

**ОСОБЛИВОСТІ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ МОРФОГЕННОГО КАЛЮСУ  
*POPULUS TREMULA L.* В УМОВАХ *IN VITRO***

*А.Ф. Ліханов, С.Ю. Білоус, кандидати біологічних наук*

*А.А. Клюваденко, кандидат сільськогосподарських наук*

*Національний університет біоресурсів і природокористування України*

*Досліджено вплив екзогенних гормональних стимулів на тканини листків *Populus tremula L.* in vitro і визначено специфіку ініціації непрямого морфогенезу, який відбувається через початкову дедиференціацію тканин з утворенням паренхіматозного калюсу і його подальшою кластеризацією на гетерогенні зони через утворення гістохімічних бар'єрів. З'ясовано, що морфогенез у калюсних культурах *Populus tremula L.* синхронізований з відкладеннями калози, які ізолюють групи промеристемних клітин, тим самим підвищуючи їх автономність і просторову впорядкованість з наступним утворенням меристемодних тканинних структур.*

**Ключові слова:** *Populus tremula L.*, калюс, клітина, морфогенез, калоза, лігнін, диференціація, in vitro.

Серед швидкозростаючих видів деревних рослин для створення плантацій різного призначення одним із перспективних є осика (*Populus tremula L.*). Найрезультативнішим серед методів отримання оздоровленого генетично-однорідного садивного матеріалу *P. tremula* за таких умов є біотехнологія мікроклонального розмноження рослин in vitro. Даний метод довів свою ефективність, проте потребує ретельного підборі умов культивування, зокрема оптимізації складу живильних середовищ, гормональної індукції морфогенних процесів тощо.

Отримання морфогенного калюсу з подальшою регенерацією рослин-регенерантів – найважливіший етап біотехнологічного процесу. Перехід

калюсної тканини з неморфогенного стану в морфогенний індукується гормональними стимулами [2, 3, 5, 8, 13], однак сам процес диференціації клітин з утворенням первинних меристем має видоспецифічні особливості і вимагає детального та всебічного вивчення. Одним із маловивчених аспектів морфогенезу є роль біополімерів клітини в просторовій ізоляції та первинній диференціації калюсних тканин. Такими полімерами виступають калоза і компоненти лігніну. Калоза відкладається на зовнішній стінці плазмалеми [16] і регулює міжклітинний транспорт речовин. У синтезі полісахариду ( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкану) бере участь калозосинтетаза II, яка являє собою трансмембранний білок плазматичної мембрани [15], проте питання щодо утворення калози залишається відкритим [1, 4]. Біосинтез компонентів лігніну відбувається шляхом окислення монолігнолів за участю пероксидаз і лакказ [1, 4]. Калоза і лігнін виконують бар'єрну функцію і вибірково регулюють міжклітинний транспорт низькомолекулярних сполук і продуктів вторинного метаболізму, від якого залежить іонний баланс, енергетичний та пластичний обмін у клітинах, реалізація внутрішньоклітинних програм їх розвитку та диференціації.

**Мета досліджень** – вивчення послідовності стадій морфогенезу в процесі формування рослин-регенерантів *P. tremula* зеленокорої форми, а також виявлення центрів локалізації калози і лігніну та з'ясування їх взаємозв'язку з початком тканинної диференціації калюсних культур *in vitro*.

**Матеріали і методика досліджень.** Дослідження процесів клітинної диференціації і формування меристемоїдних структур у калюсних тканинах осики зеленокорої проводили на первинних калюсах, отриманих в умовах *in vitro* з фрагментів асептичних пагонів (1-1,5 см ) і висічок листових пластинок (1 см<sup>2</sup>).

Масу калюсної тканини, що досягла 2 г, пересаджували і культивували в стерильних умовах на 20 мл живильного середовища. Пасажування калюсних культур здійснювали кожні 30-35 діб. Експеримент з ініціації калюсогенезу та активації проліферації клітин проводили в термостаті без освітлення ( $t=24\pm 2$  °C), а також у культуральному приміщенні в режимі клімат-контролю

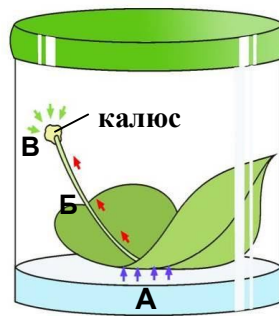
(за температури  $24 \pm 2$  °C, вологості повітря 70 % з освітленням 3-4 тис. Лк., 16-годинного фотоперіоду) [2]. При проведенні усіх біотехнологічних прийомів дотримувалися загальноприйнятих методик [5, 6, 7, 8, 9].

Гістохімічні та цитологічні дослідження дедиферинційованих тканин калюсу виконували на мікропрепаратах товщиною 10–12 мкм. Калюсні тканини фіксували розчином Чемберлена – 70%-ий етиловий спирт – формалін – льодяна оцтова кислота – 90:5:5, далі здійснювали дегідратацію матеріалу та просочували його парафіном [10]. Зрізи товщиною 10 мкм готували на санному мікротомі (LKB 8800, Швеція). Флуоресценцію клітинних стінок вивчали на мікроскопі Axioscope A1 Carl Zeiss із використанням оптичних фільтрів. Локалізацію відкладень калози визначали за її люмінесценції з аніліновим синім (розведення 1:1000, фарбування – 10 хв). Компоненти М-лігніну в клітинних стінках виявляли методом перманганатної реакції з наступною обробкою зрізів 15 %-м розчином HCl і рідким аміаком до появи вишнево-червоного забарвлення [11]. Фотодокументацію отриманих результатів і цифрову обробку даних виконували за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення Image Pro Premier 9.0.

За результатами досліджень встановлено, що на гормональних живильних середовищах експланти осики зеленокорої виявили високу чутливість до регуляторів росту ауксинового типу. Після травматичного пошкодження листків та перенесення їх на живильне середовище Мурасіге і Скуга [14] за 7 діб на дистальному від листової пластинки кінці черешка було зафіксовано початок калюсоутворення. Калюсогенез визначався активним наростанням щільної за консистенцією паренхіматозної тканини зеленуватого забарвлення. Заслуговує на увагу факт ініціації утворення калюсу на черешку, який знаходився поза зоною прямого контакту з живильним середовищем. Гормональна стимуляція поділу клітин відбувалась у тканинах черешка за умов базипетального транспорту ауксиноподібних регуляторів росту (рис. 1 А, блакитні стрілки), через васкулярну систему бічних жилок другого і третього

порядків у центральну жилку і далі до кінцевої частини черешка (рис. 1 Б, червоні стрілки), де утворювалася калюсна тканина (рис. 1 В, зелені стрілки).

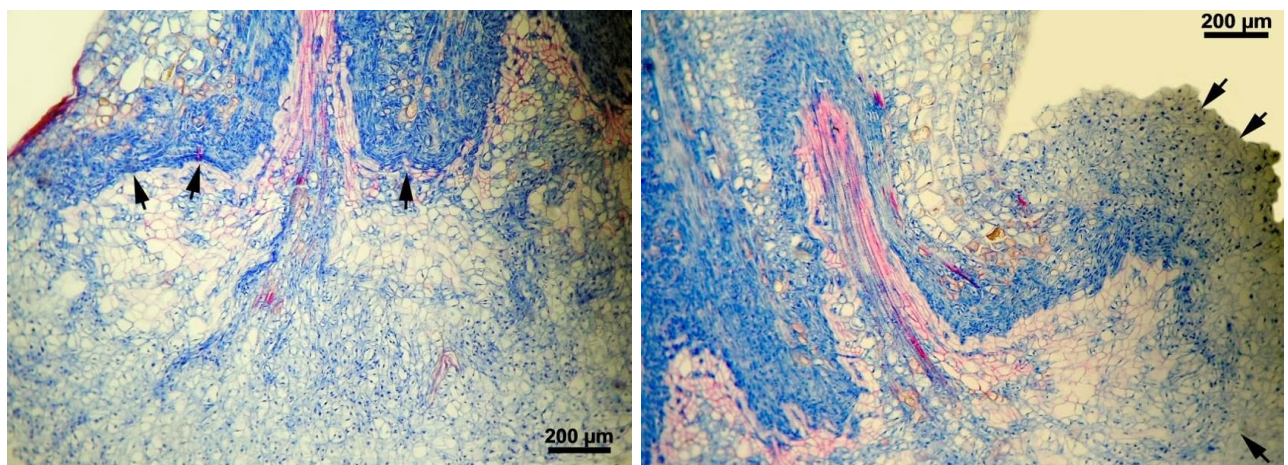
Гістологічний аналіз тканин черешка осики зеленокорої показав, що формування калюсів у черешках має чітко визначену просторову гетерогенність. Найактивніша зона поділу клітин черешка знаходилась у паренхімі кори.



**Рис. 1. Базипітальний транспорт екзогенних регуляторів росту:**

А – від живильного середовища до тканин пластинки; Б – від тканин пластинки до черешка; В – формування калюсу в базальній частині черешка

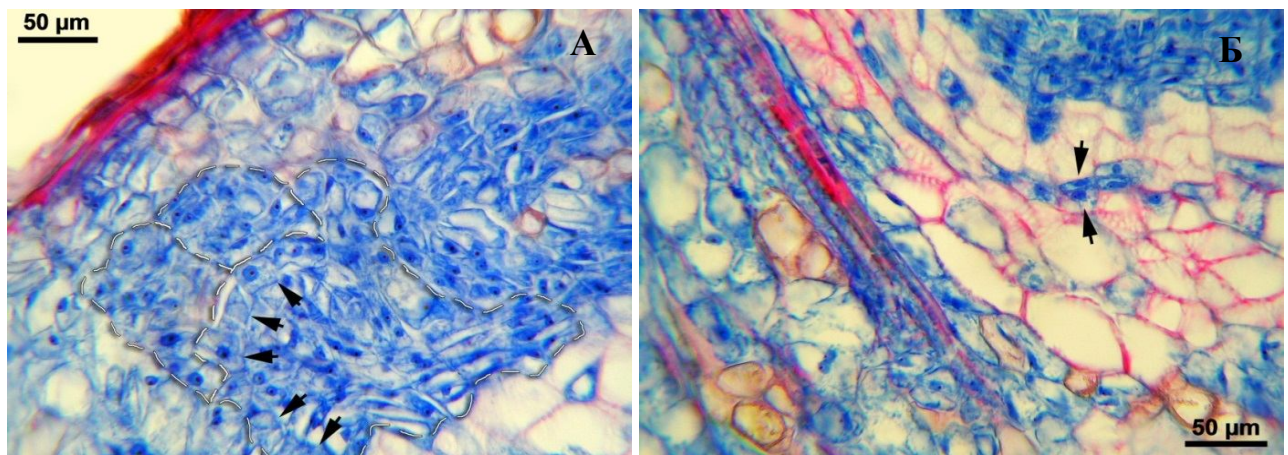
Щільно притиснуті одна до одної клітини характеризувалися густою оксифільною цитоплазмою (рис. 2). Тканини первинного калюсу навколо провідних пучків відзначалися скупченням дрібних клітин з високими показниками об'ємного співвідношення ядро/цитоплазма (N/C). У латеральній і дистальній зонах черешка виявлялася тенденція до збільшення об'ємних показників цитоплазми.



**Рис. 2. Гормональна індукція калюсогенезу в тканинах експланта осики зеленокорої *in vitro* (фарбування водним синім та сафраніном)**

Установлено, що характер просторової орієнтації клітин у тканинах калюсу мав значні варіації від безструктурної маси нерегулярно розташованих клітин до чітко організованих прошарків клітин із синхронізованими у часі клітинними циклами. Клітини епідермісу в базальній калюсогенній зоні черешка поступово лігніфікувалися, їх клітинні оболонки ставали товстішими. Внаслідок нерівномірного відкладення біополімерів на внутрішніх стінках і активної проліферації клітин кори, епідерма піддавалася облітерації, а її клітини просочувалися суберином і втрачали протопласт, що є проявом захисної реакції органу на травматичне пошкодження.

У калюсі корової зони було виявлено формування морфогенних структур. За принципом організації первинні морфогенні структури мали типові тканинспецифічні ознаки, характерні для адвентивних коренів (рис. 3).



**Рис. 3. Ініціація формування та розвитку адвентивного кореня в калюсі осики зеленокорої в умовах *in vitro*:**

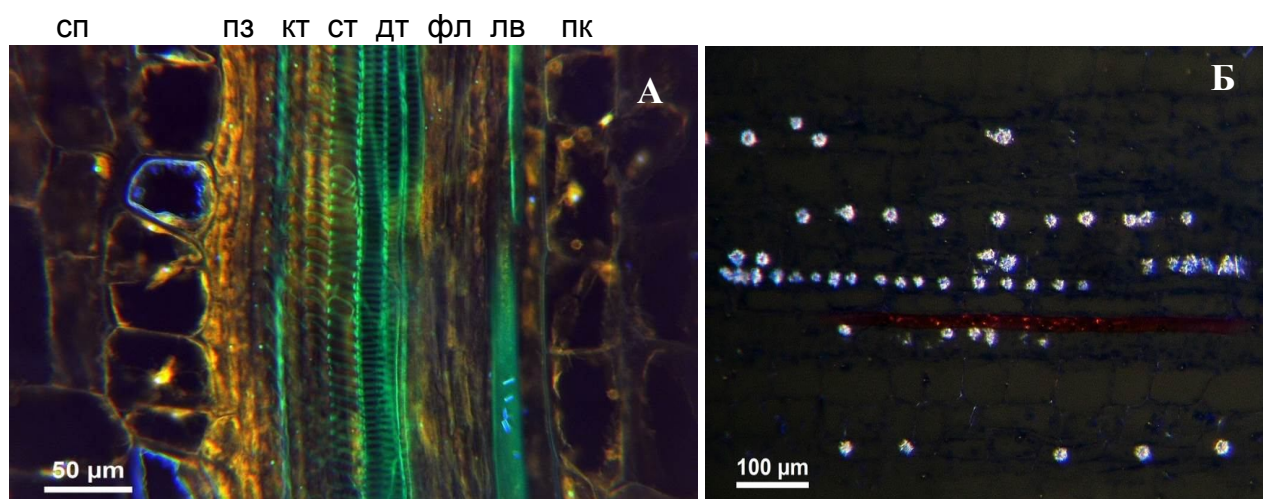
А – з дистальної зони черешка листка, Б – у базальній частині черешка (стрілками позначено формування протодерми в зачатку кореня, фарбування водним синім і сафраніном).

У калюсі черешків також виявили гормональну індукцію диференціації і спеціалізації паренхімних клітин у трахеальні елементи (гідроцити). У калюсах вони були значно коротшими за трахеїди стебла і черешків. У васкулярній системі гідроцити представлені елементами з кільчастими, спіральними та дробинчастими потовщеннями, які дають яскраву флуоресценцію у зеленому спектрі.



В умовах *in vitro* відзначено значне збільшення загальної кількості ідіобластів, які містять фенольні сполуки, флобафени не розчинні в етиловому спирті, бутанолі і ксилолі (рис. 4).

Окрім того, в тканинах черешків, що знаходилися в умовах гетеротрофного живлення *in vitro*, спостерігали активізацію процесу відкладення оксалату кальцію у вигляді сферичних друз розміром 18-25 мкм. Солі кальцію накопичувалися, переважно, у клітинах паренхіми кори уздовж волокон. Дослідження тканин методом темного поля показали, що у звичайних умовах у протопластах ідіобластів формується один сферичний кристал. Проте в культурі *in vitro* кількість друз збільшується до двох-трьох.



**Рис. 4. Відкладення продуктів вторинного метаболізму в тканинах черешка *P. tremula* зеленокорі форми:**

А – інвертоване зображення фрагмента черешка листка; Б – друзи оксалату кальцію, що виявляються методом темного поля: СП – серцевинна паренхіма; ПЗ – перимедулярна зона; КТ – кільчасті трахеїди; СТ – спіральні трахеїди; ДТ – дробинчасті трахеїди; ФЛ – флоема; ЛВ – луб’яне волокно; ПК – паренхіма кори

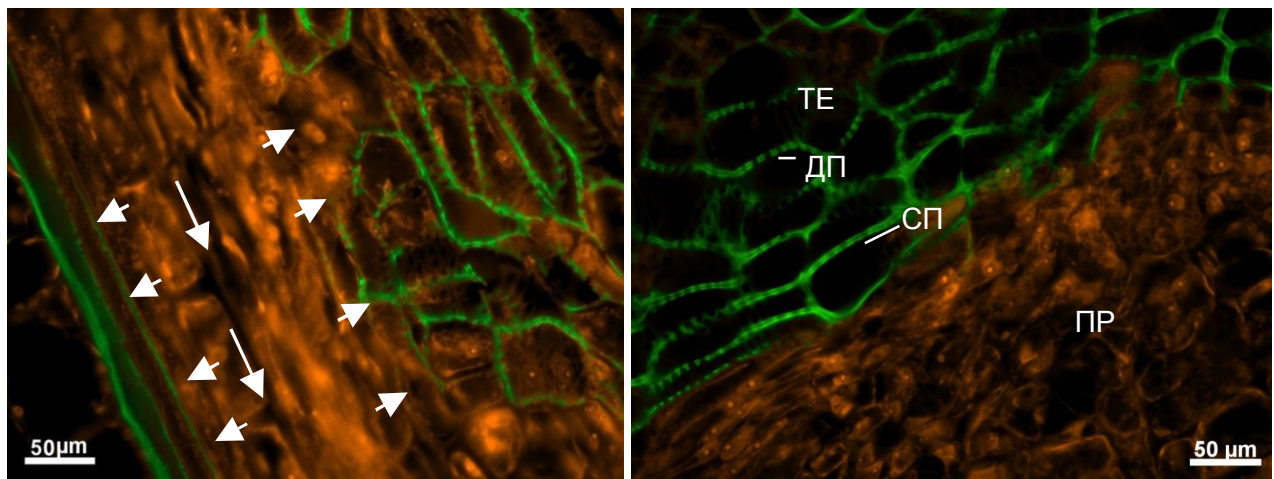
Підвищення загальної кількості відкладень органічних сполук кальцію може бути пов’язано з активною дегідратацією аскорбінової кислоти до дегідроаскорбінової з подальшим розкладанням останньої до щавлевої кислоти. Відомо, що підвищення її концентрації в клітинах токсично для рослинного організму, тому нейтралізація щавлевої кислоти кальцієм – важливий механізм нормалізації фізіологічних процесів в умовах клітинного стресу.

Відкладення кальцію також зафіксовано у луб'яних волокнах, проте в цих структурах вони представлені рафідами (поодинокими призматичними кристалами). У темному полі кристали виявляються через яскраве світіння. Незначні відкладення оксалату кальцію у формі невеликих кристалів також знайдені у міжклітинниках паренхіми кори.

У калюсогенній зоні черешка інтенсивна проліферація клітин супроводжувалась їх розтягненням, здерев'янінням і формуванням вторинних потовщень у вигляді пор від супротивних до чергових, що не характерно для трахеїд черешка, у яких пори зазвичай розташовані лише супротивно. Варто відзначити, що трахеальні елементи, які утворилися з клітин калюсу, не мали вираженої прозенхимної будови. Їх розташування у тканині дещо хаотичне і має характер нагромадження, що, безумовно, надто ускладнює здатність трахеїд виконувати транспортні функції.

Відомо, що процес ксилогенезу значною мірою регулюється гормонами ауксинової природи. Регулятори росту посилюють розтягнення клітин і підвищують активність кислих пероксидаз, які беруть участь у формуванні вторинних клітинних стінок, зшиванні монолігнолів і утворенні компонентів М-лігніну.

Розтягнення клітин супроводжується синтезом і відкладенням на клітинних стінках калози та лігніну. Локалізація калози виявляється аніліновим синім, який має здатність до флуоресценції з максимумом емісії у зеленому спектрі. За інтенсивністю флуоресценції в тканинах чітко визначається просторова детермінованість синтезу  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкану, яка може бути пов'язана з особливостями базипітального транспорту регуляторів росту від тканин мезофілу клітинами флоєми і далі латерально до суміжних тканин первинної кори, у тому числі екстраксіялярних волокон і ксилеми (рис. 5).



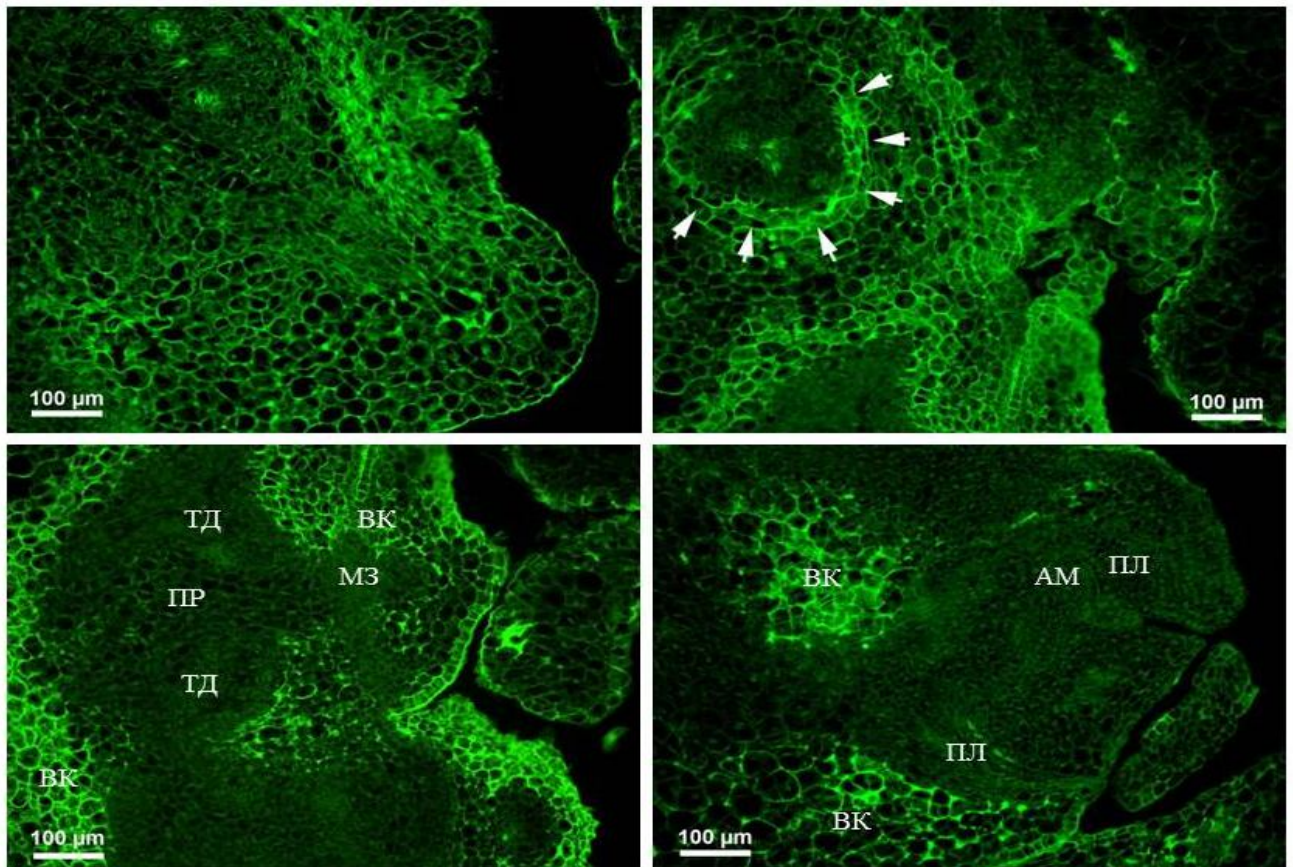
**Рис. 5. Диференціація клітин у калюсі черешка осики зеленокорі:**

А – відкладення калози у клітинних стінках екстраксиллярних волокон і трахеальних елементів під впливом 2,4-Д (фарбування аніліновий синім) (стрілками позначені напрямки переміщення екзогенних регуляторів росту); Б – гормональна індукція розтягнення клітин у калюсі черешка: ТЕ – трахеальні елементи; СП – супротивні пори; ДП – дробинчасті пори; ПР – паренхіма з активною проліферацією клітин

Інтенсивність флуоресценції полісахариду навколо меристемоїдних осередків зазвичай однакова. Цей факт може свідчити, що активізація ферментного комплексу, відповідального за синтез калози, регулюється з одного центру, яким може бути група клітин, із специфічними регуляторними властивостями.

Запуск процесу утворення калози може бути індукований екстрацелюлярними молекулярними сигналами, які ініціальна група клітин синтезує та виділяє в навколишній міжклітинний простір. Подальший розвиток і диференціація клітин супроводжується утворенням функціонально специфічних зон: меристемоїдів, які започатковують утворення первинних метамерів, характерних для адвентивних бруньок, провідних тканин, що складені трахеально-подібними елементами та паренхімних структур (рис. 6., А, Б), які виконують запасну та буферну функції.





**Рис. 6. Формування промеристемоїдних зон в тканинах калюсу *P. tremula*:**

ТД – трахеїди; ВК – відкладання калози та лігніну; МЗ – меристемоїдна зона; ПР – проваскулярна зона; АМ – апікальна меристема; ПЛ – примордій листочка

У морфогенних калюсах адвентивні бруньки закладаються на його поверхні. Апікальна меристема має в діаметрі 50-70 мкм. Примордії листків закладаються почергово та синхронно. Перші листкові примордії складені паренхіматозними клітинами. Наступні метамери листків анатомічно є типовими для рослин *P. tremula*. Отже, структурна організація перших вегетативних органів після проходження рослини через дедиференціацію клітин, формування апікальних меристем, мають ознаки аномального розвитку, тератологічних вад, котрі від метамеру до метамеру поступово зникають. Вегетативні органи ювенільної рослини, одержаної методом непрямого морфогенезу, мають типову для окремого виду морфо-анатомічну будову, розвинуту кореневу систему, нормальне стебельце і листки.

**Висновки.** Таким чином, цитологічні і анатомо-гістохімічні дослідження калюсних тканин *P. tremula* зеленокорої форми показали, що формування

рослин-регенерантів шляхом непрямого морфогенезу пов'язано з послідовним проходженням експлантів через стадії: дедиференціації тканин і утворення паренхіматозного калюсу; просторової ізоляції окремих груп клітин калюсу через відкладення на їх клітинних стінках біополімерів (калози, лігніну, суберину); виділення ініціальної промеристемної групи клітин; розвиток меристемоїдів і трансформацію клітин в елементи васкулярної системи та основної паренхіми; формування адвентивних бруньок в осередку клітин калюсної тканини; корекції морфогенезу зачатків аксиальних органів; росту і розвитку ювенільного пагона та формування індивідуальної кореневої системи; утворення життєздатного соматичного клону рослини.

### Список літератури

1. Андреева В. А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений / Андреева В. А. – М. : Наука, 1988. – 128 с.
2. Білоус С. Ю. Особливості калюсогенезу *Populus tremula* L. в культурі *in vitro* / С. Ю. Білоус // Збірник науково-технічних праць. – Львів : РВВ НЛТУ України. – 2012. – Вип. 22.10. – С. 19-25.
3. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Бутенко Р. Г.– М. : Наука, 1964. – 272 с.
4. Горшкова Т. А. Растительная клетка как динамическая система / Горшкова Т. А. – М. : Наука, 2007. – 429 с.
5. Катаева Н. В. Клональное микроразмножение растений / Н. В. Катаева, Р. Г. Бутенко. – М. : Наука, 1983. – 96с.
6. Кушнір Г. П. Мікроклональне розмноження рослин, теорія і практика / Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька. – К. : Наук. думка, 2005. – 270 с.
7. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин: підр. [для студ. агробіол. та біолог. спец., наук., викл., асп.] / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак. В. А. Кунах. – К. : Поліграфконсалтинг, 2003. – 520 с.

8. Мельничук М. Д. Процеси калусоутворення та органогенезу в культурі *in vitro* гібриду тополі / М. Д. Мельничук, А. П. Пінчук, В. М. Маурер. – К. : Аграрна освіта і наука, 2004. – Т.5, № 1 – 2. – С. 8–13.

9. Мусієнко М. М. Біотехнологія рослин: Навчальний посібник / М. М. Мусієнко, О. О. Панюта. – К. : ВПЦ «Київський університет», 2005. – 114 с.

10. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений / Паушева З. П. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Агропромиздат, 1988. – 271 с.

11. Полевой В. В. Физиология растений: учеб. для биол. спец. Вузов / Полевой В. В. – М. : Высш. шк., 1989. – 464 с.

12. Фурст Г. Г. Методы анатомо-гистохимического исследования растительных тканей / Фурст Г. Г. - М. : Наука, 1979. – С. 40-65.

13. Bilous S. The features indirect morphogenesis of aspen (*Populus tremula* L.) green-bark form / S. Bilous // Miskininkyste. – 2013, 1 (73). – P. 45–51.

14. Murashige T.A revised medium for rapid, growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Scoog // *Physiol. plantarum.* – 1962. – Vol. 15, N. 3. – P. 473.

15. Kauss H. Callose synthesis // *Membranes: Specialized Functions in Plants.* – Guildford : Bios Sci. Publ., 1996. – P. 77–92.

16. Woodward S., Pegg G.F. Rishitin accumulation elicited in resistant and susceptible isolines of tomato by mycelial extracts and filtrates from cultures of *Verticillium albo-atrum* // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1986. – 29. – P. 337–347.

*Исследовано влияние экзогенных гормональных стимулов на ткани листьев Populus tremula L. in vitro и определена специфика инициации непрямого морфогенеза, который происходит через начальную дедифференциацию тканей с образованием паренхиматозного каллуса и его последующей кластеризации на гетерогенные зоны из-за образования гистохимических барьеров. Выяснено, что морфогенез в каллусных культурах Populus tremula L. синхронизирован с отложениями каллозы, изолирующие*

группы промеристемных клеток, тем самым повышая их автономность и пространственную упорядоченность с последующим образованием меристемоидных тканевых структур.

**Ключевые слова:** *Populus tremula L.*, каллус, клетка, морфогенез, каллоза, лигнин, дифференциация, *in vitro*.

*The effect of exogenous hormonal stimulus fabric leaves Populus tremula L. in vitro was research and determined the specificity of the initiation of indirect morphogenesis that occurs through initial dedifferentiation parenchymatous tissue to form callus and its subsequent clustering on heterogeneous areas through the creation of histochemical barriers. It is shown that morphogenesis in callus cultures of Populus tremula L. synchronized with deposits of callose that isolate groups promeristematic cells , thus increasing their autonomy and spatial ordering of the subsequent formation meristemoid tissue structures.*

**Keywords:** *Populus tremula L.*, callus, cell, morphogenesis, callose, lignin, differentiation, *in vitro*.