

ПАРАМЕТРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ФИТОХИМИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ РАСТЕНИЙ *MARSILEA HIRSUTA* R. BR. В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

М.В. Саркисова

магистрант,

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва, Россия)

E-mail: sarkisowa.marina@yandex.ru

М.Ю. Чередниченко

к.б.н., доцент,

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва, Россия)

E-mail: michael.tsch@gmail.com

Актуальность. Ухудшение экологической обстановки в мире приводит к сокращению природных популяций ценных лекарственных и декоративных растений, в том числе популяции *Marsilea hirsuta*. Для сохранения природных популяций *M. hirsuta* предлагается использовать клональное микроразмножение с учетом физиолого-биохимических особенностей аseptических растений.

Цель работы. Подбор оптимальных условий культивирования растений *M. hirsuta in vitro* и проведение первичного фитохимического скрининга растительных экстрактов.

Материал и методы. Изолированные экспланты аseptических растений *M. hirsuta* культивировали на питательных средах с различным минеральным составом, кислотностью и консистенцией. Первичный фитохимический скрининг проводили по стандартным методикам.

Результаты. Применение 2-узловых черенков приводит к формированию максимального числа (7) микропобегов в конце пассажа. Уменьшение кислотности до pH 4 не оказывает существенного влияния на эффективность индукции образования адвентивных побегов, их морфологию и высоту. При pH 6 или 7 формируются ослабленные растения с бледно-зелеными листьями и слабо развитой корневой системой. На третьи сутки на жидкой среде растения развиваются лучше, чем на твердой. К седьмым суткам показатели на обоих вариантах сред выравниваются, а после десятых суток рост на жидкой среде замедляется. Первичный фитохимический скрининг растительных экстрактов показал наличие таких компонентов, как танины и фенольные соединения, флавоноиды, алкалоиды и протеины.

Выводы. Оптимальным размером черенка является два узла. Для получения максимального числа узлов и максимальной длины побега за минимальное время культивирования рекомендуется выращивание *M. hirsuta* на жидкой питательной среде (pH 4-5) с пересадкой каждые десять дней. Первичный фитохимический анализ показал наличие в *M. hirsuta* некоторых ценных веществ.

Ключевые слова: *Marsilea hirsuta*, *in vitro*, клональное микроразмножение, растительный экстракт, фитохимический скрининг.

Для цитирования: Саркисова М.В., Чередниченко М.Ю. Параметры культивирования и фитохимический скрининг растений *Marsilea hirsuta* R. BR. в условиях *in vitro*. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(6):52–56. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-06-08>

Аквариумным аналогом ландшафтного дизайна для садов и парков является акваскейпинг. При такой организации пространства главная роль отведена растениям. Начинающие аквариумисты отдают предпочтение растениям, способным за короткое время и при средней освещенности быстро покрыть грунт. Одним из таких растений является марсилия волосистая (*Marsilea hirsuta* R. Br.), семейство Marsileaceae. Это небольшой водный папоротник с тонким стелющимся стеблем – корневищем, от которого отходят в два ряда тонкие, прямостоячие черешки, несущие сложные листья [1]. Наиболее характерной чертой этой груп-

пы папоротников является то, что часть их жизни проходит в воде, часть – на суше.

Помимо ценности в качестве декоративных растений, представители рода *Marsilea* L. представляют собой огромный резервуар биологически активных веществ с различными химическими свойствами, которые широко применяют как в научной, так и в народной медицине. Например, некоторые племена Индии употребляют в пищу растения рода *Marsilea* для лечения и профилактики множества заболеваний [2]. В связи с ухудшением экологической обстановки в мире природные популяции ценных лекарственных и декоративных

растений, в том числе популяции *M. hirsuta*, сокращаются [3].

Для сохранения природных популяций, на фоне большого интереса к данному растению со стороны аквариумистики и фармацевтики, можно предложить использование технологии клонального микроразмножения. Преимущества данной технологии перед классическими способами размножения – получение генетически однородного, свободного от вирусов посадочного материала, высокий коэффициент размножения, а также проведение работ в течение всего года. Эти преимущества позволяют создавать необходимое количество растений как для декоративных целей, так и для выделения ценных вторичных метаболитов, включая активные фармацевтические ингредиенты, а также реинтродуцировать впоследствии размноженные *in vitro* растения в природу для восстановления численности популяции [4].

Основной источник вторичных соединений у марсилии – корневища. В их состав входят флавоноиды, фенольные кислоты, различные виды воска, обнаружены высшие жирные кислоты и высшие алифатические углеводороды, а также пролин [5]. По результатам исследований, проведенных *in vitro* на растениях вида *M. quadrifolia* L. (марсилия четырехлистная), можно сделать вывод, что представители этого рода не только хорошо культивируются в асептических условиях, но и способны накапливать в корневище ценные вторичные метаболиты [4, 6, 7]. Последующий сравнительный анализ изоферментных спектров доказывает, что в регенерировавших растениях *in vitro* энзимы обладают более интенсивной каталитической активностью, чем в растениях *in vivo* [4]. Следует отметить, что *M. hirsuta* изучена гораздо меньше, чем *M. quadrifolia*,

Ц е л ь р а б о т ы – подбор оптимальных условий культивирования растений *M. hirsute in vitro* и проведение первичного фитохимического скрининга растительных экстрактов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили асептические растения *M. hirsuta* компании «Tropical». Изолированные экспланты, состоящие из сегмента побега с 1–3 узлами, культивировали на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС). В экспериментах по изучению влияния кислотности среды на рост растений экспланты высаживали на пита-

тельные среды с половинным содержанием базовых компонентов МС (1/2 МС) с рН 4–7. При этом рН питательной среды регулировали при помощи растворов 1 н. NaOH и 10% HCl. При определении влияния консистенции питательной среды на рост растений экспланты помещали на питательные среды 1/2 МС с добавлением (8 г/л) и без добавления агар. Все манипуляции с асептическим растительным материалом проводили в ламинар-боксах «ЛШ-1» (ООО «Компания Биоком», Россия).

Для получения экстракта *M. hirsuta* свежий растительный материал растирали в керамической ступке и разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1:2,5 (масса:объем); смесь перемешивали и помещали в водяную баню LOIP LB-140 (ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Россия) при температуре 90 °С на 30 мин. Затем экстракт процеживали через два слоя марли и центрифугировали на микролитровой центрифуге HETTICH Mikro 120 (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Германия) при 14000 g 15 мин. Данная методика экстракции позволяет получить максимальный выход вторичных соединений в экстрагент [8]. Первичный фитохимический скрининг проводили в пробирках для центрифугирования типа «Eppendorf» в соответствии со стандартными методиками: танины и общая сумма фенольных соединений [9], флавоноиды [10], сапонины [9], алкалоиды [11], восстанавливающие сахара [12], протеины [13] и гликозиды [10]. Для качественных реакций использовались следующие реактивы: фенольные соединения – 3%-ный спиртовой раствор хлорида железа, 10%-ный водный раствор ацетата свинца; сапонины – дистиллированная вода; алкалоиды – концентрированная соляная кислота и реактив Драгендорфа; восстанавливающие сахара – растворы Фелинга А и В; протеины – 10%-ный раствор гидроксида натрия и 1%-ный раствор сульфата меди; гликозиды – ледяная уксусная кислота, 5%-ный раствор хлорида железа (III) и концентрированная серная кислота. По изменению окраски, выпадению осадка или образованию кольца на границе сред определяли наличие того или иного класса соединений.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel. Данные на рисунках и в тексте представлены в виде средних (\bar{x}) с указанием доверительного интервала ($\pm CI$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность клонального микроразмножения зависит от условий культивирования растений и, прежде всего, от гормонального и минерального состава питательной среды, ее кислотности и консистенции, а также типа/размера первичного экспланта. На начальном этапе необходимо было установить оптимальный размер первичного экспланта для получения максимального коэффициента размножения. Динамика образования адвентивных узлов и формирования микрорастений на первичном экспланте приведены на рис. 1 и 2.

Как следует из полученных данных, применение 2-узловых черенков приводило к формированию в конце периода культивирования 7 шт. микропобегов, что превышало показатели 1- и 3-узловых эксплантов в 1,5–3 раза (4,7 шт. и 2,1 шт. соответственно).

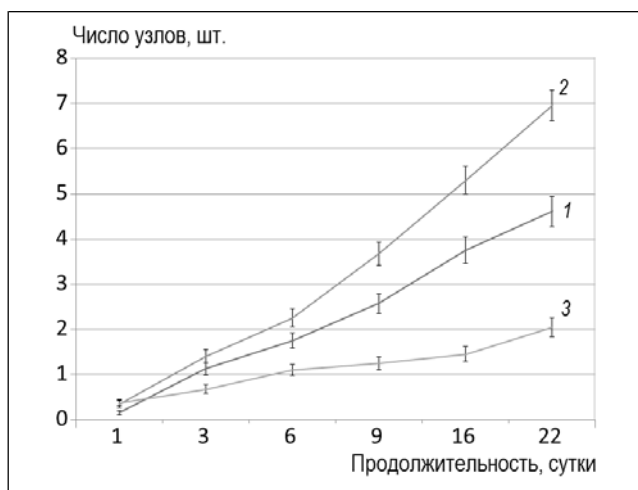


Рис. 1. Число адвентивных узлов *M. hirsuta* при различном размере первичного экспланта: 1 – 1 узел; 2 – 2 узла; 3 – 3 узла

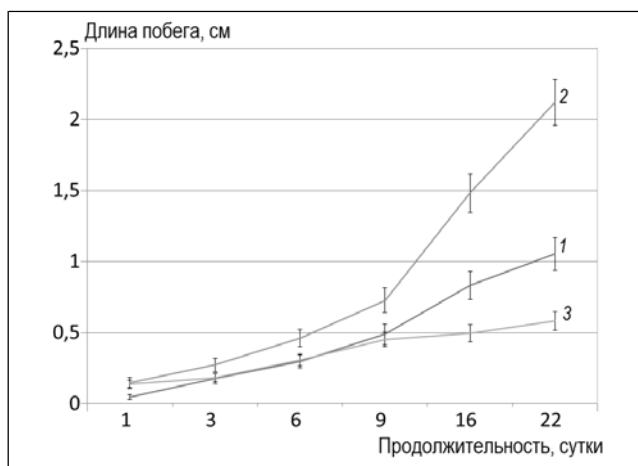


Рис. 2. Длина адвентивных микропобегов *M. hirsuta* при различном размере первичного экспланта: 1 – 1 узел; 2 – 2 узла; 3 – 3 узла

Сформировавшиеся побеги характеризовались активным ростом, и их длина составляла 2,3 см. В остальных опытных вариантах формировались растения с укороченными микропобегами, длина которых не превышала 0,6–1,1 см. Таким образом, оптимальным размером экспланта можно считать 2 узла; экспланты данного размера использовали при проведении дальнейших экспериментов.

Одним из важных факторов, регулирующих рост марсилии в аквариуме, является кислотность среды, которая оказывает влияние на доступность элементов питания, а также на внешний вид растения (число листочков в сложном листе, их окраска, высота растения и др.) [7, 14]. Было изучено влияние кислотности питательной среды (рН 4–7) на общее количество адвентивных (новых) узлов. Контрольным вариантом являлось значение рН 5, как типичное для аквариумов.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что уменьшение кислотности среды до рН 4 не оказывает существенного влияния на эффективность индукции образования адвентивных побегов, их морфологию и высоту. Учитываемые показатели находились на уровне контрольного варианта, например, длина побегов при рН 5 составила $4,8 \pm 0,9$ см, а при рН 4 – $4,2 \pm 1,3$ см. Кроме того, в этих вариантах наблюдалось формирование мощной корневой системы. Причем в контрольном варианте (рН 5) формировались длинные корни, которые равномерно распределялись по дну культурального сосуда. При увеличении рН среды до 6 и 7 наблюдали формирование ослабленных растений с листьями бледно-зеленой окраски и слабо развитой корневой системой. Длина микрорастений в этих условиях не превышала $2,1 \pm 0,8$ см. Кроме того, в нейтральных условиях выращивания растения *M. hirsuta* характеризовались низким коэффициентом размножения, который составил в среднем от 3 до 4.

M. hirsuta является растением-«амфибией», произрастающим как на суше, так и в воде. В естественных условиях ее корни всегда плотно погружены как в почвенный, так и водный субстрат. Однако в условиях *in vitro*, как правило, культивирование эксплантов происходит на твердой питательной среде, и не всегда учитывается влияние использования жидкой питательной среды на важные морфофизиологические процессы.

Исходя из совокупности всех этих фактов, были проведены исследования влияния консистенции питательной среды на динамику роста

побегов *M. hirsuta* и коэффициент размножения. Результаты представлены на рис. 3 и 4.

В результате проведенных исследований установлено, что уже на 3-и сутки после посадки видны существенные различия при культивировании на жидкой и твердой средах (рис. 3 и 4). Однако через неделю скорость роста и образования адвентивных микропобегов на двух опытных вариантах сравнивается, а потом растения на жидкой среде замедляют свой рост, при этом активный рост на твердой питательной среде продолжается.

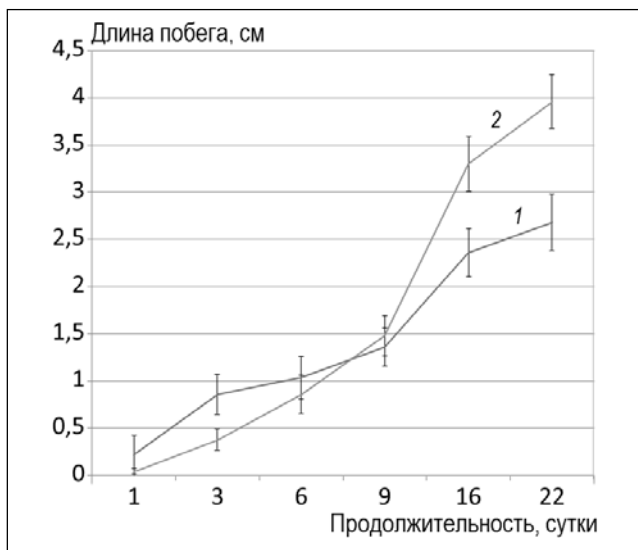


Рис. 3. Длина адвентивных побегов при культивировании *M. hirsuta* на питательных средах различной консистенции: 1 – в жидкой среде; 2 – в твердой среде

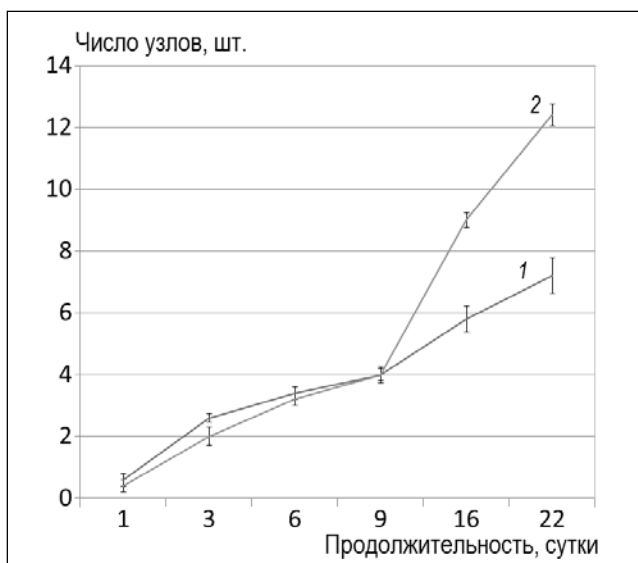


Рис. 4. Число адвентивных узлов *M. hirsuta* на питательных средах различной консистенции: 1 – в жидкой среде; 2 – в твердой среде

Таким образом, выбор консистенции среды будет зависеть от конечной цели. Если необходимо за минимальный срок получить максимальный прирост растительного материала, то выращивать лучше на жидкой среде с последующей пересадкой один раз в 10 суток, так как скорость роста на жидкой среде замедляется по истечении данного срока. Для долгосрочного выращивания с минимальным числом пересадок лучше культивировать растения *M. hirsuta* на твердой питательной среде.

В заключение был проведен первичный фитохимический скрининг растительных экстрактов, полученных из растений-регенерантов *M. hirsuta*, с целью выявления активных химических компонентов, таких как алкалоиды, гликозиды, фенольные соединения (включая отдельные тесты на флавоноиды и танины), восстанавливающие сахара. В результате эксперимента установлено, что в экстракте содержатся следующие классы веществ: фенольные соединения (в том числе танины и флавоноиды), алкалоиды и протеины.

ВЫВОДЫ

Культура *in vitro* является удобной системой для быстрого получения необходимого количества растений *M. hirsuta*. Оптимальный размер черенка – 2 узла. Для получения максимального числа узлов и максимальной длины побега за минимальное время культивирования рекомендуется выращивание *M. hirsuta* на жидкой питательной среде (pH 4–5) с пересадкой каждые 10 дней. Первичный фитохимический анализ показал наличие в *M. hirsuta* таких веществ, как фенольные соединения (в том числе танины и флавоноиды), алкалоиды и протеины.

ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

1. Masatoshi A., Tsuyoshi O. A master of aquatic plants. Nature Aquarium in formation magazine. 2012; 46: 9–38.
2. Soni P. *Marsilea quadrifolia* Linn. A valuable culinary and remedial fern in Jaduguda, Jharkhand, India. International Journal of Life Science & Pharma Research. 2012; 2(3): 99–104.
3. Dihoru G., Dihoru A. Plante rare, periclitatesiendemicein Flora României–Listarosië. Acta Botanica HortiBucurestiensis. 1993–1994: 173–197.
4. Banciu C., Carasan M.E., Brezeanu A. *In vitro* propagation of the endangered species *Marsilea quadrifolia* L. – morphological and biochemical analysis of the regenerates. Romanian Biotechnological Letters. 2009; 14(1): 4139–4145.
5. Vijayalakshmi M., Kiruthika R., Bharathi K., Ruckmani K. Phytochemical screening by LC-MS analysis and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Marsilea quadrifolia* plant extract. International Journal of Pharm Tech Research CODEN (USA). 2015; 8(9):148–157.

6. Rolli E., Brunoni F., Marieschi M. et al. *In vitro* micropropagation of the aquatic fern *Marsilea quadrifolia* L. and genetic stability assessment by RAPD markers. *Plant Biosystems*. 2015; 149(1): 7–14.
7. Shekhawat M.S., Manokari M. Direct Organogenesis from Rhizome Explants in *Marsilea quadrifolia* L.: A Threatened Fern Species. *Advances in Biology*. 2015; 1: 1–6.
8. Choudhury J., Majumdar S., Roy S., Chakraborty U. Antioxidant activity and phytochemical screening of two edible wetland pteridophytes *Diplazium esculentum* (Retz) Sw and *Marsilea minuta* L.–a comparative study. *World journal of pharmaceutical and medical research*. 2017; 3(9): 195–203.
9. Aiyegoro O.A., Okoh A.I. Preliminary Phytochemical Screening and *In vitro* Antioxidant Activities of the Aqueous Extract of *Helichrysum longifolium* DC. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2010; 10(21): 1–8.
10. Baghel P.S., Ray S. Preliminary phytochemical screening of certain aphrodisiac plants used in traditional system of medicine. *International Journal of Botany Studies*. 2017; 2(5): 33–36.
11. Kumar A., Ilavarasn R., Jayachandran T. et al. Phytochemical investigation on a tropical plant. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2009; 8: 83–85.
12. Fehling's Test– Definition, Principle, Procedure, Result, Uses [Электронный ресурс]. URL: <https://microbenotes.com/fehling-test/> (дата обращения 09.01.2021).
13. Biuret Test for Protein [Электронный ресурс]. URL: <https://microbenotes.com/biuret-test-for-protein/> (дата обращения 09.01.2021).
14. Саркисова М.В., Чередниченко М.Ю. Оценка анатомо-морфологических особенностей растений *Marsilea hirsuta* R. Br. в культуре *in vitro* и *ex vitro*. *Естественные и технические науки*. 2020; 4(142): 35–38 (Sarkisova M.V., Cherednichenko M.Yu. Ocenka Assessment of anatomical and morphological features of *Marsilea hirsuta* R.Br. plants in culture *in vitro* and *ex vitro*. *Estestvennye i tehniczeskie nauki*. 2020; 4(142): 35–38).

Поступила после доработки 13 апреля 2021 г.

CULTIVATION PARAMETERS AND PHYTOCHEMICAL SCREENING OF PLANTS *MARSILEA HIRSUTA* R. BR. UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

© M.V. Sarkisova, M.Yu. Cherednichenko, 2021

M.V. Sarkisova

MSc-student, Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy (Moscow)

M.Yu. Cherednichenko

Ph.D. (Biol.), Associate Professor,

Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy (Moscow)

Actuality. To preserve natural populations of *Marsilea hirsuta* it is possible to propose the use of clonal micropropagation, taking into account physiological and biochemical characteristics of aseptically grown plants.

Aim. Selection of optimal conditions for *in vitro* cultivation of *M. hirsuta* plants and primary phytochemical screening of plant extracts.

Material and methods. Isolated explants of *M. hirsuta* aseptically grown plants were cultivated on nutrient media with various mineral composition, acidity and consistency. Primary phytochemical screening of extracts was carried out according to standard methods.

Results. The use of 2-nodal cuttings led to the formation of maximum amount of micro-shoots (7). A decrease in acidity to pH 4 has no significant effect on the efficiency of adventitious shoots formation, their morphology and height. At pH 6 or 7, weakened plants with pale green leaves and a poorly developed root system are formed. On the 3rd day on a liquid medium, the plants develop better than on a solid one; by the 7th day, the indicators on both media variants are equalized, after the 10th day, growth on a liquid medium slows down. Primary phytochemical screening of plant extracts showed the presence of components such as tannins and phenolic compounds, flavonoids, alkaloids and proteins.

Conclusion. The optimal cutting size is 2 nodes. To obtain the maximum number of nodes and shoot length for the minimum cultivation time, it is recommended to grow *M. hirsuta* on a liquid nutrient medium (pH 4...5) with a transplant every 10 days. Primary phytochemical analysis showed the presence of some valuable compounds.

Keywords: *Marsilea hirsuta*, *in vitro*, clonal micropropagation, plant extract, primary phytochemical screening.

For citation: Sarkisova M.V., Cherednichenko M.Yu. Cultivation parameters and phytochemical screening of plants *Marsilea hirsuta* R. Br. under *in vitro* conditions. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2021; 24(6): 52–56. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-06-08>