juan-Vicedo, J., Serrano-Martínez, F., Cano-Castillo, M., Casas, J.L. *In Vitro* Propagation, Genetic Assessment, and Medium-Term Conservation of the Coastal Endangered Species *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Cupressaceae) from Adult Trees // *Plants.* – 2022. – Vol.11. – P. 187-193. doi.org/10.3390/plants11020187

21. Coelho, N., Gonçalves, S., Romano, A. Endemic plant species conservation: Biotechnological approaches // *Plants.* – 2020. – Vol.9, No.3. – P.345-356. doi.org/10.3390/plants9030345



OPTIMIZATION OF THE MODE OF DEPOSITION OF ASEPTIC CULTURES *IN VITRO* OF A RARE AND ENDEMIC SPECIES *ALLIUM IVASCZENKOA*E

Tagimanova D., Raizer O., Nagmetova G., Khapilina O.

National Center for Biotechnology, 13/5 Korgalzhynskoye Road, Astana, 010000  
tagds@mail.ru

ABSTRACT

Optimization of the method of medium-term storage of the rare and endangered plant species *Allium ivasczenkoe* under *in vitro* conditions using modern approaches of biotechnology is an urgent task. Aseptic microplants *Allium ivasczenkoe* were used as starting material. The cultivation of microplants was carried out on nutrient media supplemented in various combinations with an increased concentration of sucrose, mannitol, chlorocholine chloride, ABA and BAP at various temperature and light conditions of deposition. The survival dynamics of *A. ivasczenkoe* varied depending on cultivation regimes. After 9 months of deposition, the survival of test-tube plants in mode 1 (control) was 20%, mode 2 - 60-80%, mode 3 - 30-50%. Under experimental conditions, the best results were obtained by depositing aseptic cultures for 9 months at a low positive temperature and low light intensity (mode 2) on nutrient media with the addition of CCC 120 mg/l and a sucrose concentration of 60 g/l and (B-1) and MS medium containing 0.5 mg/l BAP and 3 g/l mannitol (MSBM). This mode of deposition made it possible to lengthen the period between transplants, as well as to maintain the viability of *A. ivasczenkoe* microplants from 60 to 80%. The data obtained make it possible to optimize the mode of medium-term storage of *Allium ivasczenkoe* under *in vitro* conditions for the mass production of rare species of bulbous plants in order to restore, reproduce and preserve the number of valuable gene pool and natural populations, create gene banks *in vitro*, reintroduce and green building.

**Keywords:** *in vitro* culture, *Allium ivasczenkoe*, microplants, rare species, deposition, biodiversity, explant, growth inhibitors.

*ALLIUM IVASCZENKOA*E СИРЕК КЕЗДЕСЕТІН ЖӘНЕ ЭНДЕМИЯЛЫҚ ТҮРІНІҢ АСЕПТИКАЛЫҚ КУЛЬТУРАЛАРЫН *IN VITRO* ОРТА МЕРЗІМДЕ САҚТАУ РЕЖИМІН ОҢТАЙЛАНДЫРУ

Тагиманова Д., Райзер О., Нагметова Г., Хапилина О.

Ұлттық биотехнология орталығы, Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана қ., 010000  
tagds@mail.ru

ТҮЙІН

Заманауи биотехнологиялық тәсілдерді пайдалана отырып, сирек, жойылып бара жатқан және дәрілік өсімдіктер түрлерін *in vitro* жағдайында орта мерзімді сақтау әдісін оңтайландыру өзекті мәселе болып табылады. Бастапқы материал ретінде *Allium ivasczenkoe* асептикалық микроөсімдіктері пайдаланылды. Микроөсімдіктерді өсіру сахароза, маннитол, хлорохинхлорид, АВА және ВАР жоғары концентрациясы бар әртүрлі комбинацияларда толықтырылған қоректік орталарда әртүрлі температура мен жарық жағдайында депонирлеу жүргізілді. *A. ivasczenkoe* тіршілігінің динамикасы өсіру режимдеріне байланысты өзгеріп отырды.

Тәжірибе жағдайында ең жақсы нәтиже асептикалық культураларды 9 ай бойы төмен оң температурада және төмен жарық қарқындылығында (2 режим) 120 мг/л ССС және 60 г/л сахароза концентрациясы қосылған және (B-1) және құрамында 0,5 мг/л ВАР пен 3 г/л маннитол (MSVM) бар MS қоректік ортада депонирлеу нәтижесінде алынды. Бұл депонирлеу режимі қайта отырғызу арасындағы кезенді ұзартуға, сонымен қатар *A. ivasczenkoe* микроөсімдіктерінің өміршеңдігін 60-тан 80%-ға дейін сақтауға мүмкіндік берді. Алынған нәтижелер реинтродукция мен жасыл құрылыс, *in vitro* гендік банктер, табиғи популяциялар мен бағалы генофондтағы түрлердің санын сақтау мен жаңғырту, қалпына келтіру мақсатында сирек кездесетін пиязды өсімдіктерді жаппай өндіру үшін *in vitro* жағдайында *Allium ivasczenkoe* орта мерзімді сақтау режимін оңтайландыруға мүмкіндік береді.

**Кілтті сөздер:** *in vitro* культурасы, *Allium ivasczenkoe*, микроөсімдіктер, сирек түр, депонирлеу, биотүрлілік, эксплант, өсу тежегіштері.