

**Торутанов Павел Сергеевич**

лаборант-исследователь

**Антонова Елена Ивановна**

д-р биол. наук, профессор, директор

Научно-исследовательский центр фундаментальных  
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный  
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

DOI 10.31483/r-111565

## **ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННОГО САДОВО- ОГОРОДНОГО, ДЕКОРАТИВНОГО И ЦЕННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ СПИЛАНТЕС ОГОРОДНЫЙ (SPILANTHES OLERACEA)**

*Аннотация:* в статье приводятся данные микроклонального размножения спилантеса огородного (*Spilanthus oleracea*) после оптимизации протокола культивирования и адаптации к грунту.

*Ключевые слова:* спилантес огородный, микроклонирование, *in vitro*, фитогормоны, биотехнологические методы, каллус, среда Мурасиге – Скуга.

В настоящее время в медицинских целях используются почти 3000 видов различных растений, около 100 видов выращивают специально, остальные произрастают в дикой природе [2]. Природные запасы растительных ресурсов быстро истощаются, под угрозой исчезновения находятся ценные в фармакологическом отношении виды. В этой связи становится актуальным поиск способов ускоренного размножения редких видов.

Современные достижения в области клеточных технологий, в частности клональное микроразмножение, позволили в условиях *in vitro* неполовым путем клонировать растения генетически идентичные исходному экземпляру [4]. Ме-

тод обладает рядом преимуществ перед традиционными способами размножения – растения-клоны не инфицированы вирусами, от одного растения-донора можно получить большое количество потомков, растения быстрее развиваются и быстрее переходят к репродуктивной фазе, проводить работы можно в течение всего года и с экономией площадей, необходимых для выращивания посадочного материала [6].

Перспективный и хозяйственно ценный для человека вид – спилантес огородный (*Spilanthus oleracea*) – декоративное, пищевое и ценное лекарственное растение. Его активно применяется в косметологии и медицине, как природный ботокс. Спилантес включают в состав косметических средств, так как он улучшает выработку коллагена клетками кожи. В своем составе растение содержит спилантол, который используют в качестве анальгетика, анестетика, противовоспалительного и противогрибкового средства и для снятия мышечного напряжения. Так же, в небольших количествах спилантес можно использовать в кулинарии как салатное растение из-за пикантного острого вкуса листьев [10; 12]. В настоящее время известно, что в условиях культуры многие сорта спилантеса плохо размножаются обычными способами, по причине того, что семена имеют невысокую всхожесть, проростки часто поражаются различными грибковыми и вирусными заболеваниями.

*Цель исследования* – оптимизировать протокол микроклонального размножения спилантеса огородного (*Spilanthus oleracea*).

*Материалы и методы исследования.* В целях повышения эффективности дальнейших этапов размножения, была создана первичная культура целых растений из семян Спилантеса огородного *Spilanthus oleracea* [12]. Семена были простерилизованы – сначала окунались в мыльный раствор, затем в 70% этиловый спирт, затем в гипохлорид натрия. Остатки стерилизующих веществ смывали в 3-х порциях дистиллированной воды. После стерилизации экспланты можно высаживались на проавтоклавированные твердые агаризованные среды Murashige-Skuga, Шенка-Хильдебранта, Гамборга В-5 (ООО «Биолот» Россия) в

стерильных условиях ламинар-бокса. Культивирование происходило в климатической камере при температуре +25°C, фотопериод – 16 часов света + 8 часов темноты.

Процесс клонального микроразмножения включал 4 этапа:

- 1) выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры;
- 2) собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества меристематических клонов;
- 3) укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям;
- 4) выращивание растений и подготовка их к посадке в почву.

С полученного каллуса были изготовлены постоянные гистологические препараты, определяли ядерно-цитоплазматическое отношение. В работе использовались стандартные методики и красители [9].

Для подсчета ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО) в каллусных клетках использовался сканирующий микроскоп для лабораторных исследований Panoramic DESK. Расчеты производились по формуле:  $ЯЦО = S_{я}/S_{ц}$ , где:  $S_{я}$  – площадь ядра клетки;  $S_{ц}$  – площадь цитоплазмы.

*Результаты исследования.* Культивирование проводили в течение 8 недель. Первые проростки стали появляться на 5–7 сутки культивирования. Всхожесть семян на 3-ю неделю культивирования (рис. 1), на питательной среде Мурасиге-Скуга составила 90%, в среде Гамборга – 30% и в среде Шенка-Хильдебранта – 50%.

В целом, семена образуют проростки высотой до 2,5–3 см. с хорошо сформированными листьями 2–3-го порядка (рис. 2). Таким образом, для успешного выращивания и размножения в условиях *in vitro* семян спилантеса огородного *Spilanthus oleracea* наиболее подходит универсальная питательная среда Мурасиге-Скуга, обогащенная азотом, что увеличивает коэффициент размножения растений на 30% [13].

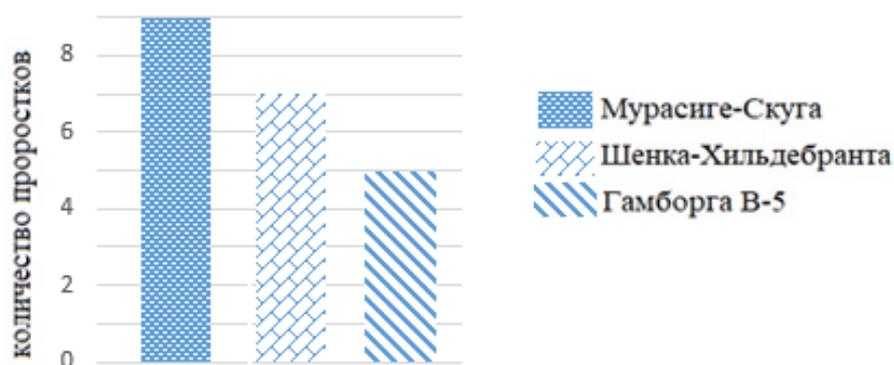


Рис. 1. Динамика роста семян Спилантеса огородного (*Spilanthes oleracea*) на разных питательных средах

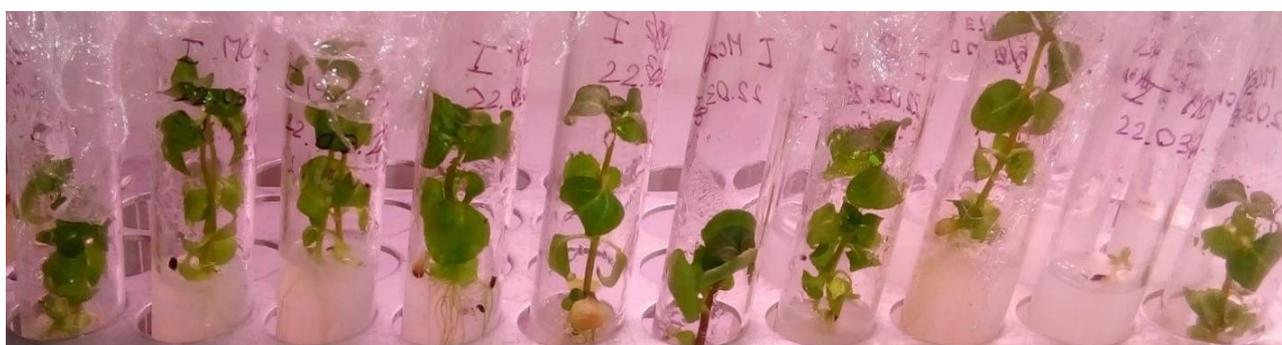


Рис. 2. Проростки Спилантеса огородного (*Spilanthes oleracea*) на питательной среде Murashige-Skuga

Для получения каллусной ткани проростки были пересажены на новую питательную среду. Из полученных проростков были отделены стеблевые и листовые экспланты. На листовые экспланты предварительно были нанесены поранения для ускорения образования каллуса. Все экспланты были высажены на новую (полную гормональную) питательную среду с добавлением фитогормонов: ауксинов и цитокининов в концентрации 1 мг/л ИУК и 6-БАП («Биолот» Россия). Ауксины способствовали дифференцировке, а цитокинины вызывали пролиферацию, что приводило к образованию каллусов.

Первые очаги каллусообразования появились через 21 день. На 28 сутки культивирования на полной гормональной среде образовались крупные «мозоли» каллуса на стеблевых эксплантах молодого растения. Каллусная ткань светлая, желто-белого цвета, рыхлой структуры клетки каллуса имеют хорошо

развитые крупные ядра и образуют в каллусной ткани отдельные очаги меристематической активности. В дальнейшем такой каллус хорошо разрастается, а процессы морфогенеза определяют развитие полноценного растения.

На листовых эксплантах первые очаги каллусообразования появлялись на 35-ые сутки культивирования на полной гормональной среде: каллус бело-зеленого цвета, рыхлой структуры (рис. 3). За 98 суток культивирования каллус образовали всего 5 эксплантов, что составляет 50% от общего числа.



Рис. 3. Каллус на листовых и стеблевых эксплантах Спилантеса огородного (*Spilanthes oleracea*)

На гистологических препаратах определяли ЯЦО (табл. 1). Из таблицы следует, что ЯЦО меньше 1, что указывает на высокий пролиферативный потенциал [1].

Таблица 1

Ядерно-цитоплазматическое отношение ядер каллуса Спилантеса огородного (*Spilanthes oleracea*) на 28 сутки культивирования на питательной среде Мурасиге-Скуга с фитогормонами – 1 мг/л ИУК и 6-БАП

Ся	48,28	40,06	52,61	17,51	65,10	73,59	47,91	20,06	53,26
Сц	1299,10	757,42	528,39	1169,28	944,83	1070,01	538,50	695,92	875,43
ЯЦО	0,037	0,052	0,099	0,067	0,068	0,068	0,088	0,028	0,064

В результате проведенного количественного подсчета соотношений разных групп клеток в составе клеточной популяции каллуса спилантеса огородного

(*Spilanthes oleracea*) находящихся в одном поле зрения микроскопа было выделено несколько форм (рис. 4, 5): округлые клетки (рис. 4 в, г) 70%; вытянутые (рис. 4 б, в) 20%; гигантские клетки не правильной формы (рис. 4 а) 10%.

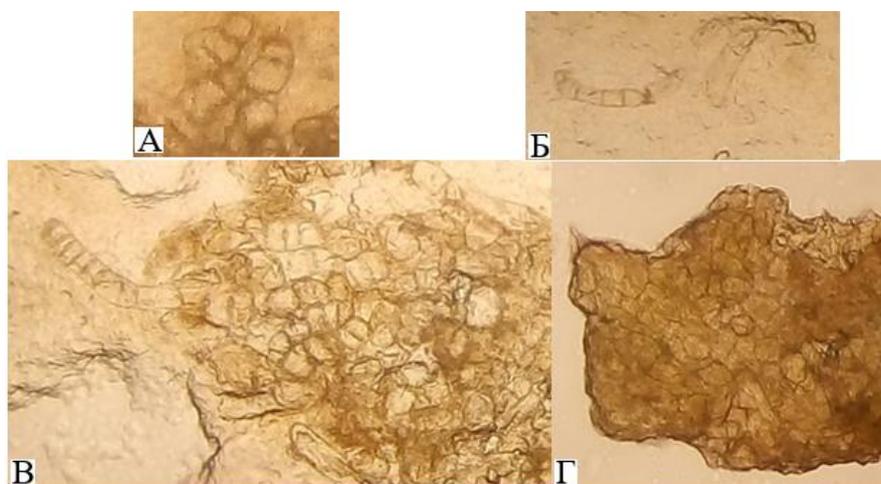


Рис. 4. Клетки каллуса Спилантеса огородного (без красителя) на 28 сутки культивирования на питательной среде Мурасиге-Скуга с фитогормонами – 1мг/л ИУК и 6-БАП



Рис. 5. Соотношение разных форм клеток каллуса Спилантеса огородного (*Spilanthes oleracea*) на 28 сутки культивирования на питательной среде Мурасиге-Скуга с фитогормонами – 1мг/л ИУК и 6-БАП

Для предупреждения старения каллусных клеток было произведено пассирование (пересадка) каллуса на свежую питательную среду того же состава (рис. 6). Первичный каллус отделяют от материнского растения и в дальнейшем культивируются отдельно. Культивирование каллуса проводили в течении 65 дней. Первый признаки морфогенеза появились на 3-ей неделе культивирования (рис. 7).



Рис. 6. Внешний вид каллуса Спилантеса огородного (*Spilanthes oleracea*), после пересадки на полную гормональную питательную среду Мурасиге-Скуга.

Срок культивирования 2 суток



Рис. 7. На каллусе Спилантеса огородного (*Spilanthes oleracea*) появились небольшие центры меристематической активности, в которых начали формироваться зачатки органов: стебли и первые листья, т.е. начинаются процессы органогенеза. Срок культивирования 4 недели на полной гормональной питательной среде Мурасиге-Скуга

При получении посадочного материала методом культуры *in vitro* наиболее сложным является процесс адаптации и перевода растений в нестерильные условия открытого грунта. Это объясняется тем, что в условиях *in vitro* влажность воздуха близка к насыщающей, отсутствует градиент водного потенциала между испаряющей поверхностью листа и атмосферой, снижается транспирация из-за дефицита CO<sub>2</sub>, у растений появляются нефункционирующие устьица, снижается осмотическое давление, происходит обезвоживание корней на агаре и нарушение водного баланса. Это приводит к появлению специфического приспособительного культурального фенотипа, отличающегося анатомически и физиологически от основных характеристик обычных растений [4; 6].

В нашем исследовании укоренившиеся растения после 65-и суток роста в условиях *in vivo*, высаживали в почвенный субстрат, состоящий из садовой

земли, торфа и перлита в соотношении 1:1:1 для адаптации. Выращивание производилось в условиях лаборатории. Растения высаживались в пластиковые контейнеры по 3–5 образцов, накрывались прозрачными крышками для предотвращения потерь влаги в начальный период (рис. 8). К моменту высадки в почвенный субстрат высота растений составляла 3 см. Культивирование в почве продолжалось 30 дней. Контейнеры с растениями размещались в климатической камере при тех же условиях: температура +25°C, фотопериод – 16 часов света + 8 часов темноты.

Процент прижившихся растений составил 60% (на вторую неделю). Рост и развитие растений в почве проходило без отклонений: укоренение произошло за 1-ю неделю, корневая и побеговая части достигли максимального развития за 14-ть суток.



Рис. 8. Проростки Спилантеса огородного (*Spilanthes oleracea*) в почвенном субстрате

Таким образом, оптимизированный нами протокол микроклонального размножения *in vitro* Спилантеса огородного (*Spilanthes oleracea*) показала, что в условиях искусственного освещения всхожесть на твердой агаризованной питательной безгормональной среде Мурасиге-Скуга (MS) составляет 90%. Наиболее предпочтительно использовать питательную среду с добавлением фитогормонов: ауксинов и цитокининов в концентрации 1 мг/л НУК и 6-БАП. Адаптация растений спилантеса огородного (*Spilanthes oleracea*) к почвенным условиям заняло 14 суток.

### ***Список литературы***

1. Бугара И.А. Морфологическое и цитохимическое исследование каллусных культур мяты / И.А. Бугара, А.М. Бугара // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского Серия «Биология, химия». – 2008. – Т. 21 (60). №1. – С. 44–52. – EDN SYMGXE
2. Бугара И.А. Клональное микроразмножение мяты в культуре стеблевых сегментов *in vitro* / И.А. Бугара // Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана: тематический сборник научных трудов. – 2004. – С. 97–103.
3. Бугара А.М. Получение каллусных культур Ломоноса виноградолистного (*Clematis vitalba* L.) и их анализ на содержание тритерпеновых гликозидов / А.М. Бугара, С.И. Чмелева, А.И. Сидякин // Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана: тематич. сб. науч. тр. / ред. колл. В.Г. Мишнев [и др.]. – Вып. 16. – Симферополь, 2006. – С. 36–41.
4. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
5. Васильченко Е.Н. Технология создания реституционных линий сахарной свёклы / Е.Н. Васильченко [и др.] // Вестник ВГАУ. – 2018. – Вып. 1 (56). – С. 42–501.
6. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
7. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений / Т.И. Дитченко. – Минск: БГУ, 2007. – 102 с. EDN TKVDIV
8. Тимофеева О.А. Клональное микроразмножение растений / О.А. Тимофеева, Ю.Ю. Невмержицкая. – Казань: Казанский университет, 2012. – 56 с.
9. Торутанов П.С. Оптимизация протокола изготовления, постоянных гистологических препаратов растений в качестве демонстрационного материала для образовательных учреждений / П.С. Торутанов, Е.И. Антонова. – Ульяновск: УлГПУ им. И.Н. Ульянова НИЦ ФППББ, 2023. – 416 с. EDN WINLJI
10. Шевелухи В.С. Сельскохозяйственная биотехнология / под ред. В.С. Шевелухи. – 2-е изд. – М., 2003. – 416 с.

11. Спилантес огородный, или акмелла: как вырастить красивую и съедобную диковинку [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://7dach.ru/Uleyskaya/spilantes-ogorodnyu-ili-akmella-kak-vyrastit-krasivuyu-i-sedobnuyu-dikovinku-299135.html> (дата обращения: 08.05.2024).

12. Спилантес — масляный кресс с любопытными головками соцветий [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.botanichka.ru/article/spilantes-maslyanyiy-kress-s-lyubopyitnymi-golovkami-sotsvetiy/> (дата обращения: 08.05.2024).

13. George E. F. Plant propagation by tissue culture / E.F. George, M.A. Hall, G.J. De Klerk. 3 rd Edition. Vol 1. The Background. Edited by Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2008.