

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение  
«Биотехнологический лицей №21»,  
программа дополнительного образования «Биотехнология растений»  
Новосибирская область, р.п. Кольцово

## **Микроклональное размножение лекарственных растений**

Автор: Цепляева Екатерина Владимировна, 10 «А» класс  
Научный руководитель: Несмелова Лилия Андреевна,  
педагог дополнительного образования  
МБОУ «Биотехнологический лицей №21»

р.п. Кольцово, 2025

## Содержание

Глоссарий .....	3
Словарь сокращений .....	3
Введение .....	4
1. Литературный обзор.....	5
1.1 Тимьян обыкновенный.....	5
1.2. Микрклональное размножение тимьяна обыкновенного .....	6
1.3 Календула обыкновенная.....	7
1.4. Микрклональное размножение календулы обыкновенной .....	7
2. Материалы и методы.....	9
3. Результаты.....	10
3.1. Результаты микрклонального размножения тимьяна обыкновенного.....	10
3.2. Результаты микрклонального размножения календулы обыкновенной.....	11
Заключение.....	12
Список литературы.....	13

## Глоссарий

- *In vitro* — исследования в пробирках, в условиях экспериментальной научной лаборатории.
- Ауксины — фитогормоны, которые стимулируют рост главного стебля и замедляют формирование боковых побегов.
- Гиббереллины — фитогормоны, которые служат для стимулирования плодообразования
- Среда Мурасиге и Скуга (МС) — питательная среда, используемая в лабораториях для выращивания растительных культур клеток или целых растений.
- Цитокинины — фитогормоны, стимулируют образование боковых побегов и корневой поросли.

## Словарь сокращений

1. ИУК — индолилуксусная кислота
2. ТДЗ — тидиазурон
3. БАП — 6-бензиламинопурин
4. ИМК — индолил-3-масляная кислота
5. Кинетин— 6-фурфуриламинопурин
6. МС — питательная среда Мурасиге и Скуга
7. НУК — 1-нафтилуксусная кислота

## Введение

С давних времен люди использовали для сохранения и профилактики здоровья, различные растения (травы, кору деревьев, ягоды, корешки и так далее). Растения содержат биологически активные вещества, которые вырабатываются в процессе их жизнедеятельности и способны накапливаться в их определённых органах: чаще всего в листьях, корешках и бутонах. Со временем такая медицина разделилась на народную и фармацевтическую. Сейчас также активно используется традиционная медицина, и развивается фармацевтика. Поэтому выращивание лекарственных растений, а конкретно календулы и тимьяна, остаётся актуальным.

Многие виды рода *Thymus L.* и рода *Asteraceae* являются ценными лекарственными и ароматическими растениями, содержащими биологически активные вещества, которые оказывают антиоксидантное, обезболивающее, отхаркивающее и иммуномодулирующее действие. Лекарственные препараты на основе тимьяна применяются при расстройствах пищеварения, метеоризме, простудных заболеваниях, гриппе, воспалительных заболеваниях органов дыхания, нервных расстройствах, при заболеваниях кожи или ротовой полости (Тевфик, 2021). Лекарственные препараты на основе календулы обладают дезинфицирующими, противовоспалительными, антимикробными, успокаивающими, желчегонными свойствами.

Решение многих проблем селекции растений, а также поддержания биоразнообразия природной флоры в настоящее время невозможно без привлечения биотехнологических методов. Одним из таких широко используемых приемов является клональное микроразмножение, которое позволяет быстро размножить ценные генотипы, получить генетически однородный, оздоровленный посадочный материал и значительно увеличить коэффициент размножения растений (Егорова, Тевфик, 2023).

**Цель** данного исследования – получение микроклонов календулы и тимьяна.

### **Задачи:**

1. Изучить литературу по микроразмножению календулы и тимьяна;
2. Подобрать материал для введения в культуру *in vitro*;
3. Подобрать способ стерилизации;
4. Подобрать питательные среды и концентрации фитогормонов для дальнейшего микроразмножения.

## 1. Литературный обзор

### 1.1 Тимьян обыкновенный

Тимьян обыкновенный (рис.1) — низкорослое многолетнее растение, принадлежащее роду семейства Яснотковые (*Lamiaceae*) с небольшими ароматными овальными листьями серовато-зелёного цвета, тонкими древесными стеблями и гроздьями мелких светло-пурпурных цветов. Представители рода – низкорослые ароматические кустарнички и полукустарнички. Растение не боится засухи и не требует обильного полива. Высота взрослого тимьяна может достигать 30 см.



**Рис.1.** Тимьян обыкновенный

Это растение обладает огромным количеством полезных свойств:

- эфирное масло тимьяна обладает противовоспалительным действием,
- отвар этой травы применяют в качестве отхаркивающего средства при лечении ОРВИ, если болезнь сопровождается кашлем;
- чай с чабрецом может стать помощником при тошноте, спазмах, вздутиях и запорах, потому что тимол и карвакрол (вещество, получаемое из масел тимьяна, способное справиться с грибком, а также обладает выраженным противовоспалительным и обезболивающим эффектом) в составе тимьяна хорошо влияют на пищеварительную систему;
- чабрец обладает высокой антиоксидантной активностью, а также богат витамином С;
- обладает доказанными антибактериальными, антисептическими и антимикробными свойствами;
- чай с чабрецом пьют при желании похудеть, так как он подавляет аппетит;

- обладает свойством повышать восприимчивость организма к инсулину, становясь средством профилактики диабета второго типа;

- предупреждает анемию благодаря высокому содержанию железа.

Именно из-за такого набор полезных качеств, тимьян следует массово размножать для использования на производстве лекарственных препаратов (Ильина, 2006; Кортиков, Кортиков, 2002).

## **1.2. Микроклональное размножение тимьяна обыкновенного**

На основе литературных данных можно увидеть, что метод микроклонального размножения один из способов выращивания тимьяна.

Дауленова Мейржан с коллегами (2015) проводила работу по сравнению способов микроклонального размножения тимьяна ползучего. В первом способе, использовали комбинированный метод *in vitro* и гидропоники. Для эксперимента, в качестве эксплантов, были взяты апикальные сегменты проростков, образовавшихся из проросших семян, которые в последствии помещали на питательные среды МС (Murashige, Skoog, 1962) и  $\frac{1}{2}$  МС, с добавлением регулятора роста ИМК, для образования корней в концентрации 0,1 мг/л. Также, в качестве эксплантов были взяты сегменты активно растущих побегов. Для микроклонирования была взята питательная среда N. Также ученые для размножения тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum L.*), в условиях *in vitro*, использовали экспланты для микроразмножения длиной 0,4-0,5 см (апикальные сегменты проростков, образовавшиеся из проросших семян) и помещали на питательную среду  $\frac{1}{2}$ МС, где уменьшили вдвое содержание микро- и макроэлементов, и добавили 0,1 мг/л ИМК. Через 7-10 дней наблюдалось образование корней, а микрорастения — на 28-30 день. Затем с полученных микрорастений брали экспланты и сажали на питательную среду МС с добавлением 0,1 мг/л ИМК. По данному способу из одного экспланта можно получить в течение 9 месяцев 30 000 микрорастений

Способность к регенерации побегов чечевицы была проверена учеными Khawar K.M., Özcan, S. (2002) на среде МС, содержащей 0,225 мкМ/л ТДЗ, с использованием эксплантов семядольных узлов. Авторы отметили, что 0,225 мкМ/л ТДЗ положительно влияет на развитие побегов из каллусов на основе семядольных узлов. Регенерированные побеги вырезали и культивировали на среде МС с добавлением 1,25 мкМ/л кинетина для укоренения, затем саженцы акклиматизировались к условиям окружающей среды, а затем высаживались в тепличных условиях.

### 1.3 Календула обыкновенная

Календула обыкновенная (рис. 2) — однолетние, двулетние или многолетние травы и полукустарники, железисто-опушённые, с ветвистыми стеблями и мощной корневой системой. Листья цельные, очередные, продолговатые. Принадлежит роду семейства Астровые (*Asteraceae*). Фармакологические исследования выявили седативное, противосудорожное, гипотензивное, противовоспалительное действие препаратов на основе соцветий календулы. Также учёные установили положительный эффект препаратов календулы при неврозах, болезнях желчных путей, гипертонии, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Настой растения очень полезен и при простудах, им хорошо полоскать горло при респираторных заболеваниях, воспалении слизистой оболочки полости рта, закапывать в нос при насморке. Отличные результаты получены и при лечении препаратами календулы воспалительных и инфекционных заболеваний глаз, таких как конъюнктивит, ячмень и др. Цветки календулы показывают прекрасные результаты и при наружном применении, оказывая антисептическое, противовоспалительное, ранозаживляющее действие при гнойных процессах на коже, незаживающих ранах и ожогах. Чаще всего используют водный настой или спиртовую настойку соцветий (Абрамчук, 2004; Кушина, Карпухин, 2019; Елисеева, Ткачева, 2018).



**Рис.2.** Календула обыкновенная (фото из интернета)

### 1.4. Микрклональное размножение календулы обыкновенной

Календула очень неприхотливое растение, которое не требует особых условий выращивания, оно широко распространено и даже иногда ложно считается сорняковым. Именно из-за этого не так много людей задумываются о том, что календула нуждается в особом размножении и выведении генетически чистых микрклонов, которые можно использовать для производства лекарств. Поэтому в литературных источниках практически отсутствует информация о введении календулы в культуру *in vitro*.

Турецкие ученые (Çöçü, Uranbey at etc., 2004) использовали экспланты гипокотилия, семядоли и семядольных узлов *Calendula officinalis*, которые культивировали на среде МС с добавлением различных концентраций ТДЗ, кинетина, НУК и ИМК для лучшего микроразмножения. Наибольшая частота регенерации придаточных побегов была достигнута у эксплантатов гипокотилия и семядолей на среде МС с добавлением 0,75 мг/л ТДЗ и 0,25 мг/л или 0,50 мг/л ИМК. Также хороший результат получился из семядольных узлов на среде МС с добавлением 0,75 мг/л TDZ и 0,05 мг/л НУК или 2 мг/л кинетина и 1 мг/л НУК. Побеги укореняли на среде МС с добавлением 1 мг/л НУК. Наконец, укоренившиеся ростки переносили в горшки.

Португальские ученые (2012), для введения в культуру *in vitro* брали семена *Calendula officinalis* L. Семенную оболочку полностью удаляли и проводили поверхностную стерилизацию, затем помещали эксплант на среду МС. 45-дневные микроклоны пересаживали на модифицированную МС: сокращали до половины количества  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и  $\text{KNO}_3$ , добавляли 20 г/л сахарозы, 1,3 мкМ/л тиамина HCl, 3 мкМ/л пиридоксина, 4,1 мкМ/л никотиновой кислоты, 0,6 мМ/л миоинозитола, агара 7,8 г/л. рН питательной среды  $5,8 \pm 0,1$ . Самый высокий уровень укоренения (80%) был получен при добавлении НУК 0,1 мг/л.

## 2. Материалы и методы

Для исследования были взяты семена тимьяна обыкновенного и экспланты календулы обыкновенной.

Семена тимьяна подвергали двухэтапной стерилизации в стерильном ламинар-боксе. Сначала семена обработали в 20% растворе Domestos в течении 40 минут, затем промыли стерильной дистиллированной водой 3 раза, после была проведена обработка в 70% растворе этанола в течении минуты, затем семена аккуратно высаживали на питательные среды с различной концентрацией фитогормонов НУК (1 мкМ/л и 2мкМ/л) и БАП (1мкМ/л), а также на среды без содержания регуляторов роста.

Изначально мы вводили календулу обыкновенную в культуру *in vitro* семенами, но из-за наличия сильной внутренней инфекции было принято решение взять экспланты. Материал (пазушные и апикальные почки) также подвергали двухэтапной стерилизации. Промывали в 20% растворе Domestos 30 минут, затем в автоклавированной дистиллированной воде 3 раза, потом обрабатывали 3% раствором перекиси водорода в течении минуты. Стерильные экспланты помещали на среду с содержанием цитокинина БАП 1 мкМ/л.

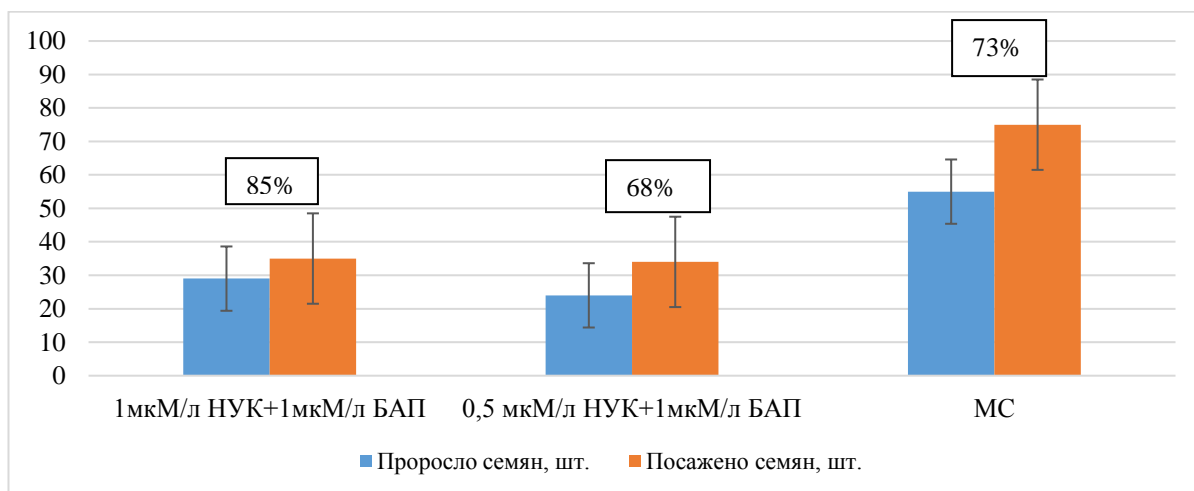
Посаженный материал помещали в климатическую камеру, где были созданы условия контролируемой температуры и освещения.

### 3. Результаты

#### 3.1. Результаты микроклонального размножения

##### тимьяна обыкновенного

Нами было получено множество здоровых микропобегов тимьяна обыкновенного. Общий коэффициент всхожести составил 75%.



**Рис. 3.** Результаты всхожести семян тимьяна обыкновенного на питательных средах с разным содержанием регуляторов роста

На рисунке 3 представлены результаты всхожести семян тимьяна обыкновенного на среде Мурасиге и Скуга с различными концентрациями фитогормонов. Наилучший прирост тимьяна был на питательной среде с добавлением 1 мкМ/л НУК и 1 мкМ/л БАП, что составило 85% и на чистом МС 73%, а наихудший показатель был на среде с добавлением 0,5 мкМ/л НУК+1 мкМ/л БАП, 68%.

Такой результат говорит о том, что для прорастания семян тимьяна требуется одинаковое количества цитокинина и ауксина. Так же можно проращивать семена и без добавления фитогормонов.

### 3.2. Результаты микроклонального размножения календулы обыкновенной

В связи, с высокой инфицированностью семенного материала, мы использовали экспланты апикальных и пазушных почек. В результате был получен образец успешно введенного в культуру *in vitro* экспланта календулы, взятого с апикальной почки, который в последствии был использован для продолжения микроклонального размножения (рис.4).



**Рис.4.** Фотография проросшей апикальной почки календулы обыкновенной

Изначальная выживаемость первой серии эксплантов составила 50%, но этого хватило для последующего культивирования календулы.

## **Заключение**

Таким образом, для введения в культуру *in vitro* календулы обыкновенной лучше брать эксплант верхушечной почки, а для тимьяна обыкновенного можно брать семена.

На первом этапе микроклонального размножения тимьяна обыкновенного лучше всего использовать питательную среду Мурасиге и Скуга с добавлением 1 мкМ/л НУК и 1 мкМ/л БАП, а для календулы хорошо подходит среда с содержанием 1 мкМ/л БАП.

## Список литературы

1. Абрамчук А.В. Культивируемые лекарственные растения. Ассортимент, свойства, технология возделывания / А.В. Абрамчук, С.К. Мингалев. Екатеринбург. 2004. 292 с.
2. Дауленова М.Ж. и др. Способ микроклонального размножения тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) *in vitro* // Номер инновационного патента: 29919, от 15.06.2015
3. Кушина И.В., Карпухин М.Ю. Календула – популярное лекарственное и декоративное растение // Аграрное образование и наука. 2019
4. Тевфик А.Ш. Клональное микроразмножение тимьяна обыкновенного *in vitro* – методические рекомендации / А.Ш. Тевфик, Н.А. Егорова. Симферополь. ИТ «АРИАЛ», 2021. 28 с.
5. Егорова Н.А., Тевфик А.Ш. Клональное микроразмножение некоторых видов рода *Thymus* L. / *Turczaninowia*. 2023. Т. 26. № 3. 5–13с.
6. Ильина Т.А. Лекарственные растения России. М.: Эксмо, 2006. 192.
7. Кортиков В.Н., Кортиков А.В. Справочник лекарственных растений. – Ростов-на-Дону.: Проф-Пресс, 2002. 800 с.
8. Елисеева Т., Ткачева Н. Календула (Ноготки, лат. *Caléndula*) // Журнал здорового питания и диетологии ([Journal.edaplus.info](http://Journal.edaplus.info)). 2018. Т.4. № 2. 2-11с.
9. Victório, C.P., Lage, C.S. and Sato, A. Tissue culture techniques in the proliferation of shoots and roots of *Calendula officinalis* // *Revista Ciência Agronômica*. 2012. V.43. P.539-545.
10. Khawar, K.M., Özcan, S. High frequency shoot induction from cotyledonary node explants of different lentil (*Lens culinaris* Medik) genotypes and *in vitro* micrografting // *Biotechnol. Biotechnol. Equipment*. 2002. V.16. P.12-17.
11. Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. 1962. V.15. P.473-479
12. Çöçü S., Uranbey S., İpek A., Khawar K.M. at all. Adventitious shoot regeneration and micropropagation in *Calendula officinalis* L. // *Biologia planetarium*. 2004. V48. №3. P. 449-451.