

## ЕНДОГЕННІ ФІТОГОРМОНИ ГАМЕТОФІТІВ ПАПОРОТІ *POLYSTICHUM ACULEATUM* (L.) ROTH НА РІЗНИХ ЕТАПАХ МОРФОГЕНЕЗУ В КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

І.В. КОСАКІВСЬКА, В.А. ВАСЮК, Л.В. ВОЙТЕНКО, М.М. ЩЕРБАТЮК, К.О. РОМАНЕНКО, Л.М. БАБЕНКО

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної Академії наук України, Київ

E-mail: irynakosakivska@gmail.com, valentynavasyuk@gmail.com, lesyavoytenko@gmail.com, chrom.botany@ukr.net, katerynaromanenko4@gmail.com, lilia.babenko@gmail.com

*Методом високоефективної рідинної хроматографії визначено вміст індоліл-3-оцтової (ІОК), гіберелової (ГК<sub>3</sub>), абсцизової (АБК) кислот і цитокінінів – зеатину (З), зеатинглюкозиду (ЗГ), зеатинрибозиду (ЗР), ізопентеніладеніну (іП) та ізопентеніладенозину (іПА) в гаметофітах папороті Polystichum aculeatum на різних етапах морфогенезу в культурі in vitro. На етапі розвитку лопаткоподібного проталія гаметофіти містили значні кількості ГК<sub>3</sub> та ІОК, тоді як вміст АБК та цитокінінів був низьким. Серед цитокінінів домінувала неактивна форма – ЗГ та активний іП. На етапі утворення серцеподібного талому рівень ГК<sub>3</sub> збільшився в 1,6, ІОК – у 2,4, АБК – в 1,7 рази. Вміст неактивного іПА збільшився вдвічі, значно зросла кількість активних ЗР та іП. На етапі розвитку спорофіта на поверхні талому відбулося зменшення рівнів ІОК, АБК та ГК<sub>3</sub>. Зафіксовано накопичення неактивного ЗГ і зменшення вмісту активних зеатину і зеатинрибозиду. На всіх етапах морфогенезу гаметофітів переважала ГК<sub>3</sub>, найбільший вміст якої виявлено у період розвитку архегоніїв та антеридіїв. Характер акумуляції гіберелової кислоти і зеатинрибозиду засвідчили ключову роль цих гормонів у регуляції ростових процесів та розвиткові репродуктивних структур гаметофіта P. aculeatum.*

**Ключові слова:** *Polystichum aculeatum*, фітогормони, гаметофіт, морфогенез, культура in vitro.

**Вступ.** Характерною ознакою папоротей є чергування поколінь, яке забезпечує незалежний розвиток нестатевого спорофіта і статевого гаметофіта. Зрілі гаметофіти – це дрібні (1–2 мм) багатоклітинні автотрофи. Їх можна вирощувати в культурі *in vitro* до повної зрілості, спостерігати за їхнім розвитком та маніпулювати, не завдаючи руйнації [1, 2]. Лабораторні дослідження дозволяють проаналізувати ріст та морфогенез талому гаметофіта, диференці-

ацію статевих клітин та формування архегоніїв й антеридіїв, утворення спорофітної зиготи та зародка [3].

Процеси росту і розвитку гаметофіта і спорофіта у папоротей, як і у представників інших таксонів, контролюються багатокомпонентною гормональною системою [4]. Ауксини задіяні у регуляції клітинного поділу, розтягуванні та диференціації клітин, фото- та гравітропізму, апікального домінування, ембріо-, органо- та морфогенезу, розвитку кореневої системи, а також формуванні квіток, насіння та його проростання, плодів, старіння [5–9]. Гібереліни (ГК) стимулюють лінійний ріст стебла, пагонів і коренів, збільшення поверхні листка і числа міжвузлів, індують цвітіння, детермінують стать, контролюють процеси проростання насіння [10]. Цитокініни (ЦК) контролюють поділ клітин, стимулюють утворення та активність меристем пагонів, формують атрагуючу здатність тканин, затримують процес старіння листків, інгібують ріст та галуження кореня, беруть участь у регуляції процесу проростання насіння, формуванні відповіді на стресові впливи тощо [11]. Абсцизова кислота відома як тригер захисних механізмів у відповідь на стресові сигнали [12], відіграє важливу роль у багатьох клітинних процесах, включаючи розвиток насіння, спокій, проростання, вегетативний ріст [13], а також впливає на архітектуру кореневої системи [14]. Регуляція фізіологічних процесів у рослин забезпечується завдяки синергічній або антагоністичній взаємодії між фітогормонами різних класів. Так, синергічну взаємодію між ауксинами та ЦК спостерігали під час мікророзмноження та росту верхівки стебла *Artemisia amygdalina* Desne [15] та впродовж калусоутворення й диференціації клітин

© І.В. КОСАКІВСЬКА, В.А. ВАСЮК, Л.В. ВОЙТЕНКО, М.М. ЩЕРБАТЮК, К.О. РОМАНЕНКО, Л.М. БАБЕНКО, 2020

*A. absinthium* [16]. ГК функціонують односпрямовано з ауксинами і виступають у якості антагоністів ЦК і АБК [10].

Перше повідомлення про дослідження фітогормонів гаметофіта папороті *Pteris longifolia* L. з'явилося у 1938 р. Повідомлялось, що в молодих спорофітах акумулюються ауксини, які сприяють подальшому розвитку та контролюють розростання проталія, перешкоджаючи появі адвентивних виростів на його поверхні [17]. В подальшому було встановлено, що у формуванні статевого поліморфізму папороте-подібних задіяні гібереліни та гібереліноподібні речовини [18]. Розвиток антеридіїв на таломі папоротей активується гібереліноподібним гормоном антеридіогеном [19]. Виявлено, що для кожного виду папоротей характерна специфічна хімічна структура антеридіогену. Цей гібереліноподібний гормон синтезується і виділяється в навколишнє середовище на стадії розвитку проталія [20], активує проростання спор папоротей [21] та індукує розвиток антеридіїв на більш пізніх стадіях морфогенезу гаметофіта [20]. У видів родів *Lygodium* Sw. і *Anemia* Sw. чоловічий гаметофіт формувалася за умов високого вмісту антеридіогену, а в разі його відсутності утворювався жіночий. Низька концентрація ендogenous антеридіогену зумовлювала розвиток двостатевого заростку, який містив антеридії й архегонії [22, 23]. Антеридіоген відіграє важливу роль в видоутворенні та еволюції папоротей, оскільки він сприяє перехресному міжгаметофітному заплідненню і формуванню генетичної гетерозиготності [19–21, 24]. У гаметофітах папороті *Asplenium nidus* L. виявлені ІОК, ГК<sub>9</sub> та цитокініни (*транс*-зеатин, *транс*-зеатинрибозид, дигідрозеатин, дигідрозеатинрибозид, ізопентеніладенін та ізопентеніладенозин) [25]. На ранніх етапах розвитку апогамного ембріонального покоління папороті *Dryopteris affinis* (Lowe) Fraser-Jenkins були визначені ендogenous ІОК та гібереліни, кількість яких коливалася залежно від віку гаметофіта [26]. У гаметофітах *Blechnum spicant* L. серед ендogenous гіберелінів переважали ГК<sub>4</sub> і ГК<sub>20</sub> [27]. Виявилось, що ЦК індукують фемінізацію у деяких спорових рослин, зокрема у дводомних мохів [24]. Вміст ЦК у жіночих гаметофітах *B. spicant* був значно вище, ніж у

чоловічих, при цьому переважали ізопентеніладенін та ізопентеніладенозин [28]. АБК була ідентифікована в спорах і протонемі гаметофіта *Anemia phyllitidis* (L.) Sw. [29, 30]. Повідомлялось, що АБК є антагоністом антеридіогену [3, 31, 32]. Екзогенна АБК блокувала розвиток антеридіїв у гаметофітах *Ceratopteris richardii* Brongn та *B. spicant* [27, 32]. Водночас, АБК стимулювала розвиток ризоїдів і сприяла формуванню чашоподібних жіночих гаметофітів [33].

У наших попередніх роботах повідомлялося про вивчення балансу ендogenous ІОК та АБК в органах *Polystichum aculeatum* (L.) Roth на різних фенологічних фазах розвитку спорофіта. Було встановлено, що максимум в акумуляції ендogenous ІОК із домінуванням вільної форми зафіксований під час вегетативного розвитку спорофіта у фазу інтенсивного росту, тоді як накопичення АБК відбувалося при переході до репродуктивної фази під час формування сорусів [34]. Також ми проаналізували вплив екзогенних ГК<sub>3</sub> та бензиламінопурину (БАП) на морфогенез гаметофіта *P. aculeatum* в культурі *in vitro*. Зокрема, було виокремлено та встановлено часові межі чотирьох етапів у формуванні серцеподібного талому гаметофіта. Показано, що БАП сповільнював розвиток гаметофіта на стадії протонемі, а під впливом ГК<sub>3</sub> відбувалось формування аномальних таломів [35].

Отже, аналіз літературних джерел, присвячених вивченню фітогормональної регуляції росту і розвитку гаметофітів папоротей, виявив, що на сьогодні визначеною є участь гіберелінів у формуванні статі, тоді як роль ендogenous ауксинів, цитокінінів та АБК і питання взаємодії фітогормонів під час росту та розвитку гаметофітів залишаються відкритими. Тому метою нашої роботи було вивчення балансу фітогормонів на різних етапах морфогенезу гаметофіта папороті *Polystichum aculeatum*, вивченого в умовах *in vitro*.

**Матеріали та методи.** Об'єктом дослідження були гаметофіти лептоспорангіатної папороті *Polystichum aculeatum* (L.) Roth. Це трав'яний полікарпик, гемікриптофіт з зимозеленим феноритмотипом.

Проростання спор та вирощування гаметофітів проводилося за методикою, описаною ра-

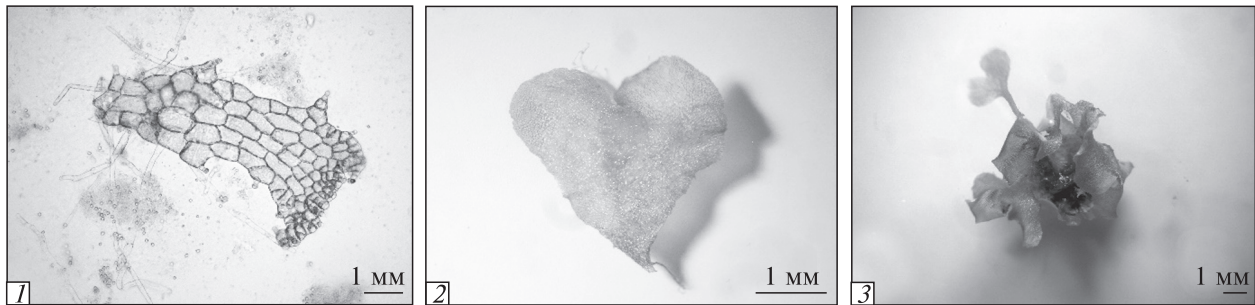


Рис. 1. Морфологічні стани гаметофіта *Polystichum aculeatum*: 1 – лопаткоподібний проталій; 2 – серцеподібний талом; 3 – спорофіт на поверхні талому гаметофіта. Масштаб: 1 – 100 мкм, 2, 3 – 1 мм

ніше [35]. Вміст ендогенних фітогормонів (ФГ) визначали на наступних етапах морфогенезу гаметофіта: 1 – розвиток лопаткоподібного проталія, 30 доба від проростання спор (рис. 1, 1), 2 – утворення серцеподібного талому, 60 доба від проростання спор (рис. 1, 2), 3 – розвиток спорофіта на поверхні талому гаметофіта, 120 доба від проростання спор (рис. 1, 3).

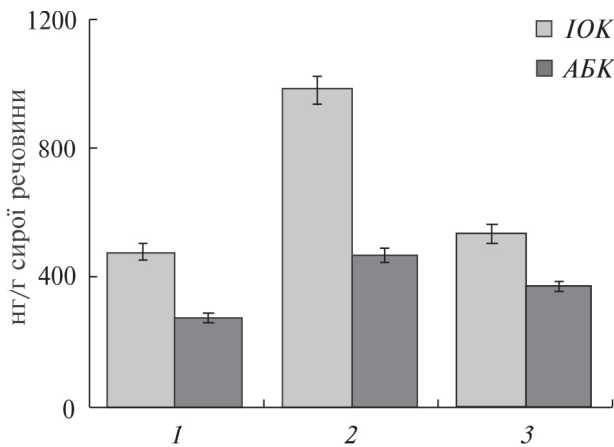
Наважки матеріалу (2 г) розтирали у рідкому азоті та гомогенізували у 48 мл охолодженого 80 % етанолу, який містив 1–2 краплі антиоксиданту (0,02 % диетилдитіокарбамату натрію) та екстрагували впродовж 24 год. Відфільтровані спиртові екстракти випарювали до водного залишку об'ємом 4 мл у вакуумному ротаційному випаровувачі (тип 350 р, Польща) температури не вище +40 °С, до якого додавали 15 мл охолодженого метанолу з мурашиною кислотою (15 : 1) і центрифугували впродовж 30 хв при 15000 об/хв, температурі +4 °С на центрифугі К-24 фірми Janetski (Німеччина). Отримані супернатанти випарювали до 5 мл і переносили в чисті пробірки. Подальше очищення ФГ проводили за методом [36] на двох твердофазних колонках SPE C18 Sep-Pak Plus, Waters та SPE Oasis MCX, 6 cc/150 мг, Waters. Колонку C18 використовували для видалення ліпофільних речовин, протеїнів та пігментів. На колонці SPE Oasis MCX здійснювали сорбцію ІОК, АБК, ГК<sub>3</sub> та ЦК. Елюцію ІОК, АБК та ГК<sub>3</sub> проводили 100 % метанолом, ЦК – за допомогою розчину, котрий містив 60 мл 100 % метанолу і 2,5 мл 26 % аміаку, доведеного до 100 мл бідистилятом. Отримані елюенти випарювали досуха на вакуумному ротаційному випаровувачі за тем-

ператури, що не перевищувала +40 °С. Сухі залишки перед аналізом відновлювали до об'єму 200 мкл 45 % метанолом.

Аналітичне визначення ФГ проводили методом високоефективної рідинної хроматографії на рідинному хроматографі Agilent 1200 LC з діодно-матричним детектором G 1315 В (США). Для хроматографічного розділення ФГ використовувалась колонка Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 з ліпофільно-модифікованим сорбентом, розмір часток якого становив 5 мкм (оберненофазна хроматографія). Після хроматографічного розділення компонентів проб об'ємом 20 мкл системою розчинників (метанол, ультрачиста вода, оцтова кислота у об'ємному співвідношенні 45 : 54,9 : 0,1) проводили детекцію ІОК та АБК в УФ-області поглинання за аналітичної довжини хвилі 280 та 254 нм. Після розділення проб системою розчинників (ацетонітрил, ультрачиста вода, оцтова кислота – 30 : 69,9 : 0,1) детектували ГК<sub>3</sub> за 210 нм. Проби з ЦК розділяли системою розчинників (метанол, вода, оцтова кислота – 35 : 64,5 : 0,5), а детекцію проводили за 269 нм. Швидкість рухомої фази розчинників під час детекції ІОК та АБК становила 0,7 мл/хв, ГК<sub>3</sub> та ЦК – 0,5 мл/хв. В якості стандартів при побудові калібровочних таблиць використовувались немічені ІОК, АБК, ГК<sub>3</sub>, *транс*-зеатинглюкозид (*m*-3Г), *транс*-зеатин (*m*-3), *транс*-зеатинрибозид (*m*-3Р), ізопентеніладенін (іП) та ізопентеніладенозин (іПА) виробництва Sigma, США.

Досліди проводили у трьох біологічних та трьох аналітичних повторах. Аналіз і обрахунок вмісту фітогормонів здійснювали за допомогою програмного забезпечення Agilent Chem Station





**Рис. 2.** Вміст індоліл-3-оцтової (ІОК) та абсцизової (АБК) кислот у гаметофітах *Polystichum aculeatum* на різних етапах морфогенезу: 1 – розвиток лопаткоподібного проталія; 2 – утворення серцеподібного талому; 3 – розвиток спорофіта на поверхні талому гаметофіта

(версія В.03.01). Отриманні кількісні значення обробляли статистично, використовуючи програму Microsoft Excel 2010. Достовірність різниці оцінювали за критерієм Ст'юдента, використовуючи 5 % рівень значущості ( $P \leq 0,05$ ; 0,01 та 0,001 при  $n = 6$ ).

**Результати досліджень та їх обговорення.** На 30-ту добу від проростання спор проталій *P. aculeatum* мав витягнуту форму, його активний ріст здійснювався за рахунок поділу клітин. На цій стадії відбувалось переорієнтування клітинних поділів при переході від одновимірного нитчастого росту до двовимірного площинного росту: апікальна клітина проталіальної нитки диференціювалась в меристематичну клітину, яка починала активно ділитися і формувала меристему проталія. З моменту відокремлення меристематичної клітини поступово йшло формування виїмки і багатоклітинної меристеми. Проталій набував характерної лопаткоподібної форми, відбувалось його розростання за рахунок поділу апікальних клітин, і розтягання дочірніх клітин. По краю проталія формувалися поодинокі одноклітинні сосочкоподібні волоски – трихоми, що диференціювались з дочірніх термінальних клітин (рис. 1, 1). На цьому етапі морфогенезу у гаметофітах виявлені значні кількості ГК<sub>3</sub> та ІОК, тоді як вміст АБК був низьким (рис. 2, 3). Серед ци-

токінінів домінували активний іП і неактивний ЗГ (таблиця). Показано, що ЗГ належить до запасних форм ЦК і в разі необхідності легко розщеплюється β-глюкозидазою, перетворюючись у активну форму [37]. На етапі утворення серцеподібного талому (60 доба) більшість гаметофітів мали серцеподібну форму, симетричні широкі одношарові «крильця», переважали бісексуальні таломи, зрідка зустрічались асиметричні безстатеві індивіди. Археогоніальна подушка формувалась в центрі серцеподібного талому і складалась із клітин в кілька шарів. Така складність в будові подушки необхідна для подальшого живлення зародка спорофіта. В зоні археогоніальної подушки, на нижньому боці талому, формувалися перші археогонії. Антеридії розвивалися раніше за жіночі органи (рис. 1, 2).

На етапі серцеподібного талому, який відзначався активним ростом та утворенням репродуктивних структур, вміст гормонів значно підвищився. Рівень ГК<sub>3</sub> збільшився в 1,6, ІОК – у 2,4, АБК – в 1,7 рази (рис. 2, 3). Зафіксоване нами зростання вмісту ІОК у гаметофіті папороті було подібним до акумуляції гормону у меристемах пагонів і молодих тканинах квіткових рослин [38, 39]. У роботі Simm та ін. [39] відмічається, що у рослин різних таксонів шляхи синтезу, транспорту і нагромадження гормонів подібні, проте можуть мати специфічні для виду особливості. Збільшення вмісту ГК<sub>3</sub> відповідало формуванню та розвитку антеридіїв та археогоніїв на таломі папороті. У роботах інших авторів повідомлялось, що екзогенні гібереліни детермінували розвиток чоловічого гаметофіта папороті *Blechnum spicant* [27, 40].

У папоротей *Anemia phyllitidis* [41] та *Ceratopteris richardii* [42] екзогенна ГК<sub>7</sub> стимулювала формування та розвиток антеридіїв. Проте, екзогенна ГК<sub>3</sub> призводила до формування апогамного спорофіта у папороті *Dryopteris affinis* [26], тоді як у папоротей роду *Schizaeaceae* (*Anemia phyllitidis* і *A. mexicana*) стимулювала розвиток гаметофітів [43]. Високий вміст АБК у 60-добових гаметофітах *P. aculeatum*, на нашу думку, позитивно впливав на розвиток ризоїдів й жіночих репродуктивних структур, що узгоджується з даними [33].

На цьому ж етапі нами були зафіксовані зміни у співвідношенні між ізоформами цито-

кінінів. Так, вміст іП та іПА збільшився вдвічі, значно зросла кількість ЗР (до  $537,8 \pm 26,6$  нг/г сирої речовини), а З та ЗГ знаходилися на рівні чутливості методу (таблиця). Зеатинрибозид належить до найбільш активних домінуючих гормонів цитокінінового ряду, завдяки цьому позиціонується, як діюча форма цитокінінів, що регулює розвиток рослин [44]. Нагромадження ЗР у гаметофітах узгоджується з відомостями щодо значних рівнів ЦК у швидкоростучих тканинах з високим мітотичним індексом [45]. Акумуляція неактивних форм цитокінінів у нижчих рослин відбувається досить активно на відміну від квіткових, тому висловлювалися припущення, що саме вони є діючими формами ЦК у еволюційно менш розвинутих організмів [46]. Зростання концентрації ізопентенільних форм у гаметофітах *P. aculeatum* свідчить про їхню важливість у регуляції ростових і репродуктивних процесів та відображає особливості метаболізму ЦК у папоротей, які займають проміжну позицію в еволюційному розвитку між нижчими споровими і насінневими рослинами.

Одним із шляхів вивчення регуляторної функції фітогормонів є використання екзогенної обробки рослин. Показано, що форма апекса протонеми гаметофіта папороті *Dryopteris varia* (L.) Kuntze залежала від вмісту ІОК у середовищі культивування. За низьких концентрацій формувалася апікальний сосочок, за високих – ризоїдальний [47]. Екзогенна обробка гаметофітів папороті *Platycerium coronarium* (J. Koenig ex O.F. Mull.) ауксинами і цитокінінами в низьких концентраціях [48] та гаметофітів

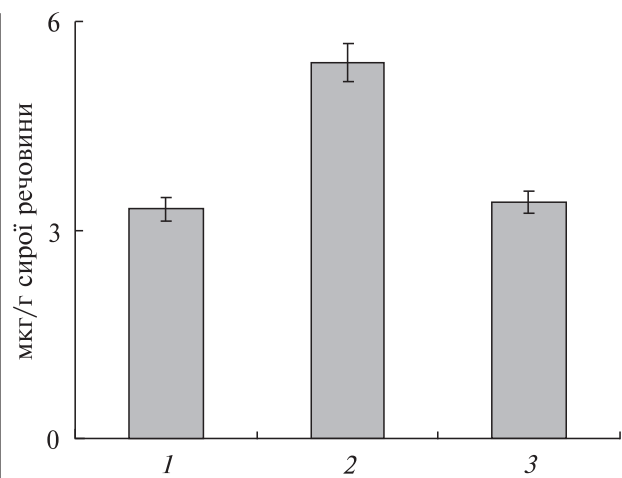


Рис. 3. Вміст гібереллової кислоти (ГК<sub>3</sub>) у гаметофітах *Polystichum aculeatum* на різних етапах морфогенезу: 1 – розвиток лопаткоподібного проталія; 2 – утворення серцеподібного талому; 3 – розвиток спорофіта на поверхні талому гаметофіта

папороті *Dryopteris affinis* – ауксинами, цитокінінами і гіберелінами індукувала формування апогамного спорофіта [26]. Екзогенна АБК у високій концентрації пригнічувала ріст протонеми папороті *Mohria caffrorum* (L.) Desv., проте гібереліни знімали інгібуєчий ефект АБК. Ауксини і кінетин не впливали на ріст протонеми, але під час взаємодії з АБК інгібуєчий ефект певною мірою нівелювали [49]. Повідомлялось, що екзогенна обробка цитокінінами гаметофітів папоротей *Alsophila odonelliana* (Alston) Lehnert та *Osmunda regalis* L. спричиняли зменшення розмірів серцеподібного талому, викли-

**Вміст цитокінінів у гаметофіті *Polystichum aculeatum* на різних етапах морфогенезу (нг/г сирої речовини)**

Ізоформи цитокінінів	Етап морфогенезу		
	Розвиток лопаткоподібного проталія, 30 діб	Розвиток серцеподібного талому, 60 діб	Розвиток спорофіта на таломі гаметофіта, 120 діб
Зеатинглюкозид	$30,8 \pm 1,5$	сліди	$42,7 \pm 2,1$ *
Зеатин	$17,3 \pm 0,9$	сліди	сліди
Зеатинрибозид	сліди	$537,8 \pm 26,9$	$285,3 \pm 14,3$ ***
Ізопентеніладенін	$22,7 \pm 1,1$ ***	$54,1 \pm 2,7$	$24,1 \pm 1,2$ ***

Примітка: \* – достовірна відмінність в порівнянні з етапом розвитку лопаткоподібного проталія для  $P \leq 0,05$ , при  $n = 6$ . \*\*\* – достовірна відмінність в порівнянні з етапом розвитку серцеподібного талому для  $P \leq 0,001$ , при  $n = 6$ . ### – достовірна відмінність в порівнянні з етапом розвитку лопаткоподібного проталія для  $P \leq 0,001$ , при  $n = 6$ . ++ – достовірна відмінність в порівнянні з етапом розвитку серцеподібного талому для  $P \leq 0,01$ , при  $n = 6$ .

кала численні розростання і деформації, пригнічували формування репродуктивних структур [50, 51]. У папороті *Blechnum spicant* та у дводомних мохів рослин високий вміст цитокінінів викликав фемінізацію гаметофітів [24, 28]. У наших дослідження було встановлено, що бензиламінопурин (БАП) сповільнював морфогенез гаметофіта *P. aculeatum* в культурі *in vitro* на стадії протонеми, а під впливом ГК<sub>3</sub> відбувалось формування аномальних таломів [35]. Цитокініни (БАП, кінетин та іП) індукували фотоморфогенез у гаметофітах папороті *Ceratopteris richardii* від нитчастого до проталіального росту шляхом зменшення видовження клітин, активації їхнього поділу та індукування утворення ризоїдів у клітинах, розташованих безпосередньо під апікальною меристемою [52]. Отримані нами результати дозволяють припустити, що у регуляції росту апікальних клітин і формуванні ризоїдів на етапі лопаткоподібного проталія у гаметофітах *P. aculeatum* задіяні ІОК та гібереліни, кількості яких виявились досить високими.

На етапі розвитку спорофіта на поверхні талому (120 доба від проростання спор) гаметофіти були округлої форми із хвилястими крильцями. Активність меристеми згасала, виїмка сильно розтягувалась, ріст талому припинявся. Продовжувався активний ріст ризоїдів, довжина яких переважала довжину талому. Антеридії були сконцентровані, головним чином, серед ризоїдів і були багаточисельними. На окремих заростках із заплідненими архегоніями розвивалися перші проростки спорофіта, сформовані із одної-двох вай (рис. 1, 3).

Розвиток раннього спорофіта на поверхні зрілого талому гаметофіта з численними світло-коричневими ризоїдами відбувався на тлі зменшення акумуляції ІОК, АБК та ГК<sub>3</sub>, котра наближалась до рівня, визначеного на етапі лопаткоподібного проталія (рис. 2, 3). У 120-денних гаметофітів зафіксовано накопичення неактивних ізоформ цитокінінів (переважно ЗГ –  $42,7 \pm 2,2$  нг/г сирової речовини) і зменшення вмісту активних форм З до слідових кількостей й ЗР майже вдвічі (таблиця). Загалом на всіх етапах морфогенезу гаметофітів *P. aculeatum* переважала ГК<sub>3</sub>, найбільший вміст якої ( $5,5 \pm 0,5$  мкг/г сирової речовини) виявлений у період

розвитку сформованих репродуктивних структур – архегоніїв та антеридіїв. Рівні ІОК та АБК під час росту ризоїдів зменшувались. Відомо, що за низьких концентрацій ауксину в середовищі культивування спор папороті *Onoclea sensibilis* L. прискорювалось видовження ризоїдів протонеми, тоді як субоптимальні концентрації, навпаки, інгібували цей процес [53]. У низькій концентрації АБК стимулювала розвиток ризоїдів у *Ceratopteris richardii* [33].

Таким чином, отримані результати продемонстрували присутність ендогенних ауксинів, гіберелінів, цитокінінів та абсцизової кислоти, визначили особливості їхнього балансу та зв'язок з ростовими та репродуктивними процесами на трьох етапах морфогенезу гаметофіта папороті *P. aculeatum* в культурі *in vitro*.

**Висновки:** Проведене дослідження дозволило визначити вміст і співвідношення між головними класами ендогенних фітогормонів на трьох етапах морфогенезу гаметофіта папороті *Polystichum aculeatum* в культурі *in vitro*. Показано, що максимумами у накопиченні ІОК, АБК, ГК<sub>3</sub> та ЗР припадали на етап утворення серцеподібного талому, який відзначався активним ростом гаметофіта і формуванням репродуктивних органів. Характер акумуляції гіберелової кислоти і зеатинрибозиду засвідчили ключову роль цих гормонів у регуляції ростових процесів та розвитку репродуктивних структур гаметофіта. Високий вміст фітогормонів у гаметофіті та органах спорофіта *P. aculeatum* [34] порівняно з покритонасінними рослинами може свідчити про те, що у папороті відбувається гіперсинтез фітогормонів, або регуляція фізіологічних процесів у вищих судинних спорових рослин потребує більшої кількості фітогормонів.

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин в якості об'єктів дослідження.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Публікація містить результати досліджень, проведених в рамках проекту, що фінансується Національною Академією наук України № III-71-14.431 «Гормональний контроль росту та розвитку спорових рослин (різної таксономічної належності)».

ENDOGENOUS PHYTOHORMONES OF FERN *POLYSTICHUM ACULEATUM* (L.) ROTH GAMETOPHYTES AT DIFFERENT STAGES OF MORPHOGENESIS *IN VITRO* CULTURE

*I.V. Kosakivska, V.A. Vasyuk, L.V. Voytenko, M.M. Shcherbatiuk, K.O. Romanenko, L.M. Babenko*

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

E-mail: ilynakosakivska@gmail.com, valentynavasyuk@gmail.com, lesyavoytenko@gmail.com, chrom.botany@ukr.net, katernaromanenko4@gmail.com, lilia.babenko@gmail.com

The content of indolyl-3-acetic (IAA), gibberellic ( $GA_3$ ), abscisic acids (ABA) and cytokinins – zeatin (Z), zeatin-O-glucoside (ZG), zeatinriboside (ZP), isopentenyladenine (iP) and isopentenyladenosine (iPA) was determined using the method of high-performance liquid chromatography in fern *Polystichum aculeatum* gametophytes at different stages of its morphogenesis in *in vitro* culture. It was shown that at the stage of spatulate prothallium development the gametophytes contained significant amounts of  $GA_3$  and IAA, while the content of ABA and cytokinins was low. The inactive ZG and active iP dominated. At the stage of cordiform thallus formation the level of  $GA_3$  increased by 1.6, IAA – by 2.4, ABA – by 1.7 times. The content of inactive iPA increased twice, the level of active ZR and iP increased significantly. At the stage of sporophyte development on the surface of gametophyte thallus the levels of IAA, ABA and  $GA_3$  decreased. The accumulation of inactive ZG and decrease in the content of active zeatin and zeatinriboside were documented. At all stages of gametophytes morphogenesis  $GA_3$  was dominant, the highest content of it was detected during the development of archegonium and antheridium. The character of gibberellic acid and zeatinriboside accumulation has shown the key role of these hormones in the regulation of growth processes and the development of reproductive structures of *P. aculeatum* gametophytes.

ЭНДОГЕННЫЕ ФИТОГОРМОНЫ ГАМЕТОФИТОВ ПАПОРОТНИКА *POLYSTICHUM ACULEATUM* (L.) ROTH НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

*И.В. Косаковская, В.А. Васюк, Л.В. Войтенко, Н.Н. Щербатюк, Е.А., Романенко, Л.М. Бабенко*

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определено содержание индолил-3-уксусной (ИУК), гибберелловой ( $ГК_3$ ), абсцизовой (АБК) кислот и цитокининов – зеатина (З),

зеатинглюкозида (ЗГ), зеатинрибозида (ЗР), изопентениладенина (иП) и изопентениладенозина (иПА) в гаметофитах папоротника *Polystichum aculeatum* на разных этапах морфогенеза в культуре *in vitro*. На этапе развития лопаткоподобного проталия га-метофиты содержали значительные количества  $ГК_3$  и ИУК, тогда как уровень АБК и цитокининов был низким. Среди цитокининов доминировали неактивная форма ЗГ и активная – иП. На этапе образования сердцевидного таллома уровень  $ГК_3$  увеличился в 1,6, ИУК – в 2,4, АБК – в 1,7 раза. Содержание неактивной иПА возросло вдвое, значительно увеличилось количество активных ЗР и иП. На этапе развития спорофита на поверхности таллома гаметофита произошло уменьшение количества ИУК, АБК и  $ГК_3$ . Зафиксировано накопления неактивного ЗГ и уменьшение содержания активных зеатина и зеатинрибозида. На всех этапах морфогенеза гаметофита преобладала  $ГК_3$ , наибольшее количество которой обнаружено в период развития архегониев и антеридиев. Характер аккумуляции гибберелловой кислоты и зеатинрибозида показали ключевую роль этих гормонов в регуляции ростовых процессов и развитии репродуктивных структур гаметофита *P. aculeatum*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Raghavan, V., *Developmental Biology of Fern Gametophytes*. Cambridge University Press, 1989, 361 p.
2. Menéndez, V., Arbesú, R., Somer, M., Revilla, A., and Fernández, H., From Spore to Sporophyte: How to Proceed *In Vitro*. In: Working with Ferns: Issues and Applications. Eds. Fernández H., Kumar A., Re-villa A. Springer. New York. Dordrecht. Heidelberg. London. 2011a, pp. 97–110. doi: 10.1007/978-1-4419-7162-3\_7.
3. Banks, J.A., Gametophyte development in ferns, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1999, vol. 50, pp. 163–86. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.163.
4. Kosakivska, I.V., Babenko, L.M., Shcherbatiuk, M.M., Vedenicheva, N.P., Voytenko, L.V., and Vasyuk, V.A., Phytohormones during growth and development of Polypodiophyta. *Advances in Biology & Earth Sci.*, 2016, vol. 1, no. 1, pp. 26–44.
5. Cheng, Y., Zhao, Y., A role for auxin in flower development, *J. Integr. Plant Biol.*, 2007, vol. 49, pp. 99–104. doi: 10.1111/j.1672-9072.2007.00412.x.
6. Korasick, D.A., Enders, T.A., Strader, L.C., Auxin biosynthesis and storage forms, *J. Exp. Bot.*, 2013, vol. 64, no. 9, pp. 2541–55. doi: 10.1093/jxb/ert080.
7. Ludwig-Muller, J., Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants, *J. Exp. Bot.*, 2011, vol. 62, no. 6, pp. 1757–73. doi: 10.1093/jxb/erq412.
8. Mano, Y., Nemoto, K., The pathway of auxin bio-



- synthesis in plants, *J. Exp. Bot.*, 2012, vol. 63, no. 8, pp. 2853–72. doi: 10.1093/jxb/ers091.
9. Teale, W.D., Paponov, I.A., and Palme, K., Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2006, vol. 7, no. 11, pp. 847–59. doi: 10.1038/nrm2020.
  10. Gantait, S., Sinniah, U.R., Ali, M.N., and Sahu, N.C., Gibberellins – a multifaceted hormone in plant growth regulatory network, *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2015, vol. 16, no. 5, pp. 406–12. doi: 10.2174/1389203716666150330125439.
  11. Wybouw, B., De Rybel, B., Cytokinin – A Developing Story, *Trends in Plant Science*, 2019, vol. 24, no. 2, pp. 177–85. doi: 10.1016/j.tplants.2018.10.012.
  12. Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R.G., Pandey, M., and Sharma, S., Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects, *Frontiers in plant science*, 2017, vol. 8, pp. 161–73. doi: 10.3389/fpls.2017.00161.
  13. Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., and Steber, C., Molecular aspects of seed dormancy, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2008, vol. 59, pp. 387–415. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092740.
  14. Harris, J., Abscisic acid: hidden architect of root system structure, *Plants*, 2015, vol. 4, pp. 548–72. doi: 10.3390/plants4030548.
  15. Rasool, R., Kamili, A., Masood, A., Ganai, B., and Akbar, S., Synergistic effect of auxins and cytokinins on propagation of *Artemisia amygdalina* (Asteraceae), a critically endangered plant of Kashmir, *Pakistan J. Botany*, 2013, vol. 45, no. 2, pp. 629–34.
  16. Zia, M., Riaz-ur-Rehman, and Chaudhary, M.F., Hormonal regulation for callogenesis and organogenesis of *Artemisia absinthium* L., *African J. Biotechnology*, 2007, vol. 6, no. 16, pp. 1874–8.
  17. Albaum, H.G., Inhibitions due to growth hormones in fern prothallium, *Amer. J. Bot.*, 1938, vol. 25, pp. 124–33.
  18. Atallah, N.M., Banks, J.A., Reproduction and the pheromonal regulation of sex type in fern gametophytes, *Front. Plant Sci.*, 2015, vol. 6, pp. 100–7. doi: 10.3389/fpls.2015.00100.
  19. Yamane, H., Fern antheridiogens. *Int. Rev. Cytol.*, 1998, vol. 184, pp. 1–32. doi: 10.1016/S0074-7696(08)62177-4.
  20. Tanaka, J., Yano, K., Aya, K., Hirano, K., Takehara, S., Koketsu, E., Ordonio, R.L., Park, S.H., Nakajima, M., Ueguchi-Tanaka, M., and Matsuoka, M., Antheridiogen determines sex in ferns via a spatiotemporally split gibberellin synthesis pathway, *Science*, 2014, vol. 346, no. 6208, pp. 469–73. doi: 10.1126/science.1259923.
  21. Chiou, W.L., Farrar, D.R., Antheridiogen production and response in Polypodiaceae species, *Amer. J. Bot.*, 1997, vol. 84, no. 5, pp. 633–40. doi: org/10.2307/2445900.
  22. Furber, M., Kraft-Klaunzer, P., Mander, L.N., Pour, M., Yamane, H., Yamauchi, T., and Murofushi, N., Synthesis and structure determination of gibberellin derived antheridiogens from fern gametophytes of the *Lygodium* genus, *Austr. J. Chem.*, 1995, vol. 48, pp. 427–44. doi: https://doi.org/10.1071/CH9950427.
  23. Furber, M., Lewis, N., and Graham, L.P., New synthesis pathways from gibberellins to antheridiogens isolated from tree fern genus, *Anemia. J. Organic. Chem.*, 1990, vol. 55, no. 16, pp. 4860–70.
  24. Korpelainen, H., Labile sex expression in plants, *Biol. Rev.*, 1998, vol. 73, pp. 157–80. doi: org/10.1111/j.1469-185X.1997.tb00028.x.
  25. Menéndez, V., Abul, Y., Bohanec, B., Lafont, F., and Fernández, H., The effect of exogenous and endogenous phytohormones on the *in vitro* development of gametophyte and sporophyte in *Asplenium nidus* L., *Acta Physiol. Plant.*, 2011, vol. 33, pp. 2493–500. doi: 10.1007/s11738-011-0794-9.
  26. Menéndez, V., Villacorta, N.F., Revilla, M.A., Gotor, V., Bernard, P., and Fernández, H., Exogenous and endogenous growth regulators on apogamy in *Dryopteris affinis* (Lowe) Frasser-Jenkins, *Plant Cell Rep.*, 2006, vol. 25, no. 2, pp. 85–91. doi: 10.1007/s00299-005-0041-1.
  27. Menéndez, V., Revilla, M.A., Bernard, P., Gotor, V., and Fernández, H., Gibberellins and antheridiogen on sex in *Blechnum spicant* L., *Plant Cell Rep.*, 2006, vol. 25, pp. 1104–10. doi: 10.1007/s00299-006-0149-y.
  28. Menéndez, V., Revilla, M.A., Fal, M.A., and Fernández, H., The effect of cytokinins on growth and sexual organ development in the gametophyte of *Blechnum spicant* L., *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 2009, vol. 96, pp. 245–50. doi: 10.1007/s11240-008-9481-y.
  29. Cheng, C.Y., Schraudolf H., Nachweis von abscisinsäure in sporen und jungen Prothallien von *Anemia phyllitidis* L. Sw., *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 1974, vol. 71, pp. 366–9. doi: 10.1016/S0044-328X(74)80043-7.
  30. Bürcky, K., Das Vorkommen von Abscisinsäure in *Anemia phyllitidis* L. Sw. (Schizaeaceae) während der Sporenreifung, *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 1977, vol. 85, no. 2, pp. 181–3. doi: org/10.1016/S0044-328X(77)80294-8.
  31. Hickok, L.G., Abscisic acid resistant mutants in the fern *Ceratopteris*: characterization and genetic analysis, *Can. J. Bot.*, 1985, vol. 63, pp. 1582–5. doi: org/10.1139/b85-220.
  32. Warne, T.R., Hickok, L.G., Control of sexual development in gametophytes of *Ceratopteris richardii*: antheridiogen and abscisic acid, *Bot. Gaz.*, 1991, vol. 152, pp. 148–53. doi: 10.1086/337874.
  33. Hickok, L.G., Abscisic acid blocks antheridiogen-



- induced antheridium formation in gametophytes of the fern *Ceratopteris*, *Can. J. Bot.*, 1983, vol. 61, pp. 888–92. doi: org/10.1139/b83-098.
34. Voytenko, L.V., Kosakivska, I.V., Peculiarities of the accumulation and distribution of indole-3-acetic and abscisic acids in the organs of sporophyte of wild fern *Polystichum aculeatum* (L.) Roth. at different phenological phases of development, *Dopov. the Nation Acad of Sciences of Ukraine*, 2017, vol. 12, pp. 112–8 (in Ukrainian). doi: org/10.15407/dopovidi2017.12.112.
  35. Babenko, L.M., Romanenko, K.O., Shcherbatiuk, M.M., Vasheka, O.V., Romanenko, P.O., Negretsky, V.A., and Kosakivska, I.V., Effects of exogenous phytohormones on spore germination and morphogenesis of *Polystichum aculeatum* (L.) Roth gametophyte *in vitro* culture, *Cytol. Genet.*, 2018, vol. 52, no. 2, pp. 117–26. doi: org/10.3103/S0095452718020032.
  36. Dobrev, P.I., Vankova, R., Quantification of Abscisic Acid, Cytokinin, and Auxin Content in Salt-Stressed Plant Tissues. In: Shabala S., Cuin T. (eds) *Plant Salt Tolerance. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Humana Press, Totowa, NJ., 2012, vol. 913, pp. 2251–61. doi: 10.1007/978-1-61779-986-0\_17.
  37. Kiran, N.S., Benková, E., Reková, A., Dubová, J., Malbeck, J., Palme, K., and Brzobohatý, B., Retargeting a maize  $\beta$ -glucosidase to the vacuole-evidence from intact plants that zeatin-O-glucoside is stored in the vacuole. *Phytochemistry*, 2012, vol. 79, pp. 67–77. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.03.012.
  38. Sassi M., Vernoux, T., Auxin and self-organization at the shoot apical meristem. *J. Exp. Bot.*, 2013, vol. 64, no. 9, pp. 2579–92. doi: 10.1093/jxb/ert101.
  39. Simm, S., Scharf, K.-D., Jegadeesan, S., Chiusano, M.L., Firon, N., and Schleiff, E., Survey of Genes Involved in Biosynthesis, Transport, and Signaling of Phytohormones with Focus on *Solanum lycopersicum*, *Bioinformatics and Biology Insights*, 2016, vol. 10, pp. 185–207. doi: 10.4137/BBI.S38425.
  40. Valledor, L., Menéndez, V., Canal, M.J., Revilla, A., and Fernández, H., Proteomic approaches to sexual development mediated by antheridiogen in the fern *Blechnum spicant* L., *Proteomics*, 2014, vol. 14, no. 17–8, pp. 2061–2071. doi: 10.1002/pmic.201300166.
  41. Kazmerczak, A., Ethylene is a positive regulation for GA<sub>3</sub>-induced male sex in *Anemia phyllitidis* gametophytes, *Plant Cell Rep.*, 2003, vol. 22, no. 5, pp. 295–302. doi: org/10.1007/s10535-007-0143-4.
  42. Banks, J.A., Mutations affecting the sexual phenotype of the *Ceratopteris richardii* gametophyte, *J. Cell Biochem.*, 1993, Suppl. 17 B, pp. 13–26.
  43. Nakanishi, K., Endo, M., Naef, U., and Johnson, L.F., Structure of the antheridium-inducing factor of the fern *Anemia phyllitidis*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1971, vol. 93, no. 21, pp. 5579–81. doi: org/10.1021/ja00750a047.
  44. Schäfer, M., Brütting, C., Meza-Canales, I.D., Großkinsky, D.K., Vankova, R., Baldwin, I.T., and Meldau, S., The role of *cis*-zeatin-type cytokinins in plant growth regulation and mediating responses to environmental interactions, *J. Exp. Bot.*, 2015, vol. 66, no. 16, pp. 4873–84. https: doi.org/10.1093/jxb/erv214.
  45. Schaller, G.E., Street, I.H., and Kieber, J.J., Cytokinin and the cell cycle. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2014, vol. 21, pp. 7–15. doi: 10.1016/j.pbi.2014.05.015.
  46. Letham, D.S., Cytokinins as phytohormones-sites of biosynthesis, translocation and function of translocated cytokinin. In: *Cytokinins: chemistry, activity and function* / Eds. Mok D.W.S., Mok M.C./ CRC Press, Boca Raton, Florida, 1994, pp. 57–80.
  47. Nakazawa, S., Morphogenesis of the fern protonema. II. Modification of the apical differentiation in *Dryopteris* affected by IAA. *Protoplasma*, 1959, vol. 52, no. 1, pp. 1–4. doi: org/10.1007/BF02665680.
  48. Kwa, S.H., Wee, Y.C., Lim, T.M., and Kumar, P.P., Morphogenetic plasticity of callus reinitiated from cell suspension cultures of the fern *Platytychium coronarium*, *Plant Cell Tissue Organ. Cult.*, 1997, vol. 48, pp. 37–44. doi: org/10.1023/A:1005756822370.
  49. Chia, S.G.E., Raghavan, V., Abscisic acid effects on spore germination and protonemal growth in the fern *Mohria caffrorum*, *New Phytol.*, 1982, vol. 92, pp. 31–7. doi: org/10.1111/j.1469-8137.1982.tb03360.x.
  50. Bonomo, M.C., Martínez, O.G., Tanco, M.E., Cardozo, R., and Avilés, Z., Spores germination and gametophytes of *Alsophila odonelliana* (Cyatheaceae) in different sterile media, *Phyton* (Buenos Aires), 2013, vol. 82, pp. 119–26.
  51. Greer, G.K., Dietrich, M.A., DeVol, J.A., and Rebert, A., The effects of exogenous cytokinin on the morphology and gender expression of *Osmunda regalis* gametophytes, *Amer. Fern J.*, 2012, vol. 102, pp. 32–46. doi: org/10.1640/0002-8444-102.1.32.
  52. Spiro, M.D., Torabi, B., and Cornell, C.N., Cytokinins induce photomorphogenic development in dark grown gametophytes of *Ceratopteris richardii*, *Plant Cell Physiol.*, 2004, vol. 45, pp. 1252–60. doi: 10.1093/pcp/pch146.
  53. Miller, P.M., Sweet, H.C., and Miller, J.H., Growth Regulation by Ethylene in Fern Gametophytes. I. Effects on Protonemal and Rhizoidal Growth and Interaction with Auxin, *Amer. J. Bot.*, 1970, vol. 57, no. 2, pp. 212–7. doi 10.1007/s11738-011-0794-9.

Надійшла в редакцію 01.03.19  
Після доопрацювання 13.05.19  
Прийнята до друку 18.01.20