

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

Фітогормональний комплекс *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce (род. Orchidaceae Juss.) і його роль у розробці методів розмноження *in vitro*

Досліджено складові фітогормонального комплексу *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce на різних етапах онтогенезу та розроблено підходи введення цього виду в культуру *in vitro*. Показано, що в процесі онтогенезу відбуваються зміни вмісту цитокінінів, індолілоцтової та абсцизової кислот у вегетативних і генеративних органах *C. damasonium*, а також варіюють співвідношення їхніх вільних і зв'язаних форм. При переході до репродуктивного розвитку в генеративних органах підвищується вміст індолілоцтової кислоти та цитокінінів, у вегетативних — знижується. Вперше встановлено взаємозв'язок між інтенсивністю калусогенезу з експлантів вегетативних і генеративних органів *C. damasonium* та вмістом і співвідношенням складових фітогормонального комплексу на певних етапах онтогенезу, що необхідно враховувати при розробці методів мікроклонального розмноження.

Кожна окрема клітина має внутрішні регуляторні механізми, за допомогою яких узгоджуються всі її життєві процеси. На рівні багатоклітинного рослинного організму існує також потреба в ієрархічній системі регулювання, що координує процеси диференціації, росту, розвитку, обміну речовин, а також розмноження. Регуляція запуску та реалізації програм морфогенезу як у рослин, так і у грибів відбувається за допомогою збалансованих багатокомпонентних гормональних систем, кожен компонент яких характеризується специфічними функціями, проте перебіг процесів життєдіяльності здебільшого залежить від збалансованості кількості і дії всіх фітогормонів [1]. Співвідношення компонентів гормонального комплексу зумовлює стан органів рослин і дає можливість оцінити фізіологічні процеси, які в них відбуваються. Тому визначення вмісту фітогормонів є необхідним для з'ясування їхньої регуляторної ролі. Крім того, фітогормони відіграють найважливішу роль в культивуванні рослин *in vitro*, а саме: в індукції поділу клітин експланту, утворенні калусу та морфогенезі рослин *in vitro*. Для більшості рослин пошук гормональних компонентів середовища має випадковий характер, коли необхідно перевірити широкий діапазон концентрацій і комбінацій фітогормонів у живильному середовищі для стимуляції і активування проліферації, росту і розвитку експлантів у культурі. Тому вивчення комплексу ендегенних фітогормонів дозволяє прискорити процес оптимізації культивування експлантів *in vitro*. Особливо цікавими і актуальними такі дослідження є для рідкісних і зникаючих видів родини Orchidaceae Juss., оскільки клональне розмноження для всіх її представників — один із найбільш перспективних шляхів збереження генофонду. Цей метод дає можливість контролювати чинники навколишнього середовища і забезпечує широке впровадження модельних систем культури рослинних тканин *in vitro* для подальших теоретичних та прикладних досліджень морфогенезу — актуальної проблеми сучасної біології. На сьогодні такі методи розроблені для окремих рослин, однак роботи по розмноженню рідкісних, зникаючих і ен-

демічних дикорослих видів, до яких належать орхідні флори України, практично відсутні. Це пов'язано, насамперед, із застосуванням емпіричних підходів при розробці методів клонального мікророзмноження, оскільки відсутня теорія морфогенезу *in vitro*, а кожен вид рослин характеризується індивідуальними реакціями на умови культивування. Отже, розробка ефективних методів розмноження та збереження рідкісних і зникаючих видів орхідей потребує комплексного вивчення їхньої біології, онтогенезу, еколого-фізіологічних особливостей *in situ* й створення умов для культивування *in vitro*.

Матеріали та методи. Об'єктом досліджень була *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce (булатка великоквіткова) — європейсько-середземноморський рідкісний вид. Стебло *C. damasonium* пряме, міцне, заввишки 20–60 см, відходить від укороченого висхідного або прямого кореневища, густо вкритого ниткоподібними коренями 7–12 см завдовжки. Листки овальні або еліптично-овальні, сидячі, на верхівці загострені або тупуваті, з обох боків не опушені, з 5–7 дугоподібними жилками, що добре помітні зверху. Суцвіття до 12 см, пряме, рідке з 3–8 квітками; приквітки нижніх квіток листкоподібні, ланцетні або лінійно-ланцетні, загострені, 2–4 см завдовжки. Квітки спрямовані вгору або горизонтально розміщені, без зав'язі, 1,5–2 см завдовжки, білі. Зовнішні листочки оцвітини продовгуваті або ланцетно-продовгуваті з п'ятьма жилками, внутрішні тупі, обернено-яйцеподібні з однією жилкою. Губа біла, всередині жовтувата, спереду біля основи з півмісяцевою жовтою цяткою. Зав'язь скручена, під час дозрівання плоду розкручується. Цвіте *C. damasonium* у травні–липні, плодоносить у липні–серпні. Плід — коробочка до 2 см з прямими реберцями. Розмножується насінням і вегетативно. Росте у світлих хвойних, мішаних й широколистяних лісах, де едифікатором є дуб скельний і пухнастий, на галявинах, зрідка — на узліссях, переважно на вапняках і ґрунтах з високим вмістом гумусу. Популяції виду нараховують кілька десятків, зрідка до тисячі особин, щільність низька [2–4].

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

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

Статистичне опрацювання отриманих результатів. Фітогормони досліджували у трьох біологічних і трьох аналітичних повторностях, біометричні показники — у п'ятидесятикратній повторності. Одержані дані обробляли за допомогою комп'ютерної статистичної програми Excel ліцензійного пакета Microsoft Office 2007. Визначали значення серед-

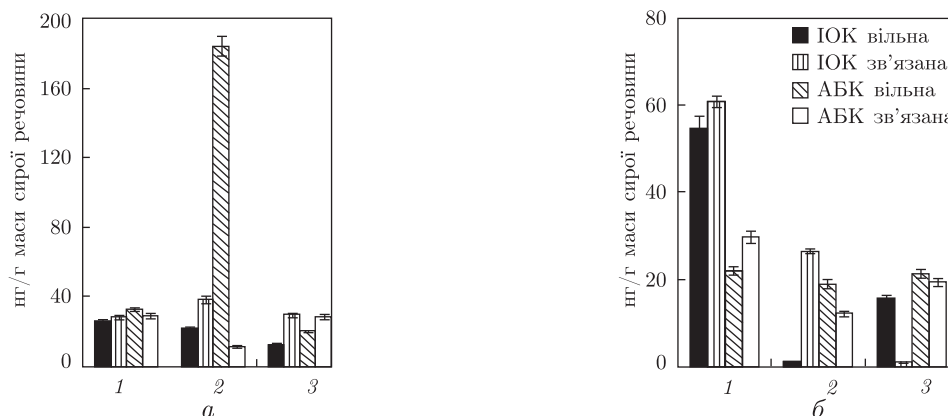


Рис. 1. Вміст ІОК і АБК у квітках (1), листках (2), стеблах (3) *Cephalanthera damasonium* у період цвітіння (а) та плодоутворення (б)

нього арифметичного, стандартної похибки, середнього квадратичного відхилення. Достовірність різниці оцінювали за критерієм Стюдента, використовуючи 5% рівень значущості ($P \leq 0,05$).

Результати та обговорення. Одним із завдань роботи було дослідження вмісту і складу, а також співвідношень ключових фітогормонів у вегетативних та генеративних органах *C. damasonium* на різних етапах онтогенезу. При аналізі даних щодо вмісту ІОК та АБК у вегетативних і генеративних органах *C. damasonium* у період цвітіння відзначені такі закономірності якісного і кількісного співвідношення фітогормонів. Вегетативні органи рослин характеризуються значно меншою кількістю вільної форми ІОК, а в квітках спостерігається майже однаковий показник для обох форм ІОК із незначним переважанням кон'югованої (рис. 1). На жаль, ці дані не дають уявлення про справжній вміст ауксинів у окремих клітинах або тканинах, оскільки вони можуть концентруватися в одних компартментах, а в інших взагалі бути відсутніми. Меншу кількість вільної ІОК у стеблі та листках можна пояснити кореляцією між вмістом гормонів індольної природи та інтенсивністю ростових процесів. Найвищий вміст цього АБК зафіксовано в листках ($195,5 \pm 9,5$ нг/г маси сирої речовини), причому в більшій кількості була наявною її вільна форма ($184,2 \pm 9,2$ нг/г м. с. р.). Таке підвищення рівня АБК може бути пов'язано з недостатньою швидкістю інактивації надлишків вільної форми або низькою активністю окислювальних ферментів [6]. Вважають, що наявність значної кількості АБК у тканинах і органах у період інтенсивного росту може свідчити про її важливу роль у регуляції процесів росту і розвитку організмів [7]. Як відомо, листки є основними органами синтезу АБК. Фітогормон накопичується переважно в хлоропластах і в незначній кількості в цитозолі та вакуолі. У квітках і стеблі кількість АБК була практично однаковою, проте у квітках переважала вільна форма, а в стеблі — зв'язана.

При вивченні ендогенного вмісту ІОК і АБК у вегетативних і генеративних органах *C. damasonium* у період плодоутворення найбільш виразно спостерігався підвищений вміст ІОК у зав'язях порівняно з періодом цвітіння. При цьому вміст ІОК був практично вдвічі більший ($115,6 \pm 5,8$ нг/г м. с. р.), ніж вміст АБК ($51,8 \pm 2,5$ нг/г м. с. р.). Підвищення вмісту ендогенних фітогормонів обумовлює надходження асимілятів і стимуляцію метаболізму в певному органі чи тканині. У зав'язях таке підвищення вмісту цих фітогормонів необхідне для формування і розвитку насіння.

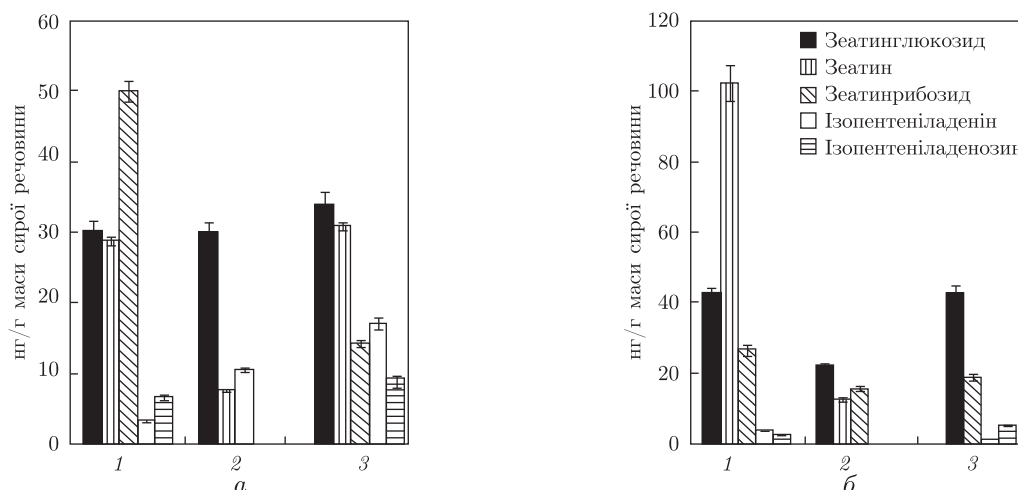


Рис. 2. Вміст ЦТК у квітках (1), листках (2), стеблах (3) *Cephalanthera damasonium* у період цвітіння (а) та плодоутворення (б)

Регуляція переходу рослин до репродуктивного розвитку відбувається за допомогою комплексу гормональних речовин, які утворюються у вегетативних органах під дією фотоперіодичного сигналу або при вікових змінах. Важливе місце в цьому процесі посідають ЦТК. В усіх органах *C. damasonium* виявлено значно вищі рівні ЦТК Z-типу порівняно з іР-цитокінінами в період цвітіння (рис. 2). Дія ЦТК у репродукційному процесі залежить від певної їх концентрації, а будь-які відхилення та супероптимальні дози справляють інгібіторний ефект [8]. Можливо, саме з цим пов'язано те, що як для вегетативних, так і генеративних органів були характерні порівняно високі кількісні показники зеатинглюкозиду. Загальна ж кількість ЦТК була найменшою в листках ($48,1 \pm 2,4$ нг/г м.с.р.), вдвічі більшою в стеблі ($105,6 \pm 5,3$ нг/г м.с.р.) і квітках ($119 \pm 5,9$ нг/г м.с.р.).

У період плодоутворення у вегетативних органах *C. damasonium* відбувалося зниження вмісту ЦТК на тлі його збільшення у зав'язях. При цьому в листках і стеблі був вищий рівень зеатинглюкозиду ($22,2 \pm 1,1$ та $42,7 \pm 2,1$ нг/г м.с.р.), а в зав'язях — зеатину ($102,5 \pm 5,1$ нг/г м.с.р.). Участь ЦТК як одного з важливих компонентів гормональної системи рослин у контролі генеративних процесів показана багатьма дослідженнями. Так, екзогенні ЦТК за сприятливих умов стимулювали цвітіння різних видів рослин [9]. Насіння, що розвивається, характеризується вищим вмістом ЦТК порівняно з іншими органами рослин. Максимум вмісту ЦТК у насінні, як правило, припадає на період найактивнішого клітинного поділу. Проте деякі дослідники вважають, що підвищення рівня ЦТК скоріше є характерним супроводженням росту, ніж фактором, що впливає на нього [10]. Найвищі рівні ЦТК властиві насінню на ранніх стадіях ембріогенезу, через що його вважають місцем синтезу ЦТК *de novo*. Проте здатність до автономного синтезу ЦТК, очевидно, з'являється вже після закладання плодів і початку їхнього розвитку [11]. Окремі ізоформи тРНК містять ізопентеніладенін, а також його метилтіопохідні. При розпаді тРНК звільняються ЦТК, які можуть впливати на метаболізм компетентних клітин. На відміну від вільних іР-цитокінінів, які гідроксильються в рослинах з утворенням ще більш активного транс-зеатину, іР-цитокініни в складі тРНК гідроксильються, навпаки, з утворенням малоактивного цис-зеатину [12]. Встановлено, що у рослин тРНК не є головним джерелом ЦТК [13].

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

Наступним завданням роботи було введення *C. damasonium* в культуру *in vitro*. У дослідженнях використовували експланти з листків, стебел, пелюсток, зав'язей, насінних зачатків та пиляків *C. damasonium*. Враховуючи співвідношення ключових фітогормонів, експланти відбирали на стадії онтогенезу, для якої характерним є найбільший вміст вільних форм ЦТК, ІОК, а найменшим — вільної форми АБК. Також необхідно враховувати співвідношення ІОК і АБК, ЦТК і АБК. Для листків і стебла такою стадією є вегетація, оскільки вегетативні органи в цей період характеризуються найвищим вмістом фітогормонів індольної природи та ЦТК. Хоча для листків характерним є підвищений вміст АБК, саме в цей період вони містили найвищий рівень ЦТК, які відіграють найважливішу роль у поділі клітин та калюсогенезі.

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

Найважливішу роль в індукції поділу клітин експланту, утворенні калюсу та морфогенезі відіграють фітогормони, які є невід'ємним компонентом мікроклонального розмноження рослин. Як основні фактори дедиференціації використовували 2,4-Д, ІМК та 6-БАП у концентраціях від 0,5 до 3,0 мг/л. Підбір оптимальних концентрацій та співвідношень фітогормонів у живильному середовищі за даних умов культивування показав, що максимальною частота калюсогенезу є при використанні живильних середовищ, у яких зберігається таке ж співвідношення цитокінінів і ауксинів, як і для інтактного органа. З табл. 1 видно, що у *C. damasonium* максимальна частота калюсогенезу спостерігається при культивуванні на живильному середовищі з додаванням екзогенних цитокінінів і ауксинів у співвідношенні 1,5, що є характерним для інтактних органів. При культивуванні на живильних середо-

Таблиця 1. Залежність калюсогенезу експлантів *Cephalanthera damasonium* від співвідношення ендогенних та екзогенних фітогормонів (цитокінінів і ауксинів)

Експлант	Цитокініни/ауксини		Частота калюсогенезу, %
	ендогенні	екзогенні	
Зав'язь	1,5	2,0	3,0 ± 0,1
		1,7	9,4 ± 0,5
		1,5	23,9 ± 1,1
Стебло	1,5	2,0	—
		1,7	4,2 ± 0,2
		1,5	9,3 ± 0,4

Примітка. “—” — калюс не утворився.

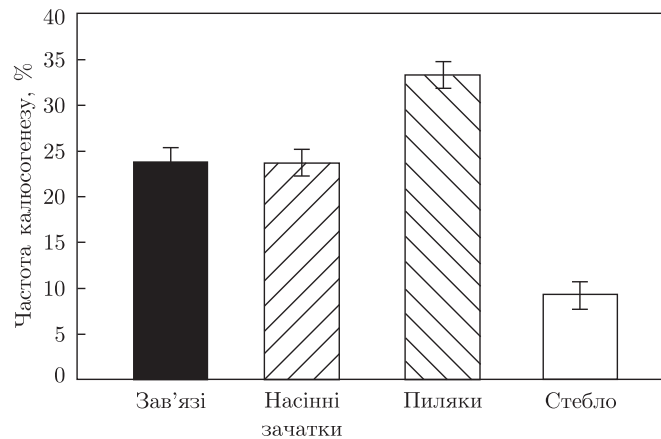


Рис. 3. Частота калюсогенезу з різних типів експлантів *Cephalanthera damasonium*

вищах з іншими кількісними співвідношеннями фітогормонів частота калюсогенезу значно менша і не перевищує 10%.

Отже, у результаті проведених досліджень було отримано калюсні культури зі стебла, зав'язей, насінних зачатків та пиляків *C. damasonium*. Максимальну частоту калюсогенезу встановлено при культивуванні експлантів зав'язей, насінних зачатків і пиляків (до 33%), а мінімальну — при культивуванні експлантів стебла (до 9%) (рис. 3). Це, можливо, обумовлено підвищеним вмістом ендогенних фітогормонів, а саме ІОК та ЦТК, у генеративних органах порівняно з вегетативними, у яких було відмічено підвищений вміст АБК. Цей факт підтверджує залежність морфогенетичного потенціалу експланту від вмісту ендогенних фітогормонів.

Із експлантів зав'язей, насінних зачатків та пиляків були отримані переважно морфогенні типи калюсу — компактні, вузлові, щільні; калюси з експлантів стебла були переважно неморфогенні — м'які, нещільні, водянисті. Цитологічний аналіз цих калюсних культур показав ряд специфічних особливостей, до яких можна віднести значну структурну гетерогенність та наявність різних за морфологією типів утворень. У калюсах зав'язей, насінних зачатків та пиляків було виявлено дрібні клітини з великими ядрами, які локалізувалися групами та утворювали меристематичний осередок, поділ клітин якого призводив до утворення лігніфікованих елементів судин та трахеїд. Інший шлях морфогенезу в меристематичних осередках — це спонтанний ембріогенез. Калюсна клітина покривалася щільною оболонкою і відокремлювалася від оточуючих клітин, збільшувалася та змінювала забарвлення. Така клітина характеризувалася чітко спрямованим поділом, у результаті закладання орієнтованих клітинних перегородок утворювалася чотириклітинна структура (тетрада), всі клітини якої були розташовані лінійно, після чого формувався багатоклітинний ембріоїд.

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

1. Ситник К. М., Мусатенко Л. І., Васюк В. А. та ін. Фітогормони судинних рослин і спорових // Проблеми фітогормонології / Під ред. К. М. Ситника. – Київ: Український фітосоціологічний центр, 2007. – С. 270–346.
2. Собко В. Г. Науки заповідне зілля. – Київ: Фітосоціоцентр, 2005. – 452 с.
3. Червона книга України. Рослинний світ / Під ред. Я. П. Дідуха. – Київ: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
4. Собко В. Г. Стежинами Червоної книги. – Київ: Урожай, 2007. – 280 с.
5. Методические рекомендации по определению фитогормонов / АН УССР. Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного. – Препр. – Киев, 1988. – 78 с.
6. Генералова В. М., Васюк В. А., Мусатенко Л. І. АБК та гібереліни в органах проростків *Phaseolus vulgaris* L. і *Zea mays* L. // Укр. ботан. журн. – 2009. – **66**, № 5. – С. 705–712.
7. Курчій Б. О. Вміст абсцизової кислоти в рослинах озимого жита на різних стадіях онтогенезу // Физиология и биохимия культ. растений. – 2000. – **32**, № 6. – С. 444–448.
8. Corbesier L., Prinsen E., Jackmard A. et al. Cytokinin levels in leaves, leaf exudates and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition // J. Exp. Bot. – 2003. – **54**. – P. 2511–2517.
9. Веденічева Н. П., Мусатенко Л. І. Локалізація і динаміка цитокінінів у період формування репродуктивних органів *Zea mays* L. // Укр. ботан. журн. – 2008. – **65**, № 6. – С. 896–902.
10. Van Staden J. Occurrence and potential physiological effects of algae plant growth regulators // Intern. Workshop and Training Course on Microalgal Biology and Biotechnology (Mosonmagyaróvár, Hungary, 18–20 June 1999). – Hungary, 1999. – P. 40.
11. Веденічева Н. П., Мусатенко Л. І. Участь цитокінінів у формуванні репродуктивних органів рослин з різним типом росту // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 3 (15). – С. 15–23.
12. Letham D. S. Cytokinins as phytohormones – sites of biosynthesis, translocation and function of translocated cytokinins // Cytokinins. Chemistry, Activity and Function / Eds. D. W. S. Mok, M. C. Mok. – Boca Raton: CRC Press, 1994. – P. 57–80.
13. Sakakibara H. Cytokinin biosynthesis and metabolism // Plant Hormones. Biosynthesis signal transduction, action. – Dordrecht: Kluwer, 2004. – P. 95–114.

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

Надійшло до редакції 01.10.2013

Е. А. Шейко, член-кореспондент НАН України Л. И. Мусатенко

Фитогормональный комплекс *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce (род. Orchidaceae Juss.) и его роль в разработке методов размножения *in vitro*

Исследованы составляющие фитогормонального комплекса *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce на разных этапах онтогенеза и разработаны подходы введения их в культуру *in vitro*. Показано, что в процессе онтогенеза происходят изменения содержания цитокининов, индолилуксусной и абсцизової кислот в вегетативных и генеративных органах *C. damasonium*, а также варьируют соотношения их свободных и связанных форм. При переходе к репродуктивному развитию в генеративных органах повышается содержание индолилуксусной кислоты и цитокининов, а в вегетативных — снижается. Впервые установлена взаимосвязь между интенсивностью каллусогенеза из эксплантов вегетативных и генеративных органов *C. damasonium* и содержанием и соотношением составляющих фитогормонального комплекса на определенных этапах онтогенеза, что необходимо учитывать при разработке методов микроклонального размножения.

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

Phytohormone complex of *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce (gen. Orchidaceae Juss.) and its role in the development of reproduction methods *in vitro*

The article deals with studies of the components of the Cephalanthera damasonium (Mill.) Druce phytohormonal complex at the various stages of ontogenesis and with the elaboration of approaches to its introduction into the culture in vitro. It has been shown that, during ontogenesis, the contents of cytokinin, IAA, and ABA in the organs of C. damasonium, change, and the ratio of active and bound phytohormone forms varies. During the transition to the reproductive development, the contents of IAA and cytokinins in the orchid generative organs increase, and those of the vegetative organs decrease. The interrelation of callusogenesis intensity of C. damasonium vegetative and generative organs explants and the content and the ratio of the phytohormonal complex components at the specified stages of ontogenesis is first found. This must be taken into account in the elaboration of methods of microclonal reproduction of this species.