

МРНТИ 34.31.33: 62.99.37

<https://doi.org/10.26577/EJE.2022.v71.i2.07>

С.В. Кушнарченко<sup>1\*</sup>, Н.В. Ромаданова<sup>1</sup>, Т.Т. Турдиев<sup>1</sup>,  
М.М. Аралбаева<sup>1</sup>, Қ.Р. Қалыбаев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РГП на ПХВ «Институт биологии и биотехнологии растений», Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>РГУ «Сайрам-Угамский государственный национальный природный парк»,

Казахстан, Туркестанская область

\*e-mail: svetlana\_bio@mail.ru

## СОХРАНЕНИЕ В КРИОБАНКЕ ОБРАЗЦОВ ГРЕЦКОГО ОРЕХА ИЗ НЕСКОЛЬКИХ ПОПУЛЯЦИЙ САЙРАМ-УГАМСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО НАЦИОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКА

Грецкий орех (*Juglans regia* L.) является одной из наиболее экономически важных орехоплодных культур. В Казахстане дикорастущая популяция грецкого ореха зарегистрирована на юге страны и охраняется на территории Сайрам-Угамского государственного национального природного парка. В результате экспедиций 2018–2019 г.г. проведено описание 136 образцов *Juglans regia* по дескрипторам Международного института изучения генетических ресурсов растений (International Plant Genetic Resources Institute), собраны плоды 73 образцов грецкого ореха, отличающиеся высоким разнообразием по размеру, форме и массе орехов, выходу ядра, окраске и текстуре скорлупы и другим параметрам. Для сохранения биоразнообразия *Juglans regia* был разработан эффективный метод криоконсервации изолированных зародышевых осей. После поверхностной дезинфекции 0,1% раствором сулемы и промывания стерильной дистиллированной водой, зародышевые оси высушивали в потоке стерильного воздуха в ламинар-боксе в течение 1 часа до относительной влажности 12,1%, помещали в криопробирки и погружали в сосуд Дьюара с жидким азотом. У 72,4% зародышевых осей после криогенного хранения отмечена регенерация растений на питательной среде Драйвера-Куньюки с 1 мг/л 6-бензиламинопурина и 0,01 мг/л индолилмасляной кислоты. Создана криогенная коллекция 73 образцов грецкого ореха. Впервые генетический материал *Juglans regia*, произрастающий в Казахстане, сохранен в криогенном банке при температуре -196°C.

**Ключевые слова:** *Juglans regia* L., орех грецкий, криоконсервация, криобанк, изолированные зародышевые оси

С.В. Кушнарченко<sup>1\*</sup>, Н.В. Ромаданова<sup>1</sup>, Т.Т. Турдиев<sup>1</sup>,  
М.М. Аралбаева<sup>1</sup>, Қ.Р. Қалыбаев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>«Өсімдіктер биологиясы және биотехнология институты» ШЖҚ РМК, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2</sup>«Сайрам-Өгем мемлекеттік ұлттық табиғи паркі» РММ, Қазақстан, Түркістан облысы

\*e-mail: svetlana\_bio@mail.ru

### Сайрам-Өгем мемлекеттік ұлттық табиғи паркінің бірнеше популяцияларынан алынған грек жаңғақ үлгілерін криобанкте сақтау

Грек жаңғағы (*Juglans regia* L.) – экономикалық маңызды жаңғақ культурасының бірі болып табылады. Қазақстанда жабайы өсетін грек жаңғағының популяцияны еліміздің оңтүстігінде тіркелген және Сайрам-Өгем мемлекеттік ұлттық табиғи паркінің аумағында қорғауға алынған. Экспедициялардың нәтижесінде 2018–2019 ж. Халықаралық өсімдіктердің генетикалық ресурстар институтының (International Plant Genetic Resources Institute) дескрипторлары бойынша *Juglans regia*-ның 136 түрі сипатталды, жаңғақтардың мөлшері, пішіні мен салмағы, ядро шығымдылығы, қабықтың түсі мен құрылымы бойынша өте әртүрлі грек жаңғағының 73 түрінің жемістері жиналды. *Juglans regia* биоәртүрлілігін сақтау үшін оқшауланған ұрықтық осьтерді эффективті криоконсервациялау әдісі әзірленді. 0,1% сулема ерітіндісімен бетін дезинфекциялап, стерильді дистилденген сумен шайғаннан кейін ұрықтық осьтерді ламинар бокстің ішінде стерильді ауа ағынында 1 сағат бойы 12,1% салыстырмалы ылғалдылыққа дейін кептірілді сосын криопробиркаға салып сұйық азоты бар дьюар сауытына батырылды. Ұрықтық осьтердің 72,4% криогенді сақтаудан кейін Драйвер-Куньюки қоректік ортада 1 мг/л 6-бензиламинопурина және

0,01 мг/л индолилмай қышқылы бар өсімдік регенерациясы байқалды. 73 грек жаңғақ үлгісінің криогендік коллекциясы жасалды. Қазақстанда өсетін *Juglans regia* тұқымының генетикалық материалы алғаш рет криогендік банкте -196 °С температурада сақталды.

**Түйін сөздер:** *Juglans regia* L., грек жаңғағы, криоконсервация, криобанк, оқшауланған ұрықтық осьтер

S.V. Kushnarenko<sup>1\*</sup>, N.V. Romadanova<sup>1</sup>, T.T. Turdiyev<sup>1</sup>,  
M.M. Aralbayeva<sup>1</sup>, K.R. Kalybayev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Plant Biology and Biotechnology, Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup> Sairam-Ugam State National Natural Park, Kazakhstan, Turkestan region

\*e-mail: svetlana\_bio@mail.ru

### **Preservation in a cryobank of *Juglans regia* L. accession from several populations in the Sairam-Ugam State National Natural Park**

Persian walnut (*Juglans regia* L.) is one of the most economically important nut crops. In Kazakhstan, the wild-growing population of *Juglans regia* is registered in the south of the country and is protected on the territory of the Sairam-Ugam State National Natural Park. As a result of expeditions in 2018-2019 136 accessions of *Juglans regia* were described according to the descriptors of the International Plant Genetic Resources Institute, fruits of 73 accessions of walnuts were collected, which are highly diverse in terms of size, shape and weight of nuts, kernel yield, color and texture of the shell and other parameters. To conserve the biodiversity of *Juglans regia*, the efficient cryopreservation technique has been developed for isolated embryonic axes. After surface disinfection with 0.1% mercuric chloride solution and rinsing with sterile distilled water, the embryonic axes were desiccated under laminar flow 1 hour to moisture content of 12.1%, placed in cryovials, and immersed in a Dewar vessel with liquid nitrogen. In 72.4% of embryonic axes after cryogenic storage, plant recovery was noted on the Driver-Kuniyuki walnut medium with 1 mg/l 6-benzylaminopurine and 0.01 mg/l indolylbutyric acid. A cryogenic collection of 73 *Juglans regia* accessions has been established. For the first time, the genetic material of *Juglans regia*, growing in Kazakhstan, has been stored in a cryogenic bank at -196 °C.

**Key words:** *Juglans regia* L., walnut, cryopreservation, cryobank, isolated embryonic axes

## **Введение**

Орех грецкий – *Juglans regia* L. относится к семейству Ореховые (*Juglandaceae* A. Rich. Ex Kunth.), распространен в умеренных и субтропических регионах северного полушария. Вид сохранился в диком состоянии в Западном Тянь-Шане [1-3], в Киргизии реликтовые леса *J. regia* до сих пор занимают значительные территории – около 47 000 га, хотя в последние десятилетия отмечается заметное сокращение ареала этого вида [4]. В Казахстане орех грецкий охраняется на территории Сайрам-Угамского государственного национального природного парка, где находится дикорастущая популяция в пойме реки Угам (Угамский очаг). Здесь *Juglans regia* не образует крупных зарослей, деревья формируют небольшие группы площадью 0,6-8 га и сосредоточены в наиболее влажных местах [3, 5].

Орех грецкий отличается высоким полиморфизмом, разнообразие форм проявляется прежде всего в морфологических признаках плодов: размерах, форме, окраске и толщине скорлупы, выходу ядра, а также содержанию жира и других химических соединений [6]. Большое разнообразие

по многим морфологическим характеристикам, в том числе размеру и форме орехов, толщине и текстуре скорлупы, массе ядра было отмечено при обследовании Угамской популяции [5]. Высокий уровень генетического разнообразия был выявлен на основе использования 8 микросателлитных ДНК-маркеров (SSR-маркеров) в 11 исследованных природных популяциях Киргизии [4]. Формы ореха грецкого также различаются по срокам цветения, устойчивости к болезням, урожайности, регулярности плодоношения и др. На основе обширных молекулярно-генетических и морфометрических исследований 44 природных популяций евразийского континента наиболее высокое генетическое разнообразие было выявлено в популяциях грецкого ореха в Пакистане и Индии, что дало возможность предположить, что эти южноазиатские популяции содержат предположительно предковые формы орехов [7, 8].

Важность сохранения генетического разнообразия дикорастущего грецкого ореха обусловливается фактом, что селекция этой орехоплодной культуры часто осуществляется методом отбора высокоурожайных и устойчивых к стресс-

факторам растений из природных популяций. Высокое разнообразие морфологических признаков у грецкого ореха Угамской популяции свидетельствует о чрезвычайной важности этого генетического материала для селекции ценной орехоплодной культуры и необходимости его надежного сохранения.

В настоящее время криоконсервация считается единственным методом долгосрочного сохранения ценных генетических ресурсов растений [9, 10]. Для многих важных сельскохозяйственных культур, таких как злаки, хранение семян представляет собой достаточно рутинную задачу. Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций (The Food and Agriculture Organization of the United Nations, ФАО) разработала стандарты сохранения таких ортодоксальных семян, хорошо переносящих обезвоживание. Образцы семян подсушивают в контролируемых условиях при температуре 5-20°C до 10-25% относительной влажности, в зависимости от вида, и помещают на долгосрочное хранение при температуре  $-18 \pm 3^\circ\text{C}$  (базовые коллекции). Активные коллекции семян сохраняют в условиях среднесрочного хранения при низких положительных температурах 5-10°C и относительной влажности  $15 \pm 3^\circ\text{C}$  [11]. В отличие от семян, вегетативно размножаемые культуры гораздо труднее сохранить в течение длительного времени. По мнению международного научного сообщества, криоконсервация – это единственный способ долгосрочного сохранения многих ценных плодовых, ягодных, овощных и орехоплодных культур, размножаемых вегетативно [12-15]. Незаменим этот метод при необходимости сохранить на долгий срок короткоживущие семена, например, грецкого или лесного орехов, у которых после одного-полутора лет хранения существенно снижается жизнеспособность [16]. Орехи целиком невозможно сохранить в жидком азоте из-за их большого размера и высокого содержания жира. Однако зародышевые оси, изолированные из семян, оказались подходящим эксплантом для криоконсервации [17]. Для успешной криоконсервации изолированных зародышевых осей требуется их подсушивать в асептических условиях ламинар-бокса до оптимальной относительной влажности [18-19].

Целью настоящей работы явилась разработка протокола криоконсервации изолированных зародышевых осей и создание криобанка образ-

цов грецкого ореха, отобранных из нескольких популяций Сайрам-Угамского государственного национального природного парка.

### Материалы и методы

Морфологическое описание образцов грецкого ореха (деревья, листья, плоды) было проведено с использованием дескрипторов, рекомендованных Международным институтом изучения генетических ресурсов растений (International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) [20]. В полевых условиях координаты участков произрастания орехов на местности фиксировались с помощью GPS-навигатора ETREX (Garmin).

Собранные в Сайрам-Угамском государственном национальном парке орехи до начала экспериментов хранились при температуре  $+10 \pm 2^\circ\text{C}$ . Для изолирования зародышевых осей орехи промывали в мыльном растворе и освобождали ядро (зародыш) от скорлупы. В асептических условиях ламинар-бокса из ядер орехов выделяли зародышевые оси с прилегающей частью семядолей, поверхностно дезинфицировали в 0,1% растворе сулемы в течение 7 мин, после чего трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Исследовали влияние высушивания изолированных зародышевых осей на их жизнеспособность и регенерацию растений после криоконсервации в жидком азоте. По 10 зародышевых осей помещали в чашки Петри и подсушивали в потоке стерильного воздуха в ламинар-боксе в течение 0, 1 или 2 час, затем переносили в криопробирки и погружали в сосуды Дьюара на 1 час. Размораживали криопробирки при температуре  $+4^\circ\text{C}$ , после чего изолированные зародышевые оси помещали в пробирки с питательной средой Драйвера и Куньюки (DKW) [21] с добавлением 0,1 мг/л 6-бензиаминопурина (БАП); 0,01 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК); 4 г/л агара; 1,75 г/л джелрайта, 20 г/л сахарозы, рН 5,7. Повторность экспериментов трехкратная, количество зародышевых осей в каждом варианте опыта составляло 30 шт.

Для определения относительной влажности по 10 зародышевых осей в трехкратной повторности, подсушенных ламинар-боксе в течение 0, 1 и 2 час, помещали в стеклянные бюксы с притертыми крышками и выдерживали в суходжаровом шкафу при температуре  $103^\circ\text{C}$  в течение 16 час. Относительную влажность определяли как разницу между сырой и сухой массой [22] по следующей формуле 1:

$$\% \text{ относительной влажности} = - [(СырМ - СухМ) / (СырМ)] \times 100\% \quad (1)$$

где СырМ – сырая масса изолированных зародышевых осей;

СухМ – сухая масса изолированных зародышевых осей;

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартных методов. Для сравнительной оценки средних величин был использован *t*-критерий Стьюдента [23]. Статистически значимыми считались различия при  $P < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В результате научной экспедиции в сентябре 2019 г. было проведено обследование насаждений и сбор растительного материала грецкого ореха на территории Сайрам-Угамского государственного национального природного парка в Тюлькубасском филиале в ущельях Кокбулак и Машат. В начале 50-х годов прошлого столетия была произведена посадка в этих ущельях грецкого ореха семенами из природных популяций.

Все исследованные деревья были пронумерованы и, в соответствии с дескрипторами [20], было описано 65 деревьев (образцов) грецкого ореха (рисунок 1).

Обследованные популяции находятся в ущелье Кокбулак на высоте 778-860 м над уровнем моря и в ущелье Машат – 647-671 м. У 34 образцов были собраны орехи для изучения морфологических характеристик плодов и сохранения в криогенном банке. Растительность в месте

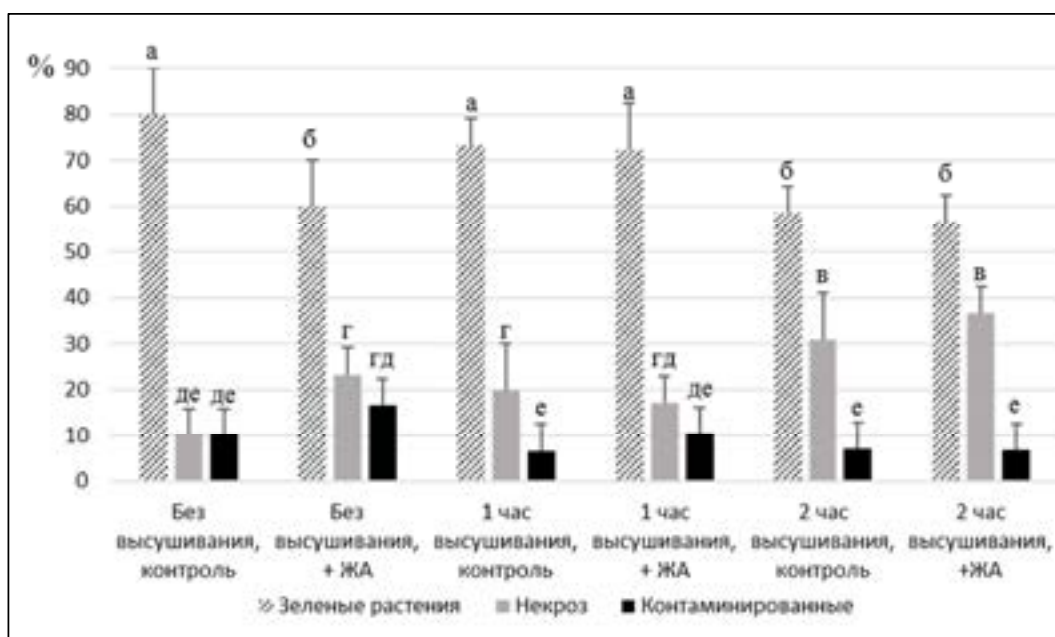
сбора представлена в основном разреженным лесом (61,5%), иногда густым лесом (23,1%), кустарниковыми зарослями (10,8%), травянистой растительностью с редкими деревьями и кустарниками (4,6%) (рис. 1 а, б). Грецкий орех в основном представлен молодыми жизнеспособными сильными одно- (53,8%), реже двух- (27,7%), трех- (12,3%) и четырехствольными деревьями (6,2%). В среднем диаметр основного ствола составляет  $137,9 \pm 53,2$  см, диаметр второго ствола –  $110,7 \pm 31,3$  см, третьего –  $111,5 \pm 50,2$  см. Возраст деревьев 60-70 лет (72,3%), реже более молодые деревья (27,7%). Форма кроны – вытянутая (38,5%) и раскидистая (35,4%), чуть в меньшей степени округлая (26,2%) (рис. 1 б). Преобладают высокие деревья (более 20 м – 72,3%), деревья высотой от 10 до 20 м составляют 24,6%, низкорослых деревьев менее 4%. Побеги неопушенные, цвет молодых однолетних побегов – зеленые, более старых – коричневые, главный черешок – зеленого цвета. Длина сложного листа варьировала от 23,4 до 59,9 см, среднее значение –  $39,15 \pm 4,39$  см; ширина – от 13,2 до 44,1 см; среднее значение –  $26,05 \pm 3,07$  см. На сложном листе расположено 5, 7 или 9 простых широкоэллиптических листочков с цельнокрайними краями пластинки. Длина простых коротких листочков колеблется от 2,0 до 13,3 см, среднее значение –  $6,14 \pm 1,76$ ; длина простых длинных листочков колеблется от 8,2 до 30,7 см, среднее значение –  $15,68 \pm 2,74$ . Ширина узких коротких простых листочков находится в диапазоне от 1,0 до 11 см, среднее значение –  $3,8 \pm 0,87$ ; ширина широких листочков колеблется от 5,7 до 17,2 см, среднее значение –  $9,94 \pm 1,41$ .



а, б – взрослые плодоносящие деревья, образцы № 20 и 54; в – плоды  
Рисунок 1 – Орех грецкий в Сайрам-Угамском государственном национальном природном парке, Тюлькубасский филиал, ущ. Кокбулак

Плодоношение в основном слабое, отмечено у 63,1% образцов, у 23,1% – отсутствует, тип плодоношения в основном верхушечный. Орехи различались по массе, размеру, форме и окраске скорлупы. Плоды в основном округлой (86,0%), реже коротко- (12,0%) и удлинненно-трапецевидной (2,0%) формы (рис. 1 в). Длина орехов варьировала от  $24,9 \pm 2,1$  до  $40,1 \pm 3,1$  мм; ширина составляла от  $20,9 \pm 1,6$  до  $33,8 \pm 2,2$  мм. Текстура скорлупы орехов очень грубая, неровная (78,0%), редко средняя (14,3%), еще реже шероховатая (7,1%). Цвет скорлупы темный (42,0%) и очень темный (36,0%) редко средний (14,0%) и светлый (8,0%). Масса орехов со скорлупой варьировала от  $6,2 \pm 1,2$  до  $13,1 \pm 2,7$  г. Масса ядра – от  $1,53 \pm 0,7$  до  $6,8 \pm 2,1$  г; выход ядра составил 24,9-65,8%. Для коммерческих сортов грецкого ореха имеются определенные требования в отношении качества плодов. Так, масса орехов должна находиться в пределах 12-18 г, при этом, выход ядра должен быть не менее 50% [24, 25]. В исследованных дикорастущих популяциях были выявлены образцы, соответствующие вышеуказанным параметрам.

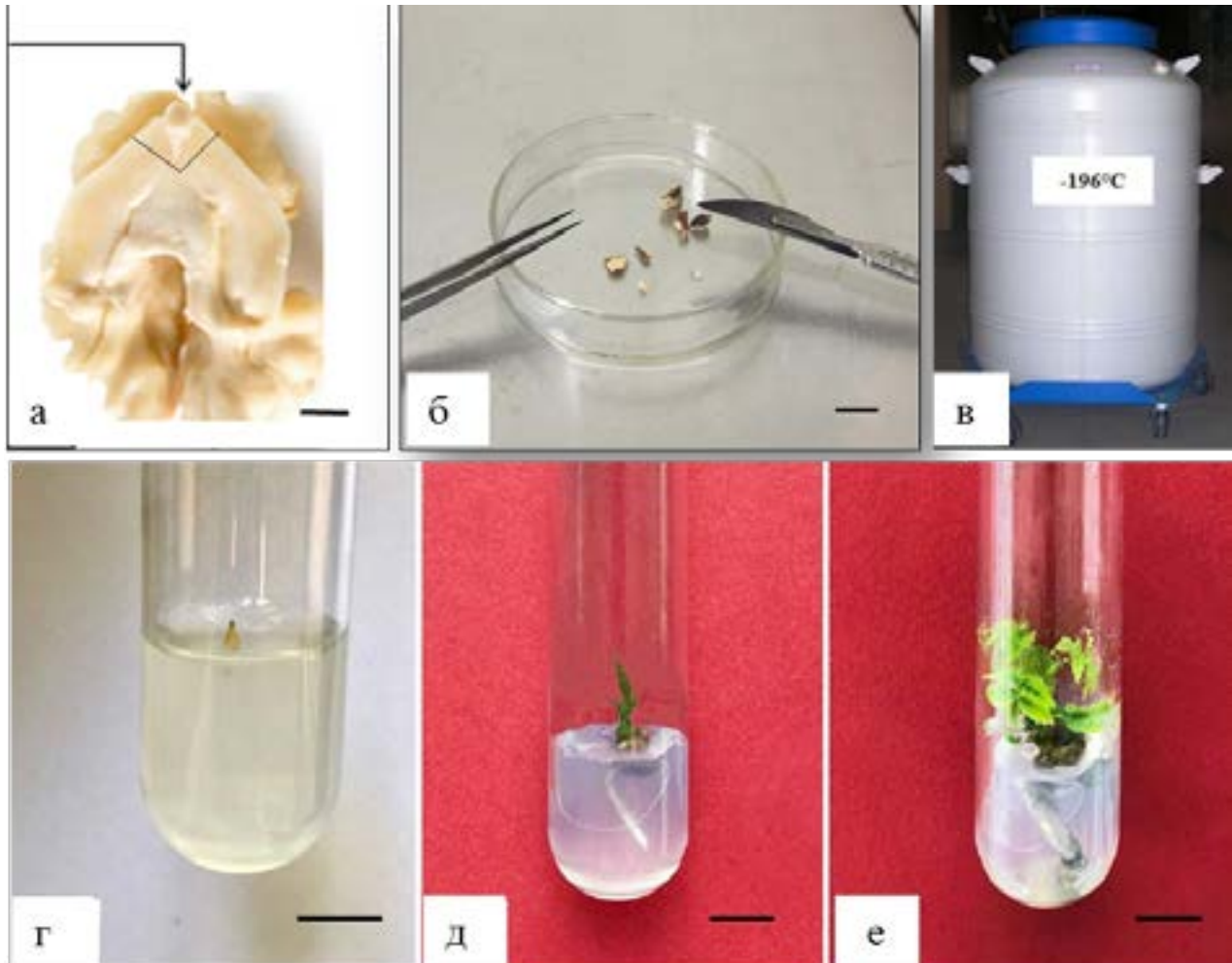
В процессе разработки протокола криоконсервации изолированных зародышевых осей изучали влияние относительной влажности / длительности высушивания осей в потоке стерильного воздуха в ламинар-боксе на их выживаемость после криоконсервации. Рассчитанная относительная влажность зародышевых осей без высушивания составляла  $16,3 \pm 0,4\%$ ; после одного часа высушивания снижалась до  $12,1 \pm 0,9\%$ ; после двух часов – до  $7,1 \pm 0,6\%$ . Жизнеспособность зародышевых осей после замораживания в жидком азоте существенно зависела от длительности высушивания их в ламинар-боксе. Так, без высушивания только 60% зародышевых осей выживали после криоконсервации; высушивание в течение 1 час достоверно повышало процент жизнеспособных осей, развивающихся в растения, до 72,4% (рис. 2). Высушивание в течение двух часов снижало посткриогенную жизнеспособность осей в среднем до 56,7%, при этом до 36,7% возрастала доля некротизированных эксплантов, не способных к дальнейшему развитию, по сравнению с вариантами без высушивания или высушиванием в течение 1 часа (рис. 2).



**Рисунок 2** – Результаты криоконсервации зародышевых осей грецкого ореха после различной длительности высушивания в ламинар-боксе. Данные, обозначенные различными буквами, достоверно отличаются при  $P < 0,05$ . (ЖА – жидкий азот)

Таким образом, оптимальная длительность высушивания зародышевых осей в течение 1 часа до достижения ими 12,1% относительной влажности позволила получить высокий процент регенерации растений после криоконсервации. В среднем 72,4% зародышевых осей после цикла замораживания-оттаивания оставались жизнеспособными и на питательной среде формировали полноценные растения (рис. 3). Этот

процент жизнеспособности зародышевых осей вполне соответствует данным литературы. Так, от 70 до 90% проростков различных культур были получены из криоконсервированных зародышевых осей с относительной влажностью 7,8-11,5% [18, 19]. В работе американских исследователей сообщается о сохранении 75-96% жизнеспособности после криоконсервации зародышевых осей различных видов *Corylus* [17].



а – изолирование зародышевой оси (показано стрелкой) с прилегающей частью семядолей;  
б – подсушивание зародышевых осей в потоке стерильного воздуха в ламинар-боксе;  
в – криоконсервация зародышевых осей в сосуде Дьюара; г-е – развитие растений после помещения зародышевых осей на питательную среду DKW с 0,1 мг/л БАП и 0,01 мг/л ИМК (г), через одну неделю (д) и один месяц (е). Шкала увеличения 1 см.

**Рисунок 3** – Этапы криоконсервации изолированных зародышевых осей грецкого ореха

В криогенный банк на длительное хранение были помещены 73 образца, отобранные из различных популяций Сайрам-Угамского государственного национального природного парка, в том числе 39 образцов, собранных в 2018 году в пойме реки Угам в ущелье Бак-Шелпек (Угамский филиал) [5] и 34 образца – из насаждений в ущельях Кокбулак и Машат (Тюлькубасский филиал). Создана криогенная коллекция, состоящая из 73 образцов дикорастущего *Juglans regia* (411 зародышевых осей).

### Заключение

Дикорастущая популяция *Juglans regia* в Казахстане, охраняемая на территории Сайрам-Угамского государственного национального природного парка, представляет собой самую северную часть естественного ареала грецкого ореха. В работе представлены результаты по описанию и сбору дикорастущих образцов грецкого ореха, отличающихся высоким полиморфизмом по размеру, форме и массе орехов, выходу ядра, окраске и текстуре скорлупы, а также другим параметрам. Для сохранения этого ценного генетического материала разработан эффективный метод криоконсервации зародышевых осей, изолированных их семян

грецкого ореха. Разработанный протокол криоконсервации позволяет сохранить в среднем 72,4% жизнеспособных зародышевых осей, после размораживания способных формировать полноценные растения на питательной среде. Создана криогенная коллекция 73 дикорастущих образцов *Juglans regia*. Ценный генетический материал грецкого ореха, произрастающего на территории Казахстана, впервые сохранен на длительное время в криогенном банке Института биологии и биотехнологии растений при температуре -196°C.

### Благодарность

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках проекта AP08855758 «Разработка эффективной технологии микроклонального размножения коммерчески ценных сортов грецкого ореха для производства высококачественного посадочного материала, адаптированного к условиям юго-востока Казахстана».

Авторы выражают благодарность сотрудникам Сайрам-Угамского государственного национального природного парка за помощь в организации экспедиций и сбора растительного материала.

### Литература

- 1 Флора Казахстана / под ред. Н.В. Павлова. – Алма-Ата: Изд-во АН КазССР, 1960. – Т. 3. – 459 с.
- 2 Байтенов М.С. Флора Казахстана. Родовой комплекс флоры. – Алматы: «Фылым», 2001. – Т. 2. – 279 с.
- 3 Джангалиев А.Д., Салова Т.Н., Туреханова Р.М. Дикие плодовые растения Казахстана. – Алматы: КазгосИНТИ, 2001. – 135 с.
- 4 Torokeldiev N., Ziche M., Gailing O., Finkeldey R. Genetic diversity and structure of natural *Juglans regia* L. populations in the southern Kyrgyz Republic revealed by nuclear SSR and EST-SSR markers // *Tree Genetics & Genomes*. – 2019. – Vol. 15. – P. 5-16.
- 5 Утегенова Г.А., Кушнаренко С.В., Қалыбаев Қ.Р., Шораұлы Б., Огарь Н.П. Оценка состояния дикорастущей популяции ореха грецкого (*Juglans regia* L.) в Казахстане // *Ізденістер, нәтижелер. Исследования, результаты*. – 2019. – № 2. – С. 276-285.
- 6 Martinez M.L., Labuckas D.O., Lamarque A.L., Maestri D.M. Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products // *J. Sci. Food Agric*. – 2010. – Vol. 90. – P. 1959-1967.
- 7 Roor W., Konrad H., Mamadjanov D., Geburek T. Population differentiation in common walnut (*Juglans regia* L.) across major parts of its native range – insights from molecular and morphometric data // *J Hered*. – 2017. – Vol. 108 (4). – P. 391-404.
- 8 Bernard A., Lheureux F., Dirlwanger E. Walnut: past and future of genetic improvement // *Tree Genetics & Genomes*. – 2018. – Vol. 14. – P. 1-28.
- 9 Pence V., Ballesteros D., Walters C., Reed B.M., Philpott M., Dixon K.W., Pritchard H.W., Culley T.M., Vanhove A.C. Cryobiotechnologies: Tools for expanding long-term *ex situ* conservation to all plant species // *Biological Conservation*. – 2020. – Vol. 250. – 8 p.
- 10 Jenderek M., Reed B.M. Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National Plant Germplasm System // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. – 2017. – Vol. 53. – P. 299-308.
- 11 ФАО. Стандарты генных банков для генетических ресурсов растений для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства. Изд. второе, испр. и доп.. – Рим, 2015. – 167 с.
- 12 Ochatt S., Lambardi M., Panis B., Pathirana R., Revilla M. A., Wang Q.C. Cryopreservation and *in vitro* banking: a cool subject – Preface from the editors // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2021. – Vol. 144. – P. 1–5.

- 13 Zhang J.M., Lu X.X., Xin X., Yin G.K., He J.J., Huang B., Jiang D., Chen X.L. Cryopreservation of *Citrus* anthers in the National Crop Genebank of China // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* – 2017. – Vol. 53. – P. 318-327.
- 14 Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant.* – 2011. – Vol. 47 (1). – P. 5-16. DOI: 10.1007/s11627-010-9327-2
- 15 Vollmer R., Villagaray R., Cárdenas J., Castro M., Chávez O., Anglin N. L., Ellis D. A large-scale viability assessment of the potato cryobank at the International Potato Center (CIP) // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* – 2017. – Vol. 53. – P. 309-317.
- 16 Mehlenbacher S.A. Hazelnut (*Corylus*). Genetic resource of temperate fruit and nut crops // *Acta Horticulturae.* – 1991. – Vol. 290. – P. 790-836.
- 17 Reed B.M., Hummer K.E. Long-term storage of hazelnut embryonic axes in liquid nitrogen // *Acta Horticulturae.* – 2001. – Vol. 556. – P. 77-79. DOI: 10.17660/ActaHortic.2001.556.24
- 18 Normah M.N., Makeen A.M. Cryopreservation of excised embryos and embryonic axes. In: B.M. Reed (ed.). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide.* Springer Science + Business Media, LLC. – 2008. – P. 211-240.
- 19 Normah M.N., Choo W.K., Kushnarenko S.V., Reed B.M. Cryopreservation of orthodox and recalcitrant seed. In: Trigiano R.N. & Gray D.J. (eds.). *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology.* CRC Press. Taylor & Francis Group, LLC. – 2011. – P. 507-514.
- 20 Descriptors for walnut (*Juglans* spp.). International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy. – 1994. – 51 p.
- 21 Driver J.A., Kuniyuki A.H. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock [*Juglans hindsii* x *Juglans regia*, tissue culture] // *HortScience.* – 1984. – Vol. 12. – P. 507-509.
- 22 Reed B.M., Schwanke S., Shala R. Pear seeds retain viability after liquid nitrogen immersion // *HortScience.* – 2001. – Vol. 36 (6). – P. 1121-1122.
- 23 Лакин Г.Ф. Биометрия. Учеб. пособие для биол. спец. вузов. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
- 24 Cosmulescu S., Botu M. Walnut biodiversity in south-western Romania-resource for perspective cultivars // *Pak. J. Bot.* – 2012. – Vol. 44. – P. 307-311.
- 25 Khadivi-Khub A. Genetic divergence in seedling trees of Persian walnut for morphological characters in Markazi province from Iran // *Braz. J. Bot.* – 2014. – Vol. 37. – P. 273-281.

### References

- 1 *Flora Kazakhstana. [Flora of Kazakhstan]*. Alma-Ata: Izd-vo AN KazSSR, 1960, T. 3. (In Russian)
- 2 Bajtenov, M.S. *Flora Kazakhstana. Rodovoj kompleks flory. [Flora of Kazakhstan. Generic complex of flora]*. Almaty: Fylym, 2001, T. 2. (In Russian)
- 3 Dzhangaliev, A.D., Salova, T.N., and Turekhanova, R.M. *Dikie plodovye rasteniya Kazakhstana. [Wild fruit plants of Kazakhstan]*. Almaty: KazgosINTI, 2001. (In Russian)
- 4 Torokeldiev, N., Ziehe, M., Gailing, O., and Finkeldey R. “Genetic diversity and structure of natural *Juglans regia* L. populations in the southern Kyrgyz Republic revealed by nuclear SSR and EST-SSR markers”. *Tree Genetics & Genomes* 15, (2019): 5-16. <https://doi.org/10.1007/s11295-018-1311-8>
- 5 Utegenova, G.A., Kushnarenko, S.V., Kalybaev, K.R., Shorayly, B., and Ogar', N.P. “Ocenka sostoyaniya dikorastushchej populyacii orekha greckogo (*Juglans regia* L.) v Kazakhstane [Assessment of the state of the wild-growing population of walnut (*Juglans regia* L.) in Kazakhstan]”. *Izdenister, natizheler. Issledovaniya, rezul'taty* no 2 (2019): 276-285. (In Russian)
- 6 Martinez, M.L., Labuckas, D.O., Lamarque, A.L., and Maestri D.M. “Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products”. *J. Sci. Food Agric.* 90, (2010): 1959-1967. DOI 10.1002/jsfa.4059
- 7 Roor, W., Konrad, H., Mamadjanov, D., and Geburek, T. “Population differentiation in common walnut (*Juglans regia* L.) across major parts of its native range – insights from molecular and morphometric data”. *J Hered.* 108, no. 4. (2017): 391-404. <https://doi.org/10.1093/jhered/esw122>
- 8 Bernard, A., Lheureux, F., and Dirlwanger, E. “Walnut: past and future of genetic improvement”. *Tree Genetics & Genomes* 14 (2018): 1-28. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1214-0>
- 9 Pence, V., Ballesteros, D., Walters, C., Reed, B.M., Philpott, M., Dixon, K.W., Pritchard, H.W., Culley, T.M., and Vanhove A.C. “Cryobiotechnologies: Tools for expanding long-term *ex situ* conservation to all plant species”. *Biological Conservation*.250 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108736>
- 10 Jenderek, M., and Reed, B.M. “Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National Plant Germplasm System”. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 53 (2017): 299-308. DOI: 10.1007/s11627-017-9828-3
- 11 FAO. *Standarty gennyh bankov dlya geneticheskikh resursov rastenij dlya proizvodstva prodovol'stviya i vedeniya sel'skogo hozyajstva. [FAO. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture]*. Izd. vtoroe, ispr. i dop. Rim, 2015. (In Russian)
- 12 Ochatt, S., Lambardi, M., Panis, B., Pathirana, R., Revilla, M. A., and Wang, Q.C. “Cryopreservation and *in vitro* banking: a cool subject – Preface from the editors”. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 144 (2021): 1–5. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01985-1>
- 13 Zhang, J.M., Lu, X.X., Xin, X., Yin, G.K., He, J.J., Huang, B., Jiang, D., and Chen, X.L. “Cryopreservation of *Citrus* anthers in the National Crop Genebank of China”. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 53 (2017): 318-327. DOI 10.1007/s11627-017-9848-z
- 14 Engelmann, F. “Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity”. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 47 (2011): 5-16. DOI: 10.1007/s11627-010-9327-2



- 15 Vollmer, R., Villagaray, R., Cárdenas, J., Castro, M., Chávez, O., Anglin, N. L., and Ellis, D. "A large-scale viability assessment of the potato cryobank at the International Potato Center (CIP)". *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 53 (2017): 309-317. DOI 10.1007/s11627-017-9846-1
- 16 Mehlenbacher, S.A. "Hazelnut (*Corylus*). Genetic resource of temperate fruit and nut crops". *Acta Horticulturae* 290 (1991): 790-836.
- 17 Reed, B.M., and Hummer, K.E. "Long-term storage of hazelnut embryonic axes in liquid nitrogen". *Acta Horticulturae* 566 (2001): 77-79. DOI: 10.17660/ActaHortic.2001.556.24
- 18 Normah, M.N., and Makeen, A.M. "Cryopreservation of excised embryos and embryonic axes". In: B.M. Reed (ed.). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer Science + Business Media, LLC, 2008: 211-240.
- 19 Normah, M.N., Choo, W.K., Kushnarenko, S.V., and Reed B.M. "Cryopreservation of orthodox and recalcitrant seed". In: Trigiano R.N. & Gray D.J. (eds.). *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. CRC Press. Taylor & Francis Group, LLC, 2011: 507-514.
- 20 *Descriptors for walnut (Juglans spp.)*. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy, 1994.
- 21 Driver, J.A., and Kuniyuki, A.H. "In vitro propagation of Paradox walnut rootstock [*Juglans hindsii* x *Juglans regia*, tissue culture]". *HortScience* 12 (1984): 507-509.
- 22 Reed, B.M., Schwanke, S., and Shala, R. "Pear seeds retain viability after liquid nitrogen immersion". *HortScience* 36, no 6, (2001): 1121-1122.
- 23 Lakin, G.F. *Biometriya. Ucheb. posobie dlya biol. spec. vuzov*. M.: Vyssh. shk., 1990. (In Russian)
- 24 Cosmulescu, S., and Botu, M. "Walnut biodiversity in south-western Romania-resource for perspective cultivars". *Pak. J. Bot.* 44 (2012): 307-311.
- 25 Khadivi-Khub A. "Genetic divergence in seedling trees of Persian walnut for morphological characters in Markazi province from Iran". *Braz. J. Bot.* 37 (2014): 273-281. DOI: 10.1007/s40415-014-0080-3