

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 44.03.05 Педагогическое образование
Профили подготовки Биология, Химия
Форма обучения очная

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

«ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ
РОДА *RAEONIA* ПРИ ОРГАНИЗАЦИИ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ СО ШКОЛЬНИКАМИ»

Студент  Гашицкая Валерия Андреевна

Руководитель  Солдатов С.А.

Нормоконтролер  Клыченков С.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 09.06.23 № 15)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой 

(протокол заседания ГЭК от 05.07.23 № 3)

Секретарь ГЭК  Клыченков С.В.

Пенза, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1. Разнообразие пионов, культивируемых в ботаническом саду им. И.И. Спрыгина	5
1.2. Биологические особенности некоторых видов рода <i>Paeonia</i>	8
1.3. Типы покоя семян растений	14
1.4. Техника культивирования растительного материала на искусственных питательных средах.....	18
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	30
2.1. Объекты исследования.....	30
2.2. Методы исследования	35
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	37
3.1 Особенности проращивания семян некоторых видов рода <i>Paeonia</i>	37
3.2 Особенности культивирования в условиях <i>in vitro</i> некоторых видов рода <i>Paeonia</i>	42
3.3 Наблюдение за особенностями онтогенеза рода <i>Paeonia</i> на базе Ботанического сада им. И.И Спрыгина	44
3.4. Митотический индекс	48
ГЛАВА 4. ПРОЕКТНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ШКОЛЬНИКОВ В РАМКАХ ПОДГОТОВКИ К НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ	54
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	57
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	59

ВВЕДЕНИЕ

Род *Paeonia* L. – род, с удивительной древней историей [3, 8, 9], сейчас его изучение шагнуло далеко вперед, разработаны современные и точные методы исследования [1, 2, 5, 14, 20, 23].

Значение исследований данного рода очень важно, особенно в условиях постоянно изменяющейся среды и климата.

Во-первых, для большинства видов пионов стоит острая проблема охраны. Из 12 видов пионов, которые представлены на территории нашей страны, 7 остро нуждаются в охране [21, 17, 30]. В связи с особенностями онтогенеза данных видов, таких как долговременное прорастание семян, продолжительный прегенеративный период, вегетативная неподвижность сделают их крайне уязвимыми к нагрузке окружающей среды. Ботанические сады, одна из возможности сохранить генофонд этих видов [4, 28, 25].

Большинство видов пионов, которые изучены, несут важнейшую роль с точки зрения фармакологии, так как содержат биологически активные вещества [3].

Высокие декоративные свойства дикорастущих пионов обращают на себя внимание как объекты зеленого строительства, а их пластичность в плане морфологии и возможность к гибридизации дают большие возможности для селекционной работы.

Большую актуальность введения в культуру определяется тем, что пионы, как правило, в нашей области полностью отсутствуют в природной флоре. По мнению некоторых авторов [16], может произрастать дикорастущий *P. tenuifolia* L. на юго-западе области. В целом, дикорастущие пионы (*P. tenuifolia*, *P. anomala*, *P. suffruticosa*) произрастают в парках и садах области с большой редкостью.

Интродукция пионов на территории Ботанического сада имени И.И. Спрыгина (ныне Пензенского ботанического сада ПГУ) имеет

давнюю историю – начиная с 1930-х гг. прошлого века. Но, до 2016 г. его возможности не использовались в полной мере – в саду были представлены в разные годы всего лишь 1-2 вида дикорастущих пионов. С 2016 г. все изменилось, коллекции видов стали пополняться, началось введение в культуру и изучение еще 14 различных видов (таксонов) дикорастущих пионов.

Цель работы: изучить особенности семенного размножения, роста и развития растений сорта *Paeonia* в условиях *in vitro* в процессе организации научно-исследовательской работы со школьниками.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. изучить видовое разнообразие сортов Пионов в ботаническом саду им. И.И. Спрыгина;
2. изучить возможность семенного размножения, особенности роста и развития;
3. подобрать оптимальные условия для стерилизации семян;
4. рассмотреть методы культивирования растений в условиях *in vitro*;
5. подобрать оптимальные условия для введения в культуру и для клонального микроразмножения растений;
6. получить молодые растения, оценить их прорастание в условиях *in vitro*;
7. выяснить возможность использования полученного материала в изучении школьного курса биологии.

Практическая значимость: представленную работу можно использовать при организации внеурочной деятельности обучающихся.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Разнообразие пионов, культивируемых в ботаническом саду им. И.И. Спрыгина

Такое растение как пион издревле считали символом долголетия, богатства и процветания, он также упоминается во многих произведениях, песнях, легендах. Его выращивали в садах императоров, уже в I тысячелетии в Китае был известен пион молочно-цветковый *Peonia lactiflora* Pall., он имел белыми, розовыми или красными бутоны [14].

Название пиона происходит из далекой Греции, во имя бога здоровья – Пеона. Это наименование он имеет благодаря своим лечебным свойствам, корневища и семена пиона применяли при лечении различных болезней.

Пион – очень непростой род в филогенетическом отношении. До сих пор ведутся разные проверки по определению места рода на филогенетическом древе. Различными методами молекулярной биологии удалось обосновать необходимость отделения рода из семейства *Ranunculaceae* Juss в отдельное семейство *Paeoniaceae* Rudolphi порядка *Saxifragales* (Angiosperm Phylogeny Group, 2016). Родственные связи пионовых внутри порядка являются пока не совсем доказуемыми, как и границы между видами, это обусловлено высокой внешней пластичностью, возможностью гибридизации и полиплоидизации; приходится говорить о видовых комплексах. Именно поэтому мы не имеет точного числа видов данного растения, у авторов разных источников, оно варьируется. По данным The plant list род включает 36 видов. Некоторые ученые, а именно большинство полагают, что род достаточно древний, реликт мезофильной арктотретичной флоры; по происхождению связан с Восточной Азией, в большинстве своем с горными лесами субтропической части Юго-Западного Китая [17], здесь наблюдается самое большое

разнообразие видов, жизненных форм. Именно в данной местности сосредоточены все древовидные виды, которые считаются наиболее примитивными [9].

Листья большие, очередные, дважды-трижды-тройчатые, доли могут быть как широкими (пион крупнолистный), так и узкими (пион тонколистный).

Цветки большие, объемные, верхушечные, 6-20 см в диаметре. Обычно, цветки одиночные, но может быть и наличие сразу нескольких. Цветки обоеполые, спиральные или спиральноциклические. Околоцветник двойной, чашелистики имеют различные формы. Лепестки округлой или овальной формы, вогнутые, их края могут быть цельными, разрезанными. Цветовая гамма самая разнообразная: пионам присущи белая, желтая, кремовая, розовая, пурпурная, красная окраски, насыщенность и оттенки могут варьироваться. Плод представлен голый или опушенный листовкой. Семена различны, имеют округлую или овальную форму, могут быть как матовыми, так и блестящими, коричневого, черного или бурого цветов [1, 4].

В Ботаническом саду им. И.И. Спрыгина представлено большое разнообразие видов пионов. Данное место обладает самой обширной коллекцией цветочно-декоративных травянистых растений. Ботанический сад включает в себя растения с пяти континентов нашей планеты. Это поистине уникальное место.

На данное время в Ботаническом саду представлено около 16 видов (таксонов) дикорастущих пионов (таблица 1). Такие виды как, *Paeonia peregrine* Mill., *Paeonia officinalis* L., *Paeonia lactiflora*, *Paeonia caucasica*, *Paeonia mlokosewitschii*, *Paeonia rosea*, *Paeonia tenuifolia*, *Paeonia anomala*, *Paeonia intermedia*, *Paeonia chamaeleon*, *Paeonia mascula* L., *P. coriacea* Boiss, *P. rockii* (S.G.Haw & Lauener) T.Hong & J.J.Li ex D.Y.Hong, *P. emodi* Royle, *P. obovata* Maxim, *P. humilis* Retz, *P. tomentosa* (Lomakin) N. Busch, *P. daurica* Andrews.

Таблица 1 Виды пионов, представленных в Пензенском Ботаническом саду им. И.И. Спрыгина

№	Название, под которым числится в коллекции (число экземпляров, шт)	Жизненная форма; особенности экологии	Ареал	Источник поступления	Онтогенетическое состояние на сентябрь 2020 г.
Виды стародавней интродукции					
1.	<i>P. tenuifolia</i> L.* (10)	Травянистое, гелиофит, мезоксерофит	Европейско-кавказский (степной)	?	G
2.	<i>P. anomala</i> L. (3)	Травянистое, сциогелиофит, мезофит	Восточноевропейско-азиатский ареал (лесной)	?	G
С 2016 г.					
3.	<i>P. caucasica</i> (Schipcz.) Schipcz.* (3)	Травянистое, сциогелиофит, мезофит, литофит	Кавказ	Питомник «Агбина», г. Москва	G
4.	<i>P. peregrina</i> Mill. (2)	Травянистое, сциогелиофит, мезофит, литофит	Юго-восток Европы	Самарский БС	V
5.	<i>P. mlokozewitschii</i> Lomakin (2)	Травянистое, сциогелиофит, мезофит, литофит	Кавказ	Питомник «Агбина», г. Москва	G
6.	<i>P. intermedia</i> C.A. Mey. (2)	Травянистое, гелиофит, мезоксерофит,	Юг Сибири, Казахстан ¹	Самарский БС	V
7.	<i>P. veitchii</i> Lynch (3)	Травянистое, сциогелиофит, мезофит	Китай	Самарский БС	G
8a	<i>P. lactiflora</i> Pall.* (6)	Травянистое, сциогелиофит, мезофит	Дальний Восток	БС Вятского ГУ	G
8б	в т.ч. форма <i>P. lactiflora</i> Pall. <i>rosea</i> (6)	Травянистое, сциогелиофит, мезофит	Дальний Восток	Амурский филиал БСИ ДВО РАН, г. Благовещенск	G
9	<i>P. ×suffruticosa</i> Andrews (1)	Кустарник	Китай	Частная коллекция, г. Пенза	V
С 2019 г.					
10.	<i>P. daurica</i> Andrews	Травянистое, сциогелиофит, ксеромезофит, литофит	Крым, Кавказ	БС г. Бонн, Германия	-

Продолжение таблицы 1					
11.	<i>P. tomentosa</i> (Lomakin) N. Busch (6)	Травянистое, сциогелиофит, мезофит, литофит	Кавказ, Северный Иран	Самарский БС	Im
12.	<i>P. humilis</i> Retz	Травянистое, сциогелиофит, мезофит	Средняя Азия	Самарский БС	-
13.	<i>P. obovata</i> Maxim* (6)	Травянистое, сциогелиофит, мезофит	Дальний Восток, Китай, Корея, Япония	Самарский БС	Im
14.	<i>P. emodi</i> Royle	Травянистое, сциогелиофит, мезофит	Гималаи	БС Тюбинген, г. Мюнхен, Германия	-
15.	<i>P. rockii</i> (S.G.Haw & Lauener) T.Hong & J.J.Li ex D.Y.Hong (1)	Кустарник	Китай	БС Тюбинген, г. Мюнхен, Германия	Im
16.	<i>P. coriacea</i> Boiss. (4)	Травянистое, сциогелиофит, мезофит	Эндемик Испании и Сев. Африки (Алжир, Марокко)	БС г. Бонн, Германия	Im

Примечания: * – виды, занесенные в Красную книгу РФ

1 – трудно установить границу этого вида, так как он трудно отличим от гибридного и уклоняющегося.

1.2. Биологические особенности некоторых видов рода *Paeonia*

К началу нашей работы, нам удалось собрать на территории Ботанического сада ПГУ семена 8 видов рода Пион.

Виды пионов, включенные в данную работу на территории Пензенского ботанического сада, сентябрь 2021 г.



Рисунок 1. Paeonia peregrine Mill.

Данный вид характеризуется ярким внешним видом. Имеются цветки чаще всего красного цвета, размер около 5 см, может быть и больше, количество лепестков может варьироваться от 5 до 7 и более, листья сложные с перистой листовой пластинкой. Пион данного вида имеет прямостоячие побеги и очередное расположение листьев. Плод пиона имеет вид листовки. Данное растение декоративное, является редким и охраняемым.



Рисунок 2. Paeonia officinalis L.

Пион лекарственный имеет прямостоячие побеги с листьями, имеющими очередное листорасположение. Листья этого пиона имеют сложное строение и яйцевидную форму, а также перисто-тройчатую листовую пластинку. Цветки бывают белого и красного цвета, также цветки имеют пятна и полосы желтого цвета. Размеры цветков варьируются от 5 см и более, число лепестков от 7 штук и более. Плод представляет собой листовку бурого, зеленого, красного, а также черного цвета. Любит свет, является мезотрофом и мезофитом. Пион этого вида является декоративным и культивируемым растением.



Рисунок 3. *Paeonia lactiflora*

Пион имеет прямостоячие побеги, с очередным листорасположением. Листья у этого пиона сложные с рассеченной листовой пластинкой, форма листа ланцетная или овальная, край листа зубчатый. Цветки данного пиона имеют белый, розовый или красный цвет, также имеются пятна и полосы разных цветов, могут быть белого, желтого или красного цвета. Размеры цветка разнообразны от 5 см и более, также и количество лепестков может быть от 5 до 7 штук и более. Плод, как и у большинства пионов, листовка, с оттенками бурого, зеленого и красного цвета. Пион любит свет, по отношению к питанию является

мезотрофом, а по отношению к влаге – мезофит. Молочно-цветковый пион декоративен, а также является лекарственным и редким растением, который находится под охраной.



Рисунок 4. *Paeonia caucasica*

Кавказский пион имеет прямостоячие побеги и очередное листорасположение. Листья данного вида сложные, имеют округлую форму и гладкий край. Пион кавказский имеет красные или белые цветки с пятнами и полосками желтого цвета. Размеры цветков 5 и более сантиметров, а количество лепестков может быть от 5 до 7 штук. Плод пиона кавказского представляет собой листовку, чаще всего белого цвета. Как и многие пионы является декоративным, лекарственным, редким и охраняемым. Главной особенностью является то, что данный вид ядовит.



Рисунок 5. Paeonia mlokosewitschii

Пион Млокоसेвича как и многие имеет прямостоячие побеги и очередное листорасположение. Листья у этого вида сложные и имеют овальную форму с гладким краем. Цветки имеет небольшие 5-7 см, обычно белого или желтого цвета, имеют пятна или полосы желтого цвета, с лепестками от 5 до 7 штук и более. Пион Млокосевича имеет плод листовку с различными оттенками, такими как бурый, зеленый, красный. Данный вид в отличие от других является теневыносливым, а также мезотрофом и мезофитом. Пион редкий, декоративный и подвержен охране.



Рисунок 6. *Paeonia tenuifolia*

Тонколистный пион имеет прямостоячие побеги с очередным листорасположением. Листья данного вида сложные с овальной формой. Цветки только красные или в оттенках красного, размеры от 2 до 5 см, количество лепестков варьируется от 5 до 7 штук. Плод как и у большинства это листовка бурого цвета. Этот вид очень любит свет, по отношению к питанию имеется два пути это эвтроф и мезотроф, к влаге может относиться как ксерофит и мезофит. Тонколистный пион декоративный, лекарственный и редкий, находится под охраной. Также как и кавказский является ядовитым.



Рисунок 7. *Paeonia anomala*

Уклоняющийся пион один из самых ярких и красивых видов, он имеет прямостоячие побеги с очередным листорасположением. Листья данного вида сложные и имеют округлую форму с гладким краем. Цветки имеют разные цвета, самые редкие белые, чаще всего встречаются красные, разные оттенки розового, фиолетового или лилового. Размеры цветка от 5 сантиметров, количество лепестков варьируется между 5-7. Является декоративным и редким.



Рисунок 8. *Paeonia intermedia*

Пион средний, как и многие, обладает прямостоячим побегом, листья имеют очередное расположение. Они сложные, яйцевидной формы с гладким или зубчатым краем. Цветки пиона среднего только красного цвета или его оттенка, имеются пятна и полосы желтого цвета, размером цветки 5 и более сантиметров. Плод, как и у многих пионов, представлен листовкой, чаще всего бурого или зеленого цвета. Пион средний мезофит и мезотроф, очень любит свет, является декоративным и редким растением. Данный вид находится под охраной.

1.3. Типы покоя семян растений

Семя является главной единицей размножения и распространения по окружающему миру растений. Семя происходит из семязачатка, чаще

всего это происходит после оплодотворения. Само зрелое семя в большинстве своем состоит из зародыша, семенной кожуры и запасющих тканей: эндосперма, который возникает у покрытосемянных при двойном оплодотворении, при слиянии центрального ядра зародышевого мешка и второго спермия. Он представляет собой разросшуюся ткань нуцеллуса.

Зародыш, однако, может быть настолько большим, что занимать почти весь объем семени, или он может быть настолько маленьким, слабо дифференцированным, что может даже остановиться в своем развитии на одной из ранних фаз, и даже в этой ситуации запасющие ткани уже могут быть хорошо развиты.

У такой разновидности как покрытосемянное растение семена находятся внутри плода. Наружную часть принято называть околоплодником. По сочности плоды околоплодника делят на сочные и сухие. Сухие плоды делят на: листовка, боб, стручок, коробочка, двукрылатка, вислоплодник, дробная членистый боб, орешек, орех, желудь, семянка, зерновка. Сочные плоды делят на: костянки, ягоды, яблоки, гесперидии [9, 13].

Для всех семян есть уникальная слагаемая успеха проращивания, это влажность в достаточном количестве, доступ кислорода и температура благоприятная для проращивания. Температура, которую стоит выбирать для проращивания, напрямую и полностью зависит от происхождения растений, как правило, географического в первую очередь. Так, например, у семян растений, которые обитают в северных широтах, он находится в области 5-25°, у южных, растений, которые любят тепло, он сдвинут в сторону более высоких значений 15-35°. В процессе проращивания семян, есть такое понятие как минимальные и максимальные температуры, ниже и выше которых семена прорасти просто не могут, и такое понятие как оптимальная температура, при такой температуре процесс идет наиболее быстро и полно.

Семена, которые не прорастают из-за отсутствия благоприятных условий внешней среды, находятся в так называемом вынужденном покое. В связи с покоем, который вынужден, у многих растений в процессе изменений и приспособлений, выработалась такая способность семян как находиться в органическом покое, такой покой будет непосредственно связан с их особыми свойствами. Такой покой используется растением при полном отсутствии прорастания, или при снижении всхожести при благоприятных для этого внешних условиях.

Обоснования такого состояния, как органический покой, могут быть очень разнообразны. Это состояние может быть вызвано сниженной активностью самого зародыша, или различными свойствами его внешних покровов, включая околоплодник, или, что наиболее часто встречаются, сочетание различных таких факторов. Органический покой чаще всего встречается у таких семян, которые находятся в самых различных географических областях Земли, чаще всего там, где иногда меняются климатические условия, такие как: смена лета и зимы, периодов дождей и засухи [30].

По данным покоя и способов проращивания, мы проанализировали взятые нами виды. Получили такие данные:

Paeonia anomala

Тип покоя: морфо-физиологический, БВ-ВЗ (глубокий), при проращивании используется только холодная стратификация 2°C. Трудность заключается в том, что у данного вида сильный ФМТ (физиологический механизм торможения), то есть семенам очень сложно выйти из покоя. Семена характеризуются высокой грунтовой всхожестью только лишь при посеве осенью незрелыми или после 1 года сухого хранения.

Paeonia mascula L.

Тип покоя: морфо-физиологический, Б-ВЗ (глубокий), при проращивании используется только холодная стратификация 2-3°C и

возможна обработка гиббереллинами. Трудность также, как и в предыдущем виде, заключается в сильном ФМТ (физиологический механизм торможения), а также проблема в продолжительности нахождения семян, в ожидании прорастания, это около 5 месяцев.

Paeonia lactiflora

Тип покоя: морфо-физиологический, Б-В2 (промежуточный), при проращивании используется только тепло 19-22°C и возможна обработка гиббереллинами. Трудность заключается в среднем ФМТ (физиологический механизм торможения), а также проблема в продолжительности нахождения семян, в ожидании прорастания, это около 3-5 месяцев.

Paeonia intermedia

Тип покоя: морфо-физиологический, Б-В1 (промежуточный), при проращивании используется 2 этапа стратификации: I – при 12°C в течение 5-6 месяцев для доразвития зародыша и прорастания, II – при 5°C для устранения покоя эпикотиля. ФМТ слабый (физиологический механизм торможения), а также проблема в продолжительности нахождения семян, в ожидании прорастания, это более 5 месяцев.

Paeonia tenuifolia

Тип покоя: морфо-физиологический, Б-В3 (глубокий), семена нуждаются в двухэтапной стратификации.: I – при 18-20° или лучше при 12/30° в течение 5 месяцев для доразвития зародыша и прорастания, II – при 5° для устранения покоя эпикотиля. Трудность заключается в сильном ФМТ (физиологический механизм торможения), а также проблема в продолжительности нахождения семян, в ожидании прорастания, это более 5 месяцев, в данной ситуации может помочь обработка гиббереллинами, они могут способствовать доразвитию зародыша.

Paeonia officinalis L.

Тип покоя: морфо-физиологический, Б-В2 (глубокий), при проращивании используется холодная стратификация 2-3°C, также семена

прорастают в тепле на свету, но очень медленно (за 10 мес 34%). Холодная стратификация стимулирует прорастание. Трудность заключается в среднем ФМТ (физиологический механизм торможения), а также проблема в продолжительности нахождения семян, в ожидании прорастания, это около 5 месяцев. При обработке гибберлинами также стимулируется прорастание.

Paeonia mlokosewitschii

Тип покоя: морфо-физиологический, Б-В3 (глубокий), при проращивании используется тепло 19-25°C. Трудность заключается в сильном ФМТ (физиологический механизм торможения), а также проблема в продолжительности нахождения семян, в ожидании прорастания, это около 3-5 месяцев, в данной ситуации может помочь обработка гиббереллинами, они могут способствовать доразвитию зародыша.

Paeonia caucasica

Тип покоя: морфо-физиологический, Б-В3 (глубокий), Семена находятся в эпикотильном покое, нуждаются в двухэтапной стратификации: I – при 15/30° в течение 2-4 месяцев, II – при 5-10°C в течение 2-3 месяцев. Обработка гибберлинами устраняет покой эпикотили, заменяя холодной стратификацией. Трудность заключается в сильном ФМТ (физиологический механизм торможения), а также проблема в продолжительности нахождения семян, в ожидании прорастания, это более 5 месяцев.

1.4. Техника культивирования растительного материала на искусственных питательных средах

В связи с развитием науки и большого рода открытий, которые произошли как в биологии, так и в различных технических науках,

генетике, инженерии. Во многих открытиях важную роль сыграл и метод культивирования клеток, тканей, а также органов растений, на данном этапе это одно из направлений научно-технического прогресса. Прогресс в различных сферах благоприятно влияет на уровень жизни людей и даже повышает его.

Биотехнология развивается в нескольких направлениях:

1. Клеточная инженерия;
2. Генетическая инженерия;
3. Промышленная биотехнология [2].

Сейчас активно используются разные методы при производстве клеток, тканей и органов растений, такие методы позволяют решать теоретические и практические задачи, а также затрагивает множество отраслей на пути к достижению целей.

Одна из отраслей, которая затрагивается – растениеводство. В этой, довольно широкой отрасли можно выделить несколько направлений:

1. размножение и освобождение от вирусов;
2. создание новых форм растений с помощью методов генной инженерии;
3. клеточная селекция в культуре *in vitro*;
4. сохранение генетических ресурсов культурных и дикорастущих видов растений [20].

Такой метод, как *in vitro* заключается в том, что нужно искусственно вырастить клетку растения на специальной питательной среде, при условии соблюдения асептики. Данный метод включает в себя большой спектр объектов, имеющих растительное происхождение, например, изолированные органы, зародыши, некоторые культуры протопластов, суспензионная культура.

Выявлено, что самая оптимальная для изучения клетка, это клетка растения. Она наиболее хорошо подходит при работе методом *in vitro* для изучения как физиологических, так и биологических и химических

процессов. Именно благодаря изучению данных процессов биотехнология не стоит на месте, а развивается и вносит предпосылки в развитие многих современных технологий. Такими процессами будут изучение жизни на клеточном и молекулярном уровне организации [15].

Как нам сказано в определении культивирования, этот процесс происходит именно в условиях асептики. Чем же создаются такие условия?

Стерилизация – очищение какого-либо предмета или материала от любых видов микроорганизмов (включая бактерии и их споры, грибы, вирусы и прионы), либо их уничтожение. Осуществляется термическим, химическим, радиационным и фильтрационным методами.

Именно физико-химические свойства материала, который подлежит стерилизации, а также цель исследования определяет целесообразность применения какого-либо из методов стерилизации [15].

Главным принципом в проведении работы с изолированными клетками и тканями является асептические условия. Перед проведением любых работ, следует убедиться, что комната, в которой проводится работа, стерильна, а также одежда и руки работающих с эксплантами; посуда, которая будет использоваться для культивирования объектов; инструменты; питательные среды; экспланты [15].

Приборы, которые используются для создания условий асептики: ламинар-бокс, автоклав, сушильный шкаф.

Ламинар-бокс необходим для стерильных пересадок при работе с эксплантами. Этот прибор создает асептические условия на рабочем месте путем обработки пространства воздухом, а также с помощью ультрафиолетовых ламп (рис. 9). Так же, для более тщательной стерильности, рабочая поверхность должна быть обработана 70%-ным этанолом.



Рисунок 9. Ламинар-бокс LAMSYSTEMS, класс II/тип А

Всю посуду, которую будут использовать во время опытов, оборачивают в бумагу и помещают в сушильный шкаф, где она стерилизуется при температуре 160°C в течение 1,5-2 часов. В данном приборе асептические условия достигаются в результате обработки сухим жаром (рис. 10).



Рисунок 10. Сушильный шкаф

Каждый раз, начиная работу необходимо повторно простерилизовать все инструменты, путем помещения их в стакан с 96% спиртом и обжечь в пламени спиртовки. Так делают перед каждым использованием инструментов.

Питательные среды, которые не содержат термолабильных веществ, стерилизуют в автоклаве при давлении 0,5-1 атм. (рис. 11). Время стерилизации зависит от объема среды в сосуде. Сосуды, которые содержат 25-50 миллилитров среды, стерилизуют в течение 15-20 мин, объемом 2-4 литра – в течение 30-40 мин.



Рисунок 11. Автоклав Tuttnauer 2540 ML, AUTOCLAVE – STEAM STERILIZER

Для питательных сред с термолабильными соединениями стерилизация с помощью автоклава не подходит, потому что они разрушаются при воздействии давления. Для таких питательных сред будут применяться методы холодной стерилизации. Вещество, которое будет использовано обрабатывают этиловым эфиром, который удаляется при пониженной температуре, а то, что осталось растворяют в дистиллированной воде и в асептических условиях добавляют к питательной среде [18].

Один из обязательных этапов асептики – стерилизация эксплантов. Для этого используется различный набор химических соединений. Например, растворы соединений, которые содержат активный хлор (хлорамин, гипохлорит кальция и натрия, сулема), бром (бромная вода), диацид, перекись водорода, спирт, антибиотики.

Стерилизация эксплантов позволяет улучшить коэффициент урожайности, так как она удаляет с эксплантов инфекции. Также есть

важные моменты в стерилизации семян, на которые стоит обратить внимание. Один из них – это правильный подбор агентов и времени самой стерилизации.

При подборе набора стерилизующих агентов учитывают следующее:

- ✓ стерилизующее вещество должно губительно действовать на все микроорганизмы и в то же время минимально повреждать растительные ткани;

- ✓ вид стерилизующего вещества, его концентрация и длительность применения зависят от плотности и чувствительности ткани, которая должна быть стерилизована;

- ✓ стерилизующее вещество должно легко удаляться из ткани промыванием стерильной дистиллированной водой или подвергаться разложению [18].

Если стерилизация прошла успешно, и все стерилизующие агенты подобраны верно, степень инфицирования эксплантов не должна превышать 1-3%.

Питательные среды бывают двух видов: твердые (агаризованные) и жидкие. Выбор какого-либо вида питательной среды будет зависеть от вида растения и цели, которая поставлена в исследовании. Жидкие среды по своему удобны тем, что имеют большую подвижность трофических элементов. Но и твердые среды имеют достоинства. На таком виде сред можно с легкостью проводить различные манипуляции с изучаемыми объектами.

При подборе состава питательной среды необходимо учитывать вид изучаемого растения. Для размножения методом «*in vitro*» используют среды Мурасиге и Скуга, Гамборга, Хеллера и другие.

Наиболее часто используется среда Мурасиге и Скуга (1962) (табл. 2, 3). Она хорошо сбалансирована по входящим в нее компонентам и дает хорошие результаты при культивировании клеток многих видов растений.

Таблица 2 Приготовление маточных растворов для среды Мурасиге-Скуга

№ п.п.	Компонент среды	Количество вещества
Маточный раствор макросолей (г на 1 л маточного раствора)		
1.	KNO ₃	38
2.	NH ₄ NO ₃	33
3.	KH ₂ PO ₄	3,4
4.	MgSO ₄ · 7H ₂ O	7,4
	или MgSO ₄ безводный	3,6
5.	CaCl ₂ · 2H ₂ O	8,8
	или CaCl ₂ безводный	6,65
Маточный раствор микросолей (мг на 100 мл маточного раствора)		
6.	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	25
7.	CuSO ₄ · 5H ₂ O	2,5
8.	H ₃ BO ₃	620
9.	MnSO ₄ · 5H ₂ O	2410
	или MnSO ₄ · 4H ₂ O	2230
10.	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	860
11.	KJ	83
12.	CoCl ₂ · 6H ₂ O	2,5
13.	FeSO ₄	557
	Na ₂ ЭДТА	745

Таблица 3 – Среда Мурасиге-Скуга для клеточных и тканевых культур

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хелат	5 мл/л
CaCl ₂	50 мл/л
Тиамин-HCl	0,1 мг/л
Пиридоксин-HCl	0,5 мг/л
Никотиновая кислота	0,5 мг/л
Мезоинозит	100 мг/л
Глицин	2 мг/л
Сахароза	30 г/л
pH 5,6-5,8	

Среда Гамборга применима для бобовых, злаковых и луковичных растений (табл. 4, 5).

Таблица 4 Среда Гамборга (В-5)

№ п.п.	Компоненты среды	Количество вещества
Маточный раствор макросолей (г на 1 л маточного раствора)		
1.	KNO ₃	50
2.	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,68
3.	MgSO ₄ *7H ₂ O	3
	или MgSO ₄ безводный	5
4.	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	
5.	CaCl ₂ · 2H ₂ O	3
	или CaCl ₂ безводный	
Маточный раствор микросолей (мг на 100 мл маточного раствора)		
6.	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	12,5
7.	CuSO ₄ · 5H ₂ O	12,5
8.	H ₃ BO ₃	1650
9.	MnSO ₄ · 5H ₂ O	500
	или MnSO ₄ · 4H ₂ O	
10.	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	100
11.	KJ	37,5
12.	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,25
13.	FeSO ₄	556
	Na ₂ ЭДТА	746

Таблица 5 Среда Гамборга (В₅) для клеточных и тканевых культур

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хелат	5 мл/л
CaCl ₂	50 мл/л
Тиамин-НСl	1000 мг/л
Пиридоксин-НСl	100 мг/л
Никотиновая кислота	100 мг/л
Мезоинозит	10000 мг/л
Глицин	2 мг/л
Сахароза	30 г/л
pH 5,5	

При изготовлении питательной среды следует начинать с приготовления маточных растворов. Так как они являются неотъемлемой частью, они снижают погрешность при взвешивании компонентов соли, а так же предотвращают попадание микроорганизмов в объект.

Компоненты среды можно разделить на следующие группы:

- ✓ Макроэлементы;
- ✓ Микроэлементы;
- ✓ Содержащие железо;
- ✓ Вещества хлорид кальция;
- ✓ Витамины;
- ✓ Вещества, содержащие углерод;
- ✓ Фитогормоны.

Данный порядок расположения, позволяет следить за процедурой приготовления маточных растворов.

Те растворы, которые получились хранят при низких температурах, это нужно для предотвращения взаимодействия солей друг с другом и образования осадка.

Витамины важнейшие вещества, которые необходимы для стимулирования биохимических процессов в клетке. При изготовлении питательных сред используют такие витамины как: группа В (В1, В6, В12); С (аскорбиновую кислоту), РР (никотиновую кислоту), мезоинозит.

Витамины нельзя добавить просто так, для того что бы их добавить следует знать количество вещества. Обычно на коробке указывают процентное содержание раствора, именно эти данные и нужны. При наличии этих данных можно определить, какое количество необходимо, чтобы приготовить раствор определенной концентрации. После получения раствора, необходимо отобрать нужное количество и разлить по пенициллинкам/пробиркам.

Затем все пенициллинки/пробирки помещают в морозильник, для того чтобы раствор не испортился. Когда среда будет готова, достают

нужное количество раствора и, разморозив раствор, вливают его к питательной среде.

Фитогормоны также являются наиболее важными веществами, они обеспечивают рост и дифференцировку клеток. Растворы фитогормонов необходимо готовить непосредственно перед началом работы [16].

Для правильного приготовления питательных сред необходимо соблюдать следующую последовательность:

1. Растворить сахар, сухие компоненты (за исключением агар-агара) в воде.
2. Добавить к раствору сахарозы маточного раствор макросолей, микросолей, хелат железа, хлористый кальций, витамины и фитогормоны.
3. Долить агар-агар к раствору солей.
4. Довести питательную среду до нужного объема (1 литр) дистиллированной водой.
5. Измерить pH среды: если pH превышает 5,5-6,0 добавляют несколько капель 0,1 н HCl, если ниже этого значения – 0,1 н NaOH.
6. Разлить готовую среду в горячем виде по пробиркам или колбам.
7. Закрыть колбы или пробирки ватными пробками, накрыть целлофаном и затянуть резинкой.

Для того чтобы обнаружить или доказать отсутствие грибковой инфекции питательную среду помещают в чашки Петри. Если выращивание занимает длительное время, то питательную среду необходимо поместить в пробирки (47 мл).

Для того чтобы качественно провести метод культивирования следует соблюдать много правил, одно из них это соблюдение физических факторов окружающей среды.

Также есть и другие составляющие, такие как рост и развитие, именно от них растений зависит от следующих физических факторов: температура, свет и влажность [24].

Для каждого растения все индивидуально, отдельно подбирается оптимальная температура, чтобы обеспечить большой рост. Для большинства культур данная температура составляет 25-27°C.

Свет так же сильно влияет на рост растений в условиях *in vitro*. Многим каллусным тканям растений свет не нужен, так как у них отсутствуют хлоропласты. Экспланты выращивают на свету. Чтобы подобрать оптимальные условия для культивируемого объекта, следует регулировать интенсивность, качество освещения и фотопериод.

При работе с эксплантами в комнате необходимо поддерживать влажность 60-70%. При снижении влажности, воздух станет сухим, и питательная среда может засохнуть или ее концентрация может измениться. Следовательно, нарушение этого фактора может привести к нарушению условий культивирования.

Такие благоприятные условия окружающей среды (температура, свет и влажность) можно создать с помощью климатических камер.

Таким образом, для того чтобы вырастить большой процент здоровых растений в культуре *in vitro*, необходимо:

- уметь стерилизовать экспланты;
- уметь готовить питательную среду *in vitro*;
- правильно подобрать условия для выращивания растений (свет, температуру, влажность).

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Для работы были взяты семенные материалы из Пензенского ботанического сада им. И.И. Спрыгина ПГУ.

Пензенский ботанический сад им. И.И. Спрыгина ПГУ находится в западной возвышенной части г. Пензы на окраине плато левого берега реки Суры. Географические координаты: 53°07' с. ш., 45°02' в. д. Высота над уровнем моря: 232 м. [4]

Климат в городе Пенза умеренно – континентальный, переходные сезоны короткие. Зимний период достаточно продолжительный и начинается в первых числах ноября, а заканчивается в конце марта. В общей сложности зима длится примерно 150 суток. В зимний период климат умеренно холодный со средней температурой февраля -9,1°C. Лето короче зимы и составляет 50-55 суток (с конца марта по начало сентября). Средняя температура июля равна +20,4°C, а среднегодовая температура составляет +4,4°C:

- среднегодовой температурный минимум -35°C;
- среднегодовой температурный максимум +23,8°C;
- абсолютный температурный минимум -40,5°C (1978);
- абсолютный температурный максимум +40,4°C (2010).

Осадки выпадают обычно в пределах 450-650 мм, однако, в засушливые годы могут понижаться до 312 мм (1996), а во влажные повышаются до 730 мм (2004). Для данной местности характерны весенние засухи, а также нередко летние и осенние засухи.

Юго-западное направление ветра обычно преобладает (230 дней).

Пасмурных дней в году при нижней облачности в среднем – 76, облачных – 154, ясных – 135.

Почвы хорошо структурированы ореховатого типа. Слабоподзолистые серые лесные почвы с низким содержанием гумуса.

Объекты исследования – растения из отдела Цветковые – отдел *Magnoliophyta*. Класс Двудольные – класс *Magnoliopsida*. Порядок Камнеломкоцветные *Paeoniales* – порядок *Saxifragales*. Семейство Пионовые – семейство *Paeoniaceae*. Род Пион – род *Paeonia*.

Виды: Пион Лекарственный (*Paeonia officinalis* L.), пион Молочно-цветковый (*Paeonia lactiflora*), пион Кавказский (*Paeonia caucasica*), пион Млокосевича (*Paeonia mlokosewitschii*), пион Тонколистный (*Paeonia tenuifolia*), пион Уклоняющийся (*Paeonia anomala*).

Paeonia officinalis L.

Пион лекарственный очень любит свет, является мезотрофом и мезофитом. Цветки бывают белого и красного цвета, также цветки имеют пятна и полосы желтого цвета. Размеры цветков варьируются от 5 см и более, число лепестков от 7 штук и более. Также имеется плод, он представляет собой листовку бурого, зеленого, красного, а также черного цвета. Пион лекарственный является декоративным и культивируемым растением.



Рисунок 12. *Paeonia officinalis* L.

Paeonia lactiflora

Пион Молочно-цветковый имеет цветки белого, розового или красного цвета, также имеются пятна и полосы разных цветов, могут быть белого, желтого или красного цвета. Плод у данного пиона листовка, с оттенками бурого, зеленого и красного цвета. Данный вид любит свет, по отношению к питанию является мезотрофом, а по отношению к влаге – мезофит. Молочно-цветковый пион декоративен, является лекарственным и редким, находится под охраной.



Рисунок 13. *Paeonia lactiflora*

Paeonia caucasica

Кавказский пион является ядовитым видом. Имеет красные или белые цветки с пятнами и полосками желтого цвета. Плод пиона представляет собой листовку, чаще всего белого цвета. Данный вид является декоративным, лекарственным, редким и охраняемым.



Рисунок 14. *Paeonia caucasica*

Paeonia mlokosewitschii

Пион Млокосевича имеет небольшие цветки 5-7 см, обычно белого или желтого цвета, имеют пятна или полосы желтого цвета. Данный вид имеет плод листовку с различными оттенками, такими как бурый, зеленый, красный. Этот пион в отличие от других является теневыносливым, а также мезотрофом и мезофитом. Он редкий, декоративный и подвержен охране.



Рисунок 15. *Paeonia mlokosewitschii*

Paeonia tenuifolia

Тонколистный пион является ядовитым, имеет цветки только красные или в оттенках красного. Плод как и у большинства это листовка бурого цвета. Этот пион очень любит свет, по отношению к питанию имеется два пути это эвтроф и мезотроф, к влаге может относиться как ксерофит и мезофит. Тонколистный пион декоративный, лекарственный и редкий, находится под охраной.



Рисунок 16. *Paeonia mlokosewitschii*

Paeonia anomala

Уклоняющийся пион один из самых ярких и красивых видов, он имеет цветки разного цвета, самые редкие белые, чаще всего встречаются красные, разные оттенки розового, фиолетового или лилового. Является декоративным и редким.



Рисунок 17. *Paeonia mlokosewitschii*

2.2. Методы исследования

Исследование по изучению особенностей культивирования растений в условиях *in vitro* проводилось на базе ПГУ ПИ им. В.Г. Белинского на кафедре «Общая биология и биохимия».

Эксперимент был проведен в период октябрь 2021 – май 2023 года.

Опыт был заложен 13 октября 2021 года. Для данных видов схема опыта была следующая.

1. Подбор оптимальных условий стерилизации семян.
 2. Снятие пленки с семян (Пионы).
 3. Пересаживание стерильных эксплантов в готовую (стерильную) питательную среду.
 4. Определение митотического индекса.
- В течение прорастания семян, мы отмечали:
1. появление первых всходов;
 2. особенности роста.

Во всей работе представлены средние арифметические данные.

Также нами был проведен анализ – определение митотического индекса (MI, %). Митотический индекс показывает отношение числа клеток, находящихся в митозе, к общему числу проанализированных клеток, исследованных на микропрепарате, который изучается. Данный вид анализа показывает уровень нормального протекания митоза, об уменьшении процесса деления клеток или, наоборот, увеличении митотической активности тканей. На основе таких показателей делается вывод о митотоксическом или митозстимулирующем действии изучаемого фактора [11,12].

Определяется MI, % по формуле:

$$MI, \% = \frac{(П + М + А + Т)}{N} \times 100,$$

где (П+М+А+Т) – сумма клеток, находящихся на стадии профазы, метафазы, анафазы и телофазы соответственно.

Данный индекс можно определить используя световой микроскоп, посчитав в поле зрения клетки с видимыми хромосомами и разделив его на общее число клеток в поле зрения. Количественно можно сравнить группы клеток по их способности к делению. В условиях эксперимента мы можем полностью менять условия среды и количественно определить это воздействие на способность клеток к разрастанию путем деления (пролиферация) [10, 29].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Особенности проращивания семян некоторых видов рода

Paeonia

Методика биотехнологических исследований основана на общепринятых классических приемах работы с культурами изолированных тканей и органов растений (Бутенко, 1999).

Для культивирования растений использовали два типа питательной среды: среда Murashige, Skoog (1962) и среда B5 (Gamborg, Eveligh, 1968).

Основной питательной средой выбрана среда Гамборга, успешно применяемая для размножения растений рода *Paeonia*. Полужидкие питательные среды стали намного удобнее в работе, потому что у нас не было возможности постоянно следить за световым и температурным режимом при культивировании. Культивирование производили при естественном световом дне и комнатной температуре. В таких условиях при ярком солнце плотные питательные среды могли подсыхать, что негативно сказывалось на росте и развитии растений [1, 26, 24].

В связи со спецификой покоя данного объекта, для каждого мы использовали разные схемы культивирования.

С семенами работали в асептических условиях. Для этого были приняты следующие меры:

- обработка поверхности ламинар-бокса 96% спиртом;
- стерилизация инструментов, эксплантов;
- стерилизация инструментов в ламинар-боксе с помощью УФ излучения и биофильтрата (время стерилизации – час 45 минут).

Для повышения уровня стерильности следует надеть стерильный хлопчатобумажный халат, руки обработать 96% спиртом или 0,05% раствором хлоргексидина биглюконата. Все необходимые инструменты для работы (пинцеты, скальпели и препаровальные иглы,

микробиологические петли и лезвия) перед началом работы обработать в стакане 96% спиртом. Перед непосредственным использованием инструмент нужно обжигать на пламени спиртовки и остужать.

Для стерилизации семян мы применяли следующий метод. Стерилизацию проводили в септических условиях. Семена последовательно обрабатывали 0,5%-ным раствором марганцевокислого калия и 1%-ным раствором медного купороса по 15 минут для освобождения от бактериальных и грибковых инфекций. Затем в стерильных условиях обрабатывали следующими дезинфицирующими растворами: 70% раствором этанола и перекисью водорода по 1 мин [1, 5].



Рисунок 18. Семена *Paeonia* (процесс стерилизации)

Стерилизовать семена заранее необходимо, потому что отсутствие стерилизации ведет к образованию грибковой инфекции в чашках Петри уже через несколько дней. После выдерживания в дезинфицирующих растворах семена проращивали в чашках Петри на дистиллированной воде при разных температурах, в зависимости от вида *Paeonia*:

- при температуре +4-5°C (*Peonia peregrine* Mill.; *Paeonia officinalis* L.; *Paeonia caucasica*), помещены в холодильник.
- при температуре +25°C (*Paeonia lactiflora*; *Paeonia mlokosewitschii*; *Paeonia tenuifolia*; *Paeonia anomala*), в термостате.

Особенность культивирования этого рода является то, что выход семян из покоя составляет от 1 месяца до 12 месяцев. Семена на проращивание были заложены 13.10.21 [5].



Рисунок 19. Семена *Paeonia* (процесс проращивания)

Первые проростки появились 13.11.21, это были проростки вида *Paeonia lactiflora*. Полученные проростки стерилизовали и пересадили в питательную среду. Данная схема позволяет получить стерильные проростки для выращивания в культуре *in vitro*.



Рисунок 20. Прорастание семена *Paeonia lactiflora*

Семена всех исследуемых сортов пиона плохо набухают. Процесс набухания семян практически не зависел от температуры среды проращивания. Плохая водопроницаемость покровов семени пионов указывает на присутствие у них физического покоя и необходимость скарификации.

Высокая всхожесть семян и дружность прорастания не наблюдалась, у пиона молочно-цветкового – 37,5%.

Наблюдается наличие покоя у семян данного рода. Это является одной из проблем при проращивании семян этого рода. Существует несколько причин покоя семян видов рода *Paeonia* L. Во-первых, это недоразвитый зародыш. Не быстрое прорастание семян видов рода *Paeonia* L. может зависеть и от глубокого физиологического покоя эпикотиля - точки роста побега. Такое явление может отмечаться при наличии в семенах абсцизовой кислоты (АБК). Также сниженная ферментативная активность может влиять на развитие зародыша внутри семени и его прорастание. Помимо перечисленных признаков, долгое прорастание может быть связано с наличием природного полимера,

который находится в семенной кожуре и понижает проницаемость растительных клеток для воды [1, 7, 26].

У рода *Paeonia* L. в природных условиях преобладает размножение делением, поэтому схема с использованием семян и последующее введение в культуру *in vitro* для данного рода весьма проблематично. К тому же у этого рода довольно крупные семена, их вес от 2 до 5 г на одно семя.

У пиона кавказского всхожесть семян составила 10%. Мы предполагаем, что это связано с наличием глубокого физиологического покоя семян. По справочным данным семена пиона кавказского требуют стратификации не меньше 7 месяцев. Семена для опытов были первого года хранения. В литературе отмечается повышение всхожести у семян данного вида на второй и третий год хранения. Данный вид пиона отличается крупными семенами. Масса одного семени составляет 2-3 г. Всхожесть семян этого вида может достигать лишь 30-35%. В большинстве случаев она небольшая и составляет 10-20 %. Остальные семена могут прорасти на второй и третий годы [12, 18, 26].



Рисунок 21. Проросшие семена *Paeonia caucasica*

Самую низкую всхожесть показали остальные виды заложенных нами видов пионов (тонколистный, лекарственный, Млокосевича, уклоняющийся и *peregrine*) – менее 10%.

Их семена начали прорасть лишь спустя 15 месяцев, после появления зародышевого корешка, семена покрылись плесенью и при повторной стерилизации положительного результата не отмечалось. Поэтому мы продолжили работу с выжившими объектами.

3.2 Особенности культивирования в условиях *in vitro* некоторых видов рода *Paeonia*

Пророщенные семена подверглись стерилизации и переносу в культуру *in vitro*. В течении двух недель наблюдался рост, а затем все образцы были уничтожены грибковой болезнью.



Рисунок 22. Пересаженный *Paeonia caucasica*

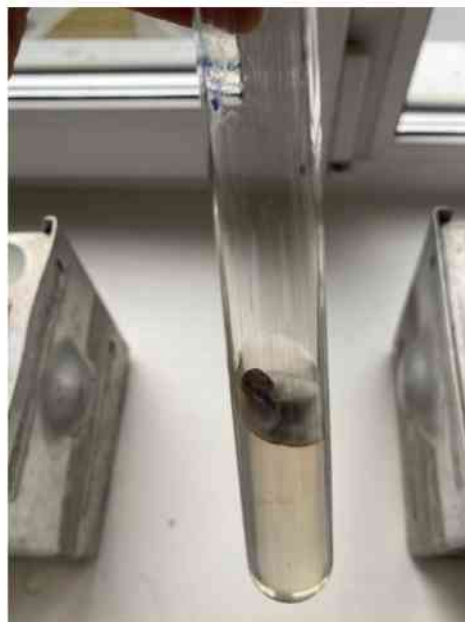


Рисунок 23. Пораженный грибом *Paecilomyces caucasicus*

Данный результат может свидетельствовать о занесении бактерий при пересаживании на питательную среду и выборе неверного метода стерилизации.

После заражения мы попытались повторить попытку пересадки. Во второй попытке перед пересадкой зародышевый корешок был очищен от семенной кожуры и прошел этап стерилизации. В течении нескольких недель отмечался рост.



Рисунок 24. Проростки *Paecilomyces lactiflora*



Рисунок 25. Проросший *Peonia caucasica*

Стерилизация проростков проводилась по схеме: 70% раствор этанола и перекись водорода по 1 мин. После выдерживания в дезинфицирующих растворах проростки несколько раз промывали дистиллированной водой и в стерильных условиях высаживали в культуру *in vitro* [1, 7, 24].

3.3 Наблюдение за особенностями онтогенеза рода *Peonia* на базе Ботанического сада им. И.И. Спрыгина

Помимо работ в лаборатории, мы проводили изучения онтогенеза пионов на базе Ботанического сада им. И.И Спрыгина. В середине апреля были замечены массовые всходы пионов. Затем благодаря стабильно теплой погоде +15-18°C, наблюдается активный рост всходов.

В саду нам рассказали, что выращивание данного рода происходит не только частями растения, но и семенами. Большая проблема проращивания из семян заключается в большом количестве времени при ожидании всходов. Биолог ботанического сада, Можаяева Галина

Федоровна, объяснила, что посаженные семена в этом году, они ждут только через 2-3 года, ведь вероятность всхода в первый год менее 10%.

Семена сначала высаживают в небольших теплицах, затем ждут всходов. После появления проростков пионы переносят на открытую территорию ботанического сада. При размножении пионов участками корневища или другими частями шанс появления новых прижившихся растений резко увеличивается. Также данный метод позволяет приобретать новые сорта растений. Так произошло и в нашем ботаническом саду, несколько лет назад из Сербии была привезена часть корневища древовидного пиона Рока, сейчас данное растение является редким и уникальным экземпляром в ботаническом саду в Пензе.



Рисунок 26. *Paeonia Rockii*

После зимы всходы пиона появляются сразу как сойдет снег, ведь данный род является холодостойким и перемены температур для него не опасно. Ранние сорта пионов начинают зацветать в середине мая и продолжают цвести до конца июня. В целом период цветения пионов продолжается с мая по август. Разнообразие цветовой палитры у данных сортов пионов в ботаническом саду очень большое. Осенью садоводы и

биологи ботанического сада собирают часть семян пионов для дальнейшей посадки в грунт и проращивания [18, 26].



Рисунок 27. Проращивание Раеопiа в Ботаническом саду им. И.И. Спрыгина



Рисунок 28. Растение Раеопіа в возрасте 7 дней после прорастания в Ботаническом саду им. И.И. Спрыгина



Рисунок 29. Растение Раеопіа в возрасте 25 дней после прорастания в Ботаническом саду им. И.И. Спрыгина



Рисунок 30. Растение Раеонiа в возрасте 20 дней после прорастания в Ботаническом саду им. И.И. Спрыгина

3.4. Митотический индекс

В Ботаническом саду нам удалось взять часть корневища для проведения митотического анализа. Данный анализ позволит нам определить уровень протекания митоза, вид анализа показывает уровень нормального протекания митоза, в норме ли он, или наоборот, отмечается увеличении митотической активности тканей [8, 10, 29].

Первый этап работы это приготовление красителя и фиксатора. Данная работа проводилась в лаборатории, для начала был изготовлен фиксатор Кларка (уксусный алкоголь).

Как готовили фиксатор Кларка: смешали 3 мл 96% этилового спирта и 1 мл ледяной уксусной кислоты.



Рисунок 31. Приготовление фиксатора Кларка

Для проведения анализа использовали корешки пиона уклоняющегося, взятые из ботанического сада.



Рисунок 32. Paeonia anomala

Для опыта мы взяли корешки длиной 6 мм, срезанные корешки поместили на 30 часов в фиксатор Кларка и поместили в холодильник на верхнюю полку.



Рисунок 33. Корешки тиона, помещенные в фиксатор

Следующим этапом было приготовление красителя и окраска препарата. Для этого взвесили 0,1 г орсеина. Добавили к орсеину 2,5 мл ледяной уксусной кислоты. Закрыли пробирку пробкой и оставили на сутки в холодильнике на верхней полке.



Рисунок 34. Приготовление красителя

Далее нагрели под тягой пробирку с красителем до кипения. К остывшему раствору прилили 2,5 мл дистиллированной воды и снова нагрели до кипения. Закрыли пробирку резиновой пробкой и ставили на сутки в холодильник на верхнюю полку. Краситель фильтровали и добавили к нему 0,5 мл 0,5% соляной кислоты.



Рисунок 35. Последний этап приготовления красителя

Далее нам нужно заменить фиксатор на краситель, для этого нужно осторожно слить фиксатор в отходы, а к корешкам в бюкс добавить краситель и снова оставить на 30 часов.

Краситель в своем составе имеет соляную кислоту и поэтому одновременно с окрашиванием произошла и мацерация тканей. После окрашивания нужно приготовить давленный препарат из получившихся корешков. Для этого мы приготовили раствор 45% уксусной кислоты: смешали 1 мл ледяной уксусной кислоты и 1,2 мл дистиллированной воды.

Препарат поместили в каплю 45% уксусной кислоты на предметное стекло и ждали 2 минуты. После рядом сделали вторую каплю 45% уксусной кислоты и пинцетом перенесли в неё корешок. Затем накрыли его покровным стеклом. Далее концом спички, одновременно придерживая покровное стекло, круговым движением и осторожным постукиванием по покровному стеклу материал равномерно распределили в один слой клеток [8, 10, 29].



Рисунок 36. Приготовление давленного препарата

После приготовления препарата поместили его на предметный столик микроскопа Ломо «Микмед 5». Препарат рассматривали сначала при малом увеличении, затем при большом.



Рисунок 37. Микроскоп Ломо «Микмед 5»

Рассмотрев препарат, мы обнаружили, что митоз уже закончился, и видно лишь интерфазу. Это можно объяснить тем, что взятый нами препарат был уже в грунте около двух недель. А митоз идет первые 15-20 часов после прорастания, поэтому сам митоз мы и не увидели.

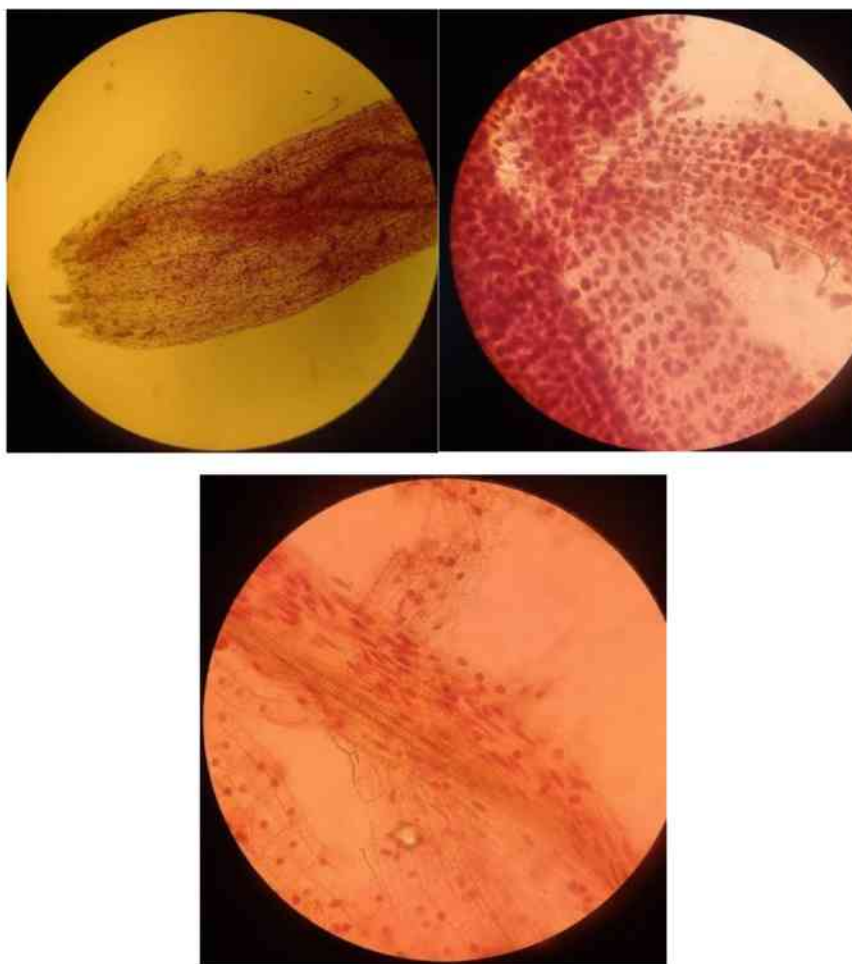


Рисунок 38. Клетки Раeонiа апотала

ГЛАВА 4. ПРОЕКТНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ШКОЛЬНИКОВ В РАМКАХ ПОДГОТОВКИ К НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

Сейчас исследовательская и проектная деятельность учащихся является неотъемлемой частью учебного процесса и приоритетной задачей современного образования. Это обосновано тем, что в основе исследовательской деятельности лежит системно-деятельностный подход. Такой подход поощряется потому, что учащиеся, не только показывают исследования, но и запоминают большое количество того, что выполняли практически. Исследовательская деятельность помогает формировать и развивать все виды универсальных учебных действий (УУД) школьников, а именно личностных, регулятивных, познавательных, коммуникативных. [6,19,22].

Опыты и эксперименты, которые проводились в бакалаврской работе можно использовать при подготовке учеников к научно-практическим конференциям.

Данная работа должна осуществляться в несколько этапов:

1) Подготовительный:

- определение темы исследования, цели и задачи;
- обозначение актуальности и значимости темы;
- определение сроков и составление плана исследовательской работы.

2) Основной:

- формирование и изучение литературы по данной теме;
- составление плана теоретической работы;
- расширение и углубления знаний по данной теме исследования;
- закрепления теоретического материала по средствам выполнения различных заданий;

- анализ и обобщение, сопоставление полученной информации;
- подкрепление теоретической информации практической деятельностью;

- выполнение лабораторных опытов;

- анализ и обсуждение результатов.

3) Заключительный:

- обобщение и систематизация полученных данных;

- оформление работы (доклад, презентация, статья);

- подготовка к выступлению по данной теме исследования.

В результате сделанной работы у учащихся знания по биологии становятся более углубленными, формируются универсальные учебные действия, развиваются навыки самостоятельной учебно-познавательной деятельности [19, 22, 27].



Рисунок 39. Диплом 3 степени, полученный на Региональном конкурсе исследовательских работ для студентов и учащихся образовательных учреждений

Работа «Культивирование растений *in vitro*» была представлена на Региональном конкурсе исследовательских работ для студентов и учащихся образовательных учреждений, где был получен диплом

победителя 3 степени. Это подчеркивает актуальность темы и ее основных направлений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы изучались растения – Пионы. Все исследования проводились с растениями, которые выращиваются в условиях Пензенского ботанического сада им. И. И. Спрыгина ПГУ. Семена для проведения лабораторных экспериментов были предоставлены сотрудниками ботанического сада [4].

Растения из отдела Цветковые – отдел *Magnoliophyta*. Класс Двудольные – класс *Magnoliopsida*. Порядок Камнеломкоцветные *Paeoniales* – порядок *Saxifragales*. Семейство Пионовые – семейство *Paeoniaceae*. Род Пион – род *Paeonia*.

Виды: Пион Лекарственный (*Paeonia officinalis* L.), пион Молочно-цветковый (*Paeonia lactiflora*), пион Кавказский (*Paeonia caucasica*), пион Млокосевича (*Paeonia mlokosewitschii*), пион Тонколистный (*Paeonia tenuifolia*), пион Уклоняющийся (*Paeonia anomala*).

В ходе написания бакалаврской работы проводились наблюдения за ростом растений. Были изучены особенности культивирования растений в условиях *in vitro*. Мы выбрали оптимальные условия для введения в культуру эксплантов растений пионов видов молочно-цветковый, кавказский [5].

В результате полученных данных можно сделать вывод, что на рост и развитие растений в условиях *in vitro* влияют многие факторы:

1. Правильная стерилизация семян растений;
2. Правильно приготовленная питательная среда, где подобраны компоненты в определенном количественном соотношении, в соответствии с видом растения;
3. Внешние условия, в которых прорастают растения (свет, температура и т.д.);
4. Соблюдение стерильности.

При написании бакалаврской работы были выполнены поставленные цели и задачи. Были изучены особенности видового разнообразия сотов рода *Paeonia* в ботаническом саду им. И.И. Спрыгина. Так же были подобраны оптимальных условия для стерилизации семян, условия для введения в культуру, а также выполнен митотический анализ. В результате выполненной работы были получены зачатки молодых растений, и проанализированы их прорастание в условиях *in vitro*; а также выяснили возможность использования полученного материала в изучении школьного курса биологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. Физиология растений. Учебник для студентов вузов. М.: Академия, 2005. 640 с.
2. Белокурова В.Б., Листван Е.В., Майстров П.Д., Сикура Й.Й., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры // Цитология и генетика, 2005. 41-51 с.
3. Ботанико-фармакогностический словарь. / Под ред. Блиновой К.Ф. Яковлевой Г.П. М.: Высшая Школа, 1990. С. 65.
4. Ботанический сад [Офиц. сайт]. URL: <https://botsad.pnzgu.ru>. (Дата обращения: 10.10.2021).
5. Брюхин В.Б. Развитие зародыша пиона *in vivo* и *in vitro*. – Автореф. дис. канд. биол. наук. Ботан. ин-т им. В.Л. Комарова. Санкт-Петербург, 1993. 21с.
6. Васильева М.З. Методика преподавания биологии: учебно-методический комплект (для студентов, обучающихся по специальности «Биология»). Горно-Алтайск: РИО ГАГУ, 2008. 138 с.
7. Васильева М.Ю. Формирование органов возобновления у травянистых пионов // Вопросы интенсификации декоративного садоводства. М.: 1975. С. 65-69.
8. Викторов Д.П. Практикум по физиологии растений. Воронеж: ВГУ, 1991. 160 с.
9. Генкель П.А. Физиология растений. Физиология растений. Учебное пособие по факультативному курсу. Для 9 класса. М.: Просвещение, 1970. 175 с.
10. Гиль Л.С. Опыт ускоренного размножения пионов. // Цветоводство № 4, 1959. С.23.

11. Гольд В.М., Гаевский Н.А., Голованова Т.И. Электронный учебно-методический комплекс «Физиология растений». Красноярск: ИПК СФУ, 2008. 148 с.
12. Грязнов В.П., Сиротина Л.В. Практикум по физиологии растений. Белгород: БелГУ, 2000. 68 с.
13. Дубров В. Ито-гибриды: прошлое и будущее // Цветоводство. май/июнь 2007.
14. Ипполитова Н.Я. Культура пионов в средней полосе. М.: Колос, 1979.
15. Кириленкова В.Н., Обухов Д.К. Клетки и ткани: методическое пособие. М.: Дрофа, 2008. 118 с.
16. Кретович В.Л. Биохимия растений. М.: Высшая школа, 2000. 445 с.
17. Лариса Павлова. Пионы. – М.: Фитон XXI, 2015. 64 с.
18. Мазец Ж.Э., Судейная С.В. Практикум по физиологии растений. Часть 1 Минск: БГПУ, 2009. 64 с.
19. Научно-исследовательская работа по биологии, как важный способ активизации школьников [Офиц. сайт] URL: <http://natural-sciences.ru/ru/article/viewid=10139> (Дата обращения: 01.02.2023).
20. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. Л.: Наука, 1985. 347 с.
21. Рейвн П. Современная ботаника В 3т. Т1,2. М.: Мир, 1990. 560 с.
22. Русских Г.А. Технология проектного обучения // Биология в школе, 2015. 21-31 с.
23. Манойлина С. Совершенствование методики определения микротравмирования семян. М.: LAP Lambert Academic Publishing, 2013. 168 с.
24. Технология возделывания пионов /электронный ресурс/ <http://www.aaa-flowers.ru> (Дата обращения: 01.02.2023).

25. Тимохин В.И. Культура пионов и способы размножения. Интродукция и приёмы культуры цветочно-декоративных растений. М.: Наука, 1997. 168 с.
26. Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений /Учебно-методическое пособие. Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003. 8 с.
27. Шибаета М.М. Особенности организации проектной деятельности обучающихся на основе цифровых технологий // Педагогические науки, 2015. С. 55-63.
28. Широков А.И., Крюков Л.А. Основы биотехнологии растений: Электронное учебно-методическое пособие. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. 49 с.
29. Шмидт В.М. Математические методы в ботанике. Л.: ЛГУ, 1984. 288 с.
30. Якушкина Н.И., Бахтенко Е.Ю. Физиология растений: [учебник для студентов вузов, обучающихся по специальности 032400 «Биология»]. М.: Владос, 2005. 463 с.