



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



ОСОБЕННОСТИ АНАТОМО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ *SCHISANDRA CHINENSIS* (TURCZ.) BAILL. И *ELEUTEROCOCCUS SENTICOSUS* MAXIM. ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Марамохин Э.В., Малахова К.В., Зонтиков Д.Н.

ФГБОУ ВО «Костромской государственный университет», 156005, г. Кострома, ул. Дзержинского, 17, Россия,
E-mail: maramokhin91@mail.ru

Резюме

Данная работа посвящена изучению морфологических и анатомических структур каллусных тканей, полученных в процессе культивирования тканей лимонника китайского (*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.) и элеутерококка колючего (*Eleuterococcus senticosus* Maxim.) на питательных средах в условиях *in vitro*, что открывает возможности для получения биологически активных веществ и получения микропобегов путем морфо- и геммогенеза. Для получения каллусной ткани *S. chinensis* были использованы части листовой пластинки, междуузлия микропобега и нижняя часть маточного побега; для *E. senticosus* - нижняя часть микропобега. С целью индуцирования каллусогенеза применялся метод культивирования *in vitro* на различных типах питательных сред (Мурасиге-Скуга и Кворина-Лепорье), в том числе и на средах, содержащих разные виды регуляторов роста: 6-бензиламинопурин в концентрации 1.0 мг/л, индолилмасляная кислота в концентрации 0.1 мг/л, тидиазурон в концентрации 0.1 мг/л. Производилась морфологическая оценка каллусной ткани, затем были сделаны срезы каллуса, на основе которых приготовлены микропрепараты. По ним дана анатомическая оценка ткани. У *S. chinensis* удалось получить три типа каллусных тканей из разных частей растения, отличающихся по окраске, рыхлости, морфогенности, наличию почек геммогенеза. У *E. senticosus* получен только один тип каллусной ткани. Каллусная ткань из междуузлия *S. chinensis* оказалась наиболее перспективной для культивирования с целью получения растительной биомассы. Полученные каллусы *S. chinensis* и *E. senticosus* были пассивированы на питательную среду с целью индукции структурного морфогенеза. При микроскопии каллусной ткани из листовой пластинки *S. chinensis* выявлена плотная, компактная структура каллусной ткани, а также элементы проводящей системы около очага формирования структурного геммогенеза. Каллусная ткань из междуузлия микропобега *S. chinensis* имела крупные клетки, имеющие правильную структуру; удалось обнаружить хорошо сформированную микропочку, а также структуры проводящей системы. Каллусная ткань из части микропобега *E. senticosus* показала наличие хаотично расположенных, не связанных между собой крупных бесцветных клеток. В результате работы мы получили каллусную ткань на безгормональной среде и смогли наблюдать ее додифференцировку до формирования жизнеспособных соматических эмбриоидов.

Ключевые слова: *Schisandra chinensis*, *Eleuterococcus senticosus*, каллусная ткань, структурный морфогенез, геммогенез, культура *in vitro*, микропобег

Цитирование: Марамохин Э.В., Малахова К.В., Зонтиков Д.Н. Особенности анатомо-морфологической структуры каллусной ткани *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. и *Eleuterococcus senticosus* Maxim. при культивировании в условиях *in vitro*. *Биомика*. 2018. Т.10(3). С. 274-280. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-36

**FEATURES OF ANATOMICAL AND MORPHOLOGICAL STRUCTURE
OF CALLUS TISSUE OF *SCHISANDRA CHINENSIS* (TURCZ.) BAIL. AND
ELEUTHEROCOCCUS SENTICOSUS MAXIM. DURING CULTURED *IN VITRO***

Maramokhin E.V., Malakhova K.V., Zontikov D.N.

Kostroma State University, 156005, Kostroma, 17 Dzerzhinskogo str. Russia, E-mail: maramokhin91@mail.ru

Resume

This work is devoted to the study of morphological and anatomical structures of callus tissues obtained during the cultivation of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.) and *Eleuterococcus senticosus* Maxim.) on nutrient media in *in vitro* conditions, which opens the possibility for obtaining BAS and obtaining microsprouts through morpho- and gemmogenesis. For the production of *S. chinensis* callus tissue, parts of the leaf blade, the internode of the microspore and the lower part of the mother shoot were used; *E. senticosus* - the lower part of the microsprout. In order to induce callusogenesis, an *in vitro* cultivation method was used on various types of nutrient media (Murashige-Skoog and Quoirin-Lepoivre), including media containing different kinds of growth regulators: 6-benzylaminopurine at a concentration of 1.0 mg/L, indolylbutyric acid at a concentration of 0.1 mg/L, and thidiazuron at a concentration of 0.1 mg/L. Morphological evaluation of callus tissue was made, then callus sections were made, on the basis of which microscope slide were prepared. They were given an anatomical evaluation of the tissue. *S. chinensis* managed to obtain three types of callus tissues from different parts of the plant, differing in color, friability, morphogenicity, presence of bud of gemmogenesis. In *E. senticosus* we received only one type of callus tissue. Callus tissue from the internode of *S. chinensis* proved to be the most promising for cultivation for the purpose of obtaining plant biomass. The resulting *S. chinensis* and *E. senticosus* calli were passivated on a nutrient medium in order to induce structural morphogenesis. With microscopy of callus tissue from the *S. chinensis* leaf blade, a dense, compact structure of the callus tissue was revealed, as well as elements of the conducting system near the focus of formation of structural gemmogenesis. The callus tissue from the internode of the *S. chinensis* microsprout had large cells having a regular structure; it was possible to detect a well-formed microbud, as well as the structure of the conducting system. Callus tissue from the part of *E. senticosus* microscope showed the presence of chaotically located, unconnected large colorless cells.

Keywords: *Schisandra chinensis*, *Eleuterococcus senticosus*, callus tissue, structural morphogenesis, gemmogenesis, *in vitro* culture, microsprout

Citation: Maramokhin E.V., Malakhova K.V., Zontikov D.N. Features of anatomical and morphological structure of callus tissue of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Bail. and *Eleutherococcus senticosus* Maxim. during cultured *in vitro*. *Biomics*. 2018. V. 10(3). P. 274-280. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-36

Введение

Изучение каллусных тканей в биотехнологии занимает ведущее место, поскольку эта ткань является источником биологически активных веществ (БАВ) – схизандрин, элеутерозиды. Кроме того есть возможность получения из нее микропобегов путем индукции структурного морфогенеза и геммогенеза [Туть (Tut'), 2008]. Использование БАВ растительного происхождения ограничено доступностью растительных ресурсов и может представлять угрозу для редких видов лекарственных растений, к которым, в частности, относятся лимонник китайский *Schisandra chinensis* и элеутерококк *Eleuterococcus senticosus*. Эти растения являются эндемиками Дальнего Востока, которые активно интродуцируются в Центрально-европейском регионе России. Культуры клеток изучаемых нами растений могут служить возобновляемым источником ценных вторичных

метаболитов, однако до настоящего времени известны лишь единичные примеры их коммерческого применения. Основными причинами сложившейся ситуации являются недостаточная продуктивность культур клеток по вторичным метаболитам и низкая скорость образования биомассы. Работа по изучению клеточных культур была проведена А.М. Носовым: изучение вторичных метаболитов в каллусных тканях *Tribulus terrestris* L., *Panax ginseng* C.A.Mey. и *Dioscorea deltoidea* Wall., влияние синтетических и натуральных регуляторов роста на накопление этих веществ с целью их использования в фармакологической промышленности [Носов (Nosov), 2010].

У многих растений из семейства схизандровых (*Schizandreaceae*) и семейства аралиевых (*Araliaceae*) удается добиться только образования каллуса, но не получается вызвать образование из этих тканей микропобегов. Это

является существенным недостатком, поскольку говорить о разработанности технологии клонального микроразмножения какого-либо растения можно лишь при комплексном подходе к культивированию, т. е. с использованием не только микропобегов, но и других альтернативных способов и методов культивирования [Шорников (Shornikov), 2008]. Изучение анатомической и морфологической структуры тканей каллуса, полученных из разных частей изучаемых растений, позволит лучше понять причины отсутствия структурного морфогенеза и скорректировать биотехнологические методы, что в дальнейшем даст возможность получить микропобеги непосредственно из каллуса.

Цель исследования: изучение особенностей ростовых процессов и анатомо-морфологической структуры каллусных тканей *S. chinensis* и *E. senticosus*.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являются различные виды каллусных тканей, полученные из маточных растений лимонника китайского *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. и элеутерокка колючего *Eleuterococcus senticosus* Maxim., побеги которых были предоставлены с Дальнего Востока (Приморский край). Растения были введены в культуру *in vitro* с соблюдением условий асептики, после чего образовавшиеся из почек микропобеги использовались для получения каллуса. Каллусогенез у *S. chinensis* был индуцирован из части листовой пластинки, междоузлия микропобега, а также из нижней части маточного культивируемого побега [Тут', 2008]. Из нижней части микропобега был получен каллус *E. senticosus*. Для получения каллусных тканей применялся метод

культивирования *in vitro* на различных типах питательных сред, в том числе и средах, содержащих разные группы регуляторов роста [Muratova, 2010]. Более выраженный каллусогенез наблюдался у части тканей *S. chinensis*, которые пассивировали на питательную среду Кворина-Лепорье (QL), а для *E. senticosus* использовалась среда Мурасиге-Скуга (МС) [Murashige, Skoog, 1962]. Обе эти среды содержали мезоинозит в концентрации 100 мг/л, глицин – 2 мг/л, тиамин – 0.5 мг/л, пиридоксин – 0.5 мг/л, сахарозу – 20 г/л, агар – 5.0 г/л. В качестве регуляторов роста в среде QL применялся 6-бензиламинопурина (6-БАП) в концентрации 1,0 мг/л и индолилмасляная кислота (ИМК) в концентрации 0,1 мг/л [Шорников (Shornikov), 2008]. В среде MS использовали тидиазурон (ТДЗ) в концентрации 0.1 мг/л, на которой наблюдалось образование каллуса [Упадышев (Upadyshev), 2004, Шорников (Shornikov), 2008;]. После того, как каллус достигал значительных размеров при культивировании, он извлекался из питательной среды, впоследствии производилась его морфологическая оценка, а затем были сделаны срезы каллусной ткани. На их основе были приготовлены микропрепараты, по которым была дана анатомическая оценка ткани при общем увеличении микроскопа $\times 160$.

Результаты и обсуждение

Морфологическое исследование каллусных тканей у лимонника китайского и элеутерококка колючего.

У *S. chinensis* удалось получить три типа каллусных тканей из разных частей растения, отличающихся по окраске, рыхлости, морфогенности, наличию почек геммогенеза (рис. 1).

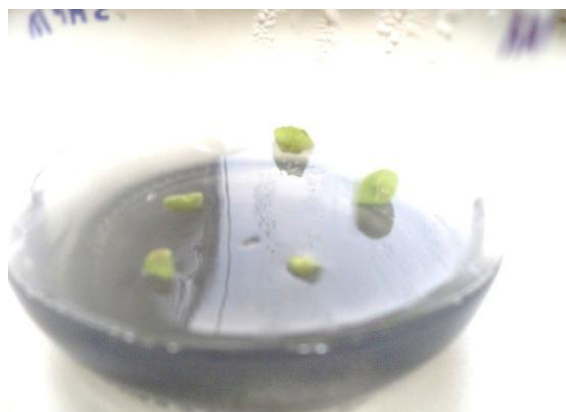


Рис. 1. Культивирование каллусной ткани у *S. chinensis* из листовой пластинки на 5 день (слева) и на 30 день (справа)
Fig. 1. Cultivation of callus tissue in *S. chinensis* from leaf blade on day 5 (left) and on day 30 (right)

Под морфогенностью мы понимаем оформленность каллусной ткани при многократном повторении условий эксперимента. У *E. senticosus* мы получили только один тип каллусной ткани. Оценку

сформированности каллусных тканей у изучаемых растений проводили на 30-35 день культивирования. Все данные были нами внесены в сводную таблицу (табл. 1).

Табл. 1.

Морфология каллуса *Schisandra chinensis* и *Eleuterococcus senticosus*
Table 1. Callus morphology *Schisandra chinensis* и *Eleuterococcus senticosus*

Часть растения Part of the plant	Окраска каллуса Callus coloration	Рыхлость каллуса Callus friability	Морфогенность каллуса. Почки геммогенеза Morphogenicity of callus. Kidney gemogenesis
<i>S. chinensis</i>			
Срез микропобега Slice of the microscale	Коричнево-зеленая Brown-green	Плотный Dense	Каллус морфогенен, имеет плоскосплюсненную форму, мелкобугристую поверхность, разрастается не вглубь среды, а к периферии. Почек геммогенеза не наблюдалось. Callus is morphogenic, has a flattened shape, a small-hummocky surface, grows not deep into the environment, but to the periphery. The buds of gemmogenesis were not observed.
Междоузлие Interstitium	Бледно-зеленая, желтая Pale green, yellow	Рыхлый каллус, легко разрушается при манипуляции инструментом Friable callus, easily destroyed by manipulation of the instrument	Каллус неморфогенен, на питательной среде имеет произвольный рост, сильно обводнен, часто особенно при длительном культивировании распадается. Обнаружены почки геммогенеза. Callus is non-morphogenic, on the nutrient medium it has an arbitrary growth, is heavily watered, often especially during prolonged cultivation it disintegrates. The buds of gemmogenesis were detected.
Листовая пластина Leaf plate	Желто-зеленая Yellow-green	Плотный Tight	Каллус морфогенен, имеет шарообразную форму, равномерно разрастается вглубь и на периферию среды. Поверхность не бугристая. Наблюдались проводящие элементы почек. Callus is morphogenic, has a spherical shape, evenly extends deep into the periphery of the medium. The surface is not bumpy. Conductive elements of the buds were observed.
<i>E. senticosus</i>			
Срез микропобега Slice of the microscale	Бледно-желтый, почти белый Pale yellow, almost white	Рыхлый, не образует каллусный конгломерат, состоит из скопления делящихся, слабо контактирующих тканей Friable, does not form a callus conglomerate, consists of a cluster of fissile, weakly contacting tissues	Каллус неморфогенен, на питательной среде погибает, культивируется непосредственно на микропобеге, образуя рыхлую белую массу. Почек геммогенеза не наблюдалось. Callus is non-morphogenic, dies on the nutrient medium, cultivated directly on the microscale, forming a friable white mass. The buds of gemmogenesis were not observed.

Согласно нашим наблюдениям, каллус, полученный у одного и того же растения, сильно варьирует в зависимости от тканевых структур, из которых он был получен. Каллусообразование у *S. chinensis* удалось индуцировать не только на гормональных, но и на безгормональных средах. Однако на средах, не содержащих регуляторы роста, он имел слабое развитие, получить его удавалось только из среза микропобега. Листовой и межузловой каллусогенез на безгормональных средах индуцировать не удалось. У *E. senticosus* только с использованием приведенных выше цитокининов удалось индуцировать малодифференцированный каллус.

Каллусная ткань из междоузлия *S. chinensis* оказалась наиболее перспективной для

культивирования с целью получения растительной биомассы с целью возможного использования этой ткани для получения схизандрина. Для культивирования использовали питательную среду МС с регуляторами роста 6-БАП в концентрации 1 мг/л и ИМК в концентрации 0,1 мг/л. Время субкультивирования составило в среднем 52 дня при 8 часовом досвечивании (2000 люкс) и влажности воздуха 70%. Был отмечен быстрый рост каллусной ткани со свойствами, представленными в таблице 1. Рыхлость ткани позволяет выращивать её в промышленных масштабах с использованием биореакторов. Все этапы субкультивирования показаны на изображении (рис. 2).

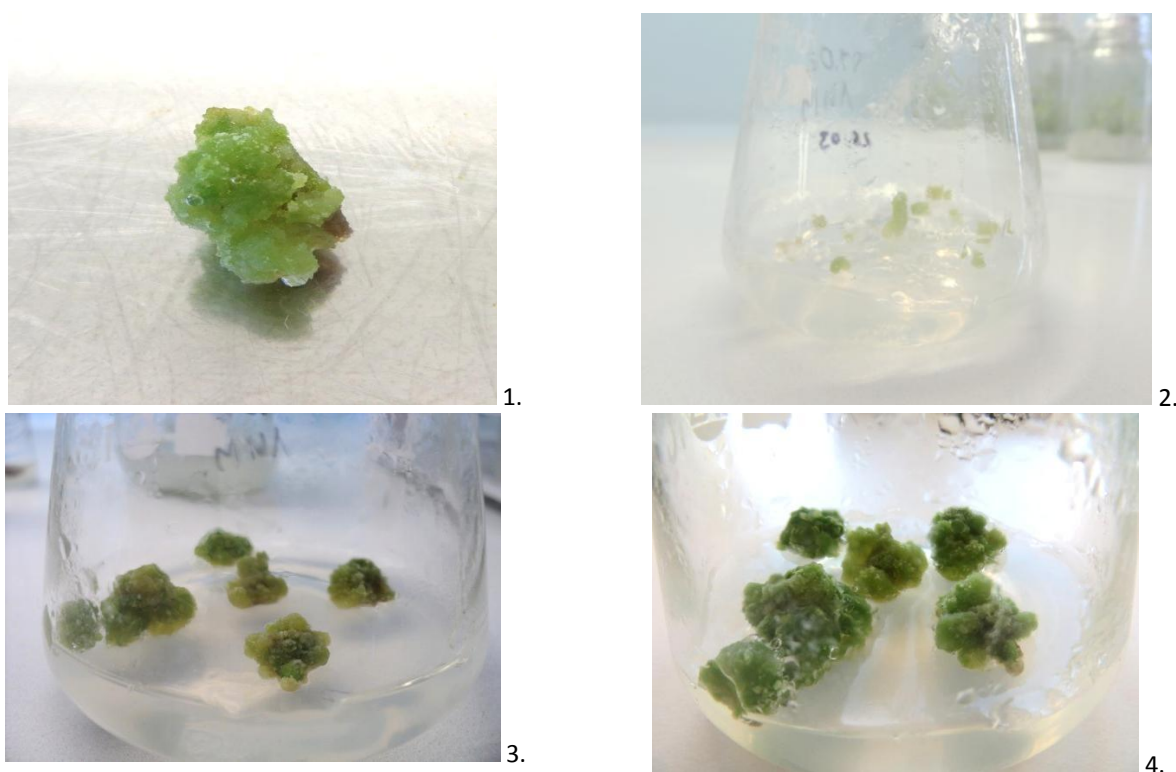


Рисунок 2. Этапы субкультивирования каллуса *S. chinensis*: 1.- Донорная каллусная ткань из междоузлия; 2.- 1-й день пассажа каллусной ткани; 3.- 30-й день пассажа; 4.- 52-ой день субкультивирования
 Figure 2. Stages of subculturing of *S. chinensis* callus: 1.- Donor callus tissue from the internode site; 2.- the 1st day of passage of the callus tissue; 3.- the 30th day of the passage; 4. The 52nd day of subculture

Полученные каллусы *S. chinensis* и *E. senticosus* были пассивированы на питательную среду с целью индукции структурного морфогенеза; каллус *S. chinensis* продолжал разрастаться, каллус *E. senticosus* погибал, что соответствовало литературным данным по нашим объектам [Ахметова (Akhmetova), 2014]. Это стимулирует выяснение особенностей анатомии каллусной ткани

S. chinensis и *E. senticosus* на предмет обнаружения геммогенеза и других структур морфогенеза. *Анатомические исследования каллусных тканей у S. chinensis и E. senticosus.*

Каллусные ткани изучаемых растений отличались не только морфологически, но и имели анатомические различия. В ряде изучаемых тканей удалось обнаружить структурный геммогенез.

Каллусная ткань из листовой пластинки *S. chinensis*. При приготовлении микропрепарата была выявлена плотная, компактная структура каллусной ткани. Микроскопическое изучение при общем увеличении микроскопа $\times 160$ показало наличие сомкнутых правильных рядов клеток зеленого цвета. По краю каллусной ткани клетки

имели коричневый цвет и отличались большими размерами по сравнению с тканью, расположенной в нижних слоях. Были также выявлены элементы проводящей системы, которые обнаружили около очага формирования структурного геммогенеза. Микропочка оказалась по объективному наблюдению нежизнеспособной (рис. 3).

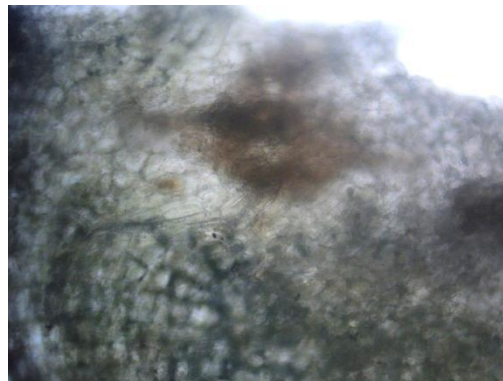
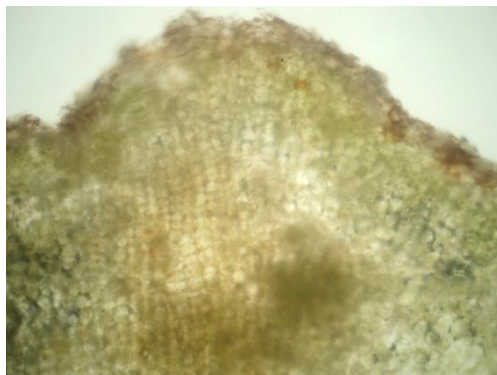


Рис. 3. Структура каллусной ткани из листовой пластинки (слева) и геммогенез с проводящей системой (справа) у *S. chinensis*
Fig. 3. Structure of callus tissue from the leaf blade (left) and gemmogenesis with a conducting system (right) in *S. chinensis*

Каллусная ткань из среза нижней части микропобега *S. chinensis* по сравнению с предыдущей оказалась более мягкой и рыхлой. При микроскопическом исследовании были обнаружены неплотно сомкнутые ряды клеток светло-зеленого цвета. Ряды клеток имели структуру неправильной формы. Край этой ткани имел коричневый цвет за счет наличия отмерших клеток. Структурного геммогенеза выявлено не было.

продуктивным. Ткань имела обводненность и рыхлость. Микроскопическое изучение препарата показало наличие крупных клеток, имеющих правильную рыхлую структуру и хаотичное расположение. Цвет клеток был либо бледно-зеленым, либо бесцветным. Краевого отмирания клеток не наблюдалось. Здесь удалось обнаружить хорошо сформированную микропочку, а также структуры проводящей системы (рис. 4).

Изучение каллусной ткани междоузлия микропобега у *S. chinensis* оказалось наиболее

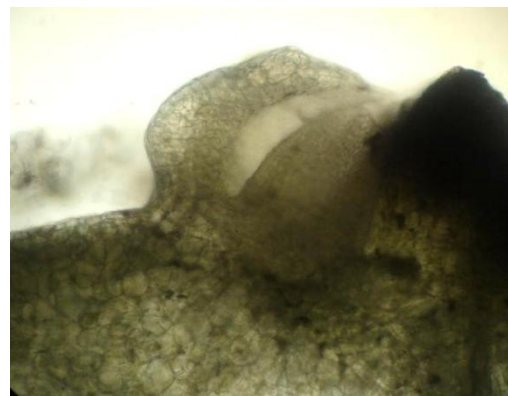
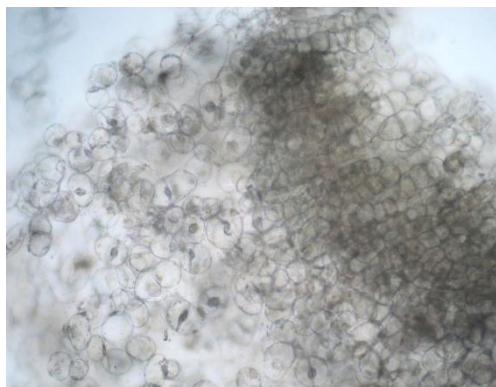


Рис. 4. Структура каллусной ткани из междоузлия (слева) и геммогенез с проводящей системой (справа) у *S. chinensis*
Fig. 4. The structure of callus tissue from the internode (left) and gemmogenesis with a conducting system (right) in *S. chinensis*

Приготовление микропрепаратов каллусной ткани из части микропобега *E. senticosus* выявило рыхлость и обводненность этой ткани, она легко распадалась. Микроскопическое исследование показало наличие хаотично расположенных, не связанных между собой крупных бесцветных клеток. Краевого отмирания клеток выявлено не было, как не было выявлено и структурного геммогенеза.

Заключение

Получены каллусные ткани из различных частей растений *Schisandra chinensis* и *Eleutherococcus senticosus* на безгормональной среде. Были выявлены различные структуры каллусной ткани в зависимости от донорной части растения, отличающиеся по окраске, рыхлости, морфогенности, что представляет интерес для биотехнологических методов получения из каллуса БАВ. Анатомические исследования каллусных тканей выявили вариабельность в расположении, размере, наличии очагов некроза, цвете у клеток каллуса из разных частей культивируемого растения. Удалось наблюдать додифференцировку некоторых тканей у *S. chinensis* (возможность получения микропобегов из каллусной ткани путем структурного геммогенеза). Полученные результаты исследований могут быть использованы для промышленного культивирования клеточных культур ценных лекарственных растений *S. chinensis* и *E. senticosus* с целью получения БАВ. Совершенствование методов получения соматических эмбрионов позволит производить посадочный материал изучаемых растений для плантационного выращивания. Дальнейшие исследования в этой области будут направлены на ускорение ростовых процессов клеточных культур и увеличение содержания БАВ.

Литература

1. Ахметова А.Ш. Размножение лимонника китайского (*Schisandra chinensis* (Turcz) Baill.) in vitro. *Агрохимия*. 2014. №11. С. 52-57.
2. Муратова С.А. Совершенствование метода клонального микроразмножения актинидии и лимонника китайского. *Современное садоводство*. 2010. №1. С. 96-100].
3. Носов А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения. *Биотехнология*. 2010. №5. С. 8-28.
4. Туть Е.А., Упадышев М.Т. Особенности микроразмножения актинидии и лимонника китайского. *Сельскохозяйственная биология*. 2008. №3. С. 96-101.

5. Шорников Д.Г. Разработка метода клонального размножения элеутерококка колючего (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. *Биология клеток растений in vitro и биотехнология: Тезисы IX междунар. конф.*, г. Звенигород, 8-12 сентября 2008 г. М.: ИД ФБК ПРЕСС, 2008. С. 442.
6. Шорников Д.Г. Совершенствование технологии размножения редких садовых растений в культуре in vitro и оценка их потенциала устойчивости к абиотическим стрессорам. Автореф. канд. диссерт. 2008. 27 С.
7. Упадышев М.Т., Туть Е.А. Особенности размножения актинидии и лимонника китайского in vitro и зелеными черенками. *Плодоводство и ягодоводство России*. 2004. Т. 11. С. 200-209.
8. Murashige T.A., Skoog F. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. 1962. V. 15. P. 473-497.

References

1. Akhmetova A.Sh. Razmnozhenie limonnika kitaiskogo (*Schisandra chinensis* (Turcz) Baill.) in vitro. *Agrokhimiya*. 2014. No. 11. P. 52-57. [Reproduction of *Schisandra chinensis* (Turcz) Baill.) in vitro - In Russian]
2. Murashige T.A., Skoog F. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. 1962. V. 15. P. 473-497.
3. Muratova S.A. Perfection of the method of clonal micropropagation of actinidia and magnolia vine of Chinese / SA Muratova and others // *Modern gardening*. Michurinsk, 2010. V.1 P. 96-100 [In Russian].
4. Nosov A.M. Use of cellular technologies for industrial production of biologically active substances of plant origin. *Biotechnology*, 2010. V.5 - P. 8-28. [In Russian].
5. Tut' E.A. Peculiarities of micropropagation of actinidia and magnolia vine magnesium. *Agricultural Biology*. 2008. No 3. P. 96-101 [In Russian].
6. Shornikov D.G. Development of a method for clonal multiplication of eleutherococcus senticosus (Rupr. et Maxim.) Maxim.). *Biology of plant cells in vitro and biotechnology: Tez. IX Intern. Conf., Zvenigorod, September 8-12, 2008 - Moscow: ID FBK PRESS*, 2008. P. 442. [In Russian].
7. Shornikov D.G. Perfection of the technology of reproduction of rare garden plants in culture in vitro and evaluation of their potential for resistance to abiotic stressors. Michurinsk.: Abstract, 2008. 27 P. [In Russian].
8. Upadyshev M.T., Tut' E.A. Specifics of propagation of actinidia and magnolia vine in in vitro and green cuttings. *Fruit growing and grapes breeding of Russia*. 2004. V. 11. P. 200-209. [In Russian].