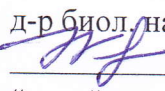


Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Биологический институт
Кафедра физиологии растений и биотехнологии

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Руководитель ООП
Зав. каф. физиологии растений и
биотехнологии

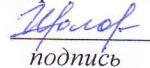
д-р биол. наук, профессор
 О. В. Карначук
« » 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

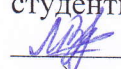
ВЛИЯНИЕ ЭКДИСТЕРОНА И СЕЛЕНА НА РОСТ И ВТОРИЧНЫЙ
МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ *LICHNIS CHALCEDONICA* В
УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

по основной образовательной программе подготовки магистра
направление подготовки 06.04.01 – Биология

Нечаева Марина Вадимовна

Руководитель ВКР
д-р биол. наук, профессор
 И. Ф. Головацкая
подпись

«02» июня 2020 г.

Автор работы
студентка группы № 01422
 М. В. Нечаева
подпись

РЕФЕРАТ

Тема данной магистерской диссертации – Влияние экдистерона и селена на рост и вторичный метаболизм культуры *Lychnis chalcedonica* L. в условиях *in vitro*.

Объём магистерской работы 84 страницы, для ее написания использовалось 52 источника отечественной и 29 зарубежной литературы. Содержит 4 таблицы и 30 рисунков.

Структура работы представлена: списком сокращений, введением, четырьмя главами, выводами, заключением и списком использованной литературы.

Ключевые слова: *Lychnis chalcedonica* L., клеточная культура, экдистерон, селенит натрия, сапонины, флавоноиды, пролин, перекисное окисление липидов.

Во введении изложена актуальность темы: она определяется тем, что данное исследование описывает влияние экдистерона и микроэлемента селена на рост и вторичный метаболизм клеточной культуры, предложен альтернативный источник растительного сырья – клеточная культура.

В первой главе рассмотрены клеточные культуры, как источники вторичных метаболитов, показана роль селена и экдистероидов в растении, во второй главе модели изучения растительных организмов и основные принципы культивирования растительного материала. В третьей главе представлен объект и методики исследования. Объектом исследования была клеточная культура *L. chalcedonica*. Четвертая глава является основной, в ней рассмотрены результаты исследования, на основании которых, были представлены выводы и заключение.

В магистерской работе показана зависимость роста и вторичного метаболизма культуры *L. chalcedonica* от экдистерона и селенита натрия в среде культивирования.

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии и биоинженерии при кафедре физиологии растений и биотехнологии Биологического института НИ ТГУ.

Список сокращений

АБК – абсцизовая кислота

АФК – активные формы кислорода

БАВ – биологически активные вещества

БАД – биологически активные добавки

ИУК – индолил-3-уксусная кислота

МДА – малоновый диальдегид

МС – питательная среда Мурасиге-Скуга

НУК – нафтилуксусная кислота

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ТБК – тиобарбитуровая кислота

УФ – ультрафиолетовое излучение

ЦК – цитокинины

ЭКД – экдистерон

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота

6-БАП – 6-бензиламинопурин

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	4
ВВЕДЕНИЕ	8
1. КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ КАК ИСТОЧНИКИ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ.....	11
1.1. Экдистероиды в растении.....	13
1.2. Роль селена в растительном организме	17
2. КУЛЬТУРА КЛЕТОК, ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ РАСТЕНИЙ.....	22
2.1. Культуры клеток растений как биологические модели	23
2.2. Основные принципы культивирования растительного материала <i>in vitro</i>	26
2.2.1. Получение каллуса и его культивирование.....	29
3. ОБЪЕКТ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЙ	34
3.1. Объект исследований	34
3.2. Методики исследований	36
3.2.1. Приготовление питательной среды.....	36
3.2.2. Получение стерильной посуды	37
3.2.3. Работа в ламинарном боксе	37
3.2.4. Метод получения стерильных проростков.....	38
3.2.5. Метод индукции каллусогенеза.....	39
3.2.6. Метод пассирования клеточной культуры.....	39
3.2.7. Метод количественного определения экдистерона.....	40

3.2.8. Метод количественного определения флавоноидов	42
3.2.9. Метод фиксации клеточной культуры	44
3.2.10. Определение размеров и морфологии каллусных клеток.....	44
3.2.11. Методика определения перекисного окисления липидов	46
3.2.12. Определение содержания пролина.....	47
3.2.13. Определение содержания сапонинов.....	48
4. ВЛИЯНИЕ ЭКДИСТЕРОНА И СЕЛЕНА НА РОСТ И ВТОРИЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ <i>LYCHNIS CHALCEDONICA</i> В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	50
4.1. Индукция и регуляция каллусогенеза <i>L. chalcedonica in vitro</i>	50
4.1.1. Подбор условий стерилизации семян <i>L. chalcedonica</i>	50
4.1.2. Подбор среды для проращивания семян <i>L. chalcedonica</i>	51
4.1.3. Получение каллусной ткани <i>L. chalcedonica</i> и ее поддержание	52
4.2. Влияние экдистерона на рост и вторичный метаболизм клеточной культуры <i>L. chalcedonica</i>	55
4.2.1. Рост клеточной культуры в зависимости от концентрации экдистерона в среде.....	55
4.2.2. Морфология клеток культуры в зависимости от концентрации экдистерона в среде	58
4.2.3. Влияние экзогенного экдистерона на содержание эндогенного экдистерона в клеточной культуре <i>L. chalcedonica</i>	62
4.2.4. Влияние экзогенного экдистерона на содержание флавоноидов в клеточной культуре <i>L. chalcedonica</i>	64

4.3. Влияние селена на рост и вторичный метаболизм клеточной культуры <i>L. chalcidonica</i>	65
4.3.1. Рост клеточной культуры в зависимости от концентрации селена в среде.....	66
4.3.2. Влияние селена на содержание флавоноидов в клеточной культуре <i>L. chalcidonica</i>	68
4.3.3. Влияние селена на интенсивность перекисного окисления липидов в клеточной культуре <i>L. chalcidonica</i>	69
4.3.4. Влияние селена на уровень содержания пролина в клеточной культуре <i>L. chalcidonica</i>	70
4.3.5. Влияние селена на уровень содержания сапонинов в клеточной культуре <i>L. chalcidonica</i>	71
ВЫВОДЫ.....	73
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	75
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	76

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в фармакологии получают широкое распространение препараты растительного происхождения, поскольку именно растения имеют часто невоспроизводимый по качественному составу набор биологически активных веществ (БАВ), а также имеют ряд преимуществ по сравнению с синтетическими препаратами: хорошую переносимость, редкое развитие аллергических реакций и побочных эффектов (Сергалиева и др., 2015). Спрос на лекарственные препараты из растительного сырья привел к снижению разнообразия диких видов лекарственных растений. Одним из путей решения проблем сохранения растительных ресурсов и получения БАВ является биотехнологический способ воспроизводства растений – культуры растительных клеток. Интерес к культуре *in vitro* также вызван потребностью в удобной модельной системе для изучения ростовых и метаболических клеточных процессов.

Lychnis chalcidonica L. из семейства Caryophyllaceae является ценным лекарственным растением, содержащим фитоэкдистероиды, сапонины, флавоноиды и фенольные соединения, что послужило основой для введения этого вида в культуру *in vitro*. Эти биологически активные вещества *L. chalcidonica* используют для получения комплексного препарата анаболического, противогрибкового, противосклеротического, радиопротекторного, иммуностимулирующего, гемореологического и противоопухолевого действий (Зибарева, 1995).

Фармакологическая значимость БАВ лихниса увеличивает интерес к данному виду и служит основанием для его введения в клеточную культуру *in vitro*. В настоящее время недостаточно сведений о физиологической роли экдистероидов и селена в жизнедеятельности растений, и прежде всего клеточной культуры (Lafont, 2003; Головацкая, 2004; Головацкая и др., 2018).

В связи с этим целью исследования стало изучение влияния экдистерона и селена на рост и вторичный метаболизм клеточной культуры *Lychnis chalcidonica* в условиях *in vitro*.

В соответствии с поставленной целью решали следующие задачи:

- 1) получить стабильную каллусную клеточную культуру *L. chalcidonica*; предварительно подобрать оптимальный способ стерилизации семян *L. chalcidonica* и оптимальную питательную среду для активации каллусогенеза и продолжительного субкультивирования клеточной культуры.
- 2) изучить морфологию и вторичный метаболизм исходной клеточной культуры;
- 3) изучить рост и морфологию клеточной культуры в зависимости от концентрации экзогенного экдистерона в среде,
- 4) изучить влияние экзогенного экдистерона на содержание эндогенного экдистерона и флавоноидов в клеточной культуре *L. chalcidonica*,
- 5) изучить влияние селена на рост, интенсивность перекисного окисления липидов, содержание пролина, сапонинов и флавоноидов в клеточной культуре *L. chalcidonica*.

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии и биоинженерии при кафедре физиологии растений и биотехнологии Биологического института НИ ТГУ.

Результаты работы опубликованы в материалах LXV научной студенческой конференции Биологического института ТГУ «Старт в науку» (Томск, апрель 2017 г.) по направлению физиология растений и биотехнология, в материалах Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы картофелеводства: фундаментальные и прикладные аспекты» (Томск, 10–13 апреля 2018 г.), в сборнике научных статей «Фенольные соединения: функциональная роль в растениях» по материалам X Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», (Москва, 14-19 мая 2018 г.), в XI Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (23–27 сентября 2018 г.,

г. Минск, Республика Беларусь), в Материалы LXIX научной студенческой конференции Биологического института «Старт в науку» (Томск, 20–24 апреля 2020 г.).

Автор выражает благодарность научному руководителю профессору, доктору биологических наук И. Ф. Головацкой за помощь в выполнении работы, консультанту Ю.В. Медведевой за полезные рекомендации и предоставленный материал, а также Е.В. Бойко за помощь в освоении методик исследования.

1. КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ КАК ИСТОЧНИКИ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Растения являются продуцентами многих БАВ – соединений, способных оказывать воздействие на биологические процессы в организме. В настоящее время известно более 100 000 вторичных метаболитов, продуцируемых растениями (Макаревич, Филипова 2013). Многие из них являются практически и экономически важными продуктами и используются в фармакологической, косметической, пищевой промышленности. Далеко не полный список этих соединений включает в себя: сердечные гликозиды, сапонины, стерины, каротиноиды, флавоноиды, экдистероиды, полифенолы, алкалоиды, витамины, хиноны, дубильные вещества, кумарины.

Культуры клеток и тканей, полученные *in vitro*, как и клетки интактного растения, способны синтезировать БАВ, которые могут иметь большое практическое значение. По качественному и количественному составу они могут быть схожи с вторичными метаболитами исходных растений, но могут и отличаться (Мурашина и др., 2015).

На сегодняшний день показаны возможности синтеза разнообразных вторичных метаболитов клеточными культурами. К ним относятся:

1) Фенольные соединения – вещества ароматической природы, которые содержат одну или несколько гидроксильных групп, связанных с атомами углерода ароматического ядра;

2) Изопреноиды, терпеноиды – природные соединения из группы липидов, образующиеся в живых организмах из мевалоновой кислоты. Среди изопреноидов множество физиологически активных веществ: антибиотики, витамины А, D, Е, К, гормоны, спирты, кардиотонические вещества, пигменты и другие;

3) Алкалоиды – группа азотсодержащих органических соединений природного происхождения;

4) Тритерпены и родственные им стероиды – группа циклических изопреноидных соединений, содержащих шесть изопреновых звеньев;

5) Дитерпены – компоненты смол и другие.

На сегодняшний день собрана большая коллекция клеточных культур растений из различных семейств, синтезирующих вторичные метаболиты, широко используемые в промышленности. К ним относятся: женьшень дальневосточный – источник гинзенозида; диоскорея дельтовидная, продуцирующая стероидные гликозиды; раувольфия змеиная, способная к синтезу антиаритмического алкалоида аймалина и т.д.

Примеры лекарственных веществ, полученные на основе каллусных культур:

- Стевиозид – естественный подсластитель и заменитель сахара, получаемый из растения *Stevia rebaudiana* Bertoni;
- “Биоинфузин” и “БЦЛ-ФИТО” – новые препараты из надземных частей *Rhaponticum carthamoides* с участием фирм Genesis Group (США), Fitostar и Mitra – вызывают существенный анаболический и иммуностимулирующий эффект на клеточном и гуморальном уровне (Ивановский, 2000; Тимофеев, 2001).
- Арглабин – вещество, проявляющее противоопухолевые свойства. Содержится в растении *Artemisia glabella* Kar. et Kir. Входит в состав одноименного препарата.

При подборе оптимальных условий для культивирования растений *in vitro* можно добиться повышения продукции вторичных метаболитов.

1.1. Экдистероиды в растении

Экдистероиды составляют самое распространенное и самое многочисленное семейство стероидных соединений в животном и растительном мире; они участвуют в жизнедеятельности практически всех классов организмов, выполняя множественные функции (Тимофеев, 2005).

Изучение фитоэкдистероидов получило свое бурное развитие с середины 60-х годов благодаря работам японского ученого К. Наканиси и сотр. (Nakanishi et al., 1996). В поисках противораковых препаратов они впервые выделили экдистероиды из растительного сырья. Вслед за ними ученые многих стран интенсивно начали поиск фитоэкдистероидов.

В Советском Союзе изучение экдистероидов было начато в 70-х с выделением его из растения серпухи (*Serratula intermis*) Я. К. Яцюком и Г. М. Сегалем (Яцюк, Сегель, 1970).

Большинство экдистероидов, представляющих собой группу близких по химическому строению полигидроксилированных стероидов, являются естественными гормонами членистоногих, регулирующими процессы метаморфоза и линьки (Nakanishi, 1971; Ахрем, Ковганко, 1989; Ахрем и др., 1973; Горовиц и др., 1974; Slama et al., 1974). Присутствие экдистероидов не ограничено членистоногими (насекомыми и ракообразными), имеется полная документация об их обнаружении в одноклеточных простейших, древних группах кишечноротовых (полипы, кораллы, медузы), а также в моллюсках, кольчатых и плоских червях (цестодах и трематодах), нематодах (Rees, 1995; Lafont, Dinan, 2003). Ни в одном из видов млекопитающих экдистероиды не обнаружены.

Познание теоретических основ проявления биологической активности экдистероидов в живых системах важно для понимания прикладного использования этих соединений в качестве фармацевтических,

инсектицидных или противопаразитарных средств. Выявлено, что экдистерон (в составе препарата Экдистерон-80) из растений *Serratula coronata* L. обладает выраженными, антигипоксическими, адаптогенными гастропротективными и термопротективными свойствами (Пунегов и др, 2008). Так же выявлено, что фитоэкдистероиды (экдистерон и туркестерон) повышают адаптационные возможности организма в условиях иммобилизационного стресса: уменьшают трофические нарушения в слизистой желудка, предотвращают инволюцию тимико-лимфатической системы, предотвращают увеличение массы надпочечников и снижают в них содержания аскорбиновой кислоты и холестерина, стимулируют процессы иммуногенеза у животных с вторичным иммунодефицитом, развившимся на фоне стрессорного воздействия (Шахмурова и др., 2010).

Современный уровень научных изысканий по экдистероидам включает как фундаментальные исследования в области генетики, клеточной и молекулярной биологии, биомедицинской химии, физиологии человека, животных и растений, так и прикладные направления, направленные на решение реальных проблем в области химии синтеза и технологии природного сырья, биотехнологии, фармакологии, медицины, энтомологии и ряда областей сельского хозяйства.

За последнее десятилетие началось широкое коммерческое использование трех важнейших экдистероидов (рисунок 1) – ponasterone (ponA), muristerone (murA) и ecdysterone (20E).

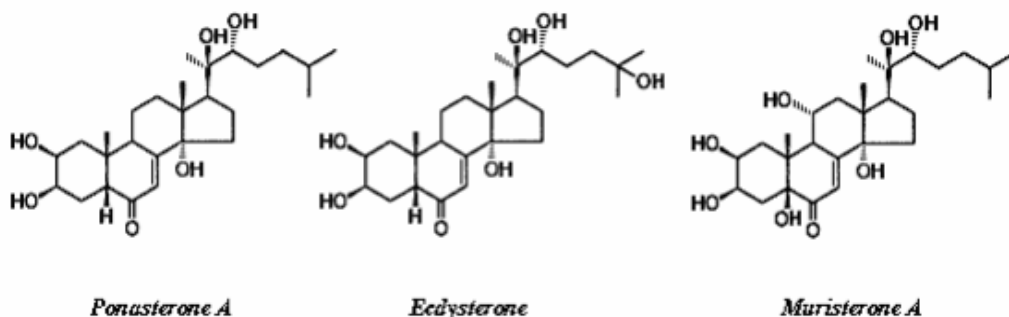


Рисунок 1 – Экдистероиды, нашедшие широкое практическое применение
(Тимофеев, 2005)

Учитывая биологическую важность данного класса соединений в целях повышения качества жизни человека, в настоящее время ведущими лабораториями разных стран проводится скрининг мировой флоры с целью идентификации видов-сверхпродуцентов, биотестирование и молекулярное моделирование активности всех известных и вновь открываемых экдистероидов с целью выявления наиболее важных составов (Harmata, Dinan, 1997; Dinan et al., 2001; Балтаев, 2000; Voigt et al., 2001; Volodin et al., 2002; Harmata et al., 2002; Dinan, 2003; Lafont, 2003; Bathori, Pongracz, 2005).

Содержание фитоэкдистероидов в растениях обычно составляет 0,01-0,1% от сухого веса (редко 1-2%), что на несколько порядков превышает концентрацию зооэкдистеронов в организмах насекомых и ракообразных. Концентрация фитоэкдистеронов неодинакова в различных частях растений и зависит от стадии развития растений и условий его произрастания (Яцук, Сегель, 1970; Карначук, 1996).

Первичный химический синтез экдистероидов в искусственных условиях не осуществляется, как правило, из более активных соединений методом химической трансформации могут быть получены только малоактивные продукты вторичного значения (Dinan, 2003). Аналогичные проблемы возникают при использовании методов биотехнологии –

биосинтез в условиях культуры тканей, клеток или модифицированных корней сопровождается накоплением неидентифицированных или неактивных соединений (Тимофеев, 2004).

В оптимальных условиях возделывания концентрация 20Е в растениях ежегодно повышается. Выход на устойчивый уровень для взрослых листовых органов достигается с 4-го года жизни (0.27-0.29 %), для семян с 5-6-го года (0.57 %). На содержание 20Е в массовых органах оказывают влияние погодные и климатические условия: температура воздуха, спектральный состав света, атмосферное и почвенное увлажнение, стрессовые факторы (варьирование в пределах от 0.19 до 0.43 %). Условия прохладного климата действуют положительно на накопление 20Е в надземных органах, а жаркий и сухой климат наоборот, способствует концентрированию его в корневой системе. Важное место занимает фактор реутилизации, при котором содержание 20Е в фитомассе может оказаться на 25-60 % выше (Тимофеев, 2001).

В соответствии с данными проф. И. Ф. Головацкой (2014) можно говорить об увеличении под действием ЭКД углеводного обмена в семенах ячменя за счет активации синтеза α -амилазы алейронового слоя. Так же, согласно предположению Slama (Slama, Lafont 1995), полярные фитоэкдистероиды являются транспортными формами неполярных стеринов. Стерины превращаются в экдистероиды с целью транспортировки их в другие части растения, где они снова превращаются в стерины или выступают в качестве их промежуточного метаболита. Так же есть данные, что образование экдистеронов происходит из мевалоната через 24-стерины и из холестерина (Lafont, Horn, 1989; Ахрем, Ковганко, 1989). ЭКД представляют собой легко мобилизуемый источник стеринов, необходимых для роста и размножения растений (Странски и др., 1998).

Большое структурное разнообразие и более высокое содержание фитоэкдистероидов ставят растения в привилегированное положение по сравнению с животными организмами в качестве источника экдистероидов. Экдистерон – самый распространенный фитоэкдистероид, обнаруженный в более 160 видах растений (Baltsev, 2000).

1.2. Роль селена в растительном организме

Селен был открыт в 1817 году И. Берцелиусом и его помощником Г. Ганом при исследовании осадков, которые образовались в свинцовой камере при производстве серной кислоты. Новый элемент из-за химического сходства с теллуром был назван греческим словом, который в переводе означает – Луна. Селен – эссенциальный элемент, металл из VI группы таблицы Менделеева, наиболее схожий по химическому составу к неметаллу – сере, но химически более активный (Барабой, Шестакова, 2004). Селен относится к малораспространенным химическим элементам и его содержание в земной коре составляет $6 \cdot 10^{-5}\%$ (Вапиров, 2016).

За последние два десятилетия в мире резко возрос интерес к селену, который в крайне низких концентрациях является важным микроэлементом бактерий, животных и человека. По современным данным, до 80% населения России обнаруживают гипоселеноз – недостаточную обеспеченность селеном (Давыденко и др., 2012). Если в организм взрослого человека поступает менее 15-30 мкг селена в сутки – снижается активность глутатионпероксидазы, происходит активация ПОЛ, возрастает вязкость липидов мембран – плазматических, митохондриальных, снижается активность сукцинатдегидрогеназы, цитохромоксидазы митохондрий, возникают некрозы печени, очаги некроза в миокарде, плешивость, бесплодие, отеки и возрастает риск развития атеросклероза (Барабой, Шестакова, 2004).

Проблема болезней, связанных с селенодефицитом, остается открытой до сих пор. Для борьбы с дефицитом селена применяются БАД, содержащие неорганический селен, в первую очередь – селенит натрия. Селен способен не только повышать общую сопротивляемость организма к действию биопатогенов, но и оказывать протекторный эффект при некоторых видах онкологических заболеваний и даже при иммунодефиците. Селен является одним из антиоксидантных веществ, поддерживающих внутренний баланс распределения микро- и макроэлементов и замедляющих старение организма человека. Он увеличивает сопротивляемость организма к патогенным микроорганизмам и вирусам, стимулируя выработку лейкоцитов и образование интерферона. Защитное действие селена в животных клетках обусловлено функционированием ряда белков, в состав которых входят селен-содержащие аминокислоты (селеноцистеин и селенометионин) (Кузнецов, 2004).

Селен, как говорилось ранее, необходим для нормальной жизнедеятельности животных и растений. Биологическое действие селена на эндокринную систему связано с экспрессией генов человека, кодирующих 30 селенопротеинов. Селен участвует в защите организма от развития кардиологических и некоторых онкологических заболеваний (удалении свободных радикалов), участвует в метаболизме тиреоидных гормонов, сперматогенезе, устойчивости к патогенам, выведении тяжелых металлов из организма. Микроэлемент входит в состав ряда ферментов (например, тиоредоксинредуктаз, глутатионпероксидаз, и других) и принимает участие в поддержании перекисного гомеостаза, предупреждая развитие большого числа заболеваний человека (Русецкая, 2014).

Исследования последних лет показали, что селен является микроэлементом и для растений (Головацкая, 2013). Проблема дефицита селена в почвах отмечается во многих регионах и, как следствие, дефицит его в растениях. Дефицит селена задерживает рост, развитие, переход к

цветению у растений, кроме того растения теряют устойчивость к вариациям факторов среды, особенно к переохлаждению и к засолению почвы, потеря тургора, увядание. Однако высокие концентрации селена оказывают негативное влияние на их рост, вызывая хлороз, особенно в молодых листьях. Одной из причин такой токсичности может быть то, что селен в высоких концентрациях самостоятельно может вызывать окислительный стресс у растений. Несмотря на то, что основной метаболизм селена, как полагают, был утрачен в высших растениях, вполне возможно, что он приносит пользу растению, неспецифично входя в функциональные метаболиты.

Логично допустить, что в растениях, также, как и у животных, селен обладает протекторным эффектом, который может реализоваться через функционирование селен-зависимых белков, в частности, защитных селенопероксидаз. Защитное действие селена в растениях связано с формированием активных центров ферментов антиоксидантной системы – супероксиддисмутазы, глицинредуктазы, глутатионпероксидазы, каталазы, аскорбатпероксидазы и дегидроаскорбатредуктазы, увеличением пула некоторых низкомолекулярных антиоксидантов: аскорбиновой кислоты, каротиноидов, глутатиона (Русецкая, 2014). Существуют доказательства наличия в клетках растений отдельных компонентов системы синтеза селен-содержащих белков, в частности UGA-декодирующей селен-цистеиновой тРНК.

Селен участвует как в первой фазе биохимической адаптации (окисление чужеродных веществ с образованием органических окисей и перекисей), так и во второй ее фазе (связывание и выведение активных метаболитов). Протекторное действие селена у растений при окислительном стрессе выражается в снижении интенсивности ПОЛ, изменении уровня свободного пролина, накоплении биомассы, увеличении содержания

хлорофиллов и активности глутатионпероксидазы, дегидроаскорбат-редуктазы и каталазы.

В природе селен встречается часто в малых количествах, в хорошо аэрируемых почвах присутствует в виде селенитов и селенатов, которые хорошо растворяются и усваиваются растениями. Наиболее растворимой и биодоступной формой селена для растений является селенат, который преобладает в щелочных и хорошо окисленных почвах. Селенит, наоборот, в основном присутствует в анаэробных почвах или в водных условиях. Сложные отношения минеральных веществ в почве и в растении уменьшают доступность элемента. Например, удобрения, содержащие селен, часто не оказывают заметного эффекта из-за хлоридов, которые связывают селен в нерастворимые соединения.

Защитный эффект селена так же распространяется на водный статус. Изменение водного статуса при стрессе, которое проявляется в аккумуляции осмолитов и сопровождается, как правило, падением водного потенциала, является одной из общих неспецифических реакций растения на действие многих стрессоров различной физической природы (Кузнецов, 2004). Селен влияет на устойчивость растительного организма к разному роду стрессорным факторам, в том числе к УФ-радиации, гербицидам, гипотермии и засолению (Блинохватов и др., 2001; Yao at al., 2010). Установлено, что обработка селенитом натрия (предпосевная, внекорневая и двойная) оказывала стимулирующее действие на растяжение листовой поверхности стебля растений пшеницы в почвенной культуре. Селен независимо от способа обработки повышал содержание основного фотосинтетического пигмента хлорофилла *a* (Кулагина, Головацкая, 2011).

Исследование селена в растениях важно, так как именно в растениях элементы присутствуют в органически связанной, т.е. в наиболее усвояемой

для животных форме. Органически связанный селен усваивается организмом человека и животных в 5–10 раз лучше, чем минеральный (Шубина, 2013).

Влияние селена на интегральные физиологические процессы в настоящее время практически не исследовано. Не выявлены оптимальные концентрации селена, оказывающие стресс-защитное действие на растение в неблагоприятных условиях произрастания (Кузнецов, 2004). В отличие от человека и животных, биологическая роль селена в растениях изучена недостаточно.

2. КУЛЬТУРА КЛЕТОК, ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ РАСТЕНИЙ

Термин «культура клеток, тканей и органов растений» применяется к выращиваемым частям растения таким как: изолированные зародыши, изолированные органы (кончики корней, меристемы побегов, листовые примордии, части молодых цветков и плодов), каллусная ткань, суспензионная культура, культура протопластов (рисунок 2).



Рисунок 2 – Варианты культивирования клеток, тканей и органов растений на искусственных питательных средах (Дитченко, 2007)

Набор объектов растительного происхождения, которые можно перевести в культуру *in vitro*, достаточно объемен, среди них преимущественно пригодными являются двудольные травянистые растения, затем следуют однодольные травянистые виды, следом – зерновые культуры. Труднее создать окружение для стабильных *in vitro* культур древесных растений, особенно голосеменных (Лобанок и др., 1988).

У большей части растений клетки при определенных условиях способны возвращаться в «активную часть цикла» снова возвращаясь к делению. Такой процесс называется дедифференциацией, который является важным для процесса роста и развития растений (Rossi et al., 2001; De Veydler et al., 2007; Francis, 2009).

В основе метода создания культуры клеток, тканей и органов растений лежит исключительное свойство растительной клетки – тотипотентность.

Тотипотентность – свойство клеток осуществлять генетическую информацию ядра, обеспечивающую их дифференцировку, а также развитие до целого организма (Гиляров и др., 1986). У животных тотипотентность характерна лишь некоторым клеткам кишечнотолостных, а у высших животных с возникновением специализации клеток (начиная с ранних этапов эмбриогенеза) тотипотентность не осуществляется. У растений, в отличие от животных, в природных условиях тотипотентность проявляют и специализированные клетки (при заживлении ран). В таком варианте на травмированной части растения в результате дезорганизованной пролиферации клеток происходит образование каллуса (лат. «мозоль»). Индукцию каллуса так же можно видеть при прививании подвоя и привоя. Первоначально каллус представляет собой недифференцированные клетки, но в дальнейшем достижима вторичная дифференциация с возникновением специализированных тканей и органов.

Следует подчеркнуть, что тотипотентность открывает огромные возможности для генетической инженерии растений и биотехнологии, дает возможность моделировать исключительные дифференцировки и эмпирически изучать феномен эпигенетической наследственности.

2.1. Культуры клеток растений как биологические модели

Метод культуры клеток и тканей растений имеет следующие преимущества:

- 1) легкость клеточных моделей;
- 2) отсутствие коррелятивных взаимодействий и контроля со стороны других тканей, органов, целого организма, что делает возможным изучение состояния клетки на уровне первичных элементарных процессов в ответ на воздействия извне;

3) возможность быстро добывать нужную массу в асептических условиях;

4) контроль условий культивирования по многим параметрам.

Культура клеток как экспериментально созданная биологическая система, являясь моделью исследований клетки *in vitro*, нашла широкое использование в самых разнообразных фундаментальных и прикладных исследованиях (Бердичевец, Фоменко, 2014).

Культуры клеток высших растений имеют две сферы применения:

1. Изучение клетки вне организма обуславливает основополагающую роль клеточных культур в фундаментальных исследованиях по генетике, физиологии, цитологии и молекулярной биологии растений. Популяциям растительных клеток свойственны специфические особенности: генетические, эпигенетические (зависящие от избирательной активности генов) и физиологические. При долговременном культивировании гетерогенной по этим признакам популяции идет размножение клеток, фенотип и генотип которой соответствует данным условиям выращивания, популяция эволюционирует (Глеба, 1981). Все это указывает на то, что культуры клеток являются новой экспериментально созданной биологической системой. Культуры клеток и тканей могут служить адекватной моделью при изучении метаболизма и его регуляции в клетках и тканях целого растения.

2. Культивируемые клетки высших растений могут рассматриваться как типичные микрообъекты, достаточно простые в культуре, что позволяет применять к ним не только аппаратуру и технологию, но и логику экспериментов, принятых в микробиологии. Вместе с тем, культивируемые клетки способны перейти к программе развития, при которой из

культивируемой соматической клетки возникает целое растение, способное к росту и размножению (Бутенко, 1989).

Клетки растений *in vitro* являются удобной моделью для изучения многих физиолого-биохимических процессов и генетики растительного организма (рисунок 3).

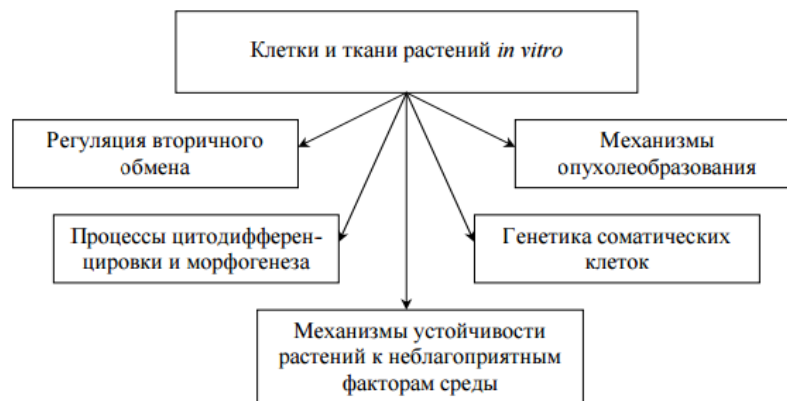


Рисунок 3 – Направления использования культуры клеток и тканей для решения теоретических вопросов физиологии, биохимии и генетики растений (Дитченко, 2007)

Роль культуры изолированных клеток и тканей в биотехнологии следует рассматривать в нескольких направлениях.

Первое связано со способностью изолированных растительных клеток производить ценные для медицины, парфюмерии, косметологии и других отраслей промышленности вещества вторичного метаболизма. Продуктивность культивируемых клеток в результате клеточной селекции может значительно превышать продуктивность целых растений, что широко используется для создания технологий промышленного получения БАВ. Помимо биосинтеза нужных соединений, культивируемые клетки способны к биотрансформации, т.е. превращению дешевых предшественников в ценный конечный продукт.

Второе направление – это микроклональное размножение растений, использование культуры изолированных тканей для размножения и

оздоровления посадочного материала, что позволяет получать от одной меристемы десятки тысяч растений в год, при этом создается система безвирусного растениеводства.

Третье направление – использование изолированных клеток и тканей в селекции растений. Метод открывает новые возможности для расширения генетических основ, облегчения и ускорения селекционного процесса, конструирования принципиально новых форм растений (Тимофеева, Румянцева, 2012).

Кроме того, растительные материалы, полученные с помощью методов *in vitro*, позволяют эффективное применение новых аналитических методов, таких как метаболомика (Chun-Zhao, Praveen, 2009).

Таким образом, в настоящее время развитие в растениеводстве, фармакологии, пищевой, парфюмерной, химической промышленности связано с дальнейшим развитием клеточных технологий растений и их ускоренным внедрением в народное производство.

2.2. Основные принципы культивирования растительного материала *in vitro*

Согласно классификации Мурасиге (1977), процесс микроклонального размножения можно осуществлять следующими путями:

1. Образование адвентивных побегов тканями экспланта.
2. Активация пазушных меристем.
3. Возникновение адвентивных побегов в каллусе.
4. Соматический эмбриогенез в каллусной ткани.
5. Формирование придаточных эмбриоидов в ткани первичных соматических зародышей (деление первичных эмбриоидов).
6. Индукция соматического эмбриогенеза в клетках экспланта.

Основной метод, использующийся при микроклональном размножении растений – активация развития уже существующих в растении меристем. Он основан на снятии апикального доминирования.

Этого можно достичь двумя путями:

а) добавлением в питательную среду веществ цитокининового и ауксинового ряда, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов. Как правило, в качестве цитокининов используют 6-бензиламинопурин (БАП) или 6-фурфуриламинопурин (кинетин) и зеатин. Ауксины вызывают процесс дедифференцировки клетки, подготавливающий ее к делению, а цитокинины – пролиферацию дедифференцированных клеток (Чуб, 2003).

б) удалением верхушечной меристемы стебля с последующим микрочеренкованием побега *in vitro* на безгормональной среде;

Полученные таким образом побеги отделяют от первичного экспланта и вновь самостоятельно переносят на свежие питательные среды, вызывающие пролиферацию пазушных меристем и приводящие к возникновению побегов более высоких порядков (Кильчевский, Хотылева, 2012). Зачастую в качестве экспланта используют верхушечные или пазушные почки, которые отделяют из побега и помещают на питательную среду с цитокининами. Делят возникающие пучки побегов, черенкуют и переносят на свежеприготовленную питательную среду. После серии пассажей, добавляя в питательную среду ауксины, побеги укореняют *in vitro*, а затем переносят в почву, где создают среду, способствующую адаптации растений.

На данный момент этот метод широко используется в производстве посадочного материала технических и овощных сельскохозяйственных культур, а также для размножения культур промышленного цветоводства (например, гвоздики), тропических и субтропических растений, плодовых и ягодных культур, древесных растений.

Второй метод – индукция адвентивных почек непосредственно тканями экспланта. Он основан на способности изолированных частей растения при благоприятных условиях воспроизводить дефицитные органы, регенерировав таким образом целые растения. Можно добиться образования адвентивных почек почти из любых органов и тканей растения (изолированного зародыша, листа, стебля, семядолей, чешуек луковиц, сегментов корней и зачатков соцветий). Этот процесс происходит на питательных средах, содержащих цитокинины в соотношении с ауксинами 10:1 или 100:1. В качестве ауксина используют ИУК или НУК. Таким способом были размножены многие представители семейства лилейные, томаты, древесные растения (из зрелых и незрелых зародышей).

Третий метод, практикуемый при микроклональном размножении, основывается на дифференциации из соматических клеток зародышеподобных структур, которые по своему виду напоминают зиготические зародыши. Этот метод получил название соматического эмбриогенеза. В отличие от развития *in vivo*, соматические зародыши развиваются асексуально (вне зародышевого мешка) и по своему внешнему виду напоминают биполярные структуры, у которых синхронно наблюдается развитие апикальных меристем стебля и корня. Согласно Стеварду, соматические зародыши проходят 3 стадии развития: глобулярную, сердцевидную, торпедовидную и в конечном итоге имеют тенденцию развития в проросток.

Четвертый метод микроклонального размножения – дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани.

Практически он мало используется с целью получения посадочного материала *in vitro*. Это связано с тем, что при частом пассировании каллусной ткани может изменяться ploидность растений регенерантов, наблюдаются структурные перестройки хромосом и накопление генных мутаций. Вместе с генетическими изменениями отмечаются и морфологические: низкорослость, аномальное жилкование листьев,

укороченные междоузлия, сниженная устойчивость к болезням и патогенам. В то же время, некоторые недостатки этого метода в селекционной работе оборачиваются преимуществами. В некоторых случаях он является единственно возможным способом размножения растений в культуре тканей. Через клеточную культуру успешно размножаются сахарная свекла, злаковые, представители рода *Brassica*, подсолнечник и другие культуры (Широков, Крюков, 2012).

2.2.1. Получение каллуса и его культивирование

Каллусную ткань *in vitro* можно получить практически из любой живой ткани растения (рисунок 4).

Подбор экспланта в основном зависит от цели исследования. Нужно убедиться в подходящем биологическом состоянии экспланта. Молодые ткани лучше подходят для получения каллуса, чем зрелые. Лучшими эксплантами являются ткани, ответственные за пролиферацию. Для индукции каллусогенеза нежелательно использовать одревесневшие ткани, старые ткани с низким уровнем метаболизма, плохо пролиферирующие ткани (мякоть плодов и др.), ткани, покрытые восками и суберином, и т.п. Проращивание стерилизованных семян в асептических условиях часто дает наиболее пригодный материал для индукции каллуса.

Процесс получения первичного каллуса и его последующего культивирования требуют стерильности. Обычно используют известные методики стерилизации либо разрабатывают их экспериментально для каждого конкретного объекта.

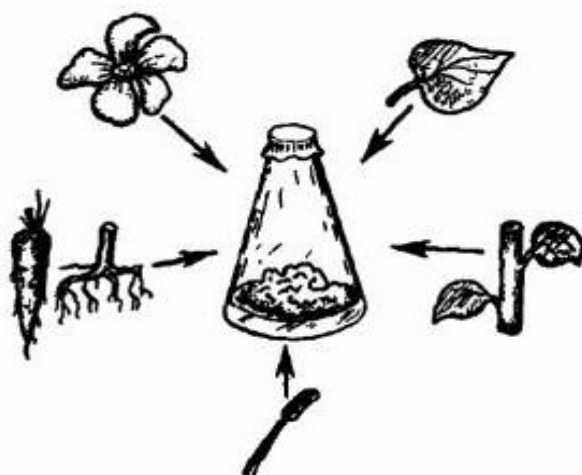


Рисунок 4 – Типы эксплантов, используемые для получения каллусной ткани
(Дитченко, 2007)

Механическое повреждение ткани экспланта является достаточно важным фактором для индукции каллусогенеза. Еще со времен Габерландта быстрое деление каллусных клеток связывалось с выделением растением в связи с травмой некрогормонов (позже эти стимулирующие рост вещества получили название травминовой кислоты).

Образование каллуса зависит от размеров экспланта. Для каждого вида растений существует минимальный критический размер экспланта – минимальная масса экспланта, при которой идет каллусогенез. Он сильно варьирует у разных видов. При его уменьшении невозможно индуцировать образование каллуса. Например, экспланты из флоэмы корней моркови массой всего 3,8 мг вполне жизнеспособны для активного роста каллуса, тогда как масса аналогичного экспланта земляной груши слишком мала для индукции каллусогенеза. Это, очевидно, зависит от размеров и, следовательно, числа клеток в эксплантах разных видов растений. Многие ткани обладают физиологической полярностью, поэтому важна определенная ориентация эксплантов в пространстве при переносе их на питательную среду. Кончики корней легко образуют каллус, если они помещены на агар горизонтально. Сегменты стебля лучше образуют каллус, если их поместить вертикально, одним из концов погрузив в агар. При этом каллус образуется

более интенсивно на стороне экспланта, которая на материнском растении обращена к корню. В случае изоляции эксплантов из корнеплодов полярность не имеет существенного значения (Кефели, Дмитриева, 1989).

Для образования каллусной ткани *in vitro* клетки экспланта должны дедифференцироваться, т.е. утратить специфические характеристики исходной ткани. Перестройка клеток эксплантов разных специализаций, предшествующая каллусогенезу, происходит сходным образом. Клетки эксплантов теряют вещества запаса — липиды, крахмал, белки. Фотосинтезирующие клетки теряют хлорофилл и липиды хлоропластов, но при этом возрастает количество амилопластов. Разрушается аппарат Гольджи, перестраивается эндоплазматический ретикулум и элементы цитоскелета, увеличивается число полисом. Клетка синтезирует РНК и ДНК, и начинается экспрессия генов, присущая каллусным клеткам. Исчезают тканеспецифичные белки-антигены и появляются белки, специфичные для делящихся клеток. Эти наблюдения свидетельствуют об изменении активности генов и белкового аппарата клеток при дедифференцировке.

В результате процесса дедифференцировки происходит образование *in vitro* первичного каллуса, что зачастую бывает трудно, т.к. ткани разных видов растений и даже разных частей растения требуют для дедифференциации и каллусогенеза разного количества и соотношения гормонов.

Каллусная ткань, выращиваемая поверхностным способом на агаре, представляет собой аморфную массу тонкостенных паренхимных клеток, не имеющих строго определенной анатомической структуры. Однако было бы ошибочно думать, что каллусные ткани однообразны. Исследователи делят их на типы по таким морфологическим признакам, как цвет, консистенция, характер поверхности, а также по интенсивности роста и способности к зеленению.

В зависимости от консистенции каллусные ткани бывают рыхлыми, среднеплотными и плотными. Рыхлые каллусы состоят из сильно оводненных клеток и легко распадаются на мелкие агрегаты. Среднеплотные каллусы имеют хорошо выраженные места меристематической активности, их клетки могут быть отделены друг от друга сильным взбалтыванием. Для плотных каллусов характерны мелкие клетки, а также наличие выраженных зон с камбиальными и трахеиподобными элементами. Отмечено, что компактные каллусы могут дать начало рыхлым тканям, но не наоборот.

В случае получения первичного каллуса при оптимально подобранной среде часть эксплантов обычно за 3–6 недель образует каллусы в количестве достаточном для пересадки. Для того чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и отмирания каллусных клеток, полученный каллус переносят на свежую питательную среду. Эту операцию называют пассированием. Первичный каллус разделяют на части, которые в дальнейшем культивируются отдельно. Следует обратить внимание на размеры кусочков каллуса, переносимых на свежую питательную среду: если они слишком малы, то дальнейший рост каллуса может быть угнетен. Оптимальный размер пересаживаемого каллуса зависит от вида растения. В некоторых случаях применяется способ субкультивирования без деления полученного каллуса на отдельные кусочки, при котором после пересадки на свежую среду, каллус продолжает расти всем объемом.

Каллусные ткани в условиях *in vitro* можно выращивать неопределенно долго, периодически пересаживая их на свежую питательную среду. Удачно полученные линии каллусных культур требуют регулярной пересадки примерно через каждые 4 недели.

Таким образом, превращению любой клетки в каллусную предшествует процесс глубокой биохимической и структурной перестройки. Добавление к среде экзогенных гормонов приводит к началу каллусогенеза. Обязательное условие дедифференцировки клетки и ее превращения в

каллусную клетку – присутствие в питательной среде представителей двух групп регуляторов роста: ауксинов и цитокининов.

3. ОБЪЕКТ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Объект исследований

Объектом исследований служила клеточная культура растения Зорьки обыкновенной, или Зорьки халцедонской (лат. *Lychnis chalcedonica*) – вида двудольных цветковых растений, включённый в род Зорька (*Lychnis*) семейства Гвоздичные (*Caryophyllaceae*).

Зорька обыкновенная – многолетнее корневищное травянистое растение. Стебли прямостоячие, маловетвистые, жёсткоопушённые, достигающие от 0,5 до 1 м в высоту.

Прикорневые листья лопатчатые, стеблевые листья (в очертании) от ланцетовидных до яйцевидных (до 12 см длиной), по обеим сторонам шершавоопушённые, по краю и средней жилке с нижней стороны волосистые. Цветки собраны по 10–50 в почти головчатые соцветия на верхушке побега, почти сидячие, 1–1,5 см в диаметре. Чашечка трубчатая, узкая, с зубчатым краем. Венчик обычно ярко-алый, реже белый или розовый, лепестки глубоко разделённые на две доли.

Тычинки равные по длине чашечке. Пестики в числе 5, также одной длины с чашечкой. Плод – яйцевидная коробочка до 1 см в диаметре, раскрывающаяся пятью створками. Семена фасолевидные, красно-коричневые. Число хромосом $2n = 24$. Естественный ареал зорьки обыкновенной – Европейская часть России и близлежащие государства. Зорька издавна выращивается в качестве декоративного садового растения в Европе и Северной Америке, где нередко дичает (Губанов и др., 2003).

Растение зорька обыкновенная было впервые указано и описано П.С. Палласом в Ставропольском районе Самарской области в заповеднике «Самарская Лука» в 1769 году. Латинское наименование растения «лихнис» произошло от греческого слова «*Lychnis*», что означает «светоч», «лампа», «светильник». В древности листья одного из видов этого рода применялись в качестве фитилей.

Растение встречается на влажных опушках лиственных и смешанных лесов, по кустарникам, склонам и днищам балок, на лесных полянах и опушках, высокотравных лугах, по долинам рек, в зарослях кустарников, оврагах, в Европе, Сибири, Средней Азии и Монголии среди лугового мезофитного высокотравья. Популяции немногочисленные. Зорька издавна выращивается в качестве декоративного садового растения в Европе и Северной Америке, где нередко дичает.

Лекарственным сырьем зорьки обыкновенной являются цветы, листья и корни, которые собирают в начале и в период полного цветения, до начала плодоношения (обычно с мая по август, но нужно ориентироваться по климатическим условиям). В это время перечисленные части растения накапливают наибольшее количество действующих веществ.

Известно, что основными биологически активными веществами зорьки обыкновенной являются экдистероиды, фенольные соединения: флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, кумарины; полисахариды, сапонины и витамины (Смолякова и др., 2010), именно эти вторичные метаболиты обуславливают геморелогическую активность данного растения (Plotnikov, 2000).

3.2. Методики исследований

3.2.1. Приготовление питательной среды

Приготовление питательной среды включало предварительное приготовление матричных растворов макро- и микросолей (таблица 1). Непосредственно перед экспериментом смеси солей сливали в соответствующей последовательности и количествах (таблица 2).

Таблица 1 – Приготовление матричных растворов

Компоненты	Концентрация мг/л среды
Макросоли	
KNO ₃	1900
NH ₄ NO	1650
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Микросоли	
KJ	0,83
MnSO ₄ • 4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ • 4H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ • 6H ₂ O	0,025
Хелат	
FeSO ₄ • 7H ₂ O	27,8
Na ₂ ЭДТА • 2H ₂ O	37,3

Таблица 2 – Приготовление питательной среды МС (Мурасиге - Скуга)

Среда MS	Концентрация на литр среды
Макросоли	100 мл
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 мл
Микросоли	1 мл
Хелат	10 мл
Агар	9 г
Сахароза	30 г
Никотин	1 мл
Перидоксин	1 мл
Тиамин	1 мл

Питательные среды, не содержащие термолабильных веществ, стерилизовали автоклавированием при давлении 0,5–1,0 атм. Продолжительность стерилизации зависела от объема среды в сосуде. Культуральные сосуды со средой объемом 2–4 л в течение 30–40 мин.

3.2.2. Получение стерильной посуды

Чистую посуду (чашки Петри, пинцеты, сосуды для рассадки семян), предварительно завернутую в бумагу или фольгу, инструменты стерилизовали сухим жаром в сушильном шкафу при температуре 160°C в течение 1,5–2,0 ч.

3.2.3. Работа в ламинарном боксе

Всю последующую работу проводили в ламинарном боксе с соблюдением стерильности.

Работа в ламинарном боксе включала ряд последовательных процедур, предусмотренных инструкцией прибора (Labronco, USA):

- 1) Помещали все необходимые инструменты (горелка, спички, чашки Петри, 70% раствор этилового спирта, вата, пинцеты, скальпели) на стол ламинара;
- 2) Включали продув, закрывали ламинар;
- 3) Включали UV свет на 15–20 минут в токе стерильного воздуха;
- 4) По завершении стерилизации, источник ультрафиолетового света выключали, оставляли бокс в токе стерильного воздуха на 15–20 минут для удаления избытка озона.

Непосредственно перед работой в боксе инструменты стерилизовали еще раз, помещая в фарфоровый или стеклянный стакан с 96%-ным этиловым спиртом и обжигали каждый из них в пламени спиртовки. Стерильные инструменты использовали только для одноразовой манипуляции. Перед повторным использованием их снова обрабатывали спиртом и обжигали.

Руки предварительно обрабатывали ватой, смоченной в 70%-ном растворе этилового спирта. На колени клали мокрое полотенце, в целях безопасности.

2.2.4. Метод получения стерильных проростков

Перед высевом семян на питательную среду проводили их стерилизацию в стерилизующем растворе с последующим высушиванием под УФ-А.

Семена при помощи инструментов аккуратно распределяли по стерильным сосудам, сосуды закрывали фольгой (рисунок 5).



Рисунок 5 – Семена и проросток лихниса на питательной среде МС

Таким образом, использование асептических условий посева (ламинар) предварительно стерилизованных семян позволил заложить эксперимент по получению эксплантов для каллусогенеза.

3.2.5. Метод индукции каллусогенеза

Работу проводили в асептических условиях. Для того чтобы стерильно извлечь растительный материал, первоначально обжигали горлышко в пламени спиртовки. Снимали фольгу и снова обжигали горлышко баночки в пламени спиртовки. Стерилизовали пинцет, которым очень аккуратно производили перенос стерильного растения в стерильные чашки Петри, а затем производили изоляцию эксплантов с помощью стерильного скальпеля (Дитченко, 2009). Для индукции каллуса *Lychnis chalcidonica* L. структурные элементы его стерильных проростков и растений (семядоли, лист) помещали на модифицированную твердую питательную среду *in vitro*.

Индукцию каллусогенеза проводили на среде МС с добавлением гормонов ауксинового и цитокинового рядов.

3.2.6. Метод пассирования клеточной культуры

Для поддержания роста клеточной культуры *L. chalcidonica* каждые 14 дней каллус перемещали на свежую модифицированную твердую

питательную среду *in vitro*. Пассирование клеточной культуры осуществляли на среде МС с добавлением гормонов ауксинового (НУК) и цитокининового ряда (6-БАП). Каллус индуцировался в темноте.

3.2.7. Метод количественного определения экдистерона

Раздел 3.2.7. – 3.2.13 (стр. 40 – 49) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Раздел 3.2.7. – 3.2.13 (стр. 40 – 49) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Раздел 3.2.7. – 3.2.13 (стр. 40 – 49) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Раздел 3.2.7. – 3.2.13 (стр. 40 – 49) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Раздел 3.2.7. – 3.2.13 (стр. 40 – 49) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Раздел 3.2.7. – 3.2.13 (стр. 40 – 49) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Раздел 3.2.7. – 3.2.13 (стр. 40 – 49) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Раздел 3.2.7. – 3.2.13 (стр. 40 – 49) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Раздел 3.2.7. – 3.2.13 (стр. 40 – 49) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Раздел 3.2.7. – 3.2.13 (стр. 40 – 49) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

4. ВЛИЯНИЕ ЭКДИСТЕРОНА И СЕЛЕНА НА РОСТ И ВТОРИЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ *LICHNIS CHALCEDONICA* В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

Глава 4 (стр. 50 – 72) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

ВЫВОДЫ

Раздел ВЫВОДЫ (стр. 73 – 74) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

ВЫВОДЫ

Раздел ВЫВОДЫ (стр. 73 – 74) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстовых выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ № 413/ОД от 24.05.2016 г.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам наших исследований можно заключить, что обработка селеном и экдистероном изменяет темпы роста и развития растений, направление их метаболизма, что можно использовать в практике для регуляции жизнедеятельности растений. Поскольку лихнис халцедонский является лекарственным растением, то наиболее важным является контроль синтеза биологически активных веществ – вторичных метаболитов (экдистероидов, флавоноидов, сапонинов).

Растения для своего выращивания требуют большие площади. Их активная жизнедеятельность ограничена климатическими факторами. В связи с этим, наиболее удобным способом их культивирования является получение *in vitro* микроклонов и клеточной культуры.

Возможность регуляции вторичного метаболизма перечисленных растительных моделей позволяет использовать их в фармакологической промышленности.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

- 1) Bajguza A., Godlewska-Zylkiewicz B. Protective role of 20-hydroxyecdysone against lead stress in *Chlorella vulgaris* cultures // Phytochemistry. 2004. V. 65. – P. 711 – 720.
- 2) Bates L., Waldren R., Teare I. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil, 1973. V. 39. – P. 205–207.
- 3) Bathori M., Pongracz Z. Phytoecdysteroids – from isolation to their effects on humans // Curr Med Chem. 2005. V. 12(2). – P. 153 – 172.
- 4) Chun-Zhao Liu, Praveen K.S. *Saussurea medusa* cell suspension cultures for flavonoid production // Methods in Molecular Biology. 2009. – P. 53 – 59.
- 5) De Veylder L., Beeckman T., Inzé, D. The ins and outs of the plant cell cycle // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2007. V. 8(8). – P. 655 – 665.
- 6) Dinan L., Savchenko T., Whiting P. On the distribution of phytoecdysteroids in plants // Cellular and Molecular Life Sci. 2001. V. 58(8). – P. 1121 – 1132.
- 7) Dinan L. Ecdysteroid structure-activity relationships // Studies in Natural Products Chemistry. 2003. V. 29. – P. 3 – 71.
- 8) Francis D. What's new in the plant cell cycle? // Progress in botany. 2009. – P. 33 – 49.
- 9) Francis Z. The biological action of saponins in animal systems: a review /. Francis Z. Kerem H. Makkar et al. // British J. Nutrition. 2002. V. 88. – P. 587 – 605.
- 10) Harmata J., Dinan L. Biological activity of natural and synthetic ecdysteroids in the BII bioassay. // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 1997. V. 35. – P. 219 – 225.
- 11) Harmatha J., Dinan L., Lafont R. Biological activities of a specific ecdysteroid dimer and of selected monomeric structural analogues in the B(II) bioassay // Insect Biochem Mol. Biol. 2002. V. 32(2). – P. 181 – 185.

- 12) Hostettmann K., Marston A. Saponins. // Chemistry and pharmacology of natural products / Cambridge University Press. 1995. ISBN 978-0-521-32970-5. OCLC 29670810. – P. 3.
- 13) Kreis W., Müller-Uri F. Biochemistry of Sterols, Cardiac Glycosides, Brassinosteroids, Phytoecdysteroids and Steroid Saponins / Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. Annual Plant Reviews book series. 2018. V. 40. – P. 4.
- 14) Lafont R., Horn D. Phytoecdysteroids: Structures and Occurrence // Ecdysone. From Chemistry to Mode of Action / Ed. Koolman J. Stuttgart: Georg Thieme. 1989. – P. 39-64.
- 15) Lafont R. Ecdysteroids and related molecules in animals and plants. Conference on Isoprenoids // Chem Listy. 2003. V. 97. – P. 280 – 281.
- 16) Lafont R., Dinan L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update // Journal of Insect Science. 2003. V. 3(7). – P. 30.
- 17) Morrissey J.P., Osbourn A.E. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis // Microbiol. Mol. Biol.: Reviews. 1999. V. 63. P. 708 – 724.
- 18) Nakanishi K. The ecdysones // Pure and Appl. Chem. 1971. V. 25. – P. 167 – 195.
- 19) Nakanishi K., Koreeda M., Sasaki S., Chang M.L., Hsu H.Y. Insect hormones // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1996. – P. 915 – 917.
- 20) Nakanishi K., Koreeda M., Sasaki S., Chang M.L., Hsu H.Y. Natural antioxidants and biocides from wild medicinal plant // 11th Pacific Science Congress. Abstracts. 1996. – P. 67 – 69.
- 21) Plotnikov M.V. The hemorheological effects of *Lychnis chalconica* L. extracts // Eksp Klin Farmakol. 2000. V. 63(2). – P. 54 – 56.
- 22) Rees H.H. Ecdysteroid biosynthesis and inactivation in relation to function // Europ J Entomol. 1995. V. 92(1). – P. 9 – 39.
- 23) Rossi V., Varotto S., Locatelli, S., Lanzanova C., Lauria M., Zanotti E., Hartings H., Motto M. The maize WD-repeat gene *ZmRbAp1* encodes a member of the MSI / RbAp sub-family and is differentially expressed during endosperm

development // *Molecular Genetics and Genomics*. 2001. V. 26(54). – P. 576 – 584.

24) Slama K., Romanuk M., Sorm F. *Insect Hormones and Bioanalogues*. – Springer-Verlag. 1974. – P. 303 – 305.

25) Slama K., Lafont R. *Insect Hormones – Ecdisteroids: Their Presence and Action in Vertebrates* // *Eur. J. Entomol.* 1995. V. 92. – P. 335-377.

26) Sun H.-X., Xie Y., Ye Y.-P. *Advances in saponin-based adjuvants (англ.)* // *Vaccine*. 2009. V. 27 (12). – P. 1787–1796.

27) Voigt B., Whiting P., Dinan L. The ecdysteroid agonist/antagonist and brassinosteroid-like activities of synthetic brassinosteroid/ecdyteroid hybrid molecules // *Celluar and Molecular Life Sciences*. 2001. V. 58(8). – P. 1133 – 1140.

28) Volodin V., Chadin I., Whiting P., Dinan L. Screening plants of European North-East Russia for ecdysteroids // *Biochemical Systematics and Ecology*. 2002. V. 30(6). – P. 525 – 578.

29) Yao X.Q. Antioxidant responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B / X.Q. Yao, J.Z. Chu, C.J. Ba // *Biol. Trace Elem. Res.* 2010. V. 136. – P. 96–105.

30) Ахрем А.А., Левина И. С., Титов Ю. А. Экдизоны – стероидные гормоны линьки насекомых. – Минск: Наука и техника, 1973. – С. 34 – 48.

31) Ахрем А.А., Ковганко Н.В. Экдистероиды: химия и биологическая активность. – Минск: Наука и техника, 1989. – С. 135 – 138, 329.

32) Балтаев У.А. Фитоэкдистероиды – структура, источники и пути биосинтеза в растениях // *Биоорганическая химия*. Т. 26(1). 2000. – С. 892 – 925.

33) Барабой В. А., Шестакова Е. Н. Селен: биологическая роль и антиоксидантная активность // *Украинский биохимический журнал*. 2004. Т. 76 (1). – С. 23.

- 34) Бердичевец Л.Г. Биотехнологические подходы культивирования представителей рода *Digitalis* L. / Л.Г. Бердичевец, Т.И. Фоменко // Сборник статей Международной научной конференции. – Минск, 2014. – С. 55–59.
- 35) Блинохватов А.Ф. Селен в биосфере / А.Ф. Блинохватов, Г.В. Денисова, Д.Ю. Ильин и др. – Пенза: РИО ПГСХА, 2001. – С. 324.
- 36) Бутенко Р. Г. Биотехнология растений: культура клеток / Р. Г. Бутенко. – Москва: Агропромиздат, 1989. – С. 280.
- 37) Вапиров В.В. Селен. Некоторые аспекты химии, экологии и участия в развитии патологии / Вапиров В.В., Шубина М.Э., Вапирова Н.В., Беличенко В.И., Шубин И.В. – Петрозаводск: ПетрГУ, 2016. – С. 68.
- 38) Гиляров М.С. Биологический энциклопедический словарь / М. С. Гиляров, А. А. Баев, Г. Г. Винберг и др. – Москва: Сов. Энциклопедия, 1986. – С. 864.
- 39) Глеба Ю.Ю. Гибридизация соматических клеток растений // Культура клеток растений / Ю. Ю. Глеба. – Москва: Наука, 1981. – С. 85 – 91.
- 40) Головацкая И.Ф. Действие экдистерона на морфофизиологические процессы в растении // Физиология растений. 2004. Т. 51, № 3. – С. 452 – 458.
- 41) Головацкая И.Ф., Володина Н.А. Регуляция роста и вторичного метаболизма клеточной культуры *Saussurea orgadai* 28-гомобрасинолидом и селеном // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15, № 3 (6). – С. 1591 – 1595.
- 42) Головацкая И. Ф. Влияние селена на морфогенез и биохимические параметры растений *Triticum aestivum* L. в зависимости от селективного света / (и др.) // Агрохимия. 2013. – №5. – С. 58–65.
- 43) Головацкая И.Ф. Регуляция селеном ростовых и антиоксидантных реакций *Lychnis chalcidonica* на стадии цветения / И.Ф. Головацкая (и др.) // Роль физиологии и биохимии в интродукции и селекции овощных, плодово-ягодных и лекарственных растений: материалы III международной конференции. М. 2017. – С. 135–138.

44) Головацкая И.Ф., Шипицына Н.В., Видершпан А.Н., Бойко Е.В., Иванова В.А., Нечаева М.В. Зависимость уровня флавоноидов в *Melilotus officinalis* от способа внесения селена. // Фенольные соединения: функциональная роль в растениях: сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», Москва, 14-19 мая 2018 г. / отв. ред. Н.В. Загоскина – М.: ИФР РАН. 2018. – С. 443.

45) Головацкая И.Ф., Кабил Ф., Когай В., Кайлер О.А., Нечаева М.В., Гавенко А.А., Гурина Е.А. Устойчивость растений-регенерантов *Solanum tuberosum* к ионам меди *in vitro* // Актуальные проблемы картофелеводства: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, 10–13 апреля 2018 г. / отв. ред. М.В. Ефимова. – Томск: Издательский Дом Томского государственного университета. 2018. – С. 40 – 45.

46) Горовиц М.Б., Зацны И.Л., Абубакиров Н.К. Экдизоны в растительном мире // Раст. Ресурсы. 1974. № 10. – С. 261 – 274.

47) Губанов И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России / И.А. Губанов, К.В. Киселева, В.С. Новиков и др. – М.: Т-во науч. изд. КМК. 2003. – С. 535.

48) Давыденко Н.И. Обоснование необходимости комплексного обогащения при разработке функциональных хлебобулочных изделий / Н.И. Давыденко, В.А. Нестерова, А.И. Карчевная // Ползуновский вестник. – 2012. – №2/2. – С. 201–206.

49) Дитченко, Т. И. Курс лекций «Культура клеток, тканей и органов растений» / Т. И. Дитченко. – Минск: БГУ. 2007. – С. 14 – 17.

50) Дитченко Т.И. Физиология роста и развития растений: метод. рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов / Т.И. Дитченко. – Минск: БГУ. 2009. – С. 36.

51) Зибарева Л. Н. Виды рода *Lychnis* L. – перспективные источники экдистероидов // Растительные ресурсы. 1995. Т. 31, вып. 4. – С. 1–9.

52) Ивановский А.А. Влияние биоинфузина на некоторые показатели иммунитета // Ветеринария. 2000. №9. – С. 43 – 46.

53) Карначук Р.А. Экдистерон в листьях растений в условиях селективного света // Теоретические и практические аспекты изучения лекарственных растений : материалы, посвященные памяти проф. Л.М. Березнеговской / под ред. Березовской Т.Б. Томск; сиб. мед. гос. ун-т. 1996.– С. 91-95.

54) Кефели В.И. Биотехнология: курс лекций / В.И. Кефели, Г.А. Дмитриева. – Пущино. 1989. – С. 96.

55) Генетические основы селекции растений в 4т. Т.3. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия / науч. Ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск: Беларус, навука. 2012. – С. 94.

56) Колупаев Е. Ю. Пролин: физиологические функции и регуляция содержания в растениях в стрессовых условиях / Ю. Е. Колупаев, А. А. Вайнер, Т. О. Ястреб // Вісник харківського національного аграрного університету. Біологія. 2014. – Т. 2 (32). – С. 16 – 17.

57) Кузнецов В. В. Защитное действие селена при адаптации растений пшеницы к условиям засухи : автореф. дис. кан. биол. наук / Вас. В.Кузнецов. – М. 2004. – С. 21.

58) Кузнецов В.В. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. В.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. – Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2012. – С. 348.

59) Кулагина Ю. М. Влияние селенита натрия на рост и развитие растений пшеницы в зависимости от способа обработки / Ю. М. Кулагина, И. Ф. Головацкая // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2011. – Т. 14, № 2. – С. 56–64.

60) Е. Я. Ладыгина. Химический анализ лекарственных растений: Учеб. пособие для фармацевтических вузов / Ладыгина Е. Я., Сафронич Л. Н.,

Отряшенкова В. Э. и др. Под ред. Гринкевич Н. А., Сафронич Л. Н. – М.: Высшая Школа. 1983. – С. 176.

61) Биотехнология – сельскому хозяйству / А.Г. Лобанок, М.В. Залашко, Н.И. Анисимова и др. – Минск: Урожай. 1988. – С. 199.

62) Макаревич Е.В., Филиппова Е.В. Экстракты растительного происхождения ингибируют размножение вируса гриппа в культуре клеток MDCK // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 4. – С. 273 – 274.

63) Муравьева Д. А., Самылина И. А., Яковлев Г. П. Фармакогнозия. – 4 изд. – М.: Медицина, 2002. – 656 с. – ISBN 5-225-04714-9. – С. 323

64) Мурашкина И.А., Васильев И.Б., Гордеева В.В. Использование культуры клеток растений в биотехнологии лекарственных средств.– Иркутск: ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России. 2015. – С. 83.

65) Нечаева М. Н. Влияние экдистерона на морфологию клеточной культуры *Lychnis chalcidonica* L. *in vitro* / М.В. Нечаева, К.А. Рухляда // Материалы LXIX научной студенческой конференции Биологического института «Старт в науку». 2020. – С. 46.

66) Пунегов В. В., Сычев Р. Л., Зайнуллин В. Г., Федоров В. Н, Пунегова Н. В. Получение субстанции Экдистерон-80 из *Serratula coronata* L. и оценка ее фармакологического действия. I. Адаптогенная, гастропротекторная, термопротекторная и антигипоксическая активность субстанции. – Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42 (8). – С. 6.

67) Русецкая Н.Ю. Структурно-функциональные закономерности биологического действия халькогеноорганических соединений: дис. канд. биол. наук / Н.Ю. Русецкая. – Саратов. 2014. – С. 318.

68) Сергалиева М.У., Мажитова М.В., Самотруева М. А. Биологическая активность экстрактов растений рода *Astragalus* // Современные проблемы науки и образования. 2015. №5. – С. 40 – 42.

69) Смолякова И.М., Авдеев С.Н., Калинкина Г.И., Зибарева Л.Н. Исследование химического состава лихниса халцедонского, культивируемого в Западной Сибири // Химия растительного сырья. 2010. № 3. – С. 9.

70) Спектрофотометрическое определение суммарного содержания флавоноидов в лекарственных препаратах растительного происхождения / Сорокина О.Н. (и др.) // Известия Саратовского ун-та. Новая серия. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2013. – Т. 13, вып. 3. – С. 8–11.

71) Странски К., Немец В., Слама К. Липидный состав семян у содержащего экистероиды вида растений *Leuzea carthamoides* (Willd.) DC (*Asteraceae*) // Физиология растений. 1998. Т. 45. – С. 390-396.

72) Тимофеев Н.П. Левзея сафлоровидная: Проблемы интродукции и перспективы использования в качестве биологически активных добавок // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты. Сб. научн. трудов. Вып. 5. – Москва, РАЕН. 2001. –С. 108 – 134.

73) Тимофеев Н. П. Накопление и сохранность 20-гидроксиэкидизона в лекарственном сырье левзеи // Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения. – Казань, Казанский национальный исследовательский технологический университет. 2004. Т. 2 (5). – С. 25

74) Тимофеев Н.П. Фитозкистероиды: фармакологическое использование и активность (обзор) // Медицинские науки. 2005. № 4. – С. 26 – 66.

75) Тимофеева О.А. Культура клеток и тканей растений / О.А. Тимофеева, Н.И. Румянцева. – Казань, 2012. – 91 с.

76) Червяковский Е. М. Роль флавоноидов в биологических реакциях с переносом электронов / Е.М. Червяковский, В.П. Курченко, В.А. Костюк // Белорусский государственный университет. – Минск, Республика Беларусь. 2009: Т. 4 (1). – С. 1.

77) Шахмурова Г. А., Сыров В. Н., Хушбактова З. А.. Иммуномодулирующая и стресс-протективная активность

фитозкдистероидов экдистерона и туркестерона при иммобилизационном стрессе у мышей // Химико-фармацевтический журнал. 2010. Т. 44(1). – С. 9.

78) Широков А.И. Основы биотехнологии растений / Учебно-методическое пособие / А.И. Широков, Л.А. Крюков. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет. 2012. – С. 49.

79) Шихалеева Г.Н. Модифицированная методика определения пролина в растительных объектах / Г.Н. Шихалеева, А.К. Будняк, И.И. Шихалеев, О.Л. Иващенко // Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина. 2014. – вып. 21, №1112. – С. 168–172.

80) Шубина О.И. Влияние селенита натрия на рост, фотосинтетические показатели, продуктивность яровой пшеницы и накопление в ней селена на черноземе бескарбонатном в Восточном Забайкалье : автореф. дис. канд. биол. наук / О.И. Шубина. – Улан-Удэ. 2013. – С. 132.

81) Яцюк Я.К., Сегель Г.М. О выделении экдистерона // Химия природных соединений. 1970. №2. – С. 281.

Введите текст:

...или загрузите файл:

Файл не выбран...

Выбрать файл...

Укажите год публикации: 2020

Выберите коллекции

- ☒ Все
 ☒ Рефераты
 ☒ Авторефераты
 ☒ Иностранные конференции
 ☒ PubMed
- ☒ Википедия
 ☒ Российские конференции
 ☒ Иностранные журналы
- ☒ Российские журналы
 ☒ Энциклопедии
 ☒ Англоязычная википедия

Анализировать

Проверить по расширенному списку коллекций системы Руконтекст

Обработан файл:
для библиотеки.doc.

Год публикации: 2020.

Оценка оригинальности документа - 95.06%

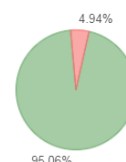
Процент условно корректных заимствований - 0.0%

Процент некорректных заимствований - 4.94%

Просмотр заимствований в документе

Время выполнения: 31 с.

Документы из базы



Источники заимствования	В списке литературы	Источники Заимствования
1. Защитное действие селена при адаптации растений пшеницы к условиям засухи Авторы: Кузнецов, Василий Владимирович. Год публикации: 2004. Тип публикации: автореферат диссертации. http://dlib.rsl.ru/loader/view/01002669311?get=pdf Показать заимствования (8)	—	1.52%
2. Реферат: Клеточная биотехнология Год публикации: 2016. Тип публикации: реферат. http://www.bestreferat.ru/files/35/bestreferat-140435.docx Показать заимствования (9)	—	1.37%
3. Регуляция роста и вторичного метаболизма клеточной культуры Saussurea orgadai 28-гомобрассинолидом и селеном Авторы: Головацкая Ирина Феоктистовна, Володина Наталья Александровна. Год публикации: 2013. Тип публикации: статья научного журнала. http://cyberleninka.ru/article/n/regulyatsiya-rosta-i-vtorichnogo-metabolizma-kletochnoy-kultury-saussurea-orgadai-28-gomobrassinolidom-i-selenom Показать заимствования (8)	—	1.36%
4. ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ СЕЛЕНА ПРИ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ К УСЛОВИЯМ ЗАСУХИ Авторы: Кузнецов, Василий Владимирович. Год публикации: 2004. Тип публикации: автореферат диссертации. http://dlib.rsl.ru/loader/view/01000809140?get=pdf Показать заимствования (7)	—	1.35%
5. Клеточная биотехнология Год публикации: 2016. Тип публикации: реферат. http://mobiro.org/downloads/biologija/11173.zip Показать заимствования (8)	—	1.13%
6. Влияние брассиностероидов на формирование защитных реакций проростков рапса в условиях засоления Авторы: Ефимова Марина Васильевна, Мануйлова Арина Владимировна, Малофий Марина Константиновна. Год публикации: 2013. Тип публикации: статья научного журнала. http://cyberleninka.ru/article/n/vliyaniye-brassinosteroidov-na-formirovaniye-zaschitnyh-reaktsiy-prorostkov-rapsa-v-usloviyah-zasoleniya Показать заимствования (7)	—	0.98%

Значимые оригинальные фрагменты

Библиографические ссылки

Искать в Интернете

Дополнительно

Руководителю ООП
магистратуры по направлению
06.04.01 Биология ТГУ
Зав. каф. физиологии растений и
биотехнологии, доктору биол.
наук, профессору
О. В. Карначук
от студентки 2 курса
магистратуры М. В. Нечаевой

СЛУЖЕБНАЯ ЗАПИСКА

Прошу разрешить размещение текста моей магистерской диссертации «Влияние экдистерона и селена на рост и вторичный метаболизм клеточной культуры *Lichnis chalconica* в условиях *in vitro*», выполненной на базе кафедры физиологии растений и биотехнологии БИ ТГУ (научный руководитель – И. Ф. Головацкая), в Электронной библиотеке (репозитории) ТГУ с изъятием следующих разделов, поскольку они содержат неопубликованные данные, в том числе результаты интеллектуальной деятельности в научно-технической сфере, которые имеют потенциальную коммерческую ценность, а так же описание модифицированных методик: раздел «Объект и методики исследований: п. 3.2.7-3.2.13, раздел 4 « Влияние экдистерона и селена на рост и вторичный метаболизм клеточной культуры *Lichnis chalconica* в условиях *in vitro*», «Выводы».

29.05.2020

М. В. Нечаева

О.В. Карначук