

АНАТОМО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ЛИСТЬЕВ ЛИМОНА (*CITRUS LIMON* (L.) BURM. F.)

Ю.С. ЧЕРЯТОВА, А.А. МАХОВА

(Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева)

Приведены результаты изучения особенностей анатомического строения листьев лекарственного растения лимона (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) из семейства Рутовые (*Rutaceae*), который используется в фармацевтической промышленности для получения ценного эфирного лимонного масла, обладающего антибактериальным и антиоксидантным свойством. В литературе нет полных сведений об анатомическом строении листьев лимона, что затрудняет проведение микродиагностики лекарственного сырья, поэтому изучение анатомических особенностей листьев лимона является весьма актуальным. Лекарственный растительный материал свежих листьев *C. limon* был получен из апельсины ботанического сада имени С.И. Ростовцева. Анатомический анализ сырья и гистохимические реакции проводили согласно нормативной документации Государственной фармакопеи Российской Федерации. Микроскопическое строение показало, что листья *C. limon* дорсовентральные, листовая пластинка гипостоматическая. Устьичный аппарат листьев аномоцитный. В листе наблюдались секреторные эндогенные структуры, представленные лизигенными эфирномасличными вместилищами круглой формы, которые формировались в столбчатом и зубчатом мезофилле листа, а в также основной паренхиме черешка. Эфирное масло синтезировалось в секреторных клетках вместилища, которые в итоге претерпевали автолиз и высвобождали содержимое в образующуюся полость. Главная жилка листовой пластинки и черешка листа представлена коллатеральным проводящим пучком, на поперечном срезе имеющего вид кольца. К характерным маркерным признакам листа также относится наличие в мезофилле и паренхиме черешка листа одиночных кристаллов ромбовидной формы и друз оксалата кальция. В результате проведенных исследований были установлены значимые анатомо-диагностические признаки листьев *C. limon*, которые могут быть использованы при написании фармакопейных статей.

Ключевые слова: *Citrus limon* (L.) Burm. f., фармакогнозия, микроскопический анализ, анатомо-диагностические признаки, анатомия листа, эфирное масло, лизигенные эфирномасличные вместилища.

Введение

Одним из основных направлений в изучении лекарственных растений является установление анатомо-диагностических признаков сырья с целью выявления его морфологической принадлежности. На сегодняшний день у ряда ценных лекарственных растений, несмотря на их широкое применение и популярность, анатомические особенности вегетативных органов остаются малоизученными.

Лимон (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) – многолетнее вечнозеленое субтропическое растение семейства Рутовые (*Rutaceae*), представляющее собой невысокое дерево от 3 до 7 м высотой. В дикорастущем виде лимон не встречается. В России лимон культивируется в качестве плодового и лекарственного растения на Черноморском побережье Кавказа [3].

Лекарственное растительное сырье листьев лимона входит в Государственный реестр лекарственных средств РФ [1]. Листья содержат флаваноновые гликозиды:

гепередин, эриодиктин, неогеспередин; кумарины и ситостерин [9, 10]. Характерный запах листьев лимона обусловлен наличием эфирного лимонного масла, которое содержит до 90% монотерпена лимонена и около 3% цитраля [14, 15]. Эфирное масло лимона обладает ярко выраженным антибактериальным, противовирусным и антиоксидантным действием [11].

В отечественной и иностранной литературе нет полных сведений об анатомическом строении листьев лимона, особенно это касается отсутствием описания петиолярной анатомии. Более того, вопрос о происхождении эфирномасличных вместилищ цитрусовых, в частности, лимона, согласно данным литературы, на сегодняшний день является достаточно спорным [6]. Одни исследователи полагают, что вместилища лимона развиваются схизогенно, другие считают, что лизигенно, а третьи полагают, что вместилища лимона развиваются схизолизигенно [8, 12, 13]. Эти факты существенно затрудняют проведение полноценной микродиагностики и оценки подлинности рассматриваемого лекарственного растительного сырья.

Исходя из вышеизложенного изучение анатомических особенностей листьев лимона является достаточно актуальным.

Цель исследований: выявление анатомо-диагностических признаков лекарственного растительного сырья листьев лимона. В задачи работы входило установление анатомического строения листовой пластинки и черешка листьев лимона, а также определение генезиса эфирномасличных вместилищ.

Материал и методы исследований

Научно-исследовательская работа была выполнена на кафедре ботаники, селекции и семеноводства садовых растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева в 2019–2020 г. Лекарственный растительный материал свежих листьев *C. limon* был получен из оранжереи ботанического сада имени С.И. Ростовцева. Изготовление микропрепаратов листьев и проведение гистохимических реакций выполняли согласно нормативной документации Государственной фармакопеи Российской Федерации [2]. Детализированный анатомический анализ лекарственного растительного сырья осуществляли по методике Ю.С. Черятовой [4]. Гистологический состав тканей листа определяли согласно справочным материалам [5]. В работе использовали микроскоп Carl Zeiss Primo Star и цифровую фотокамеру Canon Digital IXUS105.

Результаты и их обсуждение

Листовая пластинка *C. limon* кожистая, голая. Благодаря наличию эпикуткулярного воска поверхность листьев глянцевая. Эпидерма листьев однослойная. Клетки эпидермы листа полигональные, таблитчатые. Клеточные стенки верхней эпидермы листьев *C. limon* характеризовались менее извилистыми очертаниями по сравнению с клеточными стенками нижней эпидермы (рис. 1). Боковые стенки мелко, неясно четковидные. Все стенки эпидермальных клеток утолщены, но боковые – несколько меньше, чем наружные и внутренние; местами в боковых стенках хорошо различимы поры.

Листовая пластинка гипостоматическая. Устьица, расположенные на нижней стороне листа, распределены диффузно по всей поверхности пластинки. Устьичный аппарат листьев *C. limon* аномоцитный. Околоустьичные клетки были морфологически сходны с основными эпидермальными клетками (рис. 1 Г). Клеточные стенки замыкающих клеток устьиц, обращенные к устьичной щели, наиболее утолщены. Необходимо отметить, что замыкающие клетки устьиц располагаются ниже поверхности основных эпидермальных клеток.

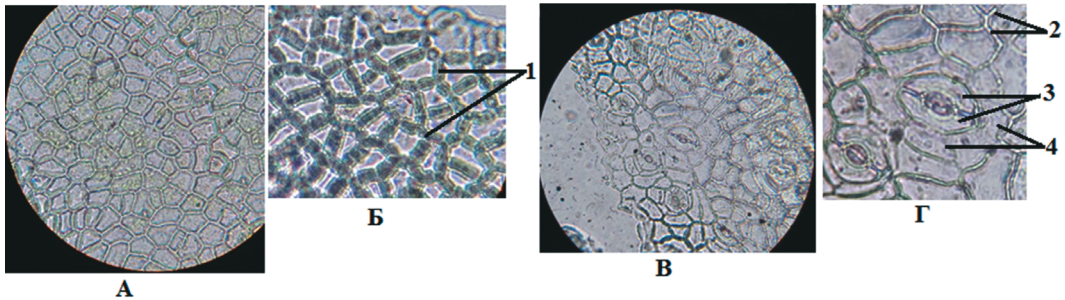


Рис. 1. Строение эпидермы листовой пластинки *Citrus limon* (L.) Burm. f. (парадермальный срез):
 А – верхняя эпидерма ($\times 200$); Б – клетки верхней эпидермы ($\times 400$);
 Б' – нижняя эпидерма ($\times 200$);
 Г – клетки нижней эпидермы и аномоцитные устьица ($\times 400$):
 1 – клеточные стенки верхней эпидермы;
 2 – клеточные стенки основных клеток нижней эпидермы;
 3 – замыкающие клетки устьиц; 4 – околостычные клетки

Листья *C. limon* дорсовентральные. Под верхней эпидермой листа располагался довольно плотный двухслойный столбчатый мезофилл. Многослойный рыхлый губчатый мезофилл, расположенный с нижней стороны пластинки, занимал наибольший объем листа. Губчатый мезофилл составлял от 9 до 10 слоев клеток (рис. 2). Следует отметить, что по краю листа клетки губчатого мезофилла слагались более плотно, нежели в центральной его части.

В толще мезофилла листа располагались лизигенные секреторные эфирно-масличные вместилища. Особенно отчетливо вместилища были видны на листьях в проходящем ярком свете в виде небольших светящихся точек (рис. 2 Б). В клетках эпидермы листа (реже субэпидермально) также были обнаружены одиночные кристаллы ромбовидной формы.

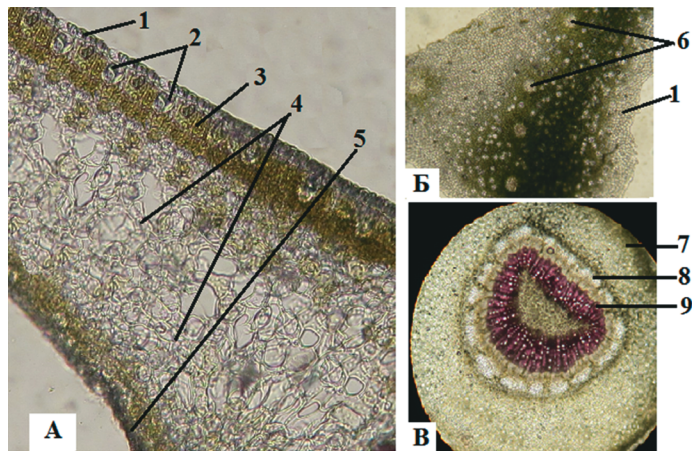


Рис. 2. Анатомическое строение листовой пластинки *Citrus limon* (L.) Burm. f.:
 А – мезофилл на поперечном срезе листа ($\times 200$);
 Б – листовая пластинка (вид с поверхности) ($\times 40$);
 Б' – поперечный срез листовой пластинки в области главной жилки ($\times 200$):
 1 – верхняя эпидерма; 2 – ромбовидные кристаллы оксалата кальция;
 3 – столбчатый мезофилл; 4 – губчатый мезофилл; 5 – нижняя эпидерма;
 6 – лизигенные эфирномасличные вместилища; 7 – уголковая колленхима;
 8 – волокна склеренхимы; 9 – проводящий пучок главной жилки листа

Жилкование листа сетчатое. Различные по размерам жилки формировали анастомозирующую сеть. Наиболее крупная средняя жилка занимала медианное положение. Средняя жилка листа была представлена открытым коллатеральным проводящим пучком. Характерной особенностью пучка было то, что его проводящие ткани располагались кольцом вложенными цилиндрами. Камбий изначально в листе закладывался, однако функционировал непродолжительно. В силу этого в пучке обнаруживалось небольшое число вторичных проводящих элементов. Со стороны флоэмы пучок был армирован волокнами склеренхимы, а с верхней и нижней стороны листовой пластинки ассоциирован субэпидермально расположенными тяжами угловой колленхимы. Средняя жилка *C. limon* выступала в виде хорошо выраженного ребра на абаксиальной поверхности листовой пластинки. Боковые жилки листа имели закрытые коллатеральные пучки.

Эндогенные секреторные вместилища *C. limon* возникали вследствие растворения (лизиса) группы клеток, обособившихся внутри мезофилла листа. В лизигенных вместилищах секрет синтезировался в клетках, которые в итоге претерпевали автолиз и высвобождали содержимое в образующееся пространство (полость). По периферии полости вместилища обнаруживались частично разрушенные клетки. Необходимо отметить, что образование лизигенных вместилищ характерно при голокринном типе секреции, когда секреция происходит путем лизиса секреторных клеток.

При выполнении серии поперечных срезов пластинки удалось выявить этапы развития лизигенных вместилищ в листе лимона (рис. 3).

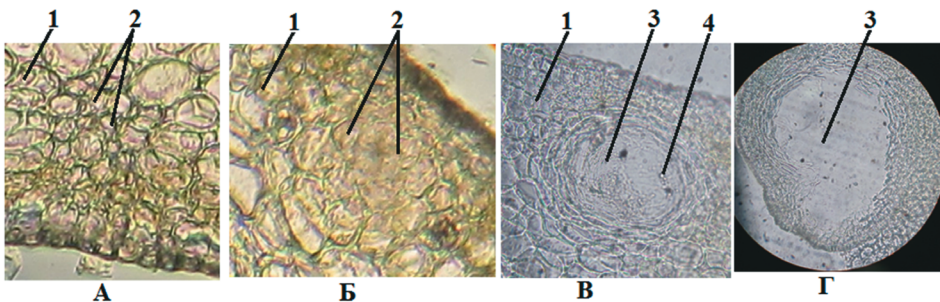


Рис. 3. Развитие лизигенных эфирномасличных вместилищ на поперечном срезе листа *Citrus limon* (L.) Burm. f. ($\times 400$):

- А – начальный этап формирования – обособление клеток;
- Б – средний этап формирования – лизирование клеток;
- В – заключительный этап формирования – зрелое эфирномасличное вместилище с выраженной полостью и каплями масла;
- Г – старое эфирномасличное вместилище:
- 1 – клетки мезофилла листа; 2 – лизирующиеся клетки;
- 3 – полость эфирномасличного вместилища; 4 – капли эфирного масла

На ранней (начальной) стадии образования лизигенного вместилища происходили обособление, группировка, а также специализация клеток мезофилла. На средней стадии формирования вместилища наблюдались лизирование части обособившихся клеток мезофилла и начало формирования центральной полости, заполненной секретом (каплями эфирного масла). При формировании вместилища сначала лизировалось несколько центральных клеток, а затем этот процесс распространялся на соседние периферийные клетки. В этой стадии часть клеток вместилища после секреторной фазы претерпевала автолиз. Таким образом, становится очевидным, что эфирное масло вырабатывалось секреторными клетками до их разрушения. На поздней (заключительной) стадии развития вместилища все клетки были лизированы, объем полости увеличен. Вместилища с эфирным маслом довольно крупные, круглой формы. Эфирное масло растения представляло собой прозрачную ароматную жидкость желтого цвета с ярко выраженным лимонным запахом.

Особенностью лизигенных вместилищ лимона было то, что они не имели четко обособленной стенки. По периферии полости вместилища наблюдались частично спавшиеся или разрушенные клетки. Препарируя листья лимона с приростов прошлого года, можно было также обнаружить старые (сенильные) эфирномасличные вместилища, полость которых уже была высвобождена от эфирного масла.

Таким образом, при возникновении на месте постоянных тканей (мезофилла) листа *C. limon* лизигенных эфирномасличных вместилищ происходила морфофункциональная перестройка клеток, вследствие чего они приобретали секреторную функцию. Необходимо отметить, что обнаруженные этапы формирования лизигенных вместилищ в листе лимона могут послужить дополнительными маркерными признаками при проведении анатомического анализа рассматриваемого лекарственного сырья.

В полуцилиндрическом черешке лимона в центральной части находится открытый коллатеральный пучок, проводящие ткани которого на поперечном срезе располагались в виде кольца (рис. 4). Большую часть проводящего пучка составляли трахеальные элементы ксилемы.

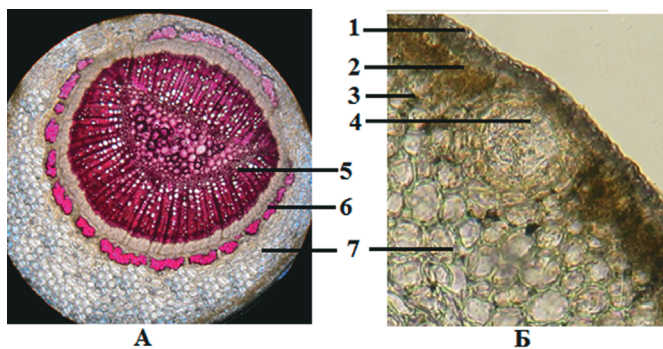


Рис. 4. Анатомическое строение поперечного среза черешка *Citrus limon* (L.) Burm. f.: А – строение черешка в области главной жилки ($\times 200$); Б – коровая часть черешка ($\times 400$): 1 – эпидерма; 2 – хлоренхима; 3 – колленхима; 4 – лизигенное эфирномасличное вместилище; 5 – проводящий пучок; 6 – волокна склеренхимы; 7 – основная паренхима коры

Следует отметить, что центральную часть черешка листа занимала неспециализированная крупноклеточная лигнифицированная паренхима. Механическая функция пучка была усилена волокнами склеренхимы, располагающимися по периферии. Устойчивость черешка к изгибам обеспечивала также сплошная двух- трехслойная уголкового колленхима коровой части. Остальное пространство в черешке листа занимала основная паренхима. В паренхиме черешка листа изредка встречались кристаллоносные клетки, содержащие по одному крупному ромбовидному кристаллу или острокристаллической друзе оксалата кальция. По периферии черешка также были обнаружены лизигенные эфирномасличные вместилища круглой формы, образовавшиеся в результате лизиса группы клеток, обособившихся внутри основной паренхимы коры.

Выводы

В результате проведенной работы были установлены следующие значимые анатомо-диагностические признаки листьев *Citrus limon*:

1. Листовая пластинка кожистая, голая. Клеточные стенки верхней эпидермы листьев характеризуются менее извилистыми очертаниями по сравнению с клеточными стенками нижней эпидермы.

2. Листовая пластинка гипостоматическая. Устьичный аппарат аномоцитный.
 3. Лист дорсовентральный. Под верхней эпидермой располагается двухрядный столбчатый мезофилл, состоящий из плотно сомкнутых прямоугольных клеток. Губчатый мезофилл весьма рыхлый и составляет от 9 до 10 слоев клеток.
 4. Проводящий пучок главной жилки и черешка листа открытый коллатеральный, имеющий на поперечном сечении вид кольца.
 5. Расположенные в мезофилле листа и паренхиме черешка лизигенные эфирно-масличные вместилища круглой формы.
 6. Встречающиеся в мезофилле и черешке листа одиночные кристаллы ромбовидной формы и друзы оксалата кальция.
- Установленные в работе маркерные анатомо-диагностические признаки листьев *C. limon* могут быть использованы при написании фармакопейных статей.

Библиографический список

1. Государственный реестр лекарственных средств. – М.: Изд-во «Научный центр экспертизы и средств медицинского применения», 2008. – Т. 1. – 1398 с.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации. – М.: Изд-во «Научный центр экспертизы и средств медицинского применения», 2008. – 12 изд. – Т. 1. – 704 с.
3. Мазнев Н.И. Большая энциклопедия высокоэффективных лекарственных растений. – М.: Эксмо, 2009. – 608 с.
4. Черятова Ю.С. Анатомия лекарственных растений и лекарственного растительного сырья: Учебное пособие. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2010. – 95 с.
5. Черятова Ю.С. Основы гистологии лекарственных растений: Учебное пособие. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2016. – 93 с.
6. Эверт Р.Ф. Анатомия растений Эзау. Меристемы, клетки и ткани растений: строение, функции и развитие. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. – 600 с.
7. Ahmed M. Seasonal variation in lemon (*Citrus limon* L. Burm. f) leaf and rind oil composition / M. Ahmed, M.L. Arpaia, R.W. Scora // *Journal of Essential Oil Research*. – 2001. – Vol. 13, № 3. – P. 149–153.
8. Bosabadilis A. Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* / A. Bosabadilis, A.W. Galston // *Protoplasma*. – 1982. – Vol. 112. – P. 63–70.
9. Ekundayo O. The composition of lemon petitgrain oil (*Citrus limon* (L.) N.L. Burm.) / O. Ekundayo, O. Bakare, A. Adesomoju // *Journal of Essential Oil Research*. – 1990. – Т. 2, № 5. – P. 269–270.
10. Lota M. – L. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species / M. – L. Lota, D. de R. Serra, F. Tomi // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2002. – Vol. 50, № 4. – P. 796–805.
11. Misharina T. Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures / T. Misharina, A. Samusenko // *Applied Biochemistry & Microbiology*. – 2008. – Vol. 44 (4). – P. 438–442.
12. Turner G.W. Shizogenous secretory cavities of *Citrus limon* (L.) Burm. f. and a reevaluation of the lysigenous gland concept / G.W. Turner, A.M. Berry, E.M. Gifford // *International Journal of Plant Science*. – 1998. – Vol. 159. – P. 75–88.
13. Turner G.W. A brief history of the lysigenous gland hypothesis // *Botanical Review*. – 1999. – Vol. 65. – P. 76–88.
14. Verzera A.L. Extraction technology and lemon oil composition / A. Verzera, P. Dugo, L. Mondello // *Italian Journal of Food Science*. – 1999. – Vol. 11, № 4. – P. 361–370.
15. Verzera A. Influence of cultivar on lemon oil composition / A. Verzera, C. Russo, G. La Rosa // *Journal of Essential Oil Research*. – 2001. – Vol. 13, № 5. – P. 343–347.

ANATOMO-DIAGNOSTIC TRAITS OF LEMON LEAVES (*CITRUS LIMON* (L.) BURM. F.)

YU.S. CHERYATOVA, A.A. MAKHOVA

(Russian Timiryazev State Agrarian University)

*The article summarizes the results of studying the anatomical structure of the leaves of a medicinal lemon plant (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) from the Rutaceae family, which is used in the pharmaceutical industry to produce valuable lemon essential oil with antibacterial and antioxidant properties. There is no complete information about the anatomical structure of lemon leaves in the literature, which makes it challenging to conduct microdiagnosis of medicinal raw materials. Therefore, the study of the anatomical features of lemon leaves is relevant.*

*The researchers took the medicinal plant material of the fresh leaves of *Citrus limon* from the greenhouse of the Botanical Garden named after S.I. Rostovtsev. They carried out anatomical analysis of raw materials and histochemical reactions according to the regulatory documentation of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. The microscopic structure showed that the leaves of *Citrus limon* are dorsoventral, the leaf blade is hypostomatic. The stomatal apparatus of the leaves is anomocytic. In the leaf, endogenous secretory structures were observed, represented by round-shaped lysigenic essential oil receptacles formed in the columnar and spongy mesophyll of the leaf and the main petiole parenchyma. The essential oil was synthesized in the secretory cells of the receptacle, which eventually underwent autolysis and released contents into the resulting cavity. A collateral conductive bundle with a ring-shaped cross-section represents the central vein of the leaf blade and leaf petiole. The characteristic marker features of the leaf also include the presence of single rhomboid crystals and drusen calcium oxalate in the leaf petiole mesophyll and parenchyma. As a result of the studies, significant anatomical and diagnostic signs of *Citrus limon* leaves were found, which can be used in writing pharmacopeia articles.*

Key words: *Citrus limon* (L.) Burm. f., pharmacognosy, microscopic analysis, anatomo-diagnostic traits, leaf anatomy, essential oil, lysigenic essential oil receptacles.

References

1. Gosudarstvennyy reestr lekarstvennykh sredstv [The state register of medicines]. T. 1. Moscow: Izd-vo "Nauchnyy tsentr ekspertizy i sredstv meditsinskogo primeneniya". 2008: 1398. (In Rus.)
2. Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiyskoy Federatsii [The State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. Moscow: Izd-vo "Nauchnyy tsentr ekspertizy i sredstv meditsinskogo primeneniya". 2008: 704. (In Rus.)
3. Maznev N.I. Bolshaya entsiklopediya vysokoeffektivnykh lekarstvennykh rasteniy [Big Encyclopedia of highly effective medicinal plants]. Moscow: Eksmo. 2009: 608. (In Rus.)
4. Cheryatova Yu.S. Anatomiya lekarstvennykh rasteniy i lekarstvennogo rastitel'nogo syria: Uchebnoe posobie [Anatomy of medicinal plants and medicinal plant materials: Study manual]. Moscow: Izd-vo RGAU-MSKHA imeni K.A. Timiryazeva. 2010: 95. (In Rus.)
5. Cheryatova Yu.S. Osnovy gistologii lekarstvennykh rasteniy: Uchebnoe posobie [The basics of histology of medicinal plants: Study manual]. Moscow: Izd-vo RGAU-MSKHA imeni K.A. Timiryazeva. 2016: 93. (In Rus.)
6. Evert R.F. Anatomiya rasteniy Ezau. Meristemy, kletki i tkani rasteniy: stroenie, funktsii i razvitiye [Plant Anatomy Esau. Meristems, cells and tissues of plants: structure, functions and development]. Moscow: BINOM. Laboratoriya znaniy. 2015: 600. (In Rus.)

7. *Ahmed M., Arpaia M.L., Scora R.W.* Seasonal variation in lemon (*Citrus limon* L. Burm. f) leaf and rind oil composition. *Journal of Essential Oil Research*. 2001; 13 (3): 149–153.
8. *Bosabadilis A., Galston A.W.* Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa*. *Protoplasma*. 1982; 112: 63–70.
9. *Ekundayo O., Bakare O., Adesomoju A.* The composition of lemon petitgrain oil (*Citrus limon* (L.) N.L. Burm.). *Journal of Essential Oil Research*. 1990; 2 (5): 269–270.
10. *Lota M. – L., Serra D. de R., Tomi F.* Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50 (4): 796–805.
11. *Misharina T., Samusenko A.* Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures. *Applied Biochemistry & Microbiology*. 2008; 44 (4): 438–442.
12. *Turner G.W., Berry A.M., Gifford E.M.* Shizogenous secretory cavities of *Citrus limon* (L.) Burm. f. and a reevaluation of the lysigenous gland concept. *International Journal of Plant Science*. 1998; 159: 75–88.
13. *Turner G.W.* A brief history of the lysigenous gland hypothesis. *Botanical Review*. 1999; 65: 76–88.
14. *Verzera A., Dugo P., Mondello L.* Extraction technology and lemon oil composition. *Italian Journal of Food Science*. 1999; 11 (4): 361–370.
15. *Verzera A., Russo C., La Rosa G.* Influence of cultivar on lemon oil composition. *Journal of Essential Oil Research*. 2001; 13 (5): 343–347.

Черятова Юлия Сергеевна, канд. биол. наук, доцент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязев (127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976–16–18; e-mail: u.cheryatova@rgau-msha.ru).

Махова Анастасия Александровна, бакалавр института садоводства и ландшафтной архитектуры РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязев (127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: makhova_nastya@mail.ru).

Yulya S. Cheryatova, PhD (Bio), Associate Professor, the Department of Botany, Breeding and Seed Technology of Horticultural crops, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow (127550, Russian Federation; phone: (499) 976–16–18; E-mail: u.cheryatova@rgau-msha.ru).

Anastasia A. Makhova, bachelor student, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow (127550, Russian Federation; E-mail: makhova_nastya@mail.ru).