

А.С. Земцова^{1*}, С.В. Кушнарченко², Н.В. Ромаданова^{1,2}

¹Казахский Национальный Университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

²РГП «Институт биологии и биотехнологии растений, Казахстан, г. Алматы

*e-mail: zemtsovaalina@gmail.com

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ *IN VITRO* И КРИОГЕННОГО БАНКА СЕМЯН *BERBERIS HETEROPODA*

Изучено влияние жидкого азота (ЖА) и стратификации на прорастание семян 8 форм *Berberis heteropoda* Schrenk. Лабораторная всхожесть (ЛВ) свежесобранных семян без использования дополнительных обработок данного вида не превышала 5%. Для стимуляции прорастания семян использовали следующие виды обработки: воздействие жидкого ЖА при -196 °С в течение 20 ч; стратификация во влажном перлите в течение 8 недель при температуре 4 °С; а также стратификация с предварительным погружением в ЖА на 20 ч. После обработки ЖА ЛВ в среднем увеличилась в 2,8 раза. Не было отмечено всхожести у образцов 1-5 и 8 ни до воздействия ЖА, ни после, предположительно это связано с большим содержанием воды в более крупных семенах этих форм. Следует отметить, что стратификация ускорила энергию прорастания семян, кроме того, ЛВ после стратификации в среднем составила 21,6%, что в 5 раз превышало ЛВ семян без дополнительных обработок.

Полученные побеги были введены в культуру *in vitro* на среду Мурасиге и Скуга с 30 г/л сахарозы, 0,8 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,02 мг/л индолилмасляной кислоты, 0,1 мг/л гибберелловой кислоты, 1 мг/л аскорбиновой кислоты, 1 мг/л пантотената кальция, 4 г/л агара, 1,75 г/л джелрайта, рН 5,7. Жизнеспособность побегов после проверки на специализированной среде 523 составила 46,4%. Семена 8 образцов *B. heteropoda* были заложены в криогенный банк при температуре -196 °С, 3 образца были помещены на долгосрочное хранение при температуре -20 °С.

Ключевые слова: *Berberis heteropoda*, семена, жидкий азот, стратификация, лабораторная всхожесть, культура *in vitro*, криогенный банк.

A.S. Zemtsova^{1*}, S.V. Kushnarenko², V. Romadanova^{1,2}

¹Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

²Institute of Plant Biology and Biotechnology, Kazakhstan, Almaty

*e-mail: zemtsovaalina@gmail.com

Creation of *in vitro* collection and seeds cryogenic bank of *Berberis Heteropoda*

The effect of liquid nitrogen (LN) and stratification on seed germination of 8 forms of *Berberis heteropoda* Schrenk was studied. Laboratory germination (LG) of freshly harvested seeds without the use of additional treatments of this species did not exceed 5%. To stimulate seed germination, the following types of treatment were used – exposure to liquid nitrogen (LN) at -196 °C for 20 h, stratification in wet perlite for 2 months at 4 °C and stratification with preliminary immersion in LN for 20 h. After LN treatment LG increased by an average of 2.8 times. No germination was observed in samples 1-5 and 8 either before or after exposure to LN, presumably due to the high-water content in larger seeds of these forms. It should be noted that stratification accelerates the energy of seed germination, in addition, the LG after stratification averaged 21.6%, which is 5 times higher than the LG of seeds without additional treatments.

The obtained shoots were introduced into *in vitro* culture on Murashige and Skoog medium with 30 g/l sucrose, 0.8 mg/l 6-benzylaminopurine, 0.02 mg/l indolylbutyric acid, 0.1 mg/l gibberellic acid, 1 mg/l ascorbic acid, 1 mg/l calcium pantothenate, 4 g/l agar, 1.75 g/l Gelrite, pH 5.7. The viability of shoots after testing on specialized medium 523 was 46.4%. Seeds of eight accessions of *B. heteropoda* were placed in a cryogenic bank at -196 °C, 3 accessions were placed for long-term storage at -20 °C.

Key words: *Berberis heteropoda*; seeds; liquid nitrogen; stratification; laboratory germination; *in vitro* culture; cryogenic bank.

А.С. Земцова^{1*}, С.В. Кушнарченко², Н.В. Ромаданова^{1,2}

¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

²Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: zemtsovaalina@gmail.com

***Berberis Heteropoda* тұқымдарының *in vitro* коллекциясын және криогенді банкін құру**

Berberis Heteropoda Schrenk тұқымының 8 формасының тұқым өнуіне сұйық азот (СА) және стратификацияның әсері зерттелді. Бұл түрдің қосымша өңдеуін қолданбай жаңадан жиналған тұқымның зертханалық өнгіштігі (ЗӨ) 5%-дан аспады. Тұқымның өнуін ынталандыру үшін келесі өңдеу түрлері қолданылды: -196°C температурада 20 сағат бойы сұйық азоттың (СА) әсер етуі; 4°C температурада 8 апта бойы ылғалды перлитте стратификация; сонымен қатар 20 сағат бойы СА-та алдын ала батыру стратификациясы. СА-пен өңдегеннен кейін ЗӨ орта есеппен 2,8 есе өсті. 1-5 және 8 үлгілерде СА әсерінен бұрын да, одан кейін де өну байқалмады, бұл үлкен тұқымдардағы судың жоғары болуына байланысты. Айта кету керек, стратификация тұқымның өну энергиясын жылдамдатты, сонымен қатар стратификациядан кейінгі ЗӨ – орташа есеппен 21,6%, бұл – қосымша өңдеусіз тұқымдардың ЗӨ-ден 5 есе жоғары.

Алынған өркендер 30 г/л сахароза, 0,8 мг/л 6-бензиламинопурин, 0,02 мг/л индолил май қышқылы, 0,1 мг/л гибберелл қышқылы, 1 мг/л аскорбин қышқылы, 1 мг/л кальций пантотенаты, 4 г/л агар, 1,75 г/л джелрайт, рН 5,7 бар Мурасиге және Скуга қоректік ортаға *in vitro* культурасына енгізілді. Арнайы 523 қоректік ортада тексеруден кейінгі өркендердің өміршеңдігі 46,4%. *B. heteropoda* 8 үлгідегі тұқымдары -196°C температурада криогенді банкке, 3 үлгі -20°C температурада ұзақ сақтауға қойылды.

Түйін сөздер: *Berberis heteropoda*, тұқым, сұйық азот, стратификация, зертханалық өнгіштігі, *in vitro* культурасы, криогенді банк.

Введение

Барбарис – важное лекарственное, витаминное растение, веками используемое человеком в лечебных и пищевых целях. В фармацевтической промышленности барбарис чаще всего используется как антибактериальное средство, из-за множества ценных лекарственных свойств исследуются возможности его применения для лечения и предупреждения различных заболеваний в том числе рака, сахарного диабета и сердечно-сосудистых заболеваний [1-3]. В литературе имеются данные об исследовании компонентного состава многих зарубежных и казахстанских видов барбариса, выявлена антиоксидантная, антибактериальная, цитотоксическая и другие активности, а также его противовоспалительные и иммуномодулирующие эффекты [4-7].

В Казахстане произрастает 8 видов барбариса, в том числе изучаемый *B. разнокожковый* (*Berberis heteropoda* Schrenk или *Berberis sphaerocarpa* Kar. & Kir.), который встречается в Зайсане, Алтае и Тарбагатае, Джунгарском, Заилийском и Кунгей Алатау, Чу-Илийских горах [8-9]. Помимо этого, ареал распространения данного вида охватывает Монголию и западные районы Китая [9]. На сегодняшний момент уже 2 казахстанских вида барбариса, а именно *B.*

илийский и *B. каркаралинский* занесены в Красную книгу, наблюдается тенденция сокращения ареалов и других ценных видов, поэтому столь важно изучить и сохранить все уникальные казахстанские виды [10-11].

Целью данной работы послужило сохранение семян *Berberis heteropoda* при различных температурных режимах, в том числе и при температуре жидкого азота (-196°C), а также создание коллекции *in vitro*. В качестве объекта исследования этот вид барбариса был выбран ввиду того, что ранее в лаборатории криосохранения гермоплазмы РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК (ИББР) был создан криогенный банк барбариса в том числе и *Berberis heteropoda*, однако, лабораторная всхожесть (ЛВ) семян этого вида не превышала 10% [12]. Для увеличения процента ЛВ семян многие исследователи используют дополнительные обработки, например, стратификацию, скарификацию, погружение в жидкий азот на непродолжительное время и другие [13-18]. В данной работе нами также были использованы дополнительные обработки семян для увеличения процента их ЛВ, это позволит сохранить этот вид на длительный период в виде коллекции растений *in vitro* и криоколлекции семян в криогенном банке.

Материалы и методы

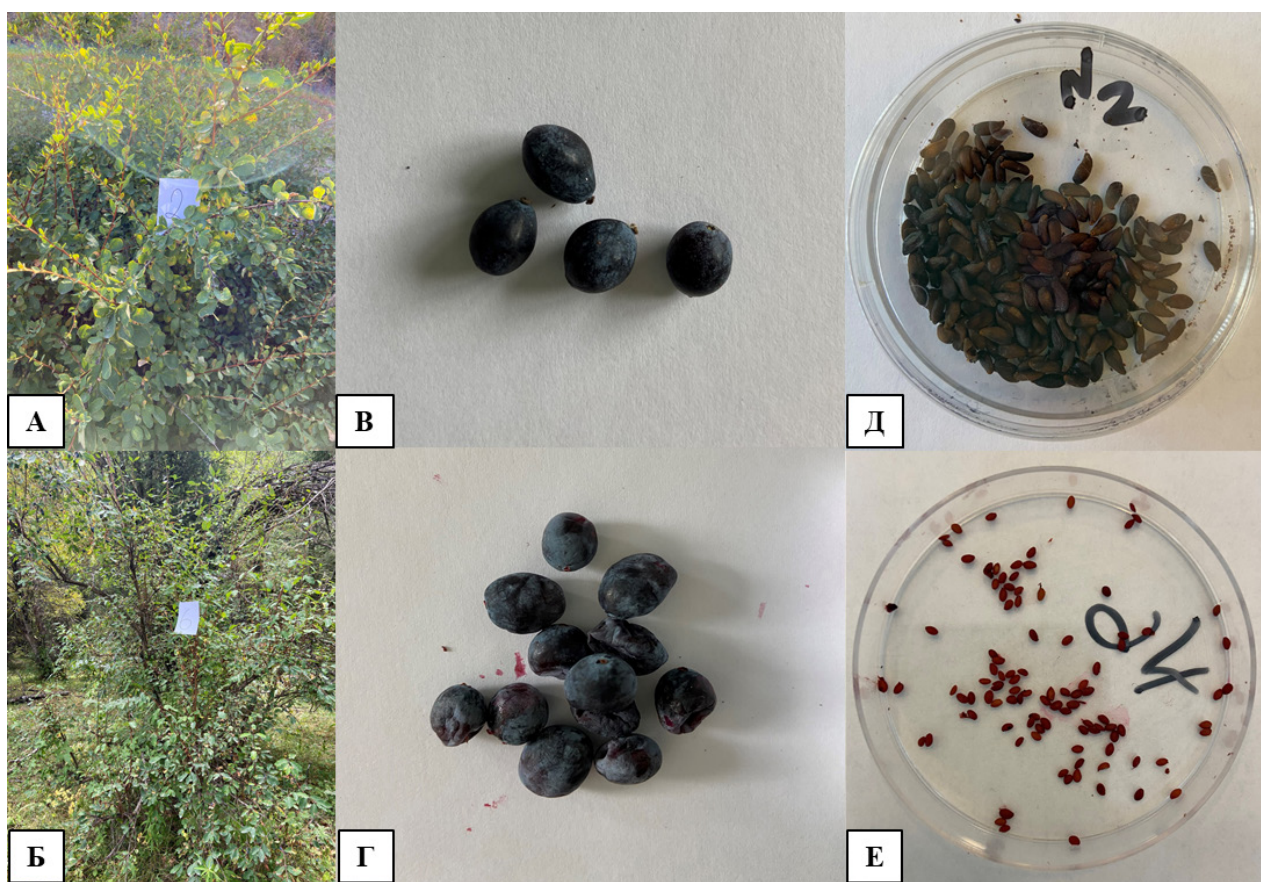
Объекты исследования

Объектами исследования служили семена 8 образцов *B. разноножкового*, собранного в Залийском Алатау в ущелье Иссык (рисунок 1). Высота произрастания кустарников над уровнем моря варьировала от 1623 до 1751 м.

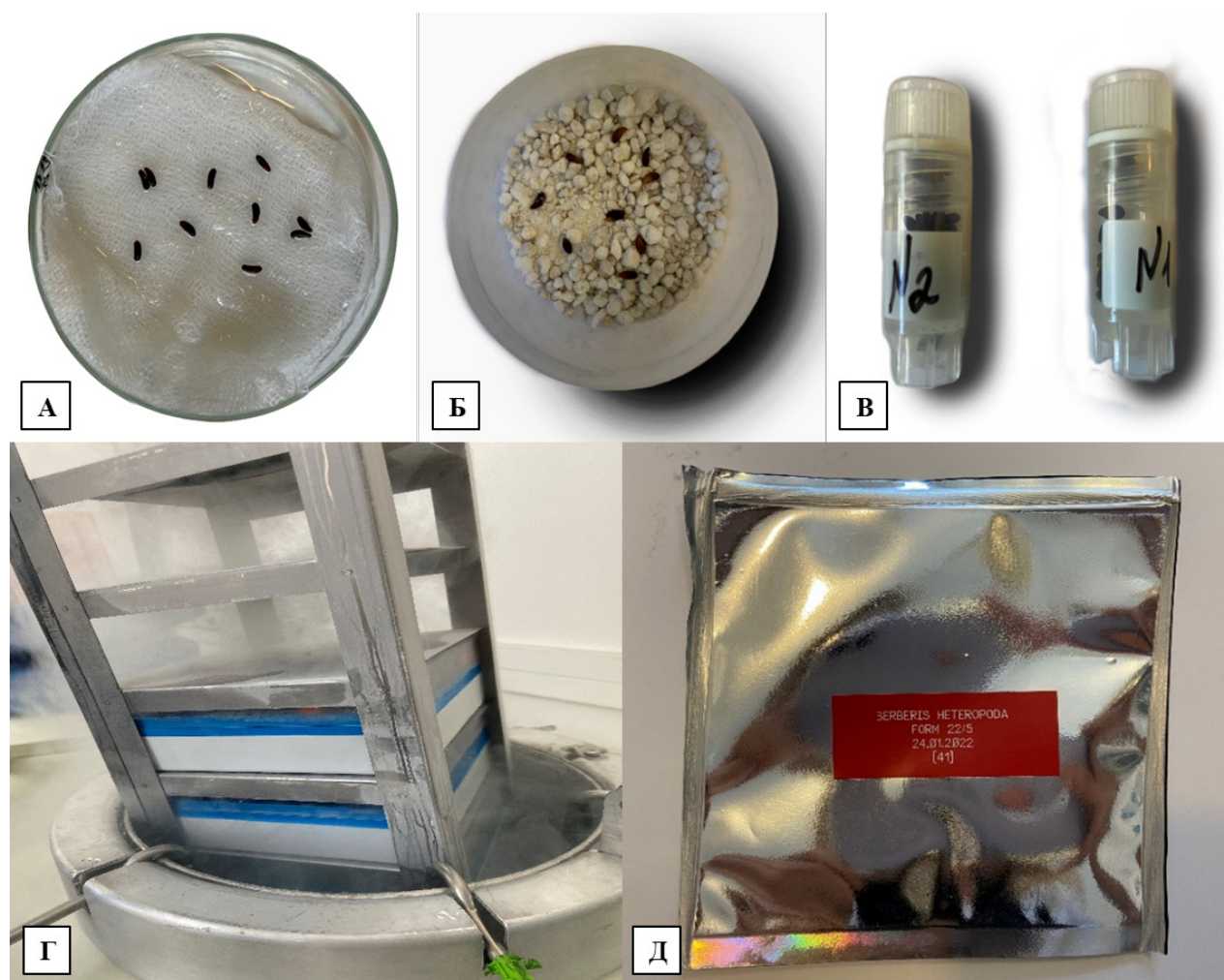
Проращивание семян

Для получения проростков семена предварительно подсушивали при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$, в течение 2 недель. Затем семена вымачивали в дистиллированной воде на протяжении 6 часов. После чего одну часть просушенных семян использовали для проращивания в стандартных условиях светокультуральной комнаты (температура $24 \pm 1^\circ\text{C}$, освещенность $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$,

16-часовом фотопериод) в чашках Петри на влажной марле – контроль 1 (К1) (рисунок 2А). Вторую часть перед проращиванием в стандартных условиях на влажной марле предварительно помещали в криопробирки размером 1,2 мл и погружали в жидкий азот (ЖА) при температуре -196°C на 20 часов – опыт 1 (О1) (рисунок 2В). Третью часть помещали на стратификацию во влажном перлите при температуре 4°C освещенности $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$, 16-часовом фотопериоде, в на 2 месяца, после чего контейнеры с семенами во влажном перлите переносили в стандартные условия для проращивания – контроль 2 (К2) (рисунок. 2Б). Последнюю часть семян погружали на 20 часов в ЖА, после чего проводили стратификацию и проращивание семян также, как это было описано в К2 – опыт 2 (О2).



А – Кустарник формы 2; Б – Кустарник формы 6; В – Плоды формы 2;
Г – Плоды формы 6; Д – Семена формы 2; Е – Семена формы 6
Рисунок 1 – *Berberis heteropoda*, отобранные формы 2 и 6



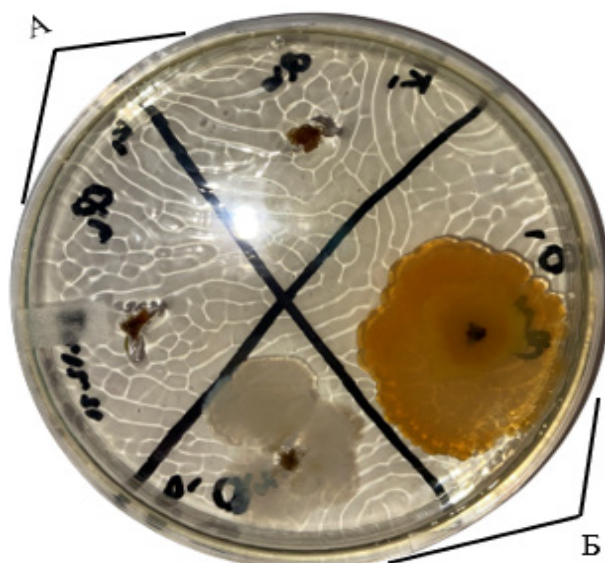
А – Проращивание семян в чашках Петри на влажной марле; Б – Стратификация семян во влажном перлите; В – Криопробирки с семенами перед погружением в жидкий азот; Г – Семена, помещенные на длительное хранение в дьюары с жидким азотом (-196°C); Д – Семена, запаянные в пакеты из ламинированной алюминиевой фольги

Рисунок 2 – Различные обработки семян *Berberis heteropoda*

Введение в культуру in vitro

Полученные после проращивания проростки стерилизовали в 0,1% растворе $HgCl_2$ в течение 5 мин, как это описано в работах Ромадановой Н.В. с соавторами [12, 19]. Апексы побегов после стерилизации размещали по пробиркам со средой Мурасиге и Скуга (МС) с 30 г/л сахарозы, 0,8 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,02 мг/л индолилмасляной кислоты, 0,1 мг/л гибберелловой кислоты, 1 мг/л аскорбиновой кислоты, 1 мг/л пантотената кальция, 4 г/л агара, 1,75 г/л джелрайта, pH 5,7 и культивировали в стандартных условиях. В течение 4 недель наблюдали за ростом побегов в культуре *in vitro*.

Введённые в культуру *in vitro* побеги протестировали на отсутствие посторонней микрофлоры на специализированной среде для роста бактерий и грибов 523, в состав которой входили: 10 г/л сахарозы, 8 г/л гидролизата казеина, 4 г/л дрожжевого экстракта, 2 г/л KH_2PO_4 , 0,15 г/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 6 г/л джелрайта, pH 6,9 [20]. У побегов срезали основания и переносили на среду 523 и в течение 2 недель наблюдали за окраской среды. При условии, если среда оставалась прозрачной, производили дальнейшее размножение побегов. Помутнение среды указывало на инфицированность побегов, которые в дальнейшем более не использовались (рисунок 3) [19].



А – Асептические сегменты побегов;
Б – Инфицированные сегменты побегов

Рисунок 3 – проверка побегов *in vitro* на среде 523 для обнаружения бактерий и грибов (10 г/л сахарозы, 8 г/л гидролизата казеина, 4 г/л дрожжевого экстракта, 2 г/л KH_2PO_4 , 0,15 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 6 г/л джелрайта)

Криоконсервация семян

Семена *B. heteropoda* поместили в криогенный банк для долгосрочного хранения при температуре жидкого азота (-196°C). Предварительно высушенные семена помещали в криопробирки (рисунок 2В), которые были размены в криобоксах и погружали в дьюар с жидким азотом (рисунок 2Г). Также, семена распределяли по герметично запаянным пакетикам из алюминиевой фольги, которые помещали на длительное хранение в морозильную камеру при температуре -20°C (рисунок 2Д).

Статистический анализ

В экспериментах использовали по 15 семян (3 повторности) ($n=45$). Обработку полученных результатов проводили с помощью статистических методик, описанных в пособии Г.Ф. Лакина и в программном пакете SYSTAT [21-22].

Результаты и обсуждение

Низкий процент ЛВ семян *B. heteropoda* побудил провести серию экспериментов с различными дополнительными обработками для стимуляции прорастания семян. В качестве контроля использовали семена без обработки. В результате эксперимента проростки в К1 появились только у форм 6 и 7 с 17 по 35 сутки, ЛВ со-

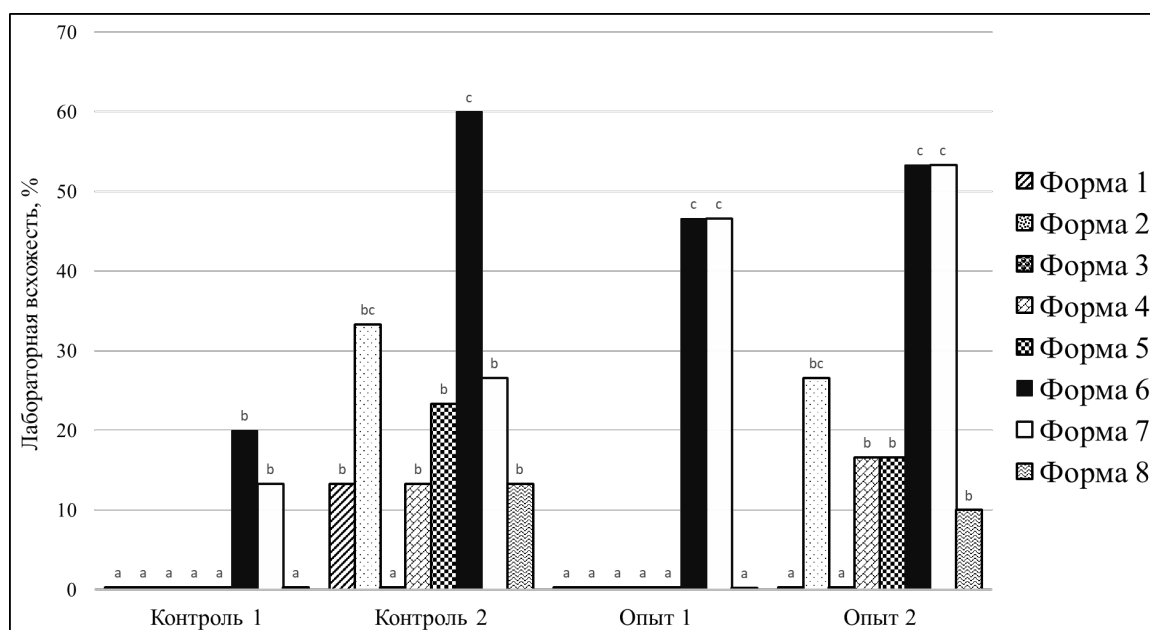
ставила 20,0% и 13,3% соответственно (рисунок 4). Данные многих исследований показывают, что экспозиция семян в ЖА увеличивает их ЛВ, в особенности это касается семян, которые хранятся длительное время, а также для семян, которым требуются стрессовые условия для прорастания [12-18].

В О1 после обработки ЖА ЛВ семян форм 6 и 7 возросла до 46,6%, что выше в 2,3 и 3,5 раза соответственно, что подтверждает данные литературных источников. Предположительно семена форм 1-5 и 8 не проросли и после воздействия ЖА, потому как были значительно крупнее (0,4 см) в отличие от семян форм 6 и 7 (0,1 см) (рисунок 1Д, 1Е). Вероятнее всего, в крупных семенах под воздействием сверхнизких температур образовались кристаллы льда из-за большого количества внутриклеточной воды, о действии которой также много говорится в изученной литературе [23-25]. В дальнейших экспериментах для увеличения процента ЛВ нами будут предприняты дополнительные меры для стимулирования ЛВ крупных семян, например, до воздействия ЖА для дегидратации семени будут просушены в сушильном шкафу при различных температурных режимах.

Многие исследователи для повышения энергии прорастания семян используют стратификацию, благодаря которой ЛВ повышается вдвое, в отдельных случаях более чем в 5 раз [12, 15-18]. Нами была проведена стратификация семян во влажном перлите в течение 2 месяцев при температуре 4°C (К2), а также стратификация с предварительной обработкой в ЖА (О2). Лабораторная всхожесть семян после стратификации в К2 в среднем составила – 21,6% и варьировала от 0% у 3 образца до 60,0% у 6 образца (рисунок 4).

Стоит заметить, что после стратификации (К2) проростки из семян барбариса появлялись уже на 3 день, то есть стратификация ускоряет энергию прорастания (ЭП), при этом и ЛВ семян в К2 в среднем превышала ЛВ в К1 более чем в 5 раз.

В результате можно сделать вывод, что стратификация является более эффективным способом повысить как ЛВ так и ЭП семян барбариса, что так же подтверждает данные литературных источников. ЛВ семян в О2 составила 22,1%, что почти в 2 раза выше, чем в О1 и статистически не отличается от ЛВ в К2, соответственно воздействие ЖА до стратификации не повлияло на ЛВ, что скорее всего также связано с размером семян и большим содержанием внутриклеточной воды.



Контроль 1 – семена, пророщенные в стандартных условиях светокультуральной комнаты (температура $24 \pm 1^\circ\text{C}$, освещенность $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$, 16-часовом фотопериод) в чашках Петри на влажной марле;
 Контроль 2 – семена, пророщенные в стандартных условиях после стратификации во влажном перлите в течение 2 месяцев при температуре 4°C освещенности $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$, 16-часовом фотопериоде;
 Опыт 1 – семена, пророщенные в стандартных условиях после погружения в жидкий азот (ЖА) в течение 20 часов при температуре (-196°C);
 Опыт 2 – семена, пророщенные в стандартных условиях после погружения в ЖА в течение 20 часов и стратификации во влажном перлите в течение 2 месяцев при температуре 4°C освещенности $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$, 16-часовом фотопериоде.
 Данные представляют собой среднее значение \pm стандартная ошибка.

Значения, представленные разными буквами, значительно различались при $p \leq 0,05$

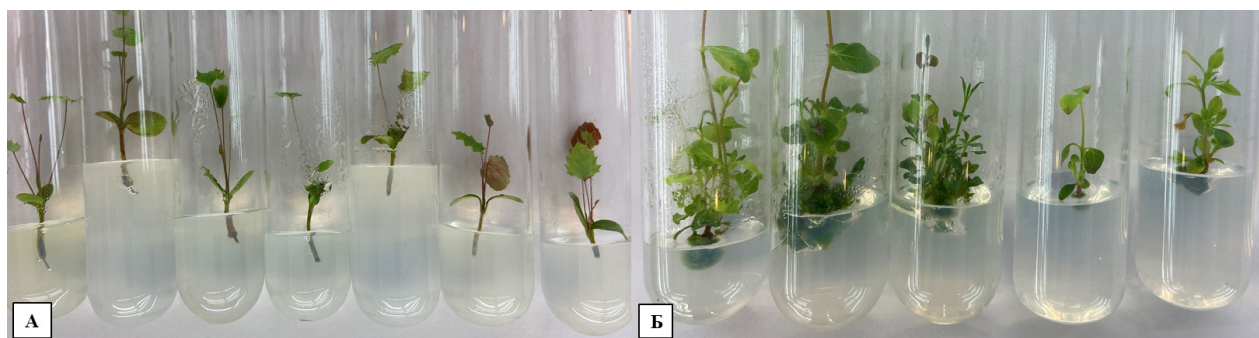
Рисунок 4 – Лабораторная всхожесть семян 8 образцов *Berberis heteropoda* после различных обработок

По итогу в культуру *in vitro* было введено 62 проростка барбариса, полученных при проращивании семян (рисунок 5). Процент асептических побегов при введении в культуру *in vitro* составил 90,3%, только 2 побега были инфицированы и у 4 наблюдали некроз. Полученные асептические побеги были протестированы на специализированной среде 523. Процент инфицированности составил – 53,6%. В целом жизнеспособность асептических побегов при введении в культуру *in vitro* составила – 46,4%. Способ введения в культуру *in vitro* проростков, полученных их семян для дикорастущих видов является достаточно эффективным приемом для получения асептических *in vitro* растений, так как отмечается достаточно невысокий процент инфицированности, чем при введении в культуру *in vitro* побегов, пророщенных из черенков или изолированных у растений в природных условиях, что опять же подтверждает данные, полученные нами ранее [12, 19, 25-27].

В результате проделанной работы нами был пополнен криогенный банк (-196°C) растений

Республики Казахстан, расположенный в РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» (ИББР) 8 образцами семян *Berberis heteropoda*. Помимо этого, 3 образца семян этого вида, запаянные в пакетах из ламинированной алюминиевой фольги помещены в морозильную камеру при температурном режиме хранения -20°C .

На данный момент коллекция ИББР – это единственный криогенный банк растений в Республике Казахстан. На данный момент банк уже насчитывает 769 образцов различных плодовых, ягодных, орехоплодных, злаковых, косточковых культур и картофеля. В том числе и оздоровленный в культуре *in vitro* безвирусный материал, а также редкие, исчезающие виды, занесенные в Красную книгу Казахстана. Сохранение растительного материала в криогенном банке послужит надежным хранилищем генетического материала в течение неограниченного времени, будет защищен от возможных глобальных катастроф, в том числе и глобального потепления.



А – Первая неделя культивирования; Б – Четвертая неделя культивирования;
Рисунок 5 – Побеги барбариса в культуре *in vitro*

Заключение

Барбарис распространен по всему земному шару, известно 580 его видов. Разные условия произрастания (температура, влажность, состав почв и т.д.) делает виды этого растения приспособленными к абсолютно противоположным климатическим режимам. Соответственно все виды барбариса сильно отличаются между собой. Кроме того, нами отмечено и внутривидовое разнообразие барбариса, например, внутри вида у *B. integerrima* и *B. oblonga*, отмечали кардинально разные по форме, размеру и цвету кустарники, плоды, листья, колючки и т.д. [27]. Барбарисы также отличались по энергии произрастания семян. У некоторых видов (*B. iliensis*, *B. integerrima* и *B. oblonga*) ЛВ без каких-либо обработок составляла в среднем 78,8%. Для всех видов барбариса ЛВ повышалась после стратификации, при этом для *B. amurensis*, *B. nummularia* и *B. sibirica* она увеличивалась вдвое. Было также установлено, что семена *B. koreana* и *B. vulgaris*, плохо прорастают во влажном перлите. Для этих видов дополнительно применяли скарификацию и воздействие жидкого азота [19, 27]. ЖА и стратификацию, также использовали для практически не прорастающих семян *B. heteropoda*.

В результате проведенных экспериментов можно сделать вывод, что жидкий азот и стратификация стимулируют прорастание семян *B. heteropoda* различного происхождения. Это подтверждает проведенные ранее исследования на других видах барбариса [12, 19], а также для проращивания семян других культур [13, 15, 18]. Наиболее эффективное воздействие на ЛВ семян оказала стратификация семян при 4°C во влажном перлите, что повыси-

ло ЛВ более чем в 5 раз. В справочнике по проращиванию покоящихся семян Николаевой М.Г. с соавторами [15] стратификация также указана, как один из надежных способов проращивания покоящихся семян, особенно для тех, для которых в естественных условиях прорастание начинается лишь через 1-2 года после посева, а появление всходов может растянуться на несколько лет. Использование этого способа в результате позволяет не только получать проростки, но и ускорять этот процесс.

Кроме того, в этом исследовании отмечено получение высокого процента прорастания у мелких семян в сравнении с крупными. Из чего сделан вывод, что для увеличения процента ЛВ крупных семян требуется их более длительное высушивание, для дегидратации внутриклеточной воды. Для подтверждения этого вывода будут проведены дополнительные исследования.

Отработанные ранее методы введения в культуру *in vitro* для других видов барбариса позволили получить порядка 50% асептических побегов *B. heteropoda*. В результате коллекция *in vitro* и криогенного банка (-196°C) пополнены 8 образцами *B. heteropoda*, 3 образца были помещены на режим хранения -20°C. На сегодняшний день в криогенном банке (-196°C) сохранено 28 образцов различных форм *Berberis heteropoda*, 14 образцов помещены в морозильную камеру при -20 °С.

Благодарность

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках Программно-целевого финансирования BR18574149.

Литература

1. Tang J, Feng Y., Tsao S., Wang N., Curtain R., and Wang Y. Berberine and Coptidis Rhizoma as novel antineoplastic agents: a review of traditional use and biomedical investigations // J. Ethnopharmacol. – 2009. – Vol. 126. – P. 5-17.
2. Gao Y., Wang F., Song Y., Liu H. The status of and trends in the pharmacology of berberine: a bibliometric review // Chinese medicine. – 2020. – No 15(1). – P. 1-13.
3. Abd E., Wahab A.E., Ghareeb D.A., Sarhan E.E., Abu-Serie M.M., El Demellawy M.A. *In vitro* biological assessment of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine: antioxidants, antiacetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects // BMC Complement Altern Med. – 2013. – Vol. 13(1), – No. 218. – P. 13-18.
4. Romadanova N.V., Karasholakova L.N., Eshbakova K.A., Özek G., Özek T., Yur S., Kushnarenko S.V. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Berberis iliensis* M. Pop and *Berberis integerrima* Bunge fruits pulp // Res. on Crops. – 2021. – Vol. 22(4). – P. 940-947.
5. Hosry L.E., Boyer L., Garayev E.E., Mabrouki F., Bun S.S., Debrauwer L., Auezova L., Cheble E., Elias R. Chemical composition, antioxidant and cytotoxic activities of roots and fruits of *Berberis libanotica* // Nat. Prod. Commun. – 2016. – P. 645-648.
6. Kalmarzi R.N., Naleini S.N., Ashtary-Larky D., Peluso I., Jouybari L., Rafi A., Ghorat F., Heidari N., Sharifian F., Jalal Mardaneh P., Aiello P., Helbi S., Kooti W. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of barberry (*Berberis vulgaris*) and its main compound // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2019. – P. 1-10.
7. Li L., Zhu H. M., Yan Q., Li S.Y., Li F. The antibacterial activity of *Berberis heteropoda* Schrenk and its effect on irritable bowel syndrome in rats // Chin. J. Nat. Med. – 2020. – No. 18. – P. 356-68.
8. Флора Казахстана / под ред. Н.В. Павлова / – Алма-Ата: Изд-во АН КазССР, 1960. – Т. III. – 459 с.
9. Чекалин С.В., Пожарский А.С., Ишаева А.Н. Барбарисы Юго-восточного и Южного Казахстана / при участии Н.А. Исмаиловой, В.А. Масаловой, С.В. Набиевой, Т.И. Речицкой, Г.С. Жунусова, А.И. Елисейевой / – Алматы: ТОО «Luxe media Group», 2017. – 92 с.
10. Красная книга Казахстана. Т. 2. Растения. – 2-е изд. перераб. и доп. – Астана: ТОО АртPrintXXI, 2014. – 452 с.
11. Begenov A., Mukhitdinov N., Ametov A., Nazarbekova S., Kuatbayev A., Tynybekov B., Abidkulova K., Ydyrys A. Assessment of the Current Status of Populations of Kazakh Rare Plants (*Berberis iliensis* M. Pop) // World Applied Sciences Journal. – 2014. – Vol. 30 (1). – P. 105-109.
12. Ромаданова Н.В., Карашолакова Н., Махмутова И.А., Ишмуратова М.Ю., Копыткова Л.А., Кабулова Ф.Д., Кушнарченко С.В. Сохранение генетического материала некоторых видов барбариса в криобанке // Вестник Карагандинского Университета. – 2019. – No. 3(95). – С. 20-26.
13. Кушнарченко С.В., Мухитдинова З.Р., Аралбаева М.М. Криоконсервация семян: Методические рекомендации. – Алматы: Типография “TST-Company”, 2011. – 33 с.
14. Kushnarenko S.V., Salnikov E., Nurtazin M., Mukhitdinova Z., Rakhimbaev I., Reed B.M. Characterization and Cryopreservation of *Malus sieversii* Seeds // The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology. – 2010. – Vol. 4 (Special Issue 1). – P. 5-9.
15. Николаева М.Г. Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Ленинград: Наука, 1985. – 348 с.
16. Dowsett C.A., James T., Trivedi P. Adaption of a technique for the accelerated ageing of weed seeds to evaluate their longevity // New Zealand Plant Protection. – 2012. – Vol. 65. – P. 69-73.
17. Bewley J.D., Black M. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. – Berlin; Heidelberg; New York, 1982. – Vol. 2. – 375 p.
18. Bareke T. Biology of seed development and germination physiology // Plants & Agriculture Research. – 2018. – Vol. 8. – Issue 4. – P. 336-346.
19. Ромаданова Н.В., Мишустина С.А., Карашолакова Л.Н., Аралбаева М.М., Рахимбаев И.П., Кушнарченко С.В. Создание коллекции *in vitro* дикорастущих видов *Berberis sp.* // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2016. No. 121. – С. 69-76.
20. Viss, P.R., Brooks E.M., Driver J.A. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture // In Vitro Cell. Dev. Biol. – 1991. – Vol. 27. – P. 42.
21. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов / 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.
22. SYSTAT (2007) SYSTAT 12.0, SYSTAT Software, Inc, San Jose, CA, pp. Statistics software.
23. Попов А.С. Криогенное хранение культур клеток растений // Культура клеток растений. – М: Наука, 1981. – С. 150-162.
24. Dumet D., Benson E.E., Engelmann F., Hiroko T. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated desiccated plant germplasm // Ed. Int. Plant Genetics Resources Institute. – 2000. – P. 43-56.
25. Ромаданова Н.В. Биотехнология получения оздоровленных саженцев яблони: монография. – Алматы, 2020 г. – 132 с.

26. Romadanova N.V., Mishustina S.A., Matakova G.N., Kuhsnarenko S.V., Rakhimbaev I.R., Reed B.M. *In vitro* collection of *Malus* shoot cultures for cryogenic bank development in Kazakhstan // Acta Horticulturae, March 2016 – Vol. 1113. – P. 271-277.

27. Ромаданова Н.В., Мишустина С.А., Карашолакова Л.Н., Аралбаева М.М., Кабулова Ф.Д., Абидкулова К.Т., Кушнаренко С.В. Введение в культуру *in vitro* дикорастущих видов *Berberis* флоры Казахстана и Узбекистана // Вестник КазНУ им. аль-Фараби, серия биологическая, No 3 (65), 2015. – С. 346-354.

References

1. Abd E., Wahab A.E., Ghareeb D.A., Sarhan E.E., Abu-Serie M.M., El Demellawy M.A. *In vitro* biological assessment of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine: antioxidant, antiacetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects // BMC Complement Altern Med. – 2013. – Vol. 13(1), – No. 218. – P. 13-18.

2. Bareke T. Biology of seed development and germination physiology // Plants & Agriculture Research. – 2018. – Vol. 8. – Issue 4. – P. 336-346.

3. Begenov A., Mukhitdinov N., Ametov A., Nazarbekova S., Kuatbayev A., Tynybekov B., Abidkulova K., Ydyrys A. Assessment of the Current Status of Populations of Kazakh Rare Plants (*Berberis iliensis* M. Pop) // World Applied Sciences Journal. – 2014. – Vol. 30 (1). – P. 105-109.

4. Bewley J.D., Black M. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. – Berlin; Heidelberg; New York, 1982. – Vol. 2. – 375 p.

5. Chekalin S.V., Pozharskij A.S., Ishaeva A.N. “Barbarisy Jugo-vostochnogo i Juzhnogo Kazahstana / pri uchastii N.A. Ismailovoj, V.A. Masalovoj, S.V. Nabievoj, T.I. Rechickoj, G.S. Zhunusova, A.I. Eliseevoj / [Barberries of Southeastern and Southern Kazakhstan]”. Almaty: TOO «Luxe media Group», (2017): 92 (In Russian)

6. Dowsett C.A., James T., Trivedi P. Adaption of a technique for the accelerated ageing of weed seeds to evaluate their longevity // New Zealand Plant Protection. – 2012. – Vol. 65. – P. 69-73.

7. Dumet D., Benson E.E., Engelmann F., Hiroko T. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated desiccated plant germplasm // Ed. Int. Plant Genetics Resources Institute. – 2000. – P. 43-56.

8. “Flora Kazahstana / pod red. N.V. Pavlova /. [Flora of Kazakhstan].” Alma-Ata: Izd-vo AN KazSSR, T. III, (1960): 459 (In Russian)

9. Gao Y., Wang F., Song Y., Liu H. The status of and trends in the pharmacology of berberine: a bibliometric review // Chinese medicine. – 2020. – No 15(1). – P. 1-13.

10. Hosry L.E., Boyer L., Garayev E.E., Mabrouki F., Bun S.S., Debrauwer L., Auezova L., Cheble E., Elias R. Chemical composition, antioxidant and cytotoxic activities of roots and fruits of *Berberis libanotica* // Nat. Prod. Commun. – 2016. – P. 645-648.

11. Kalmarzi R.N., Naleini S.N., Ashtary-Larky D., Peluso I., Jouybari L., Rafi A., Ghorat F., Heidari N., Sharifian F., Jalal Mardaneh P., Aiello P., Helbi S., Kooti W. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of barberry (*Berberis vulgaris*) and its main compound // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2019. – P. 1-10.

12. “Krasnaia kniha Kazahstana. Rasteniia [Red book of Kazakhstan. Plants]” Vol. 2. Astana: TOO «ArtPrintXXI» (2014): 452 (In Russian)

13. Kushnarenko S.V., Muhitdinova Z.R., Aralbaeva M.M. “Kriokonservatsiya semjan: Metodicheskie rekomendatsii [Cryopreservation of seeds: Guidelines].” Almaty: Tipografija “TST-Company”, (2011): 33 (In Russian)

14. Kushnarenko S.V., Salmikov E., Nurtazin M., Mukhitdinova Z., Rakhimbaev I., Reed B.M. Characterization and Cryopreservation of *Malus sieversii* Seeds // The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology. – 2010. – Vol. 4 (Special Issue 1). – P. 5-9.

15. Lakin G.F. “Biometrija: Uchebnoe posobie dlja biol. spec. vuzov / 4-e izd., pererab. i dop. [Biometrics: Textbook for biological specialties of universities / 4th edition, revised and enlarged].” M.: Vyssh. shkola, (1990): 352 (In Russian)

16. Li L., Zhu H. M., Yan Q., Li S.Y., Li F. The antibacterial activity of *Berberis heteropoda* Schrenk and its effect on irritable bowel syndrome in rats // Chin. J. Nat. Med. – 2020. – No. 18. – P. 356-68.

17. Nikolaeva M.G., Razumova M.V., Gladkova V.N. “Spravochnik po prorashhivaniju pokojashhihsja semjan [A guide to germinating of dormant seeds].” Leningrad: Nauka, (1985): 348 (In Russian)

18. Popov A.S. “Kriogennoe hranenie kul'tur kletok rastenij [Cryogenic storage of plant cell cultures].” Kul'tura kletok rastenij. M: Nauka, (1981): 150-162 (In Russian)

19. Romadanova N.V., Karasholakova L.N., Eshbakova K.A., Özek G., Özek T., Yur S., Kushnarenko S.V. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Berberis iliensis* M. Pop and *Berberis integerrima* Bunge fruits pulp // Res. on Crops. – 2021. – Vol. 22(4). – P. 940-947.

20. Romadanova N.V., Karasholakova N., Mahmutova I.A., Ishmuratova M.Ju., Kopytkova L.A., Kabulova F.D., Kushnarenko S.V. “Sohranenie geneticheskogo materiala nekotoryh vidov barbarisa v kriobanke [Preservation of some barberry species genetic material in a cryobank].” // Vestnik Karagandinskogo Univeriteta. No. 3(95). (2019): 20-26 (In Russian)

21. Romadanova N.V., Mishustina S.A., Karasholakova L.N., Aralbaeva M.M., Rahimbaev I.R., Kushnarenko S.V. “Sozdanie kollekcii *in vitro* dikorastushhih vidov *Berberis* sp. [Creation of an *in vitro* collection of wild *Berberis* sp.]” B’ulleten’ Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada. No. 121. (2016): 69-76. (In Russian)
22. Romadanova, N.V. “Biotehnologija poluchenija ozdorovlennyh szhencev jabloni: monografiya. [Biotechnology for obtaining virus free apple planting stocks: a monograph].” Almaty, (2020): 132 (In Russian)
23. Romadanova N.V., Mishustina S.A., Matakova G.N., Kuhsnarenko S.V., Rakhimbaev I.R., Reed B.M. *In vitro* collection of *Malus* shoot cultures for cryogenic bank development in Kazakhstan // Acta Horticulturae, March 2016 – Vol. 1113. – P. 271-277.
24. Romadanova N.V., Mishustina S.A., Karasholakova L.N., Aralbaeva M.M., Kabulova F.D., Abidkulova K.T., Kushnarenko S.V. “Vvedenie v kul’turu *in vitro* dikorastushhih vidov *Berberis* flory Kazahstana i Uzbekistana [Introduction to *in vitro* culture of wild *Berberis* species of the flora of Kazakhstan and Uzbekistan].” Vestnik KazNU im. al’-Farabi, serija biologicheskaja, No 3 (65), 2015. – S. 346-354.
25. SYSTAT (2007) SYSTAT 12.0, SYSTAT Software, Inc, San Jose, CA, pp. Statistics software.
26. Tang J, Feng Y., Tsao S., Wang N., Curtain R., and Wang Y. Berberine and Coptidis Rhizoma as novel antineoplastic agents: a review of traditional use and biomedical investigations // J. Ethnopharmacol. – 2009. – Vol. 126. – P. 5-17.
27. Viss, P.R., Brooks E.M., Driver J.A. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture // In Vitro Cell. Dev. Biol. – 1991. – Vol. 27. – P. 42.