

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА  
ГЕНОМІКИ НАН УКРАЇНИ»

**БУЛАВІН ІЛЛЯ ВОЛОДИМИРОВИЧ**

УДК 576.3:57.043:581.43

**ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ КОРЕНІВ *ARABIDOPSIS  
THALIANA* (L.) НЕУНЦ. В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* В УМОВАХ  
КЛІНОСТАТУВАННЯ**

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертація є рукописом

Робота виконана у відділі клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України

**Науковий керівник:**

доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України  
**Кордюм Єлизавета Львівна,**  
Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного  
НАН України, завідувач відділу  
клітинної біології та анатомії

**Офіційні опоненти:**

доктор біологічних наук, старший  
науковий співробітник,  
**Кравець Олена Адольфівна,**  
ДУ «Інститут харчової біотехнології  
та геноміки НАН України»,  
провідний науковий співробітник

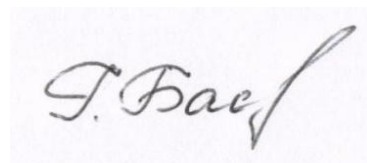
кандидат біологічних наук, старший  
науковий співробітник,  
**Лобачевська Оксана Василівна,**  
Інститут екології Карпат НАН  
України, завідувач відділу  
екоморфогенезу рослин

Захист відбудеться 10 жовтня 2017 р. о 11.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ-123, вул. Осиповського, 2а, тел./факс: (044) 434-37-77, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.

Автореферат розісланий «\_\_» ..... 2017 р.

Вчений секретар спеціалізованої  
вченої ради, к. б. н.



Баєр Г. Я.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** У зв'язку із сьогоденними планами людства освоєння космосу значно активізувалися дослідження впливу мікрогравітації на рослини з метою пізнання механізмів їхньої адаптації до цього чинника, з'ясування гравічутливості/гравізалежності базових клітинних процесів, що є необхідною теоретичною основою розробки технологій вирощування рослин в космосі, отже автотрофної ланки біорегенеративних систем життєзабезпечення та прогнозу надійності їхнього функціонування (Ferl et al., 2002; Kordyum, 2014; Ferl, 2015). Багаторічними дослідженнями встановлено ряд закономірностей впливу мікрогравітації на морфогенез, просторову орієнтацію та полярність органогенезу, фізіологію, біохімію клітинного метаболізму, експресію генів, репродукцію та диференціювання клітин, тобто процесів, що лежать в основі росту та розвитку організмів (Halstead, Dutcher, 1987; Kordyum, 1994, 1997, 2014; Perbal, Driss-Ecole, 1994; Edelmann, 1999; Ueda et al., 1999; Paul et al., 2012; Hoson, 2014; Mazars et al., 2014; Kiss, Kittang et al., 2015). Проте, не вирішено остаточно питання щодо впливу мікрогравітації на ріст і диференціювання клітин, в першу чергу гравірецепторних, хоча ці питання є ключовими для розуміння механізмів адаптації рослин до умов космічного польоту. Основними об'єктами досліджень в численних космічних і модельних експериментах слугували рослини *in vivo*, тобто ті, які виростили з насіння, що утворилося в наземних умовах. На прикладі рослин *Lepidium sativum* L. (Volkman et al., 1986), *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Тарасенко, 1985; Kiss, Edelmann, 1999), *Beta vulgaris* (Кордюм и др., 2008) показано, що в умовах мікрогравітації гравірецепторний апарат зародкових коренів інтактних проростків формується, але не функціонує у відсутності гравітаційного вектора. Результати досліджень *in vitro*, в яких використовували культуру протопластів (Rasmussen et al., 1992) та калусні культури (Сытник и др., 1984; Wang, 2006), в основному стосуються структурних і метаболічних змін. Існує лише одне повідомлення про відсутність центральної статенхіми, тобто статоцитів, в коренях, які утворилися *de novo* з калусу в культурі *in vitro* за умов мікрогравітації (Podlutzky, 1992). Залишаються відкритими питання щодо впливу мікрогравітації на органо-, та гістогенез, диференціювання гравірецепторних клітин кореневого чохла та клітин ростових зон коренів *in vitro*.

Тому, для досліджень була відібрана модельна система “Ризогенез *in vitro*”, в якій, на відміну від моделей *in vivo*, формування коренів, починаючи від перших поділів клітин до повного утворення органу відбувається в умовах модельованої мікрогравітації (кліностатування). Розширити та доповнити існуючі уявлення щодо гравічутливості/гравізалежності процесів органогенезу, за умов впливу реальної та модельованої мікрогравітації можна через використання модельних рослин із стійкими мутаціями, зокрема *scr* (*scarecrow*) та *shr* (*short root*), в яких порушується організація (радіальний патерн) кореня, що визначається дією двох транскрипційних факторів SHR та SCR, що регулюють асиметричні поділи клітин при формуванні двох ініціальних рядів клітин – периблеми та ендодерми (Di Laurenzio et al., 1996; Martinka, 2012).

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, тематиками.**

Дисертаційна робота виконувалась в рамках фундаментальних науково-дослідних робіт відділу клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України: 00112U004176 “Дослідження біологічної дії мікрогравітації на мембранному та клітинному рівнях (“Біолабораторія-М”)” – 2012-2013 рр.; 00113U002583 “Дослідження впливу мікрогравітації на фізико-хімічні властивості цитоплазматичної мембрани рослинних клітин (МЕМБРАНА)” – 2014 р.; 0115U002737 “Фізико-хімічні властивості біомембран рослинних клітин в умовах мікрогравітації: цитоплазматична та енергетичні мембрани” – 2015-2016 рр.

**Мета та завдання дослідження.** Метою роботи було з'ясування впливу кліноостатування на морфогенез та структурно-функціональну організацію клітин коренів *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта, утворених *de novo* в культурі *in vitro*.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

- відпрацювати методи індукції утворення коренів *in vitro* в калусній культурі та на листових експлантах;
- порівняти анатомічну структуру коренів дикого типу та *scr* мутанта, утворених в калусній культурі та на листових експлантах в контролі та в умовах кліноостатування;
- дослідити ультраструктуру клітин кореневого чохла та клітин ростових зон коренів, утворених *in vitro* в контролі та за умов кліноостатування;
- вивчити організацію актинового і тубулінового цитоскелету в клітинах ростових зон коренів трансгенних рослин *A. thaliana* GFP-MAP4 та GFP-FABD2 в контролі та за умов кліноостатування;
- охарактеризувати розподіл ауксину в апексах коренів трансгенних рослин *A. thaliana* DR5rev::GFP в контролі, умовах кліноостатування та при гравістимуляції.

**Об'єкт дослідження:** морфогенез і гравічутливість коренів, сформованих *de novo* в культурі *in vitro* за умов кліноостатування.

**Предмет дослідження:** вплив кліноостатування на анатомічну будову коренів, цитоскелет, ультраструктуру клітин та розподіл ауксину у кореновому апексі.

**Методи дослідження:** культура тканин *in vitro* (отримання калусу, індукція ризогенезу), світлова мікроскопія (дослідження анатомії коренів, утворених *in vitro*) трансмісійна електронна мікроскопія (вивчення ультраструктури клітин ростових зон коренів, утворених *in vitro*), конфокальна мікроскопія (дослідження орієнтації елементів цитоскелету в коренях *in vitro*, вивчення розподілу ауксин-залежного репортерного білка в коренях *in vivo* та *in vitro*), методи статистики.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше досліджено процеси морфогенезу коренів *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта в культурі *in vitro* в умовах модельованої мікрогравітації (кліноостатування). Показано, що формування коренів в культурі *in vitro* з листових експлантів відбувається шляхом поділу клітин пучкового камбію черешків, в калусній культурі – з морфогенних осередків калусної тканини. Встановлено, що диференціювання гравірецепторних клітин чохла та клітин ростових зон коренів *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта, які формуються *in vitro* з листових експлантів в стаціонарному контролі відбуваються

подібно до таких зародкових коренів. В коренях, утворених з калусу відзначено анатомічні зміни: зменшення довжини ростових зон, фасціація. Показано, що при кліностатуванні формування кореневого чохла та ростових зон коренів *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта, утворених з листових експлантів відбувається подібно до контролю. Виявлено зміни локалізації амілопластів в статоцитах, ультраструктурні перебудови мітохондрій в клітинах меристеми та дистальній зоні розтягу (ДЗР). Прогресуюча вакуолізація, збільшення розмірів ER-тілець, перебудови організації тубулінового цитоскелету в зоні розтягу підтверджують той факт, що місце сприйняття гравітаційного стимулу та власне ростові реакції (тропізми) у рослин є просторово роз'єднаними, і як наслідок найбільші зміни фіксуються в зонах активно метаболізуючих клітин (де відбувається дуже швидкий ріст клітин). Доведено, що корені, сформовані в культурі *in vitro* в умовах модельованої мікрогравітації, є фізіологічно активними. Одержані дані чітко доводять можливість реалізації генетично детермінованої програми морфогенезу та диференціювання клітин за умов модельованої мікрогравітації.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані дані можуть застосовуватись для подальших дослідницьких робіт та експериментальних розробок модельних систем з метою виявлення структурних та функціональних закономірностей адаптації рослин до умов реальної та модельованої мікрогравітації. Результати дослідження можуть використовуватись в учбовому процесі при підготовці спеціалістів з клітинної біології та при розробці експериментів щодо впливу умов реальної мікрогравітації.

**Особистий внесок здобувача.** Спільно з науковим керівником було сформульовано проблему, обрано тему дисертаційної роботи, визначено об'єкт та напрямок експериментального вирішення проблеми. Дисертація є самостійною роботою здобувача.

**Апробація результатів.** Основні положення дисертації доповідались на XIV міжнародній молодіжній науково-практичній конференції “Людина і космос” (11–13 квітня, 2012, Дніпропетровськ, Україна); міжнародних конференціях молодих учених “Актуальні проблеми ботаніки та екології” (19–23 вересня, 2012, Ужгород, Україна; 18–22 червня 2013, Щолкіне, Крим; 9–12 вересня, 2014, Умань, Україна); VII міжнародній конференції молодих науковців (20–23 листопада, 2012, Харків, Україна); 13-й, 14-й та 15-й Українських конференціях з космічних досліджень (2–6 вересня, 2013, Євпаторія, Крим; 8–12 вересня, 2014, Ужгород, Україна; 24–28 серпня, Одеса, Україна, 2015); Biennial International Symposium on ELGRA (11–14 September, 2013, Vatican City, Rome); Міжнародній конференції “Геноміка рослин та біотехнологія” та другій конференції молодих учених “Біологія рослин та біотехнологія”, (23–24 грудня, 2013, Київ, Україна); Plant Biology and Biotechnology International Conference (28–30 May, 2014, Almaty, Kazakhstan).

**Публікації.** Отримані в ході дослідницької роботи результати були опубліковані в 16 наукових працях, з яких 4 статті у провідних фахових виданнях, 1 стаття в зарубіжному науковому виданні та 11 тез доповідей.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація викладена на 159 сторінках друкованого тексту, містить 9 таблиць, 36 рисунків і складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, експериментальної частини з

обговоренням результатів роботи, узагальнення, висновків, списку використаних джерел, який містить 254 посилань, та додатка.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

В огляді літератури висвітлені уявлення щодо впливу умов реальної та модельованої мікрогравітації на анатомію рослин, ультраструктуру клітин, організацію актинового та тубулінового цитоскелета, розподіл ауксину. Підкреслюється, що більшою мірою дослідження проводилися на зародкових коренях, що утворилися з насіння в умовах 1g. Зазначається обмеженість досліджень щодо регенерації рослин *in vitro* для вивчення процесів гістогенезу та клітинного диференціювання, в першу чергу гравірецепторного апарату, в умовах реальної та модельованої мікрогравітації.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для досліджень обрані рослини *A. thaliana* (L.) Heynh., екотип Columbia (Col-0), *scr* мутант, у якого одночасно формується одно-, та двошарова кора (Di Laurenzio et al., 1996; Martinka, 2012) та трансгенні рослини: GFP-FABD2 (Voight et al., 2005), GFP-MAP4 (Marc et al., 1998), DR5::revGFP (Geisler et al., 2014). Перші дві трансгенні лінії є модельними для прижиттєвої візуалізації актинового і тубулінового цитоскелету, відповідно, а DR5::revGFP – візуалізації ауксин-залежного репортерного білка. Стерилізацію насіння здійснювали 70 %-вим розчином спирту та 12 %-вим розчином гіпохлориту натрію («Білизна», Україна) з п'ятиразовим промиванням стерильною дистильованою водою. Перед культивуванням насіння стратифікували при температурі +4 °C протягом 3 діб. Матеріал вирощували в скляній посудині об'ємом 250 мл на середовищі Мурасіге та Скуга (МС) (Murashige-Skoog, 1962) при температурі 22–24 °C із фотоперіодом 16/8 год (світло/темрява) та освітленні 93 мкмоль·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> протягом 21-ї доби.

Для отримання калусної тканини на сім'ядольних листках і листках розетки 22-добових рослин дикого типу та *scr* мутанта, 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 (Kordyum et al., 2008). 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 °C із фотоперіодом 16/8 год (світло/темрява) та освітленні 7,4–9,3 мкмоль·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> протягом 12–14 і 20 діб.

Для дослідження анатомії та ультраструктури клітин, корені дикого типу та мутанта, отримані *de novo*, відокремлювали від листового експланта за допомогою пінцета і їхні сегменти, довжиною близько 1,5 см, фіксували в розчині 2,5% глютарового альдегіду на 0,1 М кокодилатном буфері (рН 7,2). Постфіксацію виконували 1% OsO<sub>4</sub> на тому ж буфері. Матеріал зневоднювали за загальноприйнятою методикою в спиртах висхідної концентрації та ацетоні, заливали в суміш епон-аралдіт (Carde, 1986). Зрізи 0,5–1,0 мкм та 50–60 нм для анатомічних та ультраструктурних досліджень виготовляли на ультрамікросомі МТ-

XL (“RMR Instruments”, США). Зрізи 0,5–1,0 мкм забарвлювали 0,12 %-вим толуїдиновим синім, дослідження проводили на мікроскопі Axioscope (“Carl Zeiss”, Німеччина) з цифровою фотокамерою Canon PowerShot A 480. Напівтонкі зрізи (50–60 нм) переносили на бленди з підкладкою з формвара, контрастували уранілацетатом і цитратом свинцю і досліджували за допомогою електронного мікроскопа JEM 1230 (“Jeol”, Японія). Отримані негативи сканували в програмі HP Precisionscan Pro 3.1. На цифрових фотографіях вимірювали парціальні об’єми органел, площу клітин епідерми і товщину клітинних стінок в програмі ImageTool v. 3.00 (UTHSCSA).

Візуалізацію мікротрубочок, мікрофіламентів та ауксину в коренях трансгенних рослин здійснювалась за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа LSM5 Pascal (“Zeiss”, Німеччина) з лінзами Plan Neofluar (вихід флюоресценції в області 488 нм, збір флюоресценції в 500–600 нм).

Обробку даних було проведено за допомогою програми Excel 7 (Microsoft Office 2007). Всі отримані числові значення тестували на нормальність розподілу значень у вибірці. Визначення достовірності різниці отриманих даних здійснювали за критерієм Стюдента (T-test) ( $p \leq 5\%$ ) для незалежних вибірок з нормальним розподілом та критерієм Манна-Уїтні (U-test) ( $p \leq 5\%$ ) для незалежних вибірок з розподілом, що відрізнявся від нормального. Всі дані представлені у формі  $M \pm m$ , де  $M$  – середнє арифметичне,  $m$  – середнє арифметичне відхилення (Baran et al., 2008).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Утворення коренів *de novo* з калусної тканини.** Калусну тканину отримували з листків рослин *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта. Листки розетки відрізали, робили насічки по периферії і переносили абаксіальною стороною на живильне середовище МС з додаванням 2,4-Д у концентрації 1 мг/л. На 30 добу культивування калусна тканина була жовто-біло-зеленого кольору, пухкою та легко розпадалася на окремі клітинні агрегати. Отриманий первинний калус переносили у чашки Петрі з живильним середовищем 1/10 МС для індукції ризогенезу. За нашими даними успішна індукція ризогенезу відбувалася на світлі і залежала від розмірів самої калусної тканини.

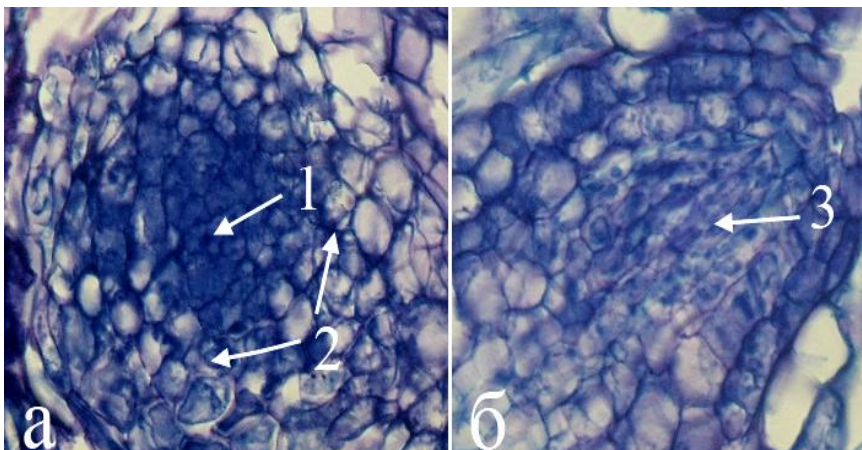


Рис. 1. Морфогенний осередок (а) та кореневий зачаток (б) у калусній тканині *A. thaliana* дикого типу: 1 – центральна зона, 2 – периферична зона, 3 – зачаток кореня (світлова мікроскопія,  $\times 980$ ).



Корені у дикого типу та мутанта утворювалися на калусах, середній об'єм яких був  $0,72 \text{ см}^3$ , тобто довжина, ширина та висота дорівнювали 1,2; 1 та 0,5 см відповідно. Корені утворювалися по всій поверхні калусів, а їхня кількість варіювала від 2–7 до 69. Висока морфогенетична здатність калусів корелювала з появою трихом на їхній поверхні, що узгоджуються з даними літератури (Rumyantseva et al., 2005).

При цитоморфологічному дослідженні отриманих калусних культур нами були виявлені осередки гістогенезу – трахеєподібні елементи, паренхімні і меристематичні типи клітин. Морфогенні осередки виникали на периферії калусної тканини на великій відстані або дуже близько один до одного і мали виражену зональність: центральну та периферичну зони (рис. 1, а). Зачаток кореня формувався саме з клітин центральної зони (рис. 1, б).

**Утворення коренів *de novo* з черешків листкових експлантів.** При дослідженні моделі ризогенезу з черешків листкових експлантів в контролі було проаналізовано 318 листкових експлантів *A. thaliana* дикого типу та 326 експлантів *scr* мутанта. Появу коренів на черешках листкових експлантів відзначено на 5–6 добу культивування. Частота ризогенезу у мутанта складала 42,9 %, у дикого типу – 61,3 %. Кількість коренів на листовому експланті варіювала від 1–2 до 5–6. Найбільшу частоту утворення коренів спостерігали на експлантах із справжніх листків довжиною 0,9–1,2 см та при розташуванні експлантів нижньою стороною по відношенню до живильного середовища. Утворення коренів починалось з формування морфогенного осередка за рахунок поділу клітин камбію у провідному пучку. Далі з новоутворених клітин відбувалось формування зачатка кореня (рис. 2, б).

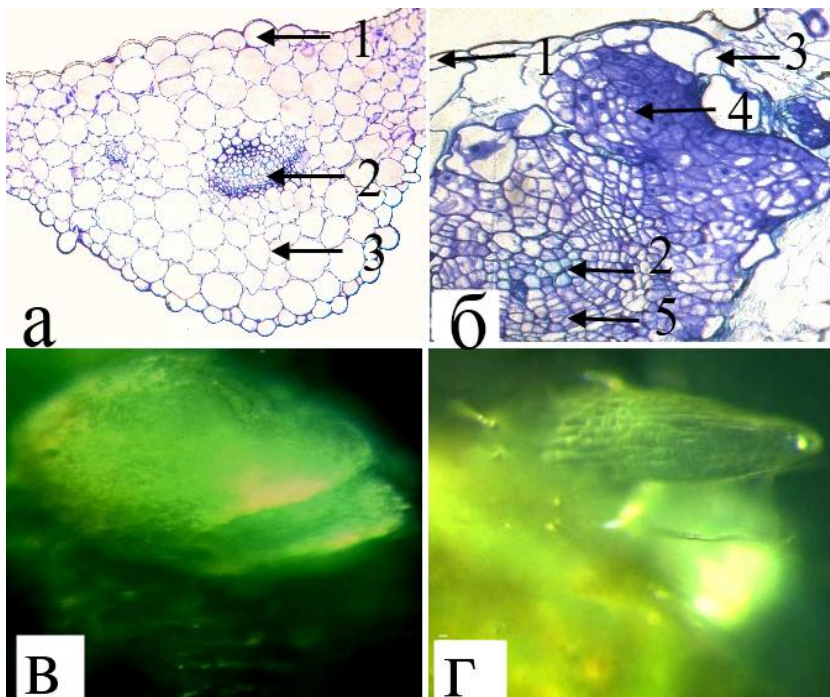


Рис. 2. Послідовні етапи ризогенезу на черешках листкових експлантів *A. thaliana* дикого типу *in vitro*: а – поперечний зріз черешка; б – клітини пучкового камбію з наступним утворенням кореневого зачатка; в – зачаток кореня на поверхні черешка; г – корінь, сформований *de novo*; 1 – епідерма, 2 – провідні пучки, 3 – хлоренхіма, 4 – зачаток кореня, 5 – клітини камбію (світлова мікроскопія, а, б – х 200; в, г – х 31,5).

Процеси формування морфогенного осередка та кореневого зачатка займали 3 дні. На четвертий день культивування кореневий зачаток з'являвся на поверхні черешка



експланта (рис. 2, в), на 5–6 день формувался корінь (рис. 2, г).

**Анатомічна будова коренів *in vivo* та *in vitro* в умовах стаціонарного контролю.** Корені дикого типу та мутанта *A. thaliana*, які утворилися на черешках листових експлантів, морфологічно, мали структуру, подібну до зародкових коренів. Анатомічно, у дикого типу під епідермою містилася двошарова кора, в якій розрізнялися клітини паренхіми та ендодерми, а також центральний циліндр, що складався з провідної тканини, оточеної перициклом. Корені *scr* мутанта мали епідерму, але в корі відзначено мозаїчність: одночасно спостерігалось формування одного та двох шарів клітин. Кореневий чохлик, що є гравірецепторним апаратом, у дикого типу та мутанта містив меристематичні клітини, статоцити на стадії диференціювання та зрілі статоцити, в яких амілопласти були в дистальній частині клітини, а ядро – в проксимальній. За статоцитами розташовувалися два шари секреторних клітин.

На прикладі дикого типу показано певні статистично достовірні відмінності анатомічних кількісних ознак між коренями, сформованими *in vivo* та *in vitro*. Відзначено збільшення довжини та ширини кореневого чохлика, меристеми та дистальної зони розтягу, кількості клітин меристеми, розмірів клітин епідерми та кори. Ймовірно, що зазначені відмінності пов'язані із змінами у процесах росту клітин та їхньої проліферації в культурі *in vitro*.

Корені *A. thaliana* дикого типу та мутанта, отримані з калусів, мали анатомію подібну до зародкових коренів. Проте кількісні анатомічні дослідження виявили коротшу зону меристеми внаслідок редукції кількості клітин з 20 до 4–15. Відзначено також появу морфозів – фасціацій коренів, які зросталися між собою частково або по всій довжині (рис. 3). В літературі фасціація *in vitro* описана як відхилення від нормальної діяльності меристеми, або ж як трансформація однієї точки росту в цілу їхню лінію (Clark et al., 1993; Vairu, Kane, 2011).

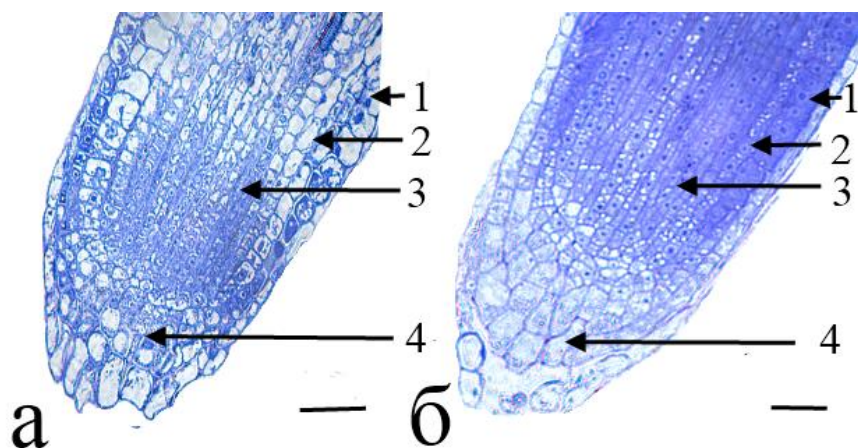


Рис. 3. Апекси зрощених коренів, утворених з калусної тканини *A. thaliana* дикого типу (а) та *scr* мутанта (б): 1 – епідерма, 2 – паренхіма, 3 – центральний циліндр, 4 – кореневий чохлик (світлова мікроскопія). Масштаб – 20 мкм.

Дослідження показали, що на відміну від коренів, сформованих з калусу, які характеризуються значними якісними та кількісними змінами в анатомічній будові, корені, утворені з листових експлантів *in vitro*, за анатомією подібні до зародкових коренів. Відмінності за кількісними ознаками значно не відображаються на загальній будові коренів. В подальших дослідженнях щодо впливу модельованої

мікрогравітації використовували корені *in vitro*, утворені з листкових експлантів.

**Анатомія коренів при дії кліностагування.** При дослідженні коренів, що формувалися на листкових експлантах в умовах кліностагування не було виявлено суттєвих відхилень в анатомічній будові від контролю (рис. 4).

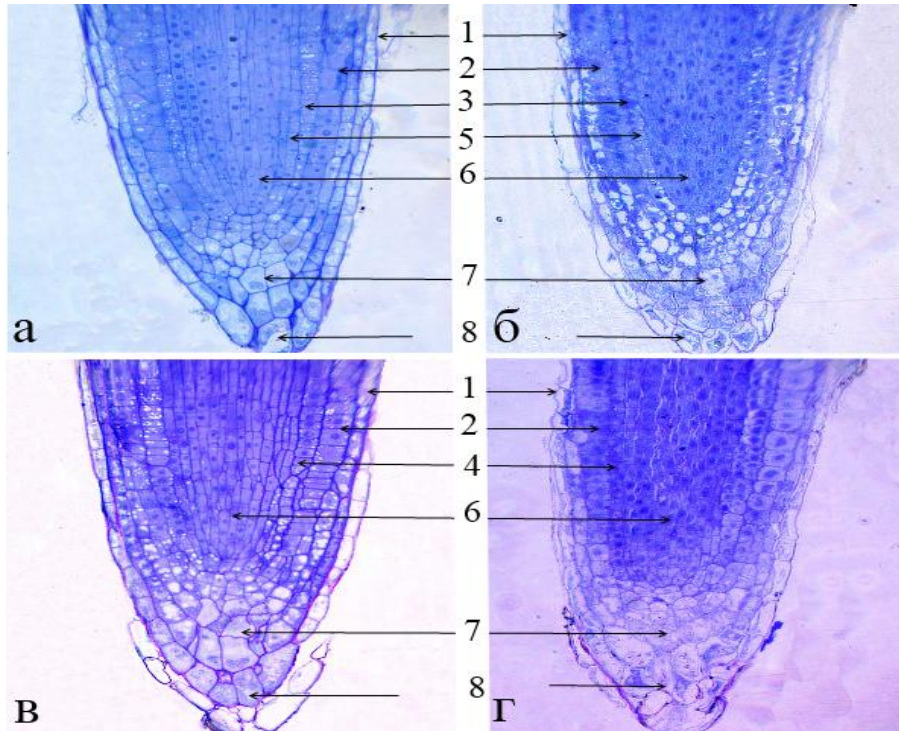


Рис. 4. Апекси коренів дикого типу (а, б) та *scr* мутанта (в, г), утворених *de novo* на листкових експлантах в контролі (а, в) та при кліностагуванні (б, г): 1 – периферичні клітини, 2 – епідерма, 3 – паренхіма, 4 – шар кори мутанта, 5 – ендодерма, 6 – центральний циліндр, 7 – статоцити, 8 – секреторні клітини (світлова мікроскопія;  $\times 400$ ).

Таблиця 1

**Параметри ростових зон коренів, утворених *in vitro* з листкових експлантів**

Варіант	Рослини	Кореневий чохлак		Меристема		ДЗР	
		Довжина (мкм)	Ширина (мкм)	Довжина (мкм)	Кількість клітин	Довжина (мкм)	Кількість клітин
Контроль	Дикий тип	99,5	101,52	223,4	22,67	95,51	6,13
		$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		2,01	1,16	10,87	1,2	6,06	0,41
	Мутант	97,97	93,05	219,07	22,13	96,3	6,47
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
		2,84	3,62	13,65	1,18	7,33	0,48
Кліностаг	Дикий тип	98,93	103,64	237,07	25,13	94,37	6,6
		$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		2,84	1,71	10,98	0,99	5,95	0,4
	Мутант	96,09	91,93	222,87	25,2	97	6,53
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
		3,98	2,54	13,29	1,61	6,24	0,45

В кореновому чохлаку виділяли колумелу та периферичні клітини. В колумелі спостерігали меристематичні клітини, зрілі статоцити та секреторні клітини. Периферичні клітини оточували колумелу, формуючи захисний чохол, та спостерігали на поверхні покривної тканини в зоні меристеми і ДЗР.

Дослідження довжини та ширини корневих чохлаків дикого типу та мутанта, а також довжини ростових зон коренів не виявили статистично достовірної різниці між контролем та кліноостатом (табл. 1).

У літературі існують суперечливі дані. Деякі дослідники відзначали зменшення меристематичної зони ембріональних коренів за умов реальної та симульованої мікрогравітації (Perbal et al., 1987; Бармичева, 1989), інші спостерігали збільшення довжини та посилення клітинного поділу (Matia et al., 2010) або відсутність статистично достовірної різниці (Lorenzi, Perbal, 1990; Volkmann et al., 1986). Порівняння отриманих нами даних на коренях, утворених *in vitro*, з літературними відомостями стосовно коренів інтактних проростків засвідчує, що певні розбіжності результатів, імовірно, залежать від тривалості експериментів, а також умов, створюваних під час вирощування рослин у культивацийних контейнерах (Colla, 2007).

Отже, для коренів *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта, сформованих *in vitro* в умовах кліноостатування повністю підтверджено диференціювання клітин коренів в двох напрямках: кореневого чохлака та ростових зон власне кореня. Аналіз кількісних показників коренів не виявив статистично достовірної різниці між коренями, утвореними *in vitro* в контролі та за умов кліноостатування.

**Ультраструктура статоцитів (гравірецепторного апарату) кореневого чохлака та ростових зон коренів.** Дослідження гравірецепторних клітин кореневого чохлака у дикого типу (рис. 5, а) та мутанта (рис. 6, а) *in vitro* показали, що в контролі вони мали типову організацію. В гіалоплазмі статоцитів в контролі спостерігалися ядро, вакуолі, мітохондрії, ендоплазматичний ретикулум (ЕР) та диктіосоми. Амілопласти з крохмальними зернами розташовувалися у дистальній частині клітин. За умов кліноостатування відзначено локалізацію амілопластів у всьому об'єму клітин без певної закономірності (рис. 5, б, рис. 6, б).

Ультраструктура клітин протодерми та периблеми коренів *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта у контролі була типовою для меристеми. У клітинах ДЗР коренів контрольного варіанта зафіксовано поступові зміни: дрібні вакуолі збільшувалися в об'ємі та зливалися. Гіалоплазма в процесі росту клітини поступово втрачала електронну щільність через зменшення кількості вільних рибосом. Ядро зазвичай займало центральну позицію. В клітинах епідерми *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта чітко виявлені овальні або видовжені ЕР-тільця (рис. 7), що являють собою локальні розширення цистерн гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, які містять фермент  $\beta$ -глюкозидазу (Matsushima et al., 2004; Романчук, 2010) та характерні для родини Brassicaceae (Iversen, 1970).

За умов кліноостатування ультраструктура клітин в загальних рисах була подібною до такої у контролі. Проте дослідження середньої площі зрізів органел виявили статистично достовірне зменшення розмірів мітохондрій у протодермі коренів *A. thaliana* дикого за умов кліноостатування (табл. 2), при цьому їхня

кількість у клітинах не змінювалася (табл. 3). В клітинах ДЗР встановлено достовірне зменшення розмірів вакуолей та збільшення їхньої кількості, зменшення розмірів мітохондрій, а також збільшення розмірів ЕР-тілець.

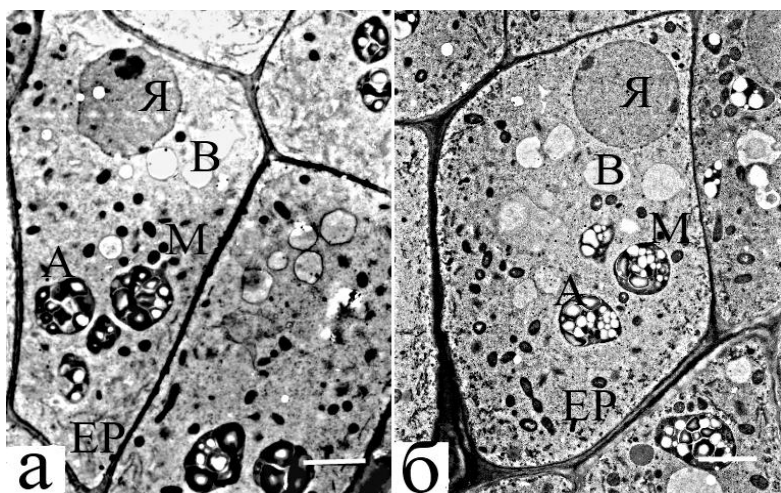


Рис. 5. Статоцити чохлаків коренів *A. thaliana* дикого типу, утворених *de novo in vitro* в стаціонарних умовах (а) та за умов кліностагування (б): Я – ядро, В – вакуоль, М – мітохондрія, А – амілопласт, ЕР – ендоплазматичний ретикулум (трансмісійна електронна мікроскопія). Масштаб – 2 мкм.

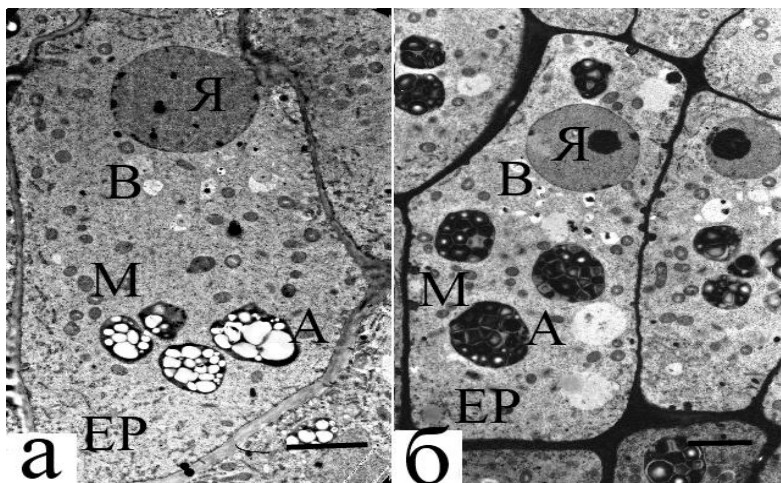


Рис. 6. Статоцити в апексах коренів *scr* мутанта, утворених *de novo in vitro* в стаціонарних умовах (а) та за кліностагування (б): Я – ядро, В – вакуоль, М – мітохондрія, А – амілопласт, ЕР – ендоплазматичний ретикулум (трансмісійна електронна мікроскопія). Масштаб – 2 мкм.

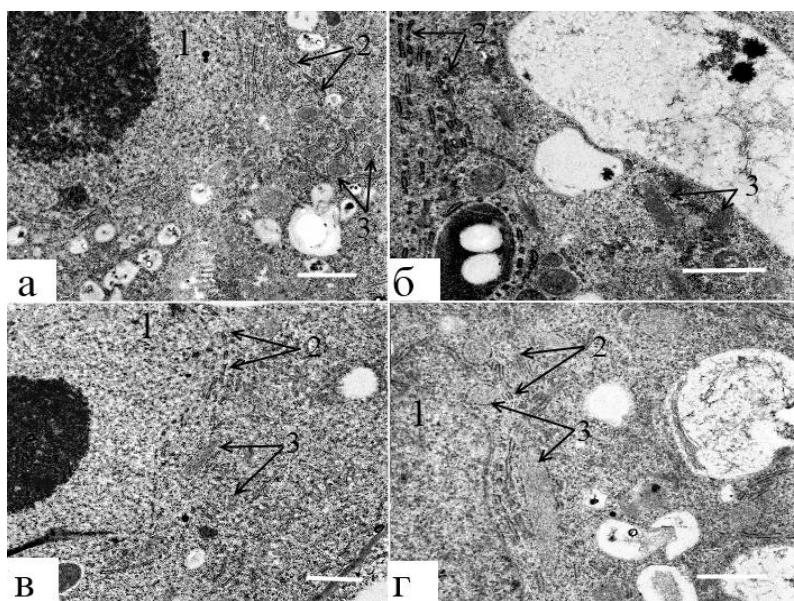


Рис. 7. ЕР-тілця в епідермі клітин ДЗР коренів дикого типу (а, б) та мутанта (в, г), сформованих *de novo* з листових експлантів в контролі (а, в) та при кліностагуванні (б, г): 1 – ядро, 2 – цистерни ЕР, 3 – ЕР-тілця. Масштаб – 1 мкм.



**Середня площа зрізів органел у клітинах протодерми та епідерми ДЗР**

Варіант досліджу		Площа органел, мкм <sup>2</sup>				
		Ядро	Вакуолі	Мітохондрії	Пластиди	ЕР-тіліця
Протодерма	Контроль	15,46±0,895 (n=20)	0,43±0,041 (n=175)	0,23±0,007* (n=335)	0,414±0,033 (n=67)	-
	Кліностат	14,70±0,75 (n=20)	0,36±0,044 (n=185)	0,19±0,004* (n=322)	0,44±0,037 (n=62)	-
Епідерма	Контроль	32,28±3,79 (n=20)	2,11±0,75* (n=110)	0,21±0,004* (n=267)	0,52±0,04 (n=40)	0,09±0,004* (n=190)
	Кліностат	28,97±3,02 (n=10)	0,93±0,17* (n=208)	0,19±0,004* (n=284)	0,54±0,06 (n=50)	0,13±0,007* (n=224)

Примітка: \* – позначено статистично достовірні відмінності між відповідними значеннями.

**Середня кількість органел у клітинах протодерми та епідермі ДЗР**

Варіант досліджу		Органели			
		Вакуолі	Мітохондрії	Пластиди	ЕР-тіліця
Протодерма (n=20)	Контроль	17,3±1,78	13,9±0,86	3,35±0,39	–
	Кліностат	15,3±1,07	15±1,18	3,1±0,38	–
Епідерма (n=10)	Контроль	18,33±2,92*	44,67±6,29	6,83±0,83	31,5±8,08
	Кліностат	29,71±3,92*	44,43±5,08	7,14±1,22	33,28±6,18

Примітка: \* – позначено статистично достовірні відмінності між відповідними значеннями.

Показано, що в коренях інтактних рослин за умов реальної та модельованої мікрогравітації (кліностатування) в статоцитах змінювалося розташування амілопластів (Kordyum, 1997; Kiss, 1999; Романчук, 2010), в клітинах меристеми фіксували перебудови мітохондрій, структури та кількості вакуолей, в ДЗР відзначено збільшення розмірів ГЕР, кількості та будови ЕР-тілець, прогресуючу вакуолізацію (Slocum, 1984; Калініна, 2007; Кордюм та ін, 2008; Бриков, 2009; Романчук, 2010). Уперше проведено порівняльний аналіз структури коренів *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта, сформованих *de novo in vitro* у стаціонарних умовах і за кліностатування виявив подібність досліджених ознак і ступеня гравічутливості клітин ростових зон власне кореня, не спеціалізованих до сприйняття гравітації, і гравірецепторних клітин чохла з такими зародкових коренів проростків. Статистично достовірні зміни розмірів мітохондрій у клітинах протодерми, а також розмірів мітохондрій, ЕР-тілець та ступеня вакуолізації в клітинах епідермі ДЗР є реакцією на дію кліностатування.

**Орієнтація елементів актинового та тубулінового цитоскелета в клітинах коренів, сформованих *de novo* в умовах кліностагування.** В контролі у корневих апексах трансгенної лінії *A. thaliana* FABD2-GFP ендоплазматичні та кортикальні актинові мікрофіламенти виявляли в клітинах протодерми зони меристеми і епідермісу подальших ростових зон. В клітинах протодерми зони меристеми ендоплазматичні мікрофіламенти оточували ядро і розходилися від нього радіально до цитоплазматичної мембрани. В ДЗР орієнтація ендоплазматичних мікрофіламентів була подібна до клітин меристеми. В ЦЗР ендоплазматичні мікрофіламенти розташовувалися в цитоплазмі між вакуолями. Кортикальні мікрофіламенти в клітинах протодерми (рис. 8, а) та епідермі ДЗР (рис. 8, б) розташовувалися перпендикулярно і косо щодо поздовжньої осі кореня. У ЦЗР кортикальні мікрофіламенти мали поздовжню орієнтацію (рис. 8, в).

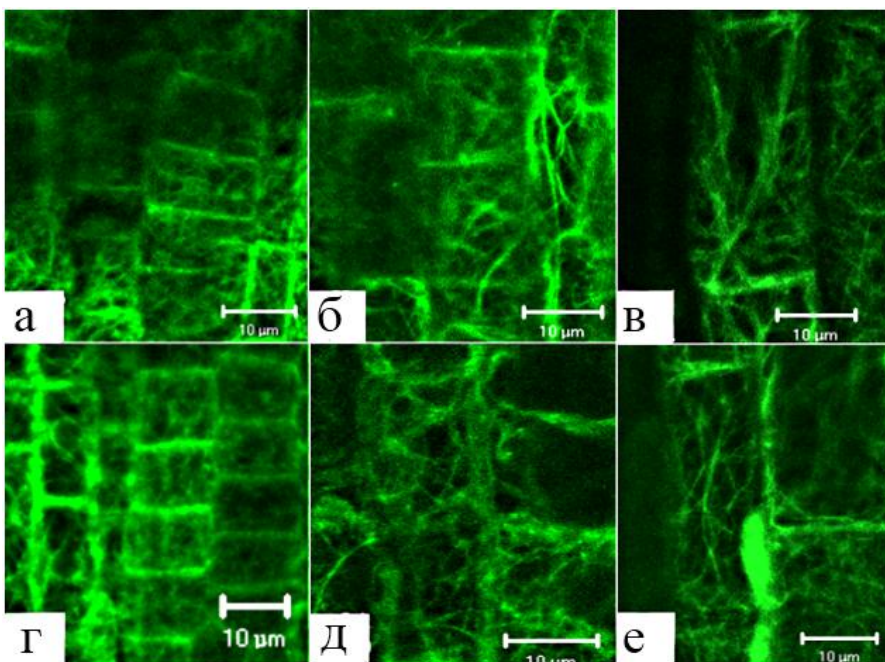


Рис. 8. Актинові мікрофіламенти в клітинах ростових зон кореня *A. thaliana* FABD2-GFP в контролі (а, б, в) і при кліностагуванні (г, д, е): а, г – меристема; б, д – ДЗР; в, е – ЦЗР.

При кліностагуванні в протодермі та епідермі ДЗР ендоплазматичні мікрофіламенти оточували ядро і розходилися від нього радіально до цитоплазматичної мембрани. В ЦЗР ендоплазматичні мікрофіламенти розташовувалися в цитоплазмі між вакуолями. Кортикальні мікрофіламенти в клітинах протодерми (рис. 8, г) та епідермі ДЗР (рис. 8, д) орієнтувалися перпендикулярно і косо щодо поздовжньої осі кореня. У ЦЗР кортикальні мікрофіламенти мали поздовжню орієнтацію (рис. 8, е). Таким чином, помітних змін в орієнтації, структурі та динамічних властивостях МФ різних зон апекса коренів за умов кліностагування виявлено не було.

У корневих апексах трансгенної лінії *A. thaliana* GFP-MAP4 в контролі орієнтація кортикальних мікротрубочок в протодермі (рис. 9, а) та епідермі ДЗР коренів (рис. 9, б), утворених *de novo*, представлена паралельними рядами, розташованими безпосередньо під цитоплазматичною мембраною, перпендикулярно до поздовжньої осі кореня. У ЦЗР мікротрубочки в основному орієнтуються косо щодо поздовжньої осі кореня (рис. 9, в). У клітинах ДЗР орієнтація кортикальних



мікротрубочок в контролі подібна до клітин меристеми (рис. 9, б).

При кліноостатуванні кортикальні мікротрубочки в клітинах протодерми розташовувалися перпендикулярно до поздовжньої осі кореня (рис. 9, г). В клітинах епідерми ДЗР поряд з перпендикулярно орієнтованими мікротрубочками, спостерігали вкорочені та дезорієнтовані кортикальні мікротрубочки (рис. 9, д). В клітинах ЦЗР кортикальні мікротрубочки мали косу орієнтацію (рис. 9, е).

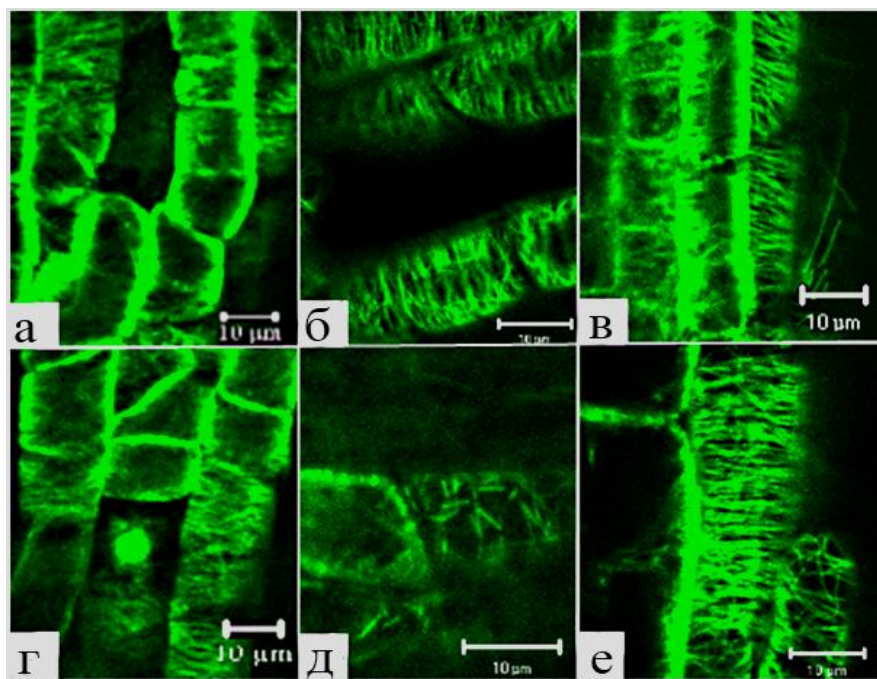


Рис. 9. Кортикальні мікротрубочки в клітинах коренів *A. thaliana* GFP-MAP4, утворених *de novo*: а, б, в – контроль; г, д, е – кліноостатування; а, г – меристема; б, д – ДЗР; в, е – ЦЗР.

Вважають, що кортикальні мікротрубочки можуть спрямовувати синтез і орієнтацію мікрофібрил целюлози – головного компонента клітинних стінок рослин, за допомогою їхньої взаємодії з целюлосинтазними комплексами (Bringmann et al., 2012), в той час як актиновий цитоскелет забезпечує транспорт везикул Гольджі, що містять целюлосинтазні комплекси первинної клітинної стінки (Endler, Persson 2011). Тому нами було досліджено структуру клітинних стінок, їхню товщину в протодермі та епідермі ДЗР коренів *A. thaliana* дикого типу, утворених *de novo* в контролі і при кліноостатуванні. При кліноостатуванні структура поперечних і поздовжніх клітинних стінок була подібна до контролю. Статистично достовірної різниці в товщині клітинних стінок в контролі і експерименті виявлено не було, проте відзначено тенденцію до потоншення клітинних стінок (табл. 4).

Таблиця 4

#### Ширина клітинних стінок протодерми і ДЗР коренів *in vitro*, (мкм)

Клітинна стінка	Протодерма	ДЗР	Протодерма	ДЗР
	Контроль		Кліноостат	
Поперечна	0,106± 0,006	0,153± 0,009	0,103± 0,004	0,155± 0,07
Поздовжня	0,152± 0,007	0,203± 0,007	0,143± 0,005	0,189± 0,005

Одночасно в умовах модельованої мікрогравітації спостерігали певну хвилястість поперечних клітинних стінок в ДЗР.

Отже, показано найбільшу чутливість тубулінового, ніж актинового цитоскелету до модельованої мікрогравітації, яка виражалася у дезорієнтації мікротрубочок в дистальній зоні розтягу. Виявлено тенденцію до потоншення переважно поздовжніх та, менше, поперечних клітинних стінок в меристемі та ДЗР коренів *A. thaliana* дикого типу *in vitro*. Хвилястість поперечних та потоншення поздовжніх клітинних стінок в ДЗР можуть бути пов'язаними як із змінами в орієнтації тубулінового цитоскелету, так і везикулярного транспорту за участю актинового цитоскелету.

**Розподіл ауксину в коренях, сформованих *de novo* на листкових експлантах.** Відомо, що ауксин контролює багато процесів, що забезпечують морфогенез рослин, зокрема процеси елонгації, галуження та розвитку органів, а також асиметричного росту – тропізму (Muday, Rahman, 2005). Використовуючи трансгенні рослини DR5rev::GFP, ми дослідили розподіл ауксин-залежного репортерного білка в зародкових коренях і коренях, утворених *de novo* з листкових експлантів, для встановлення фізіологічної активності коренів *in vitro*. Показано, що в контролі при вертикальному рості коренів сигнал спостерігався в центральному циліндрі та кореневому чохлаку (рис. 10, а, б).

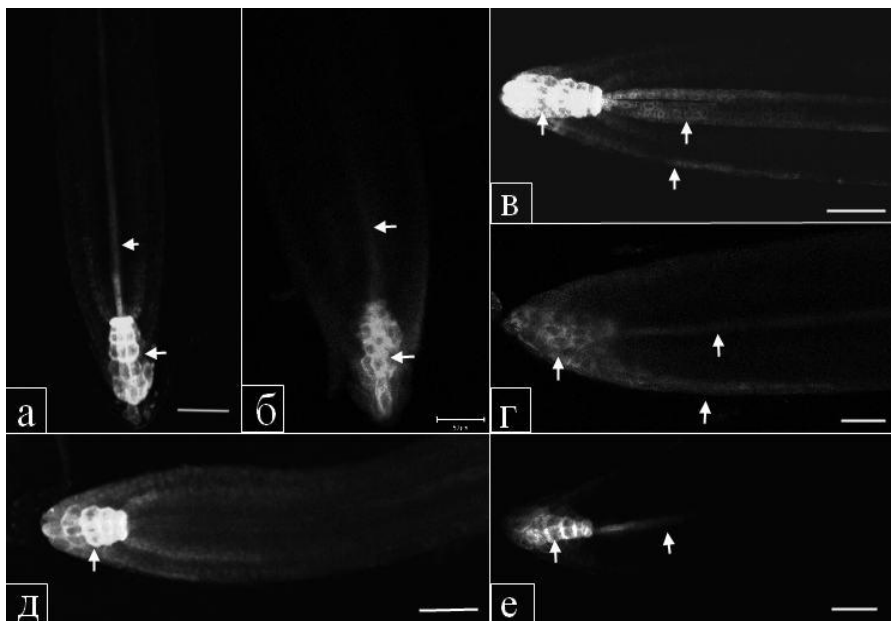


Рис. 10. Локалізація (вказано стрілочками) ауксин-залежного репортерного DR5rev::GFP в коренях *A. thaliana*, утворених з насіння (а, в, д) та в культурі *in vitro* (б, г, е): а, б – контроль, в, г – дві години гравістимуляції; д, е – кліностакування. Масштаб – 50 мкм.

Після 2-х годин гравістимуляції флюоресценцію DR5rev::GFP спостерігали на фізично нижньому боці коренів. (рис. 10, в, г). В умовах кліностакування репортерний білок виявляли лише в центральному циліндрі та кореневому чохлаку (рис. 10, д, е).

Досліди показали, що корені *in vitro*, як і *in vivo*, є гравічутливими. При кліностакуванні відбувається дезорієнтація органів, що гальмує гравірецепцію та перерозподіл ауксин-залежного репортерного білка.

## ВИСНОВКИ

Проведені дослідження процесу ризогенезу в калусній культурі та на листкових експлантах *A. thaliana* дикого типу, *scr* мутанта та трансгенних ліній GFP-FABD2, GFP-MAP4 і DR5rev::GFP в стаціонарному контролі та під впливом горизонтального повільного кліностакування, дозволили отримати нові дані щодо індукції ризогенезу *in vitro*, структурно-функціональної організації та гравічутливості коренів, утворених *de novo* в умовах модельованої мікрогравітації.

1. Підібрано умови індукції ризогенезу в калусній культурі та на черешках листкових експлантів. Встановлено, що формування коренів у калусній культурі відбувається шляхом утворення морфогенних осередків на периферії калуса, на черешках листкових експлантів – за рахунок поділу клітин камбію, частіше у базальній частині черешка при орієнтації листкового експланту нижньою стороною по відношенню до живильного середовища.

2. За анатомічною будовою корені на листкових експлантах дикого типу та *scr* мутанта подібні до зародкових коренів, певні відмінності виявлено за кількісними показниками. Ризогенез в калусній культурі відбувається з морфологічними та анатомічними відхиленнями.

3. Формування двох шарів клітин кори у *A. thaliana* дикого типу і мозаїчної структури у *scr* мутанта *in vivo* та *in vitro* за стаціонарних умов і при кліноставанні свідчить про генетичну детермінованість і стабільність диференціювання клітин кореня не залежно від функціонального навантаження.

4. Формування гравірецепторного апарату кореневого чохла в коренях, утворених *in vitro* за умов кліностакування, коли амілопласти позбавлені можливості сприймати гравітаційний стимул, вказує на генетичну детермінованість диференціювання клітин кореневого чохла.

5. Культивування коренів *in vitro* при кліноставанні призводить до зміни розмірів мітохондрій у клітинах протодерми та епідерми ДЗР, збільшення розмірів ЕР-тілець та посилення вакуолізації в клітинах епідерми ДЗР, при сталості інших основних ознак ультраструктурної організації клітин ростових зон коренів.

6. Орієнтація елементів актинового і тубулінового цитоскелету в коренях, утворених *in vitro* на листкових експлантах в стаціонарних умовах, не відрізняється від такої зародкових коренів; при кліноставанні змінюється орієнтація кортикальних мікротрубочок в клітинах ДЗР.

7. Формування коренів *in vitro* на листкових експлантах за умов кліностакування призводить до певних структурних змін клітинних стінок: тенденції до потоншення поздовжніх та поперечних клітинних стінок в меристемі та ДЗР та хвилястості поперечних клітинних стінок в ДЗР.

8. Локалізація ауксин-залежного репортерного білка в трансгенних рослинах *A. thaliana* DR5rev::GFP при гравістимуляції та кліноставанні доводить гравічутливість коренів, утворених *in vitro*.

9. За високою частотою ризогенезу, коротким терміном культивування, сталістю анатомічних ознак і збереженням здатності до нормального функціонування коренів, модель ризогенезу *in vitro* на листкових експлантах має

переваги для використання в наземних і космічних експериментах, спрямованих на з'ясування значення скалярної величини гравітації у диференціюванні клітин і морфогенезі.

## СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Булавін І.В. Ризогенез в культурі *in vitro Arabidopsis thaliana* дикого типу та *scr* мутанта / І.В. Булавін // Укр. ботан. журн. – 2014. – Т. 71, 1. – С. 79–82. (дисертантом проведено експерименти, отримано та опрацьовано експериментальний матеріал, власноручно написано статтю).
2. Булавін І.В. Анатомія та ультраструктура коренів *Arabidopsis thaliana* в культурі *in vitro* під впливом кліностагування / І.В. Булавін // Укр. ботан. журн. – 2015. – Т. 72, 2. – С. 180–185. (дисертантом проведено експерименти, отримано та опрацьовано експериментальний матеріал, власноручно написано статтю).
3. Булавін І.В. Гравічутливість коренів, утворених з листкових експлантів *Arabidopsis thaliana* в культурі *in vitro* / І.В. Булавін // Вісник Харківського національного аграрного університету. – 2015. – Серія: Біологія 1. – С. 6–13. (дисертантом проведено експерименти, отримано та опрацьовано експериментальний матеріал, власноручно написано статтю).
4. Bulavin I.V. “Rhizogenesis *in vitro*” as a model for plant space biology / I. V. Bulavin // Annals of R.S.C.B. – 2015. – V. 19, 3. – P. 1–8. (дисертантом проведено експерименти, отримано та опрацьовано експериментальний матеріал, власноручно написано статтю).
5. Булавин И.В. Ориентация цитоскелета в клетках эпидермы корней, образованных *de novo* на листовых эксплантах в условиях клиностатирования / И.В. Булавин // Цитология и генетика. – 2016. – Т. 50, 2. – С. 58–64. (дисертантом проведено експерименти, отримано та опрацьовано експериментальний матеріал, власноручно написано статтю).
6. Булавін І.В. Культура рослинних тканин *in vitro* як модель для вивчення біологічних ефектів мікрогравітації на клітинному рівні / І.В. Булавін // XIV міжнародна молодіжна науково-практична конференція «Людина і космос», Дніпропетровськ, 11–13 квітня, 2012. – С. 217.
7. Булавін І.В. Дослідження коренів *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. в культурі *in vitro* в умовах кліностагування / І.В. Булавін // Матеріали міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології», Ужгород, 19–23 вересня, 2012. – С. 192–193.
8. Булавин И.В. Морфогенез корней *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. в культурі *in vitro* в умовах симулированої мікрогравітації / И.В. Булавин / Матеріали VII Міжнародної конференції молодих учених «Біологія: от молекулы до биосферы», Харків, 20–23 листопада, 2012. – С. 11.
9. Bulavin I.V. Cortical microtubules orientation in epidermal root cells of distal elongation zone *in vitro* under clinorotation / I.V. Bulavin // Proceedings of International Conference of Young Scientists “Advances in botany and ecology”, Scholkine, 18–22 June, 2013. – P. 214–215.
10. Bulavin I.V. *In vitro Arabidopsis thaliana* root growth and anatomy under

stationary condition and clinorotation / I.V. Bulavin // ELGRA News, Vol. 28, Biennial Symposium and General Assembly 2013, Vatican City, 11–14 September, 2013. – P. 193.

11. Булавин І.В. Ультраструктура гравирецепторних кліток корневого чехлика растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунн. в культурі *in vitro* при кліностативуванні / І.В. Булавин / Тези доп. 13-ї Української конференції з космічних досліджень, 2–6 вересня, 2013, Євпаторія, Крим. – С. 82.

12. Булавин І.В. Регенераційна здатність листкових експлантів *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунн. в залежності від їх орієнтації на живильному середовищі / І.В. Булавин // Збірник тез міжнародної конференції «Геноміка рослин та біотехнологія» та другої конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія», 23–24 грудня, 2013, Київ, Україна. – С. 43.

13. Bulavin I.V. *In vitro Arabidopsis thaliana* root cap structure under clinorotation / I.V. Bulavin // Proceedings of Plant Biology and Biotechnology International Conference, Almaty, Kazakhstan, May 28–30, 2014. – P. 158.

14. Булавин І.В. Диференціювання клітин коренів *Arabidopsis thaliana* в культурі *in vitro* в умовах модельованої мікрогравітації / Булавин І.В. // Тези доп. 14-ї Української конференції з космічних досліджень, 8–12 вересня, 2014, Ужгород, Україна. – С. 44.

15. Булавин І.В. Анатомічна будова та гравітропічна реакція коренів *Arabidopsis thaliana* L., сформованих *de novo* за умов симульованої мікрогравітації / І.В. Булавин // Матеріали міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології», Умань, 9–12 вересня, 2014. – С. 113.

16. Bulavin I.V. Auxin distribution in *Arabidopsis thaliana* roots formed *de novo* under simulated microgravity / I.V. Bulavin // Abstracts of 15<sup>th</sup> Ukrainian Conference on Space Research, 24–28 August, 2015, Odessa, Ukraine. – P. 36.

## АНОТАЦІЯ

**Булавин І.В. – Особливості морфогенезу коренів *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунн. в культурі *in vitro* в умовах кліностативування. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, 2017.

В дисертації представлено результати досліджень ризогенезу в калусній культурі та на листкових експлантах *A. thaliana* дикого типу, *scr* мутанта та трансгенних ліній GFP-FABD2, GFP-MAP4 і DR5rev::GFP в стаціонарному контролі та під впливом горизонтального повільного кліностативування. Анатомічні дослідження виявили значні структурні перебудови в коренях, утворених з калусної тканини, порівняно з тими, що формувалися з листкових експлантів. За умов кліностативування в коренях *A. thaliana*, утворених *in vitro*, показано повну диференціацію гравирецепторних клітин кореневого чохла та клітин ростових зон кореня. В гравирецепторних та гравічутливих клітинах коренів показано певні перебудови ультраструктури, а також орієнтації тубулінового цитоскелету. Дослідженнями розподілу ауксин-залежного репортерного білка доведено гравічутливість коренів, утворених *in vitro*. Модель ризогенезу *in vitro* на листкових

експлантах пропонується для використання в наземних і космічних експериментах, спрямованих на з'ясування значення скалярної величини гравітації у диференціюванні клітин і морфогенезі.

**Ключові слова:** *Arabidopsis thaliana*, ризогенез *in vitro*, анатомія, ультраструктура, цитоскелет, ауксин, кліноостатування.

## АННОТАЦІЯ

**Булавин І.В. – Особенности морфогенеза корней *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. в культурі *in vitro* в умовах кліноостативування. – На правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.11 – цитология, клеточная биология, гистология. – ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев, 2017.

В диссертации представлены результаты исследований ризогенеза в калусной культуре и на листовых эксплантах *A. thaliana* дикого типа, *scr* мутанта и трансгенных линий GFP-FABD2, GFP-MAP4 и DR5rev::GFP в стационарном контроле и при воздействии медленного горизонтального клиноостативування. Исследования анатомии показали, что корни, образованные из калусной ткани, в сравнении с корнями, образованными на листовых эксплантах, имели значительные перестройки структуры. В условиях клиноостативування в корнях *A. thaliana*, сформированных *in vitro*, показан процесс полного дифференцирования гравирецепторных клеток корневого чехлика и клеток ростовых зон корня. В гравирецепторных и гравичувствительных клетках установлены изменения ультраструктуры и ориентации тубулинового цитоскелета. Исследования локализации ауксин-зависимого репортерного белка показали гравичувствительность корней, сформированных *in vitro*. Модель ризогенеза *in vitro* на листовых эксплантах предлагается для использования в наземных и космических экспериментах, направленных на определение роли скалярной величины гравитации для дифференцировки клеток и морфогенеза.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*, ризогенез *in vitro*, анатомія, ультраструктура, цитоскелет, ауксин, кліноостативування.

## SUMMARY

**Bulavin I.V. Peculiarities of Root Morphogenesis of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. in *in vitro* Culture under Clinorotation. – Manuscript.**

A thesis is for the scientific degree of Candidate of Biological Sciences, speciality 03.00.11 – cytology, cell biology, histology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017.

A new model “Rhizogenesis *in vitro*” is proposed to study the biological effects of real and simulated microgravity. Rhizogenesis from leaf explants and callus cultures of *Arabidopsis thaliana* wild type and a *scr* mutant has been investigated. The *SCARECROW* gene is essential for generating the root radial organization as it regulates an asymmetric cell division. It was shown that roots emerged *de novo* in two



ways: 1) from callus dedifferentiated cells (morphogenic loci) and 2) directly from the cambial cells of leaf petioles. It was revealed that roots formed *de novo* consist of a cap and all growth zones, like to those in embryonal roots. At the same time, the appearance of coalescent roots and roots with diminished growth zones was noted in the callus culture. Since roots formed *in vitro* on the callus surface had some structural abnormalities, roots formed *in vitro* on leaf explants of *A. thaliana* wild type, *scr* mutant, and transgenes were used in the subsequent studies by methods of light, electron and confocal microscopy. No significant differences were found in morphology and anatomy of roots formed *in vitro* on leaf explants under clinorotation in comparison with embryonal roots.

The ultrastructure of cap statocytes in roots formed *in vitro* in the stationary conditions was typical for graviperceptive cells. A nucleus was located in the proximal part of a cell, ER cisterns – in the cell distal part of a cell and in its corners. Amyloplasts-statoliths were located in the distal part of statocytes in the control. Under clinorotation, amyloplasts were grouped in the cell center or distributed throughout the cytoplasm. Such amyloplasts' position indicates that statocytes do not function as graviperceptive cells.

The characteristic features of apical meristem cells in the control were the central nucleus position, a great diversity of a size and a shape of mitochondria and plastids, ER weak development. As cells passed in the distal elongation zone (DEZ), their size enlarged, and a nucleus preserved the central location in the majority of cells. A quantity of ER-cisterns, vacuoles, and ER-bodies increased in comparison with those in meristem cells. Dictyosomes acquired polarity and produced many vesicles. Under clinorotation, the ultrastructure of meristem and elongated cells in main features was similar to that in control cells. No statistically significant differences in the organelle percentage ratio in root meristem cells of *A. thaliana* wild type were also found between the control and experiments. Cells of the DEZ appeared more sensitive to clinorotation. An increase in the percentage ratio of vacuoles and ER-bodies as well as the presence of numerous smaller mitochondria were found in these cells.

The orientation of cortical and endoplasmic actin microfilaments in cells of different root growth zones was similar in control and under clinorotation. Unlike microfilaments, the disorganization of the cortical microtubules in DEZ cells was revealed. As cortical microtubule arrays play an essential role in the cell wall formation, we studied the structure of cell walls, measured their thickness in protoderm and epidermis of DEZ in roots of *A. thaliana* wild type formed *de novo* in control and under clinorotation. Although the structure of transverse and longitudinal cell walls under clinorotation was similar to that in control, a large convolution of transverse cell walls in DEZ was observed under simulated microgravity. Simultaneously a tendency towards the cell wall thinning under clinorotation was noted.

Auxin-dependent reporter DR5rev green fluorescent protein, that is a marker of auxin localization was revealed in the central cylinder and in the cap of vertically growing roots *in vitro*. After 2 hours of gravistimulation, DR5rev::GFP fluorescence was observed in the physically low root side. Under clinorotation, DR5rev::GFP signal was noted in cap cells of roots which had no visible bending. Under gravistimulation of roots grown under clinorotation, the DR5rev::GFP localization was also revealed in the cap cells and epidermis. Such DR5rev::GFP position indicates the polar auxin transport, that is the characteristic feature of a gravitropic reaction, the obtained data demonstrate that

clinorotated roots *in vitro* sense a gravitational stimulus and can perceive it.

Thus, it was shown that cell differentiation occurs normally in roots of *A. thaliana* wild type and a *scr* mutant formed *de novo*, as in embryonal roots. In simulated microgravity, these roots are gravisensitive, so the investigated model of rhizogenesis on leaf explants is proposed for spaceflight experiments to reveal new structural and functional regularities of plant adaptation to microgravity.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, rhizogenesis *in vitro*, anatomy, ultrastructure, cytoskeleton, auxin, clinorotation.