

УДК 602:57.085.2:633.63
© 2012

О.Л. Кляченко,

А.Ф. Ліханов,

кандидати
біологічних наук

С.А. Криловська

Національний
університет біоресурсів
і природокористування
України

КЛІТИННА РЕГУЛЯЦІЯ МОРФОГЕННИХ ПРОЦЕСІВ У КАЛЮСНИХ ТКАНИНАХ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ В УМОВАХ IN VITRO

Доведено синхронізацію утворення меристемоїдів з лігніфікацією та значним відкладенням калози на зовнішніх периклінальних та антиклінальних клітинних оболонках паренхіми периферійної зони в морфогенному калюсі буряків цукрових.

У селекції буряків цукрових (*Beta vulgaris* L.) широко застосовуються методи культури рослин *in vitro*, а особливо актуальним у селекції цієї культури є отримання рослин-регенерантів методом непрямого морфогенезу [8]. Процедура отримання калюсу буряків цукрових, здатного до ембріогенезу, складна і має сортоспецифічні особливості [9]. Культура потребує ретельного добору складників живильного середовища, зокрема гормонів, вітамінів, амінокислот [1]. Найменше вивченими залишаються питання регуляції морфогенних процесів у калюсних тканинах, взаємодії між недиференційованими і високоспеціалізованими клітинами, просторової організації і розвитку меристемоїдів. Достеменно невідомі індуктори морфогенезу адвентивних органів (бруньок, коренів) і ембріоїдів, які мають полярну структуру і незалежну від материнських тканин провідну систему закритого типу. Крім того, недостатньо визначено роль біополімерів, що входять до складу клітинних стінок, у транспорті гормонів і елементів живлення, а також у процесах утворення меристемоїдів та ініціації первинної диференціації тканин.

Мета досліджень — з'ясувати особливості утворення меристемоїдів у калюсних тканинах буряків цукрових і визначити специфіку трансформації клітин у морфогенних зонах.

Методика досліджень. У дослідженнях використовували ЧС гібриди Ялтушківський ЧС 72, Білоцерківський ЧС 57, Український ЧС 70, Іванівський ЧС 33, Атаманша, Ворскла, Катюша. Морфогенний калюс рослин отримували на модифікованому середовищі за Мурасіге-Скуга [9] з додаванням: мезо-інозиту — 100 мг/л; вітаміну В₁ — 0,5; гідролізату казеїну — 0,5; 6-БАП — 1; НОК — 0,5; ІОК — 0,1 мг/л. Для цитологічних і гістохімічних досліджень добирали морфогенні калюси, культивовані упродовж 3-х пасажів (9 тижнів). Рослинний матеріал фіксували 24 год за Чемберленом [6]. Зрізи тканин фарбували залізним гематоксилином за Гейденгайном [6]. Відкладення калози виявляли методом флуоресцентної мікроскопії за використання флуорохрому анілінового синього (розведення — 1:10000) на мікроскопі AxioScope A-1 Carl Zeiss. Калюсні тканини фарбували флуорохромом 30 хв у фосфат-

ному буфері (рН — 12) і відмивали у буфері двічі по 5 хв. Фотодокументацію матеріалів і цифрову обробку експериментальних даних виконували у програмі AxioVision 40V Carl Zeiss.

Результати досліджень. У природних умовах основна функція калюсу рослин полягає у відновленні цілісності тканин рослинного організму після травматичних пошкоджень, які виникли внаслідок дії фізичних (механічні навантаження, гравітаційні сили, морозобоїни, термічні ушкодження та ін.) або біотичних (прямий вплив фітофагів чи патогенних організмів) чинників. На штучних живильних середовищах калюсогенез має іншу динаміку і вектор розвитку. У результаті активного поділу клітин можуть спонтанно створюватися передумови для мікроклонального відтворення нових рослин. У наших дослідах перші ознаки калюсоутворення на поверхні травмованих листків буряків цукрових з'являлися на 20–23-тю добу.

На перших стадіях культивування в ініціації калюсогенезу брали участь клітини мезофілу. Клітини активно ділились, але напрямки цитокінезу не мали чіткої просторової орієнтації та синхронізації у часі, внаслідок чого формувалася рихла дифузна тканина зі слабкими міжклітинними зв'язками. Клітини неморфогенного калюсу були паренхімного типу, з тонкими клітинними стінками, дуже вакуолізовані, сферичної або частіше еліпсоїдної форми, завдовжки 50–150 мкм. У тканинах неморфогенного калюсу внаслідок значного, просторово не синхронізованого розтягнення клітинних стінок, міжклітинний транспорт речовин відбувається переважно по апопласту. Симпластний зв'язок у тканинах первинних калюсів буряків цукрових ускладнюється через відсутність тісних зв'язків між клітинами, хоча саме він у високоспеціалізованих тканинах рослин відіграє важливу роль у селективному транспорті іонів і формуванні градієнтів концентрацій речовин, зокрема гормонів.

У калюсах 2-го пасажу (5–6-й тиждень) клітинні стінки паренхіми поступово трансформуються й у зовнішніх шарах клітин відбувається інтенсивне відкладення компонентів лігніну. Отже, у неморфогенному калюсі поступово утворюються дві гістохімічно гетерогенні зони — периферична і внутрішня. Слідом за гістохімічною диференціа-

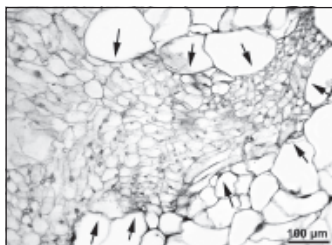


Рис. 1. Диференціація клітин в калюсах буряків цукрових ЧС гібриду Катюша в умовах *in vitro*: проваскулярна зона калюсу в оточенні лігніфікованих клітин паренхіми (стрілками позначено зону відкладення компонентів лігніну)

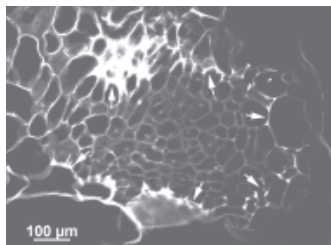


Рис. 2. Відкладення калози, диференціація клітин і формування меристематичних зон у тканинах калюсів буряків цукрових гібриду Уладово-Верхняцький ЧС 37. Фарбування аніліновим синім (1:10000)

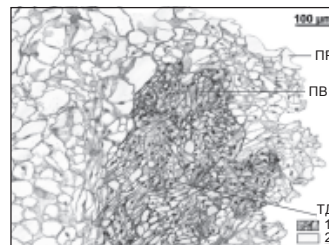


Рис. 3. Формування морфогенних модулів у калюсі буряків цукрових гібриду Український ЧС 70: 1 — морфогенний модуль з проваскулярними тяжами; 2 — паренхіматозні клітини калюсу; пр — паренхіма; пв — проваскулярні клітини; тд — трахеїдоподібні елементи (гідроцити)

цією клітин в окремих ділянках внутрішньої зони калюсу відокремлюються невеликі групи клітин з високою проліферативною активністю. Поділ таких клітин не супроводжується сильним розтягненням і всмоктуванням води. Вони мають густу базofilну цитоплазму і високий показник ядерно-цитоплазматичного співвідношення (N/C), що є характерним для клітин меристеми.

Визначено, що найкомпактніше складеними і структурованими були клітини калюсу, які перебували в оточенні крупних (150–180 мкм) без'ядерних клітин паренхіми з великими відкладеннями у вторинних клітинних стінках калози і компонентів лігніну. За оптимальних умов культивування дрібні густоплазматичні клітини ініціюють формування меристематичних. Під час дослідження морфогенного калюсу буряків цукрових установлено, що функціонально активні меристематичні можуть утворюватись як на поверхні калюсних тканин, так і в середині (рис. 1). Проте формування нових упорядкованих клітинних структур не завжди закінчується розвитком аксіальних органів, гемо- або ризогенезом.

Первинні меристематичні зони морфогенного калюсу зазвичай складалися з групи 4–8-ми дрібних (12–15 мкм) щільно зімкнених клітин, розвиток яких залежав від складу живильного середовища, просторового положення, функціонального стану і конституційних властивостей клітин, що їх оточують. Площина та інтенсивність поділу ініціальних клітин зумовлюють первинну морфологію новоутвореної структури, яка з часом ставала центром активного синтезу гормонів, біологічно активних речовин і від того починала виконувати функцію регуляторного центру, який синхронізував поділ і диференціацію клітин. Під час диференціації клітин за васкулярним типом у морфогенних структурах утворювалися сильно видовжені клітини — гідроцити, в яких поступово формувалися сітчасті та спіральні потовщення вторинних клітинних стінок. У периферійних зонах калюсів

буряків цукрових сортів Катюша, Атаманша клітини паренхіми характеризувалися значним збільшенням об'ємних показників, але на відміну від клітин проваскулярних тяжів цей процес відбувався відносно рівномірно у всіх напрямках.

Морфогенез гідроцитної системи в умовах *in vitro* мав ознаки складнішої диференціації клітин, які забезпечували формування системи, придатної до виконання спеціалізованих функцій: накопичення і транспорту речовин [2]. Просторова гідроцитна система калюсів буряків цукрових зазвичай закінчувалася біля базальної зони меристематичних конусів, які за оптимальних умов культивування перетворювалися на апікальні меристеми адвентивних бруньок або коренів. Меристематичні конуси, що функціонували як аттрактанти і центри синтезу гормонів, в оточенні лігніфікованих оболонок паренхіми створювали передумови для диференціації клітин за васкулярним типом. Отже, в культурі калюсних клітин поступово виділялися основні структурні елементи аксіального органа.

На калюсах 3-го пасажу (8–9-й тиждень) буряку цукрового Уладово-Верхняцький ЧС 37 формувалися мікропагони з цілком сформованими пазушними меристемами з типовою для цього виду будовою. За індексом ядерно-цитоплазматичного співвідношення, густиною цитоплазми, морфологією та упорядкованою зональністю клітин апікальні меристеми значно відрізняються від меристематичних. Розміри клітин меристеми від туніки до колонки мають чіткий тренд збільшення морфологічних параметрів. Клітини верхівоквих меристематичних визначалися менш вираженою залежністю їх розміру від місцеположення в структурі морфогенних тканин.

Важливими показниками функціональної спеціалізації клітин є їхня морфологія, лінійні розміри, а також форма і розміри ядра. Під час порівняльної оцінки цитометричних показників виявлено істотну різницю між клітинами перифе-

рійної паренхіми і клітинами проваскулярних тязів, апікальних меристем і верхівкових меристемодів.

Ознакою поліморфності клітин морфогенного калюсу є високий коефіцієнт варіабельності розмірів ядра. Так, максимальний діаметр ядра паренхімних клітин, які оточують морфогенні зони (модулі), майже втричі більший, ніж у полярно видовжених клітинах трахеальних елементів. Водночас розміри ядер апікальних меристем і верхівкових меристемодів відрізняються незначно. Найбільшим цей показник виявився для клітин апікальної меристеми (26,3%), а найменшим — для паренхіми периферійної зони (1,8%). У більшості досліджених зразків калюсів буряків цукрових дрібні клітини з густою цитоплазмою були в оточенні крупних клітин із значними відкладеннями в клітинних стінках β -(1 \rightarrow 3)-глюканів (калози) (рис. 2). Відомо, що калоза у рослинному організмі виконує захисні та регулювальні функції [3]. Її синтез індукується збільшенням загального пулу іонів кальцію в цитоплазмі рослинних клітин [8], дією елісаторів [4], механічними впливами [7]. Відкладення калози (як динамічний компонент клітинної стінки рослин) регулюють транспорт асимілятів у тканинах, створюють умови для часткової або повної ізоляції протопластів

клітини від дії зовнішніх факторів [5]. Поліфункціональність полісахариду створює в калюсах буряків цукрових передумови для селективного транспорту та градієнтного перерозподілу органічних речовин, продуктів первинного і вторинного метаболізму, і як наслідок викликає гістохімічну гетерогенність тканин.

Цілком можливо, що в меристемодних конусах і невеликих групах клітин, що функціонують як аттрактанти і центри синтезу гормонів, в оточенні паренхіми із значними відкладеннями в клітинних стінках калози запускається каскад молекулярно-генетичних процесів, відповідальних за регуляцію розвитку васкулярної системи і поступової диференціації тканин, у яких виділяються основні структурні елементи аксіального органа. За просторово-структурною організацією морфогенні зони в системі калюсних тканин буряків цукрових можуть розглядатись як окремі модулі (рис. 3). Кожний з таких модулів частково або повністю відокремлений від неморфогенної зони калюсу крупними паренхімними клітинами із розвиненими вторинними клітинними стінками. Подальша реалізація морфогенного потенціалу структур, утворених *de novo*, залежить від умов культивування культури, а також від функціональної активності меристемодних зон.

Висновки

Установлено, що у морфогенному калюсі буряків цукрових утворення меристемодів синхронізовано з лігніфікацією та значними відкладеннями калози на клітинних стінках паренхіми. З'ясовано, що утворення високодиференційованих морфогенних структур з розвиненою системою гідроцитів на поверхні або у середині тканин калюсів буряків цукрових починається з формування кластерів, які утворюються групою дрібних, щільнозімкнених густоплазматичних клітин. Запропоновано

просторово-структурну модель утворення первинних морфогенних структур у калюсах буряків цукрових у вигляді морфогенних модулів, які складаються з меристемодного конуса (або групи клітин з високою проліферативною активністю), проваскулярної зони з системою гідроцитів і декількох шарів дрібних клітин паренхіми. Кожний морфогенний модуль знаходиться в оточенні крупних клітин зі значними відкладеннями на клітинних стінках калози, лігніну і суберину.

Бібліографія

1. Банникова М.А., Головка А.Э., Хведыныч О. А., Кучук Н.В. Регенерация растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в культуре *in vitro*. Гистологическое изучение процессов регенерации//Цитология и генетика. — 1995. — № 6. — С. 14–22.
2. Барыкина Р.П., Чурикова О.А. Развитие, структура и функции гидроцитной системы у растений//Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. — 2004. — № 2. — С. 23–31.
3. Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамическая система. — М.: Наука, 2007. — 429 с.
4. Емельянов В.И., Кравчук Ж.Н., Поляковский С.А., Дмитриев А.П. Отложение каллозы при обработке клеток томатов (*Lycopersicon esculentum* L.) биотическими элиситорами//Цитология и генетика. — 2008. — № 2. — С. 21–28.
5. Курсанов А.Л. Транспорт ассимилятов в растении. — М.: Наука, 1976. — 825 с.
6. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Агропромиздат, 1988. — 271 с.
7. Jaffe M.J., Huberman M., Johnson J., Telewski F.W. Thigmomorphogenesis: The induction of callose formation and ethylene evolution by mechanical perturbation in bean stems//Physiol. Plant. — V. 64. — 1985. — P. 271–279.
8. Kauss H. Callose biosynthesis as a Ca — regulation process and possible relation to the induction of other metabolic changes//J. Cell Sci. Suppl. — V. 2. — 1985. — P. 89–103.
9. Murasige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture//Physiol. Plant. — 1962. — V. 15. — P. 473–497.