

УДК 60:57.085.2:582.623.2

Асист. С.Ю. Білоус, канд. біол. наук –  
 НУ біоресурсів і природокористування України, м. Київ

**ПРЯМИЙ ОРГАНОГЕНЕЗ *POPULUS TREMULA* L. З РІЗНИХ ТИПІВ  
 ЕКСПЛАНТІВ *IN VITRO***

Досліджено особливості індукції прямої регенерації тканин *P. tremula* залежно від генотипу, типу експланту та умов культивування *in vitro*. З'ясовано шляхи реалізації морфогенетичного потенціалу мікропагонів *P. tremula*. Розроблено підходи до мікролонального розмноження осики зеленокорої форми. Встановлено оптимальні складові живильного середовища з додаванням 0,25-0,5 мг·л<sup>-1</sup> кінетину, тіазаурону та активованого вугілля, що забезпечили повну реалізацію морфогенетичного потенціалу експлантів з утворенням укорінених рослин та можливістю довгострокового пасажування *P. tremula* в умовах *in vitro*.

**Ключові слова:** *Populus tremula* L., *in vitro*, живильне середовище, експлант, морфогенез, регулятори росту.

**Вступ.** Нині використання екзогенних гормональних регуляторів росту рослин (РРР) є одним з основних підходів для отримання рослин-регенерантів *in vitro*. Для запобігання структурним і функціональним змінам геному й отримання генетично-ідентичного рослинного матеріалу доцільно індукувати пряму регенерацію безпосередньо тканинами експланту. Визначальну роль у процесі диференціації та морфогенезу ізолюваних тканин та органів відіграють не лише генотипові й видові особливості але й гормональний баланс, співвідношення цитокінінів та ауксинів у складі живильного середовища (ЖС) [3]. Утворення адвентивних бруньок можливо досягнути практично з кожного органа чи тканини рослини, шляхом активації вже наявних у рослині меристем, заснованому на знятті апікального домінування, та в цьому випадку, кількість утворених мікропагонів залежатиме від генотипу рослини [5].

Першою роботою з вивчення дії фітогормонів як індуктора органогенезу в культурі тканини були роботи Скуга та ін. [4, 7]. У дослідженнях з впливу фітогормонів ауксинів і цитокінінів на розвиток експлантів у культурі *in vitro* вони показали, що залежно від співвідношення гормонів у ЖС спостерігалось утворення пагонів, коренів або калусної тканини. Тканини різних видів рослин відрізняються вимогами щодо конкретних концентрацій фітогормонів для індукції органогенезу. Напевно, основною причиною відмінностей морфогенезу *in vitro* при використанні екзогенних гормонів є наявність у тканинах ендогенних гормонів. Так, для тканин з високим вмістом цитокінінів додавання до середовища додаткових цитокінінів призводить до інгібування розвитку бруньок і органогенезу. У такому випадку органогенез відбуватиметься за відсутності цитокінінів. Підтвердженням цього є робота Арнольда та Еріксона [10].

**Мета дослідження** – визначити залежність ефективності регенерації органогенезу осики від концентрації у ЖС регуляторів росту цитокінінового типу дії та типу експланту для тривалого, масового культивування ізолюваних бруньок і мікропагонів осики шляхом прямого морфогенезу.

**Матеріали та методи.** Об'єктом досліджень слугували зразки осики зеленокорої форми. У процесі культивування використовували ЖС МС [8], Wood Plant Medium (WPM) [9] та Драйвера (DKW) [7] з додаванням до їхнього складу

різних груп цитокінінів 6-БАП, ТДЗ та кінетину як окремо, так і комбінуючи між собою. Додатково до середовища додавали активоване вугілля (1 г·л<sup>-1</sup>), в якості вуглеводневого живлення сахарозу (30 г·л<sup>-1</sup>), мезоінозит (100 мг·л<sup>-1</sup>) та агар (0,7 %), рН середовища 5,6-5,7.

Для деревних культур синтетичний аналог цитокініну ТДЗ у низьких концентраціях ефективніший порівняно з традиційними похідними пуринів, оскільки стимулює ріст через власну біологічну (цитокінінову) активність, здатний інтенсифікувати синтез і нагромадження ендогенних цитокінінів, що неодноразово підтверджено дослідженнями різних авторів [1, 6, 10]. На основі цих даних проведено дослідження гормонального впливу 6-БАП, кінетину та ТДЗ на ріст та розвиток експлантів осики в культурі *in vitro* на ЖС за прописом МС, DKW та WPM.

Для індукції регенерації листкової (розміром 1-1,5 см<sup>2</sup>), стеблові та кореневі (довжиною 1-1,5 см) експлантати, отримані від асептичних рослин на Б-ЖС, культивували на запропонованих нами морфогенних живильних середовищах (М-ЖС) з додаванням різної концентрації (БАП, ТДЗ, кінетин) протягом 30 діб (табл. 1). Висаджували від 5 до 15 експлантів кожного варіанта, щонайменше в трьох повторностях. Отримані дані опрацьовано статистично. Визначали ефективність регенерації відсоток регенерації (ВР), середню довжину регенерантів (СДР) та середню кількість регенерантів (СКР) у розрахунку на один експлант з регенерантами [2]. Результати дослідження та їх обговорення. Внаслідок проведеного експерименту встановлено, що утворення мікророслин відбувалось під дією регуляторів росту, які додавали до основного живильного середовища МС, DKW та WPM.

**Табл. 1. Вплив концентрацій цитокінінів на пагоноутворення у листкових та корневих експлантів *Populus tremula* L.**

М-ЖС	Гормон, мг·л <sup>-1</sup>	Кількість експлантів з регенерантами, шт.	ВР, %	СКР, шт.	ЕР	СДР, см	Наявність калусу на експланті	Характеристика пагона
Листкові експланти								
МС 1	0,2 ТДЗ	15	50,0 <sup>±1,0</sup>	7,0	3,5	0,5 <sup>±0,2</sup>	+++	зелений
МС 2	0,4 ТДЗ	10	33,3 <sup>±1,5</sup>	5,3	1,8	0,3 <sup>±0,1</sup>	+++	зелений
МС 3	0,5 ТДЗ	12	40,0 <sup>±2,6</sup>	6,1	2,4	0,3 <sup>±0,1</sup>	+++	зелений
Кореневі експланти								
МС 13	0,5 КІН	6	60,0 <sup>±1,0</sup>	1,7	1,0	2,0 <sup>±0,7</sup>	–	зелений
МС 14	0,25 КІН	4	40 <sup>±1,5</sup>	1,5	0,6	1,8 <sup>±0,5</sup>	–	зелений
МС 3	0,5 ТДЗ	0	0	0	0	0	+	–
МС 6	1,0 ТДЗ	0	0	0	0	0	++	–

Так, індукція органогенезу й утворення морфогенних структур відбувалась на 18 варіантах живильних середовищ, проте позитивні результати отримано лише в окремих випадках, що свідчить про різний морфогенетичний потенціал клітин експланту.

Кореневі експланти на ЖС з ТДЗ (0,5-1,0 мг·л<sup>-1</sup>) через 1,5 тижні утворювали щільну калусну тканину, в якій в подальшому не виявлено утворення морфогенних структур. Лише на ЖС МС-13 та МС-14 кореневі експланти мали ВР

60,0<sup>±1.0</sup> % та 40,0<sup>±1.5</sup> % відповідно. Водночас СКР на ЖС МС-13 також був більший від 1,7 співвідношення регенерант/експлант (рис. 1). На відміну від корневих експлантів листкові мали дещо менший ВР, і в їхньому випадку максимальний 50,0<sup>±1.0</sup> % на ЖС МС-1 з додаванням 0,2 мг·л<sup>-1</sup> ТДЗ. Водночас СКР була більшою, ніж у корневих експлантів 7,0 регенерант/експлант.



Рис. 1. Пряма індукція рослин-регенерантів осики *Populus tremula L.* з корневих експлантів: 1, 2) ініціація пагоноутворення та ризогенезу на корневих експлантах; 3) повноцінні рослини-регенеранти з корневих експлантів з вираженим морфогенним потенціалом

Одночасно з пагоногенезом на листкових експлантах відбувався інтенсивний калюсогенез на всіх варіантах ЖС із вмістом ТДЗ (0,2-0,5 мг·л<sup>-1</sup>). Сформований калюс мав світло-зелене забарвлення та наявні морфогенні зони, які за сприятливих умов культивування утворювали рослини-регенеранти осики (рис. 2).

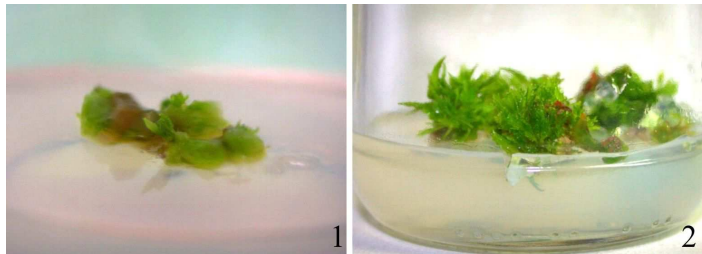


Рис. 2. Пряма індукція мікропагонів з листкових експлантів осики *Populus tremula L.*: 1) ініціація утворення мікропагонів; 2) формування множинних мікропагонів осики

За даними експерименту, на стеблових експлантах у більшості випадків спостерігали пагоногенез, інколи калюсогенез та ризогенез. Так, на ЖС з додаванням у високих концентраціях цитокиніну 6-БАП – 1,0-2,0 мг·л<sup>-1</sup> негативно впливало на стеблові експлантати на всіх живильних середовищах, про що свідчить низький ВР, 26,7<sup>±0.6</sup> % та 46,7<sup>±0.6</sup> % (табл. 2).

Культивування експлантатів на середовищі з кінетином 0,5 мг·л<sup>-1</sup> спричиняло розвиток з меристем бруньок незначної кількості пагонів та додаткових бруньок, що характеризувались уповільненим розвитком, СДР – 2,6<sup>±0.8</sup> см (місячний приріст становив 0,5-1,0 см), СКР сягав 3,5. Використання 0,25 мг·л<sup>-1</sup> кінетину сприяло утворенню мікропагонів, ВР сягав 86,7<sup>±1.0</sup> % (рис. 3).

Табл. 2. Вплив концентрації цитокинінів на пагоноутворення у стеблових експлантів *Populus tremula L.*

М-ЖС	Гормон, мг·л <sup>-1</sup>	Кількість експлантів з регенерантами, шт.	ВР, %	СКР, шт.	ЕР	СДР, см	Наявність калюсу на експланті	Характеристика пагона
МС 1	0,2 ТДЗ	11,0	73,3 <sup>±0,6</sup>	2,2	0,1	2,0 <sup>±0,2</sup>	+++	зелений
МС 2*	0,4 ТДЗ	14,0	93,3 <sup>±0,6</sup>	2,0	1,9	1,4 <sup>±0,4</sup>	++	зелений
МС 3*	0,5 ТДЗ	15,0	100,0 <sup>±0,0</sup>	9,6	9,6	2,5 <sup>±0,6</sup>	–	зелений
МС 4*	0,6 ТДЗ	12,0	80,0 <sup>±1,0</sup>	1,9	1,5	1,2 <sup>±0,7</sup>	–	зелений
МС 5*	0,8 ТДЗ	9,0	60,0 <sup>±1,0</sup>	1,2	0,7	1,8 <sup>±0,8</sup>	–	зелений
МС 6*	1,0 ТДЗ	8,0	53,3 <sup>±1,3</sup>	1,1	0,6	1,7 <sup>±0,7</sup>	–	зелений
МС 7*	1,5 ТДЗ	6,0	40,0 <sup>±1,0</sup>	1,0	0,4	1,0 <sup>±0,3</sup>	–	св. зелений
МС 8*	2,0 ТДЗ	3,0	20,0 <sup>±1,0</sup>	1,0	0,2	0,7 <sup>±0,3</sup>	–	св. зелений
МС 9*	2,5 ТДЗ	1,0	6,7 <sup>±0,6</sup>	2,0	0,1	0,3 <sup>±0,0</sup>	–	св. зелений
МС 10	0,5 БАП	8,0	53,3 <sup>±0,6</sup>	1,0	0,5	2,1 <sup>±0,7</sup>	–	зелений
МС 11	1,0 БАП	4,0	26,7 <sup>±0,6</sup>	1,0	0,3	0,4 <sup>±0,1</sup>	–	св. зелений
МС 12	2,0 БАП	7,0	46,7 <sup>±0,6</sup>	1,1	0,5	0,9 <sup>±0,3</sup>	+	св. зелений
МС 13	0,5 КІН	12,0	80,0 <sup>±1,2</sup>	3,4	2,7	2,2 <sup>±0,8</sup>	–	зелений
МС 14	0,25 КІН	13,0	86,7 <sup>±1,0</sup>	3,5	3,0	2,6 <sup>±0,8</sup>	–	зелений
DKW 15	0,5 БАП	5,0	33,3 <sup>±0,6</sup>	1,0	0,3	1,3 <sup>±0,6</sup>	–	св. зелений
DKW 16	1,0 БАП	3,0	20,0 <sup>±1,0</sup>	1,0	0,2	0,6 <sup>±0,3</sup>	–	св. зелений
DKW 17	2,0 БАП	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	–	св. зелений
WPM 18	0,5 БАП	5,0	33,3 <sup>±1,2</sup>	1,6	0,5	1,2 <sup>±0,3</sup>	–	св. зелений
WPM 19	1,0 БАП	3,0	20,0 <sup>±1,0</sup>	1,0	0,2	1,5 <sup>±0,4</sup>	–	св. зелений
WPM 20	2,0 БАП	0	0	0	0	0	+	св. зелений

\*ПС з додаванням 1 г·л<sup>-1</sup> активованого вугілля.

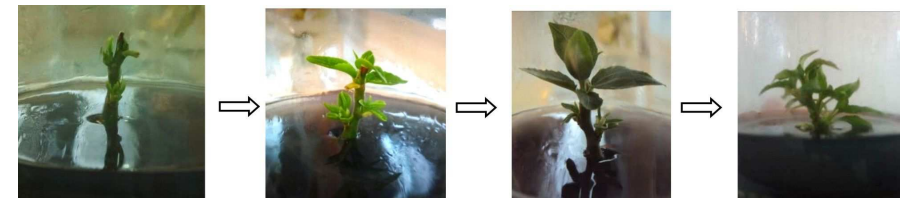


Рис. 3. Динаміка утворення мікропагонів на стеблових експлантах осики *Populus tremula L.* (протягом трьох тижнів)

У процесі досліджень встановлено, що висока концентрація цитокиніну ТДЗ, така як 1,5-2,5 мг·л<sup>-1</sup>, негативно впливала на експлантати. Спостерігали пригнічення їхнього росту, відсутність пагоноутворення. Експлантати мали вигляд стебла з бруньками, які не встигли розвинути у пагони, деякі рослини відзначались почервонінням листків та їх опаданням. Це явище характерне під час використання тїдіазурону [10, 11].

У разі 0,2 мг·л<sup>-1</sup> ТДЗ (МС-1) на стеблових експлантах одночасно з ініціацією пагоноутворення відбувалась індукція калюсної тканини в базальній частині, згодом весь експлант був покритий калюсом. Високу морфогенну здатність, максимальний приріст рослин-регенерантів, збільшення кількості міжвузлів та формування потужної кореневої системи відзначали на живильному середовищі з додаванням 0,4-0,5 мг·л<sup>-1</sup> ТДЗ, ВР 100,0<sup>±0.0</sup> (рис. 4).



**Рис. 4. Морфогенез мікропагонів зі стеблових експлантів *Populus tremula* L. на ЖС з різним співвідношенням РР: 1) МС + 0,5 мг·л<sup>-1</sup> ТДЗ; 2) МС + 0,2 мг·л<sup>-1</sup> ТДЗ; 3) МС + 0,5 мг·л<sup>-1</sup> ТДЗ; 4) МС + 0,25 мг·л<sup>-1</sup> кінетину**

Найінтенсивніше пагоноутворення зафіксоване на ЖС з додаванням низьких концентрацій гормонів цитокинінового типу дії з додаванням 0,4-0,5 мг·л<sup>-1</sup> ТДЗ та 0,25 мг·л<sup>-1</sup> кінетину (МС-2, МС-3, МС-14) СКР 5,2 для МС-3 та 3,5 – МС-14. Далі дані ЖС позначатимемо як ЖС-М.

Живильні середовища DKW та WPM з додаванням БАП характеризувались незначним пагоноутворенням. Максимальний показник отримано з додаванням 0,5 мг·л<sup>-1</sup> БАП 33,3<sup>±0,6</sup> % та 33,3<sup>±1,2</sup> % відповідно. Водночас експланти відзначались пригніченням росту, пожовтінням та почервонінням листків, відсутністю пагоноутворення. Внаслідок цього вказані прописи ЖС у подальших дослідженнях як основу для створення модифікованих середовищ для вирощування та культивування експлантів осики не використовували.

На наступному етапі сформовані мікропагони від різних типів експлантів відділяли та переносили на свіже М-ЖС з додаванням 0,5 мг·л<sup>-1</sup> ТДЗ для чергової мультиплікації впродовж тривалого часу, але тривале культивування рослин-регенерантів на М-ЖС з додаванням ТДЗ ефективно лише протягом 3-4 пасажів тому, що в клітинах експлантів відбувається нагромадження гормонів, що призводило до пригнічення росту та зменшення коефіцієнта регенерації. Через це наступне культивування тканин проводили на Б/Г ЖС за прописом МС, або з додаванням 0,25 мг·л<sup>-1</sup> кінетину. Адже рослинні тканини внаслідок стимулювання ростових чинників гормональною дією та індукцією морфогенетичного потенціалу тканин експланту, продовжували свій ріст та розвиток з високим коефіцієнтом регенерації (1:10).

**Висновки.** Отже, попередні дослідження дали змогу розробити підходи до мікроклонального розмноження осики зеленокорі форми. Вдалося з'ясувати, що органогенез у культурі бруньок осики залежить від віку рослини-донора, пори року, кількісного та якісного співвідношення регуляторів росту в ЖС. Основною причиною розроблення методів є необхідність індивідуального добору живильного середовища для культивування різних експлантів на кожному наступному етапі мікроклонального розмноження. Оптимальним є варіант використання живильного середовища з таким складом: 0,25 мг·л<sup>-1</sup> кінетину + 1 г·л<sup>-1</sup> активованого вугілля та 0,5 мг·л<sup>-1</sup> ТДЗ + 1 г·л<sup>-1</sup> активованого вугілля, які забезпечують не тільки індукцію органогенезу, але повну реалізацію морфогенетичного потенціалу експлантату з утворенням укорінених рослин.

## Літератури

1. Бульчєва Н.В. Изучение влияния сочетаний фитогормонов на каллусообразование и регенеративную способность тополя *Populus populus* ssp. / Н.В. Бульчєва, А.М. Каминская, К.Г. Скрыбин // Биотехнология: состояние и перспективы развития : матер. Междунар. моск. трет. конгр., 14-18 марта, 2005 г. : тез. докл. – М., 2005. – Ч. 1. – С. 234.
2. Конвалюк І.І. Прямий органогенез *in vitro* тирличу жовтого (*Gentiana Lutea* L.) / І.І. Конвалюк, Н.Б. Кравець, Н.М. Дробик та ін. // Биотехнологія : журнал. – К. : Вид-во Ін-ту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. – 2010. – Т. 3, № 5. – С. 66-73.
3. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин, теорія і практика / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. – К. : Вид-во "Наук. думка", 2005. – 270 с. (73).
4. Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.З. Кочиева и др. – Изд. 3-е. [перераб. и доп.]. – М. : Изд-во "Высш. шк.", 2008. – 710 с.
5. Ahuja M.R. Aspen. In: Evans DA, Sharp WR and Ammirato PJ (Eds.) Handbook of Plant Cell Culture / M.R. Ahuja / Macmillan Publishing Company. – New York, 1986. – Pp. 626-651.
6. Aubakirova L. Application of cellular biotechnology for storage of aspen biodiversity (*Populus tremula* L.) / L. Aubakirova, E. Kalashnikova / International journal of agriculture: Research and review. – 2011. – Vol. 1 (1). – Pp. 16-20.
7. Driver J.A. In vitro propagation of Paradox walnut root stock / J.A. Driver, A.H. Kuniyuki // HortScience. – 1984. – Vol. 19. – Pp. 507-509.
8. Murashige T. A revised medium for rapid, growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F.A. Scoog // Physiol. plantarum. – 1962. – Vol. 15. – № 3. – Pp. 473-497.
9. McCown B.H. Woody plant medium (WP 14) – a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species / B.H. McCown, G.B. Lloyd // Ibid. – 1981. – Vol. 16. – Pp. 453.
10. Pijut P.M. Micropropagation of *Juglans cinerea* L. (Butternut) / P.M. Pijut // Biotechnology in agriculture and forestry. – Berlin : Springer-Verlag. – 1997. – Vol. 39. – Pp. 345-357.
11. Tsvetkov I. Thidiazuron-induced regeneration in root segments of white poplar (*P. alba* L.) / I. Tsvetkov, J.F. Hausman, L. Jouve // Bulg. J. Agric. Sci. – 2007. – № 13. – Pp. 623-626 p.

### **Билоус С.Ю. Прямой органогенез *Populus tremula* L. из разных типов эксплантов *in vitro***

Исследованы особенности индукции прямой регенерации тканей *P. tremula* в зависимости от генотипа, типа экспланта и условий культивирования *in vitro*. Установлены пути реализации морфогенетического потенциала микропагонов *P. tremula* с образованием укоренившихся растений. Разработаны подходы к микроклональному размножению осины зеленокорой формы. Установлены оптимальные составляющие питательной среды с добавлением 0,25-0,5 мг·л<sup>-1</sup> кинетина, тидиазурона и активированного угля, которые обеспечили полную реализацию морфогенетического потенциала эксплантов с образованием укоренившихся растений и возможностью долгосрочного пасирования *P. tremula* в условиях *in vitro*.

**Ключевые слова:** *Populus tremula* L., *in vitro*, питательная среда, эксплант, морфогенез, регуляторы роста.

### **Bilous S.Yu. The Direct Organogenesis of *Populus Tremula* L. from Different Types of Explants *in Vitro* Culture**

The features of direct induction of tissue regeneration of *P. tremula* depending on genotype, type of explants and culture conditions *in vitro* were researched. The ways of implementation of the morphogenetic potential of microshoots *P. tremula* to form rooted plants were established. Some approaches to microclonal reproduction of aspen were elaborate. The optimal components of the culture medium with the addition of 0.25-0.5 mg·l<sup>-1</sup> kinetyn, thidiazuron and activated carbon, which provided the full realization of morphogenetic potential to form explants rooted plants and the possibility of long-term cultivation *P. tremula* in conditions *in vitro* are sampled.

**Keywords:** *Populus tremula* L., *in vitro*, the culture medium, explants, morphogenesis, growth regulators.