

УДК 581.1

ПОЛУЧЕНИЕ ДЛИТЕЛЬНО КУЛЬТИВИРУЕМОЙ ЭМБРИОГЕННОЙ КУЛЬТУРЫ *Papaver rupifragum* BOISS. & REUT. И ЕЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ И БИОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

© 2023 г. Н. И. Румянцева^{a, b, *}, Ю. А. Костюкова^a, А. И. Валиева^a, А. Н. Акулов^a, М. В. Агеева^a

^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра

“Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

^bКазанский федеральный университет, Казань, Россия

*e-mail: nat_rumyantseva@mail.ru

Поступила в редакцию 29.09.2023 г.

После доработки 18.10.2023 г.

Принята к публикации 21.10.2023 г.

Впервые получена эмбрионная культура мака скалоломного *Papaver rupifragum* Boiss. & Reut., которая была инициирована на корнях проростков, выращиваемых из семян на МС-среде с добавлением 1 мг/л ИМК. Последующее поддержание эмбрионной культуры осуществляли на безгормональной МС-среде. Длительное культивирование и сохранение эмбрионной способности культуры (более 5 лет) поддерживалось благодаря циклам адвентивного эмбриоидогенеза, включающим образование каллуса на предсуществующих эмбриоидах и индукцию из их субповерхностных клеток новых эмбриоидов. В связи с этим полученная культура *P. rupifragum* может рассматриваться как дифференцированная культура, в которой стадия каллуса является промежуточным этапом развития. Установлено, что поверхность вновь образуемых эмбриоидов покрыта поверхностной сетью экстраклеточного матрикса, сформированной полисахаридами, липидами и терпенами. Гистологический анализ показал, что для эмбрионной культуры *P. rupifragum* характерно образование комплексов слитых эмбриоидов (КСЭ), возникающих, предположительно, либо в результате кливажной полиэмбрионии, либо при синхронном развитии близлежащих эмбриоидов. Изучение гистологии и ультраструктуры КСЭ выявило, что слияние эмбриоидов обусловлено нарушениями в формировании эпидермиса и кутикулы. Гистохимические исследования установили, что эмбрионная культура *P. rupifragum* синтезирует и накапливает триацилглицериды, полисахариды, фенольные соединения (ФС), терпены и алкалоиды. Показано, что количественный и качественный состав ФС и алкалоидов культуры *P. rupifragum* зависит от возраста культуры и ее дифференцировки, регулируемой условиями выращивания (свет, темнота). Дифференцированная эмбрионная культура *P. rupifragum* сохраняет способность к формированию эмбриоидов на безгормональной МС-среде в течение длительного времени культивирования и может являться основой для дальнейшей разработки биотехнологических методов получения лекарственных соединений для косметологии и фармакологии.

Ключевые слова: *Papaver rupifragum*, алкалоиды, адвентивный эмбриоидогенез, корни, липиды, терпены, фенольные соединения, эмбрионная культура

DOI: 10.31857/S0015330323600894, EDN: BFKIWY

ВВЕДЕНИЕ

Методы культуры клеток и тканей широко используются не только для оздоровления и быстрого размножения растений, но и для получения клеточных культур суперпродуцентов вторичных метаболитов [1]. Мак скалоломный (*Papaver rupi-*

fragum Boiss. & Reut.) привлекает внимание исследователей как декоративное многолетнее растение с крупными оранжевыми цветками, а также как потенциальный источник лекарственных соединений. Представители рода *Papaver* синтезируют алкалоиды различного типа, разнообразные фенольные соединения (ФС) и эфирные масла, которые имеют широкий спектр биологической активности и могут оказывать анальгезирующее, противомикробное, противовирусное, антидиабетическое и другое действие [2]. Методы получения и культивирования клеточных культур разра-

Сокращения: КСЭ – комплекс слитых эмбриоидов, ПСЭКМ – поверхностная сеть экстраклеточного матрикса, МС-среда – среда Мурасиге и Скута, ТС – толудиновый синий, ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия, ФС – фенольные соединения.

ботаны для многих видов мака: *P. somniferum* [3, 4], *P. bracteatum* [5], *P. orientale splendidissimum* [4]. Установлено, что только эмбрионные клеточные культуры рода *Papaver* обладают способностью к синтезу алкалоидов [2, 6]. Получение клеточных культур *P. rupifragum* до сих пор не было описано. Поэтому в задачи нашей работы входило получение эмбрионной культуры *P. rupifragum*, ее цитологическое изучение, а также гистохимический и биохимический анализ соединений, синтезируемых культурой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Семена *Papaver rupifragum* Boiss. & Reut. были получены из Ботанического сада лекарственных растений Казанского государственного медицинского университета. Для индукции каллуса семена стерилизовали 2 мин в 70% этиловом спирте, 10 мин в 45% растворе “Белизны” (содержание NaOCl — 10%), трижды промывали стерильной дистиллированной водой и высаживали на МС-среду [7] с добавлением 1 мг/л ИМК, 30 г/л сахарозы и 0.8% агара. Семена проращивали при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$ на свету (плотность потока фотосинтетических фотонов $35 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \text{ с})$), фотопериод 16/8 ч (свет/темнота). После того как на корнях проростков сформировался первичный каллус и на нем начали появляться эмбриониды, их переносили на МС-среду без гормонов. Дальнейшее субкультивирование эмбрионной культуры проводили на этой же среде каждые 30 сут. на свету и в темноте при температуре $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Гистологические и электронно-микроскопические исследования проводили по ранее использованной методике [8]. Для этого каллус и эмбриониды фиксировали 2.5% глютаровым альдегидом на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2) с постфиксацией в 1% OsO_4 . Далее ткань обезвоживали в ряде спиртов с постепенным повышением концентрации, 100% ацетоне, 100% пропиленоксиде и заключали в эпоксидную смолу эпон-812. Для приготовления гистологических препаратов полутонкие срезы (3 мкм толщины), сделанные с помощью ультрамикротомы Ultra Cut E (“Reichert-Jung”, Австрия), окрашивали 0.5% толуидиновым синим и изучали с помощью микроскопа Jenamed (“Carl Zeiss”, Германия) и фотографировали, используя цифровую насадку AxioCam MRc5 с программным обеспечением AxioVision Rel. 4.6. Для электронно-микроскопических исследований срезы (70–100 нм толщины), сделанные с помощью ультрамикротомы LKB 8800 (“LKB”, Швеция), монтировали на никелевые сеточки и окрашивали последовательно 2% уранилацетатом и цитратом свинца. Исследования проводили на микроскопе “Hitachi 7800” (“Hitachi”, Япония).

Гистохимическое окрашивание эмбрионной культуры выполняли на прижизненных срезах толщиной 15–20 мкм, сделанных на вибраторе VT100S (“Leica”, Германия). Для приготовления прижизненных срезов образцы каллуса и эмбрионидов заключали в блоки из 3% агарозы, приготовленной на дистиллированной воде. Непрерывная подача ножа составляла 2.5 мм/с, частота вибрации ножа — 60 Гц. Нарезанные срезы помещали в дистиллированную воду, окрашивание проводили сразу после нарезки.

Срезы, зафиксированные в эпоксидную смолу, окрашивали 0.5% толуидиновым синим (ТС), приготовленным на 0.1% растворе Na_2CO_3 (pH 11.1). Окрашивание проводили на предметном столике Slides Warmer ХН-2002 (“C&A Scientific”, США) при 60°C в течение 1–6 мин и затем отмывали дистиллированной водой.

Для выявления липидов прижизненные срезы окрашивали в течение 10 мин 0.3% раствором Судана III, приготовленного на 70% спирте, затем отмывали дистиллированной водой, помещали в каплю дистиллированной воды и накрывали покровным стеклом. Локализацию терпенов определяли на прижизненных срезах с помощью реактива NADl как описано ранее [9].

Срезы исследовали с помощью микроскопа Jenamed (“Carl Zeiss”, Германия), используя программное обеспечение Axiovision Rel 4.6, и фотографировали с помощью цифровой камеры AxioCam MRc5 (“Carl Zeiss”, Германия). Депонирование алкалоидов изучали в УФ на микроскопе Axio Scope A1 (“Carl Zeiss”, Германия), $\lambda = 365 \text{ нм}$.

Для биохимических исследований эмбрионную культуру лиофильно высушивали на сублимационной сушилке Alpha 1-4 LD-2 (“Martin Christ”, Германия) и размалывали на шаровой мельнице MM400 (“Retsch”, Германия) при частоте 25 Гц в течение 3 мин.

Для выделения ФС и алкалоидов 50 мг лиофильно высушенной эмбрионной культуры заливали 0.5 мл подкисленного 70% этанола (конечная концентрация уксусной кислоты 0.5%), обрабатывали ультразвуком (УЗ) (10 мин, 30 кГц, 20°C) и инкубировали в течение 1 ч при 80°C . Гомогенат центрифугировали (10 мин, 10000 g), супернатант отбирали. К осадку добавляли 0.5 мл 70% подкисленного этанола, обрабатывали УЗ, инкубировали 0.5 ч при 80°C и затем центрифугировали. Объединенные супернатанты использовали для выделения алкалоидов, определения содержания растворимых ФС, проведения ТСХ и ВЭЖХ-анализа ФС.

Общее содержание растворимых ФС определяли на спектрофотометре LAMBDA 25 (“Perkin-Elmer”, США) по методу Фолина-Чокальтеу [10] и рассчитывали в мг-экв. галловой кислоты на 1 г сухого веса.

Для экстракции алкалоидов 500 мкл спиртового экстракта высушивали при 35°C, 20 ГПа на вакуумном концентраторе ("Concentrator plus, Eppendorf", США). К высушенному экстракту добавляли 100 мкл 2 N HCl, обрабатывали ультразвуком, центрифугировали (5 мин, 10000 g), супернатант отбирали, к осадку добавляли 100 мкл 2 N HCl и процедуру повторяли. Объединенный супернатант, содержащий алкалоиды в виде водорастворимых солей, отмывали от липофильных веществ 1 мл хлороформа. Верхнюю водную фазу отбирали и нейтрализовали равным объемом 2 N NaOH. Объем нейтрализованного раствора доводили водой до 0.5 мл.

Спектрофотометрическое определение алкалоидов. К 50 мкл нейтрализованного раствора, содержащего алкалоиды, добавляли 0.5 мл 0.25 М цитратно-фосфатного буфера (pH 4.7) и 0.5 мл 0.1 мМ бромкрезолового зеленого (БКЗ). Для формирования ионной пары БКЗ-алкалоид реакционную смесь выдерживали 5 мин при комнатной температуре и затем экстрагировали дважды хлороформом. Для этого к реакционной смеси добавляли 0.5 мл хлороформа, перемешивали, нижнюю хлороформенную фазу отбирали, а к водной фазе добавляли 0.5 мл хлороформа и повторяли процедуру. Хлороформенные извлечения объединяли и конечный объем образца доводили хлороформом до 1 мл. Образцы сканировали на спектрофотометре LAMBDA 25 ("PerkinElmer", США) в диапазоне от 350 до 550 нм. Максимум поглощения ионной пары БКЗ-алкалоид находится в диапазоне 418 ± 2 нм. Для получения бланка 0.5 мл буфера смешивали с 0.5 мл БКЗ и проводили экстракцию хлороформом как описано выше. Для построения калибровочной кривой использовали 0.1% раствор папаверина гидрохлорида в концентрации от 2 до 10 мкг. Подготовку образцов проводили как описано выше.

Для ТСХ вторичных соединений использовали пластины "Sorbfil" ПТСХ-АФ А-УФ. Этанольные образцы (5 мкл) наносили на стартовую линию в виде полос шириной 4–5 мм. Разделение веществ проводили в отобранной верхней фазе смеси этилацетат–уксусная кислота–муравьиная кислота–вода (90 : 10 : 10 : 24) [11]. ТСХ-пластину рассматривали при 312 нм на трансиллюминаторе ТСР-20 МС ("Vilbert Lourmat", Франция). Для проявления пятен алкалоидов на пластинах применяли реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье [11].

Исследование ФС методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ) проводили на хроматографической системе высокого давления BioLogic DuoFlow™ ("BioRad", США). В качестве неподвижной фазы использовали колонку с обращенной фазой "Symmetry® C18", размер колонки – 3.9×150 мм ("Waters", США), наполнитель с раз-

мером частиц 5 мкм и размером пор 100 Å ("Waters", США). В качестве подвижной фазы были использованы следующие растворы: раствор А – 6% уксусная кислота, раствор Б – 80% ацетонитрил. Градиент был создан по следующей схеме: 0–4 мин – 100% раствор А, 4–6 мин – 100% раствор А и 25% раствор Б, 6–8 мин – 25% раствор Б, 13–16 мин – 25–30% раствор Б, 16–26 мин – 30–65% раствор Б; 26–31 мин – 65% раствор Б; 31–41 мин – 65–100% раствор Б; 41–46 мин – 100% раствор Б; 46–47 мин – 100% раствор Б и 100% раствор А; 47–55 мин – 100% раствор А. Скорость подачи подвижной фазы – 0.6 мл/мин. Объем вводимой пробы 50 мкл. Детекцию пиков фенольных соединений осуществляли посредством детектора BioLogic QuadTec UV/Vis ("BioRad", США) при длине волны 280 и 360 нм. Идентификацию пиков фенольных кислот и флавоноидов выполняли относительно времени удерживания на колонке известных ФС (галловая, р-кумаровая, феруловая, синаповая, бензойная кислоты, рутин, кверцетин, кемпферол) ("Sigma-Aldrich", США). Для расчетов использовали значения площадей пиков полученных хроматограмм, выраженные в мкВ·с.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Образование первичного светло-коричневого каллуса наблюдали на корнях проростков *P. rupifragum* через две недели их культивирования на МС-среде с добавлением 1 мг/л ИМК (рис. 1а). Белые блестящие уплотнения на поверхности каллуса появлялись через 1–2 мес. (рис. 1б). Проведенные гистологические исследования позволяют рассматривать первичные белые уплотнения как аномально развивающиеся эмбриониды, поскольку в них происходила дифференцировка апикального и базального полюсов с образованием биполярной структуры, характерной для соматических зародышей (рис. 1в). Эмбриониды имели протодерму, но в некоторых местах ее целостность была нарушена (рис. 1г). Эмбриониды были покрыты поверхностной сетью экстраклеточного матрикса (ПСЭКМ), розово-сиреневое окрашивание толуидиновым синим свидетельствует о присутствии в ней полисахаридов (рис. 1в, 1г). ПСЭКМ, образованная секретируемыми соединениями различной природы – это морфологическая структура, характерная для кластеров эмбриогенных клеток и глобулярных эмбрионидов разных видов растений [12]. При дальнейшем культивировании на среде с ИМК у эмбрионидов *P. rupifragum* происходила дифференцировка апекса стебля с образованием небольших светлых зеленых семядолей, но развитие корня отсутствовало (рис. 1д). Гистологические исследования выявили, что у первичных эмбрионидов нарушена дифференцировка сосудистой системы и проис-

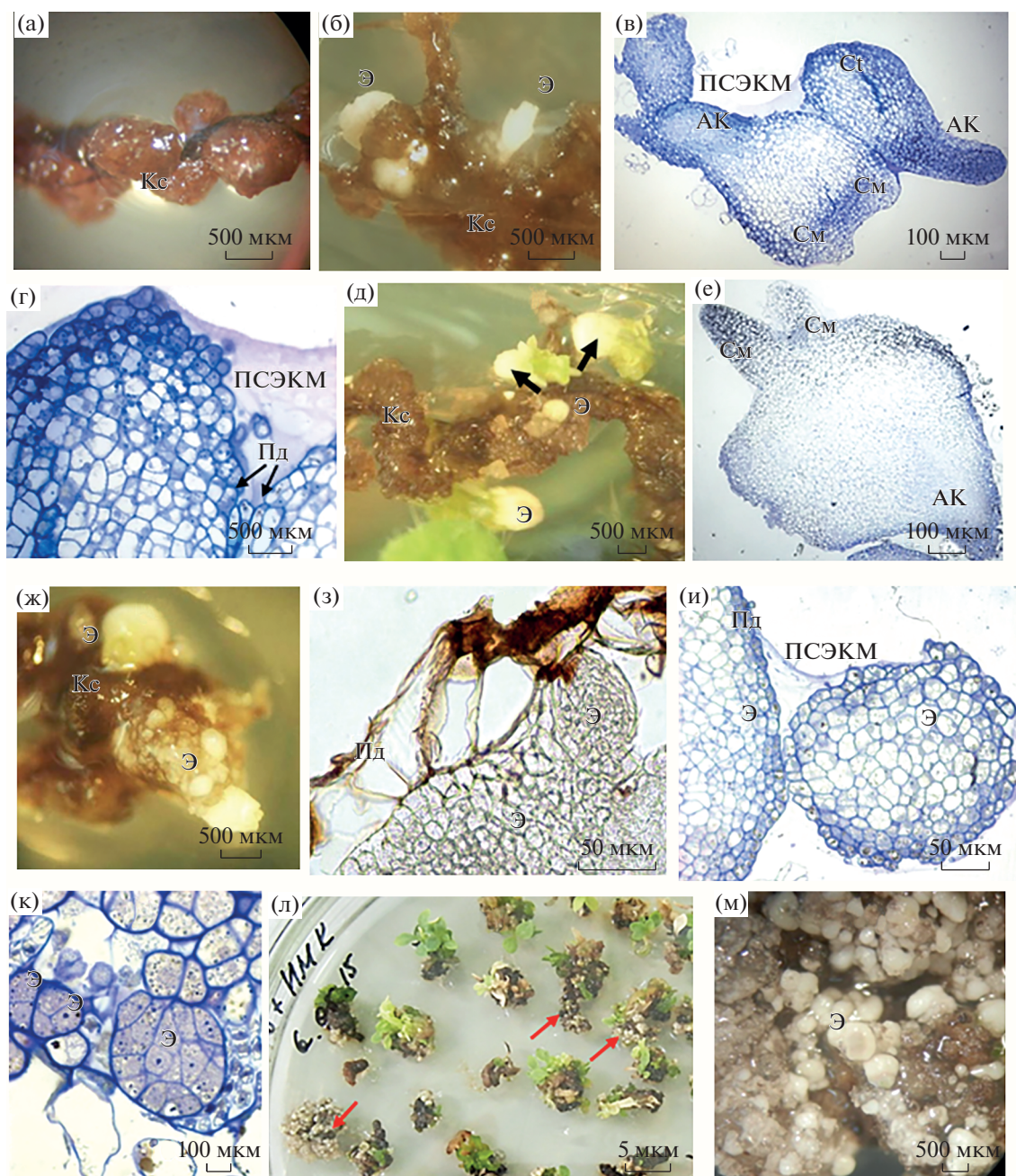


Рис. 1. Образование эмбриогенной культуры на корнях проростков *P. rupifragum*: а – индукция первичного каллуса на корнях; б – появление белых уплотнений на поверхности каллуса через 1–2 мес. культивирования на МС-среде с добавлением 1мг/мл ИМК; в, г – сердечковидные эмбриониды, покрытые слоем ПсЭКМ; д – формирование семядолей у эмбрионидов на МС-среде с добавлением ИМК на свету; е – торпедовидный эмбрионид с разросшейся центральной частью; ж – формирование вторичных эмбрионидов на безгормональной МС-среде на каллусе, образовавшемся на первичных эмбриоидах; з – субповерхностное формирование вторичных эмбрионидов; и – формирование ПсЭКМ при образовании вторичных эмбрионидов; к – множественная субэпидермальная инициация эмбрионидов; л – дифференцировка семядолей у эмбрионидов на безгормональной МС-среде на свету, стрелка указывает на формирование каллуса на базальной части КСЭ и образование на поверхности каллуса эмбрионидов; м – формирование эмбрионидов при субкультивировании на безгормональной МС-среде в темноте; развитие семядолей отсутствует. АК – апекс корня, Кс – каллус, Пд – протодерма, См – семядоля, Э – эмбрионид.

ходит разрастание центральной части эмбриоида за счет деления паренхимных клеток (рис. 1е). При переносе на безгормональную МС-среду на первичных эмбриоидах формировался мягкий

ослизненный каллус, на поверхности которого затем появлялись вторичные эмбриониды (рис. 1ж). Разрыхление эмбрионидов и формирование каллуса происходило в результате деления центральных

паренхимных клеток, и лизиса клеток протодермы. Новые эмбриониды возникали преимущественно из субповерхностных клеток (рис. 1з). На рис. 1ж показано, что вновь возникающие эмбриониды лежат на поверхности каллуса, находятся на разных стадиях развития и покрыты слизистым секретом (рис. 1и). Судя по множественной инициации новых эмбрионидов (рис. 1к), к эмбриогенному развитию было способно большое число клеток первичного каллусирующего эмбриоида. Дальнейшее развитие эмбрионидов имело свои особенности и зависело от светового режима. При субкультивировании эмбрионидов на МС-среде на свету в течение 1 мес. происходило развитие эмбрионидов от стадии глобулы до стадии формирования семядолей, но ризогенез отсутствовал. Затем, базальная часть эмбрионидов образовывала мягкий ослизненный каллус-няньку с последующим формированием новых эмбрионидов, развивающихся на поверхности каллуса (рис. 1л). При отборе каллуса с эмбриоидами и дальнейшем культивировании их на свету цикл развития эмбрионидов повторялся и проходил от глобулы до стадии развития семядолей. При культивировании в темноте развитие семядольных листьев отсутствовало (рис. 1м), но поддержание каллуса всегда сопровождалось последовательными циклами разрыхления эмбрионидов, образованием каллуса и формированием новых эмбрионидов. Полученная дифференцированная культура *P. rupifragum* сохраняла способность к формированию эмбрионидов на безгормональной МС-среде более пяти лет.

Интересно, что на МС-среде, как в темноте, так и на свету, мы очень редко наблюдали развитие отдельных зародышей, но отмечали образование бесхлорофильных крупных округлых структур (рис. 1м), на свету часто имеющих зеленую верхушку, и состоящих из эмбрионидов на стадии торпедо или формирования семядолей, слитых поверхностями (рис. 2а, 2в). Для таких структур мы ввели термин “комплексы слитых эмбрионидов” (КСЭ).

Поперечный срез каллуса с КСЭ на разных стадиях развития показывает, что культура имеет гетерогенную структуру и образована мелкими глобулами (50–70 мкм), средними глобулами (200–300 мкм), крупными глобулами (около 1 мм), которые разделены и окружены каллусными клетками (рис. 2б). На рис. 2б видно, что поперечный срез крупной глобулы является поперечным срезом КСЭ (рис. 2а). На продольном срезе КСЭ отчетливо видимый эпидермис характерен только для развивающихся семядолей; в базальной части КСЭ эпидермис фрагментарный (рис. 2г). Развитие корней у КСЭ отсутствует.

Изучение гистологии и ультраструктуры КСЭ показало, что слияние эмбрионидов обусловлено отсутствием формирования полноценного эпи-

дермиса вследствие нарушения синтеза кутикулярного слоя (рис. 2д, 2е, 2ж, 2з). На рис. 2е видно, что с поверхности клетки “отшелушиваются” слои клеточных стенок; вероятно, нарушение полимеризации компонентов клеточных стенок и кутикулы обуславливают формирование ПСЭКМ, окружающей развивающиеся эмбриониды. Как упоминалось ранее, образование новых эмбрионидов происходит преимущественно из базальной части КСЭ (рис. 1л). На продольном гистологическом срезе КСЭ хорошо видно, что в “слитых” эмбриоидах этот процесс может начинаться до стадии формирования семядолей (рис. 2з, и).

При гистологическом (рис. 2л) и электронномикроскопическом исследовании (рис. 2м–2н) семядольных листьев эмбрионидов были обнаружены клетки с многочисленными везикулами в цитоплазме, расположенные вдоль ситовидных клеток сосудистых пучков. Предполагается, что эти клетки представляют собой млечники. Клетки аналогичного строения, формирующие длинные тяжи, параллельные сосудам флоэмы, были идентифицированы в проростках *P. somniferum* [13].

Гистохимический анализ выявил, что в клетках как глобулярных эмбрионидов (рис. 3а, 3б), так и в КСЭ (рис. 3в, 3г–3е) накапливаются липофильные соединения, окрашиваемые Суданом III. Известно, что Судан III окрашивает как жирные масла, представленные преимущественно триацилглицеридами, и локализованные в сферосомах цитоплазмы, так и эфирные масла, основу которых составляют терпены и их производные [14]. Чтобы дифференцировать терпены от триацилглицеридов мы использовали специфичный для терпенов краситель NADI и выявили, что терпены накапливаются как в глобулярных эмбриоидах (рис. 3ж, з), так и в КСЭ (рис. 3к–3м). При этом оба реактива окрашивали в клетках мелкие округлые структуры (рис. 3а, 3б, 3и, 3м). Было отмечено, что на поверхности глобулярных эмбрионидов имеется слой, окрашиваемый как Суданом III (рис. 3а), так и реактивом NADI (рис. 3ж, 3з). Вероятно, ПСЭКМ, характерная для кластеров эмбриогенных клеток и глобулярных эмбрионидов, также содержит терпены. Интересно, что клетки мягкого каллуса-няньки, лежащие вокруг эмбрионидов, имели наиболее крупные включения терпенов (рис. 3и).

Окрашивание Суданом III прижизненных срезов КСЭ, выращиваемых на свету (рис. 3в), обнаружило, что липофильные соединения полностью заполняют цитоплазму клеток в базальной части КСЭ (рис. 3г–3е). При этом при использовании реактива NADI видно, что окрашиваются только округлые структуры разного размера, а цитоплазма остается бесцветной (рис. 3л, 3м). Вероятно, базальные клетки КСЭ накапливают как терпены в везикулах, так и триацилглицериды в

сферосомах, поэтому при использовании Судана III базальные клетки окрашиваются почти полностью. В “верхушке” КСЭ, сформированной развивающимися семядолями, оба гистохимических красителя выявляли только мелкие округлые структуры (рис. 3г, 3д, 3к, 3л).

Синтез и накопление липофильных соединений в эмбрионной культуре *P. rupifragum* были подтверждены при изучении ультраструктуры клеток глобулярных эмбриоидов. На электронно-микроскопических снимках цитоплазма клеток эмбриоидов, особенно клеток протодермы, заполнена многочисленными сферосомами (рис. 4а–4г). В клетках эмбриоидов также присутствуют небольшие вакуоли с осмиофильным преципитатом (рис. 4а, 3в, 3д), вероятно, ФС, возможно, алкалоидами. Осмиофильные отложения визуализировались как по тонопласту вакуолей (рис. 4б, 3в, 3д), так и в виде крупных округлых включений (рис. 4д). Эти вакуоли всегда отделены от плазмалеммы слоем сферосом и занимают более центральное положение. Клетки эмбриоидов имеют многочисленные активные митохондрии (рис. 4в, 4д), пластиды содержат крупные зерна крахмала (рис. 4г, 4е, 4ж). Стоит особо отметить многообразие липидных телец, присутствующих в клетках эмбриоидов. Они локализованы не только в цитоплазме и различаются по цвету и величине, но и в пластидах (рис. 4в, 4е, 4ж). Во многих пластидах можно выявить минимум одну пластоглобулу (рис. 4е, 4ж). Пластоглобулы так же отличаются по размеру и плотности контрастирования OsO_4 и, вероятно, образованы разными соединениями. Но их размеры значительно меньше размеров липидных телец в цитоплазме.

Исследование эмбрионной культуры в УФ обнаружило желто-зеленую внутриклеточную автофлуоресценцию каллусных клеток (рис. 5а, 5б), окружающих эмбриоиды, что может свидетельствовать о накоплении алкалоидов в каллусной культуре [15]. Голубая автофлуоресценция в отдельных поверхностных клетках эмбриоидов может свидетельствовать о накоплении в них фенольных кислот (рис. 5в, 5г).

Как следует из табл. 1, при выращивании в темноте общее содержание растворимых ФС и общее содержание алкалоидов в культуре увеличивается в зависимости от длительности пассажа: в 4-недельной культуре содержание ФС и алкалоидов выше, чем в 2-недельной культуре. При этом, содержание ФС увеличивается всего на 20%, тогда как алкалоидов — в 2.6 раза. Общее содержание ФС и алкалоидов в 3-недельной культуре на свету меньше, чем в 2-недельной культуре в темноте, но разница статистически не достоверна.

Проведенный ТСХ анализ этанольного экстракта выявил наличие пятен, окрашиваемых реактивом Драгендорфа, во всех вариантах исследуемой культуры, которые отличались как по интенсивности окрашивания, так и по положению на ТСХ пластине (рис. 6б). Пятна, наиболее интенсивно флуоресцирующие при 312 нм (рис. 6а), как правило, наиболее сильно окрашивались реактивом Драгендорфа. Видно, что культуры разного возраста (4 и 2 нед.), выращиваемые в темноте, имели разную интенсивность как окрашивания пятен реактивом Драгендорфа, так и флуоресценции, что коррелирует с почти 3-кратным различием в общем содержании алкалоидов. Интересно, что культура, выращиваемая на свету, значительно больше отличалась по количеству пятен и интенсивности их свечения от темновых культур, чем темновые культуры разного возраста отличались между собой. Следует отметить, что не все флуоресцирующие пятна окрашивались реактивом Драгендорфа, поскольку, с одной стороны, не все алкалоиды флуоресцируют, а с другой стороны, чувствительность реактива Драгендорфа может быть ниже чувствительности флуоресцентного анализа. К тому же разные алкалоиды в разной степени реагируют с реактивом Драгендорфа [16] и их содержания может быть недостаточно для явной позитивной реакции. Кроме того, не исключено, что отдельные пятна были “сложными” и представлены различными соединениями (например, ФС и алкалоидами).

При анализе спектра ФС спиртовых экстрактов трех вариантов эмбрионной культуры было выявлено наличие как свободных фенольных кислот (п-кумаровой, феруловой и 2,5-дигид-

Рис. 2. Особенности эмбрионной культуры *P. rupifragum* при выращивании на свету: а — разнообразие эмбрионных структур в культуре при развитии на свету; формирование семядольных листьев у отдельных эмбриоидов и у КСЭ (указано стрелкой); б — гистологический срез эмбрионной культуры; стрелкой указан поперечный срез КСЭ (окрашивание ТС); в — морфология КСЭ, г — продольный срез КСЭ, д, е, ж — отсутствие кутикулы, отделение слоев клеточной стенки (сплошная стрелка) и разрыхление клеточных стенок (пунктирная стрелка) у прорастающих эмбриоидов, ТЭМ; з — гистологический срез КСЭ с формирующимися адвентивными эмбриоидами из клеток базальной части (окрашивание ТС), и — деталь рис. 2з, адвентивные эмбриоиды, развивающиеся из клеток базальной части КСЭ (окрашивание ТС); к — эмбриоиды *P. rupifragum* с семядольными листьями; л — гистологический срез семядольного листа с проводящей системой (окрашивание ТС); м — дифференцировка млечников с многочисленными мелкими вакуолями вдоль ситовидных элементов (окрашивание ТС); н — электронно-микроскопические особенности клеток млечников, ТЭМ. БЧ — базальная часть, В — вакуоль, ВЭ — верхний эпидермис, Кс — каллус, КС — клеточная стенка, Кр — крахмальное зерно, КСЭ — комплекс слитых эмбриоидов, ЛТ — липидное тельце, Мл — млечник, НЭ — нижний эпидермис, Пд — протодерма, ПрП — проводящий пучок, Пл — пластида, См — семядоля, СЭ — ситовидный элемент.

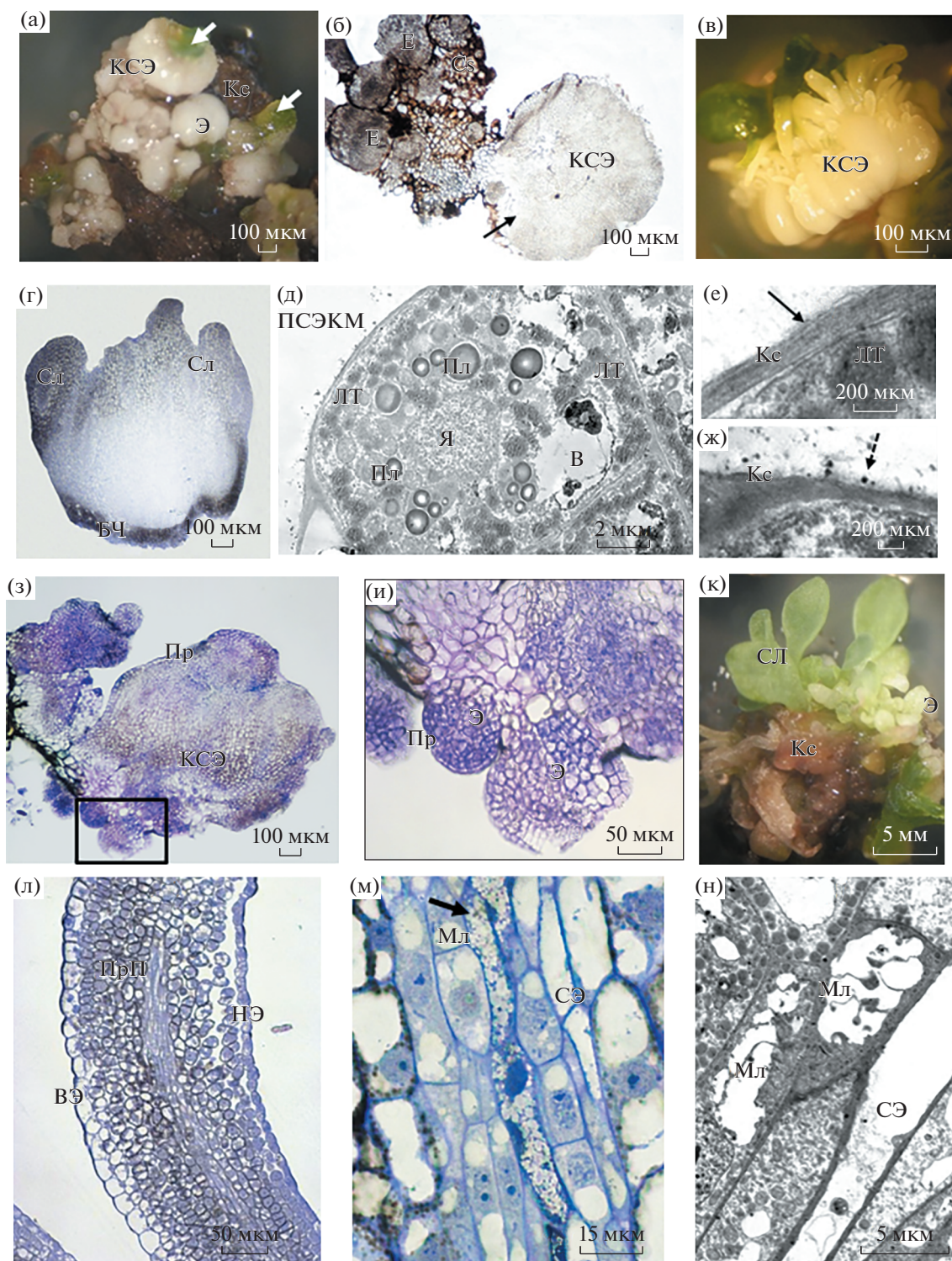


Таблица 1. Содержание алкалоидов и фенольных соединений в культуре *P. rupifragum* в зависимости от длительности пассажа и условий культивирования (темнота, свет).

	1	2	3
Содержание алкалоидов, мг/г сухого веса	3.66 ± 0.15 ^b	1.41 ± 0.11 ^a	1.18 ± 0.03 ^a
Содержание фенольных соединений, мг/г сухого веса	20.80 ± 0.64 ^b	17.39 ± 0.75 ^a	14.99 ± 0.58 ^a

Примечание: эмбрионную культуру выращивали на безгормональной МС-среде 4 нед. в темноте (1), 2 нед. в темноте (2), 3 нед. на свету (3).

роксибензойной кислот), так и флавоноидов (кверцетина и кемпферола) (рис. 7). Отличия между вариантами носили в большей степени количественный характер, тем не менее, только в вариантах темнота (4 нед.) и свет, присутствовали кверцетин и кемпферол (рис. 7а, 7в). При этом у 2-недельной темновой культуры было отмечено появление крупного неидентифицированного пика (время удерживания 48.2 мин) (рис. 7б), который отсутствовал у культуры на свету (рис. 7в) и был по площади в 4.6 раза больше, чем этот же пик у 4-недельной темновой культуры (рис. 7а). На свету содержание п-кумаровой кислоты, исходя из площадей пиков, было значительно меньше, чем в темновых вариантах каллуса.

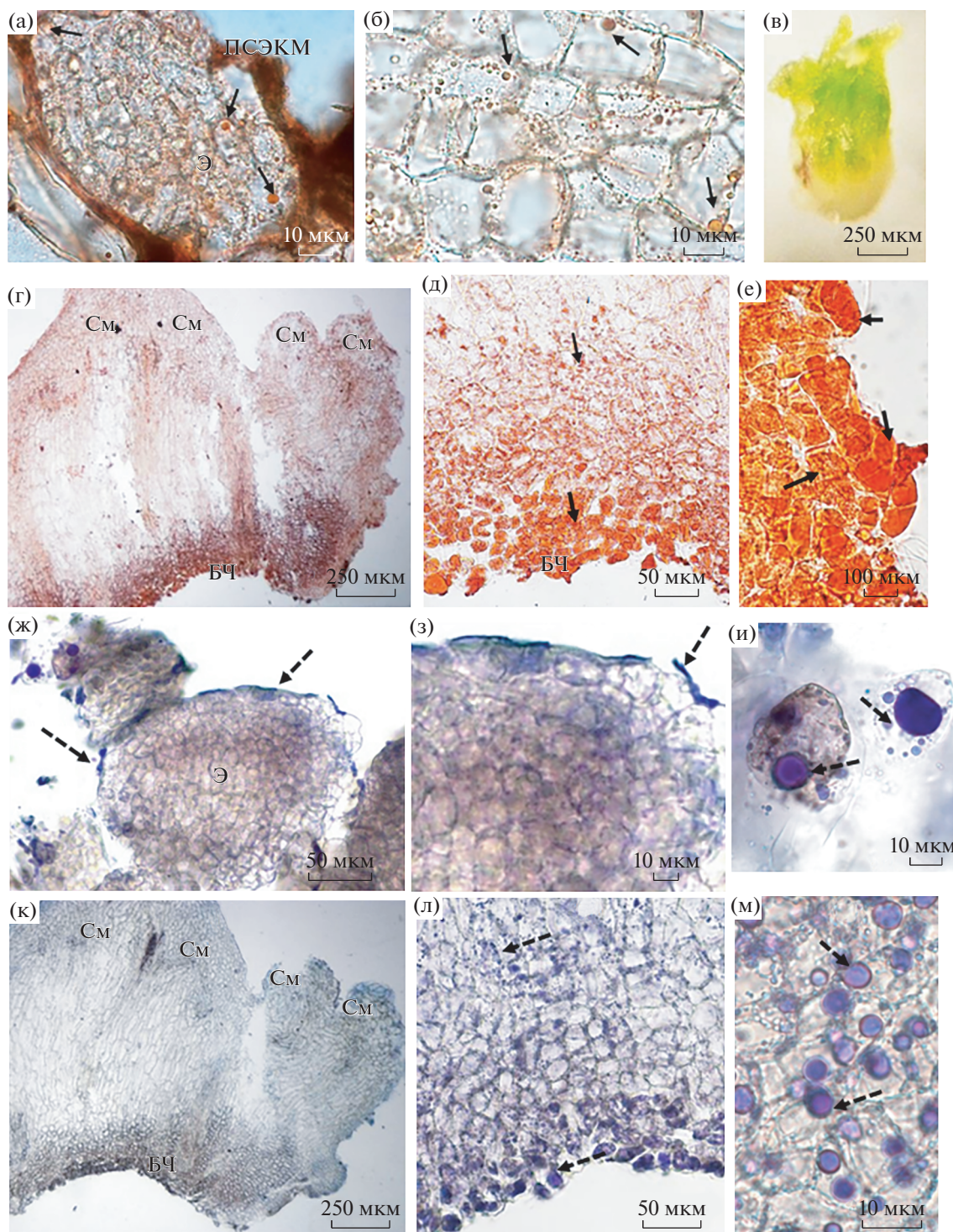
ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что культура *P. rupifragum* является эмбрионной и дифференцированной, поскольку состоит из каллусных клеток и эмбриоидов на разных стадиях развития. Получение эмбрионной культуры для *P. rupifragum* было описано впервые. Поддержание культуры происходит в результате повторяющихся циклов адвентивного эмбриогенеза на безгормональной МС-среде. Эмбриогеннокомпетентными являются отдельные субповерхностные клетки (или группы клеток) предсущего эмбриоида, в то время как остальная часть клеток эмбриоида либо формирует каллус, либо погибает. Особенностью гетерогенной культуры *P. rupifragum* является формирование многочисленных, плотно прилегающих друг к другу

или срастающихся (слитых) эмбриоидов. Образование КСЭ, вероятно, обусловлено, с одной стороны, множественной инициацией эмбриоидов, когда несколько близлежащих клеток (групп клеток) одного эмбриоида начинают синхронное развитие по пути эмбриогенеза (аналогично событиям, описанным при кливажной полиэмбрионии), а, с другой стороны, нарушениями в формировании полноценной кутикулы. Известно, что одна из функций кутикулы — это разделение органов развивающегося растения [17, 18]. Трансгенные растения *Arabidopsis thaliana*, в которых синтез кутина был нарушен сверх-экспрессией гена кутиназы, имели измененную ультраструктуру кутикулы, нарушения в формировании эпидермиса, а также слившиеся органы [17]. Кливажная полиэмбриония как бесполое формирование нескольких зародышей из отдельных клеток зиготического зародыша на его ранних стадиях развития описана для зародышей *in vivo* [19]. Есть достоверные доказательства, что кливажная полиэмбриония на стадии проэмбрио наблюдается в эмбрионных культурах голосеменных [20]. Вероятно, прямое образование эмбриоидов (без стадии каллуса) в культурах с повторяющимся циклами адвентивного эмбриогенеза также может рассматриваться как вариант кливажной полиэмбрионии.

Формирование эмбриоидов *P. rupifragum* сопровождалось развитием фибриллярной ПСЭКМ [21], описанной для эмбрионных культур различных видов растений и характерной для проэмбрио и глобулярных эмбриоидов. Ранее ПСЭКМ, в состав которой входили арабиногалактановые бел-

Рис. 3. Гистохимическое изучение клеток эмбриоидов *P. rupifragum*: а — идентификация липофильных соединений Суданом III в глобулярном эмбриоиде и на его поверхности в качестве компонента ПСЭКМ; б — внутриклеточная локализация липофильных соединений при окрашивании Суданом III; мелкие липофильные тельца расположены вдоль клеточных стенок в клетках глобулярного эмбриоида; в — образование множественных зеленых семядолей в КСЭ; г — локализация липофильных соединений в клетках КСЭ (окрашивание Суданом III); видно увеличение накопления липофильных соединений от верхушки к основанию КСЭ; д — накопление липофильных соединений в клетках базальной части КСЭ, окраска Суданом III; е — деталь рис. 3д; клетки, полностью заполненные липофильными соединениями; ж — выявление терпенов с помощью реактива NADI в глобулярном эмбриоиде и в клетках каллуса; з — прерывистые отложения терпенов в виде слоя, окрашиваемого реактивом NADI, на поверхности глобулярного эмбриоида; и — терпен-содержащие везикулы разного размера в каллусных клетках эмбрионной культуры *P. rupifragum*; к — гистологический срез КСЭ, окрашенного реактивом NADI; л — возрастание внутриклеточного накопления терпенов от семядолей к базальной части КСЭ; м — крупные везикулы и многочисленные мелкие везикулы, окрашиваемые реагентом NADI, в базальной части КСЭ. БЧ — базальная часть КСЭ, ЛТ — липофильное тельце, ПСЭКМ — поверхностная сеть экстраклеточного матрикса, См — семядоля, Э — эмбриоид. Сплошными стрелками указаны липидные тельца, окрашиваемые Суданом III, пунктирными стрелками указаны терпены, окрашиваемые реактивом NADI.



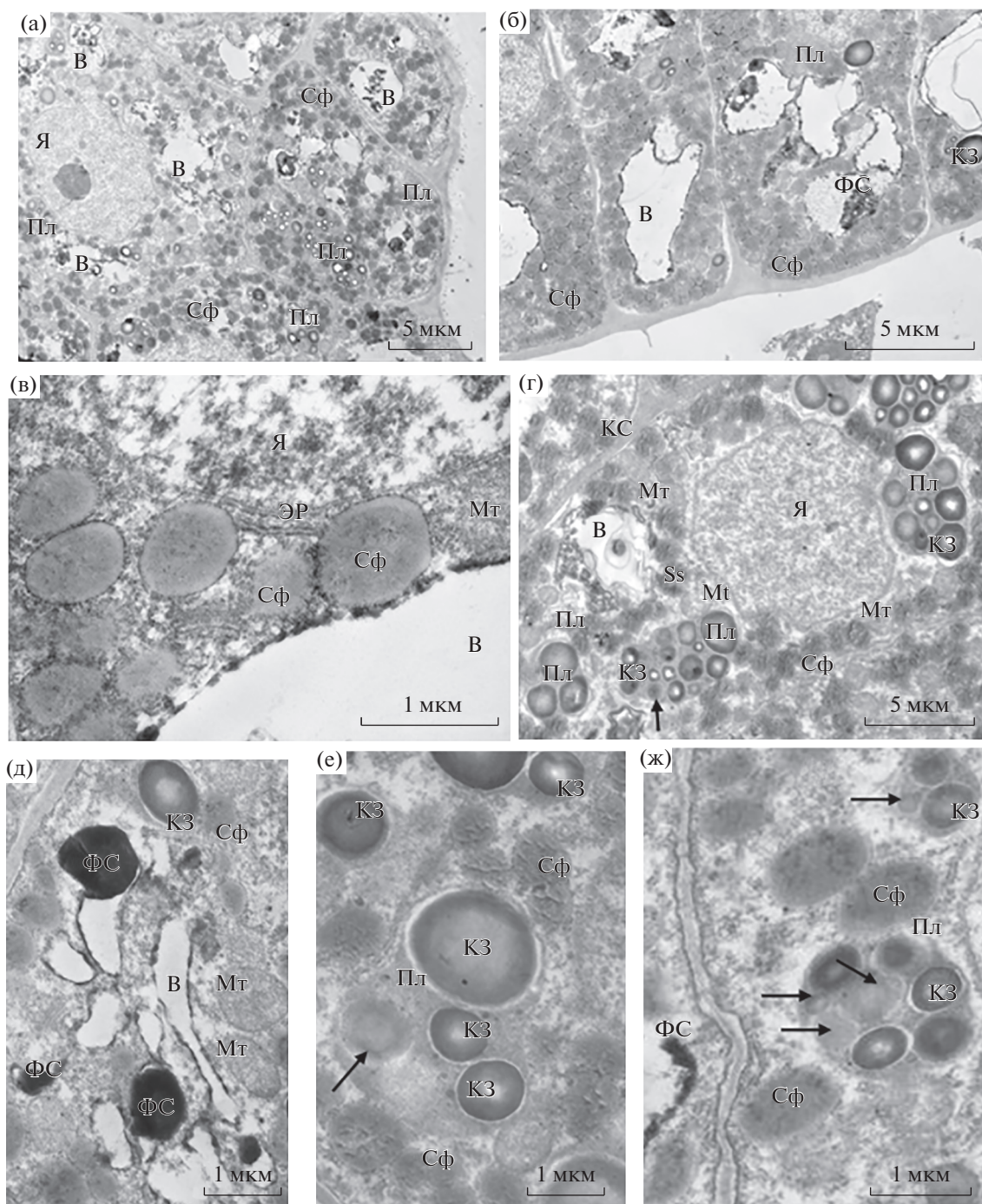


Рис. 4. Электронно-микроскопическое строение клеток эмбрионных структур *P. rupifragum*: а – клетки эмбриоида, содержащие сферосомы, пластиды с крахмальными зёрнами и мелкие вакуоли; б – клетки протодермы эмбриоида, с многочисленными сферосомами в цитоплазме; в – сферосомы, ассоциированные с ЭР; г – цитоплазма клеток с крупными амилопластами, содержащими многочисленные крахмальные зёрна, митохондриями и сферосомами; д – округлые осмиофильные включения и отложение осмиофильного материала по тонопласту в вакуолях; е, ж – пластиды с крахмальными зёрнами и пластоглобулами. В – вакуоль, Мт – митохондрия, КЗ – крахмальное зерно, Пл – пластида, Сф – сферосома, ФС – фенольные соединения, ЭР – эндоплазматический ретикулум, Я – ядро; пластоглобулы указаны стрелкой.

ки и полисахариды, была обнаружена нами в эмбрионном каллусе *Fagopyrum tataricum* [22]. Гистохимически было показано, что в состав ПСЭКМ, обнаруживаемой на поверхности про-

эмбрио и эмбриоидов *P. rupifragum*, входят полисахариды и соединения липофильной природы (липиды и терпены). Ранее липиды были идентифицированы в ПСЭКМ андрогенного каллуса

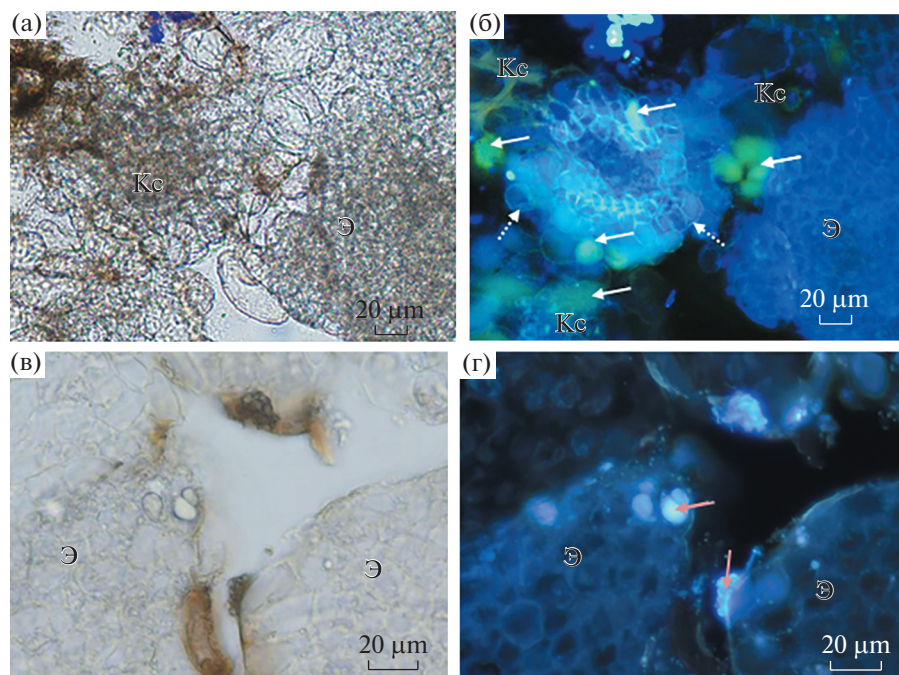


Рис. 5. Автофлуоресценция в клетках эмбриогенной культуры *P. rupifragum* при освещении прижизненных срезов УФ: а, в — прижизненные срезы эмбриоидов, б — автофлуоресценция внутриклеточных включений и клеточных стенок в паренхимных клетках каллусной ткани, г — автофлуоресценция в единичных поверхностных клетках эмбриодов. Кс — каллус, Э — эмбриоид. Белыми сплошными стрелками указана желто-зеленая автофлуоресценция алкалоидов в каллусных клетках, белой пунктирной стрелкой — автофлуоресценция клеточных стенок; розовыми стрелками указана голубая автофлуоресценция фенольных кислот.

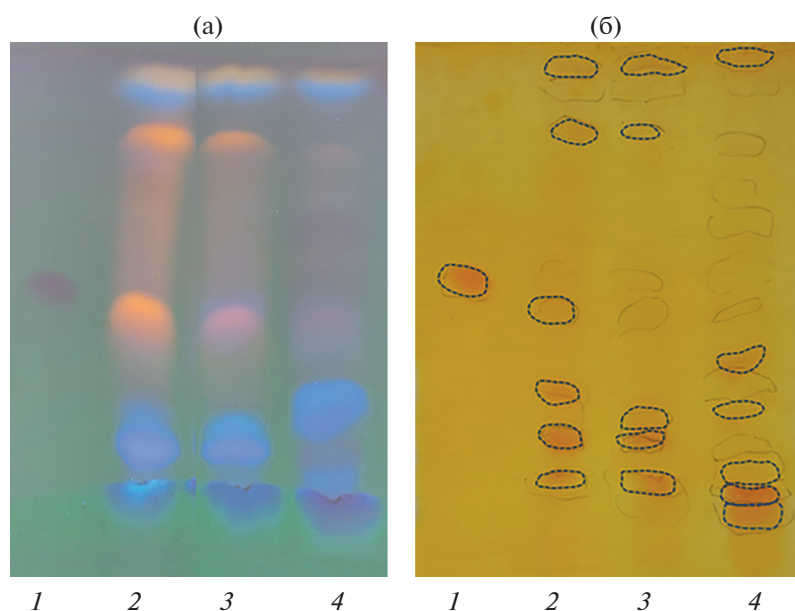


Рис. 6. ТСХ этанольного экстракта эмбриогенных культур *P. rupifragum*, культивируемых в разных условиях. 1 — папаверина гидрохлорид, 4 мкг, 2 — 4 нед. в темноте, 3 — 2 нед. в темноте, 4 — 3 нед. на свету. а — флуоресценция при 312 нм, б — окрашивание реактивом Драгендорфа; пунктирной линией обведены пятна, окрашиваемые реактивом.

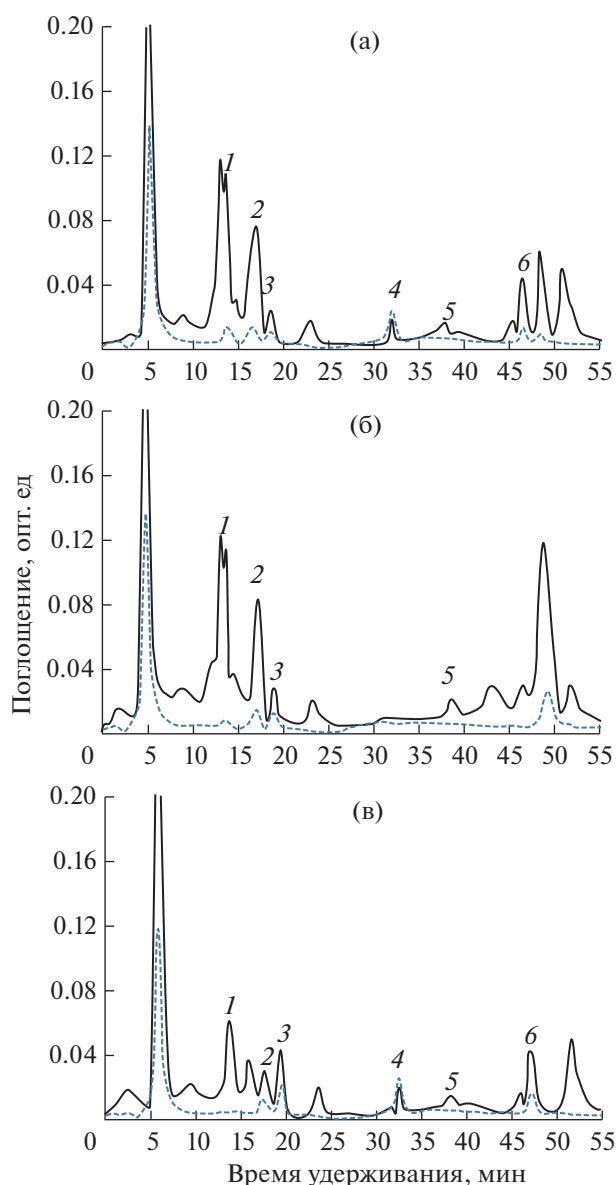


Рис. 7. ВЭЖХ фенольных соединений эмбрионных культур *P. rupifragum*, культивируемых в разных условиях: а — 4 нед. в темноте, б — 2 нед. в темноте, в — 3 нед. на свету (1 — п-кумаровая кислота, 2 — феруловая кислота, 3 — 2,5-дигидроксibenзойная кислота, 4 — кверцетин, 5 — коричная кислота, 6 — кемпферол). Сплошная линия — поглощение при 280 нм, пунктирная линия — поглощение при 360 нм.

пшеницы и камелии [23]. Предположительно, часть веществ, составляющих ПСЭКМ, имеет внутриклеточную природу и накапливается экстракционно в результате разрушения и гибели клеток эмбрионидов, переходящих к каллусообразованию. Нами показано, что цикл, включающий образование каллуса и последующее формирование новых эмбрионидов, происходит в базальной части КСЭ, в которой клетки имеют наиболее крупные липофильные включения (рис. 3). Дру-

гая часть компонентов ПСЭКМ является продуктом секреции полисахаридов и гликозилированных белков, являющихся компонентами клеточных стенок и участвующими в их синтезе, или защитными молекулами. Не исключено, что определенная часть соединений, составляющих ПСЭКМ, являются продуктом шелушивания компонентов клеточных стенок в процессе их модификации и, например, растяжения. Вполне возможно, что образование ПСЭКМ на поверхности проэмбрио и глобулярных эмбрионидов обусловлено аномалиями в образовании кутикулярного слоя и клеточных стенок как результат влияния специфических условий культивирования *in vitro*. Одним из факторов, оказывающим наиболее значимое влияние на физиологию и морфогенез растений *in vitro*, является высокая относительная влажность в сосудах культивирования, достигающая 100% [24]. Установлено, что листья растений, культивируемых *in vitro*, имеют кутикулу тоньше, чем листья растений *in vivo* [25, 26], в некоторых случаях кутикула на листьях отсутствует совсем [27]. Показано, что высокая влажность может нарушать полимеризацию кутина и эпикутикулярных восков, влияя на состав и толщину кутикулы [25], ее механические свойства [28] и проницаемость [29]. По мнению Yeung [30] морфология кутикулярного слоя отражает физические и химические условия развития зародыша. Отсутствие кутикулярного слоя в условиях высокой влажности может приводить к разрыхлению структуры и “шелушиванию” слоев клеточных стенок, что мы обнаружили при изучении ультраструктуры клеток эмбрионидов *P. rupifragum* (рис. 2). Возможными функциями ПСЭКМ, образованной полисахаридами, белками и липофильными соединениями, могут быть механическая защита и поддержание водного баланса в клетках проэмбрио и глобулярных зародышей при отсутствии полностью сформированной протодермы и полноценной кутикулы, а также ее определенная организующая функция на ранних этапах дифференцировки соматических зародышей [23]. Можно предполагать, что дефекты в развитии протодермы и кутикулярного слоя находятся в ряду факторов, “запускающих” повторные циклы каллусирования и образования адвентивных эмбрионидов в эмбрионной культуре мака скалоломного на безгормональной среде.

Как уже было отмечено, для эмбрионидов *P. rupifragum* было характерно накопление соединений липофильной природы. Известно, что семена маковых обогащены триацилглицеридами, жирными кислотами, токоферолом, предшественником которого является дитерпен фитол [2]. Синтез и накопление триацилглицеридов были описаны для эмбрионных каллусов *P. somniferum* и *P. orientale* [31]. Аккумуляцию триацилглицеридов у эмбрионидов в этих видах мака на-

блюдали на стадии глобулы. При переносе соматических зародышей на среду регенерации происходило снижение содержания липофильных соединений. По мнению авторов [31] синтезируемые липиды выполняют энергетическую функцию, так как их содержание в клетках значительно снижалось при прорастании зародышей. Необходимо отметить, что липофильные соединения, накапливающиеся в семенах представителей рода *Papaver*, определяют ценность этого растения для пищевой и косметической промышленности [32]. Семена мака богаты как насыщенными (пальмитиновая, стеариновая), так и полиеновыми (линолевая, олеиновая, альфа-линоленовая) жирными кислотами.

Наши гистохимические исследования показали, что в эмбрионной культуре *P. rupifragum* накапливаются не только липиды (преимущественно, в виде триацилглицеридов), но и терпены. Состав терпенов у маковых изучен слабо. В нескольких работах показано, что фитол — наиболее часто встречающийся терпен у маковых [2]. В листьях *P. rhoeas* выявлены терпен-содержащие стероиды и сесквитерпены [33]. Гистохимические исследования прорастающих эмбриоидов *P. rupifragum* показали, что наибольшее накопление липофильных соединений было обнаружено в базальных клетках КСЭ. Увеличение липофильных соединений в основании прорастающего эмбриоида позволяет рассматривать липиды как энергетический материал, необходимый для инициации новых эмбриоидов или, возможно, для инициации корней. Влияние терпенов на процесс корнеобразования, скорее, противоположный, так как показано, что терпены ингибируют прорастание семян и, в первую очередь, развитие корня [34]. Каковы функции терпенов в циклических ранах адвентивного эмбриоидогенеза в культуре *P. rupifragum*, какова их внутриклеточная локализация (пластидная, в пластоглобулах или цитоплазматическая, в липидных тельцах), а также состав, пока неясно, и это является предметом дальнейших исследований.

У представителей рода *Papaver* определено более 170 алкалоидов [2]. Состав алкалоидов варьирует в пределах одного и того же вида и может определяться условиями произрастания, в пределах одного растения — органом, из которого алкалоиды были выделены [2]. Ранее проведенные биохимические исследования растений *P. rupifragum* показали накопление алкалоидов реадина, протопина, реагенина и магнофлорина [35].

Как и для многих видов растений, синтез алкалоидов у представителей семейства маковых происходит в дифференцированных морфогенных культурах [6, 36, 37]. Гистологические исследования дифференцированных и частично дифференцированных (формирующих отдельные трахеиды)

культур *P. somniferum* позволили предположить, что для синтеза определенных алкалоидов необходимы определенные клеточные структуры [13]. Морфин и кодеин в клеточных культурах *P. somniferum* были обнаружены лишь в тех каллусах, в которых дифференцировались элементы проводящей системы — трахеиды. В каллусных культурах *P. bracteatum*, синтезирующих морфин, были обнаружены клетки аналогичные млечникам [5], которые были ассоциированы с трахеидами. При этом, в клеточных культурах *P. bracteatum*, в которых отсутствовала какая-либо дифференцировка, синтезировались только допамин и сангвинарин [5]. Кунах и Кацан показали, что недифференцированные культуры опийного мака не синтезируют морфинаны [38].

Согласно исследованиям Kutchan [5] накопление алкалоидов в тканях мака может происходить не только в специализированных структурах, но и в вакуолях. Было показано, что накопление сангвинарина и допамина в культуре клеток *P. bracteatum* [5] и сангвинарина в культуре клеток *P. somniferum* [15] происходит в вакуолях, а ферменты CYP80B1 и BBE синтеза сангвинарина, и протопина ассоциированы с эндоплазматическим ретикулулом клетки [13, 15].

В проведенном нами гистологическом исследовании семядольных листьев регенерантов *P. rupifragum* дифференцировка млечников была обнаружена вдоль элементов флоэмы проводящих пучков. Были выявлены широкие трубчатые образования, заполненные многочисленными везикулами. Такая структура является характерным признаком сложных млечников [39]. В обзорной работе Nagel с соавт. [39] отмечено, что членистые, сложные млечники формируются из клеток прокамбия и камбия проводящих пучков. Тем не менее, формирование млечников мы наблюдали только в зеленых семядолях эмбриоидов *P. rupifragum*.

Исследование эмбрионной культуры *P. rupifragum* в УФ обнаружило желто-зеленую автофлуоресценцию в вакуолях как в паренхимных клетках каллуса (рис. 5б), так и в отдельных поверхностных клетках разрыхляющихся эмбриоидов (рис. 5г), что может свидетельствовать о накоплении алкалоидов [15]. Аналогичное желто-зеленое свечение в вакуолях клеток в УФ наблюдали в клетках клеточной культуры опийного мака после добавления в среду культивирования элиситора, выделенного из мицелия *Botrytis cinerea* [15]. По мнению исследователей, желто-зеленая автофлуоресценция соответствует алкалоиду сангвинарину. Проведенные нами исследования показали, что количественный и качественный состав ФС и алкалоидов культуры *P. rupifragum* зависит от возраста культуры и ее дифференцировки, регулируемой условиями выращивания (свет, темнота).

Дифференцированная эмбриогенная культура *P. rufifragum* сохраняет способность к формированию эмбриоидов на безгормональной МС-среде в течение длительного времени культивирования и может являться основой для дальнейшей разработки биотехнологических методов получения лекарственных соединений для косметологии и фармакологии.

Известно, что дифференцированные культуры растений способны синтезировать более широкий спектр вторичных соединений в отличие от недифференцированных каллусных и суспензионных культур. Очевидным преимуществом дифференцированных культур также являются их морфологическая и генетическая стабильность в течение длительного времени культивирования [40].

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственных заданий, выполняемых КИББ ФИЦ КазНЦ РАН (№ государственной регистрации 122011800137-0).

Работа была выполнена частично с использованием оборудования ЦКП САЦ ФИЦ КазНЦ РАН (электронный микроскоп “Hitachi 7800”).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fazili M.A., Bashir I., Ahmad M., Yaqoob U., Geelani S.N. *In vitro* strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review // Bulletin of the National Research Centre. 2022. V. 46. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00717-z>
2. Butnariu M.M., Quispe C., Herrera-Bravo J., Pentea M., Sarac I., Küşümli A.S., Özçelik B., Painuli S., Semwal P., Imran M., Gondal T.A., Emamzadeh-Yazdi S., Lapava N., Yousaf Z., Kumar M. et al. Papaver plants: current insights on phytochemical and nutritional composition along with biotechnological applications // Oxidative Medicine and Cellular Longevity / ed. Hussain T. 2022. V. 2022. P. 1. <https://doi.org/10.1155/2022/2041769>
3. Nessler C.L. Somatic embryogenesis in the opium poppy, *Papaver somniferum* // Physiol. Plant. 1982. V. 55. P. 453. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1982.tb04526.x>
4. Kassem M.A., Jacquin A. Somatic embryogenesis, rhizogenesis, and morphinan alkaloids production in two species of opium poppy // J. Biomed. Biotech. 2001. V. 1. P. 70. <https://doi.org/10.1155/S1110724301000237>
5. Kutchan T.M., Ayabe S., Krueger R.J., Coscia E.M., Coscia C.J. Cytodifferentiation and alkaloid accumulation in cultured cells of *Papaver bracteatum* // Plant Cell Reports. 1983. V. 2. P. 281. <https://doi.org/10.1007/BF00270181>
6. Kunakh V.A. *Papaver somniferum* L. and *Papaver bracteatum* Lindl. // Biotech. Med. Plants. Genetic, physiological and biochemical basis. Kiev: Logos, 2005. P. 516.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
8. Betekhtin A., Rojek M., Jaskowiak J., Milewska-Hendel A., Kwasniewska J., Kostyukova Y., Kurczynska E., Rumyantseva N., Hasterok R. Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn // PLoS ONE 2017. V. 12. e0173537 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173537>
9. Акулов А.Н., Костюкова Ю.А. Условия культивирования, гистологический и биохимический анализ каллусной культуры солодки *Glycyrrhiza glabra* L. // Цитология. 2021. V. 63. P. 590. <https://doi.org/10.31857/S004137712106002X>
10. Folin O., Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins // J. Biol. Chem. 1927. V. 73. P. 627. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)84277-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)84277-6)
11. Wagner H., Bladt S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2nd ed. Berlin; New York: Springer, 1996. 384 p.
12. Šamaj J., Bobák M., Blehová A., Krištin J., Auxtová-Šamajová O. Developmental SEM observations on an extracellular matrix in embryogenic calli of *Drosera rotundifolia* and *Zea mays* // Protoplasma. 1995. V. 186. P. 45. <https://doi.org/10.1007/BF01276934>
13. Facchini P.J., Bird D.A. Developmental regulation of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy plants and tissue cultures // In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant. 1998. V. 34. P. 69. <https://doi.org/10.1007/BF02823126>
14. Della Rocca G., Papini A., Posarelli I., Barberini S., Tani C., Danti R., Moricca S. Ultrastructure of terpene and polyphenol synthesis in the bark of *Cupressus sempervirens* after *Seiridium cardinale* infection // Front. Microbiol. 2022. V. 13. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.886331>
15. Alcantara J., Bird D.A., Franceschi V.R., Facchini P.J. Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells after elicitor treatment // Plant Physiol. 2005. V. 138. P. 173. <https://doi.org/10.1104/pp.105.059287>
16. Zhang N., Wang M., Li Y., Zhou M., Wu T., Cheng Z. TLC–MS identification of alkaloids in *Leonuri herba* and *Leonuri fructus* aided by a newly developed universal derivatisation reagent optimised by the response surface method // Phytochem. Analys. 2021. V. 32. P. 242. <https://doi.org/10.1002/pca.2970>
17. Sieber P., Schorderet M., Ryser U., Buchala A., Kolatukudy P., Métraux J.-P., Nawrath C. Transgenic Arabidopsis plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions // Plant Cell. 2000. V. 12. P. 721. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.5.721>
18. Javelle M., Vernoud V., Rogowsky P.M., Ingram G.C. Epidermis: the formation and functions of a fundamen-

- tal plant tissue // New Phytol. 2011. V. 189. P. 17.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03514.x>
19. Батыгина Т.Б., Виноградова Г.Ю. Феномен полиэмбрионии. Генетическая гетерогенность семян // Онтогенез. 2007. V. 38. № 7. P. 166.
 20. Filonova L.H., Bozhkov P.V., Arnold S. von. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking // J. Exp. Bot. 2000. V. 51. P. 249.
<https://doi.org/10.1093/jexbot/51.343.249>
 21. Румянцева Н.И. Арабиногалактановые белки: участие в росте и морфогенезе растений // Биохимия. 2005. V. 70. № 10. P. 1301.
 22. Румянцева Н.И., Шамай Й., Энзикат Х.-Ю., Сальников В.В., Балушка Ф., Фолькманн Д. Изменение поверхностной сети экстраклеточного матрикса в процессе циклического воспроизводства проэмбриональных клеточных комплексов в каллусе *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. // Докл. Акад. наук. 2003. V. 391. № 1. P. 123.
 23. Konieczny R., Bohdanowicz J., Czaplicki A., Przywara L. Extracellular matrix surface network during plant regeneration in wheat anther culture // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2005. V. 83. P. 201.
<https://doi.org/10.1007/s11240-005-5771-9>
 24. Hazarika B. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants // Scientia Horticulturae. 2006. V. 108. P. 105.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038>
 25. Kerstiens G. Effects of low light intensity and high air humidity on morphology and permeability of plant cuticles, with special respect to plants cultured *in vitro* // Physiol. Growth Develop. Plants Cult. / ed. Lumsden P.J., Nicholas J.R., Davies W.J. Dordrecht: Springer Netherlands, 1994. P. 132.
 26. Johansson M., Kronstedt-Robards E., Robards A. Rose leaf structure in relation to different stages of micropropagation // Protoplasma. 1992. V. 166. P. 165.
<https://doi.org/10.1007/BF01322779>
 27. Wetzstein H., Sommer H. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization // Amer. J. Bot. 1982. V. 69. P. 1579.
<https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1982.tb13411.x>
 28. Matas A., Lopez-Casado G., Cuartero J., Heredia A. Relative humidity and temperature modify the mechanical properties of isolated tomato fruit cuticles // Amer. J. Bot. 2005. V. 92. P. 462.
<https://doi.org/10.3732/ajb.92.3.462>
 29. Schreiber L., Skrabs M., Hartmann K., Diamantopoulos P., Simanova E., Santrucek J. Effect of humidity on cuticular water permeability of isolated cuticular membranes and leaf disks // Planta. 2001. V. 214. P. 274.
<https://doi.org/10.1007/s004250100615>
 30. Yeung E. The orchid embryo – “an embryonic protocorm” // Botany. 2022. V. 100. P. 691.
<https://doi.org/10.1139/cjb-2022-0017>
 31. Schuchmann R., Wellmann E. Somatic embryogenesis of tissue cultures of *Papaver somniferum* and *Papaver orientale* and its relationship to alkaloid and lipid metabolism // Plant Cell Reports. 1983. V. 2. P. 88.
<https://doi.org/10.1007/BF00270173>
 32. Lančaričová A., Havrlentová M., Muchová D., Bednářová A. Oil content and fatty acids composition of poppy seeds cultivated in two localities of Slovakia // Agriculture (Polnohospodárstvo). 2016. V. 62. P. 19.
<https://doi.org/10.1515/agri-2016-0003>
 33. Christodoulakis N., Tsiarta M., Fasseas C. Leaf structure and histochemical investigation in *Papaver rhoeas* L. (Corn Poppy, Field Poppy) // J. Herbs, Spices Med. Plants. 2013. V. 19. P. 119.
<https://doi.org/10.1080/10496475.2012.755942>
 34. Singh H., Batish D., Kaur S., Arora K., Kohli K. α -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots // Ann. Bot. 2006. V. 98. P. 1261.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcl213>
 35. Slavíková L., Slavík J. Alkaloids from *Papaver rupifragum* BOISS. & REUT. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1980. V. 45. P. 761.
<https://doi.org/10.1135/cccc19800761>
 36. Galewsky S., Nessler C. Synthesis of morphinan alkaloids during opium poppy somatic embryogenesis // Plant Sci. 1986. V. 45. P. 215.
[https://doi.org/10.1016/0168-9452\(86\)90142-1](https://doi.org/10.1016/0168-9452(86)90142-1)
 37. Kamo K., Mahlberg P. Morphinan alkaloids: biosynthesis in plant (*Papaver* spp.) tissue cultures // Medic. Aromat. Plants I / ed. Bajaj Y.P.S. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1988. V. 4. P. 251.
 38. Кунах В.А., Кацан В.А. Биосинтез изохинолиновых алкалоидов мака в природе и культуре *in vitro* 1. Мак снотворный *Papaver bracteatum* L. // Укр. биохим. ж. 2003. V. 75. № 5. P. 41.
 39. Hagel J., Yeung E., Facchini P. Got milk? The secret life of laticifers: 12 // Trends Plant Sci. 2008. V. 13. P. 631.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.09.005>
 40. Krasteva G., Georgiev V., Pavlov A. Recent applications of plant cell culture technology in cosmetics and foods // Engin. Life Sci. 2021. V. 21. P. 68.
<https://doi.org/10.1002/elsc.202000078>