

## КУЛЬТУРА КАЛУСНИХ ТКАНИН

Практична реалізація культивування калусних клітин рослин досить широка: вирощують не лише клітинну біомасу як джерело біологічних речовин, а й отримують рослини з поліпшеними якісними ознаками (збалансованим вмістом жирів, незамінних амінокислот, зміненим вмістом вуглеводів, покращеним зберіганням), стійкістю проти біотичних та абіотичних стресових факторів навколишнього середовища (хвороб, шкідників, вірусів, віроїдів, бактеріозів, засолення, закислення ґрунтів, гербіцидів), підвищеним синтезом біологічно активних речовин, здатністю до фітореємедіації, тощо.

Калусна клітина, в результаті поділу якої виникає калусна тканина або калус, є одним із типів клітинної диференціації, притаманної вищим рослинам. У природі для рослини калус є тканиною, що виникає у виняткових обставинах (звичайно при травмах). Ця тканина захищає місце поранення, накопичує поживні речовини для регенерації анатомічних структур або втрачених органів.

Калусні тканини, що вирощуються штучно, поверхневим способом застосовують для: 1) збереження в активному стані різних штамів, ліній, мутантів, 2) з них одержують суспензії клітин, що ростуть на рідкому поживному середовищі, 3) використовують для одержання великої кількості клітинної біомаси, що є джерелом біологічно активних речовин, 4) вивчають теоретичні питання фізіології клітини та її біосинтетичних можливостей, 5) для регенерації рослин віддають перевагу також калусним тканинам.

Масштабність практичного використання культури клітин рослин обумовлена тим, що рослинній клітині властива тотипотентність — здатність фенотипово реалізувати спадкову інформацію, яка закодована в ДНК ядра, тобто властивість клітин диференційованих тканин після дедиференціації (з наступним створенням відповідних умов) відновлювати частину або весь організм (реалізувати омніпотентність) і давати початок рослині-регенеранту. В культурі рослинних клітин *in vitro*, що виникли з будь-якої спеціалізованої тканини, відбуваються всі форми морфогенезу, притаманні вищим рослинам: утворення коренів, стебел, квіток, зародків.

Основним типом культивованої рослинної клітини є калусна. Саме на калусні перетворюються спеціалізовані і меристемні клітини рослин після їх перенесення в умови *in vitro* на штучні поживні середовища. На калусні клітини перетворюються не лише пошкоджені (поранені) тканини, а й зовсім непошкоджені (клітини пилку, пилкової трубки). Визначальним моментом перетворення будь-якої клітини рослини на калусну є дія регуляторів росту у таких концентраціях та співвідношеннях, які на клітину в організмі як єдиній системі не діяли. Можна стверджувати універсальність перетворення на калусні всіх типів клітин, ізолюваних із рослини та культивованих у відповідних умовах.

Процес дедиференціації (втрати спеціалізації) клітини складний і пов'язаний зі зміною **експресії** (активності) **генів**. Експресія генів, які до цього не працювали («сплячих» генів), і репресія (пригнічення) деяких працюючих призводять до зміни в спектрі ферментних і структурних білків клітини. Зменшуються кількісно (уповільнюється експресія), а іноді зникають зовсім білки, притаманні фотосинтезуючим клітинам листків або запасним клітинам бульб (клубней) і кореня, з'являються білки, властиві калусним клітинам. Така зміна складу й

активності ферментних білків змінює метаболізм клітини. Біологічно активні речовини, що визначають дедиференціацію клітин рослин і їх перетворення на калусні, поряд із синтезом специфічних білків активізують інші побічні механізми, які забезпечують не лише дедиференціацію, а й наступне розмноження цих клітин. У клітинах, що перебудовуються, значно посилений синтез усіх типів РНК (основи синтезу білків, необхідних для новоствореної маси клітин).

Калусогенез під час експлантування фрагмента тканини в умовах *in vitro* властивий не лише покритонасінним, а й голонасінним рослинам, папоротям, мохам, печіночникам.

Калусні клітини в пересадній культурі можуть спонтанно набувати здатності рости на середовищі без регуляторів росту. Природа такої незалежності до одного або до обох типів регуляторів (ауксину і цитокініну), що звичайно застосовуються для одержання і вирощування клітинних культур рослин, може бути генетичною (наслідок мутації) або епігенетичною (наслідок експресії генів, що визначають незалежність клітини від екзогенних регуляторів). За генетичної незалежності калусні клітини поведуться так само, як пухлинні, за епігенетичної — вони втрачають ознаку незалежності в ряду перетворень клітина—рослина—клітина, що і є доказом негенетичної природи такої набутої незалежності від наявності в середовищі регуляторів росту.

Для одержання культивованих калусних клітин фрагменти тканин різних органів вищих рослин (експланти) вміщують на штучне поживне середовище в пробірки, чашки Петрі. Процес одержання первинного калусу і підтримання субкультивованої культури потребують асептики.

Особливості дедиференціювання клітин експланта і калусогенезу залежать від епігенетичних характеристик складових тканин. Клітини тканин запасуючої паренхіми кореня і стебла, мезофіла листка та інших спеціалізованих тканин, перенесених на поживне середовище, що містить мінеральні солі, джерела вуглецю, вітаміни і регулятори росту, повинні дедиференціюватись, тобто втратити структури, характерні для їхніх специфічних функцій у рослині, і повернутися до стану клітини, що ділиться. Часто експлант, що використовується для одержання калусу, є фрагментом органа і включає тканини, клітини яких по-різному диференційовані. Так, узятий цілком фрагмент стебла має у своєму складі клітини епідермальні, первинної корової паренхіми, камбію і судинної системи серцевинної паренхіми. У різних умовах культивування і залежно від відмінностей у фізіологічному стані вихідної рослини можна спостерігати переважну проліферацію клітин або камбію і його молодих дериватів, або кори, або серцевинної паренхіми. Різноманітне тканинне походження первинних калусних клітин є однією з причин гетерогенності культури калусної тканини, оскільки деякі функціональні особливості вихідних диференційованих клітин передаються в ряду клітинних поколінь як стійкі епігенетичні ознаки.

У клітинах експланта, що складається з високоспеціалізованих клітин, які в нормі не діляться, на самому початку культивування спостерігаються зміни в метаболізмі, пов'язані з травматичними синтезами, дедиференціюванням, підготовкою до процесів поділу. Між цими процесами може існувати причинно-наслідковий зв'язок, механізм якого точно невідомий. Можна припустити, що травма призводить до вивільнення з клітин біологічно активних речовин-індукторів або

елісаторів клітинних поділів, що відрізняються за природою від відомих регуляторів росту рослин (ауксинів, цитокінінів, гіберелінів та ін.). У ролі таких елісаторів можуть виступати продукти руйнування полісахаридів клітинної стінки.

У клітині, що готується до поділу, стимулюється синтез усіх форм РНК, розпочинається реплікація ядерної ДНК, зникають тканиноспецифічні білки-антигени і з'являються білки, специфічні для клітин, що діляться. Ці спостереження свідчать про зміни в активності генів і білкового апарату клітин під час дедиференціювання.

Утворення калусу не у всіх випадках пов'язане з поверхнею експланта. Калус може утворюватись внаслідок проліферації внутрішніх тканин без зв'язку з поверхнею зрізу. Калус, що розвивається, розриває прошарок тканин і часто виходить на поверхню. Прикладом утворення калусу, не пов'язаного із травмою, є калусогенез у культурі ізольованих пиляків. Гаплоїдна мікроспора, утворена в результаті мейозу, в процесі культивування пиляків *in vitro* часом відхиляється від нормального мікроспорогенезу, її ядро індукується до поділів, а сама клітина дедиференціюється і перетворюється на калусну.

Первинний калус, утворений на експлантах, через 3—8 тижнів (залежно від темпів росту) переносять на свіже поживне середовище.

Залежно від походження та умов вирощування колір маси калусної тканини може бути білим, жовтуватим, зеленим, червонуватим, бурим, пігментованим цілком або із зональною наявністю хлорофілу та/або антоціанів.

За типом росту калусні тканини бувають:

- пухкими, сильно обводненими, що легко розпадаються на окремі клітини;
- середньої щільності, з добре вираженими меристемними осередками;
- щільними, із зонами редукованого камбію і судин, в основному

трахеєподібними елементами - трахеїдами.

Тип росту визначається не лише особливостями генотипу культивованих клітин, а й умовами їх вирощування. Протягом циклу вирощування калусні клітини проходять кілька фаз росту.

Для отримання калусу найчастіше використовують середовища Уайта, Мурасіге і Скуга, Гамборга В5 та ін., доповнені 3% -ною сахарозою або глюкозою, сумішшю вітамінів і регуляторами росту. При отриманні первинного калусу експланти тканин рекомендується культивувати одночасно на декількох середовищах з різним співвідношенням регуляторів росту. Успіх отримання калусу у великій мірі залежить від вдалого підбору регуляторів росту, які індукують клітинні поділи. В якості ауксинів використовуються 2,4-Д і ІОК. Для врахування росту калусних тканин в першу чергу визначають збільшення їх сирової ваги. Для підрахунку числа клітин використовують метод Брауна (Brown, Rickless, 1949). Підрахунок клітин здійснюється в рахунковій камері Горяєва чи Фукса-Розенталя.