

*На правах рукописи*



**Тимофеева Светлана Николаевна**

РАЗМНОЖЕНИЕ *LABURNUM ANAGYROIDES* MEDIK.  
В УСЛОВИЯХ *IN VIVO* И *IN VITRO*  
ПРИ ИНТРОДУКЦИИ В НИЖНЕМ ПОВОЛЖЬЕ

1.5.9. Ботаника

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2021

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент  
**Юдакова Ольга Ивановна**

Официальные оппоненты: **Викторов Владимир Павлович**,  
доктор биологических наук, профессор,  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования «Московский педагогический  
государственный университет»,  
заведующий кафедрой

**Титова Галина Евгеньевна**,  
кандидат биологических наук,  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Ботанический институт  
им. В.Л. Комарова Российской академии наук,  
ведущий научный сотрудник с возложением  
обязанностей руководителя лаборатории

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки «Ордена Трудового  
Красного Знамени Никитский ботанический сад  
— Национальный научный центр РАН»

Защита диссертации состоится 16 февраля 2022 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.002.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2. Тел. (812) 372-54-06, факс (812) 372-54-43, адрес электронной почты: dissovet.24100201@binran.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук,  
<https://www.binran.ru/dissertatsionnyye-sovety/dissovet-01/>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_ г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук  Сизоненко Ольга Юрьевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Интродукция является одним из эффективных способов увеличения разнообразия хозяйственно ценных, лекарственных и декоративных растений. Расширение ассортимента высоко декоративных форм особенно актуально в отношении деревьев и кустарников, выращиваемых в регионах с умеренным климатом, так как именно их ассортимент сегодня весьма ограничен. Возрастающий спрос на лекарства природного происхождения делает актуальным создание сырьевой базы для их производства и интродукцию лекарственных растений.

Перспективным интродуцентом для эколого-климатических условий Нижнего Поволжья является бобовник анагировидный (*Laburnum anagyroides* Medik., Fabaceae) (Барышникова, Арестова, 2007). Растение характеризуется высокой декоративностью и экологической пластичностью, а также содержит алкалоиды и изофлавоны, на основе которых созданы лекарственные препараты, используемые в официальной медицине (Волынский и др., 1983; Tzancova, Danchev, 2007). Родина *L. anagyroides* – Центральная, Южная Европа и Средиземноморье. В Россию он был завезен в 18 в. на Кавказ и в Крым, но несмотря на более чем 200-летний период интродукции, в нашей стране до сих пор представлен, в основном, единичными экземплярами в ботанических садах и дендропарках. Широкое использование *L. anagyroides* в качестве декоративного растения и источника лекарственного сырья ограничивается сложностью его размножения традиционными методами в регионах, эколого-климатические условия которых отличаются от мест естественного произрастания этого вида.

**Цель исследования:** Изучение размножения *L. anagyroides in vivo* и *in vitro* при интродукции в Нижнем Поволжье.

**Задачи исследования:**

- оценить успешность интродукции *L. anagyroides* в условиях Нижнего Поволжья;
- установить причины, осложняющие семенное размножение *L. anagyroides* при интродукции в Нижнем Поволжье;
- разработать эффективные методы искусственного размножения *L. anagyroides in vivo* и *in vitro*.

**Научная новизна.** Впервые изучены феноритм и особенности семенной репродукции *L. anagyroides* в умеренно-континентальном климате Нижнего Поволжья. Показана успешность интродукции *L. anagyroides* в Нижнем Поволжье. Установлены причины, осложняющие естественное семенное размножение *L. anagyroides*. Разработаны эффективные методы искусственного выведения семян *L. anagyroides* из состояния органического покоя. Впервые разработаны технологии клонального микроразмножения *L. anagyroides* с использованием ювенильного и зрелого растительного материала. Изучены гистологические особенности развития адвентивных побегов в культуре *in vitro*, обоснована целесообразность их использования для увеличения эффективности микроразмножения.

**Научно-практическая значимость работы.** Разработанные методы искусственного размножения *L. anagyroides* в условиях *in vivo* и *in vitro*, позволяют получать в массовом количестве посадочный материал и исходный материал для селекции, что делает возможным более широкое использование этого растения в практических целях. Материалы диссертации используются при чтении курса «Биотехнология» и при проведении лабораторных работ «Большого практикума» направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология в ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского».

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- интродукция *L. anagyroides* в Нижнем Поволжье успешна, растения регулярно проходят полный цикл сезонного развития, формируют полноценные семена;
- глубокий физический покой семян *L. anagyroides* препятствует их массовому естественному прорастанию в условиях Нижнего Поволжья;
- сочетание методов теплой стратификации семян и культуры *in vitro* позволяет получать в массовом количестве посадочный материал и исходный материал для селекции.

**Декларация личного участия автора.** Автором самостоятельно выполнены фенологические наблюдения, разработаны методы выведения семян из состояния физического покоя и протоколы клонального микроразмножения *L. anagyroides*; проведена статистическая обработка результатов; сформулированы выводы; приготовлены микрофотографии. Доля личного участия в написании совместных публикаций – от 40 до 70%.

**Методология и методы исследования.** В работе использованы методы фенологических наблюдений, цитозембриологического и гистологического анализа, культуры тканей и органов растений *in vitro* и статистической обработки данных.

**Степень достоверности.** Научные положения и выводы основаны на анализе большого объёма экспериментальных данных. Их достоверность подтверждается статистической обработкой с помощью пакета компьютерных программ «Agros» и «Excel 2010».

**Апробация работы.** Результаты исследований были доложены на: Всерос. конф. «Инновационные и молекулярно-генетические исследования живых систем» (Уфа, 2009); III Всерос. науч.-практ. конф. «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира» (Волгоград, 2010); VII Междунар. науч.-практ. конф. «Биотехнология как инструмент сохранения биологического разнообразия растительного мира» (Ялта, 2016); VI Междунар. науч. конф. «Биологическое разнообразие. Интродукция растений» (Санкт-Петербург, 2016); I Междунар. науч.-практ. конф. «Ботанические сады в современном мире: наука, образование, менеджмент» (Санкт-Петербург, 2016); II Міжнар. науково-практ. конф. «Світові рослинні ресурси: стан та перспективи розвитку» (Киев, 2016); Міжнар. науково-практ. конф. «Науковий тиждень у Крутах – 2017» (Круты, 2017); Междунар. конф. «Вавиловские чтения – 2017» (Саратов, 2017); XX

Междунар. науч. конф. «Плодоводство, семеноводство, интродукция древесных растений» (Красноярск, 2017); IV (XII) Междунар. ботан. конф. молодых учёных (Санкт-Петербург, 2018); Междунар. науч.-практ. конф. «Научный и инновационный потенциал развития производства, переработки и применения эфиромасличных и лекарственных растений» (Симферополь, 2019); Междунар. науч. конф. «Живые системы – 2019» (Саратов, 2019).

**Публикации.** По материалам исследований опубликовано 23 работы, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных Перечнем ВАК РФ, 1 – в изданиях, входящих в базу SCOPUS, 1 патент и 3 учебных пособия.

**Связь с государственными научными программами, участие в выполнении грантов.** Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Минобрнауки РФ в рамках базовой части государственного задания в сфере научной деятельности по заданию № 6.8789.2017/8.9 (2017-2019 гг.).

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов, списка литературы и приложения. Объем работы – 161 страница. Она содержит 19 таблиц и 22 рисунка. Список литературы включает 316 источников, в том числе 163 на иностранных языках.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В литературном обзоре изложены сведения о эколого-биологических особенностях *L. anagyroides*, проанализированы проблемы и перспективы микроразмножения древесных растений в условиях *in vitro*, рассмотрены факторы, влияющие на его эффективность.

### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили растения *L. anagyroides*, произрастающие в Ботаническом саду СГУ имени Н.Г. Чернышевского.

Изучение сезонного ритма развития растений проводили в 2017-2019 гг. по методике И.Н. Бейдеман (1974). Успешность интродукции оценивали по методике Н.А. Кохно (1980), модифицированной для засушливых регионов (Арестова, Арестова, 2017). Акклиматизационное число (А) рассчитывали по формуле:

$$A = 2P + 4Гз + 7Зм + 7Зс, \text{ где:}$$

Р – показатель роста; Гз – показатель генеративного развития; Зм – показатель зимостойкости; Зс – показатель засухоустойчивости; перед показателями проставлены коэффициенты весомости признаков по (Арестова, Арестова, 2017).

Степень акклиматизации определяли в соответствие со шкалой: полная акклиматизация (А=100-81), успешная акклиматизация (А=80-61), удовлетворительная акклиматизация (А=60-41), слабая акклиматизация (А=40-21), отсутствие акклиматизации (А≤20).

Биологию цветения и опыления изучали по методике А.Н. Пономарева (1975). Цитоэмбриологический анализ осуществляли на препаратах просветленных пыльников и семязачатков (Негг, 1971), выделенных из

цветков, которые фиксировали каждые 2-3 сут от начала цветения до увядания. Всего была изучена структура более 1000 семязачатков. Семенную продуктивность оценивали по И.В. Вайнагий (1974), качество семян – по М.К. Фирсовой (1959).

В биотехнологических исследованиях стерилизацию растительного материала проводили 70% этанолом и 0,1% раствором сулемы (HgCl<sub>2</sub>). В экспериментах использовали питательные среды Мурасиге-Скуга (MS) (Murashige, Skoog, 1962) и Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd, McCown, 1980). Для индукции морфогенеза в среды добавляли цитокинины (БАП, кинетин, тидиазурон, зеатин) и ауксины (ИУК, ИМК и НУК) в разных концентрациях и сочетаниях. Культивирование осуществляли при температуре 26±2°С при 14 ч фотопериоде, используя Osram Fluora лампы (3 klux). Гистологические особенности морфогенеза *in vitro* изучали на препаратах, приготовленных с использованием техники просветления растительных тканей (Юдакова и др., 2012).

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1 Оценка успешности интродукции

Фенологические наблюдения показали, что в условиях Нижнего Поволжья (г. Саратов) *L. anagyroides* регулярно проходит полный цикл сезонного развития. Установленный ритм развития вегетативных побегов позволяет отнести его к поздно начинающим вегетацию, ритм цветения – к ранне-летним, длительность цветения – к среднецветущим растениям (рис.1).

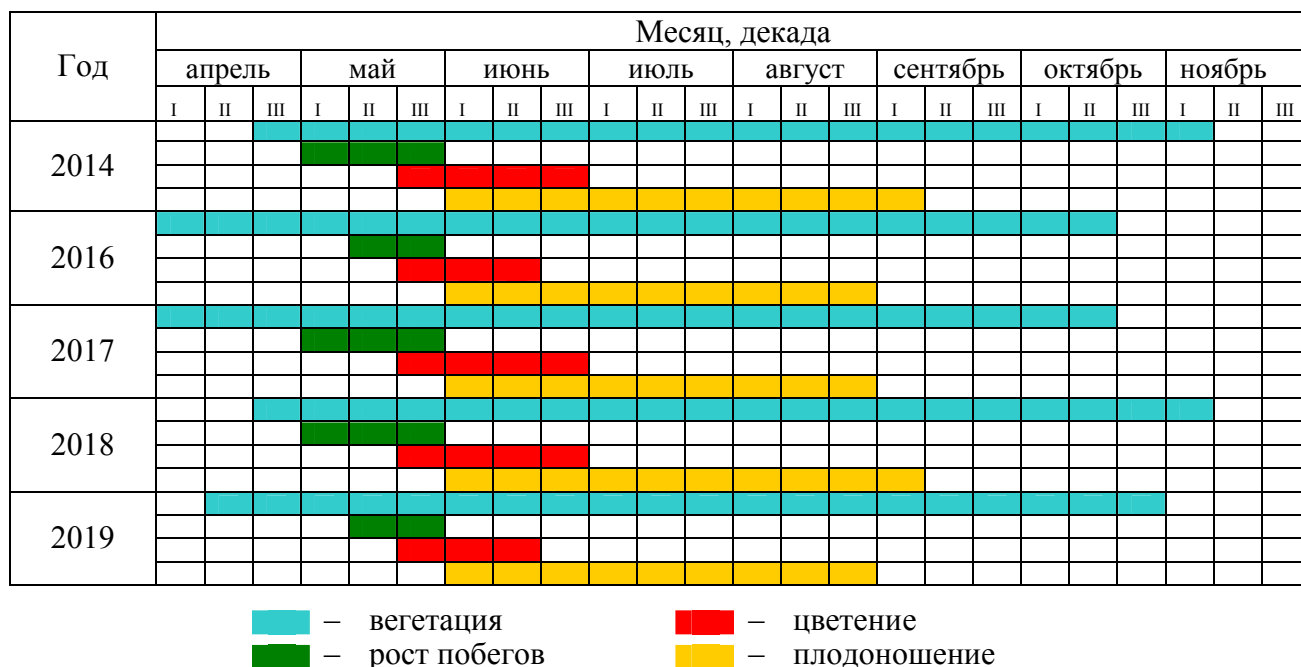


Рис. 1. Сезонный феноспектр развития *L. anagyroides* в Нижнем Поволжье

При проведении комплексной оценки адаптивной способности вида установлено: 1) рост – «относительно умеренный» (3 балла); 2) генеративное развитие – «всхожих семян мало» (4 балла); 3) зимостойкость – «частично обмерзают годовичные побеги» (4 балла); 4) засухоустойчивость – «растение

вполне засухоустойчиво» (5 баллов). Общее акклиматизационное число – 84 балла, что свидетельствует о полной акклиматизации. Однако случаи самосева у изученных растений были единичными, а развивающиеся проростки, как правило, быстро погибали. Для выявления причин низкой эффективности естественного семенного размножения был осуществлен цитозембриологический анализ, изучены процессы прорастания семян в лабораторных условиях и первые этапы онтогенеза.

### 3.2. Особенности семенного размножения *L. anagyroides* в условиях Нижнего Поволжья

Цветки *L. anagyroides* мотылькового типа, зигоморфные, обоеполые. Андроцей состоит из 10 тычинок, в пыльниках которых формируется по  $705,6 \pm 10,5$  пыльцевых зерен. Гинецей монокарпный. Завязь содержит  $5,2 \pm 0,1$  кампилотропных, красинуцеллятных и битегмальных семязачатков. Соотношение количества пыльцевых зерен к количеству семязачатков (*P/O ratio*) – 1440, что характерно для факультативных аллогамов (Cruden, 1977). Зрелые пыльцевые зерна округлой формы, трехпоровые, средний диаметр 24,1 мкм. Средняя степень дефектности пыльцы – 15,4%. В ходе проведенного цитозембриологического исследования уточнен тип развития женского гаметофита. Guignard (1881) впервые описал его как *Polygonum*-тип, но позднее Rembert (1966) идентифицировал его как *Allium*-тип. Характерной особенностью *L. anagyroides* является осуществление второго деления мейоза только в халазальной клетке диады мегаспор, тогда как микропилярная клетка не делится и постепенно дегенерирует. В результате вместо тетрад мегаспор образуются триады. Наличие таких триад указывает на моноспорический тип развития зародышевого мешка, а биполярность и восьмиядерность зрелых мегагаметофитов – на *Polygonum*-тип.

Анализ 800 зародышевых мешков показал, что зародыш и эндосперм развиваются в результате оплодотворения. Гаметофитных аномалий, нарушений эмбрио- и эндоспермогенеза, а также эмбриологических признаков апомиксиса не зарегистрировано. Из-за того, что многие зародышевые мешки остаются неоплодотворенными, в среднем только 30-40% семязачатков развиваются в семена. При средней потенциальной семенной продуктивности  $5,2 \pm 0,1$  семязачатков на завязь, реальная семенная продуктивность составляет  $1,4 \pm 0,1$  семян на плод. Тем не менее, большое количество соцветий и цветков в них позволяют изученным растениям ежегодно производить более 3000 полноценных семян. Сформировавшиеся зрелые семена практически не содержат эндосперм. *V*-образно изогнутый зародыш занимает почти весь объем семени. Зародыш нормально развитый, дифференцированный. Средний вес 1000 семян –  $19,6 \pm 3,4$  г.

При проращивании семян в лабораторных условиях на фильтровальной бумаге наклеивание единичных из них происходило в среднем на 9-е сут. В области микропиле появлялся зародышевый корешок длиной 1-2 мм. Через 1-2-е сут от начала прорастания корешок удлинялся до 5-12 мм. В это же время появлялся этиолированный гипокотиль длиной 3-4 мм, который на

4-5-е сут проращивания зеленел и удлинялся до 15-25 мм. Семядольные листья проростков эллипсоидной формы, ярко-зеленые, гладкие, цельнокрайние, длиной 5-7 мм, шириной 3-4 мм, разворачивались на 6-8-е сут от начала прорастания. На 7-9-е сут у проростков развивался первый настоящий лист.

Через 1 мес прорастало не более 10% интактных семян. Остальные, несмотря на нормальное строение, даже не набухали, что свидетельствует о водонепроницаемости семенной оболочки, характерной для многих бобовых. Для преодоления твердосемянности семена были подвергнуты стратификации: теплой (обработка горячей водой, +90°C, 15 мин), холодной (промораживание сухих семян при -18°C, 1 мес); и переменному температурному воздействию (-18°C, 1 мес / +90°C, 15 мин). Холодная стратификация повысила частоту прорастания с 4,8% (в контроле) до 9,9%, а воздействие высокими и переменными температурами – до 82,2% ( $P \leq 0,01$ ).

Длительность высокотемпературной предобработки (5, 15 и 25 мин) не влияла на частоту прорастания (75,5, 84,5, 80,0%, соответственно). Однако после 5 мин предобработки у 71,4% семян кожура сохраняла свою жесткость, что затрудняло разворачивание семядольных листьев и приводило к гибели проростков. Проростки, развившиеся после высокотемпературной предобработки, проходили все основные фазы своего развития, их морфометрические параметры не отличались от контрольных показателей, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния высокотемпературной предобработки семян на рост и развитие зародыша.

Большинство проростков, развившихся на фильтровальной бумаге, были гидратированы (рис. 2, а) и погибали после высадки в почву, поэтому дополнительно были изучены другие субстраты для проращивания: кокосовое волокно и питательная среда MS, дополненная 0,5 мг/л БАП (табл. 1).

Таблица 1.

Частота прорастания семян *L. anagyroides* на различных субстратах

Субстрат для проращивания (фактор А)	Количество проросших семян, %				Средние значения (фактор А)
	без обработки (контроль)	после температурной предобработки (фактор В)			
		-18°C, 1 мес	+90°C, 15 мин	-18°C, 1 мес / +90°C, 15 мин	
Фильтровальная бумага	4,8 а	9,9 а	82,2 defg	82,2 efg	44,8 b
Кокосовый субстрат	6,7 а	13,3 а	51,8 b	80,2 cdefg	38,0 а
MS + 0,5 мг/л БАП	7,8 а	11,9 а	82,3 fg	86,1 g	47,0 b
Средние значения (фактор В)	6,4 а	11,7 а	71,1 b	82,9 c	-
F <sub>(A)</sub> 5,4*, F <sub>(B)</sub> 290,1 ***, F <sub>(A×B)</sub> 4,8*					

Примечание. В каждом варианте изучено три повторности по 15-20 семян. Данные, обозначенные разными буквами в одном столбце, достоверно различаются по результатам двухфакторного дисперсионного анализа, \* $P \leq 0,05$ , \*\*\* $P \leq 0,01$ .



Во всех вариантах высокотемпературное воздействие оказалось эффективнее низкотемпературного (табл. 1). На кокосовом субстрате развивались нормальные проростки (рис. 2, б), но после пересадки в почву приживалось не более 40-50% из них. Проростки, развившиеся на питательной среде MS с 0,5 мг/л БАП, имели укороченный и утолщенный гипокотиль и небольшой корешок (рис. 2, в), однако именно они после высадки в почву приживались с высокой частотой (95-98%).



Рис. 2. Проростки *L. anagyroides*, развившиеся на разных субстратах:

а – через 3 нед на фильтровальной бумаге; б – через 3 нед на кокосовом субстрате; в – через 3 нед на среде MS с 0,5 мг/л БАП; г – через 1 мес (слева) и 3 мес (справа) выращивания в почве; д – через 6 мес выращивания в почве. Масштаб: 10 мм

Через 1 мес выращивания высота сеянцев достигала  $30,50 \pm 1,56$  мм, размеры семядольных листьев –  $11,12 \pm 0,29$  мм в длину и  $6,25 \pm 0,16$  мм в ширину, у растений появлялся и разворачивался первый настоящий лист (рис. 2, г). Через 2-2,5 мес развивалось 2-3 небольших тройчатосложных листа  $14,65 \pm 0,74$  мм длиной и  $7,90 \pm 0,38$  мм шириной (рис. 2, г). Через 3-3,5 мес семядольные листья желтели и опали, проростки переходили к автотрофному питанию. Через 4 мес от начала выращивания в почве высота сеянцев достигала  $50,12 \pm 5,49$  мм, размеры листьев –  $18,98 \pm 0,64$  мм в длину,  $10,21 \pm 0,32$  мм в ширину. Постепенно ростовая активность снижалась, листья опали, ткани побега одревесневали на  $\frac{2}{3}$  его высоты, растения уходили на покой. Высота сеянцев 1-го года жизни достигала 50-55 мм, диаметр стволика – 3-4 мм. Стержневая корневая система состояла из главного корня длиной 50-60 мм и нескольких боковых корней длиной от 5 до 20 мм (рис. 2, д). Проростки выдерживали пересушивание субстрата до 4-5 сут, но даже однократное переувлажнение субстрата приводило к их гибели.

Таким образом, наиболее эффективным способом массового получения проростков *L. anagyroides* является культивирование высокотемпературно

предобработанных семян на питательной среде MS, дополненной 0,5 мг/л БАП. Культивирование семян на питательной среде позволяет получать стерильные проростки, которые в дальнейшем можно либо высаживать в почву для получения сеянцев, либо, в случае ограниченности семенного материала, клонировать в условиях *in vitro* для массового размножения.

### 3.3 Разработка технологии клонального микроразмножения *L. anagyroides*

Для микроразмножения *L. anagyroides* был выбран метод активации пазушных пресформированных меристем побегов при культивировании ювенильного (семена) и зрелого растительного материала (вегетативные почки и узловые сегменты побегов). В первом случае у стерильных проростков, развившихся из высокотемпературно предобработанных семян на среде MS с 0,5 мг/л БАП (рис. 3, а) отсекали корень, а оставшуюся часть переносили на среды для собственно размножения различного состава (табл. 2). Во всех вариантах экспланты дали 100%-ный морфогенный ответ, но максимальные показатели микроразмножения (4,1-4,7 микропобегов от одного экспланта) были получены на среде MS с добавлением БАП или ТДЗ в концентрации 0,5 мг/л и на WPM с 0,5 мг/л БАП. Однако в последнем случае развивались укороченные побеги (рис. 3, б), а при использовании ТДЗ наблюдались морфозы побегов и листьев (рис. 3, г). Наиболее оптимальной как для инициации стерильных культур, так и для собственно размножения микроклонов оказалась среда MS с 0,5 мг/л БАП. Развившиеся побеги переносили далее на среду для укоренения или вновь на среду для размножения. Стабильно пролиферирующие культуры, не теряющие потенциала размножения, удавалось поддерживать на протяжении 2-2,5 лет.

Таблица 2.

Регенерация микропобегов *L. anagyroides* на средах различного состава

минеральная основа	Состав питательной среды		Количество микропобегов, шт	Длина микропобегов, мм
	фитогормон, мг/л			
	БАП	ТДЗ		
MS	0,5	–	<b>4,7 d</b>	21,5 d
	2,0	–	3,1 ab	29,7 e
	4,0	–	3,4 ab	14,5 bc
	–	0,5	<b>4,4 cd</b>	16,7 c
	–	2,0	3,1 ab	15,8 bc
	–	4,0	3,2 ab	15,5 bc
	0,25	0,25	4,0 abc	13,3 a
	0,5	0,5	4,2 abc	13,3 a
½MS	0,5	–	3,5 abc	16,8 c
	2,0	–	3,2 ab	16,9 c
WPM	0,5	–	<b>4,1 bcd</b>	11,0 a
	2,0	–	3,0 a	13,0 ab
<i>F</i>			4,5*	28,1*

Примечание: В каждом варианте изучены две повторности по 10 эксплантов. Данные, обозначенные разными буквами в одном столбце, достоверно различаются по результатам однофакторного дисперсионного анализа, \*  $P \leq 0,05$ .



Рис. 3. Инициация и собственно размножение в культуре проростков:

*a* – проростки, развившиеся на среде MS с 0,5 мг/л БАП после высокотемпературной предобработки семян (слева) и контроль (справа) (3 нед); *б* – культура побегов, полученная на среде MS (слева),  $\frac{1}{2}$ MS (в центре), WPM (справа), каждая среда дополнена 0,5 мг/л БАП (6 нед); *в* – пучок микропобегов, развившийся на среде MS с 0,5 мг/л (слева) и 4,0 мг/л БАП (справа) (8 нед); *г* – пучок микропобегов, развившийся на среде MS с 0,5 мг/л БАП (слева) и 2,0 мг/л ТДЗ (справа) (8 нед). Масштаб: 10 мм

При разработке технологии клонирования растений с использованием зрелого материала в качестве первичных эксплантов использовали одиночные пазушные почки и узловыe сегменты (пазушная почка + часть побега длиной 5-7 мм). На питательной среде узловыe сегменты массово дегенерировали (рис. 4, *a*), тогда как изолированные почки зеленели и росли. Через 4 нед количество успешно инициированных почек (72,5%) было достоверно ( $P \leq 0,05$ ) выше количества инициированных узловых сегментов (9,1%). На этапе инициации изолированных почек было апробировано 8 вариантов питательных сред различного минерального и гормонального состава. Наилучший рост и развитие эксплантов наблюдали на среде MS с добавлением 0,5 мг/л БАП (рис. 4, *б*).

Установлена сезонная зависимость приживаемости изолированных почек *in vitro*. Среднее количество почек, инициированных весной и осенью (75,3 и 70,7%, соответственно), было достоверно выше, чем летом (14,3%,  $P \leq 0,01$ ). При последующем размножении различий между культурами, инициированными весной и осенью, не наблюдалось. Это позволяет равнозначно эффективно инициировать стерильные культуры от почек, как весной, так и осенью.



Рис. 4. Инициация и собственно размножение в культуре пазушных почек:

*а* – первичные экспланты через 2 нед культивирования на среде MS с 0,5 мг/л БАП (слева – почки, справа – узловые сегменты); *б* – прорастающие почки через 6 нед культивирования на среде MS с 0,5 мг/л БАП; *в* – пучок микропобегов через 3 мес культивирования на MS с 0,5 мг/л БАП; *г* – побеги, развившиеся через 8 нед культивирования на  $\frac{1}{2}$  MS (слева), MS (в центре) и WPM (справа), каждая среда дополнена 0,5 мг/л БАП; *д* – побеги, развившиеся через 6 нед культивирования на  $\frac{1}{2}$  MS с 0,5 мг/л (слева) и на  $\frac{1}{2}$  MS с 2,0 мг/л БАП (справа). Масштаб: 10 мм

При субкультивировании на среде MS с 0,5 мг/л БАП на главном побеге развивались пазушные побеги. Через 3-4 мес формировался пучок из микропобегов длиной от 3 до 10 мм (рис. 4, *в*). Пазушные побеги размером  $\geq 5$  мм отделяли и переносили на среды различного минерального состава (табл. 3). Максимальное количество вторичных эксплантов (85,9%) было иницировано на среде  $\frac{1}{2}$  MS. Каждый эксплант при этом продуцировал наибольшее количество пазушных побегов (3,0). Данную среду использовали далее для выявления эффективного индуктора пролиферации побегов.

Таблица 3.

Регенерация микропобегов *L. anagyroides* на средах различного минерального состава, дополненных 0,5 мг/л БАП (8 нед культивирования)

Питательная среда	Количество иницированных эксплантов, %	Количество развившихся побегов, шт.	Длина микропобегов, мм
MS	45,0 б	1,1 а	9,7 а
$\frac{1}{2}$ MS	85,9 с	3,0 б	9,5 а
WPM	26,9 а	1,1 а	8,3 а
<i>F</i>	93,54**	10,60*	1,95 <sup>ns</sup>

Примечание: В каждом варианте изучены две повторности по 10 эксплантов. Данные, обозначенные разными буквами, достоверно различаются по результатам однофакторного дисперсионного анализа; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,01$ ; *ns* – нет достоверной разницы.

Развитие максимального количества пазушных микропобегов стимулировал БАП в концентрации 0,5 и 2,0 мг/л (табл. 4). Однако длительное культивирование на среде с 2,0 мг/л БАП вызывало

витрификацию тканей и появление аномальных побегов и листьев, тогда как на среде с 0,5 мг/л БАП развивались стабильно пролиферирующие культуры, которые сохраняли способность к формированию нормальных жизнеспособных микропобегов на протяжении 3 лет.

Таблица 4.

Регенерация микропобегов *L. anagyroides* под влиянием различных фитогормонов (8 нед культивирования на ½ MS)

Фитогормоны, мг/л	Количество инициированных эксплантов, %	Количество развившихся микропобегов, шт.	Длина микропобегов, мм
БАП, 0,5	85,9 b	3,0 d	9,5 d
БАП, 1,0	81,8 b	1,7 abc	9,1 cd
БАП, 2,0	85,8 b	3,0 d	9,2 cd
БАП, 4,0	80,3 b	2,0 bc	11,5 a
БАП, 0,5 + Кин, 0,5	54,4 ab	2,5 cd	7,8 bc
Кин, 0,5 + НУК, 0,5	65,9 ab	1,2 ab	6,0 a
ТДЗ, 0,5	62,0 ab	2,1 bcd	8,5 cd
ТДЗ, 2,0	65,3 ab	2,3 abc	10,7 a
Зеатин, 0,5	34,8 a	1,0 a	6,9 ab
<i>F</i>	3,4*	5,8**	6,9**

Примечание: В каждом варианте изучены три повторности по 10 эксплантов. Данные, обозначенные разными буквами, достоверно различаются по результатам однофакторного дисперсионного анализа; \*P < 0,05; \*\*P ≤ 0,01.

При культивировании зрелого и ювенильного материала коэффициент размножения не превышал 4-5 побегов на эксплант. В тоже время наряду с развитием пазушных побегов у эксплантов в области каллуса развивались многочисленные адвентивные побеги. Как правило, их не используют для клонального мироразмножения, поскольку они могут возникать в результате непрямого органогенеза, что увеличивает вероятность соматоклональной изменчивости. Для выявления путей морфогенеза было проведено гистологическое исследование эксплантов, культивируемых на безгормональной среде (контроль) и на среде MS, дополненной 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 и 4,0 мг/л БАП.

На среде без гормонов каллус не формировался. На средах с добавлением БАП у первичного побега под каллусной тканью разрасталась базальная часть (рис. 5). В ней формировались проводящие пучки и зоны повышенной пролиферативной активности, которые давали начало апикальным меристемам новых побегов. Развитие адвентивных побегов посредством прямого органогенеза из меристем первичного побега обеспечивает их генетическое соответствие и позволяет использовать все вновь развившиеся побеги для увеличения коэффициента размножения и массового получения посадочного материала. С увеличением концентрации БАП в среде интенсивность пролиферации тканей увеличивалась, но при этом многочисленные адвентивные побеги были сильно укороченными, что затрудняло их использование для микроразмножения. Таким образом, среда MS, содержащая 0,5 мг/л БАП, является оптимальной не только для инициации стерильной культуры с использованием ювенильного и зрелого

растительного материала *L. anagyroides*, но и обеспечивает образование хорошо развитых адвентивных побегов, которые можно использовать для увеличения коэффициента размножения.

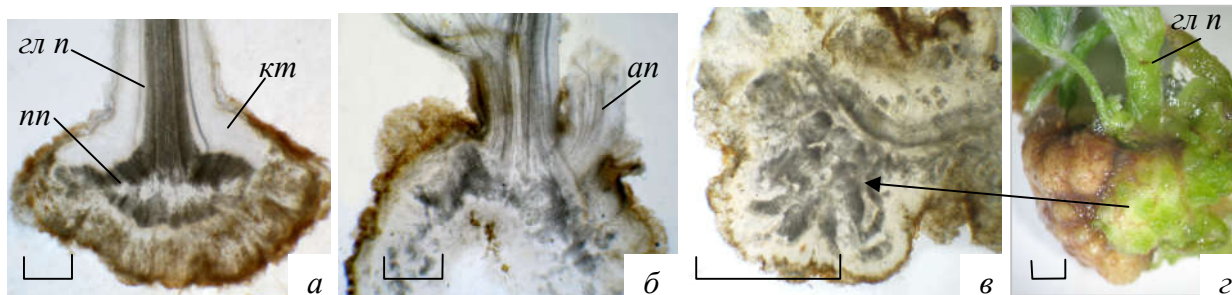


Рис. 5. Продольные срезы эксплантов, развившихся на среде MS с 0,5 мг/л БАП: а – через 3 нед культивирования (гл п – главный побег; кт – каллусная ткань; пп – проводящие пучки); б – развитие адвентивного побега (ап) через 8 нед культивирования; в – «почка» адвентивного побега (12 нед); г – прорастание адвентивных побегов через каллусную ткань (12 нед культивирования). Масштаб: 1 мм

Для индукции корнеобразования микропобеги длиной  $\geq 10$  мм отделяли и пассировали на питательные среды различного состава (всего 11 вариантов). Нормальные корни развивались только на  $\frac{1}{4}$  MS, дополненной ауксинами (ИУК, ИМК и НУК) в концентрации 0,5 мг/л. НУК стимулировал образование корней у наибольшего количества регенерантов (61,3%) (табл.5).

Таблица 5.

Ризогенез побегов *L. anagyroides* на среде  $\frac{1}{4}$  MS, дополненной ауксинами (4 нед культивирования)

Ауксин, мг/л	Количество укоренившихся побегов, %	Среднее количество корней на регенеранте, шт.	Длина корней, мм
0,0	0,0	0,0	0,0
ИУК, 0,5	24,7 а	1,5 а	8,0 а
ИМК, 0,5	29,7 а	5,8 б	21,6 б
НУК, 0,5	61,3 б	5,4 б	21,3 б
<i>F</i>	11,2*	7,0*	19,8**

Примечание: В каждом варианте изучены три повторности по 10 эксплантов. Данные, обозначенные разными буквами в одном столбце, достоверно различаются между собой по результатам дисперсионного анализа; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ .

Ризогенез начинался через 10-14 сут после переноса побегов на среду с ауксинами. Развитие корней способствовало росту побегов и новых листьев (рис. 6). Спустя 30-45 сут регенеранты помещали в пробирки с нестерильной водой на 10-14 сут и затем пересаживали в почву. Положительные результаты были получены при использовании рыхлого водопроницаемого субстрата (рН 6,0-7,0) и хорошего дренажа посадочных емкостей (до  $\frac{1}{2}$  объема). Регенеранты не переносили переувлажнение субстрата. Выживаемость растений составила 70-75%.



Рис. 6. Укорененные *in vitro* регенеранты *L. anagyroides*:

*a* – через 4 нед культивирования на  $\frac{1}{4}$  MS с 0,5 мг/л ИУК; *б* – через 4 нед культивирования на  $\frac{1}{4}$  MS с 0,5 мг/л НУК (слева) и ИМК (справа); *в* – через 6 нед выращивания в теплице. Масштаб: 10 мм

На основе проведенных исследований разработаны протоколы клонального микроразмножения *L. anagyroides* с использованием ювенильного и зрелого материала (табл.6).

Таблица 6.

Протоколы клонального микроразмножения *L. anagyroides*

Тип экспланта	Этапы микроразмножения	Описание	Продолжительность
<b>Ювенильный материал</b>			
Семена	Стерилизация	1) 1 % р-р СМС; 2) 70 % р-р спирта 3) 0,1 % р-р сулемы	15 мин 1 мин 15 мин
	1. Получение проростков	Проращивание асептических семян на среде MS + 0,5 мг/л БАП	3-4 нед
	2. Собственно размножение	Культивирование верхушек проростков на среде MS + 0,5 мг/л БАП	6-8 нед
	3. Укоренение	Культивирование микропобегов длиной $\geq 10$ мм на среде $\frac{1}{4}$ MS + 0,5 мг/л НУК	4-6 нед
	4. Адаптация к нестерильным условиям	Высадка регенерантов в смесь листовой земли и кокосового волокна (1:1)	4-8 нед
<b>Зрелый материал</b>			
Вегетативные почки	Стерилизация	1) 1 % р-р СМС; 2) 70 % р-р спирта 3) 0,1 % р-р сулемы	15 мин 1 мин 10 мин
	1. Инициация стерильных культур	Культивирование почек на среде MS + 0,5 мг/л БАП	2 нед
	2. Собственно размножение	Культивирование верхушек микропобегов на $\frac{1}{2}$ MS + 0,5 мг/л БАП	6-8 нед
	3. Укоренение	Культивирование микропобегов длиной $\geq 10$ мм на среде $\frac{1}{4}$ MS + 0,5 мг/л НУК	3-4 нед
	4. Адаптация к нестерильным условиям	Высадка регенерантов в смесь листовой земли и кокосового волокна (1:1)	4-8 нед

#### ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование показало, что растения *L. anagyroides* полностью адаптировались к условиям Нижнего Поволжья. Однако их семена характеризуются низкой полевой и лабораторной всхожестью (8-12%), тогда как у семян, полученных от растений, произрастающих в естественных местообитаниях, лабораторная всхожесть составляет около 70% (Poşta, Florin, 2017). Формирование твердосемянности, характерное для бобовых, связано с функционированием хилума, который, открываясь при низкой влажности воздуха, способствует обезвоживанию семян, и, закрываясь при высокой влажности, препятствует потере воды (Терехин, 1996). В Нижнем Поволжье период созревания семян обычно жаркий и засушливый. Высокие температуры и низкая влажность обуславливают обезвоживание семян и стимулируют быстрое формирование твердосемянности, а отрицательные температуры и низкая влажность в зимние месяцы увеличивают глубину покоя, вследствие чего способность семян к самостоятельному прорастанию значительно снижается.

Развитие гидратированных нежизнеспособных проростков при проращивании на фильтровальной бумаге, а также гибель проростков при переувлажнении кокосового субстрата выявили еще одну возможную причину отсутствия массового самосева при интродукции *L. anagyroides* в Нижнем Поволжье. Быстрое таяние снега и обильные весенние осадки, а также особенности почвы в пункте интродукции (суглинок, отсутствие дренажа) приводят к избыточному увлажнению и застою влаги в почве вследствие чего единичные проростки, развившиеся от самосева, погибают.

Результаты исследования позволяют констатировать, что лимитирующими факторами для реализации семенного размножения у *L. anagyroides* в условиях Нижнего Поволжья являются: 1) высокая температура и низкая влажность воздуха в период созревания семян, способствующие быстрому формированию твердосемянности; 2) низкая температура и влажность зимнего периода, усиливающие глубину покоя; 3) высокая влажность почвы весной, приводящая к гибели единичных проростков, развившихся от самосева.

Получить посадочный материал *L. anagyroides* можно только в лабораторных и тепличных условиях, соблюдая следующую последовательность технологических процессов: 1) обработка интактных семян 15-25 мин горячей водой ( $\approx 90^{\circ}\text{C}$ ); 2) проращивание предобработанных семян в течение 3-4 нед в условиях *in vitro* на питательной среде MS, дополненной 0,5 мг/л БАП; 3) выращивание полученных сеянцев не менее 1 года в условиях теплицы в рыхлой почвенной смеси (рН 6,0-7,0), исключая переувлажнение субстрата.

Для размножения элитных, адаптированных к новым условиям, генотипов и получения исходного материала для селекции могут быть использованы протоколы микроразмножения. При их разработке были установлены следующие специфические особенности размножения *L. anagyroides* в культуре *in vitro*. Так, в отличие от большинства древесных



растений, в том числе и бобовых (Ahuja, 1993; Vengadesan et al., 2002), использование в качестве первичных эксплантов узловых сегментов оказалось значительно менее эффективным по сравнению с одиночными почками. Причем, вегетативные почки равнозначно успешно были инициированы не только весной, но и осенью. При микроразмножении как ювенильного, так и зрелого материала БАП в концентрации 0,5 мг/л не эффективно стимулировал регенерацию побегов и обеспечивал стабильную пролиферацию культур на протяжении 2-3 лет. Лучшим индуктором ризогенеза оказался НУК в концентрации 0,5 мг/л. Коэффициент размножения при культивировании и ювенильного, и зрелого материала составил в среднем 4-5 микропобегов.

Результаты проведенного исследования могут быть использованы для массового размножения *L. anagyroides* в регионах, где его естественное семенное размножение затруднено, что позволит более интенсивно применять его как высоко декоративное растение и источник ценного фармацевтического сырья.

### ВЫВОДЫ

1. В условиях умеренно-континентального климата Нижнего Поволжья *L. anagyroides* регулярно проходит полный цикл сезонного развития, который совпадает с таковым в естественных местообитаниях. Общее акклиматизационное число составляет 84 балла, что свидетельствует о полной акклиматизации и успешной интродукции растений в условиях Нижнего Поволжья.
2. Цитоэмбриологический анализ показал, что изученные растения характеризуются половым способом репродукции и факультативной аллогамией ( $P/O \text{ ratio} = 1440 \pm 84$ ). Зародышевые мешки развиваются в соответствии с *Polygonum*-типом. Средняя степень дефектности пыльцы 15,4%. Эмбрио- и эндоспермогенез осуществляются без нарушений, растения формируют полноценные семена.
3. Отсутствие у *L. anagyroides* массового самосева при интродукции в Нижнем Поволжье обусловлено глубоким физическим покоем семян, вследствие чего более 90% из них не способны к естественному прорастанию, а также гибелью проростков из-за несоответствия эдатофических и гидротермических условий пункта интродукции естественным местообитаниям.
4. Из апробированных вариантов искусственного выведения семян *L. anagyroides* из состояния покоя и получения жизнеспособных проростков наиболее эффективным оказалось проращивание высокотемпературно предобработанных (+90°C, 15-25 мин) семян на среде MS с добавлением 0,5 мг/л БАП. Высокотемпературная предобработка не оказывала негативного влияния на зародыш и стимулировала прорастание 82,3% семян. Проращивание в условиях *in vitro* обеспечило получение проростков, которые после высадки в почву приживались с высокой частотой (95-98%).

5. Для массового размножения и отбора растений, адаптированных к новым эколого-климатическим условиям, были разработаны протоколы клонального микроразмножения *L. anagyroides* с использованием зрелого и ювенильного растительного материала. Вне зависимости от типа первичного экспланта питательная среда MS эффективнее среды WPM. Лучший индуктор морфогенеза среди протестированных цитокининов – БАП, среди ауксинов – НУК. Оптимальная концентрация фитогормонов составила 0,5 мг/л, более высокие концентрации стимулировали развитие аномальных побегов и корней. Коэффициент размножения при культивировании как ювенильного, так и зрелого материала составил в среднем 3-5 микропобегов.
6. Одновременно с пазушными побегами, развившимися путем прямого органогенеза, развивались многочисленные адвентивные побеги из каллуса, сформировавшегося в базальной части эксплантов. Гистологическое исследование показало, что не зависимо от используемых концентраций БАП все вновь развившиеся адвентивные побеги являются результатом пролиферативной активности меристем базальной части главного побега и связаны с ним общей проводящей системой. Это допускает использование адвентивных побегов для увеличения коэффициента размножения и массового получения посадочного материала.

#### **Список опубликованных работ по теме диссертации**

##### **В журналах перечня ВАК**

1. Тимофеева, С.Н. Преодоление физического покоя семян бобовника анагировидного *in vivo* и в культуре *in vitro* / С.Н. Тимофеева, О.И. Юдакова, Л.А. Эльконин // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2017. – Т. 17, Вып. 1. – С. 30-35.
2. Тимофеева, С.Н. Эмбриологические особенности бобовника анагировидного (*Laburnum anagyroides* Medik.) / С.Н. Тимофеева, О.И. Юдакова // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2020. – Т. 20. – Вып. 1. – С. 81-84.

##### **В изданиях, входящих в базу SCOPUS:**

3. Timofeeva, S.N. Micropropagation of *Laburnum anagyroides* Medik. through axillary shoot regeneration / S.N. Timofeeva, L.A. Elkonin, V.S. Tyrnov // *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. – 2014. – V. 50. – P. 561-567.

##### **Патент:**

4. Тимофеева, С.Н. Способ получения посадочного материала бобовника анагировидного / С.Н. Тимофеева, Л.А. Эльконин, В.С. Тырнов // Патент на изобретение. Заявка №2014149849 от 10.12.2014. Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений 23.01.2017РФ №2608638.

##### **Монография:**

5. Timofeeva, S.N. Application of tissue culture for *Laburnum anagyroides* Medik. propagation / S.N. Timofeeva, L.A. Elkonin, O.I. Yudakova, V.S.

Tyrnov // Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement / eds. M. Anis, N. Ahmad. – Springer Science+Business Media Singapore, 2016. – P. 135-159.

**В журналах и сборниках:**

6. Тимофеева, С.Н. Изучение возможности размножения древесных растений методами клеточных культур / С.Н. Тимофеева // Бюл. Бот. сада Саратов. гос. ун-та. – 2007. – Вып. 6. – С. 109-114.
7. Тимофеева, С.Н. Опыт клонального микроразмножения бобовника анагировидного / С.Н. Тимофеева, Л.А. Эльконин // Бюл. Бот. сада Саратов. гос. ун-та. – 2008. – Вып. 7. – С. 230-232.
8. Тимофеева, С.Н. Гистологические аспекты клонального микроразмножения *Laburnum anagyroides* Medik. / С.Н. Тимофеева, О.И. Юдакова, А.И. Степанова // Бюлл. Никит. ботан. сада. – 2016. – Вып. 120. – С. 30-35.
9. Тимофеева, С.Н. Семенное размножение *Laburnum anagyroides* (Leguminosae) при интродукции в Нижнем Поволжье / С.Н. Тимофеева, О.И. Юдакова, А.И. Харитонов, Л.А. Эльконин // Растительные ресурсы. – 2020. – Т. 56. – № 1. – С. 42-52.
10. Тимофеева, С.Н. Особенности инициации клеточных культур древесных растений / С.Н. Тимофеева // Труды Всерос. конф., посв. 10-летию кафедры генетики БГПУ им. М. Акмуллы «Инновационные и молекулярно-генетические исследования живых систем». – Уфа: Изд-во БГПУ, 2009. – С.151-158.
11. Тимофеева, С.Н. Морфогенетический потенциал в культуре тканей трудноразмножаемых древесных растений / С.Н. Тимофеева, С.В. Барышникова // Сб. статей III науч.-практ. конф. «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира». – Волгоград: AVATARS, 2010. – С. 270-276.
12. Тимофеева, С.Н. Гистологические аспекты клонального микроразмножения / С.Н. Тимофеева, О.И. Юдакова, А.И. Степанова // Сб. статей VII Междунар. научно-практ. конф. «Биотехнология как инструмент сохранения биологического разнообразия растительного мира». – Ялта, 2016. – С. 130-131.
13. Тимофеева, С.Н. Морфогенез в культуре побегов *Laburnum anagyroides* Medic. / С.Н. Тимофеева, О.И. Юдакова // Биологическое разнообразие. Интродукция растений: Матер. VI Междунар. науч. конф. – СПб, 2016. – С. 375-377.
14. Тимофеева, С.Н. Преодоление физического покоя семян бобовника анагировидного в культуре *in vitro* / С.Н. Тимофеева, О.И. Юдакова, Л.А. Эльконин // Світові рослинні ресурси: стан та перспективи розвитку : Матер. II Міжнар. науково-практ. конф. – Вінниця: Нілан-ЛТД, 2016. – С. 251-253.
15. Тимофеева, С.Н. Бобовник анагировидный при интродукции в условиях Нижнего Поволжья / Тимофеева С.Н., Юдакова О.И., Харитонов А.В. // Вавиловские чтения – 2017: Сб. статей межд. науч.-практ. конф.,

- посвященной 130-й годовщине со дня рождения акад. Н.И. Вавилова. – Саратов: ООО «Амирит», 2017. – С. 267-269.
16. Юдакова, О.И. Бобовник анагировидный при интродукции в условиях Нижнего Поволжья / О.И. Юдакова, С.Н. Тимофеева, А.И. Степанова, А.В. Харитонов // Плодоводство, семеноводство, интродукция древесных растений: Сб. матер. XX Междунар. науч. конф. – Красноярск, 2017. – С.251-253.
  17. Тимофеева, С.Н. Семенное размножение бобовника анагировидного в условиях Нижнего Поволжья / С.Н. Тимофеева, О.И. Юдакова // Матер. IV (XII) Междунар. ботан. конф. молодых учёных в СПб. – СПб: БИН РАН, 2018. – С.150-151.
  18. Тимофеева, С.Н. Создание исходного материала для селекции *Laburnum anagyroides* (Leguminosae) с использованием культуры *in vitro* / С.Н. Тимофеева, О.И. Юдакова // Научный и инновационный потенциал развития производства, переработки и применения эфиромасличных и лекарственных растений: Матер. междунар. науч.-практ. конф. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2019. – С. 191-195.
  19. Тимофеева, С.Н. Размножение *Laburnum anagyroides* в условиях *in vivo* и *in vitro* при интродукции в Нижнем Поволжье / С.Н. Тимофеева, О.И. Юдакова // Живые системы – 2019: Сб. науч. статей. – Саратов: Амирит, 2019. – С. 46-48.
  20. Тимофеева, С.Н. Размножение *Laburnum anagyroides in vivo* и *in vitro* при интродукции в Нижнем Поволжье / С.Н. Тимофеева, О.И. Юдакова // Сб. статей междунар. науч.-практ. конф., посв. 132-ой годовщине со дня рождения акад. Н.И. Вавилова. – Саратов: Амирит, 2019. – С. 36-38.
- Учебно-методические пособия:**
21. Тимофеева, С.Н. Принципы клонального микроразмножения древесных растений: учебн.-метод. пособие для студентов биол. фак. / С.Н. Тимофеева, Л.А. Эльконин, В.С. Тырнов. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2011. – 32 с.
  22. Тимофеева, С.Н. Технологии микроразмножения *in vitro* [Электронный ресурс]: учебн.-метод. пособие / С.Н. Тимофеева, Ю.В. Смолькина, Н.В. Апанасова, О.И. Юдакова; Саратов. гос. ун-т им. Н.Г. Чернышевского. – Саратов: [б. и.], 2016. – 38 с.
  23. Тимофеева, С.Н. Культура изолированных клеток, тканей и органов растений: теоретические и прикладные аспекты: учебн.-метод. пособие для студентов биол. профиля / С.Н. Тимофеева, О.И. Юдакова, Л.П. Лобанова, Т.А. Алаторцева, Ю.В. Смолькина, Н.В. Апанасова. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2018. – 68 с.