Муниципальное казенное общеобразовательное учреждение «Средняя школа № 3» г. Калача-на-Дону Волгоградской области

**Изучение семенного размножения *in vitro* редких видов семейства *Fabaceae*.**

**Выполнили:**Ничипорова Вероника,учащаяся 10 классаМКОУ  
 «СШ № 3» г.Калача-на-Дону

**Руководители:**Зубов Игорь Анатольевич, учитель химии   
и биологии МКОУ «СШ № 3» г. Калача-на-Дону»

**Консультант:**

зам. директора ГБУ ВО «Волгоградский региональный ботанический сад», к.б.н., Малаева Е.В.

Калач-на-Дону, 2018г.

**Содержание**

Список использованных сокращений‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧ 3

Введение………………………………………………………………………………..4

Методика‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧ 7

Результаты‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧ 9

Выводы‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧ 14

Список литературы‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧‧ 16

Приложение…………………………………………………………………………….17

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

6-БАП – 6-бензиламинопурин

6-БАПр – 6-бензиламинопурин рибозид

Z - зеатин

К – 6-фурфуриламинопурин (кинетин)

**Введение**

В последние десятилетия сохранение биологического разнообразия, является крайне актуальной задачей. Угроза сохранению отдельных видов и экосистем еще никогда не была так велика, как сегодня, когда рост населения и последствия хозяйственной деятельности приводят к необратимым изменениям природы нашей планеты. На XVI Международном ботаническом конгрессе, проходившем в августе 1999 г. в США подчеркивалось, что если не принять в ближайшее время действенные меры по сохранению видового разнообразия растений, то к середине XXI века могут быть потеряны от 1/3 до 2/3 из300 000 видов растений, обитающих в настоящее время на Земле (Ревин, 2000). Таким образом, крайне актуальным и необходимым является разработка реализация эффективных мероприятий по сохранению биоразнообразия. Наряду с традиционными способами сохранения растений все большее значение приобретает использование для этих целей культуры изолированных тканей и органов (Камелин, 1997; Вечернина, 2004,2006).

Использование системы *in vitro* имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными методами поддержания коллекций растений. Среди них-экономия площадей и затрат труда, независимость от климатических условий, возможность использования минимального количества эксплантов для получения стерильных культур без нарушения природных популяций, репродукция материала, трудно размножаемого традиционными методами и возможность его длительного хранения в асептических условиях (Молканова,2008).

По своей сути микроклональное размножение аналогично вегетативному пути размножения растений с той лишь разницей, что оно протекает в пробирке в услових *in vitro*, где из клеток изолированных тканей в итоге можно получить достаточно большое количество новых растений. Обязательным условием микроклонального размножения является идентичность полученного растительного материала исходному материнскому растению. Еще недавно этот способ рассматривали как возможность ускоренного размножения, а также как вспомогательный метод освобождения растений от вирусов. Однако результаты некоторых исследований показали, что значение этого метода существенно возрастает для клоновой селекции растений (экспериментальный мутагенез и расхимеривание), криосохранение ценного исходного зародышей в условиях invitro используется для разработки технологии массового и непрерывного получения «искусственных семян». Более того, использован для создания синтетических сортов. (Молканова, 2008).

Копеечник меловой (*Hedysarum cretaceum* Fisch.),Копеечник крупноцветковый (*Hedysarum grandiflorum* Pall.) и Копеечник Разумовского (*Hedysarum razoumovianum* Fisch. et Helm ex DC.) и Дрок донской (*Genista tanaitica* P.A.Smirn.) относятся к группе эндемичных и узкоспециализированных видов меловых обнажений. Это виды неустойчивы в культуре. Их численность лимитируется слабой конкурентоспособностью растений, хозяйственной разработкой мела, неумеренным выпасом скота. Сложная история формирования флоры меловых обнажений обусловила наличие особых растительных группировок и высокую степень эндемизма кальцефильных растений. Резко выраженный своеобразный химизм и механический состав почвы, температурные условия и световой режим, данных местообитаний, представляют комплекс факторов, обуславливающих развитие особых адаптационных приспособлений у растений-кальцефилов, представляющих серьезный научный интерес.

Облигатные кальцефиты не одинаково реагируют на условия культивирования (перенесение видов из природы на участки Ботанического сада).

В связи с этим особенно актуальным становится разработка эффективных способов размножения данных видов, в том числе и клонального микроразмножения данных, которые позволят обеспечить содержание их в культуре и как следствие сохранение их генофонда.

**Целью** работы являлось изучение особенностей семенного размножения *in vitro* для сохранения и ускоренного микроразмножения редких видов семейства *Fabaceae*.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи:**

1. выявить условия эффективного введения в культуру *in vitro* редких видов Копеечников и Дрока донского;
2. изучить эффективность различных стерилизующих агентов в зависимости от концентрации и времени экспозиции;
3. разработать надежные методы регенерации изолированных эксплантов на искусственных питательных средах;
4. подобрать оптимальные концентрации фитогормонов и условий культивирования на этапе микроразмножения;
5. оптимизировать состав питательных сред на всех этапах культивирования.

**Объект исследования:** В качестве первичного материала для введения в культуру послужили в основном семенаКопеечник меловой (*H. cretaceum*),Копеечник крупноцветковый (*H. grandiflorum*), Копеечник Разумовского (*H. razoumovianum*) и Дрок донской (*Genista tanaitica*), собранные в природных популяциях Волгоградской области и на интродукционном участке природной флоры Волгоградского регионального ботанического сада.

**Сроки проведения исследования:** апрель 2017- сентябрь 2018 гг.

Копеечник меловой (*H. cretaceum*),Копеечник крупноцветковый (*H. grandiflorum*), Копеечник Разумовского (*H. razoumovianum*) и Дрок донской (*Genista tanaitica*) являются редкими видами, занесенными в Красную книгу Российской Федерации и Красную книгу Волгоградской области (Красная книга РФ, 2008, Красная книга Волгоградской области, 2017).

**Дрок донской (Genista tanaitica P.A.Smirn.)**

Категория 3а. Редкий вид, узкоареальный эндемик. РКР – A, L. Занесен в Красную книгу РФ (категория 3) (Красная книга РФ, 2008).

Донецко-донской эндемик. На территории Волгоградской области отмечается на меловых обнажениях по рр. Иловле, Хопру, Бузулуку, Голубой и по правобережью р. Дона. Низкий кустарник 20–50 см высотой, с косо вверх направленными, ветвистыми, слегка опушенными или почти голыми побегами. Листья линейно-ланцетные или почти линейные. Цветки в рыхлых кистях, желтые, все части их голые. Кальцефил. Растет одиночно или небольшими группами на плотных мелах, предпочитая довольно крутые склоны с разреженной растительностью. Предпочитает сухие супесчаные и каме­нистые известковые почвы. Очень светолюбив и засухо- устойчив. Цветет в мае – июне. Энтомофил. Размножение семенное.

Лимитирующие факторы. Природно-историческая редкость вида, узкая экологическая амплитуда и низкая конкурентоспособность, пространственная разобщенность и малочисленность большинства популяций. Хозяйственное освоение территории (добыча мела, неумеренный выпас скота); на пологих склонах и ровных участках численность особей может сокращаться в результате развития сомкнутого растительного покрова, тогда как популяции на почти отвесных склонах коренных берегов рек устойчивы.

Растет единичными экземплярами или небольшими группами. Численность невелика.

Произрастает на территории природных парков «Донской» и «Нижнехоперский». Сведения о возможности сохранения вида в условиях культуры. Культивируется в в Волгоградском региональном ботаническом саду (Красная книга Волгоградской области, 2017).

**Копеечник меловой (*Hedysarum cretaceum* Fisch.)**

Категория 3а. Редкий вид, узкоареальный эндемик. Занесен в Красную книгу РФ (категория 3) (Красная книга РФ, 2008). Травянистый стержнекорневой многолетник, высотой 20–50 cм. Сообщества копеечника мелового встречаются на плотном чистом меле, на щебенке и мелкоземе, а также на частично задернованных участках; на крутых щебнистых склонах и обрывах. Однако чаще всего они приурочены к вершинам меловых обнажений. Цветет в июне – июле. Энтомофил. Плодоношение в июле – августе. Размножение как семенное, так и вегетативное.

Лимитирующим фактором для данного вида является хозяйственная деятельность человека: неумеренный выпас скота, разработка мела, распашка склонов. Вид охраняется на территории природных парков «Нижнехоперский» и «Донской» и успешно культивируется в течение многих лет в Волгоградском региональном ботаническом саду (Красная книга Волгоградской области, 2017).

**Копеечник крупноцветковый (*Hedysarum grandiflorum* Pall.)**

Категория 5б. Вид, занесенный в Красную книгу РФ, которому на территории Волгоградской области исчезновение не угрожает. Занесен в Красную книгу РФ (категория 3) (Красная книга РФ, 2008).

Травянистый стержнекорневой многолетник, (15)20-40(50) см высотой. Корень разветвленный, дающий из корневой шейки пучок укороченных побегов. Стебли сильно укороченные. Цветет в июне – июле, иногда повторно в августе – сентябре. Энтомофил. Плоды созревают в июле – августе, размножение только семенное. Лимитирующим фактором для данного вида является хозяйственная деятельность: разработка мела, неконтролируемый выпас скота.

Охраняется на территории природных парков «Нижнехоперский», «Донской» и «Щербаковский» и культивируется в Волгоградском региональном ботаническом саду (Красная книга Волгоградской области, 2017).

**Копеечник Разумовского (*Hedysarum razoumovianum* Fisch. et Helm ex DC.)**

Категория 3б. Редкий вид, имеющий значительный ареал, в пределах которого встречается спорадически и с небольшой численностью популяций. Занесен в Красную книгу РФ (категория 3) (Красная книга РФ, 2008). Эндем Заволжья, Южного Урала и Приволжской возвышенности. В Волгоградской области находится на юго-западной границе ареала. Единственное известное местонахождение находится в Камышинском р-не вблизи слияния балок Даниловская и Воднобуерачная, на границе с Саратовской областью. Травянистый стержнекорневой многолетник (поликарпик) высотой 20–40 см. Корень стержневой, мощный. Обитает на мергелевых склонах, подверженных значительной ветровой и водной эрозии, совместно с Artemisia salsoloides. Энтомофил. Плодоношение в июне – июле. Размножение семенное. Лимитирующими факторами является низкая конкурентоспособность, узкая экологическая амплитуда, малая площадь подходящих местообитаний. Охраняется на территории природного парка «Щербаковский» (Красная книга Волгоградской области, 2017).

**2.Методика**

Методика исследований базировалась на общепринятых классических приемах с культурами изолированных тканей и органов растений (Калинин, 1980; Бутенко, 1999; Методические указания МСХА им. К.А.Тимирязева, 1996). Все манипуляции с культурами тканей проводили в стерильных условиях горизонтального ламинар-бокса. В качестве первичных эксплантов использовали семена, собранные из природных популяций и интродукционного участка Волгоградского регионального батанического сада. Итоговый материал исследования имел следующий вид:

**1) Дрок донской**

- семена с интродукционного участка ГБУ ВО «ВРБС»;

**2) Копеечник Разумовского**

- семена с интродукционного участка ГБУ ВО «ВРБС»;

- семена, Волгоградская область, Камышинский район, Даниловский овраг;

**3) Копеечник меловой**

- семена, Волгоградская область, Ольховский район, с. Каменный брод;

- семена с интродукционного участка ГБУ ВО «ВРБС»;

**4) Копеечник крупноцветковый**

- семена с интродукционного участка ГБУ ВО «ВРБС»;

- семена, Волгоградская область, Камышинский район, балка Кривцовская;

Стерилизацию эксплантов проводили с помощью различных хлорсодержащих стерилизующих агентов с различным временем экспозиции. Оптимальный режим стерилизации определяли по жизнеспособности первичных эксплантов и наличию инфекции. Методика по применению стерилизующего вещества – «Лизоформин 3000» устанавливалась опытным путем сотрудниками биотехнологической лаборатории ГБУ ВО «ВРБС».

Семена предварительно обрабатывали 95%-ным этиловым спиртом в течение 50-60 секунд. В качестве стерилизатора использовали различные концентрации Белизны и Лизоформина (Табл.1).

Таблица 1.

**Варианты режимов стерилизации семян Дрока и Копеечников**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Действующее вещество** | Вариант стерелизации | |
| 10%-й | 20%-й |
| Лизоформин | 5 мин |  |
| 7мин |  |
| Белизна |  | 5 мин |
|  | 7 мин |

После многократного промывания в стерильной дистиллированной воде семена высаживали на безгормональную питательную среду с минеральной основой по прописи Мурасиге-Скуга (Murashige, Scoog, 1962) (Приложение 1). При оценке оптимального режима стерилизации учитывали количество заросших и количество проросших семян.

Для оптимизации состава сред на этапе микроразмножения были поставлены опыты на питательной среде, содержащей минеральные соли по Мурасиге и Скугу, витамины PP, B1 – по 5 мг/л, B6 – 2 мг/л, С – 1 мг/л, 20 г/л сахарозы, 6,5 г/л агар-агара. В вариантах к этой основе добавляли в различных концентрациях и соотношениях 6-БАП, 6-БАПр, кинетин, заетин. При этом отмечали: 1) коэффициент размножения – количество растений развившихся из одного экспланта; 2) количество аномальных (витрифицированных) растений.

В условиях *in vitro* растения культивировали в чашках Петри и биологических пробирках при освещении с интенсивностью 3 – 5 клк, при 16-часовом фотопериоде, температуре 240С и относительной влажности воздуха 70%.

Все опыты проводили трижды, повторность в каждом варианте 10-кратная. Результаты экспериментальных данных обрабатывались статистически па методике Б.А. Доспехова (Доспехов, 1985).

**3. Результаты**

Одним из наиболее трудоемких моментов по введению первичных эксплантов в асептическую культуру является получение стерильного материала.

При работе с редкими и исчезающими видами растений наиболее доступным материалом являются семена, собранные из природных мест обитания. Важным фактором является режим стерилизации, обеспечивающий максимальный выход жизнеспособных эксплантов.

Эмпирическим путем определяли время поверхностной стерилизации, которое зависело от процента жизнеспособных регенерантов. Использование препарата «Лизоформин 3000» позволило получить максимальный выход стерильных эксплантов для всех исследованных видов копеечников и дрока (табл. 2). В результате проведенных экспериментов был подобран оптимальный режим стерилизации семян редких видов семейства *Fabaceae* – 10%-ный раствор лизоформина в течение 5 минут. В данном случае был получен самый большой процент стерильных эксплантов – 60-90%.

Табл. 2.

**Влияние различных режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов *H. cretaceum*, *H. grandiflorum* и *H. razoumovianum и G. tanaitica***

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Стерилизующий агент** | **Режим стерилизации** | **Количество стерильных эксплантов, %** | | | |
| ***H. razoumovianum*** | ***H. cretaceum*** | ***H. grandiflorum*** | ***G. tanaitica*** |
| «Лизоформин 3000» | 10%, 5 мин. | **90** | **70** | **60** | **70** |
| 10%, 7 мин. | 60 | 30 | 40 | 30 |
| Гипохлорид натрия в составе белизны | 20%, 5 мин. | 20 | 25 | 30 | 20 |
| 20%, 7 мин. | 30 | 25 | 45 | 30 |

Анализируя полученные результаты мы установили, что с увеличением времени стерилизации увеличивается процент стерильных эксплантов, но в то же время уменьшается процент проросших семян. Что, скорее всего, связано с ингибирующими свойствами лизоформина. Оптимальный временной режим стерилизации находится в пределах до 5 минут.

В результате проведенных исследований установлено, что семена Копеечников, собранные с интродукционного участка Ботанического сада имели боле высокий процент всхожести по сравнению с природными популяциями (рис. 1,2). Вероятно, это связано с соблюдением агротехнических мероприятий на интродукционном участке Ботанического сада: полив, прополка сорняков и т.д.

**Прорастание семян Копеечников, собранных с интродукционного участка Ботанического сада**

Рис. 1. Условные обозначения: 1 – Контроль, дистилированная вода; 2 – Белизна 20%, 5 минут; 3 – Белизна 20%, 7 минут; 4 – Лизоформин 10%, 5 минут; 5 – Лизоформин 10%, 7 минут.

**Прорастание семян Копеечников, собранных с природных популяций Волгоградской области**

Рис. 2. Условные обозначения: 1 – Контроль, дистилированная вода; 2 – Белизна 20%, 5 минут; 3 – Белизна 20%, 7 минут; 4 – Лизоформин 10%, 5 минут; 5 – Лизоформин 10%, 7 минут.

В результате исследований по стерилизации семян установлено влияние режимов стерилизации на сроки прорастания; пообобраны их оптимальные концентрации и время экспозиции. Так, при увеличение времени стерилизации увеличивался процент стерильных семян, но повышался процент непрорастающих и растягивались сроки прорастания.

Также были исследованы всхожесть и динамика прорастания в зависимости от состава питательной среды. Различия в прорастании семян при введении в культуру *in vitro* во многом обусловлены генетическими и морфофизиологическими причинами.

Для изучения семенного размножения Дрока донского был заложен эксперимент по проращиванию семян на питательной среде, содержащей агар и жидкой питательной среде, так как семена в наличии были только с интродукционного участка Волгоградского регионального ботанического сада. Семена начали прорастать на 9 день после введения в культуру *in vitro* (рис. 3).Стерилизацию использовали по установленному ранее оптимальному режиму: Лизоформин 5% с экспозицией 10 минут.

Было установлено, что на агаризованной безгормональной среде после стерилизации семена начинали прорастать немного позже, чем в чашках Петри с водой (лабораторная всхожесть) и безгормональной жидкой среде. Причем наблюдалось заметное отличие динамики прорастания семян. Наименьшей энергией прорастания обладали семена, помещенные на среду, содержащую агар, проросли только 7 семян. На безгормональной питательной среде не содержащей агар получили максимальное количество проросших семян *Дрока донского* – 12.



Рис. 3. Динамика прорастания семян *Genista tanaitica*

Также был проведен эксперимент по посеву семян на различные питательные среды. В качестве регуляторов роста добавляли 6-БАП в разных концентрациях. В результате эксперимента был сделан вывод о необходимости проращивания семян на безгормональной среде. Питательные среды, содержащие гормоны, оказывали угнетающее влияние на развитие проростков. Наблюдали появление аномально утолщенных проростков, в то время как на безгормональной среде формировались проростки без морфологических отклонений.

Проростки *Копеечника Разумовского 3-й день* (жидкая питательная среда) и 4-й день (агаризованная питательная среда) (рис. 4). Всхожесть составила 90 %, в то время как лабораторная всхожесть в чашках Петри была 30%. Для *Копеечника мелового* всхожесть составила 70 %; семена проросли на 3-й (жидкая питательная среда) и 4-й день (агаризованная питательная среда) (рис. 5). Лабораторная всхожесть в чашках Петри была 40%.

**Динамика прорастания Копеечника Разумовского на агаризированной и жидкой питательной среде Мурасига и Скуга.**

**Динамика прорастания Копеечника мелового на агаризированной и жидкой питательной среде Мурасига и Скуга.**

На этапе микроразмножения на средах с добавлением различных цитокининов виды вели себя по разному (табл. 3).

**Табл. 3.**

**Регенерационная способность *Hedysarum grandiflorum* и *Hedysarum cretaceum*.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Цитокинины, мг/л | Коэффициент размножения, шт/ эксплант | Витрифици-  рованные регенеранты, % | Коэффициент размножения, шт/ эксплант | Витрифици-  рованные регенеранты, % |
|  | *Hedysarum cretaceum* | | *Hedysarum grandiflorum* | |
| БАП 0,5 | 2,0±0,3 | 80 | **3,8±0,5** | 10 |
| БАП рибозид 0,5 | **4,6±0,8** | - | 2,2±0,3 | 30 |
| Зеатин 1,0 | 2,5±0,4 | 20 | 1,2±0,2 | - |
| Кинетин 0,5 | 2,0±0,2 | - | 2,2±0,3 | - |
| Кинетин 1,0 | 1,8±0,2 | 10 | 2,5±0,4 | - |

Практически на всех средах у копеечников наблюдалась витрификация побегов. Для *H. grandiflorum* оптимальным явилось содержание на среде с добавлением 0,5 мг/л БАП, в то время как у *H. cretaceum* наблюдалась значительная витрификация. Для него лучше подошла среда с добавлением 0,5 БАП рибозид. Оба вида неплохо себя чувствовали и на среде с 0,5 мг/л кинетина – хотя коэффициент размножения и не был высок, но растения были нормальной морфологии.

*Дрок донской* неоднократно вводился в культуру в различных ботанических садах, но надежных способов культивирования пока не найдено. Для оптимизации состава среды на этапе микроразмножения к питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС, добавляли в различных концентрациях зеатин, кинетин и 6-БАП.

Из всех исследуемых цитокининов наибольший коэффициент размножения – 4, наблюдали при использовании 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л (рис. 6). При этом отмечали изменения в морфологии побегов: междоузлия побегов сокращались, уменьшались размеры листьев, изменилась их форма. Кроме того, у половины побегов при концентрации 1,0 мг/л 6-БАП наблюдалась витрификация побегов.

Рис. 6. **Влияние различных цитокининов на коэффициент размножения *Дрока донского***

*Условные обозначения:* 1 – кинетин 1,0 мг/л; 2 – кинетин 2,0 мг/л; 3 – кинетин 5,0 мг/л; 4 – зеатин 0,1 мг/л; 5 – зеатин 0,5 мг/л; 6 – зеатин 1,0 мг/л; 7 – 6-БАП 0,1 мг/л; 8 – 6-БАП 0,5 мг/л; 9 – 6-БАП 1,0 мг/л.

Все растения регенеранты копеечников и дроков будут адаптированы и высажены на интродукционном участоке Ботанического сада для.

**4.Выводы**

1. В результате исследований по стерилизации семян установлено влияние режимов стерилизации на сроки прорастания. Так, при увеличение времени стерилизации увеличивался процент стерильных семян, но повышался процент непрорастающих и растягивались сроки прорастания.

2. Экспериментально был подобран оптимальный режим стерилизации семян трех видов копеечников и дрока донского – 10%-ный раствор лизоформина в течение 5 минут, процент стерильных эксплантов досигал 90%.

3. В результате проведенных исследований установлено, что семена Копеечников, собранные с интродукционного участка Ботанического сада имели боле высокий процент всхожести по сравнению с природными популяциями.

4. Для дрока донского было установлено, что на агаризованной безгормональной среде после стерилизации семена начинали прорастать немного позже, чем в чашках Петри с водой (лабораторная всхожесть) и безгормональной жидкой среде. Причем наблюдалось заметное отличие динамики прорастания семян.

5.При использовании метода *in vitro* для размножения и сохранения редких и исчезающих видов растений необходимо учитывать генетические особенности каждого вида, типы эксплантов, и их физиологическое состояние.

6. Разработанные приемы получения растений-регенерантов в культуре изолированных тканей могут быть использованы для сохранения генофонда редких видов копеечников в коллекциях *in vitro*.

**5.Список литературы**

1. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. - М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. - 160 с.
2. Вечернина Н. А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. - Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2004. – 205 с.
3. Вечернина, Н. А. Сохранение биологического разнообразия редких, исчезающих видов, уникальных форм и сортов растений методами биотехнологии : автореф. дис. … д-ра биол. наук / Вечернина Н. А. – Барнаул, 2006. – 33 с.
4. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта с основами статистической обработки результатов исследований. - М.: Агропромиздат, 1985. - 352 с.
5. Калинин Ф. Л., Бутенко Р. Г. Методы культуры тканей в физиологии растений – Киев: Наукова думка, 1980. - 425 c.
6. Калинин Ф. Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В. В. Технология микроклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. - 488 c.
7. Камелин Р. В. Биотехнологическое разнообразие и интродукция растений // Растительные ресурсы. – 1997. - Т. 33. - Вып. 3. - С. 1-11.
8. Красная книга Волгоградской области, Воронеж. 2017, Т.2. Растения и другие организмы / Под ред. д.б.н., проф. О.Г. Барановой, д.б.н., проф. В.А. Сагалаева. Воронеж: ООО «Издат-Принт». 268 с.
9. Молканова, О. И. Особенности клонального микроразмножения у различных таксономических групп растений / О. И. Молканова // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : сб. науч. тр. III Междунар. науч. конф., Минск, 14–16 мая 2008 г. – Минск, 2008. – С. 300–304.
10. Ревин, П. Речь на XVI Международном ботаническом конгрессе / П. Ревин // Информ. бюл. Совета ботанических садов России и Отделения Международного совета по охране растений. – 2000. – Вып. 11. – С. 38–47.
11. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В. С., Калашникова Е. А., Воронин Е. С. и др. –– М.: Высш. шк., 2003. - Изд. 2. – 469 с.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. plant. - 1962. - Vol. 15. - № 3. - P. 473-497.

**ПРИЛОЖЕНИЕ**

Таблица 1

**Состав питательных сред,**

**применяемы при культивировании *in vitro***

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Компоненты сред | Концентрация (мг/л) в средах по прописи | | | | | | |  |
| Мурасиге и Скуга, 1962 г. | Гамборга и Эвелега, 1968 г. | Уайт, 1939 г. | Нича, Нич, 1974 – 1975 гг. | Као и Михайлюка 1975 г. | Китайские среды | |
| / / 6 | С экстр. картоф. |
| KNO3  NH4NO3  Ca(NO3)2  Ca(NO3)2 x 4H2O  (NH4)2SO4  MgSO4 x 7H2O  CaCl2 x H2O  CaCl2 x 2H2O  KCl  KH2PO4  NaH2PO4 x H2O  MnSO4 x H2O  MnSO4 x 4H2O  ZnSO4 x 4H2O  ZnSO4 x 7H2O  H3BO4  CuSO4 x 5H2O  Na2MoO4 x 2H2O  CoCl2 x 6H2O  FeSO4 x 7H2O  Na EDTA x 2H2O  Секвестрен 330-Fe  Мезоинозит  Аскорбиновая к-та  Тиамин – HCl  Пиридоксин– HCl  Никотиновая к-та  Сахароза  Агар «Дифко», Гель-рит, агароза | 1900  1650  -  -  -  370  -  440  -  170  -  -  22,3  8,6  -  6,2  0,025  0,25  0,025  27,8  37,3  -  100  -  0,5  0,5  0,5  30 000  - | 3000  -  -  -  134  500  -  150  -  -  150  10  -  -  2  3  0,075  0,25  0,025  -  -  28  -  -  -  -  -  20 000  - | 81  -  142  -  -  74  -  -  65  12  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  20 000  - | 950  720  -  -  -  185  166  -  -  68  -  -  25  -  10  10  0,025  0,25  -  27,8  37,3  -  200  3  1  1  -  60 000  7000 | 1900  600  -  -  -  300  -  -  300  170  -  10  -  2  -  3,6  0,025  0,25  0,025  5,0  -  -  100  -  0,005  0,005  -  125  - | 2830  -  -  -  463  185  166  -  -  400  -  -  4,4  -  1,5  1,6  -  -  -  27,8  37,3  -  200  3  3  1  -  60 000  7000 | 1000  -  -  100  100  125  -  -  35  200  -  -  -  -  -  -  -  -  -  27,8  37,3  -  -  -  1  -  -  20 000  - |

**Лаборатория биотехнологии Волгоградского регионального ботанического сада**



**Этапы клонального микроразмножения Копечников в культуре *in vitro***

|  |  |
| --- | --- |
| DSCN7412 | DSCN7409 |
| Закладка эксперимента по проращиванию семян Копеечников | Стерильные проростки |
| https://pp.userapi.com/c849328/v849328287/c73c4/U-lTxk1P7a4.jpg | https://pp.userapi.com/c849328/v849328287/c73ec/VtQXnDykht0.jpg |
| Копеечники на этапе микроразмножения |  |

**Дрок донской в культуре *in vitro***

******

