

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет

имени К. И. Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела им. К. Турысова

Кафедра «Химической и биохимической инженерии»

Балабаева Айдана Максатовна

Культивирование малины *in vitro* для получения посадочного материала

**ДИПЛОМНАЯ РАБОТА**

Специальность 5В070100 – «Биотехнология»

Алматы 2022

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет

имени К.И.Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела им. К. Турысова

Кафедра «Химической и биохимической инженерии»

**ДОПУЩЕН К ЗАЩИТЕ**

Заведующий кафедрой «Химическая и биохимическая инженерия», Доктор Ph.D.

 А. А. Амирова

" 06 " 06 2022 г.

**ДИПЛОМНАЯ РАБОТА**

На тему: " Культивирование малины *in vitro* для получения посадочного материала"

по специальности 5B070100 – «Биотехнология»

Выполнила

Балабаева А. М.

Рецензент

доктор PhD, старший научный  
сотрудник ИМББ им. М. А. Айтхожина  
КН МОН РК

 Абдолла Нуршат

" 03 " 06 2022 г.

Научный руководитель

доктор биологических наук,  
ассоциированный профессор

 Анапияев Б. Б.

" 26 " 05 2022 г.

Алматы 2022

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет

имени К.И.Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела им. К. Турысова

Кафедра «Химической и биохимической инженерии»

5B070100 – «Биотехнология»

**УТВЕРЖДАЮ**

Заведующий кафедрой «Химическая и биохимическая инженерия», Доктор Ph.D.

А. А. Амитова

“ 06 ” 2022 г.

**ЗАДАНИЕ**

**на выполнение дипломной работы**

Обучающемуся Балабаевой Айдане Максатовне.

Тема: «Культивирование малины in vitro для получения посадочного материала».

Утверждена приказом Директора Института № 489 –п от "24" декабря 2021 г.

Срок сдачи законченной работы "26" мая 2022 г.

Исходные данные к дипломной работе: Исследования проведены на базе РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина» КН МОН РК.

Краткое содержание дипломной работы:

- а) Подбор растительных эксплантов малины и выбор оптимальных условий для проведения их стерилизации;
- б) Подобрать оптимальный состав питательной среды для введения в культуру и микроклонального размножение малины;
- в) Введение в культуру и размножение двух сортов малины;
- г) Укоренение малины для получения посадочного материала.

Перечень графического материала: представлены 16 слайдов презентации работы. Рекомендуемая основная литература состоит из 24 наименований.


## ГРАФИК

подготовки дипломной работы

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю	Примечание
1. Методика микрклонального размножения	01.02.22	
2. Ботаническая характеристика малины	08.02.22	
3. Подбор оптимальных условий стерилизации эксплантов	10.02.22	
4. Выбор оптимальных питательных сред	20.02.22	
5. Особенности культивирования в условиях in vitro	05.05.22	

## Подписи

консультантов и нормоконтролера на законченную дипломную работу (проект) с указанием относящихся к ним разделов работы (проекта)

Наименования разделов	Консультанты, И.О.Ф. (уч. степень, звание)	Дата подписания	Подпись
Разделы 1-5 дипломной работы Нормоконтроллер	Б. Б. Анапияев, д.б.н., ассоц. профессор	26. 05.	

Научный руководитель



Б. Б. Анапияев

Задание принял к исполнению обучающийся



А. М. Балабаева

Дата

" 26 " 05 2022 г

## АННОТАЦИЯ

В данной работе описывается ход исследований по введению в культуру *in vitro* малины (*Rubus L.*) двух ремонтантных сортов Брянское Диво и Амира. В результате исследования были оптимизированы условия для введения в культуру *in vitro* пазушных почек, применяемые в качестве эксплантов. Проведена стерилизация растительного материала химическими агентами, что включало обработку эксплантов мыльным раствором, использование раствора 70% спирта и раствора «Белизна» в различных композициях. В качестве питательной среды применялась среда Мурасиге-Скуга с различными комбинациями фитогормонов. В ходе микроклонального размножения были подобраны оптимальные питательные среды для побегообразования растений. После пересадки растений на питательную среду для укоренения, в которой концентрация питательной основы снижалась вдвое, и спустя некоторого времени наблюдений были приведены результаты в виде фотоотчетов.

## АНДАТПА

Бұл жұмыста таңқурайдың *in vitro* мәдениетіне (*Rubus L.*) Брянское Диво мен Амира деген екі ремонтантты сорттарын енгізу бойынша жұмыс барысы сипатталған. Зерттеу нәтижесінде эксплант ретінде қолданылатын аксиларлы бүйректерді *in vitro* мәдениетіне енгізу үшін жағдайлар оңтайландырылды. Өсімдік материалын химиялық агенттермен зарарсыздандыру жүргізілді, оған экспланттарды сабын ерітіндісімен емдеу, 70% спирт ерітіндісі және түрлі композициялардағы "Белизна" ерітіндісі кірді. Қоректік орта ретінде фитохормондардың әртүрлі комбинациясы бар Мурасиге-Скуга ортасы қолданылды. Микроклоналды көбею кезінде өсімдіктердің өсуі үшін оңтайлы қоректік орта таңдалды. Өсімдіктерді тамырлау үшін қоректік ортаға трансплантациялағаннан кейін, онда қоректік негіз концентрациясы екі есе азайды және біраз уақыттан кейін бақылаулар фотоесептер түрінде нәтижелер берілді.

## **ABSTRACT**

This work describes the course of research on the introduction of raspberry (*Rubus L.*) into the culture in vitro of two remontant varieties Bryansk Divo and Amira. As a result of the study, the conditions for the introduction of axillary kidneys into culture in vitro, used as explants, were optimized. The plant material was sterilized with chemical agents, which included the treatment of explants with a soap solution, the use of a solution of 70% ethanol and a solution of "Belizna" in various compositions. Murashige and Skoog medium with various combinations of phytohormones was used as a nutrient medium. In the course of micropropagation, optimal nutrient media for the shoot formation of plants were selected. After transplanting plants to a nutrient medium for rooting, in which the concentration of the nutrient base was halved, and after some time of observations the results were presented in the form of photo reports.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение	9
1 Культура клеток, тканей и органов	10
1.1 История развития метода культивирования	10
1.2 Процессы морфогенеза	11
1.3 Факторы, определяющие ход культивирования	11
1.3.1 Асептические условия	12
1.3.2 Состав питательных сред	12
1.3.3 Влияние физических факторов	13
1.4 Микрклональное размножение	13
1.4.1 Преимущества микрклонального размножения	14
1.4.2 Этапы проведения культивирования <i>in vitro</i>	14
2 Биология и морфология растений малины	16
2.1 Особенности выращивания малины	16
2.2 Химический состав и биологическая активность побегов	18
3 Результаты исследований и их обсуждение	20
3.1 Подбор метода стерилизации	20
3.2 Подбор состава питательных сред для введения в культуру	22
3.3 Получение растений - регенерантов	23
Заключение	27
Перечень принятых сокращений	28
Список использованной литературы	29



## ВВЕДЕНИЕ

Красная малина — *Rubus idaeus* L. (Rosaceae) — вид, широко известный своими съедобными плодами. Они широко известны как пищевые продукты, так и в качестве популярного противовоспалительного и противомикробного средства, используемого в традиционной медицине в восточной части Европы. Хотя наиболее распространенным травяным лекарством в народной медицине являются плоды, побеги *R. idaeus* также использовались для лечения простуды, лихорадки и гриппоподобных инфекций [1].

Малину возделывают в северных областях Казахстана. На юге малину выращивают в предгорных и горных зонах. В Казахстане количественное значение ежегодных сборов ягодных культур далеки от потребности [2].

Создание коллекции *in vitro* обеспечивает доступ к большому количеству растительного материала в любое время года, тогда как клональное микроразмножение полностью реализует морфогенетический потенциал растения. Последний способ способствует максимальной скорости размножения культуры и, как следствие, большему количеству посадочного материала [3].

Цель данной работы заключалась в подборе оптимальных условий для введения в культуру *in vitro*, микроклонального размножения и укоренения двух сортов малины.

Задачами работы являются:

- Подбор растительных эксплантов малины и выбор оптимальных условий для проведения их стерилизации;
- Подобрать оптимальный состав питательной среды для введения в культуру и микроклонального размножения малины;
- Введение в культуру и размножение двух сортов малины;
- Укоренение малины для получения посадочного материала.

## **1 Культура клеток, тканей и органов**

Рост спроса на продовольствие во всем мире, связанный с неравномерным распределением богатств, вызывает необходимость в увеличении требований к новым технологиям, которые обеспечивают более высокие урожаи и лучшее качество продуктов [4].

Идея о том, что растения можно регенерировать или размножить либо из каллуса (ткань, представляющая собой скопление недифференцированных клеток), либо из культуры органов, получила широкое признание и последовало практическое применение в индустрии биотехнологии растений [5].

Понятие «культура клеток растений» подразумевает все работы, проводимые с культурой изолированных клеток (их частей), органов и целых растений-регенерантов (асептически полученные растения с корнями и побегами) в стерильных условиях на искусственной питательной среде *in vitro* (лат. — «в стекле», «в склянке») [4]. В этих процессах ткани или клетки либо в виде суспензий, либо в виде твердых веществ поддерживаются в условиях, благоприятных для их роста и размножения [5].

Выбор оптимальной модели культивирования тесно связан с биологическими особенностями растения и требует индивидуального подхода к каждому таксону [3].

### **1.1 История развития метода культивирования**

Первые попытки культивирования изолированных клеток, тканей растений начались в промежутке 1883-1902 г. г., когда ученые Г. Габерландт, Х. Фехтинг, К. Рехингер проводили опыты по культивированию растительных тканей на влажном песке, а после в растворе Кнопа с добавлением сахарозы, аспарагина и пептона. В процессе ученые наблюдали получение каллуса. Габерландт первым выдвинул гипотезу о тотипотентности любой живой клетки растения, однако ему не удалось экспериментально доказать гипотезу [6].

Следующий этап охватывает 1902-1922 г. г. В это время были созданы первые питательные среды для культивирования тканей животных. А также проводились попытки вырастить растительные ткани на питательных средах, содержащих растительные экстракты. Результаты оказались неудачными [7].

В 1922 г. В. Котте в Германии и В. Роббинс в США успешно культивировали кончики корней гороха и кукурузы. К сожалению, корни на средах выживали недолго [7].

1932-1940 г.г. ознаменовались работами американского ученого Ф. Уайта и французского ученого Р. Готре, которые добились продолжительного культивирования кончиков корней томата и моркови. Их работы легли в основу современных методов культуры тканей [6].

После открытия в 1955 г. нового класса фитогормонов – цитокининов, ученые смогли стимулировать деление клеток ткани паренхимы табака. Было выявлено положительное влияние натуральных экстрактов (эндосперма кокосового ореха, каштана, кукурузы) на поддержание клеточного роста и стимуляции процессов морфогенеза в культуре каллусных тканей [7].

В Казахстане исследования в области культуры тканей были начаты в 1944 г [6].

За последние десятилетия развитие методов культивирования клеток, тканей, органов растений сильно продвинулось. Метод культуры клеток широко применяется для решения вопросов биотехнологии растений [6].

## **1.2 Процессы морфогенеза**

Методы культивирования тканей и органов растений основаны на двух процессах морфогенеза: органогенез и соматический эмбриогенез. Органогенез - это формирование органов растения из определенной ткани с целью формирования полных растений, характеризующихся полярностью, что означает, что только один надземный орган или корень выбрасывается, и из этого регенерируется новая полная установка. В то же время органогенез может быть прямым, если органогенный побег непосредственно получен из эксплантов, или косвенным, если органогенный процесс происходит из ранее сформированного каллуса в исходных эксплантах [4]. Соматический эмбриогенез приводит к образованию биполярной структуры, напоминающей эмбрион, способный образовать целое растение [8].

Разработка методов культивирования тканей основана на свойстве тотипотентности растительных клеток. Тотипотентность – это генетически сохраняемая способность, которой обладают все живые клетки, создавать новую генетически идентичную клетку и, после процессов клеточного деления и дифференцировки, иметь возможность формировать ткани, органы, системы и целостные растения [4]. Лишь соматические клетки растений в условиях *in vitro* обладают свойством тотипотентности, соматические клетки животных чаще всего лишены тотипотентности [6].

## **1.3 Факторы, определяющие ход культивирования**

С практической точки зрения механизмы, которые запускают развитие растения из клетки или среза ткани, зависят от факторов, которые варьируются в зависимости от вида, типа и возраста ткани, условий окружающей среды и состава питательной среды, которые обычно управляются эмпирически на основе конкретного случая [4].

### 1.3.1 Асептические условия

Поддержание асептики при культивировании растений *in vitro* включает стерилизацию питательной среды, растительных эксплантов и проведение работ в ламинар – боксе. В ламинар – боксе асептика достигается благодаря подачи стерильного профильтрованного воздуха наружу. Также его предварительно, до начала работ, стерилизуют ультрафиолетовыми лампами и протирают этиловым спиртом [9].

Чистую посуду и инструменты, завернутые в фольгу, стерилизуют в автоклаве при повышенной температуре и давлении. Необходимо также провести поверхностную стерилизацию растительных эксплантов в растворах дезинфицирующих средств. Затем их промывают в дистиллированной воде и скальпелем удаляют наружный слой клеток, который мог быть поврежден при стерилизации. Кроме поверхностной стерилизации иногда применяют антибиотики для удаления возможного внутреннего инфицирования, встречающегося у тропических растений [9].

### 1.3.2 Состав питательных сред

Культивирование *in vitro* происходит на многокомпонентных питательных средах, которые в обязательном порядке содержат в своем составе макро- и микроэлементы, углеводы и витамины необходимые для растений. В качестве углеводов используют сахарозу и глюкозу [7]. Среди витаминов особенно важными для растений считаются витамины группы В: В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>. Некоторым растениям для роста необходимы также мезоинозит, никотиновая, фолиевая и пантотеновая кислоты [6].

Одним из важных компонентов питательной среды являются фитогормоны. При изменении комбинаций содержания фитогормонов, определяется тип морфогенеза [9].

Различают следующие группы фитогормонов: цитокинины - 6-БАП, ауксины (ИУК, НУК, 2,4-Д) и гиббереллины. Избыток ауксина часто приводит к разрастанию корней, в то время как избыток цитокинина - к появлению побегов. Баланс как ауксина, так и цитокинина часто приводит к неорганизованному росту клеток или каллуса, но морфология выростов будет зависеть от вида растения, а также от состава среды [5]. Важное свойство гиббереллинов (гибберелловой кислоты) – способствовать росту стебля в длину у растений с укороченным стеблем, т.е. устранять физиологическую и генетическую карликовость [7].

При приготовлении питательной среды важным фактором, который необходимо контролировать как для жидкой так для и агаризованной среды, является рН. Величины рН влияет на активность белков-ферментов в самой ткани и на усвояемость компонентов питательной среды растений. Оптимальный рН для роста культуры клеток растений составляет в промежутке от 5 до 6. Для того чтобы довести рН питательных сред до требуемого значения

добавляют щелочи (для повышения показателя) и кислоты (для понижения показателя) [6].

В приготовлении твердой питательной среды в качестве загустителя используют агар – агар [6].

По мере роста культур кусочки обычно отрезаются и переносятся в новые среды (субкультуры), чтобы обеспечить рост или изменить морфологию культуры [5].

Экспланты различных органов различаются по скорости роста и регенерации, в то время как некоторые вообще не растут. Значимые факторы, которые служат причиной различного регенерационного потенциала эксплантов, включают различия в стадии клеток в клеточном цикле, доступность или способность транспортировать эндогенные регуляторы роста и метаболические возможности клеток [5].

### 1.3.3 Влияние физических факторов

Физические факторы, такие как свет, температура, аэрация, влажность, оказывают значительное влияние на рост и развитие тканей *in vitro*. В качестве источника света применяют люминесцентные лампы. Принято считать, что для большинства растений оптимальное значение интенсивности света равно 1000 люкс [6] и продолжительности фотопериода - 16 часов [6].

Качество света часто упускается из виду как потенциально важный фактор окружающей среды, поскольку было показано, что оно влияет на направление морфогенеза растений *in vitro* [5].

Стандартная температура культивирования растений *in vitro* составляет  $25 \pm 2$  °C [6].

Для выращивания суспензионных культур важно учитывать направление подачи воздуха в ферментерах или в малых объёмах (колбы). Влажность в помещении для эффективного роста культур должны быть равна 60 – 70 % [9].

## 1.4 Микрклональное размножение

Микроразмножение позволяет получать большое количество растений из небольших частей исходного растения за относительно короткие промежутки времени. В зависимости от рассматриваемого вида исходный кусочек ткани может быть взят из верхушки побега, листа, боковой почки, стебля или корневой ткани. Этот метод является средством ускоренного бесполого размножения и растения, полученные с помощью этих методов, реагируют аналогично любому растению, размноженному вегетативно с собственными корнями [5].

Процесс микроклонального размножения можно провести несколькими методами: посредством активации пазушных меристем, образования адвентивных побегов в каллусе или экспланте, а также через индукцию соматического эмбриогенеза. Активация пазушных почек может проводиться либо путем удаления верхушечной меристемы и черенкованием побега *in vitro* на безгормональной среде либо путем снятия доминирования, при этом включая в состав питательной среды цитокинины [2].

#### 1.4.1 Преимущества микроклонального размножения

Микроразмножение дает несколько явных преимуществ, которые невозможны при использовании традиционных методов размножения [5]:

- Быстрое размножение генетически однородных растений (клонов), обладающих желательными признаками (устойчивость к вредителям, стрессоустойчивость, высокое содержание лекарственных средств [8]). Один эксплант может быть размножен на несколько тысяч растений за очень короткое время. После укоренения активно делящиеся культуры являются непрерывным источником микроразрезов, которые могут привести к производству растений в тепличных условиях без сезонных перерывов;

- Производство множества растений при отсутствии семян или необходимых опылителей для получения семян;

- Регенерация целых растений из растительных клеток, которые были генетически модифицированы. Используя методы микроразмножения можно быстро ввести отобранные превосходные клоны декоративных растений в достаточных количествах, чтобы оказать влияние на рынок ландшафтных растений;

- Для очистки конкретного растения от вирусных и других инфекций и быстрого размножения этих растений в качестве "очищенного материала" для садоводства и сельского хозяйства [5].

Современная культура тканей растений проводится в асептических условиях при фильтрованном воздухе. Живые растительные материалы из окружающей среды естественным образом загрязнены на своей поверхности (а иногда и внутри) микроорганизмами, поэтому требуется поверхностная стерилизация исходных материалов (эксплантов) в химических растворах [5].

Метод микроклонального размножения позволяет восстановить здоровые растения из инфицированных паразитами и патогенами [8].

#### 1.4.2 Этапы проведения культивирования *in vitro*

Микроклональное размножение *in vitro* растений состоит из пяти основных этапов [2]:

- Подготовка растения – донора.

Любая растительная ткань может быть введена в культуру *in vitro*. Однако, было установлено, что успех морфогенеза зависит от физиологических и фитосанитарных качеств растения, которые частично определяются условиями окружающей среды, в которых выращивается растение [4].

- Введение в культуру - самый сложный этап системы размножения *in vitro*. Введение тканей растений в культуру *in vitro* осуществляется путем поверхностной дезинфекции бактерицидными и фунгицидными средствами. Наиболее часто используемыми дезинфицирующими средствами являются гипохлорит натрия, гипохлорит кальция и этанол. Некоторые ткани, такие как древесные растения, нуждаются в более радикальных дезинфекционных процедурах, таких как кратковременное погружение в хлорид ртути (II) ( $HgCl_2$ ) [4].

На этом этапе также важно контролировать выделение фенольных соединений тканями и их окисление. Это защитная реакция поврежденных тканей растений, вызванная возрастом растения, обрезанием сегмента ткани и применением химикатов. Одним из способов уменьшения образования фенольных соединений является добавление активированного угля, лимонной и аскорбиновой кислот [4].

- Размножение растений. Целью этой фазы является увеличение количества единиц в системе культивирования тканей до получения желаемого количества. Чтобы улучшить морфогенный ответ экспланта, необходимо изучить и установить эффект взаимодействия регуляторов роста растений (ауксины, цитокинины) [4].

- Стадия укоренения может происходить одновременно с размножением в той же питательной среде, которая использовалась для размножения эксплантов. Однако в некоторых случаях необходимо вносить изменения в среду, включая модификацию питательных веществ и состав регулятора роста [4].

Адаптация *ex vitro* или акклиматизация растений: на этом этапе растения *in vitro* адаптируются к окружающей среде за пределами лабораторных условий. В процессе регулируются физические факторы, которые могут повлиять на выживаемость растений [4].

## **2 Биология и морфология растений малины**

Малина (*Rubus L.*) - многолетний полукустарник (до 2 м. высотой [10]) рода *Rubus*, надземная часть которого состоит из однолетних и двулетних стеблей. Подземная часть малины является многолетней. Она состоит из корневища и придаточных корней. *Rubus* - широко распространенный в Северном полушарии род семейства Розоцветные *Rosaceae Juss* [11].

Первые упоминания о малине замечены в трудах Гиппократ и произведениях Эсхила в 5 в. до н. э. Вид малины *R. chingii* Нц, родственной малине обыкновенной, упоминается в китайских источниках около 300 г. н. э. В Китае отмечено примерно 208 видов малины, 139 из которых – эндемики, поэтому место, откуда произошел *Rubus L.* считают Восточную Азию [12].

Основные сорта малины происходят от двух диких видов: красной малины (*Rubus idaeus*) и черной малины (*Rubus occidentalis*) [11].

Листья малины представляют собой сложный лист, состоящий из трех или пяти листовых пластинок с одним черешком. Формирование листьев малины происходит одновременно с ростом и развитием ветвей. У молодых саженцев первого года плодовые почки расположены в пазухах листьев. Каждая пазуха листа обычно содержит одну или две почки [11].

Плод малины – сборная костянка. Ее части закреплена на плодоложе. То насколько хорошо сцеплены костянки, определяет способность ягод сохранять свой целостный вид. Эта способность определяет транспортабельность малины [13].

Зимостойкость у малины высокая. Она начинает плодоносить на 2 год после посадки [10], т.е. у большинства сортов в первый год во время роста побегов происходит закладка латералов (плодовые ветки) в пазухах листьев, а на следующий год – плодоношение. После этого побеги малины отмирают и из почек корневища появляются новые побеги [12].

### **2.1 Особенности выращивания малины**

Малину размножают в основном вегетативными органами, корневищами, корневыми отпрысками и ветвями. Когда образуются листья, из плодовых почек образуются цветы и ягоды. Как только плоды созревают, веточки засыхают. Многие веточки малины покрыты мелкими шипами. Это видоизмененные волоски, клетки которых одревесневают [11]. Большую ценность представляют сорта с меньшей шиповатостью [13].

Опушенность побегов малины может повлиять на их поражаемость грибными болезнями [13].

Почти все сорта малины самоопыляются. Малина созревает через месяц после цветения. Созревание урожая длится так же, как и цветение. То есть



плоды созревают непрерывно в течение полутора месяцев. Сбор урожая не производится одновременно. Сбор урожая производится каждые 2-3 дня [11].

Введение в культуру *in vitro* малины проводится в фазу выхода вегетативных почек из периода покоя (март–апрель) или в период покоя (ноябрь–декабрь) [14].

Разработка эффективной процедуры микроразмножения сортов малины с ценными товарными и биологическими качества чрезвычайно важны как для селекции, так и для коммерческого размножения [15].

Плоды малины употребляются в основном в свежем виде. Однако сушка и консервирование плодов также широко используется в пищевой промышленности [11].

Лидером среди стран мира по производству малины является Россия. Это дело хорошо развито в странах Европы (Сербия, Польша, Украина, Германия, Венгрия, Франция, Великобритания и др.), США, Чили, Китае, Канаде и Корее [16].

Участки для благоприятного выращивания малины должны быть увлажненными, т. е. они могут быть вблизи рек или предгорными, горными районами, где происходит обильное выпадение осадков [16].

Бывают ремонтантные сорта малины. Это суперранние сорта, которые формируют два урожая во время вегетационного периода. Отличие корней ремонтантной малины от неремонтантной, в том, что они у нее менее мочковатые и уходят глубже в землю [16].

Актуальным является размножение ремонтантной малины (Рисунок 1) методом микроклонального размножения *in vitro*, т. к. при традиционном способе размножения она имеет низкие коэффициенты размножения [17].

Куст малины сорта «Брянское Диво» высокий, мощный, слабораскидистый. На побегах заметно небольшое количество шипов. Урожайность выше средней (50-80 ц/га). Ягоды Брянской Дивы - крупные (3,0 г), округлоконической формы и рубинового цвета. Её мякоть ароматная и сладкая. Сорт высокозимостойкий, относительно устойчив к дидимелле (грибные заболевания), антракнозу, повреждается паутинным клещом [18].

Сорт «Амира» также известен под названием «БП 1», названного в честь питомника «Берриплант» где он был селекционирован. Куст малины этого сорта сильнорослый, но компактный. Побеги толстые, густоошипленные. С одного побега получают до 1 кг. ягод, которые, не выделяя сок, без труда снимаются с плодоложа. Ягоды вырастают крупных размеров, овальной и конусообразной формы [19].



а



б

Рисунок 1 – Сорта малины

а – Брянское Диво

б – Амира

## 2.2 Химический состав и биологическая активность побегов

Красная малина способствует повышению питательной ценности диеты. Они являются одними из самых высоких цельных пищевых источников пищевых волокон, обеспечивая 6,5 г / 100 г свежего веса. Они также содержат витамин С, магний и множество других питательных веществ, таких как калий, витамин К, кальций и железо. Красная малина также содержит фитохимические компоненты с задокументированной биологической активностью [20].

Плоды малины содержат ряд фенольных соединений, преобладающими из которых являются антоцианы и эллагитаннины, сопровождающиеся значительно более низкими концентрациями флавоноидов, фенольных кислот. Эллагитаннины представляют собой группу гидролизуемых дубильных веществ [1].

Из фенольных кислот в составе частей малины было обнаружено присутствие галловой кислоты, протокатехиновой кислоты, хлорогеновой кислоты, кофейной кислоты и эллаговой кислоты [1].

Красная малина содержит примерно  $92,1 \pm 19,7$  мг антоцианов на 100 г свежих фруктов в соотношении 32:1 антоцианов на основе цианидина и пеларгонидина. Антоцианы в красной малине составляют примерно 25% их антиоксидантной способности [20].

Плоды красной малины, включая различные экстракты и отдельные компоненты, обладают противовоспалительной, антиоксидантной и метаболически - стабилизирующей активностью. Кроме того, эти эффекты были связаны с улучшением соответствующих конечных точек, таких как

снижение артериального давления, улучшение липидного профиля, снижение развития атеросклероза, улучшение сосудистой функции, стабилизация неконтролируемых симптомов диабета (например, гликемии) и улучшение функционального восстановления в моделях черепно-мозговой травмы. Ключевую роль красной малины в снижении риска метаболически обусловленных хронических заболеваний, в частности ССЗ (сердечно – сосудистые заболевания), СД2 (сахарный диабет 2 типа) и болезни Альцгеймера, что требует проведения последующих исследований на людях [20].

### 3 Результаты исследований и их обсуждение

Лабораторные работы проводились в РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина», лаборатории биоинженерии растений под руководством Н. П. Малаховой.

В исследовании использовались растения малины *Rubus L.* двух сортов: Брянское Диво и Амира. В качестве эксплантов была взята апикальная меристема пазушных почек (Рисунок 2).

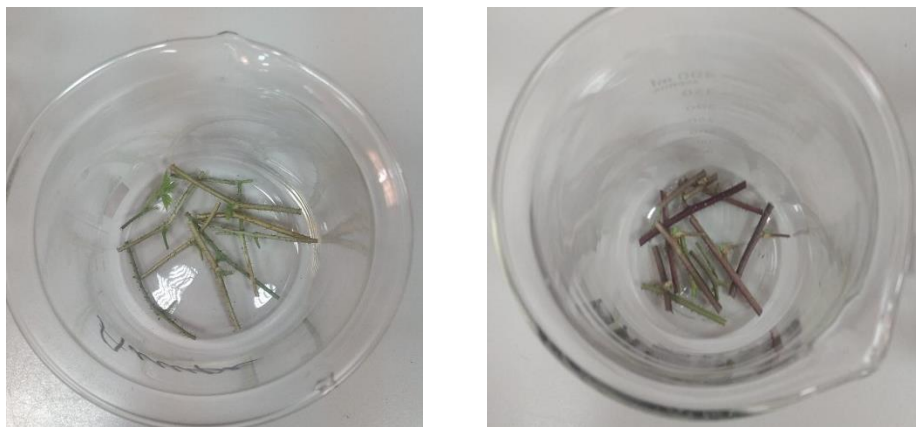


Рисунок 2 – Экспланты в виде пазушных почек

#### 3.1 Подбор метода стерилизации

Прежде чем ввести ткани растений в культуру *in vitro*, в первую очередь, должна проводиться тщательная дезинфекция эксплантов химическими средствами. Для этого был проведен подбор методов и были выбраны три варианта способа стерилизации. В каждом варианте первым шагом является перемешивание эксплантов в мыльном растворе на лабораторном шейкере в течение 30 минут. Затем, в течение такого же промежутка времени экспланты промывались под проточной водой. Ниже представлены выбранные варианты стерилизаций, которые проводятся под ламинарным боксом (Таблица 1):

1 вариант: обработка этиловым спиртом в течение 1 минуты, затем промывка эксплантов дистиллированной водой в течение 2 минут, после происходит обработка 10 % раствором «Белизны» в течение 15 минут, последний шаг – промывка эксплантов 3 раза по 5 минут дистиллированной водой.

2 вариант: также, как и в первом варианте происходит обработка спиртом и промывка дистиллированной водой, затем экспланты обрабатываются 10 % раствором «Белизны» в течение 10 минут (3) и последнее происходит промывка дистиллированной водой в такой же композиции.

3 вариант: подразумеваются те же манипуляции, отличие от предыдущих вариантов лишь в том, что обработка проводится 20 % раствором «Белизны» в

течение 10 минут, с последующей трехкратной промывкой эксплантов дистиллированной водой.

Таблица 1 – Варианты стерилизации

Вариант	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (70 %)	H <sub>2</sub> O (дист.)	«Белизна» (концентрации варьируются)	H <sub>2</sub> O (дист.)
1	1 мин	2 мин	10 % в течение 15 мин	3 раза по 5 мин
2	1 мин	2 мин	10 % в течение 10 мин	3 раза по 5 мин
3	1 мин	2 мин	20 % в течение 10 мин	3 раза по 5 мин

В результате проведения стерилизации способом № 1 (Рисунок 3а), из 13 эксплантов сорта Брянское Диво 5 эксплантов не прошли стерилизацию и из 11 простерилизованных эксплантов сорта Амира 4 также оказались не продезинфицированы, что представлено на рисунке 1. Успех этого варианта стерилизации составил 37.5 %.

Эффективность способа стерилизации № 3 (Рисунок 3в) составила 75 %, т.е. из общего количества в 56 эксплантов 6 было поражено и 2 экспланта утратили способность к дальнейшему росту.

Результаты, полученные после стерилизации растительного материала №1 и 3 способами, показали их недостаточную стерильность (Рисунок 4).

Наиболее высокий результат стерильности показал способ стерилизации № 2 (Рисунок 3б), после которого из 41 экспланта был поражен лишь 1 эксплант сорта Брянское Диво, т.е. успех стерилизации составил 97.6 %.

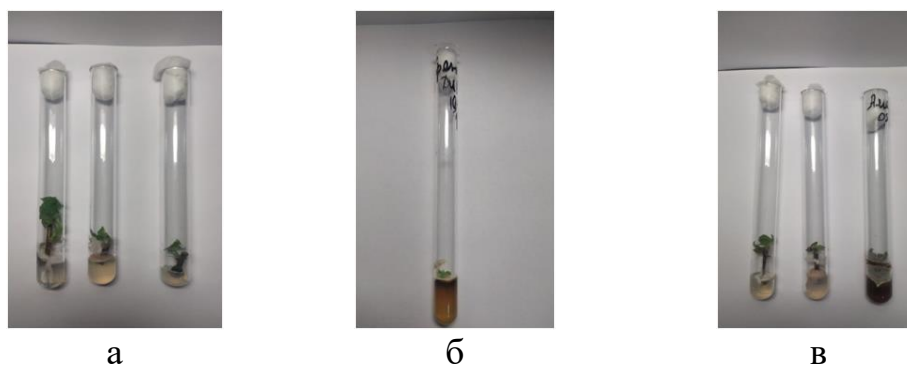
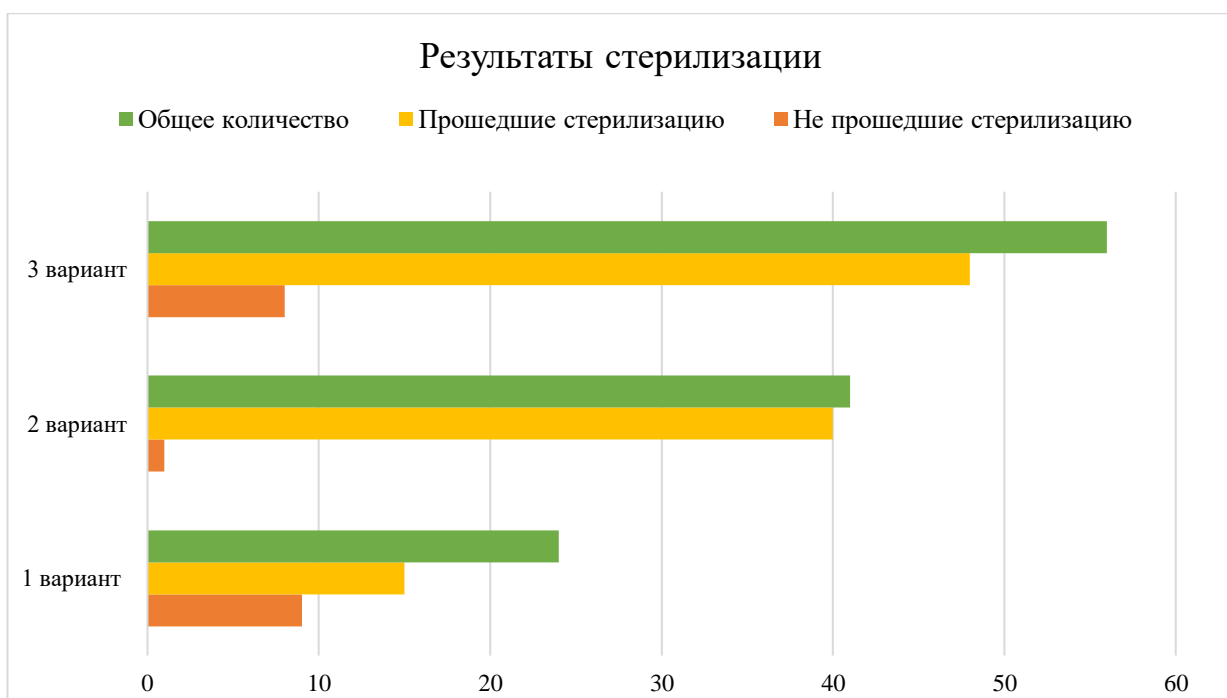


Рисунок 3 - результаты стерилизаций

а – первый вариант стерилизации; б – второй вариант стерилизации, в – третий вариант стерилизации



**Рисунок 4 – Сравнительный график результатов различных вариантов стерилизации**

Таким образом, из полученных экспериментальных данных для стерилизации эксплантов растительного материала, наиболее оптимальным является вариант № 2.

### **3.2 Подбор состава питательных сред для введения в культуру**

После этапа подбора метода стерилизации, был проведен этап подбора состава питательной среды и оптимизации условий культивирования для каждого растительного экспланта. На этапе введения в культуру *in vitro* использовалась универсальная питательная среда Мурасиге – Скуга [21] с добавлением различных концентраций фитогормонов.

Для введения в культуру эксплантов из междоузлий были использованы среды следующего состава:

1 вариант: МС – 4,33 г/л; витамины – 1 мл/л; сахароза – 30 г/л; агар – 6.5 г/л; 6-БАП – 0,5 мг/л; рН= 5,6 – 5,7 [22].

2 вариант: МС – 4,33 г/л; витамины – 1 мл/л; сахароза – 30 г/л; агар – 6.5 г/л; 6-БАП – 0,7 мг/л; рН= 5,6 – 5,7 [22].

3 вариант: МС – 4,33 г/л; витамины – 1 мл/л; сахароза – 30 г/л; агар – 6.5 г/л; 6-БАП – 1 мг/л; рН= 5,6 – 5,7 [22].

На рисунке 5 представлены результаты роста побегов после 3 недель наблюдения.



Рисунок 5 – Результаты введения в культуру эксплантов

а – сорт Брянское Диво (6-БАП – 0,5; 0,7; 1 мг/л);

б – сорт Амира (6-БАП – 0.7;0.5; 1 мг/л)

Наблюдая эмпирически, можно заметить, что для сорта Брянское Диво содержание в питательной среде 6 – БАП в концентрациях 0,5 и 0,7 мг/л более эффективно стимулирует рост побегов. Для малины сорта Амира оптимальной концентрацией является 6-БАП - 1 мг/л.

### 3.3 Получение растений - регенерантов

Следующим этапом в культивировании малины *in vitro* является микрклональное размножение. На этом этапе использовались следующие варианты питательных сред с добавлением различных комбинаций фитогормонов:

4 вариант: МС – 4,33 г/л; витамины – 1 мл/л; сахароза – 30 г/л; агар – 6.5 г/л; 6-БАП – 0,5 мг/л, ГК (GA) – 0.2 мг/л; рН= 5,6 – 5,7 [23].

5 вариант: МС – 4,33 г/л; витамины – 1 мл/л; сахароза – 30 г/л; агар – 6.5 г/л; ГК – 0,5 мг/л; рН= 5,6 – 5,7 [22].

6 вариант: МС – 4,33 г/л; витамины – 1 мл/л; сахароза – 30 г/л; агар – 6.5 г/л; 6-БАП – 1 мг/л, ГК – 1 мг/л, ИМК – 0,2 мг/л; рН= 5,6 – 5,7 [24].

Результаты роста побегов растений на 4 варианте питательной среды представлены на Рисунке 6, на 5 варианте – Рисунке 7, на 6 варианте – Рисунке 8. В Таблице 2 представлены количественные значения роста побегов на различных средах. Сравнительный график побегообразования изображен на Рисунке 9.





Рисунок 6 - результаты размножения Брянской Дивы и Амиры на питательной среде 4 варианта

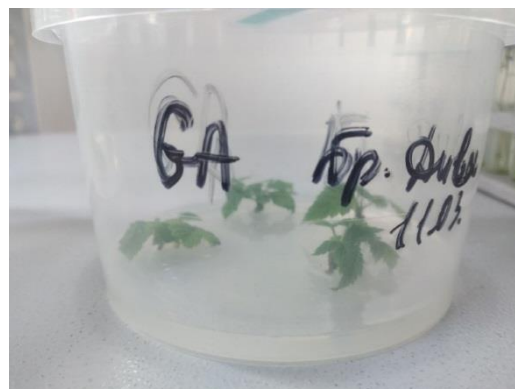


Рисунок 7 - результаты размножения Амиры и Брянской Дивы на питательной среде 5 варианта

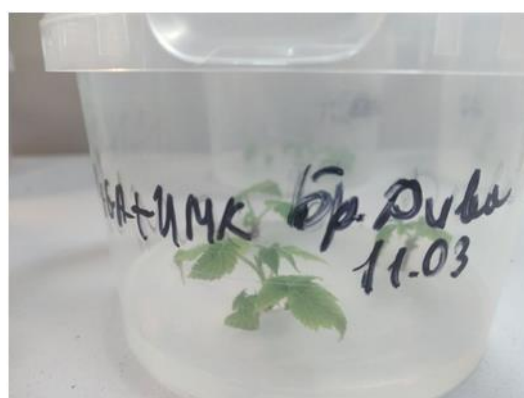
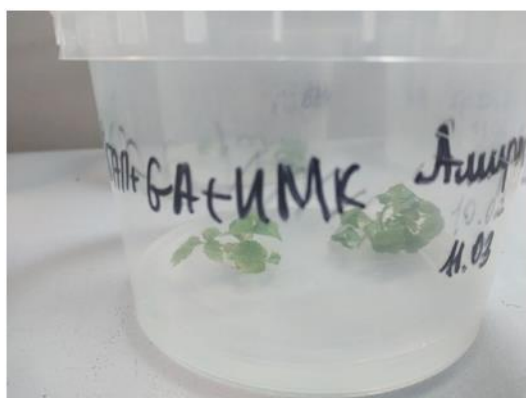


Рисунок 8 - результаты размножения Амиры и Брянской Дивы на питательной среде 6 варианта

Таблица 2 – Побегообразование на различных средах

Среда	Фитогормоны	Кол-во эксплантов	Побег	Выход, %
МС	БАП (0,5 мг/л) +ГК (0,2 мг/л)	15	25	83



МС	ГК (0,5 мг/л)	15	20	67
МС	БАП 1 мг/л + ИМК 0,2 мг/л + ГК 0,2 мг/л	16	30	94

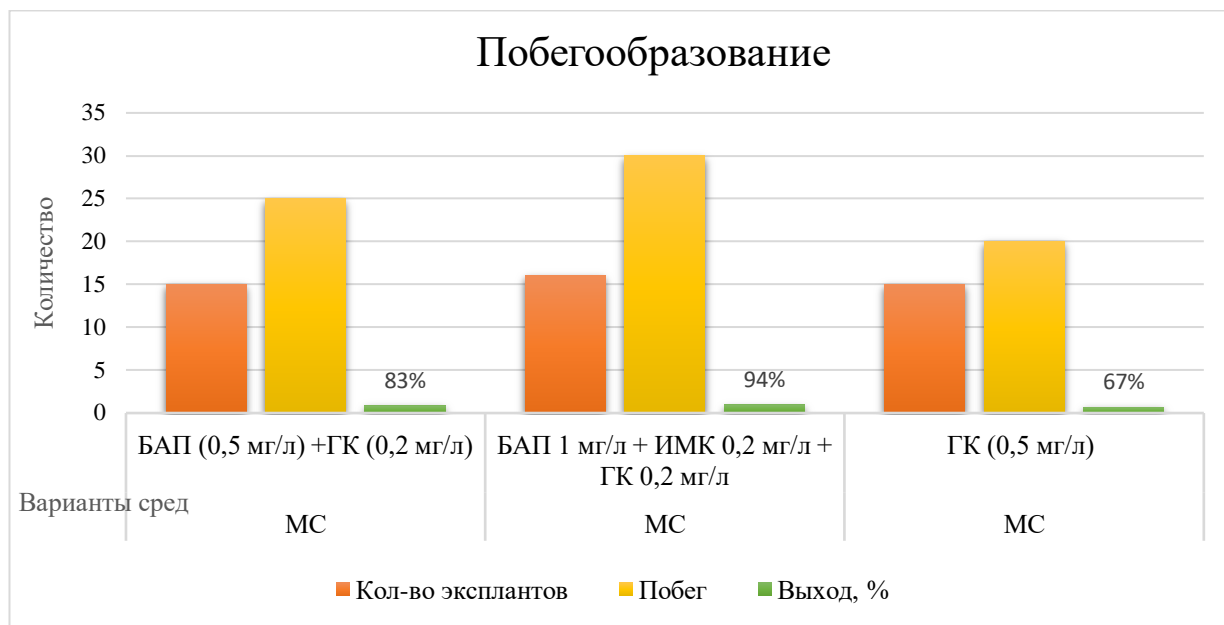


Рисунок 9 – Побегообразование на вариантах питательных сред

В результате наблюдений было выявлено, что оптимальным вариантом для размножения малины была питательная среда под номером 6, т.к. уже на 2 неделе после пересадки были видны изменения в росте.

Для укоренения растений применялись питательные среды с уменьшением концентрации питательной основы в 2 раза:

7 вариант: МС – 2,17 г/л; витамины – 1 мл/л; сахароза – 30 г/л; агар – 6.5 г/л; ИУК – 1 мг/л; рН= 5,6 – 5,7 [22].

8 вариант: МС – 2.17 г/л; витамины – 1 мл/л; сахароза – 30 г/л; агар – 6.5 г/л; ИМК – 2 мг/л; рН= 5,6 – 5,7 [24].

У малины сорта Амира активно образовывались корни на питательной среде 7 варианта (Рисунок 10).

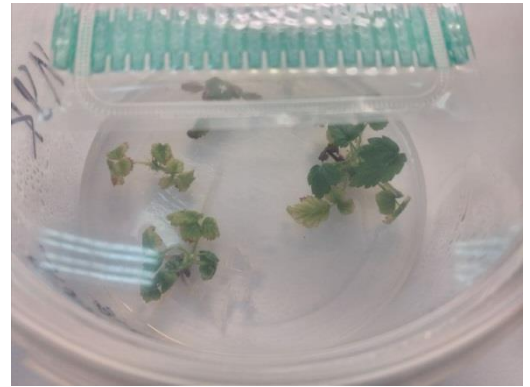
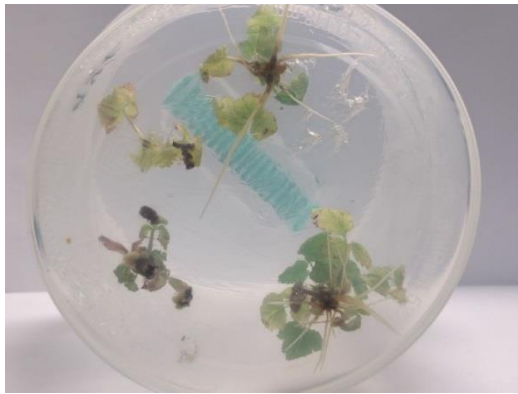


Рисунок 10 – ризогенез сорта Амира на среде 7 варианта

На среде 8 варианта ризогенез сорта Амира происходил, но корни образовывались медленнее (Рисунок 11).

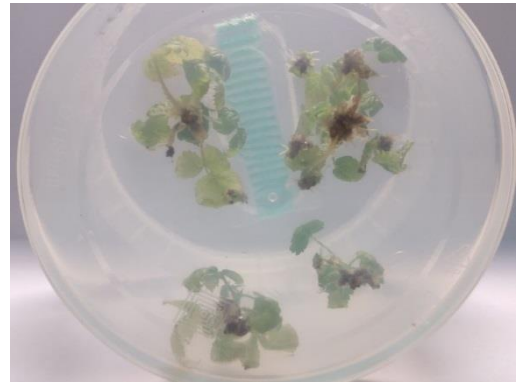
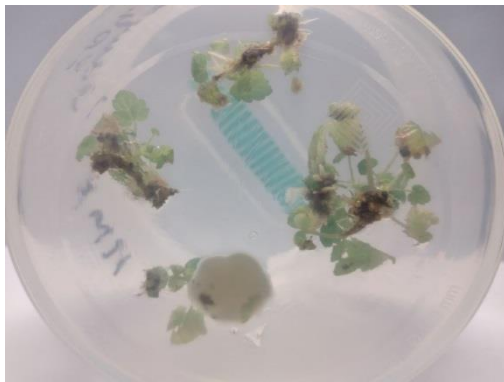


Рисунок 11 – корнеобразование Амиры на варианте 8

Образование корней у сорта малины Брянское Диво не происходило ни на одной из вариантов питательных сред, вместо корней образовывался каллус (Рисунок 12).

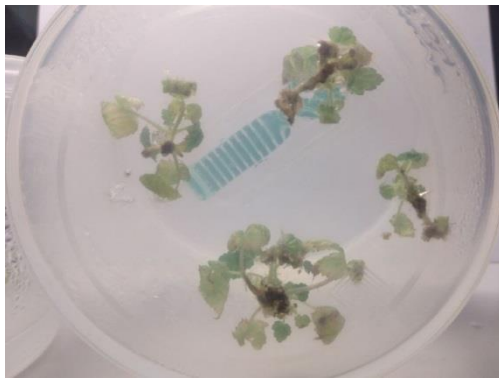


Рисунок 12 – сорт Брянское Диво на вариантах питательных сред 7 и 8

Таким образом оптимальная питательная среда для укоренения сорта Амира является 7 вариант. У сорта Брянское Диво на обоих вариантах питательных сред образовывался каллус.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненной работы по поставленным задачам были получены следующие результаты:

1. Был подобран оптимальный метод стерилизации междоузлий (вариант № 2), который обеспечивал дальнейшую жизнеспособность экспланта в культуре *in vitro*.

2. По результатам, полученным в ходе проведения экспериментальных работ, было установлено, что оптимальной средой для введения в культуру малины сорта Брянская Дива является среда МС с содержанием 6-БАП в концентрациях 0,5 и 0,7 мг/л (1, 2 вариант), для сорта Амира – это 3 вариант среды с содержанием 6-БАП 1 мг/л.

3. На этапе микроклонального размножения оптимальной средой для роста клеток растений является 6 вариант с содержанием МС, 6-БАП – 1 мг/л, ГК – 1 мг/л, ИМК – 0,2 мг/л.

4. На питательных средах, подобранных для укоренения малины сорта Амира, активно образовывались корни на питательной среде 7 варианта. У сорта Брянское Диво ризогенез не наблюдался на выбранных средах, происходило образование каллуса.

## **ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

В1 - тиамин

В2 - рибофлавин

В6 - пиридоксин

БАП - 6- бензиламинопурин

ИУК - индолилуксусная кислота

НУК - а-нафтилуксусная кислота

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

МС – питательная среда Мурасиге – Скуга

ГК – гибберелловая кислота – gibberellic acid

ИМК - индолил-3-масляная кислота

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Krauze-Baranowska M, Głód D, Kula M. Chemical composition and biological activity of *Rubus idaeus* shoots--a traditional herbal remedy of Eastern Europe. *BMC Complement Altern Med*. 2014; 14:480. Published 2014. doi: 10.1186/1472-6882-14-480.
- 2 Кампитова Г.А. Основы биотехнологии плодовых культур: учебное пособие / Г.А. Кампитова, Л.С. Ерболова. – Алматы: издательство «Эверо», 2020. – 144 с.
- 3 E. N. Raeva-Bogoslovskaya, O. I. Molkanova, I. L. Krakhmaleva, E. V. Soboleva, Biotechnology methods to produce planting material of the genus *Rubus* L. 2021 IOP Conf. Ser.: Земная среда. науч. 941 012027.
- 4 Rolando García-González, Karla Quiroz, Basilio Carrasco, Peter Caligari. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. 2011, *Ciencia e Investigacion Agraria*, p. 5-30.
- 5 P. E. Akin-Idowu, D. O. Ibitoye, and O. T. Ademoyegun, Tissue culture as a plant production technique for horti-cultural crops, *African Journal of Biotechnology*, vol. 8, pp. 3782–3788, 2009.
- 6 Валиханова Г.Ж. Биотехнология растений: учебное пособие / Г. Ж. Валиханова – Павлодар: Кереку, 2009. – 272 с.
- 7 Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений: Учебно-методическое пособие. – Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003.
- 8 Kulak V, Longboat S, Brunet ND, Shukla M, Saxena P. In Vitro Technology in Plant Conservation: Relevance to Biocultural Diversity. *Plants (Basel)*. 2022; 11(4):503. Published 2022.
- 9 Использование культуры клеток растений в биотехнологии лекарственных средств: учебное пособие / И. А. Мурашкина, И. Б. Васильев, В. В. Гордеева; ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России, Кафедра технологии лекарственных форм. – Иркутск: ИГМУ, 2015. – 83с.
- 10 Демьянова, Е.И. Ботаническое ресурсоведение: учеб. пособие по спецкурсу / Е.И. Демьянова; Перм. гос. ун-т. – Пермь, 2007 – 172 с.
- 11 Nurmukhamedova D. S. Morphological and Biological Properties of Raspberry. Issue: 12, б.м.: *Central Asian journal of theoretical and applied sciences*, December 2021. T. Volume: 02. ISSN: 2660-5317.
- 12 Камнев, А. М. Сохранение *ex situ* сортов малины сибирской селекции в коллекциях Всероссийского института генетических ресурсов растений (ВИР) им. Н.И. Вавилова: магистерская диссертация - Барнаул, 2020.

13 Казаков И. В. Кичина В. В. Малина / издание второе, переработанное и дополненное. Россельхозиздат. Москва. 1980.

14 Размножение плодовых и ягодных растений в культуре in vitro / Н. В. Кухарчик [и др.]; под общ. ред. Н. В. Кухарчик. – Минск: Беларуская навука, 2016. – 208 с. – ISBN 978-985-08-1952-9.

15 T. Stoevska, A. Trifonova, D. Karadocheva (1995) Micropropagation of Raspberries (*Rubus Idaeus*), *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 9:2-3, 27-30, DOI: 10.1080/13102818.1995.10818837.

16 Методические рекомендации по технологии выращивания малины в условиях малого предприятия. Кубанский сельскохозяйственный центр - Краснодар, 24 с.

17 Orazbaeva G.K. Klonalnoe razmnzhenie rastenij krasnoj maliny (*Rubusidaeus L.*) in vitro / Orazbaeva G. K., Majsupova I. L., Hasanov V. T., Shvidchenko V. K. // *Vestnik nauki KazATU im. S.Sejfullina*. - 2012. - №1 (72). - S.140-149.

18 Аяпов К. Плодоводство / Аяпов К. Матаганов Б. Г., 2020. - 401 с.

19 Заречный М. Сорт малины Амира. 2018.

20 Burton-Freeman B. M. Sandhu A. K. Edirisinghe I. Red Raspberries and Their Bioactive Polyphenols: Cardiometabolic and Neuronal Health Links. *Adv Nutr*. 2016; 7(1):44-65. Published 2016.

21 Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Plant Physiol*. – 1962. – V. 15. - № 95. – P. 473-497.

22 Малаева Е.В., Молканова О.И. Биотехнологические и экономические аспекты клонального микроразмножения ремонтантной малины. *Плодоводство и ягодоводство России*. 2017;48(2):183-189.

23 Иванова-Ханина Л. В. Оптимизация условий введения малины и ежевики в культуру. Южный филиал Национального университета биоресурсов и природопользования Украины «Крымский агротехнологический университет», Крым, Россия.

24 Шинкарев П.Д. Особенности микроклонального размножения малины красной на питательных средах различного состава. Тамбовское областное государственное автономное общеобразовательное учреждение «Мичуринский лицей-интернат».

**РЕЦЕНЗИЯ**

на Дипломную работу

Балабаевой Айданы Максатовны

5В070100 «Биотехнология»

На тему: «Культивирование малины *in vitro* для получения посадочного материала»

Выполнено:

- а) графическая часть на 8 листах
- б) пояснительная записка на 30 страницах

**ЗАМЕЧАНИЯ К РАБОТЕ**

Тема данной работы актуальна в области биотехнологии растений и сельского хозяйства в стране. В частности, малина широко используется в любом виде в пищевой промышленности и полезна для здоровья человека.

Во введении автор четко сформулировал цель и установил задачи работы.

В первой главе автор привел основные понятия, связанные с «культурой клеток, тканей и органов» растений: историю развития культивирования клеток, тканей *in vitro*, процессы морфогенеза и их определяющие факторы. Здесь же был подробно описан метод микрклонального размножения: его преимущества и этапы культивирования.

Вторая глава посвящена биологии и морфологии растений малины, особенностям ее выращивания, содержанию биологически активных веществ в малине, которые полезны для здоровья.

В третьей главе были описаны методы и способы, подобранные для введения в культуру, микрклонального размножения и получения растения – регенеранта. По результатам исследования были сделаны выводы и выбраны оптимальные методы культивирования малины *in vitro*.

Языково-стилистическая культура представленной работы характеризуется смысловой точностью, логичностью и выразительностью.

В работе было предоставлено достаточное графическое обоснование результатов исследований и немалое количество источников. В некоторых местах работы изложение информации было в публицистическом стиле.

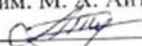
**Оценка работы**

При работе с дипломной работой автор показал владение общими и специальными компетенциями: понимает значимость своей специальности, умеет искать, обрабатывать и использовать информацию на практике, понимает роль применения метода микрклонального размножения в пищевой и сельскохозяйственной отрасли, умеет анализировать и выбирать оптимальные методы для культивирования растений *in vitro*.

В целом работа соответствует требованиям, предъявляемых к Дипломной работе и рекомендуется к защите.



**Рецензент**

доктор PhD, старший научный сотрудник  
ИМББ им. М. А. Айтхожина КН МОН РК

 Абдолла Нұршат

« 03 » 06 2022 г.



Подпись   
Заверяю Главный специалист по кадрам  
Института молекулярной биологии и биохимии  
им. М.А. Айтхожина КН МОН РК  
 03.06.2022



**ОТЗЫВ**

**НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ**

На дипломную работу

Балабаевой Айданы Максатовны

5B070100 – «Биотехнология»

Тема:

«Культивирование малины *in vitro* для получения посадочного материала»

В данной дипломной работе четко указана актуальность, которая заключается в необходимости выращивания растений малины для сельского хозяйства и в широком ее использовании в пищевой промышленности. Метод микрклонального размножения считается перспективным и имеет множество преимуществ по сравнению с традиционным способом размножения растений. Изложение информации в дипломной работе является логичным, хорошо продуманным.

Цели и задачи сформулированы точно в соответствии с темой дипломной работы. Теоретическая часть работы была сконструирована из обширной базы источников, и она была всесторонне изучена.

Языково-стилистическая культура представленной работы характеризуется грамотностью и ясностью изложения мыслей автором. Однако в некоторых местах работы прослеживаются признаки использования публицистического стиля повествования.

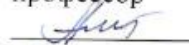
При выполнении дипломной работы Балабаева А. выказала самостоятельность в проведении исследований. Выполненные исследования отвечают поставленной цели. После полученных результатов были сформулированы обоснованные и четкие выводы.

Оформление дипломной работы соответствует нормативным требованиям.

Подводя итог можно отметить, что тема дипломной работа Балабаевой А. очень актуальна, отличается теоретической и практической ценностью. Считаю, что дипломная работа Балабаевой Айданы соответствует всем требованиям для присвоения квалификации бакалавр по специальности 5B070100 – «Биотехнология» и заслуживает очень высокой оценки «Отлично» - 97 %.

**Научный руководитель**

доктор биологических наук,  
профессор

 Анапияев Б. Б.  
«26» 05 2022 г.





## Metadata

Title

**2022\_БАК\_ Балабаева А.docx**

Author(s)

**Балабаева А**

Promoter






**Бакытжан Анапияев**

Organizational unit

**ИГИНГД**

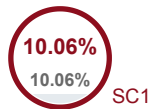
## List of possible text manipulation attempts

In this section, you can find information regarding text modifications that may aim at temper with the analysis results. Invisible to the person evaluating the content of the document on a printout or in a file, they influence the phrases compared during text analysis (by causing intended misspellings) to conceal borrowings as well as to falsify values in the Similarity Report. It should be assessed whether the modifications are intentional or not.

Characters from another alphabet		0
Spreads		0
Micro spaces		0
White characters		0
Paraphrases (SmartMarks)		45

## Record of similarities

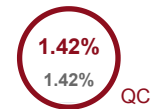
Please note that high coefficient values do not automatically mean plagiarism. The report must be analyzed by an authorized person.

**25**

The phrase length for the SC 2

**5565**

Length in words

**41554**

Length in characters

## Active lists of similarities

Scroll the list and analyze especially the fragments that exceed the SC 2 (marked in bold). Use the link "Mark fragment" and see if they are short phrases scattered in the document (coincidental similarities), numerous short phrases near each other (mosaic plagiarism) or extensive fragments without indicating the source (direct plagiarism).

### The 10 longest fragments

Color of the text

NO	TITLE OR SOURCE URL (DATABASE)	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)	
1	<a href="https://mklguo.ru/raznoe-2/rastitelnaya-tkan-vidy-tkanej-rastenij-biologiya-i-ih-funkczii-tablicza-dlya-6-klassa.html">https://mklguo.ru/raznoe-2/rastitelnaya-tkan-vidy-tkanej-rastenij-biologiya-i-ih-funkczii-tablicza-dlya-6-klassa.html</a>	34	0.61 %
2	Введение хризантем Chrysantemum L. в культуру клеток для получения растений-регенерантов 4/29/2019 Satbayev University (ИХИБТ)	29	0.52 %
3	<a href="https://studfiles.net/preview/6873047/">https://studfiles.net/preview/6873047/</a>	22	0.40 %
4	Размножение лилий в культуре in vitro 4/24/2019 Satbayev University (ИХИБТ)	21	0.38 %

5	<a href="https://mklguo.ru/raznoe-2/rastitelnaya-tkan-vidy-tkanej-rastenij-biologiya-i-ih-funkczii-tablicza-dlya-6-klasa.html">https://mklguo.ru/raznoe-2/rastitelnaya-tkan-vidy-tkanej-rastenij-biologiya-i-ih-funkczii-tablicza-dlya-6-klasa.html</a>	20	0.36 %
6	<a href="https://mklguo.ru/raznoe-2/rastitelnaya-tkan-vidy-tkanej-rastenij-biologiya-i-ih-funkczii-tablicza-dlya-6-klasa.html">https://mklguo.ru/raznoe-2/rastitelnaya-tkan-vidy-tkanej-rastenij-biologiya-i-ih-funkczii-tablicza-dlya-6-klasa.html</a>	20	0.36 %
7	Анализ эффективности применения МУН и выбор наиболее оптимального применительно к месторождению Х_Алтиева А.Е., Беркимбаева А.Ж., Мырзабаева А.Б..doc 5/7/2019 Satbayev University (ИГиНГД)	19	0.34 %
8	<a href="https://studfiles.net/preview/6873047/">https://studfiles.net/preview/6873047/</a>	17	0.31 %
9	Размножение лилий в культуре in vitro 4/24/2019 Satbayev University (ИХиБТ)	14	0.25 %
10	<a href="http://rmeb.kz/journals/2470/79086.pdf">http://rmeb.kz/journals/2470/79086.pdf</a>	13	0.23 %

from RefBooks database (0.00 %) 

NO	TITLE	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)	
----	-------	---------------------------------------	--

from the home database (5.19 %) 

NO	TITLE	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)	
1	Введение хризантем Chrysantemum L. в культуру клеток для получения растений-регенерантов 4/29/2019 <b>Satbayev University (ИХиБТ)</b>	<b>170 (21)</b>	<b>3.05 %</b>
2	Размножение лилий в культуре in vitro 4/24/2019 Satbayev University (ИХиБТ)	63 (7)	1.13 %
3	Анализ эффективности применения МУН и выбор наиболее оптимального применительно к месторождению Х_Алтиева А.Е., Беркимбаева А.Ж., Мырзабаева А.Б..doc 5/7/2019 Satbayev University (ИГиНГД)	34 (3)	0.61 %
4	Использование продуктов переработки молока для повышения качества хлебобулочных изделий 5/24/2017 Satbayev University (И_И_В_Т)	12 (2)	0.22 %
5	Оценка состояния гидротехнических сооружений (ГТС) с применением геофизических данных 5/20/2020 Satbayev University (ИГиНГД)	10 (2)	0.18 %

from the Database Exchange Program (0.00 %) 

NO	TITLE	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)	
----	-------	---------------------------------------	--

from the Internet (4.87 %) 

NO	SOURCE URL	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)	
1	<a href="https://mklguo.ru/raznoe-2/rastitelnaya-tkan-vidy-tkanej-rastenij-biologiya-i-ih-funkczii-tablicza-dlya-6-klasa.html">https://mklguo.ru/raznoe-2/rastitelnaya-tkan-vidy-tkanej-rastenij-biologiya-i-ih-funkczii-tablicza-dlya-6-klasa.html</a>	<b>104 (6)</b>	<b>1.87 %</b>

2	<a href="https://sportdisain.ru/istoriya-razvitiya-metoda-kultury-tkaney/">https://sportdisain.ru/istoriya-razvitiya-metoda-kultury-tkaney/</a>	44 (4)	0.79 %
3	<a href="https://studfiles.net/preview/6873047/">https://studfiles.net/preview/6873047/</a>	39 (2)	0.70 %
4	<a href="http://asprus.ru/blog/opisanie-sortov-maliny-rannix-srednerannix-srednepozdnix-i-remontannyx/">http://asprus.ru/blog/opisanie-sortov-maliny-rannix-srednerannix-srednepozdnix-i-remontannyx/</a>	24 (2)	0.43 %
5	<a href="https://docplayer.ru/80779852-Osnovy-biotekhnologii.html">https://docplayer.ru/80779852-Osnovy-biotekhnologii.html</a>	24 (3)	0.43 %
6	<a href="http://rmeb.kz/journals/2470/79086.pdf">http://rmeb.kz/journals/2470/79086.pdf</a>	13 (1)	0.23 %
7	<a href="http://www.bio.bsu.by/fbr/files/kurs_lectures_plant_cell_culture.pdf">http://www.bio.bsu.by/fbr/files/kurs_lectures_plant_cell_culture.pdf</a>	12 (2)	0.22 %
8	<a href="https://www.bestreferat.ru/referat-256313.html">https://www.bestreferat.ru/referat-256313.html</a>	11 (1)	0.20 %

### List of accepted fragments (no accepted fragments)

---

NO	CONTENTS	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)
----	----------	---------------------------------------