

**МОРФОЛОГИЯ, АНАТОМИЯ И РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ**

УДК (576.31+ 581.192):582.293.382: 581.143.6

DOI: 10.36305/2712-7788-2021-2-159-37-47

**ЦИТО- И ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИШАЙНИКА  
*EVERNIA PRUNASTRI* (L.) АСН. СЕМЕЙСТВА USNEACEAE В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*****Людмила Михайловна Теплицкая, Елена Федоровна Семенова, Элеонора Павловна Кириакиди**

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского  
Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского  
295000, РФ, Республика Крым, г. Симферополь, бульвар Ленина 5/7  
E- mail: lm\_teplitskaya@ukr.net, sef1957@mail.ru, kiriakidi98@list.ru

Наиболее востребованным сырьем среди лишайников для парфюмерно-косметических, эфирномасличных и фармацевтических производств являются высушенные слоевища Лентеца крупинчатого или Эвернии сливовой. Популяции данного вида в Крыму ограничены, и сборы этого растения существенно сокращают природные ресурсы. Методы биотехнологии могут решить проблему круглогодичного обеспечения сырьем технологических процессов, а также сохранения естественных запасов *E. prunastri* в природе. Поэтому актуальна разработка лихенотехнологий в контролируемых условиях, позволяющих интенсифицировать процессы накопления биомассы и в ней биологически активных соединений, продуцируемых фико- и микобионтами. В процессе культивирования *in vitro* проведен морфологический, цито- и гистохимический анализ клеток и тканей лишайника *Evernia prunastri*: дана сравнительная морфометрическая характеристика клеток микобионта и фикобионта *in vitro* и исходного материала. Изучено накопление и локализация: слизи, фенольных соединений, крахмала и гликогена, липидов и эфирных масел. Показано, что накопление в процессе развития лишайника запасных полисахаридов: крахмала и гликогена, а также других питательных веществ, таких как липиды, и веществ вторичного синтеза, в частности, эфирного масла, сопряжено с интенсивным увеличением биомассы лишайника. Однако, высокое содержание в клетках слизи и фенольных соединений не способствует активному росту и свидетельствует о старении клеток культуры. Выявлено, что качественный состав спиртового экстракта лишайника, выращенного в культуре *in vitro*, соответствует составу природного лишайника. Полученные данные могут быть использованы при разработке биотехнологии культивирования эвернии сливовой и ее бионтов.

**Ключевые слова:** цитохимия; гистохимия; фикобионт; микобионт; культивирование в контролируемых условиях; спиртовой экстракт

**Введение**

Лишайники – своеобразная группа низших растений, организм которых состоит из фикобионта (одноклеточной зеленой водоросли или цианобактерии) и микобионта (как правило, аскомицета, реже базидиомицета), образующих единый организм на основе симбиоза и, возможно, частичного паразитизма со стороны гриба (Grimm et al., 2021).

Лишайники относятся к лекарственным растениям, содержащим простые фенолы С<sub>6</sub>-С<sub>1</sub>-ряда (Куркин, 2007). В качестве лекарственного сырья используют собранные в течение года на почве или стволах различных деревьев и высушенные слоевища следующих видов лишайников: исландский мох (цетрария исландская, исландский лишайник) *Cetraria islandica* (L.) Ach., цетрария сворачивающаяся (ц. клубочковая) *C. cucullata* (Bell.) Ach., ц. снежная *C. nivalis* (L.) Ach., пармелия кочующая (п. блуждающая) *Parmelia vagans* Nyl. – сем. Пармелиевые *Parmeliaceae*; кладония звездчатая (к. альпийская или приальпийская) *Cladonia stellidris* (Opiz)

Pouzaret Vezda = *C. alpestris* (L.) Rabenh., к. деревцеподобная (к. лесная) *C. arbus-culata* (Wallr.) Flot. = *C. sylvatica* (L.) Hoffm., к. бесформенная *C. deformis* (L.) Hoffm. – сем. Кладониевые *Cladoniaceae*; уснея длиннейшая *Usnea longissima* Ach., у. бородатая *U. barbata* (L.) Weberex F.H. Wigg. = *U. barbata* (L.) Wigg., у. цветущая (у. плодоносная) *U. florida* (L.) Weberex F.H. Wigg. = *U. florida* (L.) G.H. Web., у. жесткая (у. мохнатая) *U. hirta* (L.) Weberex F.H. Wigg. = *U. hirta* (L.) Hoffm., алектория бледно-охряная (бледно-желтая) *Alectoria ochroleuca* (Hoffm.) A. Massal. = *A. ochroleuca* (Ehrh.) Nyl., эверния мезоморфная (э. кустовидная) *Evernia mesomorpha* Nyl. = *E. thamnoides* (Flot.) Arn., э. несоредиозная *E. esorediosa* (Muell. Arg.) DuRietz., э. сливовая (лентец крупинчатый) *E. prunastri* Ach. – сем. Уснеевые *Usneaceae*. Качество сырья официальных видов лишайников в Российской Федерации регламентирует ФС 42-766-73, ГОСТ 13727-68, ГОСТ 21565-76 (Лекарственное сырье..., 2006). В настоящее время определены их основные биологически активные соединения (усниновая кислота, лихенин, цетрарин, водорастворимые витамины, щавелевокислый кальций) и вызываемые ими фармакологические эффекты: антимикробные, возбуждающие аппетит, обволакивающие, противовоспалительные, противоожоговые, регенерирующие (Сафонова, 2002).

Наиболее востребованным сырьем являются высушенные слоевища кустистого лишайника эвернии сливовой. Популяции данного вида в Крыму ограничены, и сборы этого растения существенно сокращают природные ресурсы. При этом, лишайники – очень медленно растущие организмы (1-8 мм в год) и для восстановления сырьевой базы в естественных условиях произрастания требуется от 10 до 30 лет (Suzuki et al., 2016). В связи с этим поиск новых источников сырья для парфюмерно-косметической и химико-фармацевтической промышленности является актуальным. Методы биотехнологии могут решить проблему круглогодичного обеспечения сырьем технологических процессов эфирномасличного и фармацевтического производств, а также сохранения естественных запасов *E. prunastri* в природе (Митишев и др., 2014). Поэтому актуальна разработка лихенотехнологий в контролируемых условиях, позволяющих интенсифицировать процессы накопления биомассы и в ней биологически активных соединений, продуцируемых фико- и микобионтами.

### Объекты и методы исследования

Материалом служили растения лишайника *E. prunastri*, собранные в естественных местообитаниях Крымского полуострова (Теплицкая, Семенова, 2014).

В работе использовались следующие методы: цито- и гистохимический анализ, морфометрический, биохимический, метод культуры тканей *in vitro*.

Гистохимический анализ проводили общепринятыми методиками: углеводы окрашивали йодом; нуклеиновые кислоты, дубильные вещества, слизи, хитин, гемицеллюлозу, пектин – метиленовым синим или хлор-цинк-йодом; кутинизированные оболочки, жирные и эфирные масла, воска и другие липофильные соединения – суданом III в виде раствора в этиловом спирте с глицерином (1:1). Уровень накопления тех или иных веществ оценивали по интенсивности их окраски в клеточных структурах в пятибалльной системе (Upreti et al., 2015).

Морфометрический анализ проводили на временных препаратах. Под микроскопом МББ-1А просматривали 30 полей зрения на каждом объекте и определяли размеры клеток при увеличении  $\times 320$  с помощью окулярной сетки ( $S=0,64 \text{ мм}^2$ ). Математическую обработку данных проводили с помощью статистической программы STATISTICA 10.0 при уровне значимости  $P = 0,95$  (Гуринович, Пучкова, 2005).

ГЖХ-анализ спиртовых экстрактов осуществляли методом нормализации в программе Хроматэк аналитик 2.6. (Масла эфирные. Анализ методом...ГОСТ ISO 7609-2014).

При культивировании лишайника *in vitro* использовали питательную среду Мурасиге-Скуга стандартную, а также модифицированную по составу с добавлением водных или спиртовых вытяжек яблони и вяза. В качестве стерилентов использовали стандартные антисептики с различной экспозицией (Бутенко, 1999).

### Результаты и обсуждение

В лабораторных условиях, при культивировании на питательных средах симбиотические отношения между фико- и микобионтом нарушаются, но фикобионт сохраняет ряд физиологических особенностей, характерных для цианобактерий и других одноклеточных водорослей, живущих в слоевище лишайников: замедленный рост, размножение делением.

Микобионт, входящий в состав лишайника *E. prunastri*, относится к классу сумчатых грибов. Точная идентификация грибов невозможна, т.к. будучи изолированными из лишайника, они не возвращаются к своему первоначальному виду. Тело микобионта представлено мицелием, состоящим из разветвленных гиф (рис. 1).

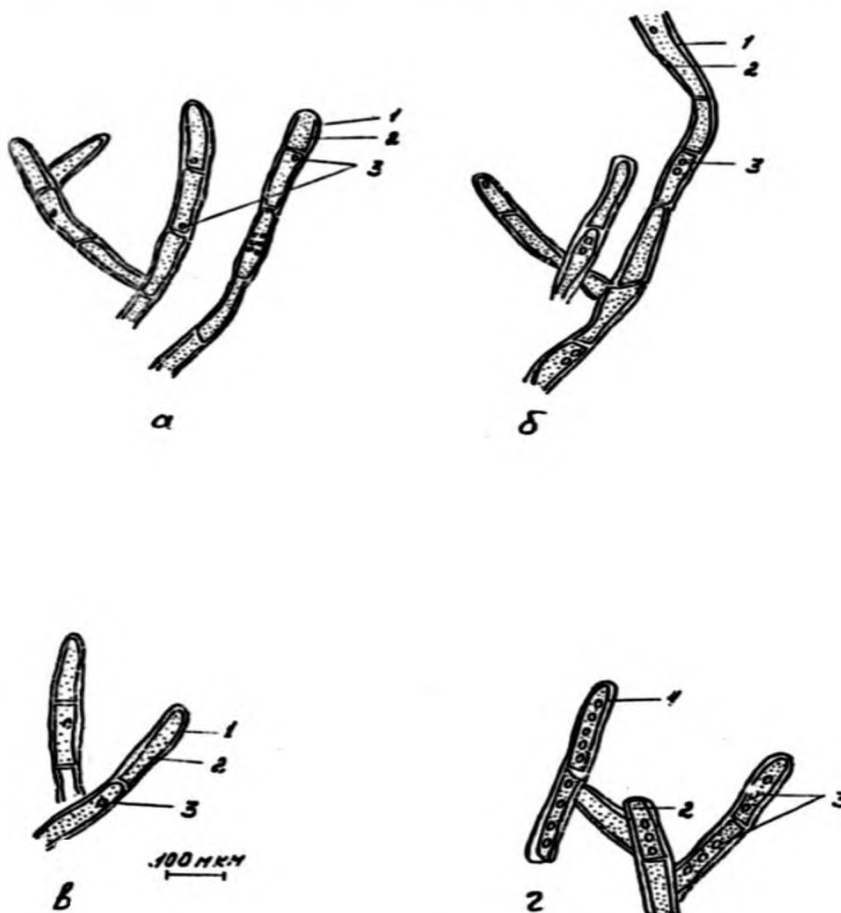


Рис. 1 Общий план строения мицелия микобионта *Evernia prunastri* Ach.: 1 – клеточная оболочка; 2 – цитоплазма; 3 – включения: а) волутин; б) липидные гранулы; в) гликоген; г) слизи, фенольные соединения

Fig. 1 General plan of the structure of the mycelium of the mycobiont *Evernia prunastri* Ach.: 1 – cellular membrane; 2 – cytoplasm; 3 – inclusions: a) volutin; b) lipid granules; c) glycogen; d) mucus, phenolic compounds

Гифа микобионта одета твердой оболочкой, основу которой составляет клеточная стенка, снаружи покрытая слизистым слоем. Основная функция клеточной стенки - защитная, кроме того, она участвует в морфогенетических и ростовых процессах. В состав клеточной стенки входят полисахариды (в частности, характеризующийся низким содержанием и включающий азот хитин), белки, липиды, нуклеиновые кислоты.

К внутренней стороне клеточной стенки примыкает пристенная трехслойная цитоплазматическая мембрана - плазмалемма. Цитоплазма в молодых клетках заполняет всю полость клетки и в ней можно заметить маленькие вакуоли. В старых клетках цитоплазма редуцирована до пристенного слоя, а центр клетки занимает крупная вакуоль. В клетках гриба откладываются запасные питательные вещества в виде гранул гликогена непосредственно в цитоплазме, а также капли эфирного масла, липидные гранулы и волютин.

Большое значение имеет строение клеточных перегородок, септ, которые являются производными клеточной оболочки и образуются путем инвагинации (выпячивания) цитоплазматической мембраны внутрь клетки. Это единственный для всех грибов путь возникновения септ. Через них осуществляется связь цитоплазмы соседних клеток, происходит перемещение питательных веществ. У лишайников аскомицетный тип септ - пластинка с центральной порой.

Гифы мицелия имеют свои особенности. Во-первых, рост грибной гифы сосредоточен только на вершине, т.е. гифы характеризуются апикальным ростом. Во-вторых, гифы мицелия растут только в длину. Кроме того, рост грибницы практически неограничен.

Гистохимические исследования, проводившиеся в течение длительного (60 суток) культивирования *E. prunastri*, имели своей целью выявление определенных веществ, связанных с особенностями метаболизма, установление их локализации в клетках и тканях. Для разработки способа выращивания лишайника в культуре *in vitro* большое значение имеет изучение изменения биохимического состава. В состав лишайников входят вещества, которые непосредственно принимают участие в клеточном обмене веществ. Это углеводы (крахмал, гликоген, хитин), липиды, нуклеиновые кислоты. Метаболизм культивируемых клеток низших растений мало изучен. Исследования механизмов клеточного обмена веществ обусловлены, прежде всего, тем, что при разработке биотехнологии *in vitro* необходимы точные знания процессов управления на биохимическом уровне (Lobakova, Smirnov, 2012).

В результате проведенных исследований была получены данные о динамике накопления дубильных веществ, слизи, крахмала, гликогена, хитина, липидов и эфирных масел в клетках культуры тканей *E. prunastri*.

Углеводы - соединения, представляющие собой непосредственные продукты фотосинтеза, служащие для построения тела лишайников. Они играют чрезвычайно важную роль в растениях, прежде всего, при построении клеточной оболочки как запасные питательные вещества и как промежуточные продукты при обмене веществ. Таким образом, углеводы играют важную роль в биохимии, физиологии и анатомии клетки. Знание структуры, свойств и роли углеводов является важнейшей предпосылкой для их гистохимического анализа.

В тканях лишайника встречаются, в основном, полисахариды. Это соединения, состоящие из моносахаридных единиц, связанных в цепочки гликозидными связями. К ним относится гликоген, который в тканях встречается в комплексе с белками и липидами. В тканях *E. prunastri* встречаются запасаемые полисахариды, например, гликоген, предшественники гликогена, крахмал, нейтральные мукополисахариды

(нейтральные мукоидные вещества). К нейтральным полисахаридам, связанным с белками, принадлежат, в частности, хитин и слизи.

У грибов, сине-зеленых бактерий, лишайников основным хранителем энергетических запасов клетки служит гликоген. В живых клетках он диффузно распределен по цитоплазме преимущественно в форме субмикроскопических мельчайших частиц. В данной работе гликоген окрашивался йодом в бурый или коричневый цвет. По интенсивности окраски составлялось представление о количестве гликогена в клетке.

Хитин – азотсодержащий полисахарид, входящий в состав оболочек мицелия микобионта. Хлор-цинк-йод окрашивал хитиновые оболочки в желтый и бурый цвет, а также кутикулу и кутикулярные слои в желто-коричневый цвет. Кутинизированные оболочки окрашивались в оранжевый цвет суданом III.

В клетках лишайника содержатся также слизи. Ткани материнского растения *E. prunastri* содержат их в больших количествах. Слизки образуют клеточные включения или представляют собой вторичное утолщение клеточной оболочки или внутренних тканей. Химически они относятся к углеводам, трудно отличимые друг от друга и, по-видимому, находятся в тесной связи с пектиновыми веществами.

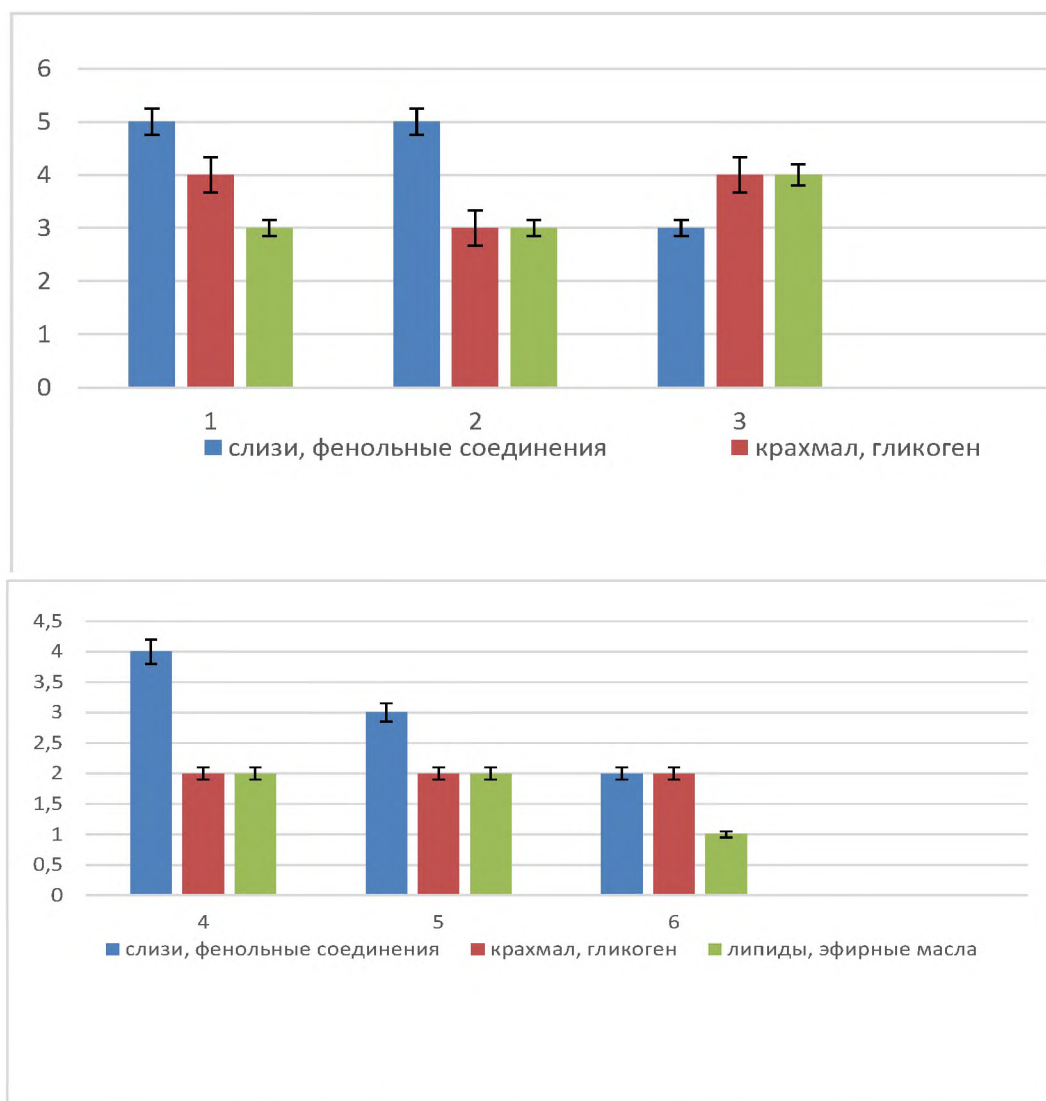
В состав межклеточного пространства входят пектиновые вещества, химически близкие к углеводам. Основные красители, кроме слизей и пектиновых веществ окрашивали также фенольные соединения (дубильные вещества), находящиеся в клетках *E. prunastri* в двух формах: в цитоплазме или в химическом соединении с целлюлозоподобными коллоидами. Фенольные соединения (дубильные вещества) пропитывают все содержимое клеток и оболочки, распределяясь диффузно, или образуются в отдельных клетках в виде включений.

Нуклеиновые кислоты участвуют в очень важных процессах жизнедеятельности клеток (структура хромосом, синтез белка). Фосфатные группы нуклеиновых кислот можно выявить с помощью таких гистохимических методов, как окрашивание основными красителями, которые дают с отрицательно заряженными фосфатными группами более или менее избирательное окрашивание. Из групп тиазиновых красителей нами для изучаемых образцов рекомендован метиленовый синий.

Растительные липиды очень разнообразны и представляют собой глицериновые эфиры высших жирных кислот. Они накапливаются в клетках как запасные питательные вещества. Под собирательным термином липиды понимают группы природных, преимущественно неполярных соединений, основным компонентом которых являются жирные кислоты. Способность растворяться в органических растворителях и другие физические свойства липидов объясняются высоким содержанием неполярных остатков углеводородов. Для всех жировых красителей единственным общим признаком является отсутствие солюбилизирующих сульфо- ( $-SO_3H$ ) или карбоксильных ( $-COOH$ ) групп. Основными представителями подобных жировых красителей являются суданы. Судан III окрашивал в цвета от оранжевого до красного жиры, масла, воска и свободные жирные кислоты.

В процессе обмена веществ в лишайниках, наряду с процессами распадами, происходят реакции, которые приводят к образованию ряда веществ, не принимающих участия в дальнейших превращениях. К ним относятся эфирные масла. Из соединений, входящих в их состав, наибольшее значение имеют терпены. Эфирные масла окрашиваются теми же красителями, что и липиды. Из литературных данных известно, что накопление веществ вторичного синтеза (эфирные масла, их гликозидносвязанные компоненты) происходит на фоне увеличения содержания запасных питательных веществ, представленных, главным образом, крахмалом (Aftab et al., 2020).

Проведенные цито- и гистохимические исследования показали, что культура лишайника эвернии сливовой на среде Мурасиге-Скуга при температуре 18°C (рис. 2) в максимальных количествах содержала фенольные вещества, слизи - 5 баллов; крахмал и гликоген - 4 балла. В меньших количествах она содержала эфирные масла и жиры - 3 балла. Морфометрический анализ выявил, что ширина клеток составляет 57,2- 64,3 кмк, а длина 228,8 - 243,1 мкм (табл. 1). Наблюдения за ростом и развитием данной культуры показали, что прирост биомассы был минимальным, накопление больших количеств слизи, фенольных соединений не способствовало росту лишайника и увеличению его биомассы.



**Рис. 2** Уровень накопления слизи, фенольных соединений, крахмала и гликогена, липидов и эфирных масел в клетках культуры *Evernia prunastri* Ach. Варианты: 1. Стандартная среда, 18°C 2. Стандартная среда с вытяжкой яблони, 18°C 3. Стандартная среда 14°C 4. Стандартная среда, 4°C 5. Стандартная среда с водным отваром вяза гладкого, 4°C 6. Стандартная среда со спиртовым экстрактом вяза, 4°C

**Fig. 2.** The level of accumulation of mucus, phenolic compounds, starch and glycogen, lipids and essential oils in *Evernia prunastri* Ach. culture cells. Options: 1. Standard environment, 18°C 2. Standard environment with an apple-tree hood, 18°C 3. Standard environment 14°C 4. Standard environment, 4°C 5. Standard medium with water decoction of smooth elm, 4°C 6. Standard medium with alcoholic elm extract, 4°C

Таблица 1

Морфометрические показатели клеток в культуре *Evernia prunastri* Ach. в сравнении с материнским слоевищем

Table 1

Morphometric parameters of cells in *Evernia prunastri* Ach. culture in comparison with the maternal stratum

№ п/п	Вариант Variant	Размеры клеток, мкм Cell size, microns	
		Длина / Length	Ширина / Width
1	Материнское слоевище Maternal stratum	161,08 ±2,30	40,04 ±1,75
2	Среда Мурасиге-Скуга, 18°C Medium Murashige-Skuga 18°C	234,50 ±3,50	58,63 ±1,42
3	Среда Мурасиге-Скуга + вытяжка яблони, 18°C Medium Murashige-Skuga + apple tree extract 18°C	231,66 ±2,86	62,92 ±1,43
4	Среда Мурасиге-Скуга, 4°C Medium Murashige-Skuga 4°C	251,68 ±3,50	60,60 ±1,75
5	Среда Мурасиге-Скуга + водный отвар вяза Medium Murashige-Skuga + elm water decoction	251,68 ±3,50	60,6 ±1,75
6	Среда Мурасиге-Скуга + спиртовой экстракт вяза, 4°C Medium Murashige-Skuga + elm spirit extract, 4°C	200,00 ±3,13 S = 29,0 V = 8,06	54,34 ±1,15 S = 5,2 V = 8,78

Лишайник эверния сливовая, культивируемый на среде Мурасиге-Скуга с добавлением спиртового экстракта яблони при 18°C содержал примерно такие же количества исследуемых веществ: максимальное количество включений слизей и фенольных соединений и значительно меньшее количество липидов, эфирных масел, крахмала и гликогена. Ширина клеток этой культуры составляет в среднем 62,92 мкм, длина 234,5 мкм (табл. 1). Проведенные наблюдения за развитием лишайника и гистохимические исследования показали, что такое состояние также не способствует активному росту культуры. Морфометрический анализ выявил, что клетки культуры тканей лишайника эвернии сливовой отличаются по размерам от клеток исходных форм. Так, длина клеток материнского слоевища составляет в среднем 161,08 мкм, ширина 40,04 мкм, а длина и ширина клеток лишайника, выращенного в культуре, соответственно, 232-235 мкм и 58-63 мкм.

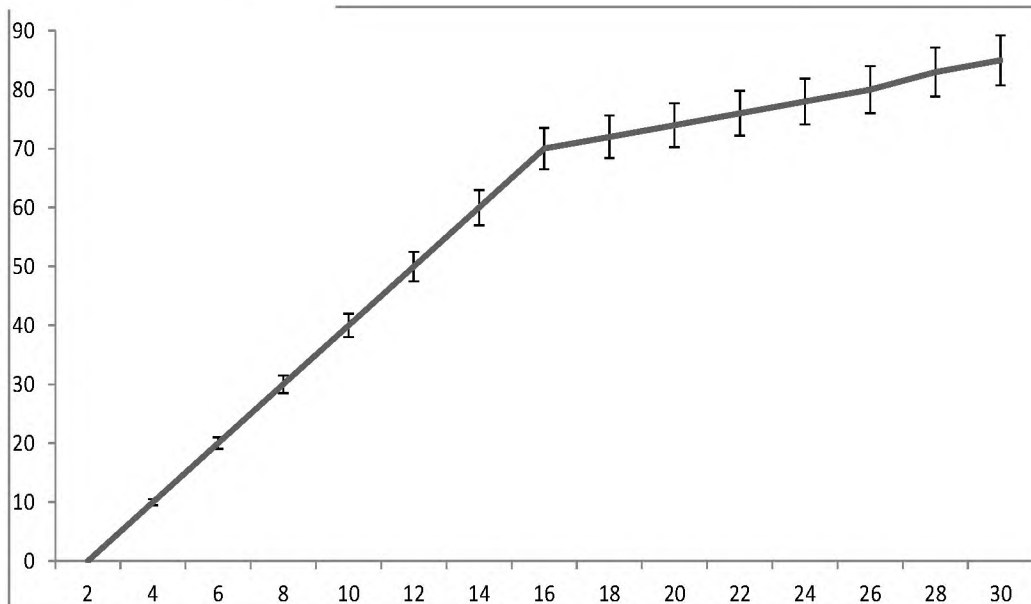
Культура, выращенная на среде Мурасиге-Скуга при температуре 14°C отличалась по содержанию всех исследуемых веществ от предыдущих вариантов. Количество крахмала и гликогена в клетках этой культуры лишайника увеличилась до 4 баллов, а количество слизей и фенольных соединений уменьшилось до 3 баллов. Такое состояние наиболее соответствует активному росту и развитию лишайника, накоплению его биомассы. Интенсивный прирост наблюдался на 18 сутки, масса сухих веществ более 60 миллиграмм. Затем интенсивность уменьшается, накопление сухих веществ происходит значительно меньше и к 30 дню составил 82 мг (рис. 3.). Как показали проведенные исследования, именно этот вариант может являться оптимальным по сравнению с предыдущим.

Проводилось также цито- и гистохимические исследования культур лишайника, произрастающих в условиях пониженных положительных температур холодильника (4°C). Культура *E. prunastri*, произрастающая на среде Мурасиге-Скуга при 4°C в процессе длительного культивирования в больших количествах содержала слизи - 4 балла. Количество жиров и эфирных масел в клетках этой культуры лишайника было в 1,5-2,0 раза меньше, чем в предыдущих вариантах, то есть снизилось до 2 баллов.



Проведенные исследования показали, что большое влияние на рост и развитие лишайника оказывают условия культивирования.

Масса сухого вещества, мг  
Drymattermass, mg

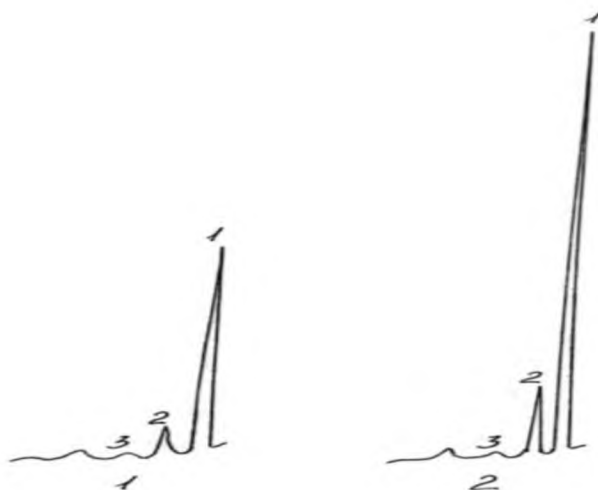


Продолжительность выращивания, сутки  
Duration of cultivation, days

**Рис. 3** Интенсивность прироста биомассы *Evernia prunastri* Ach. в процессе культивирования *in vitro* на стандартной среде при 13-15°C в зимне-весенний период  
**Fig. 3** Intensity of biomass growth of *Evernia prunastri* Ach. during *in vitro* cultivation on a standard medium at 13-15°C in winter-spring period

Экстракция лишайника *E. prunastri* непосредственно этиловым спиртом (96°) дает продукт, пригодный к употреблению. Эверния сливовая содержит 3 лишайниковых кислоты: усниновую, эверновую и атранорин. В настоящее время химическая природа ароматического начала лишайника еще недостаточно ясна. Важнейшими составными частями резиноида являются эверновая кислота и ее эфиры, которые рассматриваются как носители запаха. В процессе экстракции этиловым спиртом большая часть эверновой кислоты переходит в эверниновую и орсин. Состав резиноида не ограничивается этими кислотами, в него входит также смолы, пигменты (главным образом, хлорофилл), углеводы, воска и другие вещества (Martin et al., 2000; Alexeeva, 2005). При определении качественного состава спиртовых экстрактов природного лишайника и эвернии сливовой, выращенной в культуре тканей, использовали метод газожидкостной хроматографии. Полученные хроматограммы свидетельствуют об идентичности состава экстрактов природного лишайника и выращенного в культуре *in vitro* (рис. 4).





**Рис. 4** Хроматограммы спиртовых экстрактов: (1. эвернии сливовой, выращенной в культуре; 2. природного лишайника)  
**Fig. 4** Chromatograms of alcohol extracts: (1. *Evernia prunastri*, grown in culture; 2. natural lichen)

Основными компонентами резиноида *E. prunastri* являются эверниновая кислота, этиловый эфир эверниновой кислоты и монометилловый эфир орцина. Все важнейшие компоненты природного лишайника, являющиеся носителями запаха, входят в состав эвернии сливовой, полученной в культуре ткани *in vitro*. Однако, два из основных компонентов спиртового экстракта лишайника, выращенного в культуре, находятся в меньшем количестве, чем в составе природного лишайника. Таким образом, оба спиртовых экстракта мало отличаются по своим парфюмерным качествам.

#### Заключение

В результате проведенных исследований выполнен морфологический и биохимический анализ клеток и тканей лишайника *E. prunastri* в процессе культивирования *in vitro*, показано строение клеток фико- и микобионта, дана сравнительная характеристика морфометрических параметров клеток (ширина и длина) культуры, исходного материала, изучено накопление и локализация некоторых веществ, связанных с особенностями метаболизма (слизей, фенольных соединений, крахмала и гликогена, липидов и эфирных масел).

Проведенные цито- и гистохимические исследования выявили, что накопление в процессе развития лишайника запасных полисахаридов (крахмала и гликогена), а также других питательных веществ, таких как липиды, и веществ вторичного синтеза (эфирного масла) соответствует интенсивному росту и увеличению биомассы лишайника. Однако, высокое содержание в клетках слизей и фенольных соединений не способствует активному росту и свидетельствует о старении клеток культуры. Качественный состав спиртового экстракта лишайника, выращенного в культуре, соответствует составу природного лишайника.

Таким образом, в процессе проведения настоящей работы определена возможность выращивания *E. prunastri* в культуре тканей *in vitro*. Полученные данные могут быть рекомендованы для разработки биотехнологии культивирования эвернии сливовой и ее бионтов.

#### Литература / References

Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: «Наука», 1999. 52 с.

[Butenko R.G. Culture of isolated tissues and physiology of plant morphogenesis. M.: «Nauka», 1999. 52 p.]

Гуринович Л.К., Пучкова Т.В. Эфирные масла: химия, технология, анализ и применение. М.: Школа Косметических Химиков, 2005. 192 с.

[Gurinovich L.K., Puchkova T.V. Essential oils: chemistry, technology, analysis and application. Moscow: School of Cosmetic Chemists, 2005. 192 p.]

Куркин В.А. Фармакогнозия. Самара: «Офорт»; «СамГМУ Росздрави», 2007. 1239 с.

[Kurkin V.A. Pharmacognosy. Samara: "Ofort"; "SamSMU Roszdrava", 2007. 1239 p.]

Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. Фармакогнозия / под ред. Г.П. Яковлева. СПб.: СпецЛит, 2006. 845 с.

[Medicinal raw materials of plant and animal origin. Pharmacognosy / ed. G.P. Yakovleva. SPb.: SpetsLit, 2006. 845 p.]

Масла эфирные. Анализ методом газовой хроматографии на капиллярных колонках. Общий метод. ГОСТ ISO 7609-2014.

[Essential oils. Analysis by gas chromatography on capillary columns. General method. GOST ISO 7609-2014]

Митишев А.В., Преснякова Е.В., Семенова Е.Ф., Гурина М.А. Сравнительный анализ штаммов продуцента и инновационного продукта как основных элементов биотехнологии резиноида хлореллы // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Серия «Естественные науки». 2014. № 4 (8). С.19–29.

[Mitishev A.V., Presnyakova E.V., Semenova E.F., Gurina M.A. Comparative analysis of producer strains and innovative product as the main elements of biotechnology of chlorella resinoid. *News of higher educational institutions. Volga region. Series "Natural Sciences"*. 2014. 4 (8): 19–29]

Сафонова М.Ю. Фармакогностическое и фармакологическое изучение слоевищ цетрарии исландской *Cetraria islandica* (L.) Ach.: автореф. дис. канд. фарм. наук: 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия, 14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология / СПбХФА. СПб., 2002. 27 с.

[Safonova M.Yu. Pharmacognostic and pharmacological study of thallus of *Cetraria islandica* (L.) Ach.: author. dis. Cand. farm. Sciences: 15.00.02 - pharmaceutical chemistry and pharmacognosy, 14.00.25 - pharmacology, clinical pharmacology / SPbCFA. SPb., 2002. 27 p.]

Теплицкая Л.М., Семенова Е.Ф. Биотехнология получения резиноида из клеточных культур *Evernia prunastri* // Современные проблемы отечественной медико-биологической и фармацевтической промышленности. Матер. III Международной научно-практической конференции (г. Пенза, 21 ноября 2014 г.). Пенза: ИИЦ ПГУ, 2014. С. 160–173.

[Teplitzkaya L.M., Semenova E.F. Biotechnology of obtaining a resinoid from cell cultures of *Evernia prunastri* // Modern Problems of the Domestic Biomedical and Pharmaceutical Industry. Proceedings of the III International Scientific and Practical Conference (Penza, November 21, 2014). Penza: ИС PSU, 2014: 160–173]

Aftab A., Rizwana K., Shamsul H., Niyaz A., Pramod K. S. Chapter 9. Biotechnological Applications of Lichen // Lichen - Derived Products: Extraction and Applications / Editor Mohd Y. / Scrivener Publishing LLC, 2020. <https://doi.org/10.1002/9781119593249.ch9>

Alexeeva, N. Lichens from islands in the Russian part of the Gulf of Finland // *Folia Cryptogamica Estonica Fasc.* 2005. Vol. 41. P. 5–13.

Grimm M., Grube M., Schiefelbein U., Zühlke D., Bernhard J., Riedel K. The Lichens' Microbiota, Still a Mystery? // Front. Microbiol. 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.623839>

Lobakova E.S., Smirnov I.A. Experimental Lichenology, 2012. DOI: 10/5772|30538 <https://www.intechopen.com/books/advances-in-applied-biotechnology/experimental-lichenology>

Martin L., Randlane T., Martin J. Lichens of Vormsi Island // Folia Cryptogamica Estonica Fasc. 2000. Vol. 36. P. 65–83.

Suzuki M.T., Parrot D., Gabriele Berg, Grube M., Tomasi S. Lichens as natural sources of biotechnologically relevant bacteria // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. Vol. 100 (2). P. 583–595. DOI: 10.1007/s00253-015-7114-z

Upreti D.K., Divakar P.K., Shukla V., Bajpai R. (Ed.) Modern Methods and Approaches in Lichen Systematics and Culture Techniques // Recent Advances in Lichenology. Springer, 2015. Vol. 2. 123 p.

*Статья поступила в редакцию 24.05.2021 г.*

**Teplitskaya L.M., Semyonova E.F., Kiriakidi E.P. Cyto- and histochemical studies of the lichen *Evernia prunastri* (D.) Ach. of the Asteraceae family in vitro culture // Plant Biology and Horticulture: theory, innovation. 2021. № 2 (159). P. 37-47.**

The most demanded raw material among lichens for perfumery, cosmetic, essential oil and pharmaceutical industries are dried thalli of *Evernia prunastri*. Populations of this species in Crimea are limited, and harvests of this plant significantly reduce natural resources. Biotechnology methods can solve the problem of year-round supply of raw materials for technological processes, as well as the preservation of natural reserves of *E. prunastri* in nature. Therefore, it is relevant to develop lichen technologies under controlled conditions, which make it possible to intensify the processes of accumulation of biomass and biologically active compounds in it produced by phyco- and mycobionts. In the process of in vitro cultivation, morphological, cyto- and histochemical analysis of cells and tissues of *E. prunastri* lichen was carried out: Comparative morphometric characteristics of mycobiont and phycobiont cells in vitro and the initial material were given. The accumulation and localization of: mucus, phenolic compounds, starch and glycogen, lipids and essential oils has been studied. It has been shown that the accumulation of reserve polysaccharides during the development of a lichen: starch and glycogen, as well as other nutrients, such as lipids, and substances of secondary synthesis, in particular, essential oil, is associated with an intensive increase in the biomass of lichen. However, the high content of mucus and phenolic compounds in cells does not promote active growth and indicates aging of culture cells. It was revealed that the qualitative composition of the alcoholic extract of lichen grown in culture corresponds to the composition of natural lichen. This information obtained can be used in the development of biotechnology for the cultivation of *E. prunastri* and its bionts.

**Keywords:** *cytochemistry; histochemistry; phycobiont; mycobiont; cultivation under controlled conditions; alcoholic extract*