

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

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

**ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ НЕКОТОРЫХ РЕДКИХ И
ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА LAMIACEAE
(ГУБОЦВЕТНЫЕ)**

Выпускная квалификационная работа
обучающегося по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология
очной формы обучения, группы 07001316
Зыбкиной Дарьи Романовной

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

БЕЛГОРОД 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1. Общая характеристика микрклонального размножения	5
1.1.1. Объекты микрклонального размножения	5
1.1.2. Преимущества микрклонального размножения растений.....	6
1.2. Условия, влияющие на культивирование растений <i>in vitro</i>	7
1.2.1. Влияние выбора экспланта на культивирование растений	7
1.2.1. Создание асептических условий	8
1.2.2. Влияние состава питательной среды на культивирование растений	10
1.2.3. Влияние регуляторов роста на культивирование растений	11
1.2.4. Влияние физических факторов на процесс микрклонального	15
размножения	15
1.3. Биологическая характеристика <i>Hyssopus cretaceus</i> Dubj.....	15
1.4. Биологическая характеристика <i>Prunella grandiflora</i> (L.) Sholl.	17
1.5. Биологическая характеристика <i>Salvia sclarea</i> L.	20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	22
2.1. Материалы исследования.....	22
2.2. Методы исследования.....	22
2.2.1. Выбор, сбор, сушка, хранение.....	23
2.2.2. Приготовление и стерилизация агаризованных питательных сред.	23
2.2.3. Выбор концентрации и времени воздействия гиббереллиновой	24
кислоты на растительные объекты.....	24
2.2.4. Стерилизация растительных объектов и создание асептических	25
условий.....	25
2.2.5. Получение и культивирование стерильных проростков	26
2.2.6. Статистическая обработка данных	27
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	28
3.1. Стерилизация растительных эксплантов.....	28
3.1.1. Стерилизация растительных эксплантов <i>H. cretaceus</i>	28
3.1.2. Стерилизация растительных эксплантов <i>P. grandiflora</i>	29

3.1.3. Стерилизация растительных эксплантов <i>S. sclarea</i>	30
3.2 Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов.....	30
3.2.1 Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов вида <i>H. cretaceus</i>	31
3.2.2 Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов вида <i>P. grandiflora</i>	32
3.2.3 Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов вида <i>S. sclarea</i>	33
3.3. Влияние гиббереллиновой кислоты на прорастания семян	34
3.3.1. Влияние гиббереллиновой кислоты на прорастание семян <i>H.</i> <i>cretaceus</i>	35
3.3.2. Влияние гиббереллиновой кислоты на прорастание семян <i>P.</i> <i>grandiflora</i>	40
3.3.3. Влияние гиббереллиновой кислоты прорастание семян <i>S. sclarea</i> .	45
3.4. Подбор питательных сред для культивирования.....	51
3.4.1. Подбор питательных сред для культивирования для <i>H. cretaceus</i> ..	51
3.4.2. Подбор питательных сред для культивирования <i>P. grandiflora</i>	53
3.4.3. Подбор питательных сред для культивирования <i>S. sclarea</i>	54
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	56
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	57
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	65

ВВЕДЕНИЕ

Растения семейства *Lamiaceae* уже давно крепко вошли в обиход человека. Они широко применяются в парфюмерии, пищевой промышленности, в качестве декоративных растений. Но особую ценность им придает наличие в их составе многих биологически активных веществ, благодаря которым данные виды растений являются ценным лекарственным сырьем.

Актуальность темы исследования обусловлена тем, что разработка технологий сохранения в культуре *in vitro* лекарственных и исчезающих видов растений приобретает все большую значимость в современном мире. Данная группа методов дает возможность как сохранить редкие и лекарственные виды растений и многократно увеличить воспроизводство данных растений, так и получать из них биологически активные вещества, которые могут быть использованы в разных отраслях промышленности. Что особо актуально для растений семейства *Lamiaceae*, так как многие из них, особенно те, численность которых резко сокращается в последние годы, являются перспективными источниками многих вторичных метаболитов.

Целью данной работы является оптимизация технологии введения в культуру и микроклонального размножения *Hyssopus cretaceus* Dubj, *Prunella grandiflora* (L.) Sholl и *Salvia sclarea* L. для сохранения их в банке *in vitro*.

Для достижения выше изложенной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить оптимальный режим стерилизации растительных эксплантов видов *H. cretaceus*, *P. grandiflora* и *S. sclarea*;
2. Установить влияние различных концентраций гиббереллиновой кислоты на прорастание семян видов *H. cretaceus*, *P. grandiflora* и *S. sclarea* в течение определенного промежутка времени;
3. Осуществить подбор питательных сред для культивирования *H. cretaceus*, *P. grandiflora* и *S. sclarea* в условиях *in vitro*;

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика микроклонального размножения

Каждый организм, в том числе и растения, имеет способность к воспроизведению себе подобных, осуществляемую через размножение.

У растений выделяют половое, бесполое и вегетативное размножение. При бесполом размножении новый организм появляется из спор. При половом размножении образование нового организма происходит при слиянии двух половых клеток, называемых гаметами. Вегетативным размножением происходит путем воспроизведения растений из вегетативных частей материнского растения (Полевой, 1989, 370).

Все выше перечисленные способы размножения имеют как преимущества, так и недостатки.

К недостаткам полового размножений можно отнести получение генетически разнообразного материала и длительный ювенильный период. При бесполом размножении спорам не всегда получается найти благоприятное место для прорастания. Самым важным недостатком вегетативного размножения является то, что происходит накопление и передача инфекции, что усложняет получение здорового посадочного материала (Шевелуха и др., 2008, 103).

Все это привело к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения, лишенного данных недостатков – микроклонального размножения. Он представляет собой массовое бесполое размножение растений, при котором возникшие формы растений генетически идентичны исходному экземпляру (Бутенко, 1999, 72).

1.1.1. Объекты микроклонального размножения

Ввести в культуру *in vitro* можно довольно широкий спектр объектов растительного происхождения. Как правило, основная часть исследований

проводится с семенными растениями. В качестве эксплантов при этом используют разные органы, ткани и клетки. Наиболее удобными объектами для культивирования среди них являются двудольные травянистые растения. А вот древесные растения, особенно голосеменные, требуют для получения стабильной культуры *in vitro* гораздо более сложных условий (Дитченко, 2007, 4).

Реже вводятся в культуру низшие растения и споровые высшие растения. Многоклеточные водоросли перспективны в качестве источников фитопродуктов для пищевой, медицинской и иных отраслей промышленности, но при этом их довольно трудно поддерживать в культуре. Большое внимание так же отводят выращиванию микроводорослей. Их культивируют с целью использования их биомассы и фитопродуктов в качестве сырья для промышленности (Бутенко, 1999, 75).

1.1.2. Преимущества микроклонального размножения растений

Метод микроклонального размножения на сегодня во многих странах стал коммерческим. Это связано с тем, данный метод имеет ряд неоспоримых преимуществ перед традиционными способами размножения растений. К преимуществам клонального микроразмножения относят:

1. Освобождение от болезней бактериальной, вирусной и грибковой, микоплазменной и нематодной природы посадочного материала (Кильчевский и др., 2012, 18-19);
2. Получение генетически однородного посадочного материала (Бутенко, 1999, 73);
3. Высокий коэффициент размножения. При микроклональном размножении получают до 10^4 - 10^5 клонов в год, тогда как при традиционном способе – всего 5-100 штук (Тимофеева и др., 2012, 3);

4. Возможность регулирования факторов культивирования и получения растений в течение всего года (Кильчевский и др., 2012, 18-19);
5. Уменьшение сроков получения растительных организмов приводит к сокращению продолжительности селекционного процесса до 2–3 лет вместо 10–12 (Роговая и др., 2005, 291);
6. Ускоренное выращивание растений с длительным ювенильным периодом за счет уменьшения сроков перехода от одной фазы к другой (Роговая и др., 2005, 291);
7. Получение видов и сортов, которые не размножаются или плохо размножаются традиционными способами (Бутенко, 1999, 73).

1.2. Условия, влияющие на культивирование растений *in vitro*

Культура клеток и тканей растений, полученная в условиях *in vitro*, является основой микроклонального размножения. На сегодня культивируемые клетки и ткани можно получить из любого высшего растения, но для этого необходимо создать определенные условия, способствующие росту отдельных клеток и развитию их в полноценное растение (Зюбр и др., 2008, 4-5).

На эффективность клонального микроразмножения оказывают влияние как физико-химические условия культивирования, так и физиологические особенности вводимого в культуру растения (Цыренов, 2003, 26).

1.2.1. Влияние выбора экспланта на культивирование растений

Успех работы по введению растительных объектов в культуру во многом определяется генотипом исходного растения, так как скорость регенерации *in vitro* напрямую зависит от вида растения. Так, однодольные и

древесные растения обладают меньшей скоростью регенерации, чем многие травянистые растения.

Культивировать *in vitro* можно практически любую часть растения, если эксплант отобран на определенной стадии развития растения. Лучше всего использовать пазушные почки, верхушки побегов и меристемы. Они хорошо выживают при введении в культуру, обладают хорошей тотипотентностью и высокой скоростью роста.

Физиологический возраст экспланта так же необходимо учитывать при введении в культуру. Так как он оказывает влияние как на скорость развития, так и на реализацию возможного пути развития *in vitro*. Например, у эчеверии элегантной на эксплантах из молодых листьев возникали преимущественно корни, из старых эксплантов – побеги, а из средних по возрасту – и корни, и побеги (Валиханова, 1996, 74).

1.2.1. Создание асептических условий

Соблюдение строгой стерильности является необходимым условием при работе с культурой клеток и тканей. Для их соблюдения должна выполняться обязательная стерилизация всех используемых в работе материалов и инструментов, питательных сред, самих растительных объектов, а также операционной комнаты, одежды и рук персонала (Дитченко, 2007, 18).

При работе с культурой клеток, тканей и некоторых других работ, требующих стерильности, используются ламинар-боксы. Для чего внутренний объем ламинар-бокса облучают ультрафиолетом в течение 20 минут, после чего рабочую поверхность обрабатывают 70% раствором этилового спирта (Бутенко, 1999, 14).

Для стерилизации посуды и инструментов их предварительно моют, просушивают, заворачивают в фольгу или бумагу, после чего помещают в сухожаровый шкаф на 1,5–2 ч температуре 160 °С. Непосредственно перед

работой инструменты стерилизуют еще раз. Для этого их обжигают в пламени спиртовки, предварительно обработав 96% спиртом (Цыренов, 2003, 19; Широков и др., 2012, 15).

Питательные среды, не содержащие веществ, разлагающихся при высоких температурах, автоклавируют при давлении 0,5–1 атм от 15 до 20 мин. Другим способом стерилизации, проводимом при низких температурах, является тиндализация. Данный способ стерилизации заключается в том, что среду сначала кипятят 10 мин, затем охлаждают до комнатной температуры и оставляют так на сутки, данную процедуру повторяют дважды.

Для стерилизации растворов с термолабильными соединениями применяют метод холодной стерилизации. Для этого растворы, содержащие термолабильные вещества, подвергают фильтрации через стерильные микроскопические фильтры. После чего данные растворы соединяют в стерильных условиях с уже стерильной и охлажденной до 40 °С основой среды.

Так как на поверхности любой растительной ткани есть эпифитная микрофлора, то она сама по себе может служить источником контаминации. Поэтому все растительные экспланты подвергаются стерилизации. Для этого применяют широкий спектр химически активных веществ. Подбор реагентов, их концентрации и времени стерилизации растительных объектов строго индивидуален для каждого типа экспланта (Сорокина и др., 2002, 11). Растительные экспланты стерилизуют растворами соединений, содержащих бром или хлор, спиртом, диацетом, антибиотиками, а так же перекисью водорода.

Данный способ стерилизации устраняет только наружную инфекцию с растительной ткани. Для устранения внутренней инфекции эксплант обрабатывают антибиотиком. При необходимости использования антибиотиков применяют либо антибиотик широкого спектра действия, либо несколько специфичных для различных микроорганизмов (Дитченко, 2007, 18–20).

1.2.2. Влияние состава питательной среды на культивирование растений

Для нормального роста и развития растительной ткани или органа растения требуется соблюдение физико-химических условий (освещённости, температуры, влажности, кислорода для дыхания, углекислого газа для фотосинтеза), а также поступление минеральных и органических элементов. При культивировании растительных эксплантатов в закрытых пробирках требуются сложные по составу среды, обеспечивающие все потребности тканей или органов, так как в данном случае протекание фотосинтеза затруднено (Шевелуха и др., 2008, 14).

Так, на процесс микроклонального размножения немалое влияние оказывает кислотность питательной среды, оптимальное значение которой варьирует от 5,6 до 5,8. Кислотность среды определяет доступность питательных веществ. Среда с сильнокислыми и сильнощелочными свойствами вызывают переход железа и фосфора в нерастворимое состояние, что лимитирует поступление этих веществ в растительный организм. (Черных и др., 2013, 32). А недостаток или переизбыток любого из минеральных питательных элементов приводит к отклонению в росте и развитии растений (Сальников, 2014, 176). В силу данных обстоятельств необходимо для каждого растения подбирать индивидуальных концентраций всех элементов среды, что привело к появлению различных типов сред и их модификаций.

Чаще всего при микроклональном размножении используется среда Мурасиге и Скуга (MS) (Murashige и др., 1962). Она содержит большое количество неорганического азота, стимулирующего процессы соматического эмбриогенеза и органогенеза. Так же следует учитывать, что от этапа микроклонального размножения зависит и концентрация углеводов в среде (Цыренов, 2003, 7).

Все компоненты сред подразделяют на пять групп:

- источники углерода;
- макроэлементы;
- микроэлементы;
- регуляторы роста;
- витамины (Дитченко, 2007, 21)

Смесь минеральных солей является основой любых питательных сред, используемых для культивирования растительных объектов. Она включает в себя сульфаты, нитриты, нитраты, фосфаты; а также растворимых солей Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} . В качестве железа применяются хелаты, являющейся наиболее доступной формой для растительных тканей.

Азот, сера, фосфор входят в состав белков, нуклеиновых кислот, жиров. Железо, молибден, марганец, цинк, кобальт с порфиринами образуют макромолекулы окислительно-восстановительных ферментов, пигментов фотосинтеза. Ионы H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- необходимы для регуляции рН среды и поддержания физиологических градиентов клеток (Широков, 2012, 36).

Источники углерода являются обязательными компонентами сред, используемых в микроклональном размножении, так как большинство культивируемых растительных тканей имеют гетеротрофный тип питания. Сахароза является наиболее распространенным компонентом среды. Полисахариды в питательных средах практически не используются (Гапоненко А.К., 2004, 67).

Немаловажными компонентами среды являются так называемые биологических катализаторы, в качестве которых выступают витамины группы В (B_1 , B_6 , B_{12}), мезоинозит, аскорбиновая кислота, никотиновая кислота. Их используют для стимуляции биохимических реакций в клетках.

1.2.3. Влияние регуляторов роста на культивирование растений

Фитогормоны – это гормоны растений. Они синтезируются в специализированных тканях высших растений и действуют в качестве регуляторов онтогенеза: влияют на деление и рост клеток, созревание, состояние покоя, старение, устойчивость к стрессу, формирование пола, транспирацию, тропизмы; обеспечивают функциональную целостность растительного организма, закономерную последовательность фаз индивидуального развития (Гиляров, 1989, 673).

Фитогормоны синтезируются в различных частях растений. Так, в апексах корней образуется кинетин, в апексах побегов – индолил-3-уксусная кислота, в листьях – каурен и абсцизовая кислота, а эндосперм прорастающих семян является источником зеатина (Широков, 2012, 28).

По функциональному действию фитогормоны разделяют на пять групп:

- цитокинины
- ауксины
- гиббереллины
- абсцизины
- этилен (Дитченко, 2007, 22)

Ауксины представляют собой производные индола, стимулирующие клеточное растяжение (Гиляров, 1989, 43). Основными фитогормонами этого типа являются ИУК – β -индолил-3-уксусная кислота, ИМК – индолил-3-масляная кислота, НУК – α -нафтилуксусная кислота, 2,4-Д – 2,4-дихлорфенокси-уксусная кислота (Мошкин, 2013, 75).

Растяжение клеток под действием ауксинов связано с активацией данным фитогормоном H^+ -выкачивающего насоса в плазмалемме. За счет подкисления клеточной стенки, происходящего при этом процессе, разрываются целлюлозные и пектиновые полимеры стенки, что ведет к её размягчению. Данный процесс облегчает растяжение клетки под действием тургорного давления (Гиляров, 1989, 43).

Однако данная группа фитогормонов влияет и на иные фазы роста клеток. Ауксин активизирует синтез таких молекул как: РНК, ДНК, различных белков, микротрубочек и митотического веретена.

Ауксин способствует транспорту воды и питательных веществ к месту действия, так как под его влиянием активируются кальциевые каналы, находящиеся на плазмалемме. Все это усиливает рост различных органов растения. Таким образом, основной функцией ауксинов является определение направления движения веществ по растению (Алехина и др., 2005, 340).

В микрклональном размножении ИУК используется также для индуцирования каллусогенеза, а в комбинации с цитокининами – для индукции заложения корней (Гиляров, 1989, 43).

Гиббереллины представляют собой тетрациклические дитерпеноиды (Гиляров, 1989, 132). Данная группа фитогормонов не только стимулируют рост клеток за счет растяжения, но и активизирует других фитогормонов в растении. В культуре ткани чаще всего используется гибберелловая кислота А3, смесь гиббереллинов А3 и А7 и отечественные препараты гибберсиб, гиббор М и гибберросс, которые представляют собой смесь натриевых солей гиббереллиновой кислоты типа ГА3, ГА4, АГ7 и АГ9 (Захарычев, 2007, 163).

В растениях гиббереллины синтезируются в формирующихся семенах, верхушечных стеблевых почках, реже в корнях. В процессе онтогенеза наблюдается изменение как количества гиббереллинов, так и их состояния. Так, при прорастании семян или цветении физиологически малоактивные гиббереллины переходят в активную форму, а при созревании плодов и переходе к покою активные гиббереллины инактивируются (Гиляров М. С., 1989, 133).

Обработка данным фитогормоном способствует выходу семян из состояния покоя за счет активизации гидролитических ферментов, что вызывает ускоренное превращение запасных веществ и прорастание семян (Мошкин Е.В., 2013, 77).

Цитокинины – это фитогормоны, являющиеся производными аденина. Цитокинины разделяют на природные и синтетические, к первой группе относят производные 6-аминопурина, а именно кинетин, зеатин и 6-бензиламинопурин, среди гормонов второй группы известны производные фенилмочевины (Кузнецов, 2006, 561).

Стимуляция дифференцировки и деления клетки, а также задержка процессов старения являются главными функциями цитокинов. Данные фитогормоны усиливают синтез нуклеиновых и аминокислот, что и ведет к клеточному делению (Якушина, 2005, 125).

В культуре ткани цитокинины вызывают деление клеток и образование лигнифицированных клеток. Влияние цитокининов на дифференцировку напрямую зависит от соотношения концентраций гиббереллинов и ауксинов к концентрации цитокинов (Якушина, 2005, 127).

Абсцизовая кислота – природный гормональный ингибитор роста терпеноидной природы. Фитогормоны, относящиеся к абсцизинам, представляют собой регуляторы роста, которые синтезируются в листьях и в корневом чехлике.

Увеличение содержания этого фитогормона тормозит прорастание семян, задерживает рост пазушных почек при апикальном доминировании, ускоряет переход семян, клубней и почек в покоящееся состояние (Лутова, 2000, 439).

Для успешного роста культуры клеток растений определяющим фактором является содержание определенных фитогормонов в среде.

Гормональная система растений тесно связана с генетическим аппаратом клетки. Фитогормоны способны регулировать экспрессию генов как за счет влияния на степень метилирования ДНК, так и за счет связывания с белками – репрессорами на опероне. Это приводит сначала к активации определенных структурных генов, а затем и к синтезу ферментов. Следовательно, генетическую программу растительной культуры возможно

изменить за счет регулирования соотношения фитогормонов в питательных средах (Якушина, 2005, 127).

1.2.4. Влияние физических факторов на процесс микроклонального размножения

К физическим факторам, влияющим на культивирование растительных эксплантов относят температуру, влажность и условия освещения.

Водный режим имеет немалое значение для получения полноценных растений в культуре *in vitro*. При нарушении водного обмена растений наблюдается явление, называемое витрификацией или «стекловидностью». Клетки растения начинают набухать, листья становятся прозрачными, а стебель утолщается. Все эти изменения из-за уменьшения содержания целлюлозы, хлорофилла и лигнина сопровождаются снижением сухой массы листьев (Валиханова, 1996, 75).

Не менее важным условием культивирования является освещенность. Растения выращиваются при искусственном освещении, так как в темноте поглощение растениями солей замедляется, а это ведет к замедлению развития корневой системы. На свету, наоборот, наблюдается транспирационный ток (Черных и др., 2013, 2).

Параметры освещения зависят от культуры, но в среднем освещенность колеблется в пределах 1000–3000 Лк, а фотопериод составляет от 14 до 16 часов. Высокая интенсивность света опасна для растений, так как она может вызывать хлорозы, что в свою очередь ведет к замедлению развития культуры.

Культивирование растений обычно идет при температуре от 22 до 26 °С днем, а ночью от 18 до 22 °С (Валиханова, 1996, 77).

1.3. Биологическая характеристика *Hyssopus cretaceus* Dubj.

Один из представителей рода *Hyssopus* L. – иссоп меловой (*Hyssopus cretaceus* Dubj.). Вид относится к роду иссопа (*Hyssopus*), к семейству яснотковых (*Lamiaceae*), к порядку ясноткоцветных (*Lamiales*) (Маевский, 2006, 415). Это полукустарник от 20 до 50 см высотой. Имеет округлые серо-зеленые стебли, слабо опушенные сверху, с почти незаметной срединной жилкой и узколинейные листья. В пазухах листьев находится от трех до семи цветков, которые образуют рыхлое удлинённое однобокое кистевидное соцветие. Цветёт с мая до сентября. Цветки иссопа мелового синего цвета, очень душистые. Плод, в виде орешка, созревает в конце августа, начале сентября. *H. cretaceus* – это реликтовое растение, сохранившееся со времен третичного периода. Иссоп меловой часто поселяется на обрывах, крутых склонах преимущественно южной экспозиции. Благодаря его воздействию происходит образование почвы за счет разрушения материнской породы (Думачева, 2015, 4). Общий вид цветущего растения *H. cretaceus* представлен на рис. 1.3.1.

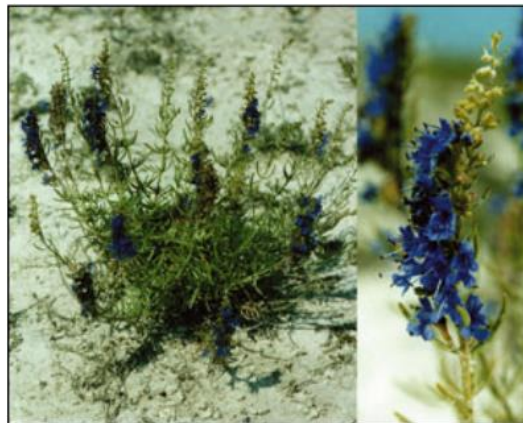


Рис. 1.3.1. Общий вид цветущего растения *H. cretaceus* (Красная книга Белгородской области, 2005,200)

В России *H. cretaceus* распространен в Курской, Белгородской, Воронежской, Ростовской, Волгоградской и Саратовской областях (Красная книга России, 2008, 313). На территории Белгородской области иссоп меловой распространен в Валуйском, Вейделевском, Ровеньском,

Новооскольском, Алексеевском, Волоконовском и Шебекинском районах (Красная книга Белгородской области, 2005, 200).

H. cretaceus включен в Красные книги Белгородской (2005, 200), Волгоградской (2006, 129), Курской (2002, 121), Ростовской (2004, 1033) и Саратовской (2006, 76) областей.

В Красной книге Белгородской области (2005, 200) вид имеет категорию VI и статус особо ценного вида.

H. cretaceus является не только эфирномасличным и декоративным растением, а так же ценным видом, необходимым для фитомелиорации меловых склонов (Гиляров, 1989, 132).

1.4. Биологическая характеристика *Prunella grandiflora* (L.) Sholl.

Представитель данного рода – *Prunella grandiflora* (L.) Sholl., относится к роду черноголовки (*Prunella* L.), семейству яснотковых (Lamiaceae), порядку ясноткоцветных (Lamiales) (Маевский, 2006, 429). Представляет собой многолетнее травянистое растение высотой 10-40 см с прямостоячими или приподнимающимися стеблями длиной от 15 до 60 см. Листья длинночерешковые, продолговатые или яйцевидно-ланцетные. Чашечка вишневого цвета (Красная книга Белгородской области, 2005, 205). Размножается семенами и вегетативно. Растет на остепненных лугах, сухих склонах, среди кустарников и в светлых лесах (Красная книга Московской области, 2008, 364). Общий вид цветущего растения вида *P. grandiflora* показан на рис. 1.4.1.



Рис. 1.4.1. Общий вид цветущего растения вида *P. grandiflora* (Красная книга Белгородской области, 2005, 205)

На территории России прорастает во многих областях, кроме Владимирской и Тверской. Данный вид занесен в Красные книги Белгородской области (2005, 205), Калужской области (2006, 217), Курской области (2013, 122), Липецкой области (2014, 338), Московской области (2008, 364), Пензенской области (2013, 143), Рязанской области (2011, 484), Смоленской области (1997, 103), Тамбовской области (2002, 211), Тульской области (2010, 122).

В Красной книге Белгородской области (2005, 205) вид имеет III категорию. По Белгородской области прорастает в Валуйском, Волоконовском, Губкинском, Корочанском, Красненском, Новооскольском и Шебекинском районах (Красная книга Белгородской области, 2005, 205).

В настоящее время установлено, что данный вид является перспективным источником многих вторичных метаболитов. Наземная часть растения богата тритерпеноидами, фенолкарбоновыми кислотами, флавоноидами (Попова и др, 2008, 327; Цуркан и др., 2011, 213-214; Шамилов и др., 2014, 132-133).

В листьях черноголовки крупноцветковой накапливаются важнейшие биогенные элементы, основными из которых являются: калий, магний, фосфор, кремний, калий и натрий (Охинченко и др., 2015, 122)

Важнейшим биологически активным веществом, синтезируемым растением вида *P. grandiflora*, является розмариновая кислота. Она обладает высокой противомутагенной (Santamaria et al., 1987, 98), антипролиферативной (Makino et al., 2000, 1143), противовоспалительной (Al-Sereiti et al., 1999, 126) и антициклооксигеназной (Patrick, Kalidas, 2004, 104), противоаллергической (Ito et al., 1998), противоопухолевой, антидепрессантной (Takeda et al., 2002) и противовирусной активностью (Mazumder et al., 1997, 3061). А так же данное вещество является одним из эффективных натуральных антиоксидантов (Malencic et al., 2000, 547) и может защищать от свободнорадикальных патологий, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, лучевая болезнь и онкологические заболевания (Lu, Foo, 2002, 1143).

Однако все известные растения, содержащие розмариновую кислоту, произрастают за рубежом и в южных зонах европейской части России. Это делает черноголовку крупноцветковую перспективным источником розмариновой кислоты, так как ее содержание в растении столько же или превышает содержание в растениях средиземноморских видов семейства *Lamiaceae* (Алексеева Л.И., Болотник Е.В., 2013,124).

Кроме того, содержащиеся в растении урсоловая и олеаноловая кислоты проявляют гепатопротекторную и противовирусную активность (вирус ВИЧ, Эпштейн-Барра, гриппа А и Б), ингибируют рост опухолей. Урсоловая кислота обладает противовоспалительным свойством (Чагоян, 1996, 60).

P. grandiflora в качестве лекарственного сырья используют как гемостатическое, антимикробное, жаропонижающее, ранозаживляющее, противовоспалительное, тонизирующее, отхаркивающее и антикомплементарное средство (Дмитрук, 1998, 210; Дмитрук, 2001, 94; Шамилов, 2013, 133).

1.5. Биологическая характеристика *Salvia sclarea* L.

Salvia sclarea L. или шалфей мускатный относится к роду шалфей (*Salvia* L.), подсемейству котовниковых (*Nepetoideae* Kostel.), семейству яснотковых (*Lamiaceae*), порядку ясноткоцветных (*Lamiales*) (Linnaei, 1753, 25). *S. sclarea* – это травянистое двулетнее растение с мощными прямостоящими или слегка изогнутыми в нижних узлах стеблями. Цветет с начала июня по конец июля, но иногда и до августа. Имеет крупные, кистевидные соцветия, длиной от 15 до 40 см, состоящие из цветоносных осей различных порядков. Плодами *S. sclarea* являются орешки, созревающие в августе-сентябре. Они имеют яйцевидную или эллипсоидальную формы, каштанового или бурого цвета. Поверхность орешков гладкая, при смачивании сильно ослизняется (Шульгин, 1963, 154; Победимова, 1954, 311; Власова, 1980, 5). Общий вид цветущего растения вида *S. sclarea* показан на рис. 1.5.



Рис. 1.5. Общий вид цветущего растения вида *S. sclarea* L. (Бочкарёв и др., 2014, 3)

В мире *S. sclarea* встречается в Западном Средиземноморье, центральной Европе, Кавказе и Средней Азии. В России дикорастущие формы данного вида встречаются на Северном Кавказе (Kintzios, 2005, 286). В Белгородской области данный вид интродуцирован в ботаническом саду НИУ «БелГУ».

Данный вид является перспективным источником многих вторичных метаболитов. Химический состав *S. sclarea* включает в себя такие вещества

как: флавоноиды (апигенин, рутин, кверцетин и цинарозид), соединения фенольной природы (дигидрокверцетин, рутин, кумарин, умбеллиферон, галловая, цикориевая и феруловая кислоты), фенолкарбоновые кислоты (хлорогеновая, галловая, кофейная и феруловая) (Гаврилин и др., 2010, 104).

Многие из этих веществ вызывают повышенный интерес фармакологов, в связи с их широким спектром биологической активности. Так, умбеллиферон обладает бактерицидной, фунгицидной и противовоспалительной активностью. Кумарины обладают фунгистатической активностью. Феруловая кислота обладает мощным гепатопротекторным эффектом (R. Rukkumani et al., 2004, 461), является сильным антиоксидантом (R. Rukkumani 2004, 552). Кофейная кислота оказывает антиоксидантное и гипогликемическое действия (Левицкий, 2010, 15; J.J. Un et al., 2006, 480). Цикориевая кислота выступает в качестве ингибитора интегразы ВИЧ типа I (Левицкий, 2010, 17).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

В качестве материала в данной работе выступали семена некоторых редких и лекарственных растений семейства *Lamiaceae*: иссопа мелового (*H. cretaceus*), черноголовки крупноцветковой (*P. grandiflora*) и шалфея мускатного (*S. sclarea*). Семена *P. grandiflora* и *S. sclarea* были собраны на территории Ботанического сада Белгородского государственного национального исследовательского университета НИУ «БелГУ», расположенного в правобережной части реки Везелка. Семена *H. cretaceus* собирались на территории села Верхние лубянки Волоконовского района Белгородской области.

Семена собирались с июня по сентябрь 2016 года, в зависимости времени созревания растений. Коллекция нативных растений была включена в гербарий кафедры биотехнологии и микробиологии НИУ «БелГУ».

Работа по микрклональному размножению редких и лекарственных видов растений семейства *Lamiaceae* проводилась в лаборатории «Инновационных методов исследования растительных объектов» (Россия, НИУ «БелГУ», кафедра биотехнологии и микробиологии).

2.2. Методы исследования

В ходе исследовательской работы были использованы следующие методы: выбор исходного материала; сбор, сушка и хранение семян; приготовление агаризованных питательных сред; стерилизация питательных сред; выбор времени и концентрации влияния гиббереллиновой кислоты на прорастание семян; стерилизация растительных объектов; получение и культивирование проростков; подбор индивидуальных питательных сред.

2.2.1. Выбор, сбор, сушка, хранение.

Сбор семян проводился в ясную сухую погоду, в дневное время суток, на территории Ботанического сада НИУ «БелГУ».

Сбор проводился вручную. Для этого аккуратно отделялась часть растения, содержащая соцветия со зрелыми семенами. Собранные пучки складывались в полиэтиленовые пакеты и этикетировались. Семена очищались от примесей, цветков и соцветий.

Сушка была проведена сразу после сбора. Данный процесс проходил в проветриваемом помещении в тени при невысокой влажности воздуха. Сырье раскладывалось ровным слоем толщиной не более 2 см на мягкой бумаге и перемешивалось 3-4 раза в день. Высушенное сырьё было упаковано в бумажные пакеты, этикетировались и хранилось в сухом тёмном месте.

Сбор, сушку и хранение проводили по методикам, общепринятым в ботанике (Середин и др., 1973; Тризна, 1992).

Параллельно проводили сбор отдельного растения для документального подтверждения и более точного его определения. Сушку и монтировку осуществляли на гербарном листе согласно методам гербаризации растений (Скворцов, 1977; Маслова, Скорбач, 2016).

2.2.2. Приготовление и стерилизация агаризованных питательных сред

Для введения растительных экстрактов в культуру *in vitro* семена культивировались на безгорональной среде Мурасиге и Скуга (Murashige и др., 1962). Количественный и качественный состав среды приведён в таблице 1 Приложения 1.

При дальнейшем подборе сред для наилучшего роста растений использовались модификации среды Мурасиге и Скуга с различной концентрацией фитогормонов.

Приготовление сред производилось по следующей методике:

- Наливаем 50-100 мл дистиллированной воды в колбу или стакан объёмом 1л и добавляем макро- и микросоли, Fe-хелат, витамины и фитогормоны;
- Взвешиваем требуемые количества мезоинозита и сахарозы. Каждую навеску растворить в воде и добавить к смеси;
- Доводим pH до 5,6-5,8 с помощью раствора 1н КОН или раствора 1н HCl.
- Навеску агара заливаем водой и нагреваем до полного растворения агара.
- Добавляем растворенный агар-агар к раствору среды MS и доводим до нужного объема дистиллированной водой.
- Стерилизуем среду в автоклаве при давлении 1 атм и температуре 120°C в течение 25 мин (Калинин и др., 1992, 36-46; Сорокина и др., 2002, 6-7; Шевелуха и др., 2008, 109-111).

2.2.3. Выбор концентрации и времени воздействия гиббереллиновой кислоты на растительные объекты

В ходе работы было изучено влияние гиббереллиновой кислоты на прорастание семян в зависимости от ее концентрации и времени воздействия.

Исходный раствор гиббереллиновой кислоты приготовили растворением 0,06 мкг сухого синтезированного гормона в 1 мл воды. Затем из данного раствора путем разбавления готовились растворы следующих концентраций: 50%, 10%, 1%. В исследовании также использовался исходный раствор

нативной гиббериловой кислоты. Далее семена изучаемых видов растений с целью ускорения прорастания обрабатывались приготовленными растворами в течение 1, 3, 6 и 12 часов.

2.2.4. Стерилизация растительных объектов и создание асептических условий

Перед стерилизацией растительные экспланты тщательно отмывались мыльным раствором, после промывались несколько раз водопроводной, а затем дистиллированной водой. Все дальнейшие манипуляции проводились в боксе микробиологической безопасности «Lamsystems» II класса, типа А2.

Проводилась ступенчатая стерилизация растительных эксплантов различными стерилизаторами. Процесс стерилизации заключался в том, что семена сначала обрабатывались 70% этиловым спиртом, затем одним из выбранных стерилизаторов в течение 20 минут, после чего семена трижды отмывались по 15 минут стерильной дистиллированной водой.

В качестве первого стерилизующего вещества применялось обеззараживающее средство «Лизоформин 3000» (ООО «Гигиена плюс»), в состав которого входит глутаровый альдегид, глиоксаль, дидецилдиметиламмоний хлорид. В работе применялся 10%-ный раствор лизоформина, который был приготовлен разбавлением 10 мл «Лизоформин 3000» в 90 мл дистиллированной воды без нагревания.

Вторым стерилизующим веществом являлся «Хлорамин Б» (ООО «Бохемие РУС»). Это натриевая соль хлорамида бензолсульфо кислоты. В исследовании использовался 5%-ный раствор хлорамина, который готовился растворением 5 г сухого порошка препарата в 100 мл дистиллированной воды при нагревании до 50-60°C.

Третьим стерилизующим агентом выступал раствор «Белизна» («БСК»), содержащий в своём составе гипохлорит натрия в концентрации от

5% до 15%. Данный раствор для работы использовался в нерастворенном виде.

Четвертый стерилизующий агент – нитрат серебра – кристаллический порошок азотнокислой соли серебра. В работе применялся 0,1% раствор, приготовленный растворением в 100 мл дистиллированной воды 100 мг соли.

В качестве пятого стерилизующего агента выступал препарат «Биоцид-С» (ООО «ПК «Юго-Запад-Химпром»). Это жидкость жёлтого цвета, содержащая алкил-диметилбензиламмоний хлорид, глутаровый альдегид и этилкарбитол. В работе использовался 3% раствор «Биоцид-С», который готовили путём разбавления 3 мл концентрата в 97 мл дистиллированной воды.

Стерилизация питательных сред, инструментов, материалов 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

Для получения стерильных проростков семена проращивали в стерильных чашках Петри и баночках на среде Мурасиге-Скуга без добавления гормонов в асептических условиях. Дальнейшее культивирование проводилось в условиях отсутствия света термостате при температуре 23 °С. После прорастания стерильные проростки пересаживались на питательные среды, содержащие фитогормоны в различных концентрациях, подобранных индивидуально для каждого растения. Затем они культивировались в климатической световой комнате при температуре 22°С. Растительные объекты перемещались на свежие питательные среды каждые 40-45 дней.

2.2.6. Статистическая обработка данных

Обработка результатов, полученных в ходе эксперимента, выполнялась на основе методов математической статистики (Зайцев, 1984, 12).

Вычисление средней арифметической, её ошибки, а также критерия Мана-Уитни для оценки достоверности полученных данных было проведено при использовании дополнительного пакета статистических функций Microsoft Office Excel (Ханс-Петер Пифо, 2011, 58).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Стерилизация растительных эксплантов

В ходе работы исследовалась эффективность стерилизации первичных растительных эксплантов, в качестве которых взяты семена редких эндемичных и лекарственных видов растений семейства яснотковых (*Lamiaceae*), следующими дезинфицирующими агентами: «Биацид» (3%), «Лизоформин 3000» (10%), «Хлорамин Б» (5%), «Нитрат серебра» (0,1%), «Белизна» (5-15%),. Стерилизация проводилась 20 минутной обработкой семян стерилизующими веществами.

Влияние режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов видов *Hyssopus cretaceus* Dubj., *Prunella grandiflora* (L.) Turra и *Salvia sclarea* L., средняя арифметическая, проверка гипотезы по критерию Манна-Уитни, а так же уровень значимости измерений представлены в таблицах 3.1.1.-3.1.3.

3.1.1. Стерилизация растительных эксплантов *H. cretaceus*

Таблица 3.1.1.

Влияние режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов вида *H. cretaceus*

Стерилизующий агент	Количество стерильных эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости,(α)
Лизоформин 3000 (10%)	87,65±2,572	0,00007	0,05
Белизна (5-15%)	94,71±1,885	0,00007	0,05
Биоцид (3%)	76,36±3,799	0,00007	0,05
Хлорамин Б (5%)	36,36±1,635	0,00007	0,05
Нитрат серебра (0,1%)	85,45±2,266	0,00007	0,05

Критерий Манна-Уитни показал, что различия по влиянию стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов вида *H. cretaceus* по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ($3,69 \pm 0,717$), достоверны при $P < 0,05$ для каждого из образцов.

Высокая стерилизующая эффективность (не менее 70% стерильных семян) выявлена при использовании всех исследуемых стерилизующих агентов кроме 5% раствора «Хлорамин Б» ($36,36 \pm 1,635$), что делает его применение нерациональным.

3.1.2. Стерилизация растительных эксплантов *P. grandiflora*

Таблица 3.1.2

Влияние режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов вида *P. grandiflora*

Стерилизующий агент	Количество стерильных эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Лизоформин 3000 (10%)	$94,55 \pm 2,473$	0,00007	0,05
Гипохлорит натрия (5-15%)	$96,364 \pm 1,521$	0,00007	0,05
Биоцид (3%)	$85,45 \pm 3,123$	0,00007	0,05
Хлорамин Б (5%)	$77,27 \pm 2,371$	0,00007	0,05
Нитрат серебра (0,1%)	$87,27 \pm 2,371$	0,00007	0,05

По критерию Манна-Уитни при $P < 0,05$ различия по влиянию стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов вида *P. grandiflora* по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ($3,82 \pm 0,872$), достоверны для каждого из образцов.

Исходя из статистических данных, высокий процент стерильных семян (более 70%) выявлен при применении всех исследуемых стерилизующих агентов.

3.1.3. Стерилизация растительных эксплантов *S. sclarea*

Таблица 3.1.3

Влияние режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов вида *S. sclarea*

Стерилизующий агент	Количество стерильных эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Лизоформин 3000 (10%)	96,85±1,274	0,00007	0,05
Белизна (5-15%)	70,25±1,061	0,00007	0,05
Биоцид (3%)	61,13±1,346	0,00007	0,05
Хлорамин Б (5%)	59,75±1,546	0,00007	0,05
Нитрат серебра (0,1%)	93,63±1,346	0,00007	0,05

Критерий Манна-Уитни показал, что различия по влиянию стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов вида по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода (0,87± 0,414), достоверны при $P < 0,05$ для каждого из образцов.

Высокая стерилизующая эффективность (не менее 70% стерильных семян) выявлена только при применении 10 % раствора «Лизоформин 3000» (96,85±1,274), 0,1% раствора нитрата серебра (93,63±1,346) и 5-15% раствора «Белизна» (70,25±1,061). Использование остальных стерилизующих агентов не является эффективным.

3.2 Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов

Обработка семян агрессивными стерилизующими агентами часто ведет к гибели семян, поэтому помимо необходимости получения стерильных эксплантов, важно сохранить их способность давать жизнеспособные проростки, которые в дальнейшем вводятся в культуру *in vitro*. Влияние режимов стерилизации на получение жизнеспособных

проростков видов *H. cretaceus*, *P. grandiflora* и *S. sclarea* отражены в таблицах 3.2.1.1.– 3.2.3.1.

3.2.1 Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов вида *H. cretaceus*

Таблица 3.2.1.1.

Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных проростков вида *H. cretaceus*

Режим ступенчатой стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
Лизоформин 3000 (10%-ный раствор)	87,65±2,572	6,4±2,72
Белизна (5-15%-ный раствор)	94,71±1,885	4,2±1,16
Биоцид (3%-ный раствор)	76,36±3,799	0,0±0,00
Хлорамин Б (5%-ный раствор)	36,36±1,635	6,3±1,28
Нитрат серебра (0,1%-ный раствор)	85,45±2,266	8,2±2,22

Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов и жизнеспособных проростков вида *H. cretaceus* отражено на рис. 3.2.1.2

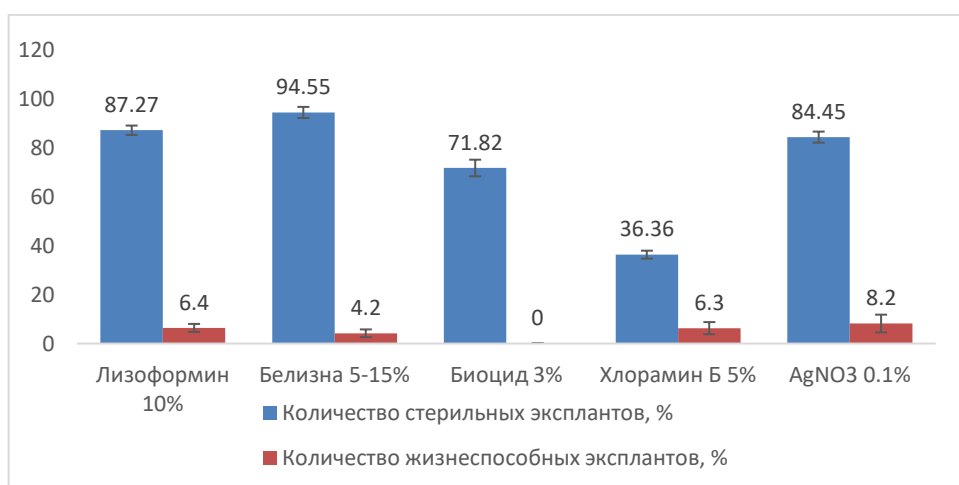


Рис. 3.2.1.2. Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов и жизнеспособных проростков вида *H. cretaceus*

Как видно из приведенных данных, оптимальным стерилизующим режимом для вида *H. cretaceus* является использование 0,1% раствора нитрата серебра в течение 20 минут, так как при таком способе стерилизации получено оптимальное соотношение процента стерильных семян к проценту жизнеспособных. Возможно применение в качестве стерилизующего агента 10% раствор «Лизоформин 3000». Применение режимов стерилизации с использованием 3% раствора «Биоцид» и 5% раствора «Хлорамин Б» не является целесообразным, так как при их использовании достигается не только низкий процент жизнеспособных семян, но и незначительный процент стерильных эксплантов.

3.2.2 Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов вида *P. grandiflora*

Таблица 3.2.2.1

Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных проростков вида *P. grandiflora*

Режим ступенчатой стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
Лизоформин 3000 (10%-ный раствор)	94,55±2,593	0,00±0,000
Биоцид (3%-ный раствор)	96,36±3,575	11,83±3,911
Белизна (5-15%-ный раствор)	85,45±1,595	27,83±2,937
Хлорамин Б (5%-ный раствор)	77,27±2,486	13,67±3,190
Нитрат серебра (0,1%-ный раствор)	87,27±2,486	5,83±1,479

Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов и жизнеспособных проростков вида *P. grandiflora* отражено на рис. 3.2.2.2.

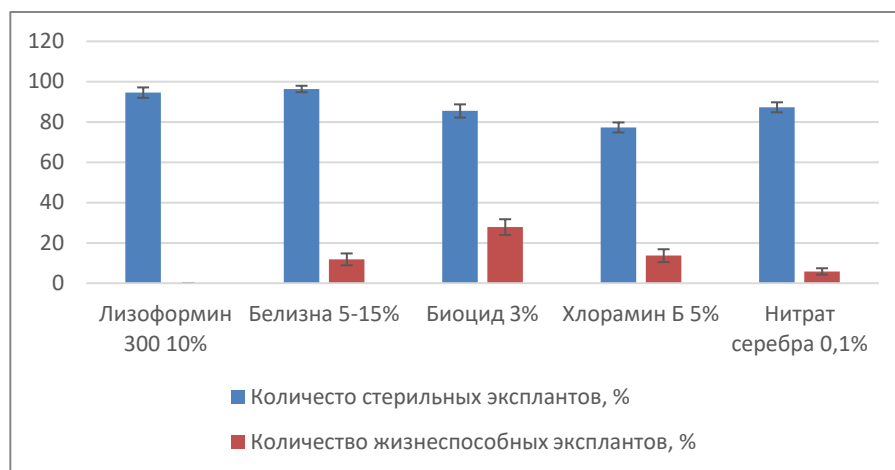


Рис. 3.2.2.2. Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов и жизнеспособных проростков вида *P. grandiflora*

Оптимальным стерилизующим агентом для вида *P. grandiflora* является 3%-ный раствор «Биоцид» при времени стерилизации, составляющей 20 минут, так как при таком способе стерилизации получено оптимальное соотношение процента стерильных семян к проценту жизнеспособных. Возможно применение в качестве стерилизующих агентов 5% раствора «Хлорамин Б» и 5-15% раствора «Белизна». Использование для стерилизации 10% раствора «Лизоформин 3000» и 0,1% раствора нитрата серебра не является рациональным, так процент семян жизнеспособных близок к нулю.

3.2.3 Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов вида *S. sclarea*

Таблица 3.2.3.1

Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных проростков вида *S. sclarea*

Режим ступенчатой стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
Лизоформин 3000 (10%-ный раствор)	96,85±1,274	0,0±0,000
Биоцид (3%-ный раствор)	70,25±1,061	35,74±0,859

Белизна (5-15%-ный раствор)	61,13±1,346	13,50±0,922
Хлорамин Б (5%-ный раствор)	59,75±1,546	24,47±0,742
Нитрат серебра (0,1%-ный раствор)	93,63±1,346	54,25±1,066

Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов и жизнеспособных проростков вида *S. sclarea* отражено на рис. 3.2.3.2.

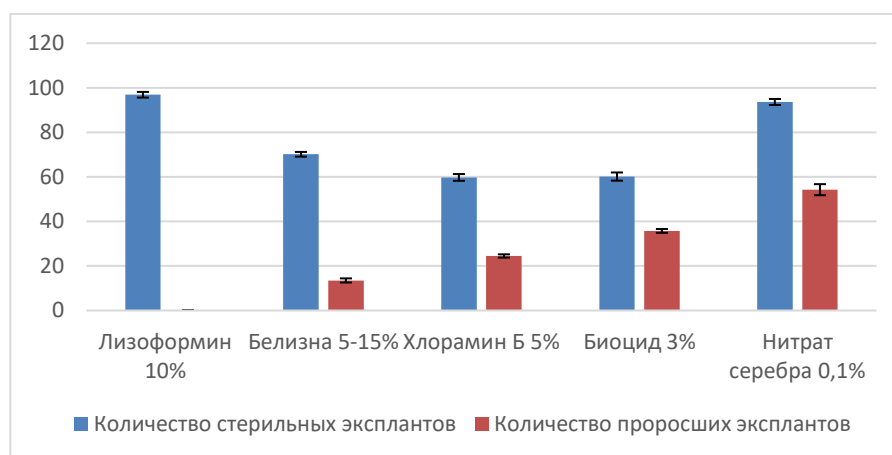


Рис. 3.2.3.2. Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов и жизнеспособных проростков вида *S. sclarea*

Оптимальным режимом стерилизации вида *S. sclarea* является использование нитрат серебра в концентрации 0,1% в течение 20 минут, так как в данном случае получено наилучшее соотношение количество стерильных растительных эксплантов к количеству жизнеспособных семян. Применение режимов стерилизации с использованием иных стерилизующих агентов не является целесообразным из-за их низкой эффективности.

3.3. Влияние гиббереллиновой кислоты на прорастания семян

В ходе эксперимента было выявлено влияние 1%, 10%, 50%, 100% растворов синтезированной гиббереллиновой кислоты, а так же 100% нативного раствора гиббереллиновой кислоты на прорастание первичных

эксплантов, в качестве которых были взяты семена редких и лекарственных видов растений семейства Lamiaceae. Время воздействия ГК на семена составляло 1, 3, 6 и 12 часов.

В таблицах 3.3.1-3.3.4 представлены влияние гиббереллиновой кислоты на прорастание эксплантов видов *Hyssopus cretaceus* Dubj. *Prunella grandiflora* (L.) Turra и *Salvia sclarea* L., средняя арифметическая, проверка гипотезы по критерию Манна-Уитни, а так же уровень значимости измерений.

3.3.1. Влияние гиббереллиновой кислоты на прорастание семян *H. cretaceus*

В качестве контроля во всех экспериментах по выявлению влияния гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *H. cretaceus* выступала вода ($8,21 \pm 2,182$).

Таблица 3.3.1.1

Влияние гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *H. cretaceus* в течение часа

Гиббериллиновая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Нативный раствор ГК	$27,44 \pm 1,430$	0,0006	0,05
100% раствор ГК	$36,56 \pm 1,621$	0,0003	0,05
50% раствор ГК	$37,89 \pm 4,071$	0,0006	0,05
10% раствор ГК	$58,33 \pm 2,179$	0,0003	0,05
1% раствор ГК	$65,78 \pm 3,111$	0,0003	0,05

Критерий Манна-Уитни показал, что при $P > 0,05$ различия по влиянию на прорастание семян вида *H. cretaceus* по сравнению с контролем, достоверны для всех растворов.

Из рисунка 3.3.1.5 видно, что при замачивании семян в различных концентрациях гиббереллиновой кислоты в течение часа, ее влияние обратно пропорционально используемой концентрации. Наибольшей эффективностью при данном времени воздействия обладает 1% раствор ГК (количество проросших семян увеличилось в 8 раз по сравнению с контролем), а наименьшей – нативный раствор.

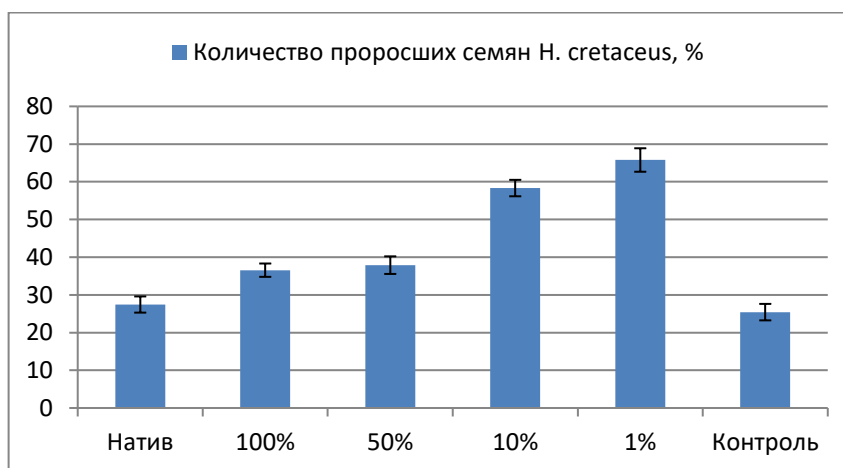


Рис. 3.3.1.2. Влияние различной концентрации гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *H. cretaceus* в течение одного часа

При замачивании семян в течение трех часов наблюдается изменение по влиянию различных концентраций гиббереллиновой кислоты на всхожесть семян.

Таблица 3.3.1.3

Влияние гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *H. cretaceus* в течение трех часов

Гиббериллиновая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Нативный раствор ГК	19,33±2,031	0,0019	0,05
100% раствор ГК	25,11±4,410	0,0003	0,05
50% раствор ГК	24,67±2,715	0,0007	0,05
10% раствор ГК	33,89±3,104	0,0003	0,05
1% раствор ГК	65,11±2,880	0,0003	0,05

Влияние всех концентраций ГК на прорастание семян достоверно различно по сравнению с контролем при $P > 0,05$ по критерию Манна-Уитни.

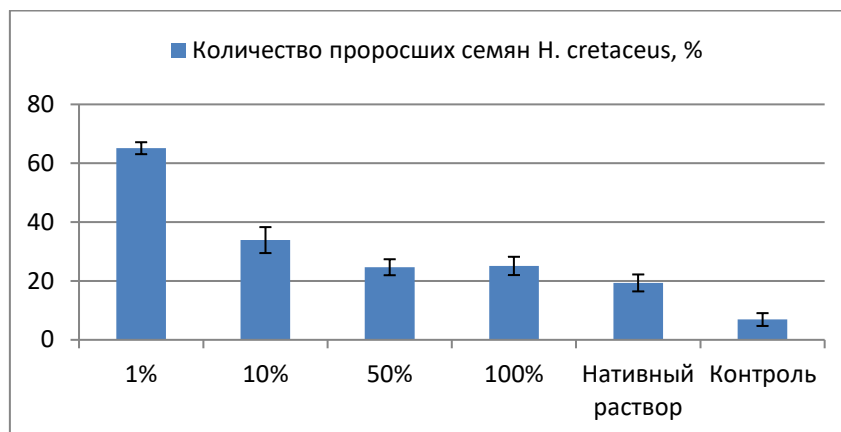


Рис.3.3.1.4. Влияние различной концентрации гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *H. cretaceus* в течение трех часов

Из рисунка 3.3.1.4. видно, что влияние гиббереллиновой кислоты так же обратно ее концентрации и при замачивании в течение трех часов. Наибольший эффект так же оказывает 1% раствор ГК (количество проросших семян увеличилось в 7,9 раз по сравнению с контролем), а наименьший – нативный.

Таблица 3.3.1.5

Влияние гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *H. cretaceus* в течение шести часов

Гиббериллиновая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Нативный раствор ГК	18,56±2,066	0,004	0,05
100% раствор ГК	16,67±1,429	0,004	0,05
50% раствор ГК	17,22±1,631	0,004	0,05
10% раствор ГК	17,78±3,161	0,004	0,05
1% раствор ГК	21,11±2,575	0,002	0,05

Критерий Манна-Уитни показал, что влияние различных концентраций гиббереллиновой кислоты при выдерживании семян в течение шести часов, при $P > 0,05$ достоверно различны по сравнению с контролем.

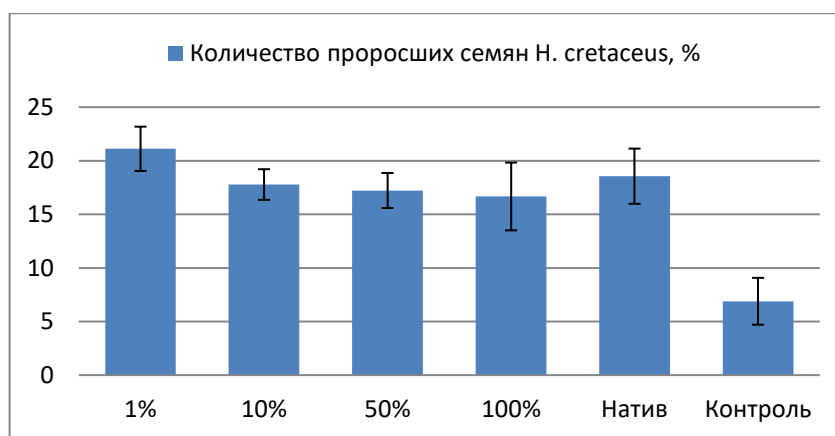


Рис. 3.3.1.6 Влияние различной концентрации гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *H. cretaceus* в течение шести часов

На рисунке 3.3.1.6. видно, что обратная зависимость прорастания семян и концентрации ГК уменьшается с увеличением времени замачивания. Нативный и 1% растворы оказывают практически одинаковое влияние на семена, при их использовании количество проросших семян увеличивается в 2,3 и 2,6 раз соответственно.

Таблица 3.3.1.7

Влияние гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *H. cretaceus* в течение двенадцати часов

Гиббериллиновая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Нативный раствор ГК	14,78±0,840	0,008	0,05
100% раствор ГК	12,56±1,892	0,07	0,05
50% раствор ГК	9,22±2,148	0,62	0,05
10% раствор ГК	9,89±1,089	0,25	0,05
1% раствор ГК	6,22±2,784	0,47	0,05

Критерий Манна-Уитни показал, что влияние гиббереллиновой кислоты достоверно отличается от контроля лишь при использовании

нативного и 100% растворов ГК. Остальные же растворы не оказывают никакого влияния на прорастание семян.

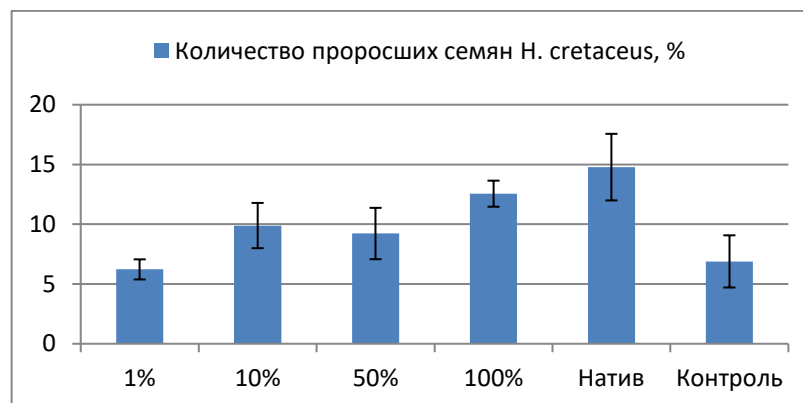


Рис. 3.3.1.8. Влияние различной концентрации гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *H. cretaceus* в течение двенадцати часов

Из рисунка 3.3.1.8. видно, что в данном случае эффективность ГК прямо пропорциональна ее концентрации. Наибольший эффект оказал нативный раствор, при его использовании прорастание семян увеличилось в 1,8 раз.

На рисунке 3.3.1.9. показано изменение влияния различных концентраций ГК с течением времени.

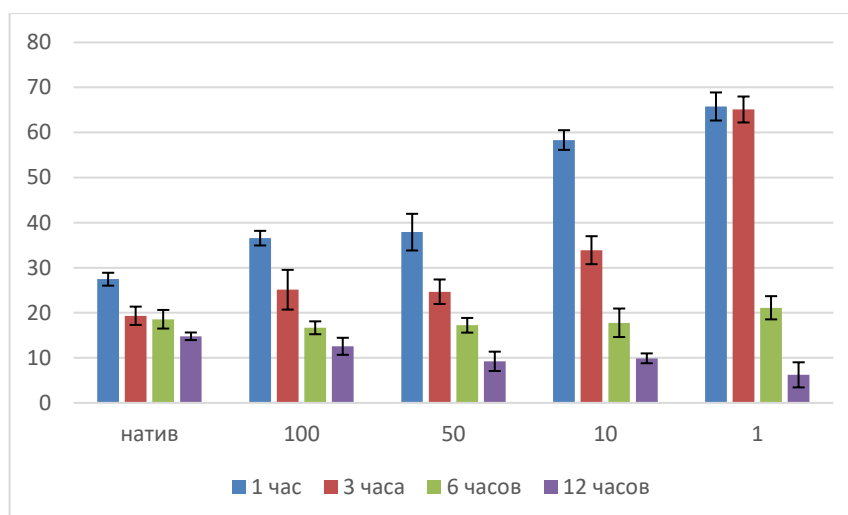


Рис. 3.3.1.9. Влияние различной концентрации гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *H. cretaceus* в течение промежутка времени

Как видно из диаграммы, эффективность гиббереллиновой кислоты уменьшается с увеличением ее концентрации. Наименьшей активностью обладает нативный раствор, а наибольшей – 1% раствор. При этом

эффективность гиббереллиновой кислоты также падает при увеличении времени ее воздействия на семена *H. cretaceus*. Кроме того, сила влияния кислоты с течением времени падает тем меньше, чем больше ее концентрация. Таким образом, наилучший эффект показал 1% раствор гиббереллиновой кислоты в течение одного часа.

На основе полученных данных можно сделать вывод, что при введении в культуру *in vitro* вида *H. cretaceus* оптимальным режимом стерилизации, при котором получено оптимальное соотношение процента стерильных семян к проценту жизнеспособных, является использование в качестве стерилизующего агента 0,1% раствора нитрата серебра в течение 20 минут. А для увеличения всхожести замачивать семена в течение одного часа 1% раствора гиббереллиновой кислоты.

3.3.2. Влияние гиббереллиновой кислоты на прорастание семян *P. grandiflora*

В качестве контроля во всех экспериментах по выявлению влияния гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *P. grandiflora* выступала вода ($23,22 \pm 3,626$).

Таблица 3.3.2.1

Влияние режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов вида *P. grandiflora* в течение одного часа

Гиббереллиновая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Нативный раствор ГК	$12,44 \pm 0,788$	0,007	0,05
100% раствор ГК	$27,22 \pm 2,072$	0,269	0,05
50% раствор ГК	$29,56 \pm 3,259$	0,251	0,05
10% раствор ГК	$30,11 \pm 3,223$	0,216	0,05
1% раствор ГК	$47,67 \pm 2,107$	0,0006	0,05

Критерий Манна-Уитни показал, что при $P > 0,05$ различия по влиянию на прорастание семян вида *P. grandiflora* по сравнению с контролем, достоверны лишь для нативного и 1% растворов. При этом для нативного раствора наблюдается ингибирование прорастания семян. Остальные концентрации кислоты по своему влиянию не отличаются от контроля.

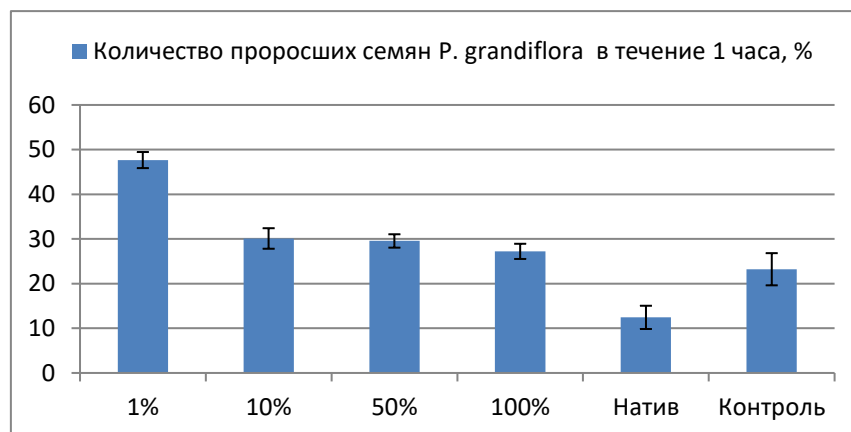


Рис.3.3.2.2. Влияние различной концентрации гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *P. grandiflora* в течение одного часа

Из рисунка 3.3.2.2. видно, что при замачивании семян в различных концентрациях гиббереллиновой кислоты в течение часа, ее влияние обратно пропорционально используемой концентрации. Наибольшей эффективностью при данном времени обладает 1% раствор ГК (количество проросших семян увеличилось в 2 раз по сравнению с контролем).

При замачивании семян в течение трех часов наблюдается изменение по влиянию различных концентраций на всхожесть семян.

Таблица 3.3.2.3

Влияние режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов вида *P. grandiflora* в течение трех часов

Гиббериллиновая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Нативный раствор ГК	23,33±2,222	0,658	0,05
100% раствор ГК	32,78±3,343	0,037	0,05
50% раствор ГК	34,56±3,340	0,017	0,05
10% раствор ГК	72,89±1,483	0,0003	0,05

1% раствор ГК	37,33±3,066	0,009	0,05
---------------	-------------	-------	------

По критерию Манна-Уитни при $P > 0,05$ влияние гиббереллиновой кислоты различно по сравнению с контролем для всех концентраций, кроме нативного раствора.

Из рисунка 3.3.2.4. видно, что эффективность гиббереллиновой кислоты увеличивается с уменьшением ее концентрации, но в то же время она резко уменьшается для 1% раствора. Лучшей эффективностью при замачивании в течение трех часов обладает 10% раствор ГК, он увеличивает количество проросших семян в 3,2 раза. Наименьшей эффективностью обладает нативный раствор, который по своему влиянию не отличается от контроля.

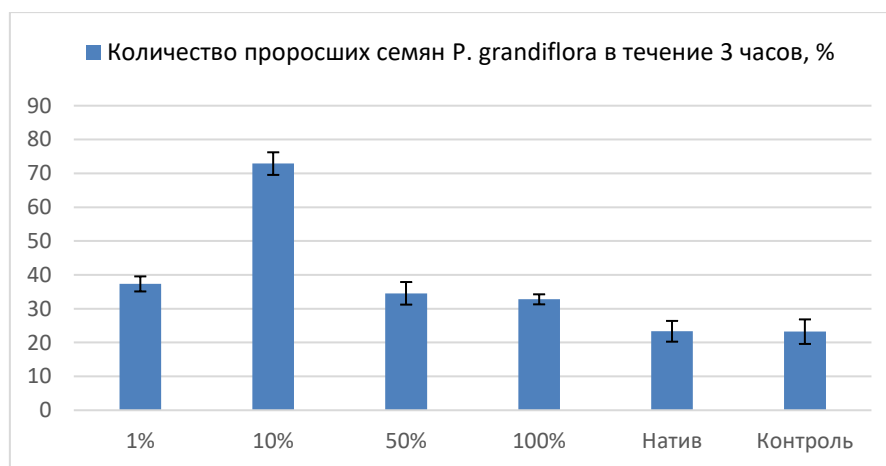


Рис. 3.3.2.4. Влияние различной концентрации гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *P. grandiflora* в течение трех часов

Таблица 3.3.2.5.

Влияние режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов вида *P. grandiflora* в течение шести часов

Гиббериллиновая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Нативный раствор ГК	25,67±2,801	0,565	0,05
100% раствор ГК	40,11±2,233	0,005	0,05
50% раствор ГК	55,44±3,515	0,0006	0,05

10% раствор ГК	38,22±3,111	0,011	0,05
1% раствор ГК	24,56±3,091	0,658	0,05

Критерий Мана-Уитни показал, что влияние гиббереллиновой кислоты достоверно различно для всех концентраций ГК кроме нативного и 1% раствора.

Из рисунка 3.3.2.6. видно, что эффективность влияния ГК в течение шести часов изменяется параболически. Эффективность возрастает при уменьшении концентрации ГК до 50%, где достигает наибольшего значения (процент прорастания семян увеличился в 2,4 раза), при дальнейшей уменьшении концентрации эффективность начинает снижаться.

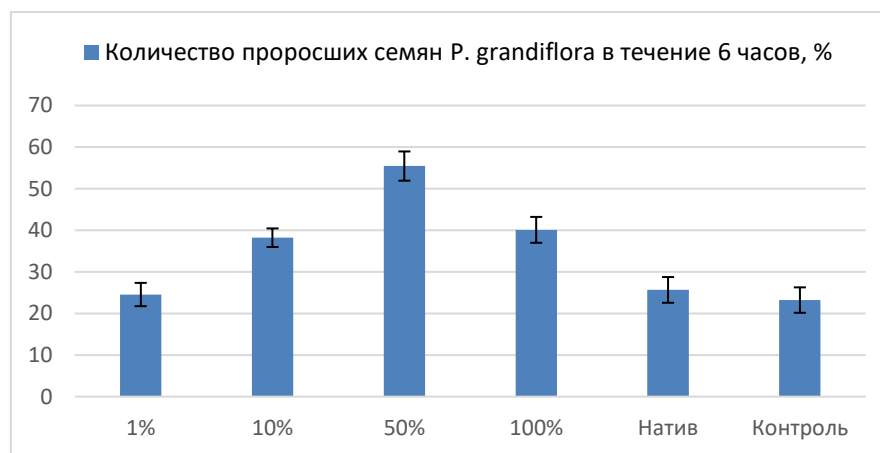


Рис.3.3.2.6. Влияние различной концентрации гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *P. grandiflora* в течение шести часов

Таблица 3.3.2.7.

Влияние режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов вида *P. grandiflora* в течение двенадцати часов

Гиббериллиновая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Нативный раствор ГК	52,56±2,547	0,0005	0,05
100% раствор ГК	41,78±2,772	0,004	0,05
50% раствор ГК	31,78±3,359	0,145	0,05
10% раствор ГК	29,67±2,485	0,185	0,05

1% раствор ГК	17,33±1,719	0,233	0,05
---------------	-------------	-------	------

По критерия Манна-Уитни при $P > 0,05$ по своему влиянию достоверно отличаются от контроля лишь нативный и 100% растворы. Для 1% раствора наблюдается незначительное ингибирование прорастания.

Из рисунка 3.3.2.8. видно, что при использовании ГК в течение двенадцати часов, ее влияние падает с уменьшением концентрации. Так, наибольшей эффективностью обладает нативный раствор, а наименьшей – 1% раствор.

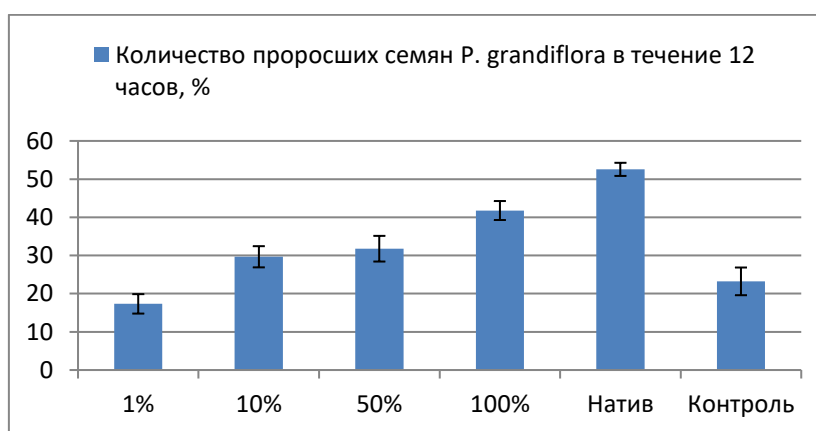


Рис. 3.3.2.8. Влияние различной концентрации гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *P. grandiflora* в течение двенадцати часов

Сводная диаграмма (рис.3.3.2.9.) показывает изменение влияния различных концентраций ГК с течением времени. Таким образом, с увеличением времени воздействия нативный раствор усиливает свое влияние на прорастание семян *P. grandiflora*, причем виден резкий скачок процента проросших семян для двенадцати часов. Для 100% синтезированного раствора также наблюдается увеличение влияния ГК с течением времени, но в данном случае изменение менее значительное, чем при использовании нативного раствора. Для 50% и 10% растворов видно увеличение влияния до определенного времени, а потом резкий спад эффективности. Для 50% раствора этот пик приходится на 6 часов, а для 10% – на 3 часа, причем этот пик является самым высоким в сравнении с другими концентрациями. И для 1% раствора видно снижение эффективности с течением времени.

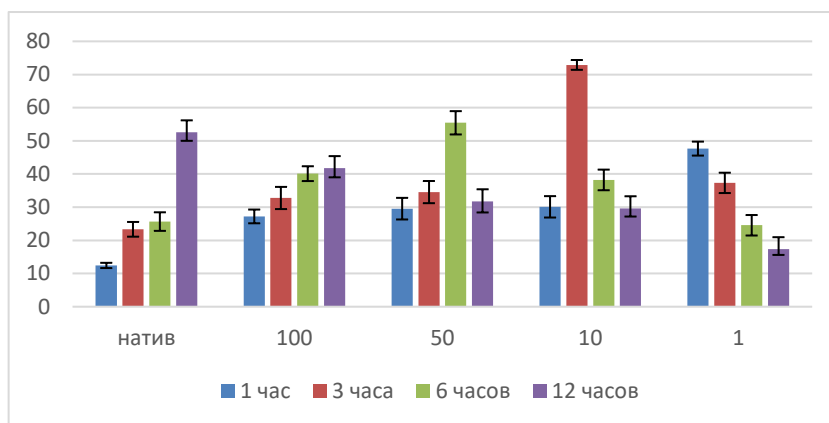


Рис. 3.3.2.9. Влияние различной концентрации гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *P. grandiflora* определенного времени

На основе полученных данных можно сделать вывод, что при введении в культуру *in vitro* вида *P. grandiflora* оптимальным режимом стерилизации, при котором получено оптимальное соотношение процента стерильных семян к проценту жизнеспособных, является использование в качестве стерилизующего агента 3% раствора «Биоцид» в течение 20 минут. А для увеличения всхожести замачивать семена в течение трех часов 10% раствором гиббереллиновой кислоты.

3.3.3. Влияние гиббереллиновой кислоты прорастание семян *S. sclarea*

В качестве контроля во всех экспериментах по выявлению влияния гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *S. sclarea* выступала вода ($54,75 \pm 1,846$).

Таблица 3.3.3.1

Влияние режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов вида *S. sclarea* в течение одного часа

Гиббериллиновая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Нативный раствор ГК	$84,63 \pm 3,097$	0,0007	0,05
100% раствор ГК	$51,75 \pm 2,623$	0,2075	0,05
50% раствор ГК	$72,13 \pm 3,545$	0,0007	0,05

10% раствор ГК	91,88±2,941	0,0007	0,05
1% раствор ГК	31,13±3,525	0,0016	0,05

По критерию Манна-Уитни при $P > 0,05$ влияние гиббереллиновой кислоты достоверно различно по сравнению с контролем для всех концентраций, кроме 100% раствора, эффективность которого при данном времени не отличается от воды. А 1% раствор в течение часа ингибирует прорастание семян.

Из рисунка 3.3.3. видно, что эффективность гиббереллиновой кислоты в зависимости от ее концентрации изменяется волнообразно. Наибольшую активность проявляют нативный и 10% растворы гиббереллиновой кислоты, они увеличивают количество проросших семян примерно в 1,5 раза.

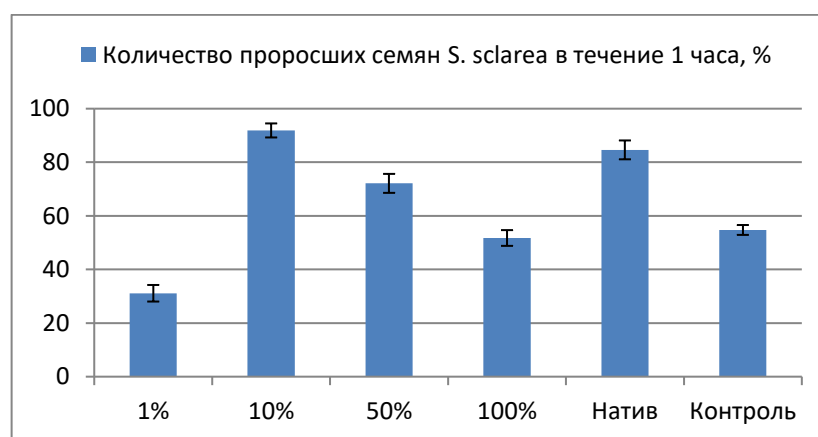


Рис. 3.3.3.2. Влияние различной концентрации гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *S. sclarea* в течение одного часа

Таблица 3.3.3.3.

Влияние режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов вида *S. sclarea* в течение трех часов

Гиббериллиновая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Нативный раствор ГК	43,54±2,093	0,006	0,05
100% раствор ГК	41,88±4,754	0,0007	0,05
50% раствор ГК	47,25±2,218	0,006	0,05

10% раствор ГК	91,51±2,895	0,0007	0,05
1% раствор ГК	78,62±3,982	0,0007	0,05

По критерию Манна-Уитни при $P > 0,05$ влияние гиббереллиновой кислоты достоверно различно по сравнению с контролем для всех концентраций.

Из рисунка 3.3.3.4. видно, что, используя гиббереллиновой кислоты в течение трех часов в различных концентрациях, сначала наблюдается увеличение эффективности при повышении концентрации, а после 10% раствора идет спад силы влияния ГК на семена.

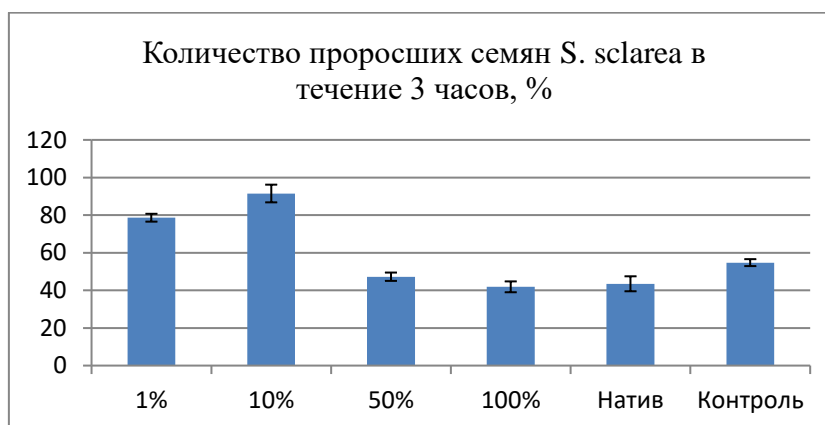


Рис.3.3.3.4. Влияние различной концентрации гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *S. sclarea* в течение трех часов

Таблица 3.3.3.5.

Влияние режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов вида *S. sclarea* в течение шести часов

Гиббериллиновая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Нативный раствор ГК	38,66±3,225	0,006	0,05
100% раствор ГК	39,75±2,915	0,003	0,05
50% раствор ГК	42,25±2,573	0,0117	0,05
10% раствор ГК	69,13±3,143	0,008	0,05

1% раствор ГК	82,25±3,190	0,0007	0,05
---------------	-------------	--------	------

По критерию Манна-Уитни при $P > 0,05$ влияние гиббереллиновой кислоты достоверно различно по сравнению с контролем для всех концентраций.

Из рисунка 3.3.3.6. видно, что при замачивании семян в различных концентрациях гиббереллиновой кислоты в течение часа, то ее влияние обратно пропорционально концентрации. Наибольшей эффективностью при данном времени обладает 1% раствор ГК (количество проросших семян увеличилось примерно в 1,5 раза по сравнению с контролем), а наименьшей – нативный раствор.

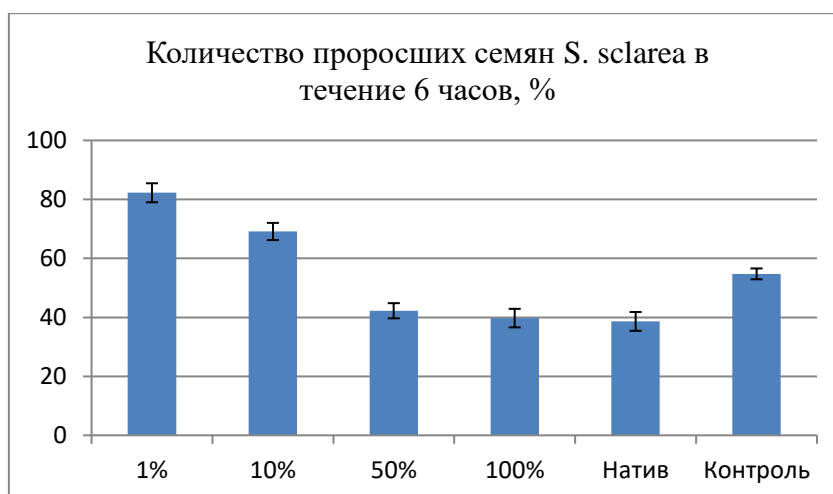


Рис.3.3.3.6. Влияние различной концентрации гиббереллиновой кислоты на проращение семян вида *S. sclarea* в течение шести часов

Таблица 3.3.3.7

Влияние режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов вида *S. sclarea* в течение двенадцати часов

Гиббериллиновая кислота	Количество проросших эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Нативный раствор ГК	32,50±3,872	0,003	0,05
100% раствор ГК	37,00±2,911	0,001	0,05
50% раствор ГК	43,63±2,542	0,011	0,05

10% раствор ГК	67,63±1,593	0,0007	0,05
1% раствор ГК	82,25±2,124	0,0007	0,05

По критерию Манна-Уитни при $P > 0,05$ влияние гиббереллиновой кислоты достоверно различно по сравнению с контролем для всех концентраций.

Из рисунка 3.3.3.8. видно, что при замачивании семян в различных концентрациях гиббереллиновой кислоты в течение часа, то ее влияние обратно пропорционально концентрации. Наибольшей эффективностью при данном времени обладает 1% раствор ГК (количество проросших семян увеличилось примерно в 1,5 раза по сравнению с контролем), а наименьшей – нативный раствор.

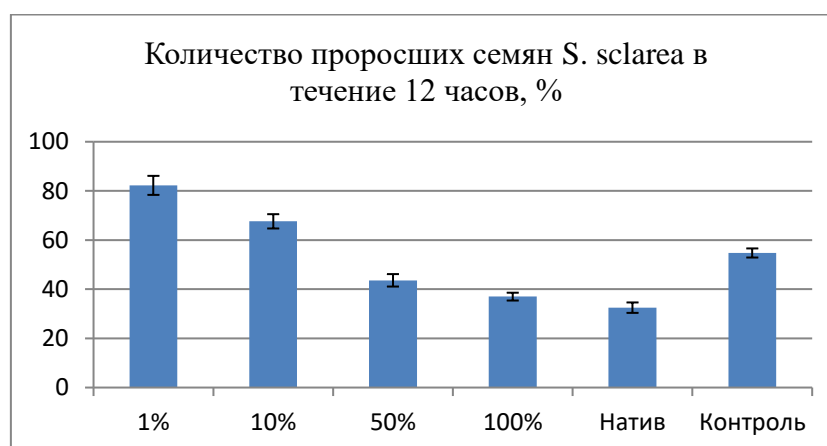


Рис. 3.3.3.9. Влияние различной концентрации гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *S. sclarea* в течение трех часов

Сводная диаграмма (рис.3.3.3.9.) показывает изменение влияния различных концентраций ГК с течением времени. Как для нативного, так и для всех концентраций синтезированной ГК, кроме 1% раствора, наблюдается снижение активности с течением времени. При этом для нативного раствора заметен активный спад эффективности с одного часа на три часа. В оставшееся время изменение эффективности происходит незначительно. При

использовании 100% раствора синтезированной ГК, наоборот, ее активность с течением времени уменьшается незначительно. Для 50% раствора, как и для нативного раствора, наблюдается пик, приходящийся на один час, а затем резкий спад. Для 10% раствора характерно наличие двух незначительно отличающихся пиков активности, приходящихся на час и три часа, затем спад эффективности в шесть и двенадцать часов. Для 1% раствора видно увеличение активности с течением времени, причем с часа до трех происходит резкий скачок активности, затем изменение эффективности происходит незначительно с трех и до двенадцати часов. Наибольшей активностью при использовании на семена *S. sclarea* обладает 10% раствор гиббереллиновой кислоты, используемый в течение одного часа.

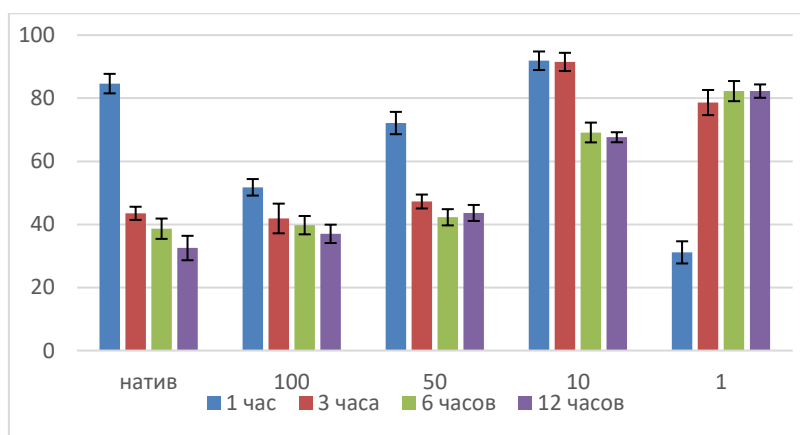


Рис.3.3.3.9. Влияние различной концентрации гиббереллиновой кислоты на прорастание семян вида *S. sclarea* в течение определенного времени

Исходя из всего выше изложенного, при введении в культуру *in vitro* вида *S. sclarea* оптимальным режимом стерилизации, при котором получено наилучшее соотношение количества стерильных растительных эксплантов и количества жизнеспособных семян, является использование в качестве стерилизующего агента 0,1% раствора нитрата серебра в течение 20 минут. А для увеличения всхожести замачивать семена в течение часа 10% раствором гиббереллиновой кислоты.

3.4. Подбор питательных сред для культивирования

Одним из важнейших условий успешного культивирования стерильных проростков является использование питательной среды с подобранной для каждого растения оптимальной концентрацией элементов. Для этого пророски *H. cretaceus*, *P. grandiflora* и *S. sclarea* высаживались на среды, условно названные MR₂₀ (таб.2 Приложения 2), MR_{1/2} (таб.3 Приложения 3), MR_{0.5} (таб.4 Приложения 4).

3.4.1. Подбор питательных сред для культивирования для *H. cretaceus*

После посадки стерильных проростков *H. cretaceus* на разные среды, они давали хороший рост.

На среде MR₂₀ развитие растения происходит наиболее активно. Формирование третьего листа происходит в первую-вторую неделю. Разветвленный корень формируется уже к третьей недели. За месяц побеги достигают длиной до семи сантиметров, в среднем формируется около пяти листов. В течение следующего месяца культивирование в росте растения практически не происходит изменения. На третий месяц растение начинает увядать (рис. 3.4.1.1).

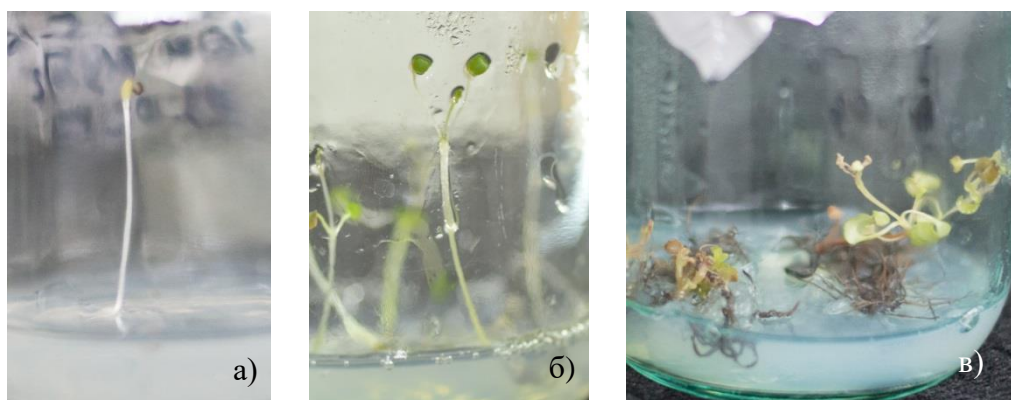


Рис.3.4.1.1 Развитие *H. cretaceus* в условиях in vitro на среде MR₂₀: а) первая неделя культивирования; б) третья неделя культивирования; в) третий месяц культивирования

На среде $MR_{1/2}$ скорость роста побега так же высока, третий лист формируется на вторую-третью неделю. Разветвленный корень формируется к третьей-четвертой недели. За месяц побеги достигают длиной до 5 см, в среднем формируется около трех-четырех листов. В течение следующего месяца культивирование растение вырастает примерно на 1,5-2 см. На третий месяц замечается уменьшение активности развития растения (рис. 3.4.1.2).

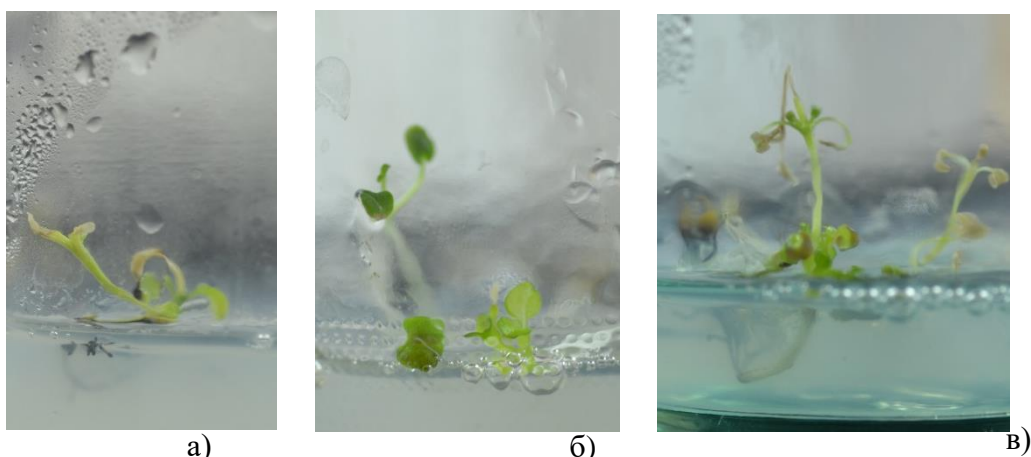


Рис.3.4.1.2 Развитие *H. cretaceus* в условиях *in vitro* на среде $MR_{1/2}$: а) первая неделя культивирования; б) третья неделя культивирования; в) второй месяц культивирования

На среде $MR_{0.5}$ скорость роста побега снижается. Третий и четвертый лист формируются на первую-вторую неделю. Формирование корня так же идет медленнее, хорошо развитый корень образуется на третью-четвертую неделю. За месяц побеги достигают длиной до 3 см, в среднем формируется около пяти листьев. В течение следующего месяца культивирование растение вырастает примерно на 1,5-2 см. На третий месяц рост растения продолжается. Данная среда является наиболее подходящей для сохранения *H. cretaceus* в банке *in vitro*, так как дает стабильный рост и развитие растения (рис. 3.4.1.3).

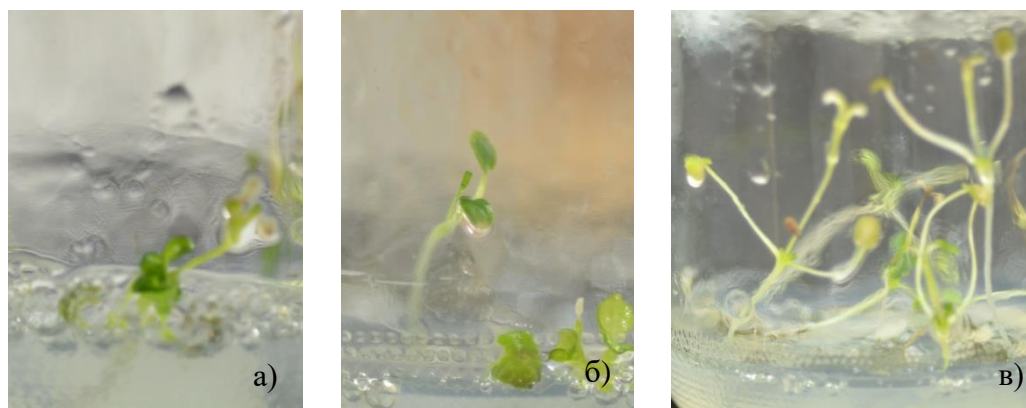


Рис.3.4.1.3 Развитие *H. cretaceus* в условиях *in vitro* на среде $MR_{0.5}$: а) первая неделя культивирования; б) третья неделя культивирования; в) второй месяц культивирования

3.4.2. Подбор питательных сред для культивирования *P. grandiflora*

После посадки стерильных проростков *P. grandiflora* на разные среды, они давали хороший рост только на средах MR_{20} и $MR_{\frac{1}{2}}$.

На среде MR_{20} развитие растения происходит наиболее активно. Формирование третьего листа происходит в третью-четвертую неделю. Разветвленный корень формируется к пятой неделе. За месяц побеги достигают длиной до 5 см, в среднем формируется около трех-четырёх листов. В течение следующего месяца культивирование растение становится до 6-7 см, формируется еще один-два листа. На третий месяц растение продолжает активно расти, становится до 8-9 сантиметров в длину, формируется до восьми листов. В течение последующих месяцев наблюдается замедление роста и постепенное отмирание нижних листьев (рис.3.4.2.1).

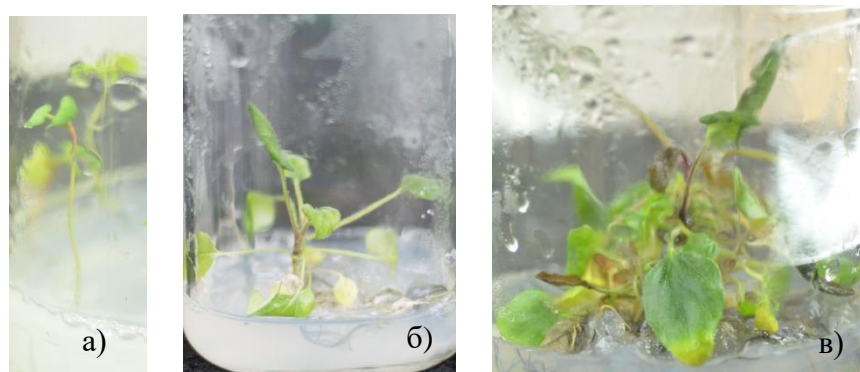


Рис.3.4.2.1 Развитие *P. grandiflora* в условиях in vitro на среде MR₂₀: а) первая неделя культивирования; б) третий месяц культивирования; в) пятый месяц культивирования

На среде MR_{1/2} скорость роста побега замедляется, третий лист формируется на четвертую-пятую неделю. Разветвленный корень формируется к пятой-шестой неделе. За месяц побеги достигают длиной до 3-5 см, в среднем формируется около трех листьев. В течение следующего месяца культивирования растение вырастает примерно на 1-1,5 см. На третий месяц растение растет медленнее, формируется до двенадцати листьев. Данная среда является наиболее подходящей для сохранения *P. grandiflora* в банке in vitro, так как дает стабильный рост и развитие растения (рис.3.4.2.2).

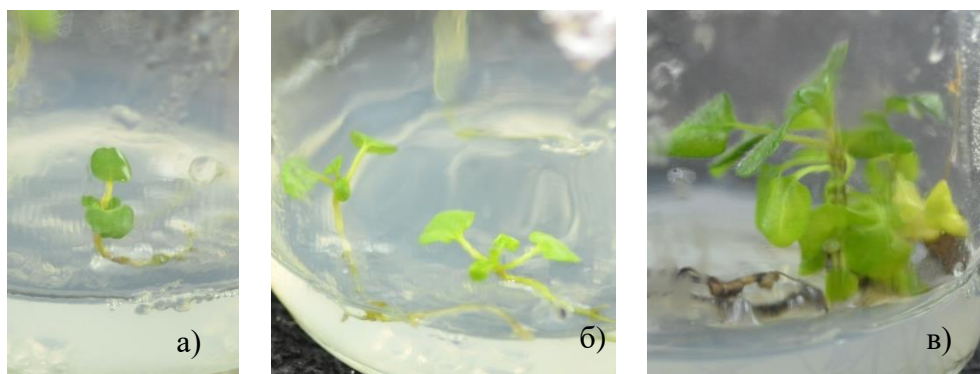


Рис.3.4.2.2 Развитие *P. grandiflora* в условиях in vitro на среде MR_{1/2}: а) первая неделя культивирования; б) первый месяц культивирования; в) третий месяц культивирования

3.4.3. Подбор питательных сред для культивирования *S. sclarea*

После посадки стерильных проростков *S. sclarea* на разные среды, они давали хороший рост только на средах MR₂₀ и MR_{1/2}

На среде MR₂₀ развитие растения происходит активно. Формирование третьего листа происходит в первую неделю. К третьей недели происходило утолщение и рост корня, появление четвертого листа. За месяц побеги достигают длиной до 3 сантиметров, в среднем формируется около шести листьев. Данная среда является наиболее подходящей для сохранения *S.*

sclarea в банке *in vitro*, так как дает стабильный рост и развитие растения (рис.3.4.3.1).

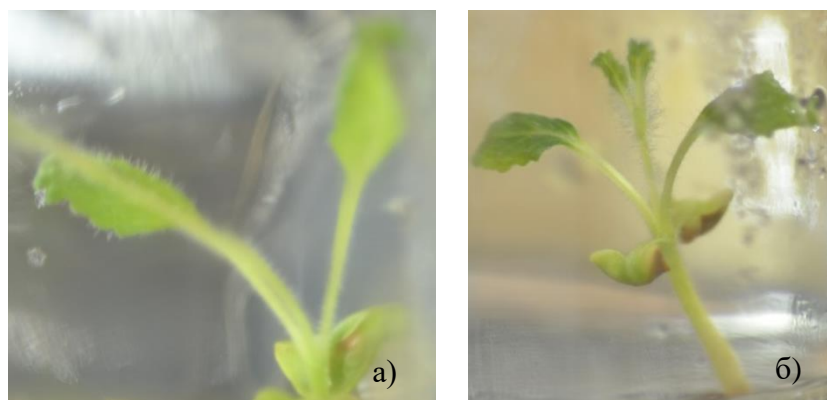


Рис.3.4.3.1 Развитие *S. sclarea* в условиях *in vitro* на среде MR_{20} : а) вторая неделя культивирования; б) первый месяц культивирования

На среде $MR_{1/2}$ скорость роста побега так же высока, третий лист формируется на вторую-третью неделю. Утолщение и рост корня происходит на третью-четвертую неделю. За месяц побеги достигают длиной до 5 см, в среднем формируется около четырех листьев (рис.3.4.3.2).

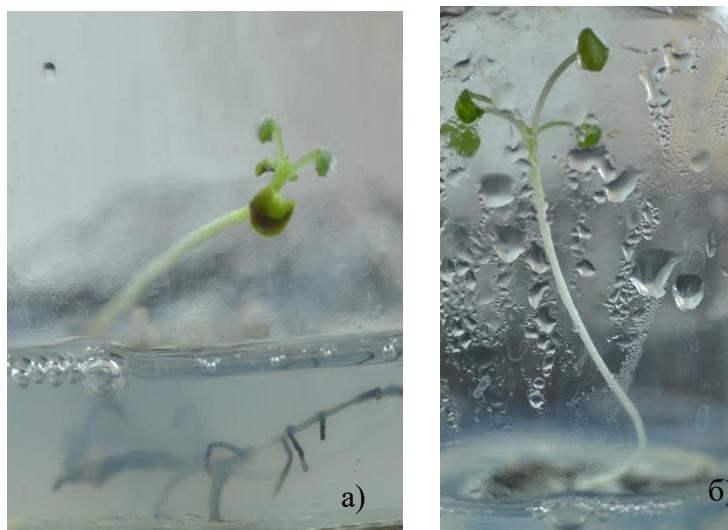


Рис.3.4.3.2 Развитие *S. sclarea* в условиях *in vitro* на среде MR_{20} : а) вторая неделя культивирования; б) первый месяц культивирования

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Выявлен режим стерилизации растений вида *H. cretaceus*, *P. grandiflora* и *S. sclarea* при введении в культуру *in vitro*, при котором получено наилучшее соотношение количества стерильных растительных эксплантов и количества жизнеспособных семян. Установлено, что для вида *H. cretaceus* оптимальным является использование в качестве стерилизующего агента 0,1% раствора нитрата серебра в течение 20 минут; для *P. grandiflora* – 3% раствор «Биоцид» в течение 20 минут; для *S. sclarea* – 0,1% раствор нитрата серебра в течение 20 минут.

2. Установлено влияние различных концентраций гиббереллиновой кислоты в течение определённого промежутка времени на семена *H. cretaceus*, *P. grandiflora* и *S. sclarea*. Так, наибольшее влияние на прорастание семян для вида *H. cretaceus* оказывает влияние 1% раствор гиббереллиновой кислоты в течение часа; для *P. grandiflora* – 10% раствор гиббереллиновой кислоты в течение трех часов; для *S. sclarea* – 10% раствор гиббереллиновой кислоты в течение часа.

3. Осуществлен подбор питательных сред для культивирования в условиях *in vitro* растений *H. cretaceus*, *P. grandiflora* и *S. sclarea*. Оптимальной питательной средой для *H. cretaceus* является среда «MR_{0,5}»; для *P. grandiflora* – «MR_{1/2}»; для *S. sclarea* – среда «MR₂₀».

Таким образом, в ходе исследовательской работы впервые были введены в культуру *in vitro* растения видов *H. cretaceus*, *P. grandiflora* и *S. sclarea*. Они дополнили существующую коллекцию редких растений, созданную на базе лаборатории «Инновационных методов исследования растительных объектов» кафедры биотехнологии и микробиологии НИУ «БелГУ».

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Al-Sereiti M.R., Abu-Amer K.M., Sen P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials // *Indian J. Exper. Biol.*, 1999. – 124-130 p;
2. Antihyperglycemic and Antioxidant Properties of Caffeic Acid in db/db Mice / J.J. Un [et al.] // *J. of Pharmacol, and Exper. Therapeutics.* – 2006. – Vol. 318, № 2. – 476-483 p;
3. Hepatoprotective role of ferulic acid: a dose-dependent study / R. Rukkumani [et al.] // *J. Med. Food.* – 2004. – Vol. 7, № 4. – 456-461 p;
4. Influence of ferulic acid on circulatory prooxidant-antioxidant status during alcohol and PUFA induced toxicity / R. Rukkumani // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 55, № 3. – 551-561 p;
5. Ito H., Miyazaki T., Ono M., Sakurai H. Antiallergic activities of rabdosiin and its related compounds: chemical and biochemical evaluations // *Bioorgan. Med. Chem.* V. 6, No. 7, 1998. – 1051-1056 p;
6. Kintzios S. E. Sage: The Genus *Salvia*. – Amsterdam, Harwood academic publishers, 2005. – 286 p;
7. Linnaei C. *Species Plantarum, Exhibentes plantas rite cognitatas, ag genera relatas cum differentis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus.* – Holmiae, 1753. – 23-27 p;
8. Lu Y., Foo L.Y. Polyphenolics of *Salvia* – a review // *Phytochemistry*, 2002. – 197-202 p;
9. Makino T., Ono T., Muso E., Yoshida H., Honda G., Sasayama S. Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells // *Nephrol Dial Transplant.* No. 15, 2000. – 1140-1145 p;
10. Malencic D.J., Gasic O., Popovic M., Boza P. Screening for antioxidant properties of *Salvia reflexa* Hornem // *Phyther. Res.*, 2000. – 546-548 p;
11. Mazumder A., Neamati N., Sunder S., Schulz J., Pertz H., Eich E., Pommier V. Curcumin analogues with altered potencies against hiv-1 integrase as

- probes for biochemical mechanisms of drug action // *J. Med. Chem.*, 1997. – 3057-3063 p;
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – №15. – 397-473 c;
 13. Patrick P., Kalidas S. Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro // *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* V. 13, No. 1, 2004. – 101-106 p;
 14. Santamaria L., Tateo F., Bianchi A., Bianchi L. Rosmarinus officinalis extract inhibits as antioxidant mutagenesis by 8-methoxypsoralen (8-MOP) and benzo[a]pyrene (BP) in *Salmonella typhimurium* // *Med. Biol. Environ.* No. 15, 1987. – 97-101 p;
 15. Takeda H., Tsuji M., Matsumiya T., Kubo M. Identification of rosmarinic acid as a novel antidepressive substance in the leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (*Perillae Herba*) // *Jpn. J. Neuropsychopharmacol.* No. 22, 2002. – 15-22 p;
 16. Алексеева Л.И., Болотник Е.В. Розмариновая кислота и антиоксидантная активность *Prunella grandiflora* и *Prunella vulgaris* (Lamiaceae) // *Растительный мир Азиатской России*, 2013. – 121-125 с;
 17. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. и др. Физиология растений. – М.: Издательский центр "Академия", 2005. – 640 с;
 18. Бочкарёв Н.И., Зеленцов С.В., Шуваева Т.П., Бородкина А.П., Состояние таксономии, морфологии и селекции Шалфея мускатного (обзор) // *Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур*, 2014 – 1-13 с;
 19. Буданцев А.Л. Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Том 4. Семейства Caprifoliaceae – Lobeliaceae. М.: Тов-во научных изданий КМК, 2011. — 630 с;

20. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие. – М.: ФБК–ПРЕСС, 1999. – 160 с;
21. Валиханова Г.Ж. Биотехнология растений – Учебник. – Алматы: Қонжық, 1996. – 272 с;
22. Власова В.С., Гостев А.А. Гетерозис у межлинейных гибридов Шалфея мускатного // Селекция, технология возделывания и переработки эфиромасличных культур. Труды ВНИИЭМК. – Симферополь, 1980. – 3–9 с;
23. Гаврилин М.В. Фенольные соединения надземной части Шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.), культивируемого в Ставропольском крае // Химия растительного сырья. 2010. №4. – 99-104 с;
24. Гапоненко А.К. Культура клеток и тканей высших растений *in vitro*, как метод биотехнологии. – 2004. – 80 с;
25. Гиляров М.С. Биологический энциклопедический словарь. – М.: "Советская энциклопедия", 1989. – 864 с;
26. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений. – Минск: БГУ, 2007. – 46 с;
27. Дмитрук С.И. Действие экстракта черноголовки на экспериментальный тонзиллит // Природные ресурсы Сибири (Сибресурс -4-98): тез. докл. 4-й Междунар. науч. практ. конф. – Томск, 1998. – 210 с;
28. Дмитрук С.И. Противовоспалительные свойства, антибактериальная и антифунгальная активности экстракта из надземной части *Prunella vulgaris* L. // Растит. Ресурсы, 2001. – Вып. 4. – 92-96 с;
29. Думачева Е.В., Чернявских В.И., Бородаева Ж.А. Биологические ресурсы семейства *Lamiaceae* Lindl. в условиях мелового юга Среднерусской возвышенности // Научные ведомости Белгородского государственного университета.. – 2015. – 36-41 с;

30. Жигунов А.В. Применение биотехнологий в лесном хозяйстве России / «Лесной журнал». – 2013. – № 2. – 35-40 с;
31. 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;
32. Захарычев, В.В. Гербициды и регуляторы роста растений. Основы биохимии и применения. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2007. – 204 с;
33. 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;
34. Кильчевский А.В., Хотылева Л.В. Генетические основы селекции растений. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия. – Минск: Беларус. навука, 2012. – 489 с;
35. Красная книга Белгородской области. Редкие и исчезающие растения, грибы, лишайники и животные. Официальное издание / Общ. науч. ред. А.В. Присный. – Белгород, 2004. – 532 с;
36. Красная книга Волгоградской области. Растения и грибы / Комитет охраны природы Администрации Волгоградской области. – Волгоград: Волгоград, 2006. – 236 с;
37. Красная книга Калужской области. / Калужский государственный педагогический университет. Калужский областной краеведческий музей. Главный ботанический сад РАН. Московский государственный университет. — Калуга: «Золотая аллея», 2006. – 608 с;
38. Красная книга Курской области. Редкие и исчезающие виды растений и грибов / Составители: Золотухин Н.И., Золотухина И.Б., Игнатов М.С., Полуянов А.В., Попова Н.Н., Прудников Н.А., Сошнина В.П., Филатова Т.Д. – Тула, 2002. – 165с;

39. Красная книга Липецкой области. Растения, грибы, лишайники / под ред. А.В. Щербакова. – Управление экологии и природных ресурсов Липецкой области, 2014. – 696 с;
40. Красная книга Московской области / отв. ред. В.А. Зубакин, В. Н. Тихомиров. – М.: Аргус: Рус. ун-т, 2008. – 560 с
41. Красная книга Пензенской области. Том 1. Растения и грибы / Комитет природных ресурсов по Пензонской области. – Пенза, 2002. – 160 с;
42. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / Министерство природных ресурсов и экологии РФ; Федеральная служба по надзору в сфере природопользования; РАН; Российское ботаническое общество; МГУ им. М. В. Ломоносова; Гл. редколл.: Ю. П. Трутнев и др.; Сост. Р. В. Камелин и др. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 885 с;
43. Красная книга Ростовской области / Министерство природных ресурсов и экологии Ростовской области. – Ростов-на-Дону: Минприроды Ростовской области, 2014. – 344с;
44. Красная книга Рязанской области: официальное научное издание. От ред. В.П. Иванчев, М.В. Казакова. Над. 2-е, переработанное и дополненное. – Рязань: НИ I «Голос губернии», 2011. – 626 с;
45. Красная книга Саратовской области: Грибы. Лишайники. Растения. Животные / Комитет охраны окружающей среды и природопользования Саратов.обл. – Саратов: Изд-то Торгово-промышленной палаты Саратов. Обл., 2006. – 528 с;
46. Красная книга Смоленской области. Книга редких и находящихся под угрозой исчезновения видов животных и растений / ред.Круглов Н.Д. – Смоленск: Смол. гос. пед. ин-т, 1997. – 294 с;
47. Красная книга Тамбовской области. Растения, лишайники, грибы / Г.С. Усова, В.А. Агафонов, К.И. Александрова, Е.А. Иванова., И.А. Иванова., Г.Г. Куликова., Е.Э. Мучник, А.И. Ртищева, А.С. Соколов,

- Л.А. Соколова, А.П. Сухоруков, С.В. Усов, В.Ф. Фирсов, Н.Ю. Хлызова – Тамбов: ИЦ «Тамбовнолиграфиздат», 2002 – 348 с;
48. Красная книга Тульской области: растения, грибы: официальное издание/Администрация Тульской области; Департамент Тульской области по экологии и природным ресурсам; под ред. А. В. Щербакова. — Тула: Гриф и К, 2010. — 393 с;
49. Кузнецов, В.В. Физиология растений. – М.: Высш. Шк., 2006. – 742 с;
50. Левицкий А.П. Хлорогеновая кислота: биохимия и физиология / А.П. Левицкий, Е.К. Вертикова, И.А. Селиванская // Мікробіологія і біотехнологія. – 2010. – № 2. – 6-20 с;
51. Лутова, Л.А. Генетика развития растений. – СПб. : Наука, 2000. – 539 с;
52. Маевский П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 600 с;
53. Мокшин Е.В. Культура клеток и тканей растений. – М. : Нобель Пресс, 2013. – 106 с;
54. Мустьяцэ Г.Н., Маковский М.И. Особенности биологии и агротехники возделывания шалфея мускатного в Молдавии // Эфирномасличные культуры Молдавии и эфирные масла: сборник. – Кишинёв: Изд-во ЦК КП Молдавии, 1972– 40-54 с;
55. Охинченко Н.С., Шамилов А.А. Элементный состав листьев черноголовки крупноцветковой (*Prunella grandiflora* L.), произрастающей на Северном Кавказе // Беликовские чтения: материалы IV Всероссийской научно-практической конференции. – Пятигорск: Рекламно-информационное агентство на Кавминводах, 2015. – 121-122 с;
56. Победимова Е.Г. Шалфей – *Salvia* L. / Флора СССР. Губоцветные – Labiatae Juss. / Под ред. В.Л. Комарова. – М.-Л.: Изд-во академии наук СССР, 1954. – 310-313 с;
57. Полевой, В.В. Физиология растений. – М.: Высш. шк., 1989. – 464 с;

58. Попова Н.В., Литвиненко В.И. Лекарственные растения мировой флоры. – Харьков: СПДФЛ, 2008. – 510 с;
59. Роговая В.В., Гвоздев М.А. Особенности микрклонального размножения косточковых культур в условиях *in vitro* / Известия Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена. – 2005. – №13. – 291-301 с;
60. Сальников, А.И. Физиология и биохимия растений. – Пермь: Издательство ФГБОУ ВПО Пермская ГСХА. 2014. – 300 с;
61. Сорокина И.К., Старичкова Н.И., Решетникова Т.Б. Основы биотехнологии растений. – Саратов: Издательство СГУ, 2002. – 34 с ;
62. Тимофеева О.А., Невмержицкая Ю.Ю. Клональное микроразмножение растений. – Казань: Казанский университет, 2012. – 56 с;
63. Ханс-Петер Пифо. Статистика. – М: Изд. ВНИИА, 2011.– 288 с;
64. Цуркан А.А., Голембиовская Е.И. Исследование флавоноидов черноголовки обыкновенной (*Prunella vulgaris* L.) // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр., 2011. – Вып. 66. – С. 213-214.
65. Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений. – Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003 – 58 с;
66. Чагоян А.А. Противоопухолевая активность некоторых видов сем. *Lamiaceae* // Раст. ресурсы, 1996. – 59-63 с;
67. 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;
68. Шамилов А.А., Арльт А.В., Ивашев М.Н. Активность извлечений из травы Черноголовки крупноцветковой при гипоксической гипоксии //

- Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2013. – № 5. – 132-133 с;
69. Шамилов А.А., Попова Н.В., Ивашев М.Н. Поиск источников розмариновой кислоты во флоре Северного Кавказа // Современные проблемы науки и образования. – № 4, 2014. – 644 с;
70. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Кочиева Е.З. Сельскохозяйственная биотехнология. – М.: «Высшая школа», 2008. – 710 с;
71. Широков А.И., Крюков Л.А. Основы биотехнологии растений. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 49 с;
72. Шульгин Г.Т. Шалфей мускатный // Эфиромасличные культуры: сборник / Под ред. А.А. Хотина и Г.Т. Шульгина. – М.: Изд-во с.-х. литературы, журналов и плакатов, 1963. –148-157 с;
73. Якушкина Н.И. Физиология растений: учебник для студентов вузов». – М: Гуманитар. изд. центр ВЛАДОС, 2005. – 463 с.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Таблица 1.

Состав питательной среды Мурасиге и Скуга(Бутенко, 1999, 13)

Компоненты среды	Количество на 1 л
	для асептических проростков
Маточные растворы макросолей	100 мл
Маточные растворы микросолей	1 мл
Fe-хелат	5 мл
CaCl ₂	5 мл
Витамины: РР	0,5 мг
В ₁	1 мг
В ₆	1 мг
Мезоинозит	100 мг
ИУК	-
БАП	-
Сахароза	20 г
Агар-агар	7 г

Состав питательной среды «MR₂₀»(Бутенко, 1999, 13)

Компоненты среды	Количество на 1 л
	для асептических проростков
Маточные растворы макросолей	100 мл
Маточные растворы микросолей	1 мл
Fe-хелат	5 мл
CaCl ₂	5 мл
Витамины: РР	0,5 мг
В ₁	1 мг
В ₆	1 мг
Мезоинозит	100 мг
ИУК	0,5 мл
БАП	1 мл
Сахароза	20 г
Агар-агар	7 г

Таблица 3.

Состав питательной среды «MR_{1/2}»(Бутенко, 1999, 13)

Компоненты среды	Количество на 1 л
	для асептических проростков
Маточные растворы макросолей	50 мл
Маточные растворы микросолей	0,5 мл
Fe-хелат	2,5 мл
CaCl ₂	2,5 мл
Витамины: PP	0,25 мг
В ₁	0,5 мг
В ₆	0,5 мг
Мезоинозит	50 мг
ИУК	0,5 мл
БАП	1 мл
Сахароза	10 г
Агар-агар	7 г

Состав питательной среды «MR₀»(Бутенко, 1999, 13)

Компоненты среды	Количество на 1 л
	для асептических проростков
Маточные растворы макросолей	100 мл
Маточные растворы микросолей	1 мл
Fe-хелат	5 мл
CaCl ₂	5 мл
Витамины: PP	0,5 мг
В ₁	1 мг
В ₆	1 мг
Мезоинозит	100 мг
ИУК	-
БАП	1 мл
Сахароза	20 г
Агар-агар	7 г