Initiation and characterization of plant cell culture of *Phlojodicarpus sibiricus*

Khandy M.T.^{1,2}, Tomilova S.V.³, Kochkin D.V.³, Nosov A.M.³

¹M. K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia; ²FSC of the East Asia Terrestrial Biodiversity FEB RAS, Vladivostok, Russia; ³M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
E-mail: handy_89@mail.ru

Key message. In the framework of the present study, callus and suspension cultures of *Phlojodicarpus sibiricus* cells were obtained. Their morphological, physiological and biosynthetic characteristics were investigated.

Keywords: *Phlojodicarpus sibiricus*, callus, suspension, coumarins

Currently, the use of plant cell cultures *in vitro* is one of the alternative sources of obtaining plant secondary metabolites. In this aspect, the plant cell culture of *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. Ex Spreng.) K.-Pol., as a source of coumarins, may be promising. It should be noted that, according to the analysis of available literature, the plant cell culture of *Ph. sibiricus* has not been previously obtained. Thus, the purpose of the present work is to obtain and study the cultures of *Ph. sibiricus* cells *in vitro*.

For experiments, we used Murashige and Skoog medium with 2,4-D and BAP [1]. Cell cultures were cultured in the dark at 25±1 °C. Suspensions were grown on a shaker at 100 rpm. Cell culture viability was determined using intravital dye phenosafranin. Growth analysis was carried out according to a standard method [2]. Coumarins in the biomass of cells were analyzed using thin layer chromatography (TLC) [3].

From the seeds of the plant *Ph. sibiricus* grew aseptically seedlings, of which subsequently received callus cell cultures. The intensity of callusogenesis was: for cotyledon leaves – 70%, for hypocotyls – 33%, for roots – 65%. Suspension cultures were induced from calluses of leaf and hypocotyl origin. The resulting suspensions were white-yellow in color, contained aggregates of meristem-like and parenchyma-like cells, and also single cells. Cell viability was at least 70%. The line obtained from callus of leaf origin had high growth rates (growth index 10). The growth index of the line induced from callus of hypocotyl origin was 3.4. TLC analysis showed the presence of coumarins and/or their glycosides in callus and suspension cultures of *Ph. sibiricus* cells. Thus, *Ph. sibiricus* plant cell cultures were first obtained and investigated.

The work was financially supported by the Russian Science Foundation (18-74-00097).

Получение и характеристика культур клеток вздутоплодника сибирского

Ханды М.Т.^{1,2}, Томилова С.В.³, Кочкин Д.В.³, Носов А.М.³

¹Северо-восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, Якутск, Россия; ²ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, Владивосток, Россия; ³Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

Аннотация. В рамках настоящего исследования были получены каллусные и суспензионные культуры клеток вздутоплодника сибирского. Исследованы их морфологические, физиологические и биосинтетические характеристики.

Ключевые слова: вздутоплодник сибирский, каллус, суспензия, кумарины

В настоящее время культуры клеток высших растений рассматриваются как возобновляемый альтернативный источник получения вторичных метаболитов растительного происхождения. В этом аспекте перспективной может быть культура клеток лекарственного растения вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K.-Pol.), в качестве источника кумаринов. Следует отметить, что, согласно анализу доступной литературы, культура клеток *Ph. sibiricus* ранее получена не была. Таким образом, цель настоящей работы, получение и исследование культур клеток вздутоплодника сибирского.

Для экспериментов использовали среду Мурасиге и Скуга с 2,4-Д и БАП [1]. Выращивание культур клеток проводили в темноте при 25 ± 1°C. Суспензии выращивали на шейкере при 100 об/мин. Жизнеспособность клеток определяли, используя прижизненный краситель феносафранин. Анализ роста проводили по стандартной методике [2]. Кумарины в биомассе клеток анализировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) [3].

Из семян растения *Ph. sibiricus* вырастили асептические проростки, из которых в последующем получили каллусные культуры клеток. Интенсивность каллусогенеза при этом составила: для семядольных листьев – 70%, для гипокотилей – 33%, для корней – 65%. Из каллусов листового и гипокотильного происхождения индуцировали суспензионные культуры. Полученные суспензии имели бело-желтый цвет, содержали агрегаты клеток меристемоподобного и паренхимоподобного типов, также одиночные клетки. Жизнеспособность клеток составила не менее 70%. Линия, полученная из каллусов листового происхождения, имела достаточно высокие показатели роста (индекс роста 10). Индекс роста линии, индуцированной из каллусов гипокотильного происхождения, составил 3,4. Анализ ТСХ показал присутствие кумаринов и/или их гликозидов в каллусных и в суспензионных культурах клеток вздутоплодника сибирского.

Таким образом, впервые получены и исследованы культуры клеток *Ph. sibiricus*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-00097).

1. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum*, 1962, 15, 473–497.
2. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений: Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. М.: БИНОМ, 2011, 386–403.
3. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas [Second Edition by H. Wagner and S. Bladt]. Brooklyn, New York. Springer-Verlag 1996. xv+ 384 pp.