

А.С. Нұртаза<sup>1</sup>, Д.А. Дюсембекова<sup>1</sup>, С.С. Исламова<sup>1,2</sup>, И.Н. Саматова<sup>1,2</sup>,  
А.Т. Умирзакова<sup>3</sup>, А.А. Какимжанова<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Национальный центр биотехнологии, Астана, Казахстан;

<sup>2</sup>Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилёва, Астана, Казахстан;

<sup>3</sup>Сайрам-Угамский государственный национальный природный парк, Шымкент, Казахстан

\*Автор для корреспонденции: kakimzhanova@biocenter.kz

## Оптимизация условий микроклонального размножения и среднесрочного хранения *in vitro* редкого вида смородины Янчевского для сохранения

В статье представлены результаты исследований по сохранению редкого вида растения смородины Янчевского (*Ribes janczewskii*) в условиях *in vitro*. Этот вид смородины более устойчив к болезням, вредителям и низким температурам, а также содержит большое количество полезных веществ, таких как аскорбиновая кислота, полифенолы и антоцианы по сравнению с другими видами. Ранее не проводились исследования по разработке биотехнологии для сохранения этого исчезающего вида. Авторами данной работы подобраны эффективная стерилизация и введение эксплантов смородины Янчевского в культуру *in vitro*, в качестве стерилизующего агента выбран 12 %-ный раствор перекиси водорода с режимом стерилизации 5 мин, где жизнеспособность эксплантов достигла до 73,3 %. Также для мультипликации оптимизирован состав питательной среды WPM с добавлением БАП 0,5 мг/л, ГК 0,4 мг/л и ИМК 0,1 мг/л, который позволил получить 4,83 новых побега на эксплант. Для среднесрочного хранения микропобегов смородины Янчевского наиболее оптимальным условием была выбрана питательная среда WPM с добавлением маннита в концентрации 20 гр/л, в результате чего прирост по высоте побегов и количеству листьев был низким, размножение побегов не наблюдалось. Была создана коллекция смородины Янчевского в культуре *in vitro*, которая позволит размножить и сохранить этот ценный вид. В настоящее время микроклонально размножено 250 побегов, из которых 120 побегов были культивированы на питательных средах для среднесрочного хранения.

*Ключевые слова:* *in vitro* культура, *Ribes janczewskii*, питательная среда WPM, среднесрочное хранение, маннит, стерилизующие агенты, микроклональное размножение, микропобеги.

### Введение

Сохранение и поддержание биологического разнообразия входит в число бережно охраняемых ключевых национальных интересов каждого государства. Растения в Европе, Азии, Америке имеют тот или иной статус редкости. Причинами этого являются антропогенная нагрузка в виде распашки земель, выпаса скота, строительства и низкая конкурентоспособность видов в фитоценозах [1, 2].

Казахстан по разнообразию биоресурсов растительного мира занимает ведущее место среди государств Центральной Азии [3]. Стоит отметить, что, в целом, 12 % растений являются эндемичными для Казахстана и многие из них находятся в статусе редких и находящихся под угрозой исчезновения [4].

Одним из таких видов, подвергшихся негативному влиянию, является смородина Янчевского, которая раньше произрастала в ущельях и долинах горных рек в горах Средней Азии (Тянь-Шань, Памиро-Алай) [5, 6]. В настоящее время *R. janczewskii* находится на грани исчезновения и занесена в Красную книгу Казахстана [7]. Смородина Янчевского находится под угрозой исчезновения, обусловленного почти полным отсутствием естественного семенного возобновления, хозяйственной деятельностью человека, выпасом скота, отсутствием защитных и лесовосстановительных мер. В то время как вид имеет важное значение для эволюции, обеспечения всех групп пользователей, в том числе селекционеров и исследователей бесценным генетическим материалом [8, 9].

В настоящее время смородина Янчевского в природе произрастает на территории Казахстана, Кыргызстана, Таджикистана и Узбекистана. Вид занесен в Красную книгу Казахстана [10] и в Международный красный лист [11].

Смородина Янчевского была названа в честь польского ботаника Эдуарда Франца Янчевского. Это листопадный кустарник высотой до 100–150 см. Побеги растения голые, молодые побеги золотистого цвета, позже становятся грязновато-жёлтыми. Листья крупные, голые до 15 см в диаметре, пятилопастные с крупными, острыми лопастями и сердцевидным основанием. Снизу с рассеянными

смолистыми пахучими железками. Листовая пластинка с обеих сторон голая, блестящая. Края листа крупнозубчатые. Цветет в июне. Плоды — чёрные ложные ягоды диаметром до 13 мм, ароматные, созревают в августе [12, 13].

*R.janczewskii* обладает ценными признаками, такими как устойчивость к весенним заморозкам благодаря позднему цветению, высокая устойчивость к вредителям и болезням (мучнистая роса, септориоз листьев), плоды богаты высоким содержанием аскорбиновой кислоты, полифенолов и антоцианов, в которых содержание выше, чем в культурных сортах [14, 15].

Смородина является наиболее популярной среди населения и ценной ягодной культурой в мире, благодаря наличию в ней высоких концентраций широкого спектра биологически активных веществ, антиоксидантов, сахаров, витаминов и минеральных компонентов. Польша — крупнейший в мире производитель черной смородины в последние годы, за ней следуют Россия, Великобритания, Скандинавия и Новая Зеландия [16]. В настоящее время грибные болезни, такие как мучнистая роса (*Sphaerotheca morsuvae*), септориоз листьев (*Mycosphaerella ribis*) и антракноз (*Pseudopeziza ribis*), являются одними из основных проблем для производителей черной смородины [8, 16, 17]. Одним из наиболее эффективных методов решения этой проблемы является межвидовая гибридизация путем создания устойчивых сортов. Таким образом, дикорастущая форма смородины Янчевского представляет селекционный интерес, как источник признаков высокой устойчивости к болезням, более высокого уровня ряда хозяйственно-ценных признаков по сравнению с существующим сортиментом.

В естественных условиях смородина Янчевского размножается семенами и отводками [8]. Достижения в области биотехнологии обеспечивают новые методы, которые используют для сохранения и оценки биоразнообразия растений. Прямое использование биотехнологических инструментов, таких как культивирование *in vitro* и криоконсервация, оказалось ценным методом для крупномасштабного размножения, сохранения и реинтродукции, находящихся под угрозой исчезновения видов растений [18].

Наиболее популярным для размножения древесных культур является микроклональное размножение. Метод микроклонального размножения позволяет хранить материал в культуре *in vitro* длительное время. Сохранить зародышевую плазму растений *in vitro* можно либо создавая условия для медленного роста (*in vitro*) и обеспечивая кратко-, среднесрочное хранение, или применяя криоконсервацию для обеспечения длительного хранения [19–21].

В настоящее время использование культуры *in vitro* для хранения микропобегов с медленным ростом представляет собой замечательный стратегический инструмент для поддержки среднесрочного сохранения генетических ресурсов растений [22–24].

Исследователи используют микроклональное размножение смородины для крупномасштабного производства, кратковременного сохранения гермоплазмы *Ribes* [25, 26]. Использование данного метода позволяет повысить эффективность оздоровления до 100 %, в 5–10 и более раз увеличить коэффициент размножения и на 2–3 года ускорить внедрение в производство новых оздоровленных сортов и форм [27, 28]. Целью исследования было провести сбор растительного материала смородины Янчевского, оптимизировать условия стерилизации эксплантов, введение в культуру *in vitro*, микроклональное размножение и среднесрочное хранение для размножения и сохранения вида.

#### Материалы и методы

В качестве объекта исследования был использован растительный материал смородины Янчевского (*Ribes janczewskii*). Материал был собран в Туркестанской области, Толебийский р-н, ГНПП «Сайрам-Угам». Координаты: долгота E070°23.994', широта N42°06.526', высота над ур. м. 2351 м (рис. 1). На всех этапах исследования экспланты выращивали в культуральных сосудах в фактеростатной комнате. На каждой полке в фактеростатной комнате были установлены светодиодные ленты SMD 5050 60 led/m, фотопериод составил 16/8, температура 24–26°C.



Рисунок 1. Смородина Янчевского

#### *Стерилизация и введение эксплантов в культуру in vitro*

Для введения в культуру *in vitro* были использованы пазушные почки однолетних побегов. Для стерилизации эксплантов была исследована эффективность растворов перекиси водорода ( $H_2O_2$ ). Основная стерилизация проводилась в стерильных условиях ламинар-бокса. Для подбора оптимальной концентрации были изучены 3 варианта стерилизации: I — 6%  $H_2O_2$ ; II — 12%  $H_2O_2$ ; III — 24 %  $H_2O_2$ , время экспозиции составило 5 мин. Далее экспланты тщательно промывали стерильной дистиллированной водой и высушивали на фильтровальной бумаге. Для оценки эффективности стерилизации экспланты культивировали на безгормональной среде *WPM* (*Woody Plant Medium*). На каждый вариант исследования было высажено по 15 эксплантов.

#### *Регенерация основного побега*

После получения стерильных и жизнеспособных эксплантов были испытаны различные гормоны (кинетин (КТ), 6-бензиламинопурин (БАП), тидиазурон (ТДЗ) и гибберелловая кислота (ГК) для регенерации основного побега в культуре *in vitro*. Для этого была использована питательная среда *WPM*. Таким образом, были изучены следующие варианты: I — *WPM* безгормональная; II — КТ 0,2 мг/л и ГК 0,5 мг/л; III — БАП 0,2 мг/л и ГК 0,5 мг/л; IV — ТДЗ 0,2 мг/л и ГК 0,5 мг/л. На каждый вариант исследования было культивировано по 25 эксплантов, наблюдение проводилось в течение 21 дня.

#### *Микроклональное размножение*

После получения основного микропобега в культуре *in vitro* было проведено исследование по микроклональному размножению. Для этого были выбраны гормоны: БАП, ГК и индолил-3-масляная кислота (ИМК). В результате были изучены следующие варианты: I — *WPM* безгормональная; II — *WPM* с БАП 0,5 мг/л, ГК 0,4 мг/л и ИМК 0,1 мг/л; III — *WPM* с БАП 1,0 мг/л, ГК 0,4 мг/л и ИМК 0,1 мг/л; IV — *WPM* с БАП 1,5 мг/л, ГК 0,4 мг/л и ИМК 0,1 мг/л. На каждый вариант исследования было культивировано по 30 эксплантов, наблюдение проводилось в течение 21 дня.

#### *Среднесрочное хранение*

Для среднесрочного хранения в условиях *in vitro* смородины Янчевского было изучено влияние повышенной концентрации сахарозы и маннита. Были изучены следующие варианты на базе питательной среды *WPM*: I — сахароза 30 гр/л; II — сахароза 60 гр/л; III — сахароза 90 гр/л; IV — маннит 10 гр/л; V — маннит 20 гр/л; VI — маннит 30 гр/л. Экспланты выращивали в культуральных сосудах в фактестатной комнате. Для изучения эффективности условий были изучены следующие параметры: высота побегов и количество листьев. Данные были сняты на 4-ый месяц культивирования.

#### *Результаты*

##### *Стерилизация и введение эксплантов в культуру in vitro*

Поверхностная стерилизация эксплантов для введения в культуру *in vitro* является первостепенной задачей. Основным фактором успеха является стерилизующий раствор, который не должен вызывать ожог тканей и максимально снизить контаминацию. Одним из широко применяемых растворов является хлорид ртути [29]. Однако раствор является токсичным и неудобен в использовании

[30]. Альтернативным раствором является перекись водорода. В наших предыдущих работах была доказана эффективность использования 12 % раствора перекиси водорода для стерилизации пазушных почек яблони [31, 32]. В данном исследовании была изучена эффективность разных концентраций перекиси водорода для стерилизации пазушных почек смородины Янчевского.

Как видно из результатов (табл. 1), высокая контаминация наблюдалась на I-м варианте. Инфицированность патогенной микрофлорой наблюдалось у 13 эксплантов из 15, что составило 86,7 %. Процент жизнеспособности эксплантов составило только 13,3 %. Увеличение концентрации перекиси водорода до 24 % (III вариант) привело к некрозу у большей части эксплантов до 66,7 %. У 10 эксплантов наблюдался ожог и только 5 эксплантов сохранили жизнеспособность. Наиболее мягким, но при этом эффективным способом стерилизации из рассматриваемых был раствор 12 % перекиси водорода (II вариант), 11 эксплантов были стерильными и сохранили свою жизнеспособность (73,3 %). Рост патогенной микрофлоры наблюдался только у 3-х эксплантов, 1 эксплант получил ожог. В опубликованных работах по микроклональному размножению смородины очень мало данных о режимах стерилизации. В 2012 году был опубликован протокол по размножению видов *Rubus* и *Ribes*, где авторы рекомендовали использовать гипохлорит кальция [25]. При стерилизации пазушных почек смородины черной была применена многоэтапная стерилизация с помощью раствора «Бриллиант», а также диацета, этилового спирта и хлоргексидина [33]. Однако работ по стерилизации с помощью перекиси водорода опубликовано не было.

Т а б л и ц а 1

**Результаты стерилизации эксплантов смородины Янчевского**

Вариант	Инфицированность эксплантов		Некроз эксплантов		Жизнеспособность эксплантов	
	шт	%	шт	%	шт	%
I — 6 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13	86,7	-	0	2	13,3
II — 12 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3	20	1	6,7	11	73,3
III — 24 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	0	10	66,7	5	33,3

Таким образом, 12 % раствор перекиси водорода является эффективным для поверхностной стерилизации пазушных почек смородины Янчевского. Была получена высокая степень жизнеспособности эксплантов до 73,3 % и низкий процент контаминации.

*Регенерация основного побега*

Для микроклонального размножения используются различные регуляторы роста. Они подбираются индивидуально, в зависимости от генотипа. Например, для размножения некоторых видов смородины на этапе регенерации основного побега авторы рекомендуют использовать гормоны БАП 2,0 мг/л и ИМК 0,5 мг/л [25]. Известно, что тидиазурон влияет на пролиферацию побегов брусники в низких концентрациях (от 0,1 до 1µМ), но ингибирует удлинение побегов [34]. Однако работы по изучению влияния кинетина и тидиазурана на микроклональное размножение смородины найдено не было.

Результаты исследований показали (табл. 2), что добавление гормонов в состав питательной среды играет ключевую роль при вегетативном размножении. На контрольном варианте исследования (I вариант) процент регенерации составил только 32 %, в среднем, с одной пазушной почки было образовано 0,36 побегов. Более того, образованные побеги были плохо сформированы. Средняя высота образованных побегов составила 0,58 см, количество листьев 2,75 шт на эксплант. При использовании кинетина (вариант II) регенерация составила 64 %. С культивируемой почки было образовано 0,88 побегов на эксплант. Побеги были обособленные и высокорослые, однако листья были плохо сформированы. Листовая пластинка была маленького размера. Влияние кинетина на высокорослость побегов отмечается и для других культур. Например, для истода миртолистного на среде с кинетином были получены наиболее высокие побеги, чем при использовании БАП [35].

Влияние гормонального состава на регенерацию основного побега

Вариант	Кол-во побегов, шт	Высота побегов, см	Кол-во листьев, шт	Процент регенерации
I — WPM безгормональная	0,36±0,11	0,58±0,03*	2,75±0,25	32%
II — WPM с КТ 0,2 мг/л и ГК 0,5 мг/л	0,88±0,17	1,31±0,05*	3,25±0,17	64%
III — WPM с БАП 0,2 мг/л и ГК 0,5 мг/л	1,48±0,16*	1,23±0,03*	3,68±0,17	88%
IV — WPM с ТДЗ 0,2 мг/л и ГК 0,5 мг/л	0,68±0,14	0,88±0,05*	5,00±0,35*	56%

\*Примечание. Средняя разница значительна на уровне 0,05. Данные выражены в виде средних ± стандартной ошибки.

На III варианте исследования был получен максимальный процент образования побегов — 88 %. Более того, было зафиксировано наибольшее количество побегов с одной пазушной почки — 1,48 шт. Листовая пластинка у образовавшихся побегов была хорошо сформирована. В среднем, было получено 3,68 листьев на эксплант. Средняя высота побегов составила 1,23 см. Также использование БАП было эффективным и для смородины золотистой (*Ribes aureum*). Авторы указывают, что концентрация 5 мкМ является наиболее оптимальной для размножения дополнительных побегов в культуре *in vitro* [36]. Эффективность БАП подтверждается и другими исследованиями. Например, гормоны БАП 2,0 мг/л, ГК 0,1 мг/л и ИМК 0,5 мг/л были успешно применены для введения в культуру *in vitro* смородины черной [37]. Для *Ribes magellanicum* добавление 1,0 мг/л БАП приводило не только к регенерации побегов, но и вытягиванию побегов в высоту. Увеличение концентрации БАП снижало апикальное доминирование и рост в высоту замедлялся [38].

Использование тидиазурона (вариант IV) было менее эффективным. Отмечено нарастание каллусной ткани в основании первичного побега. Процент регенерации составил только 56 %. Из одной почки было регенерировано 0,68 побегов. Было получено максимальное количество листьев — 5 шт на эксплант. Однако у листьев была плохо сформирована листовая пластинка. Средняя высота побегов составила только 0,88 см. Авторами отмечается, что тидиазурон эффективно используется для регенерации побегов из каллусной культуры. Побеги дикой брусники и черники были получены из каллуса при использовании этого гормона [34].



Рисунок 2. Регенированные побеги смородины Янчевского на питательной среде WPM с добавлением БАП 0,2 мг/л и ГК 0,5 мг/л

Таким образом, литературные данные и наши результаты подтверждают, что использование БАП для регенерации основного побега из пазушной почки смородины Янчевского является наиболее оптимальным вариантом. Так, для введения в культуру *in vitro* питательная среда WPM с добавлением БАП 0,2 мг/л и ГК 0,5 мг/л является эффективным гормональным сочетанием. Полученные побеги были использованы для оптимизации питательной среды для микроклонального размножения.

#### Микроклональное размножение

*In vitro* культура смородины многими исследователями используется для ликвидации вирусных заболеваний и для массового и быстрого размножения здоровых растений. Стандартно, экспланты культивируют на питательные среды с добавлением цитокининов, за исключением случаев, когда



экспланты укореняют [39]. В нашем исследовании было изучено влияние цитокинина БАП в разных концентрациях (0,5–1,0 мг/л).

При изучении различных концентрации БАП было выявлено, что эффективным содержанием является БАП 0,5 мг/л (вариант II). Было образовано 4,83 новых побега на эксплант, высота составила 1,07 см, количество листьев — 6,10 шт. На контрольном варианте (I вариант) был получен минимальный прирост по количеству побегов, только 0,90 шт. Высота побега увеличилась на 0,36 см, количество листьев на 2,63 шт (табл. 3, рис. 2).

На III варианте прирост в высоту побегов составил 1,53 см, количество побегов 2,00 шт и количество листьев 7,43 шт. При максимальной концентрации БАП (1,5 мг/л) было образовано, в среднем, 3,03 шт новых побегов. Высота увеличилась на 1,18 см, а количество листьев — 4,10 шт (табл. 3, рис. 2).

Таблица 3

**Оптимизация питательной среды для микроклонального размножения смородины Янчевского**

Вариант	День 1			День 21 (прирост)		
	Высота побегов, см	Кол-во побегов, шт	Кол-во листьев, шт	Высота побегов, см	Кол-во побегов, шт	Кол-во листьев, шт
I — WPM безгормональная	0,57±0,02	1,00±0,00	3,83±0,21	0,36±0,03*	0,90±0,06*	2,63±0,22*
II — WPM с БАП 0,5 мг/л, ГК 0,4 мг/л и ИМК 0,1 мг/л	0,57±0,02	1,00±0,00	3,90±0,18	1,07±0,03*	4,83±0,25*	6,10±0,23*
III — WPM с БАП 1,0 мг/л, ГК 0,4 мг/л и ИМК 0,1 мг/л	0,56±0,02	1,00±0,00	3,90±0,22	1,53±0,02*	2,00±0,15*	7,43±0,34*
IV — WPM с БАП 1,5 мг/л, ГК 0,4 мг/л и ИМК 0,1 мг/л	0,61±0,02	1,00±0,00	3,67±0,19	1,18±0,03*	3,03±0,19*	4,10±0,23*

\*Примечание. Средняя разница значительна на уровне 0,05. Данные выражены в виде средних ± стандартной ошибки.

Обычно для размножения побегов авторы широко используют БАП [40]. Однако концентрация гормона имеет важное значение. Например, для размножения смородины красной (*Ribes rubrum*) низкая концентрация БАП приводила к большему размножению дополнительных побегов, а более высокая концентрация подавляла. Так, оптимальным сочетанием гормонов было БАП 0,4 мг/л, ИМК 0,02 мг/л и ГК 0,2 мг/л. [41]. При размножении *Ribes magellanicum* результаты исследования показали, что использование БАП в концентрациях 0,25 мг/л или 0,50 мг/л продуцировало максимальной размножение побегов в культуре *in vitro* [38]. Для размножения смородины черной безгормональная среда была наиболее эффективной [26]. Тогда как на безгормональной среде нами не были получены положительные результаты.

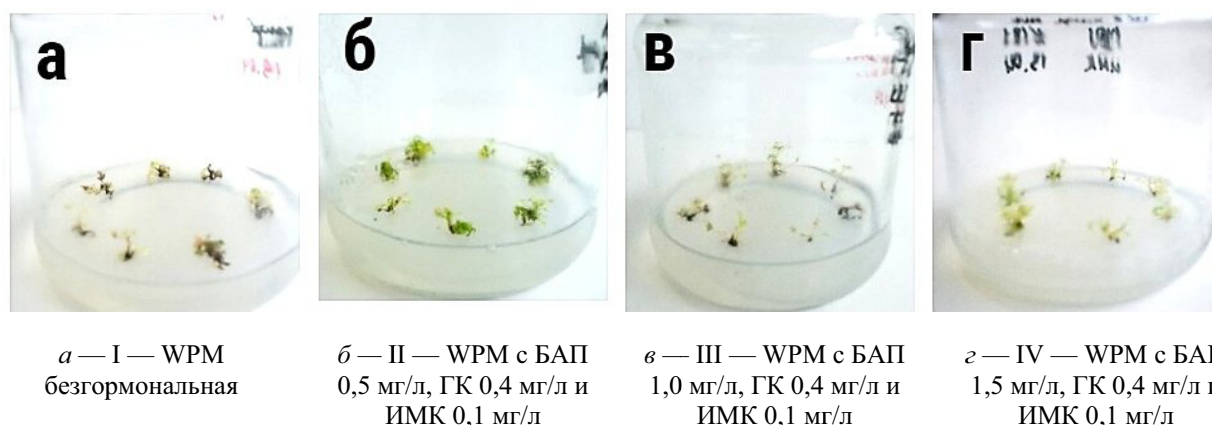


Рисунок 3. Подбор гормонов для микроклонального размножения смородины Янчевского

Таким образом, эффективной питательной средой для микроклонального размножения смородины Янчевского является WPM с добавлением БАП 0,5 мг/л, ГК 0,4 мг/л и ИМК 0,1 мг/л. На данной питательной среде через 21 день было образовано 4,83 шт новых побегов (рис. 3). В результате ис-

следования 155 побегов были микроклонально размножены. Размноженные побеги были использованы для оптимизации протокола среднесрочного хранения.

#### Среднесрочное хранение

Техника среднесрочного хранения является эффективным подходом для хранения эксплантов в культуре *in vitro* в течение многих месяцев. Этот метод позволяет контролировать рост и развитие растений и является экономически выгодным. Среднесрочное хранение применяется с учетом различных факторов: температура, условия искусственного освещения или темноты, состав среды, включая концентрации минералов или сахарозы, наличие/отсутствие регуляторов роста растений, осмотических агентов и ингибиторов роста [42]. Одним из основных условий для среднесрочного хранения является использование осмотических агентов, таких как сахароза или маннит. Например, для побегов сливы содержание сахарозы и маннита (2 %) позволило сохранить экспланты до 30 месяцев [43]. *Vitis vinifera* хранился 12 месяцев при увеличении содержания маннита до 2,5 % [44].

Условия среднесрочного хранения побегов смородины Янчевского изучены не были. Так, в нашей работе было изучено влияние сахарозы и маннита в различных концентрациях при среднесрочном хранении смородины Янчевского.

Сравнение двух осмотических агентов показало, что маннит имеет более положительный эффект на среднесрочное хранение смородины Янчевского. В результате культивирования эксплантов на питательные среды с добавлением маннита у растений отсутствовала негативная динамика роста. При увеличении концентрации осмотического вещества отметки прироста сокращались. Так, при использовании маннита в концентрации 10 гр/л прирост по высоте побегов составил 0,04 см и по количеству листьев 0,70 шт. Концентрация 20 гр/л привела к увеличению высоты побегов только на 0,04 см и по количеству листьев 0,14 шт на эксплант. При максимальной концентрации маннита (30 гр/л) прирост по высоте побегов отсутствовал, а количество листьев, в среднем, увеличилось на 0,82 шт. Однако стоит отметить, что при визуальном осмотре эксплантов наиболее оптимальным условием являлся V вариант. У листьев не было замечено хлороза, побеги сохранили зеленый насыщенный цвет. В то время как, на вариантах IV и VI была замечена изменение цвета тканей. У некоторых эксплантов начинали желтеть листья или побег. При повторном культивировании микропобеги продолжили размножаться. Была получена 100 % жизнеспособность микропобегов.

Положительный эффект маннита подтвержден и для смородины черной. Экспланты хранили в питательной среде с добавлением 2 % сахарозы и 2 % маннита в течение 18 месяцев [43]. Добавление 10 гр/л маннита позволило сохранить экспланты *Vitis heynana* в течение 12 месяцев [45].

Т а б л и ц а 4

#### Прирост микропобегов смородины Янчевского в течение 4-х месяцев

Вариант	1 день		120 дней		Прирост		Жизнеспособность, %
	Высота побегов, см	Кол-во листьев, шт.	Высота побегов, см	Кол-во листьев, шт.	Высота побегов, см	Кол-во листьев, шт.	
I — сахароза 30 гр/л	0,86±0,05	3,64±0,47	0,99±0,07	5,55±0,65	0,13	1,91	60
II — сахароза 60 гр/л	1,23±0,09	4,55±0,34	1,25±0,06	4,25±0,54	0,03	0,09	60
III — сахароза 90 гр/л	1,11±0,07	3,36±0,41	1,14±0,08	3,45±0,45	0,02	-0,3	50
IV — маннит 10 гр/л	1,13±0,07	4,86±0,46	1,17±0,09	5,00±0,53	0,04	0,70	100
V — маннит 20 гр/л	1,09±0,08	3,60±0,31	1,13±0,10	4,30±0,72	0,04	0,14	100
VI — маннит 30 гр/л	0,91±0,06	4,36±0,34	0,91±0,05	5,18±0,38	0,00	0,82	100

Примечание. Данные выражены в виде средних ± стандартной ошибки.

Использование сахарозы в качестве осмотического агента привело к относительно худшему результату. На всех эксплантах I, II и III вариантов присутствовал хлороз тканей, листья желтели. Стандартная концентрация сахарозы (30 гр/л) привела к наибольшему приросту по количеству листьев —

1,91 шт, высота побегов увеличилась на 0,13 см. Негативная динамика по количеству листьев был зафиксирован на III варианте опыта. Был отмечен отпад листьев (-0,3 шт), высота побега, в среднем, увеличилась на 0,02 см. На II варианте эксперимента прирост был незначительный: 0,03 см по высоте и 0,09 шт по количеству листьев (табл. 4, рис. 4). В целом, несмотря на отсутствие явной негативной динамики физиологического роста, у растений была получена низкая жизнеспособность после среднесрочного хранения. Максимальный процент жизнеспособности при повторном культивировании составил 60 % после среднесрочного хранения. Более того важно отметить, что у эксплантов присутствовал хлороз листьев и побегов.

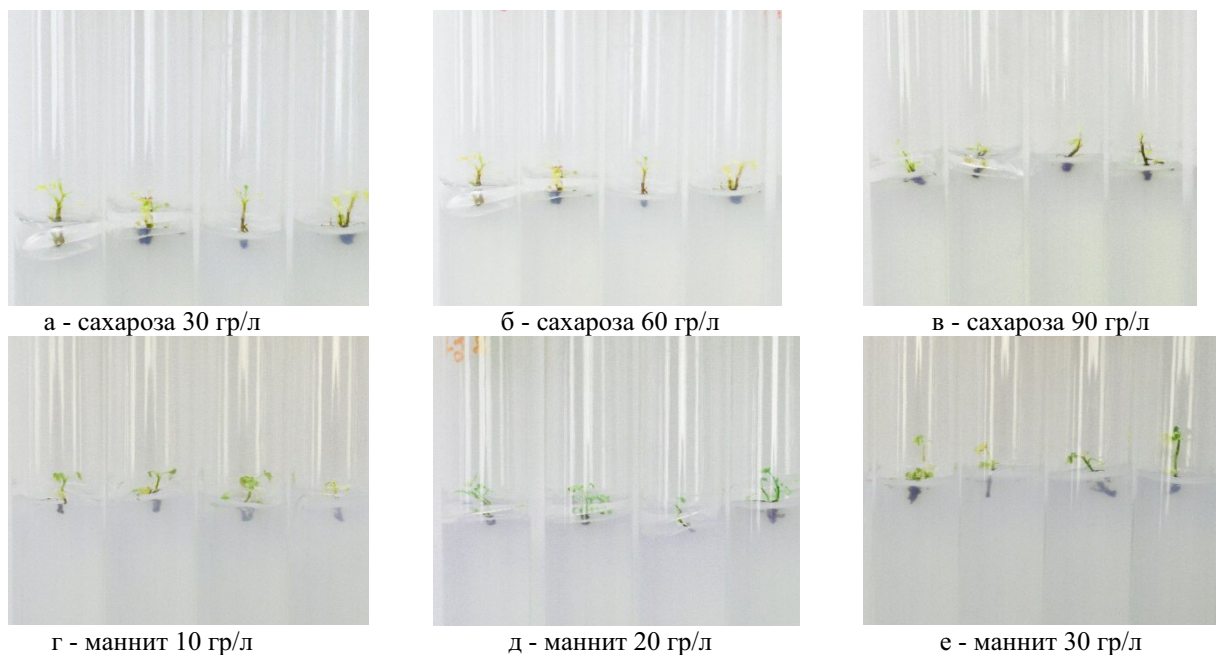


Рисунок 4. Микропобеги смородины Янчевского на среднесрочном хранении

Результаты показывают, что условия необходимо подбирать индивидуально. В нашем опыте при использовании сахарозы положительных результатов не наблюдалось. Однако для других видов растений сахароза позволяла хранить экспланты длительное время. Например, *Castanea sativa* хранились в течение 48 месяцев на среде с добавлением 30 гр/л сахарозы [46]. *Citrus jambhiri* культивировали на питательную среду WPM с 25 гр/л сахарозы, где экспланты сохраняли жизнеспособность в течение годы [47]. 60 гр/л сахарозы был эффективен для эксплантов *Prunus avium* × *P. Cerasus* в условиях темноты. Экспланты хранили 16 месяцев в таких условиях [48].

Таким образом, оптимальным условием для среднесрочного хранения микропобегов смородины Янчевского в культуре *in vitro* является питательная среда WPM с добавлением маннита 20 гр/л. Прирост по высоте побегов и количеству листьев был низким, размножение побегов не наблюдалось. Экспланты сохраняли свою жизнеспособность в течение 4-х месяцев без промежуточной пересадки растений. В результате этой работы была создана *in vitro* коллекция смородины Янчевского для сохранения вида.

#### Заключение

Исследований в мире, связанные с разработкой биотехнологии дикорастущего исчезающего вида смородины Янчевского, занесенной в Красную книгу Казахстана, не проводились. Таким образом, в результате нашей работы была разработана технология в культуре *in vitro* по сохранению и воспроизводству смородины Янчевского. Оптимизирован протокол микроклонального размножения и среднесрочного хранения побегов в культуре *in vitro*. На основе этой работы микроклонально размножены 250 побегов, из них 120 побегов культивированы на питательные среды для среднесрочного хранения. Так, была создана коллекция смородины Янчевского в культуре *in vitro*, которая позволит размножить и сохранить этот ценный вид.



Данная исследовательская работа была выполнена в рамках научного гранта AP14869409 «Разработка биотехнологии краснокнижного вида смородины Янчевского (*Ribes janczewskii*) для сохранения и воспроизводства» на 2022–2024 годы».

### Список литературы

- 1 Marchese C. Biodiversity hotspots: A shortcut for a more complicated concept / C. Marchese // *Global Ecology and Conservation*. — 2015. — Vol. 3. — P. 297-309.
- 2 Myers N. Biodiversity hotspots for conservation priorities / N. Myers, R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, G.A. Da Fonseca, J. Kent // *Nature*. — 2000. — Vol. 403. — No. 6772. — P. 853-858.
- 3 Gemedjjeva N. Representation of endemics in floristic subprovinces of Kazakhstan / N. Gemedjjeva, J.A.T. Da Silva, N. Ryabushkina // *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*. — 2010. — Vol. 4. — P. 56-63.
- 4 Ryabushkina N. Brief review of Kazakhstan flora and use of its wild species / N. Ryabushkina, N. Gemedjjeva, M. Kobaisy, C.L. Cantrell // *Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*. — 2008. — Vol. 2, No. 2. — P. 64-71.
- 5 Сайрам-Угамский государственный национальный природный парк. — [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.sugnp.kz/index.php/ru/o-parke>.
- 6 Комаров В.А. Флора СССР / В.А. Комаров. — Л.: Ботанический институт академии наук СССР, 1946. — Т. 12. — 891 с.
- 7 Постановление Правительства Республики Казахстан от 31 октября 2006 года № 1034 «Об утверждении Перечней редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений и животных». — [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://adilet.zan.kz/rus/docs/P060001034>.
- 8 Hummer K.E. Crop reports / K.E. Hummer, D.L. Barney // *Currants. Hort-Technol*. — 2002. — Vol. 12, No. 3. — P. 377-388.
- 9 Burgos-Edwards A. Qualitative and quantitative changes in polyphenol composition and bioactivity of *Ribes magellanicum* and *R. punctatum* after *in vitro* gastrointestinal digestion / A. Burgos-Edwards, F. Jimenez-Aspee, S. Thomas-Valdes, G. Schmeda-Hirschmann, C. Theoduloz // *Food Chemistry*. — 2017. — Vol. 237. — P. 1073-1082.
- 10 Қазақстанның Қызыл кітабы. 2-ші том: Өсімдіктер. 2-басылым, өңделген және толықтырылған. — Астана, «АртPrintXXI» ЖШС, 2014. — 135 б.
- 11 The International Union for Conservation of Nature's Red List of Threatened Species [Electronic resource]. Access mode: <https://www.iucnredlist.org/species/63533/12687514>.
- 12 Павлова Н.М. Черная смородина / Н.М. Павлова. — М.–Л.: Сельхозгиз, 1965. — 278 с.
- 13 Биоразнообразие флоры Казахстана. — [Электронный ресурс]. — Режим доступа: [https://kazflora.kz/catalog/?ELEMENT\\_ID=203047](https://kazflora.kz/catalog/?ELEMENT_ID=203047).
- 14 Siksnianas T. Resistance to fungal diseases of interspecific currant hybrids of *Eucoresma* section / T. Siksnianas, V. Stanys, G. Stanieny, C. Bobinas, A. Sasnauskas, R. Rugienius // *Agronomy Research*. — 2006. — Vol. 4. — No. 367. — P. 70.
- 15 Brennan R. The development of a genetic linkage map of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and the identification of regions associated with key fruit quality and agronomic traits / R. Brennan, L. Jorgensen, C. Hackett, M. Woodhead, S. Gordon, J. Russell // *Euphytica*. — 2008a. — Vol. 161, No. 1. — P. 19-34.
- 16 Brennan R.M. Currants and gooseberries / R.M. Brennan // *Temperate fruit crop breeding: Germplasm to genomics*. — Springer, Dordrecht, 2008b. — P. 177-196.
- 17 Siksnianas T. American black currant as donor of leaf disease resistance in black currant breeding / T. Siksnianas, V. Stanys, G. Staniene, A. Sasnauskas, R. Rugienius // *Biologija*. — 2005. — Vol. 51. — No. 3.
- 18 Reed B.M. Evaluation of critical points in technology transfer of cryopreservation protocols to international plant conservation laboratories / B.M. Reed, I. Kovalchuk, S. Kushnarenko, A. Meier-Dinkel, K. Schoenweiss, S. Pluta, K. Straczynska, E.E. Benson // *CryoLetters*. — 2004. — Vol. 25, No 5. — P. 341-352.
- 19 Bonga J.M. *In vitro* culture of trees / J.M. Bonga, P. Aderkas, P. Von Aderkas. — Springer Science & Business Media, 1992. — Vol. 38.
- 20 Bhojwani S.S. Plant tissue culture: an introductory text / S.S. Bhojwani, P.K. Dantu. — India: Springer, 2013. — No. 574. — 0724/B575.
- 21 Engelmann F. Management of field and *in vitro* germplasm collections. Proceedings of a consultation meeting / F. Engelmann. — 15–20 January 1996, CIAT Cali, Colombia. — 1999.
- 22 Chauhan R. *In vitro* conservation through slow-growth storage / R. Chauhan, V. Singh, A. Quraishi // *Synthetic seeds: Germplasm Regeneration, Preservation and Prospects*. — Springer, Cham, 2019. — P. 397-416.
- 23 Ruta C. Biobanking of vegetable genetic resources by *in vitro* conservation and cryopreservation / C. Ruta, M. Lambardi, E.A. Ozudogru // *Biodiversity and Conservation*. — 2020. — Vol. 29. — P. 3495-3532.
- 24 Pence V.C. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants / V.C. Pence // *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. — 2011. — Vol. 47, No 1. — P. 176-187.

- 25 Dzedzic E. Micropropagation of *Rubus* and *Ribes spp* / E. Dzedzic, J. Jagła // Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. — Humana Press, Totowa, NJ, 2012. — P. 149-160.
- 26 Vujovic T. Improvement of *in vitro* micropropagation of black currant Сасанска Срна / Т. Vujović, D. Ružić, R. Cerović // X International Rubus and Ribes Symposium 946. — 2011. — P. 123-128.
- 27 Калинин В.И. Научные основы российского плодородства / В.И. Калинин // Вестник с.-х. науки. — 2002. — №2. — С. 10–14.
- 28 Кашин В.И. Научные основы российского питомниководства / В.И. Кашин // Вестн. РАН. — 2002. — № 6. — С. 10–15.
- 29 Meghwal P.R. Effect of surface sterilizing agents on *in vitro* culture establishment of guava (*Psidium guajava* L.) / P.R. Meghwal, H.C. Sharma, S.K. Singh // Journal of Applied Horticulture. — 2000. — Vol. 2, No. 2. — С. 94-95.
- 30 Barampuram S. Effect of various sterilization procedures on the *in vitro* germination of cotton seeds / S. Barampuram, G. Allen, S. Krasnyanski // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). — 2014. — Vol. 118, Issue 1. — P. 179-185.
- 31 Nurtaza A. Micropropagation of the endangered species *Malus niedzwetzkyana* for conservation biodiversity in Kazakhstan / A. Nurtaza, G. Magzumova, A. Yessimseitova, V. Karimova, A. Shevtsov, D. Silayev, ... A. Kakimzhanova // In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. — 2021. — P. 1–12.
- 32 Kakimzhanova A. An Efficient Micropropagation System for the Vulnerable Wild Apple Species, *Malus Sieversii*, and Confirmation of Its Genetic Homogeneity / A. Kakimzhanova, D. Dyussebekova, A. Nurtaza, A. Yessimseitova, A. Shevtsov, V. Lutsay, S. Kabieva // Erwerbs-Obstbau. — 2022. — P. 1–12.
- 33 Ишмуратова М.М. Размножение сортов смородины черной (*Ribesnigrum* L.) башкирской селекции в культуре *in vitro* / М.М. Ишмуратова, Л.А. Головина // Вестн. Удмурт. ун-та. Сер. Биология. Науки о Земле. — 2017. — Т. 27, №. 4. — С. 455–461.
- 34 Debnath S.C. Germplasm characterization, propagation and maintenance of health-promoting wild berries and medicinal plant roseroot (*Rhodiola Rosea* L.) / S.C. Debnath // International Symposium on Medicinal Plants and Natural Products 1098. — 2013. — P. 61-69.
- 35 Ahmed T. Reproduction of *Polygala myrtifolia* L. / T. Ahmed // Plants by tissue culture technique. — Cairo University, 2011.
- 36 Erst A.A. Propagation of *Rubus aureum* (Family of Grossulariaceae) in *in vitro* Culture / A.A. Erst, N.A. Vechemina // Biotechnology in Russia. — 2010. — №. 5. — P. 1-10.
- 37 Ruzic D. Micropropagation as means of rapid multiplication of newly developed blackberry and black currant cultivars / D. Ruzic, T. Lazic // Agriculturae Conspectus Scientificus. — 2006. — Vol. 71, No. 4. — P. 149-153.
- 38 Arena M.E. *In vitro* propagation of *Ribes magellanicum* Poirlet / M.E. Arena, G.J.M. Pastur // Scientia horticulturae. — 1995. — Vol. 62, No 1-2. — P. 139-144.
- 39 Debnath S.C. Micropropagation of small fruits / S.C. Debnath // Micropropagation of woody trees and fruits. — 2003. — P. 465-506.
- 40 Naghmouchi S. Effect of growth regulators and explant origin on *in vitro* propagation of *Ceratonia siliqua* L. via cuttings / S. Naghmouchi, M.L. Khouja, M.N. Rejeb, M. Boussaid // BASE. — 2008. — Vol. 12, No 3. — P. 251-258.
- 41 Manole C.G. The influence of growth regulators concentrations on *in vitro* micropropagation of *Ribes rubrum* Species / C.G. Manole, V. Balan, I C. Mencinicopschi, D. Golea, S. Rodino, A. Butu // Scientific Bulletin, Series F, Biotechnologies. — 2012. — Vol. 16. — P. 26-29.
- 42 Benelli C. *In Vitro* Conservation through Slow Growth Storage Technique of Fruit Species: An Overview of the Last 10 Years / C. Benelli, W. Tarraf, T. Izgu, A. De Carlo // Plants. — 2022. — Vol. 11, No 23. — P. 3188.
- 43 Turdiyev T.T. *In vitro* germplasm cold storage of fruit and berry plants of Kazakhstan / T.T. Turdiyev, I.Y. Kovalchuk, B.Z. Kabyzbekova, N.I. Chukanova, S.N. Frolov // Eurasian Journal of Biosciences. — 2020. — Vol. 14, No 1. — P. 1213-1219.
- 44 Benelli C. *In Vitro* Conservation through Slow Growth Storage Technique of Fruit Species: An Overview of the Last 10 Years / C. Benelli, W. Tarraf, T. Izgu, A. De Carlo // Plants. — 2022. — Vol. 11, No 23. — P. 60-66.
- 45 Pan X.J. *In vitro* conservation of native Chinese wild grape (*Vitis heyneana* Roem. & Schult) by slow growth culture / X.J. Pan, W.E. Zhang, X. Li // Vitis. — 2014. — Vol. 53, No 4. — P. 207-214.
- 46 Capuana M. *In vitro* conservation of chestnut (*Castanea sativa*) by slow growth / M. Capuana, S. Di Lonardo // In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. — 2013. — Vol. 49. — P. 605-610.
- 47 Da Silva de Carvalho M.J. *In vitro* conservation of Florida Rough'lemon plants / M.J. Da Silva de Carvalho, A. da Silva Souza, E. Barbosa Santos, W. dos Santos Soares Filho, C.A. da Silva Ledo, E.M. Rodrigues Costa, F.V. Duarte Souza // Ciência Rural. — 2022. — Vol. 52, No 12. — P. 1-9.
- 48 Ozudogru E.A. Effect of culture container and carbohydrate content on *in vitro* slow growth storage of the cherry rootstock 'Gisela 5' / E.A. Ozudogru, C. Benelli, G. Dradi, M. Lambardi // Acta Physiologiae Plantarum. — 2017. — Vol. 39, No 4. — P. 2-9.

А.С. Нұртаза, Д.А. Дюсембекова, С.С. Исламова, И.Н. Саматова,  
А.Т. Умирзакова, А.А. Какимжанова

## Сирек кездесетін Янчевский қарақат түрін сақтау үшін микроклоналды көбейту және орта мерзімді *in vitro* сақтау жағдайларын оңтайландыру

Мақалада Янчевский қарақат өсімдігінің (*Ribes janczewskii*) сирек кездесетін түрін *in vitro* жағдайында сақтау бойынша зерттеулердің нәтижелері көрсетілген. Қарақаттың бұл түрі ауруларға, зиянкестерге және төмен температураға төзімді, сонымен қатар басқа түрлерге қарағанда аскорбин қышқылы, полифенолдар және антоцианиндер сияқты пайдалы заттардың көп мөлшерін қамтиды. Осыған дейін бұл жойылып кету қаупі төнген түрді сақтау үшін биотехнологияны дамыту бойынша ешқандай зерттеулер жүргізілген жоқ. Жұмыста тиімді зарарсыздандыру және Янчевский қарақатының экспланттарын *in vitro* өсіндісіне енгізу таңдалды, стерилизациялау режимі 5 минут болатын стерильдеу агенті ретінде 12% сутегі асқын тотығы ерітіндісі таңдалды, осы жағдайда экспланттың өміршеңдігі 73,3% дейін жетті. Сондай-ақ, көбейту үшін WPM қоректік ортасының құрамы БАП 0,5 мг/л, ГК 0,4 мг/л және ИМК 0,1 мг/л қосу арқылы оңтайландырылды, бұл бір эксплантка 4,83 жаңа өркен алуға мүмкіндік берді. Янчевский қарақатының микроөркендерін орта мерзімді сақтау үшін ең оңтайлы жағдай ретінде 20 г/л концентрациядағы маннит қосылған WPM қоректік ортасы таңдалды, нәтижесінде өркеннің биіктігі мен жапырақ санының жоғарлау параметрлері төмен болды, өркеннің көбеюі байқалмады. Осы бағалы түрді көбейтуге және сақтауға мүмкіндік беретін Янчевский қарақатының *in vitro* коллекциясы жасалды. Қазіргі уақытта 250 өркен микрокөбейтілді, оның 120 өркені орта мерзімді сақтау үшін қоректік орталарда өсірілді.

*Кілт сөздер:* *in vitro* өскіні, *Ribes janczewskii*, WPM қоректік ортасы, орта мерзімді сақтау, маннитол, зарарсыздандырғыштар, микрокөбейту, микроөсімдіктер.

A.S. Nurtaza, D.A. Dyusembekova, S.S. Islamova, I.N. Samatova, A.T. Umirzakova,  
A.A. Kakimzhanova

## Optimization of conditions for micropropagation and medium-term storage *in vitro* of a rare *Ribes janczewskii* for conservation

This article presents the results of studies on the *in vitro* conservation of a rare species of the Yanchevsky currant plant (*Ribes janczewskii*). This type of currant is more resistant to diseases, pests and low temperatures, and also contains a large amount of useful substances, such as ascorbic acid, polyphenols and anthocyanins compared to other types. Previously, no research has been done to develop biotechnology to conserve this endangered species. In this work, effective sterilization and the introduction of Yanchevsky currant explants into *in vitro* culture were selected, a 12% hydrogen peroxide solution was chosen as a sterilizing agent with a sterilization mode of 5 minutes, where the explant viability reached up to 73.3%. Also, for multiplication, the composition of the WPM nutrient medium was optimized with the addition of BAP 0.5 mg/l, GA 0.4 mg/l and IMC 0.1 mg/l, which made it possible to obtain 4.83 new shoots per explant. For the medium-term storage of Yanchevsky currant microshoots, the WPM nutrient medium with the addition of mannitol at a concentration of 20 g/l was chosen as the most optimal condition, as a result of which the increase in shoot height and number of leaves was low, shoot propagation was not observed. A collection of currant Yanchevsky in *in vitro* culture was created, which allows propagating and preserving this valuable species, and 250 shoots were successfully micropropagated, of which 120 shoots were cultivated on nutrient media for medium-term storage.

*Keywords:* *in vitro* culture, *Ribes janczewskii*, WPM nutrient medium, medium-term storage, mannitol, sterilizing agents, micropropagation, microshoots.

### References

- 1 Marchese, C. (2015). Biodiversity hotspots: A shortcut for a more complicated concept. *Global Ecology and Conservation*, 3, 297-309.
- 2 Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, Vol. 403, 6772, 853-858.
- 3 Gemedjieva, N., da Silva, J.A.T., & Ryabushkina, N. (2010). Representation of endemics in floristic subprovinces of Kazakhstan. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, Vol. 4, 56-63.
- 4 Ryabushkina, N., Gemedjieva, N., Kobaisiy, M., & Cantrell, C.L. (2008). Brief review of Kazakhstan flora and use of its wild species. *Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2(2), 64-71.

- 5 Sairam-Ugamskii gosudarstvennyi natsionalnyi prirodnyi park [Sairam-Ugam State National Nature Park]. Retrieved from: <http://www.sugnpp.kz/index.php/ru/o-parke> [in Russian].
- 6 Komarov, V.A. (1946). *Flora SSSR [Flora of the USSR]* (Vol. 12). Leningrad. Botanicheskii institut Akademii nauk SSSR [in Russian].
- 7 Postanovlenie Pravitelstva Respubliki Kazakhstan ot 31 oktiabria 2006 goda No 1034 «Ob utverzhdenii Perechnei redkikh i nakhodiashchihsia pod ugrozoi ischeznoventiia vidov rastenii i zhivotnykh» [Decree of the Government of the Republic of Kazakhstan dated October 31, 2006 No. 1034 “On approval of the Lists of rare and endangered species of plants and animals”]. Retrieved from: <https://adilet.zan.kz/rus/docs/P060001034> [in Russian].
- 8 Hummer, K E., & Barney, D.L. (2002). Crop reports. *Currants. Hort-Technol*, Vol. 12(3), 377-388.
- 9 Burgos-Edwards, A., Jiménez-Aspee, F., Thomas-Valdés, S., Schmeda-Hirschmann, G., & Theoduloz, C. (2017). Qualitative and quantitative changes in polyphenol composition and bioactivity of *Ribes magellanicum* and *R. punctatum* after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 237, 1073-1082.
- 10 (2014). Krasnaia kniga Kazakhstana [The Red Book of Kazakhstan]. Tom 2: Rasteniia. 2-e izdanie, perabotannoe i dopolnennoe [Volume 2: Plants. 2nd edition, edited and supplemented]. Astana: TOO «ArtPrintXXI» [in Russian].
- 11 The International Union for Conservation of Nature’s Red List of Threatened Species. Retrieved from <https://www.iucnredlist.org/species/63533/12687514>.
- 12 Pavlova, N.M. (1965). *Chernaia smorodina [Black currant]*. Moscow–Leningrad: Selkhozgiz [in Russian].
- 13 Bioraznoobrazie flory Kazakhstana [Biodiversity of the flora of Kazakhstan]. Retrieved from: [https://kazflora.kz/catalog/?ELEMENT\\_ID=203047](https://kazflora.kz/catalog/?ELEMENT_ID=203047) [in Russian].
- 14 Siksnianas, T., Stanys, V., Staniënė, G., Bobinas, C., Sasnauskas, A., & Rugienius, R. (2006). Resistance to fungal diseases of interspecific currant hybrids of *Eucoresma* section. *Agronomy Research*, Vol. 4(367), 70.
- 15 Brennan, R., Jorgensen, L., Hackett, C., Woodhead, M., Gordon, S., & Russell, J. (2008a). The development of a genetic linkage map of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and the identification of regions associated with key fruit quality and agronomic traits. *Euphytica*, 161, 19-34.
- 16 Brennan, R.M. (2008b). Currants and gooseberries. *Temperate fruit crop breeding: Germplasm to genomics*, 177-196.
- 17 Siksnianas, T., Stanys, V., Staniënė, G., Sasnauskas, A., & Rugienius, R. (2005). American black currant as donor of leaf disease resistance in black currant breeding. *Biologija*, 51(3).
- 18 Reed, B.M., Kovalchuk, I., Kushnarenko, S., Meier-Dinkel, A., Schoenweiss, K., Pluta, S., K. Straczynska, & Benson, E.E. (2004). Evaluation of critical points in technology transfer of cryopreservation protocols to international plant conservation laboratories. *CryoLetters*, 25(5), 341-352.
- 19 Bonga, J.M., Aderkas, P., & von Aderkas, P. (1992). *In vitro culture of trees* (Vol. 38). Springer Science & Business Media.
- 20 Bhojwani, S.S., & Dantu, P.K. (2013). *Plant tissue culture: an introductory text* (Vol. 318). India: Springer.
- 21 Engelmann, F. (1999). *Management of field and in vitro germplasm collections. Proceedings of a consultation meeting, 15-20 January 1996, CIAT Cali, Colombia*.
- 22 Chauhan, R., Singh, V., & Quraishi, A. (2019). In vitro conservation through slow-growth storage. *Synthetic Seeds: Germplasm Regeneration, Preservation and Prospects*, 397-416.
- 23 Ruta, C., Lambardi, M., & Ozudogru, E.A. (2020). Biobanking of vegetable genetic resources by *in vitro* conservation and cryopreservation. *Biodiversity and Conservation*, 29, 3495-3532.
- 24 Pence, V.C. (2011). Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(1), 176-187.
- 25 Dziedzic, E., & Jagła, J. (2012). Micropropagation of *Rubus* and *Ribes* spp. *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants*, 149-160. Humana Press, Totowa, NJ.
- 26 Vujovic, T., Ruzic, D., & Cerovic, R. (2011). Improvement of *in vitro* micropropagation of black currant Cacanska Crna. In *X International Rubus and Ribes Symposium 946*, 123-128.
- 27 Kalinin, V.I. (2002). Nauchnye osnovy rossiiskogo plodovodstva [Scientific foundations of Russian fruit growing]. *Vestnik selskokhoziaistvennoi nauki — Bulletin of Agricultural Science*, 2, 10–14 [in Russian].
- 28 Kashin, V.I. (2002). Nauchnye osnovy rossiiskogo plodovogo pitomnikovodstva [Scientific foundations of Russian nursery breeding]. *Vestnik Rossiiskoi akademii nauk — Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, (6), 10–15 [in Russian].
- 29 Meghwal, P.R., Sharma, H.C., & Singh, S.K. (2000). Effect of surface sterilizing agents on *in vitro* culture establishment of guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of Applied Horticulture*, 2(2), 94-95.
- 30 Barampuram, S., Allen, G., & Krasnyanski, S. (2014). Effect of various sterilization procedures on the *in vitro* germination of cotton seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(1), 179-185.
- 31 Nurtaza, A., Magzumova, G., Yessimseitova, A., Karimova, V., Shevtsov, A., Silayev, D., ... & Kakimzhanova, A. (2021). Micropropagation of the endangered species *Malus niedzwetzkyana* for conservation biodiversity in Kazakhstan. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1-12.
- 32 Kakimzhanova, A., Dyussembekova, D., Nurtaza, A., Yessimseitova, A., Shevtsov, A., Lutsay, V., ... & Kabieva, S. (2022). An Efficient Micropropagation System for the Vulnerable Wild Apple Species, *Malus Sieversii*, and Confirmation of Its Genetic Homogeneity. *Erwerbs-Obstbau*, 1-12.

- 33 Ishmuratova, M.M., & Golovina, L.A. (2017). Razmnozhenie sortov smorodiny chernoi (*Ribes nigrum* L.) bashkirskoi seleksii v kulture *in vitro* [Reproduction of varieties of black currant (*Ribes nigrum* L.) of Bashkir breeding in culture in vitro]. *Vestnik Udmurtskogo universiteta. Seriya Biologiya. Nauki o Zemle — Bulletin of the Udmurt University. The series "Biology. Earth Sciences"*, 27(4), 455–461 [in Russian].
- 34 Debnath, S.C. (2013). Germplasm characterization, propagation and maintenance of health-promoting wild berries and medicinal plant roseroot (*Rhodiola Rosea* L.). In *International Symposium on Medicinal Plants and Natural Products 1098* (pp. 61-69).
- 35 Ahmed, T.M.N.E. (2011). Reproduction of *Polygala myrtifolia* L. *Plants by tissue culture technique. Doctor's thesis*. Cairo University.
- 36 Erst, A.A., & Vechernina, N. (2010). Propagation of *Rubus aureum* (Family of Grossulariaceae) in *in vitro* Culture. *Biotechnology in Russia*, (5), 1-10.
- 37 Ruzic, D., & Ladic, T. (2006). Micropropagation as means of rapid multiplication of newly developed blackberry and black currant cultivars. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 71(4), 149-153.
- 38 Arena, M.E., & Pastur, G.J.M. (1995). *In vitro* propagation of *Ribes magellanicum* Poir. *Scientia horticultrae*, 62(1-2), 139-144.
- 39 Debnath, S.C. (2003). Micropropagation of small fruits. *Micropropagation of woody trees and fruits*, 465-506.
- 40 Naghmouchi, S., Khouja, M.L., Rejeb, M.N., & Boussaid, M. (2008). Effect of growth regulators and explant origin on *in vitro* propagation of *Ceratonia siliqua* L. via cuttings. *BASE*, 12(3), 251-258.
- 41 Manole, C.G., Balan, V., Mencinicopschi, I.C., Golea, D., Rodino, S., & Butu, A. (2012). The influence of growth regulators concentrations on *in vitro* micropropagation of *Ribes rubrum* Species. *Scientific Bulletin, Series F, Biotechnologies*, 16, 26-29.
- 42 Benelli, C., Tarraf, W., Izgu, T., & De Carlo, A. (2022). *In Vitro* Conservation through Slow Growth Storage Technique of Fruit Species: An Overview of the Last 10 Years. *Plants*, 11(23), 3188.
- 43 Turdiyev T.T., Kovalchuk, I.Y., Kabyzbekova, B.Z., Chukanova, N.I., & Frolov, S.N. (2020). *In vitro* germplasm cold storage of fruit and berry plants of Kazakhstan. *Eurasian Journal of Biosciences*, 14(1), 1213-1219.
- 44 Benelli, C., Tarraf, W., Izgu, T., & De Carlo, A. (2022). *In Vitro* Conservation through Slow Growth Storage Technique of Fruit Species: An Overview of the Last 10 Years. *Plants*, 11(23), 60-66.
- 45 Pan, X., Zhang, W.E., & Li, X. (2014). *In vitro* conservation of native Chinese wild grape (*Vitis heyneana* Roem. & Schult) by slow growth culture. *Vitis*, 53(4), 207-214.
- 46 Capuana, M., & Di Lonardo, S. (2013). *In vitro* conservation of chestnut (*Castanea sativa*) by slow growth. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49, 605-610.
- 47 Da Silva de Carvalho, M.D.J., da Silva Souza, A., Barbosa Santos, E., dos Santos Soares Filho, W., da Silva Ledo, C.A., Rodrigues Costa, E.M., & Duarte Souza, F.V. (2022). *In vitro* conservation of 'Florida Rough' lemon plants. *Ciência Rural*, 52(12), 1-9.
- 48 Ozudogru, E.A., Benelli, C., Dradi, G., & Lambardi, M. (2017). Effect of culture container and carbohydrate content on *in vitro* slow growth storage of the cherry rootstock 'Gisela 5'. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(4), 2-9.