

УДК 577.175.1:575.16:582.394

ФІТОГОРМОНИ В ОРГАНАХ СПОРОФІТУ *DRYOPTERIS FILIX-MAS* (L.) SCHOTT. В ОНТОГЕНЕЗІ

© 2018 р. Л. В. Войтенко, В. А. Васюк, І. В. Косаківська

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного

Національної академії наук України

(Київ, Україна)

Методом вискоєфективної рідинної хроматографії-мас-спектрометрії (ВЕРХ-МС) ідентифіковано комплекс ендогенних фітогормонів та проаналізовано характер акумуляції вільної і кон'югованої форм індоліл-3-оцтової (ІОК), абсцизової (АБК) та гіберелової (ГК₃) кислот в органах спорофіту лептоспорангіатної папороті *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott. на різних фазах розвитку. Встановлено, що під час весняної вегетації на етапі інтенсивного росту центром локалізації кон'югованої ІОК було кореневище спорофіту, тоді як у ваях домінувала активна форма АБК. Під час розвитку сорусів, дозрівання спор та їх висипання кількість вільної ІОК та АБК у ваях збільшувалася. На етапі завершення вегетації вміст ІОК та АБК досягав максимуму з переважанням кон'югованої ІОК у ваях та кореневищі, а вільної АБК – у ваях. Максимальний вміст вільної ГК₃ зафіксовано у ваях у фазі активних метаболічних процесів, тоді як при переході спорофіту до стану спокою у фазі осінньої вегетації максимальний вміст кон'югованої форми гормону був у кореневищах. Отримані результати свідчать, що у підтриманні ауксинового гомеостазу при переході від інтенсивного росту до формування та дозрівання спор у сорусах і на етапі завершення вегетації задіяні механізми кон'югації, а у період масового висипання зрілих спор метаболічні стратегії біосинтезу/катаболізму. Характер накопичення АБК опосередковано вказує на причетність гормону до активації захисних адаптаційних процесів в осінній період вегетації. Динаміка й локалізація ГК₃ свідчить про її участь в регуляції процесів розвитку та дозрівання спор. Закономірності кількісних і якісних змін виявили подібність у функціях головних класів фітогормонів папороті *D. filix-mas* та вищих квіткових рослин.

Ключові слова: *Dryopteris filix-mas*, індоліл-3-оцтова, абсцизова та гіберелова кислоти, спорофіт, онтогенез

До однієї з найбільш ефективних систем міжклітинної регуляції у рослин належить гормональна. Фітогормони беруть участь в управлінні фізіологічними та метаболічними процесами, а спрямованість їхньої дії визначається вмістом, локалізацією в органах та тканинах й характером міжгормональної взаємодії (Косаківська, 2003; Munné-Bosch, Müller, 2013). Присутність фітогормонів у представників різних таксонів, уніфікованість їхніх основних структурних елементів вказують на те, що ці сполуки виникли на найбільш ранніх етапах еволюції, проте поява окремих класів фітогормонів не була одночасною (Ross, Reid, 2013).

Адреса для кореспонденції: Войтенко Леся Василівна, Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, м. Київ, 01601, Україна;
e-mail: Lesya_voytenko@ukr.net

Ауксини, гібереліни та абсцизова кислота (АБК) належать до класичних фітогормонів. Ауксини контролюють ембріо-, органо- та морфогенез, апікальне домінування, судинну диференціацію, полярність органів, розвиток кореневої системи, насіння і плодів (Enders, Strader, 2015). Гібереліни, що налічують понад 130 форм, задіяні у регуляції процесів проростання насіння, координують поділ клітин і їхнє розтягування, детермінують стать, індують цвітіння квіткових рослин (Gantait et al., 2015). АБК є визнаним гормоном стресу, а стрес-індукована акумуляція АБК розглядається як складова захисного механізму, спрямованого на уповільнення метаболізму й адаптацію до впливу стресових чинників (Войтенко, Косаківська, 2016).

Секвенування геномів представників різних класів рослин дало можливість простежити походження та розвиток системи сигналіngu

окремих класів фітогормонів (Simm et al., 2016). Проте існуючої інформації замало для того, щоб скласти картину еволюції фітогормонів. Вочевидь, не вистачає даних щодо гормональної системи у рослин різного систематичного положення, дослідження їхньої динаміки протягом життєвого циклу, локалізації у вегетативних і генеративних органах, співставлення таких даних із швидкістю і напрямом ростових процесів. Найменш дослідженою групою рослин у цьому плані є судинні спорові.

До надзвичайно цікавої, еволюційно дrevньої і малодослідженої групи рослин належать папоротеподібні. Однак нині переважна більшість робіт спрямована на вивчення впливу екзогенних фітогормонів на ріст і розвиток папоротей (Kosakivska et al., 2016). Представлені у сучасній науковій літературі результати досліджень ендогенних фітогормонів папоротеподібних носять фрагментарний характер. Так, ендогенна ІОК ідентифікована у ваях *Davallia trichomanoides* Blume (Croxdale, 1976), в органах спорофітів *Asplenium nidus* L. (Menéndez et al., 2011) та *Salvinia molesta* D. Mitch. (Arthur et al., 2007). Гібереліни досліджені у спорофітах *Cibotium glaucum* (Sm.) Hook. & Arn, *Dicktonia antarctica* James Dickson (Yamane et al., 1988). АБК ідентифікована в спорах і протонемі *Anemia phyllitidis* (L.) Sw. (Cheng, Schraudolf, 1974) і *Lygodium japonicum* (Thunb.) Sw. (Yamane et al., 1980), а також у водної папороті *Marsilea quadrifolia* L. (Lin et al., 2005).

У попередніх дослідженнях ми проаналізували характер накопичення та локалізацію ендогенних ІОК, гіберелінів та АБК у вегетативних і генеративних органах спорофіту водної папороті *Salvinia natans* (L.) All. (Васюк, Косаківська, 2017; Войтенко, Косаківська, 2017б) й дикорослої папороті *Polystichum aculeatum* (L.) (Войтенко, Косаківська, 2017а).

Отже, отримані на сьогодні дані свідчать про наявність фітогормонів у папоротей. Залишаються малодослідженими питання розподілу фітогормонів у різних органах рослини, їхня динаміка протягом життєвого циклу, що унеможливило розуміння характеру функціонування гормональної системи, її регуляторної ролі у ростових процесах папоротей. Оскільки синергічний або антагоністичний характер взаємодії фітогормонів, а також скоординоване регулювання їхнього біосинтезу і розподілу в органах і тканинах рослин відіграють вирішальну роль в онтогенезі та адаптації, метою роботи було дослідити баланс фітогормонів, характер їх акумуляції та локалізації у вегетативних ор-

ганах леггоспорангіатної наземної папороті *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott. на різних етапах онтогенезу.

МЕТОДИКА

Досліджували папороть *D. filix-mas*, що зростала на експозиційній ділянці вищих спорових рослин Ботанічного саду Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Рослинний матеріал відбирали впродовж 2015 року у репродуктивний та пост репродуктивний періоди. За інформацією Центральної геофізичної обсерваторії ім. Бориса Срезневського середня температура впродовж літа становила + 21,6°C, що на 2,9°C перевищувало кліматичну норму. Протягом літа випало 68 мм опадів, що склало 30% від річної норми. Найсухішим місяцем був серпень, коли кількість опадів сягала лише 1,5 мм. Перші два місяці осені були цілком звичайними, температура у вересні була на 1 градус вищою від норми, тоді як жовтень видався холодним і температура повітря була на 1,7°C нижчою від норми. Впродовж вегетації на дослідних ділянках ботанічного саду відбувався штучний полив папоротей.

Зразки для аналізу відбирали з кінця квітня до середини жовтня у фазі інтенсивного росту (30.04), формування спор (29.05), дозрівання спор (17.06), спороношення (10.07) та завершення вегетації (21.10). У фазі інтенсивного росту вай мали равликподібну форму. Набуття ваями типового вигляду спостерігалось у фазі дозрівання спор після їх розкручування та випрямлення верхівок. Розгорнена перша пара вай містила незрілі молоді соруси білого кольору сформовані в зачаткових ваях. У фазі дозрівання спор на абаксіальній поверхні вай спостерігалось скупчення зрілих закритих сорусів чорно-бурого кольору вкритих індузіями. У фазі спороношення спорангії набували бурого забарвлення, їхні оболонки розривалися, індузії згорталися, і спори починали масово висипатися. У фазі завершення вегетації спостерігалось руйнування та всихання вай, що містили висохлі спорангії.

Фітогормони екстрагували 80% етанолом з додаванням антиоксиданту 0,002% діетилдитіокарбамату натрію (Методические рекомендации ..., 1988; Kosakivska et al., 2014). Виділення ІОК, АБК та гіберелової кислоти (ГК₃) з аліквот водного залишку проводили після заморожування при -4°C і центрифугування на центрифугі К-24 фірми «Janetski» (Німеччина) при 15000 об/хв. впродовж 15 хв. АБК та ІОК

Таблиця 1. ІОК в органах спорофіту *Dryopteris filix-mas* на різних фенологічних фазах розвитку (нг/г сирової речовини). $\bar{X} \pm SD$, n = 9

Фази розвитку спорофіту	Ваї		Кореневище	
	вільна	кон'югована	вільна	кон'югована
Інтенсивний ріст	23,5±1,2	38,9±1,9	44,4±2,2	90,1±4,5
Формування спор	5,2±0,3	36,6±1,8	14,2±0,7	42,3±2,1
Дозрівання спор	50,8±2,5	59,8±3,0	24,1±1,2	42,1±2,1
Спороношення	73,5±3,7	49,5±2,5	34,4±1,7	15,5±0,8
Завершення вегетації	сліди	226,6±11,3	10,2±0,5	116,4±5,8

визначали після кислотно-лужної переекстракції водного залишку і доочищення за допомогою тонкошарової хроматографії на пластинках Silufol UV-254 (Merck, Німеччина) у системі розчинників хлороформ: етилацетат: оцтова кислота (70:30:5), ГК₃ – етилацетат:хлороформ:оцтова кислота (90:60:1). Остаточний аналіз якісного складу й кількісного вмісту ІОК, АБК та ГК₃ проводили на рідинному хроматографі Agilent 1200 LC з діодноматричним детектором G 1315 B (США), колонка Eclipse XDB-C 18 4,6×250 мм, розмір частинок 5 мкм та з використанням мас-селективного детектора з комбінованим джерелом іонізації (MM-ES+APCI) моделі 6120. Хроматографічне розділення ІОК та АБК проводили в УФ-області поглинання за аналітичної довжини хвилі детектування 280 та 254 нм, відповідно, зі швидкістю рухомої фази 0,5 мл/хв. у системі розчинників метанол:ультрачиста вода:оцтова кислота (40:59,9:0,1), ГК₃ – у системі розчинників ацетонітрил:ультрачиста вода:оцтова кислота (30:69,9:0,1) в УФ-області поглинання на довжині хвилі 210 нм.

Детекцію гормонів на мас-селективному детекторі проводили в режимах SIM (маса 264) і Scan (у діапазоні мас 100-300) в Negative Polarity із напругою на фрагменторі 70 В. Для ідентифікації використовували немічені ІОК (Sigma, США), (±) цис-, транс-АБК (Sigma, США), ГК₃ (Sigma, США). Аналіз і обробка хроматограм проводилась за допомогою програмного забезпечення Chem Station версія B.03.01 у режимі *off line*.

Досліди проводили в триразовому біологічному та аналітичному повторах. Результати обробляли статистично ($P \leq 0,05$) з використанням програм Microsoft Excel 2007 та Origin 6.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Індоліл-3-оцтова кислота. У фазі інтенсивного росту пул ендогенної ІОК у кореневищі складав $134,5 \pm 6,7$ нг/г сирової речовини (с.р.), що удвічі перевищувало вміст гормону у ваях. Під час дозрівання сорусів і формування спор відбулося незначне зменшення вмісту гормону у ваях, однак у фазі дозрівання спор кількість ендогенної ІОК зросла вдвічі і становила $123,0 \pm 6,2$ нг/г с.р. Водночас пул ІОК у кореневищі суттєво зменшився і зберігався на низькому рівні впродовж спороношення. На завершальній фазі розвитку спорофіту у ваях та кореневищі зафіксовані максимальні кількості ІОК $226,6 \pm 11,3$ та $126,6 \pm 6,3$ нг/г с.р., відповідно (табл. 1). Кон'югована форма ІОК домінувала у ваях на всіх фенологічних фазах розвитку за винятком фази спороношення. Максимальне накопичення гормону зафіксовано під час завершення вегетації. Вміст вільної ІОК у ваях збільшувався на початку дозрівання спор і досягав максимуму ($73,5 \pm 3,7$ нг/г с.р.) у період масового висипання спор (табл. 1).

Максимуми у накопиченні кон'югованої ІОК було зафіксовано у кореневищі у фазі інтенсивного росту ($90,1 \pm 4,5$ нг/г с.р.) та на завершенні вегетації ($116,4 \pm 5,8$ нг/г с.р.). На початку висипання спор на етапі дозрівання спор кількість зв'язаної форми гормону зменшилася вдвічі і сягнула мінімального значення. Характер акумуляції вільної ІОК у кореневищах відповідав фізіологічному стану органа. Так, у фазі інтенсивного росту зафіксовано максимум, тоді як на заключній фазі вегетації спорофіту – мінімум у вмісті вільної форми гормону (табл. 1).

ФІТОГОРМОНИ В ОРГАНАХ СПОРОФІТУ

Таблиця 2. АБК в органах спорофіту *Dryopteris filix-mas* на різних фенологічних фазах розвитку (нг/г сирової речовини). $\bar{X} \pm SD$, n = 9

Фаза розвитку спорофіту	Вай		Кореневище	
	вільна	кон'югована	вільна	кон'югована
Інтенсивний ріст	29,0±1,4	2,2±0,1	14,0±0,7	5,0±0,2
Формування сорусів	11,2±0,6	2,1±0,1	16,4±0,8	4,2±0,2
Дозрівання спор	2,2±0,1	сліди	15,6±0,7	15,0±0,7
Спороношення	46,3±2,3	3,1±0,2	15,0±0,7	0,6±0,03
Завершення вегетації	219,5±11,0	сліди	сліди	5,6±0,3

У роботах інших дослідників повідомлялося, що ферменти, рецептори та білки-транспортери, задіяні у біосинтезі ІОК, локалізовані в хлоропластах, цитоплазмі, мембранах ендоплазматичного ретикулуму й мітохондріях клітин апікальних меристем стебла, а також у клітинах молодих листків, тоді як власне ІОК та її метаболіти транспортуються і зберігаються в апопласті й вакуолях клітин стебла, листків і кореня (Robert, Friml, 2009; Ludwig-Müller, 2011). Встановлено, що у базипетальне транспортування ауксинів від апекса до кореня залучені білкові транспортери AUX1 та PIN1, PIN2/AGR/EIR1 (Simm et al., 2016). Регуляція ауксинового гомеостазу відбувається також за участю інгібіторів транспорту гормону, які зв'язують білки, що взаємодіють з експортером ауксину (Enders, Strader, 2015). Акумуляована в кореневищі у період появи равлика кон'югована форма ІОК після вивільнення може бути задіяна у процесах органогенезу вай, що формуються на верхівці кореневища, подібно до того, як це відбувається у вищих рослин (Scarpella et al., 2011). «Ауксиновий сплеск» в акумуляції вільної форми ІОК, який спостерігався у ваях наприкінці дозрівання спор і досягав максимуму під час спороношення, опосередковано свідчить про залучення гормону до регуляції ростових процесів. Зафіксоване нами накопичення активної форми ІОК у зрілих спорах було подібним до явища нагромадження гормону насінням вищих рослин *Glycine max*, *Sechium edule*, *Zea mays*, *Helianthus annuus*, *Acer saccharium* тощо (Ситник та ін., 2003). Показано, що регуляція морфогенезу здійснюється за участю градієнтів концентрацій, які формуються під час біосинтезу, кон'югації та деградації ауксину (Spiess et al., 2014), а також шляхом міжклітинного (Petrásek, Friml, 2009) та внутрішньоклітинного розподілу гор-

мону (Mgravec et al., 2009). Вважають, що градієнти ІОК відіграють ключову роль під час старіння рослин (Ellis et al., 2005). Зафіксоване у наших дослідженнях зростання вмісту кон'югованої форми ІОК в органах *D. filix-mas* при завершенні вегетації може бути зумовлене зміною у співвідношенні між процесами синтезу і кон'югації гормону. Враховуючи, що кон'югати ауксину пов'язані з процесами розвитку вищих рослин (Sztein et al., 2000; Cooke et al., 2002), можна припустити, що іммобільна ІОК з вай транспортується до кореневища, де запасється і в подальшому після вивільнення (гідролізації) навесні може бути задіяна у процесах росту та розвитку зачаткових вай, формуванні бічних коренів на кореневищі та їх зростанні.

Таким чином, у підтриманні ауксинового гомеостазу у ваях впродовж росту і розвитку спорофіту *D. filix-mas* була задіяна кон'югована форма гормону. Інтенсивне ж накопичення вільної ІОК у ваях під час масового висипання спор й у кореневищі при формуванні зачатків вай збіглося з активацією фізіологічних процесів у відповідних органах папороті.

Абсцизова кислота. Впродовж фаз інтенсивного росту й спороношення пул ендогенної АБК у ваях сягав $31,2 \pm 1,6$ й $49,4 \pm 2,8$ нг/г с.р. Натомість при формуванні спор кількість гормону зменшилася втричі. Вміст АБК досяг мінімального значення $2,2 \pm 0,1$ нг/г с.р. у фазі дозрівання спор. Максимальна кількість гормону $219,5 \pm 11,0$ нг/г с.р. зафіксована у фазі завершення вегетації (табл. 2). Впродовж перших двох фенологічних фаз розвитку пул ендогенної АБК у кореневищі був в межах 20 нг/г с.р. Максимум у накопиченні гормону ($30,6 \pm 1,5$ нг/г с.р.) спостерігався в період дозрівання спор, коли на поверхні сорусів відбулося лікоподібне згорання індузій. Під час спороно-

Таблиця 3. ГК₃ в органах спорофіту *Dryopteris filix-mas* на різних фенологічних фазах розвитку (нг/г сирової речовини). $\bar{X} \pm SD$, n = 9.

Фаза розвитку спорофіту	Ваї		Кореневище	
	вільна	кон'югована	вільна	кон'югована
Інтенсивний ріст	904±27	396±9	657±19	795±19
Формування спор	732±21	507±15	585±15	513±13
Дозрівання спор	631±18	692±18	578±15	650±16
Спороношення	504±12	706±15	524±13	582±19
Завершення вегетації	323±9	527±11	507±12	752±17

шення і особливо у фазі завершення вегетації вміст АБК у кореневищі зменшився у два й три рази відповідно.

Вільна форма АБК була домінуючою у ваях на всіх фенологічних фазах розвитку. Максимум зафіксовано під час завершення вегетації при уповільненні росту надземних органів й зменшенні маси і довжин вай (табл. 2). Під час дозрівання спор на початку їх висівання кількість вільної АБК сягала мінімуму. У фазі спороношення вміст вільної форми гормону збільшився у 20 разів. У ваях впродовж усіх фаз розвитку спорофіту зафіксовані низькі і слідові кількості кон'югованої форми АБК.

Вільна форма АБК домінувала також у кореневищах на всіх фазах за винятком останньої, коли переважаючою виявилася кон'югована форма гормону. Вміст вільної форми впродовж перших чотирьох фаз розвитку спорофіту залишався практично незмінним. Мінімум кон'югованої форми АБК виявлено у кореневищі у фазі спороношення, максимум – при завершенні вегетації. Зафіксований у кореневищі максимум в акумуляції ендогенної АБК у фазі дозрівання спор, що супроводжувався приростом маси та збільшенням довжини коренів, опосередковано засвідчив причетність гормону до регуляції росту кореневої системи.

Отримані результати дозволяють припустити, що накопичення вільної форми АБК у ваях *D. filix-mas* під час завершення вегетації пов'язане з регуляцією гормоном процесу старіння. Підставою для такого припущення є дослідження інших авторів, які повідомляли про стимулювання АБК процесів старіння (Wang et al., 2012). Водночас ми припускаємо, що акумульована у кореневищі кон'югована форма гормону утворює депо для синтезу активної форми АБК. З літературних джерел відомо, що

кон'югати АБК накопичуються у клітинній стінці та вакуолях (Verslues, Zhu, 2005). Із цитозоллю клітин кореня за участю АБК-транспортерів вони переміщуються до паренхімних клітин ксилеми стебла й вивільнюються в судинах (López-Carbonell et al., 2009). Завдяки гідрофільним властивостям кон'югати рухаються в акропетальному напрямку по ксилемі стебла. В апопласті листка вони розщеплюються з утворенням вільних форм і транспортуються до мезофілу (Osakabe, et al., 2014).

Отже, активна форма АБК домінувала у ваях на всіх фенологічних фазах розвитку *D. filix-mas*. Максимальний вміст вільної форми гормону у ваях після перших приморозків є підставою для припущення щодо участі АБК у формуванні захисних адаптаційних процесів за дії низької температури. Домінування кон'югованої форми гормону у кореневищі спорофіту при завершенні вегетації розглядається як спосіб депонування АБК.

Гібереліни. Домінування вільних форм ГК₃ спостерігалось впродовж інтенсивного росту вай та під час формування спор (табл. 3). Наприкінці вегетації кількість вільних форм ГК₃ у ваях була низькою, що збігалось з початком відмирання цих органів. Водночас у кореневищах зафіксовано накопичення кон'югованих форм гормону. Загалом вміст ендогенної ГК₃ впродовж літньої вегетації, коли на абаксальній поверхні вай формувалися та розвивались соруси зі спорами, був значно вищим ніж кількості ендогенних ІОК та АБК. Отримані результати дозволяють припустити, що ключова роль у формуванні та розвитку репродуктивних структур і спор у *D. filix-mas* належить гіберелінам.

Відомо, що рослини різних систематичних груп різняться за спектром гіберелінів,

ЛІТЕРАТУРА

який не є статичним і змінюється в процесі онтогенезу, а характер дії гормону залежить від його кількості та визначається видом рослини й фазою онтогенезу (Ситник та ін., 2003). На ранніх етапах розвитку гібереліни контролюють меристематичний ріст та видовження клітин, а на пізніх – задіяні у формуванні генеративних органів (Mutasa-Göttgens, Hedden, 2009). ГК₁ та ГК₃ відповідають за активний ріст молодих органів, тоді як ГК₅ – за перебування у стані спокою (Phinney, Spray, 1982; Ross et al., 2000; Gaskins et al., 2001; Lewis et al., 2004). Вільна форма ГК₉ впливає на ріст стебла пшениці (Карначук и др., 2003), а екзогенна ГК₃ стимулювала витягування міжвузлів евкалипту, що перебували у стані активного росту, проте не впливала на міжвузля, ріст яких припинився (Seo et al., 2006). Встановлене нами зростання вмісту гіберелінів в органах *D. filix-mas* відповідало динаміці ростових процесів, а високий рівень гіберелінів на стадіях, коли відбувається розвиток спор, опосередковано вказує на їх участь у регуляції репродуктивного розвитку папороті.

Таким чином, максимум у вмісті вільної форми ГК₃ відповідав фазам активних метаболічних процесів у ваях папороті, тоді як у фазі осінньої вегетації при переході спорофіту до стану спокою максимальний вміст кон'югованої форми гормону був у кореневищах. Вміст ІОК та АБК у ваях виявився вищим, ніж у кореневищі. У фазі інтенсивного росту відбулася акумуляція кон'югованої ІОК із центром локалізації у кореневищі спорофіту. Натомість у ваях домінувала активна форма АБК. Під час розвитку сорусів, дозрівання спор та їх висипання (фаза літньої вегетації) кількість вільної ІОК та АБК у ваях збільшувалася. У фазі завершення вегетації вміст ІОК та АБК сягав максимуму з переважанням кон'югованої ІОК у ваях та кореневищі, а вільної АБК – у ваях. Збільшення вмісту вільної АБК у ваях після перших приморозків свідчить про залучення гормону до активації захисних процесів. Закономірності кількісних і якісних змін виявили подібність у функціях головних класів фітогормонів папороті *D. filix-mas* та вищих квіткових рослин.

Публікація містить результати досліджень, проведених в рамках наукового проекту Національної Академії наук України № III-71-14.431 «Гормональний контроль росту та розвитку спорових рослин (різної таксономічної належності)».

- Васюк В.А., Косаковская И.В. 2017. Особенности аккумуляции и локализации гиббереллинов в органах спорофитов высших сосудистых споровых растений в онтогенезе. *Advances in Biology & Earth Sciences*. 2 (2) : 175-184. (Vasyuk V.A., Kosakovskaya I.V. 2017. The features of accumulation and localization of gibberellins in organs of sporophytes of higher vascular spore plants in ontogenesis. *Advances in Biology & Earth Sciences*. 2 (2) : 175-184.).
- Войтенко Л.В., Косаківська І.В. 2016. Поліфункціональний фітогормон абсцизова кислота. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*. 1 (37) : 27-41. (Voytenko L.V., Kosakivska I.V. 2016. Polyfunctional phytohormone abscisic acid. *Bull. Kharkiv. Natl. Agrar. Univ. Ser. Biology*. (Visnyk Kharkiv. Natsional. Agram. Univer. Ser. Biologiya). 1 (37) : 27-41.).
- Войтенко Л.В., Косаківська І.В. 2017а. Особливості акумуляції та розподілу індоліл-3-оцтової та абсцизової кислот в органах спорофіту дикорослої папороті *Polystichum aculeatum* (L.) Roth. *Доповіді НАН України*. 12 : 112-118. (Voytenko L.V., Kosakivska I.V. 2017. Peculiarities of accumulation and distribution of indole-3-acetic and abscisic acid in the organs of sporophyte of wild fern *Polystichum aculeatum* (L.) Roth at various phenological phases of development. *Dopovidi. Nat. Acad. Sci. Ukr*. 12 : 112-118.).
- Войтенко Л.В., Косаковская И.В. 2017б. Абсцизовая кислота в органах спорофитов высших сосудистых споровых растений. *Advances in Biology & Earth Sciences*. 2 (3) : 271-283. (Voytenko L.V., Kosakovskaya I.V. 2017. Abscisic acid in sporophyte organs of higher vascular cryptogamic plants. *Advances in Biology & Earth Sciences*. 2 (3) : 271-283.).
- Карначук Р.А., Вайшля О.Б., Дорофеев В.Ю., Ушакова С.А., Тихомиров А.А., Лассер Х., Гро Дж-Б. 2003. Влияние условий роста на гормональный статус и урожайность высокорослой и карликовой линий пшеницы. *Физиология растений* 50 (2) : 265-270. (Karnachuk P.A., Vayshlya O.B., Dorofeev V.Yu., Ushakova S.A., Tikhomirov A.A., Lasser X., Gro J.B. 2003. Influence of growth conditions on the hormonal status and productivity of tall and dwarf wheat lines. *Russ. J. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastenii)*. 50 (2): 237-242.).
- Косаківська І.В. 2003. Фізіолого-біохімічні основи адаптації рослин до стресів. Київ : 191 с. (Kosakivska I.V. 2003. Physiological and biochemical bases of adaptation of plants to stress (Fiziologo-biokhimichni osnovy adaptatsii roslyn do stresiv). Kyiv : 191 p.).
- Методические рекомендации по определению фитогормонов. 1988. Киев : 78 с. (The methodical recommendations for analysis of plant hormones.

- (Metodicheskie rekomendatsii po opredeleniyu fitogormonov). 1988. Kiev : 78 p.).
- Ситник К.М., Мусатенко Л.І., Васюк В.А., Веденічева Н.П., Генералова В.М., Мартин Г.Г., Нестерова А.Н. 2003. Гормональний комплекс рослин і грибів. Київ : 186 с. (Sitnik K.M., Musatenko L.I., Vasyuk V.A., Vedenicheva N.P., Generalova V.M., Martin G.G., Nesterova A.N. 2003. Hormonal complex of plants and mushrooms. (Hormonalnii complex roslin i grybiv). Kyiv: 186 p.).
- Arthur G.D., Stirk W.A., Novak O., Hekera P., van Staden J. 2007. Occurrence of nutrients and plant hormones (cytokinins and IAA) in the water fern *Salvinia molesta* during growth and composting. *Environ. Exp. Bot.* 61 (2) : 134–144.
- Cheng C.Y., Schraudolf H. 1974. Nachweis von abscisinsäure in sporen und jungen Prothallien von *Anemia phyllitidis* L. *Sw. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie.* 71 : 366–369.
- Cooke T.J., Poli D.B., Szein A.E., Cohen J.D. 2002. Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Mol. Biol.* 49 : 319–338.
- Croxdale J.G. 1976. Hormones and Apical Dominance in the Fern *Davallia*. *J. Exp. Bot.* 27: 801–815.
- Ellis C.M., Nagpal P., Young J.C., Hagen G., Guilfoyle T.J., Reed J.W. 2005. Auxin Response Factor1 and Auxin Response Factor2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development.* 132 : 4563–4574.
- Enders T.A., Strader L.C. 2015. Auxin activity: past, present, and future. *Amer. J. Bot.* 102 (2) : 180–196.
- Gantait S., Sinniah U.R., Ali M.N., Sahu N.C. 2015. Gibberellins – a multifaceted hormone in plant growth regulatory network. *Curr. Protein Peptide Sci.* 16 (5) : 406–412.
- Gaskins P., Kobayashi M., Spray C.R., Phinney B.O., MacMillan J. 2001. Gibberellin metabolism in maize: The stepwise conversion of gibberellin A12-aldehyde to gibberellin A20. *Plant Physiology* Rockville. 115 : 413–418.
- 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., Voytenko L.V., Likhnyovskiy R.V., Ustinova A.Y. 2014. Effect of temperature on accumulation of abscisic acid and indole-3-acetic acid in *Triticum aestivum* L. seedlings. *Genet. Plant Physiol.* 4 (3–4) : 201–208.
- Lewis G.B., King R.W., Evans L.T., Mander L.N., Moritz T., Pharis R.P., Twitchin B. 2004. Synthesis of gibberellin GA₆ and its role in flowering of *Lolium temulentum*. *Phytochemistry.* 61 (1) : 77–82.
- Lin B.-L., Wang H.-J., Wang J.-S., Zaharia I., Abrams S.R. 2005. Abscisic acid regulation of heterophyly in *Marsilea quadrifolia* L.: effects of R(-) and S(+)-isomers. *J. Exp. Bot.* 56 : 2935–2948.
- López-Carbonell M., Gabasa M., Jáuregui O. 2009. Enhanced determination of abscisic acid (ABA) and abscisic acid glucose ester (ABA-GE) in *Cistus albidus* plants by liquid chromatography–mass spectrometry in tandem mode. *Plant Physiol. Biochem.* 47 : 256–261.
- Ludwig-Müller J. 2011. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *J. Exp. Bot.* 62 (6) : 1757–1773.
- Menéndez V., Abul Y., Bohanec B., Lafont F., Fernández H. 2011. The effect of exogenous and endogenous phytohormones on the in vitro development of gametophyte and sporophyte in *Asplenium nidus* (L.). *Acta Physiol. Plant.* 33 : 2493–2500.
- Mravec J., Skupa P., Bailly A., Hoyerová K., Krččák P., Bielach A., Petrášek J., Zhang J., Gaykova V., Stierhof Y.D., Dobrev P.I., Schwarzerová K., Rolčík J., Seifertová D., Luschnig C., Benková E., Zazimalová E., Geisler M., Friml J. 2009. ER-localized PIN5 auxin transporter mediates subcellular homeostasis of phytohormone auxin. *Nature.* 439 : 1136–1140.
- Munné-Bosch S., Müller M. 2013. Hormonal cross-talk in plant development and stress responses. *Front. Plant Sci.* 4 : 529–531.
- Mutasa-Göttgens E., Hedden P. 2009. Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *J. Exp. Bot.* 60 : 1979–1989.
- Osakabe Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Tran L.S. 2014. ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytol.* 202 : 35–49.
- Petrášek J., Friml J. 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development.* 136 : 2675–2688.
- Phinney B.O., Spray C.R. 1982. Chemical genetics and the gibberellin pathway in *Zea mays*. In: *Plant Growth Substances*. London: Academic Press : 101–110.
- Robert H.S., Friml J. 2009. Auxin and other signals on the move in plants. *Nature Chem. Biol.* 5 (5) : 325–332.
- Ross J.J., Reid J.B. 2013. Evolution of growth-promoting plant hormones. *Funct. Plant Biol.* 7 : 795–805.
- Ross J.J., O'Neill D.P., Smith J.J., Kerckhoffs L.H.J., Elliot R.C. 2000. Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant J.* 21 : 547–552.
- Scarpella E., Barkoulas M., Tsiantis M. 2011. Control of leaf and vein development by auxin. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 : 1–17.
- Simm S., Scharf K.D., Jegadeesan S., Chiusano M.L., Firon N., Schleiff E. 2016. Survey of genes involved in biosynthesis, transport, and signaling of phyto-

ФІТОГОРМОНИ В ОРГАНАХ СПОРОФІТУ

- hormones with focus on *Solanum lycopersicum*. Bioinform. Biol. Insights. 10 : 185-207.
- Seo M., Hanada A., Kuwahara A., Endo A., Okamoto M., Yamauchi Y., North H., Marion-Poll A., Sun T.P., Koshihara T., Kamiya Y., Yamaguchi S., Nambara E. 2006. Regulation of hormone metabolism in arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid and of gibberellin metabolism. Plant J. 48 (3) : 354-366.
- Spiess G.M., Hausman A., Yu P., Cohen J.D., Rampey R.A., Zolman B.K. 2014. Auxin input pathway disruptions are mitigated by changes in auxin biosynthetic gene expression in Arabidopsis 1[W][OPEN]. Plant Physiol. 165 : 1092-1104.
- Sztejn A.E., Cohen J.D., Cooke T.J. 2000. Evolutionary patterns in the auxin metabolism of green plants. Int. J. Plant Sci. 161 : 849-859.
- Verslues P.E., Zhu J.K. 2005. Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. Biochem. Soc. Trans. 33 : 375-379.
- Wang Y., Li B., Du M., Eneji A.E., Wang B., Duan L., Li Z., Tian X. 2012. Mechanism of phytohormone involvement in feedback regulation of cotton leaf senescence induced by potassium deficiency. J. Exp. Bot. 63 : 5887-5901.
- Yamane H., Fujoka S., Sray C.R., Phynney B.O., MacMillan J., Gaskin P. 1988. Endogenous gibberellins from sporophytes of two tree ferns, *Cibotium glaucum* and *Dicksonia antarctica*. Plant Physiol. 86 : 857-862.
- Yamane H., Sato Y., Takahashi N., Takeno K., Furuya M. 1980. Endogenous inhibitors for spore germination in *Lygodium japonicum* and their inhibitory effects on pollen germinations in *Camellia japonica* and *Camellia sinensis*. Agric. Biol. Chem. 44 : 1697-1699.

Надійшла до редакції
16.08.2018 р.

PHYTOHORMONES IN ORGANS OF SPOROPHYTE OF *DRYOPTERIS FILIX-MAS* (L.) SCHOTT. IN ONTOGENESIS

L. V. Voytenko, V. A. Vasyuk, I. V. Kosakivska

*Kholodny Institute of Botany
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)
E-mail: Lesya_voytenko@ukr.net*

The complex of endogenous phytohormones was identified by high performance liquid chromatography in combination with mass spectrometry (HPLC-MS) and the character of the accumulation of free and conjugated forms of indole-3-acetic (IAA), abscisic (ABA) and gibberellic (GA₃) acids in the organs of leptosporangiate fern *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott. on various phenological phases of sporophyte development was studied. It was shown that during the spring vegetative period at the stage of intensive growth, the center of localization of conjugated IAA is rhizome, while the active form of ABA dominates in the fronds. During the sori formation and development, ripening of spores and their rash, the number of free IAA and ABA in fronds increases. At the stage of vegetation termination, the content of IAA and ABA reaches a maximum with the predominance of conjugated IAA in the fronds and rhizome, and the free ABA in the fronds. The maximum content of free GA₃ is fixed in fronds in the phase of active metabolic processes, whereas during the transition of sporophyte to dormancy in the phase of autumn vegetation, the maximum content of the conjugated form of the hormone was in the rhizomes. The obtained results revealed that during the transition from intensive growth to the formation and maturation of spores and at the stage of vegetation termination, the mechanisms of conjugation are involved in the support of auxin homeostasis, while metabolic strategies of biosynthesis/catabolism – during the mass ripening of mature spores. The nature of the accumulation of ABA indirectly confirmed the involvement of the hormone in activation of protective adaptive processes during the autumn vegetation period. Dynamics and localization of GA₃ indicates the involvement of the hormone in the regulation of the development and maturation of spores. The regularities of quantitative and qualitative changes revealed the similarity in the functions of the main classes of phytohormones of the fern *D. filix-mas* and higher flowering plants.

Key words: *Dryopteris filix-mas*, indole-3-acetic, abscisic acid, gibberellic acid, sporophyte, ontogenesis

ВОЙТЕНКО, ВАСЮК, КОСАКІВСЬКА

**ФИТОГОРМОНЫ В ОРГАНАХ СПОРОФИТА
DRYOPTERIS FILIX-MAS (L.) SCHOTT. В ОНТОГЕНЕЗЕ**

Л. В. Войтенко, В. А. Васюк, И. В. Косаковская

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)
E-mail: Lesya_voytenko@ukr.net*

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) идентифицирован комплекс эндогенных фитогормонов и проанализирован характер аккумуляции свободной и конъюгированной форм индолил-3-уксусной (ИУК), абсцизовой (АБК) и гиббереллиновой (ГКЗ) кислот в органах спорофита leptosporangiate папоротника *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott. на различных фенологических фазах развития. Установлено, что во время весенней вегетации на этапе интенсивного роста центром локализации конъюгированной ИУК является корневище спорофита, тогда как активная форма АБК доминирует в ваях. В период формирования и развития соросов, созревания спор и их высыпания количество свободных ИУК и АБК в ваях увеличивается. На этапе завершения вегетации содержание ИУК и АБК достигает максимума с преобладанием конъюгированной ИУК в ваях и корневище, а свободной АБК – в ваях. Максимальное содержание свободной ГКЗ зафиксировано в ваях в фазе активных метаболических процессов, тогда как при переходе спорофита в состояние покоя в фазе осенней вегетации максимальное содержание конъюгированной формы гормона было в корневищах. Полученные результаты свидетельствуют, что при переходе от интенсивного роста к формированию и созреванию спор в соросах и на этапе завершения вегетации в поддержании ауксинового гомеостаза задействованы механизмы конъюгации, а в период массового высыпания зрелых спор – метаболические стратегии биосинтеза/катаболизма. Характер накопления АБК указывает на причастность гормона к активации защитных адаптационных процессов в осенний период вегетации. Динамика и локализация ГКЗ указывает на ее участие в регуляции процессов развития и созревания спор. Закономерности количественных и качественных изменений выявили сходство в функциях основных классов фитогормонов папоротника *D. filix-mas* и высших покрытосеменных растений.

Ключевые слова: *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott., индолил-3-уксусная, абсцизовая кислота, гибберелловая кислота, спорофит, онтогенез