

БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 577.17:581.143.6:633.34

^{1,2}О. О. АВКСЕНТЬЄВА, ¹М. С. ВАСИЛЬЧЕНКО, ¹А. В. ГАВРИЛЮК

¹Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна
майдан Свободи, 4, Харків, 61022

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 60, Київ, 01033

АКТИВНІСТЬ ТА ВМІСТ ФІТОГОРМОНІВ-АНТАГОНІСТІВ У ПЕРВИННИХ КАЛЮСАХ ІЗОГЕННИХ ЛІНІЙ СОЇ З КОНТРАСТНОЮ ФОТОПЕРІОДИЧНОЮ РЕАКЦІЄЮ

У роботі представлено результати дослідження вмісту та активності фітогормонів – антагоністів ІОК та АБК в первинних калюсах ізогенних за генами *E*-серії ліній сої *Glycine max* (L.) Merr, які різняться за ступенем фотоперіодичної реакції. Виявлено, що на процес первинного калюсогенезу впливає рівень активності та вмісту рістконтролюючих фітогормонів ІОК та АБК. Показник відношення ІОК/АБК, який відображає фітогормональний баланс, корелює із частотою калюсогенезу та залежить від генотипу і фотоперіодичної реакції ізоляції.

Ключові слова: *Glycine max* (L.) Merr., *E*-гени, ізогенні лінії, фотоперіодична реакція, фітогормональний статус, калюсна культура

Вступ. Фітогормональний комплекс у рослинному організмі є однією з найважливіших регуляторних систем, яка детермінує процеси росту, проліферації, метаболізму, перебіг індивідуального розвитку рослинного організму тощо [3,16]. Згідно з концепцією множинного гормонального контролю в рослинному організмі існує складна система взаємодії між окремими фітогормонами (ФГ) – фітогормональний баланс (статус). Контроль росту і розвитку обумовлений одночасною взаємодією різних фітогормонів – синергічною або антагоністичною, а не дією одного фітогормону. Крім того, один гормон може впливати на процеси сигналіngu, біосинтезу, транспорту, метаболізму інших фітогормонів [3, 12].

Калюсоутворення – це процес дедиференціації та активної проліферації і росту дедиференційованих клітин [4]. Індукція процесу калюсогенезу контролюється фітогормональним складом живильного середовища. Відомо, що гормонами стимулюючими калюсоутворення є ауксини та цитокініни. Концентрація та співвідношення ФГ є одним з найвагоміших екзогенних факторів індукції калюсогенезу [3, 4]. Експлант рослини-донора та новоутворена калюсна тканина також здатні продукувати ендогенні фітогормони. Співвідношення між екзогенними та ендогенними гормонами можуть стати вирішальними умовами ефективності калюсогенезу.

Серед ендогенних факторів, детермінуючих калюсогенез, також вагомими є генетичні, тобто генотип вихідної рослини. Система генів *E*-серії у сої культурної (*Glycine max* (L.) Merr.) детермінує темпи розвитку та фотоперіодичну реакцію рослин *in vivo* [9, 10]. Вплив цих генів на ріст і розвиток продовжує активно досліджуватися у даний час, оскільки отримання знань у цій галузі необхідно для селекційної роботи щодо вдосконалення сортів сої з використанням методів *in vitro* [13, 14]. Зручною і широко визнаною моделлю для таких досліджень є майже

ізогенні лінії сої (NILs – near isogenic lines), створені на основі сорту Clark, які відрізняються між собою лише станом окремих локусів генів *EE*. Оскільки гени *E*-серії визначають хід онтогенезу, продуктивність на рівні цілісного організму *in vivo* [15], можна припустити опосередковану участь цієї генетичної системи у процесах первинного калюсогенезу *in vitro* через зміни у фітогормональному балансі.

Метою цієї роботи було вивчення активності та вмісту основних гормонів, регулюючих процеси росту – ауксинів та АБК, у первинних калюсах ізогенних ліній сої (NILs), що відрізняються за фотоперіодичною реакцією.

Матеріал і методи досліджень

Матеріалом дослідження служили п'ять генотипів сої, які різняться за станом локусів генів *E*-серії та фотоперіодичною реакцією: чотири NILs – L 63-3016, L 65-3366, L 71-920, L 94-1110 та сорт Clark, у генофоні якого створені ізолінії. За одержаними нами раніше даними сорт Clark та лінії L 63-3016, L 65-3366 – короткоденні, а лінії L 71-920, L 94-1110 – фотоперіодично нейтральні [1]. Введення в культуру *in vitro* здійснювали через стадію асептичних проростків, які вирощували на середовищі Шенка-Хільдербранта без стимуляторів росту протягом 5 – 7 діб в окремих пробірках на світлі за освітлення 1,5 кЛк при температурі 26 °С. Для отримання первинного калюсу, експланти – сегменти асептичних сім'ядольних листків розміром 5 × 10 мм пасивували на середовище Мурасіге і Скуга, що містило 10 мг/л стимулятора росту – 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) у чашки Петрі та інкубували при температурі +26 °С у темряві протягом 28 діб.

Фітогормони екстрагували з фіксованого рослинного матеріалу, відтак проводили очистку та хроматографічне розділення суміші гормонів методом тонкошарової хроматографії, використовуючи силікагелеві пластинки (Silica gel 60 UV254) із алюміневою підложкою фірми «Merck Chemicals» (Німеччина) [5]. Гормони ідентифікували за свідками-стандартами, опромінюючи хроматограми УФ (254 нм). Активність ФГ визначали біотестуванням: ІОК – за приростом колеоптелів пшениці, АБК – за інгібуванням проростання насіння гірчиці. Активність ФГ виражали у відсотках приросту або інгібування біотесту до контролю. Вміст фітогормонів розраховували за рістконцентраційними кривими, які були побудовані з використанням стандартів ІОК (Синбіас, Китай-Україна) та АБК (Sigma-Aldrich, США). Проведено три біологічні серії експериментів з трикратною аналітичною повторністю. Отримані результати оброблені статистично за використання ліцензійного пакету програм Excel 2010. У таблицях наведені середні значення та їх стандартні похибки.

Результати досліджень та їх обговорення

Результати дослідження первинного калюсогенезу (табл. 1) в ізогенних ліній сої з контрастною фотоперіодичною реакцією показали, що всі досліджувані генотипи здатні формувати калюс на живильному середовищі з додаванням синтетичного регулятора ауксинової природи 2,4 Д дуже швидко. Різниця в частоті калюсоутворення між ізолініями спостерігається лише у перший тиждень культивування. У наших попередніх дослідженнях [1] показано, що протягом 4-7 діб культивування генотипи з короткоденною фотоперіодичною реакцією характеризувалися вищими показниками частоти калюсогенезу у порівнянні з фотоперіодично нейтральними ізолініями.

Таблиця 1

Частота калюсогенезу NILs сої культурної залежно від генотипу та фотоперіодичної реакції

Ізолінія	Генотип	Фотоперіодична реакція	Частота калюсогенезу, %
Clark*	e1E2E3E4e5E7	КДР**	47,21 ± 1,50
L 63-3016	e1E2E3e4e5E7	КДР	53,83 ± 2,42
L 65-3366	E1E2E3E4e5E7	КДР	56,34 ± 2,37
L 71-920	e1e2e3E4e5E7	ФПН**	45,09 ± 1,57
L 94-1110	e1e2E3E4E5E7	ФПН	39,65 ± 0,94

* – сорт, у генофоні якого створені ізолінії

** – фотоперіодична реакція: КДР – короткоденна, ФПН – нейтральна

Але подальше культивування протягом 4 тижнів призводило до нівелювання цієї різниці між генотипами і всі ізоляції формували первинний калюс зі 100%-ною ефективністю. За морфологічними ознаками калюсні тканини представляли собою компактні, оводнені, жовтуваті, швидко ростучі калюси.

Результати визначення активності фітогормонів-антагоністів у 28-добових первинних калюсах ізогенних ліній сої (табл. 2) показали, що активність ІОК у них вища за активність гормона-антагоніста АБК у всіх ізоляціях незалежно від їх фотоперіодичної реакції. Максимальна активність ІОК виявлена у сорту Clark з короткоденною реакцією, а мінімальна – у ізоляції L 94-1110 з фотоперіодично нейтральною реакцією. ІОК в культурі *in vitro* стимулює процес калюсоутворення, а саме, індукує дедиференціювання клітин експланта та активує ріст «розтягненням» калюсних клітин [4,17]. Оскільки живильне середовище не містить нативних ауксинів, можна припустити, що саме ендогенні ауксини, які синтезуються первинними калюсними тканинами, визначають їх рівень активності. Саме вищий рівень активності ауксинів у короткоденних ізоляціях зумовлюють швидші темпи калюсоутворення цих ізоляцій. Активність АБК в калюсах нижча, ніж ауксинів у всіх досліджуваних NILs. Причому, зв'язку між фотоперіодичною реакцією ізоляції та активністю АБК не виявлено.

Таблиця 2

Активність фітогормонів-антагоністів у первинних калюсах NILs сої культурної, %

Ізоляція	Генотип	Активність, %		
		ІОК	АБК	ІОК/АБК
Clark*	e1E2E3 E4e5E7	125,06 ± 4,73	75,23 ± 3,61	1,67
L 63-3016	e1E2E3 e4e5E7	97,09 ± 3,67	62,38 ± 2,98	1,56
L 65-3366	E1E2E3 E4e5E7	119,75 ± 5,02	68,54 ± 3,01	1,75
L 71-920	e1e2e3 E4e5E7	93,45 ± 3,21	60,82 ± 2,41	1,55
L 94-1110	e1e2E3 E4E5E7	57,64 ± 2,14	70,35 ± 3,22	0,81

* – сорт, у генофоні якого створені ізоляції

Як відомо, АБК є гормоном антагоністом ІОК щодо регулювання процесів росту за умов *in vivo* [2,11]. Однак, за умов *in vitro* при формуванні калюсних тканин показано зростання рівня цього гормону та його синергічну дію стосовно ауксинів у формуванні первинного калюсу [7]. У наших дослідженнях встановлено досить низьку активність АБК при формуванні обводненого, швидко ростучого, неморфогенного калюсу. Оскільки в рослинному організмі діє єдиний фітогормональний комплекс, то важливий не стільки вміст того чи іншого ФГ, а саме співвідношення гормонів для здійснення регуляції процесів росту і розвитку [11, 12, 17]. Тому, ми розраховували відношення вмісту рістстимулюючих гормонів до рістінгібуючих. Виявлено, що ізоляції з короткоденною фотоперіодичною реакцією, які характеризуються інтенсивнішим калюсогенезом, мають вищий показник ІОК/АБК, у порівнянні з фотоперіодично нейтральними ізоляціями.

Таблиця 3

Вміст фітогормонів-антагоністів у первинних калюсах NILs сої культурної, мкг/г сирової речовини

Ізоляція	Генотип	Вміст ФГ		
		ІОК, мкг/г	АБК, нг/г	ІОК/АБК×10 ³
Clark*	e1E2E3E4e5E7	59,09 ± 1,87	24,17 ± 0,73	2,45
L 63-3016	e1E2E3e4e5E7	45,78 ± 1,63	19,84 ± 0,65	2,31
L 65-3366	E1E2E3E4e5E7	56,17 ± 2,04	21,76 ± 0,82	2,58
L 71-920	e1e2e3E4e5E7	43,39 ± 1,84	19,21 ± 0,59	2,26
L 94-1110	e1e2E3E4E5E7	26,90 ± 0,75	22,40 ± 0,56	1,20

* – сорт, у генофоні якого створені ізоляції

Результати дослідження вмісту гормонів-антагоністів у первинних калюсах (табл. 3) показали, що вміст ІОК значно перевищує вміст ристінгібуючого гормону АБК. Швидкозростаюча, сильнооводнена, неморфогенна калюсна тканина характеризується інтенсивним ростом клітин як за рахунок інтенсивної проліферації, так і за рахунок специфічної форми росту рослинної клітини – «росту розтягненням», який детермінується фізіологічною дією ІОК [4]. Встановлено, що максимальним вмістом ІОК характеризуються калюси сорту Clark та ізогених ліній L 63-3016, L 65-3366, які проявляють короткоденну фотоперіодичну реакцію.

Ізолінії з фотоперіодично нейтральною реакцією характеризуються меншим вмістом ІОК у калюсах. За вмістом АБК досліджувані ізолінії між собою суттєво не відрізняються, за виключенням сорту Clark, який має максимальний вміст як ІОК, так і АБК. За літературними відомостями індукція первинного калюсогенезу супроводжується істотним зростанням вмісту всіх класів фітогормонів, порівняно з їхнім вмістом в експланті [6], але за формування морфогенного калюсу та індукції ембріодогенезу вміст АБК значно зменшується [7, 8]. У наших дослідках показано, що в процесі первинного калюсогенезу в ізолінії сої значно зростає вміст та активність ІОК та спостерігається високий вміст АБК з дуже низькою активністю цього гормону. Показник фітогормонального балансу ІОК/АБК за вмістом гормонів-антагоністів чітко корелює з фотоперіодичною реакцією: КДР ізолінії характеризуються вищими значеннями в порівнянні з фотоперіодично нейтральними генотипами. Одержані результати дозволяють припустити, що гени *E*-серії можуть бути задіяними у контролі калюсогенезу опосередковано, через детермінацію ними фітогормонального балансу.

Висновки

Отже, встановлено, що активність ІОК у первинних калюсах ізогених ліній сої вища за активність гормону антагоніста – АБК. Показано, що вміст ристстимулюючих ФГ значно перевищує вміст ристінгібуючого в швидко ростучих, оводнених, неморфогенних калюсах усіх досліджуваних ізогених ліній. Відношення ІОК/АБК відображає фітогормональний баланс первинних калюсних тканин та корелює із частотою калюсогенезу і залежить від генотипу та фотоперіодичної реакції ізолінії. NILs з короткоденною фотоперіодичною реакцією характеризуються інтенсивнішим калюсогенезом і високим показником ІОК/АБК в порівнянні з фотоперіодично нейтральними ізолініями.

Подяка

Автори висловлюють подяку Національному Центру генетичних ресурсів рослин України за допомогу в отриманні ізогених за *E*-генами ліній *Glycine max* (L.) Merr. з колекції Міністерства сільського господарства США (Agricultural Research Service).

1. Васильченко М. С. Фотопериодическая реакция и каллусогенез изогенных по E-генам линий сои культурной / М.С. Васильченко, О.А. Авксентьева, В.В. Жмурко // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія Біологія. — 2014. — № 1129. — С. 44—52.
2. Кефели В. И. Природный ингибитор роста – абсцизовая кислота / В.И. Кефели. — М. : Наука, 1989. — 184 с.
3. Медведев С. С. Биология развития растений. Начала биологии развития растений. Фитогормоны: Учебник / С.С. Медведев, Е.И. Шарова. — СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2011. — 253 с.
4. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин: Підручник / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. — К.: Поліграфконсалтинг, 2003. — 315 с.
5. Савинский С. В. Определение содержания зеатина, индолил-3-уксусной и абсцизовой кислот в одной растительной пробе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / С.В. Савинский, И.В. Драговоз, В.К. Педченко // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1991. — 23, № 6. — С. 611—618.
6. Третьякова И. Н. Содержание фитогормонов в микростробилах и андроклином каллусе in vitro у листовницы сибирской / И. Н. Третьякова, А. С. Иваницкая, А. Н. Иванова, Барсукова А. В. // Физиология растений. — 2009. — № 5. — С. 14—27.
7. Хмара К. А. Динамика содержания фитогормонов в каллусной ткани при индукции каллусогенеза in vitro зародышей *Picea abies* [L.] Karst. / К. А. Хмара // Труды Карельского научного центра РАН. — 2011. — № 3. — С. 131—136.

8. Чжань К. Г. Содержание гормонов в каллусах *Scutellaria baicalensis*, индуцированных тидиазуроном / [К.Г. Чжань, В. Ли, И.Ф. Мао та ін.] // Физиология растений. — 2005. — Т. 52. № 3. — С.392—398.
9. Cober E. R. Both promoters and inhibitors affected flowering time in grafted soybean flowering-time isolines / E.R. Cober, D. Curtis // Crop Sci. — 2003. — Vol. 43 — P. 886—891.
10. Cober E. R. A new locus for early maturity in soybean / E.R. Cober, S.J. Molna., M. Charette, H.D. Voldeng // Crop Sci. — 2010. — № 50. — P. 524—525.
11. Finkelstein Ruth. Abscisic Acid Synthesis and Response / Ruth Finkelstein // The Arabidopsis Book. — 2013. [Электронный ресурс] / Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3833>
12. Gaspar T. Changing concepts in plant hormone action / T. Gaspar, C. Kevers, O. Faivre-Rampant, M. Cre`vecoeur, Cl. Penel, H. Greppin and J. Dommes // In Vitro Cell Dev Biol Plant. — 2003. — № 39. — P. 85—106.
13. Mangena P. In vitro multiple shoot induction in soybean / P. Mangena, P.W. Mokwala and R.V. Nikolova // Int. J. Agric. Biol. — 2015. — Vol. 17, № 4. — P. 838—842.
14. Phat P. Optimization of soybean (*Glycine max* L.) regeneration for Korean cultivars / P. Phat, S. Rehman, H. Jung, H. Ju // Pak. J. Bot. — 2015. — № 47(6). — P. 2379—2385.
15. Tasma I. M. Mapping flowering time gene homologs in soybean and their association with maturity (E) loci / I.M. Tasma, R.C. Shoemaker // Crop Sci. — 2003. — Vol. 43. — P. 319—328.
16. Wong Ch. E. Floral Initiation Process at the Soybean Shoot Apical Meristem May Involve Multiple Hormonal Pathways / Ch.E. Wong, M.B. Singh, P.L. Bhalla // Plant Signal Behav. — 2009. — 4(7). — P. 648—651.
17. Zhao Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development / Y. Zhao // Annu. Rev. Plant Biol. — 2010. — № 61. — P. 49—64.

О. А. Авксентьева, М. С. Васильченко, А. В. Гаврилюк
Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ФИТОГОРМОНОВ-АНТАГОНИСТОВ В ПЕРВИЧНЫХ КАЛЛУСАХ ИЗОГЕННЫХ ЛИНИЙ СОИ С КОНТРАСТНОЙ ФОТОПЕРИОДИЧЕСКОЙ РЕАКЦИЕЙ

В работе представлены результаты исследования содержания и активности фитогормонов – антагонистов ИУК и АБК в первичных каллусах изогенных по генам *E*-серии линий сои *Glycine max* (L.) Merr., которые различаются по степени фотопериодической реакции. Выявлено, что на процесс первичного каллусогенеза влияет уровень активности и содержания ростконтролирующих фитогормонов ИУК и АБК. Показатель отношения ИУК/АБК, который отражает фитогормональный баланс, коррелирует с частотой каллусогенеза и зависит от генотипа и фотопериодической реакции изолинии.

Ключевые слова: *Glycine max* (L.) Merr., *E*-гены, изогенные линии, фотопериодическая реакция, фитогормональный статус, каллусная культура

О. А. Avksentyeva, M. S. Vasylychenko, A. V. Havrylyuk
V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

ACTIVITY AND CONTENT PHYTOHORMONES -ANTAGONIST IN PRIMARY CALLUS OF NILs SOYBEAN WITH CONTRASTY PHOTOPERIODIC REACTION

Aim. The aim of work was to study the activity and content of main phytohormones that regulate auxin and ABA growth in primary callus isogenic lines of soybean *Glycine max* (L.) Merr. (NILs), differing in photoperiodic response. Five NILs genotypes, which differ on loci *E*-genes and photoperiodic response were the material of the study. **Methods.** In the paper, there were used standard biotechnological methods for getting primary callus culture, thin layer chromatography (TLC) methods for distribution and determination of phytohormones (IAA and ABA) and biotesting methods for research activity phytohormones. **Results.** The results of the study of frequency primary callusogenesis in soybean isogenic lines with contrasting photoperiodic response showed the difference in frequency callusogenesis between isolines is observed only during 4-7 days in the first week of cultivation. By morphological features, callus tissue was a compact, watered, yellowish,

rapidly growing callus. Determination of activity phytohormones-antagonists in primary callus NILs soybean showed that the activity of IAA was higher than the activity of the hormone-antagonist ABA in all isolines regardless of their photoperiodic response. Maximum activity IAA was found in line Clark with shortday reaction, and the minimum - in the isolate L 94-1110 with photoperiodic neutral reaction. As the culture medium doesn't contain native auxins we can assume that endogenous auxin, which is synthesized by primary callus tissues, determines their level of activity. It is a higher level of activity of auxin in shortday isolines, determines their faster rate of the callusogenesis. ABA activity in the callus is slightly lower than auxin in all investigated NILs. Though the connection between photoperiodic response isolines and ABA activity was not found. The results of the study of hormones antagonistic content in primary callus showed that the IAA content far exceeds ABA growth inhibition hormone. Growing, watered, not morphogenic callus characterized by intense growth callus cells both by intense proliferation, and by the expense a specific form of plant cell growth - "Growth stretching," which is determined by IAA physiological effect. It is established, those callus varieties Clark and isolines L 63-3016, L 65-3366, which show shortday photoperiodic response, are characterized by the maximum content of IAA. Isolines with photoperiodic neutral reaction are characterized by lower content IAA in callus. By the content of ABA investigated isolines don't differ significantly, with the exception of Clark, which has a maximum content of both IAA and ABA. The phytohormonal balance indicator of IAA / ABA content for hormone-antagonists is clearly correlated with the photoperiodic response: SD isolines are characterized by higher value comparing to photoperiodic neutral genotypes. The results suggest that E-series genes can be involved in the callusogenesis control indirectly through their phytohormonal balance determination. **Conclusions.** Thus, in the course of the studies, we found that IAA activity in primary callus of isogenic soybean lines is higher than the active hormone antagonist - ABA. It is shown that growth stimulation phytohormon content is significantly higher than growth inhibition content in the rapidly growing, watered, not morphogenic callus of all investigated isogenic lines. The ratio of IAA / ABA reflects the phytohormonal balance in primary callus tissues and correlates with the frequency callusogenesis, depending on genotype and photoperiodic response isolate. NILs with a shortday photoperiodic response is characterized by more intense callusogenesis and high rate of IAA / ABA comparing to photoperiodic neutral isolines.

Key words: Glycine max (L.) Merr., E-genes, NILs, photoperiodic response, phytohormonal status, callus

Рекомендує до друку

Надійшла 27.01.2017

Н. М. Дробик

УДК 579.695

О. Г. ГОРШКОВА, Т. В. ГУДЗЕНКО, О. В. ВОЛЮВАЧ

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМУ *PSEUDOMONAS* *SERPACIA* ONU-327 – ДЕСТРУКТОРА ФЕНОЛЬНИХ І ВАЖКО ОКИСНЮВАЛЬНИХ СПОЛУК

Експериментально встановлено, що відібраний із забрудненого ґрунтового середовища біохімічно активний непатогенний штам мікроорганізму – ідентифікований як *Pseudomonas serpacia* ONU-327, здатен переносити “залпові навантаження” іонів важких металів. Виявлена висока сорбційно-акумуляуюча здатність штаму *P. serpacia* ONU-327 у складі біофлокул щодо