

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(**Н И У « Б е л Г У »**)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

Кафедра биотехнологии и микробиологии

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА LAMIACEAE ФЛОРЫ
БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO И IN VIVO**

Магистерская диссертация
студентки очной формы обучения
направления подготовки 06.04.01 Биология
магистерская программа Микробиология
2 курса обучения группы 07001643
Гуля Натальи Ивановны

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,
доцент кафедры
биотехнологии и микробиологии
Маслова Е.В.

Рецензент:

кандидат биологических наук,
доцент кафедры биохимии,
микробиологии и биотехнологии
Ереванского
государственного университета
М.Т. Петросян

БЕЛГОРОД 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Основные биологически активные вещества растений в условиях <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	10
1.1.1. Алкалоиды и их основные функции.....	11
1.1.2. Изопреноиды и их основные функции.....	12
1.1.3. Эфирные масла и их основные функции.....	12
1.1.4. Фенольные соединения и их основные функции.....	13
1.1.5. Дубильные вещества и их основные функции.....	14
1.1.6. Кумарины и их основные функции.....	14
1.1.7. Флавоноиды и их основные функции.....	15
1.2. Растительные экстракты и способы их получения.....	15
1.3. Биологическая и хозяйственная характеристики растений семейства <i>Lamiaceae</i>	17
1.3.1. Биологическая и хозяйственная характеристика Шалфея лекарственного (<i>Salvia officinalis</i> L.).....	18
1.3.2. Биологическая и хозяйственная характеристика шалфея лугового (<i>Salvia pratensis</i> L.).....	19
1.3.3. Биологическая и хозяйственная характеристика иссопа лекарственного (<i>Hyssopus officinalis</i> L.).....	20
1.3.4. Биологическая и хозяйственная характеристика иссопа мелового (<i>Hyssopus cretaceus</i> Dubj.).....	22
1.3.5. Биологическая и хозяйственная характеристика мяты длиннолистной (<i>Mentha longifolia</i> (L.) Huds.).....	24
1.3.6. Биологическая и хозяйственная характеристика пахучки обыкновенной (<i>Clinopodium vulgare</i> L.).....	25

1.4. Теоретические основы культивирования клеток и тканей растительных объектов в условиях <i>in vitro</i>	27
1.4.1. Биотехнология микрклонального размножения растений <i>in vitro</i>	29
1.4.2. Культивирование каллусных тканей растений <i>in vitro</i>	30
1.5. История развития методов культуры клеток и тканей высших растений в условиях <i>in vitro</i>	32
1.6. Оснащение лаборатории для работ с культурой клеток и тканей в условиях <i>in vitro</i>	35
1.7. Питательные среды для культивирования клеток и тканей растений в условиях <i>in vitro</i>	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
2.1. Материалы исследования.....	38
2.2. Методы исследования.....	39
2.2.1. Сбор, и подготовка растительного сырья к хранению.....	39
2.2.2. Приготовление питательных сред.....	40
2.2.3. Создание асептических условий в лаборатории.....	42
2.2.4. Подбор оптимальных стерилизующих агентов для растительного материала.....	43
2.2.5. Получение и культивирование стерильных проростков.....	44
2.2.6. Получение и культивирование каллусных культур.....	44
2.2.7. Приготовление растительных экстрактов.....	45
2.2.8. Приготовление суспензии микроорганизмов.....	46
2.2.9. Определение антимикробных свойств растительных экстрактов.....	47
2.2.10. Статистическая обработка полученных данных.....	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	49
3.1. Определение антимикробной активности растительных	

экстрактов, полученных из интактных растений.....	49
3.2. Подбор оптимальных стерилизующих агентов для введения растительных эксплантов в культуру <i>in vitro</i>	60
3.3. Подбор оптимального состава питательных сред для культивирования растений в условиях <i>in vitro</i>	85
3.4. Получение каллусных культур.....	102
3.5. Определение антимикробной активности растительных экстрактов, полученных из каллусных культур.....	108
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	121
4.1. Введение в культуру <i>in vitro</i> некоторых представителей семейства <i>Lamiaceae</i>	121
4.2. Антимикробная активность некоторых представителей семейства <i>Lamiaceae</i>	123
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	125
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	127
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	144

ВВЕДЕНИЕ

Мир растений обладает большим количеством биологически активных веществ, которые могут использоваться в различных отраслях промышленности. Данные биологически активные вещества являются вторичными метаболитами растений и занимают значительное место в жизни людей. В современном мире биологически активные вещества, полученные из растений, применяются для создания лекарственных препаратов, пищевых добавок, продукции косметологической и парфюмерной отрасли, сельскохозяйственных средств (Цыренов, 2003; Саакян и др., 2008).

Некоторые биологически активные вещества растений обладают антимикробными свойствами, что делает возможным использование растительных экстрактов и вытяжек против многих болезней человека. В настоящее время такое использование растительных биологически активных веществ является актуальным, так как многие патогенные микроорганизмы приобретают высокую резистентность к антибиотикам (Юткина, Кувакова, 2013). Кроме этого известно применение растительных экстрактов для защиты растений (Никитина и др., 2007).

Биологические активные вещества, применяемые человеком, синтезируются многими растениями. Для их синтеза используют более 300 видов растений, из которых только 60 видов выращиваются целенаправленно, остальные виды используют как дикорастущее сырье. Обеспечить потребности современного общества в биологически активных веществах за счет сбора и переработки дикорастущих растений, многие из которых являются уникальными и занесены в Красные книги Российской Федерации и субъектов Российской Федерации, невозможно. Это связано с проблемой ограниченности природных ресурсов, проблемой малого количества биологически активных веществ в самих растениях и проблемой отсутствия технологии размножения *in*

in vivo некоторых видов (Verpoorte, 2002). Все виды растений, которые применяются в качестве источников биологически активных веществ, находятся в потенциальной опасности, как возможные кандидаты на включение в список Красной книги (Zschocke, 2000).

Альтернативным вариантом синтеза экономически ценных биологически активных веществ является культура растительных клеток и тканей и каллусные культуры растений, которые, как и клетки интактного растения, синтезируют биологически активные вещества (Юрин, 2002; Mulabagal, 2004; Чмелева и др., 2011). Данный метод дает возможность создать дополнительную сырьевую базу для получения ценных метаболитов растений вне зависимости от места произрастания растительных видов и сезона года и позволяет использовать их в разнообразных отраслях промышленности (Гарей-Матросьян, 2016).

Учитывая непрерывное уменьшение запасов дикорастущих растений, становится очевидным необходимость замены дикорастущего сырья на гарантированно получаемую промышленным способом биомассу культивируемых клеток, которая содержит необходимые соединения в достаточном количестве (Гарей-Матросьян, 2016).

В связи с вышесказанным нами была выбрана следующая цель исследования: определить антимикробную активность некоторых представителей семейства *Lamiaceae* флоры Белгородской области в условиях *in vivo* (интактные растения) и *in vitro* (каллусные культуры).

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. определить антимикробную активность шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.), иссопа мелового (*Hyssopus cretaceus* Dubj.) и мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.) в условиях *in vivo* (интактных растений) на грамотрицательные бактерии

- (*Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers) и грамположительные бактерии (*Staphylococcus aureus* Rosenbach);
2. определить эффективные стерилизующие агенты, их концентрацию и время воздействия для получения асептического растительного материала для дальнейшего введения в культуру *in vitro* и получения каллусных культур;
 3. установить оптимальный состав питательных сред для культивирования растительного материала и получения каллусных тканей из эксплантов;
 4. провести микроклональное размножение и получить мини-растения шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.), пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.) и мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.) и каллусные культуры шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.), иссопа мелового (*Hyssopus cretaceus* Dubj.) и мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.);
 5. определить антимикробную активность каллусных культур исследуемых видов растений в условиях *in vitro* на грамотрицательные бактерии (*Escherichia coli*) и грамположительные бактерии (*Staphylococcus aureus*).

В качестве объекта исследования были выбраны растительные экспланты видов флоры Белгородской области: шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.), иссопа мелового (*Hyssopus cretaceus* Dubj.) и мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.), а также грамотрицательные бактерии вида *E. coli* и грамположительные бактерии вида *S. aureus*.

Предмет исследования – антимикробная активность растительных экстрактов интактных растений и каллусных культур вышеуказанных видов на грамотрицательные и грамположительные бактерии.

Научная новизна исследований заключается в том, что впервые исследуются антимикробные свойства растительных экстрактов из сырья флоры Белгородской области интактных растений и растений, полученный в условиях *in vitro* (в пробирке), на бактерии видов *E. coli* и *S. aureus*; впервые разработаны условия получения изолированных культур исследуемых видов в условиях *in vitro*, подобран состав питательных сред для их выращивания; впервые получены изолированные культуры исследуемых видов в условиях *in vitro*.

Результаты настоящих исследований имеют практическую значимость, которая отражается в использовании исследуемого растительного сырья в различных отраслях промышленности, таких как фармацевтическое производство, пищевая и химическая промышленность, косметология и парфюмерия. Кроме этого, появляется возможность использования клеточных культур растений исследуемых видов вместо применения их дикорастущей части, что сохраняет их популяции в природе. Полученные каллусные культуры представляют непосредственный практический интерес как потенциальный источник ценных физиологически активных веществ и могут быть использованы в промышленных масштабах для массового выращивания.

Магистерская диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы по теме исследования, характеристики объектов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов, списка используемой литературы и приложений. Список использованных источников состоит из 116 отечественных источников и 21 иностранного. В работу включены 154 рисунка, 30 таблиц, работа содержит 1 приложение.

Работа по введению в культуру *in vitro* была проведена в лаборатории «Инновационных методов исследования растительных объектов» кафедры биотехнологии и микробиологии НИУ «БелГУ»; работа по определению антимикробных свойств интактных растений и каллусных культур исследуемых видов была проведена в лаборатории «Биотехнологии и микробиологии» кафедры биотехнологии и микробиологии НИУ «БелГУ».

Выражаем благодарность М.Т. Петросян за возможность стажировки в Ереванском государственном университете по культуре клеток и тканей *in vitro*; В.Н. Скворцову и А.А. Присному за предоставленную возможность работы с культурами микроорганизмов (*E. coli* и *S. aureus*); Э.А. Снегину за рекомендации по подбору статистических критериев обработки полученных данных; А.А. Сиротину за консультации в области микробиологии; И.В. Батлущкой за предоставленную возможность выполнения магистерской диссертации на кафедре биотехнологии и микробиологии и моему научному руководителю Е.В. Масловой за оказанную помощь в выполнении магистерской диссертации.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Основные биологически активные вещества растений в условиях *in vivo* и *in vitro*

В состав клеток растений кроме первичных метаболитов (углеводов, аминокислот, жирных кислот, нуклеотидов, хлорофиллов) входит ряд веществ, которые не участвуют в основных реакциях обмена веществ, это вторичные метаболиты, которые называют биологически активными веществами (Борисова и др., 2014). Они представляют собой соединения, оказывающие специфическое действие на организм человека (Минина, Каухова, 2004).

Лекарственные растения представляют собой уникальные природные источники БАВ. Исследования биологически активных веществ представляют собой актуальное направление науки, так как эти соединения используются для лечения людей, растений и животных, применяются для регуляции численности вредителей и патогенов (Георгиевский и др., 1990).

Растения содержат в себе разнообразные по химическому составу соединения, как общие для всех растений, так и индивидуальные для определенных видов (Тырков, 2013). На сегодняшний день уже имеется информация о наличии около 12 тысяч биологически активных соединений, которые относятся к разнообразным группам веществ (Коноплева, 2010).

За последнее время ученые исследовали около 20-30 тысяч растительных видов на наличие БАВ (Ермакова, 2005). До середины XX века растения изучали в прикладном аспекте как источники ядов, лекарств, масел. Сегодня отслеживается тенденция увеличения лекарственных препаратов из соединений растительного происхождения, что составляет в странах Западной Европы около 25% препаратов (Абдрахимова, 2009). Культуры растительных клеток и тканей *in vitro*, как и интактные растения, обладают способностью к синтезу

БАВ, поэтому для промышленного синтеза их специально культивируют в биореакторах большого объема (Цыренов, 2003; Лукашевич и др., 2011).

Культуры клеток и тканей обладают рядом преимуществ по сравнению с дикорастущими и плантационными растениями: уменьшение времени получения БАВ за счет быстрого роста культуры; экологически чистая продукция, получаемая в любое время года и не зависящая от климатических и почвенных условий; получение увеличенного количества БАВ; возможность автоматизации; получения БАВ из редких видов с их сохранением в природе (Лукашевич и др., 2011; Решетников, Спиридович, 2012).

Многочисленными группами БАВ являются: алкалоиды, гликозиды, эфирные масла, флавоноиды, кумарины, витамины, полисахариды, пектиновые вещества, слизи, пигменты, жирные масла и другие (Борисова и др., 2014).

1.1.1. Алкалоиды и их основные функции

Алкалоиды представляют собой группу природных соединений, содержащих азот. На сегодняшний день их исследовано около 15 тысяч (Gershenzon, 2003). Ими богаты покрытосеменные, особенно двудольные (Абдрахимова, 2009). Алкалоиды в растениях содержатся в виде солей в листьях, семенах, плодах, травах, подземных органах (Коноплева, 2010).

Алкалоиды выполняют ряд важных функций: являются резервом азота; снижают количество токсичных аминокислот и аминов, участвуют в обезвреживании аммиака; отвечают за транспортировку азота; участвуют в регуляции рН клеточного сока и ионного баланса в растении; активируют ферменты; повышают устойчивость растений к патогенам; влияют на дифференцировку и органогенез в клетках растения (Борисова и др., 2014).

Алколоиды обладают сильным физиологическим действием и используются в медицине в качестве лекарственных средств (Hesse, 2002; Коренская, Ивановская, 2006; Aniszewski, 2007).

1.1.2. Изопреноиды и их основные функции

Изопреноиды представляют собой углеводородные соединения, содержащие пятиуглеродные изопентановые звенья (Племенков, 2001). Ациклические изопреноиды относят к классу терпенов, а циклические – к классу стеренов. Они придают растениям аромат (Артемова, Дмитриев, 2011).

К изопреноидам относят фитостерины, дитерпеновые и тритерпеновые гликозиды, сердечные гликозиды, стероидные гликозиды, экдистероиды, каротиноиды (Борисова и др., 2014). Изопреноиды относят к соединениям первичного метаболизма, они являются фитогормонами, участвуют в защите растений. Известно бактерицидное действие изопреноидов (Медведев, 2012).

Изопреноиды выполняют важные функции: принимают участие в фотосинтезе; являются фитогормонами; участвуют в переносе электронов в дыхательной и фотосинтетической цепи; являются переносчиками гликозидов; участвуют в стабилизации внутриклеточных мембран (Борисова и др., 2014).

1.1.3. Эфирные масла и их основные функции

Эфирные масла представляют собой смесь душистых летучих веществ. Они образуются соединениями, которые относятся к различным классам

веществ, преимущественно терпеноиды (Chang, 2011). Эфирные масла синтезируются в железистых волосках и чешуйках растений (Коноплева, 2010).

Эфирные масла определяют запах многих растений (Беляева, 2009). Они способствуют привлечению насекомых-опылителей, выполняют функцию аллелопатических агентов (Борисова и др., 2014). Они часто применяются в качестве компонента с антисептическими и противомикробными свойствами (Тырков и др., 2012).

1.1.4. Фенольные соединения и их основные функции

Фенольные соединения представляют собой ароматические вещества, в состав которых входит бензольное кольцо, которое несет одну или несколько гидроксильных групп или их заместителей. В растительном сырье часто встречаются простые фенольные соединения (Волынец, 2013).

Фенольные соединения представлены огромным количеством разнообразных веществ. Наиболее распространенной группой фенольных соединений является группа флавоноидов. В группу флавоноидов входят катехины, флавоны, флавонолы, изофлавоны, антицианиды и другие вещества (Волынец, 2013; Борисова и др., 2014). Кроме флавоноидов в группу фенольных соединений входят гидроксистильбены, гексагидроксидифеновая и эллаговая кислоты, лигнаны, нафтохиноны и антрахиноны, дубильные вещества, лигнины и меланины, хромоны, ксантоны, флаволигнаны (Коноплева, 2010).

Фенольные соединения выполняют важные функции в жизни растений: они защищают растения от патогенов и вредителей; уменьшают количество активных форм кислорода; выполняют сигнальную функцию в индукции генов; влияют на рост и развитие растений; выполняют структурную функцию, влияя

на растяжение клеток; являются резервными веществами; играют важную роль в окислительно-восстановительных реакциях (Абдрахимова, Валиева, 2012).

1.1.5. Дубильные вещества и их основные функции

Дубильные вещества являются полифенольными соединениями (Коренская, Ивановская, 2006). Они содержатся почти во всех растениях и локализуются в коре, древесине, корнях и корневищах, в галлах, листьях, стеблях и в оболочке плодов (Бердимуратова и др., 2006).

Дубильные вещества имеют способность образовывать устойчивые белково-танниновые структуры, поэтому их активно используют в качестве антимикробных и противовоспалительных препаратов. Кроме этого дубильные вещества обладают вяжущим, кровоостанавливающим, ранозаживляющим действием (Абдрахимова, Валиева, 2012).

1.1.6. Кумарины и их основные функции

Кумарины представляют собой летучие вещества с приятным запахом свежего сена. Это фенольные соединения с общей формулой C_6-C_3 (Коренская, Ивановская, 2006; Абдрахимова, Валиева, 2012). Насчитывают около 1500 производных кумаринов у 800 видов растений разных семейств (Абдрахимова, Валиева, 2012). Практически все многообразие кумаринов распространено в покрытосеменных растениях. Кумарины в растениях находятся в виде агликонов и гликозидов (Коноплева, 2010).

Кумарины активно используются в медицине. Они обладают антикоагулирующим действием и антимиотозной активностью. Известны также бактериостатические свойства растительных кумаринов (Коноплева, 2010).

1.1.7. Флавоноиды и их основные функции

Под флавоноидами понимают фенольные соединения, которые содержат в своей структуре фрагмент молекулы дифенилпропана (Куркина, 2012). Флавоноиды содержатся в бутонах, ЦВках, траве, плодах, корнях в количестве от 0,5 до 30%. Накапливаются флавоноиды в виде гликозидов в вакуолях, в свободном состоянии – в смоляных и эфирномасличных ходах, железках, канальцах. Богата флавоноидами надземная часть растения (Коноплева, 2010).

Флавоноиды обладают антиоксидантными, желчегонными, гепатопротекторными, противоязвенными, противоопухолевыми, антимикробными и противовоспалительными, противовирусными свойствами и гормоноподобным действием (Куркина, 2012).

1.2. Растительные экстракты и способы их получения

Биологически активные вещества растений используют в виде растительных экстрактов и вытяжек в различных отраслях промышленности. Растительные экстракты представляют собой вытяжку высокой концентрации из растительного сырья. Экстракты разделяют на жидкие, густые, вязкие с содержанием в них влаги не более 25 %; сухие экстракты с содержанием влаги не более 5% (Государственная фармакопея СССР, 1989; Хоружая, Чучалин,

2004). Экстракты получают, воздействуя на растительное сырье экстрагентом. По виду экстрагента экстракты делят на водные, спиртовые, ацетоновые, эфирные и другие (Редченкова, Хишова, 2006).

Экстракты из растительного сырья имеют преимущества: несложность технологии получения, широкий спектр действия, небольшая стоимость. Однако растительные экстракты имеют и некоторые недостатки, например, сложность стандартизации (Багирова, Северцев, 2001; Минина, Каухова, 2004).

Растительные экстракты получают различными методами: мацерацией, перколяцией, водно-спиртовой экстракцией, ультразвуковой обработкой, непрерывной экстракцией Сокслета, вливанием (инфузией), отваром, сверхкритической флюидной экстракцией (Tiwari, 2011; Hostettmann, 2014). Получение экстрактов основывается на процессах растворения, десорбции, диффузии (Леонова, Климович, 2012).

При мацерации сырье измельчают, помещают в закрытую емкость с растворителем с настаиванием при комнатной температуре, смесь сливают, фильтруют и осветляют (Минина, Каухова, 2004). Данный способ экстрагирования относится к статическим методам (Каухова, 2013). Преимуществами является простота метода и несложность оборудования. К недостаткам относят неполноту экстракции БАВ, большую продолжительность процесса, повышенное содержание балластных веществ, трудоемкость. Сейчас используют новые формы мацерации (Коничев и др., 2011).

Перколяцией получают экстракты после недолгого настаивания с созданием максимальной разности концентраций путем постепенного вытеснения извлечений чистым экстрагентом (Новиченко, 2016). Метод относится к динамическим способам экстрагирования (Каухова, 2013).

Метод водно-спиртовой экстракции представляет собой проведение экстракции низшими спиртами и водой, что дает возможность выделить водо- и спирторастворимые соединения, к которым относятся фенольные соединения,

углеводы, гликозиды, липиды, минеральные вещества, витамины и каротиноиды (Коровкина, 2007; Шутова, 2007).

Циркуляционное экстрагирование представляет собой многократное экстрагирование сырья в аппарате «Соклет», в одной и той же порции легколетучего экстрагента (Каухова, 2013). Сырье измельчают, помещают в аппарат Сокслета и подвергают экстрагированию растворителем при постоянном нагревании для равномерного кипения (Handa, 2008).

Турбо-экстракция растительного сырья представляет собой метод получения растительных экстрактов при применении роторно-пульсационной аппаратуры с выраженными вибрациями частиц сырья (Коничев и др., 2011).

Перспективными являются методы сокращения времени экстрагирования. К таким методам относят методы с применением электроимпульсных разрядов, высокочастотной и сверхвысокочастотной обработки, методы электроплазмолиза и электродиализа, ультразвука (Коничев и др., 2011).

1.3. Биологическая и хозяйственная характеристики растений семейства *Lamiaceae*

Семейство Яснотковые (*Lamiaceae*) или Губоцветные (*Labiatae*) включает в себя около 200-250 родов и около 7 тысяч видов, которые широко представлены во всех климатических зонах (Федоров и др., 1978). Это семейство богато эфиромасличными и лекарственными растениями, которые на сегодняшний день широко и активно используются в косметической, фармацевтической и пищевой промышленности (Тимчук и др., 2013).

1.3.1. Биологическая и хозяйственная характеристика Шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.)

Шалфей лекарственный (*Salvia officinalis* L.) относится к представителям рода Шалфей (*Salvia*), который насчитывает более 90 видов. Шалфей лекарственный входит в семейство Яснотковые (Lamiaceae), порядок Ясноткоцветные (Lamiales), класс двудольные (Magnoliopsida), отделу цветковые (Magnoliophyta) (APG III, 2009).

Представляет собой полукустарник высотой 50-100 см в высоту. Стебли шалфея являются четырехгранными, ветвистыми, сильно облиственными. Листья супротивные, снизу серовато-зеленые, опушенные, имеют выступающие жилки. Цветки сине-фиолетового цвета, двугубые, с заостренными прицветниками, крупные до 2,5 см. Чашечка опушенная. Тычинок шалфей лекарственный имеет две. Пестик с двураздельным столбиком и четырехлопастной завязью. Цветки собраны по 6-10 в мутовки, образуют колосовидное соцветие. Корень деревянистый. Плод – 4 шаровидных орешка. Время цветения – июнь-июль (Маевский, 2006; Ториков, 2013).

Общий вид цветущего растения шалфея лекарственного представлен на рисунке 1.3.1.1.



Рис. 1.3.1.1. Общий вид цветущего растения шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.)

Растение является эфиромасличным и лекарственным. Листья содержат около 0,5-2,5% эфирного масла, дубильные вещества, алкалоиды, урсоловую и олеановую кислоты, уваол, парадафенол (Ториков, 2013). Лекарственное значение имеют листья растения. Растение обладает противовоспалительным, кровоостанавливающим, отхаркивающим, противомикробным и успокаивающим действием. Известна роль шалфея лекарственного в уменьшении отделения пота и выделения молока у женщин, повышении секреторной активности желудочно-кишечного тракта, уменьшении образования газов (Гоголина, 2013).

Экстракт шалфея обезвреживает и выводит токсины из клеток кожи (Вшивков, 2005). Используется против стафилококков и стрептококков, для лечения гниющих ран и воспаления кожи (Гоголина, 2013).

1.3.2. Биологическая и хозяйственная характеристика шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.)

Шалфей луговой (*Salvia pratensis* L.) еще один представитель рода Шалфей (*Salvia*), который относится к семейству Яснотковые (Lamiaceae), порядку Ясноткоцветные (Lamiales), классу Двудольные (Magnoliopsida), отделу цветковые (Magnoliophyta) (APG III, 2009).

Шалфей луговой представляет собой многолетнее травянистое растение. Высота растения варьирует от 40 до 80 см. Стебель прямостоячий, простой, пушисто-мохнатый у основания. Листья морщинистые. Прикромные листья продолговатые длиной от 5 до 15 см и шириной от 2 до 7 см, мелкозубчатые по краям, имеют длинные опушенные черешки. Стеблевые листья меньшего размера, имеют короткие черешки. Соцветие образовано 4-6 мутовками. Чашечка колокольчатая, густо опушенная. Венчик имеет длину 18-25 см,

фиолетового цвета, реже розовый или белый. Тычинок немного, пестик выставляется из венчика. Плоды – трехгранные, бурого цвета. Время цветения – июнь-сентябрь (Губанов и др., 2004). Общий вид цветущего растения шалфея лугового представлен на рис. 1.3.2.1.



Рис. 1.3.2.1. Общий вид цветущего растения шалфея лугового (*S. pratensis*)

Шалфей луговой является эфирномасличным и декоративным растением. Обладает антибактериальным, противовоспалительным, отхаркивающим, тонизирующим, вяжущим, мочегонным, спазмолитическим и ранозаживляющим действием. Этими свойствами обладают листья шалфея лугового (Грау, 2003; Горчакова, 2014).

1.3.3. Биологическая и хозяйственная характеристика иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.)

Иссоп лекарственный (*Hyssopus officinalis* L.) является представителем рода Иссоп (*Hyssopus*), который относится к семейству Яснотковые (Lamiaceae), порядку Ясноткоцветные (Lamiales), классу Двудольные (Magnoliopsida), отделу цветковые (Magnoliophyta) (APG III, 2009).

Иссоп лекарственный представляет собой многолетнее полукустарниковое растение, которое произрастает в южных областях Российской Федерации, на Кавказе и в Средней Азии (Сизоненко, 2012; Ториков, 2013). Высота иссопа лекарственного варьирует от 50 до 70 см. Стебли растения четырехгранные, у основания одревесневают, являются прямостоячими. Корень стержневой, деревянистый. Листья имеют супротивное строение, являются сидячими, ланцетными, с цельным краем, серо-зеленого цвета. Цветки образуют колосовидное соцветие, синего, розового, иногда белого цвета. Плод растения – бурый орешек. Время цветения – июль-сентябрь (Маевский, 2006; Ториков, 2013; Маевский, 2014; Соловьева, 2014).

Общий вид цветущего растения иссопа лекарственного (*H. officinalis*) представлен на рисунке 1.3.3.1.



Рис.1.3.3.1. Общий вид цветущего растения иссопа лекарственного (*H. officinalis*)

Иссоп лекарственный является медоносным, лекарственным и пряно-ароматическим растением. Он включен в фармакопеи Франции, Швеции, Германии, Румынии и Португалии (Тимчук и др., 2013). Он содержит эфирное масло, сесквитерпены, дубильные вещества, олеаноловую и урсоловую кислоты, смолы, минеральные соли, органические кислоты, флавоноиды (Ториков, 2013; Гребенникова и др., 2017).

Ценность представляют листья растения. Иссоп лекарственный обладает противовоспалительным, антисептическим, противокашлевым действием. Вызывает стимуляцию пищеварения, снимает спазмы гладкой мускулатуры кишечного-желудочного тракта (Гоголина, 2013). Настои иссопа применяют в лечебных целях при заболеваниях верхних дыхательных путей, кашле, бронхите, бронхиальной астме, воспалении и туберкулезе легких, стенокардии, неврозах, ревматизме, полиартрите, для лечения ушибов, синяков, ран, болезней кожи (Сизоненко, 2012).

В эксперименте иссоп лекарственный проявляет антибактериальную, антимикотическую и антипротозойную активность (Буданцев, Лесиовская, 2001).

1.3.4. Биологическая и хозяйственная характеристика иссопа мелового (*Hyssopus cretaceus* Dubj.)

Иссоп меловой (*Hyssopus cretaceus* Dubj.) является представителем рода Иссоп (*Hyssopus*), который относится к семейству Яснотковые (Lamiaceae), порядку Ясноткоцветные (Lamiales), классу Двудольные (Magnoliopsida), отделу цветковые (Magnoliophyta) (APG III, 2009).

Иссоп меловой представляет собой полукустарник от 20 до 45-60 см в высоту. Стебли растения округлые, вверху слабо опушенные. Листья серо-зеленого цвета, с почти незаметной срединной жилкой, узколинейные. Венчик синего цвета, длиной 7-10 мм. Плод растения – орешек. Время цветения – май – сентябрь (Маевский, 2006; Маевский, 2014; Думачева и др., 2015).

Общий вид цветущего растения иссопа мелового (*H. cretaceus*) отражен на рисунке 1.3.4.1.



Рис. 1.3.4.1. Общий вид цветущего растения иссопа мелового (*H. cretaceus*)

Растение произрастает на рыхлом мелу, выступает пионером зарастания меловых обнажений, образует иссопники (Думачева и др., 2015). Является эндемиком бассейна реки Дон, его притоков и правобережья реки Волги (Литвинова, Горшкова, 1977). Иссоп меловой занесен в Красные книги России и Белгородской области. В Красной книге Белгородской области имеет VI статус редкости – особо ценный вид. На территории Белгородской области распространен в Валуйском, Вейделевском, Ровеньском, Новооскольском, Алексеевском, Волоконовском и Шебекинском районах (Красная книга Белгородской области, 2005).

Известно применение иссопа мелового как эфирномасличного и декоративного растения (Гиляров, 1989). В народной медицине применяется от болезней дыхательной системы, при респираторных инфекциях, бронхиальной астме (Буданцев, Лесиовская, 2001).

1.3.5. Биологическая и хозяйственная характеристика мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.)

Мята длиннолистная (*Mentha longifolia* (L.) Huds.) является представителем рода Мята (*Mentha*), относится к семейству Яснотковые (Lamiaceae), порядку Ясноткоцветные (Lamiales), классу Двудольные (Magnoliopsida), отделу цветковые (Magnoliophyta) (APG III, 2009).

Мята представляет собой многолетнее травянистое растение. Стебли растения прямостоячие, ветвистые, четырехгранные, беловатые, опушенные, высотой от 30 до 100 см. Листья ланцетные, длиной 5-15 см, шириной 1,5-3,5 см, сверху сизо-зеленого оттенка, снизу беловолочные, являются сидячими. Имеет ползучее корневище. Цветки собраны в мутовки, колосовидное соцветие. Цветоножки волосистые. Чашечка колокольчатая. Венчик розовато-сиреневый, длиной 3,5-4 см. Плод – бурый орешек. Время цветения – июнь – август (Губанов и др., 2004; Маевский, 2006; Маевский, 2014).

Общий вид цветущего растения мяты длиннолистной (*M. longifolia*) представлено на рис. 1.3.5.1.



Рис. 1.3.5.1. Общий вид цветущего растения мяты длиннолистной (*M. longifolia*)

Мята обладает полиморфизмом, выделяют несколько ее подвидов (Макаров, 1971). Растение произрастает на лугах, по берегам рек, во влажных низинах (Пелях и др., 2007). В Российской Федерации произрастает во всех областях, встречается во многих регионах Евразии (Губанов и др., 2004).

Мята длиннолистная используется в качестве пищевого, пряного, эфирномасличного и лекарственного растения, является медоносом (Губанов и др., 2004). Используется в народной медицине для лечения заболеваний печени (Бидарова, 2015). Богаты биологически активными веществами листья, в которых содержится не менее 2% эфирного масла, состоящего из ментола, эфиров изовалериановой и уксусной кислот, витаминов А и С. В состав листьев входит α -пинен, цинеол, пулегон, лимонен, β -фелландрен и другие терпеноиды, дубильные вещества, каротин, бетаин, органические кислоты (Склярский, Губанов, 1970; Олисаев, Кадиева, 1984; Соколов, Замотаев, 1988; Гагиева, Зубарева, 2015).

В эксперименте водно-спиртовой экстракт мяты длиннолистной обладает антибактериальными, антимикотическими свойствами (Буданцев, Лесиовская, 2001).

1.3.6. Биологическая и хозяйственная характеристика пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.)

Пахучка обыкновенная (*Clinopodium vulgare* L.) является представителем рода Пахучка (*Clinopodium*), который относится к семейству Яснотковые (Lamiaceae), порядку Ясноткоцветные (Lamiales), классу Двудольные (Magnoliopsida), отделу цветковые (Magnoliophyta) (APG III, 2009). Известны другие названия растения: душица глухая, кошачья мята, шарушник, постельница (Кьосев, 2011).

Пахучка обыкновенная представляет собой травянистое растение. Оно является опушенным. Высота растения составляет 20-70 см. Листья яйцевидные, зубчатые, сверху слабо опушенные, снизу опушенные по жилкам. Верхушечные листья отогнуты вниз. Верхушечное соцветие состоит из густых мутовок. Прицветники линейно-шиловидные. Чашечка имеют длину в 6-8 мм, с 13 жилками. Венчик пурпурный, ярко-розовый, длиной 12-15 мм. Пестик выставляется из венчика. Плоды – буровато-коричневые. Время цветения – июль – сентябрь (Губанов и др., 2004; Маевский, 2006).

Общий вид цветущего растения пахучки обыкновенной (*C. vulgare*) отражен на рисунке 1.3.6.1.



Рис. 1.3.6.1. Общий вид цветущего растения пахучки обыкновенной (*C. vulgare*)

Пахучка обыкновенная произрастает по светлым, преимущественно лиственным лесам, кустарникам, опушкам, лесным полянам. В Российской Федерации произрастает во всех областях (Маевский, 2006).

Пахучка обыкновенная содержит в своем составе тритерпеноиды, моно- и дитерпеноиды, стероиды, флавоноиды, углеводы, фенольные соединения, дубильные вещества, жирное и эфирное масло (Буданцев, Лесиовская, 2001).

Активно используется в народной медицине при головной боли, кашле, заболеваниях органов дыхания. Обладает противоглистным, антисептическим, противовоспалительным, ранозаживляющим и слабительным действием

(Кьюсев, 2011). Используется в качестве чая и приправы к кушаньям. Является хорошим медоносом (Губанов и др., 2004).

В эксперименте эфирный экстракт пахучки обыкновенной проявляет антимикробную активность, эфирное масло – антимикотическую, спиртовой экстракт плодов – антиоксидантную (Буданцев, Лесиовская, 2001).

1.4. Теоретические основы культивирования клеток и тканей растительных объектов в условиях *in vitro*

На сегодняшний день культура клеток и тканей *in vitro* помогает удовлетворить растущий спрос на лекарственные препараты растительного происхождения и помогает решить проблему появления дополнительной сырьевой базы для получения биологически активных веществ ввиду ограниченности ареалов распространения лекарственных растений (Гарей-Матросьян, 2016).

Термин «культура клеток и тканей» *in vitro* (в пробирке) используется для обозначения культивируемых частей растений: изолированных органов, каллусных и суспензионных тканей, культуры протопластов и зародышей (Дитченко, 2007). Для получения культуры клеток и тканей достаточно небольшого фрагмента растения, который получил названия – эксплант. Метод культуры клеток и тканей представляет собой культивирование эксплантов в специальной стеклянной посуде (пробирки, колбы, банки) на искусственной питательной среде (Ермишин, Воронкова, 2015).

Методы культивирования клеток и тканей растений основываются на способности к размножению в условиях *in vitro*, к тотипотентности и регенерации (Шевелуха и др., 2008). Тотипотентность позволяет клетке

развиваться до целого организма (Калинин и др., 1992; Цыренов, 2003; Мельничук и др., 2003; Егорова, Ставцева, 2006; Расторгуев, 2009).

Перечень растительных объектов, которые вводятся в культуру клеток и тканей *in vitro*, широк. Большинство исследований проводят на голосеменных и покрытосеменных растениях. Наиболее часто в культуру *in vitro* двудольные травянистые растения, затем следуют однодольные травянистые растения и зерновые культуры. Древесные растения сложнее поддаются культивированию в условиях *in vitro* (Бутенко, 1999).

На сегодняшний день метод культуры клеток и тканей растений используется для решения ряда теоретических и практических задач биологической науки из-за простоты устройства клеточных моделей, отсутствия контроля со стороны других тканей растительного организма, возможности получения значительного количества массы клеток и контроля выращивания (Дитченко, 2007; Решетников, Спиридович, 2012).

Известны несколько направлений использования культуры клеток и тканей растений. Первое направление связано со способностью культуры клеток и тканей *in vitro* образовывать ценные для человека биологически активные вещества. Метод культуры клеток и тканей позволяет получать вещества вторичного метаболизма круглый год (Шевелуха и др., 2008; Решетников, Спиридович, 2012). Второе направление культур клеток и тканей растений связано с использованием их для размножения и оздоровления растительного посадочного материала. Этот метод называется метод микрклонального размножения растений и позволяет получать от одного материнского растения тысячи безвирусных растений в год (Дитченко, 2007). Третье направление – использование клеток и тканей *in vitro* в селекции растений. Четвертое направление – криосохранение клеток и тканей *in vitro*, что представляет собой длительное хранение клеток при температуре жидкого азота в генетических банках редких и исчезающих растений (Benson, 1999; Шевелуха и др., 2008; Плаксина, Пищева, 2014).

1.4.1. Биотехнология микрклонального размножения растений *in vitro*

Культивирование клеток и тканей растений связано с микрклональным размножением, разновидностью вегетативного размножения растений (Калинин и др., 1992; Широков, Крюков, 2012). Под микрклональным размножением понимают метод массового, бесполого размножения растений, при котором все полученные растения генетически идентичны исходному организму (Расторгуев, 2009). Метод микрклонального размножения актуален для размножаемых в производстве культур (Никонович и др., 2017).

Существует много способов и разновидностей микрклонального размножения растений. Н.В. Катаева и Р.Г. Бутенко в 1983 году выделили основные два типа клонального микроразмножения: активация существующих меристематических клеток в апексе стебля, пазушных и спящих почках; индукция возникновения почек или эмбриодов с образованием адвентивных побегов, индукцией соматического эмбриогенеза, дифференциацией адвентивных почек в каллусе (Бабилова и др., 2007).

Метод микрклонального размножения состоит из нескольких этапов: 1) выбор донорного растительного организма, изолирование части растения и получение из нее растущей культуры в асептических условиях; 2) собственный этап микрклонального размножения, при котором достигается получения максимального числа микропобегов; 3) укоренение побегов с адаптацией к почвенным условиям; 4) выращивание полученных растений в условиях теплицы и подготовка их к высадке в поле (Войнов и др., 2009).

1.4.2. Культивирование каллусных тканей растений *in vitro*

В современной науке под культивированием каллусных тканей понимают длительное выращивание каллусных тканей растительных организмов. Под каллусом понимают ткань, которая возникла путем неорганизованной пролиферации клеток растений (Вечканов, Сорокина, 2012). В свою очередь пролиферация – это новообразование клеток и тканей, которое возникает путем их размножения (Назаренко и др., 2018).

Не все ученые были всегда единого мнения в вопросе данных определений. Доддс и Робертс под каллусом понимали неорганизованное меристематическое или опухолеобразное скопление клеток растений в условиях *in vitro* (1985). Терци и Санг определяли каллус как пролиферирующую ткань, растущую только на твердой поверхности (1986). Муромцев (1990) в своих трудах описывал каллус как ткань, которая возникает путем неорганизованной пролиферации клеток растения. Батыгина понимала под каллусом структуру с гетерогенной интегрированной организацией, которая образуется в результате пролиферации клеток на поверхности растения (Тимофеева, Румянцева, 2012).

Каллусные ткани выращиваются на разных типах питательных сред: на твердой агаризованной среде; на полужидкой агаризованной среде с малой концентрацией агара около 0,6-1%; среде с добавлением других желирующих полимеров; на специальных дисках, мостиках из фильтровальной бумаги, полупогруженных в жидкую питательную среду (Вечканов, Сорокина, 2012).

В природных условиях *in vivo* каллус возникает у растений только при заживлении ран (Лукаткин, Дерябин, 1999). Каллусную ткань в условиях *in vitro* можно получить практически из любой ткани растения. Молодые ткани в более пригодны для получения каллусов. Одревесневшие и старые ткани растений в этом случае используют редко. Проращивание простерилизованных

семян в асептических условиях часто дает наиболее пригодный материал для получения каллусных культур (Дитченко, 2007).

Для получения каллусной ткани экспланты обрабатывают различными стерилизующими агентами. Стерильные каллусные ткани помещают в стерильную посуду, содержащую питательную среду. Ткань, которая образуется на этой среде из клеток экспланта, получила название первичного каллуса. Полученный каллус обязательно переносят на свежую питательную среду по мере истощения элементов питания в среде, происходит это примерно раз в месяц, но для каждого вида растения время пересадки строго индивидуально. Этот процесс называют пассированием или субкультивированием. Каллус, постоянно поддерживаемый в культуре клеток и тканей *in vitro*, называют пассируемый (Назаренко и др., 2018).

Каллусные ткани могут отличаться друг от друга по морфологическим признакам. Цвет их может быть белым, желтоватым, зеленым, красным. Они могут быть рыхлыми, оводненными, легко распадающимися на отдельные клетки; средней плотности, с выраженными меристематическими очагами; плотные (Вечканов, Сорокина, 2012; Дышко, 2014). Характер роста клеток и их состояние определяют под микроскопом. Рост оценивают по увеличению массы ткани или по увеличению числа клеток в 1 мл (Назаренко и др., 2018).

Кривая роста каллусных культур *in vitro* имеет S-образный вид и разделяется на несколько фаз: лаг-фаза, где видимый рост клеток не наблюдается, и идет подготовка к делению; экспоненциальная фаза, где рост идет с ускорением; линейная фаза, где скорость роста клеток не изменяется; фаза замедленного роста, где наблюдается явное замедление роста; стационарная фаза, во время которой масса и число клеток не изменяется; фаза деградации, во время которой основная часть клеток гибнет. Возможно удержание определенных фаз каллусных тканей (Назаренко и др., 2018).

1.5. История развития методов культуры клеток и тканей высших растений в условиях *in vitro*

Методы культивирования клеток и тканей растений представляют собой направление современной биотехнологии. Термин «биотехнология» ввел в 1917 году венгерский ученый Карл Эреки (Бабилова и др., 2007). Методы биотехнологии растений были разработаны в первой половине XIX века. Большое влияние на развитие этих методов оказали достижения цитологии, научную основу которой составила появившаяся в 1839 году клеточная теория Шлейдена и Шванна (Мокшин, Лукаткин, 2013).

Историю развития методов культивирования клеток и тканей растений можно разделить на несколько этапов. Первый этап (1878-1902 гг.) связан с попытками выращивания растений в условиях *in vitro*. Немецкие ученые Герман Фехтинг, Карл Рехингер, Готлиб Хаберландт культивировали изолированные кусочки растительных организмов. В это время появились предположения о возможности длительного культивирования растений (Назаренко и др., 2018). Г.Фехтинг в 1878 году выявил наличие полярности у изолированных стеблей. В 1893 году К. Рехингер определил минимальные размеры изолированных частей растений, способные регенерировать в целые растения. В 1902 году Г. Хаберландт выдвинул гипотезу о тотипотентности растительной клетки (Ермишин, Воронкова, 2015).

Второй этап охватывает временной промежуток с 1902 года до 1922 года, когда создавались питательные среды для культивирования тканей, и связан с именами Росса Гаррисона и Алексиса Карреля. Они разработали методику культивирования животных клеток на питательных средах природного происхождения. Опыты с выращиванием растительных объектов на питательных средах проводились Чехом и Пратом (Дитченко, 2007).

Третий этап связан с научными открытиями 1922-1932 гг. Немецкий ученый В. Котте и американский ученый В. Робинсон независимо друг от друга культивировали кончики корней растений. На основании опытов они выдвинули гипотезу о необходимости использования меристематических клеток корня или стебля в качестве объекта для культивирования растений. Они предлагали использовать сложные питательные среды для культивирования растений (Черевченко и др., 2008).

Четвертый этап занимает временной промежуток с 1932 года до 1940 года. Он связан с трудами французского ученого Р. Готре и американского ученого Ф. Уайта. Р. Готре удалось получить калусную ткань при культивировании клеток камбия древесных растений на агаризованной питательной среде. Р. Готре первым стал использовать питательные среды, которые содержали в своем составе фитогормоны, ауксины. Он предложил использовать агаризованную среду. Список растений, культивируемых Готре, был отражен в 1969 году в монографии, который в это время включал уже 142 вида растений (Ермишин, Воронкова, 2015). Ф. Уайт провел культивирование корней томатов и впервые осуществил пересадку тканей на свежую питательную среду, показав, что так они могут расти неограниченно долго. Он представил состав питательной среды, которая содержала витамины (Дитченко, 2007). Большое значение на культивирование клеток и тканей растений оказал Р. Сноу, который в 1935 году опубликовал труд о влиянии индолилуксусной кислоты на растения (Ермишин, Воронкова, 2015).

Пятый этап (1940-1960 гг.) охватывает время научных открытий последователей Р. Готре и Ф. Уайта. В это время было увеличено количество видов растений, введенных в культуру *in vitro*, разработаны новые составы питательных сред, изучено значение составных компонентов сред (Дитченко, 2007). В 1955 году американские ученые Ф. Скуг и К. Миллер открыли новый класс фитогормонов - цитокинины. Они показали, что добавление в питательную среду разных соотношений цитокининов и ауксинов вызывает

разные процессы в культуре клеток и тканей. Это открытие получило название правило Скуга-Миллера (Широков, Крюков, 2012). В 1952 году впервые была получена суспензионная культура клеток растений в лаборатории Ф.Стюарда. Большое удобство в культивировании суспензионных культур внес встряхиватель, разработанный Л. Бергманном в 1960 году. Благодаря этим открытиям стало возможным появление промышленных производств биологически активных веществ с помощью культивируемых клеток растений (Ермишин, Воронкова, 2015).

Шестой этап охватывает временной промежуток 1960–1975 гг. В это время был разработан метод получения и культивирования изолированных протопластов профессором Коккингем (1960 г.), который проводил опыты с корнями и плодами томата. В 1970 г. Пауэр со своими коллегами осуществил искусственное слияние протопластов (Дитченко, 2007). Кроме этого в этот период был разработан метод микроклонального размножения. Данный метод разработали французский ученый Морель в 1959 году и русский ученый Бутенко в 1960 году. Жан Морель описал технику культивирования апикальных меристем. Р.Г. Бутенко были разработаны методики микроклонального размножения картофеля, сахарной свеклы, гвоздики, герберы и других растений (Султангазина, Абилева, 2013). В 1964 году индийские ученые С. Гухи и С. Магешвари получили гаплоидные растения в культуре пыльников дурмана. Результаты ученых показали, что микроспоры обладают тотипотентностью (Ермишин, Воронкова, 2015).

Седьмой этап взял свое начало с 1975 года и продолжается по настоящее время. Данный этап связан с быстрым развитием техники *in vitro*, созданием биотехнологий на основе культивирования высших растений и дальнейшем появлением и развитием новых направлений. Кроме этого был создан и развивается метод изолированного культивирования клеток с использованием протопластов и векторов, созданных на основе плазмид *Agrobacterium tumefaciens* и *Agrobacterium rhizogenes* (Дитченко, 2007).

1.6. Оснащение лаборатории для работ с культурой клеток и тканей в условиях *in vitro*

Все работы, связанные с культурой *in vitro*, проводят в специальных лабораториях, в условиях строгой стерильности. Эти лаборатории разделяются на несколько секций: моечная комната, комната для приготовления питательных сред, помещение для стерилизации, комната для инокуляции растений на питательные среды; световая комната (Сорокина и др., 2002).

Моечная комната должна быть оснащена мойкой и дистиллятором; сушильными и вытяжными шкафами для мойки посуды, ее дальнейшего просушивания и ее стерилизации с режимом 160 °С в течение 4 ч. В комнате для мытья посуды часто размещают автоклавы, которые используют для стерилизации питательных сред и посуды (Ермишин, Воронкова, 2015).

Комнаты для приготовления питательных сред должны быть оснащены лабораторными столами; холодильником; аналитическими весами; рН-метром; магнитной мешалкой; плиткой; лабораторной посудой. Оборудование помещения для стерилизации состоит из автоклавов; шкафов для хранения стерильных материалов (Султангазина, Абилева, 2013).

Все работы, связанные с культурой клеток и тканей, проводят в комнате для инокуляции растительных эксплантов на питательные среды, которая обладает следующим оборудованием: ламинарными боксами; бактерицидными лампами; шкафами для материалов (Сорокина и др., 2002).

Ламинарные боксы представляют собой столы с поверхностью из нержавеющей стали, в рабочее пространство которых поступает стерильный воздух, обеспечивая отсутствие микроорганизмов. Перед началом работы комнату обеззараживают с помощью УФ-лампы. Затем протирают рабочую поверхность ламинарного бокса спиртом (Ермишин, Воронкова, 2015).

Световые комнаты содержат в себе источники света; кондиционер; стеллажи для растительных объектов. Также для культивирования растительных объектов используют термостаты и климатостаты (Широков, Крюков, 2012; Ермишин, Воронкова, 2015).

1.7. Питательные среды для культивирования клеток и тканей растений в условиях *in vitro*

Существует ряд базовых питательных сред, которые берут за основу, а затем при необходимости производят их модификацию. Наиболее часто используют среду Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962). Реже используют среду В-5 Гамбурга (Gamborg, 1975) и среду Нитча (1969) (Nitsch, 1979).

Питательная среда должна иметь в себе обязательные компоненты: минеральные соли (макро- и микроэлементы), источник углеводного питания, витамины и регуляторы роста растения (фитогормоны) (Авксентьева, Петренко, 2011). Состав питательной среды подбирают для каждого вида растения индивидуально. Основой для любой питательной среды служит смесь минеральных солей (Сорокина и др., 2002). Источником углерода обычно выступает сахароза в концентрации 2 - 5% (Авксентьева, Петренко, 2011). Для стимуляции биохимических реакций в клетке используют витамины: тиамин, рибофлавин, биотин, пантотеновую кислоту, пиридоксин, аскорбиновую кислоту (Широков, Крюков, 2012).

Фитогормоны применяют для управления процессами в культуре клеток и тканей. Они влияют на дифференциацию и дедифференциацию клеток, индуцируют их деление и растяжение, участвуют в росте и развитии клеточных структур. В культуре клеток и тканей применяют ауксины, цитокинины, гиббереллины, реже – абсцизины, этилен (Сорокина и др., 2002).

Ауксины в растениях встречаются в виде β-индолил-3-уксусной кислоты. Также в группу ауксинов входят 2,4-дихлорфенилуксусная кислота, индолил-3-масляная кислота, 3-(3-индолил)-пропионовая кислота, 4-хлориндолил-3-уксусная кислота, α-нафтилуксусная кислота. Они оказывают влияние на рост клеток в фазе растяжения и на индукцию корнеобразования, участвуют в процессах развития завязи и плодообразования, обуславливают явление апикального доминирования, явления преимущественного развития верхушечной почки (Якушкина, 1980).

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. Они выполняют функции, связанные с индукцией клеточных делений, модификацией апикального доминирования и дифференциацией стебля (Chen, 1985; Ермишин, Воронкова, 2015).

В качестве гиббереллинов используют гибберелловую кислоту A₃, смесь гиббереллинов A₃ и A₇ и отечественные препараты гибберсиб, гиббор М и гибберросс (Захарычев, 2007). Гиббереллины отвечают за стимуляцию деления клеток, ускорение роста органов, чаще всего стебля, прерывание покоя семян, прорастание пыльцы и индукцию цветения растений (Алехина и др., 2005).

Большое значение имеет рН питательной среды. Для большинства видов растений оптимальный рН варьирует от 5,5 до 5,8 (Ермишин, Воронкова, 2015).

Правильный подбор питательных сред позволяет повысить продукцию вторичных метаболитов в изолированных каллусных клетках, что оказывает существенное влияние при получении биологически активных веществ (Гарей-Матросьян, 2016).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Для проведения исследований был собран растительный материал интактных растений семейства Lamiaceae: шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.), иссопа мелового (*Hyssopus cretaceus* Dubj.), мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.), пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.).

Материал собирался в разных районах Белгородской области. Растительный материал *S. pratensis* собирали в районе подстанции г. Белгород, *C. vulgare* собирали на территории участка «Лес на Ворскле» заповедника «Белогорье», п. Борисовка, *S. officinalis*, *H. officinalis*, *H. cretaceus*, *M. longifolia* собирали в Ботаническом саду НИУ «БелГУ». Растения были идентифицированы с помощью определителя (Маевский, 2006). Растительный материал был собран летом 2017 года. Коллекция растений включена в гербарий кафедры биотехнологии и микробиологии НИУ «БелГУ».

Для введения в культуру *in vitro* и получения проростков и мини-растений использовали семена растений; для получения каллусных культур использовали листовые пластинки, для определения антимикробной активности у интактных растений использовали надземную часть растений исследуемых видов.

Для определения антимикробной активности растительных экстрактов использовали тест-организмы, два штамма бактерий: кишечную палочку (*Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers, штамм VKPM-M17) и золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus* Rosenbach, штамм MDC 5233), которые были взяты в Белгородском филиале ФГБНУ ФНЦ

Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН.

Escherichia coli – грамотрицательная палочковидная бактерия, которая распространена в нижней части кишечника теплокровных животных и является частью нормальной микрофлоры человека, однако некоторые ее штаммы могут вызывать тяжелые пищевые отравления (Hudault, 2001; Vogt, Dippold, 2005).

Staphylococcus aureus – грамположительная шаровидная бактерия, которая вызывают широкий ряд заболеваний от угрей до смертельно опасных пневмоний, инфекционно-токсического шока и сепсиса. Однако 25-40% населения являются носителями этой бактерии, но не подвергаются заболеваниям (Kluytmans, 1997).

Все исследования проводились в лаборатории «Инновационных методов исследования растительных объектов» и лаборатории «Биотехнологии и микробиологии» кафедры биотехнологии и микробиологии НИУ «БелГУ».

2.2. Методы исследования

2.2.1. Сбор и подготовка растительного сырья к хранению

Сбор растительного сырья и подготовка его к хранению является важным первоначальным этапом в данных исследованиях (Дуктова, 2010). Сбор материала проводили в летний период: семена собирали в период их созревания, надземные части растений – в период максимального накопления БАВ, начиная с периода цветения до образования плодов. Сбор проводили в дневное время, в сухую и солнечную погоду. Избегали сбора запыленных растений. Собранные растения укладывали в тару.

Собранное растительное сырье расстилали на чистой ткани тонким слоем, отбирали его от отмерших и поврежденных частей, от различных примесей,

грязи. Сушку растительного сырья проводили в проветриваемом помещении методом естественного природного тепла с периодическим перемешиванием. После сушки растительное сырье укладывалось в пакеты с этикетками с названием вида растения, временем и местом сбора.

Сбор и подготовку растительного сырья к хранению проводили по общепринятым методикам (Попов и др., 1990; Дзюба и др., 2004; Дуктова, 2010).

2.2.2. Приготовление питательных сред

Исследования по введению в культуру *in vitro* и культивированию растительных эксплантов проводились на модифицированной агаризованной среде Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962). Состав питательной среды Мурасиге-Скуга представлен в приложении 1.

Питательные среды для получения стерильных проростков шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.), пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.) и мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.) имели традиционный состав среды Мурасиге-Скуга и не содержали в своем составе фитогормонов.

Полученные проростки культивировали на модифицированных питательных средах Мурасиге-Скуга разного состава для получения полноценных мини-растений *in vitro*:

1. MS₁: 6-бензиламинопурин – 1 мг/л, сахароза – 20 г/л;
2. MS₂: 6-бензиламинопурин – 3 мг/л, сахароза – 20 г/л;
3. MS₃: индолил-3-уксусная кислота – 1 мг/л, сахароза – 20 г/л;
4. MS₄: индолил-3-масляная кислота – 1 мг/л, сахароза – 20 г/л;

5. MS₅: индолил-3-уксусная кислота – 2 мг/л, кинетин – 0,2 мг/л, сахароза – 20 г/л;
6. MS₆: а-нафтилуксусная кислота – 0,5 мг/л, кинетин – 0,1 мг/л, 6-бензиламинопурин – 1 мг/л, сахароза – 20 г/л;
7. MS₇: индолил-3-масляная кислота – 2 мг/л, 6-бензиламинопурин – 0,5 мг/л, сахароза – 20 г/л;
8. MS₈: а-нафтилуксусная кислота – 2 мг/л, индолил-3-уксусная кислота – 2 мг/л, 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота – 2 мг/л, кинетин – 1 мг/л, 6-бензиламинопурин – 1 мг/л, сахароза – 20 г/л;
9. MS₉: индолил-3-уксусная кислота – 20 мг/л, кинетин – 2 мг/л, сахароза – 20 г/л;
10. MS₁₀: а-нафтилуксусная кислота – 12 мг/л, 6-бензиламинопурин – 1 мг/л, сахароза – 20 г/л;
11. MR₂₀: 6-бензиламинопурин – 2 мг/л, индолил-3-уксусная кислота – 0,5 мг/л, сахароза – 20 г/л;

Для получения каллусных культур шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), шалфея лугового (*S. pratensis*), иссопа лекарственного (*H. officinalis*), иссопа мелового (*Hyssopus cretaceus* Dubj.), мяты длиннолистной (*M. longifolia*), пахучки обыкновенной (*C. vulgare*) экспланты помещали на модифицированные питательные среды Мурасиге-Скуга разного состава:

1. MR₃₀: 6-бензиламинопурин – 2 мг/л, индолил-3-уксусная кислота – 0,5 мг/л, сахароза – 30 г/л;
2. MR₂₀: 6-бензиламинопурин – 2 мг/л, индолил-3-уксусная кислота – 0,5 мг/л, сахароза – 20 г/л;
3. MR_{6г}: не содержит фитогормонов, сахароза – 30 г/л;
4. Среда для индукции и культивирования каллусных культур *M. longifolia* MS_{кмята1}: а-нафтилуксусная кислота – 0,75 мг/л, 6-бензиламинопурин – 0,75 мг/л, ½ состава MS, сахароза – 30 г/л;

5. Среда для индукции и культивирования каллусных культур *M. longifolia* MS_{кмята2}: индолил-3-уксусная кислота – 0,5 мг/л, 6-бензиламинопурин – 10 мг/л, сахароза – 30 г/л;
6. Среда для индукции и культивирования каллусных культур *S. pratensis* MR_{кшалфей}: а-нафтилуксусная кислота – 1 мг/л, 6-бензиламинопурин – 0,5 мг/л, сахароза – 30 г/л.

Питательные среды готовились согласно общепринятым методикам культивирования растительных клеток и тканей в условиях *in vitro* (Калинин и др., 1992; Шевелуха и др., 2008; Валиханова, 2009).

2.2.3. Создание асептических условий в лаборатории

Обязательным условием при культивировании растительных клеток и тканей было создание асептических условий и полное их соблюдение. Все работы и манипуляции с культурами проводились в ламинар-боксе «Lamsystems» II класса защиты, А2 типа.

Перед началом работ ламинарная комната и поверхность ламинар-бокса подвергались стерилизации путем использования ультрафиолетовых ламп в течение 1,5-2 ч. После обработки ультрафиолетом поверхность ламинар-бокса протирали 96%-ным этиловым спиртом. После чего ламинар-бокс включался и использовался по назначению.

В исследовании использовались только стерильные материалы, посуда, среды, дистиллированная вода и инструменты. Инструменты и посуда стерилизовались в сухожаровом шкафу в течение 3,5 часов при температуре 190 °С. Дистиллированная вода, среды, различные материалы (вата, подложки), носики для дозаторов стерилизовались в автоклаве при давлении паром в 1 атм и температуре 120°С в течение 20 минут.

Асептические условия в работе при культивировании растительных клеток и тканей создавались, исходя из общепринятых методик (Сорокина и др., 2002; Дитченко, 2007; Султангазина, Абилева, 2013).

2.2.4. Подбор оптимальных стерилизующих агентов для растительного материала в условиях *in vitro*

Весь растительный материал подвергался поверхностной стерилизации, так как сам по себе служил источником заражения из-за наличия на поверхности растения эпифитной микрофлоры.

Перед стерилизацией растительный материал (семена и листья) отмывали в мыльном растворе и водопроводной воде с целью смывания грязи. После чего еще 3 раза промывали дистиллированной водой.

Стерилизацию проводили ступенчатым способом. Вначале помещали растительный материал в 70%-ный этиловый спирт на 1 минуту, а потом уже в стерилизующий раствор определенной концентрации и на определенное время. В качестве стерилизующих растворов использовали: гипохлорит натрия в концентрации 5-15% и 2,5-7,5%, лизоформин 3000 в концентрации 3%, 5%, 10%, биоцид в концентрации 3%, 5%, 10%, нитрат серебра в концентрации 0,1% и 0,5%, хлорамин Б в концентрации 5% и 10%. Стерилизующие растворы оставляли для воздействия на семена растений на 10, 20 и 30 минут, а для воздействия на листовые пластинки растений на 5, 10, 15 минут.

Стерилизацию растительного материала проводили по общепринятым методикам (Бутенко, 1999; Сорокина и др., 2002; Кильчевский, Хотылева, 2012).

2.2.5. Получение и культивирование стерильных проростков

В исследованиях получали и культивировали проростки следующих видов: шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.), пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.) и мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.).

После стерилизации семена указанных видов помещались на безгормональную питательную среду Мурасиге-Скуга и культивировались в термостате при температуре 23°C. Со временем учитывали количество стерильных и жизнеспособных проростков и среднее время прорастания семян.

После прорастания семян проростки переносили в асептических условиях на питательные среды, содержащие различные концентрации фитогормонов, и культивировали в световой комнате при температуре 23 °С с соблюдением режима день/ночь: 16/8 часов. Растения *in vitro* пассировали на свежие питательные среды каждые 1,5 месяца. Со временем учитывали качество растений *in vitro*, количество у них листьев, длину стебля, характер корня.

Получение и культивирование проростков осуществляли по общепринятым методикам (Сорокина и др., 2002; Шевелуха и др., 2008; Султангазина, Абилева, 2013).

2.2.6. Получение и культивирование каллусных культур

Каллусные культуры получали из интактных растений шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.), иссопа мелового (*Hyssopus cretaceus* Dubj.), мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.) и полученных проростков в условиях *in vitro* шалфея

лугового (*Salvia pratensis* L.) и пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.), иссопа лекарственного (*H. officinalis*) и мяты длиннолистной (*M. longifolia*).

Для получения каллусных культур брались стерильные листья растений, подвергались поранению для индукции каллусогенеза и ставились на питательные среды, содержащие различный состав. Каллусные культуры культивировались в термостате при температуре 23°C и пассировались на свежие питательные среды каждые 3-4 недели. Со временем учитывали характеристики культивируемых каллусных культур, появление у них новообразований.

Получение и культивирование каллусных культур производили согласно общепринятым методикам (Цыренов, 2003; Тимофеева, Румянцева, 2012).

2.2.7. Приготовление растительных экстрактов

Растительные экстракты из высушенного растительного сырья видов шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.) иссопа мелового (*Hyssopus cretaceus* Dubj.) и мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.) получали мацеральной техникой. В качестве экстрагента брали дистиллированную воду.

Первоначально проводили измельчение сырья с помощью ступки и пестика с последующим пропитыванием экстрагентом в соотношении сырья и растворителя 1:10 (г:мл). Полученную смесь тщательно перемешивали в течение одной минуты и оставляли в холодильнике при 4°C в течение 24 часов.

Затем смесь фильтровали через фильтровальную бумагу. Фильтраты помещали в отдельную стерильную посуду. К сырью добавляли свежую порцию экстрагента и также оставляли настаиваться при 4°C в течение 24 часов.

Данную стадию повторяли три раза для достижения максимальной экстракции биологически активных веществ из растительного сырья.

После получения 100% раствора растительного экстракта готовили его серийные разбавления. Для получения разбавления 1:10 брали 1 мл 100% растительного экстракта и помещали его с помощью автоматического дозатора в первую пробирку с 9,3 мл автоклавированной дистиллированной воды. Для получения разбавления 1:100 1 мл раствора уже брали с разбавления 1:10 и добавляли его в пробирку с 9,3 мл автоклавированной дистиллированной воды. Разбавления 1:1000 и 1:10000 готовили таким же образом.

Приготовление растительных экстрактов производили по общепринятым методикам (Rojas, 2006; Wiegand, 2008; Ginovyan, 2017).

2.2.8. Приготовление суспензии микроорганизмов

Для определения антимикробных свойств растительных экстрактов предварительно получали суточную культуру *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* на скошенном агаре с использованием среды ГРМ.

После истечения 18-24 часов роста культур на скошенном агаре готовили суспензию микроорганизмов с применением стерильного физиологического раствора. Бактериальные суспензии готовили в концентрации по 0,5 McFarland Standard, что равнялось $1-2 \times 10^8$ КОЕ/мл.

Приготовление суспензий микроорганизмов производили по стандартным методикам (Ginovyan, 2017).

2.2.9. Определение антимикробных свойств растительных экстрактов

Для определения антимикробных свойств растительных экстрактов в стерильные чашки Петри разливалась среда ГРМ при температуре 50-70°C, которые оставались при ультрафиолетовом свете на 15 минут для достижения более точной стерильности.

После застывания питательной среды в чашки Петри сеялись по 100 мкл суспензии микроорганизмов методом сплошного газона с помощью шпателя Дригальского. Антимикробную активность определяли методом диффузии в агар с использованием фильтровальных дисков. Для этого в каждую чашку Петри помещались предварительно стерильные фильтровальные диски, на которые наносились исследуемые растворы и учитывались диаметры зон подавления роста микроорганизмов.

Антимикробные свойства растительных экстрактов оценивали по следующим показателям:

1. диаметр зоны подавления микроорганизма менее 10 мм – слабая чувствительность к веществу;
2. диаметр зоны подавления микроорганизма 10 мм – умеренная чувствительность;
3. диаметр зоны подавления микроорганизма более 10 мм – высокая чувствительность.

Для контроля использовали 70%-ный раствор этилового спирта и раствор антибиотиков. Для *Escherichia coli* использовали контрольный антибиотик гентамицин, а для *Staphylococcus aureus* – цефтриаксон.

Определение антимикробной активности экстрактов проводили по стандартным методикам (Ходжиева и др., 2010; Бойко и др., 2014).

2.2.10. Статистическая обработка полученных данных

Все полученные в исследованиях данные группировались в отдельные таблицы для удобства статистической обработки. Вся статистическая обработка проводилась с помощью статистических функций приложения Microsoft Office Excel 2007 и его надстройки AtteStat 8. Достоверность исследований проверялась с применением точного критерия Фишера и критерия Фишера.

Статистическая обработка полученных данных проводилась по общепринятым методам, принятым в биометрии (Снегин, 2016).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Определение антимикробной активности растительных экстрактов, полученных из интактных растений

Результаты исследования антибактериальной активности экстракта интактного растения шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.) на микроорганизмы видов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* представлены в таблице 3.1.1 и на рисунке 3.1.1.

Таблица 3.1.1

Влияние экстракта интактного растения *S. pratensis* на микроорганизмы

Концентрация экстракта	Диаметры зон задержки роста микроорганизмов, мм	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100%	5,3±2,1	0,0±0,0
1:10	3,8±1,9	0,0±0,0
1:100	0,0±0,0	0,0±0,0
1:1000	0,0±0,0	0,0±0,0
1:1000	0,0±0,0	0,0±0,0
контроль (спирт)	8,0±1,5	0,0±0,0
антибиотик	13,25±0,56	13,29±1,1

По критерию Фишера при уровне значимости $P=0,05$ различия основной группы с контролем (спиртом) при определении влияния экстракта интактного растения *S. pratensis* на *E. coli* и *S. aureus* статистически не достоверны, что показывает отсутствие различий во влиянии экстрактов, их разбавлений и спирта.

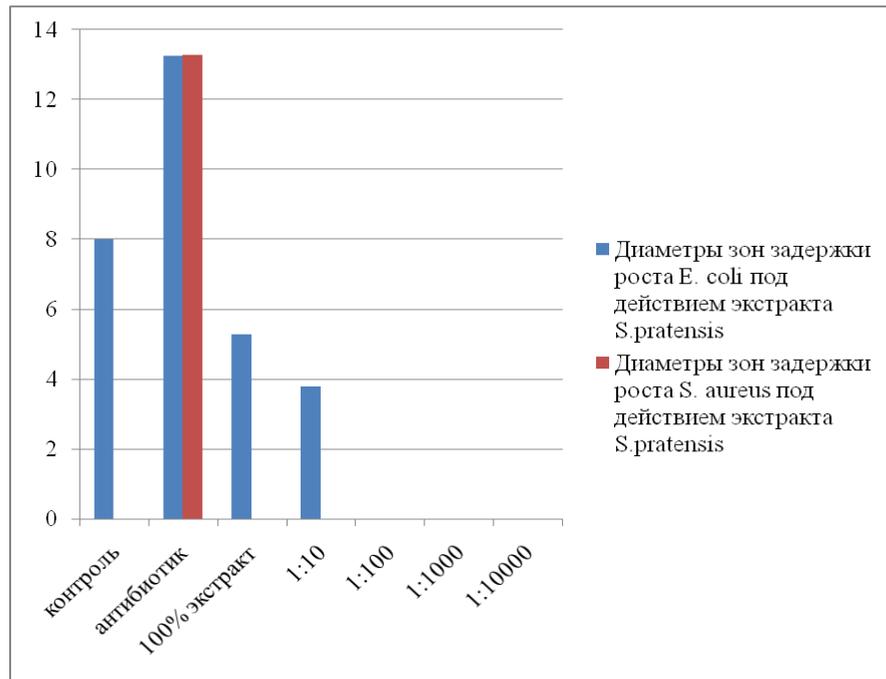


Рис. 3.1.1. Влияние экстракта интактного растения *S. pratensis* на микроорганизмы

Зоны подавления роста микроорганизмов *E. coli* и *S. aureus* под влиянием экстракта интактного растения *S. pratensis* отражены на рис. 3.1.2.

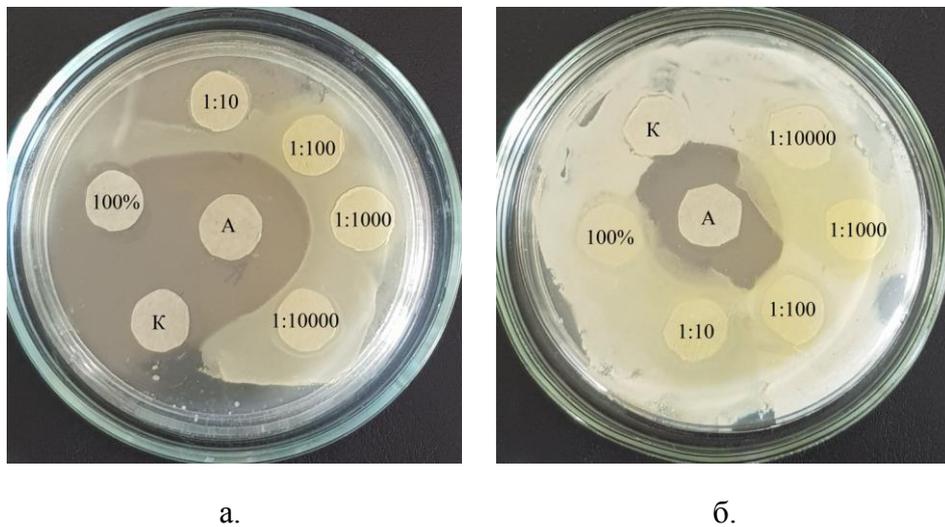


Рис. 3.1.2. Зоны подавления роста микроорганизмов под влиянием экстракта интактного растения *S. pratensis*: а. *E. coli*, б. *S. aureus*

Как видно из таблицы 3.4.1 и рисунков 3.4.1, 3.4.2 экстракт интактного растения *S. pratensis* в концентрации 100% обладает слабой антибактериальной активностью по отношению к *E. coli*. В других случаях антибактериальной активности не наблюдается.

Результаты исследования антибактериальной активности экстракта интактного растения шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.) на микроорганизмы видов *E. coli* и *S. aureus* отражены в таблице 3.1.2 и на рисунке 3.1.3.

Таблица 3.1.2

Влияние экстракта интактного растения *S. officinalis* на микроорганизмы

Концентрация экстракта	Диаметры зон задержки роста микроорганизмов, мм	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100%	4,75±0,4	7,4±1,6
1:10	5,5±0,8	7,0±0,9
1:100	4,0±1,73	4,67±0,83
1:1000	0,0±0,0	4,00±0,97
1:10000	0,0±0,0	0,0±0,0
контроль (спирт)	10,5±1,7	11,88±1,2
антибиотик	13,56±1,50	12,0±0,9

По критерию Фишера при уровне значимости $P=0,05$ различия основной группы с контролем (спиртом) при определении влияния экстракта интактного растения *S. officinalis* на *E. coli* и *S. aureus* статистически не достоверны, что показывает отсутствие различий во влиянии экстрактов, их разбавлений и спирта.

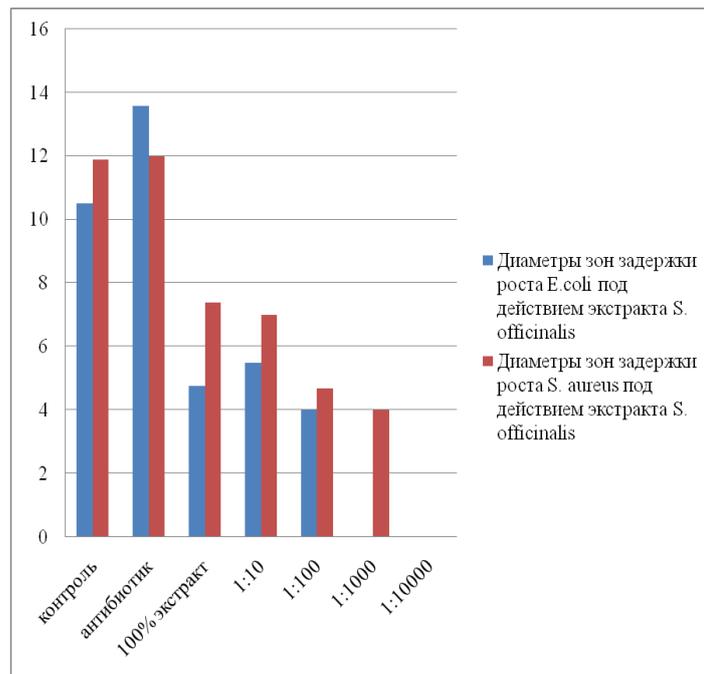


Рис. 3.1.3. Влияние экстракта интактного растения *S. officinalis* на микроорганизмы

Зоны подавления роста микроорганизмов *E. coli* и *S. aureus* под влиянием экстракта интактного растения *S. officinalis* отражены на рис. 3.1.4.

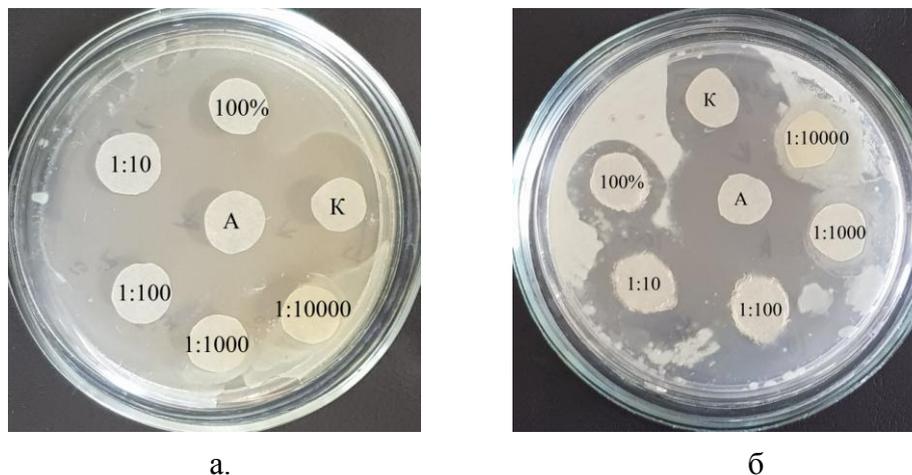


Рис. 3.1.4. Зоны подавления роста микроорганизмов под влиянием экстракта интактного растения *S. officinalis*: а. *E. coli*, б. *S. aureus*

Как видно из таблицы 3.1.2 и рисунков 3.1.3 и 3.1.4 100% экстракт, его разбавление 1:10 и 1:100 интактного растения *S. officinalis* обладают слабой антибактериальной активностью по отношению к *S. aureus* и *E. coli*. Разбавление 1:1000 имеет слабую антибактериальную активность по отношению к *S. aureus*.

Результаты исследования антибактериальной активности экстракта интактного растения иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.) на микроорганизмы видов *E. coli* и *S. aureus* отражены в таблице 3.1.3 и на рисунке 3.1.5.

Таблица 3.1.5

Влияние экстракта интактного растения *H. officinalis* на микроорганизмы

Концентрация экстракта	Диаметры зон задержки роста микроорганизмов, мм	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100%	7,22±1,4	6,5±0,9
1:10	5,13±1,15	6,8±0,7
1:100	3,5±0,8	3,3±0,8
1:1000	0,0±0,0	0,0±0,0
1:10000	0,0±0,0	0,0±0,0
контроль (спирт)	8,3±2,0	6,0±1,4
антибиотик	13,9±0,8	7,8±1,1

По критерию Фишера при уровне значимости $P=0,05$ различия основной группы с контролем (спиртом) при определении влияния экстракта интактного растения *H. officinalis* на *E. coli* и *S. aureus* статистически не достоверны, что показывает отсутствие различий во влиянии экстрактов, их разбавлений и спирта.

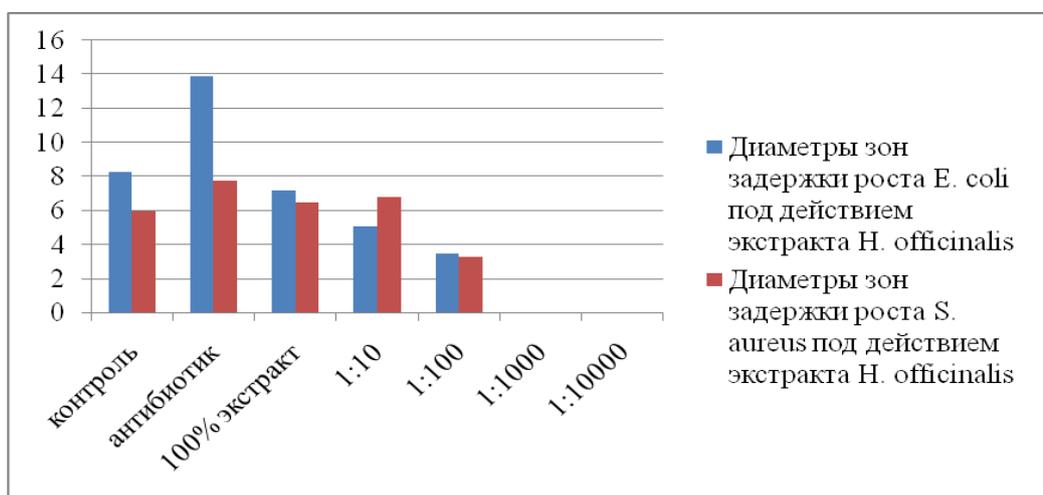


Рис. 3.1.5. Влияние экстракта интактного растения *H. officinalis* на микроорганизмы

Зоны подавления роста микроорганизмов *E. coli* и *S. aureus* под влиянием экстракта интактного растения *H. officinalis* отражены на рис. 3.1.6.

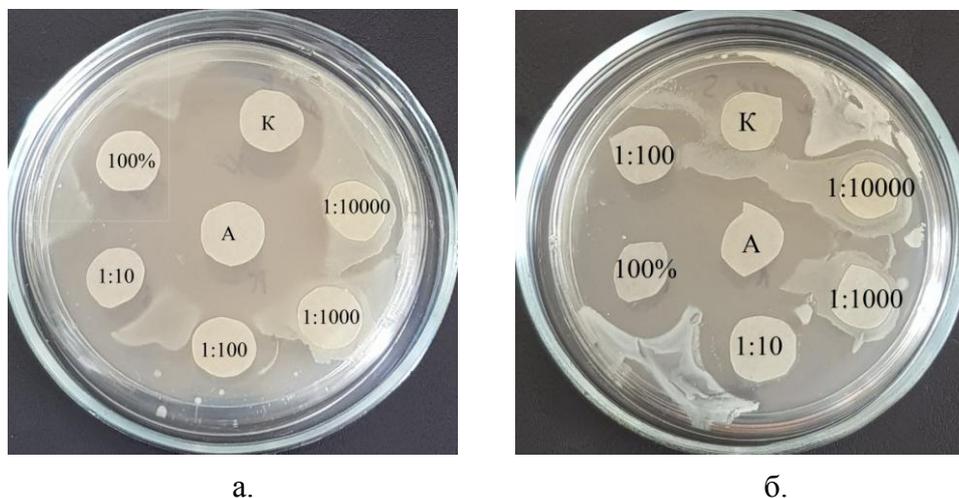


Рис. 3.1.6. Зоны подавления роста микроорганизмов под влиянием экстракта интактного растения *H. officinalis*: а. *E. coli*, б. *S. aureus*

Как видно из таблицы 3.1.3 и рисунков 3.1.5 и 3.1.6 100% экстракт, его разбавление 1:10 и 1:100 интактного растения *H. officinalis* обладают слабой антибактериальной активностью по отношению к *S. aureus* и *E. coli*.

Результаты исследования антибактериальной активности экстракта интактного растения иссопа мелового (*Hyssopus cretaceus* Dubj.) на микроорганизмы видов *E. coli* и *S. aureus* отражены в таблице 3.1.4 и на рисунке 3.1.7.

Таблица 3.1.4

Влияние экстракта интактного растения *H. cretaceus* на микроорганизмы

Концентрация экстракта	Диаметры зон задержки роста микроорганизмов, мм	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100%	4,3±0,6	8,5±1,5
1:10	9,0±1,4	6,67±1,57
1:100	4,67±0,58	3,0±0,5

1:1000	2,0±0,38	0,0±0,0
1:10000	0,0±0,0	0,0±0,0
контроль (спирт)	10,5±0,4	13,75±1,81
антибиотик	12,6±0,7	13,67±2,68

По критерию Фишера при уровне значимости $P=0,05$ различия основной группы с контролем (спиртом) при определении влияния экстракта интактного растения *H. cretaceus* на *E. coli* и *S. aureus* статистически не достоверны, что показывает отсутствие различий во влиянии экстрактов, их разбавлений и спирта.

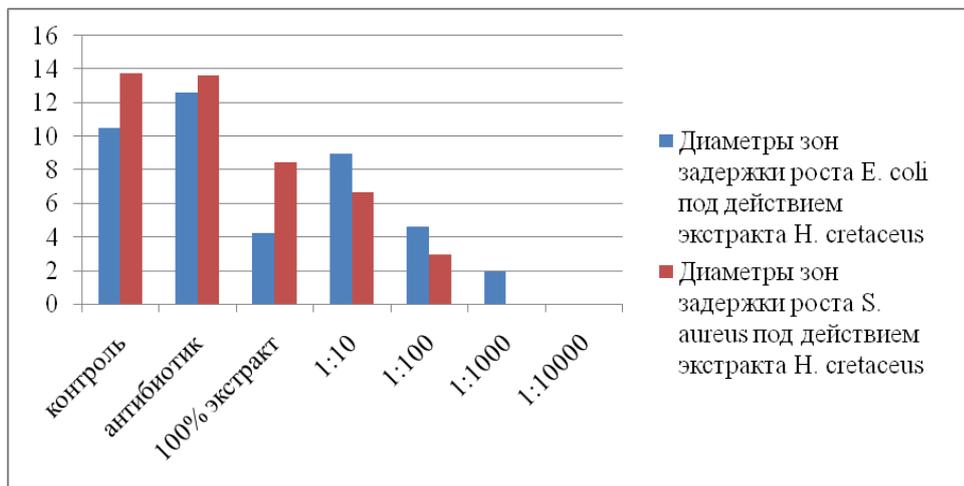


Рис. 3.1.7. Влияние экстракта интактного растения *H. cretaceus* на микроорганизмы

Зоны подавления роста микроорганизмов *E. coli* и *S. aureus* под влиянием экстракта интактного растения *H. cretaceus* отражены на рис. 3.1.8.

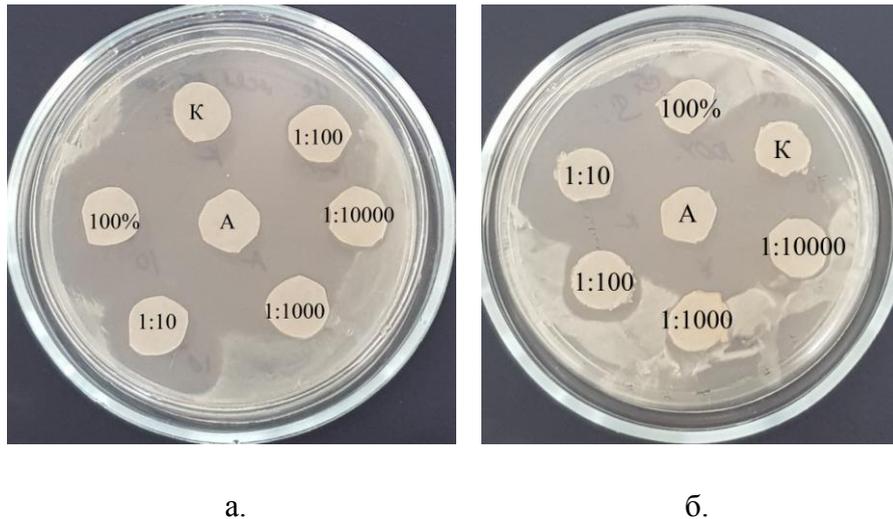


Рис. 3.1.8. Зоны подавления роста микроорганизмов под влиянием экстракта intactного растения *H. cretaceus*: а. *E. coli*, б. *S. aureus*

Как видно из таблицы 3.1.4 и рисунков 3.1.7 и 3.1.8 100% экстракт, его разбавление 1:10 и 1:100 intactного растения *H. cretaceus* обладают слабой антибактериальной активностью по отношению к *S. aureus* и *E. coli*. Разбавление 1:1000 и 1:10000 не обладает антибактериальной активностью по отношению к *S. aureus*. Разбавление 1:1000 обладает очень слабой антибактериальной активностью по отношению к *E. coli*.

Результаты исследования антибактериальной активности экстракта intactного растения пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.) на микроорганизмы видов *E. coli* и *S. aureus* отражены в таблице 3.1.5 и на рисунке 3.1.9.

Таблица 3.1.5

Влияние экстракта intactного растения *C.vulgare* на микроорганизмы

Концентрация экстракта	Диаметры зон задержки роста микроорганизмов, мм	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100%	13,67±0,94	11,0±1,7
1:10	7,3±2,8	5,67±1,13
1:100	4,4±1,0	4,44±0,76

1:1000	0,0±0,0	0,0±0,0
1:10000	0,0±0,0	0,0±0,0
контроль (спирт)	12,0±2,5	17,0±0,8
антибиотик	10,78±1,9	14,33±0,82

По критерию Фишера при уровне значимости $P=0,05$ различия основной группы с контролем (спиртом) при определении влияния экстракта интактного растения *C.vulgare* на *E. coli* и *S. aureus* статистически не достоверны, что показывает отсутствие различий во влиянии экстрактов, их разбавлений и спирта.

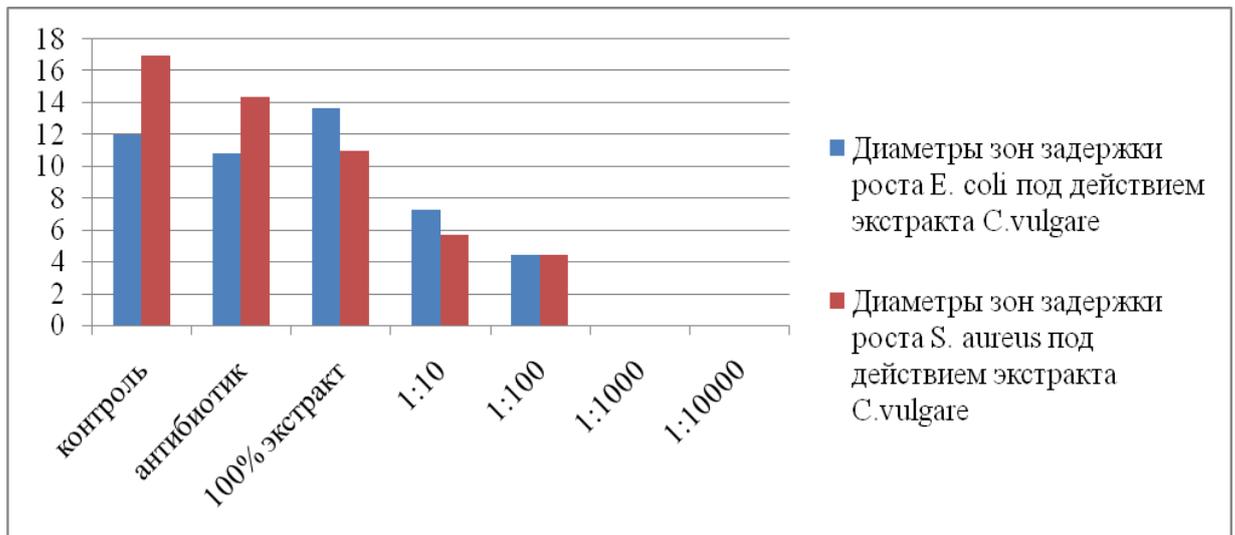


Рис. 3.1.9. Влияние экстракта интактного растения *C.vulgare* на микроорганизмы

Зоны подавления роста микроорганизмов *E. coli* и *S. aureus* под влиянием экстракта интактного растения *C.vulgare* отражены на рис. 3.1.10.

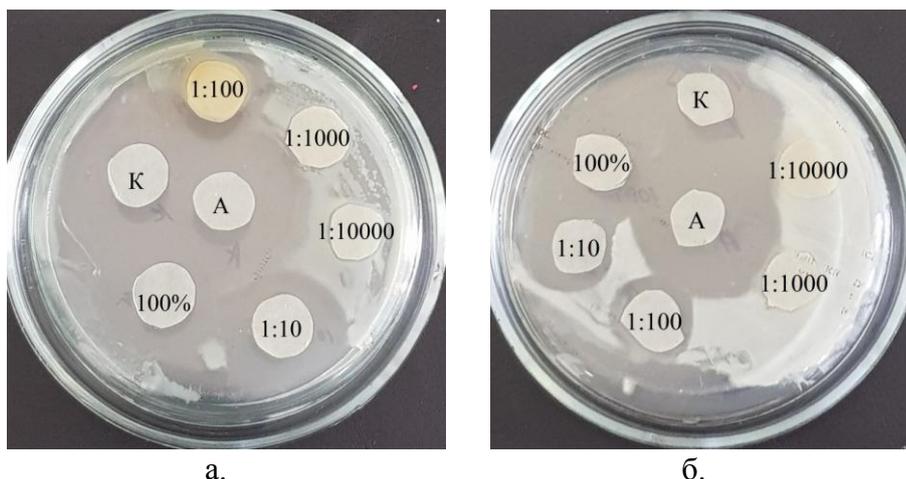


Рис. 3.1.10. Зоны подавления роста микроорганизмов под влиянием экстракта интактного растения *C.vulgare*: а. *E. coli*, б. *S. aureus*

Как видно из таблицы 3.1.5 и рисунков 3.1.9 и 3.1.10 100% экстракт интактного растения *C.vulgare* обладает сильной антибактериальной активностью по отношению к *S. aureus* и *E. coli*, разбавления экстракта 1:10 и 1:100 обладают слабой антибактериальной активностью по отношению к этим культурам микроорганизмов.

Результаты исследования антибактериальной активности экстракта интактного растения мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.) на микроорганизмы видов *E. coli* и *S. aureus* отражены в таблице 3.1.6 и на рисунке 3.1.11.

Таблица 3.1.6

Влияние экстракта интактного растения *M. longifolia* на микроорганизмы

Концентрация экстракта	Диаметры зон задержки роста микроорганизмов, мм	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100%	3,67±1,3	2,3±0,5
1:10	0,0±0,0	0,0±0,0
1:100	0,0±0,0	0,0±0,0
1:1000	0,0±0,0	0,0±0,0
1:10000	0,0±0,0	0,0±0,0

контроль (спирт)	9,0±0,9	10,0±1,5
антибиотик	10,8±1,3	13,4±0,9

По критерию Фишера при уровне значимости $P=0,05$ различия основной группы с контролем (спиртом) при определении влияния экстракта интактного растения *M. longifolia* на *E. coli* и *S. aureus* статистически не достоверны, что показывает отсутствие различий во влиянии экстрактов, их разбавлений и спирта.

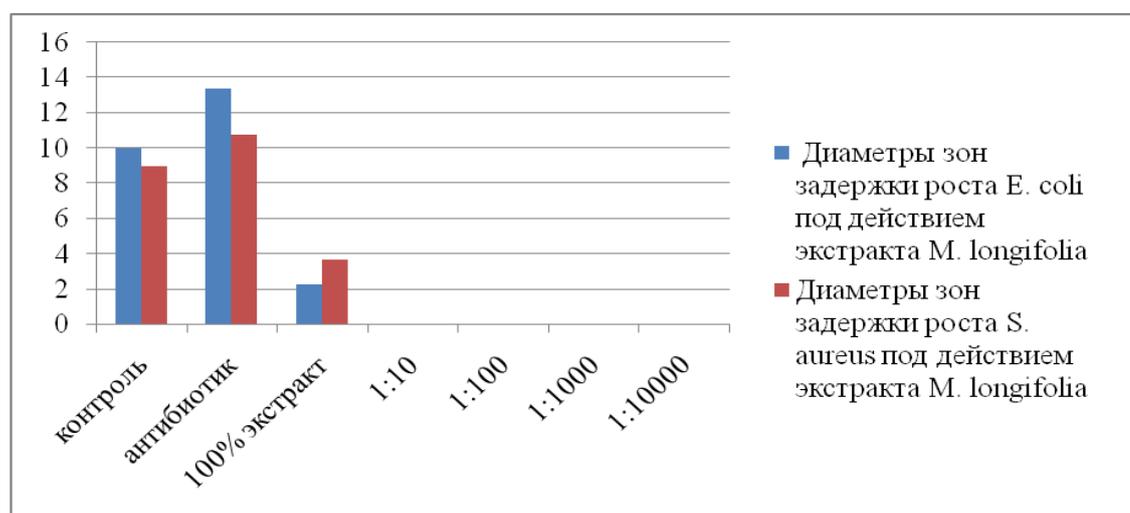


Рис. 3.1.11. Влияние экстракта интактного растения *M. longifolia* на микроорганизмы

Зоны подавления роста микроорганизмов *E. coli* и *S. aureus* под влиянием экстракта интактного растения *M. longifolia* отражены на рис. 3.1.12.

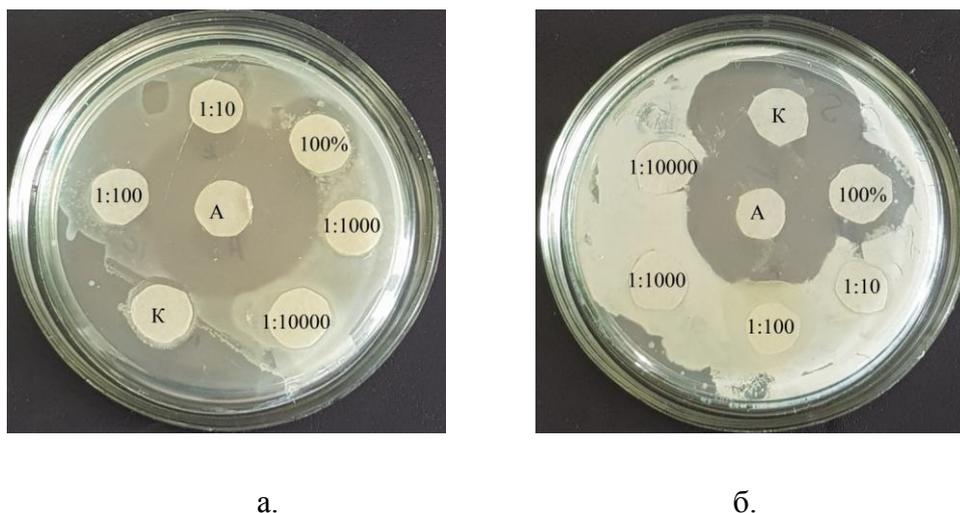


Рис. 3.1.12. Зоны подавления роста микроорганизмов под влиянием экстракта интактного растения *M. longifolia*: а. *E. coli*, б. *S. aureus*

Как видно из таблицы 3.1.6 и рисунков 3.1.11 и 3.1.12 100% экстракт интактного растения *M. longifolia* обладает очень слабой антибактериальной активностью по отношению к *S. aureus* и *E. coli*, разбавления экстракта не подавляют рост этих культур микроорганизмов.

Таким образом, в ходе исследований было определено, что наибольшим антимикробным действием из изучаемых видов обладает экстракт интактного растения *C. vulgare*.

3.2. Подбор оптимальных стерилизующих агентов для введения растительных эксплантов в культуру *in vitro*

В ходе работы сравнивалась антибактериальная активность интактных растений с антибактериальной активностью каллусных культур. Для получения каллусных культур необходимо было получить асептическую изолированную культуру *in vitro* (в пробирке). С этой целью исследовалась эффективность разных режимов стерилизации на растительные экспланты, в качестве которых

были взяты семена шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.), пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.) и мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.)

Влияние режимов стерилизации на получение асептических и жизнеспособных эксплантов (семян) вида *S. pratensis* отражено в таблице 3.2.1 и рисунке 3.2.1.

Таблица 3.2.1

Влияние режимов стерилизации на экспланты (семена) вида *S. pratensis*

Стерилизующий агент, его концентрация в растворе и время стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
Лизоформин 3000 (3%), 10 минут	60,00±1,83	16,67±1,05
Лизоформин 3000 (3%), 20 минут	96,67±1,05	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (3%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5%), 10 минут	61,67±1,39	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5%), 20 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5%), 30 минут	96,67±1,05	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 10 минут	96,67±1,05	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 20 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Биоцид (3%), 10 минут	80,0±0,9	43,3±1,0
Биоцид (3%), 20 минут	96,67±1,05	20,0±1,8
Биоцид (3%), 30 минут	100,0±0,0	20,0±1,8
Биоцид (5%), 10 минут	96,67±1,05	20,0±1,8
Биоцид (5%), 20 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Биоцид (5%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Биоцид (10%), 10 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Биоцид (10%), 20 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Биоцид (10%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (5-15%), 10 минут	96,67±1,05	20,0±1,8
Гипохлорит натрия (5-15%), 20 минут	100,0±0,0	20,0±1,8

Гипохлорит натрия (5-15%), 30 минут	96,67±1,05	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 10 минут	81,67±0,53	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 20 минут	96,67±1,05	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Хлорамин Б (5%), 10 минут	96,67±1,05	20,00±0,35
Хлорамин Б (5%), 20 минут	100,0±0,0	20,00±0,35
Хлорамин Б (5%), 30 минут	96,67±1,05	20,00±0,35
Хлорамин Б (10%), 10 минут	100,0±0,0	30,00±0,37
Хлорамин Б (10%), 20 минут	100,0±0,0	20,00±0,35
Хлорамин Б (10%), 30 минут	96,67±1,05	20,00±0,35
Нитрат серебра (0,1%), 10 минут	96,67±1,05	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 20 минут	96,67±1,05	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 30 минут	96,67±1,05	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 10 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 20 минут	96,67±1,05	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Контроль (дистиллированная вода), 30 минут	6,67±1,05	0,0±0,0

По точному критерию Фишера при уровне значимости $P > 0,05$ по своему влиянию на количество стерильных эксплантов все полученные данные, представленные в таблице 3.1, достоверно отличаются от контроля, по своему влиянию на количество жизнеспособных эксплантов достоверное отличие от контроля наблюдается только при стерилизации лизоформином 3000 (3%) 10 минут; биоцидом (3%) 10, 20 и 30 минут; биоцидом (5%) 10 минут; гипохлоритом натрия (5-15%) 10 и 20 минут; хлорамином Б (5%) 10, 20 и 30 минут; хлорамином Б (10%) 10, 20 и 30 минут.

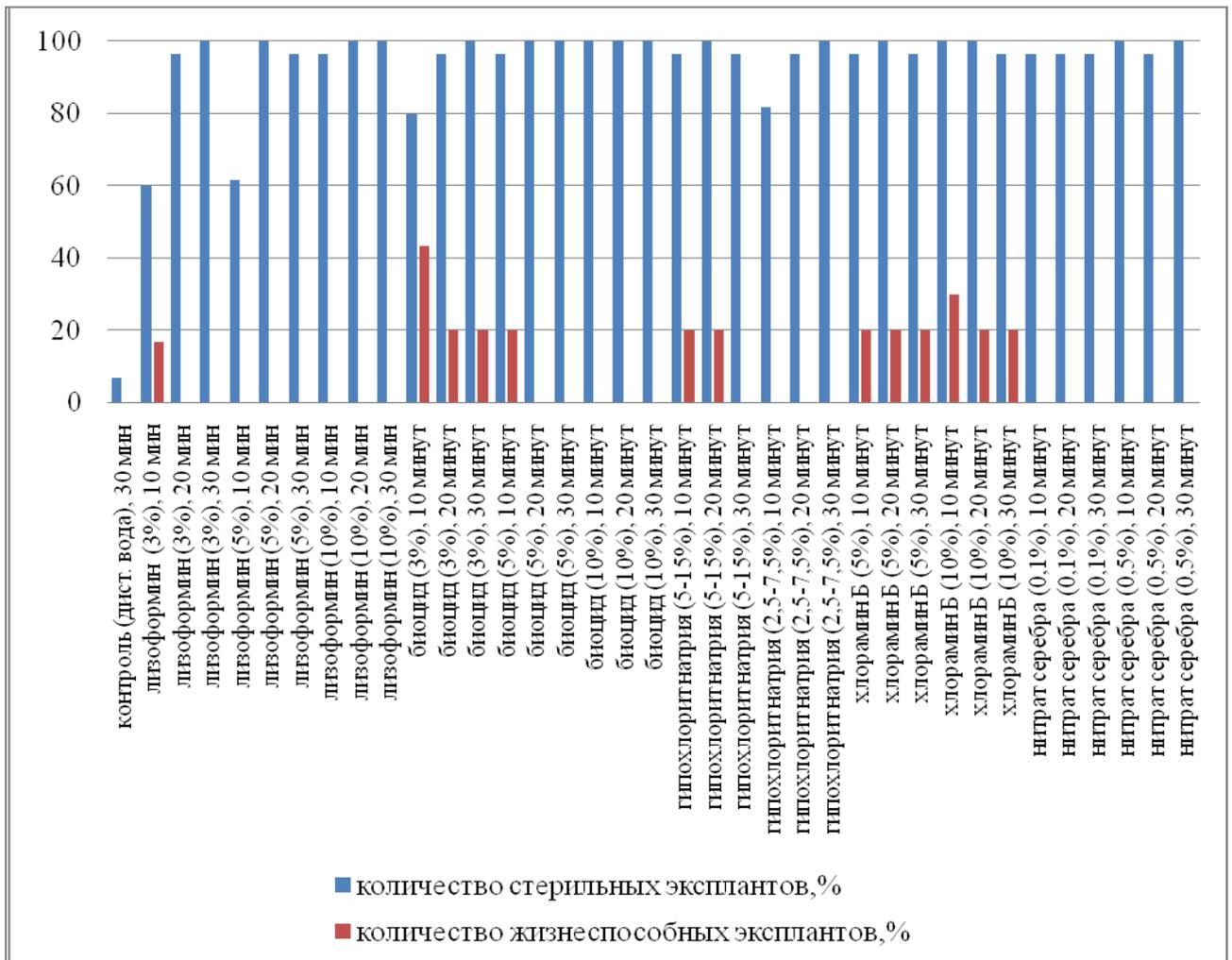


Рис. 3.2.1. Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных и жизнеспособных эксплантов вида *S. pratensis*

Как видно из таблицы 3.2.1 и рисунка 3.2.1 оптимальными стерилизующими агентами для семян вида *S. pratensis* являются 3%-ный

раствор биоцида при его действии в течение 10 минут и 10%-ный раствор хлорамина Б при его действии в течение 10 минут.

Влияние режимов стерилизации на получение асептических и жизнеспособных эксплантов (семян) вида *C. vulgare* отражено в таблице 3.2.2 и рисунке 3.2.2.

Таблица 3.2.2

Влияние режимов стерилизации на экспланты (семена) вида *C. vulgare*

Стерилизующий агент, его концентрация в растворе и время стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
Лизоформин 3000 (3%), 10 минут	85,67±0,21	58,33±0,28
Лизоформин 3000 (3%), 20 минут	86,0±0,32	17,3±0,6
Лизоформин 3000 (3%), 30 минут	85,67±0,21	43,0±0,2
Лизоформин 3000 (5%), 10 минут	99,33±0,21	28,67±0,0
Лизоформин 3000 (5%), 20 минут	100,0±0,0	21,0±0,2
Лизоформин 3000 (5%), 30 минут	100,0±0,0	21,0±0,2
Лизоформин 3000 (10%), 10 минут	100,0±0,0	57,0±0,4
Лизоформин 3000 (10%), 20 минут	73,67±1,05	15,3±0,2
Лизоформин 3000 (10%), 30 минут	99,33±0,21	15,3±0,2
Биоцид (3%), 10 минут	100,0±0,0	28,67±0,56
Биоцид (3%), 20 минут	99,3±0,2	42,3±0,1
Биоцид (3%), 30 минут	100,0±0,0	28,67±0,21
Биоцид (5%), 10 минут	100,0±0,0	29,3±0,4
Биоцид (5%), 20 минут	100,0±0,0	28,67±0,21
Биоцид (5%), 30 минут	100,0±0,0	28,3±0,3
Биоцид (10%), 10 минут	86,0±0,32	27,0±0,5
Биоцид (10%), 20 минут	100,0±0,0	27,0±0,5
Биоцид (10%), 30 минут	100,0±0,0	44,0±0,2
Гипохлорит натрия (5-15%), 10 минут	99,3±0,2	57,33±0,46
Гипохлорит натрия (5-15%), 20 минут	100,0±0,0	51,3±0,6

Продолжение таблицы 3.2.2

Гипохлорит натрия (5-15%), 30 минут	100,0±0,0	99,3±0,2
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 10 минут	99,33±0,21	42,0±0,2
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 20 минут	100,0±0,0	41,3±0,1
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 30 минут	100,0±0,0	49,0±0,2
Хлорамин Б (5%), 10 минут	96,67±1,05	42,0±0,2
Хлорамин Б (5%), 20 минут	100,0±0,0	42,0±0,2
Хлорамин Б (5%), 30 минут	100,0±0,0	17,3±0,5
Хлорамин Б (10%), 10 минут	100,0±0,0	80,3±0,1
Хлорамин Б (10%), 20 минут	100,0±0,0	56,3±0,7
Хлорамин Б (10%), 30 минут	100,0±0,0	16,67±0,11
Нитрат серебра (0,1%), 10 минут	99,33±0,21	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 20 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 30 минут	43,3±0,6	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 10 минут	100,0±0,0	20,3±0,1
Нитрат серебра (0,5%), 20 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Контроль (дистиллированная вода), 30 минут	5,29±0,97	0,0±0,0

По точному критерию Фишера при уровне значимости $P > 0,05$ по своему влиянию на количество стерильных эксплантов все полученные данные, представленные в таблице 3.2.2, достоверно отличаются от контроля, по своему влиянию на количество жизнеспособных эксплантов достоверное отличие от контроля не наблюдается только при стерилизации нитратом серебра (0,1%) 10, 20 и 30 минут и нитратом серебра (0,5%) 20 и 30 минут.

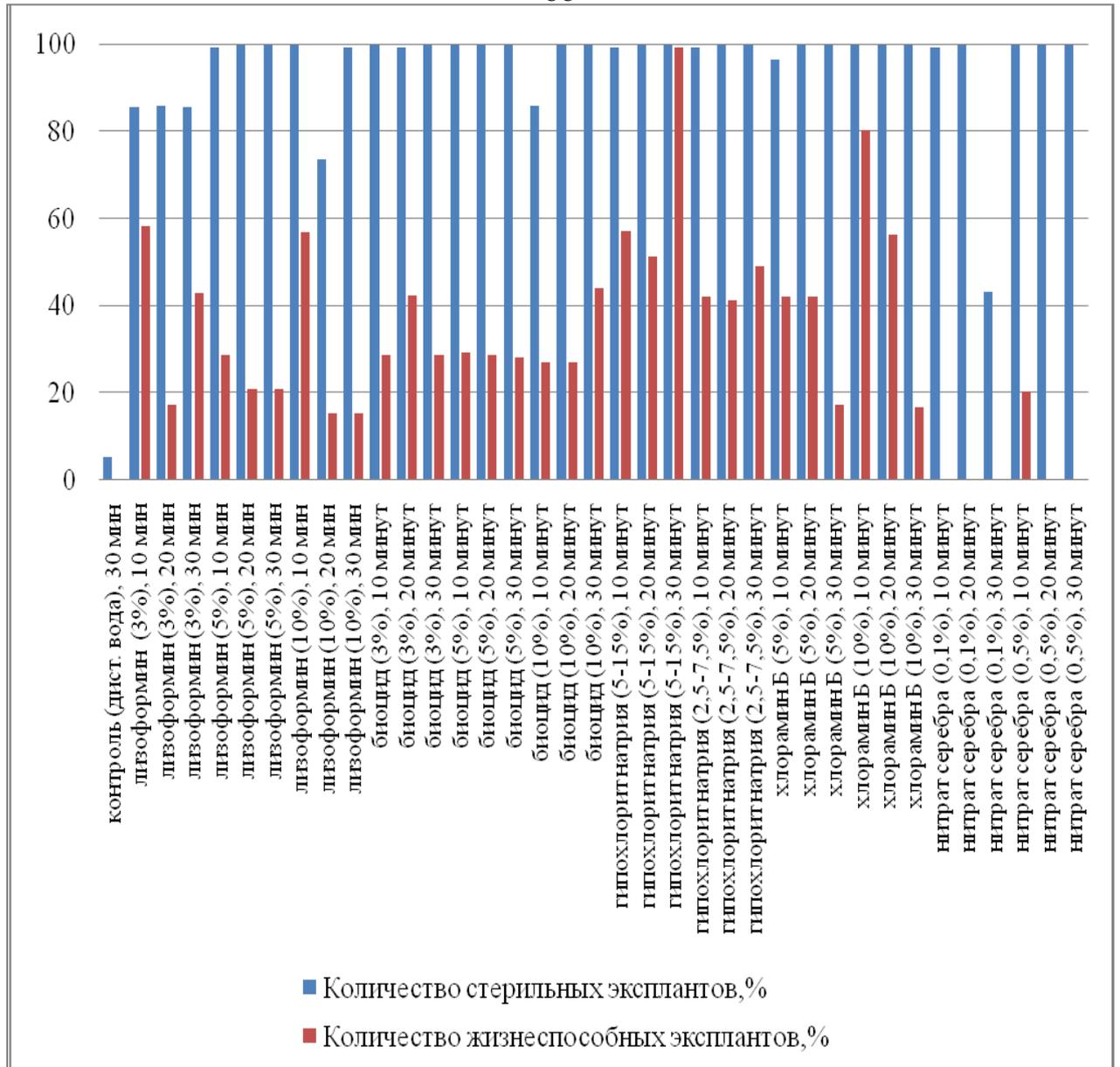


Рис. 3.2.2. Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных и жизнеспособных эксплантов вида *C. vulgare*

Как видно из таблицы 3.2.2 и рисунка 3.2.2 оптимальными стерилизующими агентами для семян *C. vulgare* являются 5-15%-ный раствор гипохлорита натрия при его действии в течение 30 минут и 10%-ный раствор хлорамина Б при его действии в течение 10 минут.

Влияние режимов стерилизации на получение асептических и жизнеспособных эксплантов (семян) вида *M. longifolia* отражено в таблице 3.2.3 и рисунке 3.2.3.

Влияние режимов стерилизации на экспланты (семена) вида *M. longifolia*

Стерилизующий агент, его концентрация в растворе и время стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
Лизоформин 3000 (3%), 10 минут	100,0±0,0	28,3±0,3
Лизоформин 3000 (3%), 20 минут	99,33±0,21	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (3%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5%), 10 минут	100,0±0,0	15,33±0,28
Лизоформин 3000 (5%), 20 минут	100,0±0,0	15,67±0,38
Лизоформин 3000 (5%), 30 минут	100,0±0,0	15,0±0,2
Лизоформин 3000 (10%), 10 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 20 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Биоцид (3%), 10 минут	98,67±0,11	28,67±0,21
Биоцид (3%), 20 минут	100,0±0,0	16,0±0,2
Биоцид (3%), 30 минут	100,0±0,0	16,0±0,2
Биоцид (5%), 10 минут	100,0±0,0	15,67±0,2
Биоцид (5%), 20 минут	100,0±0,0	57,3±2,3
Биоцид (5%), 30 минут	100,0±0,0	27,67±0,1
Биоцид (10%), 10 минут	100,0±0,0	15,67±0,21
Биоцид (10%), 20 минут	100,0±0,0	29,0±0,2
Биоцид (10%), 30 минут	100,0±0,0	29,67±0,28
Гипохлорит натрия (5-15%), 10 минут	98,0±0,2	95,3±0,1
Гипохлорит натрия (5-15%), 20 минут	100,0±0,0	71,0±0,2
Гипохлорит натрия (5-15%), 30 минут	100,0±0,0	59,7±0,1
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 10 минут	100,0±0,0	44,0±0,2
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 20 минут	100,0±0,0	41,3±0,1
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 30 минут	100,0±0,0	28,3±0,1
Хлорамин Б (5%), 10 минут	100,0±0,0	15,33±0,28
Хлорамин Б (5%), 20 минут	100,0±0,0	70,67±0,11

Продолжение таблицы 3.2.3

Хлорамин Б (5%), 30 минут	100,0±0,0	70,67±0,11
Хлорамин Б (10%), 10 минут	100,0±0,0	42,67±0,1
Хлорамин Б (10%), 20 минут	100,0±0,0	14,33±0,1
Хлорамин Б (10%), 30 минут	100,0±0,0	14,33±0,1
Нитрат серебра (0,1%), 10 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 20 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 10 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 20 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Контроль (дистиллированная вода), 30 минут	8,0±0,5	0,0±0,0

По точному критерию Фишера при уровне значимости $P > 0,05$ по своему влиянию на количество стерильных эксплантов все полученные данные, представленные в таблице 3.2.3, достоверно отличаются от контроля, по своему влиянию на количество жизнеспособных эксплантов достоверное отличие от контроля не наблюдается только при стерилизации лизоформином 3000 (3%) 20 и 30 минут; лизоформином 3000 (10%) 10, 20 и 30 минут; нитратом серебра (0,1%) 10, 20 и 30 минут и нитратом серебра (0,5%) 10, 20 и 30 минут.

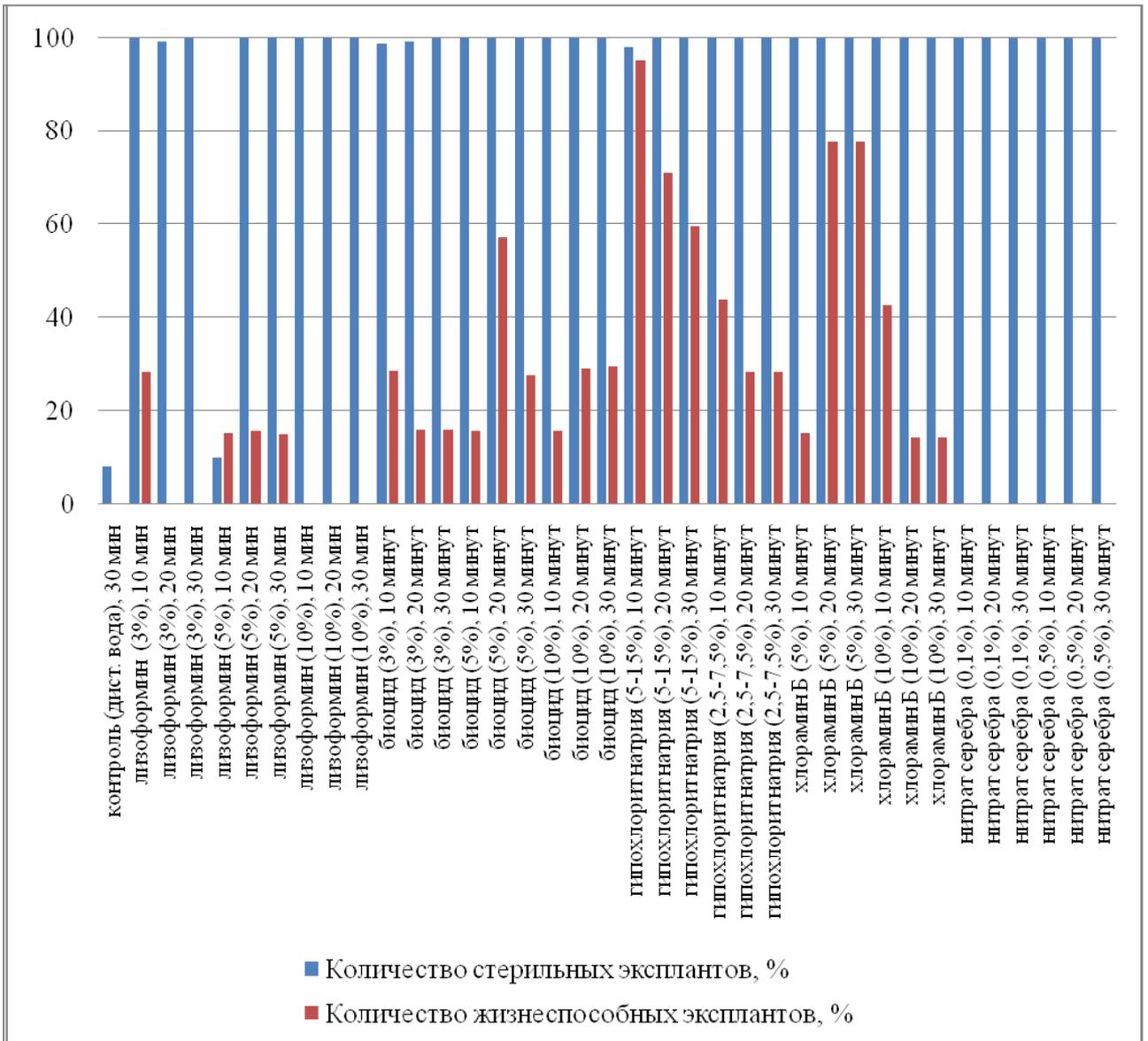


Рис. 3.2.3. Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных и жизнеспособных эксплантов вида *M. longifolia*

Как видно из таблицы 3.2.3 и рисунка 3.2.3 оптимальными стерилизующими агентами для семян *M. longifolia* являются 5-15%-ный раствор гипохлорита натрия при его действии в течение 10 минут и 5%-ный раствор хлорамина Б при его действии в течение 20 и 30 минут.

Влияние режимов стерилизации на получение асептических и жизнеспособных эксплантов (семян) вида *H. officinalis* отражено в таблице 3.2.4 и рисунке 3.2.4.

Влияние режимов стерилизации на экспланты (семена) вида *H. officinalis*

Стерилизующий агент, его концентрация в растворе и время стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
Лизоформин 3000 (3%), 10 минут	99,67±0,11	14,67±0,11
Лизоформин 3000 (3%), 20 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (3%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5%), 10 минут	100,0±0,0	59,67±0,11
Лизоформин 3000 (5%), 20 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 10 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 20 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Биоцид (3%), 10 минут	100,0±0,0	21,0±0,2
Биоцид (3%), 20 минут	100,0±0,0	40,33±0,11
Биоцид (3%), 30 минут	100,0±0,0	86,0±0,2
Биоцид (5%), 10 минут	100,0±0,0	40,33±0,11
Биоцид (5%), 20 минут	100,0±0,0	57,3±2,3
Биоцид (5%), 30 минут	100,0±0,0	41,0±0,2
Биоцид (10%), 10 минут	98,0±0,2	0,0±0,0
Биоцид (10%), 20 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Биоцид (10%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (5-15%), 10 минут	100,0±0,0	100,0±0,0
Гипохлорит натрия (5-15%), 20 минут	100,0±0,0	60,67±0,21
Гипохлорит натрия (5-15%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 10 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 20 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Хлорамин Б (5%), 10 минут	100,0±0,0	20,33±0,11
Хлорамин Б (5%), 20 минут	100,0±0,0	60,67±0,21

Продолжение таблицы 3.2.4

Хлорамин Б (5%), 30 минут	100,0±0,0	60,67±0,21
Хлорамин Б (10%), 10 минут	100,0±0,0	100,0±0,0
Хлорамин Б (10%), 20 минут	100,0±0,0	60,67±0,21
Хлорамин Б (10%), 30 минут	100,0±0,0	41,0±0,2
Нитрат серебра (0,1%), 10 минут	100,0±0,0	80,33±0,11
Нитрат серебра (0,1%), 20 минут	100,0±0,0	41,0±0,2
Нитрат серебра (0,1%), 30 минут	100,0±0,0	14,67±0,11
Нитрат серебра (0,5%), 10 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 20 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 30 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Контроль (дистиллированная вода), 30 минут	6,0±0,2	0,0±0,0

По точному критерию Фишера при уровне значимости $P > 0,05$ по своему влиянию на количество стерильных эксплантов все полученные данные, представленные в таблице 3.2.4, достоверно отличаются от контроля, по своему влиянию на количество жизнеспособных эксплантов достоверное отличие от контроля не наблюдается только при стерилизации лизоформином 3000 (3%) 20 и 30 минут; лизоформином 3000 (5%) 20 и 30 минут; лизоформином 3000 (10%) 10, 20 и 30 минут; биоцидом (10%) 10, 20 и 30 минут; гипохлоритом натрия (5-15%) 30 минут; гипохлоритом натрия (2,5-7,5%) 10, 20 и 30 минут; нитратом серебра (0,5%) 10, 20 и 30 минут.

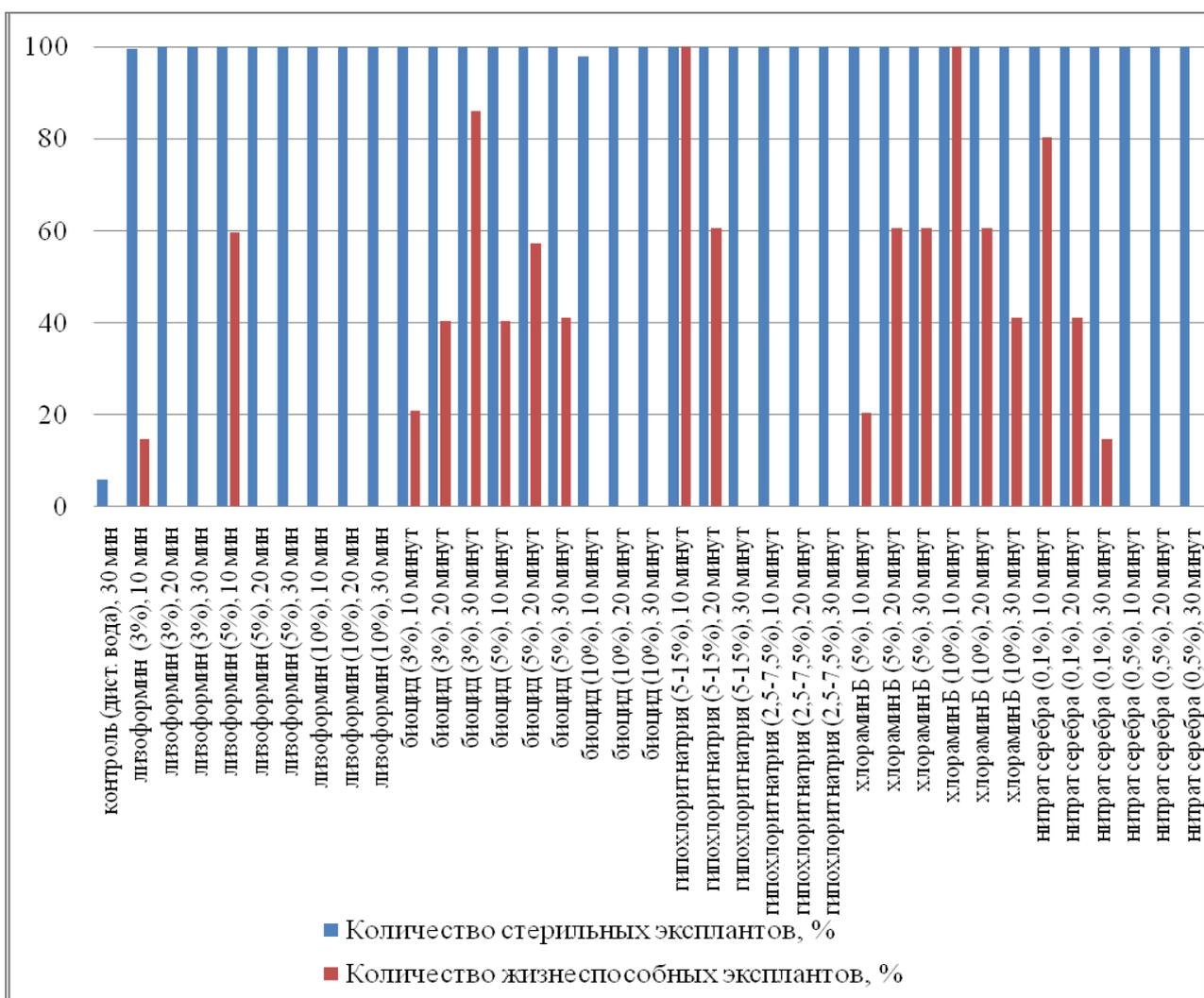


Рис. 3.2.4. Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных и жизнеспособных эксплантов вида *H. officinalis*

Как видно из таблицы 3.2.4 и рисунка 3.2.4 оптимальными стерилизующими агентами для семян *H. officinalis* являются 5-15%-ный раствор гипохлорита натрия при его действии в течение 10 минут и 10%-ный раствор хлорамина Б при его действии в течение 10 минут.

Исследовалась эффективность разных режимов стерилизации на растительные экспланты, в качестве которых были взяты листовые пластинки шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), иссопа лекарственного (*H. officinalis*), иссопа мелового (*Hyssopus cretaceus* Dubj.), мяты длиннолистной (*M. longifolia*).

Влияние режимов стерилизации на получение асептических эксплантов и эксплантов (листовых пластинок) с индукцией каллусогенеза вида *S. officinalis* отражено в таблице 3.2.5 и рисунке 3.2.5.

Таблица 3.2.5

Влияние режимов стерилизации на экспланты (листовые пластинки) вида *S. officinalis*

Стерилизующий агент, его концентрация в растворе и время стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество эксплантов с индукцией каллусогенеза, %
Лизоформин 3000 (3%), 5 минут	61,0±0,2	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (3%), 10 минут	83,0±0,5	17,67±0,46
Лизоформин 3000 (3%), 15 минут	87,33±0,45	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5%), 5 минут	57,33±0,46	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5%), 10 минут	58,0±0,5	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5%), 15 минут	85,67±0,94	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 5 минут	91,0±0,2	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 10 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 15 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Биоцид (3%), 5 минут	53,0±1,0	0,0±0,0
Биоцид (3%), 10 минут	52,67±0,94	0,0±0,0
Биоцид (3%), 15 минут	58,33±0,69	0,0±0,0
Биоцид (5%), 5 минут	69,3±0,1	0,0±0,0
Биоцид (5%), 10 минут	72,67±0,38	0,0±0,0
Биоцид (5%), 15 минут	74,33±0,90	0,0±0,0
Биоцид (10%), 5 минут	70,67±0,28	0,0±0,0
Биоцид (10%), 10 минут	80,0±1,3	0,0±0,0
Биоцид (10%), 15 минут	83,0±0,5	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (5-15%), 5 минут	40,33±0,11	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (5-15%), 10 минут	74,0±0,2	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (5-15%), 15 минут	81,67±0,3	13,33±0,2

Продолжение таблицы 3.2.5

Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 5 минут	41,67±0,38	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 10 минут	43,67±0,58	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 15 минут	45,33±0,91	0,0±0,0
Хлорамин Б (5%), 5 минут	20,0±0,2	0,0±0,0
Хлорамин Б (5%), 10 минут	21,67±0,56	0,0±0,0
Хлорамин Б (5%), 15 минут	25,33±0,82	0,0±0,0
Хлорамин Б (10%), 5 минут	41,0±0,4	0,0±0,0
Хлорамин Б (10%), 10 минут	46,67±0,64	0,0±0,0
Хлорамин Б (10%), 15 минут	53,33±0,56	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 5 минут	32,33±0,21	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 10 минут	62,33±0,59	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 15 минут	77,67±0,46	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 5 минут	50,0±0,9	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 10 минут	66,33±0,28	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 15 минут	85,33±0,82	0,0±0,0
Контроль (дистиллированная вода), 30 минут	0,0±0,0	0,0±0,0

По точному критерию Фишера при уровне значимости $P > 0,05$ по своему влиянию на количество стерильных эксплантов все полученные данные, представленные в таблице 3.2.5, достоверно отличаются от контроля, по своему влиянию на количество жизнеспособных эксплантов достоверное отличие от контроля наблюдается только при стерилизации лизоформином 3000 (3%) 10 минут; гипохлоритом натрия (5-15%) 15 минут.

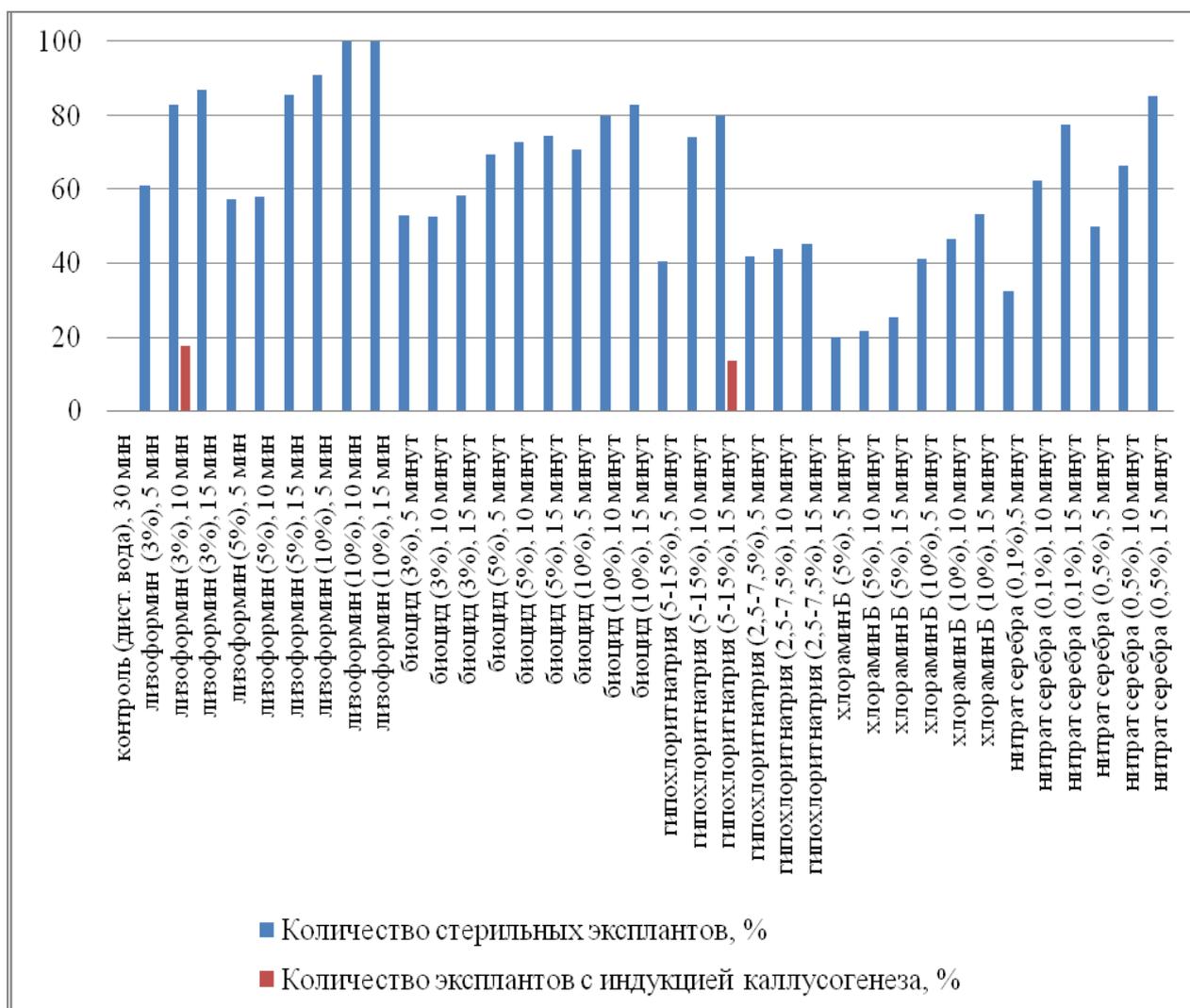


Рис. 3.2.5. Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов и индукцию каллусогенеза у вида *S. officinalis*

Как видно из таблицы 3.2.5 и рисунка 3.2.5 оптимальными стерилизующими агентами для листовых пластинок *S. officinalis* являются 3%-ный раствор лизоформина 3000 при его действии в течение 10 минут и 5-15%-ный раствор гипохлорита натрия при его действии в течение 15 минут.

Влияние режимов стерилизации на получение асептических эксплантов и эксплантов (листовых пластинок) с индукцией каллусогенеза вида *H. cretaceus* отражено в таблице 3.2.6 и рисунке 3.2.6.

Влияние режимов стерилизации на экспланты (листовые пластинки) вида *H. cretaceus*

Стерилизующий агент, его концентрация в растворе и время стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество эксплантов с индукцией каллусогенеза, %
Лизоформин 3000 (3%), 5 минут	65,67±0,28	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (3%), 10 минут	67,0±0,2	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (3%), 15 минут	71,33±0,76	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5%), 5 минут	70,67±0,56	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5%), 10 минут	73,0±0,5	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5%), 15 минут	77,67±1,01	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 5 минут	74,33±0,74	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 10 минут	78,67±0,64	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 15 минут	85,67±0,74	0,0±0,0
Биоцид (3%), 5 минут	68,33±0,64	0,0±0,0
Биоцид (3%), 10 минут	69,33±0,69	0,0±0,0
Биоцид (3%), 15 минут	73,0±0,48	0,0±0,0
Биоцид (5%), 5 минут	71,0±0,2	0,0±0,0
Биоцид (5%), 10 минут	72,67±0,38	0,0±0,0
Биоцид (5%), 15 минут	77,0±0,8	0,0±0,0
Биоцид (10%), 5 минут	81,0±0,2	0,0±0,0
Биоцид (10%), 10 минут	84,0±0,8	0,0±0,0
Биоцид (10%), 15 минут	86,0±0,7	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (5-15%), 5 минут	81,67±0,64	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (5-15%), 10 минут	100,0±0,0	15,0±0,6
Гипохлорит натрия (5-15%), 15 минут	100,0±0,0	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 5 минут	67,33±0,46	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 10 минут	70,0±0,2	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 15 минут	75,0±0,7	0,0±0,0

Продолжение таблицы 3.2.6

Хлорамин Б (5%), 5 минут	36,0±0,7	0,0±0,0
Хлорамин Б (5%), 10 минут	41,33±0,59	0,0±0,0
Хлорамин Б (5%), 15 минут	44,67±0,3	0,0±0,0
Хлорамин Б (10%), 5 минут	50,33±0,28	0,0±0,0
Хлорамин Б (10%), 10 минут	52,33±0,46	0,0±0,0
Хлорамин Б (10%), 15 минут	58,0±0,5	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 5 минут	18,0±0,5	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 10 минут	23,67±0,59	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 15 минут	28,33±0,33	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 5 минут	42,0±0,5	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 10 минут	52,33±0,46	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 15 минут	62,0±0,8	0,0±0,0
Контроль (дистиллированная вода), 30 минут	0,0±0,0	0,0±0,0

По точному критерию Фишера при уровне значимости $P > 0,05$ по своему влиянию на количество стерильных эксплантов все полученные данные, представленные в таблице 3.2.6, достоверно отличаются от контроля, по своему влиянию на количество жизнеспособных эксплантов достоверное отличие от контроля наблюдается только при стерилизации гипохлоритом натрия (5-15%) 10 минут.

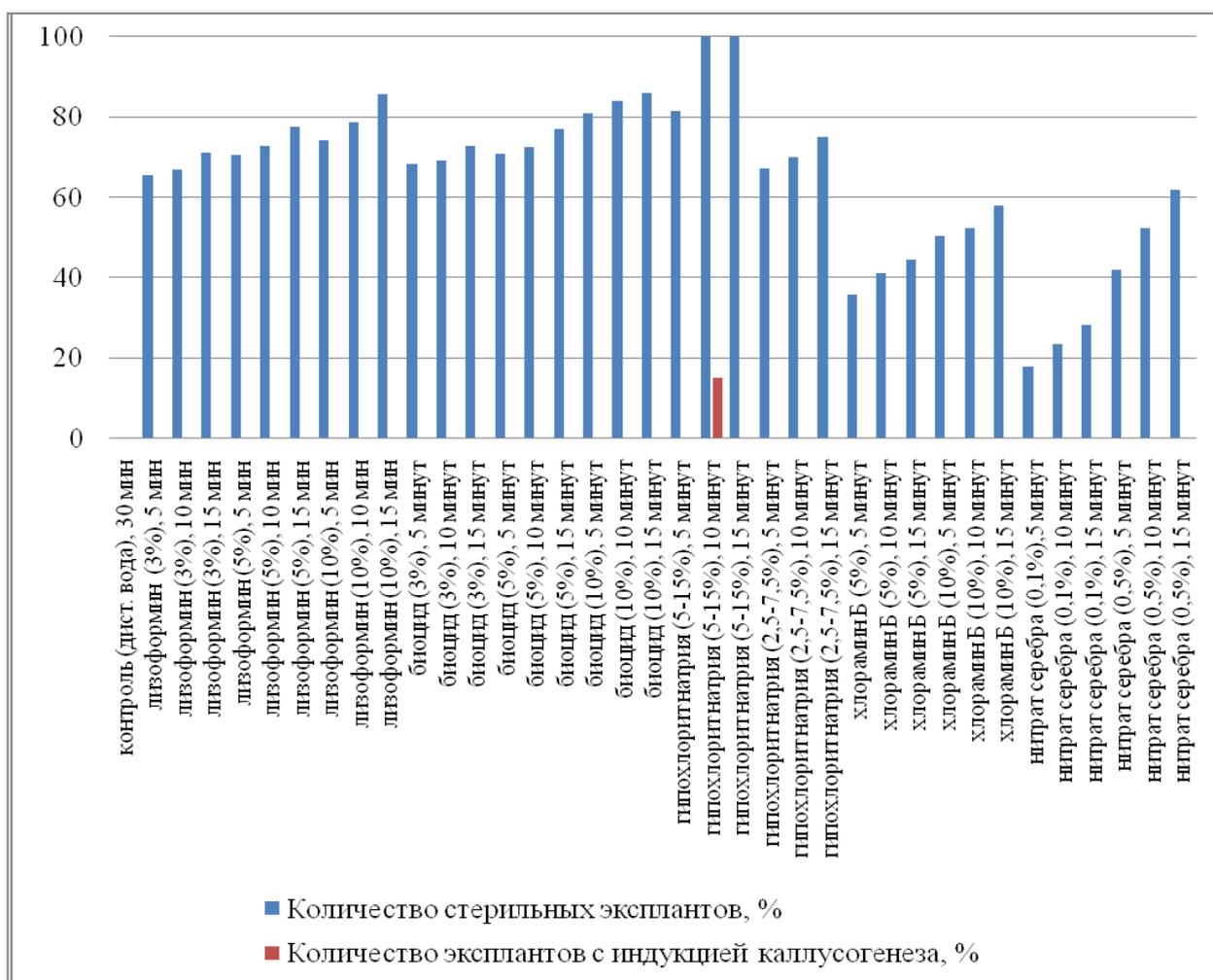


Рис. 3.2.6. Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов и индукцию каллусогенеза у вида *H. cretaceus*

Как видно из таблицы 3.2.6 и рисунка 3.2.6 оптимальными стерилизующими агентами для листовых пластинок *H. cretaceus* являются 5-15%-ный раствор гипохлорита натрия при его действии в течение 10 минут.

Влияние режимов стерилизации на получение асептических эксплантов и эксплантов (листовых пластинок) с индукцией каллусогенеза вида *H. officinalis* отражено в таблице 3.2.7 и рисунке 3.2.7.

Влияние режимов стерилизации на экспланты (листовые пластинки) вида *H. officinalis*

Стерилизующий агент, его концентрация в растворе и время стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество эксплантов с индукцией каллусогенеза, %
Лизоформин 3000 (3%), 5 минут	44,67±0,64	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (3%), 10 минут	51,0±0,7	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (3%), 15 минут	56,3±0,58	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5%), 5 минут	65,33±0,28	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5%), 10 минут	70,33±0,28	18,67±0,59
Лизоформин 3000 (5%), 15 минут	77,67±1,01	22,0±0,5
Лизоформин 3000 (10%), 5 минут	81,33±1,30	27,33±0,46
Лизоформин 3000 (10%), 10 минут	86,67±0,11	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 15 минут	90,33±0,64	0,0±0,0
Биоцид (3%), 5 минут	74,33±0,74	19,33±0,74
Биоцид (3%), 10 минут	75,67±0,21	0,0±0,0
Биоцид (3%), 15 минут	78,67±0,28	0,0±0,0
Биоцид (5%), 5 минут	76,67±0,56	0,0±0,0
Биоцид (5%), 10 минут	82,67±0,56	0,0±0,0
Биоцид (5%), 15 минут	84,33±0,28	0,0±0,0
Биоцид (10%), 5 минут	81,33±0,28	0,0±0,0
Биоцид (10%), 10 минут	86,67±0,46	0,0±0,0
Биоцид (10%), 15 минут	88,0±0,2	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (5-15%), 5 минут	67,33±0,46	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (5-15%), 10 минут	75,33±0,46	15,0±0,6
Гипохлорит натрия (5-15%), 15 минут	82,33±0,58	31,67±0,56
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 5 минут	36,67±0,56	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 10 минут	44,33±0,74	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 15 минут	51,67±0,38	0,0±0,0

Продолжение таблицы 3.2.7

Хлорамин Б (5%), 5 минут	42,0±0,5	0,0±0,0
Хлорамин Б (5%), 10 минут	59,0±1,7	0,0±0,0
Хлорамин Б (5%), 15 минут	64,0±0,5	0,0±0,0
Хлорамин Б (10%), 5 минут	60,33±0,21	0,0±0,0
Хлорамин Б (10%), 10 минут	77,67±0,46	18,67±0,21
Хлорамин Б (10%), 15 минут	83,67±0,59	24,33±1,10
Нитрат серебра (0,1%), 5 минут	46,33±0,64	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 10 минут	54,33±0,82	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 15 минут	59,33±0,11	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 5 минут	60,33±0,11	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 10 минут	65,33±0,28	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 15 минут	69,67±0,28	0,0±0,0
Контроль (дистиллированная вода), 30 минут	0,0±0,0	0,0±0,0

По точному критерию Фишера при уровне значимости $P > 0,05$ по своему влиянию на количество стерильных эксплантов все полученные данные, представленные в таблице 3.2.7, достоверно отличаются от контроля, по своему влиянию на количество жизнеспособных эксплантов достоверное отличие от контроля наблюдается только при стерилизации лизоформином 3000 (5%) 10 и 15 минут; лизоформином 3000 (10%) 5 минут; биоцидом (3%) 5 минут; гипохлоритом натрия (5-15%) 10 и 15 минут; хлорамином Б (10%), 10 и 15 минут.

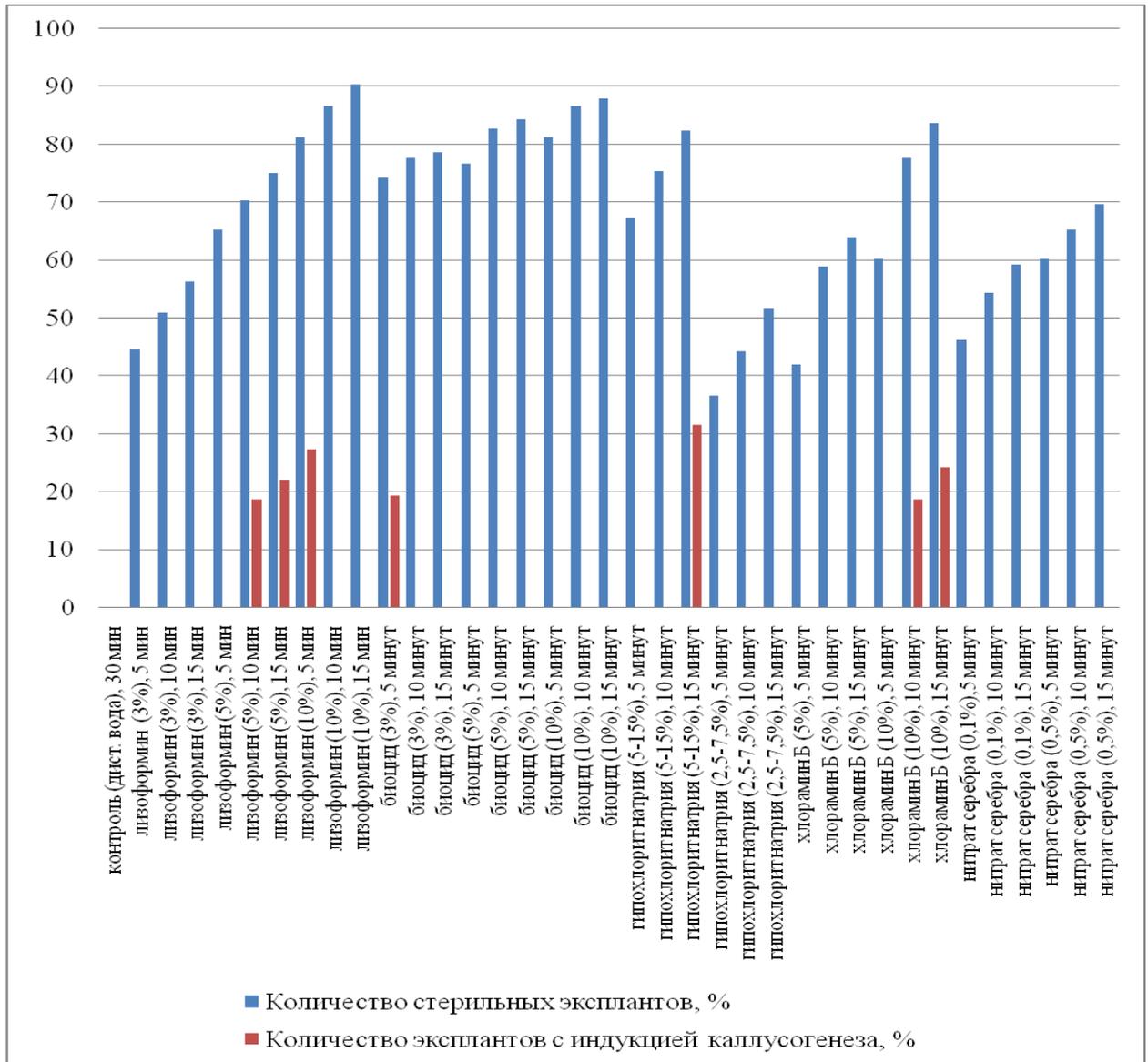


Рис. 3.2.7. Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов и индукцию каллусогенеза у вида *H. officinalis*

Как видно из таблицы 3.2.7 и рисунка 3.2.7 оптимальными стерилизующими агентами для листовых пластинок *H. officinalis* являются 5-15%-ный раствор гипохлорита натрия при его действии в течение 15 минут и 10%-ный раствор лизоформина 3000 при его действии в течение 5 минут.

Влияние режимов стерилизации на получение асептических эксплантов и эксплантов (листовых пластинок) с индукцией каллусогенеза вида *M. longifolia* отражено в таблице 3.2.8. и рисунке 3.2.8.

Влияние режимов стерилизации на экспланты (листовые пластинки) вида *M. longifolia*

Стерилизующий агент, его концентрация в растворе и время стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество эксплантов с индукцией каллусогенеза, %
Лизоформин 3000 (3%), 5 минут	55,67±0,46	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (3%), 10 минут	64,67±0,82	14,33±0,38
Лизоформин 3000 (3%), 15 минут	75,0±0,6	20,33±0,11
Лизоформин 3000 (5%), 5 минут	72,0±0,5	11,0±0,7
Лизоформин 3000 (5%), 10 минут	80,33±0,28	25,33±0,82
Лизоформин 3000 (5%), 15 минут	83,0±0,5	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 5 минут	87,33±0,46	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 10 минут	89,0±0,2	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10%), 15 минут	91,33±0,57	0,0±0,0
Биоцид (3%), 5 минут	68,67±0,56	0,0±0,0
Биоцид (3%), 10 минут	71,33±0,42	0,0±0,0
Биоцид (3%), 15 минут	80,67±0,11	16,0±0,8
Биоцид (5%), 5 минут	75,33±0,11	13,67±0,86
Биоцид (5%), 10 минут	82,67±0,56	21,0±0,3
Биоцид (5%), 15 минут	83,33±0,28	0,0±0,0
Биоцид (10%), 5 минут	78,33±0,38	0,0±0,0
Биоцид (10%), 10 минут	84,0±0,66	0,0±0,0
Биоцид (10%), 15 минут	87,0±0,8	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (5-15%), 5 минут	70,0±0,4	21,0±0,7
Гипохлорит натрия (5-15%), 10 минут	76,33±0,28	31,33±0,46
Гипохлорит натрия (5-15%), 15 минут	83,0±0,7	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 5 минут	48,33±0,64	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 10 минут	54,0±0,4	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5%), 15 минут	61±0,4	0,0±0,0

Продолжение таблицы 3.2.8

Хлорамин Б (5%), 5 минут	54,67±0,94	0,0±0,0
Хлорамин Б (5%), 10 минут	59,67±0,28	0,0±0,0
Хлорамин Б (5%), 15 минут	65,67±0,94	0,0±0,0
Хлорамин Б (10%), 5 минут	63,33±1,05	0,0±0,0
Хлорамин Б (10%), 10 минут	75,0±0,9	0,0±0,0
Хлорамин Б (10%), 15 минут	80,0±0,2	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 5 минут	64,33±0,56	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 10 минут	69,33±0,28	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1%), 15 минут	75,33±0,82	26,33±0,59
Нитрат серебра (0,5%), 5 минут	76,0±0,7	19,67±1,8
Нитрат серебра (0,5%), 10 минут	82±0,8	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5%), 15 минут	86,0±0,2	0,0±0,0
Контроль (дистиллированная вода), 30 минут	0,0±0,0	0,0±0,0

По точному критерию Фишера при уровне значимости $P > 0,05$ по своему влиянию на количество стерильных эксплантов все полученные данные, представленные в таблице 3.2.8, достоверно отличаются от контроля, по своему влиянию на количество жизнеспособных эксплантов достоверное отличие от контроля наблюдается только при стерилизации лизоформином 3000 (3%) 10 и 15 минут; лизоформином 3000 (5%) 5 и 10 минут; биоцидом (3%) 15 минут; биоцидом (5%) 5 и 10 минут; гипохлоритом натрия (5-15%) 5 и 10 минут; нитратом серебра (0,1%), 15 минут; нитратом серебра (0,5%) 5 минут.

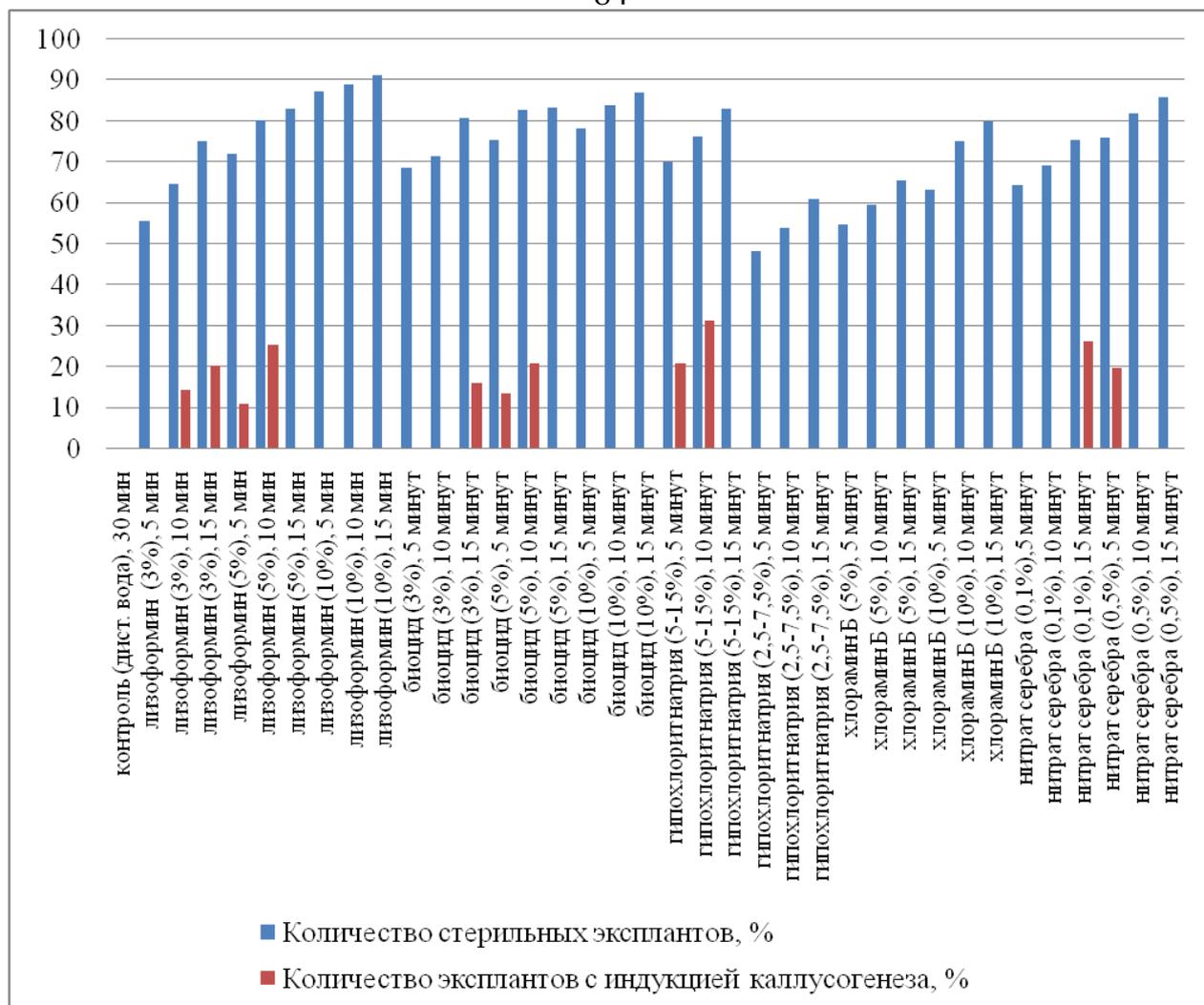


Рис. 3.2.8. Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов и индукцию каллусогенеза у вида *M. longifolia*

Как видно из таблицы 3.2.8 и рисунка 3.2.8 оптимальными стерилизующими агентами для листовых пластинок *M. longifolia* являются 5-15%-ный раствор гипохлорита натрия при его действии в течение 10 минут и 0,1%-ный раствор нитрата серебра при его действии в течение 15 минут.

3.3. Подбор оптимального состава питательных сред для культивирования растений в условиях *in vitro*

В ходе работы осуществляли подбор оптимального состава питательных сред для получения мини-растений (*Salvia pratensis* L., *Salvia officinalis* L., *Clinopodium vulgare* L., *Hyssopus officinalis* L., *Hyssopus cretaceus* Dubj., *Mentha longifolia* (L.) Huds.) и их каллусных культур в условиях *in vitro*.

Проростки растений видов *S. pratensis*, *C. vulgare*, *H. officinalis* и *M. longifolia* культивировали на разных средах. Полученные параметры роста и развития мини-растений представлены в таблицах 3.3.1 – 3.3.4.

Параметры роста и развития мини-растений вида *S. pratensis* на разных средах представлены в таблице 3.2.1, где ДП – длина побега, КЛ- количество листьев, ПК – потемнение корня, ЦВ – цвет растения, и на рисунках 3.3.1 – 3.3.30. Наблюдали рост растительных эксплантов на 6 день культивирования.

Таблица 3.2.1

Параметры роста и развития мини-растений *S. pratensis* на разных типах сред

Среда	Характеристика растений		
	На 1 неделе культивирования	На 2 недели культивирования	На 3 неделе культивирования
MR ₂₀	ДП – 1,8 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – зеленый 	ДП – 2,5 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – светло-зеленый 	ДП – 2,7 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – желто-коричневый 
	Рис. 3.3.1. <i>S. pratensis</i> на среде MR ₂₀ на 1 неделе культивирования	Рис. 3.3.2. <i>S. pratensis</i> на среде MR ₂₀ на 2 неделе культивирования	Рис. 3.3.3. <i>S. pratensis</i> на среде MR ₂₀ на 3 неделе культивирования

MS ₂	<p>ДП – 1 см; КЛ –4; ПК не наблюдается; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.4. <i>S. pratensis</i> на среде MS₂ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3,8 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.5. <i>S. pratensis</i> на среде MS₂ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3,8 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – коричнево-зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.6. <i>S. pratensis</i> на среде MS₂ на 3 неделе культивирования</p>
MS ₃	<p>ДП – 2,5 см; КЛ –4; ПК не наблюдается; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.7. <i>S. pratensis</i> на среде MS₃ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3,5 см; КЛ –6; наблюдается ПК; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.8. <i>S. pratensis</i> на среде MS₃ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 4 см; КЛ –8; наблюдается ПК; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.9. <i>S. pratensis</i> на среде MS₃ на 3 неделе культивирования</p>
MS ₄	<p>ДП – 1 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – желто-зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.10. <i>S. pratensis</i> на среде MS₄ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 1,7 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – желто-зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.11. <i>S. pratensis</i> на среде MS₄ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 1,7 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – желто-зеленый; погибшее растение</p>  <p>Рис. 3.3.12. <i>S. pratensis</i> на среде MS₄ на 3 неделе культивирования</p>

MS ₅	<p>ДП – 3,2 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.13. <i>S. pratensis</i> на среде MS₅ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 4 см; КЛ –6; наблюдается ПК; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.14. <i>S. pratensis</i> на среде MS₅ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 4 см; КЛ –6; наблюдается ПК; ЦВ – зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.15. <i>S. pratensis</i> на среде MS₅ на 3 неделе культивирования</p>
MS ₆	<p>ДП– 2,4 см; КЛ –4; наблюдается Пк; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.16. <i>S. pratensis</i> на среде MS₆ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ– насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.17. <i>S. pratensis</i> на среде MS₆ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3 см; КЛ –6; наблюдается ПК; ЦВ– желто- зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.18. <i>S. pratensis</i> на среде MS₆ на 3 неделе культивирования</p>
MS ₇	<p>ДП – 2,4 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.19. <i>S. pratensis</i> на среде MS₇ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3,4 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ– насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.20. <i>S. pratensis</i> на среде MS₇ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3,4 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – коричнево- зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.21. <i>S. pratensis</i> на среде MS₇ на 3 неделе культивирования</p>

MS ₈	<p>ДП – 2,3 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ– насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.22. <i>S. pratensis</i> на среде MS₈ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 4 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ– темно - зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.23. <i>S. pratensis</i> на среде MS₈ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 4 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ– желто-коричневый; образование каллуса</p>  <p>Рис. 3.3.24. <i>S. pratensis</i> на среде MS₈ на 3 неделе культивирования</p>
MS ₉	<p>ДП – 2,3 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.25. <i>S. pratensis</i> на среде MS₉ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП –3 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ– светло- зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.26. <i>S. pratensis</i> на среде MS₉ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП –3 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ – желто-коричневый; образование каллуса</p>  <p>Рис. 3.3.27. <i>S. pratensis</i> на среде MS₉ на 3 неделе культивирования</p>
MS ₁₀	<p>ДП –3 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ– насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.28. <i>S. pratensis</i> на среде MS₁₀ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП –3 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – желто-коричневый</p>  <p>Рис. 3.3.29. <i>S. pratensis</i> на среде MS₁₀ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП –3 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – желто-коричневый; образование каллуса</p>  <p>Рис. 3.3.30. <i>S. pratensis</i> на среде MS₁₀ на 3 неделе культивирования</p>

Как видно из таблицы 3.3.1 и рисунков 3.3.1-3.3.30 оптимальной средой для получения мини-растений вида *S. pratensis* является среда MS₃; оптимальными средами для индукции каллусогенеза являются MS₈, MS₉, MS₁₀.

Параметры роста и развития мини-растений вида *C. vulgare* на разных средах представлены в таблице 3.3.2, где ДП – длина побега, КЛ- количество листьев, ПК – потемнение корня, ЦВ – цвет растения, и на рисунках 3.3.31 – 3.3.60. Семена проросли на 6 день культивирования.

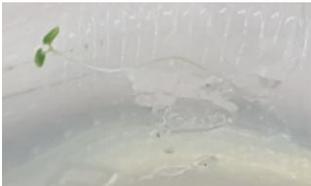
Таблица 3.3.2

Параметры роста и развития мини- растений вида *C. vulgare* на разных типах сред

Среда	Характеристика растений		
	На 1 неделе культивирования	На 2 недели культивирования	На 3 и далее неделе культивирования
MR ₂₀	<p>ДП – 1,2 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ– светло-зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.31. <i>C. vulgare</i> на среде MR₂₀ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 1,4 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ – светло-зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.32. <i>C. vulgare</i> на среде MR₂₀ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 1,4 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ – коричневый</p>  <p>Рис. 3.3.33. <i>C. vulgare</i> на среде MR₂₀ на 3 неделе культивирования</p>
MS ₂	<p>ДП – 3,4 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ– насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.34. <i>C. vulgare</i> на среде MS₂ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3,6 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.35. <i>C. vulgare</i> на среде MS₂ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3,6 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – желто-коричневый</p>  <p>Рис. 3.3.36. <i>C. vulgare</i> на среде MS₂ на 2 неделе культивирования</p>

MS ₃	<p>ДП – 4 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.37. <i>C. vulgare</i> на среде MS₃ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 4,5 см; КЛ –6; наблюдается ПК; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.38. <i>C. vulgare</i> на среде MS₃ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 4,7 см; КЛ –6; наблюдается ПК; ЦВ– насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.39. <i>C. vulgare</i> на среде MS₃ на 3 неделе культивирования</p>
MS ₄	<p>ДП – 3,9 см; КЛ –4; ПК не наблюдается; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.40. <i>C. vulgare</i> на среде MS₄ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 4 см; КЛ –4; наблюдается потемнение и разветвление корня; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.41. <i>C. vulgare</i> на среде MS₄ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 4,5 см; КЛ –6; наблюдается потемнение и разветвление корня; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.42. <i>C. vulgare</i> на среде MS₄ на 3 неделе культивирования</p>
MS ₅	<p>ДП – 4 см; КЛ –2; наблюдается ПК; ЦВ растения – насыщенный зеленый</p>	<p>ДП – 5,2 см; КЛ –2; наблюдается ПК; ЦВ растения – насыщенный зеленый</p>	<p>ДП – 5,8 см; КЛ –6; наблюдается ПК; ЦВ растения – насыщенный зеленый</p>

	 <p>Рис. 3.3.43. <i>C. vulgare</i> на среде MS₅ на 1 неделе культивирования</p>	 <p>Рис. 3.3.44. <i>C. vulgare</i> на среде MS₅ на 2 неделе культивирования</p>	 <p>Рис. 3.3.45. <i>C. vulgare</i> на среде MS₅ на 3 неделе культивирования</p>
MS ₆	<p>ДП – 2,7 см; КЛ – 4; ПК не наблюдается; ЦВ растения – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.46. <i>C. vulgare</i> на среде MS₆ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3,1 см; КЛ – 4; наблюдается ПК; ЦВ растения – коричневый</p>  <p>Рис. 3.3.47. <i>C. vulgare</i> на среде MS₆ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3,1 см; КЛ – 4; наблюдается ПК; ЦВ растения – коричневый; образование каллуса</p>  <p>Рис. 3.3.48. <i>C. vulgare</i> на среде MS₆ на 3 неделе культивирования</p>
MS ₇	<p>ДП – 2,6 см; КЛ – 2; ПК не наблюдается; ЦВ – насыщенный зеленый</p>	<p>ДП – 2,6 см; КЛ – 2; наблюдается ПК; ЦВ – коричнево-зеленый</p>	<p>ДП – 2,6 см; КЛ – 2; наблюдается ПК; ЦВ – коричневый; образование каллуса</p>

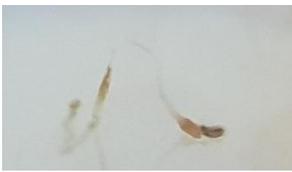
	 <p>Рис. 3.3.49. <i>C. vulgare</i> на среде MS₇ на 1 неделе культивирования</p>	 <p>Рис. 3.3.50. <i>C. vulgare</i> на среде MS₇ на 2 неделе культивирования</p>	 <p>Рис. 3.3.51. <i>C. vulgare</i> на среде MS₇ на 3 неделе культивирования</p>
MS ₈	<p>ДП – 2,4 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ – светло - зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.52. <i>C. vulgare</i> на среде MS₈ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 2,4 см; КЛ –2; наблюдается ПК; ЦВ – коричнево – зеленый; образуется каллус</p>  <p>Рис. 3.3.53. <i>C. vulgare</i> на среде MS₈ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 2,4 см; КЛ –2; наблюдается ПК; ЦВ – коричнево – зеленый; образуется каллус</p>  <p>Рис. 3.3.54. <i>C. vulgare</i> на среде MS₈ на 3 неделе культивирования</p>
MS ₉	<p>ДП – 4,1 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.55. <i>C. vulgare</i> на среде MS₉ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 4,1 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ – светло- зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.56. <i>C. vulgare</i> на среде MS₉ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 4,1 см; КЛ –2; наблюдается ПК; ЦВ – коричневый; образование каллуса</p>  <p>Рис. 3.3.57. <i>C. vulgare</i> на среде MS₉ на 3 неделе культивирования</p>

MS ₁₀	<p>ДП –3,4 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.58. <i>C. vulgare</i> на среде MS₁₀ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП –3,4 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ – бело-коричневый; образуется каллус</p>  <p>Рис. 3.3.59. <i>C. vulgare</i> на среде MS₁₀ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП –3,4 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ– бело-коричневый; образуется каллус</p>  <p>Рис. 3.3.60. <i>C. vulgare</i> на среде MS₁₀ на 3 неделе культивирования</p>
------------------	---	--	--

Как видно из таблицы 3.3.2 и рисунков 3.31 – 3.60 оптимальной средой для получения хорошо растущих мини-растений вида *C. vulgare* является среда MS₃ и MS₅; оптимальными средами для индукции каллусогенеза являются среда MS₆, MS₇, MS₈, MS₉, MS₁₀.

Параметры роста и развития мини-растений вида *H. officinalis* на разных средах представлены в таблице 3.3.3, где ДП – длина побега, КЛ- количество листьев, ПК – потемнение корня, ЦВ – цвет растения, и на рисунках 3.61. – 3.85. Растительные экспланты прорастали на 10 день культивирования.

Параметры роста и развития мини- растений вида *H. officinalis* на разных типах сред

Среда	Характеристика растений		
	На 1 неделе культивирования	На 2 недели культивирования	На 3 и далее неделе культивирования
MS ₁	<p>ДП –2,4 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ – светло-коричневый</p>  <p>Рис. 3.3. 61. <i>H. officinalis</i> на среде MS₁ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП –2,4 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ – насыщенно-коричневый</p>  <p>Рис. 3.3.62. <i>H. officinalis</i> на среде MS₁ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП –2,4 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ –коричневый; растение погибло</p>  <p>Рис. 3.3.63. <i>H. officinalis</i> на среде MS₁ на 3 неделе культивирования</p>
MS ₂	<p>ДП – 1,5 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.64. <i>H. officinalis</i> на среде MS₂ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 1,9 см; КЛ –4; наблюдается потемнение и покраснение корня; ЦВ растения – зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.65. <i>H. officinalis</i> на среде MS₂ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3,6 см; КЛ –6; наблюдается ПК; ЦВ растения – зелено-коричневый</p>  <p>Рис. 3.3.67. <i>H. officinalis</i> на среде MS₂ на 3 неделе культивирования</p>

MS ₃	<p>ДП – 1,8 см; КЛ –4; ПК не наблюдается; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.68. <i>H. officinalis</i> на среде MS₃ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 2 см; КЛ –4; ПК не наблюдается; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.69. <i>H. officinalis</i> на среде MS₃ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 2,7 см; КЛ –6; наблюдается ПК; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.70. <i>H. officinalis</i> на среде MS₃ на 3 неделе культивирования</p>
MS ₄	<p>ДП – 0,7 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ – зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.71. <i>H. officinalis</i> на среде MS₄ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 1,2 см; КЛ –3; ПК не наблюдается; ЦВ – зеленый с потемнением</p>  <p>Рис. 3.3.72. <i>H. officinalis</i> на среде MS₄ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 4,5 см; КЛ –6; ПК не наблюдается; ЦВ – зеленый; образуется каллус</p>  <p>Рис. 3.3.73. <i>H. officinalis</i> на среде MS₄ на 3 неделе культивирования</p>

<p>MS₅</p>	<p>ДП – 1,1 см; КЛ –4; ПК не наблюдается; ЦВ – зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.74. <i>H.n officinalis</i> на среде MS₅ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 2,2 см; КЛ –4; ПК не наблюдается; ЦВ– зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.75. <i>H. officinalis</i> на среде MS₅ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 2,3 см; КЛ –6; наблюдается ПК; ЦВ растения – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.76. <i>H. officinalis</i> на среде MS₅ на 3 неделе культивирования</p>
<p>MS₆</p>	<p>ДП – 0,6 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ растения – желто-коричневый</p>  <p>Рис. 3.3.77. <i>H. officinalis</i> на среде MS₆ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 0,6 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ растения – желто- коричневый</p>  <p>Рис. 3.3.78. <i>H. officinalis</i> на среде MS₆ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 0,6 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ – зеленый, зеленый; образование каллуса</p>  <p>Рис. 3.3.79. <i>H. officinalis</i> на среде MS₆ на 3 неделе культивирования</p>

<p>MS₈</p>	<p>ДП – 1,8 см; КЛ –2; наблюдается ПК; ЦВ растения – светло - зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.80. <i>H. officinalis</i> на среде MS₈ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 1,8 см; КЛ –2; наблюдается ПК; ЦВ растения – бело- коричневое</p>  <p>Рис. 3.3.81. <i>H. officinalis</i> на среде MS₈ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 1,8 см; КЛ –2; наблюдается ПК; ЦВ – коричнево – бело- коричневое; растение погибло</p>  <p>Рис. 3.3.82. <i>H. officinalis</i> на среде MS₈ на 3 неделе культивирования</p>
<p>MS₉</p>	<p>ДП – 1,3 см; КЛ –2; наблюдается ПК; ЦВ растения – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.83. <i>H. officinalis</i> на среде MS₉ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 1,5 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ растения – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.84. <i>H. officinalis</i> на среде MS₉ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 1,6 см; КЛ –4; наблюдается ПК; ЦВ растения – насыщенный зеленый;</p>  <p>Рис. 3.3.85. <i>H. officinalis</i> на среде MS₉ на 2 неделе культивирования</p>

Как видно из таблицы 3.3.3 и рисунков 3.61 – 3.85 оптимальной средой для получения мини-растений вида *H. officinalis* является среды MS₃ и MS₅, MS₉; оптимальными средами для индукции каллусогенеза являются среды MS₄ и MS₆.

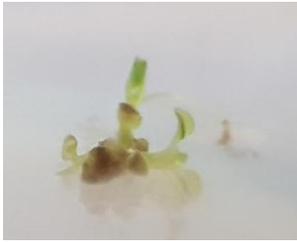
Параметры роста и развития мини-растений вида *M. longifolia* на разных средах представлены в таблице 3.3.4, где ДП – длина побега, КЛ- количество листьев, ПК – потемнение корня, ЦВ – цвет растения, и на рисунках 3.86. – 3.109. Растительные экспланты прорастали на 8 день культивирования,

Таблица 3.3.4

Параметры роста и развития мини-растений вида *M. longifolia* на разных типах сред

Среда	Характеристика растений		
	На 1 неделе культивирования	На 2 недели культивирования	На 3 и далее неделе культивирования
MS ₁	<p>ДП – 2,1 см; КЛ – 4; наблюдается ПК; ЦВ – зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.86. <i>M. longifolia</i> на среде MS₁ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 2,5 см; КЛ – 7; наблюдается ПК; ЦВ – зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.87. <i>M. longifolia</i> на среде MS₁ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 2,6 см; КЛ – 7-8; наблюдается ПК; ЦВ – зеленый; наблюдается увеличение побегов</p>  <p>Рис. 3.3.88. <i>M. longifolia</i> на среде MS₁ на 3 неделе культивирования</p>
MS ₂	<p>ДП – 2,2 см; КЛ – 4; ПК не наблюдается; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.89. <i>M. longifolia</i> на среде MS₂ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 2,2 см; КЛ – 7; ПК не наблюдается; ЦВ – зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.90. <i>M. longifolia</i> на среде MS₂ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 2,5 см; КЛ – 7; ПК не наблюдается; ЦВ – зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.91. <i>M. longifolia</i> на среде MS₂ на 3 неделе культивирования</p>

<p>MS_3</p>	<p>ДП – 2,4 см; КЛ – 2; ПК не наблюдается; ЦВ – насыщенный зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.92. <i>M. longifolia</i> на среде MS_3 на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3 см; КЛ – 4; наблюдается ПК; ЦВ – насыщенный зеленый; наблюдается увеличение числа побегов</p>  <p>Рис. 3.3.93. <i>M. longifolia</i> на среде MS_3 на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3,8 см; КЛ – 4-9; наблюдается ПК; ЦВ – насыщенный зеленый наблюдается увеличение числа побегов до 5 штук</p>  <p>Рис. 3.3.94. <i>M. longifolia</i> на среде MS_3 на 3 неделе культивирования</p>
<p>MS_4</p>	<p>ДП – 2,1 см; КЛ – 4; ПК не наблюдается; ЦВ – зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.95. <i>M. longifolia</i> на среде MS_4 на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3 см; КЛ – 3; ПК не наблюдается; ЦВ – зеленый; наблюдается увеличение числа побегов</p>  <p>Рис. 3.3.96. <i>M. longifolia</i> на среде MS_4 на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3,2 см; КЛ – 4; ПК не наблюдается; ЦВ – зеленый; наблюдается увеличение числа побегов</p>  <p>Рис. 3.3.97. <i>M. longifolia</i> на среде MS_4 на 3 неделе культивирования</p>

<p>MS₅</p>	<p>ДП – 3,0 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ – зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.98. <i>M. longifolia</i> на среде MS₅ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3,7 см; КЛ –4; ПК не наблюдается; ЦВ– зеленый</p>  <p>Рис. 3.3.99. <i>M. longifolia</i> на среде MS₅ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 3,7 см; КЛ –4; ПК не наблюдается; ЦВ– зеленый; образуется плотный каллус</p>  <p>Рис. 3.3.100. <i>M. longifolia</i> на среде MS₅ на 3 неделе культивирования</p>
<p>MS₆</p>	<p>ДП – 1,3 см; КЛ –2; ПК не наблюдается; ЦВ растения – зелено-коричневый</p>  <p>Рис. 3.3.101. <i>M. longifolia</i> на среде MS₆ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 1,9 см; КЛ –3; ПК не наблюдается; ЦВ растения –зелено- коричневый; наблюдается увеличение числа побегов</p>  <p>Рис. 3.3.102. <i>M. longifolia</i> на среде MS₆ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 2,2 см; КЛ –7; наблюдается ПК; ЦВ – зеленый; наблюдается увеличение числа побегов</p>  <p>Рис. 3.3.103. <i>M. longifolia</i> на среде MS₆ на 3 неделе культивирования</p>

<p>MS₈</p>	<p>ДП – 1,6 см; КЛ –2; наблюдается ПК; ЦВ растения – светло - коричневый</p>  <p>Рис. 3.3.104. <i>M. longifolia</i> на среде MS₈ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 1,6 см; КЛ –2; наблюдается ПК; ЦВ растения – светло - коричневый</p>  <p>Рис. 3.3.105. <i>M. longifolia</i> на среде MS₈ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 1,6 см; КЛ –2; наблюдается ПК; ЦВ – коричневый; образуется каллус</p>  <p>Рис. 3.3.106. <i>M. longifolia</i> на среде MS₈ на 3 неделе культивирования</p>
<p>MS₉</p>	<p>ДП – 0,9 см; КЛ –2; наблюдается ПК; ЦВ растения – коричневый</p>  <p>Рис. 3.3.107. <i>M. longifolia</i> на среде MS₉ на 1 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 0,9 см; КЛ –2; наблюдается ПК; ЦВ растения – коричневый</p>  <p>Рис. 3.3.108. <i>M. longifolia</i> на среде MS₉ на 2 неделе культивирования</p>	<p>ДП – 0,9 см; КЛ –2; наблюдается ПК; ЦВ растения – коричневый; растение погибло</p>  <p>Рис. 3.3.109. <i>M. longifolia</i> на среде MS₉ на 2 неделе культивирования</p>

Как видно из таблицы 3.3.4 и рисунков 3.86 – 3.109 оптимальной средой для получения мини-растений вида *M. longifolia* является среды MS₁, MS₂, MS₃, MS₄ и MS₆; оптимальными средами для индукции каллусогенеза являются среды MS₅ и MS₈.

Таким образом, для каждого для изучаемого вида были подобраны оптимальные питательные для культивирования в условиях *in vitro*.

3.4. Получение каллусных культур

Полученные в ходе исследований каллусные ткани изучаемых видов растений культивировались на различных типах питательных сред. Рост этих каллусных культур представлен в таблице 3.4.1 – 3.4.6.

Рост каллусной культуры вида шалфей лугового (*Salvia pratensis* L.) и его характеристика на разных типах питательных сред Мурасиге-Скуга отражены в таблице 3.4.1.

Таблица 3.4.1

Каллусные культуры *S. pratensis* на разных типах питательных сред

Среда	Характеристика каллусной культуры	Фото
MR ₃₀	Каллусная культура темно-коричневого цвета, плотная, имеются новообразованные участки, органогенез не обнаружен	 <p>Рис. 3.4.1. <i>S. pratensis</i> на среде MR₃₀ на 5 месяце культивирования (5 пассаж)</p>  <p>Рис. 3.4.2. <i>S. pratensis</i> на среде MR₃₀ на 6 месяце культивирования (6 пассаж)</p>
MR ₂₀	Каллусная культура темно-коричневого цвета, плотная, новообразованные участки наблюдаются в малых количествах, органогенез не обнаружен	 <p>Рис. 3.4.3. <i>S. pratensis</i> на среде MR₂₀ на 7 месяце культивирования (7 пассаж)</p>

Продолжение таблицы 3.4.1

MR _к шалфей	Каллусная культура темно-коричневого цвета, плотная, имеются новообразованные участки, обнаружен органоогенез	 <p>Рис. 3.4.4. <i>S. pratensis</i> на среде MR_{к шалфей} на 7 месяце культивирования (7 пассаж)</p>  <p>Рис. 3.4.5. <i>S. pratensis</i> на среде MR_{кшалфей} на 8 месяце культивирования (8 пассаж)</p>
MR _{бг}	Каллусная культура темно-коричневого цвета, рыхлая, новообразованные участки не обнаружены, органоогенез не обнаружен	 <p>Рис. 3.4.6. <i>S. pratensis</i> на среде MR_{бг} на 9 месяце культивирования (9 пассаж)</p>

Как видно из таблицы 3.4.1 и рисунков 3.4.1 – 3.4.6 оптимальной средой для выращивания каллусных культур *S. pratensis* являются среды MR₃₀ и MR_{кшалфей}. Именно на них регистрируется образование новых клеток.

Рост каллусной культуры вида шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.) и его характеристика на разных типах питательных сред Мурасиге-Скуга отражены в таблице 3.4.2.

Таблица 3.4.2

Каллусные культуры *S. officinalis* на разных типах питательных сред

Среда	Характеристика каллусной культуры	Фото
MR ₃₀	Каллусная культура темно-коричневого цвета, плотная, имеется большое количество новообразованных участков, органоогенез не обнаружен	 <p>Рис. 3.4.7. <i>S. officinalis</i> на среде MR₃₀ на 10 месяца культивирования (10 пассаж)</p>

Из-за малого количества полученного материала каллусная культура *S. officinalis* культивировалась только на питательной среде MR₃₀, где регистрировалось появление участков с меристематической активностью.

Рост каллусной культуры вида иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.) и его характеристика на разных типах питательных сред Мурасиге-Скуга отражены в таблице 3.4.3.

Таблица 3.4.3

Каллусные культуры *H. officinalis* на разных типах питательных сред

Среда	Характеристика каллусной культуры	Фото
MR ₃₀	Наблюдается полиморфизм каллусной ткани, каллусная культура от кремового до темно-коричневого цвета, плотная, имеется большое количество новообразованных участков, органогенез не обнаружен	 <p>Рис. 3.4.8. <i>H. officinalis</i> на среде MR₃₀ на 10 месяце культивирования (10 пассаж)</p>  <p>Рис. 3.4.9. <i>H. officinalis</i> на среде MR₃₀ на 7 месяце культивирования (7 пассаж)</p>
MR ₂₀	Каллусная культура темно-коричневого цвета, плотная, имеется большое количество новообразованных участков, органогенез не обнаружен	 <p>Рис. 3.4.10. <i>H. officinalis</i> на среде MR₂₀ на 7 месяце культивирования (7 пассаж)</p>
MR _{6г}	Каллусная культура темно-коричневого цвета, рыхлая, новообразованные участки не обнаружены, органогенез не обнаружен	 <p>Рис. 3.4.10. <i>H. officinalis</i> на среде MR₂₀ на 7 месяце</p>

Как видно из таблицы 3.4.3 и рисунков 3.4.8 – 3.4.10 оптимальной средой для выращивания каллусных культур *H. officinalis* являются среды MR₃₀ и MR₂₀. Именно на этой среде наблюдается образование новых клеток.

Рост каллусной культуры вида иссопа лекарственного (*Hyssopus cretaceus* Dubj.) и его характеристика на разных типах питательных сред Мурасиге-Скуга отражены в таблице 3.4.4 и рисунке 3.4.11.

Таблица 3.4.4

Каллусные культуры *H. cretaceus* на разных типах питательных сред

Среда	Характеристика каллусной культуры	Фото
MR ₃₀	Каллусная культура от темно-коричневого цвета, плотная, имеется большое количество новообразованных участков, органогенез не обнаружен	 <p>Рис. 3.4.11. <i>H. cretaceus</i> на среде MR₃₀ на 7 месяце культивирования (7 пассаж)</p>

Из-за ограниченного количества полученного материала каллусная ткань *H. cretaceus* культивировалась только на среде MR₃₀. На ней наблюдался активный рост культуры с появлением новообразованных участков.

Рост каллусной культуры вида мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.) и его характеристика на разных типах питательных сред Мурасиге-Скуга отражены в таблице 3.4.5.

Каллусные культуры *M. longifolia* на разных типах питательных сред

Среда	Характеристика каллусной культуры	Фото
MS _к мята1	Каллусная культура темно-коричневого цвета, очень плотная, имеется большое количество новообразованных участков, органогенез не обнаружен	 <p>Рис. 3.4.12. <i>M. longifolia</i> на среде MR₃₀ на 10 месяце культивирования (10 пассаж)</p>
MR _к мята2	Каллусная культура темно-коричневого цвета, очень плотная, имеется малое количество новообразованных участков, органогенез не обнаружен	 <p>Рис. 3.4.13. <i>M. longifolia</i> на среде MR₂₀ на 9 месяце культивирования (9 пассаж)</p>
MR ₃₀	Каллусная культура темно-коричневого цвета, плотная, большое количество новообразованных участков, органогенез не обнаружен	 <p>Рис. 3.4.14. <i>M. longifolia</i> на среде MR₂₀ на 9 месяце (9 пассаж)</p>

Как видно из таблицы 3.4.5 и рисунков 3.4.12 – 3.4.14 оптимальными средами для культивирования каллусных культур *M. longifolia* являются среды MR₃₀ и MR_{кмята1}. Именно на этих средах наблюдается активный меристематический рост.

Рост каллусной культуры вида пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.) и его характеристика на разных типах питательных сред Мурасиге-Скуга отражены в таблице 3.4.6.

Каллусные культуры *C. vulgare* на разных типах питательных сред

Среда	Характеристика каллусной культуры	Фото
MR ₃₀	Каллусная культура темно-коричневого цвета, плотная, имеется большое количество новообразованных участков, обнаружен органогенез	 <p>Рис. 3.4.15. <i>C. vulgare</i> на среде MR₃₀ на 7 месяце культивирования (7 пассаж)</p>
MR ₂₀	Каллусная культура темно-коричневого цвета, плотная, имеются новообразованные участки, органогенез не обнаружен	 <p>Рис. 3.4.16. <i>C. vulgare</i> на среде MR₂₀ на 7 месяце культивирования (7 пассаж)</p>
MR _{6r}	Каллусная культура зелено-коричневого цвета, рыхлая, новообразованных участков не обнаружено, органогенез не обнаружен	 <p>Рис. 3.4.17. <i>C. vulgare</i> на среде MR₂₀ на 9 месяце (9 пассаж)</p>

Как видно из таблицы 3.4.6 и рисунков 3.4.15 – 3.4.17 оптимальными средами для культивирования каллусных культур *C. vulgare* являются среды MR₃₀ и MR₂₀. Именно на этих средах регистрируется появление новообразованных участков.

Таким образом, были подобраны оптимальные питательные среды для выращивания каллусных культур исследуемых видов.

3.5. Определение антимикробной активности растительных экстрактов, полученных из каллусных культур

В ходе работы изучили антимикробные свойства каллусных культур исследуемых видов.

Результаты исследования антибактериальной активности экстракта каллусной ткани 6-го пассажа шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.) на микроорганизмы видов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* представлены в таблице 3.5.1 и рисунке 3.5.1.

Таблица 3.5.1

Влияние экстракта *S. pratensis*, полученного из каллусной культуры, на микроорганизмы

Концентрация экстракта	Диаметры зон задержки роста микроорганизмов, мм	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100%	11,1±1,7	10,14±0,65
1:10	6,44±1,12	4,6±1,7
1:100	2,25±0,25	0,0±0,0
1:1000	1,00±0,45	0,0±0,0
1:10000	2,8±0,7	0,0±0,0
контроль (спирт)	10,78±1,39	9,5±2,3
антибиотик	15,1±0,7	13,38±1,1

По критерию Фишера при уровне значимости $P=0,05$ различия основной группы с контролем (спиртом) при определении влияния экстракта каллусной культуры *S. pratensis* на *E. coli* и *S. aureus* статистически не достоверны, что показывает отсутствие различий во влиянии экстрактов, их разбавлений и спирта.

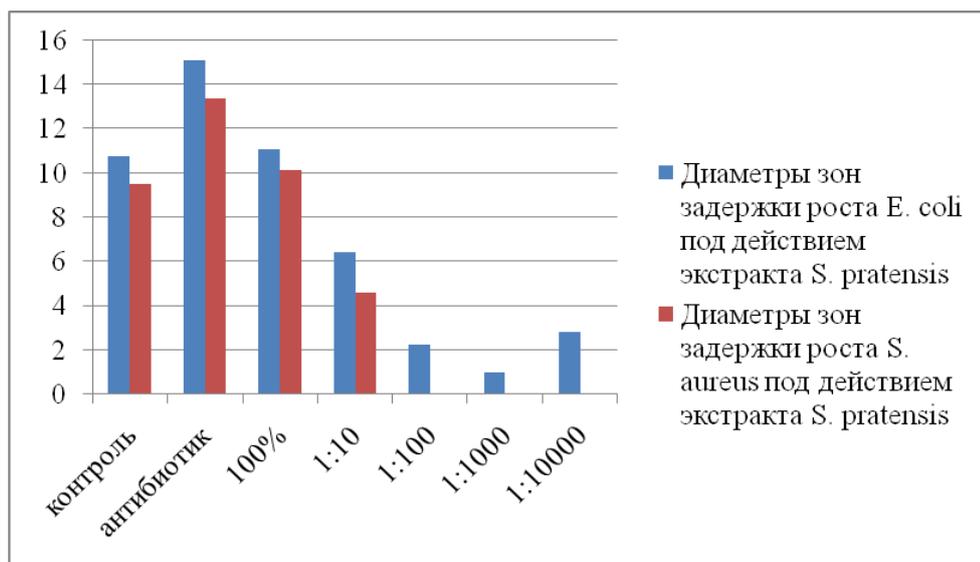


Рис. 3.5.1. Влияние экстракта *S. pratensis*, полученного из каллусных культур, на микроорганизмы

Зоны подавления роста микроорганизмов *E. coli* и *S. aureus* под влиянием экстракта *S. pratensis*, полученного из каллусной ткани, отражены на рис. 3.5.2.

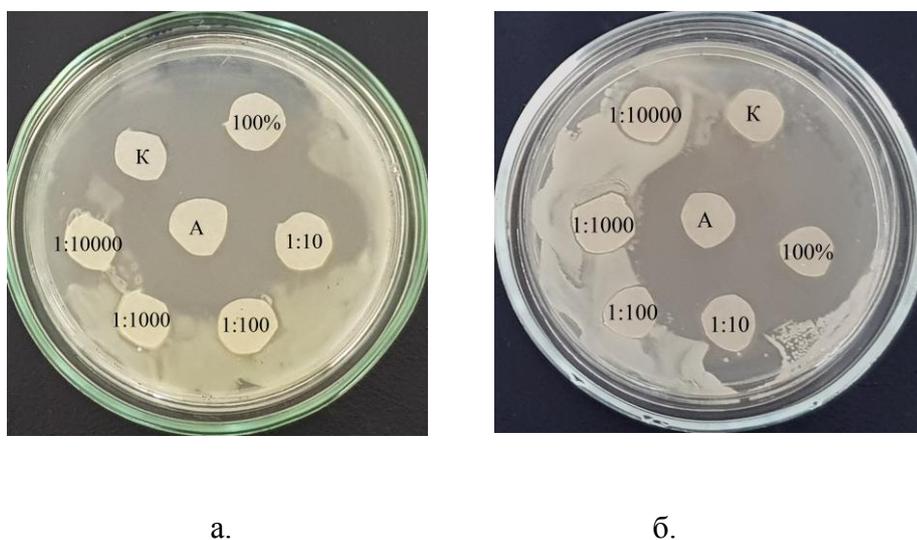


Рис. 3.5.2. Зоны подавления роста микроорганизмов под влиянием экстракта *S. pratensis*, полученного из каллусных культур: а. *E. coli*, б. *S. aureus*

Как видно из таблицы 3.5.1 и рисунков 3.5.1 и 3.5.2 100% экстракт *S. pratensis*, полученный из каллусных культур, обладает сильной антибактериальной активностью по отношению к *S. aureus* и *E. coli*, разбавления экстракта 1:10 оказывают слабое антимикробное действие на

микроорганизмы, разбавление 1:100 оказывает слабое антимикробное действие только на *E. coli*, остальные разбавления не оказывают антимикробное действие на данные микроорганизмы.

Результаты исследования антибактериальной активности экстракта каллусной культуры 10-го пассажа шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.) на микроорганизмы видов *E. coli* и *S. aureus* отражены в таблице 3.5.2 и рисунке 3.5.3.

Таблица 3.5.2

Влияние экстракта *S. officinalis*, полученного из каллусной культуры, на микроорганизмы

Концентрация экстракта	Диаметры зон задержки роста микроорганизмов, мм	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100%	12,9±0,7	12,7±1,6
1:10	10,11±1,24	12,0±1,5
1:100	10,83±0,91	9,33±3,48
1:1000	3,0±0,2	1,33±0,33
1:10000	1,0±0,6	0,0±0,0
контроль (спирт)	11,36±0,95	9,0±1,12
антибиотик	12,2±0,6	12,2±1,0

По критерию Фишера при уровне значимости $P=0,05$ различия основной группы с контролем (спиртом) при определении влияния экстракта каллусной культуры *S. officinalis* на *E. coli* и *S. aureus* статистически не достоверны, что показывает отсутствие различий во влиянии экстрактов, их разбавлений и спирта.

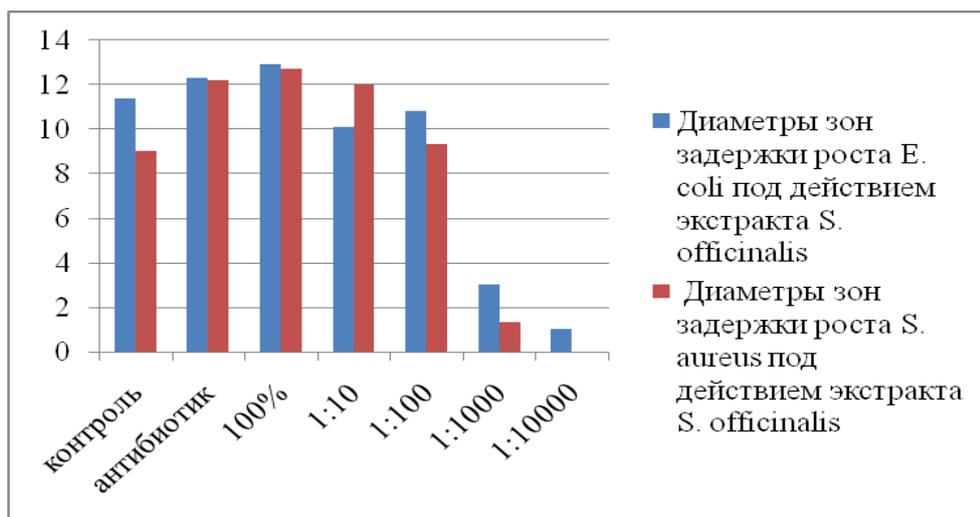
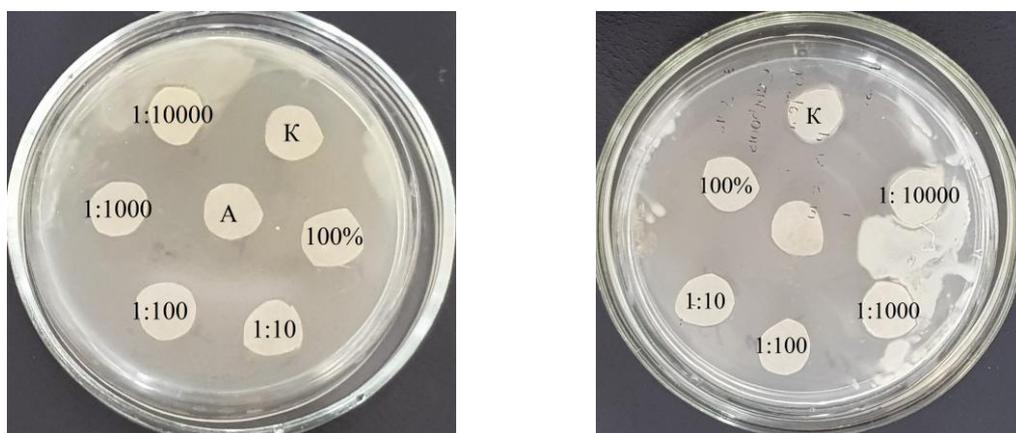


Рис. 3.5.3. Влияние экстракта *S. officinalis*, полученного из каллусных культур, на микроорганизмы

Зоны подавления роста микроорганизмов *E. coli* и *S. aureus* под влиянием экстракта *S. officinalis*, полученного из каллусной ткани, отражены на рис. 3.5.4.



а.

б.

Рис. 3.5.4. Зоны подавления роста микроорганизмов под влиянием экстракта *S. officinalis*, полученного из каллусных культур: а. *E. coli*, б. *S. aureus*

Как видно из таблицы 3.5.2 и рисунков 3.5.3 и 3.5.4 экстракт *S. officinalis*, полученный из каллусных культур, обладает сильной антибактериальной активностью по отношению к *S. aureus* в концентрации 100% , разбавлении 1:10 и 1:100 и по отношению к *E. coli* в концентрации 100% и разбавлении 1:10,

разбавления экстракта 1:1000 и 1:10000 оказывают слабое антимикробное действие на *E. coli*, разбавления 1:100 и 1:1000 оказывает слабое антимикробное действие только на *S. aureus*.

Результаты исследования антибактериальной активности экстракта каллусной культуры 10-го пассажа иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.) на микроорганизмы видов *E. coli* и *S. aureus* отражены в таблице 3.5.3 и рисунке 3.5.5.

Таблица 3.5.3

Влияние экстракта *H. officinalis*, полученного из каллусной культуры, на микроорганизмы

Концентрация экстракта	Диаметры зон задержки роста микроорганизмов, мм	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100%	12,0±2,0	13,75±1,6
1:10	5,8±1,3	3,2±0,9
1:100	5,5±1,6	1,0±0,6
1:1000	2,8±0,7	0,0±0,0
1:10000	1,0±0,4	0,0±0,0
контроль (спирт)	13,1±1,2	10,2±3,2
антибиотик	13,1±0,75	13,0±0,9

По критерию Фишера при уровне значимости $P=0,05$ различия основной группы с контролем (спиртом) при определении влияния экстракта каллусной культуры *H. officinalis* на *E. coli* и *S. aureus* статистически не достоверны, что показывает отсутствие различий во влиянии экстрактов, их разбавлений и спирта.

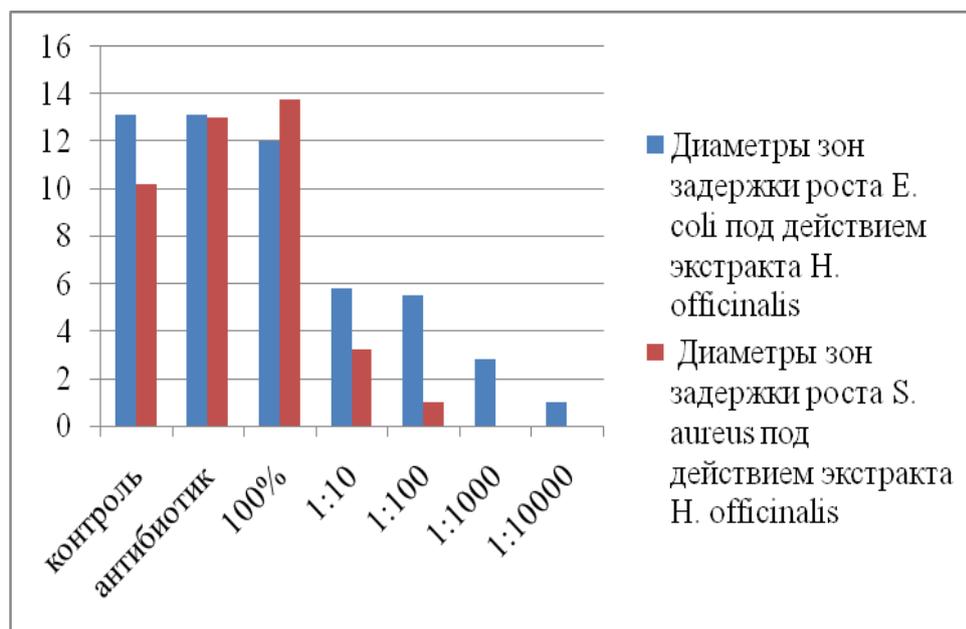


Рис. 3.5.5. Влияние экстракта *H. officinalis*, полученного из каллусных культур, на микроорганизмы

Зоны подавления роста микроорганизмов *E. coli* и *S. aureus* под влиянием экстракта *H. officinalis*, полученного из каллусной ткани, отражены на рис. 3.5.6.

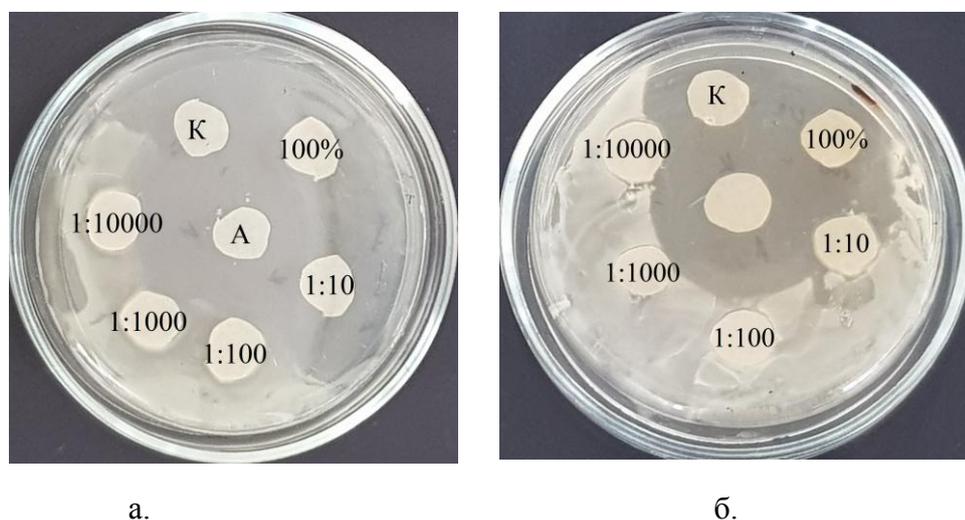


Рис. 3.5.6. Зоны подавления роста микроорганизмов под влиянием экстракта *H. officinalis*, полученного из каллусных культур: а. *E. coli*, б. *S. aureus*

Как видно из таблицы 3.5.3 и рисунков 3.5.5 и 3.5.6 экстракт *H. officinalis*, полученный из каллусных культур, обладает сильной антибактериальной

активностью по отношению к *S. aureus* и *E. coli* в концентрации 100%, разбавлении 1:10, 1:100 и 1:1000 обладают слабой антимикробной активностью по отношению к *E. coli*, разбавления 1:10 и 1:100 оказывают слабое антимикробное действие на *S. aureus*.

Результаты исследования антибактериальной активности экстракта каллусной культуры 10-го пассажа иссопа мелового (*Hyssopus cretaceus* Dubj.) на микроорганизмы видов *E. coli* и *S. aureus* отражены в таблице 3.5.4 и рисунке 3.5.7.

Таблица 3.5.4

Влияние экстракта *H. cretaceus*, полученного из каллусной культуры, на микроорганизмы

Концентрация экстракта	Диаметры зон задержки роста микроорганизмов, мм	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100%	13,8±1,3	13,75±1,6
1:10	10,2±2,4	16,8±0,6
1:100	0,0±0,0	10,0±2,2
1:1000	0,0±0,0	7,7±1,8
1:10000	0,0±0,0	0,0±0,0
контроль (спирт)	15,89±1,33	15,2±0,9
антибиотик	18,0±1,0	15,4±1,5

По критерию Фишера при уровне значимости $P=0,05$ различия основной группы с контролем (спиртом) при определении влияния экстракта каллусной культуры *H. cretaceus* на *E. coli* и *S. aureus* статистически не достоверны, что показывает отсутствие различий во влиянии экстрактов, их разбавлений и спирта.

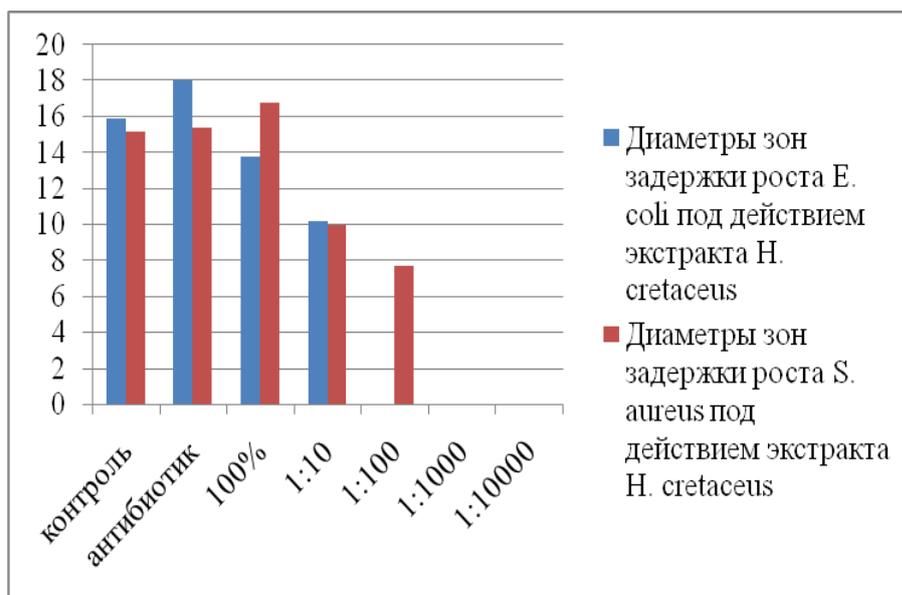


Рис. 3.5.7. Влияние экстракта *H. cretaceus*, полученного из каллусных культур, на микроорганизмы

Зоны подавления роста микроорганизмов *E. coli* и *S. aureus* под влиянием экстракта *H. cretaceus*, полученного из каллусной ткани, отражены на рис. 3.5.8.

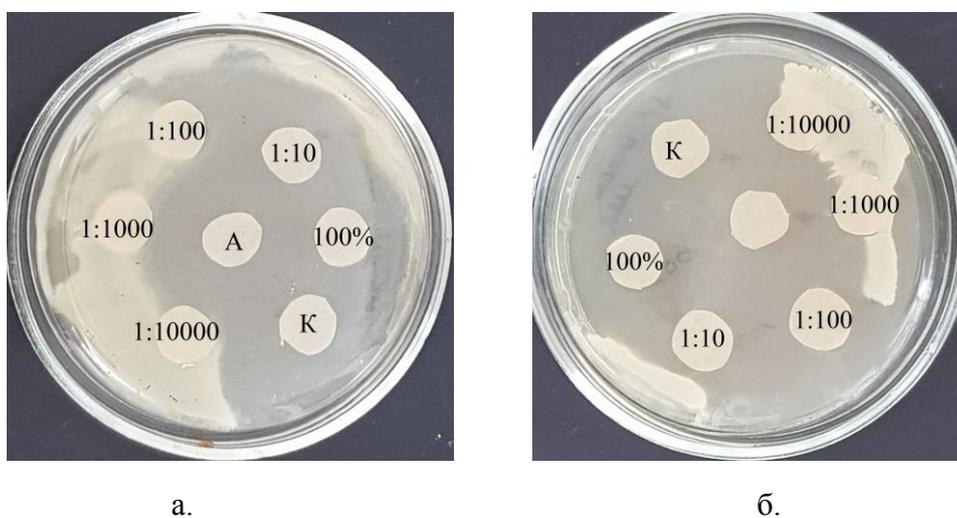


Рис. 3.5.8. Зоны подавления роста микроорганизмов под влиянием экстракта *H. cretaceus*, полученного из каллусных культур: а. *E. coli*, б. *S. aureus*

Как видно из таблицы 3.5.4 и рисунков 3.5.7 и 3.5.8 экстракт *H. cretaceus*, полученный из каллусных культур, обладает сильной антибактериальной активностью по отношению к *S. aureus* и *E. coli* в концентрации 100% и

разбавлении 1:10, средней и слабой антибактериальной активностью по отношению к *S. aureus* в разбавлении 1:100 и 1:1000 соответственно.

Результаты исследования антибактериальной активности экстракта, полученного из каллусной культуры 7-го пассажа пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.) на микроорганизмы видов *E. coli* и *S. aureus* отражены в таблице 3.5.5 и рисунке 3.5.9.

Таблица 3.5.5

Влияние экстракта *C. vulgare*, полученного из каллусной культуры, на микроорганизмы

Концентрация экстракта	Диаметры зон задержки роста микроорганизмов, мм	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100%	6,5±2,2	13,8±1,2
1:10	5,7±1,9	10,7±2,1
1:100	5,6±1,2	10,0±2,2
1:1000	3,7±1,0	7,7±1,8
1:10000	3,8±1,0	0,0±0,0
контроль (спирт)	7,8±0,9	10,5±0,5
антибиотик	12,5±0,5	15,7±1,3

По критерию Фишера при уровне значимости $P=0,05$ различия основной группы с контролем (спиртом) при определении влияния экстракта каллусной культуры *C. vulgare* на *E. coli* и *S. aureus* статистически не достоверны, что показывает отсутствие различий во влиянии экстрактов, их разбавлений и спирта.

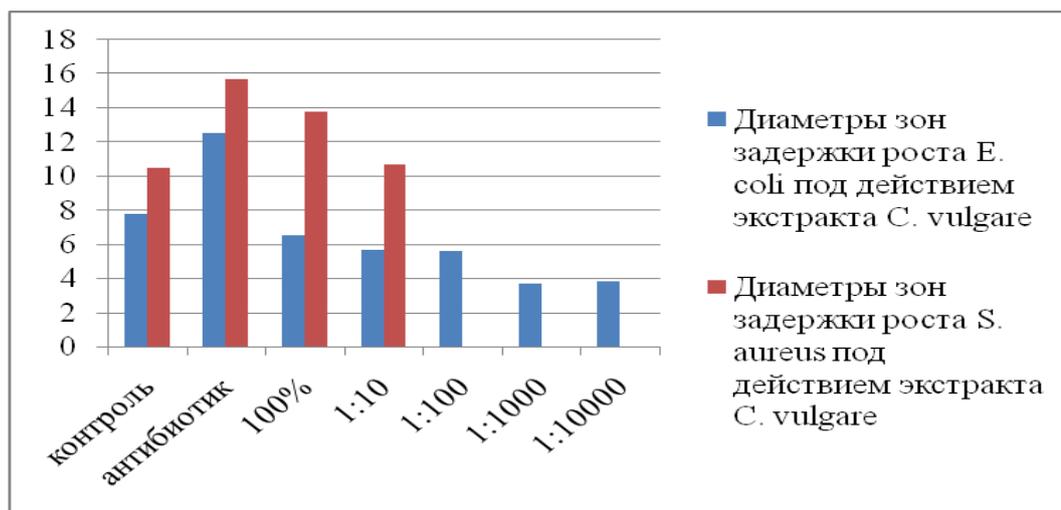


Рис. 3.5.9. Влияние экстракта *C. vulgare*, полученного из каллусных культур, на микроорганизмы

Зоны подавления роста микроорганизмов *E. coli* и *S. aureus* под влиянием экстракта *C. vulgare*, полученного из каллусной ткани, отражены на рис. 3.5.10.

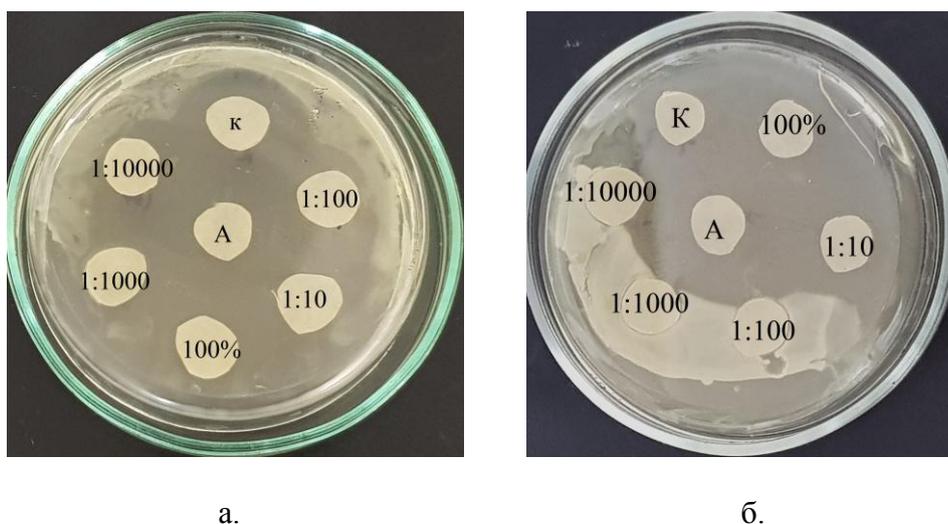


Рис. 3.5.10. Зоны подавления роста микроорганизмов под влиянием экстракта *C. vulgare*, полученного из каллусных культур: а. *E. coli*, б. *S. aureus*

Как видно из таблицы 3.5.5 и рисунков 3.5.9 и 3.5.10 экстракт *C. vulgare*, полученный из каллусных культур, обладает сильной антибактериальной активностью по отношению к *S. aureus* в концентрации 100% и разбавлении 1:10, умеренной антибактериальной активностью к *S. aureus* в разбавлении 1:100 и слабой антибактериальной активностью к этому микроорганизму в

разбавлении 1:1000, по отношению к *E.coli* экстракт обладает слабой антибактериальной активностью во всех разбавлениях вплоть до 1:10000.

Результаты исследования антибактериальной активности экстракта каллусной культуры 10-го пассажа мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.) на микроорганизмы видов *E. coli* и *S. aureus* отражены в таблице 3.5.6 и рисунке 3.5.11.

Таблица 3.5.6

Влияние экстракта *M. longifolia*, полученного из каллусной культуры, на микроорганизмы

Концентрация экстракта	Диаметры зон задержки роста микроорганизмов, мм	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100%	3,3±1,0	7,3±2,1
1:10	3,5±0,9	5,5±1,6
1:100	2,2±0,2	0,0±0,0
1:1000	2,5±0,3	0,0±0,0
1:10000	1,67±0,3	0,0±0,0
контроль (спирт)	6,4±1,9	7,0±1,0
антибиотик	14,0±0,5	12,4±1,2

По критерию Фишера при уровне значимости $P=0,05$ различия основной группы с контролем (спиртом) при определении влияния экстракта каллусной культуры *M. longifolia* на *E. coli* и *S. aureus* статистически не достоверны, что показывает отсутствие различий во влиянии экстрактов, их разбавлений и спирта.

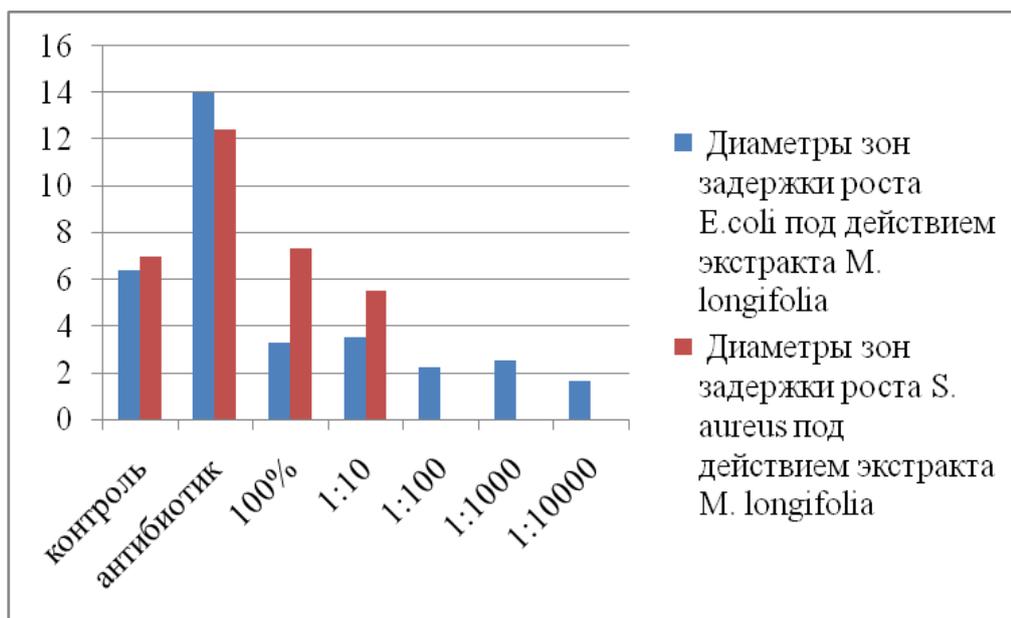
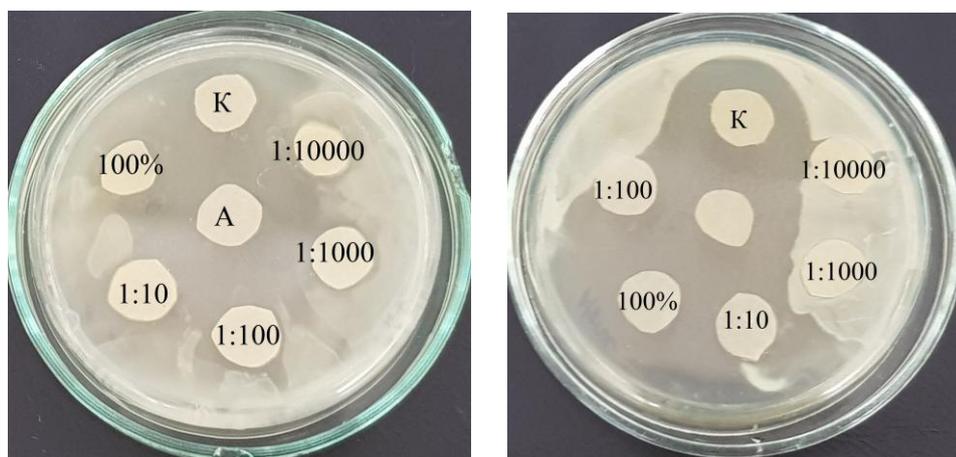


Рис. 3.5.11. Влияние экстракта *M. longifolia*, полученного из каллусных культур, на микроорганизмы

Зоны подавления роста микроорганизмов *E. coli* и *S. aureus* под влиянием экстракта *M. longifolia*, полученного из каллусной ткани, отражены на рис. 3.5.12.



а.

б.

Рис. 3.5.12. Зоны подавления роста микроорганизмов под влиянием экстракта *M. longifolia*, полученного из каллусных культур: а. *E. coli*, б. *S. aureus*

Как видно из таблицы 3.5.6 и рисунков 3.5.11 и 3.5.12 экстракт *M. longifolia*, полученный из каллусных культур, обладает слабой антибактериальной активностью по отношению к *S. aureus* и *E.coli* в концентрации 100% и разбавлении 1:10 и по отношению к *E.coli* в разбавлении 1:100, 1:1000, 1:10000.

В ходе проведенного исследования установлено, что наибольшей антибактериальной активностью из изучаемых видов обладает каллусная ткань вида *H. cretaceus*.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Введение в культуру *in vitro* некоторых представителей семейства

Lamiaceae

Работы по введению в культуру *in vitro* видов шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.), иссопа мелового (*Hyssopus cretaceus* Dubj.), мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.) проводились впервые для Белгородской области. Интерпретация и сравнение полученных результатов с литературными данными по введению в культуру *in vitro* видов семейства Lamiaceae показали как сходства, так и различия.

В большинстве исследований в качестве стерилизующих агентов при введении в культуру *in vitro* используют 0,1%-ный раствор диацида, 50%-ный раствор «Брадофена», препарат «Белизна», 0,1%-ный раствор AgNO_3 , 0,1%-ный раствор сулемы при времени стерилизации 4-10 минут (Окладникова, 2007; Егорова и др., 2011; Егорова и др., 2013; Якимова, Егорова, 2014; Сахвон и др., 2016). Однако использование препарата «Белизна» и 0,1%-ного раствора AgNO_3 показало, что стерилизация в течение этого времени для исследуемых видов недостаточна.

Использование в качестве стерилизующего агента препарата «Лизоформин 3000» в течение 20 минут описано в работе ученых Московского государственного Университета (Криницына и др., 2016). Этот режим дает большое количество жизнеспособных и стерильных проростков, однако при стерилизации выбранных нами видов оптимальное время стерилизации с использованием лизоформина было уменьшено до 5-10 минут в зависимости от вида экспланта.

Использование в качестве стерилизующих агентов 1-6%-ных растворов хлорамина Б в ряде литературных данных (Мокшин, Лукаткин, 2008; Сащенко, 2013) показало невысокие результаты жизнеспособных и стерильных эксплантов, поэтому была увеличена концентрация раствора до 10%, что увеличило количество эксплантов как по стерилизации, так и по жизнеспособности в нашей работе.

Использование в качестве стерилизующего агента «Биоцид» при введении в культуру на сегодняшний день является новым способом стерилизации. Исследования, проведенные в нашей работе, показали, что для некоторых растений семейства *Lamiaceae* оптимально использование только маленьких концентраций этого препарата. Кроме этого в наших исследованиях было определено, что подбор стерилизующих агентов для каждого вида растения должен проводиться строго индивидуально.

После подбора оптимальных стерилизующих агентов важным этапом является определение оптимального состава питательной среды, который зависит от целей исследования. Для проростания стерильных проростков оптимальной средой явилась безгормональная среда Мурасиге-Скуга, что совпадает с литературными данными (Крицкая, Кашин, 2013).

Для получения мини-растений и кулусных культур использовались различные соотношения фитогормонов. Для кулусных культур *Mentha longifolia* (L.) Huds. использовались среды MS_{мята1} и MS_{мята2}, которые были показаны рядом авторов как оптимальные для некоторых видов рода *Mentha* (Бугара, Мальцева, 2015; Мубарак и др., 2015), при этом было отмечено, что рост и развитие кулусных культур *M. longifolia* наблюдается только на среде MS_{мята1}. Для культивирования кулусных тканей *Salvia pratensis* L. использовалась среда MR_{шалфей}, которая является оптимальной для рода *Salvia* (Егорова и др., 2011), культивирование на ней кулусных культур *S. pratensis* показало хорошие результаты с видимым наличием большого количество новообразований в культуре. Оптимальные питательные среды для

культивирования мини-растений и каллусных культур других видов, представленных в настоящей работе, не нашли отражения в литературе, поэтому подбирались с использованием разнообразных соотношений фитогормонов.

4.2. Антимикробная активность некоторых представителей семейства Lamiaceae

Работы по определению антимикробной активности каллусных культур видов шалфей луговой (*Salvia pratensis* L.), шалфей лекарственный (*Salvia officinalis* L.), пахучка обыкновенная (*Clinopodium vulgare* L.), иссоп лекарственный (*Hyssopus officinalis* L.), иссоп меловой (*Hyssopus cretaceus* Dubj.), мята длиннолистная (*Mentha longifolia* (L.) Huds.) проводились впервые для Белгородской области.

Широко в научной литературе рассматривается антимикробное влияние интактных растений шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.). В большинстве работ исследуют влияние эфирного масла и водно-спиртового экстракта шалфея лекарственного на микроорганизмы, при этом доказано большее влияние на грамположительные бактерии, чем на грамотрицательные (Лепешков и др., 2001; Решетников и др., 2015; Тищенко, Филимонова; 2016), что совпадает с нашими результатами. Также встречаются данные об исследовании антимикробной активности эфирного масла интактного растения иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.), которое оказывает влияние, как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактерии (Решетников и др., 2015), что также совпадает с нашими результатами.

Данные по антибактериальной активности шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.), пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.), иссопа мелового

(*Hyssopus cretaceus* Dubj.), мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.) на сегодняшний день нами не обнаружены в научной литературе.

Кроме исследования антимикробной активности интактных растений в настоящей работе представлены результаты по антимикробной активности каллусных культур, которые являются на данный момент актуальными и отражены в работах многих авторов (Агларова и др., 2005; Саакян, Петросян, 2010; Амантаев, Ахметова, 2013).

Полученные нами результаты показывают, что каллусные культуры уже на 6-7 месяце культивирования (6-7 пассаж) накапливают биологически активные вещества и оказывают сильное и умеренное антимикробное действие на микроорганизмы, что подтверждается авторами других научных работ (Саакян и др., 2008).

Сравнительный анализ антимикробной активности интактных растений в условиях *in vivo* и каллусных культур в условиях *in vitro* представлен в небольшом количестве работ. Все это свидетельствует о новизне проводимых нами исследований. Определено, что каллусные культуры большинства видов растений синтезируют большее количество БАВ и обладают более сильным антимикробным действием, чем дикорастущие и плантационные растения (Яковлева, Любаковская, 2010), что совпадает с нашими результатами в отношении растений видов *S. pratensis*, *S. officinalis*, *H. officinalis*, *H. cretaceus*, *M. longifolia*. Данная закономерность не наблюдается только в отношении вида *C. vulgare*, где наблюдается более сильное антимикробное действие экстрактов интактного растения по сравнению с экстрактами, полученными из каллусных культур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день вопросы лечения заболеваний природными антимикробными препаратами, представленными растительными вытяжками и экстрактами, приобретают востребованность, так как они имеют широкий спектр действия, не обладают токсичностью, не вызывают аллергические реакции, не оказывают раздражающего действия (Хаджиева и др., 2010).

Получить в большом количестве биологически активные вещества, обладающие антимикробными свойствами, позволяет культура клеток и тканей *in vitro*. Культура клеток и тканей позволяет получать БАВ без извлечения дикорастущего сырья из природных популяций, тем самым появляется возможность сохранения природных популяций растений. Этот метод также позволяет получать экологически чистое сырье для различных отраслей промышленности, поскольку каллусная ткань выращивается в изолированной среде без воздействия антропогенных факторов (Буркова и др., 2014).

В результате исследований был дополнен созданный нами ранее генетический банк редких, исчезающих и лекарственных растений лаборатории «Инновационных методов исследования растительных объектов» культурами шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.), пахучки обыкновенной (*Clinopodium vulgare* L.), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.), мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* (L.) Huds.), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.). Это позволило исследовать их антимикробные свойства.

Полученные результаты исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Установлена умеренная и слабая антимикробная активность исследуемых видов растений в условиях *in vivo* (интактных растений) на грамотрицательные бактерии (*Escherichia coli* (Migula) Castellani and

Chalmers) и грамположительные бактерии (*Staphylococcus aureus* Rosenbach). Определено, что наибольшим антимикробным действием из изучаемых видов обладает экстракт интактного растения *C. vulgare*.

2. Установлены эффективные стерилизующие агенты для получения асептических и жизнеспособных эксплантов и эксплантов с индукцией каллусогенеза. Определены их оптимальная концентрация и время воздействия. Для большинства исследуемых видов оптимальным режимом является воздействие стерилизующего агента в течение 10 минут, исключение составляет вид *H. cretaceous*.
3. Установлены оптимальные составы питательных сред для культивирования мини-растений *in vitro* и получения каллусных культур из эксплантов;
4. Получены мини-растения *S. pratensis*, *C. vulgare*, *H. officinalis* и *M. longifolia* и каллусные культуры *S. pratensis*, *S. officinalis*, *C. vulgare*, *H. officinalis*, *H. cretaceus* и *M. longifolia*.
5. Установлена сильная, умеренная и слабая антибактериальная активность каллусных культур исследуемых видов (*in vitro*) на грамотрицательные бактерии (*E. coli*) и грамположительные бактерии (*S. aureus*). Определено, что наибольшей антибактериальной активностью из изучаемых видов обладает каллусная ткань вида *H. cretaceus*.

Таким образом, в ходе исследований определена антимикробная активность некоторых представителей семейства *Lamiaceae* флоры Белгородской области в условиях *in vivo* (интактные растения) и *in vitro* (каллусные культуры), проведен сравнительный анализ этих данных. Показана более сильная антимикробная активность каллусных тканей (*in vitro*) по сравнению с интактными растениями (*in vivo*) всех исследуемых видов, кроме *C. vulgare*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абдрахимова, Й.Р. Вторичные метаболиты растений: физиологические и биохимические аспекты. Часть 2. Алкалоиды: учебно-методическое пособие / Й.Р. Абдрахимова. – Казань: Казанский государственный университет, 2009. – 40 с.
2. Абдрахимова, Й.Р. Вторичные метаболиты растений: физиологические и биохимические аспекты. Часть 3. Фенольные соединения: учебно-методическое пособие / Й.Р. Абдрахимова, А.И. Валиева. – Казань: Казанский университет, 2012. – 40 с.
3. Авксентьева, О.А. Биотехнология высших растений: культура *in vitro* / О.А. Авксентьева, В.А. Петренко. – Харьков: ХНУ имени В.Н. Каразина, 2011. – 60 с.
4. Агларова, А.М. Культура *in vitro* и фитохимический анализ полыни эстрагон / А.М. Агларова, З.М. Алиева, А.Г. Юсуфов // Известия вузов. Северо-кавказский регион. Естественные науки. – 2005. – №4. – С. 44-46.
5. Алехина, Н.Д. Физиология растений / Н.Д. Алехина, Ю.В. Балнокин, В.Ф. Гавриленко. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 640 с.
6. Амантаев, Н.Г. Микрклональное размножение и антимикробные свойства эфирномасличных растений: Материалы международной конференции молодых ученых (18 января) / Н.Г. Амантаев, С.Б. Ахметова. – Караганда, 2013. – 184 с.
7. Артемова, Э.К. Основы общей и биоорганической химии: учебное пособие / Э.К. Артемова, Е.В. Дмитриев. – Воронеж: ООО «Издательство КноРУС», 2011.– 113 с.

8. Бабикина, А.В. Растение как объект биотехнологии / А.В. Бабикина, Т.Ю. Горпенченко, Ю.Н. Журавлев // Комаровские чтения. – 2007. – № 4. – 184-213 с.
9. Багирова, В.Л. Настойки, экстракты, эликсиры и их стандартизация / В.Л. Багирова, В.А. Северцев. – С.-Петербург: СпецЛит. – 2001. – 223 с.
10. Беляева, Л.А. Биохимия растений / Л.А. Беляева. – Гомель: ГГУ им. Ф.Скорины, 2009. – 108 с.
11. Бердимуратова, Г.Д. Биологически активные вещества растений: выделение, разделение, анализ / Г.Д. Бердимуратова, Р.А. Музычкина, Д.Ю. Корулькин, Ж.А. Абилов, А.У. Тулегенова. – Алматы: Атамур, 2006. – 438 с.
12. Бидарова, Ф.Н. Современная фармация: проблемы и перспективы развития / Ф.Н. Бидарова. – Владикавказ, 2015. – 465 с.
13. Бойко, Н.Н. Скрининг антимикробных свойств спиртоводных вытяжек из некоторых видов растительного сырья, содержащего хинонпроизводные / Н.Н. Бойко, А.И. Зайцева, Т.П. Осолодченко // Annals of Mechnikov Institute. – 2014. – №4. – С. 67–72.
14. Борисова, Г.Г. Основы биохимии вторичного обмена растений: учебное пособие / Г.Г. Борисова, А.А. Ермошин, М.Г. Малева, Н.В. Чукина. – Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2014. – 128 с.
15. Бугара, И.А. Получение каллусных культур *Mentha piperita* L. и их цитологическая характеристика при выращивании на питательных средах с различной концентрацией селена / И.А. Бугара, О.А. Мальцева // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. – 2011. – №4. – С.17-23.

16. Буданцев, А.Л. Дикорастущие полезные растения России / А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесиовская. – СПб.: Издательство СПХФА, 2001. – 663 с.
17. Буркова, Е.А. Перспектива применения фитобиотехнологии для получения биологически активных веществ / Е.А. Буркова, А.В. Канарский, З.А. Канарская // Вестник Казанского технологического университета. – 2014. – №14. – С 352 – 357.
18. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
19. Валиханова, Г.Ж. Биотехнология растений: учебное пособие / Г.Ж. Валиханова. – Павлодар: Кереку, 2009. – 272 с.
20. Вечканов, Е.М. Основы клеточной инженерии: учебное пособие / Е.М. Вечканов, И.А. Сорокина. – Ростов-на-Дону, 2012. – 136 с.
21. Войнов, Н.А. Современные проблемы и методы биотехнологии / Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н.В. Зобова. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. – 418.
22. Волынец, А.П. Фенольные соединения в жизнедеятельности растений / А.П. Волынец. – Минск: Беларус. навука, 2013. – 283 с.
23. Вшиков, А.А. Основы косметической химии: учебное пособие / А.А. Вшиков. – Екатеринбург: Изд-во Российского государственного профильно-педагогического университета, 2005. – 429 с.
24. Гагиева, Л.Ч. Результаты идентификации органических компонентов в траве мяты длиннолистной хромато-масс-спектрометрическим методом / Л.Ч. Гагиева, Н.Н. Зубарева // Известия Горского государственного аграрного университета. – 2015 - № 52, ч.4. – С. 420-424.
25. Гарей-Матросьян, С.С. Образование и некоторые свойства вторичных метаболитов изолированных культур *Citrullus colocynthis* (L.) Schard.,

- Artemisia aucheri* Boiss. и *Onosma Sericeum* Willd. Флоры Ирана: автореф. дисс. ... канд. биол. наук / С.С. Гарей-Матросьян. – Ереван: НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА ГНКО, 2016. – 19 с.
26. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1990. – 333 с.
27. Гиляров М.С. Биологический энциклопедический словарь / М.С. Гиляров. – М.: "Советская энциклопедия", 1989. – 864 с.
28. Гоголина, Т. Рецепты леса. Часть 2. Лекарственные травы / Т. Гоголина. – Кадуй, 2013. – 127 с.
29. Горчакова, А.Ю. О биологии шалфея лугового на остепненном склоне: материалы I Международной научно-практической интернет – конференции «Теоретические и практические аспекты достижений лекарственных растений» (20-21 марта) / А.Ю. Горчакова. – Харьков: Издательство НФаУ, 2014. – С. 200.
30. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.
31. Грау, Ю. Дикорастущие лекарственные растения / Ю. Грау, Р. Юнг, Б. Мюнкер. – М. : Изд-во АСТ, 2003. – С. 54.
32. Гребенникова, О.А. Биологически активные вещества *Hyssopus officinalis* L. /О.А. Гребенникова, А.Е. Палий, Л.А. Хлыпенко, В.Д. Работягов // Журнал «Орбиталь». – 2017 . – №1. – С.1-8.
33. Губанов, И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Том 3: Покрытосеменные / И.А. Губанов, К.В. Киселева, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров. – Москва: Т-во научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований, 2004. – 520 с.

34. Дзюба, В.Ф. Лекарственные растения в фитотерапии / В.Ф. Дзюба, В.А. Николаевский, В.М. Щербаков, И.М. Коренская. – Воронеж: Воронежский государственный университет. – 83 с.
35. Дитченко, Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений / Т.И. Дитченко. – Минск: БГУ, 2007. – 46 с;
36. Дуктова, Н.А. Заготовка лекарственного растительного сырья: учебно-методическое пособие / Н.А. Дуктова. – Горки: Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, 2010. – 60 с.
37. Думачева, Е.В. Биологические ресурсы семейства Lamiaceae Lindl. в условиях мелового юга Среднерусской возвышенности / Е.В. Думачева, В.И. Чернявских, Ж.А. Бородаева // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – С. 616.
38. Дышко, В.Н. Клеточная и тканевая биотехнология в растениеводстве / В.Н. Дышко. – Смоленск: ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА», 2014. – 69 с.
39. Егорова, Н.А. Изменчивость каллусных культур лаванды при длительном пассировании *in vitro* / Н.А. Егорова // Таврический вестник аграрной науки. – 2017. – №1 (9). – С. 16-27.
40. Егорова, Н.А. Микроразмножение эфиромасличных растений с использованием культуры изолированных тканей и органов *in vitro* / Н.А. Егорова, А.Г. Кривоухатко, И.В. Ставцева, Л.И. Каменек // Таврийский вестник аграрной науки. – 2013. – №1. – С. 9-14.
41. Егорова, Н.А. Морфогенез и клональное микроразмножение *Salvia sclarea* L. *in vitro* / Н.А. Егорова, И.В. Ставцева, И.В. Митрофанова // Труды Никитского ботанического сада. – 2011. – Том 133. – С.41-52.
42. Егорова, Н.А. Некоторые итоги и перспективы биотехнологических исследований эфиромасличных растений / Н.А. Егорова, И.В. Ставцева // Научные труды ИЭЛР. – Симферополь, 2006. – Вып. 26 – С. 19–26.

43. Ермакова, И.П. Физиология растений : учебник для студентов вузов / И. П. Ермакова. – М. : Изд. центр «Академия», 2005. – 640 с.
44. Ермишин, А.П. Биотехнология растений и биобезопасность: пособие / А.П. Ермишин, Е.В. Воронкова. – Минск: БГУ, 2015. – 359 с.
45. Захарычев, В.В. Гербициды и регуляторы роста растений. Основы биохимии и применения / В.В. Захарычев. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2007. – 204 с.
46. Калинин, Ф.Л. Технология микрклонального размножения растений / Ф.Л. Калинин, Г.П. Кушнир, В.В. Сариацкая. – Киев: Наук. Думка, 1992. – 232 с.
47. Каухова, И.Е. Технология фитопрепаратов. Часть 1(методы получения и очистки): методические указания к лабораторным работам / И.Е. Каухова. – СПб.: Издательство СПХФА, 2013. – 80 с.
48. Кильчевский, А.В. Генетические основы селекции растений: Т.3. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия /А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск: Беларус. навука, 2012. – 489 с.
49. Коничев, А.С. Традиционные и современные методы экстракции биологически активных веществ из растительного сырья: перспективы, достоинства, недостатки / А.С. Коничев, П.В. Баурин, Н.Н. Федоровский, А.И. Марахова, Л.М. Марахова, М.А. Черникова // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». – 2011. – № 3. – С. 49 – 54.
50. Коноплева, М.М. Фармакогнозия: природные биологически активные вещества / М.М. Коноплева. – Витебск: УО «Витебский государственный медицинский университет», 2010. – 233 с.
51. Коренская, И.М. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие алкалоиды / И.М. Коренская, Н.П. Ивановская. – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2006. – 63 с.

52. Коровкина, Н.В. Исследование состава бурых водорослей Белого моря с целью дальнейшей переработки / Н.В. Коровкина, Н.И. Богданович, Н.А. Кутакова // Химия растительного сырья. – 2007. – № 1. – С. 59-64
53. Красная книга Белгородской области. Редкие и исчезающие растения, грибы, лишайники и животные. Официальное издание / Общ. науч. ред. А.В. Присный. – Белгород, 2004. – 532 с.
54. Криницына, А.А. Культивирование *in vitro* зародышей некоторых видов *Raeonia* / А.А. Криницына, М.С. Успенская, В.В. Мурашев // Бюллетень Ботанического сада-института. – 2016. – Вып. 15. – С. 43-44.
55. Куркина, А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография / А.В. Куркина. – Самара: ООО «Офорт», ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 290 с.
56. Кьосев, П.А. Лекарственные растения: самый полный справочник / П.А. Кьосев. – М.: Эксмо, 2011. – 944 с.
57. Леонова, М.В. Экстракционные методы изготовления лекарственных средств из растительного сырья: учебно-методическое пособие / М.В. Леонова, Ю.Н. Климочкин. – Самара: Самарский государственный технический университет, 2012. – 118 с.
58. Лепешков, А.Г. Антимикробная активность сверхкритических экстрактов : Материалы международной научно-практической конференции «Продовольственная индустрия Юга России. Экологически безопасные энергосберегающие технологии хранения и переработки сырья растительного и животного происхождения» / А.Г. Лепешков, А.Р. Водяник, К.М. Аверин, М.Г. Гапон, А.В. Алешукина. – Краснодар, 2001. – 31 с.
59. Литвинова, Н.П. Об ареалах трех эндемичных видов меловых обнажений Русской равнины / Н.П. Литвинова, О.С. Горшкова //

- Проблемы экологии, геоботаники, ботанической географии и флористики. – Л.: Наука, Ленингр. отд-ние, 1977. – С. 151 - 155.
60. Лукаткин, А.С. Цитология и клеточная инженерия: учебное пособие / А.С. Лукаткин, А.Н. Дерябин. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 1999. – 200 с.
61. Лукашевич, Н.П. Фармакогнозия: учебно-методическое пособие / Н.П. Лукашевич, Г.Н. Бузук, Н.Н. Зенькова, Т.М. Шлома, И.В. Ковалева, В.Ф. Ковганов, Т.В. Щигельская. – Витебск: ВГАВМ, 2011. – 118 с.
62. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России / П.Ф. Маевский. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 600 с.
63. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. 11-е издание / П.Ф. Маевский. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. – 635.
64. Макаров, В.В. Хемотипы дикорастущих видов мяты флоры СССР / В.В. Макаров // Растительные ресурсы. – 1971. – Т.7. – № 1. – С.24-31
65. Медведев, С.С. Физиология растений: учебник / С.С. Медведев. – СПб.: БХВ-Петербург, 2012. – 512 с.
66. Мельничук, М.Д. Біотехнологія рослин: підручник / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. – К.: Поліграф Консалтинг, 2003. – 520 с.
67. Минина, С.А. Химия и технология фитопрепаратов / С.А. Минина, И.Е. Каухова. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 560 с.
68. Мокшин, Е.В. Изучение способности *Adonis vernalis* L. к морфогенезу в культуре *in vitro*: сборник IX Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (8-12 сентября 2008) / Е.В. Мокшин, А.С. Лукаткин // Москва: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. – 464 с.
69. Мокшин, Е.В. Культура клеток и тканей растений / Е.В. Мокшин, А.С. Лукаткин. – М.: Нобель Пресс, 2013. – 106 с.

70. Мубарак, М.М. Индукция каллусогенеза и соматического органогенеза у различных типов эксплантов мяты болотной / М.М. Мубарак, Р.О. Новаковский, Е.Н. Баранова, М.Ю. Чередниченко // Известия ТСХА. – 2015. – №3. – С. 5-15.
71. Назаренко, Л.В. Биотехнология растений: учебник и практикум для бакалавриата и магистратуры / Л.В. Назаренко, Ю.И. Долгих, Н.В. Загоскина, Г.Н. Ралдугина. – М.: Издательство Юрайт, 2018. – 161 с.
72. Никитина, В.С. Антибактериальная активность полифенольных соединений, выделенных из растений семейств Geraniaceae и Rosaceae / В.С. Никитина, Л.Ю. Кузьмина, А.И. Мелентьев, Г.В. Шендель // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – №6. – С.705-712.
73. Никонович, Т.В. Биотехнология в растениеводстве / Т.В. Никонович, А.Н. Иванистов, В.В. Французёнок. – Горки: БГСХА, 2017. – 84 с.
74. Новиченко, О.В. Получение биологически активных веществ высших водных растений Волго-Каспийского бассейна на примере *potamogeton perfoliatus* L. и *zostera noltii*: состав, свойства и перспективы применения: дис. ... к.т.н.: 05.18.07. – Астрахань, 2016. – 171 с.
75. Окладникова, Н.Н. Биологически активные вещества шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) при интродукции и в условиях *in vitro*: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.12 / Н.Н. Окладникова. – Рамонь: ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы имени А.Л. Мазлумова», 2013. – 23 с.
76. Олисаев, В.А. Дары леса и их использование / В.А. Олисаев, Л.С. Кадиева. - Орджоникидзе: ИП, 1984. - С. 19, 25, 41, 55, 56, 64, 76.
77. Пелях, Е. О внутривидовом полихимизме *M. longifolia* (L.) Huds / Е. Пелях, М. Писова, В. Чобану // Biologie. Seria «Stiinte ale naturii». – 2007. – № 1. – С. 92-96.

78. Плаксина, Т.В. Биотехнология в селекции, размножении и сохранении растений / Т.В. Плаксина, Г.Н. Пищева // Бюллетень Ботанического сада-института ДВО РАН. – 2014. – вып.12. – С. 22 – 30.
79. Племенков, В.В. Введение в химию природных соединений / В.В. Племенков. – Казань, 2001. – 376 с.
80. Попов, В.И. Лекарственные растения / В.И. Попов, Д.К. Шапиро, И.К. Данусевич. – Минск: Полымя, 1990. – 304 с.
81. Расторгуев, С.Л. Культура изолированных тканей и органов в селекции плодовых растений / С.Л. Расторгуев. – Мичуринск: издательство Мичуринского государственного аграрного университета, 2009. – 170 с.
82. Редченкова, В.Н. Анализ требований некоторых фармакопей предъявляемых к экстрактам / В.Н. Редченкова, О.М. Хишова // Химико-фармацевтический журнал. – 2006. – Том 40., №1. – С. 37-40.
83. Решетников, В.Н. Биологическая активность эфирных масел растений в связи с составом и оптической активностью компонентов / В.Н. Решетников, А.Г. Шутова, Е.В. Спиридович // Доклады академии наук Беларуси. – 2015. – №1. – С. 75-77.
84. Решетников, В.Н. Научные и практические аспекты развития биотехнологии растений в Республике Беларусь / В.Н. Решетников, Е.В. Спиридович // Тр. Белорус. гос. ун-та. Сер. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. — 2012. — Т. 7, ч. 1. — С. 69—83.
85. Саакян, Н.Ж. Антибактериальная активность изолированной культуры живучки женеvской *Ajuga genevensis* L. / Н.Ж. Саакян, М.Т. Петросян, Дж. А. Агаджанян // Биологический журнал Армении. – 2008. – №1-2 (60). – С. 60-65.
86. Саакян, Н.Ж. Изучение минимальной ингибирующей концентрации изолированной культуры живучки женеvской / Н.Ж. Саакян, М.Т.

- Петросян // Ученые записки ЕГУ, Химия и биология. – 2010. – №2. – С. 51-53.
87. Сахвон, Е.В. Сравнительный анализ способов асептического введения в культуру *in vitro* растений *Melittis sarmatica* Клок / Е.В. Сахвон, О.А. Кудряшова, И.Ф. Вайновская, А.А. Волотович // Вестник Полесского государственного университета. Серия природоведческих наук. – 2016. – № 1. – С. 22-27.
88. Сащенко, М.Н. Влияние экзогенных факторов среды на морфогенез и регенерационную способность селекционного материала гороха посевного: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 06.01.05 / М.Н. Сащенко. – Томск: ГОУ ВПО «Томский государственный университет», 2007. – 23 с.
89. Сизоненко, С.В. Гісоп лікарський у культуру: Лікарське рослинництво: від досвіду минулого до новітніх технологій: матеріали Міжнародної науково–практичної інтернет–конференції / С.В. Сизоненко, Т.О. Белова. – Полтава, 2012. – С. 82-84.
90. Складневский, Л.Я. Лекарственные растения в быту / Л.Я. Складневский, И.А. Губанов. – М.: Россельхозиздат, 1970. - С. 73, 126, 130, 197.
91. Снегин, Э.А. Практикум по биометрии: учебное пособие / Э.А. Снегин. – Белгород: ИД «Белгород» НИУ «БелГУ», 2016. – 56 с.
92. Соколов, С.Я. Лекарственные растения / С.Я. Соколов, И.П. Замотаев. – М.: «Vita», 1993. -С. 18, 78.
93. Соловьева, А.Ю. Изучение аккумуляции селена и влияния его на накопление первичных и вторичных метаболитов в лекарственном и эфирно-масличном сырье: дисс. ... к.с.-х.н.: 06.01.06 / А. Ю. Соловьева. – Москва, 2014. – 147 с.
94. Сорокина, И.К. Основы биотехнологии растений / И.К. Сорокина, Н.И. Старичкова, Т.Б. Решетникова. – Саратов: Издательство СГУ, 2002. – 34 с;

95. Султангазина, Г.Ж. Биотехнология растений / Г.Ж. Султангазина, Г.А. Абилева. – Костанай: Костанайский государственный университет им. А. Байтурсынова, 2013. – 57 с.
96. Тимофеева, О.А. Культура клеток и тканей растений / О.А. Тимофеева, Н.И. Румянцева. – Казань: Казанский федеральный университет, 2012. – 91 с.
97. Тимчук, К.С. Иссоп лекарственный – содержание эфирного масла и его компонентный состав: материалы международной научной конференции (29-31 мая 2013) / К.С. Тимчук, Т.Г. Железняк, З.Н. Ворнику, И.П. Драгалин. – Минск: ГНУ «Центральный ботанический сад Академии наук Беларуси», 2013. – С.206 – 207.
98. Тищенко, И.Ю. Антимикробная активность эфирных масел мяты перечной, шалфея лекарственного, сосны обыкновенной и мелисы лекарственной: Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин : матеріали II міжнар. наук.-практ. Internet-конф., м. Харків, 21-23 берез / И.Ю. Тищенко, Н.И. Филимонова. – Харьков : НФаУ, 2016. –240 с.
99. Ториков, В.Е. Лекарственная ценность овощных, плодово-ягодных, полевых растений и дикоросов: монография / В.Е. Ториков. – Брянск: Издательство Брянской ГСХА, 2013. – 292 с.
100. Тырков, А.Г. Антимикробная активность эфирных масел, выделенных из растений Астраханского региона / А.Г. Тырков, Л.Т. Сухенко, Э.Р. Акмаев // Вестник Алтайского государственного университета. – 2012. – Т.88. – № 2. – С. 57-59.
101. Тырков, А.Г. Выделение и анализ биологически активных веществ / А.Г. Тырков. – Астрахань : Астраханский государственный университет, Издательский дом «Астраханский университет», 2013. – 104 с.

102. Федоров, А.А. Флора европейской части СССР / А.А. Федоров, Е.Г. Бобров, В.Н. Ворошилов, В.Н. Гладкова, Т.Г. Дергвиз-Соколова, С.С. Иконников, И.А. Линчевский, Ю.Л. Меницкий, В.В. Письяукова, Е.Г. Победимова, А.И. Пояркова, Н.Н. Цвелев. – Ленинград: «Наука», Ленинградское отделение, 1978. – 259 с.
103. Ходжиева, З.Д. Изучение антимикробной активности лекарственных препаратов с фитозэкстрактом / З.Д. Ходжиева, Е.А. Теунова, И.С. Крахмалев // *Pharmaceutical sciences*. – 2010. – №11. – С. 152 – 154.
104. Хоружая, Т.Г. Экстракционные фитопрепараты промышленного производства: учебно-методическое пособие / Т.Г. Хоружая, В.С. Чучалин. – Томск: Издательство НТЛ, 2004. – 123 с.
105. Цыренов, В.Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений / В.Ж. Цыренов. – Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003 – 58 с.
106. Черевченко, Т.М. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro* / Т.М. Черевченко, А.Н. Лаврентьева, Р.В. Иванников. – Киев: Наукова думка, 2008. – 633 с.
107. Чмелева, С.И. Каллусные культуры *Fatshedera lizei* – продуценты тритерпеновых гликозидов / С.И. Чмелева, Т.Ю. Брановицкая, Д.А. Панов, А.В. Омельченко, И.А. Бугара // *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского*. – 2011. – №2. – С. 313 – 320.
108. Шевелуха, В.С. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.З. Кочиева. – М.: «Высшая школа», 2008. – 710 с.
109. Широков, А.И. Основы биотехнологии растений / А.И. Широков, Л.А. Крюков. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 49 с.

110. Шутова, А.Г. Оценка антиоксидантной активности экстрактов и эфирных масел пряно-ароматических и лекарственных растений / А.Г. Шутова // Растительные ресурсы. – 2007. – Т.43. – вып.1. – С. 112-125.
111. Юрин, В.М, Основы ксенобиологии: учебное пособие / В.М. Юрин. – Минск: ООО “Новое знание”, 2002. – 267 с.
112. Юткина, И.С. Антимикробные свойства водных настоев солодки уральской / И.С. Юткина, А.Р. Кувакова // Международный научно-исследовательский журнал. Фармацевтические науки. – 2013. – №9(6). – С. 35-36.
113. Якимова, О.В. Индукция каллусогенеза в культуре изолированных органов *Origanum vulgare* L. / О.В. Якимова, Н.А. Егорова // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2014. – №2. – С.159-160.
114. Яковлева, О.А. Антимикробная и антиоксидантная активность сирени сорта «М.Шолохов» *in vivo* и в культуре *in vitro* / О.А. Яковлева, Л.А. Любаковская // Вестник ВГМУ. – 2010. – №1. – С. 28-35.
115. Якушкина, Н.И. Физиология растений / Н.И. Якушкина. – М.: Просвещение, 1980. — 446 с.
116. Angiosperm Phylogeny Group An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III // *Botanical Journal of the Linnean Society*. — London, 2009. — Т. 161, № 2. — P. 105—121.
117. Aniszewski, T. Alkaloids – secrets of life / T. Aniszewski. – Amsterdam: 2007. –143 p.
118. Benson, E.E. Plant Conservation Biotechnology / E.E. Benson. – London, University of Abertay, UK: Taylor and Francis Group, 1999. – 309 p.

119. Chang, D.-W. Kinetics of cell lysis for *Microcystis aeruginosa* and *Nitzschia palea* in the exposure to β -cyclocitral / D.-W. Chang, M.-L. Hsieh, Y.- M. Chen, T.-F. Lin, J.-S. Chang // *Journal of Hazardous Materials*. – 2011. – № 185. – P. 1214–1220.
120. Chen, C. Localization of Cytokinin Biosynthetic Sites in Pea Plants and Carrot Roots / C. Chen // *Plant Physiology*. – 1985. – №78. – 510-513 c.
121. Gamborg, O.L. The effect of amino acids ammonium of the growth of plant cells in suspens culture /O. L. Gamborg // *Plant Physiol.* – 1975. – №45. – 372-375 c.
122. Gershenzon, J. Plant Defenses: Surface Protectants and Secondary Metabolites. In *Plant Physiology* / J. Gershenzon, L.Taiz and E.Zeiger // Sinauer Associates, Sunderland, Mas-sachusetts, 2003. – №1. – PP. 347-376.
123. Ginovyan, M. Antimicrobial activity of some plant materials used in Armenian traditional medicine /M. Ginovyan, M. Petrosyan, A. Trchounian // *BMC Complement Altern Med.* – 2017. – № 17. – P. 50 – 59.
124. Handa, S. S. Extraction technologies for madicinal and aromatic plants / S.S. Handa, S.P.S. Khanuja, G. Longo, D.D. Rakesh. – Trieste (Italy): International centre for science and high technology, 2008. – 266 p.
125. Hesse, M. Alkaloids. Nature's Curse or Blessing / M. Hesse // *Wiley-VCH*, 2002. – № 1. – P. 283 –291.
126. Hostettmann, Kurt. Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods. Volume 1. / Kurt Hostettmann. – Chichester: Wiley, 2014. – 569 p.
127. Hudault, S. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection / S. Hudault, J. Guignot, A.L. Servin // *Gut*. – 2001. – № 49 (1). – P. 47–55.

128. Kluytmans, J. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks / J. Kluytmans, A. Belkum, H. Verbrugh // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1997. – №10 (3). – P. 505–520.
129. Mulabagal, V. Plant Cell Cultures – An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites / V. Mulabagal // *International Journal of Applied Science and Engineering.* – 2004. – № 2. – P. 29–48.
130. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F.A. Skoog // *Physiologia Plantarum.* – 1962. – №15. – 473-397 c.
131. Nitsch, J.P. Haploid plants from pollen grains /J.P/ Nitsch // *Sciencel.* – 1969. – № 3842. –587-589 c.
132. Rojas, J.J. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. / J.J. Rojas, V.J. Ochoa, S.A. Ocampo, J.F. Munoz // *BMC Complement Altern Med.* – 2006. –№ 6. – P. 2.
133. Tiwari, P. Phytochemical screening and extraction: a review / P. Tiwari, B. Kumar, M. Kaur, G. Kaur, H. Kaur // *Internationale Pharmaceutica Scientia.* – 2011. – Vol.1, Issue 1. – P. 98-106.
134. Verpoorte, R. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites / R. Verpoorte, A. Contin , J. Memelink // *Phytochem. Rev.*– 2002.– Vol.1.– P.13–25.
135. Vogt, R.L. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June-July 2002 / R.L. Vogt, L. Dippold // *Public Health Rep.* – 2005. – № 120 (2). – P. 174–8.
136. Wiegand, I. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances / I. Wiegand, K. Hilpert, REW. Hancock // *Nat Protoc.* – 2008. – №3. – P. 163–175.

137. Zschocke, S. Plant part substitution – a way to conserve endangered medicinal plants? / S. Zschocke // J. Ethnopharmacol.– 2000.– Vol.71, №1-2.– P. 281–292.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Состав питательной среды Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962)

Компоненты среды	Концентрация в средах по прописи, мг/л
Макросоли	
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ ×7H ₂ O	370
CaCl ₂ ×2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
Микросоли	
MnSO ₄ ×4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ ×4H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₄	6,2
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,025
Хелатное железо	
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27,8
NaEDTA×2H ₂ O	37,3
Витамины	
Мезоинозит	100
Тиамин-НСl	0,1
Пиридоксин-НСl	0,5
Никотиновая кислота	0,5
Глицин	2,0