

Приложение 2. Протоколы модифицированных методов витрификации для криоконсервации образцов рода *Rubus*
Supplement 2. Protocols for modified vitrification methods for cryopreservation of *Rubus* specimens

Страна, учреждение / Country, institution	Россия, ВИР / Russia, VIR	США, NCGRP / USA, NCGRP	Норвегия, NIBIO / Norway, NIBIO	Казахстан, ИББР / Kazakhstan, IPBB
Публикация / Publication	Ukhatova et al., 2017*; Dunaeva et al., 2017	Jenderic et al., 2025	Ma et al., 2024	Turdiyev et al., 2024
Метод / Method	Дроплет–витрификация / Droplet vitrification	Дроплет–витрификация / Droplet vitrification	Дроплет–витрификация / Droplet vitrification	Витрификация–модификация/ (Kovalchuk et al., 2010) / Vitrification– modification (Kovalchuk et al., 2010)
Этапы / Stages				
Микроразмножение	MS с витаминами, дополненная: - 6-БАП (0,5 мг/л) - ИМК (0,05 мг/л) - сахарозой (30 г/л) - агаром (7 г/л) Культивирование 4–6 недель. Акклиматизация к холоду не проводится.	MS с витаминами, дополненная: - БА (6-БАП) (1 мг/л) - ИМК (0,1 мг/л) - ГК (0,1 мг/л) - FeSO ₄ ·7 H ₂ O (13,95 мг/л) - Na ₂ -EDTA (18,65 мг/л) - сахарозой (30 г/л) - гелритом (1,45 г/л) - бакто-агаром (3,5 г/л) После 4–6 недель культивирования акклиматизация к холоду в течение трех недель с суточным режимом 8 час. при 22° С (интенсивность света 10 μmol m ⁻² s ⁻¹), затем 16 час. при – 1°С (без освещения).	MS с витаминами, дополненная: - 6-БАП (0,5 мг/л) - ИМК (0,1 мг/л) - Fe-EDDHA (36 мг/л) - сахарозой (30 г/л) - агаром (6 г/л) Акклиматизация к холоду не проводится.	MS с витаминами, дополненная: - NaFe EDTA (10 мг/л) – двухкратное увеличение - 6-БАП (0,5 мг/л) - ИМК (0,1 мг/л) - сахарозой (30 г/л) - гелритом (1,45 г /л) - бакто-агаром (3,5 г/л) После трех недель культивирования акклиматизация к холоду в течение трех недель с суточным режимом 8 час. при 22° С (интенсивность света 10 μmol m ⁻² s ⁻¹), затем 16 час. при – 1°С (без освещения).
Изоляция эксплантов (апексов побегов <i>in vitro</i> растений), предкультивирование	MS с витаминами жидкая. Предкультивирование не проводится.	MS с витаминами, дополненная: - 5% DMSO (стерилизация через фильтр) - бакто-агаром (1 г/л) Акклиматизация эксплантов к холоду 48 час. с суточным режимом 8 час. при 22°С (интенсивность света 10 μmol m ⁻² s ⁻¹), затем 16 час. при – 1°С (без освещения).	пошаговое культивирование в растворах сахарозы: - 0,25 М (сутки), - 0,5 М (сутки), - 0,75 М (сутки).	MS с витаминами, дополненная сахарозой (0,3 М). Культивирование на агаровой питательной среде двое суток в условиях холодной акклиматизации с суточным режимом 8 час. при 22°С (интенсивность света 10 μmol m ⁻² s ⁻¹), затем 16 час. при – 1°С (без освещения).

Страна, учреждение / Country, institution	Россия, ВИР / Russia, VIR	США, NCGRP / USA, NCGRP	Норвегия, NIBIO / Norway, NIBIO	Казахстан, ИББР / Kazakhstan, IPBB
Публикация / Publication	Ukhatova et al., 2017*; Dunaeva et al., 2017	Jenderic et al., 2025	Ma et al., 2024	Turdiyev et al., 2024
Метод / Method	Дроплет–витрификация	Дроплет–витрификация	Дроплет–витрификация	Витрификация–модификация (Kovalchuk et al., 2010) / Modified vitrification (Kovalchuk et al., 2010)
Этапы / Stages				
Обработка эксплантов осмо – и криопротекторами	Загрузочный раствор LS: MS с витаминами, дополненная: - сахарозой (0,4 М) - глицеролом (2 М) Культивирование при комнатной температуре 20 мин.	Загрузочный раствор LS: MS с витаминами, дополненная: - сахарозой (0,4 М) - глицеролом (2 М) Культивирование при комнатной температуре 2 час.	Загрузочный раствор LS: MS с витаминами, дополненная: - сахарозой (0,4 М) - глицеролом (2 М) Культивирование при комнатной температуре 20 мин.	Загрузочный раствор LS: MS с витаминами, дополненная: - сахарозой (0,4 М) - глицеролом (2 М) Культивирование при комнатной температуре 20 мин.
	Витрифицирующий раствор PVS2: - MS с витаминами - 15% (w/v) глицерол - 15% (w/v) DMSO - 30% (w/v) этиленгликоль - сахароза 0,4 М PVS2 используется предварительно охлажденный до 0°C. Культивирование в растворе PVS2 30 мин. при комнатной температуре.	Витрифицирующий раствор PVS2: - MS с витаминами - 15% (w/v) глицерол - 15% (w/v) DMSO - 30% (w/v) этиленгликоль - сахароза 0,4 М Культивирование в растворе PVS2 40 мин. при комнатной температуре.	Витрифицирующий раствор PVS2: - MS с витаминами - 30% (w/v) глицерол - 15% (w/v) DMSO - 15% (w/v) этиленгликоль - сахароза 0,4 М Условия культивирования не приводятся.	Витрифицирующий раствор PVS2: - MS с витаминами - 30% (w/v) глицерол - 15% (w/v) DMSO - 15% (w/v) этиленгликоль - - сахароза 0,4 М Культивирование в растворе PVS2 80 мин. на льду.
Размораживание эксплантов	MS с витаминами, дополненная сахарозой (1,2 М) Культивирование при комнатной температуре 15 мин.	MS с витаминами, дополненная сахарозой (1,2 М) Культивирование при комнатной температуре 20 мин.	MS с витаминами, дополненная сахарозой (0,75 М) Культивирование при комнатной температуре 20 мин.	Вода 45°C – 1 мин, далее вода 22°C – 1 мин., дважды погружение в жидкую питательную среду MS, дополненную сахарозой (1,2 М), высушивание на фильтровальном диске и перенос на питательную среду для отрастания апексов.
Посткультивирование	Данный этап отсутствует.	Данный этап не приводится.	Культивирование апексов в растворе сахарозы (0,75 М) в темноте трое сут.	Культивирование апексов в жидкой питательной среде MS, дополненной сахарозой (1,2 М) в течение 1-2 мин.

Страна, учреждение / Country, institution	Россия, ВИР / Russia, VIR	США, NCGRP / USA, NCGRP	Норвегия, NIBIO / Norway, NIBIO	Казахстан, ИББР / Kazakhstan, IPBB
Публикация / Publication	Ukhatova et al., 2017*; Dunaeva et al., 2017	Jenderic et al., 2025	Ma et al., 2024	Turdiyev et al., 2024
Метод / Method	Дроплет–витрификация / Droplet vitirification	Дроплет–витрификация / Droplet vitirification	Дроплет–витрификация / Droplet vitirification	Витрификация–модификация (Kovalchuk et al., 2010) / Modified vitrification (Kovalchuk et al., 2010)
Этапы / Stages				
Регенерация апексов/	MS с витаминами, дополненная: - сахарозой (20 г/л) - агаром (7 г/л) - зеатин рибозидом (0,5 мг/л) - ИУК (0,5 мг/л) - ГК (0,2 мг/л). Фитогормоны стерилизуют через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм.	Среда для микроразмножения, из которой исключается ИМК.	Среда для микроразмножения.	Среда для микроразмножения.
Образцы, число	13 образцов: сорта малины <i>Rubus idaeus</i> L.	25 образцов: сорта малины <i>R. idaeus</i> L. (6), сорта ежевики (9), образцы дикорастущих видов (3), селекционные линии ежевики (6), морошка (1).	23 образца: сорта малины <i>R. idaeus</i> L.	25 образцов: сорта малины <i>R. idaeus</i> L. (13), дикорастущие виды (2), селекционные гибриды (10).
Характеристика посткриогенной регенерационной способности	От 24,2 % до 89,3%* Высокое варьирование между повторностями опыта.	50% – 90%. **	80% и выше **	40% – 90% **

*Данный протокол был использован и в настоящей работе / This protocol was also used in the present work.

**Среднее значение уровня посткриогенной регенерационной способности с величиной стандартной ошибки не приводятся / The mean value of the post-cryogenic regenerative capacity with the standard error is not given.

Использованные сокращения / Abbreviations used:

6 БАП – 6-бензиламинопурин / 6 BAP – 6-benzylaminopurine; ИМК – индолил-3-масляная кислота / IBA – Indole-3-butyric acid; НУК – α -нафтилуксусная кислота / NAA – α -naphthylacetic acid; ГК – гибберелловая кислота / GA – gibberellic acid; DMSO – диметилсульфоксид / Dimethyl sulfoxide.