

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(НИУ «БелГУ»)

ИНСТИТУТ ФАРМАЦИИ, ХИМИИ И БИОЛОГИИ
Кафедра биотехнологии и микробиологии

**ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ IN VITRO НЕКОТОРЫХ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА ЗВЕРОБОЙНЫЕ
(HYPERICACEAE) И АСТРОВЫЕ (ASTERACEAE)**

Выпускная квалификационная работа студентки
очной формы обучения
направления подготовки 19.03.01 Биотехнология
4 курса группы 11001617
Семькиной Валерии Витальевны

Научный руководитель
кандидат биологических наук
доцент кафедры
биотехнологии им микробиологии
НИУ «БелГУ»
Маслова Е.В.

**БЕЛГОРОД
2020**

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Получение изолированных органов растений.....	7
1.1.1. Преимущества и перспективы использования метода получения изолированных культур.....	8
1.1.2. Факторы и стадии получения изолированных культур клеток и тканей.....	10
1.1.3. Условия, влияющие на получение изолированных растений in vitro.....	12
1.1.4. Особенности лаборатории для культивирования растений в условиях in vitro.....	13
1.1.5. Правила асептики при введении в культуру in vitro.....	14
1.1.6. Типы питательных сред	17
1.2. Характеристика некоторых видов семейств <i>Hypericaceae</i> и <i>Asteraceae</i>	20
1.2.1. Биологическая характеристика и перспективы применения.....	21
<i>Hypericum perforatum</i> L.	21
1.2.2. Биологическая характеристика и перспективы применения.....	24
<i>Echinacea purpurea</i> L.....	24
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	27
2.1. Материалы исследования.....	27
2.2. Методы исследования.....	27
2.2.1. Сбор, сушка и хранение растительного материала	27
2.2.2. Питательные среды для культивирования изолированных культур клеток и тканей в условиях in vitro	28
2.2.3. Создание асептических условий в лаборатории.....	29
2.2.4. Стерилизация растительных объектов.....	30
2.3. Статистическая обработка данных.....	31
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	33

3.1. Стерилизация растительных эксплантов вида	33
<i>Hypericum perforatum</i> L.	33
3.2. Стерилизация растительных эксплантов вида <i>Echinacea purpurea</i> L.	39
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	45
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	47
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	53

ВВЕДЕНИЕ

Растительные объекты широко используются в современном мире, в различных отраслях промышленности: сельском хозяйстве, фармацевтической, пищевой и косметической промышленности.

Растения, имеющие в своем составе биологически активные вещества и обладающие антимикробными и антиоксидантными свойствами, могут выращиваться в культуре *in vitro*, не зависимо от их условий произрастания и места (Авксентьева, 2011). Так же в культуру *in vitro* могут быть введены растения редких и исчезающих видов, входящие в Красную книгу России и Белгородской области. Это необходимо для не только сохранения исчезающих видов в природе, но и использования их в качестве растительного сырья для различных областей промышленности.

Альтернативным методом синтеза экономически выгодных биологически активных веществ является изолированная культура клеток и тканей в условиях *in vitro*, которая, как и интактное растение синтезирует биологически активные вещества (Чмелева и др., 2011).

Виды *Hypericum perforatum* L. и *Echinacea purpurea* L. являются лекарственными растениями, которые содержат в своём составе ценные химические вещества, на основе которых произведено множество фармацевтических препаратов и БАДов. Поэтому именно они были выбраны для введения в культуру *in vitro* и дальнейшего исследования.

Метод введения растительных объектов в культуру *in vitro* один из перспективных методов, так как он используется не только в генетике и селекции, но и нашел своё применение в физиологии и практическом использовании клеточных культур.

Пополнение генетического банка лаборатории *in vitro* один из наиболее перспективных путей сохранения и поддержания биоразнообразия растений Белгородской области. Для этого важно подобрать стерилизующий агент перед введением в культуру *in vitro*, а так же разработать наиболее

эффективный режим культивирования и микроклонального размножения индивидуально для каждого вида растений.

Учитывая все выше сказанное, можно считать, что метод изолированных культур клеток и тканей *in vitro* можно использовать разносторонне, как для сохранения генофонда в условиях *in vitro*, так и для ускоренного их микроклонального размножения. А также как альтернативный источник получения биологически активных веществ для медицинской, парфюмерной, косметической промышленности (гликозиды, стероиды, алкалоиды, эфирные масла) на основе каллусных тканей, которые культивируются на агаризованных и жидких средах. Продуктивность каллусных культур превышает в разы продуктивность интактных растений. Поэтому на основе метода культуры клеток и тканей производят такие препараты, как аймалин – на основе клеток раувольфии змеиной (*Rauvolfia serpentina*), диосгенин – на основе клеток диоскореи (*Dioscorea*), так же есть препарат на основе каллусной ткани женьшеня (*Panax*).

Поэтому, нами была выбрана следующая цель: введение в культуру *in vitro* некоторых представителей семейства Зверобойные (Hypericaceae) и Астровые (Asteraceae).

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить оптимальные стерилизующие агенты для растительных объектов видов *H. perforatum* L. и *E. purpurea* L.
2. Оптимизировать режим стерилизации растительных объектов видов *H. perforatum* L. и *E. purpurea* L.
3. Получить в культуре *in vitro* проростки видов *H. perforatum* L. и *E. purpurea* L.

Объектами исследования послужили лекарственные растения флоры Белгородской области, один из которых произрастает на территории области *H. perforatum*, а второй интродуцирован *E. purpurea*.

Предметом исследования являлось введение растительных объектов в культуру *in vitro*.

Научная новизна данного исследования заключается в том, что будут подобраны оптимальные стерилизующие агенты и режимы стерилизации растительных объектов *H. perforatum* L. и *E. purpurea* L.

Введение растительных объектов в культуру *in vitro* проведено в лаборатории «Инновационных методов исследования растительных объектов» кафедры биотехнологии и микробиологии НИУ «БелГУ».

Полученные результаты исследований опубликованы в нескольких статьях и тезисах.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Получение изолированных органов растений

В настоящее время клеточная и тканевая инженерия растений одно из перспективных направлений биотехнологии. Клеточная и тканевая инженерии включает в себя культивирование растительных объектов в условиях *in vitro*, а также проведение с ними различных манипуляций (Бутенко, 2008).

Культура клеток и тканей представлена органами растений, наращиваемыми в стерильных, лабораторных условиях на искусственных питательных средах.



Рис. 1.1. Виды культивирования клеток, тканей и органов растений на искусственных питательных средах

История метода культивирования изолированных клеток и тканей растений содержит несколько этапов:

1. С 1892 по 1902 гг. - немецкие учёные Хаберландт, Фёхтинг и Рехингер проводили культивирование растительной ткани в растворе сахарозы. Хаберландт предложил гипотезу о тотипотентности любой живой растительной клетки.

2. С 1902 по 1922гг. – произошло создание питательных сред для культивирования тканей животных.

3. С 1922 по 1932 гг. - американский ученый Робинс и немецкий ученый Котте стали культивировать на твердых питательных средах корни томатов и кукурузы.

4. С 1932 по 1940 гг. - французский ученый Готре представил длительное культивирование тканей растений в условиях *in vitro*, которое было осуществлено с помощью периодического пересаживания их на свежую питательную среду.

5. С 1940 по 1960 гг.- после открытия в 1955 году нового класса фитогормонов – цитокининов, была получена возможность стимулирования деления клеток кусочков ткани сердцевины паренхимы табака.

6. С 1960 по 1975 гг. - профессор Ноттингемского университета Коккинг разработал ферментативный способ получения изолированных протопластов из корней и плодов томата, культивирование которых проводилось в контролируемых условиях.

7. С 1975 г. по настоящее время - продолжается интенсивное развитие техники культивирования растительных объектов в условиях *in vitro* (Мурашкина, 2015).

1.1.1. Преимущества и перспективы использования метода получения изолированных культур

Метод изолированной культуры клеток и тканей лежит в основе клеточной и тканевой биотехнологии растений. Это один из альтернативных методов получения биологически активных веществ из растений (Джаксыбаева, Султумбаева, 2015).

Изолированная культура по сравнению с интактными растениями имеет множество преимуществ:

- Получение экологически чистых продуктов независимо от климатических, сезонных и географических условий и антропогенных факторов среды
- Сохранение редких и исчезающих растений продуцентов, в виде экстрактов
- Возможность стандартизировать условия выращивания
- Создание клеточных линий сверх продуцентов
- Синтез новых веществ, для биотрансформации конечных продуктов
- Возможность автоматизации процессов. (Лукашевич и др., 2011; Решетников, Спиридович, 2012).

Получение изолированных культур клеток и тканей состоит из нескольких этапов, в каждом из которых имеются индивидуальные перспективы использования.

1. Отбор растений в культуре *in vitro* на устойчивость к внешним отрицательным факторам среды: например, избытку минеральных солей в почве, непостоянному температурному режиму и тяжёлым металлам (Пятигорская, 2013). Использование биотехнологического метода, для создания новых форм растений является одним из перспективных направлений в области сельского хозяйства и растениеводства.

2. Использование метода каллусных тканей для оздоровления и размножения посадочного материала. Перспектива данного подразделения заключается в быстром и эффективном размножении ценных генотипов, путем микрклонального размножения растений в условиях *in vitro*. Преимущество нового метода по сравнению с традиционной технологией состоит в разведении и ускорении тех видов, которые совершенно не воспроизводятся либо плохо воспроизводятся обычным способом.

3. Получение большего количества биологически активных веществ, ценных для косметического, лекарственного и других видов

производства на основе изолированных клеточных культур (Пронченко, Вандышев, 2013). Преимущество заключается в том, что появляется возможность расширить спектр генетического разнообразия, уменьшить сроки селекции, а так же получить биологическую форму растения, которое будет устойчиво к биотическим и абиотическим факторам внешней среды.

4. Также выделяют ещё одно дополнительное направление, это метод криоконсервации культивируемых клеток и тканей растений. С помощью данного метода, мы можем длительное время хранить клетки и ткани растений при температуре жидкого азота (-196°C), это необходимо с той целью, чтобы создать банк ценных видов растений. (Мокшин и др., 2013).

Все этапы использования метода изолированных культур клеток и тканей имеют практическое применение в различных отраслях современной промышленности. Возможно, использовать данный метод в косметологии для получения кремов на основе растений обладающих антиоксидантной активностью, в сельском хозяйстве и медицине для замены антибиотиков, а так же можно использовать в пищевой промышленности в виде добавок и приправ (Дышко, 2014).

1.1.2. Факторы и стадии получения изолированных культур клеток и тканей

Изолированная культура клеток и тканей — это клетки и кусочки тканей растений, которые могут произрастать либо сохранять жизнеспособность вне организма в изолированных условиях *in vitro*.

Тип изолированной культуры зависит от источника происхождения и лабораторных условий выращивания.

В процессе получения изолированных культур в условиях *in vitro* все клетки и ткани проходят основные стадии своей жизнедеятельности:

1) Лаг-фаза;

- 2) Экспоненциальная фаза;
- 3) Фаза замедленного роста;
- 4) Стационарная фаза;
- 5) Фаза деградации и отмирания клеток (Рис. 1.1.3).

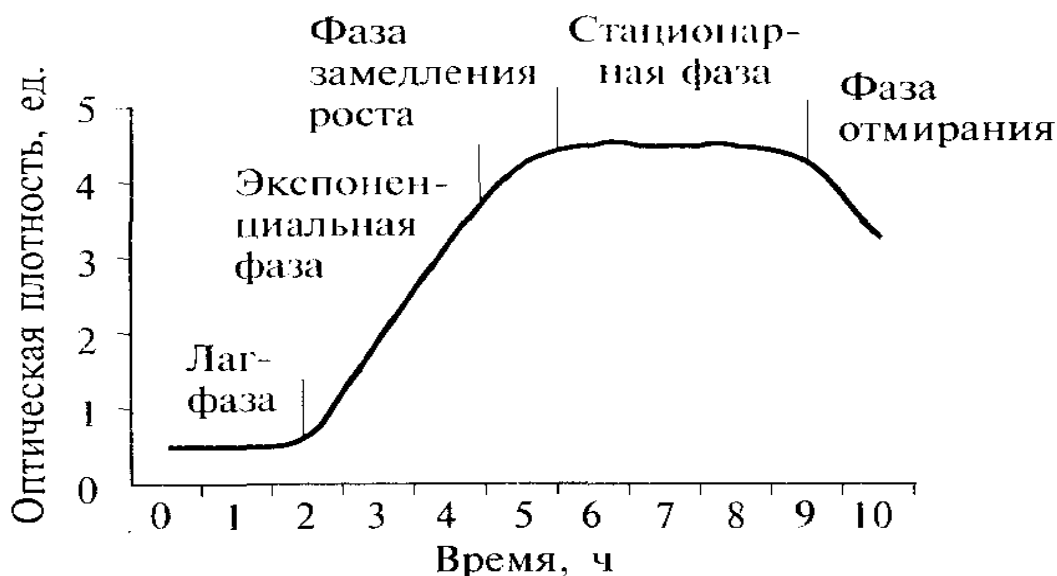


Рис. 1.1.3. Фазы роста изолированных культур клеток и тканей при культивировании в условиях *in vitro*

Первая фаза (Лаг-фаза) заключается в подготовке растительных клеток к делению.

В экспоненциальной фазе самая высокая митотическая активность синтеза, происходит ускоренный рост и увеличение каллусной культуры.

В третьей – фазе замедленного роста происходит истощение питательной среды, но размер клеток продолжает возрастать.

Стационарная фаза подразумевает сохранение постоянного значения биомассы, так как начинается отмирание клеток, которое компенсируется за счет новых клеточных делений.

Затем в фазе деградации происходит отмирание изолированной культуры.

При продолжительном культивировании клеток и тканей высших растений в условиях *in vitro* образуется специфическая популяция, которая

относится к типу неполовых (популяция соматических клеток). Данной популяции свойственны такие характеристики как: физиологическая асинхронность, генетическая гетерогенность и гормон независимость (Авксентьева, 2011).

Физиологическая асинхронность – это важное свойство неполовой популяции, которое заключается в том, что в каждый данный временной промежуток клетки находятся в различных фазах роста, одни клетки делятся, вторые растут, а третьи уже стареют. Поэтому, физиологическое состояние такой популяции оценивают по состоянию большей части клеток (Вечканов, 2012).

Генетическая гетерогенность – это формирование идентичных или подобных фенотипов при разнообразных генетических причинах, так же может быть результатом любых мутаций (Бутенко, 2010).

Только клетки меристематических тканей могут быть стабильными на геномном уровне. В остальных случаях при культивировании в условиях *in vitro* могут возникать такие мутации как: полиплоидия, анеуплоидия, хромосомные aberrации, генные трансформации. С другой стороны, генетическая гетерогенность не может являться минусом, так как это важное условие существования популяции клеток, которое служит основой для их адаптации (Мурашкина и др., 2015, Егорова и др., 2013).

1.1.3. Условия, влияющие на получение изолированных растений *in vitro*

На получение изолированных растений влияют различные факторы. Наиболее важными являются физические факторы, такие как:

- **Свет.** Многие семян начинают произрастать при сильном освещении, некоторые, наоборот, в полной темноте из-за отсутствия способности к фотосинтезу. В качестве источника света в лаборатории

выступают люминесцентные лампы. Кроме интенсивности света, на проростки, так же влияет еще и его качество (Малаева, 2016).

- **Температура.** Прорастание происходит в термостатах, в которых оптимальная температура для процесса составляет от 23 до 26 °С. Этот фактор влияет на рост в условиях *in vitro*, а так же активность ферментов.

- **Влажность.** Влажность помещения, в котором произрастают культуры, составляет от 60 до 70%. Если в комнате воздух будет сухой, то произойдет усыхание питательной среды в пробирках и баночках, особенно если они закрыты ватно-марлевыми пробками.

- **pH среды.**

Действие факторов окружающей среды на растительные объекты не всегда полностью изучено, но от них зависит получение проростков в условиях *in vitro*. Поэтому когда вводят новый вид в культуру *in vitro* необходимо подробно изучить влияние всех внешних факторов на рост и физиологические характеристики относительно данного вида растения (Назаренко и др., 2018).

1.1.4. Особенности лаборатории для культивирования растений в условиях *in vitro*

Лаборатория должна состоять из 3 помещений:

1. Комната с ламинарными – боксами, где проводятся все манипуляции по пересадке и введению в культуру растительных эксплантов.
2. Комната для приготовления питательных сред.
3. Моечная
4. Автоклавная
5. Световые, темновые культуральные комнаты.

Иногда из-за ограниченного пространства, приходится объединять некоторые комнаты вместе, например, можно объединить комнату для приготовления питательных сред, моечную и стерилизующую (автоклавную).

В моечном помещении должны быть установлены мойки с холодной и горячей водой, дистиллятор и бидистиллятор, шкафы для хранения сухой посуды, а так же емкости для моющих и дезинфицирующих веществ. Обязательно должен быть сушильный шкаф для сушки вымытой посуды и заодно ее стерилизации (Цыренов, 2013).

Комната по приготовлению питательных сред оснащена лабораторными столами, аналитическими весами, магнитными мешалками, рН-метром, электрическими плитками, посудой для приготовления сред и необходимыми веществами и реагентами. Так же должны быть установлены холодильник для хранения маточных растворов макро и микро солей, витаминов, фитогормонов и других веществ.

В комнате для стерилизации должны быть сухожаровые шкафы для стерилизации посуды и инструментов, а так же автоклавы для стерилизации питательных сред. Помещение обязательно должно быть оснащено приточно-вытяжной вентиляцией.

Комната для работы с изолированными культурами клеток и тканей содержит ламинарные – боксы, УФ лампы, шкафы для хранения стерильных питательных сред и инструментов с посудой.

Культуральная комната делится на две части:

- световое отделение, с лампой близкой к спектру светового дня (от 3 до 10 кЛк),
- темновое отделение, то есть без источника света.

1.1.5. Правила асептики при введении в культуру *in vitro*

Главным условием введения в культуру *in vitro* это соблюдение асептических условий в лаборатории. Потому что в случае развития

микроорганизмов, происходит повреждение питательных сред и самих изолированных культур. Из-за этого все этапы работ проводятся в строго стерильных условиях (Дитченко, 2007).

Стерильные условия достигаются с помощью данных методов:

1. Текущим паром (автоклавированием, пастеризацией, кипячением);
2. Дробная стерилизация (тиндализация);
3. Стерилизация сухим жаром (в сухожаровых шкафах);
4. Прокаливание над пламенем горелки;
5. Химическими реагентами (стерилизующими растворами);
6. Фильтрованием с помощью бактериальных фильтров;
7. С помощью воздействия ультрафиолетовых лучей;

Для соблюдения всех правил асептики при выполнении блока работ по введению растительных эксплантов в культуру *in vitro* стерилизации подвергаются:

- Операционная комната (ламинарная, в которой производят посадку и пересадку культур);
- Одежда и руки рабочего персонала;
- Посуда, которая используется при культивировании;
- Все инструменты и материалы, необходимые при работе;
- Питательные среды;
- А также сами объекты культивирования.

Ламинарные – боксы, в настоящее время, востребованы для работы в лабораториях. Асептические условия в них достигаются с помощью подачи стерильного воздуха в рабочую область, а так же УФ – лампами, которые обеспечивают стерильность рабочей поверхности. Но даже после этих всех процедур, перед началом работы рабочую поверхность ламинара протирают 70% спиртом.

Вся посуда, используемая в работе, так же проходит этап стерилизации. Сначала ее моют мыльным раствором, затем ополаскивают дистиллированной водой и сушат.

Для стерилизации сухим жаром в сухожаровом шкафу посуду либо заворачивают в фольгу, либо помещают в специальные боксы и стерилизуют 1,5-2 часа при температуре 160°C. При такой стерилизации происходит гибель не только бактерий, но и их спор.

Так же возможна стерилизация посуды текучим паром в автоклаве, при 1,5– 2 атм. (120–130 °С), на протяжении 30-40 минут. Посуда так же заворачивается в фольгу, в пипетки и колбы закрываются ватно-марлевыми пробками.

Стерильная посуда используется только для одноразовой манипуляции, для повторного использования его необходимо поместить в спирт, а затем обжечь в пламени спиртовки или горелки.

Стерилизация инструментов происходит в сухожаровом шкафу (160-170°C) в течение 2 часов. При работе с инфицированными изолированными культурами возможно мгновенное и эффективное обеззараживание с применением гласперленового стерилизатора (Егорова и др., 2009).

Питательные среды без термолабильных веществ, проходят стерилизацию в автоклаве (0,5-1 атм.) 20 минут. Сначала готовые среды разливают по колбам, которые затем закрывают ватно-марлевыми пробками или фольгой (Калашникова, 2012).

Для стерилизации сред с термолабильными веществами используют метод холодной стерилизации.

Так как растительные объекты тоже являются источником посторонней микрофлоры, то они тоже подвергаются стерилизации под действием различных стерилизующих агентов. Стерилизацию эксплантов проводят растворами веществ, которые в своём составе имеют:

1. активный хлор, который содержится в:
 - сулеме

- хлорамине
- гипохлорите кальция и натрия
- 2. бром (бромная вода)
- 3. диацид
- 4. перекись водорода
- 5. антибиотики
- 6. . спирт

При подборе стерилизатора необходимо учитывать несколько правил:

- Стерилизующий агент должен пагубно влиять на все микроорганизмы и при этом не наносить вред растительному экспланту;
- Подбирать концентрацию и длительность применения стерилизатора в зависимости от плотности и чувствительности растительной ткани;
- Вещество должно легко удаляться из тканей с помощью промывания дистиллированной водой или же оно должно легко разлагаться.

Перед стерилизацией растительный объект необходимо промыть в мыльном растворе, а затем ополаснуть в дистиллированной воде и погрузить его на 30 секунд в 70% спирт (этанол), если это семена, то на 1-2 минуты. Затем очищенный растительный материал помещают в стерилизующие растворы.

После стерилизации, объект необходимо промыть тремя порциями стерильной воды, выдерживая эксплант в каждой по 15 минут.

1.1.6. Типы питательных сред


Правильно подобранная питательная среда - это главный аспект при культивировании изолированных культур клеток и тканей растений. Получение культуры *in vitro* происходит на многокомпонентной среде, которая состоит из:

1. Макроэлементов (N, P, S, K, Ca, Mg, Fe)

2. Микроэлементов (В, Мп, Zn, Cu, Мо)
3. Источника углерода
4. Витаминов
5. Регуляторов роста.

В состав питательных сред входят витамины, такие как: рибофлавин, тиамин, пантотеновая кислота, биотин, пиридоксин, аскорбиновая кислота (Alaiwi1, 2012).

Основным определяющим фактором роста является содержание различных регуляторов роста. В состав среды часто входят фитогормоны ауксины и цитокинины. Ауксины – фитогормоны, которые являются универсальным регулятором роста. Цитокинины - фитогормоны, стимулирующие деление клеток растений. На рисунке 1.1.6. показано влияние растительных гормонов на различные растительные объекты.



	Эксплант	Каллус	Корни	Побеги	Нет роста
Ауксин	–	3,00 мг/л	3,00 мг/л	0,03 мг/л	–
Цитокинин	–	0,2 мг/л	0,02 мг/л	1,00 мг/л	0,2 мг/л

Составу		Функция*
Ауксин	3-Индолилуксусная кислота, (2,4-дихлорфенокси)уксусная кислота (синтетический ауксин) и другие	Индукцирует рост в длину, в больших концентрациях ингибирует образование корней и деление клеток
Цитокинины	Кинетин, 6-бензаминопурин Абсцизовая кислота Гибберелин и другие	Стимулирует образование каллуса Стимулирует дифференцировку Стимулирует деление клеток и рост в длину

* Ауксин: образование каллуса. Цитокинин: незначительное деление клеток

Рис.1.1.6. Влияние растительных гормонов (Шмид Р.Д., 2020)

Регулируя содержания фитогормонов в питательной среде, можно получить различные варианты морфогенеза растительных эксплантов. Из ауксинов чаще всего применяют 2,4 – Д (дихлорфеноксиуксусную кислоту) в концентрации 1 мг/л, а так же НУК (а – нафтилуксусную кислоту) 0,1 – 2 мг/л, а так же ИУК (индолил – 3 – уксусная кислота). Из цитокининов

используют кинетин, б – БАП (б – бензиламинопурин) и зеатин. Наиболее эффективное соотношение фитогормонов устанавливается экспериментальным путём (Кулаева, 2013).

В составе среды могут быть и антиоксиданты, такие как: аскорбиновая кислота, глутатион, дитиотриэтол, диэтилтиокарбамат, поливинилпирролидон (Буркова, 2014).

В качестве источника углерода используют глюкозу или сахарозу в концентрации от 20 до 60 г/л.

В таблице 1.1.6 представлен состав питательных сред различных авторов для культивирования растений в условиях *in vitro*.

Таблица 1.1.6

Состав питательных сред, для культивирования *in vitro*

Компоненты сред	Концентрация (мг/л) в средах по прописи				
	Мурасиге и Скуга	Гамборга и Эвелега	Уайга	Нича, Нич	Као и Ми-хайлока
KNO ₃	1900	3000	81	950	1900
NH ₄ NO ₃	1650	–	–	720	600
Ca(NO ₃) ₂	–	–	142	–	–
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	–	–	–	–	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	–	134	–	–	–
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	500	74	185	300
CaCl ₂ ·H ₂ O	–	–	–	166	–
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	150	–	–	–
KCl	–	–	65	–	300
KH ₂ PO ₄	170	–	12	68	170
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	–	150	–	–	–
MnSO ₄ ·H ₂ O	–	10	–	–	10
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	–	–	25	–
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8,6	–	–	–	2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	–	2	–	10	–
H ₃ BO ₄	6,2	3	–	10	3,6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,075	–	0,025	0,025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	–	0,25	0,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	–	–	0,025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	–	–	27,8	5,0
NaEDTA·2H ₂ O	37,3	–	–	37,3	–
Секвестрен 330–Fe	–	28	–	–	–
Мезоинозит	100	–	–	200	100
Аскорбиновая кислота	–	–	–	3	–
Тиамин–HCl	0,5	–	–	3	0,005
Пиридоксин–HCl	0,5	–	–	1	0,005
Никотиновая кислота	0,5	–	–	–	–
Сахароза	30000	20000	20000	60000	125

Для приготовления твердых питательных сред используют агар, являющийся уплотнителем среды, в количестве 6,5-7 г/л. Культуры изолированных клеток и тканей растут на средах с pH = 5,5-5,8.

Чаще всего для культивирования *in vitro* используют среду Мурасиге – Скуга (Murashige, Skoog, 1962), которая первоначально была разработана для культивирования табака. Затем были разработаны и другие типы питательных сред, такие как:

- Для культивирования бобовых растений и злаковых культур используют среды Гамборга и Эвелега;
- Для роста стеблевой пластины после регенерации и ускорения роста побегов лучше всего подходит среда Уайта;
- Чтобы произошла индукция андрогенеза в культуре пыльников злаковых культур, необходима среда Ничей;
- Для культивирования изолированных клеток и протопластов используют среду Као и Михайлюка.

Типы питательных сред пополняются с каждым днём, так как для каждого вида растений подбирают индивидуальный состав. Для труднокультивируемых клеток и тканей разрабатывают специальные сложносоставные питательные среды.

1.2. Характеристика некоторых видов семейств *Hypericaceae* и *Asteraceae*

Белгородская область находится в Европейской части России, на территории Среднерусской возвышенности. Флора характеризуется зональностью и включает в себя: широколиственные леса и степи.

В Белгородской области насчитывается 1284 вида растений, которые делятся в зависимости от расположения: земля, вода, глина, песок (Еленевский и др., 2004).

В дикой флоре региона произрастает большое количество лекарственных растений, в том числе эфирных и медоносных, таких как: зверобой, шалфей луговой, ромашка аптечная, терн, шиповник дикий и др. (Бидарова, 2015).

Вид *Hypericum perforatum* L. можно встретить в лесах и полях области, а *Echinacea purpurea* L. является интродуцированным, поэтому в Белгородской области в основном его можно встретить только как декоративное растение.

1.2.1. Биологическая характеристика и перспективы применения

Hypericum perforatum L.

Зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum* L.) – относится к роду зверобой (*Hypericum*) семейству зверобойные (*Hypericaceae*).

Зверобой (*Hypericum*) – травянистое лекарственное растение, широко используется в медицине, для лечения различных заболеваний.

Семейство Зверобойные (*Hypericaceae*) насчитывает 40 родов и свыше 1000 видов растений, самый известный из них зверобой продырявленный. Чаще всего Зверобой можно встретить в лесной, лесостепной и степной зоне европейской части России, а так же в Западной и Восточной Сибири, Забайкалье, на Кавказе, в Крыму, Средней Азии, в Белоруссии и Украине.

H. perforatum L. – небольшое травянистое растение, полукустарник, стебель высотой от 30 до 100 см.; листья имеют продолговатую форму, гладкие, с хаотично расположенными по листовой пластинке просвечивающими, а по краям черными точками (секреторными вместилищами); соцветие – метёлка; цветки с пятилепестным венчиком желтого цвета, с бурыми пятнами. После цветения на месте бутонов образуются плоды – это небольшая коробочка с семенами (Горкин, 2008). Общий вид растения *H. perforatum* L. представлен на рис. 1.2.1.



Рис. 1.2.1. Общий вид растения *H. perforatum* L. (Губанов, Киселева, 2003)

В мире вид *H. perforatum* L. распространен в Японии, на Корейском полуострове, Северо - Восточном Китае, Америке (США, Канада).

Данный вид занесен в Красные книги Республики Карелия (2007, 209) и Ханты-Мансийского автономного округа (2013, 388) .

Карта распространения *H. perforatum* L. на территории России представлена на рис. 1.2.2.



Рис. 1.2.2. Карта распространения вида *H. perforatum* L. на территории России.

Первые упоминания о зверобое встречаются в XVII веке при царе Михаиле. Его поставляли на царский двор с Западной Сибири. Уже тогда зверобой использовали в народной медицине для заживления ран, грудных болях и кашле.

В селах при набивании соломой детских матрасов, обязательно клали веточку зверобоя, люди считали, что запах растения огородит ребенка от испуга во время сна.

Сейчас в медицине все более популярно лечение лекарственными препаратами на растительной основе, в том числе и на основе зверобоя.

Препараты из зверобоя могут применяться как спазмолитики, дезинфицирующие и противовоспалительные средства, а так же как мочегонное. Витаминный состав дополняет лечебные свойства.

Широкий спектр фармакологических свойств связан с химическим составом растения.

В литературных источниках указано, что в растении содержатся гиперин, гиперинин, эфирные масла 0,2-0,3%, дубильные вещества 10-12%, смолистые вещества 17%, антоцианы (5-6%), сапонины, кумарины, флавоноиды (рутин, кверцитрин, изокверцитрин, гиперизид) и антибиотик гиперфорин. Так же в составе имеются и органические кислоты, в частности изовалериановая (Беляева, 2009). Так же зверобой богат витаминами: никотиновой кислотой, витамином Е, витаминами Р и РР, аскорбиновой кислотой, а также каротином. Есть в его составе и цериловый спирт, холин и следы алкалоидов.

Надземная часть содержит:

- золу – 4,21%;
- макроэлементы (мг/г): К – 16,80, Са – 7,30, Мп – 2,20, Fe – 0,1;
- микроэлементы (КБН): Mg – 0,25, Cu – 0,34, Zn – 0,7, Со -0,2, Мо – 5,60, Se – 5,00, Ni – 0,18, Sr -0,18, Cd – 7,20, Pb – 0,08.

В качестве действующих веществ выступают конденсированные антраценовые производные – гиперинин и псевдогиперинин (0,5%).

Поэтому, растительную фитомассу *H. perforatum* L. можно применять в нескольких отраслях промышленности, таких как: фармация, косметология и пищевая промышленность.

1.2.2. Биологическая характеристика и перспективы применения

Echinacea purpurea L.

Эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea* L.) - относится к роду эхинацея (*Echinacea*) семейству Астровые (*Asteraceae*).

Эхинацея (*Echinacea*) – многолетнее, травянистое растение, которое обладает иммуномодулирующими, противовирусными, противомикробными и антибактериальными свойствами, применяется в народной медицине и современной фармакологии (Mistríková, 2006).

Род *Echinacea* насчитывает 11 видов, самые известные из них эхинацея белая, пурпурная, а так же узколистная, все они нашли применение в народной медицине.

Высота растения 90 – 130 см, стебли прямые, могут быть ветвистые, покрыты щетинистыми волосками. Имеет поочередное расположение листьев, листья узкие, овальной формы с опушением и соцветия корзинки одиночные с диаметром до 15 см. Лепестки заостренные, яркие. Сердцевина красно-коричневого цвета (Кьюсев, 2011).

Цветет эхинацея с июня и до первых заморозков. Семена созревают в октябре (Цилин, 2015). Общий вид растения *E. purpurea* представлен на рисунке 1.3.

Впервые ее лечебные свойства были описаны еще североамериканскими шаманами. Ею лечили простуду, головные боли, раны, ожоги, а так же использовали при укусах ядовитых змей и насекомых. В Европе эхинацея появилась в XVII веке в качестве декоративного растения.

На рисунке 1.2.3. представлен общий вид растения вида *E. purpurea*.



Рис. 1.2.3. Общий вид растения *E. purpurea* (Киселёва и др., 2010)

Родиной растения является восточная часть Северной Америки, там эхинацея произрастает в дикой природе на песчаных берегах рек, каменистых почвах и засушливых районах. В европейских странах используется как декоративное растение, которое выращивают на садовых участках, парках и садах. В России в Самарской области и Краснодарском крае осуществляется выращивание *E. purpurea* в промышленных масштабах (Самородов, 1996).

Карта распространения *E. purpurea* на территории России представлена на рис. 1.2.4.



Рис. 1.2.4. Карта распространения вида *E. purpurea* на территории России.

У эхинацеи богатый химический состав, в который входят: микроэлементы (Zn, Se, Fe, Mn, Si, Ca, Co, Ag, K и др.), витамины, а так же эфирные масла, органические кислоты, алкалоиды, дубильные вещества, полисахариды (гетероксиланы, арабинорамногалактаны), гликозиды, смолы, ферменты и флавоноиды (рутин и никотифлорин) (Абдрахимова, 2012).

Все эти вещества находятся в цветах, стеблях, листьях и корневище (Куркин, 2010).

На основе травяного сока и растительных экстрактов производят БАДы и лекарственные препараты (Лавренов, 2007).

Лекарственные препараты на основе *E. purpurea* занимают лидирующие позиции на рынке иммуномодуляторов растительного происхождения (Авдеева, 2007). Во Всероссийском институте лекарственных и ароматических растений из *E. purpurea* в 1995 г. получен препарат «Эстифан», который применяется в качестве иммуностимулирующего препарата при иммунодефиците. Так же в наших аптеках можно встретить такой препарат как «Иммунал», который на 80% состоит из сока цветущей эхинацеи и рекомендован для профилактики гриппа и простуды.

Так же перспективно применение полисахаридов, входящих в состав эхинацеи, в качестве средства, которое является противодействующим вызываемой противоопухолевыми препаратами лейкопении (Сакович и др. 2010).

Так же было установлено, что эхинацею пурпурную можно применять и как кормовую добавку, так как при добавлении *E. purpurea* в корм молодняку крупного рогатого скота или свиней она благоприятно влияет на их рост.

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Материалом исследования являлись семена лекарственных растений: зверобоя продырявленного (*H. perforátum* L.) и эхинацеи пурпурной (*E. purpurea* L.).

Материал был собран на территории Корочанского района Белгородской области в селе Ломово на правом берегу реки Корень и в ботаническом саду НИУ «БелГУ». Для определения видов растений использовали определитель П.Ф. Маевского (2014).

Сбор производили 2 раза: в конце июня и начале августа 2019года.

Работы по стерилизации и введению в культуру *in vitro* были проведены в лаборатории «Инновационных методов исследования растительных объектов» (Россия, НИУ «БелГУ», кафедра биотехнологии и микробиологии).

2.2. Методы исследования

В качестве методов исследования были использованы следующие:

- сбор, сушка и хранение растительных объектов;
- приготовление питательных сред для культивирования изолированных культур клеток и тканей в условиях *in vitro*;
- стерилизация растительных объектов ;
- создание асептических условий;
- статистическая обработка полученных данных.

2.2.1. Сбор, сушка и хранение растительного материала

Сбор растительного сырья произведен в сухую погоду, при полном созревании семян. Срезали соцветия с верхней части стебля (примерно

посередине), затем формировали небольшие пучки и помещали их в заранее подготовленные пакеты с этикетками (Дуктова, 2010).

Сушка проводилась природным теплом в проветриваемом помещении, без воздействия прямых солнечных лучей и без посторонних, резких запахов. Соцветия раскладывали тонким слоем на бумагу, периодически переворачивая их.

После высушивания отделяли семена из соцветия и переносили в отдельные бумажные пакеты с указанием вида и времени сбора растения для последующего хранения. Хранили при комнатной температуре в сухом месте.

Сбор, сушка и хранение были произведены по общепринятым в ботанике методикам (Середин и др., 1973, Тризна, 1992).

2.2.2. Питательные среды для культивирования изолированных культур клеток и тканей в условиях *in vitro*

Введение растительных объектов в культуру *in vitro* производили на агаризованных питательных средах Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962). Качественный и количественный состав среды представлен в приложении 1.

Чтобы получить проростки в стерильных условиях семена помещали на питательную среду, без фитогормонов.

Первым этапом приготовления питательной среды является получение маточных растворов макро - и микроэлементов, а также хелатного железа, хлористого кальция и витаминов, хранение которых осуществляется в отдельных колбах с указанием названия вещества и даты изготовления. С помощью мерных цилиндров производим отбор растворов, а затем переносим их в колбу, в которой уже находится растворенный агар (6,5 г/л). Затем измеряем уровень pH с помощью pH-метра P-VP 10 Sartorius PB 11, нужное значение 5,6 - 5,8, если значение больше или меньше то с помощью

кислоты и щелочи доводим до нужного. Разливаем среду по баночкам, в которые будем помещать растительные объекты и после этого стерилизуем их водяным паром под давлением в автоклаве.

Приготовление питательной среды было произведено по стандартным методикам, для растительных культур клеток и тканей (Шевелуха и др., 2008; Сорокина и др., 2002; Калинин и др., 1992).

2.2.3. Создание асептических условий в лаборатории

Обязательным этапом при введении в культуру *in vitro* семян, является создание и соблюдение асептических условий в лаборатории.

Работа по введению в культуру *in vitro* и пересадку на свежую питательную среду, проводится в ламинарных – боксах «Lamsystems» II класса защиты.

А работа по части микробиологии, исследование антибактериальной активности, была проведена в ламинарных – боксах «Lamsystems» III класса защиты.

Перед рабочим процессом в операционной комнате включаются все УФ лампы в ламинарных боксах, на 1,5 часа, для достижения асептических условий.

Вход в операционную комнату разрешается в бахилах, маске, шапочке, халате и перчатках. Работа в боксе начинается только после обработки рабочей поверхности 96% спиртом (Азарова, 2008).

Инструменты необходимые для работы так же подвергаются стерилизации в сухожаровом шкафу, посуду стерилизуют в автоклаве.

Асептические условия создаются и поддерживаются в операционной комнате согласно общепринятым методам для работы с изолированными культурам клеток и тканей (Егорова и др., 2013; Лутова, 2010).

2.2.4. Стерилизация растительных объектов

Перед тем как приступить к стерилизации растительные объекты тщательно промывали водопроводной водой в сите с использованием моющего средства, промывали 2-3 раза, затем ополаскивали дистиллированной водой (Тимофеева и др., 2016). Затем для проведения дальнейших манипуляций объекты переносили в ламинарную комнату в микробиологический бокс «Lamsystems» II класса, A2 типа (Verpoorte, 2002).

Стерилизация была ступенчатой, в качестве стерилизующих агентов выступали вещества химической природы (белизна, биоцид, сулема, гипохлорит натрия, лизоформин, перекись водорода), перед стерилизацией в стерилизатор семена помещали в 70% раствор этанола на 1 минуту.

Для первой опытной группы использовали «Лизоформин 3000» (ООО «Гигиена плюс»). Раствор представляет собой жидкость голубого цвета, которая содержит в своём составе глутаровый альдегид, глиоксаль, который обладает бактерицидной активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, а так же спороцидной, вирулицидной и фунгицидной активностью. Применяли 3 концентрации 3%, 5% и 10%.

Для второй опытной группы семян в качестве стерилизатора выступила белизна. Белизна – светло – желтый раствор, обладающий дезинфицирующими и антисептическими свойствами, за счёт наличия в своём составе гипохлорита натрия с концентрацией от 5% до 15%. Стерилизатор применяли в 2 концентрациях: 100% и разбавленный напополам дистиллированной водой, то есть 50%, время воздействия так же составляло 10, 15 и 20 минут.

Для третьей группы был использован биоцид 3%, 5% и 10%. Это химическое вещество, подавляющее все процессы жизнедеятельности любых видов микроорганизмов.

Четвертую группу стерилизовали в перекиси водорода с концентрациями 36%, 18% и 9%. Обладает гемостатическим эффектом, является антисептическим средством.

Для пятой группы использовали Сулему 0,1% . раствор сулемы обладает сильным дезинфицирующим и антибактериальным действием.

Для шестого опыта был использован «Хлорамин Б» в 5% концентрации. Хлорамин – это органическая соль Na, обладающая дезинфицирующими свойствами по отношению к микроорганизмам, так как в своём составе содержит активный хлор.

Для седьмой опытной группы был использован 0,1% раствор нитрата серебра, который обладает антисептическим и бактерицидным действием.

Для всех стерилизаторов время воздействия было 10, 15 и 20 минут. Концентрированные растворы разбавляли до нужной концентрации дистиллированной водой.

Затем проводили отмывание семян автоклавированной дистиллированной водой в трёхкратной повторности по 15 минут.

Манипуляции по стерилизации растительных объектов были проведены по общепринятым методикам, для работы с культурами клеток и тканей растений (Шевелуха и др., 2008).

2.3. Статистическая обработка данных

Обработку данных полученных в ходе эксперимента производили при помощи программного пакета Microsoft Excel. Для этого нами были использованы статистические характеристики, такие как: средняя арифметическая величина ($x_{\text{ср}}$), ошибка средней величины ($Sx_{\text{ср}}$).

Для оценки достоверности различий полученных данных между опытными и контрольной группами использовали критерий Стьюдента, так как у нас было всего 3 экспериментальных повторности.

Статистическую обработку так же проводили по общепринятым методикам в биометрии (Зайцев, 1984; Снегин, 2016).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Стерилизация растительных эксплантов вида

Hypericum perforatum L.

Испытывали действие стерилизующих растворов: «Лизоформин 3000» (3%, 5%, 10%); «Белизна» (100%, 50%); «Биоцид» (3%, 5%, 10%); «Перекись водорода» (36%, 18%, 9%) и «Сулема» (0,1%) на семена зверобоя в течение 10,15 и 20 минут.

На рисунке 3.1. представлен результат влияния лизоформина на стерильность растительных эксплантов вида *H. perforatum*.

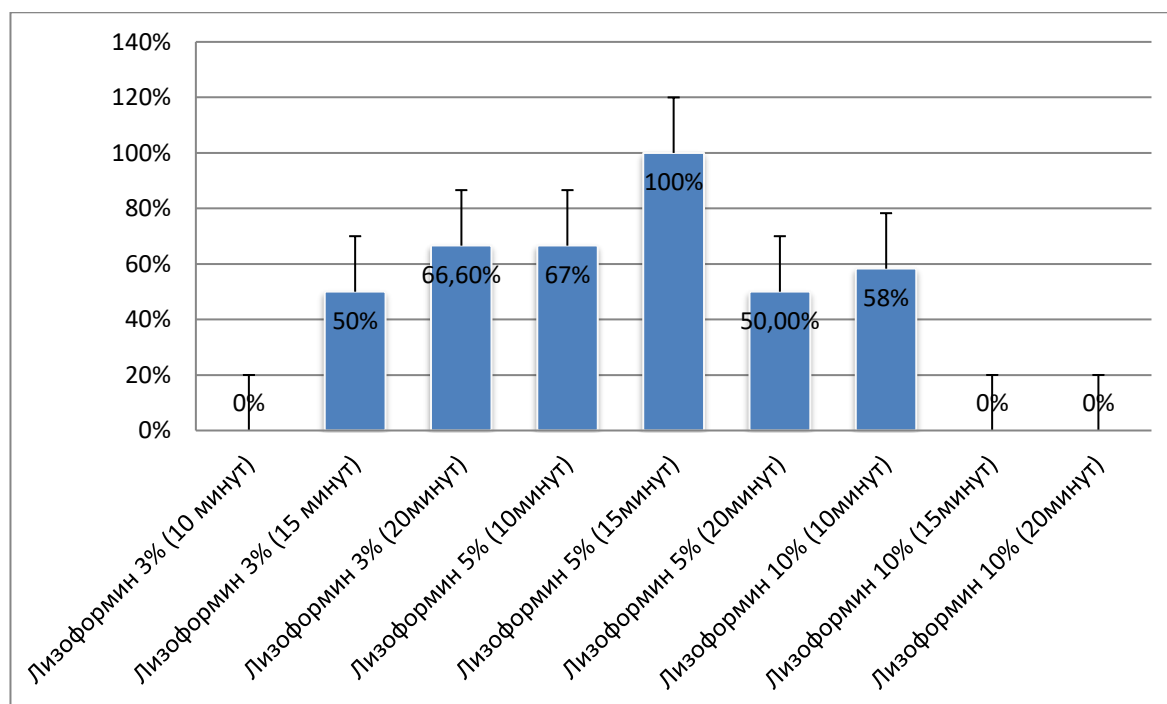


Рис.3.1. Влияние лизоформина на стерильность растительных эксплантов вида *H. perforatum*

Исходя из рисунка 3.1. можно сделать вывод, что наилучшим режимом стерилизации является воздействие 5% лизоформином в течение 15 минут.

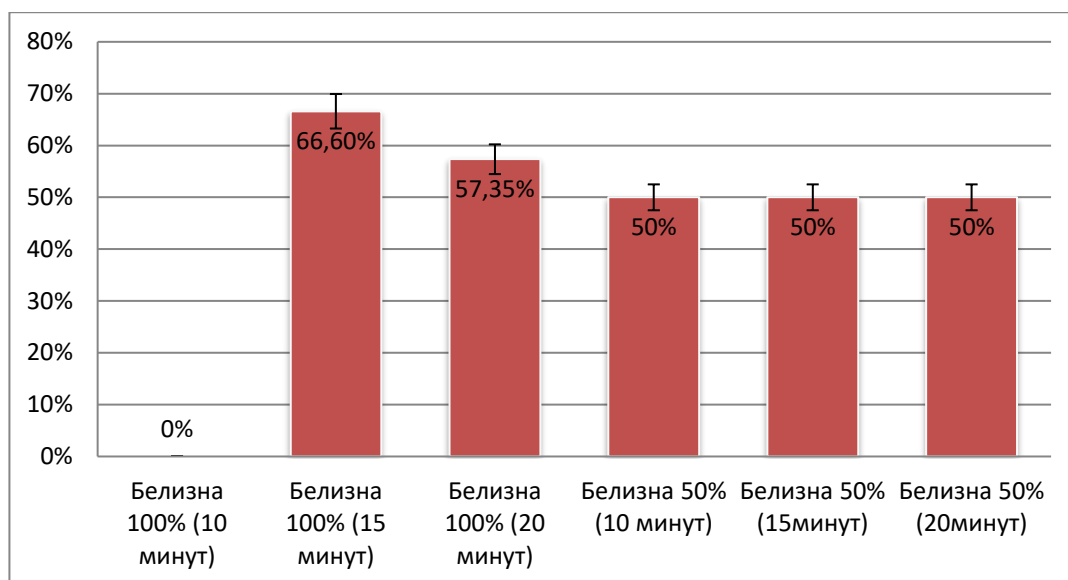


Рис.3.2. Влияние белизны на стерильность растительных эксплантов вида *H. perforatum*

Результаты влияния дезинфицирующих свойств белизны представлены на рис.3.2. Из диаграммы видно, что наилучшим режимом стерилизации является использование 100% белизны в течение 15 минут, так же можно отметить воздействие 100% белизны в течение 20 минут и стерилизацию 50% белизной в течение времени 10, 15 и 20 минут.

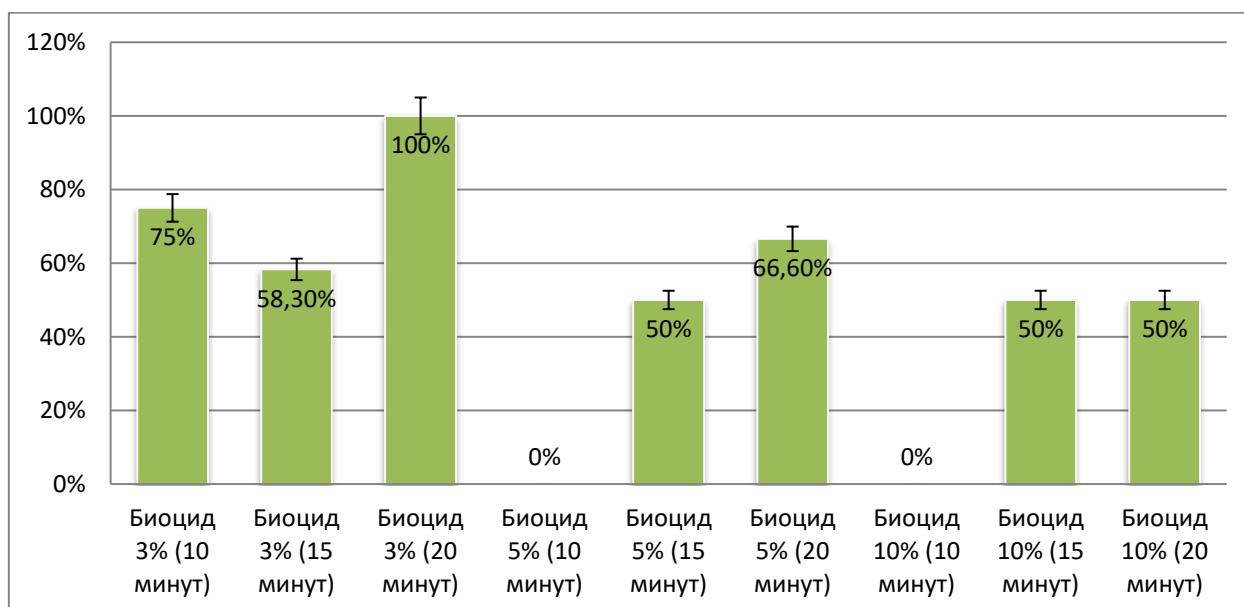


Рис.3.3. Влияние биоцида на стерильность растительных эксплантов вида *H. perforatum*

Результаты влияния дезинфицирующих свойств биоцида представлены на рис.3.3. Из диаграммы видно, что оптимальным является режим использования 3% концентрации биоцида со временем воздействия 20 минут. Так же неплохие результаты даёт использование 3% биоцида на протяжении 10 минут и 5% биоцида в течение 20 минут.

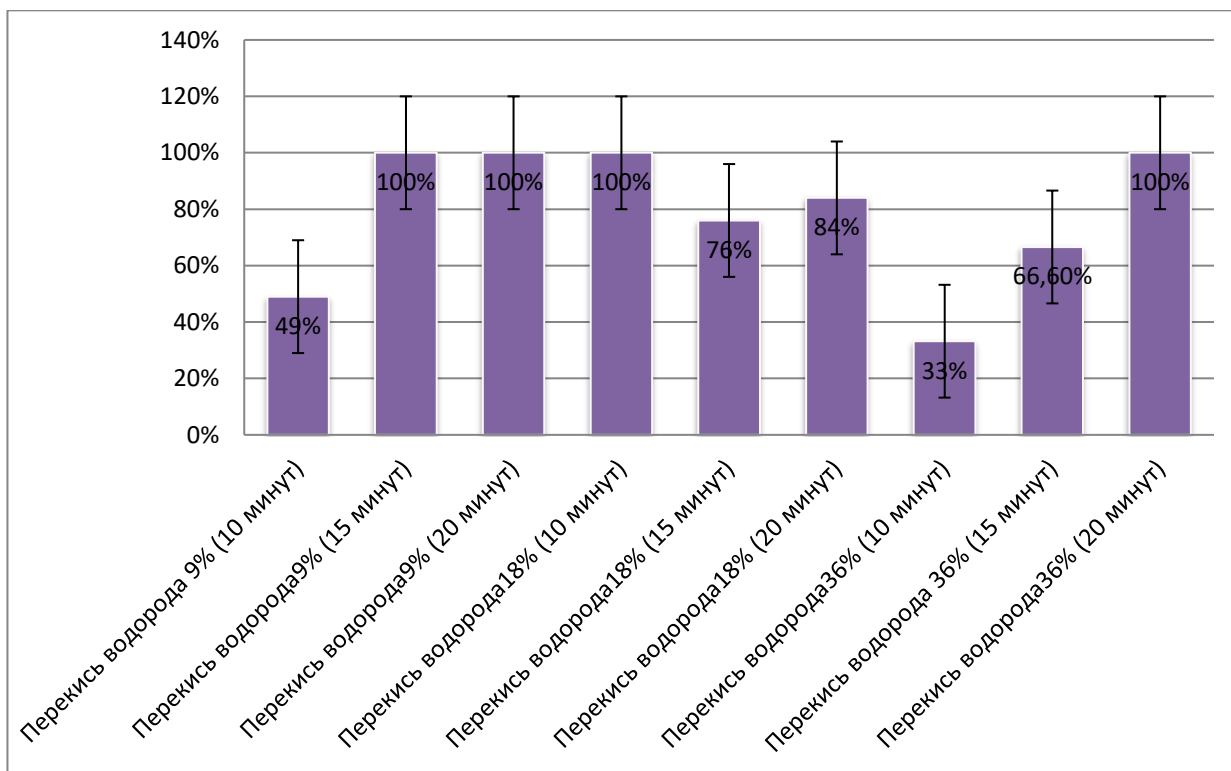


Рис.3.4. Влияние перекиси водорода на стерильность растительных эксплантов вида *H. perforatum*

Результаты влияния дезинфицирующих свойств перекиси водорода представлены на рис.3.4. При воздействии перекисью водорода сработали все концентрации, но более эффективное воздействие у 9% перекиси в течение 15 и 20 минут, у 18% в течение 10, 15 и 20 минут, а у 36% перекиси водорода в течение 20 минут.

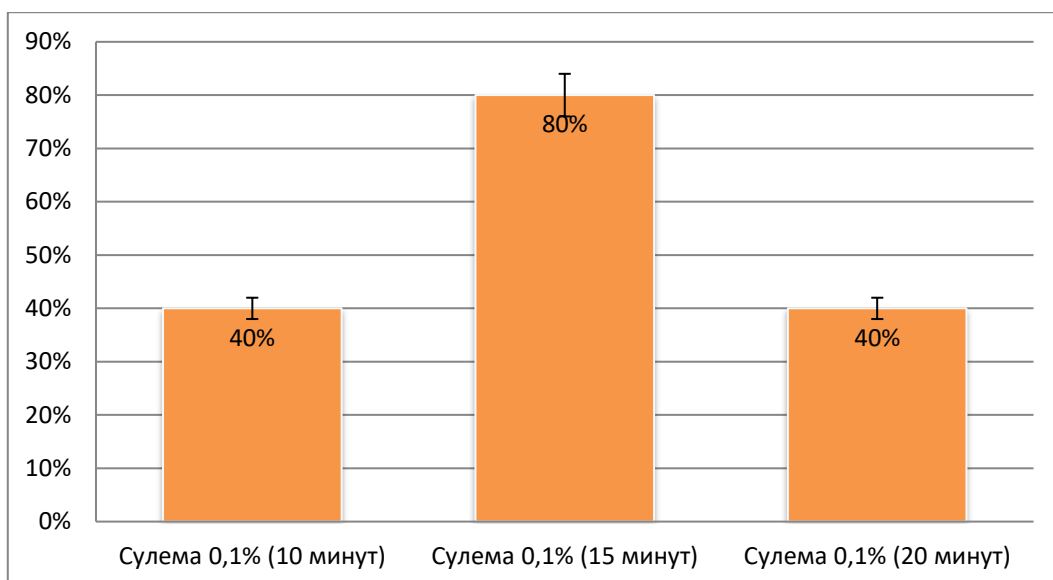


Рис.3.6. Влияние сулемы на стерильность растительных эксплантов вида *H. perforatum*

Результаты влияния дезинфицирующих свойств сулемы представлены на рис.3.6. Для стерилизации 0,1% сулемой наиболее эффективное время воздействия составило 15 минут.

На рисунке 3.7. представлены полученные проростки *H. perforatum* в условиях in vitro.

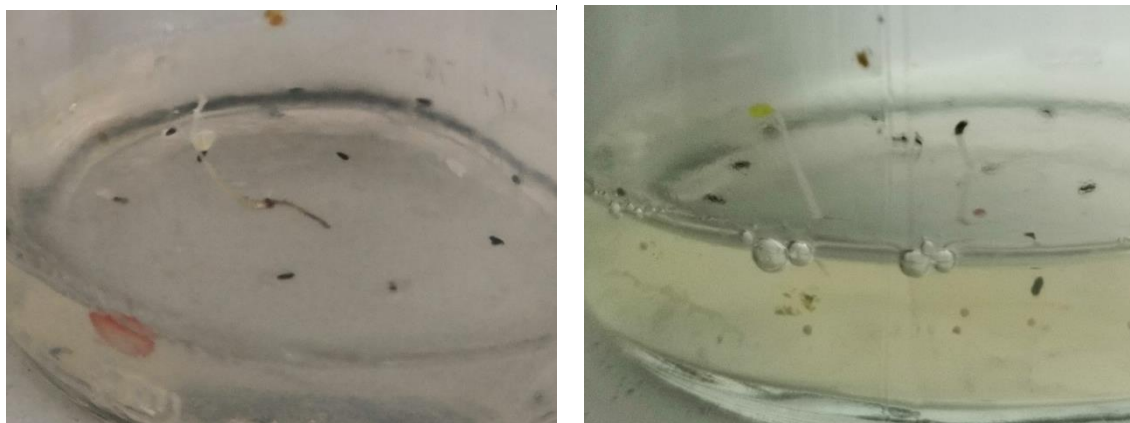


Рис.3.7. Стерильные проростки вида *H. perforatum* в культуре in vitro.

Результаты воздействия режимов стерилизации на получение стерильных и жизнеспособных проростков вида *H. perforatum* представлены в таблице 3.1.

Воздействие режимов стерилизации на получение стерильных и жизнеспособных проростков вида *H. perforatum*

Стерилизующий агент	Длительность стерилизации, (мин.)	Количество стерильных эксплантов, (%)	Количество жизнеспособных эксплантов, (%)	Критерий Стьюдента (t)
Лизоформин 3%	10	0 ± 0	0 ± 0	0
Лизоформин 3%	15	50 ± 2	0 ± 0	3,472
Лизоформин 3%	20	83,3 ± 1	0 ± 0	7,788
Лизоформин 5%	10	83,3 ± 1	0 ± 0	7,788
Лизоформин 5%	15	100 ± 0	0 ± 0	0
Лизоформин 5%	20	50 ± 2	0 ± 0	3,472
Лизоформин 10%	10	0 ± 0	0 ± 0	0
Лизоформин 10%	15	0 ± 0	0 ± 0	0
Лизоформин 10%	20	0 ± 0	0 ± 0	0
Белизна 100%	10	0 ± 0	0 ± 0	0
Белизна 100%	15	83,3 ± 1	0 ± 0	7,788
Белизна 100%	20	58,3 ± 1,5	16,6 ± 1	6
Белизна 50%	10	50 ± 2	25 ± 1,5	3,472
Белизна 50%	15	50 ± 2	0 ± 0	3,472
Белизна 50%	20	50 ± 2	8,3 ± 0,5	3,472
Биоцид 3%	10	83,3 ± 1	0 ± 0	7,788
Биоцид 3%	15	75 ± 1,5	0 ± 0	6,458
Биоцид 3%	20	100 ± 0	0 ± 0	0
Биоцид 5%	10	0 ± 0	0 ± 0	0
Биоцид 5%	15	50 ± 2	0 ± 0	3,472
Биоцид 5%	20	50 ± 2	0 ± 0	3,472
Биоцид 10%	10	0 ± 0	0 ± 0	0
Биоцид 10%	15	50 ± 2	0 ± 0	3,472
Биоцид 10%	20	50 ± 2	0 ± 0	3,472
Перекись водорода 36%	10	50 ± 2	0 ± 0	3,472
Перекись водорода 36%	15	83,3 ± 1	16,6 ± 1	7,788
Перекись водорода 36%	20	100 ± 0	0 ± 0	0
Перекись водорода 18%	10	100 ± 0	0 ± 0	22,916
Перекись водорода 18%	15	100 ± 0	0 ± 0	0
Перекись водорода 18%	20	100 ± 0	0 ± 0	0

Продолжение таблицы 3.1.

Перекись водорода 9%	10	74±1,5	0 ± 0	17,777
Перекись водорода 9%	15	100±0	0 ± 0	0
Перекись водорода 9%	20	100±0	0 ± 0	0
Сулема 0,1%	10	50±2	20±1,79	7,986
Сулема 0,1%	15	100±0	8,3 ± 0,5	0
Сулема 0,1%	20	50±2	0 ± 0	3,472

Используя критерий Стьюдента, установили, что значения стерильных и жизнеспособных эксплантов (табл.3.1) статистически достоверны.

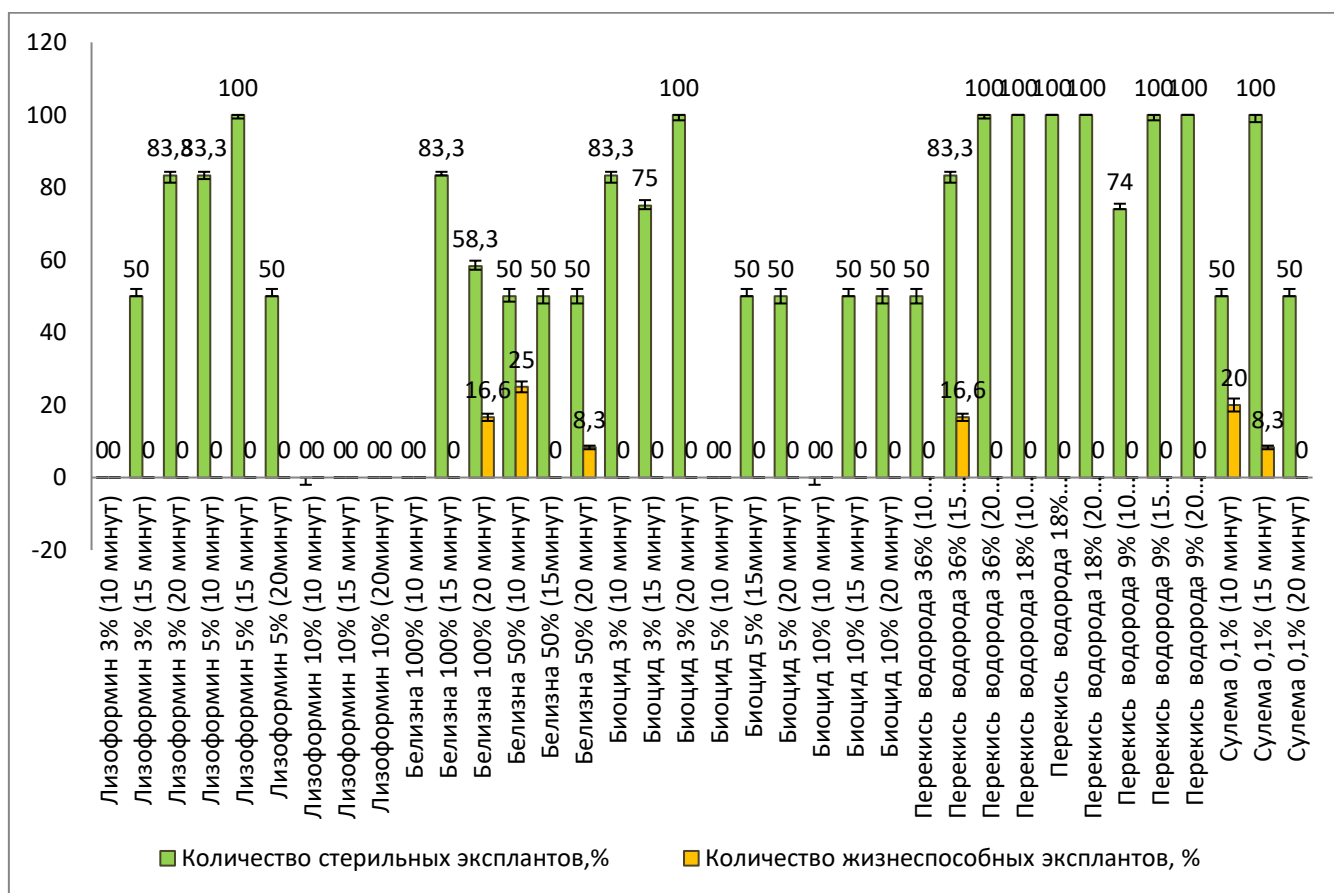


Рис.3.8. Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных и жизнеспособных проростков вида *H. perforatum*

Исходя из данных на рис.3.8. установлено, что для вида *H. perforatum* эффективными стерилизующими агентами являются: белизна 50% при воздействии в течение 10 минут, белизна 100% в течение 20 минут, перекись водорода 36% при воздействии в течение 15 минут, сулема 0,1% при воздействии в течение 10 и 15 минут, так как получены наибольшие

соотношения количества стерильных эксплантов к жизнеспособным. Остальные стерилизаторы не привели к получению жизнеспособных проростков, поэтому их использование не целесообразно.

3.2. Стерилизация растительных эксплантов вида *Echinacea purpurea* L.

Для введения в культуру *in vitro* вида *Echinacea purpurea* были использованы следующие стерилизаторы: «Лизоформин 3000» (3%, 5%, 10%), «Белизна» (100%, 50%), «Биоцид» (3%, 5%, 10%), «Хлорамин Б» (5%), «Нитрат серебра» (0,1%). Воздействие стерилизаторов было в течение 10, 15 и 20 минут.

На рисунке 3.12. представлены результаты влияния лизоформина на стерильность растительных эксплантов вида *E.purpurea*.

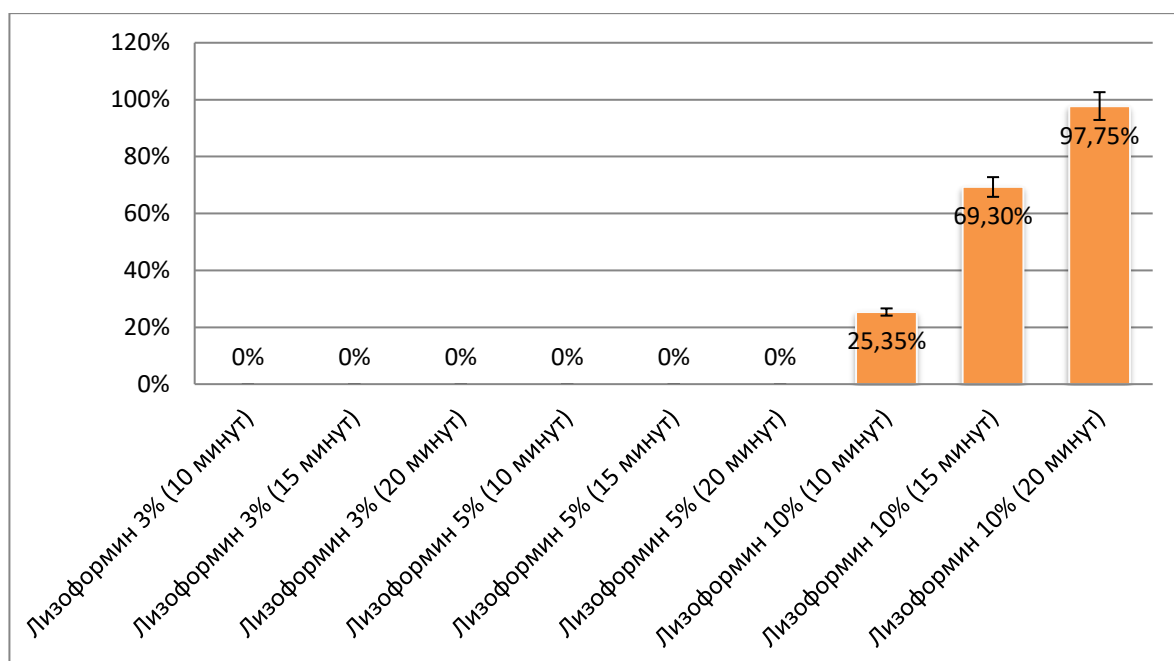


Рис.3.12. Влияние лизоформина на стерильность растительных эксплантов вида *E.purpurea*

Исходя из рисунка 3.12.можно сделать вывод, что более эффективным режимом стерилизации является воздействие 10% раствора лизоформина в течение 20 минут.

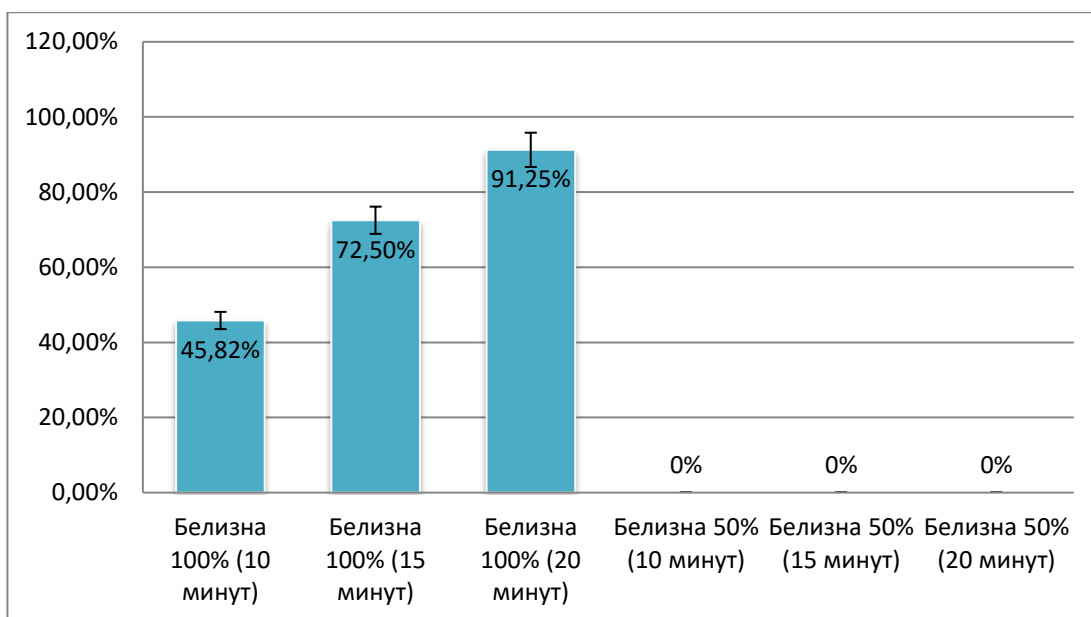


Рис.3.13. Влияние белизны на стерильность растительных эксплантов вида *E.purpurea*

Результаты воздействия дезинфицирующих свойств белизны представлены на рисунке 3.13. из диаграммы видно, что наилучшим режимом стерилизации является использование 100% белизны в течение 20 минут, так же можно отметить воздействие 100% раствора в течение 15 минут.

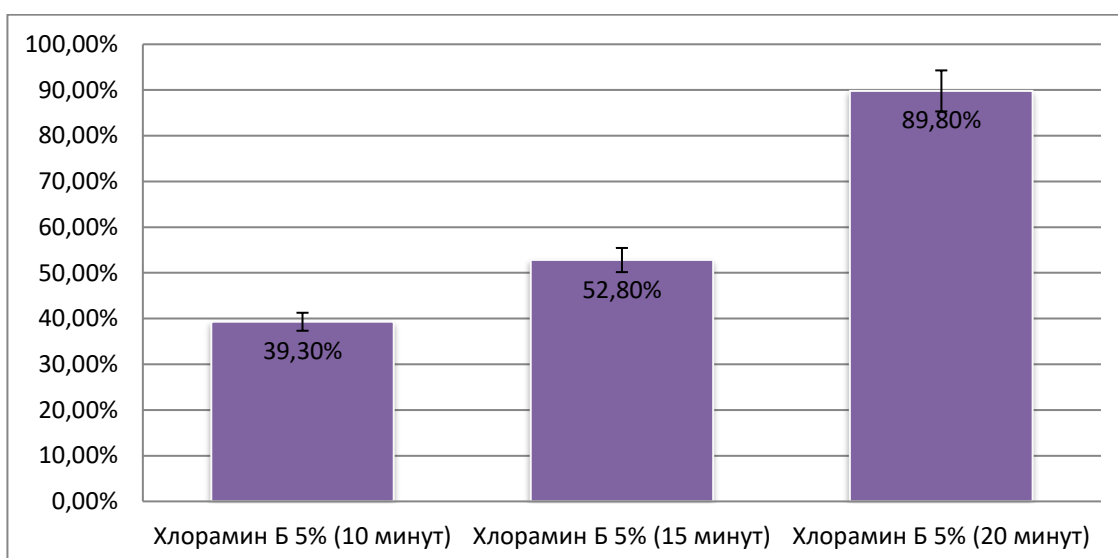


Рис.3.14. Влияние хлорамина Б на стерильность растительных эксплантов вида *E.purpurea*

Результаты влияния дезинфицирующих свойств хлорамина Б представлены на рисунке 3.14. При воздействии хлорамином сработали все концентрации, но наиболее эффективное воздействие отмечено у 5% раствора хлорамина Б в течение 20 минут

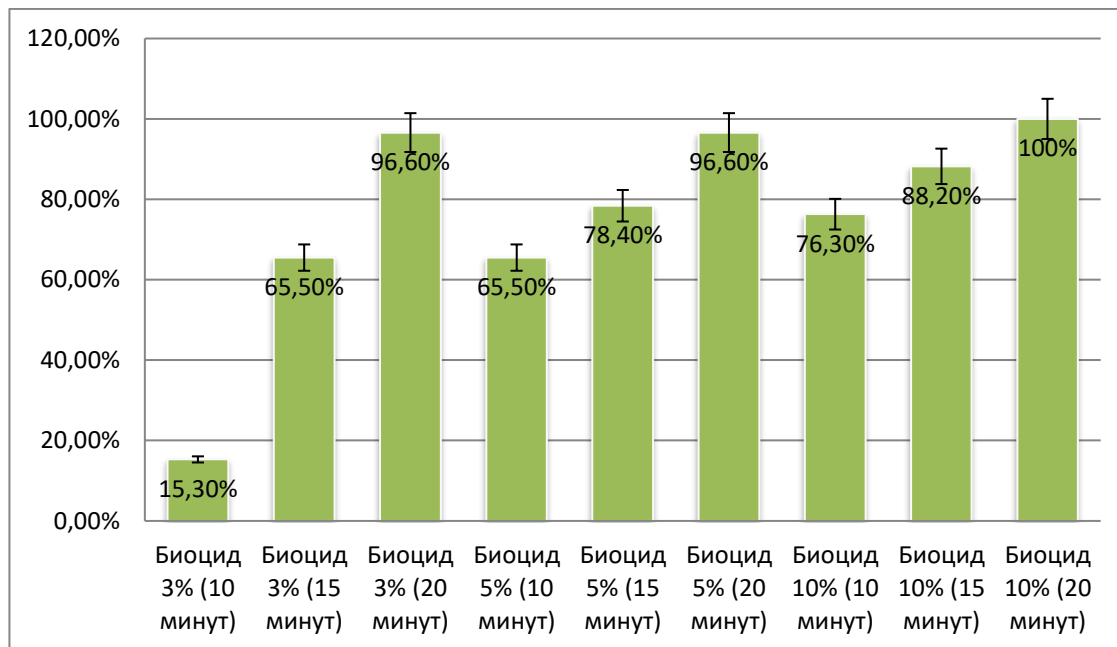


Рис.3.15. Влияние биоцида на стерильность растительных эксплантов вида *E.purpurea*

Результаты влияния дезинфицирующих свойств биоцида представлены на рисунке 3.15. При стерилизации биоцидом сработали все концентрации, но более эффективное воздействие выявлено у 3%, 5% и 10% раствора в течение 20 минут.

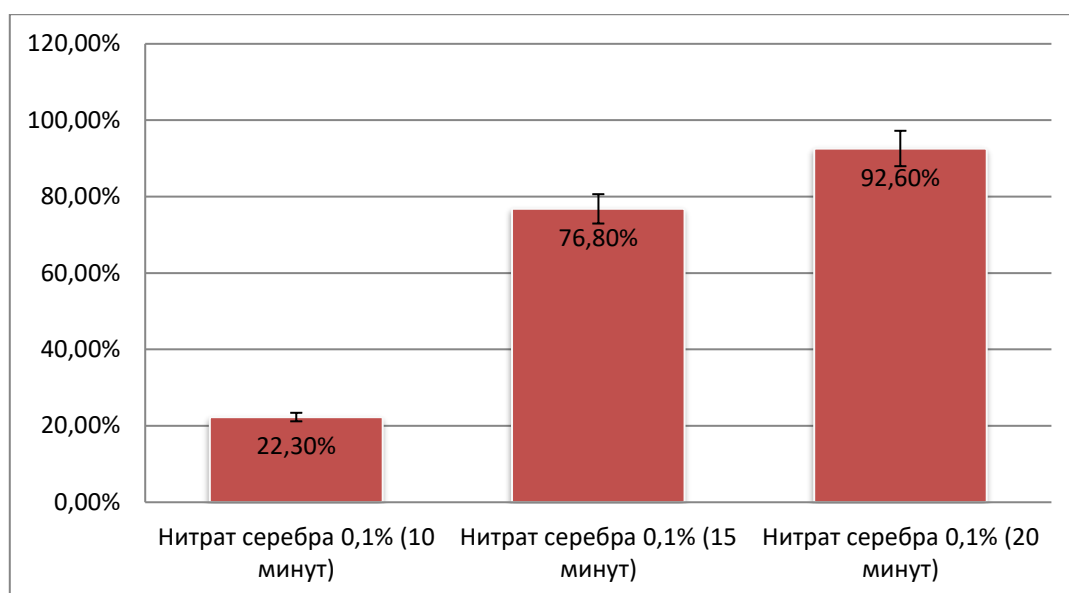


Рис.3.16. Влияние нитрата серебра на стерильность растительных эксплантов вида *E.purpurea*

Результаты влияния дезинфицирующих свойств нитрата серебра представлены на рисунке 3.16. Исходя из диаграммы можно сделать вывод, что наиболее эффективным режимом стерилизации является воздействие 0,1% нитратом серебра в течение 20 минут.

В таблице 3.2. и на рисунке 3.17. представлены полученные данные воздействия режимов стерилизации на получение стерильных и жизнеспособных проростков вида *E.purpurea*.

Таблица 3.2

Воздействие режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов
вида *E. purpurea*

Режим ступенчатой стерилизации	Длительность стерилизации, мин.	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %	Критерий Стьюдента (t)
Лизоформин 3%	10	0 ± 0	0 ± 0	0
Лизоформин 3%	15	0 ± 0	0 ± 0	0
Лизоформин 3%	20	0 ± 0	0 ± 0	0
Лизоформин 5%	10	0 ± 0	0 ± 0	0
Лизоформин 5%	15	0 ± 0	0 ± 0	0
Лизоформин 5%	20	0 ± 0	0 ± 0	0
Лизоформин 10%	10	25,3±0,69	0 ± 0	8,289
Лизоформин 10%	15	69,3± 0,78	0 ± 0	27,435

Продолжение таблицы 3.2.

Лизоформин 10%	20	97,75 ± 1,27	0 ± 0	36,008
Белизна 100%	10	45,82±0,48	5±0,28	11,321
Белизна 100%	15	72,5 ±1,25	11,3 ±1,34	14,628
Белизна 100%	20	91,25 ± 1,06	24,75 ± 0,86	17,777
Белизна 50%	10	0 ± 0	0 ± 0	0
Белизна 50%	20	0 ± 0	0 ± 0	0
Хлорамин Б 5%	10	39,3 ±0,45	0 ± 0	10,436
Хлорамин Б 5%	15	52,8 ±0,64	4,7 ±0,46	11,584
Хлорамин Б 5%	20	89,8 ± 1,52	15,25 ± 0,86	15,107
Биоцид 3%	10	15,3 ±0,25	0 ± 0	6,896
Биоцид 3%	15	65,5 ±1,16	0 ± 0	13,364
Биоцид 3%	20	96,6 ± 1,84	0 ± 0	24,853
Биоцид 5%	10	65,5±1,16	0 ± 0	13,364
Биоцид 5%	15	78,4 ± 1,29	0 ± 0	14,736
Биоцид 10%	10	76,3 ±1,27	0 ± 0	14,712
Нитрат серебра 0,1%	10	22,3 ±0,64	0 ± 0	8,285
Нитрат серебра 0,1%	15	76,8±1,22	3 ±0,34	12,364
Нитрат серебра 0,1%	20	92,6 ± 1,35	8,5 ± 0,97	19,927

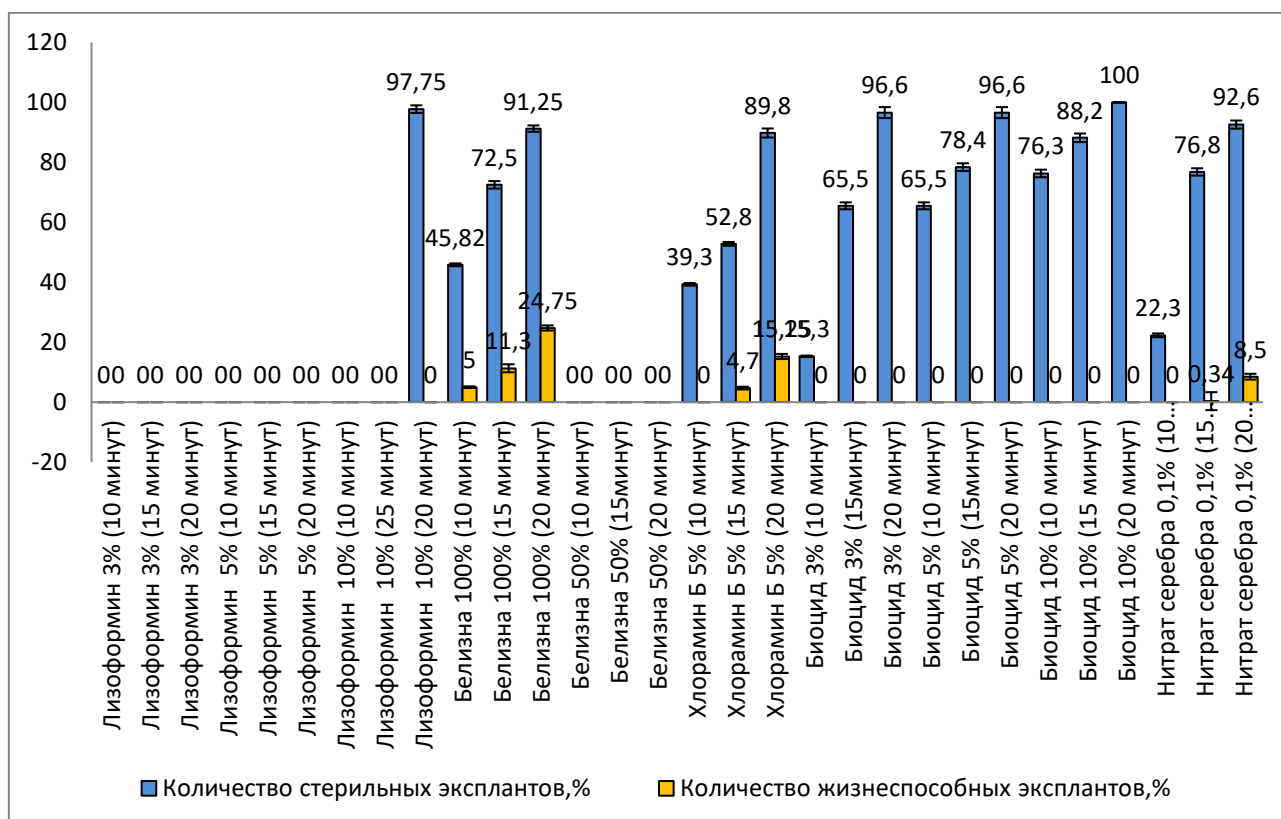


Рис. 3.17. Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных и жизнеспособных эксплантов вида *E. purpurea*

Исходя из данных таблицы 3.2. и рисунка 3.17. можно сделать вывод, что эффективным стерилизатором для вида *E.purpurea* служит раствор белизны в 100% концентрации в течение 20 минут. Это следует из того, что при использовании раствора белизны получено наибольшее соотношение количества стерильных эксплантов к жизнеспособным.

Так же исходя из полученных данных можем сделать вывод, что в качестве стерилизующего агента можем так же использовать белизну 100% в течение 15 минут, хлорамин Б в 5% концентрации в течение 20 минут и нитрат серебра в 0,1% в течение 20 минут, так как процент жизнеспособных проростков тоже довольно высок, но к сожалению данный процент меньше чем при использовании 100% белизны.

На рисунке 3.18. представлены полученные проростки в условиях *in vitro*.

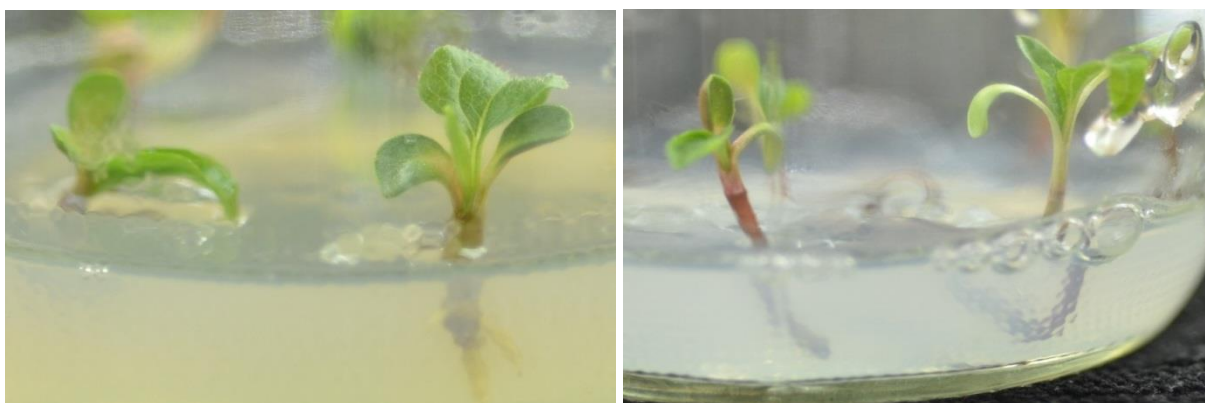


Рис.3.18. Стерильные проростки вида *E. purpurea* в культуре *in vitro*

Применение остальных режимов неприемлемо, так как после стерилизации утрачивается жизнеспособность семян, и они не прорастают.

С помощью критерия Стьюдента, было выяснено, что влияние стерилизаторов на количество стерильных проростков по сравнению с контролем (водой), достоверно для всех образцов.

Больше всего стерильных эксплантов получено при стерилизации в течение 20 минут.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современном мире все больше людей начинают следить за своим здоровьем и отказываются от химических продуктов, поэтому происходит активное замещение синтетических лекарственных и косметических препаратов, на продукцию натурального растительного происхождения. Именно в растительном мире мы можем найти большое количество растений с ценным химическим составом, но, к сожалению, многие растения с лекарственными свойствами, являются краснокнижными.

Поэтому широкое применение может найти получение растительных объектов в культуре *in vitro*.

Методы введения в культуру *in vitro* и микрклонального размножения растений помогут не только сохранить исчезающие виды в природе, но и использовать их в качестве растительного сырья для различных областей промышленности.

Так же мы сможем получать экологически чистый материал, более высокими антимикробными и антиоксидантными свойствами, по сравнению с нативными растениями.

Исследования, проведенные в данной работе по введению в культуру *in vitro* растений видов *Hypericum perforatum* L. и *Echinacea purpurea* L., послужат началом для дальнейшего получения изолированной культуры клеток и тканей и изучения её антимикробной и антиоксидантной активности.

На основании полученных результатов мы можем сделать следующие выводы:

1. Определены оптимальные стерилизующие агенты для растительных объектов видов *H. perforatum* L. и *E. purpurea* L.

Установлено, что наиболее эффективными стерилизующими агентами для вида *H. perforatum* L. являются: белизна 100% и 50%, перекись 18% и сулема 0,1%.

Для вида *E. purpurea* L. эффективным стерилизатором является раствор белизны в 100% концентрации.

2. Оптимизирован и подобран режим стерилизации для видов *H. perforátum* L. и *E. purpurea* L.

Установлено, что для вида *H. perforátum* эффективными режимами стерилизации являются: белизна 100% при воздействии в течение 15 и 20 минут, перекись водорода 36% при воздействии в течение 15 минут, сулема 0,1% при воздействии в течение 10 и 15 минут.

Для вида *E. purpurea* эффективным режимом стерилизации служит раствор белизны в 100% концентрации в течение 20 минут. Так же возможно использование режимов: 100% белизны в течение 15 минут, 5% хлорамина Б в течение 20 минут и 0,1% нитрат серебра в течение 20 минут.

3. Введены в культуру *in vitro* растительные объекты видов *H. perforátum* и *E. purpurea* для дальнейшего получения из них каллусных культур и синтеза ценных биологически активных веществ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alaiwil W. A., Sairam R. V., Josekutty P.C., Potlakayala S. D., Karelia D., Goldman S.L. In vitro regeneration, flowering, and cell culture of *Centaurea* species / *African Journal of Biotechnology*. – 2012. – № 11. – 2297-2302 с;
2. Mistríková I. & Vaverková Š. (2006): *Echinacea* – chemical composition, immunostimulatory activities and uses. – *Thaiszia – J. Bot.* 16: 11-26
3. Murashige T and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures.// *Physiol Plant* 15(3), 1962. – PP. 473—497.
4. Verpoorte, R. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites / R. Verpoorte, A. Contin , J. Memelink // *Phytochem. Rev.*– 2002.– Vol.1.– P.13–25.
5. 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.
6. Авдеева, Е.В. Рост и индикаторная роль древесных растений в урбанизированной среде / Е.В. Авдеева. – Красноярск: СибГТУ, 2007. - 361 с.
7. Авксентьева, О.А. Биотехнология высших растений: культура *in vitro* / О.А. Авксентьева, В.А. Петренко. – Харьков: ХНУ имени В.Н. Каразина, 2011. – 60 с.
8. Азарова О.П., Чачина С.Б. Основы биотехнологии. – Омск: Издательство ОмГТУ, 2008. – 44 с;
9. Беляева, Л.А. Биохимия растений / Л.А. Беляева. – Гомель: ГГУ им. Ф.Скорины, 2009. – 108 с.
10. Бидарова, Ф.Н. Современная фармация: проблемы и перспективы развития / Ф.Н. Бидарова. – Владикавказ, 2015. – 465 с.

11. 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.
12. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 2010.– 272 с.
13. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 2008 . – 160 с.
14. Вечканов, Е.М. Основы клеточной инженерии: учебное пособие / Е.М. Вечканов, И.А. Сорокина. – Ростов-на-Дону, 2012. – 136 с.
15. Горкин А.П. Современная иллюстрированная энциклопедия – М.:Росмэн – Пресс, 2006 – 560с.
16. Губанов И.А., Киселева К.В. Иллюстрированный определитель растений Средней России: Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные). – М.: Т-во научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований, 2003. – 665 с;
17. Дитченко, Т. И. Культура клеток, тканей и органов растений: Метод. рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов / Т. И. Дитченко. – Минск: БГУ, 2007. – 25 с.
18. Домотенко, Л. В. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: настоящее и будущее/ Л. В. Домотенко, И. С. Косилова, А. П. Шепелин // Современная лабораторная диагностика. – 2017. – № 2 (22). – С. 30-32.
19. Джаксыбаева Г. Г., Султумбаева А. К. Культура тканей и биотехнология растений: учебное пособие / Г. Г. Джаксыбаева, А. К. Султумбаева. - Павлодар: Кереку, 2015. - 99 с.
20. Дуктова, Н.А. Заготовка лекарственного растительного сырья: учебно-методическое пособие / Н.А. Дуктова. – Горки: Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, 2010. – 60 с.

21. Дышко, В.Н. Клеточная и тканевая биотехнология в растениеводстве / В.Н. Дышко. – Смоленск: ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА», 2014. – 69 с.
22. Егорова Т. А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии: Учеб.пособие для высш. пед. Учеб заведений. – М.: Издательский центр «Академия», 2009 . – 208 с.
23. Егорова, Н.А. Микроразмножение эфиромасличных растений с использованием культуры изолированных тканей и органов *in vitro* / Н.А. Егорова, А.Г. Кривохатко, И.В. Ставцева, Л.И. Каменек // Таврийский вестник аграрной науки. – 2013. – №1. – С. 9-14.
24. Еленевский А.Г., Радыгина В.И., Чаадаева Н.Н. Растения Белгородской области (конспект флоры). – Москва: МГПУ, 2004. – 120 с;
25. Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. – М.: Наука, 1984. – 424 с;
26. Калашникова Е. А. Клеточная инженерия растений : учебное пособие. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2012. – 317 с.
27. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сариацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наук. Думка, 1992. – 232 с;
28. Киселёва К. В., Майоров С. Р., Новиков В. С. Флора средней полосы России: Атлас-определитель / Под ред. проф. В. С. Новикова. – М.: ЗАО «Фитон+», 2010. – 430 с.
29. Красная книга Республики Карелия / Министерство сельского, рыбного хозяйства и экологии Республики Карелия [и другие; авторы-составители: А. В. Артемьев и другие ; научные редакторы: чл.-кор. РАН Э. В. Ивантер, д-р биол. наук О. Л. Кузнецов] - Петрозаводск: Карелия, 2007. - 364 с.
30. Красная книга Ханты-Мансийского автономного округа – Югры: животные, растения, грибы. Изд. 2-е / отв. ред. А.М. Васин, А.Л. Васина. – Екатеринбург: Издательство Баско, 2013. – 460 с.: ил.

31. Кулаева О. Н. Цитокинины, их структура и функции. – М.: Наука, 2013. – С. 9-23.
32. Куркин В.А., Акушская А.С., Авдеева Е.В., Вельмяйкина Е. И., Даева Е.Д., Каденцев В.И. Флавоноиды травы эхинацеи пурпурной // Химия растительного сырья. 2010. №4. С.87-89
33. Кьосев, П.А. Лекарственные растения: самый полный справочник / П.А. Кьосев. – М.: Эксмо, 2011. – 944 с.
34. Лавренов В.К., Лавренова Г.В. Современная энциклопедия лекарственных растений - М.: ЗАО «ОЛМА Медиа Групп», 2007 - 272 стр.
35. 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.
36. Лутова Л. А. Биотехнология высших растений. – М.: Издательство Санкт-Петербургского университета, 2010. – 240 с.
37. Маевский П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. 11-е изд. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. – 635 с.
38. Малаева Е.В. Культура растительных клеток и тканей. Практикум по биотехнологии: учебное пособие. – М.: Планета, 2016. – 47 с.
39. Мокшин Е.В. Культура клеток и тканей растений /Е.В. Мокшин, А.С. Лукаткин. – М.: Нобель Пресс, 2013. – 106 с.
40. Мурашкина И. А., Васильев И. Б., Гордеева В. В. Использование культуры клеток растений в биотехнологии лекарственных средств : учебное пособие. –Иркутск : ИГМУ, 2015. – 83с.
41. 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.
42. Пронченко Г.Е., Вандышев В.В.«Растения – доноры БАД. За и против». – Москва, ГЭОТАР-Медиа, 2013 – 167 с.
43. Пятигорская Н. В. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств из растительного сырья : уч.-метод, пособие

/ Н. В. Пятигорская, И. А. Самылина, В. В. Береговых и др. - СПб. : СпецЛит, 2013. – 367.

44. 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.

45. Рубинчикова Т. И. Лекарственные растения Белгородской области. Белгород, 1986 — С. 19—21. Овчинников В. В.

46. Сакович Г. С. и др. Некоторые итоги клинического изучения препаратов и компонентов эхинацеи, результаты исследования безопасности, возможные побочные эффекты, взаимодействие с другими лекарственными средствами // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. – Т. 8. – №. 4. – С. 11-19.

47. Самородов А.В., Поспелов С.В., Моисеева Г.Ф., Серeda А.В. Фитохимический состав представителей рода эхинацея и его фармакологические свойства // Химико-фармацевтический журнал. 1996, Т.30, №.4. С. 32—37.

48. Середин Р.М., Соколов С.Д. Лекарственные растения и их применение. – Ставрополь: Ставропольское книжное издательство, 1973. – 240 с;

49. Сорокина И.К., Старичкова Н.И., Решетникова Т.Б. Основы биотехнологии растений. – Саратов: Издательство СГУ, 2002. – 34 с;

50. Снегин, Э.А. Практикум по биометрии: учебное пособие / Э.А. Снегин. – Белгород: ИД «Белгород» НИУ «БелГУ», 2016. – 56 с.

51. Тимофеева С.Н., Смолькина Ю.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Технологии микроразмножения *in vitro*: Учеб. - метод. пособие. – Саратов, 2016. - 38с.

52. Тризна А.А. Растения – жизнь и здоровье. – Тула: Приок. кн. изд-во, 1992. – 192 с;

53. Цицилин А. Н. Лекарственные растения: атлас – справочник – Москва; Издательство «Э», 2015 - 288 с.

54. Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений. – Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003 – 58 с;

55. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Кочиева Е.З. Сельскохозяйственная биотехнология. – М.: «Высшая школа», 2008. – 710 с;

56. Шмид Р. Наглядная биотехнология и генетическая / Р. Шмид; пер. с нем. — 3-е изд. — М. : Лаборатория знаний, 2020. — 324с.: ил.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

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

Компоненты среды	Концентрация компонентов в среде, мг/л
Макрокомпоненты	
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
Микрокомпоненты	
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
Хелат железа	
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

Таблица критических значений t-критерия Стьюдента

df	p=0,05	p=0,01	p=0,001	df	p=0,05	p=0,01	p=0,001
1	12,70	63,65	636,61	47	2,012	2,685	3,510
2	4,303	9,925	31,602	48	2,011	2,682	3,505
3	3,182	5,841	12,923	49	2,010	2,680	3,500
4	2,776	4,604	8,610	50	2,009	2,678	3,496
5	2,571	4,032	6,869	51	2,008	2,676	3,492
6	2,447	3,707	5,959	52	2,007	2,674	3,488
7	2,365	3,499	5,408	53	2,006	2,672	3,484
8	2,306	3,355	5,041	54	2,005	2,670	3,480
9	2,262	3,250	4,781	55	2,004	2,688	3,476
10	2,228	3,169	4,587	56	2,003	2,667	3,473
11	2,201	3,106	4,437	57	2,002	2,665	3,470
12	2,179	3,055	4,318	58	2,002	2,663	3,466
13	2,160	3,012	4,221	59	2,001	2,662	3,463
14	2,145	2,977	4,140	60	2,000	2,660	3,460
15	2,131	2,947	4,073	61	2,000	2,659	3,457
16	2,120	2,921	4,015	62	1,999	2,657	3,454
17	2,110	2,898	3,965	63	1,998	2,656	3,452
18	2,101	2,878	3,922	64	1,998	2,655	3,449
19	2,093	2,861	3,883	65	1,997	2,654	3,447
20	2,086	2,845	3,850	66	1,997	2,652	3,444
21	2,080	2,831	3,819	67	1,996	2,651	3,442
22	2,074	2,819	3,792	68	1,995	2,650	3,439
23	2,069	2,807	3,768	69	1,995	2,649	3,437
24	2,064	2,797	3,745	70	1,994	2,648	3,435
25	2,060	2,787	3,725	71	1,994	2,647	3,433
26	2,056	2,779	3,707	72	1,993	2,646	3,431
27	2,052	2,771	3,690	73	1,993	2,645	3,429
28	2,049	2,763	3,674	74	1,993	2,644	3,427
29	2,045	2,756	3,659	75	1,992	2,643	3,425
30	2,042	2,750	3,646	76	1,992	2,642	3,423
31	2,040	2,744	3,633	77	1,991	2,641	3,422
32	2,037	2,738	3,622	78	1,991	2,640	3,420
33	2,035	2,733	3,611	79	1,990	2,639	3,418
34	2,032	2,728	3,601	80	1,990	2,639	3,416
35	2,030	2,724	3,591	90	1,987	2,632	3,402
36	2,028	2,719	3,582	100	1,984	2,626	3,390
37	2,026	2,715	3,574	110	1,982	2,621	3,381
38	2,024	2,712	3,566	120	1,980	2,617	3,373
39	2,023	2,708	3,558	130	1,978	2,614	3,367
40	2,021	2,704	3,551	140	1,977	2,611	3,361
41	2,020	2,701	3,544	150	1,976	2,609	3,357
42	2,018	2,698	3,538	200	1,972	2,601	3,340
43	2,017	2,695	3,532	250	1,969	2,596	3,330
44	2,015	2,692	3,526	300	1,968	2,592	3,323
45	2,014	2,690	3,520	350	1,967	2,590	3,319
46	2,013	2,687	3,515				

