

ОСОБЕННОСТИ АККУМУЛЯЦИИ И ЛОКАЛИЗАЦИИ ГИББЕРЕЛЛИНОВ В ОРГАНАХ СПОРОФИТОВ ВЫСШИХ СОСУДИСТЫХ СПОРОВЫХ РАСТЕНИЙ В ОНТОГЕНЕЗЕ

В.А. Васюк^{1*}, И.В. Косаковская¹

¹ Институт Ботаники имени Н.Г. Холодного Национальной Академии Наук
Украины, Киев, Украина

PECULIARITIES OF GIBBERELLINS ACCUMULATION AND LOCALIZATION IN ORGANS OF HIGHER VASCULAR CRYPTOGAMIC PLANTS IN ONTOGENESIS

V.A. Vasyuk, I.V. Kosakovskaya (M.G. Kholodny Institute of Botany of National Academy of
Science of Ukraine, Kiev, Ukraine)

Резюме. Целью работы было изучение особенностей аккумуляции и локализации гиббереллинов в органах высших сосудистых споровых растений *Equisetum arvense* L. и *Salvinia natans* (L.) All. в процессе роста и развития спорофита. Выявлено сходство в качественном составе гиббереллиноподобных вещества (ГПВ) у исследованных видов растений. Установлено, что содержание ГПВ в вегетативных летних побегах *E. arvense* значительно превышало показатели для фертильных весенних побегов. Гиббереллины папоротника-гидрофита *S. natans* исследованы впервые. Полученные данные позволяют предположить, что донорами ГПВ у *S. natans* являются подводные вай, а у *E. arvense* – надземные органы. Показано, что при формировании и созревании спор количество гиббереллинов в спорокарпиях *S. natans* и весеннем спорофите *E. arvense* возрастало. Изменения в характере аккумуляции и локализации гиббереллинов в органах *E. arvense* и *S. natans* отвечали этапам роста спорофита и косвенно подтвердили участие этих гормонов в регуляции вегетативной и репродуктивной стадий онтогенеза спорофита.

Abstract. The objective of this research was to investigate the peculiarities of gibberellins accumulation and localization in organs of higher cryptogamic plants *Equisetum arvense* L. and *Salvinia natans* (L.) All. during sporophyte growth and development. The studied plant species were found to be similar in their qualitative composition of gibberellin-like substances (GLS). The GLS quantity in vegetative summer shoots of *E. arvense* was significantly higher than that of fertile spring ones. Gibberellins were for the first time studied in a water fern *S. natans*. Data obtained suggest that in *S. natans* GLS donors are submerged fronds while in *E. arvense* – overground organs. It was shown that during spores formation and maturing the gibberellins quantity in *S. natans* sporocarps and in spring sporophytes of *E. arvense* increased. Changes in the pattern of gibberellins accumulation and localization in organs of *E. arvense* and *S. natans* corresponded to the stages of sporophyte growth and confirmed indirectly that these hormones are involved in the regulation of vegetative and reproductive stages of ontogenesis.

Ключевые слова: *Equisetum arvense* L., *Salvinia natans* (L.) All., гиббереллины, онтогенез

Keywords: *Equisetum arvense* L., *Salvinia natans* (L.) All., gibberellins, ontogenesis

***Валентина Васюк**, к.б.н., Институт Ботаники имени Н.Г. Холодного Национальной Академии наук Украины, Киев, Украина, e-mail: vasyuk@ukr.net

Поступила в редакцию: 24 Апреля 2017

1. Введение

Фитогормоны – низкомолекулярные органические соединения, синтезируемые в незначительных количествах в клетках растений и участвующие в регуляции процессов роста и развития. Применение физиологических, биохимических и генетических подходов позволило выделить восемь основных классов фитогормонов, среди которых ауксины, гиббереллины, цитокинины, абсцизовая кислота, этилен, жасмоновая и салициловая кислоты и брасиностероиды. [21]. Характер действия фитогормонов зависит от их количества и локализации в органах и тканях растений [9, 19], а гормональный гомеостаз и стабильность регуляторики обеспечиваются системой координации и перекрещивания гормональных сигнальных и метаболических путей [13]. Присутствие фитогормонов у представителей различных таксонов, унифицированность структурных элементов указывают на то, что эти соединения возникли на ранних этапах эволюции [18]. Полученные в последние годы данные свидетельствуют о неодновременном возникновении отдельных классов фитогормонов [25]. Гиббереллины (ГК), которые объединяют более 130 форм, принадлежат к относительно молодому классу [26]. Полагают, что физиологическая активность присуща только некоторым из них (например, ГК₁, ГК₃, ГК₄, ГК₅, ГК₆ и ГК₇), другие же являются их предшественниками в биосинтезе и неактивными формами [26]. Гиббереллинам свойственна полифункциональная активность. Они стимулируют линейный рост стебля, побегов и корней, увеличивают поверхность листа и количество междоузлий, индуцируют цветение, детерминируют пол, контролируют процессы прорастания семян [11, 12, 22]. При регуляции подавляющего большинства морфогенетических процессов ГК функционируют однонаправлено с ауксином и выступают в качестве антагонистов цитокининов и абсцизовой кислоты [4, 15]. До недавнего времени считалось, что ГК проявляют гормональную активность только у семенных растений [18]. Позднее выяснилось, что у низших растений гиббереллины участвуют в трансдукции сигналов [28]. У высших растений наибольшее количество ГК идентифицировано в быстрорастущих тканях, проростках, семенах и плодах [14], у грибов – в активно растущем мицелии и спорах [2, 10]. Проведенные нами исследования выявили значительное увеличение количества ГК в период формирования и развития генеративных органов у макроводорослей *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C.Agardh, и *Chara contraria* A. Br. [5, 8]. У микроводорослей корреляционная зависимость между скоростью роста и содержанием ГК не установлена [27].

Наименее изученными остаются гиббереллины высших сосудистых споровых растений, среди которых хвощи и папоротники, одни из самых древних растений, возникших более 300 млн. лет тому назад и сохранившихся до сегодняшнего дня. Молекулярно-филогенетические исследования позволили включить хвощи и папоротники в монофилетическую группу, которая объединяет ближайших существующих предшественников современных семенных растений [17, 23, 24].

Гиббереллины проанализированы в спорофитах и гаметофитах *Cibotium*, *Blechnum*, *Discontia*, *Driopteris*, *Lygodium*, *Anemia*, *Ceratopteris*, *Psilolotum* [3]. В ваях древовидных папоротников *Cibotium glaucum* (Sm.) Hook. & Arn и *Dicktonia antarctica* James Dickson выявлено около 20 гиббереллинов, среди которых впервые найденный у высших растений ГК₄₀. Количество гиббереллинов у *C. glaucum* значительно превышало такое у *D. antarctica*, что косвенно указывает на видоспецифичность фитогормональной системы папоротниковидных [29]. Анализ литературных источников показал отсутствие работ посвященных изучению гиббереллинов у *Salvinia natans*. Изучение гормональной системы растений разных таксонов, определение характера аккумуляции и локализации отдельных классов фитогормонов в онтогенезе, сопоставление полученных данных со скоростью и направлением ростовых процессов необходимо для понимания эволюционных преобразований и выявления адаптационных приспособлений, обеспечивающих успешность существования. Поэтому целью нашей работы было изучение особенностей аккумуляции и локализации гиббереллинов в органах высших сосудистых споровых растений *Equisetum arvense* L. и *Salvinia natans* (L.) All. в процессе роста и развития спорофита.

2. Материалы и методы

Объектом исследования были спороносные генеративные (весенние) и бесплодные вегетативные (летние) побеги хвоща полевого *Equisetum arvense* L., произраставшего в природных условиях, на суглинистых почвах хорошо освещенных лесных полян в Киевской области. Температурный режим и влажность соответствовали средним для климатической зоны Лесостепи Украины. *E. arvense* – равноспоровое высшее сосудистое растение, жизненный цикл которого состоит из спорофитной и гаметофитной фаз. Спорофитный весенний побег имеет бурую окраску, на его верхушке находится спороносный колосок со спорангиями, в которых содержатся споры. Летний вегетативный зеленый фотосинтезирующий побег характеризуется жестким, ребристым, простым или кольчато-разветвленным, членистым, конечноразветвленным стеблем, состоит из узлов и междоузлий, имеет чешуевидные листья, расположенные, как и веточки, кольцами, которые образуют бурые зубчатые влагалища. Гаметофит развивается из споры. После оплодотворения яйцеклетки формируется спорофит, который некоторое время питается за счет гаметофита, затем отделяется и становится независимым организмом (рис. 1).

В начале развития высота генеративных побегов спорофита равнялась 7-9 см, в закрытых стробилах формировались и созревали споры. Длина междоузлий составляла в среднем 12-15 мм. На стадии зрелого спорофита побеги имели длину 12-14 см, междоузлия удлиннялись до 35-40 мм, в полуоткрытых стробилах содержалось небольшое количество спор. После созревания до 80% спор высыпалось из стробил. У генеративных весенних побегов анализировали гиббереллины корневища, междоузлий с

листовыми влагалищами и стробил, у вегетативных летних побегов – гормоны корневища и надземной части. Исследовались побеги, достигшие высоты 18, 21, 26 и 40 см.



А

Б

Рис. 1. А – спороносные генеративные побеги; Б – бесплодные вегетативные побеги *Equisetum arvense* L.



Рис. 2. Спорофит папоротника гидрофита *Salvinia natans* (L.) All.

Папоротник *Salvinia natans* (L.) All. однолетний гидрофит с коротким, горизонтальным, плавающим, разветвленным стеблем. Каждые три вай располагаются на стебле кольцами, две из них – небольшие плавающие, на коротких черешках, третья вая – подводная, рассечена на тонкие нити, выполняет преимущественно всасывающую функцию (рис. 2).

Размножается *S. natans* вегетативно или спорами. Растения гетероспоровые, разнополюе, микроспорангии с микроспорами объединены в мегаспорангии, которые находятся в шарообразных спорокарпиях у основания подводных вай. В зимний период спорофит отмирает, спорокарпии погружаются на дно водоема, весной оболочка спорокарпия разрывается, и споры всплывают на поверхность водоема, где происходит развитие и рост спорофита [7]. Растения сальвинии плавающей собирали летом в искусственных водоемах Деснянского района г. Киева. Исследовались гиббереллины подводных и плавающих (надводных) вай, а также спорокарпиев на стадиях интенсивного роста спорофита (июнь), роста спорофита (июль) и формирования спорокарпиев (август).

Для выделения свободных и конъюгированных ГПВ растительный материал гомогенизировали, экстракцию гормонов проводили в 80% этиловом спирте, водный остаток после выпаривания спирта фракционировали с этилацетатом и бутанолом при pH 2,8. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Merck (Германия) в системе растворителей (изопропанол: аммиак: вода, 10: 1: 1). В качестве маркера использовали стандартный раствор гибберелловой кислоты. Активность ГПВ определяли методом биотеста, основанном на стимуляции гиббереллинами роста гипокотилия салата [1]. Количество ГПВ вычисляли с помощью калибровочной кривой, построенной для различных концентраций ГК₃, и выражали в эквивалентах к ГК₃.

Опыты проводились в двух биологических и трех аналитических повторах. Результаты статистически обработаны ($P \leq 0.05$) с использованием программы Microsoft Excel 2003.

3. Результаты исследований и их обсуждение

Сведения о характере аккумуляции и распределения свободных и конъюгированных форм гиббереллинов в органах спорофита *E. arvense* на разных стадиях онтогенеза представлены в таблице 1. В спорофите хвоща полевого были идентифицированы ГК₃, ГК₄ и ГК₇ активности, соответствующие Rf 0,3, 0,7 и 0,6. Качественный состав ГПВ всех органов спорофита был идентичен. Пул эндогенных гиббереллинов (в мкг/г массы сырого вещества) у спорофита *E. arvense* значительно превышал такой показатель у покрытосеменных растений, для которых количество гормона измеряется в нг/г массы сырого вещества [6]. В работах других авторов сообщалось о высоком уровне эндогенных гиббереллинов у фитопатогенных и микоризных грибов [2], а также у водорослей [5, 16].

Таблица 1. Содержание ГПВ (мкг/г массы сырого вещества в эквивалентах к ГК₃) в органах спорофита *Equisetum arvense* L. в онтогенезе

Вариант	Орган спорофита	Фракции гиббереллинов	
		этилацетатная (свободные)	бутанольная (конъюгированные)
Фертильный весенний побег			
Высота побега, 4 см	целый побег со стробилом	0,4±0,02	0,4±0,02
стробил со спорами закрытый	стробил	1,2±0,05	0,9±0,04
	междоузлия с листьями	0,4±0,01	0,2±0,01
	корневище	0,1±0,01	0,02±0,003
Стробил, частично со спорами, раскрытый	стробил	0,7±0,04	0,8±0,04
	междоузлия с листками	0,2±0,02	0,3±0,02
	корневище	0,025±0,01	0,03±0,01
Вегетативный летний побег			
Высота побега, 18 см	надземная часть	3,5±0,7	5,4±0,3
	корневище	1,9±0,2	1,6±0,08
Высота побега, 21 см	надземная часть	3,0±0,2	5,1±0,1
	корневище	1,0±0,01	0,9±0,06
Высота побега, 26 см	надземная часть	1,2±0,02	1,1±0,02
	корневище	0,2±0,01	0,2±0,01
Высота побега, 40 см	надземная часть	0,9±0,01	0,2±0,01
	корневище	0,2±0,01	0,2±0,01

Стробилы фертильных весенних побегов *E. arvense* отличались высоким уровнем ГПВ. Активные формы преобладали над конъюгированными, что соответствовало началу формирования и развития спор. В междоузлиях количество ГПВ было значительно меньшим, а корневища отличались наиболее низким уровнем активности гиббереллинов. После раскрытия стробил наблюдалось снижение уровня эндогенных гиббереллинов, что совпадало во времени с завершением процесса спорообразования и отделением зрелых спор. На стадии открытых стробил в междоузлиях с листьями зафиксирован рост уровня конъюгированных форм ГПВ. Одновременно наблюдалось увеличение пула эндогенных гиббереллинов в корневищах. Характер распределения фитогормона между междоузлиями и стробилами фертильных весенних

побегов соответствовал физиологической функции органов *E. arvense*, которая на этой стадии онтогенеза направлена на формирование и созревание спор.

После высыпания спор и отмирания фертильных весенних побегов от корневища отрастали вегетативные фотосинтезирующие побеги. В процессе роста вегетативного побега спорофита мы наблюдали постепенное уменьшение пула эндогенных гиббереллинов. На завершающей стадии роста в надземной части отмечено уменьшение количества свободных форм ГПВ с 3,5 до 0,9, конъюгированных – с 5,4 до 0,2 мкг/г массы сырого вещества, что соответствовало замедлению ростовых процессов и старению спорофита. Наименьшее количество гиббереллинов было локализовано в корневищах: 0,2 – свободных и 0,2 мкг/г массы сырой вещества – конъюгированных.

Следовательно, характер аккумуляции гиббереллинов в органах фертильного и вегетативного побегов свидетельствует о причастности этого класса гормонов к регуляции процессов роста и развития спорофита *E. arvense*. Особенности локализации ГПВ в спорофите позволяют предположить, что сайтом синтеза гормона являются надземные органы *E. arvense*.

Данные об особенностях аккумуляции и распределения свободных и конъюгированных форм гиббереллинов в органах спорофита *S. natans* на разных стадиях онтогенеза представлены в таблице 2.

Таблица 2. Содержание ГПВ (мкг/г массы сырого вещества в эквивалентах к ГК₃) в органах спорофита *Salvinia natans* (L.) All. в онтогенезе

Стадия онтогенеза	Орган спорофита	Фракции ГПВ	
		этилацетатная (свободные)	бутанольная (конъюгированные)
интенсивный рост спорофита	плавающие вай	1,2±0,06	0,7±0,04
	подводные вай	1,4±0,07	0,5±0,03
рост спорофита	плавающие вай	1,2±0,06	0,3±0,02
	Подводные вай	2,3±0,12	0,7±0,04
формирование спорокарпиев	плавающие вай	1,5±0,08	0,8±0,04
	подводные вай	5,7±0,29	0,2±0,01
	спорокарпии	1,3±0,07	0,7±0,04
отмирание вегетативных органов	скопление спорокарпиев	7,7±0,39	2,4±0,12

Преобладание свободных форм ГПВ наблюдалось во всех органах на всех стадиях онтогенеза. Свободные формы ГПВ аккумулировались преимущественно в подводных ваях, которые, вероятно, являются донорами гормона. Известно, что у высших растений местом синтеза ГПВ является зона апекса и молодые листья. Активное продуцирование фитогормонов происходит и в междоузлиях, которые находятся на стадии интенсивного роста [30]. Фонологические наблюдения выявили, что увеличение размера растений происходило за счет новообразованных вай. Следовательно, зафиксированный в наших исследованиях рост уровня гиббереллинов обусловлен продуцированием гормона в этих ваях и развившихся спорокарпиях, для которых отмечено высокое содержание свободных и конъюгированных форм ГПВ. Известно, что гиббереллины на ранних этапах онтогенеза контролируют рост и удлинение клеток, а на поздних – задействованы в формировании генеративных органов [20]. Таким образом, выявленное нами увеличение содержания ГПВ соответствовало динамике ростовых процессов, а высокий уровень гиббереллинов в спорокарпиях косвенно указывает на участие гормонов в репродуктивном процессе.

4. Выводы

Характер аккумуляции и локализации гиббереллинов в органах высших сосудистых споровых растений *Equisetum arvense* и *Salvinia natans* косвенно подтвердил участие гормона в регуляции вегетативной и репродуктивной фаз онтогенеза. Содержание ГПВ в вегетативных летних побегах *E. arvense* значительно превышало показатели фертильных весенних побегов. Гиббереллины папоротника-гидрофита *S. natans* исследованы впервые. Полученные данные позволяют предположить, что донорами ГПВ у *S. natans* являются подводные вай, а у *E. arvense* – надземные органы. При формировании и созревании спор количество гиббереллинов в спорокарпиях *S. natans* и весеннем спорофите *E. arvense* возрастало.

Литература

1. Агнестикова В.Н., (1966) Методы определения регуляторов роста растений и гербицидов, Москва, Наука, 93 с.
2. Андрианова Т.В., Васюк В.А., Мусатенко Л.И., (1993) Состояние и перспективы исследования фитогормонов грибов, Препринт, Киев: Ин-т Ботаники, 54 с.
3. Васюк В.А., Косаківська І.В., (2015) Гібереліни папоротей: участь у регуляції фізіологічних процесів, *Укр. Бот. Журн.*, 72(1), 65-73.
4. Васюк В.А., Веденичова Н.П., Косаківська І.В., (2015) Цитокініни та гібереліноподібні речовини в онтогенезі *Equisetum arvense*, *Укр. Бот. Журн.*, 72(2), 164–171.
5. Васюк В.А., Войтенко Л.В., Мусатенко Л.И., (2004) Гиббереллиноподобные вещества *Chara contraria* A. Br. (Charophyceae), *Альгология*, 14(4), 410-417.
6. Генералова В.М., Васюк В.А., Мусатенко Л.И., (2009) АБК та гібереліни в органах проростків *Phaseolus vulgaris* L. та *Zea mays* L., *Укр. Бот. Журн.*, 66(5), 705-712.

7. Вашека О.В., Безсмертна О.О., (2012) Атлас папоротей флори України: монографія, К.: Паливода А.В., 160 с.
8. Веденичова Н.П., Васюк В.А., Косаківська І.В., (2015) Сезонна динаміка ендогенних цитокінінів і гіберелінів у чорноморської макроводорості *Cystoseira barbata* (*Phaeophyceae*), *Укр. Бот. Журн.*, 72(3), 261-266.
9. Косаківська І.В., (2003) Фізіолого-біохімічні основи адаптації рослин до стресів, К.: Сталь, 191 с.
10. Brueckner B., Blechschmidt D., Sembdner G., Schneider G. Fungal Gibberellin Production /Ed. Vandamme E.J., (1989) *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors, Elsevier Applied Biotechnology Series*, 383-429.
11. Chandler J.W., (2011) The hormonal regulation of flower development, *J. Plant Growth Regul.*, 30, 242-254.
12. Davière J.M., Achard P., (2013) Gibberellin signaling in plants, *Development*, 140, 1147-1151.
13. El-Showk S., Raili Ruonala R., Helariutta Y. (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk, *Development*, 1373-1383.
<http://dev.biologists.org/content/140/7/1373.full-corresp-1>
14. Gantait S., Sinniah U.R., Ali M.N., Sahu N.C., (2015) Gibberellins - a multifaceted hormone in plant growth regulatory network, *Curr. Protein Pept. Sci.*, 16(5), 406-412.
15. Gupta R., Chakrabarty S., (2013) Gibberellic acid in plant. // *Plant Signal Behav.*, 8, №9: e25504. Published online 2013 Jun 28. doi:10.4161/psb.25504 PMID: PMC4002599.
16. Jennings R.S., (1968) Gibberellins as endogenous growth regulation in green and brown algae, *Planta*, 80(1), 34-42.
17. Karol K.G., Arumuganathan K., Boore J.L., Duffy A.M., Everett K.D., Hall J.D., Hansen S.K., Kuehl J.V., Mandoli D.F., Mishler B.D., Olmstead R.G., Renzaglia K.S., Wolf P.G., (2010) Complete plastome sequences of *Equisetum arvense* and *Isoetes flaccida*: implications for phylogeny and plastid genome evolution of early land plant lineages, *BMC Evolutionary Biology*, 10:321 DOI: 10.1186/1471-2148-10-321.
18. MacMillan J., (2001) Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi and bacteria, *J. Plant Growth Regul.*, 20(4), 387-442.
19. Munné-Bosch S., Müller M., (2013) Hormonal cross-talk in plant development and stress responses, *Front. Plant Sci.*, 4, 529-531.
20. Mutasa-Göttgens E., Hedden P., (2009) Gibberellin as a factor in floral regulatory networks, *J. Exp. Bot.*, 60(7), 1979-1989.
21. Peleg Z, Blumwald E., (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 290-295.
22. Peters R.J., (2013) Gibberellin Phytohormone Metabolism // *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms: New Concepts and Experimental Approaches*. Ed. Bach T.J., Rohmer M., New York: Springer, 233-249.
23. Pryer K.M., Schneider H., Smith A.R., Cranfill R., Wolf P.G., Hunt J.S., Sipes S.D., (2001) Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants, *Nature*, 409, 618-622.
24. Qiu Y.B., Li L.B., Wang B., Chen Z.D., Dombrowska O., Lee J., Kent L., Li R.Q., Jobson R.W., Hendry T.A., Taylor D.W., Testa C.M., Ambros M., (2007) A nonflowering land plant phylogeny inferred from nucleotide sequences of seven chloroplast, mitochondrial, and nuclear genes, *Int. J. Plant Sci.*, 168, 691-708.

25. Ross J.J., Reid J.B., (2010) Evolution of growth-promoting plant hormones, *Functional Plant Biology*, 37(9), 795–805.
26. Sponsel V.M., Hedden P., (2010) Gibberellin Biosynthesis and Inactivation, *Plant Hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action*, Ed. Davies P.J. - Dordrecht: Springer, 63-94.
27. Stirk W.A., Bálint P., Tarkowská D., Novák O., Strnad M., Ördög V., van Staden J., (2013) Hormone profiles in microalgae: Gibberellins and brassinosteroids, *Plant Physiol. Biochem.*, 70, 348-353.
28. Vandebussche E., Fierro A.S., Wiedemann G., Reski R., Van Der Straeten D., (2007) Evolutionary conservation of plant gibberellin signalling pathway components, *BMC Plant Biology*, 7:65doi:10.1186/1471-2229-7-65.
29. Yamaguchi S., (2008) Gibberellin metabolism and its regulation, *Annu Rev Plant Biol.*, 59, 225–251.
30. 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.