



УДК 57.017.2/.6:582.394:577.175.1

ОСОБЛИВОСТІ АКУМУЛЯЦІЇ Й ЛОКАЛІЗАЦІЇ ІНДОЛІЛ-3-ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ В ОРГАНАХ СПОРОФІТА *SALVINIA NATANS* (L.) ALL. НА РІЗНИХ ФЕНОЛОГІЧНИХ ФАЗАХ РОЗВИТКУ

Л. В. Войтенко, Р. В. Ліхньовський, І. В. Косаківська

Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, Київ 01601, Україна
e-mail: Lesya_voytenko@ukr.net

Рослини різноспорової однорічної папороті гідрофіта *Salvinia natans* L. збирали влітку у штучних водоймах Деснянського району м. Києва, починаючи з червня 2015 р. з інтервалом один місяць. Біометричні дослідження цілої рослини (клону) та окремих сегментів плаваючих і занурених вай виявили, що зміни маси і довжини спорофіта на різних фенологічних фазах розвитку відбувалися переважно за рахунок новоутворених органів (модулів), тоді як лінійні розміри окремих сформованих вай залишалися практично незмінними. За масою і довжиною окрема занурена вая значно перевищувала плаваючу. У фазу стаціонарного росту (липень) маса окремої зануреної ваї збільшувалась удвічі завдяки інтенсивному формуванню багатоклітинних ниткоподібних волосків, тоді як довжина майже не змінювалася. Під час репродуктивного розвитку (серпень–вересень) зростання маси спорофіта відбувалося завдяки утворенню спорокарпіїв. Уперше методом високоефективної рідинної хроматографії проаналізовано характер акумуляції та локалізації індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) в органах спорофіта *S. natans*. З'ясовано, що у фазу інтенсивного росту папороті (червень) загальний вміст ІОК у плаваючих і занурених ваях був однаково високим і досягав 182 нг/г сирої речовини. У період активного розростання й опущення занурених вай (липень) вміст ендогенної ІОК становив 546,3 нг/г сирої речовини, тоді як кількість гормону у плаваючих ваях залишалася на рівні попередньої фази. Значне зменшення вмісту гормону у старіючих плаваючих і занурених ваях спостерігали на початку спорогенезу у фазу формування спорокарпіїв і дозрівання спор. На етапі пізнього спорогенезу на початку фази відмирання вегетативних органів (вересень) у скупченнях спорокарпіїв, які містили зрілі спори, загальний вміст ІОК становив 193 нг/г сирої речовини. У фази активного та стаціонарного росту у плаваючих і занурених ваях домінувала вільна форма гормону. Кон'югована ІОК була локалізована переважно в занурених ваях у кількостях, які у 4 та 36 разів, відповідно, перевищували вміст такої у плаваючих. Розподіл ІОК між плаваючими і зануреними ваями засвідчив, що місцем локалізації ІОК у фазу стаціонарного росту є занурені ваї, а у фазу відмирання вегетативних органів – спорокарпії. Специфічні зміни у накопиченні та локалізації ендогенної ІОК

виявили зв'язок між ростовими процесами та розподілом і вмістом вільної та кон'югованої форм фітогормону у вегетативних і генеративних органах спорофіта водної папороті *Salvinia natans* (L.) All. упродовж її індивідуального розвитку.

Ключові слова: *Salvinia natans* (L.) All, спорофіт, індоліл-3-оцтова кислота, ріст, розвиток.

ВСТУП

Фітогормонам належить ключова роль у регуляції процесів росту і розвитку рослин, адаптації до мінливих умов довкілля. Реакції на температурний і водний режими, умови освітлення, баланс поживних і мінеральних речовин формуються за участю фітогормонів [25]. Ауксини разом із гіберелінами, цитокінінами, абсцизовою кислотою і етиленом належать до класичних фітогормонів [22, 39]. Поліфункціональні ауксини контролюють ембріо-, органо- та морфогенез, апікальне домінування, судинну диференціацію, полярність органів, розвиток кореневої системи, насіння і плодів [8, 11]. Найбільш поширеним серед ауксинів є індоліл-3-оцтова кислота (ІОК), виявлена у бактерій, грибів, спорових і насінневих рослин, комах і людей [41]. ІОК міститься в клітинах у вільному (активному) і кон'югованому (неактивному) станах. Кон'юганти з глюкозою, аспарагіноювою кислотою, олігосахаридами, білками і нуклеїновими кислотами утворюють своєрідне депо гормону і вважаються його транспортною формою. Гомеостаз ІОК регулюється через біосинтез гормону *de novo*, його переміщення, кон'югацію і деградацію [23]. Ферменти, рецептори та білки-транспорттери, задіяні у біосинтезі гормону, локалізовані в хлоропластах, цитоплазмі, мембранах ендоплазматичного ретикулуму й мітохондріях, тоді як власне ІОК та її метаболіти транспортуються і зберігаються в апопласті й вакуолях [29, 35, 53]. До активних ауксинів, окрім ІОК, належать також 4-хлоріндол-3-оцтова кислота (4-Cl-ІОК), яку вперше виявили у представників родини Fabaceae, та фенілоцтова кислота [42, 45]. Пізніше ці сполуки були ідентифіковані у багатьох видів рослин [23, 46, 50], проте їхні фізіологічні функції остаточно не з'ясовані [48].

Представлені у сучасній науковій літературі результати досліджень ендегенних ауксинів папоротеподібних мають фрагментарний характер. Зокрема, ендегенна ІОК була ідентифікована у вегетуючих ваях, однак не знайдена в апексах наземної папороті *Davallia trichomanoides* [7]. ІОК разом із цитокінінами та гіберелінами виявлено у кореневищі та в пагонах папоротеподібної рослини *Psilotum nudum*. Показано, що під час і після спороношення вміст гормону був однаково високим як у підземних, так і в наземних органах спорофіта [1]. В органах вегетуючого спорофіта й апоспорового гаметофіта папороті *Asplenium nidus* L. в культурі *in vitro* відмічено високий вміст ендегенних фітогормонів, серед яких ІОК, рівень якої сягав 250–300 пмоль/г сухої речовини [31]. З'ясовано, що кількість ендегенної ІОК в органах спорофіта водної папороті *Salvinia molesta* дорівнювала 393 пмоль/г сухої речовини, водночас у середовищі її культивування вміст екзогенної ІОК становив 30,8 пмоль/г сухої речовини [2].

Наявні на сьогодні відомості про фізіологічні функції ауксинів у папоротеподібних нечисленні та подекуди суперечливі і базуються переважно на результатах, отриманих після екзогенної обробки гаметофіта. Зокрема, встановлено, що форма апекса протонеми *Dryopteris varia* залежала від вмісту ІОК у середовищі її культивування. За низьких концентрацій формувався апікальний сосочок, за високих –

ризоїдальний [36]. Встановлено, що у *Platyserium coronarium* (Koenig) Desv. екзогенна обробка гаметофіта низькими концентраціями ауксинів і цитокінінів [27, 28], а у *Dryopteris affinis* – ауксинів, цитокінінів і гіберелінів індукували апогамне формування спорофіта [32]. Крім того, виявлено зв'язок між дією екзогенних гормонів і зміною ендogenous вмісту ІОК та гіберелінів (ГК₁, ГК₃, ГК₄, ГК₇ та ГК₉) на ранніх стадіях розвитку апогамного ембріонального покоління *D. affinis*, що свідчить про безпосередню участь досліджуваних фітогормонів у розвитку жіночої стерильності гаметофітів даного виду папороті [32]. Додавання низьких концентрацій ауксину в середовище культивування спор багаторічної наземної папороті *Onoclea sensibilis* за наявності етилену прискорювало видовження філаментів і ризоїдів протонеми, тоді як субоптимальні концентрації, навпаки, – інгібували ці процеси [33].

У папоротей, адаптованих до існування у водному середовищі, ауксин задіяний в активації розвитку бічних меристем гаметофіта. Так, у *Ceratopteris richardii* Brongn. екзогенні α -нафтилоцтова і 2,4,5-трихлорфеноксіцтова кислоти ауксинового ряду індукували розвиток бічних меристем гаметофіта й ініціювали формування рослин чоловічої статі. Антагоніст ауксину р-хлорфеноксізіомасляна кислота пригнічувала розвиток бічних і апікальних меристем і генерувала появу кулеподібного гаметофіта. 2,3,5-трийодбензойна та *n*-1-нафтилфталомова кислоти викликали зміни у транспортуванні ауксину, що призводило до тимчасової затримки росту бічних меристем та утворення різних за формою гаметофітів із вторинних меристем. Ауксини також контролювали утворення ризоїдів на гаметофіті й впливали на прояв тотипотентності клітин і розвиток вай [16, 17].

В окремих дослідженнях проаналізовано роль екзогенних ауксинів у регуляції розвитку спорофіта. Так, екзогенні ІОК та індоліл-3-масляна кислота гальмували ріст основного кореня, проте не впливали на формування додаткових бічних коренів у *Ceratopteris richardii*. Подібну дію чинив інгібітор полярного транспорту ауксину N-(1-нафтил)фталомова кислота [18]. Регенерацію спорофіта *Asplenium nidus* викликали введені у середовище культивування папороті ІОК, БАП та гіберелова кислота, тоді як регенерація гаметофіта відбувалася за відсутності фітогормонів [31].

Виявилось, що ІОК та цитокініни (ЦТК), котрі задіяні у регуляції апікального домінування у вищих судинних рослин [10], не впливали на ріст і диференціацію бічних бруньок у папороті *Davallia trichomanoides* Blume [7]. Водночас у водяної папороті *Marsilea drummondii* саме ІОК і ЦТК зеатинового ряду, задіяні в апікальному домінуванні, індукують ріст бічних бруньок зі субапікальної, середньої і базальної частин стебла декапітованих рослин [40]. Екзогенна ІОК сповільнювала процес старіння листків у водяних покритонасінних *Jussiaea repens* і *Eichhornia crassipes*, а також вай у папороті-гідрофіта *Salvinia molesta* [38].

Наявність ауксинів у рослин різних таксонів, серед яких найдревніші, є опосередкованим свідцтвом стародавнього еволюційного походження гормону [6]. Разом із тим, відомості про ауксини рослин різного систематичного положення, специфіку їхньої динаміки впродовж життєвого циклу, локалізацію у вегетативних і генеративних органах надзвичайно обмежені. Представники відділу папоротеподібних (*Polypodiophyta*) як один із головних компонентів рослинного покриву суходолу [3] та водойм [49] є найменш дослідженими у цьому аспекті. Різносторова однорічна папороть гідрофіт *Salvinia natans* (L.) All. привертає особливу увагу, оскільки її існування на межі повітряного і водного середовищ має забезпечуватися певними структурно-функціональними адаптаційними властивостями виду.

Тому метою нашої роботи було дослідити зв'язок між ростовими процесами та характером розподілу і вмістом вільної та кон'югованої форм індоліл-3-оцтової кислоти у вегетативних і генеративних органах спорофіта водяної папороті *Salvinia natans* (L.) All. упродовж її індивідуального розвитку.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Папороть *Salvinia natans* (L.) All. належить до монотипної родини Salviniaceae [24, 47]. Вона має тонке, розгалужене, горизонтальне стебло, на котрому ваї розташовані кільцями у шість або більше рядів. Кожне кільце сформоване з двох цілокраїх плаваючих (надводних) і однієї зануреної (підводної) ваї. Плаваючі ваї овально-подовгасті з короткими черешками (рис. 1, А), занурені – багатократно розсічені на 8–12 ниткоподібних сегментів, які густо вкриті багатоклітинними волосками темно-бурого, іноді коричневого кольору, зовні схожі на корені (рис. 1, Б).

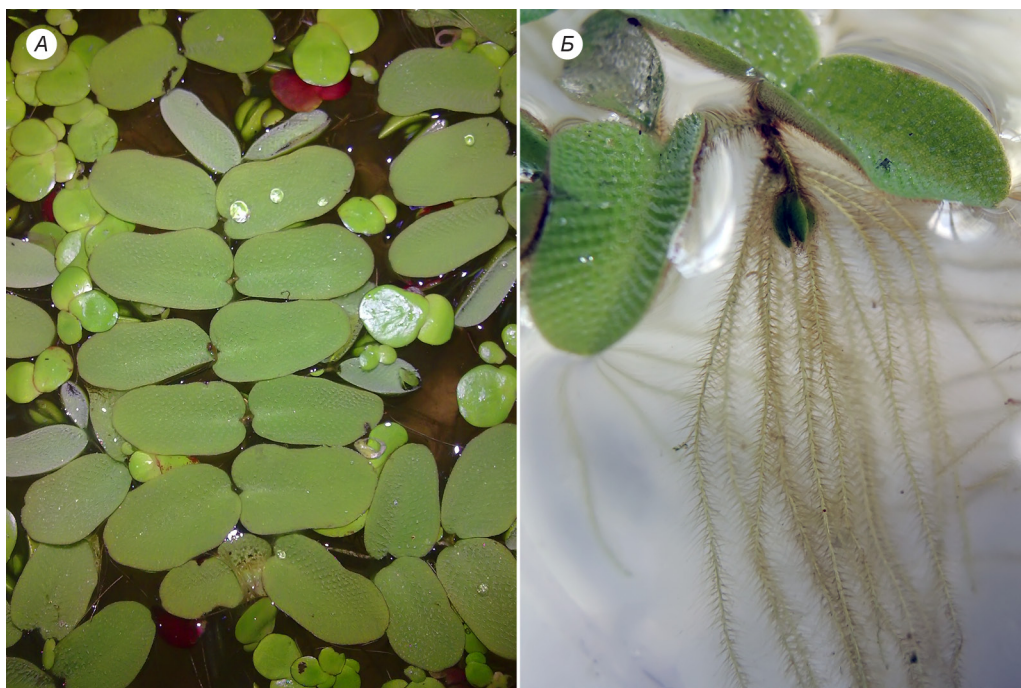


Рис. 1. Плаваючі (А) та занурені (Б) ваї *Salvinia natans* у фазу стаціонарного росту

Fig. 1. Floating (A) and submerged (B) fronds of *Salvinia natans* in the steady-state growth phase

На адаксіальній поверхні плаваючих ваї містяться сосочки з трихомами, на абаксіальній – зіркоподібні волоски. Плаваючі та занурені ваї відрізняються за мікроструктурою поверхні й фізіологічними функціями. У плаваючих ваїх активно відбувається фотосинтез, тоді як занурені – забезпечують мінеральне живлення, газообмін і утримують рослини на поверхні водойми [5, 43].

Рослини гетероспорові. Мікро- і мегаспори утворюються всередині мікро- і мегаспорангіїв, які містяться, відповідно, у кулеподібних спорокарпіїх, зібраних у групи по 3–8 штук біля основи занурених ваї. Восени спорофіт відмирає, спорокарпії

опадають на дно. Навесні оболонка спорокарпії розривається і спорангії піднімаються на поверхню водойми, де і відбувається утворення і подальший розвиток гаметофіта. Після запліднення яйцеклітини сперміями розвивається спорофіт. Завдяки швидкому вегетативному розмноженню рослини сальвінії утворюють густі зарості [9, 51].

Життєвий річний цикл розвитку водяної папороті *S. natans* складається з чергування фаз гаметофіта (включно з діапаузою) і спорофіта (рис. 2).

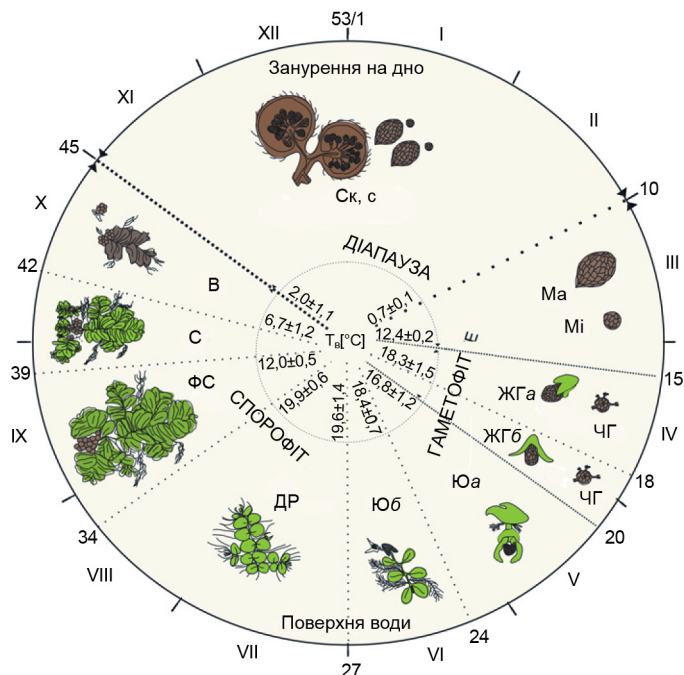


Рис. 2. Діаграма річного циклу розвитку *Salvinia natans*. Скорочення: Ск – спорокарпій; с – спори; Ма – макроспора; Мі – мікроспора; ЧГ – чоловічий гаметофіт. Стадії розвитку жіночого гаметофіта: ЖГa – рання; ЖГб – пізня. Стадії розвитку спорофіта: Ю – ювенільна стадія, Юa – рання, Юб – пізня; ДР – доросла рослина; ФС – формування спор; С – старіння; В – відмирання; Б – діапауза; T_w [°C] – температура води. Римськими цифрами позначено місяці. Арабські цифри по колу вказують тижні року [адаптовано за Gaika, Szmaja, 2013]

Fig. 2. Diagram of the *Salvinia natans* annual development cycle. Abbreviations: Ск – sporocarp; с – spore, Ма – macrospore, Мі – microspore, ЧГ – male gametophyte. Female gametophyte development stages: ЖГa – early, ЖГб – late. Sporophyte development stages: Ю – juvenile; Юa – early; Юб – late, ДР – mature; ФС – spore-producing; С – subsenile; В – senile; Б – diapause; T_w [°C] – water temperature. Roman numerals indicate consecutive months, and Arabic numerals on the circumference of the circle indicate a week of the year [adapted according to Gaika, Szmaja, 2013]

Рослини збирали влітку у штучних водоймах Деснянського району м. Києва, починаючи з червня 2015 р. з інтервалом один місяць. Досліджували плаваючі та занурені ваї спорофіта основного пагона дорослої рослини у фазах інтенсивного росту (червень), стаціонарного росту (липень), формування спорокарпіїв та дозрівання спор (серпень), а також зрілі спорокарпії у фазу відмирання вегетативних органів на етапі пізнього спорогенезу. Проводили біометричні вимірювання лінійних показників довжини та маси окремих вай і рослини (клону) загалом.

Фракцію ІОК екстрагували охолодженим 80%-ним етанолом із додаванням 1–2 крапель антиоксиданту (0,02% діетилдитіокарбамату натрію). Спиртові екстракти випарювали до водного залишку і заморожували. Аліквоту розмороженого водного залишку розчином 2 н НСІ доводили до рН 3,0 і центрифугували при 10000 об./хв упродовж 20 хв на центрифугі К-24 фірми “Janetski” (Німеччина). Використана методика виділення й очищення вільної та кон’югованої форм ІОК описана раніше [26]. Дослідження якісного складу проб і визначення вмісту ІОК проводили на рідинному хроматографі Agilent 1200 з діодно-матричним (DAD) і мас-селективним (MSD) детекторами. Хроматографічне розділення проводили на колонці Eclipse XDB-C18 розмірами 4,6×250 мм із зернистістю частинок 5 мкм зі швидкістю рухомої фази 0,5 мл/хв у системі розчинників метанол : вода : оцтова кислота (40:59,9:0,1). Запис спектрограм ІОК на DAD проводили в УФ-ділянці при максимумі поглинання на довжині хвилі 280 нм з подальшою ідентифікацією за мас-спектром, одержаним на MSD моделі 6120, оснащеного комбінованим джерелом іонізації (MM-ES-APCI). Детекцію ІОК на мас-селективному детекторі проводили в режимах SIM і Scan у Positive Polarity (реєстрація позитивно заряджених іонів M^+) у діапазоні мас 100–300. Для ідентифікації фітогормону використовували немічену ІОК (Sigma, США). Обрахунок хроматограм здійснювали за допомогою програмного забезпечення Chem Station версія B.03.01 у режимі *off-line*. Досліди проводили у триразовому біологічному й аналітичному повторях. Результати обробляли статистично ($P \leq 0,05$) з використанням програм Microsoft Excel 2007 та Origin 6.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Дорослий спорофіт сальвінії характеризується клональною будовою, утворюється під час формування нових модулів, які розвиваються навколо центральної (найстарішої) частини рослини радіально. Складність структури клону визначається його віком. Розростання модулів клону відбувається подібно до росту бічних гілок у судинних рослин [15].

Розростання клону ми спостерігали у червні–серпні за температури води +18–27 °С. Розпад клону на окремі модулі збігався з появою і розвитком спорокарпіїв (третя декада серпня–початок вересня) та зниженням температури води до +18 °С і нижче.

Результати біометричних досліджень цілої рослини (клону) та окремих сегментів плаваючих і занурених вай основної дорослої рослини на різних фенологічних фазах розвитку спорофіта *S. natans* представлені на рис. 3. Встановлено, що за масою і довжиною окрема занурена вая значно перевищувала плаваючу. Плаваючі вай загалом відзначалися незначним збільшенням біометричних показників. Разом з тим, маса і довжина плаваючої частини спорофіта зросла від 22 до 40 мг та від 45 до 62 мм, відповідно, що відбулося завдяки новоутвореним ваям і видовженню стебла. На стадії стаціонарного росту завдяки інтенсивному формуванню багатоклітинних ниткоподібних волосків маса окремої зануреної вай збільшувалась удвічі, тоді як довжина майже не змінювалась. На стадії репродуктивного розвитку зростання маси спорофіта відбувалося завдяки утворенню спорокарпіїв (рис. 3).

Отже, біометричний аналіз засвідчив, що зміни маси і довжини спорофіта *S. natans* відбувалися переважно завдяки новоутвореним органам (модулям), тоді як лінійні розміри окремих сформованих вай основної дорослої рослини майже не змінювалися.

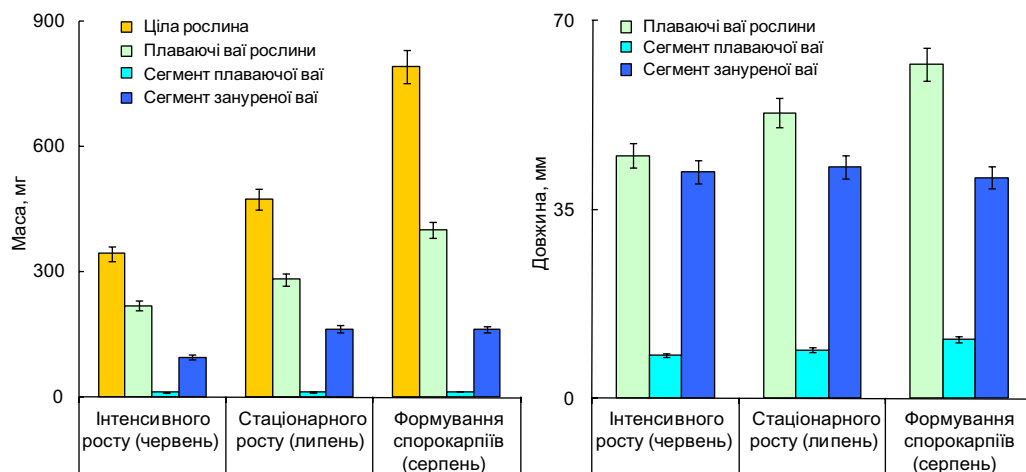


Рис. 3. Біометричні показники цілої рослини (клуби) та сегментів плаваючих і занурених вай основної дорослої рослини на різних фенологічних фазах розвитку спорофіту *Salvinia natans*

Fig. 3. Biometric characteristics of the whole plant (clone) and segments of floating and submerged fronds of the main mature plant at the various phenological stages of *Salvinia natans* sporophyte development

Восени у фазу зрілих спорокарпіїв плаваючі та занурені ваї відмирають. Спорокарпії діаметром $0,4 \pm 0,002$ см, розростаючись, групуються у скупчення діаметром близько 6 см, які утримуються на поверхні водойми завдяки наявності гігроскопічної оболонки та залишків повітря всередині (рис. 4). У спорангіях кулеподібних спорокарпіїв у цей період розвитку сальвінії містяться зрілі мікро- і мегаспори [43].



Рис. 4. Сформовані кулеподібні спорокарпії *Salvinia natans*, розташовані біля основи занурених вай (А), та їхні скупчення (Б)

Fig. 4. Formed bullet-shaped sporocarps of *Salvinia natans* located near the base of submerged fronds (A) and their clump (B)

Уперше методом вискоєфективної рідинної хроматографії в органах спорофіта *Salvinia natans* на різних фенологічних фазах розвитку були ідентифіковані вільна та кон'югована форми ІОК (рис. 5, 6).

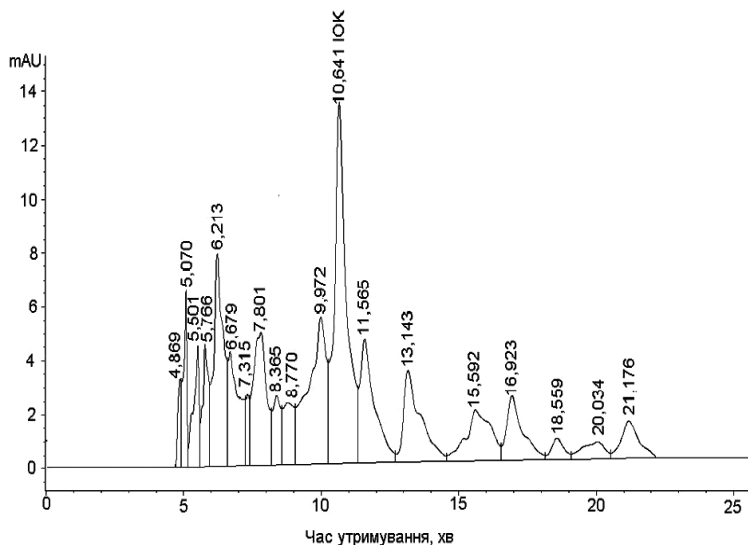


Рис. 5. Хроматограма розділення складної суміші з вмістом ендогенної індоліл-3-оцтової кислоти з плаваючих вай *Salvinia natans* на стадії інтенсивного росту спорофіта

Fig. 5. Separation chromatogram of compound mixture containing endogenous IAA from floating fronds of *Salvinia natans* at the sporophyte intensive stage growth

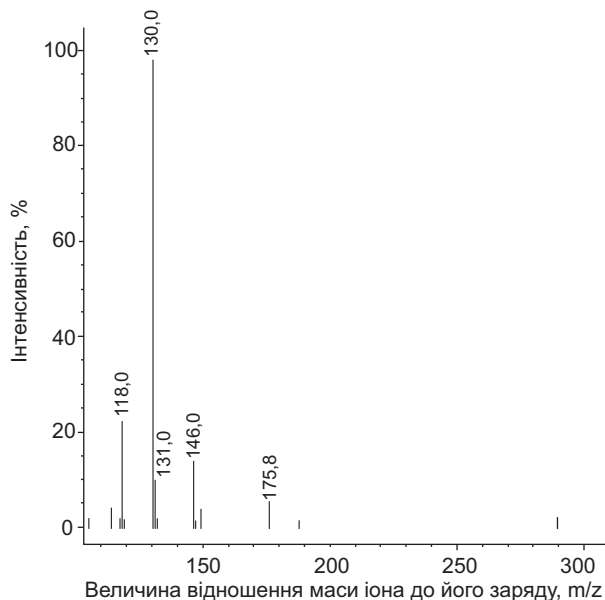
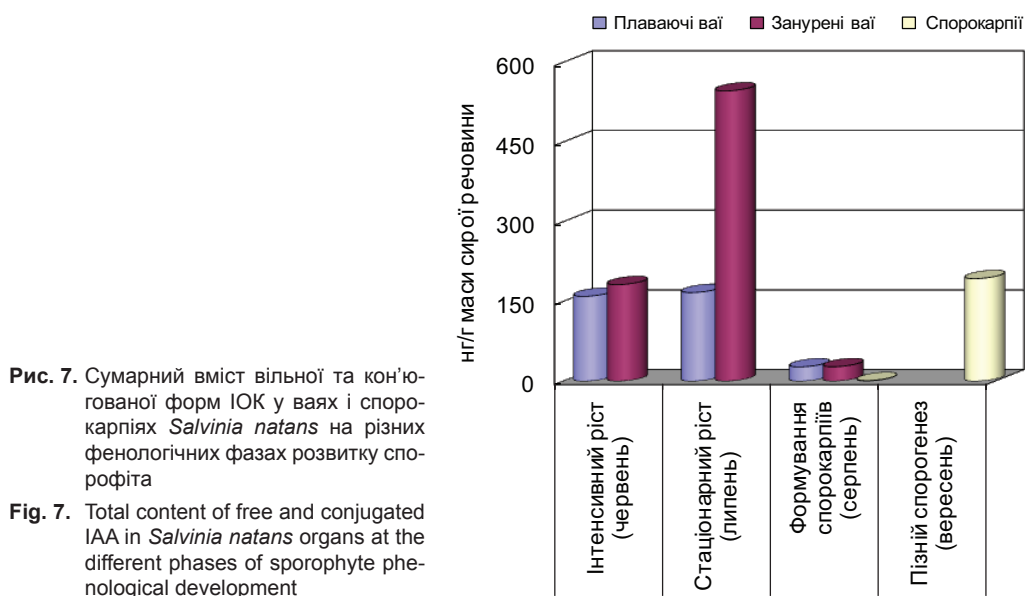


Рис. 6. Мас-спектр ІОК, що містить кластер молекулярного іона ($m/z = 130$) та фрагментарні іони ($m/z = 118, 131, 146$ та 176), одержаний під час хроматографічного розділення та ідентифікації складної суміші

Fig. 6. IAA mass-spectrum that contains the molecular ion cluster ($m/z = 130$) and fragmentary ions ($m/z = 118, 131, 146$ and 176) obtained during chromatographic separation and identification of compound mixture

У фазу інтенсивного росту папороті (червень), під час наростання біомаси й утворення молодих бічних пагонів, котрі в подальшому відокремлювались і фор-

мували нові рослини, загальний вміст ІОК у плаваючих і занурених ваях був однаково високим (рис. 7). У фазу стаціонарного росту (липень), коли видовження плаваючих і занурених вай дорослих рослин припинилося, загальний вміст ІОК у занурених ваях збільшився втричі. При цьому кількість гормону у плаваючих ваях залишалася на рівні попередньої фази. Суттєве зменшення рівня ІОК виявлено у плаваючих і занурених ваях у фазу формування спорокарпіїв та дозрівання спор (серпень). Водночас у спорокарпіїх ІОК була наявна у слідових кількостях. У фазу відмирання вегетативних органів (вересень) на етапі пізнього спорогенезу у спорокарпіїх, які містили зрілі спори, загальний вміст ІОК підвищувався до 193 нг/г сирої речовини (рис. 7).



Отже, впродовж перших двох фенологічних фаз розвитку спорофіта *S. natans* основним центром локалізації ендогенної ІОК є занурені вай, для яких характерне інтенсивне розростання та опушення. У наступну фазу формування спорокарпіїв та дозрівання спор відбувається зменшення вмісту гормону у ваях, а на початку фази відмирання вегетативних органів – збільшення у спорокарпіїх. Акумуляована в спорокарпіїх наприкінці спорогенезу ІОК, на нашу думку, може бути задіяна у процесі формування мікро- і мегаспорангіїв, а в подальшому в регуляції весняного проростання спор і формування гаметофіта. Підставою для цього припущення слугують результати досліджень покритонасінних рослин. Так, значний рівень ІОК у насінні та плодах пов'язаний за участі фітогормону в регуляції процесів дозрівання та проростання [13, 34, 44].

У фази активного та стаціонарного росту у плаваючих і занурених ваях домінувала вільна форма гормону. Кон'югована ІОК була локалізована переважно в занурених ваях у кількостях, які значно перевищували вміст такої у плаваючих (див. таблицю). Значна кількість вільної ІОК у ваях у фазу активного росту відповідає фізіологічній функції гормону як регулятора органо- та морфогенезу [8, 11].

“Ауксиновий сплеск” вільної форми ІОК, який спостерігався у занурених ваях у фазу стаціонарного росту, на нашу думку, може бути обумовлений переміщенням гормону, синтезованого у хлоропластах плаваючих вай, та включенням його у регуляцію ростових процесів занурених вай (див. таблицю). Відомо, що ІОК, задіяна в регуляції росту бічних коренів і розгалуженні пагонів, надходить у тканини в результаті “віддаленого транспорту” з місця синтезу в хлоропластах, тоді як підтримка ауксинового гомеостазу забезпечується шляхом “ближнього транспорту” гормону [53, 54]. Наявність локальних ауксинових максимумів є вирішальним фактором у здатності рослин набувати відповідної структури [4, 12, 14]. Встановлено, що асиметрична акумуляція ауксинів у певних клітинах і органах виникає завдяки спрямованому транспорту, біосинтезу, деградації та кон’югації вільної ІОК як основної форми гормону [37, 53]. У сальвінії немає кореневої системи, проте видозмінені занурені ваї здатні поглинати мінеральні речовини з води [5]. Відомо, що ауксини задіяні у регуляції морфогенезу та впливають на архітектуру коренів у вищих судинних рослин [20]. Виявлене у наших дослідженнях накопичення ІОК у занурених ваях відповідало періоду зростання опушеності останніх, що дає підстави зробити припущення про подібність фізіологічної функції ІОК у сальвінії до такої у коренях вищих судинних рослин.

Вміст вільної та зв’язаної форм ІОК у органах *Salvinia natans* на різних фенологічних фазах розвитку спорофіту, нг/г сирої речовини

Content of free and conjugated IAA in *Salvinia natans* organs at different phases of sporophyte phenological development, ng/g of fresh weight

Орган	Форма ІОК	Фенологічна фаза розвитку спорофіта			
		Інтенсивний ріст (червень)	Стаціонарний ріст (липень)	Формування спорокарпіїв та дозрівання спор (серпень)	Відмирання вегетативних органів (вересень)
Плаваючі ваї	Вільна	149,5±7,5	166,6±8,3	13,7±0,7	
	Кон’югована	10,1±0,5	0,6±0,03	13,2±0,7	
Занурені ваї	Вільна	138,2±6,9	510,0±25,5	7,0±0,3	
	Кон’югована	43,5±2,2	36,3±1,8	20,1±1,0	
Спорокарпії	Вільна			0,6±0,02	161,6±8,1
	Кон’югована			0,5±0,02	21,4±1,1

Отже, у фазу стаціонарного росту спорофіта занурені ваї сальвінії плаваючої, які виконують всисну функцію, стають місцем локалізації ІОК, котра контролює поділ клітин, диференціацію, відносно подовження верхівки, ініціацію розвитку волосків та інтенсивне опушення, як і у коренях вищих рослин [19, 20]. Вірогідно, джерелом поповнення активної ІОК у занурених ваях на стадії стаціонарного росту може також виступати кон’югована форма гормону [30]. З уповільненням росту спорофіта і старінням вай вміст ІОК значно зменшився. У плаваючих ваях вміст

обох форм гормону був однаковим, тоді як у занурених переважала кон'югована форма ІОК (див. таблицю), що відповідає динаміці у вмісті ауксинів у вищих судинних рослин на відповідних фазах онтогенезу [29]. Низька кількість ІОК, виявлена на початку формування спорокарпіїв (див. таблицю), на нашу думку, може вказувати на участь інших груп фітогормонів (гіберелінів і цитокинінів, як у харових водоростей) у формуванні репродуктивних структур [21, 52]. У скупченнях зрілих спорокарпіїв у разі відмирання вегетативних органів і дозріванні спор зафіксовано високий вміст вільної форми ІОК (див. таблицю).

ВИСНОВКИ

Уперше методом високоефективної рідинної хроматографії визначено вміст і локалізацію вільної та кон'югованої форм ендогенної індолил-3-оцтової кислоти в органах різноспорової однорічної папороті гідрофіта *Salvinia natans* (L.) All. Встановлено, що фаза інтенсивного росту спорофіта відбувалася на тлі значної кількості вільної ІОК у плаваючих і занурених ваях. Найвищий вміст ІОК зафіксовано у занурених ваях у фазу стаціонарного росту. У фазу формування спорокарпіїв та дозрівання спор відбулося зменшення рівня ІОК. У занурених ваях спостерігали перевагу кон'югованої форми гормону. Акумуляована в спорокарпіїх у фазу відмирання вегетативних органів на етапі пізнього спорогенезу ІОК, на нашу думку, може бути задіяна у процесі формування мікро- і мегоспорангіїв, а в подальшому в регуляції весняного проростання спор і формування гаметофіта. Розподіл ІОК між плаваючими і зануреними ваями засвідчив, що місцем локалізації ІОК у фазу стаціонарного росту є занурені ваї, а у фазу відмирання вегетативних органів – спорокарпії. Специфічні зміни у накопиченні та локалізації ендогенної ІОК виявили зв'язок між ростовими процесами та розподілом і вмістом вільної та кон'югованої форм фітогормону у вегетативних і генеративних органах спорофіта водяної папороті *Salvinia natans* (L.) All. упродовж її індивідуального розвитку.

1. Abul Y., Menéndez V., Gómez-Campo C. et al. Occurrence of plant growth regulators in *Psilotum nudum*. **Journal of Plant Physiology**, 2010; 167: 1211–1213.
2. Arthur G.D., Stirk W.A., Novak O. et al. Occurrence of nutrients and plant hormones (cytokinins and IAA) in the water fern *Salvinia molesta* during growth and composting. **Environ. and Exp. Botany**, 2007; 61(2): 134–144.
3. Babenko L.M., Sheyko O.A., Kosakivska I.V. et al. Structural and functional characteristics of pteridophytes (Polypodiophyta) **The Biulleten of Kharkiv National. Agrar. University (Ser. Biology)**, 2015; 1(34): 80–103. (In Ukrainian).
4. Benková E., Michniewicz M., Sauer M. et al. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. **Cell**, 2003; 115: 591–602.
5. Cholodny N.G. About metamorphosis of plastids in hairs of *Salvinia natans* submerged leaves. **J. of Russian Bot. Soc.**, 1924; 7: 153–160. (In Russian).
6. Cooke T.J., Poli D., Cohen J.D. Did auxin play a crucial role in the evolution of novel body plans during the Late Silurian–Early Devonian radiation of land plants? **The Evolution of Plant Physiology**, 2003, 5 (21): 85–116.
7. Croxdale J.G. Hormones and Apical Dominance in the Fern *Davallia*. **J. of Exp. Bot.**, 1976; 27: 801–815.
8. Davies P.J. (ed). **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action**. Revised 3rd edn. Dordrecht: Springer, 2010. 816 p.

9. Didukh Ya.P., Pluta P.G., Protopopova V.V. et al. **Ecoflora of Ukraine**. Kyiv: Phytosociocenter, 2000. 284 p. (In Ukrainian).
10. Dun E.A., Ferguson B.J., Beveridge C.A. Apical dominance and shoot branching. Divergent opinions or divergent mechanisms? **Plant Physiology**, 2006; 142: 812–819.
11. Enders T.A., Strader L.C. Auxin activity: past, present, and future. **Amer. J. Botany**, 2015; 102 (2): 180–196.
12. Esmon C.A., Tinsley A.G., Ljung K. et al. A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2006; 103: 236–241.
13. Finkelstein R.R. The role of hormones during seed development and germination. In: Davies, P.J. (Ed), **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction**. The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2004: 513–537.
14. Friml J., Vieten A., Sauer M. et al. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical basal axis of *Arabidopsis*. **Nature**, 2003; 426: 147–153.
15. Gaika A., Szmeja J. Phenology of the aquatic fern *Salvinia natans* (L.) All. in the Vistula Delta in the context of climate warming. **Limnologia**, 2013; 43: 100–105.
16. Gregoric M., Fisher R. Auxin regulates lateral meristem activation in developing gametophytes of *Ceratopteris richardii*. **Can. J. Bot.**, 2006; 84 (10): 1520–1530.
17. Hill J.P. Meristem development at the sporophyll pinna apex in *Ceratopteris richardii*. **International Journal of Plant Sciences**, 2001; 162: 235–247.
18. Hou G., Hill J.P., Blancaflor E.B. Developmental anatomy and auxin response of lateral root formation in *Ceratopteris richardii*. **J. Exp. Bot.**, 2004: 685–693.
19. Ikeda Y., Men S., Fischer U. et al. Local auxin biosynthesis modulates gradient-directed planar polarity in *Arabidopsis*. **Nat. Cell Biol.**, 2009; 11: 731–738.
20. Jones B., Ljung K. Subterranean space exploration: the development of root system architecture. **Curr. Opin. Plant Biol.**, 2012; 15: 97–102.
21. Kaźmierczak A., Stepiński D. GA3 content in young and mature antheridia of *Chara tomentosa* estimated by capillary electrophoresis. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, 2005; 43(1): 65–67.
22. Kende H., Zeevaart J.A.D. The five “classical” plant hormones. **The Plant Cell**, 1997; 9: 1197–1210.
23. Korasick D.A., Enders T.A., Strader L.C. Auxin biosynthesis and storage forms. **J. Exper. Botany**, 2013; 64: 2541–255.
24. Korchagina I.A. **Taxonomy of Higher Spore Plants with Fundamentals of Paleobotany**. St. Petersburg, 2011. P. 514–522. (In Russian).
25. Kosakivska I.V. **Physiological-biochemical fundamentals of plant adaptation to stresses**. Kyiv: Stal, 2003. 191 p. (In Ukrainian).
26. Kosakivska I.V., Voytenko L.V., Likhnyovskiy R.V., Ustinova A.Y. Effect of temperature on accumulation of abscisic acid and indole-3-acetic acid in *Triticum aestivum* L. seedlings. **Genetics and Plant Physiology**, 2014; 4 (3–4): 201–208.
27. Kwa S.H., Wee Y.C., Lim T.M., Kumar P.P. IAA-induced apogamy in *Platyserium coronarium* (Koenig) Desv. Gametophytes cultured *in vitro*. **Plant Cell Rep**, 1995; 14: 598–602.
28. Kwa S.H., Wee Y.C., Lim T.M., Kumar P.P. Morphogenetic plasticity of callus reinitiated from cell suspension cultures of the fern *Platyserium coronarium*. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, 1997; 48: 37–44.
29. Ljung K. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. **Development**, 2013; 140: 943–950.
30. Ludwig-Müller J. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. **J. Exp. Bot.**, 2011; 62: 1757–1773.
31. Menéndez V., Abul Y., Bohanec B. et al. The effect of exogenous and endogenous phytohormones on the *in vitro* development of gametophyte and sporophyte in *Asplenium nidus* (L.). **Acta Physiol. Plant**, 2011; 33: 2493–2500.

32. Menéndez V., Villacorta N.F., Revilla M.A. et al. Exogenous and endogenous growth regulators on apogamy in *Dryopteris affinis* (Lowe) Frasser-Jenkins. **Plant Cell Rep**, 2006; 25(2): 85–91.
33. Miller P.M., Sweet H.C., Miller J.H. Growth Regulation by Ethylene in Fern Gametophytes. I. Effects on Protonemal and Rhizoidal Growth and Interaction with Auxin. **American Journal of Botany**, 1970; 57 (2): 212–217.
34. Miransari M., Smith D.L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, 2014; 99: 110–121.
35. Mockevičiūtė R. **Indole-3-acetic acid-protein complexes in chloroplasts and mitochondria** / Summary of doctoral dissertation Biomedical sciences botany (04 B), 2010. 37 p.
36. Nakazawa S. Morphogenesis of the fern protonema. II. Modification of the apical differentiation in *Dryopteris* affected by IAA. **Protoplasma**, 1959 (1); 52: 1–4.
37. Paciorek T., Friml J. Auxin signaling. **J. Cell Sci**, 2006; 119: 1199–1202.
38. Pati C.K., Bhattacharjee A. Influence of IAA on the retention of detached leaf senescence of three aquatic plant species. **International Journal of Science and Knowledge**, 2013; 2(1): 42–46.
39. Peleg Z., Blumwald E. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. **Current Opinion Plant Biol**, 2011; 14: 290–295.
40. Pilate G., Sossountzov L., Miginiac E. Hormone Levels and Apical Dominance in the Aquatic Fern *Marsilea drummondii* A. Br. **Plant Physiol**, 1989; 90: 907–912.
41. Ross J.J., Reid J.B. Evolution of growth-promoting plant hormones. **Funct. Plant Biol**, 2013; 7: 795–805.
42. Sauer M., Robert S., Kleine-Vehn J. Auxin: simply complicated. **Journal of Experimental Botany**, 2013; 64(9): 2565–2577.
43. Shcherbatiuk M.M., Babenko L.M., Sheyko O.A., Kosakivska I.V. Microstructural features of water fern *Salvinia natans* (L.) All. organ surfaces. **Modern Phytomorphology**, 2015; 7: 129–133. (In Ukrainian).
44. Shin S., Lee J., Rudell D. et al. Transcript Profiles of Auxin Efflux Carrier and IAA-Amido Synthetase Genes Suggest the Role of Auxin on Apple (*Malus × domestica*) Fruit Maturation Patterns. **American Journal of Plant Sciences**, 2015; 6: 620–632.
45. Simon S., Petrášek J. Why plants need more than one type of auxin. **Plant Sci**, 2011; 180: 454–460.
46. Slovin J.P., Bandurski R.S., Cohen J.D. Auxin. In: Hooykaas P.J.J., Hall M.A., Libbenga K.R., eds. **Biochemistry and molecular biology of plant hormones**. Amsterdam: Elsevier, 1999; 115–140.
47. Smith A.R., Pryer K.M., Schuettpelz E. et al. A classification for extant ferns. **Taxon**, 2006; 55: 705–731.
48. Strader L.C., Nemhauser J.L. Auxin 2012: A rich mea ho'oulu. **Development**, 2013; 140: 1153–1157.
49. Szmeja J., Galka A. Survival and reproduction of the aquatic fern *Salvinia natans* (L.) All. during expansion in the Vistula Delta, south Baltic Sea coast. **Journal of Freshwater Ecology**, 2013; 28: 113–123.
50. Tivendale N.D., Davidson S.E., Davies N.W. et al. Biosynthesis of the halogenated auxin, 4-chloroindole-3-acetic acid. **Plant Physiol**, 2012; 159: 1055–1063.
51. Vasheka O.V., Bezsmertna O.O. **Atlas of the fern flora of Ukraine**: Kyiv: Palivoda, 2012. 284 p. (In Ukrainian).
52. Voytenko L.V., Musatenko L.I. Phytohormones as growth regulators in thallus of fresh-water charophytes at the various ontogenesis stages: In: Morgun V.V. (Ed.) **Plant Physiology: Problems and Prospects of their Development**. Kyiv: Lagos, 2009, 2: 423–437. (In Ukrainian).

53. Woodward A. W., Bartel B. Auxin regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, 2005; 95: 707–735.
54. Zažímalová E., Murphy A. S., Yang H. et al. Auxin transporters – why so many? **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, 2010; 2: a001552.

**PECULIARITIES OF ACCUMULATION AND LOCALIZATION
OF INDOLE-3-ACETIC ACID IN ORGANS OF *SALVINIA NATANS* (L.) ALL.
SPOROPHYTE AT THE DIFFERENT PHENOLOGICAL DEVELOPMENT PHASES**

L.V. Voytenko, R.V. Likhnyovskiy, I.V. Kosakivska

*M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine
2, Tereshchenkivska St., Kyiv 01661, Ukraine
e-mail: Lesya_voytenko@ukr.net*

Plants of heterosporous annual fern hydrophyte *Salvinia natans* L. were collected in ponds of the Desniansky district of Kyiv city during summer time beginning from June, 2015 at one-month interval. Biometric studies of the whole plant (clone) and some segments of floating and submerged fronds showed that changes in the sporophyte weight and length at the various phenological phases of development occurred mostly owing to newly formed organs (modules) while linear dimensions of some formed fronds remained practically unchanged. The weight and length of an individual submerged frond considerably exceeded those of floating one. At the steady-state growth phase (July) the weight of an individual submerged frond increased two times due to an intensive formation of multi-cellular filamentous hairs while the length remained almost unchanged. During the reproductive development (August-September) the sporophyte weight increased as a result of sporocarps formation. The pattern of IAA accumulation and localization in organs of the sporophyte *S. natans* was for the first time analyzed using HPLC. At the phase of a fern intensive growth (June), the total IAA content of floating and submerged fronds was shown to be similarly high and reached 182 ng/g of fresh weight. During an active overgrowth and pubescence of submerged fronds (July) the endogenous IAA content was 546.3 ng/g of fresh weight while the quantity of this hormone in floating fronds remained at the level of the previous phase. A considerable reduction of this hormone content in ageing floating and submerged fronds was observed following the sporogenesis beginning at the phase of sporocarp formation and spore ripening. At the stage of late sporogenesis in the beginning of vegetative organs dying phase (September), the total IAA content in sporocarps that contained mature spores was 193 ng/g of fresh weight. The free hormone form dominated at the stage of an active and steady-state growth of floating and submerged fronds. Conjugated IAA was localized mostly in submerged fronds in quantity which exceeded that of floating ones 4 and 36 times, respectively. Distribution of this hormone between floating and submerged fronds shows that during the steady-state growth phase IAA is localized in submerged fronds, while at the phase of vegetative organs dying – in sporocarps. Specific changes in accumulation and localization of endogenous IAA revealed the correlation between growth processes and distribution, and content of phytohormone free and conjugated forms in sporophyte vegetative and reproductive organs of *S. natans* water fern during its individual development.

Keywords: *Salvinia natans* (L.) All, sporophyte, indole-acetic acid, growth, development.

ОСОБЕННОСТИ АККУМУЛЯЦИИ И ЛОКАЛИЗАЦИИ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ В ОРГАНАХ СПОРОФИТА *SALVINIA NATANS* (L.) ALL. НА РАЗНЫХ ФЕНОЛОГИЧЕСКИХ ФАЗАХ РАЗВИТИЯ

Л. В. Войтенко, Р. В. Лихневский, И. В. Косаковская

Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины
ул. Терещенковская, 2, Киев 01601, Украина
e-mail: Lesya_voytenko@ukr.net

Растения разноспорового однолетнего папоротника гидрофита *Salvinia natans* (L.) All. собирали летом в искусственных водоемах Деснянского района г. Киева начиная с июня 2015 г. с интервалом в один месяц. Биометрические исследования целого растения (клона) и отдельных сегментов плавающих и погруженных вай показали, что изменения массы и длины спорофита на разных фенологических фазах развития происходили преимущественно благодаря образованию новых органов (модулей), тогда как линейные размеры отдельных ранее сформированных вай оставались практически неизменными. Масса и длина погруженной вай значительно превышали такие показатели у плавающей. В фазу стационарного роста (июль) масса отдельной погруженной вай увеличилась вдвое благодаря интенсивному формированию многоклеточных нитевидных волосков, в то время как длина оставалась почти без изменений. В процессе репродуктивного развития (август–сентябрь) прирост массы спорофита происходил за счет образования спорокарпиев. Впервые методом высокоэффективной жидкостной хроматографии проведен анализ аккумуляции и локализации индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) в органах спорофита *S. natans*. Значительное уменьшение содержания гормона в стареющих плавающих и погруженных ваях наблюдались в начале спорогенеза в фазе формирования спорокарпиев и созревания спор. Показано, что в фазу интенсивного роста папоротника (июнь) пул эндогенной ИУК в плавающих и погруженных ваях был одинаково высоким и достигал 182 нг/г сырого вещества. Во время активного разрастания и опушивания погруженных вай количество эндогенной ИУК в них достигло 546,3 нг/г сырого вещества, тогда как уровень гормона в плавающих ваях оставался на уровне предыдущей фазы. Существенное уменьшение содержания гормона в стареющих плавающих и погруженных ваях наблюдалось в начале спорогенеза в фазу формирования спорокарпиев и созревания спор. На этапе позднего спорогенеза в начале фазы отмирания вегетативных органов (сентябрь) в скоплениях спорокарпиев, содержащих зрелые споры, пул эндогенной ИУК составлял 193 нг/г сырого вещества. На фазах активного и стационарного роста в плавающих и погруженных ваях доминировала свободная форма гормона. Конъюгированная ИУК локализована преимущественно в погруженных ваях в количестве, в 4 и 36 раз, соответственно, превышающем содержание таковой в плавающих. Распределение ИУК между плавающими и погруженными ваями показало, что местом локализации ИУК в фазу стационарного роста являются погру-

женные вай, а в фазу отмирания вегетативных органов – спорокарпии. Специфические изменения в характере аккумуляции и локализации эндогенной ИУК выявили взаимосвязь между ростовыми процессами и распределением и содержанием свободной и конъюгированной форм гормона в вегетативных и репродуктивных органах спорофита водной папороти *S. natans* на протяжении её индивидуального развития.

Ключевые слова: *Salvinia natans* (L.) All, спорофит, индолил-3-уксусная кислота, рост, развитие.

Одержано: 08.08.2016