

**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
( Н И У « Б е л Г У » )**

**ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК  
КАФЕДРА БИОТЕХНОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ**

**ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОЛИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ РЕДКИХ И  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ, ДИКОРАСТУЩИХ И  
ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛГОРОДСКОЙ  
ОБЛАСТИ**

Выпускная квалификационная работа  
обучающегося по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология  
очной формы обучения, группы 07001316  
Гайдай Полины Александровны

Научный руководитель  
к.б.н., доцент  
Маслова Е.В.

БЕЛГОРОД 2017

## О Г Л А В Л Е Н И Е

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1 Общая характеристика метода культуры растительных клеток тканей.....	5
1.1.1.Перспективы использования и области применения метода изолированной культуры клеток и тканей растений .....	6
1.2 Факторы, влияющие на культивирование растительных клеток и тканей .....	7
1.2.1 Создание асептических условий.....	7
1.2.2. Генетические и физиологические факторы культивирования растительных клеток .....	8
1.2.3 Физические факторы культивирования растительных клеток .....	9
1.2.4 Влияние состава питательной среды на культивирование растительных клеток и тканей .....	10
1.2.5 Влияние регуляторов роста на культивирование растительных клеток и тканей .....	13
1.3 Некоторые виды редких и лекарственных растений, дикорастущих и интродуцированных на территории Белгородской области.....	16
1.3.1.Биологическая характеристика и перспективы применения <i>Bellevalia sarmatica</i> (Georgi) Woronow. ....	16
1.3.2. Биологическая характеристика и перспективы применения <i>Nigella damascena</i> L. ....	18
1.3.3.Биологическая характеристика и перспективы применения <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench.....	20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	23
2.1. Материалы исследования.....	23
2.2. Методы исследования .....	24
2.2.1. Выбор, сбор, сушка, хранение. ....	24
2.2.2. Приготовление и стерилизация питательных сред.....	25
2.2.3. Определение оптимальной концентрации и времени воздействия гибберелловой кислоты на растительные объекты. ....	26
2.2.4. Стерилизация растительных объектов и создание асептических условий.....	27
2.2.5. Получение и культивирование стерильных проростков .....	29
2.2.6. Статистическая обработка данных .....	29
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	30
3.1. Влияние стерилизующих агентов на количество полученных стерильных эксплантов .....	30
3.1.1. Стерилизация растительных эксплантов <i>Bellevalia sarmatica</i> .....	30
3.1.2. Стерилизация растительных эксплантов <i>Nigella damascena</i> .....	31

3.2.3. Стерилизация растительных эксплантов <i>Echinacea purpurea</i> .....	32
3.2 Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов .....	34
3.2.1 Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов вида <i>Bellevia sarmatica</i> .....	34
3.2.2. Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов вида <i>Nigella damascena</i> .....	35
3.2.3. Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов вида <i>Echinacea purpurea</i> .....	36
3.3 Изучение влияния гибберелловой кислоты на семена редких и лекарственных видов растений .....	38
3.3.1 Изучение влияния гибберелловой кислоты на семена вида <i>B. sarmatica</i> .....	38
3.3.2 Изучение влияния гибберелловой кислоты на семена вида <i>Nigella damascena</i> .....	43
3.3.3 Изучение влияния гибберелловой кислоты на семена вида <i>Echinacea purpurea</i> .....	48
3.4 Подбор питательных сред для культивирования редких и лекарственных видов растений .....	53
3.4.1 Подбор питательных сред для культивирования стерильных эксплантов вида <i>B.</i> <i>sarmatica</i> .....	53
3.4.2 Подбор питательных сред для культивирования стерильных проростков вида <i>Nigella damascena</i> .....	54
3.4.3 Подбор питательных сред для культивирования стерильных проростков вида <i>Echinacea purpurea</i> .....	55
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	57
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК .....	59
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	65

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время набирают активность разработки технологий получения изолированных культур *in vitro* растений, численность которых сокращается, а также растений, используемых в качестве лекарственного сырья (Жолобова, 2012). Метод культивирования растительных тканей в условиях *in vitro* позволяет не только получать в короткие сроки большое количество растений от одного экспланта, но также даёт возможность получения содержащихся в растении вторичных метаболитов в большем количестве, нежели из нативного растения (Орлова, 2003).

Ввиду того, что изучаемые виды (*Nigella damascena* (L.) и *Echinacea purpurea* (L.) Moench) являются ценным лекарственным сырьём, а вид *Bellevalia sarmatica* (Georgi) Woronow - исчезающим, их успешное размножение в условиях *in vitro* является актуальным в настоящее время.

Исходя из вышеизложенного нами была поставлена следующая цель: получение изолированной культуры редких и лекарственных видов растений, дикорастущих и интродуцированных на территории Белгородской области.

В соответствии с изложенной целью были поставлены следующие задачи исследования:

1. Определение оптимальных стерилизующих агенты для растительных эксплантов видов *N. damascena*, *E. purpurea* и *B. sarmatica*;
2. Определение оптимальной концентрации и времени воздействия гибберелловой кислоты на семена видов *N. damascena*, *E. purpurea* и *B. sarmatica*;
3. Подбор оптимального состава питательных сред для культивирования в условиях *in vitro* растений видов *N. damascena*, *E. purpurea* и *B. sarmatica*.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Общая характеристика метода культуры растительных клеток тканей

Методом культуры растительных клеток и тканей называют выращивание в искусственных условиях различных растительных клеток, тканей, органов. Этот метод был разработан сравнительно недавно и получил широкое применение в современной биотехнологии (Авксентьева, 2011; Калинин 1980; Бутенко и др.1999).

Для получения культуры растительных клеток могут использоваться не дифференцированные меристематические клетки растения (апексы, меристемы пазушных почек), а также клетки, уже прошедшие процесс дифференциации (клетки листа, пыльники и т.д.) (Калинин, 1992 с.17).

К культуре растительных клеток и тканей выращиваются *in vitro* не только отдельные растительные органы, но суспензионные культуры, каллусные культуры клеток; изолированные зародыши растительных организмов, а также культуры протопластов (Циренов, 2003).

Выбор растительных объектов, которые можно ввести в изолированную культуру, очень разнообразен. Чаще всего в исследованиях используются ткани и клетки покрытосеменных растений. Труднее создать условия для стабильных культур древесных растений (Дитченко, 2007, с.5). Наиболее сложные в этом отношении хвойные растения. Их клетки содержат большое количество соединений, ингибирующих пролиферацию клеток (Широков и др., 2012 ).

В качестве эксплантов могут выступать и мохообразные, лишайники, папоротниковидные, а также многоклеточные водоросли, но получение и поддержание их культуры затруднено (Дитченко, 2007, с.4-5).

В основе методов изолированной культуры растений лежит способность растительной клетки реализовывать генетическую информацию,

обеспечивающую ее развитие до целого организма - тотипотентность. Это свойство могут проявлять практически все клетки растительного организма.

Однако для ряда растений невозможно проявление тотипотентности в составе специализированной ткани из-за ряда регулирующих механизмов. Эти механизмы перестают действовать при извлечении клетки из растения и помещении её на питательную среду, что даёт ей возможность восстановить растение из клетки или группы клеток (Дитченко 2007, Волова 1997).

#### 1.1.1. Перспективы использования и области применения метода изолированной культуры клеток и тканей растений

Область применения метода изолированной культуры растительных клеток и тканей разнообразна и имеет тенденцию к постоянному расширению:

1. Получение растений, трудноразмножаемых традиционными способами;
2. Получение оздоровленного генетически однородного посадочного материала в сравнительно короткие сроки;
3. Получение содержащихся в растениях биологически активных соединений, а также синтез новых;
4. Использование культуры растительных клеток для биотрансформации конечных продуктов;
5. Использование изолированных клеточных культур в фундаментальных исследованиях физиологии, цитологии, генетики и селекции (Авксентьева 2011; Калинин 1992 ; Сазыкин, 2008).

## 1.2 Факторы, влияющие на культивирование растительных клеток и тканей

В настоящее время не существует высших растений, для которых неприменим метод изолированной культуры клеток и тканей. Но его использование возможно только при учёте определённых условий и факторов, влияющих на рост и развитие изолированной культуры (Зюбр 2008).

### 1.2.1 Создание асептических условий

От соблюдения правил асептики и поддержания стерильности в лаборатории культуры клеток и тканей зависит успешность всей работы.

Лаборатория, в которой проводятся работы по культивированию клеток высших растений, должна содержаться в чистоте и порядке, необходима периодическая дезинфекция помещений.

Все манипуляции с растительными эксплантами должны проводиться в ламинарном боксе с соответствующим уровнем защиты. Стерилизация рабочей поверхности ламинарного бокса достигается за счёт работы встроенных ультрафиолетовых ламп. После стерилизации ультрафиолетом рабочая поверхность ламинарного бокса дополнительно обрабатывается этиловым спиртом (Дитченко 2007 с.15).

Не менее важна стерилизация лабораторной посуды и инструментов, используемых в работе. Их заворачивают в бумагу или фольгу и стерилизуются в сухожаровом шкафу от 1,5 до 2 часов при температуре от 160 до 190 градусов. Перед самой работой в боксе инструменты погружаются в ёмкость с 96% спиртом и обжигаются в пламени спиртовки. Инструменты меняются после каждой манипуляции.

Питательные среды, не содержащие термолабильных веществ, стерилизуют в автоклаве 15-40 минут при давлении 0,5–1 атм.

Термолабильные компоненты среды стерилизуются отдельно холодной стерилизацией с помощью фильтров, после чего в стерильных условиях ламинарного бокса добавляются в стерильную питательную среду.

Растительные объекты также подвергаются стерилизации. Для каждого вида растения подбирается наиболее подходящий для него стерилизатор, его концентрация и время воздействия, что позволяет не только эффективно обеззаразить растительный объект, но и сохранить его жизнеспособность. Перед использованием стерилизующего вещества растительные объекты отмываются в мыльном растворе, очищаются от лишних тканей и предварительно стерилизуются в 70% растворе этанола. После стерилизации растительные объекты несколько раз отмываются стерильной водой для удаления стерилизующего агента (Дитченко, 2007; Сорокина, 2002).

#### 1.2.2. Генетические и физиологические факторы культивирования растительных клеток

Наиболее сильно на культивирование растительной ткани влияют генетические факторы. Так, например, однодольные травянистые растения менее выражено обладают способностью к регенерации по сравнению с двудольными. Другим примером может служить то, что культуры тканей разных сортов хмеля по-разному реагировали на соотношение и концентрацию стимуляторов роста в питательной среде.

Влияние генетических различий наблюдается не только среди клеточных культур разных семейств или видов, но и в культурах, полученных из разных органов одного материнского растения.

К физиологическим факторам относится время года, в которое проводилась изоляция экспланта. Известно, что ткани и органы, которые были изолированы в период покоя менее чувствительны к составу питательной среды, в отличии от тех, что были изолированы во время вегетации растения.



Большое значение имеет размер экспланта. Регенерационная способность растительного объекта тем выше, чем большего размера используется растительный эксплант. Из эксплантов большого размера на питательной среде спонтанно могут образовываться побеги и корни, вне зависимости от содержания фитогормонов. Но в то же время эксплант не должен быть слишком большим, т.к. с увеличением размера экспланта повышается опасность заражения культуры (Тимофеева, 2012).

### 1.2.3 Физические факторы культивирования растительных клеток

К физическим факторам культивирования растительных эксплантов относят влияние кислотности питательной среды, температурного режима и освещённости на состояние культуры растительных клеток. При культивировании растительных тканей учитываются требования материнского растения к фотопериоду. Чаще всего при культивировании растений используют освещённость в при 14-16 часов. Такой режим способствует развитию корней и побегов для большинства растений.

От температуры культивирования зависит скорость биохимических реакций в растительной ткани, что является немаловажным фактором получения стабильной культуры растительных клеток. Оптимальным для большинства растительных культур является диапазон температур от 23 до 28 градусов. Температурный режим растения зависит от вида растения и ареала его обитания.

Кислотность питательной среды определяет доступность питательных веществ для растительных клеток, что немаловажно при их культивировании. Сильнокислые и сильнощелочные среды переводят в нерастворимую форму некоторые важные макро- и микроэлементы, что мешает их усваиванию растениями. Также при высоком значении кислотности некоторые элементы, напротив, растворяются и образуют токсичные для изолированной культуры соединения (Черных и др., 2013). Оптимальным значением кислотности

питательной среды является 5,6-5,8. Однако, некоторые растительные объекты проявляют большую активность при повышении и понижении значения рН. Это связано с тем, что в естественных условиях растения произрастают на почвах с различным показателем кислотности (Тимофеева 2012).

Влажность также играет важную роль при культивировании. Для климатической комнаты, камеры или термостата оптимальным значением влажности является 60- 70% (Цыренов, 2003).

#### 1.2.4 Влияние состава питательной среды на культивирование растительных клеток и тканей

Культивирование изолированных клеток и тканей проводят на многокомпонентных питательных средах. Они могут существенно различаться по своему составу, но все они содержат комплекс необходимых для растительных объектов компонентов (Зюбр, 2008). Состав питательной среды подбирается индивидуально для каждого вида растений, исходя из его потребностей и особенностей развития, что обосновывает большое разнообразие питательных сред и их модификаций (Цыренов, 2003).

Выделяют 5 основных групп компонентов сред для культивирования растительных тканей:

- источники минеральных компонентов (микро- и макроэлементы)
- витамины
- источники углерода (сахароза, глюкоза, фруктоза)
- стимуляторы роста
- отвердители.

Основным компонентом всех питательных сред служат источники микро- и макроэлементов, в роли которых выступают смеси минеральных солей. В их состав входят фосфаты, нитраты, сульфаты, а также ионы калия,

натрия, кальция и магния, железо присутствует в виде хелатов. Все эти элементы важны для нормального развития растительной ткани и выполняют важные функции (Широков и др., 2012).

Не менее важным компонентом питательных сред являются источники углерода, поскольку изолированные растительные ткани требуют наличия в среде органических компонентов в усваиваемой форме. Наиболее популярный источник углерода - сахароза, хотя иногда используются и другие моно- и дисахариды. Полисахариды в питательных средах используются очень редко. Их используют для выращивания опухолевых клеток (Широков и др., 2012; Гапоненко, 2004).

Витамины в питательные среды добавляют для стимуляции биохимических реакций. Они входят в состав многих ферментов, соответственно ферментативная активность в растительной клетке сильно зависит от содержания нужного количества витаминов в питательной среде. (Широков и др. и др., 2012).

Отдельно стоит отметить мезоинозит. Его добавляют в большинство сред культуры клеток. Он может значительно улучшить ответ, особенно у однодольных. Влияние мезоинозита на рост клеток является значительным, хотя его присутствие и не является необходимым для роста многих видов растений (Гапоненко, 2004).

При культивировании растительных клеток и тканей используются твёрдые и жидкие питательные среды. Последние имеют ряд преимуществ, так как обеспечивают большую площадь соприкосновения клетки с питательными элементами среды. Они используются для культивирования суспензионных культур. Так как в жидкой среде экспланты лишены опоры, в пробирки со средой помещаются специальные бумажные или полимерные мостики, выполняющие эту функцию.

Твёрдые питательные среды готовятся из тех же компонентов, что и жидкие, но с добавлением уплотняющих компонентов. При их

использовании клетки не погружаются в среду, а находятся на её поверхности.

В качестве уплотняющего компонента обычно используется агар-агар, полученный из морских водорослей. При нагревании агар растворяется в воде и после остывания до 45°C застывает, образуя гель. Его преимущества в том, что он не разлагается ферментами, выделяемыми растительной тканью, не реагирует с компонентами среды и имеет высокую температуру плавления (Герхард, 1983).

Сравнительно недавно в качестве отвердителя применяется гельрит. Он представляет собой водорастворимый полисахарид, получаемый из бактерий рода *Pseudomonas*. В культуре клеток растений на чашках Петри, обеспечивает очень прозрачный гель, облегчая микроскопический анализ клеток и тканей. Недостатком гельрита является то, что он чувствителен к влиянию фитогормонов (Герхард, 1983).

При размножении *in vitro* часто используют среды Мурасиге и Скуга, Гамборга, Хеллера и другие.

Чаще всего предпочтение отдаётся среде Мурасиге и Скуга, содержащей неорганический азот в высоких концентрациях, что оптимально как для процессов неорганизованного роста, так и для процессов органогенеза.

Среда Гамборга и Эвелеге была разработана для культуры каллуса сои. Общая концентрация солей ниже, чем в среде Мурасиге и Скуга, но больше содержание нитратного азота и меньше аммиачного. В настоящее время применяется по большей части для культивирования клеток и тканей злаковых и бобовых растений

Среда Уайта часто используется в различных модификациях, так как в первоначальном виде содержит низкую концентрацию солей К и Na. Эта среда подходит для проведения процесса укоренения побегов и роста стебля растения после регенерации.

Среда Ничей была разработана для культуры пыльников, и содержит более низкие концентрации соли, чем в среде Мурасиге и Скуга, но не ниже, чем в среде Уайта (Егорова, 2003).

Составы наиболее часто используемых питательных сред представлены в приложениях 1-4.

#### 1.2.5 Влияние регуляторов роста на культивирование растительных клеток и тканей

Одним из важнейших факторов, которые следует учитывать для успешного культивирования растительных клеток и тканей - влияние на растительные объекты с регуляторов роста или фитогормонов.

Фитогормоны – органические вещества, являющиеся регуляторами и координаторами онтогенеза высших растений. Действуют они в небольших количествах и оказывают влияние на взаимодействие между клетками, тканями и органами, регулируют процессы деления и роста клеток, ритмы вегетации и состояния покоя, время созревания семян и т.д. От них зависит функциональная целостность всего организма растения (Гиляров и др. 1986, с 673).

По воздействию различают несколько групп фитогормонов:

Ауксины – это вещества индольной природы. Главные представители этого типа растительных гормонов: ИУК –  $\beta$ -индолил-3-уксусная кислота, ИМК – индолил-3-мас-ляная кислота и др. (Полевой, 1989).

ИУК вызывает усиленное поступление воды в растительную клетку, что приводит к растяжению клетки и изменению скорости химической реакции в ней. Также этот фитогормон ускоряет процессы деления клеток, активизирует дыхательные и гидролитические ферменты, что усиливает процессы энергетического обмена. Результатом этого влияния является стимулирование прорастания семян (Мокшин 2013).

Под влиянием ауксинов активируются кальциевые каналы плазмолеммы, что способствует транспорту воды и питательных веществ. Это активирует рост органов растения. Чаще всего ИУК используется также для индукции каллусогенеза (Алёхина, 2005).

Гиббереллины – это фитогормоны изопреновой природы. Они активизируют рост клеток путём растяжения, а также синтез других гормонов. Наиболее часто в работах по клеточной культуре растений используется гибберелловая кислота (Захарычев, 2007).

Обработка этим гормоном может инициировать выход из состояния покоя. Незадолго до этого гиббереллины накапливаются в различных органах растения. Они активизируют гидролитические ферменты и их синтез, что вызывает более быстрые превращения запасных веществ и прорастание семян. В составе культуральных сред гибберелловую кислоту используют для поддержания роста культур в суспензии, а также для индукции роста побегов (Мокшин 2013).

Цитокинины – это производные аденина. Их подразделяют на природные (кинетин, зеатин, БАП) и синтетические (производные фенилмочевины) (Кузнецов, 2006).

Цитокинины стимулируют клеточное деление и дифференцировку, а также замедляют процессы старения. Они усиливают белковый синтез и репликацию, стимулируют рост листьев и образование клубней (Якушкина, 2005, с. 113).

Цитокинины характеризуются способностью притягивать аминокислоты, углеводы и регуляторные вещества к клеткам и тканям, которые содержат этот гормон (Алёхина, 2005).

Как и указанные выше фитогормоны, этот вид гормонов нарушает покой клубней и индуцирует прорастание семян. В культуре ткани они активизируют деление клеток и снимают апикальное доминирование, а также инициируют появление клеток с прочной клеточной стенкой.

Абсцизовая кислота – природный гормональный ингибитор роста который синтезируется в листьях и в корневом чехлике. Фитогормоны этой группы тормозят процессы роста, индуцированные другими гормонами. Накопление её происходит перед наступлением периода покоя, к его окончанию содержание этого гормона снижается. Обработка растений ауксинами, цитокининами и гиббереллинами ими может подавлять действие абсцизовой кислоты (Кузнецов, 2006).

Этилен представляет собой газ, отличающийся большой летучестью. Как и абсцизовая кислота он представляет собой ингибитор ростовых процессов и клеточного деления, а также в сочетании с другими группами гормонов активирует органогенез. Этилен индуцирует прорастание без доступа света семян, нуждающихся для этого в освещении, активирует рост боковых корней и ингибирует рост главного (Широков и др., 2012).

Фитогормоны производятся в определённых частях растений. Апикальные меристемы побегов служат источников ауксинов, апексы корней являются донорами кинетина, в листовых клетках происходит синтез каурена, гибберелины образуются в корневой зоне растяжения.

Содержание фитогормонов в питательной среде является одним из самых важных факторов, влияющих процесс культивирования растительных объектов. Изменяя соотношение гормонов средах, можно направлять рост культуры в нужную нам сторону.

При культивировании и фитогормоны, добавленные в различных пропорциях, регулируют синтез собственных растительных гормонов. Если При равной концентрации в среде ауксинов и цитокининов активируется процесс каллусогенеза. В то же время при значительном превосходстве ауксинов наблюдается ризогенез, а при обратном соотношении наблюдается развитие почек и побегов (Якушкина, 2005).

### 1.3 Некоторые виды редких и лекарственных растений, дикорастущих и интродуцированных на территории Белгородской области

Белгородская область находится в Европейской части Российской Федерации, на юге и юго-западе Среднерусской возвышенности. Для флоры области характерна зональность, включающая два типа растительности – широколиственные леса и степи (Еленевский и др., 2004).

В регионе высокий уровень развития сельскохозяйственной отрасли экономики, в результате чего на его природную среду оказывается большая антропогенная нагрузка, что сказывается на численности популяция дикорастущих видов растений. На территории области распространено более множество видов растительных организмов, 179 из которых занесены в Красную книгу Белгородской области (Красная книга Белгородской области, 2005).

В настоящее время Белгородская область также является единственным активно действующим центром интродукции в Центрально-Чернозёмном районе.

#### 1.3.1. Биологическая характеристика и перспективы применения *Bellevalia sarmatica* (Georgi) Woronow.

Бельвалия (*Bellevalia*) - род цветковых растений семейства Лилейные (*Liliaceae*). Представители рода *Bellevalia* встречаются не только в России, но также на территории Турции, Израиля, Ирана, Афганистана, Румынии и Молдавии и в Крыму. Насчитывается 60 видов растений, относящихся к этому роду (Шхиян, 2001).

Одним из представителей является вид, встречающийся на территории Белгородской области - бельвалия сарматская (*Bellevalia sarmatica* (Georgi)



Woronow ). Вид относится к роду бельвалия (*Bellevaia*) семейства Лилейные (*Liliaceae*), класс однодольные (*Liliopsida*)(Маевский, 2006).

Это весенне-луковичное многолетнее травянистое растение высотой от 10 до 15 см. На продолговатом стебле с притуплённым рыльцем располагаются от 3 до 7 ремневидных листа. Листья широкие, мясистые. Луковица широкая, яйцевидной формы. цветоножки горизонтально отклонены от стебля. Плод представлен виде трёхгнездной коробочки с выраженными лопастями. Семена у *B. sarmatica* сарматской крупные, чёрные, шаровидной формы. Цветёт *B. sarmatica* многоцветковой кистью с серо-бурыми цветами в апреле-мае. Размножение семенное. Прорастают семена с осени до весны. В культуре цветение наблюдается лишь на пятый год культивирования. В естественных условиях *B. sarmatica* можно найти в степях на сухих местах и глинистых буграх. Как сорное растение *B. sarmatica* растёт на посевах (Красная книга Белгородской области 2005, 71). Общий вид растения представлен на рисунке 1.1



Рис. 1.1 Рис. 1.1. Общий вид цветущего растения *B. sarmatica* (Красная книга Белгородской области, 2005, 71)

Основная часть ареала располагается не на территории России. Данный вид встречается в Причерноморье (Украина), в Молдавии, Болгарии и на Востоке Румынии, а также в Турции и на севере Ирана. В Российской Федерации данный вид произрастает в Ростовской, Воронежской, Волгоградской областях, в Краснодарском и Ставропольском крае, а также

на Кавказе (КК РФ, 284). В Белгородской области *B. sarmatica* распространена в основном в Новоскольском, Вейделевском и Ровеньковском районах (Красная книга Белгородской области, 2005, 71).

В настоящее время вид *B. sarmatica* включен в Красную книгу РФ (2008). Вид включен в Красные книги Республик Дагестан (1998), Калмыкия (2014), Молдова (2015), Северная Осетия-Алания (1999), Краснодарского (1994) и Ставропольского (2013) краев, Белгородской (2005) Воронежской (2011), Волгоградской (2006), Ростовской обл. (2014). Вид охраняется в заповеднике «Ростовский» и ряде ООПТ в Ростовской обл. (КК РФ, 284).

В Красной книге Белгородской области (2005, 200) вид имеет категорию III и статус редкого на территории области вида (Красная книга Белгородской области, 2005, 71).

Растения *B. sarmatica* имеют большое коммерческое и хозяйственное значение, используются в качестве декоративных растений. Содержащиеся в них вторичные метаболиты пока не изучены, их роль требует дальнейшего изучения.

### 1.3.2. Биологическая характеристика и перспективы применения *Nigella damascena* L.

Чернушка (*Nigella*) - род однолетних цветковых растений семейства Лютиковые. Представители рода *Nigella* произрастают в Западной Европе, Северной Африке и Западной Азии. Известно более 20 видов, из которых 10 встречаются на территории России (Крашенинников 1937).

Одним из представителей рода *Nigella*, произрастающим на территории Российской Федерации, является Чернушка дамасская или Девица в зелени (*Nigella damascena* L.) Вид относится к роду Чернушка (*Nigella*) семейства Лютиковые (*Ranunculaceae*), класс Двудольные (*Magnoliopsida*) (Маевский, 2006).

*N. damascena* это однолетнее ветвистое растение с прямым стеблем до 30—60 см в высоту. Листья очередные, дважды-, триждыперисто-рассеченные на линейно-шиповидные доли. Цветки одиночные, до 4 см в диаметре, с 5-8 лепестками в виде двугубых образований; Растение имеет множество тычиной и несколько пестиков, частично сросшихся между собой (Оголевец, 1951; Гаммерман, 1990; Губанов, 1976).

Плоды — вздутые листовки с многочисленными трехгранными поперечно-морщинистыми черными семенами. В отличие от других видов, у *N. damascena* мешочки срастаются между собой до верхушки (Энциклопедический словарь Брокгауза и Ефрона 1890-1707).

Цветет растение всё лето. Семена созревают в августе — сентябре. (Гаммерман, 1990).

В естественных условиях *N. damascena* растёт по сухим степным склонам, на полях и около дорог. Культивируется в парках, на газонах, садах, иногда дичает (Маевский 2014). Общий вид цветущего растения *N. damascena* представлен на рисунке 1.2



Рис. 1.2. Общий вид цветущего растения *N. damascena* (Попова, 2008)

Вид встречается в Северной Африке (Алжир, Тунис, Ливия, Марокко), в Западной Азии, на Кавказе, в Южной и Юго-Восточной Европе (Оголевец 1951).

*N. damascena* является лекарственным, эфирномасличным и декоративным растением. Сырьём для лекарственных препаратов служат семена, содержащие до 30-40% жирного масла, в состав которого входят 30

компонентов, в том числе производные ретинола, токоферола и ситостерина (Маширова, 2012).

Также семена содержат, алкалоид дамасценин, сесквитерпеновые углеводороды, стерин, витамин Е. Кроме того, из семян выделен фермент липаза, который используется для лечения болезней пищеварительного тракта, связанных с заболеваниями печени и поджелудочной железы. В результате исследований был разрешен к применению в медицинской практике препарат «Нигедаза», содержащий выделенную липазу (Орловская и др. 2002).

В листьях *N. damascena* содержится до 430мг витамина С. Также в растениях содержится эфирное масло с приятным запахом земляники или малины, используемое в парфюмерии (Губанов и др. 1976, Кудинов 1986).

### 1.3.3. Биологическая характеристика и перспективы применения *Echinacea purpurea* (L.) Moench

Эхинацея (*Echinacea*) — род многолетних растений из семейства Сложноцветные (*Asteraceae*), класс Двудольные (*Magnoliopsida*). Наиболее изученным представителем этого рода является Эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea*).

Это травянистый многолетник высотой от 120 до 150 см. Корневая система мочковатая недлинная. Стебель шершавый, ветвится. Прикорневые листья собраны в розетку, они резко сужаются к черешку.

Лепестки цветка пурпурово-розовые, заострённые, до 4 см длиной. Сердцевина красновато-коричневая. Соцветия *E. purpurea* одиночные, диаметром до 8—12 см. Цветоносы длинные, не ветвятся. Плод представляет собой четырехгранную семянку серовато-бурого цвета. Семена крупные серого цвета, с одной стороны зазубренные.

Цветение *E. purpurea* происходит с июля по сентябрь. Созревание семян приходится на октябрь (Цилин 2015). Общий вид цветущего растения *E. purpurea* представлен на рисунке 1.3.



Рис 1.3 Общий вид цветущего растения *E. purpurea* (Цилин, 2015 с. 265)

В диком виде *E. purpurea* произрастает в восточной части Северной Америки, на открытой местности гористых лесов и прерий, на известковых склонах, а также на песчаных почвах долин Огайо (Оголевец, 1951). В настоящее время вид интродуцирован во флору многих стран. В России *E. purpurea* культивируется во многих регионах, однако в промышленных масштабах культивирование данного вида осуществляется только в Самарской области и Краснодарском крае (Самородов, 1996).

В Белгородской области вид *E. purpurea* культивируется на территории Ботанического сада Белгородского государственного национального исследовательского университета (НИУ «БелГУ»).

Вид *E. purpurea* применяется в народной и традиционной медицине. На основе сока или экстракта растений производятся многие лекарственные препараты и биологически активные добавки. В качестве сырья для лекарственных средств используют цветки, корневища и корни. (Лавренов 2007).

В листьях и стеблях *E. purpurea* содержатся полисахариды (гетероксиланы, арабинорамногалактаны), фитостерины, полиамины, гликозиды, дубильные вещества, сапонины, эхинолон, органические

кислоты, эхинацин, смолы. Одним из ведущих видов биологически активных веществ, содержащихся в *E. purpurea* является группа фенолпропаноидов, наиболее характерные представители которых - цикориевая и кофейная кислоты. Среди флавоноидов в составе растения выделены никотифлорин и рутин (Куркин 2010).

В корневищах и корнях был обнаружен инулин (до 6 %), глюкоза (до 7%), эфирные и жирные масла, фенолкарбоновые кислоты, бетаин, смолы. Все органы *E. purpurea* содержат макро- и микроэлементы, эфирные масла и ферменты (Оголевец, 1951).

Растения вида *E. purpurea* обладают высокими бактерицидными свойствами и используются как антисептическое средство для внутреннего и наружного употребления (Лавренов 2007).

В настоящее время препараты на основе эхинацеи пурпурной лидируют на рынке иммуномодуляторов растительного происхождения. Их доля составляет около 80% (Авдеева 2007). Перспективным является применение полисахаридов, содержащихся в *E. purpurea* в качестве средства, противодействующего вызываемой противоопухолевыми препаратами лейкопении (Сакович и др. 2010).

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы исследования

Материалами для исследования служили семена и проростки редких и лекарственных растений, дикорастущих и интродуцированных на территории Белгородской области: *Bellevalia sarmatica*, *Nigella damascena* и *Echinacea purpurea*. Семена указанных растений были собраны на территории Ботанического сада Белгородского государственного национального исследовательского университета (НИУ «БелГУ»), расположенного в правобережной части реки Везелка.

Время сбора растений – июнь-сентябрь 2016 года, в зависимости от времени созревания семян. Коллекция нативных растений была загербаризирована и включена в гербарий кафедры биотехнологии и микробиологии НИУ «БелГУ».

Работа по получению изолированной культуры редких и лекарственных видов растений проводилась в лаборатории «Инновационных методов исследования растительных объектов» (Россия, НИУ «БелГУ», кафедра биотехнологии и микробиологии).

## 2.2. Методы исследования

Методы проведения работы включали в себя выбор растительных объектов; сбор, сушку и хранение семян растительных объектов; приготовление твёрдых питательных сред; стерилизацию питательных сред; выбор концентрации и времени воздействия ГК на растительные экспланты. стерилизацию растительных эксплантов и создание асептических условий; получение и культивирование стерильных проростков; подбор индивидуальных питательных сред.

### 2.2.1. Выбор, сбор, сушка, хранение.

В качестве растительных эксплантов были выбраны семена редких и лекарственных видов *Bellevalia sarmatica*, *Nigella damascena* и *Echinacea purpurea*. Сбор проводился на территории Ботанического сада Белгородского государственного национального исследовательского университета (НИУ «БелГУ») в ясную сухую погоду, в дневное время суток. Его даты соответствуют периодам полного созревания семян.

Сбор осуществлялся вручную. Так как зрелые семена легко осыпались, срезалась наземная часть растения, содержащая плодоносящие соцветия. Собранные пучки растений помещались в чистые пакеты и маркировались (Середин, 1973; Гаммерман, 1990).

Сушка семян проводилась сразу после сбора. Семена очищались от примесей, цветков и соцветий.

Процесс сушки проходил естественным путём на открытом балконе, в тени. Сырьё раскладывалось мягкой бумаге ровным слоем примерно в 2 см толщиной и перемешивалось несколько раз в день. На ночь семена убирались в помещение. Высушенное сырьё упаковывалось в подписанные бумажные пакеты и хранилось в сухом тёмном месте (Середин, 1973).



Все указанные работы проводили по принятым в ботанике методикам (Середин, 1973; Тризна, 1992).

### 2.2.2. Приготовление и стерилизация питательных сред

Культивирование растительных эксплантов *Bellevalia sarmatica*, *Nigella damascena* и *Echinacea purpurea* производилось на твёрдых питательных средах Мурасиге и Скуга с различным соотношением регуляторов роста (Murashige и др., 1962).

Нами была проведена модификация среды Мурасиге и Скуга. В среду добавлялись различные концентрации фитогормонов для активации процессов роста, а также мезоинозит (100 мг/л) в качестве источника дополнительного питания растительных объектов.

Проращивание семян всех растительных объектов проводилось на модифицированной среде Мурасиге и Скуга, не содержащей фитогормоны.

Для дальнейшего роста и развития проростков использовались следующие модификации среды Мурасиге и Скуга:

- Среда Мурасиге и Скуга, содержащая индолилуксусную кислоту в концентрации 0,5 мг/л и 6-бензиламинопурин в концентрации 1 мг/л. Данная среда использовалась для культивирования всех растительных объектов. Нами среда была обозначена как «MR20».
- Среда Мурасиге и Скуга с уменьшенным в 2 раза содержанием микро- и макроэлементов, а также сахарозы и мезоинозита. Данная среда использовалась для культивирования всех растительных объектов. Нами среда была обозначена как «MR1/2».
- Среда Мурасиге и Скуга, содержащая индолилуксусную кислоту в концентрации 0,1 мг/л и 6-бензиламинопурин в концентрации 1 мг/л. Данная среда использовалась для

культивирования всех растительных объектов. Нами среда была обозначена как «MR0,1».

- Среда Мурасиге и Скуга, содержащая 6-бензиламинопурин в концентрации 0,5 мл/л. Данная среда использовалась для культивирования всех растительных объектов. Нами среда была обозначена как «MR0,5».

- Среда Мурасиге и Скуга, содержащая 6-бензиламинопурин в концентрации 10 мл/л. Данная среда была использована для культивирования растительных эксплантов вида *Bellevalia sarmatica*. Нами среда была обозначена как «MRBS».

Приготовление сред производилось по стандартным методикам, принятым в работе по введению в культуру *in vitro* (Калинин и др., 1992; Сорокина и др., 2002; Шевелуха и др., 2008).

### 2.2.3. Определение оптимальной концентрации и времени воздействия гибберелловой кислоты на растительные объекты.

Проводились опыты по изучению воздействия гибберелловой кислоты на растительные экспланты в зависимости от времени воздействия и используемой концентрации. Для каждого растения время и воздействия и концентрация действующего раствора подбирались индивидуально.

Исходных раствор гибберелловой кислоты готовили путём разведения 0,006 мг сухого гормона искусственно синтезированного гормона в 100 мл воды. Затем и него готовились растворы с разными концентрациями путём разведения 1:1, 1:10 и 1:100. В опытах также использовался раствор нативной гибберелловой кислоты, полученной из растительных организмов.

Семена растений видов *B.sarmatica*, *N. damascena* и *E. purpurea* замачивались в приготовленных растворах гибберелловой кислоты на различное время. Нами были выбраны контрольные точки после 1 часа воздействия гибберелловой кислоты на семена, 3 часов, 6 часов и 12 часов.

#### 2.2.4. Стерилизация растительных объектов и создание асептических условий

Первым этапом стерилизации растительных объектов было их отмывание в мыльном растворе и промывание сначала водопроводной, а затем дистиллированной водой. Все дальнейшие манипуляции проводились в боксе микробиологической безопасности «Lamsystems» II класса, типа А2.

Стерилизацию растительных объектов проводили ступенчато. Применялись различные стерилизующие агенты («Лизоформин 3000», «Белизна», «Хлорамин Б», «Биоцид-С», нитрат серебра). Перед обработкой ими семена на 1 минуту замачивались в 70%-ном растворе этанола.

В дальнейшем стерилизацию растительных объектов проводили несколькими стерилизаторами, подбирая для каждого растения наиболее подходящий стерилизующий агент.

В первом опыте в качестве стерилизующего агента использовалось дезинфицирующее средство «Лизоформин 3000». Данный стерилизующий агент представляет собой жидкий концентрат синего цвета, обладающий антимикробной активностью в отношении вирусов, бактерий, грибов, а также спор. Применялся 10%-ный раствор лизоформина. Время воздействия на стерилизуемый объект составляло 20 минут.

Раствор готовили путём разбавления 10 мл средства «Лизоформин 3000» дистиллированной водой в количестве 90 мл. Приготовленный раствор использовался в течение 14 дней.

Во втором опыте в качестве стерилизующего агента использовался раствор «Белизна», представляющий собой раствор гипохлорита натрия в концентрации от 5% до 15%. Обладает бактерицидным, фунгицидным и вирулицидным действием. Стерилизующий агент использовали неразбавленным. Время стерилизации растительных эксплантов составляло 20 минут.

В третьем опыте в качестве стерилизующего агента применялся препарат «Хлорамин Б». Средство представляет собой органическую соль натрия и обладает дезинфицирующей активностью в отношении бактерий, грибов и вирусов, благодаря наличию в составе активного хлора.

В работе применялся 5%-ный раствор хлорамина. Его готовили следующим образом: 5 г сухого порошка препарата растворяли в 100 мл дистиллированной воды при нагревании до 50-60°C. Время воздействия хлорамина на семена составляло 20 минут.

В четвертом опыте использовался препарат «Биоцид-С», который представляет собой прозрачную жидкость жёлтого цвета, содержащую в своём составе алкил-диметилбензиламмоний хлорид, глутаровый альдегид и этилкарбитол. Является дезинфицирующим средством широкого спектра действия.

В работе использовался 3% раствор препарата «Биоцид-С», который готовили путём разбавления 3 мл концентрата в 97 мл дистиллированной воды.

В пятом опыте использовали нитрат серебра. Средство представляет собой кристаллический порошок азотнокислой соли серебра. Обладает антисептическим, бактерицидным и фунгицидным действием.

Для стерилизации использовался 0,1% раствор, приготовленный путём растворения 100 мг соли в 100 мл дистиллированной воды. Время стерилизации составляло 20 минут.

После воздействия стерилизующих агентов отработанные растворы сливались. Семена отмывались стерильной дистиллированной водой три раза по 15 минут.

Стерилизация используемых в работе материалов, посуды, инструментов и оборудования проводилась по методикам, принятым в работе по культуре изолированных тканей растений (Калинин и др., 1992, 46-50; Сорокина и др., 2002, 7-8; Шевелуха и др., 2008, 107-109).

### 2.2.5. Получение и культивирование стерильных проростков

Проращивание семян *Bellevalia sarmatica*, *Nigella damascena* и *Echinacea purpurea* проводилось в стерильных баночках и чашках Петри. Для получения стерильных проростков семена помещались на модифицированную безгормональную питательную среду Мурасиге и Скуга в асептических условиях ламинарного бокса и культивировались в термостате при температуре 25°C без доступа света.

После прорастания стерильные проростки пересаживались на питательные среды, содержащие гормоны, и культивировались в климатической световой комнате при температуре 22°C. Для каждого растительного объекта подбиралась индивидуальная питательная среда, на которой происходило наиболее успешное культивирование.

Растительные объекты перемещались на свежие питательные среды каждые 40-45 дней.

При получении и культивировании проростков в условиях *in vitro* использовались методы, общепринятые в работах по введению в культуру *in vitro* растительных объектов (Сорокина и др., 2002; Шевелуха и др., 2008).

### 2.2.6. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка полученных результатов выполнялась с помощью методов математической статистики (Зайцев, 1984, 12).

Вычисление средней арифметической, ее ошибки и критерия Манна-Уитни для оценки достоверности средней арифметической проводили на компьютере с применением дополнительного пакета статистических функций приложения Microsoft Office Excel (Петер-Пифо, 2010).

## ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Влияние стерилизующих агентов на количество полученных стерильных эксплантов

В ходе эксперимента была определена эффективность действия стерилизаторов на семена редких и лекарственных растений видов *Bellevalia sarmatica* (Georgi) Woronow, *Nigella damascena* (L.) и *Echinacea purpurea* (L.). В качестве стерилизаторов использовались «Лизоформин 3000» (10%), «Биацид» (3%), «Белизна» (5-15%), «Хлорамин Б (5%), «Нитрат серебра (0,1%)». Стерилизация проводилась путем выдерживания семян в стерилизующих агентах в течение 20 минут.

#### 3.1.1. Стерилизация растительных эксплантов *Bellevalia sarmatica*

Критерий Манна-Уитни показал, что различия во влиянии стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов вида по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ( $1,92 \pm 0,563$ ), достоверны при  $P < 0,05$  для каждого из образцов. Количество стерильных эксплантов после *B. sarmatica* обработки семян в течение 20 минут, средняя арифметическая, проверка гипотезы по критерию Манна-Уитни, а так же уровень значимости измерений представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 Количество стерильных семян *B. sarmatica* после стерилизации в течение 20 мин.

Стерилизующий агент	Количество стерильных эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, ( $\alpha$ )
Лизоформин 3000 (10%)	$93,33 \pm 2,659$	0,00003	0,05
Белизна (5-15%)	$78,33 \pm 3,408$	0,00003	0,05
Биоцид (3%)	$24,17 \pm 2,729$	0,00003	0,05
Хлорамин Б (5%)	$48,33 \pm 3,827$	0,00003	0,05
Нитрат серебра	$61,67 \pm 2,930$	0,00003	0,05

(0,1%)			
Контроль	1,92 ± 0,563	0,00003	0,05

Как видно из статистических данных, высокий процент стерильных семян (более 70%) зарегистрирован только при применении стерилизующих агентов Лизоформин и Белизны. В связи с этим было принято решение увеличить время стерилизации до 30 минут. Количество стерильных эксплантов *V. sarmatica* после обработки семян в течение 30 минут представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 - Количество стерильных семян *V. sarmatica* после стерилизации в течение 30 мин.

Стерилизующий агент	Количество стерильных эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, ( $\alpha$ )
Лизоформин 3000 (10%)	96,36±1,783	0,00004	0,05
Белизна (5-15%)	92,73±2,780	0,00004	0,05
Биоцид (3%)	73,64±3,631	0,00004	0,05
Хлорамин Б (5%)	78,18±3,090	0,00004	0,05
Нитрат серебра (0,1%)	84,55±3,662	0,00004	0,05
Контроль	1,92 ± 0,563		0,05

Критерий Манна-Уитни показал, что различия по влиянию стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов вида *V. sarmatica* по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода (1,92±0,563), достоверны при  $P < 0,05$  для каждого из образцов.

Для вида *V. sarmatica* высокий процент стерильных семян (более 70%) зарегистрирован при применении всех исследуемых стерилизаторов, при времени стерилизации 30 минут.

### 3.1.2. Стерилизация растительных эксплантов *Nigella damascena*

Критерий Манна-Уитни показал, что различия по влиянию стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов вида *N.*

*damascena* по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ( $2,82 \pm 0,71$ ), достоверны при  $P < 0,05$  для каждого из образцов. Количество стерильных эксплантов после обработки семян *N. damascena* в течение 20 минут, средняя арифметическая, проверка гипотезы по критерию Манна-Уитни, а так же уровень значимости измерений представлены в таблице 3.3.

Таблица 3. 3 Количество стерильных семян *N. damascena* после стерилизации

Стерилизующий агент	Количество стерильных эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни (P-значение)	Уровень значимости ( $\alpha$ )
Лизоформин 3000 (10%)	$81,82 \pm 3,41$	0,00007	0,05
Белизна (5-15%)	$92,73 \pm 2,49$	0,00007	0,05
Биоцид (3%)	$78,19 \pm 2,76$	0,00007	0,05
Хлорамин Б (5%)	$77,27 \pm 2,49$	0,00007	0,05
Нитрат серебра (0,1%)	$58,19 \pm 3,69$	0,00007	0,05
Контроль	$2,82 \pm 0,71$		0,05

Высокий процент стерильных семян (более 70%) для вида зарегистрирован при применении в качестве стерилизаторов растворов «Лизоформин 3000», «Белизна», Биоцид и Хлорамин Б при времени стерилизации 20 минут.

### 3.2.3. Стерилизация растительных эксплантов *Echinacea purpurea*

Критерий Манна-Уитни показал, что различия по влиянию стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов вида *E. purpurea* по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ( $1,25 \pm 0,41$ ), достоверны при  $P < 0,05$  для каждого из образцов. Количество стерильных эксплантов после обработки семян *E. purpurea* в течение 20 минут, средняя арифметическая, проверка гипотезы по критерию Манна-Уитни, а так же уровень значимости измерений представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 Количество стерильных семян *E. purpurea* после стерилизации

Стерилизующий	Количество	Критерий Манна-	Уровень значимости
---------------	------------	-----------------	--------------------



агент	стерильных эксплантов, %	Уитни (Р-значение)	( $\alpha$ )
Лизоформин 3000 (10%)	97,75 ± 1,27	0,00078	0,05
Белизна (5-15%)	91,25 ± 1,06	0,00078	0,05
Хлорамин Б (5%)	89,8 ± 1,52	0,00078	0,05
Биоцид (3%)	96,6 ± 1,84	0,00078	0,05
Нитрат серебра (0,1%)	92,6 ± 1,35	0,00078	0,05
Контроль	1,25 ± 0,41		0,05

Для вида *E. purpurea* высокий процент стерильных семян (более 70%) зарегистрирован при применении всех исследуемых стерилизаторов, при времени стерилизации 20 минут.

### 3.2 Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов

Большое значение для стерилизации растительных эксплантов имеет не только процент стерильных семян, но также и процент семян, сохранивших жизнеспособность под влиянием стерилизующих агентов.

#### 3.2.1 Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов вида *Bellevalia sarmatica*

Как видно из данных, приведённых в таблице 3.5 и рисунке 3.1 оптимальным стерилизующим агентом для вида *B. sarmatica* является раствор «Белизна» (5-15%), так как при использовании ее в качестве стерилизатора достигнуто наилучшее соотношение количества стерильных растительных эксплантов к количеству жизнеспособных. Также возможно применение в качестве стерилизующих агентов 5% раствора Хлорамина Б и 10% раствора «Лизоформин 3000», при их использовании так же достигается высокий уровень жизнеспособных эксплантов. Применение режимов стерилизации с использованием 3% раствора Биоцида и 0,1% раствора Нитрата серебра является нецелесообразным, так как жизнеспособность семян в данном случае утрачивается.

Таблица 3.5 Количество стерильных и жизнеспособных проростков вида *B. sarmatica*

Режим ступенчатой стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
Лизоформин 3000 (10%-ный раствор)	96,36 ± 1,78	18,5 ± 2,56
Белизна (5-15%-ный раствор)	92,73 ± 2,78	20,67 ± 2,4
Биоцид (3%-ный раствор)	73,64 ± 3,63	0 ± 0
Хлорамин Б (5%-ный раствор)	78,33 ± 3,09	9,33 ± 1,12
Нитрат серебра (0,1%-ный раствор)	84,55 ± 3,66	0 ± 0,000

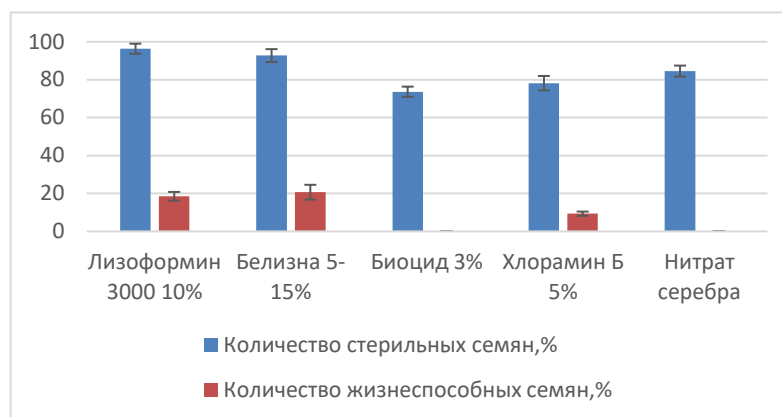


Рис. 3.1 Количество стерильных и жизнеспособных проростков вида *V. sarmatica*

### 3.2.2. Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов вида *Nigella damascena*

Как видно из данных, приведенных в таблице 3.6 и на рисунке 3.2, оптимальным стерилизующим агентом для вида *N. damascena* является раствор Биоцида в концентрации 3%, так как при использовании его в качестве стерилизатора достигнуто наилучшее соотношение количества стерильных растительных эксплантов к количеству жизнеспособных. Также оказалось возможным применение в качестве стерилизующих агентов 5% раствора Хлорамина Б и 0,1% раствора Нитрата серебра при их использовании так же достигается высокий уровень жизнеспособных эксплантов. Применение режимов стерилизации с использованием раствора «Белизна» и раствора «Лизоформин 3000» в концентрации 10% является нецелесообразным, так как жизнеспособность семян в данном случае утрачивается.

Таблица 3.6 Количество стерильных и жизнеспособных проростков вида *N. damascena*

Режим ступенчатой стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
Лизоформин 3000 (10%-ный раствор)	81,82 ± 3,41	0

Белизна (5-15%-ный раствор)	92,73 ± 2,49	0
Биоцид (3%-ный раствор)	78,19 ± 2,77	10,17 ± 0,84
Хлорамин Б (5%-ный раствор)	77,27 ± 2,49	7,17 ± 2,43
Нитрат серебра (0,1%-ный раствор)	58,19 ± 3,69	5,83 ± 1,58

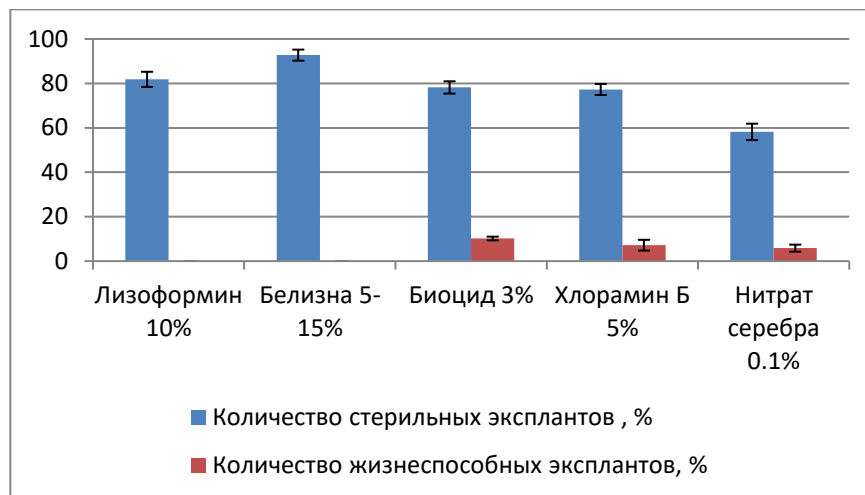


Рис. 3.2 Количество стерильных и жизнеспособных проростков вида *N. damascena*

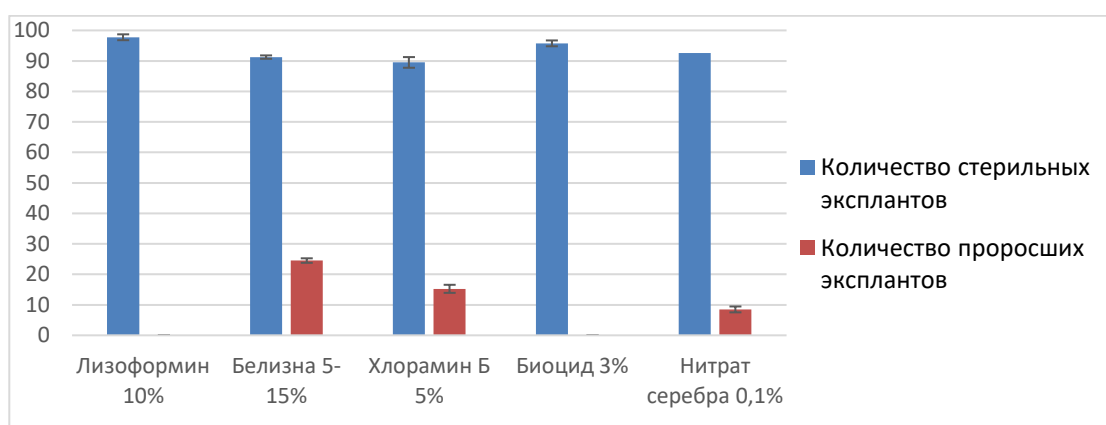
### 3.2.3. Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов вида *Echinacea purpurea*

Как видно из данных, приведенных в таблице 3.7 и на рисунке 3.3, оптимальным стерилизующим агентом для вида *E. purpurea* является раствор «Белизна» (5-15%), так как при использовании ее в качестве стерилизатора достигнуто наилучшее соотношение количества стерильных растительных эксплантов к количеству жизнеспособных. Также оказалось возможным применение в качестве стерилизующих агентов раствора Хлорамина Б (5%) и Нитрата серебра (0,1%), так как при их использовании так же достигается высокий уровень жизнеспособных эксплантов, хотя и меньший по сравнению с Белизной. Применение режимов стерилизации с использованием раствора Биоцида (3%) и раствора «Лизоформин-3000» в концентрации 10% является нецелесообразным, так как жизнеспособность семян в данном случае утрачивается.

Таблица 3.7

Количество стерильных и жизнеспособных проростков вида *E. purpurea*

Режим ступенчатой стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
Лизоформин 3000 (10%-ный раствор)	97,75 ± 1,27	0 ± 0
Белизна (5-15%-ный раствор)	91,25 ± 1,06	24,75 ± 0,86
Хлорамин Б (5%-ный раствор)	89,8 ± 1,52	15,25 ± 0,86
Биоцид (3%-ный раствор)	96,6 ± 1,84	0 ± 0
Нитрат серебра (0,1%-ный раствор)	92,6 ± 1,35	8,5 ± 0,97

Рис. 3.3 Количество стерильных и жизнеспособных проростков вида *E. purpurea*

### 3.3 Изучение влияния гибберелловой кислоты на семена редких и лекарственных видов растений

В ходе эксперимента было выявлено влияние разных концентраций растворов синтетической гибберелловой кислоты, а также нативного раствора гибберелловой кислоты на количество проросших семян редких и лекарственных видов растений. Были выбраны контрольные точки после 1 часа воздействия гибберелловой кислоты на семена, 3 часов, 6 часов и 12 часов.

#### 3.3.1 Изучение влияния гибберелловой кислоты на семена вида *B. sarmatica*

Исходя из данных, представленных в таблице 3.8, различия по влиянию ГК на число проросших семян вида *B. sarmatica* по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ( $19,11 \pm 1,15$ ), являются достоверными при  $P < 0,05$  для всех изучаемых растворов.

Таблица 3.8 Количество проростков вида *B. sarmatica* после обработки ГК в течение 1 часа

Гибберелловая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, ( $\alpha$ )
Нативный раствор ГК	$45,71 \pm 3,659$	0,000855	0,05
100% раствор ГК	$39,14 \pm 1,959$	0,000855	0,05
50% раствор ГК	$35,07 \pm 2,065$	0,000855	0,05
10% раствор ГК	$32,43 \pm 1,594$	0,000855	0,05
1% раствор ГК	$27,28 \pm 3,347$	0,000855	0,05
Контроль	$19,11 \pm 1,15$		0,05

Из рисунка 3.4 видно, что эффективность воздействия гормона прямо пропорциональна его концентрации. Наибольшей эффективностью при выдерживании семян в растворах ГК обладает нативный раствор гибберелловой кислоты, а наименьшей - раствор искусственно синтезированной ГК в концентрации 1%.

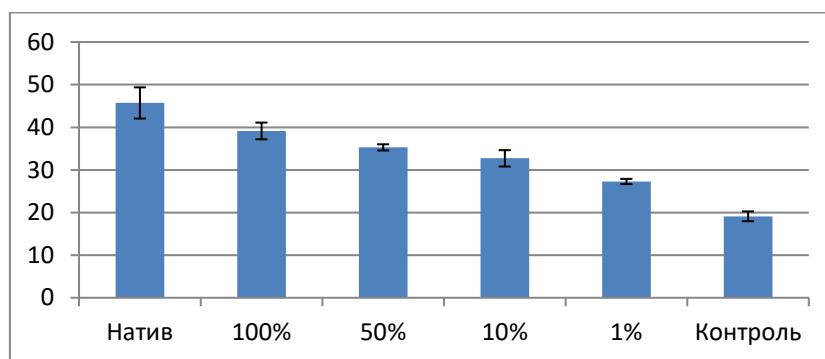


Рисунок 3.4 Количество проростков вида *V. sarmatica* после обработки ГК в течение 1 часа

При увеличении времени воздействия гибберелловой кислоты на семена *V. sarmatica* до 3 часов наблюдается незначительное повышение их прорастаемости.

Исходя из данных, представленных в таблице 3.9, различия по влиянию ГК на число проросших семян вида *V. sarmatica* по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ( $19,11 \pm 1,15$ ), являются достоверными при  $P < 0,05$  для всех изучаемых растворов.

Таблица 3.9 Количество проростков вида *V. sarmatica* после обработки ГК в течение 3 часов

Гибберелловая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, ( $\alpha$ )
Нативный раствор ГК	41,44± 1,62	0,0003	0,05
100% раствор ГК	34,11±1,44	0,0003	0,05
50% раствор ГК	31,89±1,44	0,0003	0,05
10% раствор ГК	27,67±1,03	0,0003	0,05
1% раствор ГК	24,67±1,12	0,004	0,05
Контроль	19,11±1,15		0,05

Из рисунка 3.5 видно, что эффективность воздействия гормона прямо пропорциональна его концентрации. Наибольшей эффективностью при выдерживании семян в растворах ГК по-прежнему обладает нативный раствор гибберелловой кислоты, а наименьшей - раствор искусственно синтезированной ГК в концентрации 1%.

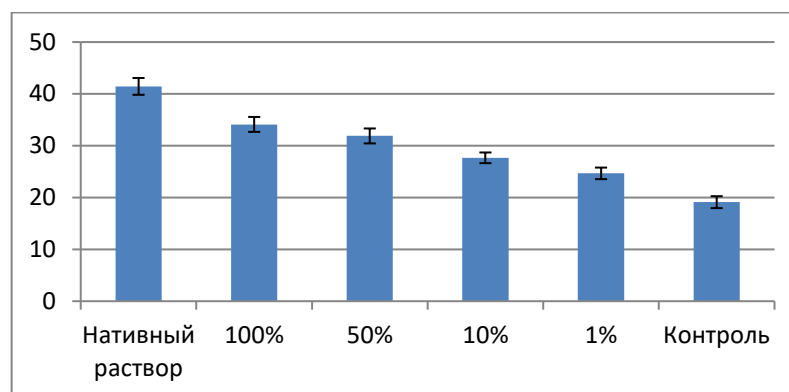


Рис. 3.5 Количество проростков вида *V. sarmatica* после обработки ГК в течение 3 часов

При увеличении времени воздействия гибберелловой кислоты на семена *V. sarmatica* до 6 часов наблюдается изменение влияния гибберелловой кислоты на количество полученных проростков.

Исходя из данных, представленных в таблице 3.10, различия по влиянию на количество проросших эксплантов вида по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ( $19,11 \pm 1,15$ ), достоверны при  $P < 0,05$  для всех изучаемых растворов, за исключением 10% раствора искусственно синтезированной гибберелловой кислоты. Его действие практически не отличается от контроля.

Таблица 3.10 Количество проростков вида *V. sarmatica* после обработки ГК в течение 6 часов

Гибберелловая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, ( $\alpha$ )
Нативный раствор ГК	$27,89 \pm 1,83$	0,004	0,05
100% раствор ГК	$25,78 \pm 1,48$	0,005	0,05
50% раствор ГК	$23,33 \pm 1,41$	0,015	0,05
10% раствор ГК	$22,36 \pm 2,23$	0,085	0,05
1% раствор ГК	$23,78 \pm 0,92$	0,011	0,05
Контроль	$19,11 \pm 1,15$		0,05

Из рисунка 3.6 видно, что прямая зависимость между концентрацией гормона и прорастаемостью семян меняется с увеличением времени воздействия. Высокой эффективностью при выдерживании семян в растворах ГК в течение 6 часов обладают все представленные растворы.



Наименьшую эффективность показывает 10% раствор искусственно синтезированной гибберелловой кислоты.

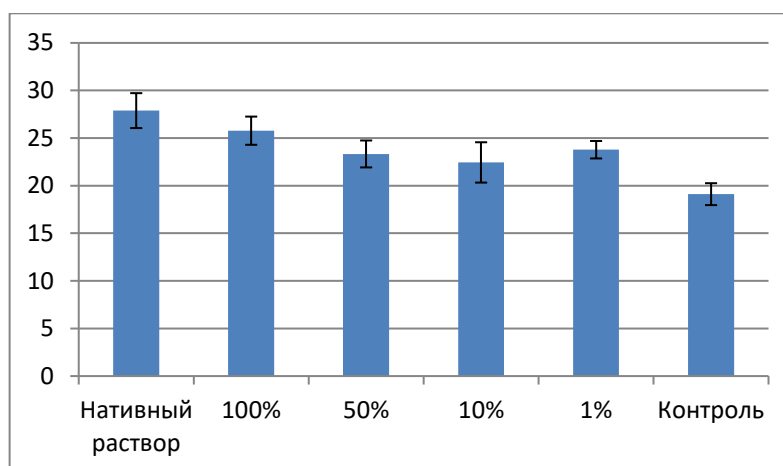


Рис 3.6 Количество проростков вида *V. sarmatica* после обработки ГК в течение 6 часов

При дальнейшем увеличении времени воздействия гибберелловой кислоты на семена *V. sarmatica* до 12 часов наблюдается изменение её влияния на количество полученных проростков.

Исходя из данных, представленных в таблице 3.11, различия по влиянию на количество проросших эксплантов вида по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ( $19,11 \pm 1,15$ ), достоверны при  $P < 0,05$  только для нативного раствора гибберелловой кислоты. Остальные представленные растворы не отличаются по действию от контроля.

Таблица 3.11 Количество проростков вида *V. sarmatica* после обработки ГК в течение 12 часов

Гибберилловая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, ( $\alpha$ )
Нативный раствор ГК	$9,67 \pm 0,951$	0,0004	0,05
100% раствор ГК	$14,11 \pm 1,280$	0,013	0,05
50% раствор ГК	$15,78 \pm 1,547$	0,085	0,05
10% раствор ГК	$17,56 \pm 2,082$	0,596	0,05
1% раствор ГК	$22,33 \pm 2,053$	0,102	0,05
Контроль	$19,11 \pm 1,15$		0,05

Из рисунка 3.7 видно, что прямая зависимость между концентрацией гормона и прорастаемостью семян с увеличением времени воздействия меняется на обратную. При времени воздействия гормона на семена 12 часов, он ингибирует прорастаемость семян.

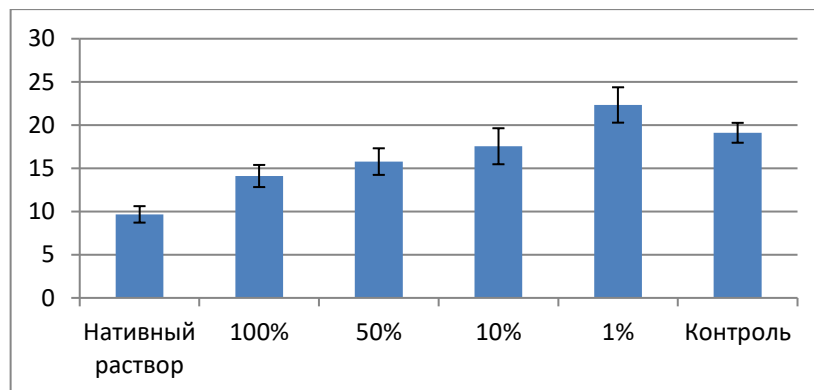


Рис. 3.7 Количество проростков вида *V. sarmatica* после обработки ГК в течение 12 часов

Исходя из всего выше изложенного, можно сделать вывод, что для вида *V. sarmatica* оптимальным режимом стерилизации, при котором получено наилучшее соотношение количества стерильных растительных эксплантов и количества жизнеспособных семян, является использование в качестве стерилизующего агента «Белизна» в течение 30 минут с предварительным замачиванием семян в течение 1 часа в нативном растворе гибберелловой кислоты. При использовании этой комбинации уровень выхода жизнеспособных семян увеличился в 2,2 раза, по сравнению с контролем, что видно на рисунке 3.8.

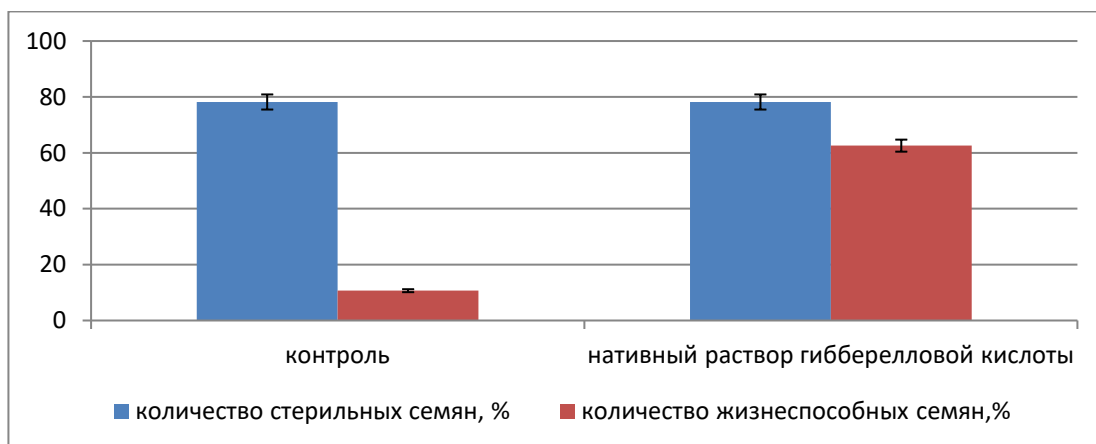


Рис 3.8. Количество проростков вида *V. sarmatica* после обработки ГК по сравнению с контролем.

### 3.3.2 Изучение влияния гибберелловой кислоты на семена вида *Nigella damascena*

Исходя из данных, представленных в таблице 3.12, различия по влиянию на количество проросших эксплантов вида *N. damascena* по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ( $10,67 \pm 0,53$ ), достоверны при  $P < 0,05$  для всех представленных растворов, за исключением 1% раствора синтетической гибберелловой кислоты. Его действие не отличается от контроля.

Таблица 3.12 Количество проростков вида *N. damascena* после обработки ГК в течение 1 часа

Гибберелловая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, ( $\alpha$ )
Нативный раствор ГК	$62,57 \pm 2,15$	0,0008	0,05
100% раствор ГК	$36,57 \pm 2,27$	0,0008	0,05
50% раствор ГК	$27,43 \pm 2,12$	0,0008	0,05
10% раствор ГК	$13,14 \pm 1,04$	0,0243	0,05
1% раствор ГК	$10,57 \pm 1,29$	0,0502	0,05
Контроль	$10,67 \pm 0,53$		0,05

Из данных, представленных на рисунке 3.9 видно, что прорастаемость семян вида *N. damascena* напрямую зависит от концентрации действующих растворов. Наибольшей эффективностью обладает нативный раствор гибберелловой кислоты, наименьшей - 10% раствор синтетической гибберелловой кислоты

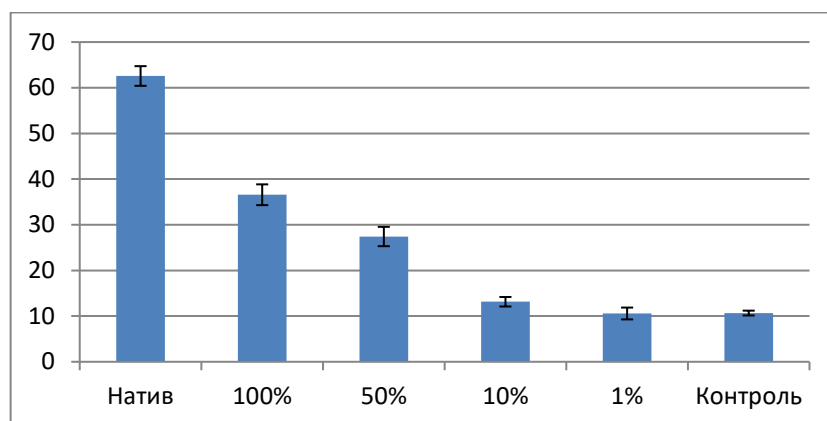


Рис. 3.9 Количество проростков вида *N. damascena* после обработки ГК в течение 1 часа

При увеличении времени воздействия гибберелловой кислоты на семена *N. damascena* до 3 часов наблюдается изменение её влияния на количество полученных проростков.

Исходя из данных, представленных в таблице 3.13, различия по влиянию на количество проросших эксплантов вида *N. damascena* по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ( $10,67 \pm 0,53$ ), достоверны при  $P < 0,05$  для всех представленных растворов, за исключением 1% раствора синтетической гибберелловой кислоты. Его действие не отличается от контроля.

Таблица 3.13 Количество проростков вида *N. damascena* после обработки ГК в течение 3 часов

Гибберелловая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, ( $\alpha$ )
Нативный раствор ГК	$59,44 \pm 0,47$	0,0003	0,05
100% раствор ГК	$29,89 \pm 0,95$	0,0003	0,05
50% раствор ГК	$21,78 \pm 0,91$	0,0003	0,05
10% раствор ГК	$14,56 \pm 0,96$	0,0035	0,05
1% раствор ГК	$11,56 \pm 1,43$	0,691	0,05
Контроль	$10,67 \pm 0,53$	0,0003	0,05

Из рисунка 3.10 видно, что зависимость прорастаемости семян вида *N. damascena* от концентрации действующих растворов по-прежнему представляет собой прямую зависимость, незначительно меняется

количество проросших семян. Наибольшей эффективностью обладает нативный раствор гибберелловой кислоты, наименьшей - 10% раствор синтетической гибберелловой кислоты.

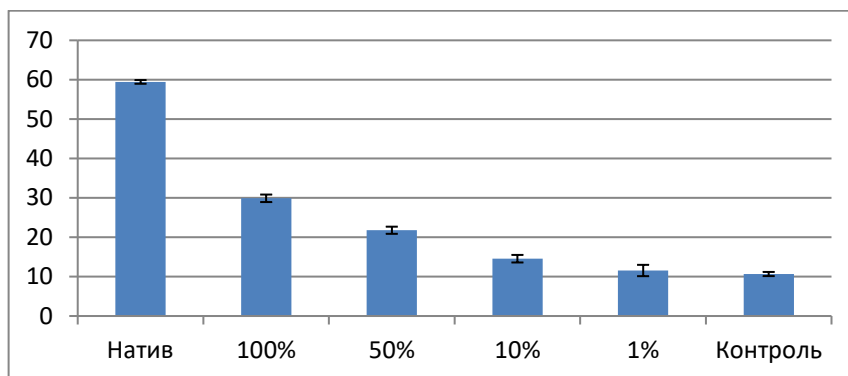


Рис. 3.10 Количество проростков вида *N. damascena* после обработки ГК в течение 3 часов

При дальнейшем увеличении времени воздействия гибберелловой кислоты на семена *N. damascena* до 6 часов наблюдается изменение её влияния на количество полученных проростков.

Исходя из данных, представленных в таблице 3.14, различия по влиянию на количество проросших эксплантов вида *N. damascena* по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ( $10,67 \pm 0,53$ ), достоверны при  $P < 0,05$  для всех представленных растворов.

Таблица 3.14 Количество проростков вида *N. damascena* после обработки ГК в течение 6 часов

Гибберилловая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Нативный раствор ГК	$33,86 \pm 2,26$	0,0003	0,05
100% раствор ГК	$25,29 \pm 2,29$	0,0003	0,05
50% раствор ГК	$23,29 \pm 1,93$	0,0003	0,05
10% раствор ГК	$15,43 \pm 1,73$	0,0003	0,05
1% раствор ГК	$16,29 \pm 1,83$	0,0003	0,05
Контроль	$10,67 \pm 0,53$		0,05

Из рисунка 3.11 видно, что зависимость прорастаемости семян вида *N. damascena* от концентрации действующих растворов по-прежнему представляет собой прямую зависимость, меняется только количество

проросших семян. Наибольшей эффективностью обладает нативный раствор гибберелловой кислоты, наименьшей - 10% раствор синтетической гибберелловой кислоты. Явно видно ингибирующее действие гормона.

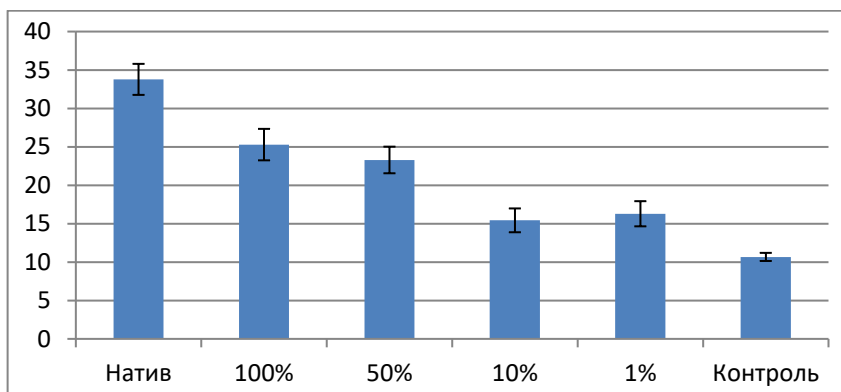


Рис. 3.11 Количество проростков вида *N. damascena* после обработки ГК в течение 6 часов

При дальнейшем увеличении времени воздействия гибберелловой кислоты на семена *N. damascena* до 12 часов наблюдается изменение её влияния на количество полученных проростков.

Исходя из данных, представленных в таблице 3.15, различия по влиянию на количество проросших эксплантов вида *N. damascena* по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ( $10,67 \pm 0,53$ ), достоверны при  $P < 0,05$  для всех представленных растворов, за исключением нативного раствора гибберелловой кислоты. Результат его действия принципиально не отличается от контроля.

Таблица 3.15 Количество проростков вида *N. damascena* после обработки ГК в течение 12 часов

Гибберелловая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, ( $\alpha$ )
Нативный раствор ГК	$10,33 \pm 1,11$	0,79	0,05
100% раствор ГК	$13,56 \pm 0,97$	0,017	0,05
50% раствор ГК	$15,11 \pm 1,87$	0,003	0,05
10% раствор ГК	$17,11 \pm 1,43$	0,003	0,05
1% раствор ГК	$21,67 \pm 2,41$	0,003	0,05
Контроль	$10,67 \pm 0,53$		0,05

Из рисунка 3.12 видно, что прямая зависимость прорастаемости семян вида *N. damascena* от концентрации действующих растворов, меняется на обратную. Наименьшей эффективностью обладает нативный раствор гибберелловой кислоты, наибольшей - 1% раствор синтетической гибберелловой кислоты.

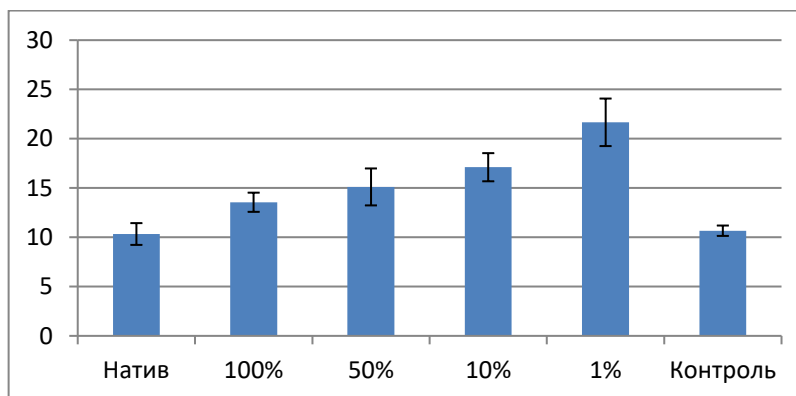


Рис. 3.12 Количество проростков вида *N. damascena* после обработки ГК в течение 12 часов

Исходя из всего выше изложенного, можно сделать вывод, что для вида *N. damascena* наиболее оптимальным режимом стерилизации, при котором получено наилучшее соотношение количества стерильных растительных эксплантов и количества жизнеспособных семян, является использование в качестве стерилизующего агента раствора «Биоцид-С» в течение 20 минут с предварительным замачиванием семян в течение 1 часа или 3 часов в нативном растворе гибберелловой кислоты. При использовании этой комбинации уровень выхода жизнеспособных семян увеличился более чем в 5 раз, по сравнению с контролем, что видно на рисунке 3.13.

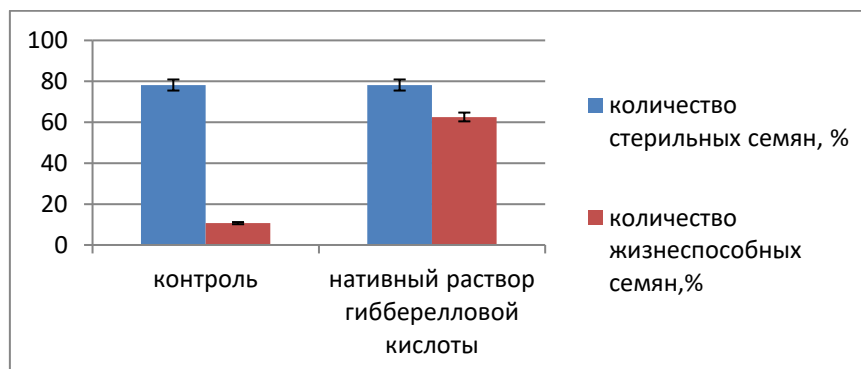


Рис 3.13. Количество проростков вида *N. damascena* после обработки ГК по сравнению с контролем.

### 3.3.3 Изучение влияния гибберелловой кислоты на семена вида *Echinacea purpurea*

Исходя из данных, представленных в таблице 3.16 различия по влиянию ГК на число проросших семян вида *E. purpurea* по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ( $25,43 \pm 0,94$ ), являются достоверными при  $P < 0,05$  для всех изучаемых растворов, за исключением 10% и 50% растворов синтетической гибберелловой кислоты. Они по воздействию не отличаются от контроля.

Таблица 3.16 Количество проростков вида *E. purpurea* после обработки ГК в течение 1 часа

Гибберелловая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, ( $\alpha$ )
Нативный раствор ГК	$67,43 \pm 1,92$	0,002	0,05
100% раствор ГК	$58,86 \pm 2,88$	0,002	0,05
50% раствор ГК	$24,86 \pm 0,95$	0,898	0,05
10% раствор ГК	$26,14 \pm 0,83$	0,898	0,05
1% раствор ГК	$81,43 \pm 1,84$	0,002	0,05
Контроль	$25,43 \pm 0,94$		0,05

Из рисунка 3.14 видно, что воздействие гибберелловой кислоты на прорастаемость семян представлено параболой. Наименьшей эффективностью характеризуется 100% раствор синтетической гибберелловой кислоты, наибольшей - 1% раствор синтетической гибберелловой кислоты.



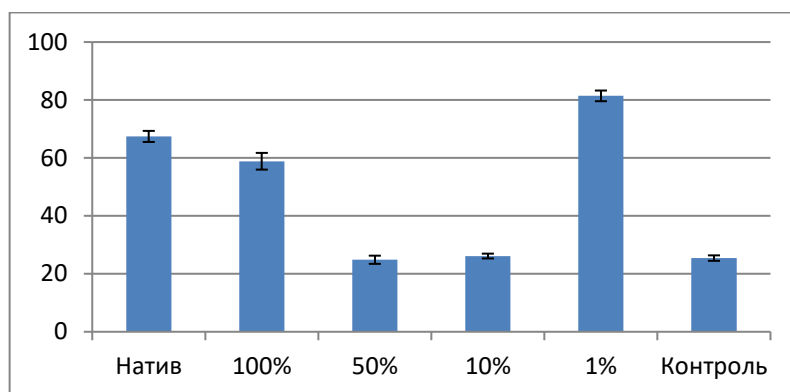


Рис. 3.14 Количество проростков вида *E. purpurea* после обработки ГК в течение 1 часа

При увеличении времени воздействия гибберелловой кислоты на семена *E. purpurea* до 3 часов наблюдается изменение её влияния на количество полученных проростков.

Исходя из данных, представленных в таблице 3.17, различия по влиянию ГК на число проросших семян вида *E. purpurea* по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ( $25,43 \pm 0,94$ ), являются достоверными при  $P < 0,05$  для всех изучаемых растворов, за исключением 50% раствора синтетической гибберелловой кислоты. Он по воздействию не отличается от контроля.

Таблица 3.17 Количество проростков вида *E. purpurea* после обработки ГК в течение 3 часов

Гибберилловая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, ( $\alpha$ )
Нативный раствор ГК	$63,43 \pm 4,98$	0,002	0,05
100% раствор ГК	$55,29 \pm 2,86$	0,002	0,05
50% раствор ГК	$26,29 \pm 2,11$	0,949	0,05
10% раствор ГК	$48,14 \pm 2,81$	0,002	0,05
1% раствор ГК	$49,86 \pm 2,95$	0,002	0,05
Контроль	$25,43 \pm 0,94$		0,05

Из рисунка 3.15 видно, что воздействие гибберелловой кислоты на прорастаемость семян по-прежнему описывается параболой, однако меняется соотношение между проростками семян, замоченных в разных растворах. Наименьшей эффективностью характеризуется 10% раствор синтетической

гибберелловой кислоты, наибольшей - нативный раствор гибберелловой кислоты.

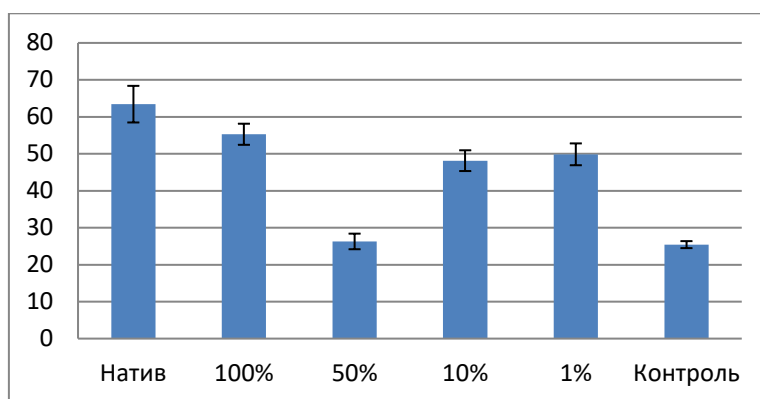


Рис. 3.15 Количество проростков вида *E. purpurea* после обработки ГК в течение 3 часов

При дальнейшем увеличении времени воздействия гибберелловой кислоты на семена *E. purpurea* до 6 часов наблюдается изменение её влияния на количество полученных проростков.

Исходя из данных, представленных в таблице 3.18, различия по влиянию ГК на число проросших семян вида *E. purpurea* по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ( $25,43 \pm 0,94$ ), являются достоверными при  $P < 0,05$  для всех изучаемых растворов, за исключением 50% раствора синтетической гибберелловой кислоты. Он по воздействию не отличается от контроля.

Таблица 3.18 Количество проростков вида *E. purpurea* после обработки ГК в течение 6 часов

Гибберелловая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, ( $\alpha$ )
Нативный раствор ГК	$60,29 \pm 3,67$	0,0017	0,05
100% раствор ГК	$46,43 \pm 3,76$	0,0017	0,05
50% раствор ГК	$28,86 \pm 1,39$	0,159	0,05
10% раствор ГК	$40,14 \pm 1,94$	0,0017	0,05
1% раствор ГК	$43,58 \pm 1,22$	0,0017	0,05
Контроль	$25,43 \pm 0,94$		0,05

Из рисунка 3.16 видно, что воздействие гибберелловой кислоты на прорастаемость семян по-прежнему описывается параболой, соотношение между проростками семян, замоченных в разных растворах, не меняется.

Происходят изменения в количестве проросших семян. Наименьшей эффективностью характеризуется 10% раствор синтетической гибберелловой кислоты, наибольшей - нативный раствор гибберелловой кислоты.

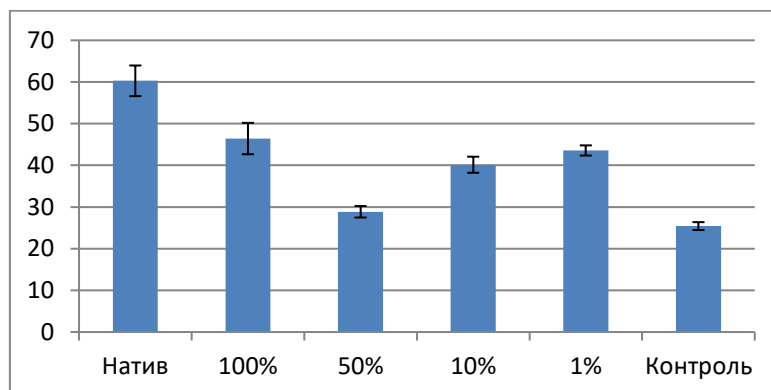


Рис. 3.16 Количество проростков вида *E. purpurea* после обработки ГК в течение 6 часов

При дальнейшем увеличении времени воздействия гибберелловой кислоты на семена *E. purpurea* до 12 часов наблюдается изменение её влияния на количество полученных проростков.

Исходя из данных, представленных в таблице 3.19, различия по влиянию на количество проросших эксплантов вида по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ( $19,11 \pm 1,15$ ), достоверны при  $P < 0,05$  только для нативного раствора гибберелловой кислоты. Остальные представленные растворы не отличаются по действию от контроля.

Таблица 3.19 Количество проростков вида *E. purpurea* после обработки ГК в течение 12 часов

Гибберелловая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, ( $\alpha$ )
Нативный раствор ГК	$59,86 \pm 1,512$	0,0017	0,05
100% раствор ГК	$31,71 \pm 0,860$	0,0151	0,05
50% раствор ГК	$24,85 \pm 1,111$	0,848	0,05
10% раствор ГК	$24,71 \pm 1,122$	0,848	0,05
1% раствор ГК	$24,57 \pm 1,146$	0,848	0,05
Контроль	$25,43 \pm 0,94$		0,05

Из рисунка 3.17 видно, что при воздействии гормона на семена в течение 12 часов, его эффективность угасает, более того, наблюдается ингибирование прорастаемости семян.

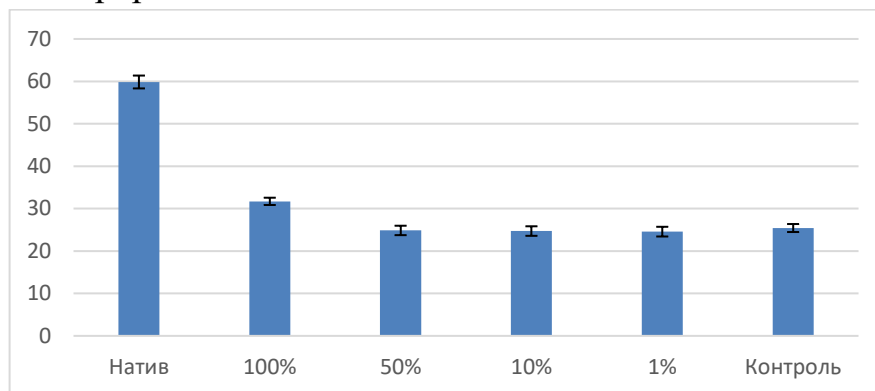


Рис. 3.17 Количество проростков вида *E. purpurea* после обработки ГК в течение 12 часов

Исходя из всего выше изложенного, можно сделать вывод, что для вида *E. purpurea* оптимальным режимом стерилизации, при котором получено наилучшее соотношение количества стерильных растительных эксплантов и количества жизнеспособных семян, является использование в качестве стерилизующего агента «Белизна» в течение 20 минут с предварительным замачиванием семян в течение 1 часа в 1% растворе синтетической гибберелловой кислоты. При использовании этой комбинации уровень выхода жизнеспособных семян увеличился в 3,2 раза, по сравнению с контролем, что видно на рисунке 3.18.

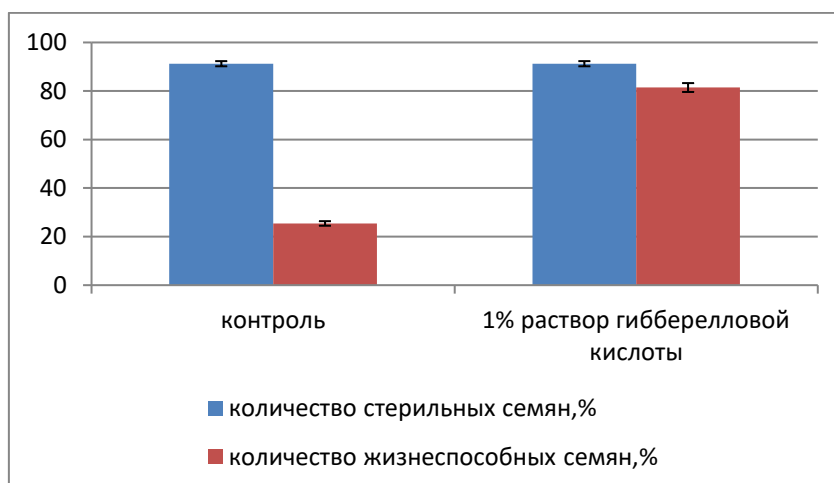


Рис. 3.18 Количество проростков вида *E. purpurea* после обработки ГК по сравнению с контролем.

### 3.4 Подбор питательных сред для культивирования редких и лекарственных видов растений

Для получения изолированной культуры редких и лекарственных видов растений немалое значение имеет состав среды, на которой культивируются стерильные проростки. Нами были проведены опыты по подбору питательных сред для культивирования редких и лекарственных растений видов *Bellevallia sarmatica* (Georgi) Woronow, *Nigella damascena* (L.) и *Echinacea purpurea* (L.). На каждой среде каждое растение вело себя по-разному.

#### 3.4.1 Подбор питательных сред для культивирования стерильных эксплантов вида *B. sarmatica*

На среде состава MR20 наблюдается развитие проростков. Через несколько месяцев культивирования они сбрасывают семена, растут в высоту, наблюдается образование луковицы. Данная среда подходит для культивирования растений с целью их дальнейшего микрклонального размножения.

На средах состава MR1/2, MR0,1 и MR0,5 нет различий в развитии проростков. Проростки не сбрасывают семенную оболочку, развития листьев не наблюдается, у некоторых проростков зеленеет стебель. Корень длинный и толстый у всех проростков.

На среде состава MRBS наблюдается медленный рост. Некоторые проростки сбрасывают семена, видны зачатки развивающихся листьев. Растения зелёные, корни длинные, толстые, белого цвета. Данная питательная среда подходит для культивирования стерильных проростков вида *B. sarmatica* с целью сохранения их в банке *in vitro*.

Фотографии проростков *B. sarmatica* представлены на рисунках 3.19 - 3.20.

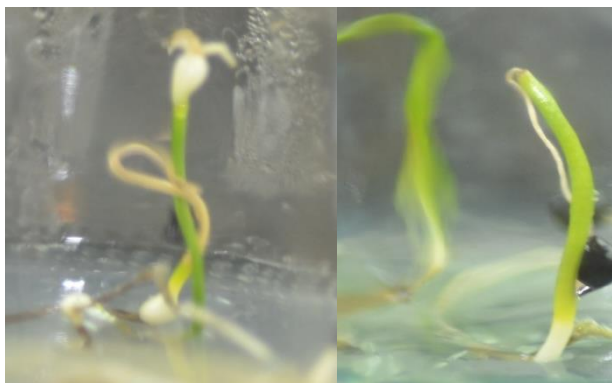


Рисунок 3.19 Проростки *B. sarmatica* на средах MR20 и MRBS

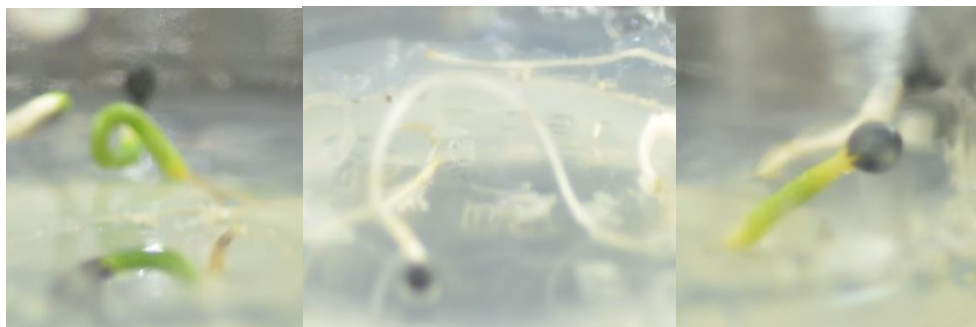


Рисунок 3.20 Проростки *B. sarmatica* на средах MR0,1, MR1/2 и MR0,5

#### 3.4.2 Подбор питательных сред для культивирования стерильных проростков вида *Nigella damascena*

На среде MR20 за два месяца культивирования и пересадки на свежую среду данного состава все полученные проростки погибли. У проростков наблюдались два развитых листа и развитый корень. Очевидно, что данная среда не является подходящей для *N. damascena*.

На среде состава MR1/2 проростки утратили здоровый вид менее чем за месяц культивирования. У проростков наблюдалось два-три листа и плохо развитый корень чёрного цвета. К концу первого месяца культивирования проростков на данной среде наблюдался каллусогенез. Возможно, данная среда больше подходит для получения каллусных культур *N. damascena*, нежели для культивирования стерильных проростков.

На среде MR 0,1 за месяц культивирования проростков наблюдалось их развитие и рост. Растения высокие, с несколькими развитыми листьями. Корень хорошо развит. Однако через некоторое время растения стали утрачивать здоровый вид. Листья и стебель стали белыми, проростки -

слабыми. Был замечен процесс каллусогенеза. Вероятно, данная среда больше подходит для получения каллусных культур *N. damascena*, нежели для культивирования стерильных проростков.

За месяц культивирования проростков на среде MR0,5 наблюдалось их развитие. Растения на данной питательной среде растут невысокими, зелёными, с несколькими развитыми листьями и развитым корнем. Очевидно, что данная питательная среда подходит для культивирования стерильных проростков вида *N. damascena* с целью сохранения их в банке *in vitro*.

Фотографии проростков *N. damascena* представлены в рисунке 3. 21.

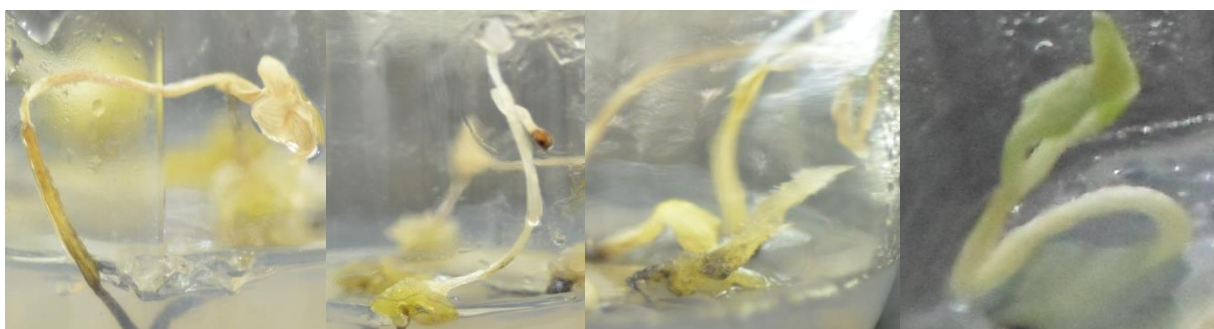


Рисунок 3.21 Проростки *N. damascena* на средах MR20, MR1/2, MR0,1 и MR0,5.

### 3.4.3 Подбор питательных сред для культивирования стерильных проростков вида *Echinacea purpurea*

На среде состава MR20 не наблюдалось активного роста. К началу второй недели культивирования развился третий лист, появились зачатки четвёртого. Корень розовый, листья и стебель зелёные. Данная питательная среда подходит для культивирования стерильных проростков вида *E. purpurea* с целью сохранения их в банке *in vitro*.

На среде состава MR1/2 не наблюдалось активного роста проростков. К концу первой недели культивирования появились зачатки третьего листа. Ризогенеза не наблюдалось. Данная питательная среда подходит для культивирования стерильных проростков вида *E. purpurea* с целью сохранения их в банке *in vitro*.

На среде состава MR0,1 растения выглядят хорошо, зелёные. За неделю культивирования появился третий лист, корень окрасился слабо розовый цвет. Активного роста не наблюдалось. Данная питательная среда подходит для культивирования стерильных проростков вида *E. purpurea* с целью сохранения их в банке *in vitro*.

На среде состава MR0,5 растения выглядят сильными, здоровыми. Активно идёт рост и развитие, хорошо развит третий лист, появляются зачатки четвёртого. Корень белого цвета, активно растёт. Данная среда подходит для культивирования растений с целью их дальнейшего микрклонального размножения.

Фотографии проростков *E. purpurea* представлены на рисунке 3.22.



Рисунок 3.22 Проростки *E. purpurea* на средах MR20, MR1/2, MR0,1 и MR0,5



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе полученных результатов исследования можно сделать следующие выводы:

1. Определены оптимальные стерилизующие агенты для растительных эксплантов видов *N. damascena*, *E. purpurea* и *B. sarmatica*. Установлено, что для эксплантов *E. purpurea* наилучшим стерилизатором является раствор «Белизна» при времени воздействия 20 минут; для *N. damascena* наилучшее соотношение стерильных и жизнеспособных семян даёт раствор Биоцида С при времени воздействия 20 минут; для семян *B. sarmatica* оптимальным стерилизатором является раствор «Белизна» при времени воздействия 30 минут.

2. Определены оптимальные концентрации и время воздействия гибберелловой кислоты на семена указанных выше видов. Установлено, что наилучшие показатели прорастаемости семян *B. sarmatica* даёт при замачивании их в нативном растворе гибберелловой кислоты на 1 час. Для семян *E. purpurea* воздействие 1% раствора синтетической гибберелловой кислоты оказалось оптимальной комбинацией. У *N. damascena* наибольшее количество проросших семян наблюдается при замачивании их на 1 часа в нативном растворе гибберелловой кислоты.

3. Осуществлён подбор оптимального состава питательных сред для культивирования в условиях *in vitro* растений вышеуказанных видов. Определено, что высокий рост стерильных проростков вида *N. damascena* наблюдается при культивировании их на среде «MR0,1», а на среде «MR0,5», рост замедляется. Для *E. purpurea* напротив, активный рост наблюдался именно на этой среде. На остальных средах активного роста не наблюдалось, однако не было замечено признаков увядания растений. Для растений вида *B. sarmatica* активный рост наблюдается на среде «MR20». На остальных средах он замедлен либо отсутствует вовсе.

По итогам проведённой работы растения видов *N. damascena*, *E. purpurea* и *B. sarmatica* впервые были введены в культуру *in vitro* и

пополнили существующий банк лаборатории «Инновационных методов исследования растительных объектов» кафедры биотехнологии и микробиологии НИУ «БелГУ»

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Bauer R., Wagner H. Echinacea: handbuch für ärzte, apotheker und andere naturwissenschaftler. Stuttgart, 1990, 182s.
2. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and with tobacco tissue cultures /Physiologia Plantarum. – 1962. – №15. – 397-473 с;
3. Wagner H. Pharmazeutische Biologie. Drogen und ihre inhaltsstoffe. Stuttgart; N.Y. 1993. 522 s. ВФС 42-2371-94.
4. Авксентьева О.А., Петренко В.А. Биотехнология высших растений: культура in vitro. – Харьков: ХНУ имени В.Н. Каразина, 2011. – 60 с;
5. Алёхина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. Физиология растений. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 640 с
6. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с;
7. Волова Т. Г. Биотехнология – Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – 252 с.
8. Биологический энциклопедический словарь / Гл. ред. М. С. Гиляров; Редкол.: А. А. Баев, Г. Г. Винберг, Г. А. Заварзин и др. — 2-е изд., исправл. — М.: Сов. Энциклопедия, 1986. — 831 с.
9. Гаммерман А. Ф., Кадаев Г. Н., Яценко-Хмелевский А. А. Лекарственные растения (Растения-целители): Справ. пособие — 4-е изд. — М.: Высш. шк., 1990.
10. Гапоненко А.К. Культура клеток и тканей высших растений in vitro, как метод биотехнологии. 2004
11. Губанов И.А., Киселева К.В. Иллюстрированный определитель растений Средней России: Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные). – М.: Т-во научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований, 2003. – 665 с;
12. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений: курс

- лекций – Минск БГУ, 2007. – 102 с.
13. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии: учебное пособие. М.: Изд. Центр «Академия», 2003. 208с.
  14. Еленевский А.Г., Радыгина В.И., Чаадаева Н.Н. Растения Белгородской области (конспект флоры). – Москва: МГПУ, 2004. – 120 с;
  15. Жолобова О.О. Сохранение редких и исчезающих видов растений в культуре *in vitro* и оценка уровня их внутривидового полиморфизма: автореферат диссертации канд. биол. наук. – Белгород: НИУ «БелГУ», 2012. – 24 с;
  16. Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. – М.: Наука, 1984. – 424 с;
  17. Захарычев В.В. Гербициды и регуляторы роста растений. Основы биохимии и применения. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2007. – 204 с;
  18. Зюбр Т.П., Пешкова В.А., Мурашкина И.А. Использование культуры клеток растений в биотехнологии лекарственных средств. – Иркутск: ГОУ ВПО ИГМУ Росздрава, 2008. – 65 с;
  19. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сариацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наук. Думка, 1992. – 232 с;
  20. Калинин Ф. Л., Сариацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений — Киев: Наук. думка, 1980 — 488 с.
  21. Козявина К.Ю. Раковский А.А. Калошина А.А. Использование регенерации в микрклональном размножении растений - Брянск 2013.
  22. Красная книга Белгородской области. Редкие и исчезающие растения, грибы, лишайники и животные. Официальное издание / Общ. науч. ред. А.В. Присный. – Белгород, 2004. – 532 с;

23. Красная книга Волгоградской области. Растения и грибы / Комитет охраны природы Администрации Волгоградской области. – Волгоград: Волгоград, 2006. – 236 с;
24. Красная книга Воронежской области. Растения. Лишайники. Грибы / Правительство Воронежской области; Управление по экологии и природопользованию Воронежской области; Воронежский государственный университет. – Воронеж: МОДЭК, 2011. – 472 с;
25. Красная книга Республики Калмыкия. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения растения и грибы. – Элиста: ЗАО «НПП Джангар», 2014. – 199 с;
26. Красная книга Ростовской области / Министерство природных ресурсов и экологии Ростовской области. – Ростов-на-Дону: Минприроды Ростовской области, 2014. – 344с;
27. Красная книга Ставропольского края. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и животных. Растения / Н.С. Панасенко (отв. ред.). – Ставрополь: Полиграфсервис, 2002. – 384 с;
28. Крашенинников И. М. Род 514. Чернушка — *Nigella* // Флора СССР : в 30 т. — Изд-во АН СССР, 1937. — Т. VII / 792с
29. Кудинов, М.П. Пряноароматические растения – Минск: Урожай, 1986. – 159 с
30. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. – М.: Высш. Шк., 2006. – 742 с;
31. Куркин В.А., Акушская А.С., Авдеева Е.В., Вельмяйкина Е. И., Даева Е.Д., Каденцев В.И. Флавоноиды травы эхинацеи пурпурной // Химия растительного сырья. 2010. №4. С.87-89
32. Лавренов В.К., Лавренова Г.В. Современная энциклопедия лекарственных растений - М.: ЗАО «ОЛМА Медиа Групп», 2007 - 272 стр.
33. Маевский П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 600 с;

34. Маширова С. Ю., Орловская Т. В. Изучение компонентного состава липидов семян чернушки посевной и чернушки дамасской // Научные ведомости БелГУ 2012.
35. Методы общей бактериологии. Т.1/ ред. Герхард Ф. М: Мир, 1983. 536с.
36. Мокшин Е.В., Лукаткин А.С. Культура клеток и тканей растений. – М.: Нобель Пресс, 2013. – 106 с;
37. Оголевец Г.С. - Энциклопедический словарь лекарственных, эфирномасличных и ядовитых растений - М.: Государст. изд. сельскохоз. литературы, 1951. 508 с.
38. Орлова И.Г. Основные пути воспроизводства культурной и дикорастущей флоры. – Ставрополь: Изд-во СГУ, 2003. – 142 с.
39. Орловская Т.В. (и др.) Выделение и изучение ферменталипазы из семян чернушки посевной // Регион. конф. по фармации, фармакологии и подготовке кадров (57; 2002; Пятигорск): материалы. — Пятигорск, 2002. — С. 18-19
40. Ханс-Петер Пифо. Статистика – М.: Изд. ВНИИА, 2011 - 288с.
41. Полевой В.В. Физиология растений. Учебник для биологических специальностей ВУЗов. - М.: Высшая школа, 1989. - 464 с., илл.
42. Сазыкин Ю.О., Орехов С. Н., Чакалева И.И. Биотехнология — 3-е изд., стер. — М.: Издательский центр «Академия», 2008. — 256 с.
43. Сакович Г. С. и др. Некоторые итоги клинического изучения препаратов и компонентов эхинацеи, результаты исследования безопасности, возможные побочные эффекты, взаимодействие с другими лекарственными средствами // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. – Т. 8. – №. 4. – С. 11-19.
44. Самородов А.В., Пospelов С.В., Моисеева Г.Ф., Серeda А.В. Фитохимический состав представителей рода эхинацея и его

- фармакологические свойства // Химико-фармацевтический журнал. 1996, Т.30, №.4. С. 32—37.
45. Середин Р.М., Соколов С.Д. Лекарственные растения и их применение. – Ставрополь: Ставропольское книжное издательство, 1973. – 240 с;
46. Сковородкин Д.Н. Методическое пособие по биотехнологии для студентов БГСХА.
47. Сорокина И.К., Старичкова Н.И., Решетникова Т.Б. Основы биотехнологии растений. – Саратов: Издательство СГУ, 2002. – 34 с;
48. Тимофеева О.А., Румянцева Н.И. Культура клеток и тканей растений. – Казань: Казанский университет, 2012. – 88 с. Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений: учебно-методическое пособие. – Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003. – 58 с.
49. Тризна А.А. Растения – жизнь и здоровье. – Тула: Приок. кн. изд-во, 1992. – 192 с;
50. Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений. – Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003 – 58 с;
51. Цицилин А. Н. Лекарственные растения: атлас – справочник – Москва; Издательство «Э», 2015 - 288 с.
52. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Кочиева Е.З. Сельскохозяйственная биотехнология. – М.: «Высшая школа», 2008. – 710 с;
53. Широков А.И., Крюков Л.А. Основы биотехнологии растений. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 49 с.
54. Шхиян А. С., Нерсесян А. А. Род *Bellevalia* Lapeyr., Беллевалия // Флора Армении / Под ред. А. Л. Тахтаджяна. — Ruggell (Liechtenstein): Gantner, 2001. — Т. 10 : Monocotyledones (исключая Poaceae). — С. 271—279. — 612 с

55. Чернушка, растения из семейства лютиковых // Энциклопедический словарь Брокгауза и Ефрона : в 86 т. (82 т. и 4 доп.). — СПб., 1890—1907.
56. Черных Е.Н., Новиков П.С., Сергеев Р.В. Изучение динамики формирования меристематических очагов в культуре растительной ткани методом ЯМР-спектроскопии / Научный журнал КубГАУ. — 2013. — № 90(6). — 1-34 с;
57. Якушкина Н.И. Физиология растений. — М.: Просвещение, 1980. — 446 с.



## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение 1 Состав питательной среды Мурасиге-Скуга (Murashige и др. 1962)

Компоненты среды	Количество на 1 л	
	для асептических проростков	для каллусогенеза
Маточные растворы макросолей	100 мл	100 мл
Маточные растворы микросолей	1 мл	1 мл
Fe-хелат	5 мл	5 мл
CaCl <sub>2</sub>	5 мл	5 мл
Витамины: РР	0,5 мг	0,5 мг
В <sub>1</sub>	1 мг	1 мг
В <sub>6</sub>	1 мг	1 мг
Мезоинозит	100 мг	100 мг
ФГ: НУК	-	2 мг
ИУК	-	2 мг
2,4-Д	-	2 мг
Кинетин	-	1 мг
БАП	-	1 мг
Сахароза	30 г	30 г
Агар-агар	7 г	7 г

Приложение 2  
Состав питательной среды Гамборга-Эвелера  
(Егорова, 2003)

Компоненты среды	Концентрации
Маточные растворы макросолей	50 мл/л
Маточные растворы микросолей	1 мл/л
Fe-хелат	5 мл/л
CaCl <sub>2</sub>	50 мл/л
Витамины: PP	1 мг/л
B <sub>1</sub>	10 мг/л
B <sub>6</sub>	1 мг/л
Мезоинозит	100 мг/л
2,4-Д	2 мг/л
Сахароза	20 г/л

Приложение 3  
Состав питательной среды Уайта  
(Егорова, 2003)

Компоненты среды	Концентрации
Маточные растворы макросолей	50 мл/л
Маточные растворы микросолей	1 мл/л
Fe-хелат	5 мл/л
CaCl <sub>2</sub>	0,5 мл/л
Витамины: PP	1 мг/л
В <sub>1</sub>	0,5 мг/л
В <sub>6</sub>	0,5 мг/л
Глицин	2 мг/л
Сахароза	30 г/л

Приложение 4  
Состав питательной среды Ничей  
(Егорова, 2003)

Компоненты среды	Концентрации
Маточные растворы макросолей	50 мл/л
Маточные растворы микросолей	1 мл/л
Fe-хелат	5 мл/л
CaCl <sub>2</sub>	50 мл/л
B <sub>1</sub>	0,005 мл/л
B <sub>6</sub>	0,005 мл/л
Мезоинозит	100 мл/л
Сахароза	125 мг/л