



І. В. БУЛАВІН

Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, м. Київ, 01601, МСП-1, Україна
iliyabulavin@rambler.ru

РИЗОГЕНЕЗ У КУЛЬТУРІ *IN VITRO* *ARABIDOPSIS THALIANA* ДИКОГО ТИПУ ТА *SCR* МУТАНТА

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana* (Col-0), *scr* мутант, калус, листкові експланти, ризогенез

Вступ

Морфогенетичний потенціал органів і тканин рослин обумовлений специфічною властивістю їхніх клітин — тотипотентністю, тобто здатністю клітин шляхом поділу утворювати будь-який клітинний тип організму. В системах *in vitro* можна досягти розгортання необхідних морфогенетичних процесів у органах і тканинах. Ризогенез — це процес формування коренів *de novo*. Корінь є зручним об'єктом для дослідження етапів гравітропічної реакції, оскільки місце сприйняття гравітації та відповіді на неї розділені між собою просторово. Багаторічними дослідженнями біології рослинних клітин в умовах космічного польоту переконливо доведено, що гравірецепторний апарат коренів покритонасінних рослин формується в умовах реальної мікрогравітації під час космічного польоту, але не функціонує в разі відсутності вектора гравітації (Perbal, Driss-Ecole, 1989; Korduum, 1997). Слід зазначити, що ці дані були отримані на зародкових коренях проростків, які виростили з насіння, котре утворилося при 1 g. Залишається відкритим питання стосовно можливості формування в умовах мікрогравітації гравірецепторного апарату коренів, які утворюються *de novo* в культурі *in vitro*.

© І. В. БУЛАВІН, 2013

ро. Для розв'язання цього питання перспективним є використання моделі ризогенезу з листкових експлантів і калусної тканини в космічних і наземних модельних експериментах.

Об'єкти та методи досліджень

Для досліджень обрані рослини *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., екотип Columbia (Col-0) і *scr* мутант, у якого формується один шар кори (Di Laurenzio et al., 1996). Стерилізацію насіння здійснювали 70 %-вим розчином спирту й 12 %-вим — гіпохлориту натрію («Білизна», Україна) з п'ятиразовим промиванням стерильною дистильованою водою. Перед культивуванням насіння стратифікували при температурі +4° С протягом 3 діб. Матеріал вирощували у скляній посудині об'ємом 250 мл на середовищі Мурасіге та Скуга (МС) при температурі 22—24° С із фотоперіодом 16/8 год (світло/темрява) та освітленні 93 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ протягом 21-ї доби.

На 22 добу культивування від рослин дико-го типу та *scr* мутанта відділяли сім'ядольні та справжні листки розетки разом із черешками завдовжки 0,3—0,5 см. Потім відрізали верхівки листків завдовжки 0,1—0,2 см і переносили листки на поживне середовище МС, що містило 1/10 частину мінеральних солей, без вітамінів і гормонів.

Для отримання калусної тканини на сім'ядольних листках і листках розетки 22-добових рослин робили насічки. Матеріал переносили на модифіковане середовище МС: гліцин — 3 мг/л, 2,4-Д — 1 мг/л, 0,05 %-вий кінетин, 2 %-ва глюкоза та 0,7 %-вий агар. Тривалість культивування — 30 діб. На 31 добу отриману калусну тканину переносили на середовище 1/10 МС для індукції ризогенезу. Культивування листових експлантів і калусної тканини здійснювали при температурі 22—24° С із фотоперіодом 16/8 год (світло/темрява) та за освітлення 7,4—9,3 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ протягом 12—14 і 20 діб.

Черешки листків і отримані в культурі *in vitro* корені фіксували у 2,5 %-вому глутаровому альдегіді на 0,1 М кокодилатному буфері (рН=7,2) при кімнатній температурі протягом 3 год, двічі промивали тим самим буфером, дофіксували 1 %-вим OsO₄ протягом 3 год, зневоднювали в спиртах висхідної концентрації та ацетоні, заливали в суміш епоксидних смол. Калусну тканину фіксували розчином 2,5 %-вого глутарового альдегіді на 0,1 М кокодилатному буфері (рН=7,2) при кімнатній температурі протягом 3 год, промивали тим самим буфером, зневоднювали в спиртах висхідної концентрації й толуолі, просочували парафіном (Паушева, 1974). Напівтонкі поперечні та поздовжні зрізи коренів і черешків (0,5—1,0 мкм) отримували на ультрамікромомі МТ-ХЛ (RMR Instruments, США), зрізи калусної тканини (8, 10 мкм) — на санному мікромомі МС-2. Забарвлювали 0,12 %-вим толудіновим синім, дослідження проводили на мікроскопі Axioscope (Carl Zeiss, Німеччина) з цифровою фотокамерою Canon PowerShot A 480. Частоту ризогенезу в культурі *in vitro* визначали як співвідношення кількості калусів або листових експлантів, що утворили корені, до їх загального числа у відсотках.

Результати досліджень і їх обговорення Регенерація коренів у калусній культурі

Для дослідження процесу утворення коренів у калусній культурі *A. thaliana* дикого типу та мутанта використовували первинний калус, оскільки здатність до ризогенезу знижувалася зі збільшенням кількості пасажів (Podlutsky, 1992). Формування калусної тканини на листових експлантах (середовище МС, у яке додали 2,4-Д) починалося на 8 добу культивування. При візуальному огляді на 31 добу ми відзначили, що калусна тканина була жов-

того, жовто-білого, жовто-біло-зеленого кольору, пухкою та легко розпадалася на окремі клітинні агрегати. Для індукції ризогенезу калусну тканину переносили на середовище 1/10 МС без вітамінів і гормонів. Аналізували 37 калусів дикого типу та 34 калуси мутанта. Корені появилися на поверхні калусної тканини на 8 добу культивування. Вони утворювалися по всій поверхні калусів, а кількість їх варіювала від 2—7 до 69. Частота ризогенезу була вищою в мутанта й становила 41,2 %, тоді як у дикого типу — 32,4 %. Процес морфогенезу корелює з появою трихом на поверхні калусної тканини. Так, за даними Н.І. Румянцевої та її співавторів (Rumyantseva et al., 2005), висока морфогенна активність калусів *Fagopyrum esculentum* Moench. була чітко пов'язана з формуванням трихом на їхній поверхні при субкультивуванні на поживному середовищі без додавання 2,4-Д або за низької концентрації цього регулятора росту. Припускається, що трихоми всмоктують воду та поживні речовини. Можливо також, що вони секретують різні речовини: жири, полісахариди, білки, флавоноїди і т.п.

Морфогенні осередки виникали на периферії калусної тканини на великій відстані або дуже близько один від одного й мали виражену зональність: центральну та периферичну зони (рис. 1, *a*). Зачаток кореня формувався саме з клітин центральної зони (рис. 1, *b*). Подальший ріст зачатків коренів відбувався за рахунок діяльності «меристеми» з утворенням гістогенних зон і розтягненням клітин.

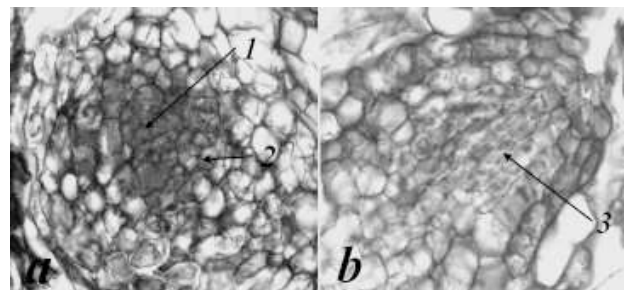


Рис. 1. Формування морфогенного осередка (*a*) й кореневого зачатка (*b*) у калусній тканині *Arabidopsis thaliana* дикого типу: 1 — центральна зона, 2 — периферична зона, 3 — зачаток кореня (світлова мікроскопія, × 980)

Fig. 1. Formation of the morphogenic locus (*a*) and the root primordium (*b*) in the *Arabidopsis thaliana* wild type callus tissue: 1 — central zone, 2 — peripheral zone, 3 — root primordium (light microscopy, × 980)

Ризогенез на листових експлантах

Було проаналізовано 318 листових експлантів *A. thaliana* дикого типу та 326 експлантів *scr* мутанта. Корені на черешках листових експлантів появилися на 5–6-ту добу культивування. Частота ризогенезу в мутанта становила 42,9 %, у дикого типу — 61,3 %. Кількість коренів на листовому експланті варіювала від 1–2 до 5–6, що обумовлено формуванням одного або декількох центрів із морфогенним потенціалом. При культивуванні сім'ядольних листків ризогенез індукувати не вдалося. В подібному експерименті, проведеному Д. Матсоном зі співавторами (Mattsson et al., 2003), утворення коренів також не спостерігалось. Тільки після додавання 3-індолілмасляної кислоти в концентрації 0,3 мг/л авторам вдалося індукувати ризогенез. Цей факт може бути підтвердженням того, що сім'ядолі містять ендогенний ауксин у незначній кількості.

У наших дослідях під час культивування справжніх листків найбільша частота утворення коренів спостерігалась у експлантів завдовжки 0,9–1,2 см. У експлантів більшої або меншої довжини здатність до ризогенезу зменшувалася (таблиця). У літературі є відомості про залежність морфогенетичного потенціалу від розміру експлантів і їхнього віку (Іванова, Митрофанова, 2010). Чим менший розмір культивованих тканин, тим нижча їх регенераційна здатність. Великі експланти з ділянками паренхіми, провідної тканини й камбієм можуть спонтанно індукувати морфогенез незалежно від концентрації регуляторів росту в живильному середовищі. Водночас помічено, що невеликі гомогенні ділянки епідермальних і субепідермальних тканин, вільні від корелятивного впливу інших тканин, можуть формувати складні структури — бруньки, пагони, корені (Кушнір, Сарнацька, 2005).

Частота утворення коренів на листових експлантах у відносних і абсолютних значеннях

| Довжина листового експланта, см | Дикий тип (Col-0) | Мутант (<i>scr</i>) |
|---------------------------------|--------------------|-----------------------|
| | частота ризогенезу | частота ризогенезу |
| 0,5–0,60 | 30,4 % (7\23) | 0 % (0\8) |
| 0,7–0,89 | 54,3 % (57\105) | 35,7 % (41\115) |
| 0,9–1,09 | 69,55 % (89\128) | 58 % (69\119) |
| 1,1–1,29 | 71,2 % (37\52) | 46 % (26\56) |
| 1,3–1,5 | 60 % (6\10) | 14,3 % (4\28) |
| Загальна частота ризогенезу | 61,6 % (196\318) | 42,9 % (140\326) |

У *A. thaliana* дикого типу й *scr* мутанта відзначено різницю в утворенні коренів у випадках адаксіального та абаксіального розміщення експлантів. При орієнтації експлантів адаксіальним боком по відношенню до живильного середовища корені не утворювалися, а на черешках спостерігалось формування лише невеликої кількості калусної тканини. Абаксіальне розміщення сприяло утворенню коренів. Г.П. Кушнір і В.В. Сарнацька (2005) відзначають, що морфогенна здатність поверхні листка генетично детермінована. Так, у рослин родини *Liliaceae* більшу регенеративну активність має адаксіальна поверхня лусок, у *Amaryllidaceae* — абаксіальна.

Черешки дикого типу й мутанта мали овальну форму з жолобоподібними заглибленнями на верхній боковій частині та тонкий шар кутикули. Під епідермою містилася хлоренхіма, яку пронизували один центральний і чотири бокові провідні пучки (рис. 2, *a*). Утворення коренів починалося з формування морфогенного осередка за рахунок поді-

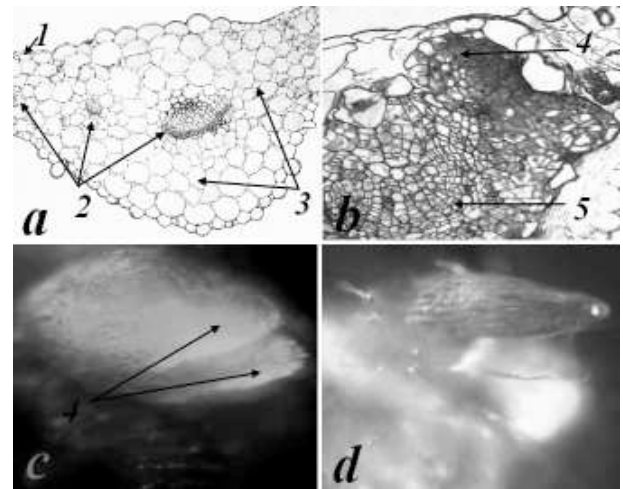


Рис. 2. Етапи ризогенезу на черешках листових експлантів *A. thaliana* дикого типу *in vitro*: *a* — поперечний зріз черешка; *b* — клітини пучкового камбію з наступним утворенням кореневого зачатка; *c* — зачаток кореня на поверхні черешка; *d* — корінь, сформований *de novo*; 1 — епідерма, 2 — провідні пучки, 3 — хлоренхіма, 4 — зачаток кореня, 5 — клітини камбію (світлова мікроскопія, *a*, *b* — $\times 200$; *c*, *d* — $\times 31,5$)

Fig. 2. Stages of rhizogenesis in the *A. thaliana* wild type leaf explant petioles *in vitro*: *a* — cross section of a petiole; *b* — cambium cells with formation of root primordium; *c* — root primordium on the petiole surface; *d* — root formed *de novo*; 1 — epidermis, 2 — vascular bundles, 3 — chlorenchyma, 4 — root primordium, 5 — cambium cells (light microscopy, *a*, *b* — $\times 200$; *c*, *d* — $\times 31,5$)

лу клітин камбію у провідному пучку. Далі з новоутворених клітин відбувалося формування зачатка кореня (рис. 2, *b*). Процеси утворення морфогенного осередка та кореневого зачатка тривали 3 доби. На четверту добу культивування на поверхні черешка експлантат з'являвся кореневий зачаток (рис. 2, *c*), на 5—6-ту — утворювався корінь (рис. 2, *d*).

Як вважається, морфогенетичні процеси в тканинах черешків пов'язані з транспортом регуляторів росту (ауксину), а також пластичних речовин. Після перенесення листових експлантів на середовище 1/10 МС фотосинтетичний процес продовжувався. Середні та бічні жилки переміщують ростові та пластичні речовини до черешків експлантів. Дослідження розподілу ендогенного ауксину в листках видів роду *Populus L.* (*P. alba L.*, *P. davidiana Dode*, *P. simonii Carriere*, *P. tomentosa Carriere*) імуногістохімічним методом показали (Dong et al., 2012), що досить висока концентрація цього регулятора росту спостерігалася в середній частині листової пластинки, тимчасом як у середній і базальній частинах черешка забарвлення було слабким. Після перенесення листків у культуру на середовище ½ МС і при подальшому їх культивуванні ступінь забарвлення зменшувався в середній частині листка й збільшувався в середній і базальній частинах черешка. Більше того, місцеve оброблення ТІБК (2, 3, 5,-трийодбензойна кислота — інгібітор полярного транспорту ауксина) листової пластинки запобігало акумуляції ІОК у середній і базальній частинах провідного пучка черешка, але не в мезофілі листової пластинки. Автори вважають це підтвердженням того факту, що накопичення ІОК у базальній частині черешка пов'язане з початком ризогенезу.

У наших дослідях корені дикого типу та мутанта *A. thaliana*, які утворилися на черешках листових експлантів, мали структуру, подібну до зародкових коренів (рис. 3, *a, b*). У дикого типу *A. thaliana* під епідермою містилася кора, в якій розрізнялися клітини паренхіми та ендодерми, а також центральний циліндр, що складався з перициклу та провідної тканини (рис. 3, *c*). Корені *scr* мутанта мали аналогічну будову, але кора в них утворена одним шаром клітин (рис. 3, *d*). Кореневий чохлак, що є гравірецепторним апаратом, у дикого типу та мутанта містить меристематичні клітини, стаатоцити на стадії диференціювання та зрілі стаатоцити, в яких амілопласти були в дистальній частині клітини, а ядро — в проксимальній. За стаатоцитами розташовувалися

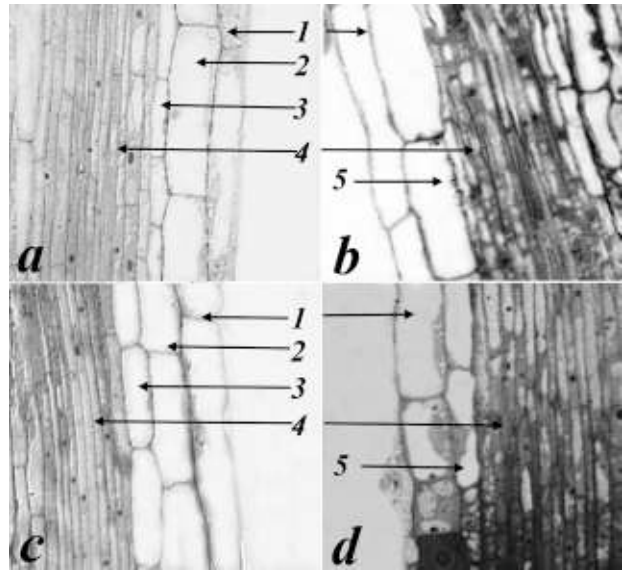


Рис. 3. Поздовжні зрізи зародкових коренів *A. thaliana* дикого типу (*a, c*) і *scr* мутанта (*b, d*) *in vivo* (*a, b*) та *in vitro* (*c, d*): 1 — епідерма, 2 — паренхіма, 3 — ендодерма, 4 — центральний циліндр, 5 — одношарова кора (світлова мікроскопія, *a* — $\times 1380$; *b, c, d* — $\times 1180$)

Fig. 3. Longitudinal sections of the *A. thaliana* embryonic roots of wild type (*a, c*) and *scr* mutant (*b, d*) *in vivo* (*a, b*) and *in vitro* (*c, d*): 1 — epidermis, 2 — parenchyma, 3 — endodermis, 4 — stele, 5 — one layer of cortex (light microscopy, *a* — $\times 1380$; *b, c, d* — $\times 1180$)

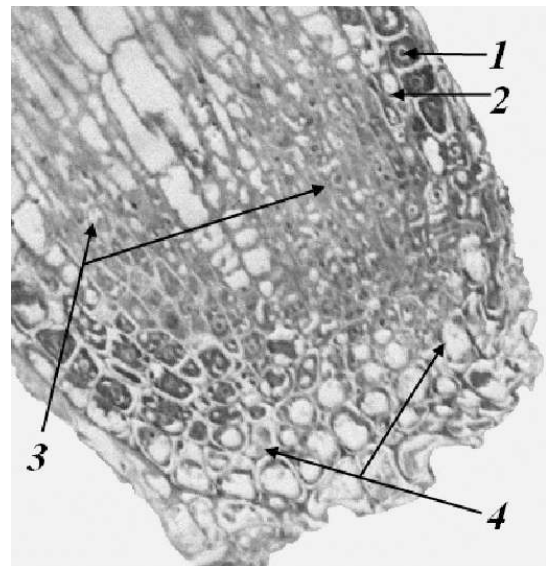


Рис. 4. Зрощені корені в калусній культурі *A. thaliana*: 1 — епідерма, 2 — паренхіма, 3 — центральний циліндр, 4 — кореневий чохлак (світлова мікроскопія, $\times 980$)

Fig. 4. Accreted roots in the *A. thaliana* callus culture: 1 — epidermis, 2 — parenchyma, 3 — stele, 4 — root cap (light microscopy, $\times 980$)

два шари секреторних клітин. Корені дикого типу досліджуваного виду та мутанта, отримані з калусів, мали аналогічну будову. Але водночас були й такі, що мали коротшу зону меристеми внаслідок зменшення кількості клітин із 20—30 до 4—15. Відзначено також утворення коренів, які зросталися між собою по всій довжині (рис. 4). Чохлики таких коренів теж або зросталися, або залишалися вільними. Припускається, що причиною їхнього зрощення є близьке розміщення морфогенних осередків.

Висновки

1. Формування коренів у калусній культурі на середовищі 1/10 МС без вітамінів і гормонів відбувалося шляхом утворення морфогенних осередків, які виникали на периферії калуса.

2. Ризогенез на черешках листових експлантів на середовищі 1/10 МС відбувався за рахунок поділу клітин камбію.

3. Корені *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта, отримані в культурі *in vitro*, мали анатомію, подібну до коренів інтактних рослин, проте в калусній культурі відзначено більшу їх різноманітність за анатомічними ознаками.

4. Враховуючи високу частоту ризогенезу, короткий термін культивування та типові анатомічні ознаки коренів, ми рекомендуємо використовувати модель ризогенезу на листових експлантах для експериментів у галузі гравітаційної та космічної біології.

Автор висловлює вдячність провідному інженеру Інституту ботаніки з відділу клітинної біології та анатомії Галині Федорівні Іваненко за допомогу при отриманні поздовжніх зрізів коренів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Иванова Н.Н., Митрофанова О.В. Органогенез *in vitro*: прямая регенерация в культуре листовых эксплантов двух сортов *Begonia riger elatior*. — 2010. — <http://botanicblog.ru/public/biotech-2010/stat305> (13.05.2013).
- Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. — К.: Наук. думка. — 2005. — 242с.
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — Изд. 2-е, перераб. и доп. — М.: Колос, 1974. — 288 с. с ил.
- Di Laurenzio L., Wysocka-Diller J., Malamy J.E., Push L., Helariutta Y., Freshour G., Hahn M.G., Feldmann K.A., Benfey P.N. The SCAR CROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root // Cell. — 1996. — 86(3). — P. 423—433.

- Dong N., Pei D., Yin W. Tissue-specific localization and dynamic changes of endogenous IAA during poplar leaf rhizogenesis revealed by *in situ* immunohistochemistry // Plant Biotechnol. Rep. — 2012. — 6(2). — P. 165—174.
- Kordyum E.L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // Int. Rev. Cyt. — 1997. — 171. — P. 1—78.
- Mattsson J., Ckurshumova W., Berleth T. Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development // Plant Physiol. — 2003. — 131(3). — P. 1327—1339.
- Perbal G., Driss-Ecole D. Polarity of statocytes in lentil seedling roots grown in space (Spacelab D1 Mission) // Plant. Physiol. — 1989. — 75(4). — P. 518—524.
- Podlitsky A.G. Ultrastructural analysis of organization of roots obtained from cell cultures at clinostating and under microgravity // Adv. Space Res. — 1992. — 12(1). — P. 93—98.
- Rumyantseva N.I., Salnikov V.V., Lebedeva V.V. Structural changes of cell surface in Callus of *Fagopyrum esculentum* Moench. during induction of morphogenesis // Rus. J. Plant Physiol. — 2005. — 52(3). — P. 381—387.

Рекомендує до друку
О.К. Золотарьова

Надійшла 14.05.2013 р.

И.В. Булавин

Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины,
г. Киев

РИЗОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* *ARABIDOPSIS THALIANA* ДИКОГО ТИПА И *SCR* МУТАНТА

Исследованы две модели ризогенеза в культуре *in vitro*: в калусной ткани и на листовых эксплантах *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., экотип Columbia (Col-0) и *scr* мутант. Показано, что корни, сформированные *de novo*, содержат все ростовые зоны, подобно зародышевым корням. Отмечено появление сросшихся корней, образовавшихся в калусной ткани. На основе полученных данных рекомендуется использование модели ризогенеза на листовых эксплантах для проведения экспериментов в области гравитационной и космической биологии.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana* (Col-0), *scr* мутант, калус, листовые экспланты, ризогенез.

I.V. Bulavin

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

RHIZOGENESIS OF *ARABIDOPSIS THALIANA* WILD TYPE AND *SCR* MUTANT *IN VITRO*

Two models of rhizogenesis *in vitro*, in the callus culture and leaf explants of *Arabidopsis thaliana* (L.) wild type (cv. Columbia) and *scr* mutant, were investigated. It was shown that roots formed *de novo* had a cap and all growth zones, similarly to those in embryonal roots. The appearance of adnated roots in the callus culture was noted. Based on the obtained data, the model of rhizogenesis from leaf explants is recommended for using in the experimental research in the field of gravitational and space biology.

Key words: *Arabidopsis thaliana* (Col-0), *scr* mutant, callus, leaf explant, rhizogenesis.