

13. Monnier M. Croissance et developpement des embryons globulaires de *Capsella Bursa-pastoris* cultivés *in vitro* dans un milieu a la base d'une nouvelle solution minerale // Bull. Soc. Bot. France, Memoires, Coll. Morphologie. – 1973. – P. 179-194.

14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol.15, N 3. – P. 473-497.

Статья поступила в редакцию 04.09.2016 г.

Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Nikiforov A.R., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Ivanova N.N., Chelombit S.V, Zhdanova I.V. Special features of *in vitro* introduction of some relict endemic species from Mountain Crimea flora // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2016. – № 121. – P. 62-69.

For the first time biotechnological studies were launched *in vitro* concerning development features of 8 relict endemic species of the Mountain Crimea flora. The article presents study results of sterilizing agents' effect on both seed and fruit viability, and information about obtaining of aseptic culture for study cases. It was revealed that seedling formation is possible on nutrient medium Monnier (1973) and Murashige, Skoog (1962).

Keywords: rare species; organ and tissue culture; culture media; microshoot regeneration.

УДК 634.1/.7;57.086.13;57:536.483;606:57.082.26

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ *IN VITRO* ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ *BERBERIS SP.*

Наталья Владимировна Ромаданова, Светлана Александровна Мишустина,
Лаззат Наушабаевна Карашолакова, Молдир Маликовна Аралбаева,
Избасар Рахимбаевич Рахимбаев, Светлана Вениаминовна Кушнаренко

РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК.

Республика Казахстан, г. Алматы, 050040, ул. Тимирязева 45

nata_romadanova@mail.ru

Создана коллекция *in vitro* 59 форм 10 дикорастущих видов барбариса из АО «Лесной питомник», Карагандинского государственного университета, дендрария алтайского ботанического сада, поймы рек Большая Алматинка, Или, Чарын, Зеравшан. Для введения в культуру *in vitro* использовали побеги, пророщенные из семян барбариса: 1 – форма *Berberis amurensis* Rupr., 12 – *B. iliensis* M. Pop, 27 – *B. integerrima* Bunge, 1 – *B. koreana* Palib., 1 – *B. nummularia* Bge., 2 – *B. oblonga* (Regel) C.K.Schneid., 1 – *B. sibirica* Pall., 12 – *B. sphaerocarpa* Kar. et Kir., 1 – *B. thunbergii* DC., 1 – *B. vulgaris* L. Семена всех видов, кроме *B. koreana*, *B. sphaerocarpa*, *B. vulgaris* сразу после сбора прорастали на 7-22 сутки во влажном перлите, лабораторная всхожесть составила от 66,2-95,6%. Для прорастания семян трех вышеуказанных форм необходима была стратификация во влажном перлите в течение 2 месяцев при температуре 4°C, лабораторная всхожесть при этом составила от 22,2 до 100%. Пророщенные побеги обрабатывали раствором коммерческого отбеливателя «Белизна», разбавленного 1:1, в течение 10 мин и размножали на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) с 30 г/л сахарозы, 1,0 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 0,01 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК), 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7. У *B. sphaerocarpa*, показавшего низкий процент всхожести даже после стратификации, побеги *in vitro* получали также из зародышей, которые изолировали из семян и помещали на вышеуказанную среду, после чего было отмечено 100% прорастание. Растения *in vitro*, полученные из семян и зародышей, проверяли на наличие эндофитной инфекции на специализированной среде 523 для роста бактерий и грибов, в состав которой входили: 10 г/л сахарозы, 8 г/л гидролизата казеина, 4 г/л дрожжевого экстракта, 2 г/л K_2HPO_4 , 0,15 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, джелрайт 6 г/л, pH 6,9. При этом 19,6% растений, освобожденные от инфекции, успешно развивались в условиях *in vitro*. Для дальнейшего клонального микроразмножения были протестированы 16 вариантов питательных сред, оптимальной являлась среда МС с 30 г/л сахарозы, с удвоенной концентрацией хелата железа, 0,8 мг/л БАП, 1 мг/л гибберелловой кислоты, 0,02 мг/л ИМК, 1 мг/л аскорбиновой кислоты, 2 мг/л пантотената кальция, 1,75 г/л джелрата, 4 г/л агара, pH 5,7. Созданная коллекция барбариса *in vitro* будет использована для создания криогенного банка, а также для закладки элитных питомников и для международного обмена генетическими ресурсами.

Ключевые слова: барбарис; семена; зародыши; культура органов и тканей; асептическая коллекция; криобанк

Введение

В последнее время проблема утраты биоразнообразия, сокращение тугайных лесов, вследствие изменения условий их произрастания, стала важной проблемой нарушения экологии. Более 90% тугайных лесов уже утеряно, те площади, которые остались, находят в неудовлетворительном состоянии. Принимаются различные программы по сохранению и восстановлению тугайных лесов, с местным населением ведутся беседы для повышения осведомленности, на данных участках запрещена хозяйственная деятельность, однако общая численность лесов постоянно сокращается. Барбарис илийский (*Berberis iliensis*) и барбарис каркаралинский (*B. karkaralensis*) занесены в Красную книгу Казахстана. Другие виды барбариса, могут также оказаться под угрозой исчезновения [1, 5].

В нашей стране, кроме естественных мест произрастания, некоторые виды барбариса содержатся лишь в ботанических садах и в частных коллекциях, что недостаточно обеспечивает надежное сохранение гермоплазмы. Дело в том, что полевые помологические коллекции подвержены воздействию различных экстремальных воздействий (природно-климатические факторы, болезни, вредители, и.т.п.). В связи с этим, недостатки традиционных приемов сохранения генетических ресурсов обусловили необходимость разработки биотехнологических методов сохранения генофонда. Анализ имеющихся литературных данных позволяет сделать заключение, что решение проблемы сохранения коллекций на современном этапе необходимо проводить с учетом применения всех наиболее прогрессивных технологий, в том числе и длительное сохранение генетического материала в криобанках [3, 7, 9]. На первом этапе проведения экспериментов по криоконсервации апикальных меристем важно получить достаточное количество хорошего качества растений *in vitro*. Оптимизации введения в культуру *in vitro* и клонального микроразмножения побегов барбариса посвящена данная работа.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись 59 образцов барбариса, собранные в Сайрам-Угамском Государственном Национальном парке в долине реки Сайрамсу в ущелье Каскасу, в ущелье Дарбаза, на озере Сусынген; в Иле-алатауском Национальном парке Заилийского Алатау в пойме реки Большая Алматинка в ущелье Алмарасан, в пойме реки Узын в ущелье Узын Каргалы, в пойме реки Иссык ущелье Иссык и в пойме реки Тургень ущелье Тургень; в пойме реки Или в ущелье Кербулак; из коллекций в АО «Лесной питомник», Алтайского ботанического сада, и из Карагандинского Государственного Университета им. Е.А. Букетова: 1 форма *Berberis amurensis* Rupr., 12 – *B. iliensis* M. Pop, 27 – *B. integerrima* Bunge, 1 – *B. koreana* Palib., 1 – *B. nummularia* Vge., 2 – *B. oblonga* (Regel) C.K.Schneid., 1 – *B. sibirica* Pall., 12 – *B. sphaerocarpa* Kar. et Kir., 1 – *B. thunbergii* DC., 1 – *B. vulgaris* L.

Проращивали побеги барбариса из однолетних черенков длиной 20-30 см, которые промывали и в течение 5 мин обрабатывали разбавленным раствором отбеливателя «Белизна» (1:1). Для стимуляции побегообразования из покоящихся почек черенки помещали в сосуды с водой (рис. 1 А). Через 2-4 недели отросшие побеги длиной 1-1,5 см срезали и в ламинарном боксе стерилизовали в 0,1% растворе сулемы ($HgCl_2$) в течение 7 мин. Асептические верхушки побегов после стерилизации помещали в пробирки со средой Мурасиге-Скуга (МС), содержащей 30 г/л сахарозы с добавлением регуляторов роста: 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина БАП, 0,01 мг/л идолилмасляной кислоты (ИМК), 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7 [8].

Для проращивания семян барбариса использовали очищенные от мякоти плодов подсушенные семена, которые обрабатывали раствором отбеливателя «Белизна»

разбавленного 1:1 в течение 5 минут: 1) культивировали в течение 2-3 суток на смоченной в воде вате и переносили во влажный перлит для проращивания (рис. 1 Б); 2) стратифицировали во влажном перлите при 4°C в течение 8 недель (рис. 1 В, Г); 3) помещали в пробирки на питательную среду Кнопа следующего состава: 1 г/л $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,25 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 г/л KH_2PO_4 , 0,125 г/л KCl , 27,8 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 37,3 мг/л $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7 (рис. 2 А, Б) [6].

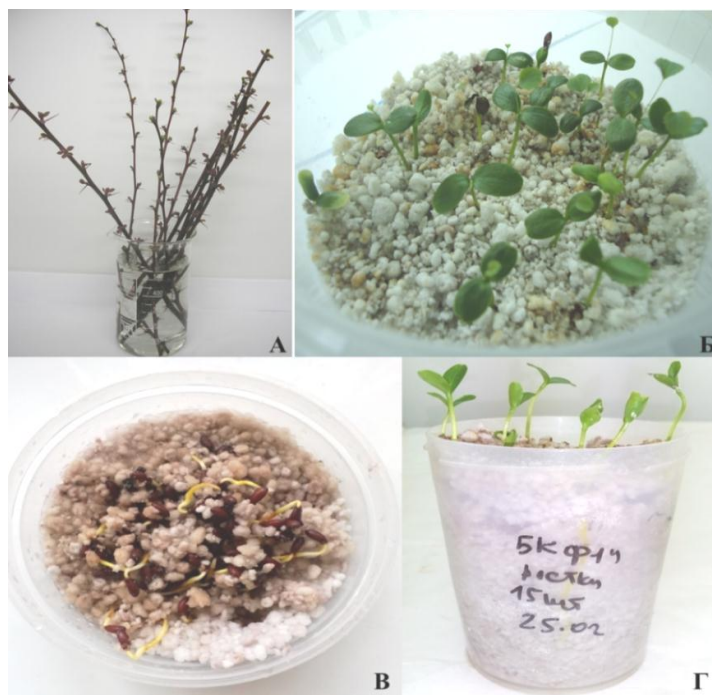


Рис. 1 Проращивание побегов барбариса для введения в культуру *in vitro*

А – Проращивание черенков *B. iliensis* в воде; Б – проростки из семян *B. integerrima* во влажном перлите; В – пророщенные семена *B. sphaerocarpa* после стратификации во влажном перлите при температуре 4°C, освещенности $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 16-ти часовом фотопериоде в течение 8 недель; Г – проращивание побегов из семян *B. sphaerocarpa* формы 14 после стратификации

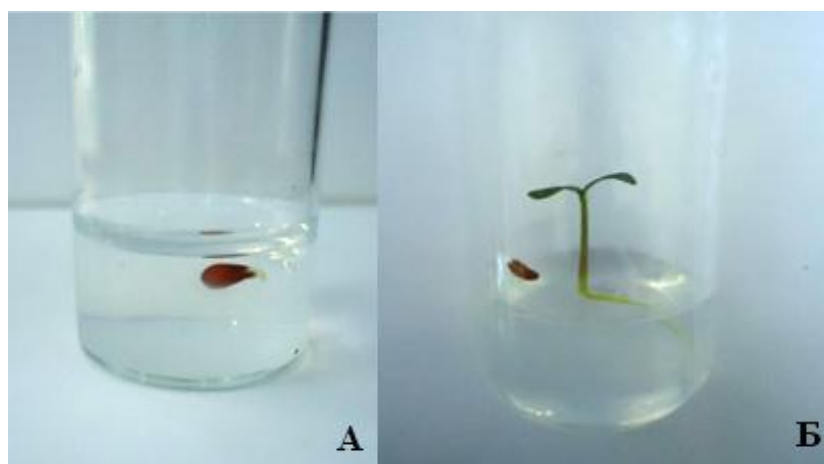


Рис. 2 Проращивание семян барбариса *B. sphaerocarpa* форма 12 на питательной среде: 1 г/л $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,25 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 г/л KH_2PO_4 , 0,125 г/л KCl , 27,8 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 37,3 мг/л $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7 при температуре 23-25°C, освещенности $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 16-ти часовом фотопериоде
А, Б – образование проростка из семени

Через 2-4 недели побеги, полученные из семян всеми вышеуказанными способами, длиной 1-1,5 см срезали и в ламинарном боксе стерилизовали в 0,1% растворе HgCl_2 в течение 10 мин с последующим промыванием в стерильной воде. Асептические верхушки побегов после стерилизации помещали в пробирки со средой МС того же состава, что описан выше. Побеги *in vitro* получали также из зародышей семян. Для чего удаляли семенную кожуру, и в стерильных условиях ламинар-бокса обрабатывали семена раствором «Белизны», разбавленного 1:1 в течение 10 мин. Изолировали зародыши, которые помещали на вышеуказанную питательную среду (рис. 3 А, Б, В).

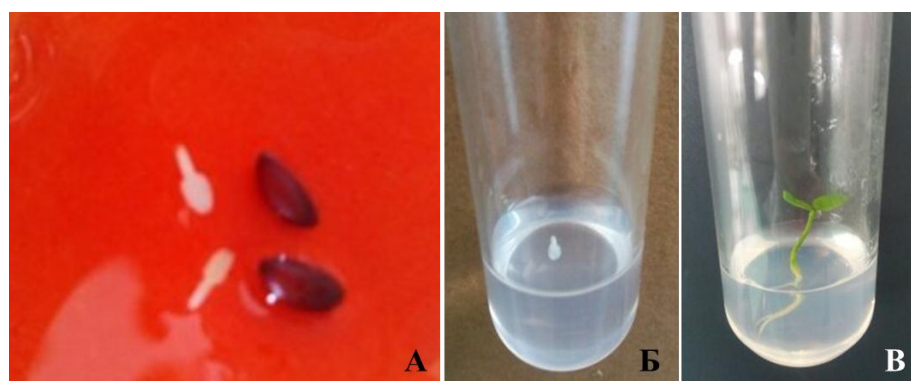


Рис. 3 Получение побегов из зародышей *B. vulgaris*

А – семена и изолированные зародыши; Б – зародыш на питательной среде МС с 30 г/л сахарозы, 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ГК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агар, рН 5,7; В – развивающийся из зародыша побег

Введённые в культуру *in vitro* экспланты были протестированы на отсутствие эндофитной инфекции 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, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, gelrite 6 г/л, рН 6,9 [10]. Во время пересадки выживших визуально чистых микрочеренков на свежую питательную среду, срезали основания микропобега и помещали в чашки Петри на среду 523, культивировали при температуре 25°C в течение 1-2 недель (рис. 4А). Среда со стерильными эксплантами остается прозрачной, тогда как помутнение среды или рост колоний указывает на инфицированность микропобегов, которые следует сразу же отбраковывать (рис. 4Б).



Рис. 4 *B. sphaerocarpa* форма 14

А – рост побегов на питательной среде МС, с 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л БАП, 0,01 мг/л ИМК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агар, рН 5,7, при 23-25°C, освещенности $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 16-ти часовом фотопериоде; Б – экспланты барбариса на среде 523

Были испытаны 16 вариантов питательной среды МС с разными модификациями фитогормонов и витаминов. Пробирочные растения выращивали в светокультуральной комнате при температуре 23-25°C, освещенности $40 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 16-ти часовом фотопериоде, пассировали на свежеприготовленную питательную среду с интервалом 3-4 недели.

Коэффициент размножения микрочеренков барбариса рассчитывался по формуле: $P=a/v\cdot c$,

где а - кол-во образовавшихся побегов

в - кол-во высаженных побегов

с - кол-во пассажей

Результаты и обсуждение

Для введения в культуру *in vitro* Барбариса илийского, Б. круглоплодного и Б. цельнокрайнего использовали однолетние черенки, которые проращивали в лабораторных условиях. Процент регенерации при этом составил от 37,2% до 45,4%. Для введения в культуру *in vitro* использовали также семена, пророщенные во влажном перлите. При этом лабораторная всхожесть семян *B. amurensis*, *B. iliensis*, *B. nimmularia*, *B. sibirica*, *B. integerrima* составила от 62,1 до 92,3% (рис. 5).

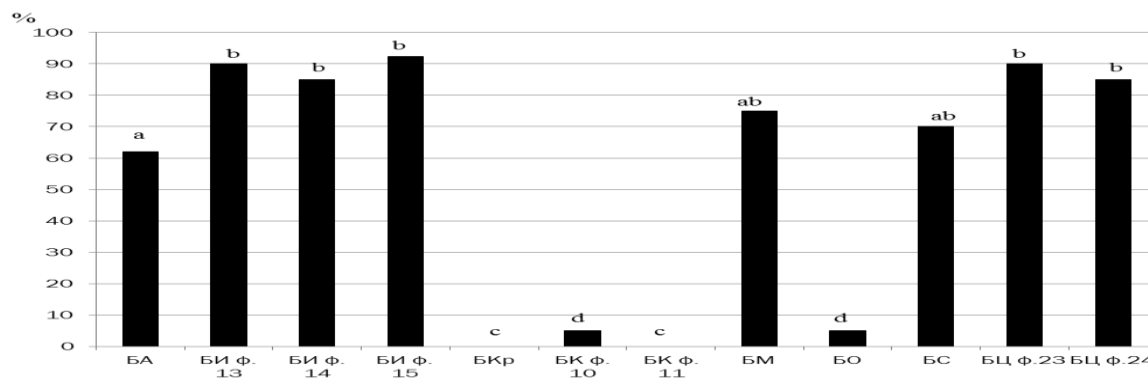


Рис. 5 Результаты проращивания семян барбариса в перлите. БА – Б. амурский, БИ – Б. илийский, БКр – Б. корейский, БК – Б. круглоплодный, БМ – Б. монетный, БО – Б. обыкновенный, БС – Б. сибирский, БЦ – Б. цельнокрайний. Значения, обозначенные разными буквами, различаются достоверно между собой при $p < 0,01$

Однако было установлено, что семена *B. koreana*, *B. sphaerocarpa* и *B. vulgaris*, практически не прорастают во влажном перлите. Выявлено, что при проведении для семян скарификации – повреждение оболочки семян с помощью тонкого лезвия, лабораторная всхожесть выше указанных образцов возрастала в среднем до 26,7%. Для увеличения процента лабораторной всхожести было принято решение провести для семян этих образцов стратификацию, а также прорастить зародыши в культуре *in vitro* и семена на питательной среде Кнопа. В результате лабораторная всхожесть плохо прораставших образцов барбариса после стратификации увеличилась в среднем до 78,8%. На среде Кнопа было отмечено в среднем 53,4% прорастания, у зародышей отмечали в среднем 73,3% образования побегов (рис. 6).

Далее для побегов, полученных из проросших семян в перлите и побегов, проросших из черенков, для введения в культуру *in vitro* необходима была стерилизация в 0,1% растворе HgCl_2 в течение 10 мин. Асептические верхушки побегов помещали в пробирки со средой: МС с 30 г/л сахарозы, 1,0 мг/л БАП, 0,01 мг/л ИМК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7 и культивировали при температуре 23-25°C, освещенности $40 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 16-ти часовом фотопериоде. В течение 1-4 недели наблюдали за ростом

побегов в культуре *in vitro*. В результате отбраковали в среднем по образцам: 39,6% побегов, на которых была выявлена инфицированность и 12,6% побегов с некрозом (рис. 7).

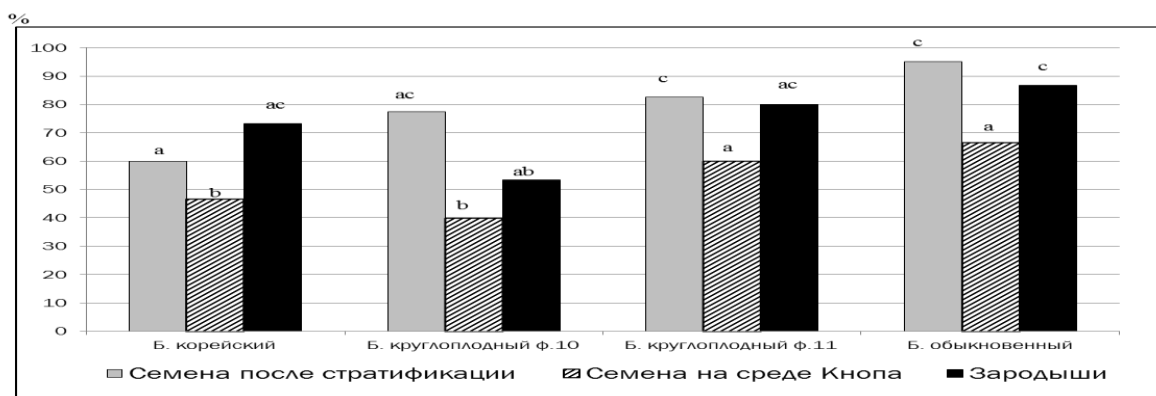


Рис. 6 Результаты прорастания семян и зародышей барбариса. Значения, обозначенные разными буквами, различаются достоверно между собой при $p < 0,01$

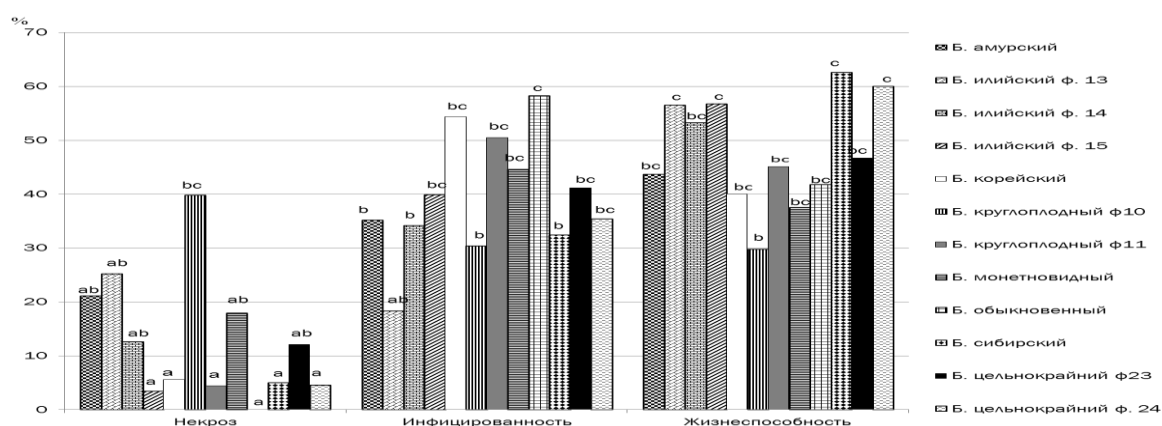


Рис. 7 Результаты введения в культуру *in vitro* побегов барбариса, пророщенных из семян. Значения, обозначенные разными буквами, различаются достоверно между собой при $p < 0,01$

Следующим наиболее важным этапом для успешного клонального микроразмножения побегов *in vitro*, служил контроль чистоты пробирочных растений на специализированной среде 523 для детекции бактерий и грибов. Проверка показала, что в среднем 54,5% побегов, введенных в культуру *in vitro*, на которых инфекция визуально не проявлялась, были поражены эндофитной инфекцией.

Большое значение при введении в культуру *in vitro* и клональном микроразмножении растений имеет состав питательной среды. Основным требованием к питательной среде является обеспечение высокого коэффициента размножения, т.е. максимальной регенерации растений из микрочеренков в минимальные сроки [2, 4]. В основном значение имеет соотношение регуляторов роста и минеральных веществ в питательной среде. Поэтому для дальнейшего успешного клонального микроразмножения важно было подобрать оптимальную их концентрацию (рис. 8 А-В). Средой, на которой получили качественные растения и максимальный коэффициент размножения была питательная среда МС с 30 г/л сахарозы, с удвоенной концентрацией ХЖ, 0,8 мг/л БАП, 1 мг/л ГК, 0,02 мг/л ИМК, 1 мг/л АК, 2 мг/л ПК, 1,75 г/л джелрата, 4 г/л агара, pH 5,7 (рис. 8 Г).

В результате проведенной работы создана коллекция растений барбариса *in vitro*, состоящая из 59 образцов: 1 форма *B. amurensis*, 12 форм – *B. iliensis*, 27 – *B.*

integerrima, 1 – *B. koreana*, 1 – *B. nummularia*, 2 – *B. oblonga*, 1 – *B. sibirica*, 12 – *B. sphaerocarpa*, 1 – *B. thunbergii*, 1 – *B. vulgaris*.

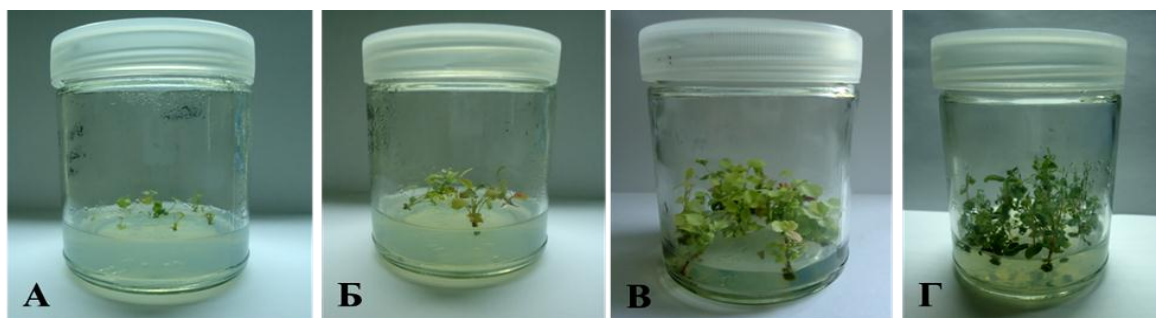


Рис. 8 Развитие побегов *B. iliensis* форма 10 на различных вариантах питательных сред
 А – ½МС с 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л БАП, 0,01 мг/л ИМК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7; Б – МС с 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л БАП, 2 мг/л ГК, 0,01 мг/л ИМК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7; В – МС с 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л БАП, 3 мг/л ГК, 0,05 мг/л ИМК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7; Г – МС с 30 г/л сахарозы, 5 мг/л ХЖ, 0,8 мг/л БАП, 1 мг/л ГК, 0,02 мг/л ИМК, 1 мг/л АК, 2 мг/л ПК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7

Полученная коллекция *in vitro* послужит не только для создания криобанка, а также для проведения широкого спектра биологических и медицинских исследований. Среди них, прежде всего, разработка надежной методологии сохранения генетических ресурсов, особенно редких и исчезающих видов с возможной последующей их реинтродукцией в естественные места обитания.

Коллекция может быть вовлечена в селекционный процесс по улучшению существующих и созданию новых сортов, для закладки элитных питомников, а также для международного обмена генетическими ресурсами.

Выводы

В результате проведенных исследований, установлено, что для введения в культуру *in vitro* апексов побегов барбариса, пророщенных в лабораторных условиях, наиболее оптимальной является 7 минутная обработка в HgCl₂, регенерация – 27,0%. Для побегов, полученных из семян, наиболее эффективна 10 мин обработка – 52,3% жизнеспособности.

Для получения побегов из семян *B. koreana*, *B. sphaerocarpa* и *B. vulgaris*, необходима была скарификация, повышающая лабораторную всхожесть до 26,7% или стратификация, повышающая лабораторную всхожесть до 78,8%. Кроме того, эффективно проращивание семян этих видов на среде Кнопа – 53,4% и проращивание зародышей – 73,3% образования побегов.

Для дальнейшего успешного клонального микроразмножения была необходима проверка полученных побегов *in vitro* на специализированной среде 523 для детекции бактерий и грибов. Проверка показала, что в среднем 54,5% побегов, введенных в культуру *in vitro*, у всех исследуемых образцов, не имеющих видимого заражения, были поражены эндофитной инфекцией.

При вариации минеральных веществ и регуляторов роста в питательных средах для размножения было выявлено, что оптимальной является среда МС с 30 г/л сахарозы, с удвоенной концентрацией ХЖ, 0,8 мг/л БАП, 1 мг/л ГК, 0,02 мг/л ИМК, 1 мг/л АК, 2 мг/л ПК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7.

В результате проведенной работы создана коллекция растений барбариса *in vitro*, состоящая из 59 образцов: 1 форма *B. amurensis*, 12 – *B. iliensis*, 27 – *B. integerrima*, 1 – *B. koreana*, 1 – *B. nummularia*, 2 – *B. oblonga*, 1 – *B. sibirica*, 12 – *B. sphaerocarpa*, 1 – *B. thunbergii*, 1 – *B. vulgaris*.

Список литературы

1. Красная книга Казахской ССР. Часть 2. Растения. – Алма-Ата, 1981. – 263 с.
2. Ковальчук И.Ю., Волгина М.А., Насибулина А.Х. Использование клонального микроразмножения в селекции плодовых и ягодных культур // Ускорение размножения посадочного материала плодовых культур с использованием биотехнологич. методов. – Алма-Ата: КАСХН, 1991. – С. 6-14.
3. Попов А.С. Криогенное хранение культур клеток растений // Культура клеток растений. – М: Наука, 1981. – С. 150-162.
4. Трускинов Э.В. Культура *in vitro* как современный способ воспроизведения, сохранения и интродукции вегетативно размножаемых растений // Биол. разнообразие. Интродукция растений. – С.П., 2007. – С. 85.
5. 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.
6. Knop W. Quantitative Untersuchungen Über den Ernährungsprozess der Pflanze // Landwirtschaftl. Vers. Stn. – 1865. – N 7. – P. 93-107.
7. Lynch P.T., Benson E.E., Harding K. Climate change: the role of ex situ and cryo-conservation in the future security of economically important, vegetatively propagated plants // J. Horticultural Science & Biotechnology. – 2007. – Vol. 82, N. 2. – P. 157-160.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-479.
9. Reed B.M. The basics of *in vitro* storage and cryopreservation // National Clonal Germplasm Repository, Corvallis, O.R. USA. – 2002. – P. 34-46.
10. 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.

Статья поступила в редакцию 24.10.2016 г.

Romadanova N.V., Mishustina S.A., Karasholakova L.N., Aralbayeva M.M., Rakhimbayev I.R., Kushnarenko S.V. *In vitro* collection of wild *Berberis* species // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2016. – № 121. – P. 69-76.

There is *in vitro* collection that includes 59 forms of 10 wild barberry from JSC «Forest nursery», Karaganda State University, Altai botanical garden arboretum, Bolshaya Almatinka, Ili, Charyn and Zeravshan floodplains. Shoots germinated from barberry seeds were used for an introduction into *in vitro* culture: Form 1 *Berberis amurensis* Rupr., 12 – *B. iliensis* M. Pop, 27 – *B. integerrima* Bunge, 1 – *B. koreana* Palib., 1 – *B. nummularia* Bge., 2 – *B. oblonga* (Regel) C.K.Schneid., 1 – *B. sibirica* Pall., 12 – *B. sphaerocarpa* Kar. et Kir., 1 – *B. thunbergii* DC., 1 – *B. vulgaris* L. Seeds of all species except *B. koreana*, *B. sphaerocarpa*, *B. vulgaris* have germinated immediately in wet perlite in 7-22 days after harvesting, the laboratory germination ranged from 66.2% to 95.6%. The stratification in moist perlite for 2 months at 4°C was necessary for seed germination of 3 forms mentioned above and the laboratory germination thereby ranged from 22.2% to 100%. Germinated seedlings were treated with commercial bleach «Belizna» diluted 1:1 for 10 min and were propagated on Murashige and Skoog nutrient medium (MS) with 30 g/l sucrose, 1.0 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP), 0.01 mg/l indole butyric acid (IBA), 1.75 g/l gelrite, 4 g/l agar, pH 5.7. *In vitro* *Berberis sphaerocarpa* shoots that showed low germination rate even after stratification were also obtained from embryos that were isolated from the seeds and placed on the medium described above, then 100% germination was observed. *In vitro* plants derived from the seeds and the embryos were tested for endophytic infection on 523 specialized medium for the growth of bacteria and fungi consisting of 10 g/l sucrose, 8 g/l casein hydrolyzate, 4 g/l yeast extract, 2 g/l KH₂PO₄, 0,15 g/l MgSO₄•7H₂O, 6 g/l gelrite, pH 6.9. Thus, 19.6% of infection-free plants successfully developed under *in vitro* conditions. Sixteen nutrient medium variants were tested for clonal micropropagation and MS medium was optimal with 30 g/l sucrose, double concentration of MS iron, 0.8 mg/l BAP, 1 mg/l gibberellic acid, 0.02 mg/l IBA, 1 mg/l ascorbic acid, 2 mg/l calcium pantothenate, 1.75 g/l gelrite, 4 g/l agar, pH 5.7. Established *in vitro* barberry collection will be used for the creation of a cryogenic bank, as well as for setting up elite nurseries and for the international exchange of genetic resources.

Keywords: *barberry; seeds; embryos; tissue and organ culture; aseptic collection; cryobank.*