

УДК 57.085.23

DOI: 10.7868/S3034606125040056

КУЛЬТУРА КЛЕТОК РУТЫ ДУШИСТОЙ: ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ, ЛОКАЛИЗАЦИЯ И СОДЕРЖАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Ю. А. Костюкова, А. Н. Акулов*, А. И. Валиева

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук,
Казань, 420111, Российская Федерация

* E-mail: akulov_anton@mail.ru

Обоснование и цель. Культура клеток, полученная из листовых эксплантов (листьев, выращенных в условиях *in vitro*) ценного лекарственного растения руты душистой (*Ruta graveolens* L.), длительно поддерживает морфогенный потенциал: при культивировании в темноте происходит формирование меристематических, листовидных структур, а на свету — побегов. Цель работы заключалась в изучении строения морфогенной клеточной культуры руты и накопления в ней вторичных соединений. **Методы.** Использовали гистологические, гистохимические методы, а также метод флуоресцентной микроскопии. **Результаты** показали наличие в клеточной культуре руты специализированных структур — вместилищ и идиобластов, в которых происходило накопление терпенов, алкалоидов, кумаринов. Биохимический анализ показал присутствие в культуре клеток алкалоидов, простых кумаринов, фуранокумаринов и терпенов. Содержание алкалоидов варьировало от 0.31 до 0.52 мг/г сухого веса по ходу культивирования и было наименьшим на 16-е сут. Содержание кумаринов увеличивалось к концу культивирования от 0.20 до 0.66 мг/г сухого веса. **Вывод.** Полученная клеточная культура руты душистой может представлять интерес в качестве объекта для изучения особенностей клеточной дифференцировки и в качестве возможного продуцента различных типов БАВ.

Ключевые слова: *Ruta graveolens*, автофлуоресценция, алкалоиды, морфогенная культура клеток, кумарины, терпеноиды

Принятые сокращения: БАВ — биологически активные вещества; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ЛпС — листовидные структуры; ТСХ — тонкослойная хроматография; УЗ — ультразвук; УФ — ультрафиолет.

Благодарности. Авторы благодарны коллективному спектро-аналитическому центру физико-химических исследований строения, свойств и состава веществ и материалов (ЦКП-САЦ) Казанского научного центра РАН за частичное использование его оборудования (электронного микроскопа Hitachi 7800).

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН.

Соблюдение этических стандартов. Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Ссылка для цитирования: Костюкова Ю. А., Акулов А. Н., Валиева А. И. Культура клеток руты душистой: гистологические особенности, локализация и содержание биологически активных веществ. Цитология / Cell and Tissue Biology, 2025, том 67, № 4, с. 255. doi: 10.7868/S3034606125040056

Поступила в редакцию 27.08.2025
После доработки 12.09.2025
Принята к публикации 17.09.2025

УДК 57.085.23

DOI: 10.7868/S3034606125040056

Rue Cell Culture: Histological Features, Localization and Content of Biologically Active Substances

Y. A. Kostyukova, A. N. Akulov*, A. I. Valieva

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
Kazan, 420111, Russian Federation*

* e-mail: akulov_anton@mail.ru

Abstract. Objective: A cell culture obtained from leaf explants of the valuable medicinal plant *Ruta graveolens* L. seedlings grown in vitro maintains its morphogenic potential for a long time. When cell culture is cultivated at the dark meristemoids and leaf-like structures were formed, and when it cultivated at light the shoots are formed. The aim of the work was a histological and biochemical study of morphogenic rue cell culture. **Methods:** Histological, histochemical methods, as well as fluorescence microscopy were used. **Results:** Specialized structures, idioblasts, containing clusters of alkaloid droplets, and cavities, accumulating terpenes were revealed. Biochemical analysis also revealed that alkaloids, coumarins, furanocoumarins and terpenes are synthesized in the rue cell culture. The alkaloid content ranged from 0.31 to 0.52 mg/g dry weight during the passage and was lowest on day 16 of cultivation. The content of coumarins increased by the end of passage from 0.20 to 0.66 mg/g dry weight. **Conclusion:** The rue cell culture may be used as an object for studying the features of cell differentiation, and as a possible producer of various types of biologically active substances.

Keywords: *Ruta graveolens*, autofluorescence, alkaloids, morphogenic cell culture, coumarins, terpenoids

Acknowledgments. The authors thank the Collective Spectro-Analytical Center for Physicochemical Studies of the Structure, Properties, and Composition of Substances and Materials (CKP-SAC) of FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences for the partial use of its equipment (Hitachi 7800 electron microscope).

Funding. This work was carried out under the state assignment of the Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences.

Ethics approval and consent to participate. The authors did not conduct any experiments involving animals or human participants.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

For citation: Kostyukova Y. A., Akulov A. N., Valieva A. I. Rue cell culture: histological features, localization and content of biologically active substances. *Tsitologiya / Cell and Tissue Biology*, 2025, vol. 67, no. 4, p. 209. doi: 10.7868/S3034606125040056

Received August 27, 2025
Revised September 12, 2025
Accepted September 17, 2025

Рута душистая (*Ruta graveolens* L.) является источником более 120 различных биологически активных веществ (БАВ) и находит применение в фармакологии и косметологии (Petit-Paly et al., 1989; Malik et al., 2017; Szweczyk et al., 2022). БАВ руты душистой обладают широким спектром лечебных свойств. Например, фуранокумарины используются для лечения кожных заболеваний, таких как витилиго и псориаз (Szweczyk et al., 2022), акридоновые алкалоиды — для лечения опухолей (Eilert, 1988; Yadav et al., 2022). Эти соединения проявляют также антибактериальное и противогрибковое действие (Petit-Paly et al., 1989; Fredj et al., 2007; Adamska-Szweczyk et al., 2016; Malik et al., 2017). Ценные вторичные метаболиты руты душистой локализованы в клетках различных тканей и органов: терпены накапливаются в секреторных вместилищах листьев, плодов, цветков (Malik et al., 2017), акридоновые алкалоиды — в идиобластах и проводящих тканях корней, стеблей и листьев (Eilert, 1988; Junghanns et al., 1998), фуранокумарины — в элементах проводящей системы листьев растений и в клетках перикарпия (Milesi et al., 2001), либо в эпидермальных клетках листа (Zobel, Brown, 1989), простые кумарины — в листьях, плодах, стеблях и корнях растений (Malik et al., 2017).

Многочисленные работы, проведенные по индукции клеточных культур растений *in vitro* показали, что культивируемые клетки могут представлять высококачественный растительный материал для фармацевтических или косметических целей (Szweczyk et al., 2022). В ранее проведенных исследованиях по индукции клеточных культур руты душистой было показано, что каллусные и суспензионные культуры сохраняют способность к синтезу и накоплению вторичных метаболитов в специализированных клетках и многоклеточных структурах, функционально аналогичным структурам в растениях *in vivo* (Malik et al., 2017; Ahmad 2010; Szweczyk et al., 2022). Терпены накапливаются в секреторных вместилищах (Кузовкина и др., 1975; Peterson et al., 1978), кумарины — в паренхимных клетках и/или идиобластах (Кузовкина и др., 1975), алкалоиды — исключительно в идиобластах (Eilert et al., 1986). Изучение взаимосвязи между уровнем дифференцировки клеточной культуры и составом БАВ при длительном поддержании клеток является важным для понимания ее потенциальных возможностей (Kruglova et al., 2023).

В опубликованных исследованиях по клеточным культурам руты были представлены результаты, касающиеся локализации и накопления лишь отдельных групп вторичных метаболитов. Работ по клеточной культуре руты, индуцированной из листьев растений *in vitro*, в которых было бы представлено одновременное изучение локализации и накопления БАВ всех основных классов вторичных соединений этого растения, нам не известны. Цель работы заключалась в гистологическом и биохимическом исследовании длительно культивируемой морфогенной клеточной культуры руты, полученной из листовых эксплантов растений руты душистой.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объект исследования. Семена руты душистой (*Ruta graveolens* L.) были получены из питомника редких и лекарственных растений Г. А. Анисимова (Томск, Россия). Для выращивания растений в асептических условиях, а также для получения и поддержания культуры клеток

применяли питательные среды на основе микро- и макроэлементов среды MS (Murashige, Skoog, 1962). Среде MS/HF использовали для выращивания растений, а среду MS/Rg1 для индукции каллуса и дальнейшего субкультивирования. В среду MS/HF были добавлены 25 г/л сахарозы, тиамин, пиридоксин и никотиновая кислота по 2 мг/л и 100 мг/л мезоинозитола. В среду MS/Rg1 дополнительно к вышеперечисленным компонентам добавляли 3 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4 Д), 2 мг/л индол-3-уксусной кислоты (ИУК), 2 мг/л альфа-нафтилуксусной кислоты (НУК) и 0.5 мг/л кинетина. Величину pH всех питательных сред доводили до 5.5—5.6, используя разбавленную HCl, добавляли 7.5 г/л агар-агара и автоклавировали при 0.7 атм 1 ч. Семена стерилизовали в 10 %-ном растворе гипохлорита натрия и проращивали на среде MS/HF (световой режим: 16 ч день, 8 ч ночь; температура 24—25 °С). Для индукции каллуса использовали экспланты листьев 30-суточных растений, выращиваемых *in vitro* на среде MS/HF. Среде MS/Rg1 использовали для поддержания клеточной культуры.

Гистологическое изучение клеточной культуры руты выполняли на образцах, зафиксированных в эпоксидной смоле Epon 812 по методике, описанной ранее (Румянцева и др., 2023). Срезы изучали с помощью микроскопа Jenamed (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали, используя цифровую насадку AxioCam MRc5 с программным обеспечением AxioVision Rel. 4.6. Прижизненное исследование клеточной культуры осуществляли на препаратах, приготовленных на микротоме с вибрирующим лезвием VT1000 S (Leica, Германия) по описанной ранее методике (Акулов, Костюкова, 2021). Локализацию терпенов определяли на прижизненных срезах, как описано ранее (Акулов, Костюкова, 2021), с помощью реактива NADl, состоящего из N, N-диметил-п-фенилендиамина солянокислого, α -нафтола в фосфатном буфере. Известно, что реактивом NADl терпены окрашиваются в фиолетовый цвет (Pasqua et al., 2002), а эфирные масла — в голубой (Machado et al., 2006). Срезы изучали с помощью микроскопа Jenamed (Carl Zeiss, Германия), фотографировали цифровой камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия).

Флуоресцентная микроскопия. Для выявления autofлуоресцирующих структур применяли прижизненные срезы толщиной 25 мкм. Готовые препараты сначала просматривали в проходящем свете, а затем в отраженном ультрафиолетовом (УФ; длина волны источника УФ 330—380 нм, возбуждающий фильтр 400 нм, запирающий эмиссионный фильтр 420 нм) с использованием флуоресцентного микроскопа Биолам-Л (ЛОМО, Россия). Для обнаружения кумаринов прижизненные срезы помещали на 10 мин в 10 %-ный раствор аммиака. Затем срезы изучали с помощью микроскопа Jenamed (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали, используя цифровую насадку AxioCam MRc5 с программным обеспечением AxioVision Rel. 4.6.

Подготовка образцов для биохимического анализа. Клеточную массу отделяли от среды культивирования, 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. Выделение и спектрофотометрическое определение алкалоидов проводили по методу, описанному ранее (Валиева, Акулов, 2024).

Суммы кумаринов оценивали на основе методики количественного определения кумаринов в траве донника лекарственного (*Herbae meliloti*) согласно фармакопейной статье-протоколу (ФСП 42-0330168301). К 100 мг сухой измельченной клеточной массы добавляли 20 мл гексана и экстрагировали 2 ч на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Экстракт отбирали и отбрасывали, остаток высушивали, а затем экстрагировали 20 мл хлороформа 1.5 ч на кипящей водяной бане. Охлажденный экстракт фильтровали, центрифугировали (10 мин, 12000 g) и доводили объем до 10 мл. Полученный экстракт кумаринов использовали для спектрофотометрического определения кумаринов и ВЭЖХ-анализа. Оптическую плотность полученного экстракта кумаринов измеряли на спектрофотометре Lambda 25 (Perkin Elmer, США) при 310 нм. Содержание кумаринов X вычисляли по формуле $X = D \times 10 \times 10 / 365 \times m$, где D — оптическая плотность экстракта; 10 — объем экстракта, мл; 10 — коэффициент пересчета, в мг/г; 365 — удельный показатель поглощения кумарина в хлороформе; m — масса навески, г.

Выделение и очистка алкалоидов для высокоэффективной жидкой хроматографии (ВЭЖХ). К 100 мг сухой и измельченной клеточной массы добавляли 2 мл петролейного эфира, обрабатывали ультразвуком (УЗ) (10 мин, 30 кГц), центрифугировали (10 мин, 12000 g), петролейный эфир отбирали, осадок повторно экстрагировали петролейным эфиром. Затем остаток высушивали и использовали для выделения алкалоидов. Навеску (25 мг) заливали 1 мл 80 %-ного этанола подкисленного HCl (до 2 % по объему), обрабатывали УЗ (10 мин, 30 кГц) и центрифугировали (10 мин, 12000 g). Экстракцию повторяли дважды, супернатанты объединяли. Этанол выпаривали при 35 °С, 20 ГПа на вакуумном концентраторе (Eppendorf Concentrator plus/Vacufuge TM, США), экстракт доводили до 1 мл водой, добавляли 1 мл хлороформа, перемешивали и расслаивали центрифугированием (1 мин, 1000 g). Верхнюю (водную) фазу, содержащую соли алкалоидов, отбирали, подщелачивали 10 %-ным NH₄OH до pH 9, добавляли равный объем хлороформа, перемешивали и расслаивали центрифугированием (1 мин, 1000 g). Нижнюю (хлороформную) фазу, содержащую основания алкалоидов, отбирали и высушивали в струе воздуха при 50 °С. Полученный экстракт алкалоидов растворяли в 100 мкл 80 %-ного этанола, подкисленного HCl (до 2 %, по объему) и использовали для дальнейшей ВЭЖХ.

ВЭЖХ алкалоидов и кумаринов проводили на хроматографической системе высокого давления BioLogic DuoFlow™ (BioRad, США), использовали колонку Symmetry® C18 (3.9 × 150 мм, 5 мкм, 10 нм) (Waters, США). Детекцию пиков осуществляли посредством детектора BioLogic QuadTec UV/Vis (BioRad, США) при длине волны 260 нм для кумаринов и 280 нм для алкалоидов. Объем вводимой пробы составлял 50 мкл.

Для разделения алкалоидов использовали следующие растворы: раствор А — деионизированная вода MilliQ, раствор Б — 60 %-ный ацетонитрил. Градиент раствора Б был построен по следующей схеме: 0—1 мин — 0 %; 1—11 мин — 0—10 %; 11—36 мин — 10—100 %; 36—41 мин — 100 %; 41—42 мин — 100—0 %; 42—45 мин — 0 %. Скорость потока — 0.8 мл/мин.

Для разделения кумаринов использовали изократический режим элюции. В качестве подвижной фазы

использовали смесь воды, метанола и ацетонитрила (50:35:15). Скорость подачи подвижной фазы — 0.6 мл/мин. Для идентификации пиков кумаринов использовали кумарин и экстракт смеси фуранокумаринов, состоящую из бергаптена, ксантоксина и изопимпинеллина. Для количественного анализа фуранокумаринов использовали калибровочную кривую, построенную, исходя из определенного количества стандартного образца и площади его пика на хроматограмме.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) вторичных метаболитов. Для ТСХ использовали пластины ПТСХ-АФ-А-УФ (Sorbfil, Россия). ТСХ алкалоидов проводили как описано ранее (Валиева, Акулов, 2024). ТСХ-пластину рассматривали на трансиллюминаторе ТСП-20 МС (Vilbert Lourmat, Франция) при 312 нм. Для проявления алкалоидов применяли реактив Драгендорфа (Wagner, Bladt, 1996). Для ТСХ терпеноидов к 50 мг сухой измельченной клеточной массы добавляли 2 мл смеси петролейного эфира и ацетона (1:1), обрабатывали УЗ (5 мин, 30 кГц, 20 °С), центрифугировали (10 мин, 10000 g), супернатант высушивали досуха и растворяли в 10 мкл ацетона. Разделение проводили в смеси петролейный эфир—гексан—ацетон (2:1:1). Для выявления терпеноидов ТСХ-пластину опрыскивали анисовым альдегидом и затем нагревали 5 мин при 100 °С (Wagner, Bladt, 1996).

Статистическая обработка данных. Среднее арифметическое значение и стандартную ошибку определяли с использованием программы SigmaPlot. Значимость отличий определяли, используя критерий Тьюки для множественных сравнений (ANOVA) при уровне $P \leq 0.05$.

Использованные реактивы. Реактивы для приготовления сред за исключением сахарозы имели маркировку ACS grade, производства фирм Serva и Sigma-Aldrich (США). Другие реактивы: бромкрезоловый зеленый, кумарин, эпоксидная смола Epon 812 (Sigma-Aldrich, США), глутаровый альдегид (Fluca, Швейцария), толуидиновый синий (Serva, Германия), пропилен (Acros, США), ацетон, ацетонитрил, гексан, гидроксид аммония, гидроксид калия, петролейный эфир, соляная кислота, хлороформ, этанол, этилацетат, гидроксид аммония (Chemman Мосреактив, Россия), йодистый калий, нитрат висмута основной, сахароза («Реахим», Россия), N, N-диметил-п-фенилендиамин солянокислый, α -нафтол, ледяная уксусная кислота (ОТК «Экос-1», Россия), анисовый альдегид (Gunna, Россия), ксантоксин, бергаптен, изопимпинеллин («Вилар», Россия), тетраоксид осмия (Alfa Aesar, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологические характеристики клеточной культуры руты душистой. В работе по получению клеточной культуры мы проверяли различные сочетания фитогормонов, и наиболее эффективной комбинацией оказалась комбинация фитогормонов в среде MS/Rg1. Эта комбинация показала не только самую высокую частоту каллусогенеза, но обеспечивала рост культуры клеток при длительном культивировании. Длительность культивирования составляла 30 сут. Прирост биомассы за это время составлял 240.5 % от исходной биомассы.

Время отбора образцов для исследования определяли по появлению отчетливых морфологических изменений культуры. Поэтому для изучения морфологических, биохимических и гистологических особенностей клеточной

культуры руты душистой были отобраны образцы на 7-е, 16-е и 21-е сут культивирования. На 7 сут культивирования клеточная культура руты душистой представляла собой плотную массу клеток белого цвета с редкими желтыми очагами на поверхности (рис. 1а). На 16-е сут клеточная культура руты приобретала более желтый оттенок (рис. 1б), а на 21-е сут клеточная культура становилась более рыхлой, с множественными участками желтого цвета, состоящими из структур с гладкой, блестящей поверхностью (рис. 1в). При выращивании клеточной культуры руты на свету на среде MS/HF наблюдали образование побегов и листьев из плотных желтых структур (рис. 1б, з–е). Клеточная культура руты в течение 5 лет сохраняет способность к геммогенезу и имеет гетерогенную морфологию.

Гистологическая характеристика клеточной культуры руты. Особенности клеточной культуры руты изучали в те же сроки: на 7-е, 16-е и 21-е сут культивирования. На 7-е сут в клеточной культуре обнаружены округлые паренхимные клетки двух типов, отличающиеся внутриклеточной организацией. На срезах клеточной культуры выявлены клетки паренхимного типа с большой центральной вакуолью, с крупными крахмальными зернами в амилопластах (рис. 2а), а также клетки с плотной цитоплазмой, с крупными ядрами, с одной крупной и несколькими мелкими вакуолями (рис. 2б). Последний морфологический тип клеток сходен с клетками, имеющими активный метаболизм и, возможно, синтезирующими вторичные метаболиты (Canaveze et al., 2021).

В культуре на 7-е сут также обнаружены округлые клеточные комплексы, состоящие из удлиненных вакуолизированных клеток, расположенных слоями (рис. 2в).

В центральной зоне этих комплексов были выявлены сосудистые элементы (рис. 2з). В клеточных культурах аналогичные клеточные комплексы рассматриваются как меристемоиды (McCown et al., 1988; Dobrowolska et al., 2017). Присутствие в меристемоидах сосудистых элементов предполагает наличие в них прокамбиальных клеток (Miyashima et al., 2012), которые обладают свойством плюрипотентности (Wang et al., 2011) и могут быть клетками-инициалами меристемоидов. Кроме описанных клеток и комплексов, в клеточной культуре руты были обнаружены кластеры клеток, возникшие в результате координированных периклинальных делений (рис. 2д). Формирование подобных кластеров клеток описано для растущих органогенных каллусов киви (Czernicka et al., 2021).

На 16-е сут на гистологических срезах клеточной культуры руты наблюдали лопастные структуры, поверхность которых была покрыта эпидермальными клетками, среди которых встречались замыкающие клетки устьиц (рис. 3а, б). Данную структуру мы рассматриваем как листовидную (ЛпС). В течение пассажа, в условиях отсутствия освещения, на ЛпС преобладал процесс образования каллуса, однако на отдельных ЛпС формировались желтые блестящие уплотнения (рис. 3в). На прижизненных гистологических срезах желтые уплотнения имели неправильную форму с многочисленными протуберанцами (рис. 3з). Продольные гистологические срезы желтых уплотнений показали, что уплотнения состоят из меристематических клеток, к которым закладывалась проводящая система (рис. 3д, е). Побеговая или корневая меристемы на срезах не определялись. Подобное анатомическое строение характерно для процессов

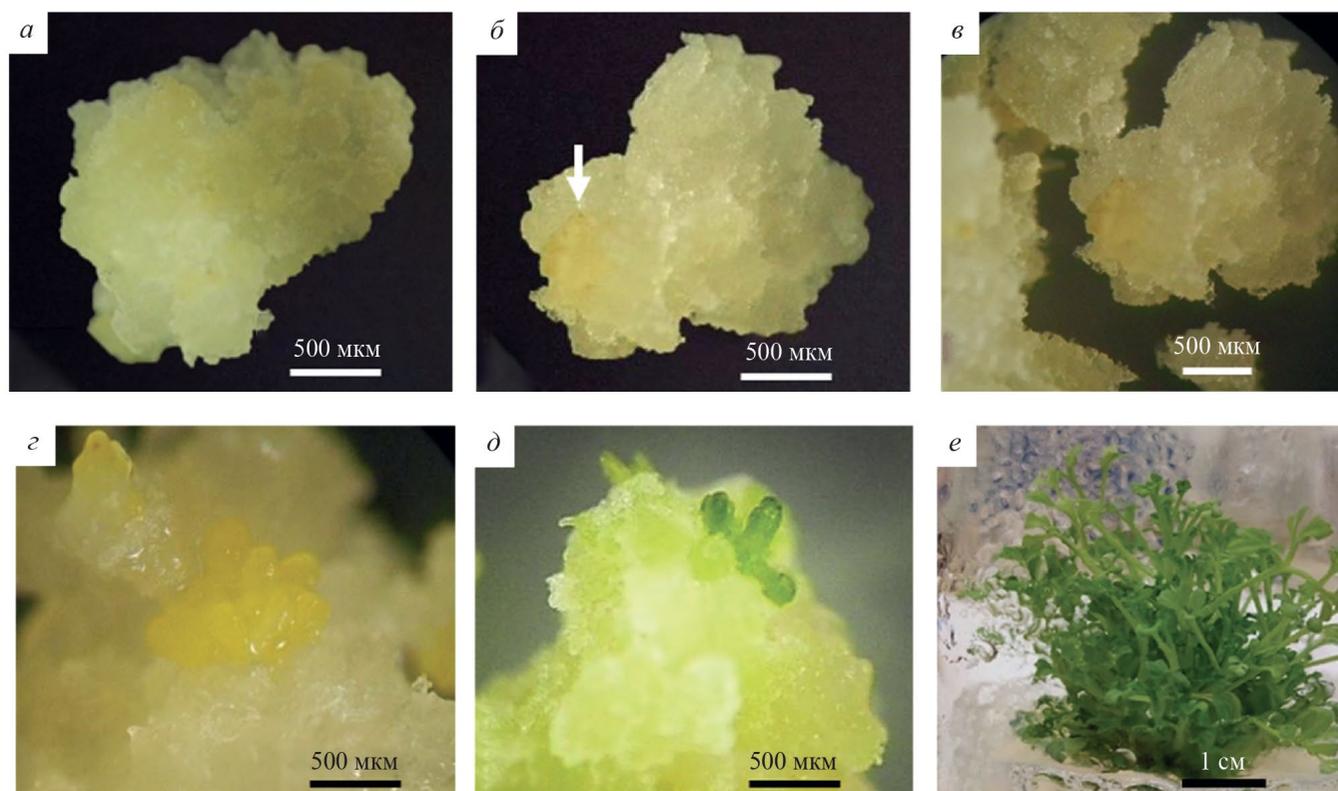


Рис. 1. Культура клеток руты душистой, растущая на среде MS/Rg1 в темноте (а–в) и на среде MS/HF на свету (з–е). Желтые уплотнения (б) указаны стрелкой.

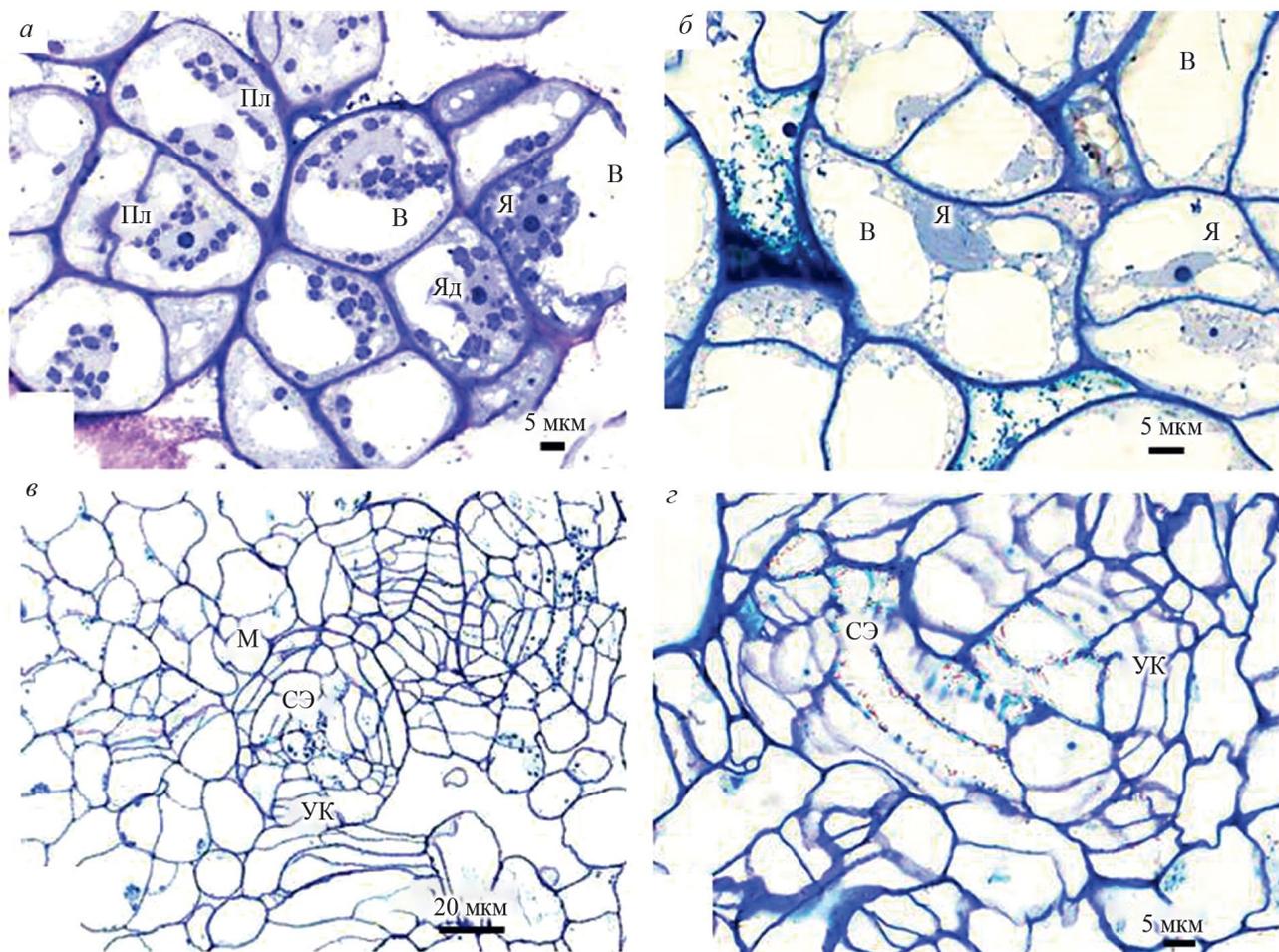


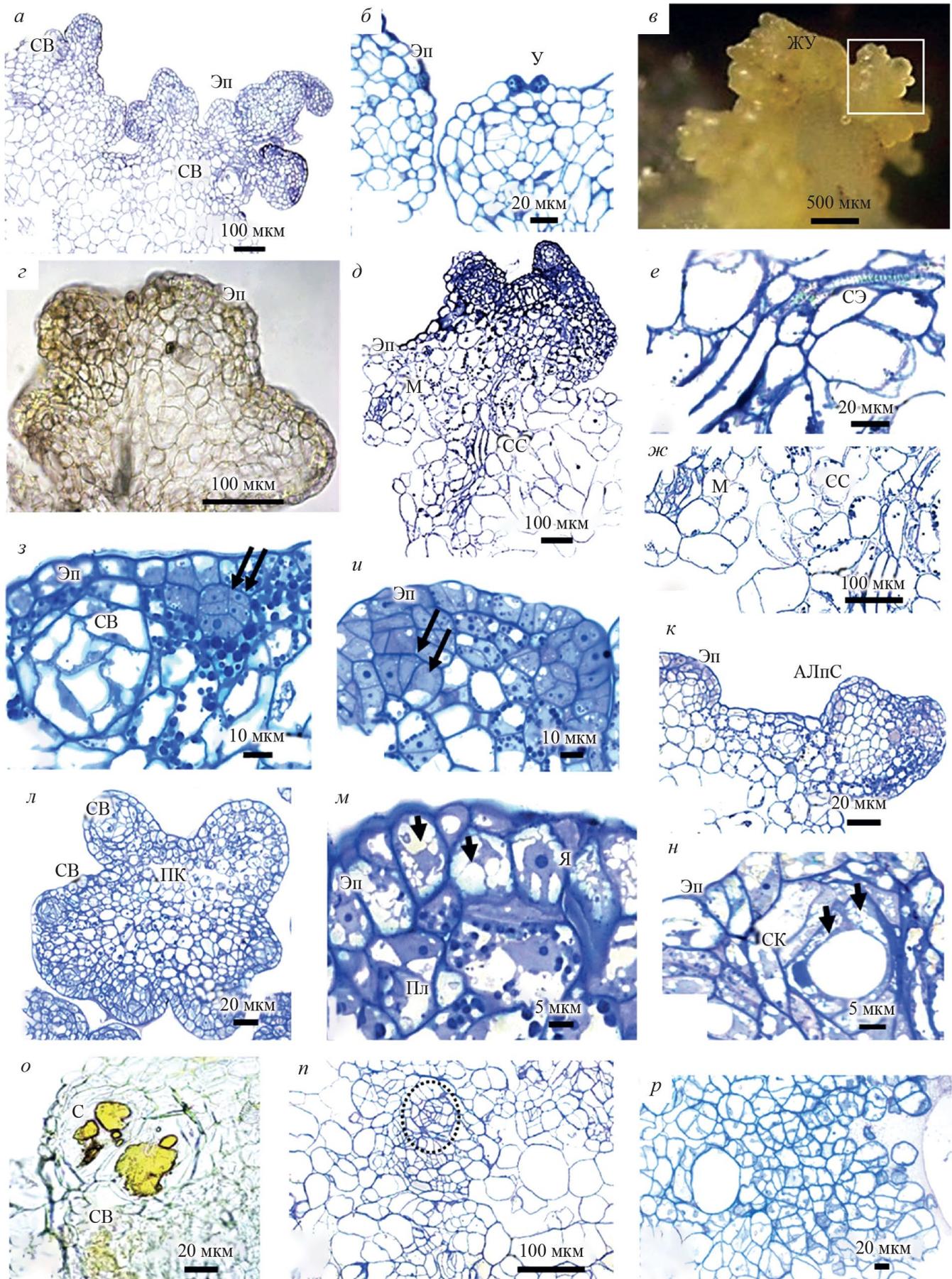
Рис. 2. Гистологические особенности клеточной культуры руты душистой на 7-е сут культивирования: *a* — группы клеток паренхимного типа с многочисленными крахмальными зернами; *б* — группы клеток паренхимного типа с крупными и мелкими вакуолями, *в* — меристемоид, состоящий из округлых удлиненных клеток паренхимного типа, расположенных по поверхности меристемоида и сосудистых элементов, группы периклинально делящихся клеток (в центре); *г* — сосудистые элементы меристемоида. **Обозначения:** В — вакуоль, М — меристемоид, Пл — пластиды, СЭ — сосудистый элемент, УК — удлиненные клетки, Я — ядро, Яд — ядрышко.

органогенеза *in vitro*, сопровождающегося формированием проводящей системы между органом и исходной тканью (Haensch, 2004). Результаты гистологических исследований позволяют рассматривать желтые уплотнения как листовые примордии, формирующиеся адвентивно из компетентных субэпидермальных клеток исходных ЛпС (рис. 3з, и, к). Формирование адвентивных ЛпС сопровождалось разрушением исходной структуры

(рис. 3к) и дифференцировкой меристемоидов в субэпидермальных и в более глубоких слоях ЛпС (рис. 3д, ж).

Адвентивно сформированные ЛпС на поперечных срезах покрыты эпидермальными клетками (рис. 3л, м). Эпидермальные клетки имели крупное ядро с ядрышком, плотную цитоплазму с многочисленными вакуолями (рис. 3м). Субэпидермально располагались клетки с крахмальными зернами и густой цитоплазмой (рис. 3м).

Рис. 3. Гистологические особенности клеточной культуры руты душистой на 16-е сут культивирования: *a* — гистологический продольный срез ЛпС; *б* — замыкающие клетки устьиц в эпидермальном слое ЛпС; *в* — морфология ЛпС с желтыми уплотнениями (одно выделено квадратом); *г* — прижизненный срез желтого уплотнения; *д* — продольный срез ЛпС с листовыми примордиями; *е* — сосудистые элементы проводящей системы, подходящие к листовым примордиям; *ж* — меристемоид, сформированный около проводящей системы; *з* — деления субэпидермальных клеток и формирование меристематической зоны (указана стелками); *и* — заложение листового примордия (указана стрелками); *к* — растущая ЛпС; *л* — поперечный срез ЛпС с секторными вместилищами; *м* — эпидермальные клетки ЛпС с крупными ядрами, густой цитоплазмой, многочисленными вакуолями; *н* — секреторное вместилище ЛпС, люмен вместилища окаймляют клетки с многочисленными вакуолями и густой цитоплазмой; *о* — секрет желтого цвета, заполняющее вместилище, прижизненный срез ЛпС; *п* — паренхимные клетки и комплексы координированно делящихся клеток (обведены пунктиром); *р* — отдельные клетки паренхимного типа имели значительный размер и достигали 90 мкм в длину. **Обозначения:** АлпС — адвентивно сформированная листовая структура (ЛпС), ЖУ — желтые уплотнения, ПК — паренхимные клетки, С — секрет, СВ — секреторное вместилище, СК — секреторные клетки вместилищ, СС — сосудистая система, СЭ — сосудистый элемент, У — устьица, Я — ядро, Эп — эпидермальные клетки. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.



Центральную зону ЛпС составляли паренхимные клетки. Субповерхностно в лопасть были выявлены полости овальной формы, внутреннюю поверхность которых выстилали живые клетки с густой цитоплазмой, с многочисленными мелкими и крупными вакуолями (рис. 3н). На фиксированных препаратах отмечено, что полости не содержали никаких включений (рис. 3н), тогда как на прижизненных срезах люмен был заполнен содержимым желтого цвета (рис. 3о).

Анатомическое строение полостей ЛпС и накопление в них вторичных метаболитов аналогично секреторным вместилищам, формирующихся в листьях и молодых побегах растения руты душистой (Bennici, Tani, 2004; Beck, 2005; Malik et al., 2017). Необходимо отметить, что цитологические особенности внутренних клеток вместилищ и эпидермальных клеток листовых примордиев сходны, поэтому можно предположить, что в эпидермальных клетках происходят схожие метаболические процессы. Накопление вторичных метаболитов в клетках эпидермиса и вместилищах, может определять желтый цвет клеточной культуры, который мы наблюдали к 16-м сут

культивирования. На 16-е сут клеточную культуру руты душистой составляли ЛпС, паренхимные клетки без крахмальных зерен с густой цитоплазмой, с крупными вакуолями (рис. 3н) и кластеры периклинально делящихся клеток (рис. 3н, выделены пунктиром). Среди клеток паренхимного типа были обнаружены клетки значительных размеров, достигающих 90 мкм в длину (рис. 3р).

На 21-е сут культивирования клеточную культуру составляли разрыхляющиеся ЛпС (рис. 4а). Разрыхление сопровождалось увеличением размера клеток ЛпС, отдельные паренхимные клетки могли достигать 400 мкм в длину (рис. 4а). На гистологических срезах также были обнаружены меристематиды и формирующиеся листовые примордии (рис. 4б). Непрерывное формирование ЛпС в течение пассажа и последующее их зарастание каллусом способствовало увеличению массы клеточной культуры руты душистой. В редких случаях на 21-е сут в темноте наблюдали формирование аномальных побегов (рис. 5а), имеющих сформированный апекс, листовые примордии и сосудистую систему, связанную с меристематидом (рис. 5б).

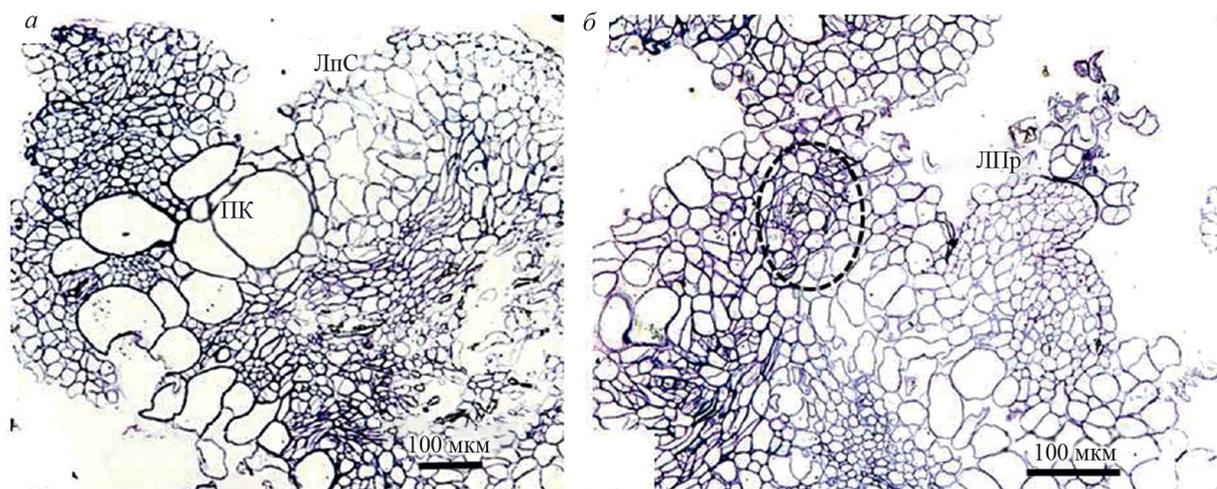


Рис. 4. Гистологические особенности клеточной культуры руты душистой на 21-е сут культивирования: а — разрыхление ЛпС; б — группы делящихся клеток (обведены пунктиром) и формирующиеся ЛпС. *Обозначения:* ПК — паренхимные клетки. Остальные обозначения те же, что на рис. 3.

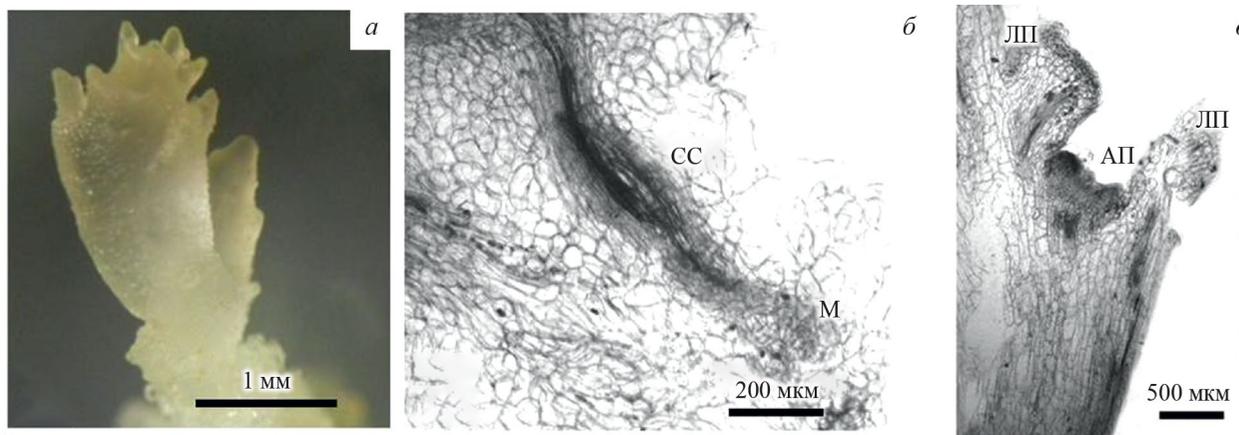


Рис. 5. Аномальный побег, сформированный в клеточной культуре руты душистой при культивировании в темноте: а — морфология аномального побега; б — проводящая система аномального побега, отходящая от клеток меристематиды; в — апекс побега с листовыми примордиями и апикальной меристемой побега роста. *Обозначения:* АП — апикальная меристема, ЛП — листовые примордии, М — меристематид, СС — сосудистая система.

Гистохимическое и биохимическое изучение клеточной культуры руты. Известно, что растения руты душистой синтезируют и накапливают моно- и сесквитерпены (Malik et al., 2017). Окрашивание прижизненных срезов клеточной культуры реактивом NAD1 на 7-е сут культивирования выявило локализацию терпенов в вакуолях

удлиненных клеток, окружающих меристемоиды, и в вакуолях паренхимных клеток без крахмальных зерен (рис. 6*в, з*). На 16-е сут терпены были обнаружены в вакуолях эпидермальных и субэпидермальных клеток ЛпС (рис. 6*д, е*), на 21-е сут — в люмене вместилищ разрыхляющихся структур (рис. 6*ж*). ТСХ анализ также выявил

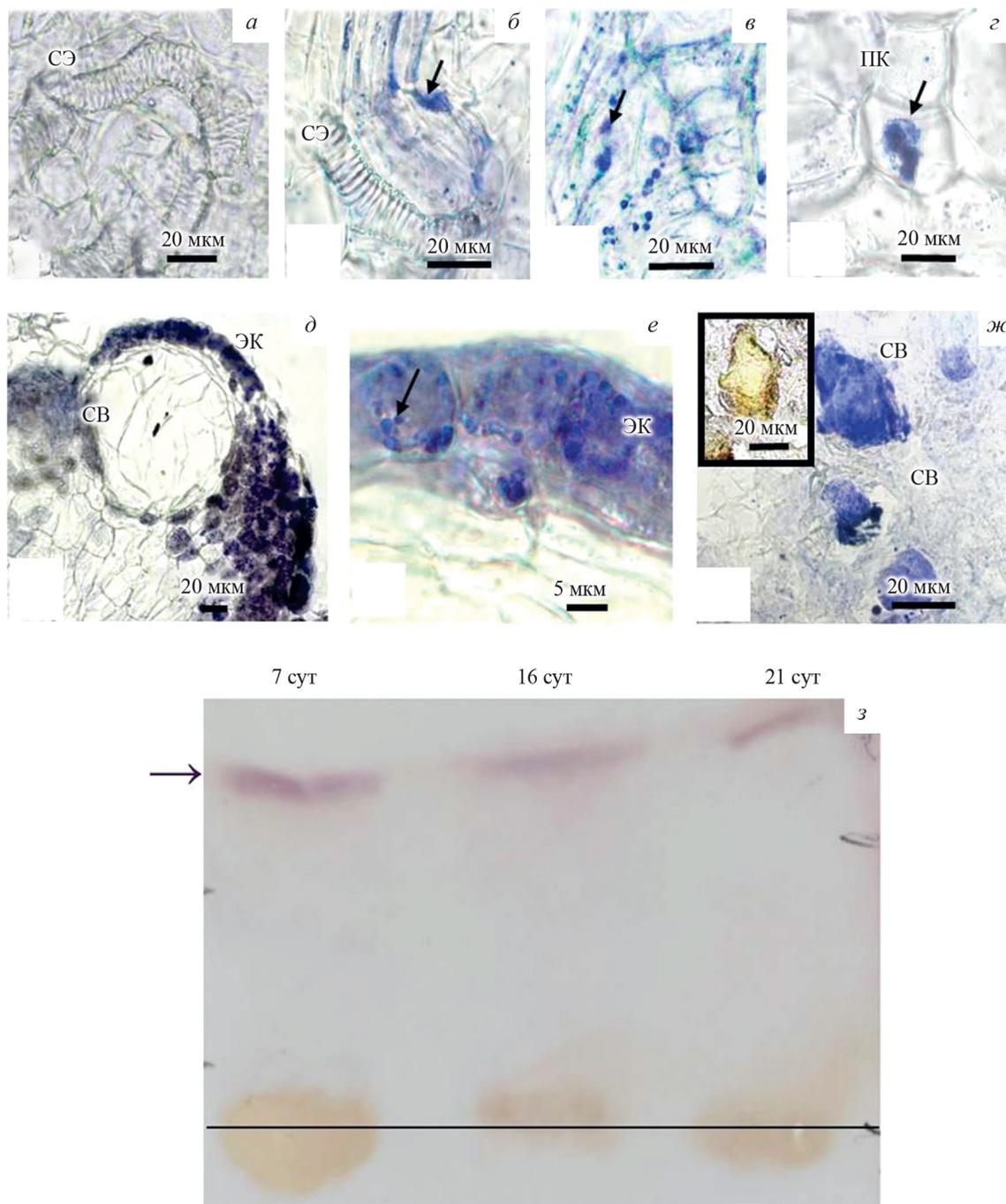


Рис. 6. Локализация терпенов в клеточной культуре руты душистой: *a* — гистологический срез меристемоида с сосудистыми элементами; *б* — отсутствие терпенов в сосудистых элементах меристемоида, незначительное накопление терпенов (стрелки) в вакуолях удлиненных клеток меристемоида на 7-е сут культивирования; *в, з* — вакуоли с терпенами в клетках каллуса руты душистой на 7-е сут (указаны стрелкой); *д* — клетки эпидермиса и субэпидермальных слоев ЛпС, заполненные вакуолями с терпенами на 16-е сут; *е* — эпидермальные клетки ЛпС с многочисленными вакуолями, содержащими терпены (вакуоли с терпенами показаны стрелкой); *ж* — разрыхляющаяся ЛпС с секреторными вместилищами, заполненными терпенами, на 21-е сут культивирования, в черной врезке представлено неокрашенное секреторное вместилище, заполненное терпенами; *з* — ТСХ-пластина с разделением экстракта терпенов из клеточной культуры руты душистой на 7-е, 16-е и 21-е сут культивирования. После разделения, пластины были обработаны аниисовым альдегидом. Обозначения те же, что на рис. 2.

наличие терпенов в клеточной культуре в течение всего пассажа (рис. 6з).

Одним из способов цитодиагностики вторичных соединений в растительных тканях является изучение их автофлуоресценции (Roshchina, 2014). Для растения руты характерен синтез алкалоидов и кумаринов, обладающих флуоресценцией в УФ. Анализ срезов клеточной культуры методом флуоресцентной микроскопии в УФ показал, что в отдельных паренхимных клетках на 7 сут (рис. 7б) и в ЛпС на 16—21-е сут культивирования присутствуют идиобласты с округлыми включениями, флуоресцирующими оранжевым цветом (рис. 7г, е). Известно, что оранжевая автофлуоресценция и округлая морфология включений в идиобластах характерны для акридоновых алкалоидов (Eilert et al., 1986; Richit, Kuhn, 2025). Идиобласты ЛпС, содержащие акридоновые алкалоиды, были хорошо различимы и при изучении клеточной культуры с помощью световой микроскопии (рис. 7ж—и). Интересно, что акридоновые алкалоиды были также локализованы в идиобластах, имеющих спиральное утолщение клеточных стенок, аналогичных утолщениям у трахеид (рис. 8в, г). Подобный тип идиобластов описан в обзорной работе (Foster, 1955).

Наличие кумаринов в растительной ткани выявляют с помощью флуоресцентной микроскопии. После обработки прижизненных срезов щелочными растворами различные кумарины проявляют характерную флуоресценцию от голубовато-зеленого до оранжевого цвета (Weryszko-Chmielewska, Chwil, 2017). При просмотривании в УФ-свете срезов клеточной культуры, обработанных гидроксидом аммония, голубовато-зеленая флуоресценция в вакуолях клеток, характерная для кумаринов была обнаружена в поверхностных слоях ЛпС на 16- и 21-е сут (рис. 8г, е), тогда как в начале культивирования (7 сут) не наблюдали флуоресценции. Обработка прижизненных срезов щелочным раствором показала, что специализированные клетки, накапливающие кумарины и гроздеподобные скопления алкалоидов, локализованы в одной области ЛпС и расположены вблизи друг от друга (рис. 8г, е, з).

Биохимическое изучение клеточной культуры руты выявило, что содержание алкалоидов изменялось в ходе пассажа: на 7-е сут содержание алкалоидов (на сухой вес) составляло 0.57 мг/г, к 16-м сут их содержание снижалось до 0.31 и увеличивалось к концу культивирования до 0.54 мг/г (табл. 1). ТСХ анализ фракции алкалоидов подтвердил наличие в культуре клеток руты душистой алкалоидов (рис. 9а, б). Известно, что растения руты содержат две основные группы алкалоидов: фуорохинолиновые и акридоновые; первые флуоресцируют голубым либо синим цветом, вторые — желто-оранжевым (Malik et al., 2017; Szewczyk et al., 2022). Можно предположить, что положительную реакцию с реактивом Драгендорфа

показали фуорохинолиновые алкалоиды, поскольку они флуоресцировали при 312 нм голубым и фиолетовым (рис. 9а). Анализ ВЭЖХ показал, что алкалоиды были представлены 9 соединениями, из которых 5 (пики 2—5, 7 и 9) присутствовали только в начале культивирования, а два (пики 6 и 8) являлись основными алкалоидами в середине и конце культивирования (рис. 9в).

Согласно данным ВЭЖХ выделенных кумаринов, они были представлены как простыми кумаринами, так и фуранокумаринами (ксантоксином, бергаптемом, изопимпинеллином). Интенсивность пиков ксантоксина и бергаптена (пики 2 и 3 соответственно) незначительно увеличивалась к концу культивирования (рис. 10). Суммарное содержание фуранокумаринов (на сухой вес) в клеточной культуре руты душистой незначительно увеличивалось к концу культивирования от 0.154 до 0.169 мг/г, тогда как содержание простых кумаринов к концу возрастало в 3.3 раза: от 0.198 до 0.662 мг/г (табл. 1).

Таким образом, было показано, что в клеточной культуре руты происходит накопление терпенов, алкалоидов, кумаринов, а выявленные вторичные метаболиты локализованы в специализированных клетках и в клеточных компартаментах.

ОБСУЖДЕНИЕ

Первые успешные работы по получению каллусных и суспензионных культур руты душистой, обладающих способностью к синтезу кумаринов (Steck et al., 1971), алкалоидов (Eilert et al., 1986), терпенов (Peterson et al., 1978), а также к одновременному синтезу терпенов и алкалоидов (Кузовкина и др., 1975), были проведены в 70-е годы прошлого века. Разноплановые исследования *Ruta graveolens* продолжаются и в настоящее время (Szewczyk et al., 2022). Для индукции каллусных и суспензионных культур руты душистой в качестве экспланта использовали различные органы растения: корни (Кузовкина и др., 1975), стебли (Peterson et al., 1978), листовые сегменты (Ahmad et al., 2010), гипокотили (Szewczyk et al., 2022). Применение в качестве эксплантов листьев растений руты душистой, выращенных в условиях *in vitro*, описано нами впервые.

Проведенные исследования показали, что клеточная культура руты, полученная из листовых эксплантов асептически выращенных растений *in vitro*, дифференцирована и способна к геммогенезу (формирование ЛпС, побегов). Предполагается, что клетки меристематических являются инициалами ЛпС. Согласно Галперину (Halperin, 1969), в меристематоиде присутствуют клетки, по физиологическому состоянию эквивалентные клеткам прокампбия, эти клетки могут быть способны как к индукции органов растения, так и к формированию новых центров роста клеточной культуры. По-видимому, в полученной нами клеточной

Таблица 1. Содержание БАВ в клеточной культуре руты душистой в процессе культивирования

Содержание на сухой вес, мг/г	Длительность культивирования, сут		
	7	16	21
Алкалоиды	0.572 ± 0.037	0.311 ± 0.017*	0.542 ± 0.039
Кумарины, из них: фуранокумарины	0.198 ± 0.004*	0.517 ± 0.023*	0.662 ± 0.005*
Флавоноиды	0.154 ± 0.002	0.151 ± 0.002	0.169 ± 0.004*
	1.184 ± 0.004*	1.249 ± 0.005*	1.283 ± 0.003*

* Различия между показателями для одного того же БАВ достоверны при $P \leq 0.05$.

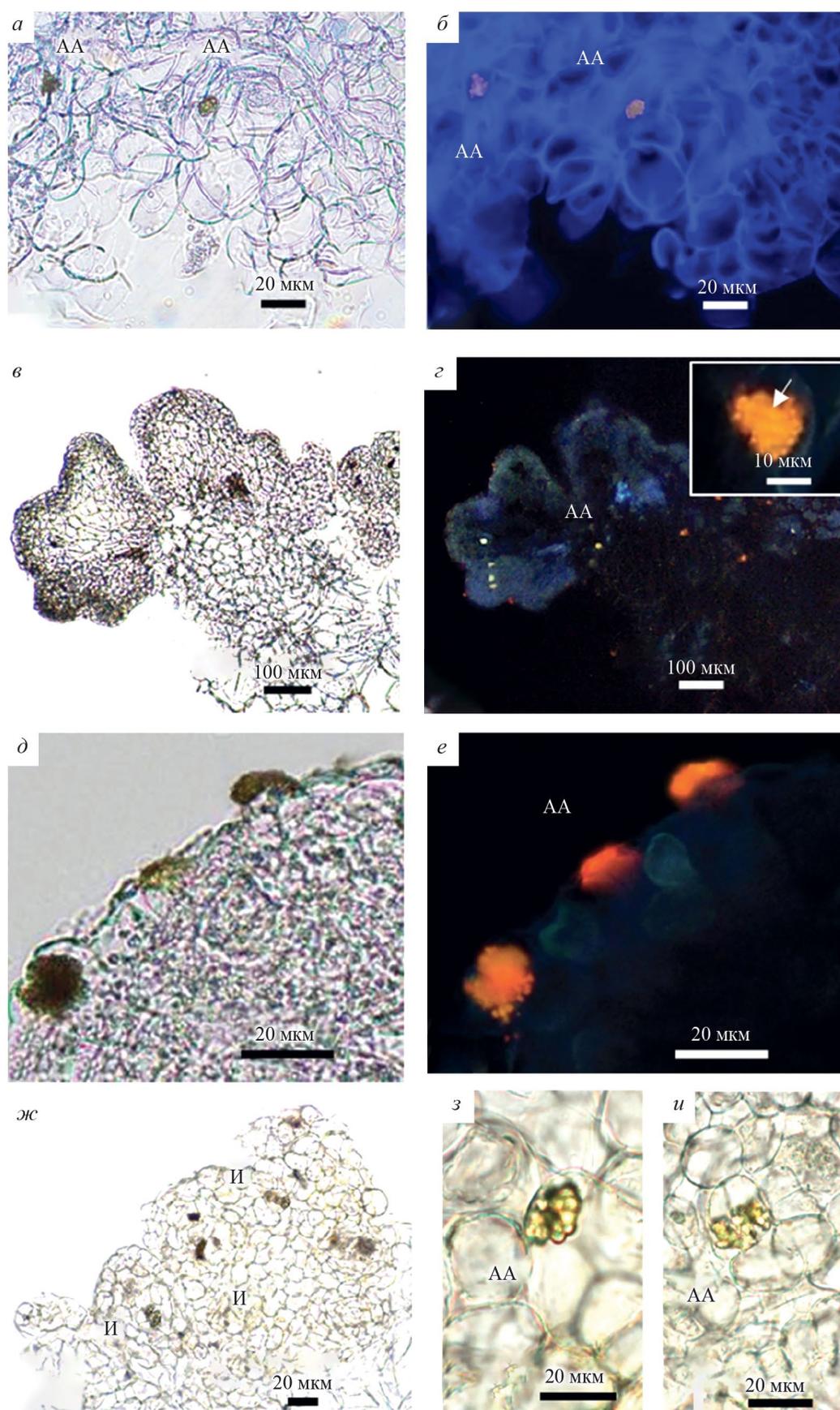


Рис. 7. Локализация акридоновых алкалоидов (АА) в клеточной культуре руты душистой на 7-е и 21-е сут культивирования. Флуоресцентная (б, г, е) и световая (а, в, д, ж, з, и) микроскопия: а, б — 7-е сут; в, г, ж, з, и — 16-е сут. АА имели в УФ-свете оранжевую автофлуоресценцию (б, г, е) и представляли скопления соединений округлой формы (врезка на рис. 7г), АА отчетливо определялись в идиобластах (И) клеточной культуры с помощью световой микроскопии на 16-е сут (ж–и).

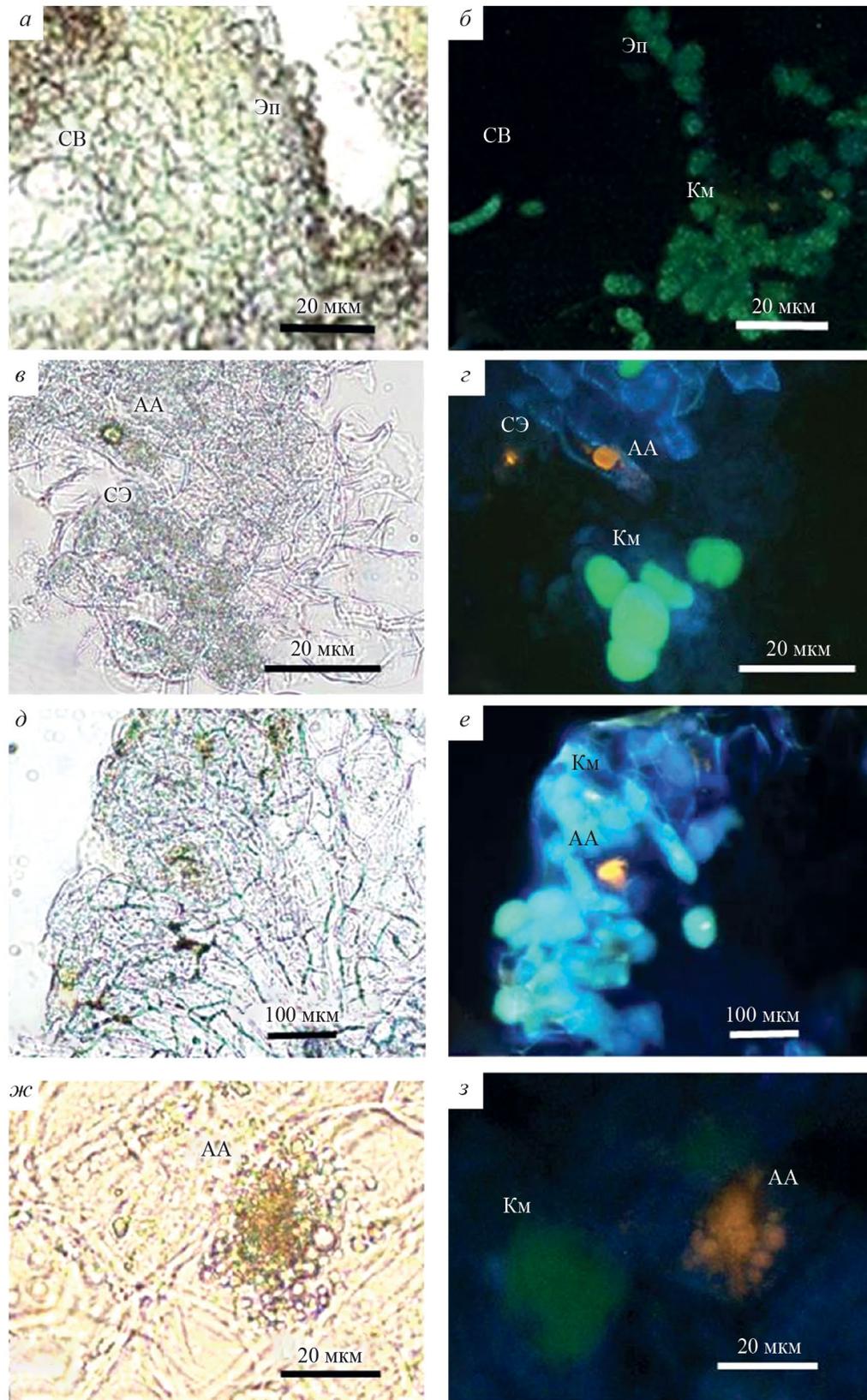


Рис. 8. Локализации кумаринов (Км) в клеточной культуре руты душистой на 16-е и 21-е сут культивирования. Флуоресцентная микроскопия после обработки срезов 10%-ным раствором аммиака; а, в — прижизненный срез ЛпС в проходящем свете на 16-е сут; д, ж — то же на 21-е сут; б, г — прижизненный срез в УФ на 16-е сут; е, з — то же на 21-е сут. Зеленая флуоресценция характерна для Км. *Обозначения:* Км — кумарины. Остальные обозначения те же, что на рис. 2 и 7.

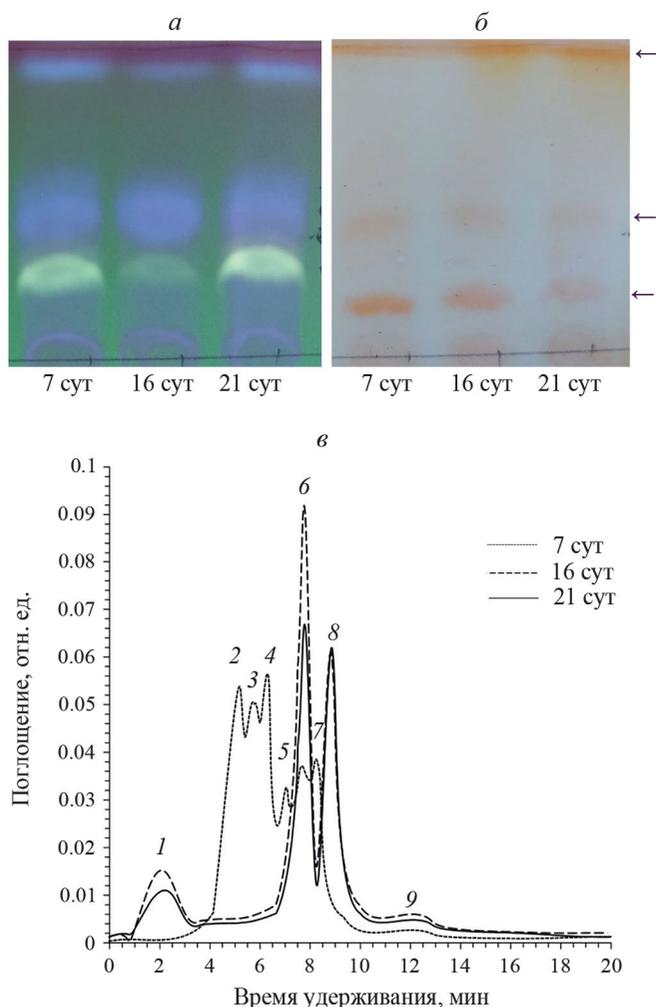


Рис. 9. Хроматографический анализ алкалоидов культуры клеток руты душистой на 7-е, 16-е и 21-е сут культивирования: а, б — ТСХ-пластина после разделения алкалоидов: флуоресценция алкалоидов при 312 нм (а) и окрашивание реактивом Драгендорфа (б, показано стрелками); в — хроматограмма экстракта алкалоидов. По оси ординат — поглощение (отн. ед.) при длине волны 260 нм.

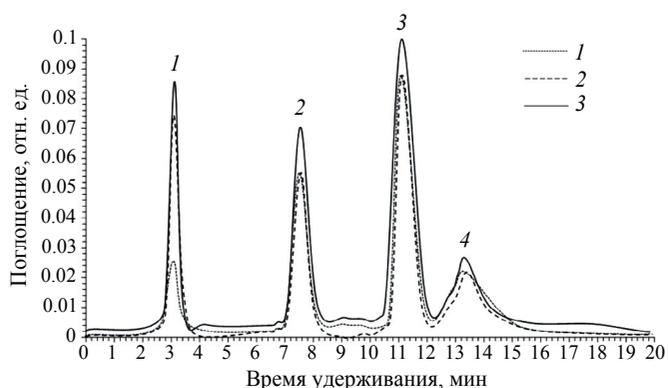


Рис. 10. Хроматограмма экстракта кумаринов из культуры клеток руты душистой на 7-е, 16-е и 21-е сут культивирования. Обозначения пиков: 1 — кумарин, 2 — ксантоксин, 3 — бергаптен, 4 — изопимпеллин. По оси ординат — поглощение (отн. ед.) при длине волны 280 нм.

культуре руты меристемоиды были сходны с меристематическими зонами каллусной культуры руты душистой, индуцированной из листовых сегментов растений *in vivo* (Ahmad et al., 2010). Непрерывное формирование ЛпС через адвентивный органогенез, а также из клеток меристемоидов, и дальнейшее разрыхление ЛпС способствовало нарастанию однородной, достаточно рыхлой массы клеточной культуры руты. Рыхлая структура морфогенной клеточной культуры руты отличает ее от типичных клеточных морфогенных культур, характеризующихся плотной, глобулярной морфологией (Ikeuchi et al., 2013).

Клеточная культура руты душистой сохранила особенности вторичного метаболизма, характерного для растений руты душистой *in vivo*. Биохимические исследования показали, что в клеточной культуре руты содержатся терпены, алкалоиды, кумарины. Синтез вторичных метаболитов сопровождался дифференцировкой специализированных клеток и клеточных структур: идиобластов, вместилищ.

Для представителей семейства *Rutaceae* вместилища являются основным местом синтеза и накопления терпенов (Liang et al., 2006; Zhou et al., 2014). Дифференцировка секреторных вместилищ, накапливающих терпены, показана на клеточных культурах, полученных из корня (Кузовкина и др., 1975) и побега (Peterson et al., 1978). Однако гистохимические исследования полученной нами клеточной культуры руты душистой выявили, что терпены могут быть локализованы не только во вместилищах, формирующихся в субэпидермальных слоях ЛпС, но и в вакуолях эпидермальных клеток ЛпС, расположенных над вместилищами, а также в единичных клетках паренхимного типа. Таким образом, накопление терпенов вне секреторных вместилищ у руты душистой описано нами впервые.

Кроме терпенов в клеточной культуре руты присутствуют кумарины, акридоновые и фуранохинолиновые алкалоиды. Кумарины и акридоновые алкалоиды были обнаружены в специализированных клетках, локализованных в поверхностных слоях ЛпС (рис. 7, 8). Полученные результаты согласуются с результатами, описанными на культуре руты, индуцированной из корней, в которой описаны идиобласты с многочисленными включениями, имеющими разнообразную флуоресценцию (Кузовкина и др., 1975). Наибольшее содержание алкалоидов было обнаружено на 7- и 21-е сут культивирования (табл. 1). Согласно проведенным исследованиям, увеличение содержания кумаринов начиналось с 16-х сут культивирования (табл. 1) в период формирования ЛпС. Наибольшее содержание алкалоидов было выявлено на 7-е сут в период дифференцировки меристемоидов и на 21-е сут на этапе разрыхления клеточной массы (рис. 3). Необходимо отметить, что на 21-е сут клеточная культура состояла преимущественно из разрыхленных ЛпС, что совпадало с максимальным содержанием кумаринов.

Полученные результаты позволяют предположить, что как количество, так и состав вторичных соединений в полученной нами культуре клеток руты душистой могут быть связаны с ее дифференцировкой. Согласно данным из литературы, наибольшее содержание кумаринов отмечали в высоко дифференцированных клеточных культурах (Diwan, Malpathak, 2010), тогда как высокое содержание акридоновых алкалоидов (Кузовкина и др., 1979) и хинолиновых алкалоидов (Ramavat et al., 1985) было показано в недифференцированных неморфогенных клеточных культурах.

Таким образом, полученная длительно культивируемая клеточная культура руты душистой сохраняет способность к органогенезу и содержит вторичные метаболиты различных групп (терпены, кумарины, алкалоиды). Разнообразие вторичных соединений, синтезирующихся в клеточной культуре руты, по-видимому, поддерживается

постоянным формированием ЛпС и дифференцировкой специализированных клеток. Полученная клеточная культура руты душистой может представлять интерес в качестве объекта для изучения особенностей клеточной дифференцировки, и возможного продуцента различных типов БАВ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акулов А. Н., Костюкова Ю. А. 2021. Условия культивирования, гистологический и биохимический анализ каллусной культуры солодки *Glycyrrhiza glabra* L. Цитология. Т. 63. № 6. С. 59. (Akulov A. N., Kostyukova Yu. A. 2021. Cultivation conditions, histological and biochemical analysis of callus culture of licorice *Glycyrrhiza glabra* L. Russ. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 63. № 6. P. 59.) <https://doi.org/10.31857/S004137712106002X>
2. Валиева А. И., Акулов А. Н. 2024. Применение бромкрезолового зеленого для спектрофотометрического определения содержания алкалоидов на примере руты душистой. Физиол. раст. Т. 71. № 1. С. 10. (Valieva A. I., Akulov A. N. 2024. Application of bromocresol green for spectrophotometric determination of alkaloid content using the example of *Ruta graveolens*. Russian J. Plant Physiol. V. 71. № 1. P. 101.) <https://doi.org/10.31857/S0015330324010171>
3. Кузовкина И. Н., Ладыгина Е. Я., Смирнов А. М. 1975. Люминесцентно-микроскопическое изучение корневой ткани руты душистой. Физиол. раст. Т. 22. № 3. С. 598. (Kuzovkina I. N., Ladygina E. Ya., Smirnov A. M. 1975. Luminescence-microscopic study of the root tissue of rue. Russian J. Plant Physiol. V. 22. № 3. P. 598.)
4. Adamska-Szewczyk A., Glowniak K., Baj T. 2016. Furochinoline alkaloids in plants from Rutaceae family — a review. Current issues in pharmacy and medical sciences. Curr. Issues Pharm. Med. Sci. V. 29. P. 33. <https://doi.org/10.1515/cipms-2016-0008>
5. Ahmad N. Faisal M., Mellas A., Aref I. 2010. *In vitro* callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Ruta graveolens* L. S. Afr. J. Bot. V. 76. P. 597. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.03.008>
6. De Almeida M., Graner E. M., Brondani G., De Oliveira L. S., Artioli F. A., De Almeida L. V., Leone G. F., Baccarin F. J. B., Oliveira Antonelli P., Cordeiro G. M., Oberschelp G. P. J., Batagin-Piotto K. D. 2015. Plant morphogenesis: theoretical bases. Advances in forestry science. V. 2. P. 13. <https://doi.org/10.34062/afs.v2i1>
7. Beck C. B. 2005. An introduction to plant structure and development: plant anatomy for the twenty-first century. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139165365>
8. Bennici A., Tani C. 2004. Anatomical and ultrastructural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *Citrus limon*: evaluation of schizolysigenous ontogeny. Flora — Morphology, distribution, functional ecology of Plants. V. 199. P. 464. <https://doi.org/10.1078/0367-2530-00174>
9. Canaveze Y., Scudeler E. L., Machado R. S. 2021. Neem secretory cells: developmental cytology and indications of cell autotoxicity. Protoplasma. V. 258. P. 415. <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01580-3>
10. Czernicka M., Chłosta I., Kęska K., Kozieradzka-Kiszkurno M., Abdullah M., Popielarska-Konieczna M. 2021. Protuberances are organized distinct regions of long-term callus: histological and transcriptomic analyses in kiwifruit. Plant Cell Rep. V. 40. P. 637. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02661-0>
11. Diwan R., Malpathak N. 2010. Histochemical localization in *Ruta graveolens* cell cultures: elucidating the relationship between cellular differentiation and furanocoumarin production. In vitro Cell Dev. Biol. Plant. V. 46. P. 108. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9239-1>
12. Dobrowolska I. Andrade G., Clapham D., Egertsdotter U. 2017. Histological analysis reveals the formation of shoots rather than embryos in regenerating cultures of *Eucalyptus globulus*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2017. V. 128. P. 319. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1111-5>
13. Eilert U. 1988. Acridones (*Ruta* alkaloids). In: Phytochemicals in plant cell cultures. Academic Press/Elsevier. P. 419. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-715005-5.50031-5>
14. Eilert U., Wolters B., Constabel F. 1986. Ultrastructure of acridone alkaloid idioblasts in roots and cell cultures of *Ruta graveolens*. Can. J. Bot. V. 64. P. 1089. <https://doi.org/10.1139/b86-149>
15. Eljebbawi A., Dolata A., Strotmann V., Stahl. Y. 2024. Stem cell quiescence and dormancy in plant meristems. J. Exp. Bot. V. 75. P. 6022. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae201>

16. Halperin W. 1969. Morphogenesis in cell cultures. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* V. 20. P. 395.
17. Ikeuchi M., Favero D., Sakamoto Y., Iwase A., Coleman D., Rymen B., Sugimoto K. 2019. Molecular mechanisms of plant regeneration. *Annu. Rev. Plant Biol.* V. 70. P. 377.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100434>
18. Junghanns K., Kneusel R., Gröger D., Matern U. 1998. Differential regulation and distribution of acridone synthase in *Ruta graveolens*. *Phytochem.* V. 49. P. 403.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00104-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00104-6)
19. Kruglova N., Zinatullina A., Yegorova N. 2023. Histological approach to the study of morphogenesis in callus cultures *in vitro*: a review. *Int. J. Plant Biol.* V. 14. P. 533.
<https://doi.org/10.3390/ijpb14020042>
20. Kuzovkina I. N., Chernysheva T. P., Alterman I. E. 1979. Characterization of a *Ruta graveolens* callus tissue strain producing rutacridone. *Russ. J. Fiziologiya Rasteniy (Plant Physiol.)*. V. 26. P. 492.
21. Liang S.-J., Wu H., Lun X., Lu D.-W. 2006. Secretory cavity development and its relationship with the accumulation of essential oil in fruits of *Citrus medica* L. var. *Sarcodactylis* (Noot.) Swingle. *J. Integr. Plant Biol.* V. 48. P. 573.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2006.00230.x>
22. Lindsey K., Yeoman M. 1983. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *J. Exp. Bot.* V. 34. P. 1055.
23. Machado S. R., Gregório E. A., Guimaraes E. 2006. Ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Ann. Bot.* V. 97. P. 357.
24. Malik S., Moraes D., Mendonça do Amaral F., Ribeiro M. 2017. *Ruta graveolens*: phytochemistry, pharmacology, and biotechnology. In: *Transgenesis and secondary metabolism reference series in phytochemistry*. Switzerland: Springer Int. Publ. P. 117.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-28669-3_4
25. McCown B., Zeldin E., Pinkalla H., Dedolpeth R. 1988. Nodule culture: a developmental pathway with high potential for regeneration, automated micropropagation, and plant metabolite production from woody plants. In: *Hanover J.W. et al. (Eds.). 1988. Genetic manipulation of woody plants*. P. 149.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1661-9>
26. Milesi S., Massot B., Gontier E., Bourgaud F., Guckert A. 2001. *Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of furanocoumarins. *Plant Sci.* V. 161. P. 189.
27. Miyashima S., Sebastian J., Lee Y., Helariutta Y. 2012. Stem cell function during plant vascular development. *EMBO J.* V. 32. P. 178.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2012.301>
28. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* V. 15. P. 473.
29. Pasqua G., Monacelli B., Manfredini C., Loreto F., Perez G. 2002. The role of isoprenoid accumulation and oxidation in sealing wounded needles of Mediterranean pines. *Plant Sci.* V. 163. P. 355.
30. Peterson R. L., Scott M. G., Ellis B. E. 1978. Structure of a stem-derived callus of *Ruta graveolens*: meristems, leaves, and secretory structures. *Can. J. Bot.* V. 56. P. 2717.
31. Petit-Paly G., Ramawat K., Chénieux J.-C., Rideau M. 1989. *Ruta graveolens*: *in vitro* production of alkaloids and medicinal compounds. In: *Bajaj Y.P.S. 1989. Biotechnology in agriculture and forestry, 7. Medicinal and aromatic plants II*. Berlin, Heidelberg: Springer. P. 488.
32. Pfeiffer A., Janocha D., Dong Y., Medzihradsky A., Schöne S., Daum G., Suzuki T., Forner J., Langenecker T., Rempel E., Schmid M., Wirtz M., Hell R., Lohmann J. U. 2016. Integration of light and metabolic signals for stem cell activation at the shoot apical meristem. V. 5. P. 1. *eLife* 5. Art. ID: e17023.
<https://doi.org/10.7554/eLife.17023>
33. Ramawat K. G., Rideau M., Chénieux J.-C. 1985. Growth and quaternary alkaloid production in differentiating and non-differentiating strains of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*. V. 24. P. 441.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80743-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80743-8)
34. Richit J. F., Kuhn S. A. 2025. Root idioblasts reveal a specialized underground site for the storage of putative alkaloids in *Rutaceae*. *Protoplasma*. V. 262.
<https://doi.org/10.1007/s00709-025-02063-z>
35. Roshchina V. 2014. Approaches to choice of model systems for microscopic studies. *Model systems to study the excretory function of higher plants*. Dordrecht: Springer Netherlands.
<https://doi.org/10.1007/978-94-017-8786-4>
36. Steck W., Bailey B. K., Shyluk J. P., Gamborg O. 1971. Coumarins and alkaloids from cell cultures of *Ruta graveolens*. *Phytochem.* V. 10. P. 191.
37. Szewczyk A., Marino A., Molinari J., Ekiert H., Miceli N. 2022. Phytochemical characterization, and antioxidant and antimicrobial properties of agitated cultures of three Rue species: *Ruta chalepensis*, *Ruta corsica*, and *Ruta graveolens*. *Antioxidants*. V. 1. P. 592.
<https://doi.org/10.3390/antiox11030592>

38. *Wagner H., Bladt S.* 1996. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin, New York: Springer. 384 p.
39. *Wang X. D., Nolan K., Irwanto R., Sheahan M., Rose R.* 2011. Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: the fate of the pluripotent and totipotent stem cells. *Ann. Bot.* V. 107. P. 599.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcq269>
40. *Weryszko-Chmielewska E., Chwil M.* 2017. Localisation of furanocoumarins in the tissues and on the surface of shoots of *Heracleum sosnowskyi*. *Botany.* V. 95. P. 1057.
<https://doi.org/10.1139/cjb-2017-0043>
41. *Yadav T., Murahari M., Peters G., Yc M.* 2022. A comprehensive review on acridone based derivatives as future anti-cancer agents and their structure activity relationships. *Eur. J. Med. Chem.* V. 239. Art. ID: 114527.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114527>
42. *Zhou Y.-F., Mao S.-L., Li S.-F., Ni X.-L., Li B., Liu W.-Z.* 2014. Programmed cell death: A mechanism for the lysigenous formation of secretory cavities in leaves of *Dictamnus dasycarpus*. *Plant Sci.* V. 225. P. 147.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.06.007>
43. *Zobel A. M., Brown S. A.* 1989. Histological localization of furanocoumarins in *Ruta graveolens* shoots. *Can. J. Bot.* V. 67. P. 915.