

УДК: 634.551;634

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ МИНДАЛЯ
ОБЫКНОВЕННОГО (*AMYGDALUS COMMUNIS* L.), ОТОБРАННЫХ
В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ
КАЗАХСТАНА И КЫРГЫЗСТАНА**

**Турдиев Т.Т., Маденова А.К.¹, Дүйсенова К.К.², Емешева К.Б., Туйгунов З.Т.³,
Пернеев А.Н.⁴, Кабылбекова Б.Ж.⁵, Михайленко Н.В.⁶**

¹Институт биологии и биотехнологии растений

²Казахский Национальный педагогический университет имени Абая

³Казахский Национальный университет имени Аль-Фараби

⁴Жалал-Абадский научный центр Национальной академии наук Кыргызской Республики

⁵Казахский научно-исследовательский институт плодовоовощеводства

⁶Казахский Национальный аграрно исследовательский университет

**КАДИМКИ БАДАМДЫ (*AMYGDALUS COMMUNIS* L.)
КАЗАКСТАН МЕНЕН КЫРГЫЗСТАНДЫН ТАБИГЫЙ ПОПУЛЯЦИЯЛАРЫНАН
ТАНДАЛГАН ФОРМАЛАРЫНЫН МИКРОКЛОНДОР АРКЫЛУУ
КӨБӨЙТҮҮ ЫКМАСЫН ИШТЕП ЧЫГУУ**

**Турдиев Т.Т., Маденова А.К.¹, Дүйсенова К.К.², Емешева К.Б., Туйгунов З.Т.³,
Пернеев А.Н.⁴, Кабылбекова Б.Ж.⁵, Михайленко Н.В.⁶**

¹Өсүмдүктөр биологиясы жана биотехнологиясы институтунун

²Абай атындагы Казак Улуттук педагогикалык университети

³Аль-Фараби атындагы Казак Улуттук университети

⁴Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын Жалал-Абад илимий борбору

⁵Казак жемиш-жашылча илимий изилдөө институту

⁶Казак Улуттук агрардык изилдөө университет

**DEVELOPMENT OF MICROCLONAL PROPAGATION METHODS
FOR COMMON ALMOND (*AMYGDALUS COMMUNIS* L.) SELECTED FROM NATURAL
POPULATIONS IN KAZAKHSTAN AND KYRGYZSTAN**

**Turdiev T.T., Madenova A.K.¹, Duisenova K.K.², Yemesheva K.B., Tuigunov Z.T.³,
Perneev A.N.⁴, Kabylbekova B.Zh.⁵, Mikhailenko N.V.⁶**

¹Institute of Plant Biology and Biotechnology

²Kazakh National Pedagogical University named after Abai

³Al-Farabi Kazakh National University

⁴Jalal-Abad Scientific Center of the National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic

⁵Kazakh Scientific Research Institute of Fruit and Vegetable Growing

⁶Kazakh National Agrarian Research University

Аннотация. Миндаль обыкновенный (*Amygdalus communis* L.) представляет собой ценное орехоплодное растение, перспективное для выращивания в аридных условиях Южного Казахстана благодаря засухоустойчивости. Однако редкость и уязвимость на территории Казахстана обуславливают необходимость разработки эффективных стратегий по их сохранению и восстановлению. В рамках исследования были отобраны и описаны 12 генотипов миндаля в Казахстане и 6 – в Кыргызстане. В результате проведённого обследования на территории Казахстана был уточнён современный ареал произрастания дикорастущих популяций миндаля

и составлена карта-схема. Разработан и оптимизирован метод клонального микроразмножения, включая эффективные режимы стерилизации и подбор питательной среды. Выявлена высокая эффективность среды MS с добавлением 1,0 мг/л БАП и 0,02 мг/л ИМК. Полученные результаты могут быть использованы для сохранения генофонда, восстановления популяций и коммерческого размножения миндаля.

Ключевые слова: миндаль обыкновенный, микроклональное размножение, *in vitro*, побего, стерилизация.

Аннотация. Кадимки бадам (*Amygdalus communis* L.) — бул кургакчыл аймактарда, өзгөчө Түштүк Казакстанда өстүрүүгө ылайыктуу, кургакчылыкка чыдамдуу жана баалуу жаңгактуу өсүмдүк. Бирок, Казакстандын аймагында сейрек кездешкендиктен жана алсыз абалда болгондуктан, аны сактап калуу жана калыбына келтирүү боюнча натыйжалуу стратегияларды иштеп чыгуу зарыл. Изилдөөнүн алкагында Казакстандан 12 жана Кыргызстандан 6 бадамдын генотиби тандалып алынып, сүрөттөлдү. Казакстандын аймагындагы изилдөөлөрдүн негизинде жапайы бадам популяцияларынын азыркы ареалы такталып, картасы түзүлдү.

Клондук микрокөбөйтүү ыкмасы иштелип чыгып, оптималдаштырылды. Бул ыкмага эффективдүү стерилизация режимдери жана азыктандыруучу чөйрөнүн тандап алынуусу кирет. MS чөйрөсү 1,0 мг/л БАП жана 0,02 мг/л ИМК кошулганда жогорку натыйжалуулук көрсөттү. Алынган жыйынтыктар бадамдын генофондун сактап калууда, популяцияларын калыбына келтирүүдө жана коммерциялык көбөйтүүдө колдонулушу мүмкүн.

Негизги сөздөр: кадимки бадам, микроклондук көбөйтүү, *in vitro*, бүчүрлөр, стерилизация.

Abstract. The common almond (*Amygdalus communis* L.) is a valuable nut-bearing plant with high potential for cultivation in the arid conditions of Southern Kazakhstan due to its drought tolerance. However, its rarity and vulnerability in Kazakhstan necessitate the development of effective strategies for its conservation and restoration.

As part of the study, 12 almond genotypes were selected and described in Kazakhstan and 6 in Kyrgyzstan. As a result of the survey conducted in Kazakhstan, the current distribution range of wild almond populations was clarified, and a distribution map was created.

A method for clonal micropropagation was developed and optimized, including effective sterilization protocols and selection of nutrient media. The MS medium supplemented with 1.0 mg/L BAP and 0.02 mg/L IAA demonstrated high efficiency. The obtained results can be used for the preservation of genetic resources, restoration of wild populations, and commercial propagation of almond.

Keywords: common almond, microclonal propagation, *in vitro*, shoots, sterilization.

Введение

Казахстан, обладая широким спектром агроклиматических зон – от степных и пустынных ландшафтов до горных экосистем представляет собой благоприятную территорию для возделывания разнообразных сельскохозяйственных культур. Более 75% его площади занимают аридные и полупустынные территории, на которых сосредоточено около 40% общего биологического разнообразия страны [1]. Эти особенности формируют уникальные условия для выращивания устойчивых к экстремальным климатическим факторам растений, включая орехоплодные культуры.

В условиях глобального роста спроса на устойчивые и питательные продукты, Казахстан обладает потенциалом для расширения внутреннего производства орехоплодных культур. Учитывая успешный опыт стран Центральной Азии, таких как Кыргызстан и Узбекистан, Казахстан также обладает возможностями для расширения производства миндаля (*Amygdalus communis* L.), особенно в Туркестанской области, где природные и агроэкологические условия благоприятны для его выращивания.

Впервые дикие виды миндаля в Казахстане, включая *Amygdalus communis* L., были описаны профессором Аймаком Жангалиу-

лы Жангалиевым в работе «Дикорастущие плодовые растения Казахстана» (2001), где он выделил пять видов, произрастающих в природных условиях страны: *A. ledebouriana* Schlecht., *A. petunnikowii* L., *A. spinosissima* Bunge, *A. nana* L. и *A. communis* L. [2].

Среди них *A. communis* L. выделяется как генетически ценный вид, обладающий высокой устойчивостью к засухе, морозам и заболеваниям. Кроме того, плоды миндаля богаты витаминами, жирными кислотами и антиоксидантами, что делает его важной пищевой и фармакологической культурой [3, 4]. Плоды миндаля обыкновенного овальные или эллипсоидные костянки длиной до 5 см. В незрелом виде они покрыты зелёной кожурой, которая при созревании высыхает и опадает, обнажая плотную шероховатую скорлупу. Внутри находится сладкое или горькое ядро длиной 2-4 см. Созревание плодов происходит через 7-8 месяцев после цветения к концу лета или началу осени [5].

В настоящее время дикий миндаль, произрастающий в природных условиях, находится под угрозой исчезновения на территории Республики Казахстан вне заповедников и национальных парков. Основными причинами сокращения численности миндаля являются хозяйственная деятельность человека, вырубка деревьев, выпас скота и пожары. В связи с этим для Казахстана особенно важно срочно принять меры по изучению ареалов распространения, сохранению и восстановлению популяции обыкновенного миндаля как перспективной культуры [6].

В этом плане особенно актуальны методы биотехнологического клонирования, позволяющие эффективно размножать и сохранять ценные генотипы орехоплодных культур. Клональное микроразмножение предоставляет возможности для массового производства посадочного материала, устойчивого к стрессовым факторам и болезням, при минимальных затратах исходного растительного материала [7, 8].

Настоящая работа направлена на изучение биоразнообразия миндаля, а также разработку биотехнологических методов микроразмножения миндаля.

2 Материалы и методы

2.1. Сбор и оценка растительного материала

Объектами исследования являлись дикорастущие формы миндаля (*Amygdalus communis* L.) произрастающие в Казахстане и Кыргызстане. В Казахстане мониторинг современных ареалов произрастания дикорастущих популяций миндаля проводили в Сайрам-Угамском государственном национальном природном парке. В Кыргызстане экспедиционные выезды были проведены в Тоскоол-Атинском лесхозе [9, 10]. Координаты произрастания фиксировались прибором GPS (Garmin Etrex SE). В процессе камеральной обработки современные ареалы произрастания дикорастущих популяций миндаля в Казахстане нанесены на электронные топографические карты М 1:700 000 с использованием специализированной программы ArcGIS 10.2.

Для всех миндальных деревьев выполнены таксационные измерения, а состав и состояние фитоценозов описаны согласно действующим методикам с учётом процессов естественного возобновления и условий произрастания. В лабораторных условиях подготовлен гербарий и собран семенной материал от отобранных образцов миндаля. Отбор образцов осуществлялся визуально с использованием дескрипторов миндаля из «Descriptors list for Almond (*Prunus amygdalus*)». Размеры плодов (длина, ширина, толщина) измерялись штангенциркулем ШЦР-250 с точностью до 0,1 мм.

2.2. Введение в культуру *in vitro*

Для разработки методов микроразмножения использовали однолетние черенки из отобранных деревьев на территориях Казахстана и Кыргызстана.

Для получения асептических растений после завершения физиологического покоя использовали однолетние одревесневшие черенки длиной 20-25 см. Из одревесневших черенков в лабораторных условиях получали активно растущие зеленные побеги и делили их на сегменты с 1-2 почкой. Для предотвращения заражения сапрофитной микрофлорой зеленные побеги стерилизовали тремя способами: 1) обработка раствором отбеливателя «Белизна» (1:1) 5 мин и 0,1% HgCl_2 3 мин; 2) мыльным раствором, отбеливателем и стерилизация 0,1% HgCl_2 5 мин; 3) промывка раствором отбеливателя «Белизна» (1:1) в течении 10 мин, раствором 0,1%

HgCl₂ 5 мин, с последующей промывкой 3 раза стерильной дистиллированной водой [18]. Для выявления системных инфекций базальные части побегов высаживали на провокационную среду VISS [11] и культивировали при 23-25°C в течении 1-3 недель.

2.3. Микроклональное размножение

Для микроклонального размножения в культуре *in vitro* применяли питательную среду Мурасиге и Скуга (МС). Для стимуляции роста и образования новых побегов определяли оптимальные концентрации 6-бензиламинопурина (БАП) и гиббереллиновой кислоты (ГК) [12]. Оценку результатов проводили после третьего пассажа. Питательные среды стерилизовали в автоклаве (UT KBS-150LV) 25 минут при давлении 0,8-1,0 атмосфер. Растения *in vitro* культивировали

ли в контролируемых условиях при температуре 23-25°C, освещённости 40 µmol m⁻²s⁻¹ и 16-часовом фотопериоде.

3 Результаты

3.1 Обследование современных ареалов произрастания дикорастущих популяций миндаля

В результате экспедиционных выездов были обследованы дикорастущие популяции миндаля в Туркестанской области Казахстана в Сайрам-Угамском государственном национальном природном парке. В частности, Келесском лесничестве – 6 форм миндаля и в Састобинском районе – 6 форм миндаля. В Кыргызстане в Тоскоол-Атинском лесхозе было отобрано 6 форм миндаля. Координаты отобранных плюсовых форм миндаля были сняты с помощью GPS навигатора (Garmin Etrex SE) и приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Место и координаты сбора образцов миндаля обыкновенного (*Amygdalus communis* L.)

№	Форма	Точка отбора образцов миндаля обыкновенного		
		Казахстан		Кыргызстан
		Келесском лесничестве	Састобинском районе	Тоскоол-Атинскому лесхоз
		Координаты по GPS		Координаты по GPS
1	M1	N41°44'53.16" E069°42'13.26"	N42°32'02.81" E070°01'19.46"	N 41°06'30.54" E 072°36'04.13"
2	M2	N41°44'53.52" E069°42'13.14"	N42°32'03.15" E070°01'18.39"	N 41°06'31.73" E 072°36'05.21"
3	M3	N41°44'53.04" E069°42'12.90"	N42°32'03.04" E070°01'17.56"	N 41°06'34.52" E 072°36'07.52"
4	M4	N41°44'52.98" E069°42'12.96"	N42°32'02.12" E070°01'17.35"	N 41°09'38.32" E 072°37'29.91"
5	M5	N41°44'52.80" E069°42'12.78"	N42°32'01.69" E070°01'17.01"	N 41°09'38.32" E 072°37'29.91"
6	M6	N41°44'52.50" E069°42'12.84"	N42°32'01.54" E070°01'17.00"	N 41°09'38.32" E 072°37'29.91"

На основе координат была составлена карта-схема современного ареала произрастания дикорастущих популяций миндаля в

Казахстане. Координаты отобранных плюсовых форм в процессе камеральной обработки данных нанесены на электронные топографические карты М 1:700 000 (рисунок 1)



Рисунок 1 – Современные ареалы произрастания миндаля обыкновенного на территории Казахстана

Популяции миндаля обыкновенного вдоль реки Угам упомянутые Зверевым Н.Е. в настоящее время встречаются единичными отдельно стоящими деревьями среди лесных зарослей. А в популяциях, произрастающих в Келесском лесничестве и в Састобинском районе деревья представлены с признаками старения и полного отсутствия возобновления [13]. Основными причинами разрушения естественных ареалов произрастания и затруднения природного восстановления популяций миндаля являются преимущественно антропогенное воздействие – интенсивное освоение земель, выпас скота, поедающих плоды, строительство жилых объектов и транспортной инфраструктуры.

У дикорастущих популяций миндаля обыкновенного сильно выражен внутри видовой полиморфизм. Наблюдается разнообразие по морфологическим, физиологическим, биохимическим и генетическим признакам, которое играет важную роль в сохранении генетического разнообразия вида и представляет интерес для селекционеров при создании новых

сортов, устойчивых к болезням, засухе и другим стрессовым факторам.

Отбор производился визуально согласно дескрипторам миндаля «Descriptors list for Almond (*Prunus amygdalus*)», по следующим характеристикам: состояние дерева, возраст, размеры, форма кроны, обильность плодоношения, поражение болезнями, а также форма, размеры и одновременность созревания плодов, цвет и целостность их кожуры и скорлупы. Измерения плодов (длина, ширина, толщина) проводились штангенциркулем ШЦР-250 0.1.

Плоды миндаля собранные в экспедициях, тщательно сортировали и проверяли на предмет поражённости болезнями и вредителями, после чего очищали от наружной оболочки и сушили на открытом воздухе при температуре 20...24°C в течении 2-х недель. Далее заворачивали в бумажные конверты и помещали в холодильную камеру при 4°C для прохождения стратификации.

3.2 Разработка протокола клонирования, получение асептических растений миндаля

Определён лучший способ стерилизации от сапрофитной микрофлоры – последова-

тельная обработка раствором отбеливателя «Белизна» (1:1) в течение 10 мин, раствором 0,1% HgCl_2 5 мин, промывка 3 раза стерильной дистиллированной водой. При использовании такого варианта регенерация в условиях *in vitro* на среде МС без гормонов составляло 70%. Растения активно росли и развивались, а листья имели ярко-зеленый цвет.

Помимо сапрофитной микрофлоры в растениях может развиваться патогенная микрофлора, которая не погибает при стерилизации. При посадке зараженных растений на питательную среду, со временем патогенная микрофлора начнет развиваться и может погубить растения. Во избежание этого, после введения растений в культуру *in vitro* базальную часть побегов помещали на провакционную среду VISS.

В некоторых случаях в различные сроки культивирования у части побегов проявились признаки бактериальной инфекции, выраженные в потемнении основания побега, листьев, а также помутнении питательной среды, что в итоге приводило к их гибели. Проверка на провакционной среде показала наличие бактериальной инфекции. Видимо, проведенная поверхностная стерилизация первичных эксплантов способствовала освобождению от грибной инфекции, но была малоэффективна против бактериальной. Зараженные растения были отбракованы.

Полученные асептические побеги, после формирования листьев, пересаживали на различные питательные среды для подбора оптимального состава при микроразмножении (рисунок 2).



1. МС, БАП-0,1 мг/л; ГК-0,01 мг/л; сахароза – 30 г/л; pH-5,
2. МС, БАП-0,5 мг/л; ГК-0,01 мг/л; сахароза – 30 г/л; pH-5,7
3. МС, БАП-1,0 мг/л; ГК-0,01 мг/л; сахароза – 30 г/л; pH-5,7
4. МС, БАП-1,0 мг/л; ИМК-0,01 мг/л; сахароза – 30 г/л; pH-5,7
5. МС, БАП-1,0 мг/л; ИМК-0,02 мг/л; сахароза – 30 г/л; pH-5,7

Рисунок 2 – Влияние состава питательной среды
на клональное микроразмножение (среднее)

Подбор состава питательной среды для эффективного размножения миндаля и фишашки *in vitro* показал: использование в среде 0,01 мг/л ГК с различным сочетанием БАП приводит к образованию небольшого числа новых побегов, коэффициент размножения

не превышает 1,2, состояние растений не удовлетворительно, листья и стебли желтеют, а в последствии опадают, более чем 60% растений витрифицированы. Использование 1,0 мг/л БАП и 0,01 мг/л ИМК приводит к повышению коэффициента размножения рас-

тений до 2,0. Оптимальный состав – 1,0 мг/л БАП и 0,02 мг/л ИМК, в этом случае коэффициент размножения, в среднем за 2 пассажа достиг 2,8.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспедиционных исследований были изучены современные ареалы дикорастущих популяций миндаля обыкновенного в Туркестанской области Казахстана и в Тоскоол-Атинском лесхозе Кыргызстана. Полученные географические координаты позволили создать точную карту-схему распространения вида, что является важным этапом для охраны и дальнейшего использования генетического материала. Обнаружена значительная поли-

морфность внутри видов, что подчеркивает ценность этих популяций для селекционных программ и устойчивого земледелия.

В лабораторных условиях был оптимизирован протокол клонирования миндаля, включающий эффективные методы стерилизации и подбор питательных сред. Наиболее успешным оказался состав с 1,0 мг/л БАП и 0,02 мг/л ИМК, обеспечивающий высокий коэффициент размножения и здоровое развитие асептических растений. Полученные результаты создают научную основу для массового микроклонального размножения миндаля, что позволит обеспечить сохранение ценных генотипов и поддержать их коммерческое выращивание в условиях Казахстана.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Паршина Г.Н., Мукиянова У., Шабанова Л.В. Сохранение и управление биоразнообразием в Республике Казахстан: проблемы и задачи // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2012. – №2 (54). – С. 16-19.
2. А.Д. Джанглиев. Размножается семенами. Книга Дикие плодовые растения Казахстане с 2001 г. 82-87.
3. Халимова М.Р. Ареал обитания миндаля обыкновенного (*Amygdalus communis*) и его применение в медицине // Будущее науки-2017: Сборник научных статей 5-й Международной молодежной научной конференции: в 4-х томах, Курск, 26–27 апреля 2017 года / Ответственный редактор Горохов А.А. – Том 3. – Курск: Закрытое акционерное общество «Университетская книга», 2017. – С. 345-346.
4. Болотова А.С. Химический состав орехов интродуцированных сортов сладкого миндаля в южном Кыргызстане [Текст] / А.С.Болотова // Sciences of Europe. – 2017. – № 13-1 (13). – С. 8-12.
5. Beltrán Sanahuja A., Maestre Pérez S.E., Grané Teruel N., Valdés García A., Prats Moya M.S. Variability of Chemical Profile in Almonds (*Prunus dulcis*) of Different Cultivars and Origins. Foods. – 2021. – 10(1): 153. <https://doi.org/10.3390/foods10010153>.
6. Турдиев Т. и др. Микроклональное размножение миндаля обыкновенного (*prunus dulcis* mill) для восстановления регрессирующих популяций // *lzdenister natigeler*. – 2024. – №. 3 (103). – С. 178-187.
7. Reed B.M. Plant Cryopreservation: A Practical Guide. – Springer Science + Business Media LLC. New York. – 2008. – 513 p.
8. Турдиев Т.Т. Автореферат диссертации на соискание степени кандидата биологических наук. Астана. – 2010. – 23 с. Совершенствование биотехнологических методов криосохранения гермоплазмы ягодных культур.
9. Ettore B., Stefano P., Van Mele P. Descriptors for Pistachio (*Pistacia vera* L.). – Рим, Италия. – 1997. – 63 p. / Перевод Турдиевой М., Гулямовой Х. с английского издания. – 2002. – 63 с.
10. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). Descriptors list for almond (*Prunus amygdalus*) (Revised). – 1985. – 30 p.
11. Viss P.R. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture / Brooks E.M., Driver J.A. // In Vitro Cell. Dev. Biol. – 1991. – V. 27. – P. 42.
12. Kallsen C.E., Parfitt D.E. 'Tejon' Male Pistachio: An Early Blooming Pollenizer for 'Gumdrop'. HortScience. – 2018. – 53(11). – P. 1719-1721. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13175-18>.
13. Зверев Н.Е. Динамика роста фисташки настоящей и миндаля обыкновенного в Туркменистане и Казахстане // Problems of desert development. – №1. – 2018. – С. 60-62. DOI: 634.574:634.55(575.4+574).