



<https://doi.org/10.15407/ukrbotj76.03.260>

Гормональний комплекс гаметофітів папороті *Dryopteris filix-mas* (*Dryopteridaceae*) у культурі *in vitro*

Ірина В. КОСАКІВСЬКА, Леся В. ВОЙТЕНКО, Валентина А. ВАСЮК, Микола М. ЩЕРБАТЮК, Катерина О. РОМАНЕНКО, Лідія М. БАБЕНКО

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська 2, Київ 01004, Україна
iryakosakivska@gmail.com

Kosakivska I.V., Romanenko K.O., Voytenko L.V., Vasyuk V.A., Shcherbatiuk M.M., Babenko L.M. 2019. **Hormonal complex of gametophytes of *Dryopteris filix-mas* (*Dryopteridaceae*) in *in vitro* culture.** *Ukrainian Botanical Journal*, 76(3): 260–269.

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine
2 Tereshchenkivska Str., Kyiv 01004, Ukraine

Abstract. The content of endogenous phytohormones indolyl-3-acetic (IAA), gibberellic (GA₃), abscisic (ABA), salicylic (SA) acids, cytokinins – *t*-zeatin (*t*-Z), *t*-zeatin-*O*-glucoside (*t*-ZG), *t*-zeatin riboside (*t*-ZR), isopentenyl adenin (iP) and isopentenyl adenosine (iPA) was determined using the high-performance liquid chromatography-mass spectrometry system Agilent 1200 in *Dryopteris filix-mas* gametophytes at different stages of its morphogenesis in culture *in vitro*. It was shown that GA₃ and *t*-Z dominated in the thallus of 60-day gametophytes at the stage of spatulate prothallium development, which was marked by an intensive growth of the prothallium plate due to the division and extension of apical cells. The content of GA₃ reached 229.9 ± 11.5 ng/g of fresh weight (f. w.) and *t*-Z was 56.1 ± 2.8 ng/g f. w. IAA dominated in the thallus of 90-day gametophytes, which were characterized by an active development of the archegonium cushion consisting of several layers of cells necessary for the further nutrition of the sporophyte, and formation of the archegonium and antheridium. At the final stage of morphogenesis, in the thallus of 120-day gametophytes, on the surface of which sporophytes have not yet appeared, active *t*-Z dominated, whereas in the thallus with sporophytes, the content of IAA reached the maximum value (395.5 ± 19.8 ng/g f. w.) that may indicate a direct involvement of the hormone in the regulation of the sporophyte growth and development. At this stage of morphogenesis, the accumulation of *t*-ZR and the emergence of ABA were observed. The maximum content of SA (287.7 ± 14.4 ng/g f. w.) occurred at the first stage of development. Subsequently, there was a significant reduction in the hormone level. In the thallus of gametophytes, on the surface of which the sporophyte was formed, the level of SA increased. The peculiarities of quantitative and qualitative changes have shown that physiological effects of the analyzed phytohormones is directed towards regulation the morphogenesis of *Dryopteris filix-mas* gametophyte.

Keywords: gametophytes, *Dryopteris filix-mas*, *in vitro* culture, morphogenesis, phytohormones

Submitted 04 April 2019. Published 11 July 2019

Косаківська І.В., Войтенко Л.В., Васюк В.А., Щербатюк М.М., Романенко К.О., Бабенко Л.М. 2019. **Гормональний комплекс гаметофітів папороті *Dryopteris filix-mas* (*Dryopteridaceae*) в культурі *in vitro*.** *Український ботанічний журнал*, 76(3): 260–269.

Резюме. Методом високоефективної рідинної хроматографії-масс-спектрометрії визначено вміст ендогенних фітогормонів індоліл-3-оцтової (ІОК), гібереллової (ГК₃), абсцизової (АБК), саліцилової (СА) кислот і цитокінінів – *транс*-зеатину (*m*-З), *транс*-зеатин-*O*-глюкозиду (*m*-ЗГ), *транс*-зеатинрибозиду (*m*-ЗР), ізопентеніладеніну (іП) та ізопентеніладенозину (іПА) у гаметофітах папороті *Dryopteris filix-mas* на різних етапах морфогенезу в культурі *in vitro*. Рістстимулюючі гормони гіберелінового (ГК₃) та цитокінінового (*m*-З) рядів домінували в заростках 60-добових гаметофітів на етапі розвитку лопаткоподібного проталія, який відзначався інтенсивним ростом проталіальної пластинки за рахунок поділу та розтягу апікальних клітин. Вміст ГК₃ сягав 229,9 ± 1,5 нг/г сирої речовини (с. р.), *m*-З – 56,1 ± 2,8 нг/г с. р. У заростках 90-добових гаметофітів, які характеризувалися активним розвитком архегоніальної подушки, що складалась із декількох шарів клітин, необхідних для подальшого живлення зародка, та формуванням архегоніїв і антеридіїв, домінувала ІОК. На заключному етапі морфогенезу у заростках 120-добових гаметофітів, на поверхні яких ще не з'явилися спорофіти, домінував активний *m*-З, тоді як у заростках гаметофітів із ваями вміст ІОК сягав максимального значення (395,5 ± 19,8 нг/г с. р.), що може свідчити про безпосередню участь гормону в регуляції росту та розвитку спорофіта. На цьому етапі морфогенезу відмічено акумуляцію *m*-ЗР і появу АБК. Максимальний вміст СК (287,7 ± 14,4 нг/г с. р.) виявлено на етапі розвитку лопаткоподібного проталія (60-та доба). В подальшому відбулося значне зменшення рівня гормону. У заростку гаметофіта, на поверхні якого сформувався спорофіт, кількість СК дещо зростає. Виявлені закономірності кількісних і якісних змін засвідчили спрямованість фізіологічної дії проаналізованих класів фітогормонів на регулювання процесів морфогенезу гаметофіта *Dryopteris filix-mas*.

Ключові слова: гаметофіт, культура, морфогенез, фітогормони, *Dryopteris filix-mas*, *in vitro*

© 2019 I.V. Kosakivska, K.O. Romanenko, L.V. Voytenko, V.A. Vasyuk, M.M. Shcherbatiuk, L.M. Babenko. Published by the M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

Вступ

Папороті разом із іншими судинними рослинами розділяють тип життєвого циклу, що включає чергування двох поколінь: диплоїдного – спорофіта й вільноживучого гаплоїдного – гаметофіта, але із домінуючою диплоїдною фазою (Sheffield, 2008; Naufler et al., 2016). За розміром зрілі гаметофіти папоротей досить дрібні, являють собою багатоклітинні автотрофи та сапротрофи (Raghavan 1989; Menéndez et al., 2011a). Вирощування до повної зрілості в культурі *in vitro* дозволяє спостерігати за розвитком гаметофіта, досліджувати його морфогенез, формування архегоніїв і антеридіїв та утворення зиготи й зародка (Banks, 1999; Babenko et al., 2018).

Ріст і розвиток гаметофіта й спорофіта в папоротей, як і в представників інших таксонів, регулюються багатокомпонентною гормональною системою (Kosakivska et al., 2016). Фітогормони діють за низьких концентрацій, а сайт їхньої активності часто відокремлений від місця біосинтезу (Fonseca et al., 2014; Wells et al., 2013). Внаслідок транспортування відбувається розподіл і утворюються морфогенетичні градієнти гормонів у різних тканинах і органах рослини, що спричинює регуляцію росту й розвитку (Jailais, Chory, 2010; Sparks et al., 2013). Ауксидам належить ключова роль у регуляції поділу та розтягування клітин, диференціації судинних тканини, фото- і гравітропізмі, апікальному домінуванні, формуванні латеральних коренів, бічному розгалуженні пагонів, цвітінні та ембріогенезі (Enders, Strader, 2015; Naramoto, 2017; Fukui, Hayashi, 2018). На сьогодні виявлено більше 130 різних гіберелінів (ГК), проте їхня більшість не має біологічної активності. У регуляції лінійного росту стебла, пагонів і коренів, збільшенні поверхні листка й числа міжвузлів, індукції цвітіння, детермінації статі та проростання насіння беруть участь $ГК_1$, $ГК_2$, $ГК_3$ й $ГК_4$ (Lo et al., 2008; Achard, Genschik, 2009; Gantait et al., 2015). Абсцизова кислота (АБК) впливає на процесиросту старіння, є антагоністом рістстимулюючих гіберелінів, ауксинів і цитокінінів, регулює сезонний спокій, формує механізми стійкості до стресів (Voytenko, Kosakivska, 2016; Cline, Oh, 2006; Sah, Reddy, Li, 2016). Важливим компонентом гормонального комплексу рослин є цитокініни. Вони стимулюють утворення та активність меристем пагонів,

формують атрагуючу здатність тканин, затримують старіння листків, інгібують ріст і галуження кореня, беруть участь у регуляції проростання насіння й розвитку гаметофіта, формуванні відповіді на стреси (Hwang et al., 2012; Kieber, Schaller, 2014; Vedenicheva, Kosakivska, 2017). Саліцилова кислота (СК) разом з АБК, брасиностероїдами та етиленом належить до ключових фітогормонів, задіяних в реакціях рослин на абіотичні й біотичні стреси (Karpets et al., 2016). СК відіграє важливу роль у регулюванні імунітету та програмованої загибелі клітин. Підвищене накопичення СК пов'язане з розвитком надчутливої реакції-відповіді при формуванні стійкості (Dempsey, Klessig, 2017; Radojicic et al., 2018).

Фітогормональний комплекс, якісний і кількісний склад якого залежать від життєвої форми і стадії розвитку папороті, здавна привертає увагу дослідників. Так, перше повідомлення про вивчення фітогормонів гаметофітів папороті *Pteris longifolia* L. датовано 1938 роком (Albaum, 1938). Подальші дослідження виявили, що у формуванні статевого поліморфізму папоротеподібних задіяні гібереліни та гібереліноподібні речовини (Atallah, Bank., 2015). Розвиток антеридіїв на проталії папоротей ініціювався гіберелоподібним гормоном антеридіогеном, хімічна структура якого виявилась специфічною для кожного виду папоротей (Derzhavina, Pokrovskaya, 2011; Vasjuk, Kosakivska, 2015). Повідомлялося, що антеридіоген синтезувався на стадії розвитку проталії й індуктував утворення антеридіїв на пізніших стадіях морфогенезу гаметофіта (Tanaka et al., 2014). Папороті, які в систематиці посідають проміжне місце між мохами та квітковими рослинами, мають широкий діапазон гіберелінів, що пов'язують з еволюцією судинних рослин (Hirano et al., 2007). Вважають, що вони синтезують багато так званих "тупикових" неактивних гіберелінів (Greer et al., 2009). Ауксини, гібереліни й цитокініни були виявлені в гаметофітах папоротей *Asplenium nidus* L. (Menendez et al., 2011b) та *Dryopteris affinis* (Lowe) Fraser-Jenk. (Menéndez et al., 2006a). У жіночих гаметофітів папороті *Blechnum spicant* L. (= *Struthiopteris spicant* (L.) Weiss) вміст цитокінінів був значно вищим, ніж у чоловічих, при цьому переважали ізопентенільні форми гормону (Menéndez et al., 2009). У спорах і протонемі гаметофіта *Anemia phyllitidis* (L.) Sw. була ідентифікована АБК (Cheng, Schraudolf,

1974; Bürcky, 1977). Гормон виявився антагоністом антеридіогену (Hickok, 1985; Warne, Hickok, 1991; Banks, 1999). Розвиток антеридіїв у гаметофітах *Ceratopteris richardii* Brongn та *B. spicant* блокувався екзогенною АБК (Warne, Hickok 1991; Menéndez et al., 2006b). Проте, за дії гормону відбувався активний розвиток ризоїдів і формувалися чашоподібні жіночі гаметофіти (Hickok, 1983). Саліцилова кислота папоротей мало досліджена. Відомо лише, що екзогенне використання СК при культивуванні водної папороті *Azolla filiculoides* Lam., яка утворює симбіоз з азотфіксуючою ціанобактерією *Trichormus azollae* (Strasburger) Komárek & Anagnostidis (*Nostoc azollae*), виявило присутність у папороті СК-генів, відповідальних за експресію та сигналінг. Крім того, екзогенна СК впливала на активність генів ціанобіонта (De Vries et al., 2018).

У наших попередніх роботах повідомлялося про характер акумуляції й розподілу гіберелової (ГК₃), індоліл-3-оцтевої (ІОК) кислоти та АБК, а також склад і динаміку цитокінінів в органах спорофіта *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott на різних фенологічних фазах розвитку. Встановлені закономірності кількісних і якісних змін засвідчили спрямованість фізіологічної дії проаналізованих класів фітогормонів на регулювання процесів диференціації та морфогенезу спорофіта (Kosakivska et al., 2018; Vedenicheva, Kosakivska, 2018). Нами також було проаналізовано вплив екзогенних цитокінінів на морфогенез гаметофіта *D. filix-mas* у культурі *in vitro*. Встановлено, що цитокініни в концентрації 10⁻⁵ М затримували ріст гаметофіта, викликали деформацію та зменшення розмірів проталія, пригнічували розвиток статевих структур і ріст спорофіта, тоді як зменшення концентрації до 10⁻⁸ М, навпаки, стимулювало розвиток гаметофіта (Romanenko et al., 2018).

За результатами аналізу літературних джерел, присвячених вивченню фітогормональної регуляції росту й розвитку гаметофітів папоротей, виявлена участь гіберелінів у формуванні статі, тоді як роль ендогенних ауксинів, цитокінінів, АБК та СК і питання взаємодії фітогормонів під час росту та розвитку гаметофітів залишаються малодослідженими. Тому метою нашої роботи було вивчення балансу фітогормонів на різних етапах морфогенезу гаметофіта папороті *Dryopteris filix-mas*, вирощеного в умовах *in vitro*.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були гаметофіти папороті *Dryopteris filix-mas*. Це трав'яний полікарпик, гемікриптофіт з літньозеленим фенолітипом. Проростання спор та вирощування гаметофітів проводили, як описано раніше (Babenko et al., 2017). Морфологію спор і гаметофітів досліджували за допомогою мікроскопів сканувального електронного JEOL JSM-6060 LA (Японія) та світлового Carl Zeiss Primo Star (Німеччина).

Вміст ендогенних фітогормонів визначали на наступних етапах морфогенезу гаметофіта: 1 – розвиток лопаткоподібного проталія, 60-та доба від проростання спор; 2 – формування серцеподібного проталія, 90-та доба від проростання спор; 3 – розвиток спорофіта на поверхні заростку гаметофіта, 120-та доба від проростання спор. Досліджувалися також заростки гаметофіта без вай спорофіта.

Наважки матеріалу (2 г) розтирали в рідкому азоті та гомогенізували у 48 мл охолодженого 80%-вого етанолу, який містив 1–2 краплі антиоксиданту (0,02%-вого диетилдитіокарбамату натрію) та екстрагували впродовж 24 год. Відфільтровані спиртові екстракти випаровували до водного залишку об'ємом 4 мл на вакуумному ротатійному випаровувачі (тип 350 P, Польща) при температурі не вище +40 °С, до якого додавали 15 мл охолодженого розчину метанол : мурашина кислота (15 : 1) і центрифугували впродовж 30 хв. при 15000 об/хв і температурі +4 °С у центрифугі К-24 фірми "Janetski" (Німеччина). Отримані супернатанти випаровували до 5 мл і переносили в чисті пробірки. Подальше очищення фітогормонів проводили за описаним методом (Dobrev, Vankova, 2012) на двох твердофазних колонках SPE C18, Sep-Pak Plus та SPE Oasis MCX, 6 cc/150 mg, фірми "Waters" (Ірландія). Колонку SPE C18 використовували для видалення ліпофільних речовин, протеїнів та пігментів. На колонці SPE Oasis MCX здійснювали сорбцію ІОК, АБК, СК, ГК₃ та цитокінінів. Елюцію ІОК, АБК, СК та ГК₃ проводили 100%-вим метанолом, цитокінінів – за допомогою лужного елюенту (60 мл 100%-вого метанолу та 2,5 мл 26%-вого аміаку, доведеного до об'єму 100 мл ультрарізною водою). Отримані елюенти випаровували досуха у вакуумному ротатійному випаровувачі за температури, що не перевищувала +40 °С. Сухі залишки кожної

фракції перед аналізом відновлювали до об'єму 200 мікролітрів 45%-вим метанолом.

Аналітичне визначення фітогормонів проводили методом високоефективної рідинної хроматографії на рідинному хроматографі Agilent 1200 LC з діодно-матричним детектором G 1315 B (США) у тандемі з одноквадрупольним мас-спектрометром Agilent G6120A. Для хроматографічного розділення використовувалась колонка Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 з ліпофільно-модифікованим сорбентом, розмір часток якого становить 5 мкм (оберненофазна хроматографія). Після хроматографічного розділення компонентів проб об'ємом 20 мкл системою розчинників (метанол : ультрачиста вода : оцтова кислота – 45 : 54,9 : 0,1) проводили детекцію ІОК та АБК в УФ-області поглинання за аналітичної довжини хвилі 280 та 254 нм. Для визначення вмісту СК проби об'ємом 20 мкл розділяли системою розчинників (метанол : ультрачиста вода : оцтова кислота – 45 : 54,9 : 0,1) і проводили детекцію СК в УФ-області поглинання за аналітичної довжини хвилі 302 нм. Після розділення проб системою розчинників ацетонітрил : ультрачиста вода : оцтова кислота у співвідношенні 30 : 69,9 : 0,1 детектували ГК₃ за сигналом мас-детектора. Проби з цитокінінами розділяли системою розчинників (метанол : вода : оцтова кислота – 35 : 64,5 : 0,5), детекцію проводили за аналітичної довжини хвилі 269 нм. Швидкість рухомої фази розчинників під час детекції ІОК та АБК становила 0,7 мл/хв, СК – 0,8 мл/хв, ГК₃ і цитокінінів – 0,5 мл/хв. У якості стандартів при побудові калібрувальних таблиць використовувались немічені ІОК, АБК, СК, ГК₃, *транс*-зеатинглюкозид (*m*-ЗГ), *транс*-зеатин (*m*-З), *транс*-зеатинрибозид (*m*-ЗР), ізопентеніл-аденін (іП) та ізопентеніладенозин (іПА) виробництва фірми "Sigma-Aldrich" (США).

Вміст речовин-аналітів у пробах контролювали за допомогою мас-спектрометра в комбінованому режимі роботи (електроспрей та хімічна іонізація за атмосферного тиску) при негативній полярності іонізації молекул речовин-аналітів під час аналізу ІОК, АБК, СК, ГК₃ й позитивній – під час аналізу цитокінінів. Для кількісного аналізу ГК₃ використовували сигнал мас-детектора MSD SIM (налаштування 50%-вого часу сканування детектора показника *m/z* 345).

Досліди проводили у трьох біологічних та трьох аналітичних повторах. Аналіз і обрахунок

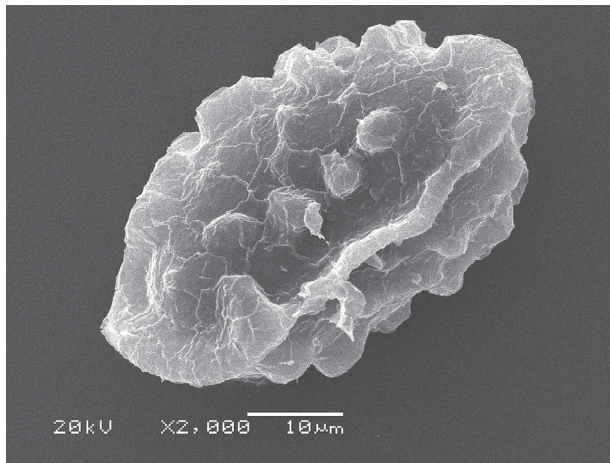


Рис. 1. Загальний вигляд спори *Dryopteris filix-mas*. Сканувальний електронний мікроскоп JEOL JSM-6060 LA (Японія)

Fig. 1. General view of a spore of *Dryopteris filix-mas*. Scanning electron microscope JEOL JSM-6060 LA (Japan)

вмісту фітогормонів здійснювали за допомогою програмного забезпечення Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition (rev. C.01.09). Отриманні кількісні значення обробляли статистично, використовуючи програму Microsoft Excel 2016. Достовірність різниці оцінювали за критерієм Стюдента, використовуючи 5%-вий рівень значущості ($P \leq 0,05$).

Результати та обговорення

Спора є першою стадією гаметофіта в життєвому циклі папоротей. Спори *D. filix-mas* білатеральні, ниркоподібної форми з гребінчиками та усіченими бородавочками по всій поверхні зморшкуватого периспорія, $49,5 \pm 0,9$ мкм завдовжки та $37,1 \pm 0,6$ мкм завширшки (рис. 1).

На 60-ту добу від проростання спор формувалися витягнуті лопаткоподібні проталії розміром 1,0–1,5 мм. Активний ріст проталіальної пластинки відбувався за рахунок поділу клітин. На верхівці лопаткоподібного проталія утворювалася невелика виїмка з апікальною меристемою. Архегоніальна подушка ще не розвивалась, статеві органи – архегонії і антеридії були відсутні. Апікальні меристематичні клітини формували два зачатки "крилець", а вздовж країв протяглия розвивалися одноклітинні сосочкоподібні залозисті трихоми, внаслідок чого край проталія виглядав досить нерівним (рис. 2, А).

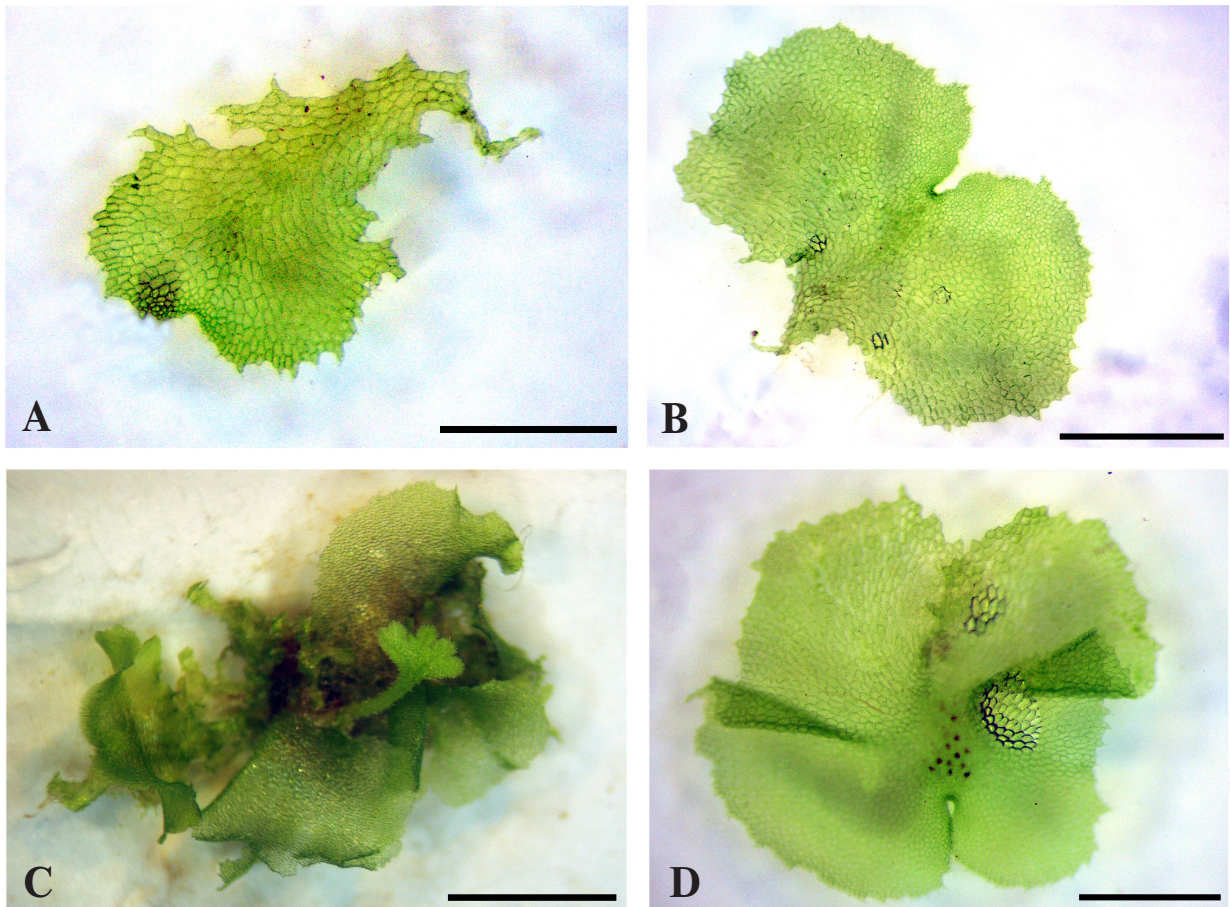


Рис. 2. Морфологічні стани (А–D) гаметофіта *Dryopteris filix-mas*. А: лопаткоподібний проталій; В: серцеподібний проталій; С: заросток гаметофіта зі спорофітом; D: заросток гаметофіта без спорофіта. Масштаб: 1 мм

Fig. 2. Morphological stages (A–D) of a *Dryopteris filix-mas* gametophyte. A: spatulate prothallium; B: cordiform prothallium; C: sporophyte on the surface of gametophyte; D: surface of the gametophyte prothallium without sporophyte. Scale: 1 mm

На 90-ту добу від проростання спор формувалися серцеподібні проталії завширшки до 3 мм з симетричними крильцями та глибокою виїмкою на верхівці. Проталії були рясно вкриті секреторними волосками. Меристематичні клітини формували центральну архегоніальну подушку, яка складалась із клітин у кілька шарів. Така складна будова подушки необхідна для подальшого живлення зародка спорофіта. На нижньому боці проталія на подушці формувалися архегонії. Чисельні антеридії утворювалися в базальній частині заростка між ризоїдами на нижньому боці проталія (рис. 2, В).

На 120-ту добу від проростання спор розміри заростків гаметофітів збільшилися, набули неправильної округло-серцеподібної форми

із хвилястими крильцями. В подальшому ріст проталія призупинявся, виїмка розтягувалась, чисельність ризоїдів збільшувалася. На окремих заростках, де відбулося запліднення, розвивалися перші проростки спорофіта, що мали одну–дві вайї (рис. 2, С). Частина гаметофітів у цей час була без ознак розвитку спорофіта (рис. 2, D).

Фітогормональний комплекс гаметофіта *D. filix-mas* на всіх досліджених етапах морфогенезу містив індоліл-3-оцтову, гіберелову та саліцилову кислоти (рис. 3, 4). Вміст ІОК становив від $38,9 \pm 1,9$ до $395,5 \pm 19,8$ нг/г сирої речовини (с. р.), ГК₃ – від $23,3 \pm 1,2$ до $229,9 \pm 11,5$, СК – від $34,9 \pm 1,7$ до $287,7 \pm 14,4$ нг/г с. р. Абсцизова кислота ($46,7 \pm 2,3$ нг/г) ідентифікована лише у 120-добових

Таблиця. Вміст цитокінінів у гаметофіті *Dryopteris filix-mas* на різних етапах морфогенезу (нг/г сирої речовини)Table. Content of cytokinins in gametophytes of *Dryopteris filix-mas* at various stages of morphogenesis (ng/g of fresh weight)

Ізоформи цитокінінів	Етап морфогенезу, доба від проростання			
	Розвиток лопатко-подібного проталія, 60	Формування серце-подібного проталія, 90	Розвиток заростку гаметофіта без спорофіта, 120	Розвиток заростку гаметофіта зі спорофітом, 120
<i>транс</i> -зеатин- <i>О</i> -глюкозид	сліди	22,1±1,1	сліди	30,4±1,5*
<i>транс</i> -зеатин	56,1±2,8	сліди	55,3±2,8	сліди
<i>транс</i> -зеатинрибозид	сліди	сліди	сліди	62,9±3,1
ізопентеніладенін	0,9±0,05	сліди	сліди	сліди
ізопентеніладенозин	0,9±0,05	0,5±0,03**	0,8±0,04**	сліди

* – достовірна відмінність у порівнянні з етапом формування серцеподібного проталія для $P \leq 0.001$ ($n = 10$);

** – достовірна відмінність у порівнянні з етапом розвитку лопаткоподібного проталія та етапом розвитку заростку гаметофіта без спорофіта для $P \leq 0.001$ ($n = 10$).

гаметофітах, на заростках яких сформувалися спорофіти, тоді як в усіх інших зразках гормон знаходився в слідових кількостях. Якісний та кількісний вміст ізоформ цитокінінів залежав від етапу морфогенезу (див. таблицю).

На етапах розвитку лопаткоподібного та серцеподібного проталіїв у тканинах 60- та 90-добових гаметофітів, які характеризувалися активним ростом та утворенням репродуктивних структур, вміст ІОК становив $64,5 \pm 3,2$ та $59,5 \pm 3,0$ нг/г с. р.) (рис. 3). З уповільненням темпів росту на 120-ту добу в гаметофітах, на заростках котрих були відсутні спорофіти, зафіксоване суттєве (більш ніж у 1,6 рази) зменшення кількості гормону. Натомість у гаметофітах, на яких розвинулись ваї та корені, спостерігалось підвищення вмісту ІОК у 10 разів (рис. 4), що може свідчити про безпосередню участь гормону в регуляції росту та розвитку спорофіта. У роботах деяких авторів наголошувалось, що ІОК разом з гіберелінами задіяна в регуляції апогамного шляху розвитку папороті *Dryopteris affinis*, у гаметофітах якої вміст гормону на різних етапах морфогенезу коливався від 4 до 108 нг/г сухої речовини (сух. р.) і був максимальним на початку розвитку апогамного зародку (Menéndez et al., 2006a).

Максимальний вміст GK_3 ($229,9 \pm 11,5$ нг/г с. р.) фіксувався на етапі розвитку лопаткоподібного проталія, який відзначався інтенсивним ростом проталіальної пластинки за рахунок поділу та розтягу апікальних клітин. На наступних етапах вміст гормону значно зменшився, однак певне зростання зафіксовано у тканинах заростку зі сформованими спорофітами (рис. 3, 4). Раніше

повідомлялося (Menéndez et al., 2006a), що на ранніх етапах розвитку апогамного зародку папороті *D. affinis* було виявлено лінійку гіберелінів, що включала GK_1 , GK_3 , GK_4 , GK_7 та GK_9 . Вміст гормонів коливався від 4 до 365 нг/г сух. р. Максимальне накопичення з домінуванням GK_3 спостерігали на 50-ту добу після проростання спор. Повідомлялося, що у гаметофітах папороті *Asplenium nidus* L. була виявлена GK_9 у концентрації 130 пмоль/г сух. р. (Menendez et al., 2011b).

Максимальний вміст СК ($287,7 \pm 14,4$ нг/г с. р.) виявлено на етапі розвитку лопаткоподібного проталія (60-та доба). В подальшому рівень гормону значно зменшувався. У заростку гаметофіта, на поверхні якого сформувався спорофіт, кількість СК дещо зросла (рис. 3, 4).

У гаметофітах *D. filix-mas* на етапі розвитку лопаткоподібного проталія домінував *транс*-зеатин – активна форма цитокініну, рівень якого сягав $56,1 \pm 2,8$ нг/г с. р. У 90-добових гаметофітах виявлена значна кількість зеатин-*О*-глюкозиду – неактивної запасної форми гормону. На заключному етапі морфогенезу (120-та доба) заростки гаметофітів, на яких сформувалися спорофіти, накопичували активний *m*-ЗР і *m*-ЗГ, тоді як заростки без спорофітів містили значні кількості *m*-З (таблиця). Зеатин і зеатинрибозид належать до найбільш активних домінуючих гормонів цитокінінового ряду, які регулюють ріст і розвиток рослин (Vedenicheva, Kosakivska, 2017). Нагромадження цих гормонів на етапі формування округло-хвилястих проталіїв *D. filix-mas* та розвитку перших проростків спорофіта на їхній поверхні узгоджується з відомостями про значний вміст ЦК

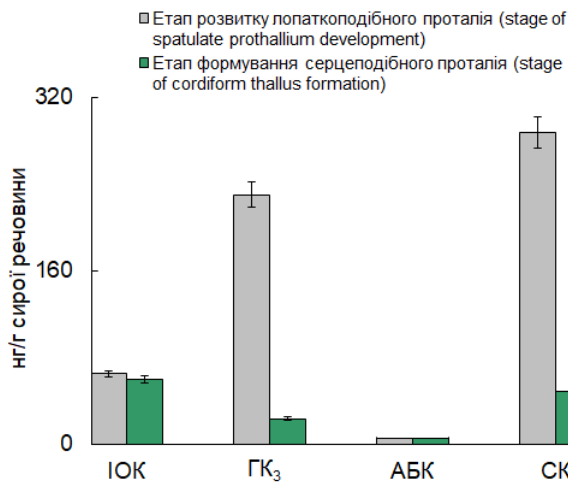


Рис. 3. Вміст ендогенних фітогормонів у гаметофітах *Dryopteris filix-mas* на різних етапах морфогенезу. Тут і на рис. 4: індоліл-3-оцтова кислота (ІОК), гіберелова (ГК₃), абсцизова (АБК), саліцилова (СК)

Fig. 3. Content of endogenous phytohormones in *Dryopteris filix-mas* gametophytes at various stages of morphogenesis. Here and in Fig. 4: indolyl-3-acetic acid (IAA), gibberellic (GA₃), abscisic (ABA), salicylic acid (SA)

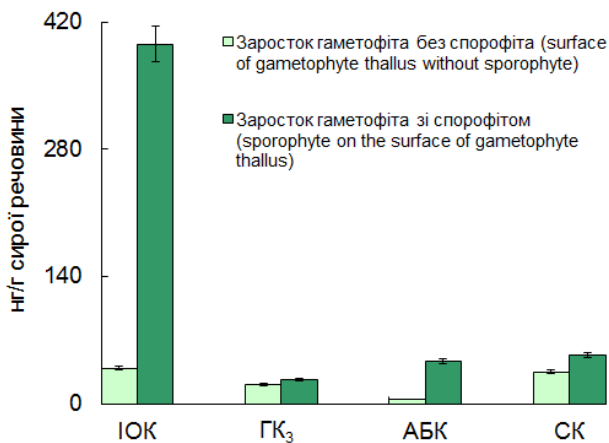


Рис. 4. Вміст ендогенних фітогормонів у 120-денних гаметофітах *Dryopteris filix-mas*

Fig. 4. Content of endogenous phytohormones in 120-day gametophytes of *Dryopteris filix-mas*

у швидкозростаючих тканинах з високим мітотичним індексом (Schaller, Street, Kieber, 2014). Неактивна ізоформа іПА була виявлена у малій кількості в тканинах гаметофіта на всіх етапах морфогенезу за виключенням останнього, коли на поверхні заростку сформувався спорофіт. Активний іП, який утворюється на початку прямого (мевалонатного) шляху біосинтезу цитокінінів і за певних умов легко трансформується у *транс*-зеатин (Frébert et al., 2011), був ідентифікований у тканинах гаметофіта на етапі розвитку лопаткоподібного проталія в низькій концентрації (таблиця). Деякі дослідники повідомляли, що в гаметофітів *Asplenium nidus* L. серед цитокінінів були присутні *транс*-ЗР (38 пмоль/г сух. р.) та іП (42 пмоль/г сух. р.), тоді як *транс*-З сягав 5 пмоль/г сух. р. (Menendez et al., 2011b).

Висновки

За результатами проведеного дослідження визначені вміст і баланс ендогенних ІОК, ГК₃, АБК, СК та цитокінінів у гаметофітів папороті *Dryopteris filix-mas* на різних етапах морфогенезу в культурі *in vitro*. Рістстимулюючі гормони гіберелінового (ГК₃) та цитокінінового (*транс*-зеатин) рядів домінували у 60-добових гаметофітів під час формування лопаткоподібного проталія, його активного росту, розвитку одноклітинних залозистих трихом. Високим вмістом відзначалась також саліцилова кислота. У заростках 90-добових гаметофітів, які характеризувалися активним розвитком архегоніальної подушки, необхідної для подальшого живлення зародка, та формуванням архегоніїв і антеридіїв, домінувала індоліл-3-оцтова кислота. При цьому вміст ГК₃ зменшувався і з'являлася запасна форма цитокінінів – зеатин-О-глюкозид. На заключному етапі морфогенезу в заростках 120-добових гаметофітів, на поверхні яких ще не з'явилися спорофіти, домінував активний *транс*-зеатин, тоді як вміст ГК₃ був найнижчим. У заростках гаметофітів зі спорофітом вміст ІОК мав максимальні показники (395,5 ± 19,8 нг/г с. р.), що може свідчити про безпосередню участь гормону в регуляції росту та розвитку вай і коренів спорофіта. На цьому етапі морфогенезу відмічено акумуляцію *транс*-зеатинрибозиду з появою абсцизової кислоти. Виявлені закономірності кількісних і якісних змін засвідчили спрямованість фізіологічної дії проаналізова-

них класів фітогормонів на регулювання процесів морфогенезу гаметофіта *Dryopteris filix-mas*.

Подяки

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)".

СПИСОК ПОСИЛАНЬ

- Achard P., Genschik P. 2009. Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany*, 60(4): 1085–1092]. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern301>
- Albaum H.G. 1938. Inhibitions due to growth hormones in fern prothallium. *American Journal of Botany*, 938, 25: 124–133.
- Atallah N.M., Banks J.A. 2015. Reproduction and the pheromonal regulation of sex type in fern gametophytes. *Frontiers in Plant Science*, 6: 100–107. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00100>
- Babenko L.M., Romanenko K.O., Shcherbatiuk M.M., Vasheka O.V., Romanenko P.O., Negretsky V.A., Kosakivska I.V. 2017. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*, (10): 101–107. [Бабенко Л.М., Романенко К.О., Шчербатиук М.М., Вашека О.В., Романенко П.О., Негрецький В.А., Косаківська І.В. 2017. Морфогенез гаметофіта дикорослої папороті *Polystichum aculeatum* (L.) Roth. флори України in культурі in vitro. *Доповіді Національної академії наук України*, (10): 101–107]. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.10.101>
- Babenko L.M., Romanenko K.O., Shcherbatiuk M.M., Vasheka O.V., Romanenko P.O., Negretsky V.A., Kosakivska I.V. 2008. Effects of exogenous phytohormones on spore germination and morphogenesis of *Polystichum aculeatum* (L.) Roth gametophyte in vitro culture. *Cytology and Genetics*, 52 (2): 117–126. <https://doi.org/10.3103/S0095452718020032>
- Banks J.A. 1999. Gametophyte development in ferns. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 163–186.
- Bürcky K. 1977. Antheridiogene in *Anemia phyllitidis* L. Sw. (Schizaeaceae) I. Zeitverlauf der Antheridiogensynthese Citation Data. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 84(2): 167–171.
- Cheng C.Y., Schraudolf H. 1974. Nachweis von abszisinsäure in sporen und jungen Prothallien von *Anemia phyllitidis* (L.) Sw. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 71: 366–369.
- Cline M.G., Oh C. 2006. A reappraisal of the role of abscisic acid and its interaction with auxin in apical dominance. *Annals of Botany*, 98(4): 891–897. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl173>
- De Vries S., De Vries J., Teschke H., von Dahlen J.K., Rose L.E., Gould S.B. 2018. Jasmonic and salicylic acid response in the fern *Azolla filiculoides* and its cyanobiont. *Plant, Cell & Environment*, 41(11): 2530–2548. <https://doi.org/10.1111/pce.13131>
- Dempsey D.A., Klessig D.F. 2017. How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? *BMC Biology*, 15: 23–34. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0364-8>
- Derzhavina N.M., Pokrovskaya Z.M. 2011. *Turczaninowia*, 14(3): 131–144. [Державина Н.М., Покровская З.М. 2011. Биоморфология спорофита и онтогенез гаметофіта *Adiantum capillus-veneris* L. (*Adiantaceae*). *Turczaninowia*, 14(3): 131–144].
- Dobrev P.I., Vankova R. 2012. Quantification of abscisic acid, cytokinin, and auxin content in salt-stressed plant tissues. *Plant Salt Tolerance. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 913: 251–261. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-986-0_17
- Enders T.A., Strader, L.C. 2015. Auxin activity: Past, present, and future. *American Journal of Botany*, 102: 180–196. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400285>
- Fonseca S., Rosado A., Vaughan-Hirsch J., Bishopp A., Chini A. 2014. Molecular locks and keys: the role of small molecules in phytohormone research. *Frontiers in Plant Science*, 5: 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00709>
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. 2011. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, 62(8): 2431–2452. <https://doi.org/10.1093/jxb/err004>
- Fukui K., Hayashi K. 2018. Manipulation and Sensing of Auxin Metabolism, Transport and Signaling. *Plant and Cell Physiology*, 59(8): 1500–1510. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy076>
- Gantait S., Sinniah U.R., Ali M.N., Sahu N.C. 2015. Gibberellins – a multifaceted hormone in plant growth regulatory network. *Current Protein & Peptide Science*, 16(5): 406–412.
- Greer G.K., Dietrich M.A., Stewart S., Devol J., Rebert A. 2009. Morphological functions of gibberellins in leptosporangiate fern gametophytes: insights into the evolution of form and gender expression. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 159: 599–615. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0794-9>
- Haufler C.H., Pryer K.M., Schuettpelz E., Sessa E.B., Farrar D.R., Moran R., Schneller J.J., Watkins Jr.J.E., Windham M.D. 2016. Sex and the single gametophyte: Revising the homosporous vascular plant life cycle in light of contemporary research. *BioScience*, 66(11): 928–937. <https://doi.org/10.1093/biosci/biw108>
- Hickok L.G. 1983. Abscisic acid blocks antheridiogen-induced antheridium formation in gametophytes of the fern *Ceratopteris*, *Canadian Journal of Botany*, 61: 888–892. <https://doi.org/10.1139/b83-098>
- Hickok L.G. 1985. Abscisic acid resistant mutants in the fern *Ceratopteris*: characterization and genetic analysis. *Canadian Journal of Botany*, 63: 1582–1585.
- Hirano K., Nakajima N., Asano K., Nishiyama T., Sakakibara H., Kojima M., Katoh E., Xiang H., Tanahashi T., Hasebe M., Banks J., Ashikari M., Kiatano H., Uegu-

- chi-Takana M., Matsuoka M. 2009. The *GID1*-mediated gibberellin perception mechanism is conserved in the lycophyte *Selaginella moellendorffii* but not in the bryophyte *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*, 19: 3058–3079. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0794-9>
- Hwang I., Sheen J., Muller B. 2012. Cytokinin signaling networks. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 353–380. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105503>
- Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Kosakivska I.V. 2016. *Plant physiology and genetics*, 48(2): 158–166. [Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Косаковская И.В. 2016. Оксид азота и пероксид водорода как сигнальные посредники при индуцировании теплоустойчивости проростков пшеницы экзогенными жасмоновой и салициловой кислотами. *Физиология растений и генетика*, 48(2): 158–166].
- Kieber J.J., Schaller G.E. 2014. Cytokinins. *Arabidopsis Book*, 12: e0168. <https://doi.org/10.1199/tab.0168>
- Kosakivska I.V., Babenko L.M., Shcherbatiuk M.M., Vedenicheva N.P., Voytenko L.V., Vasyuk V.A. 2016. Phytohormones during growth and development of Polypodiophyta. *Advances in Biology & Earth Sciences*, 1(1): 26–44.
- Kosakivska I.V., Vasyuk V.A., Voytenko L.V. 2018. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*, 12: 79–86. [Косаківська І.В., Васюк В.А., Войтенко Л.В. 2018. Ендогенні фітогормони в онтогенезі лептоспорангіатної папороті флори України *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott. *Доповіді. Національної Академії наук України*, 12: 79–86]. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.12.079>
- Lo S.F., Yang S.Y., Chen K.T., Hsing Y.I., Zeevaart J.A., Chen L.J., Yu S.M. 2008. A novel class of gibberellin 2-oxidases control semidwarfism, tillering, and root development in rice. *Plant Cell*, 20(10): 2603–2618. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060913>
- Menéndez V., Villacorta N.F., Revilla M.A., Gotor V., Bernard P., Fernández H. 2006a. Exogenous and endogenous growth regulators on apogamy in *Dryopteris affinis* (Lowe) Fraser-Jenkins sp. [ssp.] *affinis*. *Plant Cell Reports*, 25(2): 85–91. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0041-1>
- Menéndez V., Revilla M.A., Bernard P., Gotor V., Fernández H. 2006b. Gibberellins and antheridiogen on sex in *Blechnum spicant* L. *Plant Cell Reports*, 25: 1104–1110. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0149-y>
- Menéndez V., Revilla M.A., Fal M.A., Fernández H. 2009. The effect of cytokinins on growth and sexual organ development in the gametophyte of *Blechnum spicant* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96: 245–250. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9481-y>
- Menéndez V., Arbesú R., Somer M., Revilla A., Fernández H. 2011a. From spore to sporophyte: how to proceed *in vitro*. In: *Working with Ferns: Issues and Applications*. Eds H. Fernández, A. Kumar, A. Revilla. New York. Dordrecht; Heidelberg; London: Springer, pp. 97–110.
- Menéndez V., Abul Y., Bohanec B., Lafont F., Fernández H. 2011b. The effect of exogenous and endogenous phytohormones on the *in vitro* development of gametophyte and sporophyte in *Asplenium nidus* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33: 2493–2500. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0794-9>
- Naramoto S. 2017. Polar transport in plants mediated by membrane transporters: focus on mechanisms of polar auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 40: 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.06.012>
- Radojicic A., Li X., Zhang Y. 2018. Salicylic acid: A double-edged sword for programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science*, 9, Article 1133. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01133>
- Raghavan V. 1989. *Developmental biology of fern gametophytes*. Cambridge: Cambridge University Press, 361 pp.
- Romanenko K.O., Babenko L.M., Vasheka O.V., Romanenko P.O., Kosakivska I.V. 2018. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*, 11: 96–105. [Романенко К.О., Бабенко Л.М., Вашека О.В., Романенко П.О., Косаківська І.В. 2018. Фітогормональна регуляція морфогенезу гаметофіта *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott в культурі *in vitro*. *Доповіді Національної Академії наук України*, 11: 96–105]. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.11.096>
- Sah S.K., Reddy K.R., Li J. 2016. Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1–26. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00571>
- Schaller G.E., Street I.H., Kieber J.J. 2014. Cytokinin and the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology*, 21: 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.015>
- Sheffield E. 2008. Alternation of generations. In: *Biology and evolution of ferns and lycophytes*. Ed. T.A. Ranker, C.H. Haufler. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 49–74. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp194>
- Tanaka J., Yano K., Aya K., Hirano K., Takehara S., Koketsu E., Ordonio R.L., Park S.H., Nakajima M., Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M. 2014. Antheridiogen determines sex in ferns via a spatiotemporally split gibberellin synthesis pathway. *Science*, 346(6208): 469–473. <https://doi.org/10.1126/science.1259923>
- Vedenicheva N.P., Kosakivska I.V. 2017. *Cytokinins as regulators of plant ontogenesis under different growth conditions*. Kyiv: Nash Format, 200 pp. [Веденичова Н.П., Косаківська І.В. 2017. *Цитокініни як регулятори онтогенезу рослин за різних умов зростання*. Київ: Наш формат, 200 с.].
- Vedenicheva N.P., Kosakivska I.V. 2018. Endogenous cytokinins dynamics during development of sporophytes of perennial ferns *Dryopteris filix-mas* and *Polystichum aculeatum* (Dryopteridaceae). *Ukrainian Botanical Journal*, 75(4): 384–391. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj75.04.384>
- Vasyuk V.A., Kosakivska I.V. 2015. *Ukrainian Botanical Journal*, 72(1): 65–73. [Васюк В.А., Косаківська І.В. 2015. Гібереліни папоротей: участь у регу-

- ляції фізіологічних процесів. *Український ботанічний журнал*, 72(1): 65–73]. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj72.01.065>
- Voytenko L.V., Kosakivska I.V. 2016. *The bulletin of the Kharkiv national agricultural university of V.V. Dokuchaeva*, 1(37): 27–41. [Войтенко Л.В., Косаківська І.В. 2016. Поліфункціональний фітогормон абсцизова кислота. *Вісник Харківського національного аграрного університету*, 1(37): 27–41].
- Warne T.R., Hickok L.G. 1991. Control of sexual development in gametophytes of *Ceratopteris richardii*: antherid-iogen and abscisic acid. *Botanical Gazette (Chicago)*, 152: 148–153.
- Wells D.M., Laplaze L., Bennett M.J., Vernoux T. 2013. Biosensors for phytohormone quantification: challenges, solutions, and opportunities. *Trends in Plant Sciences*, 18(5): 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.12.005>
- Zia M., Riaz-ur-Rehman, Chaudhary M.F. 2007. Hormonal regulation for callogenesis and organogenesis of *Artemisia absinthium* L. *African Journal Biotechnology*, 6(16): 1874–1878.

Рекомендує до друку О.К. Золотарьова