

УДК 602.6:58: 57.086.13; 57:536.483

**РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА КРИОКОНСЕРВАЦИИ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ
ГРЕЦКОГО ОРЕХА**

**Кушнаренко С.В. *, Рымханова Н.К., Аралбаева М.М.,
Манапканова У.А., Ромаданова Н.В.**

*Институт биологии и биотехнологии растений Комитета науки
Министерства науки
и высшего образования Республики Казахстан*

**ЖАҢҒАКТЫҢ АПИКАЛДЫҚ МЕРИСТЕМАЛАРЫҢ КРИОКОНСЕРВАЦИЯЛОО
ПРОТОКОЛУҢ ИШТЕП ЧЫГУУ**

**Кушнаренко С.В. *, Рымханова Н.К., Аралбаева М.М.,
Манапканова У.А., Ромаданова Н.В.**

*Казахстан Республикасының ылым жана жогорку билим берүү министрлигинин
ылым комитетинин өсүмдүктөр биологиясы жана биотехнология институту*

**DEVELOPMENT OF CRYOPRESERVATION PROTOCOL
FOR WALNUT SHOOT TIPS**

**Kushnarenko S.V. *, Rymkhanova N.K., Aralbayeva M.M.,
Manapkanova U.A., Romadanova N.V.**

*Institute of Plant Biology and Biotechnology, Science Committee of the Ministry of Science
and Higher Education of the Republic of Kazakhstan*

Аннотация. Эффективные протоколы криосохранения необходимы для долгосрочного сохранения ценных генетических ресурсов растений. Целью данного исследования была оптимизация протокола криоконсервации апикальных меристем диких форм грецкого ореха (*Juglans regia* L.), собранных в Национальном парке Сайрам-Угам (Казахстан) и сорта Milotai 10, с использованием метода витрификации PVS2. Изучено влияние продолжительности холодовой акклиматизации и времени обработки в растворе PVS2 на регенерацию после воздействия жидким азотом. Растения *in vitro* подвергались холодовой акклиматизации при переменных температурах в климатической камере (8 часов при 22°C, освещенность 10 мкмоль м⁻² с⁻¹ / 16 часов при -1°C, в темноте) в течение 1-5 недель перед витрификацией. У неакклиматизированных побегов регенерация после криосохранения не наблюдалась, тогда как холодовая акклиматизация значительно повышала уровень восстановления. Наибольшие показатели регенерации (59,9-67,8%) были получены после 5-недельной акклиматизации, что отражает оптимальную физиологическую адаптацию клеток к стрессу замораживания и оттаивания. Продолжительность обработки в растворе PVS2 также существенно влияла на жизнеспособность побегов: оптимальные результаты достигались при 80-минутной обработке, тогда как более короткие или длительные обработки снижали регенерацию вследствие недостаточной дегидратации или токсического эффекта раствора. Разработанный протокол, сочетающий 5-недельную холодовую акклиматизацию и 80-минутную обработку PVS2, обеспечил стабильную регенерацию у всех исследованных генотипов и может быть рекомендован для создания криоколлекций *J. regia*.

Ключевые слова: *Juglans regia* L.; апикальные меристемы; метод PVS2-витрификации; криоконсервация

Аннотация. Өсүмдүктөрдүн баалуу генетикалык ресурстарын узак мөөнөттүү сактоо үчүн эффективдүү криоконсервация протоколдору зарыл. Бул изилдөөнүн максаты Казакстандын Сайрам-Угам улуттук паркынан чогултулган жапайы грек жаңгакынын (*Juglans regia* L.) жана Милотай 10 сортунун апикалдык меристемаларынын криоконсервация протоколун PVS2 витрификация ыкмасын колдонуу менен оптималдаштыруу болгон. Суюк азоттун таасиринен кийин регенерацияга суукка акклиматизациянын узактыгы жана PVS2 эритмесинде иштетүү убактысынын таасири изилденди.

In vitro өсүмдүктөр витрификацияга чейин 1-5 жума бою климаттык камерада өзгөрүлмө температураларда суукка акклиматизацияланды (8 саат бою 22°C, жарыктандыруу 10 мкмоль м⁻² с⁻¹ / 16 саат бою -1°C, караңгыда). Акклиматизацияланбаган бутактарда криосактоодон кийин регенерация байкалган жок, ал эми суукка акклиматизация калыбына келтирүү деңгээлин кыйла жогорулатты. Эң жогорку регенерация көрсөткүчтөрү (59,9-67,8%) 5 жумалык акклиматизациядан кийин алынды, бул клеткалардын тондуруу жана эритүү стрессине оптималдуу физиологиялык адаптациясын чагылдырат. PVS2 эритмесинде иштетүүнүн узактыгы да бутактардын жашоо жөндөмдүүлүгүнө олуттуу таасир этти: оптималдуу натыйжалар 80 мүнөттүк иштетүүдө жетишилди, ал эми кыскараак же узак мөөнөттүү иштетүүлөр жетишсиз дегидратация же эритменин уулуу таасиринен улам регенерацияны төмөндөттү. 5-жумалык суук акклиматизацияны жана 80 мүнөттүк PVS2 иштетүүсүн айкалыштырган иштелип чыккан протокол бардык изилденген генотиптерде туруктуу регенерацияны камсыз кылды жана *J. regia* криоколлекцияларын түзүү үчүн сунушталышы мүмкүн.

Негизги сөздөр: *Juglans regia* L.; апикалдык меристемалар; PVS2-витрификация ыкмасы; криоконсервация.

Abstract. Efficient cryopreservation protocols are essential for the long-term conservation of valuable plant genetic resources of This study aimed to optimize the conditions for shoot tip cryopreservation of *Juglans regia* L. (Persian walnut) wild genotypes collected from the Sairam-Ugam National Park (Kazakhstan) and cultivar Milotai 10 using the PVS2 vitrification method. The effects of cold acclimation duration and PVS2 exposure time on post-cryogenic recovery were evaluated. *In vitro* shoots were cold-acclimated under alternating temperatures (8 h at 22°C, 10 μmol m⁻² s⁻¹ light / 16 h at -1°C, dark) for 1-5 weeks before vitrification. Non-acclimated shoots showed no regeneration after exposure to liquid nitrogen, whereas cold acclimation significantly improved regrowth. The highest regrowth rates (59.9-67.8%) were obtained after 5 weeks of cold acclimation, indicating optimal physiological adaptation to freezing stress. PVS2 treatment time had a significant effect on regrowth. 80-min treatment with PVS2 provided the best results, while shorter or longer durations reduced viability due to insufficient dehydration or cryoprotectant toxicity. The optimized protocol combining 5-week cold acclimation and 80-min PVS2 exposure ensured stable regrowth across all tested genotypes and can be recommended for the establishment of *J. regia* cryobank collections.

Keywords: *Juglans regia* L.; Shoot tips; PVS2-Vitrification; Cryopreservation

Введение. Персидский или английский орех грецкий (*Juglans regia* L.) относится к семейству Juglandaceae A. Rich. (ex Kunth) и произрастает в умеренных и субтропических регионах северного полушария [1]. В природных условиях *J. regia* встречается в юго-восточной Европе и Центральной Азии, включая Западный Тянь-Шань Казахстана, и охраняется на территории Государственного национального природного парка «Сайрам-Угам», где дикая популяция произрастает в пойме реки Угам [2-4]. За последние десятилетия наблюдается существенное сокращение естественных популяций, в частности, в Кыргызстане площадь реликтовых лесов *J. regia* уменьшилась почти вдвое [5]. В Казахстане растения *J. regia* не образуют сплошных зарослей, а встречаются небольшими группами площадью 0,6–8 га, сосредоточенными в наиболее увлажнённых участках [4, 6].

J. regia характеризуется высоким морфологическим и генетическим разнообразием [6–10],

что делает его важным источником генов устойчивости к абиотическим стрессам, болезням и вредителям, а также ценным объектом для селекции. Исследования популяции Угам выявили деревья с крупными плодами и высоким выходом ядра [6], а климатические условия юга Казахстана формируют устойчивые к морозу и засухе формы [11].

Сохранение генофонда *J. regia* требует применения современных методов, включая криоконсервацию – единственный надёжный способ долгосрочного хранения генетических ресурсов растений, особенно видов с короткоживущими или субортодоксальными семенами [12–14]. Жизнеспособность семян грецкого ореха быстро снижается из-за перекисного окисления липидов [15, 16], что делает криосохранение оптимальной стратегией. Для орехоплодных растений успешно применяются методы криоконсервации изолированных зародышевых осей [17-20].

Криосохранение апикальных меристем, изолированных из растений *in vitro*, открывает возможности клонального сохранения элитных генотипов и дикорастущих форм [12, 17, 21]. Эффективность таких протоколов во многом определяется холодовой акклиматизацией донорных растений *in vitro* [22-28]. Следует отметить, что исследования по криоконсервации апикальных меристем *J. regia* ограничены, что определяет актуальность разработки протоколов для диких казахстанских популяций.

Несмотря на эффективность криосохранения зародышевых осей, разработка протоколов для апикальных меристем имеет ключевое значение для клонального сохранения элитных и диких форм *J. regia*. Целью данного исследования было определить оптимальные условия холодовой акклиматизации донорных растений и обработка в растворе PVS2 для успешного криосохранения апексов побегов диких и сортовых форм *J. regia* методом витрификации.

Материалы и методы исследований. В качестве растительного материала использовали побеги *in vitro* трёх диких образцов *Juglans regia* (Jug 11, Jug 12, Jug 14) из природной популяции Национального природного парка «Сайрам-Угам» и сорт Milotai 10. Побеги *in vitro* культивировали в сосудах Magenta™ (PhytoTechnology Laboratories®, США) на среде Драйвера и Куньюки (Driver and Kuniyuki walnut, DKW) [29], содержащей 4,4 μM 6-бензиламинопурина (БАП), 0,04 μM индол-3-масляной кислоты (ИМК), 20 г/л сахарозы, 4 г/л агара и 1,75 г/л джелрайта. pH среды доводили до 5,7 и автоклавировали при 121°C в течение 20 мин. Растения *in vitro* культивировали при температуре 24°C, освещенности 25 $\mu\text{мол}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, 16-ти часовом фотопериоде и пассировали на свежие питательные среды каждые 4 недели.

Холодовая акклиматизация *in vitro* растений. Четырехнедельные растения *in vitro* подвергали закаливанию при переменных температурах (8 час при 22°C, освещенность 10 $\mu\text{мол}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$; 16 час в темноте при -1°C) [24]. Длительность закаливания растений *in vitro* варьировала от 1 до 6 недель. Контрольные побеги выращивали без акклиматизации при стандартных условиях. Для криосохранения изолировали апикальные меристемы длиной 1,8-2,0 мм с 5-6 зачатками листьев.

Процедура криосохранения. Для криосохранения использовали метод PVS2-витрификации

[30, 31]. Изолированные меристемы предварительно культивировали в течение двух дней на среде DKW с 0,3 М сахарозой в условиях акклиматизации. Затем меристемы помещали в криопробирки (Corning®, США) с раствором (2 М глицерин + 0,4 М сахароза в жидкой среде DKW, pH 5,8) на 20 мин при 25°C, после чего обрабатывали криопротектором PVS2 (Plant Vitrification Solution #2) (30% глицерина, 15% этиленгликоля, 15% диметилсульфоксида, 0,4 М сахароза, pH 5,7) на льду в течение 30, 50, 80 или 100 мин. Криопробирки погружали в жидкий азот на 15-20 мин. Размораживание проводили в водяной бане при 45°C (1 мин), затем при 25°C (1 мин), после чего меристемы дважды промывали средой DKW с 1,2 М сахарозой и переносили на среду DKW для регенерации: первые 2 дня – в темноте, затем при стандартных условиях.

Статистический анализ. В первом эксперименте оценивали влияние длительности холодовой акклиматизации (0-6 недель) на регенерацию апикальных меристем трёх диких образцов. Далее, изучали влияние времени обработки раствором PVS2 (30, 50, 80, 100 мин) для трёх диких образцов и сорта Milotai 10.

Каждый вариант проводили в трёх повторностях по 20 апикальных меристем ($n=60$), контроль – 5 апексов без погружения в ЖА ($n=15$). Оценку регенерации (формирование новых побегов и листьев) проводили через 6 недель. Данные представлены как средние значения $\pm$ стандартная ошибка (SE). Проценты подвергали арксин-преобразованию; статистический анализ выполняли методом ANOVA в пакете SYSTAT 12.0 [32], различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Холодовая акклиматизация *in vitro* растений является эффективной стратегией для повышения их физиологической устойчивости к стрессу, связанному с криосохранением, и, как следствие, улучшения регенерации апексов побегов после замораживания. Продолжительность холодовой акклиматизации и время экспозиции в растворе PVS2 оказали решающее влияние на эффективность криосохранения апикальных меристем *Juglans regia*. У неакклиматизированных растений регенерация после воздействия жидким азотом отсутствовала или была крайне низкой (Рис. 1), что подтверждает важность предварительной адаптации культур к низкотемпературному стрессу.

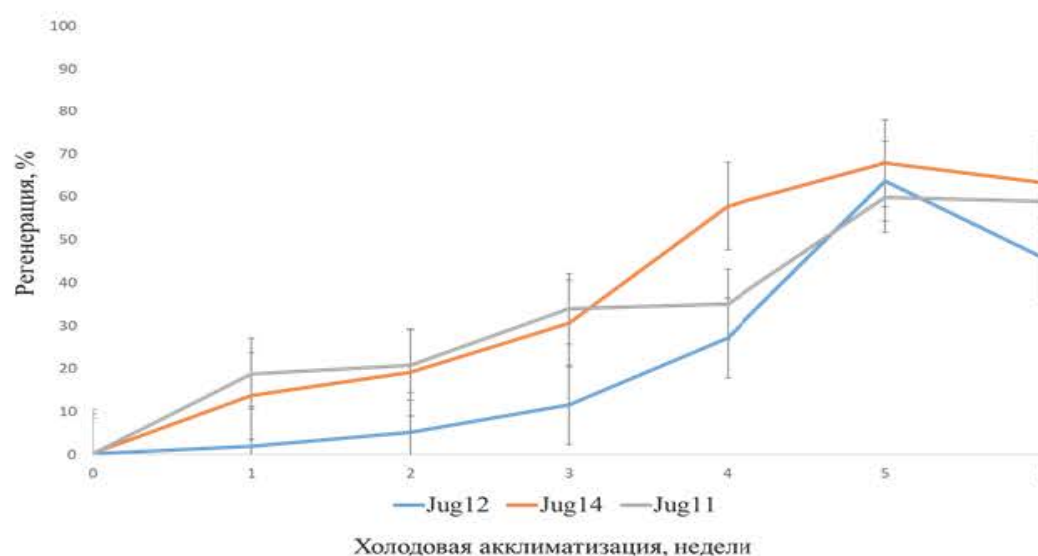


Рисунок 1 – Влияние продолжительности холодовой акклиматизации при переменных температурах (+22°C, 8 час / -1°C, 16 час) на регенерацию апикальных меристем (%) трёх диких образцов *Juglans regia* после криосохранения методом PVS2-витрификации (80 мин экспозиции)

В контрольной группе (без ЖА) уровень регенерации составлял в среднем 91,7% (от 80 до 100%). (Рис. 1).

Однонедельная акклиматизация достоверно увеличила ($P < 0.05$) регенерацию у двух из трёх исследованных диких образцов – до 13,7% у Jug 14 и 18,8% у Jug 11. Однако существенное повышение жизнеспособности наблюдалось лишь после 4-5 недель акклиматизации. Максимальные значения регенерации (59,9–67,8%) были получены после 5 недель, что соответствует оптимальному периоду акклиматизации, выявленному и для других культур умеренной зоны. Аналогичные результаты ранее были получены и при использовании метода инкапсуляции-дегидратации [33]. Однако полученные в нашем исследовании значения оказались несколько ниже данных Faгаq и соавт., что может быть связано с различиями в методах [33]. Следует отметить, что метод инкапсуляции-дегидратации является более длительным и трудоёмким по сравнению с витрификацией, поскольку включает инкапсуляцию апексов в альгинат и дегидратацию до

содержания влаги около 20%, процесс, который зависит от условий среды и требует точной оптимизации. Витрификация с использованием PVS2, напротив, обеспечивает более быстрый и воспроизводимый результат при надлежащем подборе времени обработки. Это подтверждает, что именно длительная акклиматизация при переменных температурах (+22°C, 8 час / -1°C, 16 час) формирует устойчивость клеток апикальных меристем к стрессу замораживания и оттаивания. Между генотипами отмечались различия в реакции на холодовую акклиматизацию (Рис. 1). В процессе акклиматизации иногда наблюдалось пожелтение и побурение нижних листьев, но при этом верхушечные меристемы сохраняли зелёную окраску.

Продолжительность обработки апикальных меристем в растворе PVS2 также оказала значительное влияние на эффективность криоконсервации (Рис. 2).

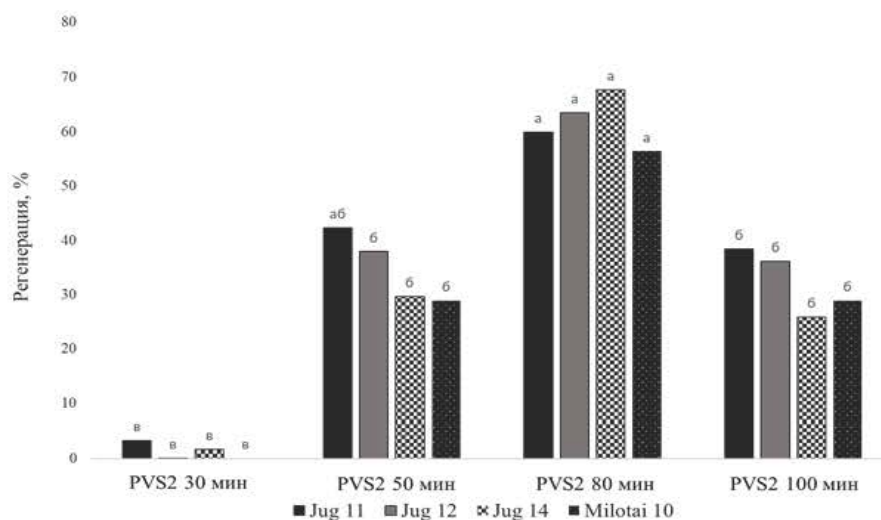


Рисунок 2 – Влияние продолжительности обработки криопротектором PVS2 (30, 50, 80 и 100 мин) на регенерацию апикальных меристем трёх диких образцов *Juglans regia* (Jug 11, Jug 12, Jug 14) и сорта Milotai 10, изолированных после 5-недельной холодовой акклиматизации. Средние значения, отмеченные одинаковыми буквами, не различаются статистически при $P < 0,05$

Короткая 30-минутная обработка оказалась недостаточной для дегидратации клеток, и регенерация отсутствовала. Увеличение времени до 50 минут повышало выживаемость до 28,9-42,3%, однако только 80-минутная обработка обеспечила оптимальную дегидратацию и максимальные показатели регенерации (56,4-67,8%). Более длительная обработка (100 мин)

вызывала снижение жизнеспособности, что связано с токсичностью компонентов PVS2.

Таким образом, сочетание 5-недельной холодовой акклиматизации при переменных температурах ($+22^{\circ}\text{C}$ / -1°C) и 80-минутной обработки в PVS2 при 0°C обеспечивает оптимальные условия для криосохранения апикальных меристем *J. regia*.

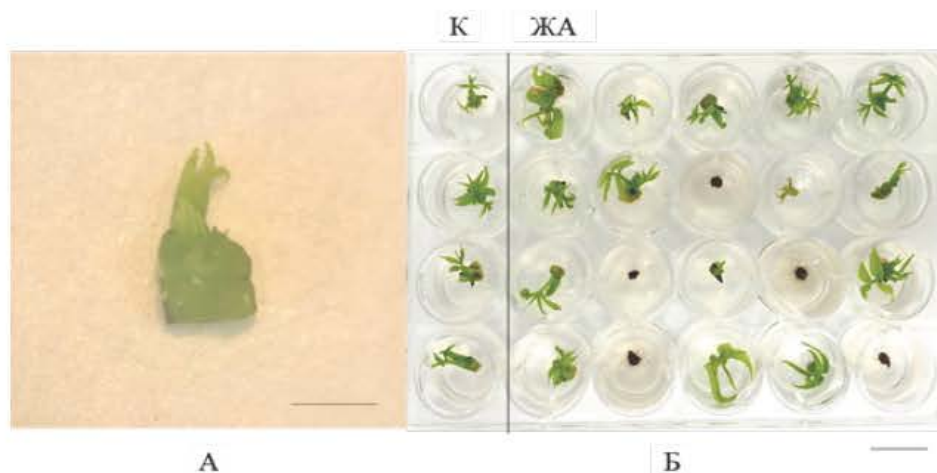


Рисунок 3 – Изолированная апикальная меристема дикорастущего образца *Juglans regia*, Jug 11 в момент изоляции (А) (шкала = 1 мм), (Б) – после обработки раствором витрификации (PVS2) в течение 80 мин, воздействия жидким азотом (ЖА) и через 3 недели после оттаивания (шкала = 1 см). К – контроль (без воздействия ЖА), ЖА – после воздействия жидкого азота

В данном исследовании апикальные меристемы, изолированные из растений *in vitro*, акклиматизировали к холоду в течение 5 недель при температуре 22°C/-1°C, затем помещали в раствор с 0,2 М глицерином и 0,3 М сахарозой на 20 минут при 25°C, после чего обрабатывали криопротектором PVS2 в течение 80 минут при 0°C и криоконсервировали методом витрификации. Этот оптимизированный протокол обеспечил в среднем 59,9% регенерации для образца Jug 11; 63,5% – для Jug 12; 67,8% – для Jug 14 и 56,4% – для сорта Milotai 10 (Рис. 1, 2, 3). Полученные результаты сопоставимы с данными по сохранению зародышевых осей *J. regia* (72,4%) и *J. nigra* (75%) [34]. Этот подход позволяет эффективно дегидратировать клетки апикальной меристемы, минимизировать повреждения при замораживании и значительно повысить посткриогенную регенерацию, что делает его перспективным для клонального сохранения генофонда как диких, так и сортовых форм грецкого ореха.

Заключение. Проведённые исследования показали, что успешное криосохранение

апикальных меристем *Juglans regia* возможно только при предварительной холодовой акклиматизации растений *in vitro*. Оптимальной продолжительностью акклиматизации является 5 недель при переменных температурах (+22 °C, 8 ч / -1 °C, 16 ч). Обработка криопротектором PVS2 в течение 80 минут оказалась наиболее эффективной для дегидратации тканей и предотвращения повреждений при замораживании и оттаивании.

Таким образом, сочетание 5-недельной холодовой акклиматизации и 80-минутной обработки в PVS2 можно рекомендовать как оптимальный протокол витрификации для криосохранения апикальных меристем *J. regia*. Полученные результаты могут быть использованы при разработке эффективных схем долгосрочного хранения генофонда орехоплодных культур.

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (Научно-техническая программа BR21882024).

Список литературы

1. Manning WE (1978) *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1058-1087.
2. McGranahan G & Leslie CA (1991) *Acta Horticulturae* 290, 907-974. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1991.290.20>
3. Aradhya M, Woeste K & Velasco D (2010) *Acta Horticulturae* 861, 127-132. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.861.16>
4. Baitenov MS (2001) in *Flora of Kazakhstan. Generic Complex of Flora*, (ed) IO Baitulin, Gylym, Almaty, Kazakhstan 2, p. 58.
5. Torokeldiev N, Ziehe M, Gailing O, Finkeldey R (2019) *Tree Genetics & Genomes* 15, 5-16. <https://doi.org/10.1007/s11295-018-1311-8>
6. Utegenova GA, Kushnarenko SV, Kalybaev KR, Shorauly B & Ogar NP (2019) *Research, results* 2, 276-285.
7. Martinez ML, Labuckas DO, Lamarque AL & Maestri DM (2010) *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 1959-1967. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4059>
8. Roor W, Konrad H, Mamadjanov D & Geburek T (2017) *Journal of Heredity* 108, 391-404. <https://doi.org/10.1093/jhered/esw122>
9. Bernard A, Lheureux F & Dirlewanger E (2018) *Tree Genetics & Genomes* 14, 1-28. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1214-0>
10. Pollegioni P, Woeste KE, Chiocchini F, Olimpieri I, Tortolano V, Clark J, Hemery GE, Mapelli S & Malvolti ME (2014) *Tree Genetics & Genomes* 10, 1027-2043. <https://doi.org/10.1007/s11295-014-0740-2>
11. Climate data. Available online: <https://geotsy.com/ru/kazakhstan/sajram-ugamskij-nacional-nyj-park-71446/pogoda-i-klimat> (accessed on 25 September 2025)
12. Pence V, Ballesteros D, Walters C, Reed BM, Philpott M, Dixon KW, Pritchard HW, Culley TM & Vanhove AC (2020) *Biological Conservation* 250, 108736. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108736>
13. Colville L & Pritchard HW (2019) *New Phytologist* 224, 557-562. <https://doi.org/10.1111/nph.16006>

14. Bonner FT (1990) *Forest Ecology and Management* 35, 35-43. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(90\)90230-9](https://doi.org/10.1016/0378-1127(90)90230-9)
15. Bonner FT (2008) in *The Woody Plant Seed Manual*, (eds) FT Bonner & RB Karrfalt, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington DC, pp. 601-606.
16. de Boucaud MT & Brison M (1995) in *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 32, (ed) YPS Bajaj, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 129-147. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03096-7_8
18. Reed BM (2008) in *Plant Cryopreservation. A Practical Guide*, (ed) BM Reed, Springer Science + Business Media, LLC, New York, pp. 3-13. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4_1
17. Normah MN & Makeen AM (2008) in *Plant Cryopreservation. A Practical Guide*, (ed) BM Reed, Springer Science + Business Media, LLC, New York, pp. 211-240. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4_10
18. Reed BM & Hummer KE (2001) *Acta Horticulturae* 566, 77-79. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.556.24>
19. Ballesteros D & Pence VC (2019) *Cryobiology* 88, 110-113. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.04.005>
20. Bettoni JC, Bonnard R & Volk GM (2021) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 144, 21-34. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01846-x>
21. Roque-Borda CA, Kulus D, Vacaro de Souza A, Kaviani B & Vicente EF (2021) *International Journal of Molecular Sciences* 22, 6157-6189. <https://doi.org/10.3390/ijms22116157>
22. Wu Y, Engelmann F, Zhao Y, Zhou M & Chen S (1999) *CryoLetters* 20, 121-130.
23. Paul H, Daigny G & Sangwan-Norreel B (2000) *Plant Cell Reports* 19, 768-774. <https://doi.org/10.1007/s002990000195>
24. Reed BM (1988) *CryoLetters* 9, 166-171.
25. Reed BM (1989) *CryoLetters* 10, 315-322.
26. Reed BM (1993) *Cryobiology* 30, 179-184.
27. Chang Y & Reed BM (2000) *Cryobiology* 40, 311-322. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2251>
28. Kushnarenko SV, Romadanova NV & Reed BM (2009) *CryoLetters* 30, 47-54.
29. Driver JA & Kuniyuki AH (1984) *HortScience* 12, 507-509.
30. Sakai A, Kobayashi S & Oiyama I (1990) *Plant Cell Reports* 9, 30-33. <https://doi.org/10.1007/BF00232130>
31. Sakai A, Hirai H & Niino T (2008) in: *Plant Cryopreservation. A Practical Guide*, (ed) BM Reed, Springer Science + Business Media, LLC, New York, pp. 33-57. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4_3
32. SYSTAT (2007) SYSTAT 12.0, SYSTAT Software, Inc., San Jose, CA, Statistics software. <https://systatsoftware.com/>
33. Faraq KM, Nagy NMN, Soliman HI & Ahmed MEE (2012) *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 6, 626-635.
34. Kushnarenko SV, Romadanova NV, Turdiyev TT, Aralbayeva MM & Kalybayev KR (2022) *Eurasian Journal of Ecology* 71, pp. 72-80. <https://doi.org/10.26577/EJE.2022.v71.i2.07>