

## СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОРНЕЙ *Arabidopsis thaliana*, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ *in vitro*

© 2023 г. И. В. Булавин\*, @, А. И. Сидякин\*, \*\*

\*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН”, Никитский спуск, 52, Ялта, 298648 Россия

\*\*Институт биохимических технологий, экологии и фармации федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования “Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского”, просп. Академика Вернадского, 4, Симферополь, 295007 Россия

@E-mail: cellbiolnbs@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.09.2022 г.

После доработки 20.03.2023 г.

Принята к публикации 20.03.2023 г.

Изучены две модели ризогенеза у *Arabidopsis thaliana in vitro*: 1) из каллуса и 2) черешков листовых эксплантов на безгормональной питательной среде Мурасиге–Скуга, содержащей 1/10 часть от общего минерального состава, а также среде с добавлением регулятора роста – индолил-3-масляной кислоты. Морфолого-анатомические исследования показали изменения структуры корней, образованных *de novo in vitro*. Методом Сабинина–Колосова установлено снижение процента рабочей поверхности корней у обоих вариантов. Обсуждается возникновение структурных изменений при ризогенезе *in vitro*, а также их влияние на функциональность корней.

**Ключевые слова:** листовые экспланты, каллус, ризогенез *in vitro*, анатомия, функциональность

**DOI:** 10.31857/S1026347022600741, **EDN:** VVFEGQ

Растительный организм способен проявлять морфогенетический потенциал при переносе отдельных его частей в условия, крайне отличающиеся от природных, какими является культура *in vitro*. Под методом культуры *in vitro* понимается совокупность способов, позволяющих культивировать изолированные клетки, ткани и органы растений в стерильных условиях на питательных средах. В основе данного метода лежит уникальное свойство растительных клеток – тотипотентность – способность при определенных условиях дедифференцироваться и под влиянием внешних условий реализовывать тот или иной путь морфогенеза (Ахметова, Зарипова, 2019). Клональное микроразмножение – один из наиболее эффективных способов получения растительного материала в значительных объемах за достаточно короткий промежуток времени (Катаева, Бутенко, 1983; Manokari, 2021). Сам процесс клонального микроразмножения разделен на несколько этапов: 1) выбор объекта, 2) собственно микроразмножение, 3) укоренение микропобегов или депонирование, 4) адаптация. При этом следует отметить, что использование данного метода сопряжено с рядом проблем, которые касаются непосредственно специфики культивирования материала *in vitro* и дальнейшей его адаптации в среде *in vivo*. Укорене-

ние является важным этапом клонального микроразмножения для различных видов растений. Корневая система играет важную роль в поглощении воды и питательных веществ, газотранспортных процессах, росте и развитии растений, а также в механизмах защиты от биотических и абиотических воздействий. Известно, что процесс укоренения *in vitro* регулируется различными генетическими факторами, компонентами питательной среды, типом и концентрацией регуляторов роста (Amghar *et al.*, 2021). Современное промышленное размножение растений *in vitro* невозможно без использования регуляторов роста. Как правило, для укоренения используют аналоги индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). Отношение растительного материала *in vitro* к экзогенному ауксину, времени и способу его применения неоднозначно. Среди регуляторов роста обычно для индукции ризогенеза у растений используют индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) (Souza *et al.*, 2022), 1-нафталинуксусную кислоту (НУК) (Chi-ni, Schuyler, 1996; Тихомирова, 2010; Гусева и др., 2013; Souza *et al.*, 2022), ндолил-3-масляную кислоту (ИМК) (Rani *et al.*, 2003; Гусева и др., 2013; Souza *et al.*, 2022), а также безгормональные среды с уменьшенным содержанием макро-, и микроэлементов (Кушнir, Сарнацька, 2005). На питательных сре-

дах с различными регуляторами роста изучены гистологические аспекты формирования корней *in vitro* (Martínez Pastur *et al.*, 2005; Naija *et al.*, 2008), их морфология и анатомия (Reis *et al.*, 2017; Bulavin *et al.*, 2020; Jagiełło-Kubiec *et al.*, 2021; Manokari *et al.*, 2021), некоторые количественные признаки (Rogalski *et al.*, 2003; Jagiełło-Kubiec *et al.*, 2021; Soriano *et al.*, 2022), активность пероксидазы (Naija *et al.*, 2008), содержание эндогенной ИУК (Jagiełło-Kubiec *et al.*, 2021), накопление вторичных метаболитов (Reis *et al.*, 2017; Jagiełło-Kubiec *et al.*, 2021). Для безгормональных сред в большинстве работ исследователи указывают факт образования корней и определяют их количественные характеристики. Отмечается, что изучение особенностей ризогенеза *in vitro* с регуляторами роста и при их отсутствии является необходимым для понимания протекания данного процесса и возможности его регуляции (Rose *et al.*, 2006; Manokari *et al.*, 2021). Поскольку формирование корней в культуре *in vitro* может происходить путем прямого и непрямого органогенеза, нами было выбрано две модельные системы: ризогенез *in vitro* из черешков листовых эксплантов и каллусной ткани *Arabidopsis thaliana* на питательных средах без регуляторов роста и при их введении.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для введения в культуру *A. thaliana* (Col-0) семена стерилизовали 70% раствором спирта (45 с) и 5% раствором гипохлорита натрия (7 мин) с пятикратной промывкой стерильной дистиллированной водой, переносили в культуральные сосуды на модифицированную питательную среду Мурашиге-Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) без регуляторов роста с последующей стратификацией при +4°C в течение 3 сут. Материал культивировали при температуре +22–24°C с фотопериодом 16/8 ч (свет/темнота) и освещенности 93 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>.

Для индукции образования каллуса, розеточные листья отделяли от 22–40 дневных растений, делали насечки и помещали на модифицированную питательную среду МС, содержащую макро-, и микросоли, витамины (В1 – 0.1 мг/л, В6 – 0.5 мг/л, РР – 0.5 мг/л), глицин (3.0 мг/л), 2,4-Д (1.0 мг/л), кинетин (0.05 мг/л) и глюкозу (1.5%), агар-агар (0.7%). Культивирование материала осуществляли при температуре +22–24°C с фотопериодом 16/8 ч и освещенности 7.4–9.3 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>.

Ризогенез из каллусной ткани и в культуре листовых эксплантов индуцировали на питательной среде МС, содержащей 1/10 часть от общего минерального состава без регуляторов роста (1/10 МС), а также с добавлением ИМК (2.0 мг/л для индукции корней из каллуса). Культивирование материала осуществляли при температуре +22–24°C с

фотопериодом 16/8 ч и освещенности 7.4–9.3 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>.

Для анатомических исследований черешки листьев и, полученные в культуре *in vitro* корни, фиксировали в 2.5% глутаровом альдегиде на 0.1 М какодилатном буфере (рН 7.2) при комнатной температуре в течение 3 ч, дважды промывали тем же буфером, постфиксировали 1% OsO<sub>4</sub> в течение 3 ч, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и ацетоне, заливали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Калусную ткань помещали в фиксатор Кларка, промывали в 70% этаноле, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и толуоле, пропитывали парафином. Полутонкие поперечные и продольные срезы корней и черешков (0.5–1.0 мкм) получали на ультрамикротоме МТ-ХЛ (RMR Instruments, США) и Ultracut E (Reichert, Австрия), срезы калусной ткани (8, 10 мкм) – на санном микротоме МС-2 (Точмедприбор, Украина). Окрашивание проводили водным раствором толуидинового синего (0.12%), исследования выполняли на микроскопе Axioscope A1 (Carl Zeiss, Германия) и СХ41 (Olympus, Япония), оснащенном камерой SC 50 (Olympus, Германия) и программным обеспечением CellSens Imaging Software v. 1.17.

Для анализа ультраструктурной организации клеток корней *in vitro*, использовали материал, подготовленный для анатомических исследований. Продольные ультратонкие срезы (50–60 нм) получали на ультрамикротоме МТ-ХЛ, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе JEM 1230 (Jeol, Япония).

Определение общей, рабочей и недействительной поверхности корневой системы выполняли согласно методу Сабинина–Колосова (Панфилова и др., 2010) в модификации. Корни 10 суточных проростков, 14 дневных растений, и, полученные в культуре *in vitro*, последовательно погружали в три лунки 96-луночных планшетов с 200 мкл раствора 0.0003 н метиленовой сини (96.0 мг/1.0 дм<sup>3</sup>) на 1.5 мин в каждую. При двукратном погружении происходила адсорбция красителя на всей поверхности корней. При третьем погружении корней в раствор краситель поглощался только рабочей поверхностью корней. Концентрацию метиленовой сини определяли колориметрически, используя калибровочную кривую (рис. 1), расчеты площади поверхности корневой системы общей ( $S_{\text{общ}}$ ), рабочей ( $S_{\text{раб}}$ ) и недействительной ( $S_{\text{нераб}}$ ) рассчитывали по формулам:

$$S_{\text{общ}} = 1.05 \text{ мм}^2 A_{1+2},$$

$$S_{\text{раб}} = 1.05 \text{ мм}^2 A_3,$$

$$S_{\text{нераб}} = S_{\text{общ}} - S_{\text{раб}},$$

где: 1.05 м<sup>2</sup> – коэффициент пересчета,  $A_{1+2}$ ;  $A_3$  – количество метиленовой сини, адсорбированное

корнями в первом ( $A_1$ ), втором ( $A_2$ ) и третьем ( $A_3$ ) стакане. Статистический анализ проводили с использованием ПО Statistica 7.0 и Microsoft Office 2010 (Excel).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В семени *A. thaliana* развитие корня происходит из первичного корешка, который закладывается в зародыше одновременно с почечкой (Carpon *et al.*, 2009). После гидратации семенных оболочек и поступления воды к зародышу, запускаются ростовые процессы. Дальнейшее развитие корня происходит за счет деятельности его меристемы, боковые корни разных порядков формируются за счет делений перицикла, находящегося напротив элементов ксилемы (Péret *et al.*, 2009; Vanda *et al.*, 2019). В отличие от зародышевого корешка, корни в тканях черешка листовых эксплантов и каллусе формируются *de novo*. Согласно нашим данным, после удаления верхушки листовой пластинки, части черешка и переноса листовых эксплантов абаксиальной стороной на питательную среду 1/10 МС в проводящем пучке черешка индуцируются клеточные деления, приводящие к формированию зачатка корня (рис. 2а) и в последствии к полному его формированию за счет деятельности меристемы (от 6 дней) (рис. 2б). При более длительном культивировании у корней, сформированных *de novo* из тканей черешка листовых эксплантов, наблюдалось образование боковых корней.

2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) является наиболее распространенным ауксином для индукции каллусогенеза (Dalila *et al.*, 2013; Budisantoso *et al.*, 2017), применяемым обычно в концентрации 1,0–2,0 мг/л, а также в комбинации с другими регуляторами роста (Karimian *et al.*, 2014), поскольку под ее влиянием происходит дедифференциация клеток (Dalila *et al.*, 2013). В дальнейшем эффективность морфогенетических процессов в каллусе зависит от комбинации ауксина и цитокинина, внесенных в композицию питательной среды. Под действием цитокининов происходит стимуляция деления клеток, при этом оптимальное соотношение двух регуляторов роста усиливает клеточную дифференциацию (Park *et al.*, 2002). В наших исследованиях введение в состав питательной среды 2,4-Д (1,0 мг/л) и кинетина (0,05 мг/л) обеспечивало видимый каллусогенез на листовых эксплантах, начиная с 8 сут культивирования. Появлению клеток с неорганизованным ростом предшествовало набухание тканей и разрыв эпидермы. Отмечены разные места индукции клеток каллуса: в средней, верхней, базальной частях листового экспланта, а также и по всей его поверхности. Впоследствии увеличение объема непосредственно каллуса происходило за счет деления его клеток по периферии и в верхней

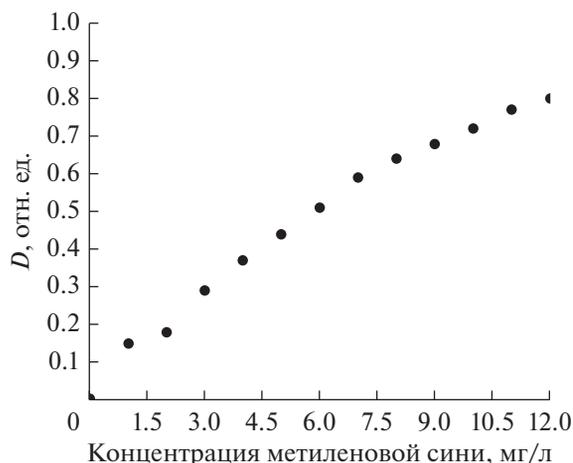


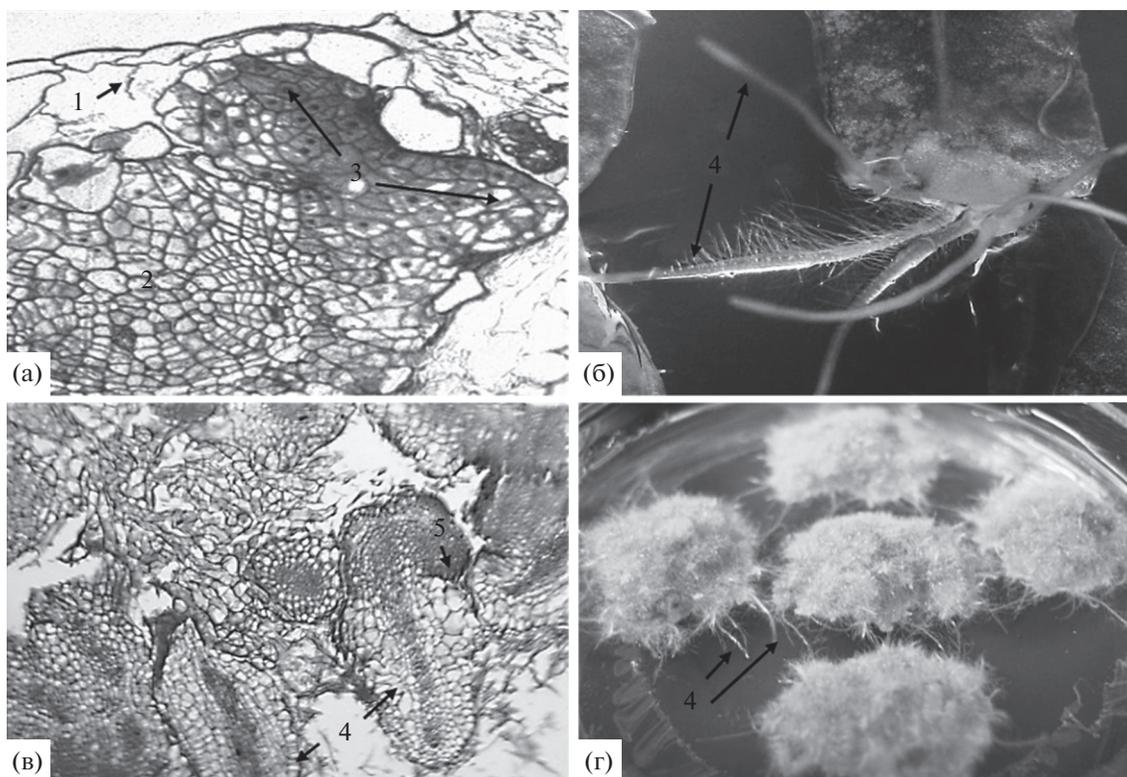
Рис. 1. Калибровочная кривая для метиленовой сини.

части. При переносе каллуса на питательную среду 1/10 МС, а также среду с ИМК инициировались процессы ризогенеза.

Морфогенез *in vitro* представляет собой сложный процесс, на который влияют эндогенные и экзогенные факторы. Проявление органогенного потенциала происходит только если клетки внутри экспланта “компетентны” или реагируют на специфические культуральные сигналы (Delporte *et al.*, 2014). По Де Клерк (De Klerk *et al.*, 1997) процесс формирования эмбриоидов, адвентивных побегов и корней *in vitro* можно разделить на несколько фаз: 1) приобретение компетенции, 2) индукция и 3) реализация. Первая фаза соответствует приобретению компетенции на этапе дедифференцировки; вторая – реакции клеток на органогенный стимул и их “готовности” к формированию специфического органа; третья – разворачиванию программы дифференциации.

Согласно гистологическим исследованиям, в каллусе формирование корней происходило из морфогенных очагов, находящихся на его периферии (рис. 2в). В отличие от ризогенеза у листовых эксплантов, образование боковых корней наблюдалось только при добавлении ИМК, в то время как на среде 1/10 МС такого эффекта не наблюдали.

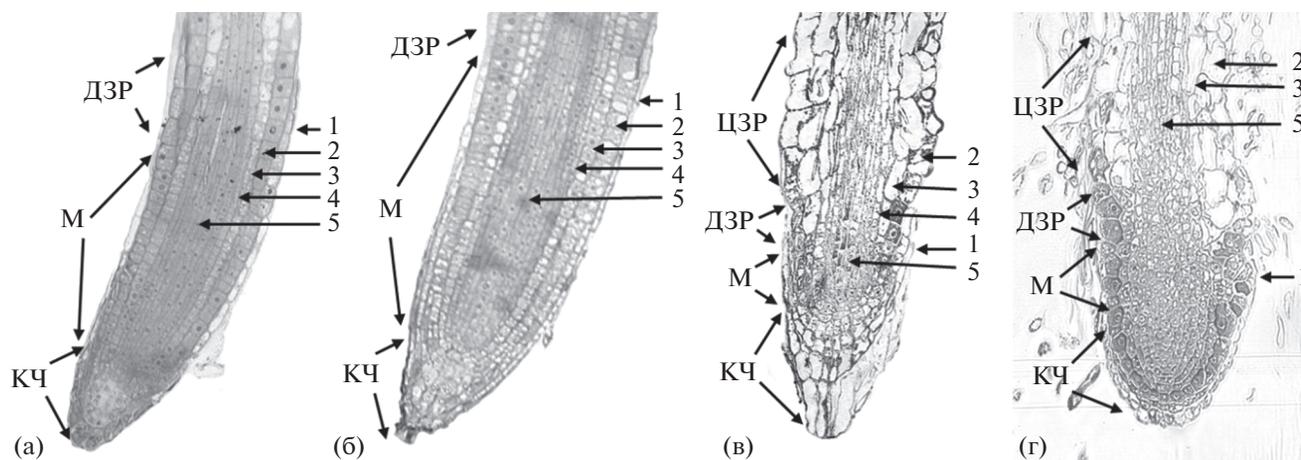
Исследования показали, что морфологически в корнях, образованных *de novo in vitro* всех вариантов формировался корневой чехлик и ростовые зоны собственно корня: меристема, растяжения (дистальная (ДЗР) и центральная (ЦЗР)), поглощения и проведения. На продольных срезах (рис. 3) в корневом чехлике различались колумелла и периферические клетки. Колумелла состояла из меристематических клеток, статоцитов на стадии дифференцировки, зрелых статоцитов и секреторных клеток. Периферические клетки окружали колумеллу и наблюдались в меристеме и дистальной



**Рис. 2.** Формирование корней *de novo in vitro* из тканей листового экспланта (а, б) и каллуса (в, г). 1 – мезофилл листового экспланта, 2 – проводящий пучок, 3 – зачаток корня, 4 – корень, 5 – меристематический очаг. Ув.  $\times 200$  (а, в),  $\times 31.5$  (б),  $\times 4.5$  (г).

зоне растяжения на поверхности покровной ткани. В ростовых зонах корня обнаружена однослойная эпидерма, двухслойная кора, в которой различались клетки паренхимы и эндодермы. Центральный цилиндр состоял из перицикла и проводящей ткани. При этом следует отметить образование сросшихся корней как в культуре листовых эксплантов (очень редко), так и при ризогенезе из каллуса (часто). Кроме того, для корней, сформировавшихся из каллуса, было характерно присутствие укороченной меристемы, а из листовых эксплантов – увеличенной по длине, в сравнении с таковой органов, полученных из семени (табл. 1). Наши результаты в отношении анатомических изменений *in vitro* находят свое подтверждение в литературе. Так, например, появление фасциаций является распространенным для стеблей растений, особенно на питательных средах, содержащих цитокинины (зеатин и 6-бензиламинопурин). Появление подобного рода органов связывают с увеличением размеров меристем и усилением роста стеблей растений (Piiev, Kitin, 2011). В литературе также отмечается и срастание корней при укоренении микропобегов (Bulavin *et al.*, 2020). В наших исследованиях показано формирование меристематических очагов на периферии каллуса и в проводящем пучке листовых эксплантов. Воз-

можно, из-за образования множественных очагов и происходящих в них активных делений происходит постепенное сближение первых и дальнейшие морфогенетические процессы приводят к срастанию органов или одна точка роста разделяется на несколько (Baigu, Kane, 2011). Гистоанатомические изменения также не являются редкостью при исследовании структуры органов растений *in vitro*. Так для корней микрочеренков *Betula nigra* L. и *Acer rubrum* L. показано формирование значительных по размерам межклетников, отмечена гипертрофированность клеток коры, явившаяся причиной аномально большой площади поперечного сечения органов. Исследователями также был сделан акцент и на более рыхлой упаковке проводящих элементов (McClelland *et al.*, 1990). В подобной работе при изучении микроструктурной стабильности регенерантов *Vitex negundo* L., полученных методом клонального микроразмножения, в корнях, образованных *in vitro*, отмечена паренхиматизированность коры, недоразвитость перидермы, эндодермы и сердцевины. Такого рода изменения в большей степени связывают с приспособительными реакциями культивируемых растений к комплексу специфических факторов условий среды *in vitro* (Вечернина и др., 2008).



**Рис. 3.** Продольные срезы корней *A. thaliana*, полученных из семени (а), листовых эксплантов (б) и каллуса на питательной среде 1/10 МС (в), каллуса на среде 1/10 МС с добавлением ИМК (г). КЧ – корневой чехлик, М – меристема, ДЗР – дистальная зона растяжения, ЦЗР – центральная зона растяжения; 1 – клетки корневого чехлика, 2 – эпидерма, 3 – паренхима коры, 4 – эндодерма, 5 – центральный цилиндр. Ув.  $\times 200$ .

Поскольку корни, полученные в культуре *in vitro* из каллуса, обладали видимыми морфолого-анатомическими изменениями, нами проведен ультраструктурный анализ клеток чехлика и некоторых ростовых зон корней, полученных *in vitro* из листовых эксплантов. В гиалоплазме дифференцированных статоцитов *A. thaliana in vitro* (рис. 4а) наблюдали ядро, вакуоли, митохондрии, амилопласты, эндоплазматический ретикулум и диктиосомы. Ядро по форме округлое или овальное, находилось в проксимальной части клетки. Вакуоли имели округлую форму и характеризовались электрон-прозрачным или гранулярным содержанием средней электронной плотности. В большинстве своем они размещались в проксимальной части статоцита, под ядром, иногда встречались в его средней части. Митохондрии, овальной или удлинённой формы содержали развитую систему крист, в матриксе присутствовали электрон-прозрачные участки. Популяция митохондрий обна-

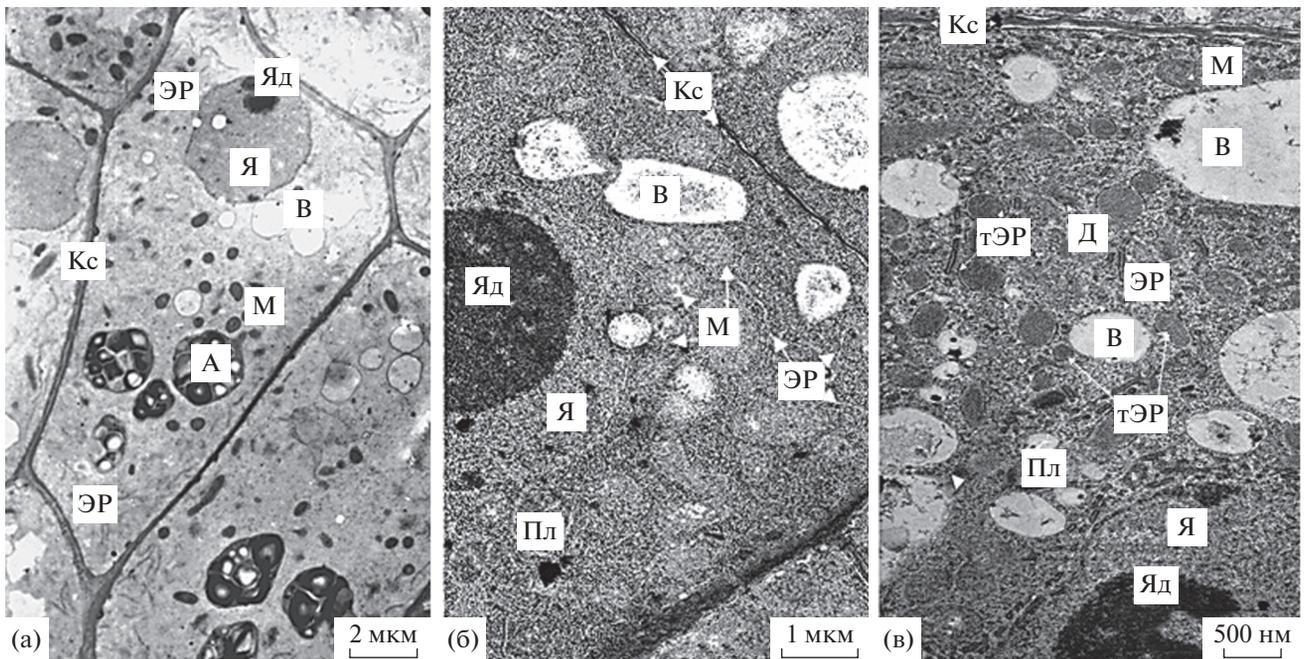
руживалась во всем объеме статоцитов. Амилопласты овальной или неправильной формы содержали электрон-плотную строму, в которой различались крахмальные зерна разного размера, формы и электронной плотности. Количество и плотность крахмальных зерен в амилопластах варьировала в зависимости от их размера. Амилопласты располагались в дистальной части статоцитов, над цистернами ЭПР. Отдельные цистерны имели удлиненную форму и размещались около продольных клеточных стенок, в то время как их скопления наблюдались в дистальной части статоцита, а также в углах проксимальной. Единичные диктиосомы встречались как в дистальной, так и в проксимальной части статоцита, состояли из 4–5 цистерн и характеризовались полярностью.

В протодерме корней (рис. 4б) в центре клеток наблюдалось округлое ядро, содержащее диффузный хроматин и ядрышко, диаметр которого со-

**Таблица 1.** Количественные показатели зон корней *A. thaliana*

Параметры	Корневой чехлик			Меристема			Дистальная зона растяжения		
	П	ЛЭ	К	П	ЛЭ	К	П	ЛЭ	К
Длина, мкм	66.21 $\pm$ 4.23	92.94 $\pm$ 3.47*	69.32 $\pm$ 4.9	144.78 $\pm$ 17.21	223.95 $\pm$ 18.42*	56.44 $\pm$ 2.54*	104.34 $\pm$ 3.37	101.89 $\pm$ 2.38	23.3 $\pm$ 1.72*
Ширина, мкм	76.25 $\pm$ 2.18	118.92 $\pm$ 3.48*	–	107.06 $\pm$ 2.17	158.11 $\pm$ 9.45*	–	110.68 $\pm$ 3.61	167.38 $\pm$ 9.77*	–
Количество клеток	5.67 $\pm$ 0.21	5.67 $\pm$ 0.21	5 $\pm$ 0.18	20.5 $\pm$ 1.96	27.67 $\pm$ 2.26*	6.83 $\pm$ 1.32*	8.67 $\pm$ 0.42	7.67 $\pm$ 0.8	2.5 $\pm$ 0.24*

Примечание. \* – статистически достоверные различия между одинаковыми параметрами в сравнении с первичными корнями;  $M \pm m$ ,  $n = 6$ ;  $p = 0.05$ ;  $t$ -критерий; П – корни проростков; ЛЭ – корни, образованные из листовых эксплантов; К – корни, образованные из каллуса.



**Рис. 4.** Ультраструктурная организация клеток корней *A. thaliana*, образованных в культуре *in vitro* из листовых эксплантов: а – статоциты, б – фрагмент клетки протодермы, в – фрагмент клетки ДЗР. А – амилопласт, В – вакуоль, Д – диктиосома, Кс – клеточная стенка, М – митохондрия, Пл – пластида, тЭР – тельце эндоплазматического ретикула, Я – ядро, Яд – ядрышко, ЭР – эндоплазматический ретикулум.

ставлял более половины ядра. В некоторых ядрышках обнаруживали ядрышковую вакуоль. Свободные рибосомы были самым распространенным компонентом гиалоплазмы и обуславливали ее высокую электронную плотность. Контуры органелл были не четкими на фоне интенсивно окрашенных рибосом. Пластиды были округлой или удлиненной формы с плотной стромой и слабо развитой внутренней мембранной системой. Округлой или удлиненной формы митохондрии имели развитые кристы и матрикс средней электронной плотности. Немногочисленные диктиосомы характеризовались тонкими контурами мембран и слабо выраженной полярностью. Эндоплазматический ретикулум был слабо развит, наблюдались мелкие вакуоли.

При переходе клеток из меристемы в ДЗР (рис. 4в) вакуоли постепенно увеличивались в объеме за счет слияния мелких органелл. Гиалоплазма в процессе роста клеток теряла электронную плотность вследствие уменьшения количества свободных рибосом. Ядро овальной или лопастной формы обычно занимало центральное положение или несколько смещалось. Эндоплазматический ретикулум был представлен длинными цистернами, на которых плотно размещались рибосомы. Форма и размеры пластид варьировали на срезах, хотя в основном наблюдались органоиды овальной или удлиненной формы. Некоторые пластиды содержали крахмальные зерна.

Диктиосомы приобретали характерную для зрелых органелл полярность и продуцировали многочисленные везикулы разного размера. В клетках эпидермы корней *A. thaliana*, сформированных из листовых эксплантов, четко обнаруживали овальные или удлиненные тельца ЭПР.

Согласно полученным нами данным, дифференциация клеток корней, полученных *in vitro* из тканей листовых эксплантов на безгормональной среде, происходит аналогично таковой корней *in vivo*, т.е. в двух противоположных направлениях: к базальной и апикальной частям органа за счет деятельности инициалей, проксимальная часть которых, по отношению к покоящемуся центру, формирует будущие клетки коры и центрального цилиндра, латеральная – эпидермы и периферических клеток корневого чехлика, дистальная – колумеллы (Pardal, Heidstra, 2021). Так для корневого чехлика, выполняющего функции органа восприятия (давление, влажность, гравитация) и защиты меристемы (Barlow, 2002), на уровне ультраструктуры показано формирование клеток колумеллы, в первую очередь статоцитов, которым, в зрелом состоянии, была присуща полярность, выраженная в расположении ядра в проксимальной части клетки, цистерн ЭПР – в дистальной (Hilaire *et al.*, 1997). Особенностью данного типа клеток также была незначительная вакуолизация, в сравнении с таковой периферических клеток, и наличие амилопластов, строма которых заполне-

**Таблица 2.** Показатели функциональности первичных корней и, полученных в культуре *in vitro*

Вариант	Площадь корневой системы					
	Общая		Рабочая		Недеятельная	
	мм <sup>2</sup>	% от общей площади	мм <sup>2</sup>	% от общей площади	мм <sup>2</sup>	% от общей площади
Проростки (10 сут)	3.191 ± 0.151	100.00	1.774 ± 0.07	55.59	1.417 ± 0.06	44.41
Растения (14 сут)	3.436 ± 0.170*		1.893 ± 0.08*	55.09	1.543 ± 0.07	44.91
Корни из листовых эксплантов (14 сут)	2.654 ± 0.130*		1.097 ± 0.04*	41.33	1.557 ± 0.07	58.67
Корни из каллуса (14 сут)	2.666 ± 0.133		0.989 ± 0.05*	37.10	1.677 ± 0.06	62.90

Примечание. \* – статистически достоверные различия между одинаковыми параметрами в сравнении с первичными 14 сут корнями;  $M \pm m$ ,  $n = 6$ ;  $p = 0.05$ ;  $t$ -критерий.

на крахмальными зернами. Клетки протодермы морфологически и структурно аналогичны меристематическим: отчетливо выделялось крупное ядро, остальные органеллы находились в гиалоплазме с большим количеством рибосом, что обуславливало ее высокую электронную плотность, плазматическая мембрана плотно прилегала к клеточной стенке (Whaley *et al.*, 1960). При переходе клеток в ДЗР постепенно происходили естественные изменения: их размеры увеличивались, гиалоплазма становилась менее электрон-плотной, увеличивалась вакуолизация, количество цистерн ЭПР, диктиосомы приобретали большую активность за счет продукции везикул. Также было заметным формирование телец ЭПР, представляющих собой расширения ГЭР, характерные для видов Brassicaceae (Iversen, 1970), и встречающиеся в клетках некоторых представителей семейств Parvaceae, Resedaceae (Bones *et al.*, 1989), Caraganeae, Tovariaceae (Behnke, Eschbeck, 1978). Согласно литературе тельца ЭПР у *A. thaliana* накапливают фермент класса гидролаз ( $\beta$ -гликозидазу РУК10) (Matsushima *et al.*, 2003), и по предположениям могут участвовать в защите растений от травоядных и патогенов (Nagano *et al.*, 2005). На сегодня в свободно доступных сведениях можно встретить отдельные исследования ультраструктурной организации клеток (Marín-Méndez *et al.*, 2009) и их органелл в каллусе (Климчук, 2001), листьев нормальных и витрифицированных побегов на этапе мультимпликации и укоренения (Louro *et al.*, 1999), зачатков корней в клеточных агрегатах (Tylicki *et al.*, 2000), в которых выявляли изменения в той или иной степени. Исследователями отмечено, что оптимально подобранные условия помогают минимизировать возникновение структурных перестроек (Wafa *et al.*, 2016).

Для характеристики функциональной активности корней *A. thaliana*, образованных из семени и, полученных путем прямого и непрямого органогенеза *in vitro*, нами проведен анализ их общей, рабочей и недейтельной поверхности. Для первичных корней на 10 и 14 сут (табл. 2) установлена общая площадь поверхности, при этом для последних наряду с увеличением общей поверхности на 7%, отмечено некоторое снижение функциональности органов. Так, у 10 сут растений рабочая площадь корней составляла 55.6% от общей, а у 14 дневных – 55.0%; при этом недейтельная площадь увеличивалась, что объясняется нормальными процессами развития органов и их общим увеличением. Данные, полученные при исследовании корней, индуцированных *de novo in vitro*, демонстрируют снижение общей площади поверхности на 22%. Корни, образованные из листовых эксплантов, в сравнении с таковыми 14 сут растений, характеризовались снижением рабочей площади и увеличением недейтельной части на 14%. Корни, индуцированные *de novo* из каллуса на среде 1/10 МС с ИМК, в сравнении с таковыми растений и образованными из листовых эксплантов, характеризовались еще большим снижением площади рабочей поверхности на 18% и 4%, соответственно. При этом недейтельная часть поверхности корней больше возрастала. Интегральным показателем работоспособности корневой системы является деятельная поверхность, которую составляют молодые корни и корневые волоски (Дуктова, 2018). Из литературных данных известно, что формирование деятельной поверхности корней зависит от многих факторов: типа субстрата, его минеральных компонентов, а также регуляторов роста (Zhang *et al.*, 2018). Кроме того, частично на структуру и функциональность корней может влиять непосредственно и гелеобразу-

ющий компонент питательной среды. Исследователями отмечено, что корни *Nemesia denticulata*, формировавшиеся на агаризированной питательной среде МС с половинным содержанием макро-, и микроэлементов имели более короткие корневые волоски, крупные клетки ризодермы и менее организованный корневой чехлик, в сравнении с таковыми, образованными на бумажной массе с добавлением жидкой питательной среды того же состава (Labrousse *et al.*, 2012). Возможно, причиной изменения функционального состояния корней *in vitro* является комплекс факторов, связанных непосредственно с условиями культивирования. Так индукция ризогенеза из листовых эксплантов происходила на среде 1/10 МС без регуляторов роста. Т. о. некоторое снижение функциональной активности органов могло происходить из-за наличия агар-агара в питательной среде. Образование корней из каллуса также индуцировали на питательной среде того же состава (с добавлением ИМК). Однако следует отметить, что до момента ризогенеза, каллусогенез поддерживали на среде, содержащей 2,4-Д, что не исключает накопление регуляторов роста в клетках. В источниках литературы имеются сведения о негативном влиянии вышеупомянутого регулятора роста на структуру корней, в виде укорочения органов и других структурных аномалий (Özkul *et al.*, 2016). Поскольку давно известна тесная связь структуры органа с выполняемыми им функциями, и, в свете выявленных анатомических изменений, можно предположить, что недействительная часть корней, т.е. апопласт, составленный из клеточных стенок и межклетников, более развит и, соответственно, имеет большую относительную площадь.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные четко продемонстрировали, что корни, образованные *de novo in vitro* из каллуса и черешков листовых эксплантов на питательной среде МС в присутствии ИМК и без регулятора роста могут характеризоваться морфолого-анатомическими изменениями, при этом степень отклонений в каллусной ткани выше, в сравнении с листовыми эксплантатами. Перестройки в анатомии корней (укорочение зон), образованных из каллуса, возможно, связаны с непосредственным влиянием 2,4-Д, при этом вероятной причиной срастания органов является близкое расположение морфогенных очагов. Из-за тесной взаимосвязи структуры органов и выполняемыми ими функциями, предполагается, что обнаруженные морфолого-анатомические изменения могут влиять на физиологические функции корней *in vitro*, снижая процент их рабочей поверхности.

Работа по исследованию функциональности корней *Arabidopsis thaliana* выполнена в рамках

Государственного задания № 122011700347-4 (FNNS-2022-0010) ФГБУН “НБС-ННЦ”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ахметова А.Ш., Зарипова А.А. Индукция морфогенеза лука неридоцветного в культуре *in vitro* // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 4. С. 540–544.
- Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К., Бородулина И.Д., Эрст А. Адаптация растений-регенерантов с использованием гидропоники // Известия АлтГУ. 2008. Т. 3. С. 7–10.
- Гусева К.Ю., Бородулина И.Д., Мякишева Е.П., Таварткиладзе О.К. Укоренение *in vitro* сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) // Известия АлтГУ. 2013. № 3 (79). С. 56–60.
- Дуктова Н.А. Физиологические аспекты селекции твердой пшеницы на устойчивость к корневым гнилям // Земледелие и растениеводство. 2018. № 6. С. 24–27.
- Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. 96 с.
- Климчук Д.О. Варіації ультраструктурної організації мітохондрій в клітинах гороху *in vitro* // Цитология и генетика. 2001. Т. 35. № 2. С. 36–42.
- Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. К.: Наук. Думка, 2005. 271 с.
- Панфилова О.Ф., Пильщикова Н.В., Фаттахова Н.К. Практикум по физиологии растений. М.: РГАУ-МСХА, 2010. 108 с.
- Тихомирова Л.И. Особенности индукции морфогенеза из различных фрагментов цветка ириса в культуре *in vitro* // Turczaninowia. 2010. Т. 13. № 3. С. 147–151.
- Amghar I., Ibriz M., Ibrahim M., Boudra A., Gaboun F., Meziani R., Iraqi D., Mazri M.A., Diria G., Abdelwahd R. *In vitro* root induction from argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) adventitious shoots: influence of ammonium nitrate, auxins, silver nitrate and putrescine, and evaluation of plantlet acclimatization // Plants. 2021. V. 10. <https://doi.org/10.3390/plants10061062>
- Banda J., Bellande K., von Wangenheim D., Goh T., Guyomarc'h S., Laplaze L., Bennett M.J. Lateral root formation in *Arabidopsis*: A well-ordered L-Rexit // Trends Plant Sci. 2019. V. 24. P. 826–839. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.06.015>
- Bairu M.W., Kane M.E. Physiological and developmental problems encountered by *in vitro* cultured plants // J. Plant Growth Regul. 2011. V. 63. P. 101–103.
- Barlow P.W. The root cap: cell dynamics, cell differentiation and cap function // J. Plant Growth Regul. 2002. V. 21. P. 261–286. <https://doi.org/10.1007/s00344-002-0034-z>
- Behnke H.-D., Eschlbeck G. Dilated cisternae in Capparales – an attempt towards the characterization of a specific endoplasmic reticulum // Protoplasma. 1978. V. 97. P. 351–363.
- Bones A.M., Evjen K., Iversen T.-H. Characterization and distribution of dilated cisternae of the endoplasmic reticulum in intact plants, protoplasts, and calli of Brassicaceae // Israel J. Bot. 1989. V. 38. P. 177–192.

- Budisantoso I., Amalia N., Kamsinah.* *In vitro* callus induction from leaf explants of *Vanda* sp. stimulated by 2,4-D // Biosaintifika. 2017. V. 9. № 3. P. 492–497. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v9i3.11018>
- Bulavin I., Brailov V., Zhdanova I.* *In vitro* rhizogenesis of the *Lavandula angustifolia* cultivars // BIO Web of Conferences. 2020. V. 24. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202400017>
- Capron A., Chatfield S., Provart N., Berleth T.* Embryogenesis: pattern formation from a single cell // The Arabidopsis Book. 2009. V. 7. e0126. <https://doi.org/10.1199/tab.0126>
- Chi-ni H., Schuyler S.K.* Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima* // PCTOC. 1996. V. 44. P. 1–6.
- Dalila Z.D., Jaafar H., Manaf A.A.* Effects of 2,4-D and kinetin on callus induction of *Barringtonia racemosa* leaf and endosperm explants in different types of basal media // Asian J. Plant Sci. 2013. V. 12. P. 21–27. <https://doi.org/10.3923/ajps.2013.21.27>
- De Klerk G.J., Arnholdt-Schmitt B., Lieberei R., Neumann K.-H.* Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects // Biol. Plant. 1997. V. 39. P. 53–66. <https://doi.org/10.1023/A:1000304922507>
- Delporte F., Pretova A., du Jardin P., Watillon B.* Morphology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat // Protoplasma. 2014. V. 251. P. 1455–1470. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0647-7>
- Hilaire E., Paulsen A.Q., Brown C.S., Guikema J.A.* Plastid distribution in columella cells of a starchless *Arabidopsis* mutant grown in microgravity // Plant Cell Physiol. 1997. V. 38. № 4. P. 490–494.
- Iliev I., Kitin P.* Origin, morphology, and anatomy of fasciation in plants cultured *in vivo* and *in vitro* // Plant Growth Regul. 2011. V. 63. P. 115–129. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9540-3>
- Iversen T.-H.* The morphology, occurrence, and distribution of dilated cisternae of the endoplasmic reticulum in tissues of plants of the Cruciferae // Protoplasma. 1970. V. 71. P. 467–477.
- Jagiello-Kubiec K., Nowakowska K., Lukaszewska A.J., Pacholczak A.* Morpho-anatomical and biochemical changes associated with rooting of micropropagated ninebark cuttings // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2021. V. 147. P. 229–237. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02119-x>
- Karimian R., Lahouti M., Davarpanah S.* Effects of different concentrations of 2,4-D and kinetin on callogenesis of *Taxus brevifolia* Nutt. // J. Appl. Biotechnol. Rep. 2014. V. 1. № 4. P. 167–170.
- Labrousse P., Delmail D., Decou R., Carlue M., Lhernould S., Krausz P.* Nemesia root hair response to paper pulp substrate for micropropagation // Sci. World J. 2012. Article ID 859243. <https://doi.org/10.1100/2012/859243>
- Louro R.P., Dos Santos A.V., Machado R.D.* Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. I. shoots cultivated *in vitro* in multiplication and elongation-rooting media // Int. J. Plant Sci. 1999. V. 160. № 2. P. 217–227. <https://doi.org/10.1086/314118>
- Manokari M., Priyadharshini S., Shekhawat M.* Microstructural stability of micropropagated plants of *Vitex negundo* L. // Microsc. Microanal. 2021. V. 27. № 3. P. 626–634. <https://doi.org/10.1017/S1431927621000283>
- Marín-Méndez W., Sanchéz-Chacón E., Gatica-Arias A.M., Ramírez-Fonseca P., Freer-Bustamante E., Valdez-Melara M.* Ultrastructure and histology of organogenesis induced from shoot tips of maize (*Zea mays*, Poaceae) // Rev. biol. trop. 2009. V. 57. Suppl. 1. P. 129–139.
- Martínez Pastur G., Arena M., Hernandez L., Curvetto N., Eliasco E.* Histological events during *in vitro* rooting of *Nothofagus nervosa* (Fagaceae) // N. Z. J. Bot. 2005. V. 43. № 1. 61–70. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2005.9512944>
- Matsushima R., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I.* A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a beta-glucosidase with an ER retention signal in *Arabidopsis* // Plant J. 2003. V. 33. P. 493–502. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01636.x>
- Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Plant Physiol. 1962. V. 15. P. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- McClelland M.T., Smith M.A.L., Carothers Z.B.* The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants // PCTOC. 1990. V. 23. P. 115–123.
- Nagano A.J., Matsushima R., Hara-Nishimura I.* Activation of an ER-body-localized  $\beta$ -glucosidase via a cytosolic binding partner in damaged tissues of *Arabidopsis thaliana* // Plant and Cell Physiol. 2005. V. 46. № 7. P. 1140–1148. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci126>
- Najia S., Elloumi N., Jbir N., Ammar S., Kevers C.* Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured *in vitro* // C. R. Biol. 2008. V. 331. № 7. P. 518–825. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.04.002>
- Özkul M., Özel Ç.A., Yüzbaşıoğlu D., Ünal F.* Does 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) induce genotoxic effects in tissue cultured *Allium* roots? // Cytotechnology. 2016. V. 68. P. 2395–2405. <https://doi.org/10.1007/s10616-016-9956-3>
- Pardal R., Heidstra R.* Root stem cell niche networks: it's complexed! Insights from *Arabidopsis* // J. Exp. Bot. 2021. V. 72. P. 6727–6738. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab272>
- Park J.B., Lee K.B., Lee S.* Histological study of callus formation and root regeneration from mung bean (*Vigna radiata* W.) // J. Plant Biol. 2002. V. 45. P. 170–176. <https://doi.org/10.1007/BF03030310>
- Péret B., De Rybel B., Casimiro I., Benková E., Swarup R., Laplaze L., Beeckman T., Bennett M.J.* *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story // Trends Plant Sci. 2009. V. 14. P. 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.05.002>
- Rani G., Arora S., Nagpal A.* Direct rhizogenesis from *in vitro* leaves of *Withania somnifera* (L.) Dunal // J. Herbs

- Spices Med. Plants. 2003. V. 10. P. 47–54.  
[https://doi.org/10.1300/J044v10n03\\_05](https://doi.org/10.1300/J044v10n03_05)
- Reis R.V., Chierrito T.P.C., Silva T.F.O., Albiero A.L.M., Souza L.A., Goncalves J.E., Oliveira A.J.B., Goncalves R.A.C. Morpho-anatomical study of *Stevia rebaudiana* roots grown *in vitro* and *in vivo* // Rev. bras. farmacogn. 2017. V. 27. P. 34–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.007>
- Rogalski M., Moraes L.K.A., Felisbino C., Crestani L., Guerra M.P., Silva A.L. Enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* // Rev. Bras. Frutic. 2003. V. 25. № 2. P. 293–296.
- Rose R.J., Wang X.-D., Nolan K.E., Rolfe B.G. Root meristems in *Medicago truncatula* tissue culture arise from vascular-derived procambial-like cells in a process regulated by ethylene // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. № 10. P. 2227–2235.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erj187>
- Soriano L., de Oliveira C.R., Muniz F.R., Machado I.S. *In vitro* rhizogenesis of *Ananas comosus* var. *erectifolius* under influence of synthetic auxins // Res. Soc. Dev. 2022. V. 11. № 5. e35511528055.  
<https://doi.org/10.33448/rsd-v11i5.28055>
- Souza J.A., Bettoni J.C., Costa M.D., Baldissera T.C., Mangrich dos Passos J.F., Primieri S. *In vitro* rooting and acclimatization of “Marubakaido” apple rootstock using indole-3-acetic acid from rhizobacteria // Communications in Plant Sciences. 2022. V. 12. P. 16–23.  
<https://doi.org/10.26814/cps2022003>
- Tylicki A., Burza W., Kuras M., Dziadczyk E., Malepszy S. Structural and ultrastructural analysis of root primordia *in vitro* cultures (RPC) of *Solanum lycopersicoides* Dun // Plant Sci. 2000. V. 156. № 1. P. 73–83.  
[https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(00\)00237-5](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(00)00237-5)
- Wafa S.N., Mat Taha R., Mohajer S., Mahmud N., Ahmed A.B.A. Organogenesis and ultrastructural features of *in vitro* grown *Canna indica* L. // BioMed Res. Int. 2016. V. 2016. Article ID 2820454.  
<https://doi.org/10.1155/2016/2820454>
- Whaley W.G., Mollenhauer H.H., Leech J.H. The ultrastructure of the meristematic cell // Am. J. Bot. 1960. V. 47. № 6. P. 401–449.  
<https://doi.org/10.2307/2439557>
- Zhang D.J., Yang Y.J., Liu C.Y., Zhang F., Wu Q.S. Root hair growth and development in response to nutrients and phytohormones / Root Biology. Soil Biology // Eds. Giri B., Prasad R., Varma A. Springer, Cham, 2018. V. 52. P. 65–84.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4_3)

## An *in vitro* *Arabidopsis thaliana* Root Structural and Functional Characterization

I. V. Bulavin<sup>1, #</sup> and A. I. Sidyakin<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Federal State Funded Institution of Science “The Labor Red Banner Order Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS”, Nikitskiy Spusk, 52, Str., Yalta, 298648 Russia

<sup>2</sup> Institute of Biochemical Technologies, Ecology and Pharmacy of Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “V.I. Vernadsky Crimean Federal University”, Academician Vernadsky Avenue, 4, Simferopol, 295007 Russia

#e-mail: cellbiolnbs@yandex.ru

Two models of *Arabidopsis thaliana* rhizogenesis *in vitro* were studied: 1) from callus and 2) leaf explants petioles on the Murashige and Skoog one-tenth strength hormone-free nutrient medium and also with the addition of the growth regulator such as indole-3-butyric acid. Morphological and anatomical studies show significant changes in the structure of the roots formed *de novo in vitro* from callus tissue, while the organs from leaf explant petioles were similar to those formed from the seed (primary). By Sabinin-Kolosov method, a decrease in the percentage of active root surface was established. Occurrence of the structural changes during *in vitro* rhizogenesis and their effect on root functionality are discussed.

**Keywords:** leaf explants, callus, rhizogenesis *in vitro*, anatomy, functionality