

КАЦАН В. А.<sup>1✉</sup>, ПОТОПАЛЬСЬКИЙ А. І.<sup>1,2</sup>, ЗАДОРЖНИЙ Б. О.<sup>1</sup><sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Заболотного, 150, ORCID: 0000-0002-9972-4353

<sup>2</sup> Інститут оздоровлення і відродження народів України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Заболотного, 150

✉ val.katsan@gmail.com

**ВПЛИВ ІЗАТИЗОНУ НА РОЗВИТОК ТА РІСТ ПАРОСТКІВ  
У *KALANCHOE DAIGREMONTIANA* (RAIM.-HAMET & PERRIER) A. BERGER**

**Мета.** Виявлення можливого впливу Ізатизону на процеси адаптаційного морфогенезу в рослин. Як модель було обрано каланхое Дегремона. **Методи.** Для вирощування рослин використано паростки одного віку, отримані з листків однієї рослини; рослини вирощували методом ґрунтової культури в окремих горщиках. Для дослідження впливу концентрації Ізатизону на появу рослин та розвиток їх 1-ої, 2-ої та 3-ої пари листків, а також ріст корінців використано зрілі листки із середнього ярусу рослин. Для Ізатизону були використані 5 варіантів розведення з метою отримання широкого діапазону концентрацій. **Результати.** На 5-у добу експозиції листків каланхое у водних суспензіях Із виявлено статистично достовірне ( $P < 0,05$ ) збільшення кількості ініційованих рослин на листок у варіанті з найбільшим розведенням Із. За середнього та високих розведень на 10-у добу спостерігали достовірне прискорення появи 2-ої пари листків ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ). Появу 3-ї пари листків у рослин дослідних варіантів спостерігали на 11 та 17 діб раніше, ніж у контролі, для найвищих розведень відповідно ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,001$ ). **Висновки.** Виявлено здатність Ізатизону стимулювати ініціацію рослин по периметру листків каланхое Дегремона та прискорювати процеси їх диференціації та росту залежно від концентрації препарату.

**Ключові слова:** Ізатизон, каланхое Дегремона, розвиток та ріст паростків.

Утворення рослин по периметру листків у каланхое Дегремона є еволюційним пристосуванням для рослин-сукулентів, відбувається завдяки поєднанню ембріогенезу та органогенезу, має конститутивний характер; здатність утворювати життєздатні зиготні ембріони та життєздатне насіння при цьому утрачена. Розвиток таких рослин контролюється ключовими регуляторами

органогенезу в рослин – *STM* та ембріогенезу – *LEC1* та *FUS3*, які належать до класу *KNOX1* гомеобоксних генів [1]. Утрата здатності утворювати життєздатне насіння в каланхое зумовлена делецією в С-кінці В-домену *LEC1* довжиною в 20 п. н. та появою передчасного стоп-кодону – зиготні ембріони при цьому не завершують розвитку, не входять у стан спокою – вони нестійкі до висушування, тому таке насіння нежиттєздатне.

Притаманний каланхое Дегремона профіль експресії *KdSTM* зумовлює підтримку пулу недиференційованих клітин в особливих ділянках по периметру листків – у заглибленнях зубчиків [1], а змінений внаслідок делеції *LEC1* є одним із ключових регуляторів розвитку рослин із соматичних ембріонів [2]. Про наявність ембріоноподібної програми як етапу розвитку таких рослин свідчать високі рівні експресії *KdLEC1* та *KdFUS3* [1]. Модуляція морфогенезу рослин у каланхое стосовно змін у довкіллі (фотоперіод, наявність вологи) та в пулі ендогенних гормонів відбувається за участю гена фактора транскрипції *KdSOC1*, який пов'язаний із накопиченням та розподілом ауксину по периметру листків, важливий для переходу від вегетативного розвитку до нестатевого розмноження, притаманного каланхое, та належить до *MADS*-боксу [3, 4]. Отже, завдяки здатності утворювати нестатевим шляхом значну кількість рослин, що є важливим адаптаційним надбанням для виживання в посушливих умовах, та відомим генетичним системам регуляції цього явища, каланхое Дегремона є зручною моделлю для дослідження впливу біологічно активних речовин на можливі адаптаційні перебудови процесів морфогенезу в рослин.

Раніше нашими дослідженнями була підтверджена здатність розробленого в нашій лабораторії Ізатизону (автори А. І. Потопальський,

© КАЦАН В. А., ПОТОПАЛЬСЬКИЙ А. І., ЗАДОРЖНИЙ Б. О.

Л. В. Лозюк) впливати на важливі для виживання в зміненому середовищі кількісні ознаки, швидкість росту та зернову продуктивність злаків, а також можливість збереження індукованих корисних ознак у наступних поколіннях після обробки [5, 6], що є свідченням доцільності досліджень Ізатізону як важливого адаптогена, який може мати перспективи для підвищення життєздатності рослин та їхньої продуктивності за дії комплексу стресорів. Заслуговує на увагу, що крім діючого начала препарату, N-метил ізатин β-тіосемікарбазону, розчинники ДМСО та ПЕГ 400 також є біологічно активними речовинами [7–11].

Тому мета нашого дослідження – виявлення можливого впливу Ізатізону на процеси адаптаційного морфогенезу в рослин на прикладі лікарського виду каланхое Дегремона.

### Матеріали і методи

Дослідження проведено в лабораторних умовах. Для вирощування рослин використано паростки одного віку, отримані з листків однієї рослини. Рослини вирощували методом ґрунтової культури в окремих горщиках. Для дослідження впливу концентрації Ізатізону на появу та ріст елементів диференціації в паростків (1-ий листок, 1-а, 2-а та 3-я пара листків, а також ріст корінців) використано зрілі листки із середнього ярусу рослин. Зрізані листки промивали водою,

прибирали рештки вологи фільтрувальним папером та поміщали в чашки Петрі на фільтрувальний папір, змочений досліджуваними розчинами. Для Ізатізону були використані 5 варіантів розведення (які у зв'язку з тим, що за отриманими даними готується патент на винахід не оголошуються), позначені цифрами і зазначені як найменше розведення (2), середнє (3) та найвищі розведення (4–6) при  $n=5$  для кожної з обраних концентрацій препарату (варіанту досліду). При появі елементів диференціації вели їх ретельний облік та фотографували; кожне з досліджень тривало не менше ніж 1,5 місяці.

### Результати та обговорення

1. Вплив Ізатізону на ініціацію паростків та появу першої пари листків.

Ініціація рослин по периметру листків каланхое проявлялася як поява першого листка на 4-у добу досліду в контрольному варіанті (1) та в більшості варіантів досліду (3-6), крім варіанту 2, де розведення Із було найменшим (рис. 1, крива 1). На 5-у добу експозиції листків каланхое у водних суспензіях Із виявлено статистично достовірне ( $P<0,05$ ) збільшення кількості ініційованих рослин на листок у варіанті з найбільшим розведенням Із (рис. 1, крива 2). Середнє значення кількості ініційованих рослин на листок у варіанті 6 перевищувало рівень контролю в 4 рази.

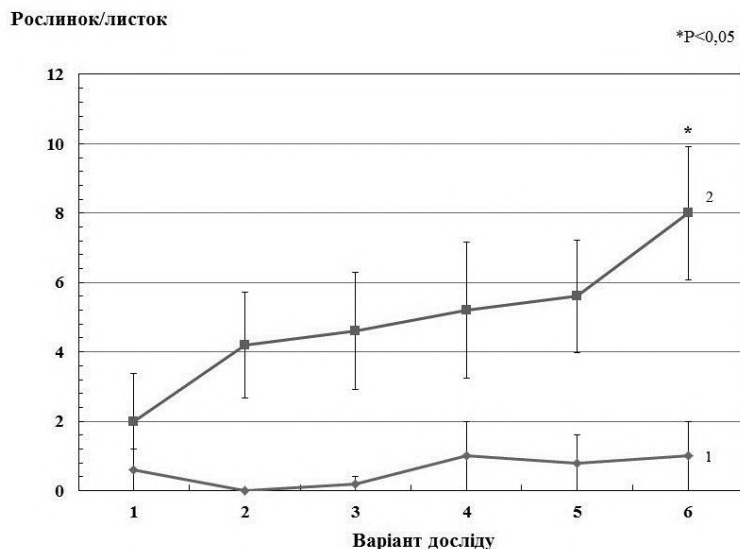


Рис. 1. Вплив Ізатізону на появу першого листка паростка каланхое. По осі X цифрами 1-6 позначено варіанти досліду, де 1 – контроль; 2–6 – розведення Ізатізону від найменшого до найвищого значення. Позначення кривих: 1 – на 4-у добу експонування в розчині Ізатізону, 5 – на 5-у добу. В кожному з варіантів 1–6 досліджено по 5 листків каланхое.

Початок появи рослин із повною 1-ю парою листків спостерігали на 6-й день досліду (рис. 2). Статистично достовірних відмінностей середнього значення кількості рослин з уже сформованою першою парою листків на листок каланхое протягом дослідженого періоду не було виявлено, за винятком варіанту 4, для якого було притаманне зменшення середньої кількості таких рослин: у період з 12-ї по 24-у добу та при завершенні досліду (47-а доба). На 7-му добу спостерігали тенденцію до збільшення кількості рослин, які вже мали обидва листки першої пари, у варіанті 6.

Отже, отримані результати досліджень є свідченням здатності Із за значних розведень прискорювати ініціацію рослин на листках каланхое. Препарат прискорював саме ініціацію, слугував тригером процесу диференціації, тому що надалі статистичних відмінностей щодо кількості рослин зі сформованою першою парою листків на листок каланхое порівняно з контрольними рослинами, не спостерігали.

2. Особливості розвитку другої пари листків під впливом Ізатізону.

Значні відмінності було виявлено щодо початку появи 2-ї пари листків під впливом Із за середнього та високих його розведень (рис. 3, 10-а

доба експозиції). Статистично достовірне перевищення рівня контролю зберігалось також на 12-у добу експозиції для варіанту досліду 5.

3. Розвиток третьої пари листків у паростків каланхое за дії Ізатізону.

Особливо заслуговує на увагу статистично достовірні і набагато раніша, ніж у контролі, поява 3-ї пари листків у рослин за високих розведень (варіанти 4, 6) – на 18-у та 24-у добу, у той час, як ініціація 3-ї пари листків у контролі відбувалася значно пізніше, лише на 35-у добу; при цьому кількість паростків, які вже мали 3 пари листків, у варіантах 4, 6 статистично достовірно перевищувала контроль (рис. 4). Тенденцію до ранішої появи 3-ї пари листків спостерігали також для середнього розведення (варіант 3) на 31-у добу експозиції; за найменшого розведення Із (варіант 2) рослини з 3-ю парою листків з'являлися на 31-у добу, але вірогідність такої ранішої появи, як і для варіанту 3 на 24-у добу, була дуже низькою.

При подальшому культивуванні були виявлені відмінності середнього значення кількості рослин з 3-ма парами листків на листок каланхое на 42-у добу (варіанти 4, 6;  $P < 0,01$  та  $P < 0,05$  відповідно).

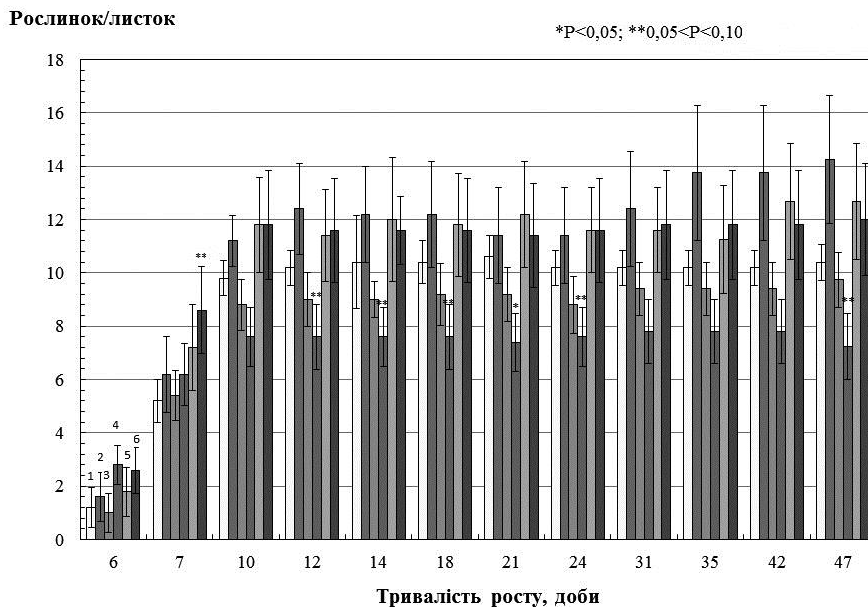


Рис. 2. Вплив Ізатізону на динаміку появи рослин з уже сформованою першою парою листків. Послідовність варіантів досліду для кожної доби росту: 1–6 (відлік починається ліворуч). Умовні позначення: 1 – контроль; 2–6 – розведення Ізатізону від найменшого до найвищого значення. Для досліджень в кожному з варіантів обрано по 5 листків каланхое ( $n=5$ ).

**Рослинок/листок**

\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*0,05<P<0,10

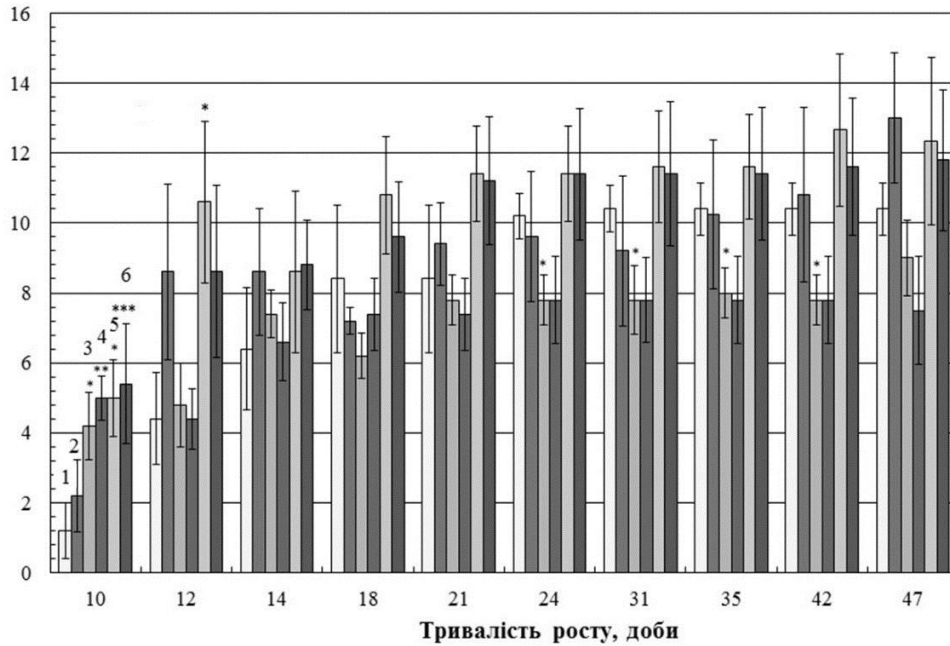


Рис. 3. Вплив Ізатізону на динаміку появи рослин з другою парою листків. Умовні позначення як для Рис. 2.

При завершенні досліджу збільшився розмах мінливості у межах варіантів, і тільки у варі-

анті 6 проявлялася тенденція до збільшення кількості рослин з 3-ма парами листків на листок каланхое (рис. 4).

**Рослинок/листок**

\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; \*\*\*\*0,05<P<0,10

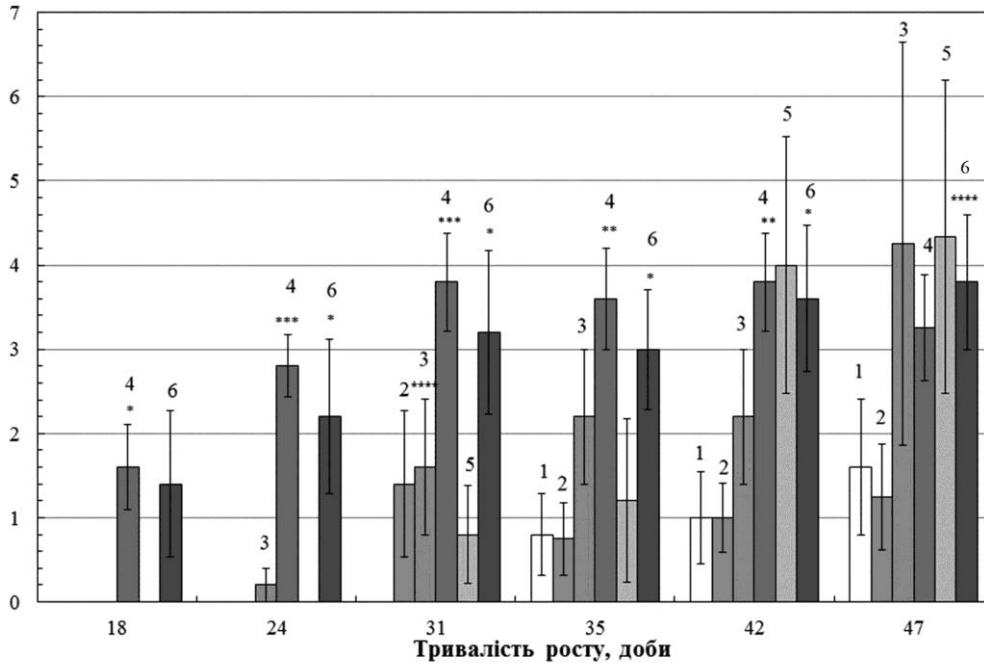


Рис. 4. Вплив Ізатізону на динаміку появи рослин з третьою парою листків. Умовні позначення як для Рис. 2.

4. Вплив Ізатізону на ріст паростків та їх коренів на листках каланхоє.

Крім стимуляції процесів диференціації у паростків каланхоє, Ізатізон за значних розведень стимулював також їх ріст. Такі відмінності росту спостерігали упродовж всього періоду, до 47-ї доби.

Для документування змін рослини фотографували на 14-у, 37-у, 42-у та 47-у доби росту. Уже на 14-у добу досліду у варіантах 4–6 спостерігали рослини, які були значно вищими від контрольних. У той же час у варіанті із середньою величиною розведення (3) суттєвих змін щодо росту рослин на 14-у добу не було виявлено, а за найменшого розведення Ізатізон пригнічував ріст паростків.

За високих розведень Ізатізону спостерігали також стимуляцію розвитку коренів. У варіанті із середньою величиною розведення (3) суттєвих змін щодо росту коренів у рослин не було виявлено, а за найменшого розведення Ізатізон пригнічував розвиток та ріст коренів.

Отримані результати можуть бути свідченням впливу Ізатізону на генетичні системи, відповідальні за перехід від вегетативного росту до притаманного каланхоє вегетативного розмноження. Можливий також вплив препарату на настання окремих етапів програми розвитку. Заслуговує на увагу, що більш ранню ініціацію рослин та закладку 1–3 пар листків стимулювали високі розведення Ізатізону. Це може бути зумовленим впливом біологічно активних речовин, які входять до складу Ізатізону [7–11], на системи регуляції цих процесів, які перебувають під контролем гомеотичних генів, відповідальних за проходження окремих етапів програми розвитку, також стосовно змін у довкіллі та наявності стресових факторів. У рослин дуже важливе значення для адаптаційних процесів мають фактори транскрипції HD-Zip класу, які кодуються гомеобоксними генами та контролюють ключові аспекти розвитку та відповіді на сигнали із довкілля [12–15]. Центральною ланкою модуляції метаболізму та фізіологічних процесів для всіх стадій розвитку рослин, настання старіння та тривалості

життя є TOR кіназний сигналінг, інтегратор сигнального каскаду від поживних речовин, джерел енергії, світла та регуляторів росту для подальшого динамічного перепрограмування транскрипції та змін метаболічних процесів, дуже важливий також для розвитку паростків каланхоє [16].

### Висновки

У результаті проведених досліджень виявлено здатність Ізатізону впливати на процеси диференціації та росту паростків у каланхоє Дегремона, особливо за значних розведень препарату.

Виявлено здатність Ізатізону за значних розведень прискорювати ініціацію рослин на листках каланхоє. Препарат прискорював саме ініціацію, слугував тригером процесу диференціації, і за найбільшого його розведення на 5-у добу досліду значення кількості ініційованих рослин на листок каланхоє статистично достовірно перевищувало рівень контролю в 4 рази.

Спостерігали також значні статистично достовірні відмінності щодо початку появи 2-ї пари листків (10-а доба експозиції) під впливом Із за середнього та високих його розведень.

Особливо заслуговує на увагу набагато раниша, ніж у контролі, статистично достовірна поява 3-ї пари листків у рослин дослідних варіантів зі значними розведеннями Із: на 18-у та 24-у доби (варіанти 4, 6). У той же час, ініціація 3-ї пари листків у контролі відбувалася значно пізніше, на 35-у добу. За середнього розведення Із (варіант 3) на 31-у добу спостерігали тенденцію до ранішої появи 3-ї пари листків, а поява 3-ї пари листків на 31-у добу за найменшого розведення Із (варіант 2) та для середнього розведення (варіант 3) на 24-у добу виявилася малоймовірною.

Отримані результати досліджень є свідченням здатності Із прискорювати процеси ініціації паростків на листках каланхоє Дегремона та їх диференціацію, особливо за значних його розведень.

Виявлена також здатність Ізатізону прискорювати ріст паростків каланхоє та їх коренів, також значною мірою за високих розведень.

### References

1. Garcês H. M. P., Champagne C. E. M., Townsley B. T., Park S., Malho' R., Pedroso M. C., Harada J. J., Sinha N. R. Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoe*. *PNAS*. 2007. Vol. 104 (39). P. 15578–15583. doi: 10.1073/pnas.0704105104.
2. Garcês H. M. P., Koenig D., Townsley B. T., Kim M., Sinha N. R. Truncation of LEAFY COTYLEDON1 Protein Is Required for Asexual Reproduction in *Kalanchoe daigremontiana*. *Plant Physiology*. 2014 Vol. 165 (1). P. 196–206. doi: 10.1104/pp.114.237222.

3. Liu C., Zhu C., Zeng H. M. Key KdSOC1 gene expression profiles during plantlet morphogenesis under hormone, photoperiod, and drought treatments. *Genetics and Molecular Research*. 2016. Vol. 15 (1). gmr.15017579. doi: 10.4238/gmr.15017579.
4. Chen Zhu, Li Wang, Jinhua Chen, Chenglan Liu, Huiming Zeng, Huafang Wang. Over-expression of *KdSOC1* gene affected plantlet morphogenesis in *Kalanchoe daigremontiana*. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7 (1). 5629. doi: 10.1038/s41598-017-04387-0.
5. Katsan V. A., Yurkevich L. N., Potopalsky A. I. Izatison and nanosilver are able to induce the changes in growth and productivity of oat plant cultivar Nezlamny persisting in the next generations. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2015. Vol. 16. P. 114–119. [in Ukrainian]
6. Katsan V. A., Yurkevich L. N., Potopalsky A. I. Influence of Izatison and Nanosilver on the content of the photosynthetic pigments in the oat Nezlamny over two generations after treatment. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2016. Vol. 19. P. 133–138. [in Ukrainian]
7. Su L.-C., Deng B., Liu S., Li L.-M., Hu B., Zhong Y.-T., Li L. Isolation and characterization of an osmotic stress and ABA induced histone deacetylase in *Arachis hyogaea*. *Front Plant Sci*. 2015. Vol. 6. P. 512. doi: 10.3389/fpls.2015.00512.
8. Uzilday B., Turkan I., Ozgur R., Sekmen A. H. Strategies of ROS regulation and antioxidant defence during transition from C<sub>3</sub> to C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus *Flaveria* under PEG-induced osmotic stress. *J. Plant Physiol*. 2014. Vol. 171 (1). P. 65–75. doi: 10.1016/j.jplph.2013.06.016.
9. Tuncer S., Gurbanov R., Sheraj I., Solel I., Esenturk O., Banerjee S. Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes. *Scientific Reports*. 2018. Vol 8. 14828. doi: 10.1038/s41598-018-33234-z.
10. Mannan A., Liu S., Aesenault P. R., Towler M. J., Vail D. R., Lorence A. Weathers P. J. DMSO triggers the generation of ROS leading to an increase in artemisin and dihydroartemisinic acid in *Artemisia annua* shoot cultures. *Plant Cell Rep*. 2010. Vol. 29 (2). P. 143–152. doi: 10.1007/s00299-009-0807-y.
11. Hieu T. H. N., Bouteau F., Mazars C., Kuse M., Kawano T. Enhanced elevations of hypo-osmotic shock induced cytosolic and nucleic calcium concentrations in tobacco cells by pretreatment with dimethyl sulfoxide. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2019. Vol. 83 (2). P. 318–321. doi: 10.080/09168451.2018.1533801.
12. Sessa G., Carabelli M., Possenti M., Morelli G., Ruberti I. Multiple Links between HD-Zip Proteins and Hormone Networks. *Int. J. Mol. Sci*. 2018. Vol. 19 (12). P. 4047. doi: 10.3390/ijms19124047.
13. Chen W., Cheng Z., Liu L., Wang M., You X., Wang J., Wan J. Small Grain and Dwarf 2, encoding an HD-Zip II family transcription factor, regulate plant development by modulating gibberellin biosynthesis in rice. *Plant Sci*. 2019. Vol. 288. 110208. doi: 10.1016/j.plantsci.2019.110208.
14. He G., Liu P., Zhao H., Sun J. The HD-ZIP II Transcription Factors Regulate Plant Architecture through the Auxin Pathway. *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21 (9). 3250. doi: 10.3390/ijms21093250.
15. Gong S., Ding Y., Hu S., Ding L., Chen Z., Zhu C. The role of HD-Zip class I transcription factors in plant response to abiotic stresses. *Physiol. Plant*. 2019. Vol. 167 (4). P. 516–525. doi: 10.1111/ppl.12965.
16. McCreedy K., Spencer V., Ja'come-Bla'squez F., Burnett J., Itzel Margarita, Sa'nchez V., Zara Riches Z., Kim M. TARGET OF RAPAMYCIN is essential for asexual vegetative reproduction in *Kalanchoe*. *Plant Physiology*. 2022. Vol. 189 (1). P. 248–263. doi: 10.1093/plphys/kiab589.

**KATSAN V.A.<sup>1</sup>, POTOPALSKY A.I.<sup>1,2</sup>, ZADOROZHNI B.O.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150

<sup>2</sup> Institute of health improvement and rebirth of the peoples of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150

### **INFLUENCE OF IZATISON ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF PLANTLETS IN *KALANCHOE DAIGREMONTIANA* (RAIM.-HAMET & PERRIER) A. BERGER**

**Aim.** The investigation was performed to studying of the influence of Izatison on the adaptiv morphogenesis in plants. *Kalanchoe Daigremontiana* was chosen as the model. **Methods.** The plants, obtained from the plantlets of same age and origin, were grown as a soil culture in separate pots. The mature leaves from the middle layer of the plants were used for the investigation. The first versions of Izatison dilutions were used. **Results.** The statistically reliable increase of the initiated plantlets on the leaf ( $P < 0.05$ ) was detected in the version with the greatest dilution for 5 days of exposition of the *Kalanchoe* leaves in the water suspensions of Izatison. The statistically reliable of the accelerated emergence of second pair of the leaves ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ ) was shown in tenth day in the versions with the middle ant the greatest dilutions. It was detected earlier emergence of the third pair of the leaves for 11–17 days ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,001$ ) in the versions with the greatest dilutions. **Conclusions.** It was shown the possibility of Izatison to stimulate the initiation of plantlets and accelerate their differentiation and the growth depending from its concentration.

**Keywords:** izatison, *Kalanchoe Daigremontiana*, development and growth of plantlets.