ДОПОВІДІ
НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

1 • 2013

БІОХІМІЯ

УДК 577.175.1:57.085:582.594.2

О. А. Шейко, член-кореспондент НАН України **Л. І. Мусатенко**

Значення фітогормонів *Ophrys oestrifera* M. Bieb. (род. Orchidaceae Juss.) при введенні в культуру *in vitro*

Досліджено складові фітогормонального комплексу Ophrys oestrifera M. Bieb. на різних етапах онтогенезу та розроблено підходи введення цього виду в культуру in vitro. Показано, що у процесі онтогенезу відбуваються як зміни вмісту цитокінінів, індолілоцтової та абсцизової кислот у вегетативних і генеративних органах O. oestrifera, так і співвідношення їхніх активних і зв'язаних форм. При переході до репродуктивного розвитку вміст індолілоцтової кислоти та цитокінінів підвищується у генеративних органах і знижується — у вегетативних. Вперше встановлено взаємозв'язок між інтенсивністю калюсогенезу з експлантів вегетативних і генеративних органів O. oestrifera та вмістом і співвідношенням складових фітогормонального комплексу на певних етапах онтогенезу, що необхідно враховувати при розробці методів мікроклонального розмноження.

Всі види родини Orchidaceae Juss. флори України є рідкісними та зникаючими. Вони характеризуються складним і тривалим життєвим циклом, під час якого має місце взаємодія з грибами-мікоризоутворювачами та спеціалізованими запилювачами. Це обумовлює високу чутливість до дії кліматичних та антропогенних чинників. У природі від проростання насіння до першого цвітіння орхідних проходить, залежно від виду та умов існування, від 4 до 15 років за загальної тривалості життєвого циклу від 20 до 30 років. Крім того, у процесі розвитку більшість видів здатна переходити до стану спокою на декілька років. Тому їх збереження потребує розробки ефективних методів прискореного розмноження та введення в культуру.

Одним із шляхів збереження генофонду орхідних в умовах культури є клональне розмноження. Цей метод дозволяє контролювати чинники навколишнього середовища. Він забезпечує широке впровадження модельних систем культури рослинних тканин *in vitro* для подальших теоретичних та прикладних досліджень морфогенезу — актуальної проблеми сучасної біології. На сьогодні такі методи розроблені для окремих рослин, однак роботи по розмноженню рідкісних, зникаючих і ендемічних дикорослих видів, до яких належать орхідні флори України, практично відсутні. Це пов'язано, насамперед, із застосуванням

© О. А. Шейко, Л. І. Мусатенко, 2013

емпіричних підходів при розробці методів клонального мікророзмноження, оскільки відсутня теорія морфогенезу *in vitro*, а кожен вид рослин характеризується індивідуальними реакціями на умови культивування.

Найважливішу роль в індукції поділу клітин експланту, утворенні калюсу та морфогенезі відіграють фітогормони, які регулюють розвиток експлантів *in vitro* шляхом зміни їхньої концентрації та співвідношення. Для більшості рослин пошук гормональних компонентів середовища має випадковий характер, коли необхідно перевірити широкий діапазон концентрацій і комбінацій фітогормонів у живильному середовищі для стимуляції і активування проліферації, росту і розвитку експлантів у культурі. Тому вивчення комплексу ендогенних фітогормонів дає можливість прискорити процес оптимізації культивування експлантів *in vitro*.

Отже, розробка ефективних методів розмноження та збереження рідкісних і зникаючих видів орхідей потребує комплексного вивчення їхньої біології, онтогенезу, еколого-фізіологічних особливостей *in situ* й створення умов для культивування *in vitro*.

Матеріали та методи. Об'єктом досліджень був реліктовий вид для України — *Ophrys oestrifera* M. Bieb. (офрис оводоносна) (род. Orchidaceae). *O. oestrifera* — передньоазійський вид на північній межі ареалу. Стебло 20–45 см заввишки. Суцвіття рідке (від трьох до восьми квіток), досягає 20 см завдовжки. Квітки великі, рожеві; середня лопать губи з ланцетним, загнутим догори придатком, бічні лопаті губи з тонкими, довгими, густо опушеними, яскраво-коричневими виростами; приквітки ланцетні, світло-зелені, довші від зав'язі. Цвіте у квітні–травні. Розмножується насінням, дуже рідко зустрічалися випадки вегетативного розмноження. Росте поодинці, зрідка невеликими групами у світлих ялівцевих і листяних лісах, серед чагарників, на кам'янистих схилах, як правило, на вапняному субстраті [1, 2]. *O. oestrifera* поширений на Кавказі та в Ірані, на території України трапляється у Криму [2].

У *лабораторному експерименті* з культурою тканин використовували культивовані на стерильних живильних середовищах експланти з вегетативних і генеративних органів, які було відібрано в період вегетації (листки, стебла), на початку цвітіння (пелюстки, пиляки) та на 25-й день після запилення (зав'язі, насінні зачатки). Попередньо проводили поверхневу стерилізацію експлантів речовинами, підібраними для кожного типу експланту, після чого їх промивали стерильною дистильованою водою. Культивування тканин і органів проводили у фотолюміностаті при 20–25 °С, 16-годинному фотоперіоді з освітленням 1000–3000 лк, 70% відносній вологості повітря та в термостаті при 25 °С у відсутності освітлення.

Методи якісного та кількісного аналізу фітогормонів. Для визначення вмісту фітогормонів використовували листки, стебла, квітки та зав'язі *O. oestrifera*. Кількісний вміст індолілоцтової (ІОК), абсцизової (АБК) кислот та цитокінінів (ЦТК) у тканинах після екстракції 80% етиловим спиртом, розділення та очищення проводили методом високоефективної рідинної хроматографії [3] на рідинному хроматографі Agilent 1200 LC з діодно-матричним детектором G 1315 B (США), колонка Eclipse XDB-C 18 2,1 × 150 мм, розмір часток 5 мм. Елюцію проводили у системі розчинників метанол : вода (37 : 63). Аналіз та обробку хроматограм виконували з програмним забезпеченням Chem Station, версія B.03.01 у режимі "on line".

Статистичне опрацювання отриманих результатів. Фітогормони досліджували у трьох біологічних і трьох аналітичних повторностях, біометричні показники — у п'яти–десятикратній повторності. Одержані дані обробляли за допомогою комп'ютерної статистичної програми Excel ліцензійного пакета Microsoft Office 2007. Визначали значення середнього арифметичного, стандартної похибки, середнього квадратичного відхилення. Досто-

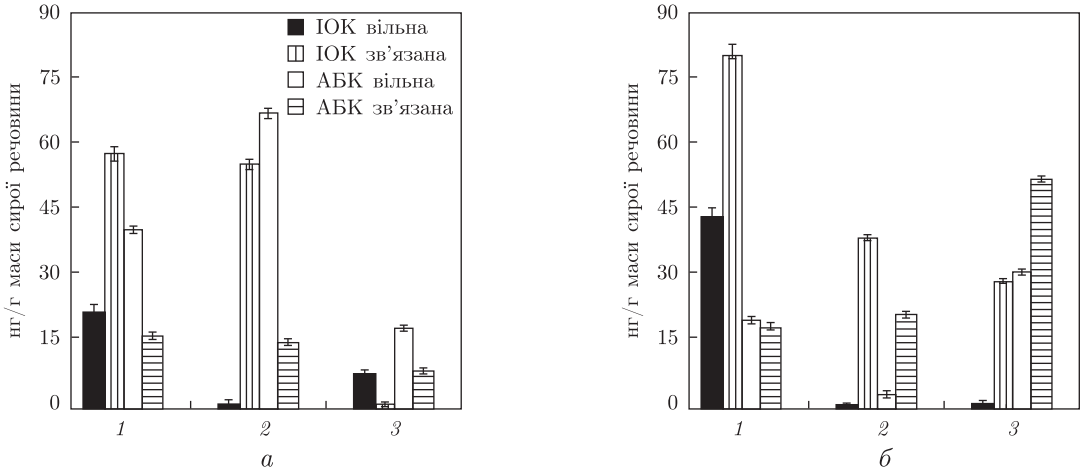

Рис. 1. Вміст ІОК і АБК у квітках (*1*), листках (*2*), стеблах (*3*) *Ophrys oestrifera* у період цвітіння (*а*) та плодоутворення (*б*)

вірність різниці оцінювали за критерієм Стьюдента, використовуючи 5% рівень значущості ($P \leqslant 0{,}05$).

Результати та обговорення. Одним із завдань дослідження було визначення вмісту і складу, а також співвідношень ключових фітогормонів у вегетативних та генеративних органах *O. oestrifera* на різних етапах онтогенезу.

У період цвітіння було встановлено варіабельність якісного та кількісного складу фітогормонів у вегетативних і генеративних органах. Квітки характеризувалися більшим вмістом зв'язаної форми ІОК (54,8±2,7 нг/г м. с. р.) порівняно з вільною (20,6±1,0 нг/г м. с. р.) (рис. 1). Для АБК, навпаки, спостерігали вдвічі більший вміст вільної форми (38,5±1,9 нг/г м. с. р.) порівняно зі зв'язаною (15,8 ± 0,8 нг/г м. с. р.). Для листків *O. oestrifera* був характерний підвищений вміст вільної форми АБК (63,8 ± 3,2 нг/г м. с. р.) при значному кількісному переважанні зв'язаної форми ІОК (53,0 ± 2,7 нг/г м. с. р.). Зв'язування гормонів — це один із шляхів інактивації вільної форми, адже зв'язані форми в результаті ферментативного розщеплення можуть бути також джерелом вільних форм [4]. Для стебла відзначалися найменші показники кількості всіх форм ІОК та АБК порівняно з іншими органами. Загальна кількість ЦТК (101,4 ± 5,1 нг/г м. с. р.) у стеблі *O. oestrifera* була значно вищою, ніж у листках (51,7 ± 2,6 нг/г м. с. р.) і майже дорівнювала їхній кількості в квітках (121,6 ± 6,1 нг/г м. с. р.) (рис. 2). В усіх органах *O. oestrifera* в період цвітіння відзначали значну кількість зеатинглюкозиду, який вважається неактивною формою ЦТК. Можна припустити, що за рахунок кон'югації відбувається нейтралізація надлишку ЦТК. Ізопентеніладенозин був виявлений лише у квітках, де був відсутній зеатинрибозид. Вважається, що основним інструментом регуляції рівня ЦТК є фермент цитокініноксидаза, який відповідає за їх деградацію і активність якого визначає розвиток вегетативних органів [5]. За іншими даними, вміст ендогенних ЦТК залежить і від активності інших ферментів, а саме глюкозилтрансфераз та глюкозидаз, які каталізують відповідно синтез і розпад глюкозильних форм і таким чином нівелюють надлишок синтезованих *de novo* вільних ЦТК чи, навпаки, підвищують їх вміст за рахунок гідролізу зв'язаних [6, 7].

У період плодоутворення в якісному і кількісному складі ендогенних фітогормонів вегетативних і генеративних органів орхідей встановлено істотні зміни, що пов'язано з функ-

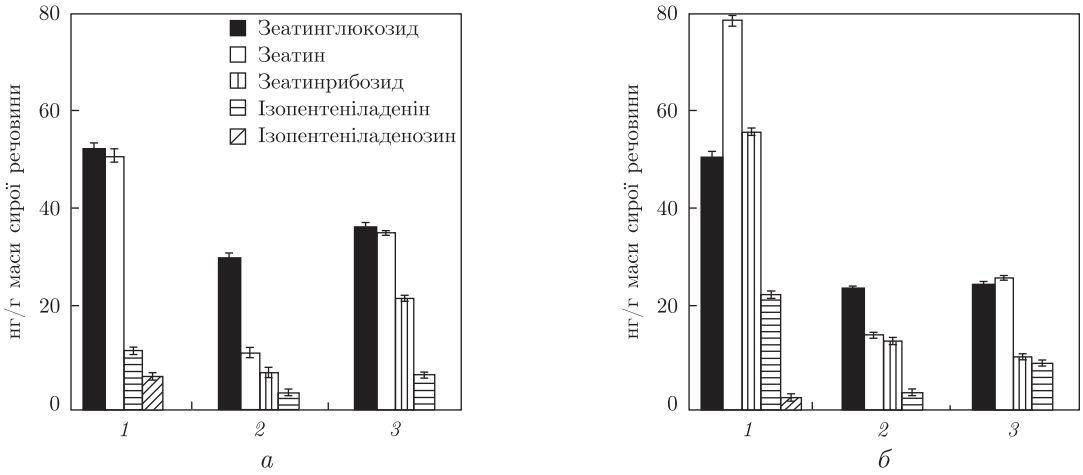

Рис. 2. Вміст ЦТК у квітках (*1*), листках (*2*), стеблах (*3*) *Ophrys oestrifera* у період цвітіння (*а*) та плодоутворення (*б*)

цією генетичного апарату рослинної клітини, з одного боку, і з процесами диференціювання і ростом самих клітин — з іншого. Генеративні органи *O. oestrifera* в період плодоутворення містили більшу кількість ІОК порівняно з іншими органами (див. рис. 1), при цьому зв'язаних форм було вдвічі більше ($80{,}1 \pm 4{,}0$ нг/г м. с. р.), ніж вільних ($43{,}4 \pm 2{,}2$ нг/г м. с. р.). Вегетативні органи містили незначну кількість вільних форм ІОК. У листках *O. oestrifera* при переході від цвітіння до плодоутворення спостерігали загальне зниження рівня ІОК і АБК, обумовлене завершенням ростових процесів і переходом до старіння [8]. При цьому в стеблах рівень АБК зростав.

Концентрація ЦТК в органах *O. oestrifera* істотно змінювалася після запилення квіток на початку плодоутворення (див. рис. 2). У вегетативних органах (листки, стебло) поступово знижувався рівень ЦТК, що, як відомо, є характерною ознакою зрілих тканин і супроводжує вікові зміни у рослин [9, 10]. У зрілих та старіючих листках спостерігали поступове зниження вільних і накопичення запасних форм глюкозидів ($21{,}7 \pm 1{,}1$ нг/г м. с. р.). Паралельно зі зниженням рівня ЦТК у вегетативних органах він зростав у генеративних. Кількість зеатину ($70{,}9 \pm 3{,}5$ нг/г м. с. р.) і зеатинрибозиду ($54{,}9 \pm 2{,}7$ нг/г м. с. р.) у зав'язях *O. oestrifera* була вищою за інші форми ЦТК: підвищення їхнього вмісту могло відбуватися або за рахунок надходження від материнської рослини, або за рахунок автономного синтезу в самих зав'язях [11].

Аналізуючи отримані результати щодо вмісту індивідуальних компонентів гормонального комплексу в надземних органах *O. oestrifera* в процесі онтогенезу орхідних, можна зробити висновок про те, що підвищений вміст ЦТК та вільної форми ІОК корелював з інтенсивністю ростових процесів рослин. Отже, вперше показано, що в процесі онтогенезу відбуваються зміни вмісту ЦТК, ІОК та АБК в генеративних та вегетативних органах, а також варіюють співвідношення активних і зв'язаних форм фітогормонів. При переході до репродуктивного розвитку підвищується вміст ІОК та ЦТК у генеративних органах *O. oestrifera* та зниження їхнього вмісту — у вегетативних.

Наступним завданням дослідження було введення *O. oestrifera* в культуру *in vitro*. У дослідженнях використовували експланти з листків, стебел, пелюсток, зав'язей, насінних зачатків та пиляків *O. oestrifera*. Враховуючи співвідношення ключових фітогормонів, екс-

планти відбирали на стадії онтогенезу, для якої характерним є найбільший вміст вільних форм ЦТК, ІОК, а найменшим — вільної форми АБК. Також необхідно враховувати співвідношення ІОК і АБК, ЦТК і АБК. Для листків і стебла такою стадією є вегетація, оскільки вегетативні органи в цей період характеризуються найвищим вмістом фітогормонів індольної природи та ЦТК. Хоча для листків характерним є підвищений вміст АБК, саме в цей період вони містили найвищий рівень ЦТК, які відіграють найважливішу роль у поділі клітин та калюсогенезі.

За результатами проведеного скринінгу ряду показників для введення в культуру *in vitro* було відібрано життєздатні експланти оптимального розміру, отримані зі стебла і зав'язі, насінних зачатків та пиляків, що зберігали стерильність та проліферували (табл. 1). Життєздатні експланти пелюсток та листків за даних умов не проліферували, тому для введення в культуру *in vitro* не використовувалися. Для кожного експланту підібрано свої стериленти при оптимальному режимі стерилізації.

Найважливішу роль в індукції поділу клітин експланту, утворенні калюсу та морфогенезі відіграють фітогормони, які є невід'ємним компонентом мікроклонального розмноження рослин. Як основні фактори дедиференціації використовували 2,4-Д, ІМК та 6-БАП у концентраціях від 0,5 до 3,0 мг/л. Підбір оптимальних концентрацій та співвідношень фітогормонів у живильному середовищі за даних умов культивування показав, що максимальна частота калюсогенезу спостерігається на живильних середовищах, у яких зберігається таке ж співвідношення ЦТК і ауксинів, як і для інтактного органа. З табл. 2 видно, що у *O. oestrifera* максимальна частота калюсогенезу відмічається при культивуванні на живильному середовищі з додаванням екзогенних ЦТК і ауксинів у співвідношенні 1,7, що є характерним для інтактних органів. При культивуванні на живильних середовищах з іншими кількісними співвідношеннями фітогормонів частота калюсогенезу була значно меншою і не перевищувала 10%.

Таблиця 1. Скринінг експлантів генеративних органів *Ophrys oestrifera* для введення в культуру *in vitro*

Критерії відбору	Інтактні органи рослин									
	Пелюстки				Пиляки	Зав'язь				Насінні зачатки
	Розмір експланту, мм									
	5	10	15	20	*N*	5	10	15	20	*N*
Стерильність	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+
Життєздатність	−	+	+	+	+	−	−	+	+	+
Проліферація	−	−	−	−	+	−	−	+	+	+

Таблиця 2. Залежність калюсогенезу експлантів *Ophrys oestrifera* від співвідношення ендогенних та екзогенних фітогормонів (цитокінінів і ауксинів)

Експлант	Цитокініни/ауксини		Частота калюсогенезу, %
	Ендогенні	Екзогенні	
Зав'язь	1,7	2,0	$1{,}9 \pm 0{,}1$
		1,7	$29{,}9 \pm 1{,}5$
		1,5	$8{,}5 \pm 0{,}4$
Стебло	1,7	2,0	$2{,}9 \pm 0{,}1$
		1,7	$12{,}2 \pm 0{,}6$
		1,5	$2{,}6 \pm 0{,}1$

Таким чином, у результаті проведених досліджень отримано калюсні культури зі стебла, зав'язей, насінних зачатків та пиляків *O. oestrifera*. Максимальна частота калюсогенезу спостерігалася при культивуванні експлантів зав'язей, насінних зачатків і пиляків (до 36%), а мінімальна — при культивуванні експлантів стебла (до 12%). Це, можливо, обумовлено підвищеним вмістом ендогенних фітогормонів, а саме ІОК та ЦТК, у генеративних органах порівняно з вегетативними, у яких було відмічено підвищений вміст АБК. Цей факт підтверджує залежність морфогенетичного потенціалу експланту від вмісту ендогенних фітогормонів.

Із експлантів зав'язей, насінних зачатків та пиляків отримано переважно морфогенні типи калюсу — компактні, вузлуваті, щільні; калюси з експлатнів стебла були переважно неморфогенні — м'які, нещільні, водянисті. Цитологічний аналіз цих калюсних культур показав ряд специфічних особливостей, до яких можна віднести значну структурну гетерогенність та наявність різних за морфологією типів утворень.

У калюсах зав'язей, насінних зачатків та пиляків виявлено дрібні клітини з великими ядрами, які локалізувалися групами та утворювали меристематичний осередок, поділ клітин якого призводив до утворення лігніфікованих елементів судин та трахеїд. Інший шлях морфогенезу в меристематичних осередках — це спонтанний ембріогенез. Калюсна клітина покривалася щільною оболонкою і відокремлювалася від оточуючих клітин, збільшувалася та змінювала забарвлення. Така клітина характеризувалася чітко спрямованим поділом, у результаті закладання орієнтованих клітинних перегородок утворювалася чотириклітинна структура (тетрада), всі клітини якої були розташовані лінійно, після чого формувався багатоклітинний ембріоїд.

Таким чином, для введення в культуру *in vitro* відібрано життєздатні експланти, отримані зі стебла, зав'язі, насінних зачатків і пиляків. Підібрано умови для отримання асептичної культури, живильні середовища з оптимальними концентраціями та співвідношенням фітогормонів. Встановлено, що максимальна частота калюсогенезу серед досліджених експлантів характерна для генеративних органів орхідних, що, можливо, обумовлено підвищеним вмістом ендогенних фітогормонів, а саме ІОК та ЦТК.

1. *Собко В. Г.* Науки заповідне зілля. – Київ: Фітосоціоцентр, 2005. – 452 с.
2. *Червона* книга України. Рослинний світ / Під ред. Я. П. Дідуха. – Київ: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
3. *Методические* рекомендации по определению фитогормонов/АН УССР. Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного. – Препр. – Киев, 1988. – 78 с.
4. *Ситник К. М., Мусатенко Л. І., Генералова В. М. та ін.* Фітогормональний комплекс первинного листка *Phaseolus vulgaris* L. за різних умов росту // Проблеми фітогормонології / Під ред. К. М. Ситника. – Київ: Фітосоціоцентр, 2007. – С. 81–122.
5. *Brugeure N., Jiano Sh., Hantke S.* Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature and is induced by cytokinins, abscisic acid and abiotic stress // Plant Physiol. – 2003. – **132**, No 3. – P. 1228–1240.
6. *Bajaguz A., Piotrowska A.* Conjugates of auxin and cytokinin // Phytochemistry. – 2009. – **70**, No 8. – P. 957–969.
7. *Веденічева Н. П., Мусатенко Л. І.* Локалізація і динаміка цитокінінів у період формування репродуктивних органів *Zea mays* L. // Укр. ботан. журн. – 2008. – **65**, № 6. – С. 896–902.
8. *Umezana T., Hizayama T., Kuromori T., Shinozaki K.* The regulatory network of plant responses to abscisic acid // Advances in Botanical Research. – 2011. – **57**. – P. 201–248.
9. *Веденічева Н. П., Мусатенко Л. І.* Участь цитокінінів у формуванні репродуктивних органів рослин з різним типом росту // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 3 (15). – С. 15–23.
10. *Иванова А. Б., Анцигина Л. Л., Ярин А. Ю.* Современные аспекты изучения фитогормонов. Цитокинины // Цитология. – 2001. – № 6. – С. 537–544.

11. *Гусаковская М. А., Блинцов А. Н.* Пространственно-временное распределение содержания зеатина и зеатинрибозида в период активности яйцеклетки в завязях растений с половым и апомиктическим типами репродукции // Физиология растений. – 2004. – **51**, № 2. – С. 249–255.

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ

Надійшло до редакції 18.06.2012

Е. А. Шейко, член-корреспондент НАН Украины **Л. И. Мусатенко**

Значение фитогормонов *Ophrys oestrifera* M. Bieb. (сем. *Orchidaceae* Juss.) при введении в культуру *in vitro*

Исследованы составляющие фитогормонального комплекса Ophrys oestrifera M. Bieb. на разных этапах онтогенеза и разработаны подходы введения их в культуру in vitro. Показано, что в процессе онтогенеза происходят изменения содержания цитокининов, индолилуксусной и абсцизовой кислот в вегетативных и генеративных органах O. oestrifera, а также варьируют соотношения свободных и связанных форм фитогормонов. При переходе к репродуктивному развитию содержание индолилуксусной кислоты и цитокининов повышается в генеративних органах и снижается — в вегетативных. Впервые установлена взаимосвязь интенсивности каллусогенеза из эксплантов вегетативных и генеративных органов O. oestrifera и соотношения составляющих фитогормонального комплекса на определенных этапах онтогенеза, что необходимо учитывать при разработке методов микроклонального размножения.

E. A. Sheyko, Corresponding Member of the NAS of Ukraine **L. I. Musatenko**

The importance of phytohormones of *Ophrys oestrifera* M. Bieb. (fam. Orchidaceae Juss.) under the introduction into culture *in vitro*

The components of the Ophrys oestrifera M. Bieb phytohormonal complex at the various stages of ontogenesis are studied, and the methods of their introduction into the culture in vitro are developed. It has been shown that, during ontogenesis, the cytokinin, IAA, and ABA contents between the organs of O. oestrifera change, and the ratio of active and bound phytohormone forms varies. During the transition to the reproductive development, the contents of IAA and cytokinins in the orchid generative organs increase and those in the vegetative organs decrease. The interrelation of the callusogenesis intensity of explants of the O. oestrifera vegetative and generative organs and the ratio of the phytohormonal complex components at the specified stages of ontogenesis is first found. This must be taken into account in the elaboration of methods of this species microclonal reproduction.