

**НЕПРЯМИЙ МОРФОГЕНЕЗ ТА РЕГЕНЕРАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ
ТКАНИН ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ**

УДК 581.1/4:

582.711.712

Article info

Received 21.02.2017

О. О. Олійник*НУ біоресурсів і природокористування України, м. Київ, Україна*

Унаслідок проведених досліджень отримано морфогенну калюсну культуру троянди ефіроолійної сорту Лань. Встановлено, що вдвічі активніше калюс починає утворюватись на частинах листової пластинки, ніж на частинах пагонів. Проаналізовано вплив регуляторів росту ауксинового та цитокінінового типів дії на формування калюсних тканин. Активне наростання калюсних тканин відбувається на живильному середовищі МС з половинним вмістом макро- та мікросолей, 0,150 мг/л ТДЗ та 0,05 мг/л НОК. Показано просторову організацію і гістогенез морфогенних структур на досліджуваних калюсних зразках.

Ключові слова: калюс, троянда ефіроолійна, культура *in vitro*, регулятори росту.

Вступ. Перші роботи щодо калюсної культури троянди ефіроолійної були пов'язані з перспективою створення клітинних технологій для отримання ароматичних речовин з біомаси культивованих клітин (Rubcova, 2009). Калюсну культуру було отримано внаслідок використання як експлантати пелюсток троянди ефіроолійної сортів Кримська червона і Мічурінка. Калюсні клітини зберігали здатність до біосинтезу ефірної олії, склад якого залежав від генотипу рослини-донора і його фізіологічного стану. Подальші дослідження в цьому напрямку показали, що нагромадження ефірної олії в калюсних культурах залежало від складу живильного середовища, і в насамперед, від концентрації і співвідношення фітогормонів.

Інший аспект використання калюсних культур троянди – отримання рослин-регенерантів і соматональних варіантів. Для низки декоративних сортів вдалося показати можливість індукції калюсогенезу в разі використання як експлантати листових дисків і стеблових сегментів (Rubcova, 2009). Разом з тим ці дослідження не призвели до вирішення кінцевого завдання – отримання рослин-регенерантів. Цей напрямок роботи для троянди ефіроолійної також є досить перспективним, оскільки дає змогу використовувати біотехнологічні підходи до створення вихідного матеріалу для селекції. Однак для їх реалізації потрібно вирішити цілу низку методичних питань, пов'язаних з отриманням морфогенних калюсних культур і рослин-регенерантів. У попередніх дослідженнях встановлено, що серед досліджуваних сортів троянди ефіроолійної української селекції Лань, Лада та Райдуга найкращі показники адаптації до умов *in vitro* (Oliynyk et al., 2016a), регенеративної здатності (Oliynyk, Kluvadenco, & Melnychuk, 2016) та наймен-

шим вмістом фенольних сполук у тканинах (Oliynyk et al., 2016b) характеризувався сорт Лань. Тому **мета цієї роботи** – отримати морфогенний калюс троянди ефіроолійної сорту Лань та формування рослин-регенерантів з калюсної тканини.

Матеріали та методи дослідження. Для досліджень використовували троянду ефіроолійну української селекції сорту Лань.

Для отримання калюсної тканини використовували стерильні листові пластинки ($S=0,40-0,50 \text{ cm}^2$) та частини стебел з пазушними бруньками ($l=0,5-0,8 \text{ cm}$), культивовані на живильних середовищах Мурасіге – Скуга (МС) та Куаріна – Леповре (QL) з додаванням до їх складу різних груп цитокінінів та ауксинів: 6-БАП (6-бензиламінопурин), ТДЗ (гідазурон), НОК (α-нафтилоцтова кислота) та ІОК (β-індоліл-3-оцтова кислота) як окремо, так і комбінуючи між собою (Alehno, & Vysockij, 1986).

Цитологічні і гістохімічні дослідження неморфогенного й морфогенного калюсу сортів троянди ефіроолійної (перший – п'ятий пасажі) проводили на мікротомних зрізах (завтовшки 10 мкм). Рослинні тканини фарбували гематоксиліном за Гейденгайном та ацетофуксином. Рослинний матеріал фіксували 24 год за прописом Чемберлена (70 % етиловий спирт: формалін: оцтова кислота – 90: 5: 5) (Dzhensen, 1965).

Результати та їх обговорення. На живильних середовищах початок калюсогенезу експлантатів троянди ефіроолійної зафіксували на частинах листової пластинки на 7-9-ту добу, на мікропагонах – на 10-14-ту добу культивування.

Надалі калюс субкультивували на живильних середовищах, доповнених регуляторами росту – БАП, НОК, ІОК та ТДЗ (табл.).

Табл. Вплив середовища та регуляторів росту на морфометричні показники калюсу сорту Лань

№ з/п	Морфометричний показник	Склад живильного середовища			
		МС+ 0,5 мг/л БАП	QL+ 2,0 мг/л БАП +0,1 мг/л ІОК	1/2 МС+0,150 мг/л ТДЗ +0,05 мг/л НОК	QL + 0,5 мг/л БАП
1	Забарвлення калюсу, 30-та доба культивування	світло-жовте	світло-жовте з осередками темно-салатового	салатове з осередками темно-зеленого	салатове з осередками темно-зеленого
2	Консистенція калюсу, 30-та доба культивування	рихла	середньої щільності	щільна	щільна
3	Регенерація мікропагонів, шт.	-	10-15	5-10	12-25
4	Інтенсивність калюсоутворення	+	++	+++	++

*Примітка: "+" – низька інтенсивність калюсоутворення; "++" – середня інтенсивність калюсоутворення; "+++ – висока інтенсивність калюсоутворення.

Візуально перші ознаки морфогенезу у культурі калюсу зафіксували на другу добу культивування. Диференціація клітин і утворення у калюсних тканинах морфогенних структур значною мірою залежить від концентрації та співвідношення регуляторів росту, що за умов відповідної компетентності клітин стимулюють процеси гомогенезу.

Аналіз експериментальних даних свідчить про те, що використання тільки БАП на середовищі МС не привело до ініціації формування морфогенного калюсу. Консистенція тканин залишилася рихлою, забарвлення – світло-жовтим. Під час культивування калюсу на середовищі QL + БАП на 30-ту добу отримали морфогенний калюс із темно-зеленими зонами, а на 40-ву добу почали формуватись розетки та мікропагони. Зі зменшенням у 2 рази мінерального складника у живильному середовищі (1/2 МС), ТДЗ та НОК відбувається активне наростання калюсних тканин. Регенерація мікропагонів відбувається на 45-ту добу.

Під впливом гормональних стимулів на базальних частинах пагонів експлантатів і на поверхнях листків, що дотикаються до живильного середовища з потрібними для проліферації клітин компонентами, активно утворюються калюсні тканини. На перших етапах формування вони подані пухкою світло-зеленою масою, яка розпадається на конгломерати за механічного навантаження. Поступово калюсна тканина твердіє і набуває інтенсивного жовто-зеленого забарвлення, внаслідок асиміляційної активності клітин калюсу (рис. 1).

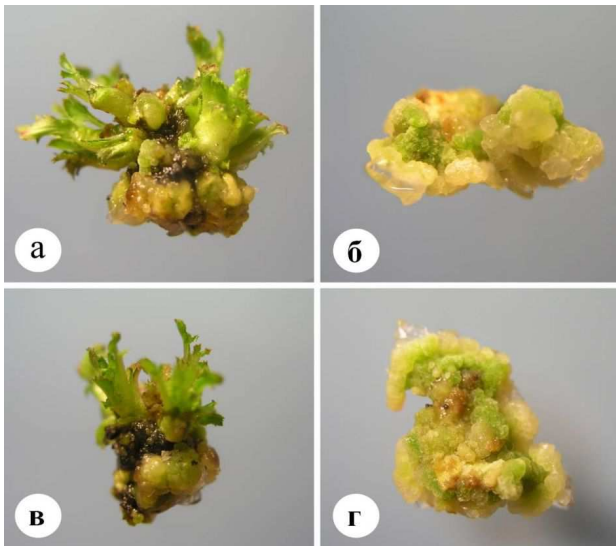


Рис. 1. Морфогенний калюс сорту Лань на різних стадіях формування: а, в – первинні регенеранти на морфогенному калюсі; б, г – формування морфогенних структур у калюсній тканині

На світлі клітини поверхневого шару калюсу нагромаджують у вакуолях поліфеноли (елагі- і галотаніни, проантоціанідини, ди- і тримери флаван-3-олів). За умов доступу кисню вони активно окислюються фенолоксідазами. Через збільшення вмісту окислених продуктів клітини буріють і поступово відмирають.

У більшості досліджених зразків морфогенних калюсів троянди ефіроолійної промеристемні зони, що

подані дрібними клітинами з густою цитоплазмою, знаходились в оточенні великих клітин із відкладеннями у клітинних стінках β -(1 \rightarrow 3)-глюканів (калози). Калоза – біополімер, що у рослинному організмі виконує захисні і регуляторні функції (Lotova, 2000). Її синтез індукується збільшенням загального пулу іонів кальцію у цитоплазмі рослинних клітин (Lotova, 2000), дією еліситорів, механічними впливами (Valles, & Voxus, 1987). Відкладення β -(1 \rightarrow 3)-глюканів впливають на симпластний транспорт метаболітів у тканинах і створюють систему бар'єрів, що перешкоджають транслокації патогенів і переносу високомолекулярних сполук через плазмолему (Ray, 2006). Біополімер створює в калюсах троянди ефіроолійної передумови для селективного транспорту метаболітів і градієнтного перерозподілу продуктів первинного і вторинного метаболізму.

Є підстави вважати, що меристемоїдні конуси або модулі та компактні групи промеристемних клітин функціонують як центри синтезу фітогормонів та інших регуляторів росту. В оточенні недиференційованих клітин паренхіми відповідні центри поступово формують навколо себе спеціалізовані тканини, ініціюють формування проваскулярної системи, поступової диференціації клітин основних запасних, провідних і прокамбіальних тканин, у яких визначаються структурні елементи аксіального органу.

За просторово-структурною організацією морфогенні зони у системі калюсних тканин троянди ефіроолійної подані меристемоїдами. Потенційно кожен з них здатен утворювати апікальні меристеми з примордіями листків і формувати первинні пагони. Оскільки в таких умовах органогенез відбувається *de novo*, перші метамери за відсутності потрібного оточення, біохімічної та просторової неупорядкованості мають ознаки тератогенезу. Цей ефект має масовий характер. Перші акти органогенезу завершуються утворенням структур з аномальною будовою. Для них характерна відсутність чіткої мережі провідних пучків, атипова просторова орієнтація клітин у тканинах. Відповідно, порушується міжклітинний зв'язок і екстрацелюлярний сигналінг. Первинні органи мають обмежений ріст, втім вони виконують важливу функцію: активно долучаються до фотосинтезу, утворюють потрібні для нормального розвитку гормони і регулятори росту.

Кожен з таких новоутворених модулів зазвичай частково або повністю виокремлений від неморфогенної зони калюсу крупними паренхімними клітинами із розвиненими вторинними клітинними стінками (рис. 2; д, ж). Подальша реалізація морфогенного потенціалу цих структур залежить від умов культивування тканин, а також від функціональної активності меристемоїдних зон.

Швидкість регенераційних процесів і нормальний розвитку органів у системі калюсних тканин залежала від збалансованості компонентів живильного середовища, співвідношення регуляторів росту і ключових ендоклітинних метаболітів, синтез яких також залежав від інтенсивності і режиму освітлення.

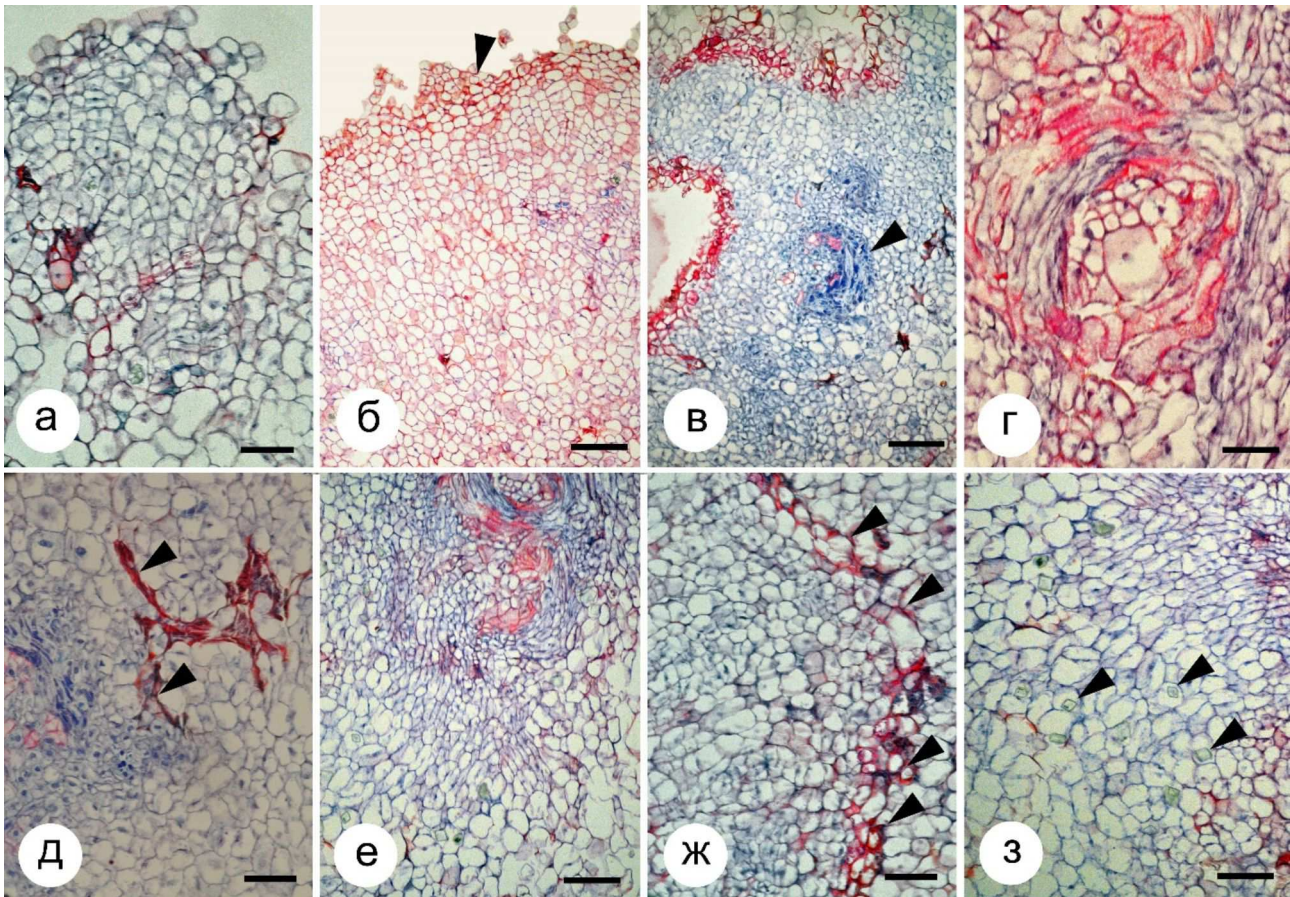


Рис. 2. Просторова організація і гістогенез морфогенних структур у калюсах троянди ефіроолійної сорту Лань: а, б – проліферація клітин неморфогенного калюсу; в – утворення промеристемних зон в оточенні прошарків клітин з лігніфікованими клітинними стінками; г, е – диференціація клітин з утворенням проваскулярних тканин; д – облітерація клітин паренхіми; ж – формування гістохімічних бар'єрів (показано стрілками), що розділяють паренхіму калюсу на окремі зони; з – відкладення у клітинах калюсу (ідіобластах) крупних призматичних кристалів солей щавлевої кислоти (показано стрілками); лінійка: б, в, е – 100 мкм; а, г, д, ж, з – 50 мкм

Висновки. Вперше, в наслідок проведеного комплексу робіт було отримано морфогенний калюс сорту Лань. Встановлено, що у даного сорту вдвічі активніше калюс починає утворюватись на частинах листової пластинки, ніж на частинах пагонів.

На живильному середовищі МС з половинним вмістом макро- та мікросолей, 0,150 мг/л ТДЗ та 0,05 мг/л НОК відбувається активне наростання калюсних тканин. Регенерація мікропагонів відбувається на 45-ту добу.

Морфогенні зони у системі калюсних тканин троянди ефіроолійної подані меристемоїдами. На початкових стадіях гомогенез завершується утворенням структур з аномальною будовою, для яких характерна відсутність чіткої мережі провідних пучків, атипова просторова орієнтація клітин у тканинах. Первинні органи мають обмежений ріст, втім вони виконують важливу функцію: активно долучаються до фотосинтезу, утворюють потрібні для нормального розвитку гормони і регулятори росту.

Перелік використаних джерел

Alehnо, G. D., & Vysockij, V. A. (1986). Klonalnoe mikro-razmnozhenie roz. *Fiziologija i biohimija kulturnyh rastenij*, 18, pp. 489–493. [in Russian].

Dzhensen, U. (1965). *Botanicheskaja gistohimija*. Moscow: Mir, p. 377. [in Russian].

Lotova, L. I. (2000). *Morfologija i anatomija vysshih rastenij*. Moscow: Jeditorial URSS, p. 528. [in Russian].

Oliynyk, O. O., Kljuvadenko, A. A., Melnychuk, M. D. (2016). Optimization of Culture Media Content for Acceleration of Growth and Cultivation of *Rosa Damascena* Mill. in *In Vitro Culture*. *Scientific Bulletin of UNFU*, 26(7), pp. 134–139. Retrived from: http://nltu.edu.ua/nv/Archive/2016/26_7/23.pdf

Oliynyk, O. O., Kljuvadenko, A. A., Lihanov, A. F., & Melnychuk, M. D. (2016a). Vplyv fenolnyh spoluk na efektyvnist uvedennja sortiv *Rosa damascena* Mill. u kulturu in vitro. *Visnyk agrarnoi nauky*, 2, pp. 28–31. [in Ukrainian].

Oliynyk, O. O., Kljuvadenko, A. A., Lihanov, A. F., & Melnychuk, M. D. (2016b). Osoblyvosti nagromadzhenja fenolnyh spoluk v eksplantatah trojandy efiroolijnoi v umovah in vitro. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*, pp. 337–341. [in Ukrainian].

Ray, F. E. (2006). *Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*. New Jersey: Hoboken, pp. 473–501.

Rubcova, O. L. (2009). *Rid Rosa L. v Ukraini: genofond, istorija, naprjamy doslidzhen, dosjagnennja ta perspektyvy*. Kyiv: Feniks, p. 375. [in Ukrainian].

Valles, M., & Boxus, P. (1987). Regeneration from *Rosa* callus. *Acta Hort*, 212, pp. 691–696.

О. А. Олейник

НЕПРЯМОЙ МОРФОГЕНЕЗ И РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ТКАНЕЙ РОЗЫ ЭФИРОМАСЛИЧНОЙ

В результате проведенных исследований получена морфогенная каллюсная культура розы эфиромасличной сорта Лань. Установлено, что в два раза активнее каллюс начинает образовываться на частях листовой пластинки, чем на частях побегов. Проанализировано влияние регуляторов роста ауксинового и цитокининовым типов воздействия на формирование каллюсных тканей. Активное нарастание каллюсных тканей происходит на питательной среде МС с половинным содержанием макро- и микросолей, 0,150 мг/л ТДЗ и 0,05 мг/л НОК. Показано пространственную организацию и гистогенез морфогенных структур исследуемых образцов каллюса.

Ключевые слова: каллюс, роза эфиромасличная, культура in vitro, регуляторы роста.

О. О. Олійник

INDIRECT MORPHOGENESIS AND REGENERATIVE ABILITY OF TISSUES OF ROSA DAMASCENA MILL

Obtaining of morphogenic callus of Lan variety of ROSA and formation of the regenerant plants from callus tissues is a necessary issue nowadays. For the research we used Rosa Damascena Mill. variety of Ukrainian selection Lan. For obtaining of the callus tissue we used sterile leaf plates and parts of stems with axillary buds cultured in nutrient media with the addition of the various groups of cytokinins and auxins. Plant tissue was stained with hematoxylin by Heidenhain and acetofuxin. Plant material was recorded for 24 hours by Chamberlain's method. We have obtained the following results. Firstly, on the medium, the beginning of the callusogenesis of aromatic rose's explants was recorded on parts of leaf plates after 7-9 days, and for microstems – 10-14 days of cultivation. Later callus was subcultured on the nutrient media, supplemented with growth regulators – BAP, NAA, IAA and TDZ. Visually, the first signs of the morphogenesis of callus culture were fixed on the 2nd day of cultivation. The differentiation of cells and the formation of callus tissue of morphogenic structures is largely dependent on the concentration and ratio of growth regulators that under relevant competences of cells stimulate processes hemogenesis. Analysis of experimental data shows that usage of only BAP in the MS medium did not lead to the initiation of the morphogenic callus formation. Secondly, under the influence of hormonal stimuli callus tissues actively formed on the basal parts of shoots of explants and on the surfaces of leaves contacting to the culture medium that contained the required components for the cell proliferation. Thus under these conditions the organogenesis occurs de novo, the first metameres, with absence of the necessary environment, biochemical and spatial disorder carry out the signs of teratogenesis. As a result of conducted studies we have determined that in Lan variety callus begins to form twice as actively in the parts of the leaf blades than in stem parts. Morphogenic zones in the system of callus cells of Rosa Damascena Mill. are represented as meristemoids. Primary bodies have limited growth; however they perform an important function: actively take part in photosynthesis, form hormones and growth regulators that are required for normal development.

Keywords: callus; rose essential oil; in vitro culture; growth regulators.

Інформація про автора:

О. О. Олійник, аспірант, НУ біоресурсів і природокористування України, м. Київ, Україна.

E-mail: osa_solodar@ukr.net