

УДК 581.18:582.34

Я.Д. Хоркавців, О.Т. Демків

ВЗАЄМОВПЛИВ СВІТЛА І ГРАВІТАЦІЇ НА ТРОПІЗМИ ПРОТОНЕМИ ТА МОРФОГЕНЕЗ ГАМЕТОФІТУ МОХІВ

Хоркавців Я.Д., Демків О.Т. Взаимовлияние света и гравитации в тропизмах протонемы и морфогенезе гаметофита мхов // Науч. зап. Гос. природоведч. музея. – Львов, 2009. – Вып. 25. – С. 143-148.

Свет и гравитация взаимодействуют на низких интенсивностях освещения и влияют на выраженность гравичувствительности, ориентацию роста столонов и реверсию гравитропизма. Гравитация способствует ускоренному развитию почек гаметофоров на апикальных клетках протонемы. Морфогенез протонематической дерновинки регулируется, в первую очередь, эндогенными факторами, действие которых подавляет свет или гравитация.

Khorkavtsiv Ya. D., Demkiv O.T. The influence of light and gravity on the tropisms of protonemata and morphogenesis of moss gametophyte // Proc. of the State Nat. Hist. Museum. – Lviv, 2009. – 25. – P. 143-148.

On the low light intensity the interaction among gravity and light influences on the alignment to gravity, orients gravitropic growth and reverses gravitropism. The gravity accelerates the development of protonemata and stimulates the transformation of the apical cells into gametophore buds. First of all endogenous factors being masked by gravity or light are necessary for the spiral growth of protonemata mats.

Флористичний аналіз бріюфлори Карпат є частиною ботанічних досліджень на високогірному стаціонарі „Пожижевська”, а підставою для лабораторних робіт незмінно залишається морфологія мохів. Об’єктом вивчення морфології є протонема – ювенільна стадія розвитку мохів, яку успішно використовують у різних галузях біології, у тому числі, космобіології. У спільних проектах на російських біосупутниках „Бион-11” і „Фотон” та американському кораблі „Columbia” ставили завдання – з’ясувати участь світла і гравітації у ростових рухах протонем. З-поміж різних типів клітин протонема мохів відома своєю чутливістю і ростовою відповіддю на дію світла та гравітації. Сприйняття і реалізація стимулів відбуваються в одній апікальній клітині, що сприяло широкому використанню мохів для досліджень фото- і гравічутливості. Протонема мохів на світлі росте плагіотропно, орієнтуючись перпендикулярно до напрямку світла і гравітації. У темряві утворюється пучок направлених вверх столонів. Ростові рухи мають виражений адаптивний характер. На світлі така форма росту забезпечує максимальне використання освітлення, а у темряві є найкоротшим шляхом до світла. У вищих рослин світло і гравітація взаємодіють з гравітропізмом, що виявляється у габітусі або формі крони дерев, а їх різноманітність розглядають як прояв адаптації [5]. Метою роботи було вивчити вплив світла різної інтенсивності і направленості на ріст та морфогенез гравітропної протонемі мохів.

Матеріал і методика досліджень

У роботі використані розповсюджені і добре вивчені експериментально види мохів: *Ceratodon purpureus* Brid., *Physcomitrella patens* B.S.G., *Pottia intermedia* (Turn.) Fürnr. і *Barbula unguiculata* Hedw.

Стерильні культури мохів отримали в лабораторних умовах. Відбирали дозрілі коробочки, стерилізували їх 1 хв. 1% сулемою, відмивали у дистильованій воді і висівали спори на агаризоване поживне середовище Кнопа у чашки Петрі. Чашки ставили у люмінестат і протонему вирощували у контрольованих умовах освітлення 2,0-2,5 тис. лк, температури 18-22°C і вологості 85-90%. Семиденні дернинки мохів знімали з агару препарувальною голкою і у вигляді клубка розміром 0,2 мм переносили на свіже середовище з 0,15 М глюкозою. Чашки поміщали у чорні картонні коробки і для гравістимуляції протонеми ставили вертикально. У такому положенні протонема росла у темряві негативно гравітропно протягом 5-7 діб. Для дослідження впливу світла на гравічутливість та орієнтацію гравітропного росту (позитивний чи негативний гравітропізм) використали синє і червоне світло різної направленості. Вертикально орієнтовані чашки з протонемою *Ceratodon purpureus* освітлювали 24 год. направленим синім ($\lambda = 405$ нм) і червоним ($\lambda = 660$ нм) світлом інтенсивністю $6 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сек}^{-1}$. Вимірювали кути між напрямом росту до і після опромінення, за якими визначали величину фото- і гравітропного згину. Контролем була протонема, чашки з якою оберталися на кліностації із швидкістю 2 об/хв, що імітувало умови невагомості. Чашки аналогічно освітлювали синім і червоним світлом. Для визначення участі гравітації у морфогенезі чашки із гравітропною протонемою *Pottia intermedia* виставляли на три доби на біле освітлення (50–100 лк) і спостерігали за утворенням бруньок. Дернинки спіральної форми отримували з вегетативних клонів *Barbula unguiculata* і *Ceratodon purpureus*, які вирощували 5-7 днів у темряві, а тоді переносили на світло або кліностаг. Через два тижні цифровою фотокамерою "Nikon" реєстрували морфологічні зміни у формуванні бруньок і формі дернинок.

Результати досліджень

Протонема мохів у темряві росте негативно гравітропно пучком столонів направлених від вектора гравітації, проявляючи, таким чином, чутливість до гравітації. Для індукції гравічутливості кореневої системи рослин необхідне червоне світло і корені деяких рослин у повній темряві ростуть горизонтально. Отже, гравітаційна реакція вимагає фототропного стимулу. У протонемі мохів взаємодія між світлом і гравітацією відбувається на рівні тропізмів, а світло як потужніший фактор пригнічує гравітропний ріст. Тому досліджували низькі інтенсивності освітлення, а те, що для мохів ефективне як червоне, так і синє світло використали для аналізу обох ділянок спектра. Для визначення взаємодії між світлом і гравітацією проведені експерименти з різними інтенсивностями червоного світла і різною направленістю світла. Встановлено, що варіабельність кутів згину після освітлення червоним світлом не залежить від вектора дії світла і гравітації [1, 10, 13]. На високих інтенсивностях бокового світла ріст протонеми орієнтований фототропно без будь-якого прояву гравітропізму. На низьких інтенсивностях – від 0,2 до

1,0 мкмоль·м⁻²·сек⁻¹ варіабельність росту була високою, але гравітропізм статистично переважав фототропізм. Отже, вища від 0,2 мкмоль·м⁻²·сек⁻¹ інтенсивність освітлення інгібувала вплив гравітації на фототропізм. В експериментах, проведених на космічному кораблі “Columbia”, встановлено, що на низькій 50 нм·м⁻²·сек⁻¹ інтенсивності червоного світла, 70% верхівок апікальних клітин орієнтувалися до світла, тоді як у земних умовах (1g) така інтенсивність була пороговою. Тобто, гравітація знижує поріг чутливості фототропізму. Показано, що афототропний мутант, який виявляв гравітропну реакцію на червоному світлі, втрачав її, якщо фітохромну функцію мутанта відновили екзогенним білівірдином [12]. Це підтверджує наявність від’ємної кореляції між граві- і фототропізмом. За результатами порівняльних досліджень впливу червоного і синього світла на гравітропізм встановлено, що червоне світло краще інгібувало гравітропний ріст, ніж синє. 4-год. експозиція протонемі *Ceratodon purpureus* на червоному світлі затримувала гравіреакцію, порівняно з темрявою, на 24 год., а на синьому – на 12 год. [7]. Тобто, післядія червоного світла була тривалішою від синього, а гравітропізм відновлювався швидше після освітлення синім світлом.

Синє освітлення, крім того, що інгібувало гравітропізм *C. purpureus*, якісно змінювало напрям росту (рис 1а, б). Якщо зорієнтували синє світло інтенсивністю 6 мкмоль·м⁻²·сек⁻¹ перпендикулярно до площини росту, тобто роз’єднали фото- і гравітропний ріст, то протонема, на відміну від негативного гравітропізму, росла позитивно гравітропно, тобто вниз, як, наприклад, ризоїди *Chara*. Це свідчить, що клітини протонемі зберегли чутливість до поляризаційної дії гравітації, але змінили напрям росту. Показано, що низькі інтенсивності світла порушували регенерацію протопластів *Ceratodon purpureus* і клітини втрачали здатність до полярного утворення позитивно чи негативно фототропних ростків [14]. Отже, до системи гравічутливості апікальних клітин протонемі належить два процеси: відчуття вектора гравістимулу і орієнтацію росту.

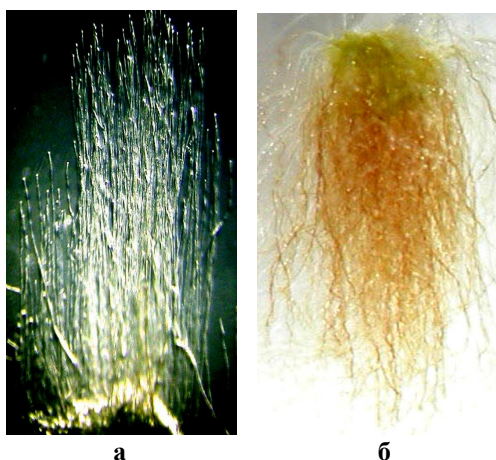


Рис. 1. Негативно (а) і позитивно (б) гравітропний фенотип протонемної дернинки *Ceratodon purpureus*. Зб.: 3×

Порівнюючи реакцію протонеми на червоне і синє світло, припускаємо, що модуляція гравітропізму здійснюється, принаймні, через дві фоторецепторні системи, які діють різними шляхами. Червоне світло через фітохромну систему інгібує гравітропізм, а синє, діючи через криптохром або інший рецептор синього світла, не тільки послаблює гравітропізм, а й змінює його напрям.

Нестійку зміну гравітропізму *Ceratodon purpureus* спостерігали під час поділу клітин [14]. Подібний ефект відомий також для стolonів *Physcomitrella patens* [9], які після клінонстатування змінили гравітропну реакцію. Для обох видів використали мутантні лінії і показали, що гравітропізм – генетично закріплена форма росту. Синє світло змінювало напрям росту лише дикої форми *C. purpureus*, але не впливало на мутантну [7, 12]. Можливо, що генний продукт відповідальний за гравітропізм дикої форми, є світлозалежний білковий репресор. Генетичний аналіз групи мутантів *C. purpureus* з різною орієнтацією до вектора гравітації дав можливість авторам [9] дійти висновку, що контроль гравіфенотипів здійснює один ген, продукт активності якого відповідальний за упорядкування і орієнтацію росту.

Дослідження розвитку гравітропної протонеми *Pottia intermedia* на світлі свідчать, що гравітація сприяє пришвидшеному закладанню бруньок і формуванню листкостеблових пагонів. Після перенесення протонеми із темряви на світло на третю добу на апікальних клітинах головних стolonів під впливом низьких інтенсивностей освітлення поступово утворювалися бруньки гаметофорів (рис. 2 а, б).

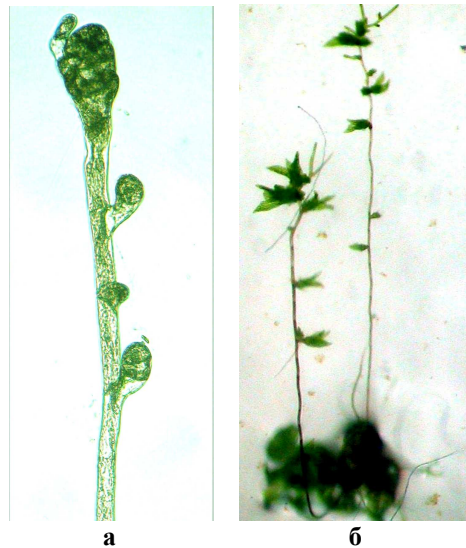


Рис. 2. Гравітропні стolonи *Pottia intermedia* із бруньками, які утворилися після перенесення протонеми із темряви на світло: **а** – початкові стадії закладання бруньок на апікальній та інтеркалярних клітинах; **б** – формування із бруньок листкостеблових пагонів. Зб.: **а** – 25×; **б** – 2×

По дві-чотири або й більше бруньок закладалося на одній субапікальній клітині і бокових відгалуженнях, а надалі вони розвивалися й на інших клітинах вздовж

столону. Обов'язковою передумовою брунькоутворення є диференціація клітин каулонемами з косими перетинками і утворення ризоїдів, що регулюється фітогормонами. Проте гравітація пришвидшила розвиток гаметофіту, оминаючи послідовність цих стадій. Попередньо встановлено, що цитокиніни та ІОК контролюють диференціацію апікальних клітин *P. intermedia* у бруньки гаметофорів [3]. Можна припустити, що розподіл фітогормонів визначає потік метаболітів і активність атрагуючого центру в апікальній клітині. Після кліноостатування бруньки гаметофорів закладалися по всій довжині столону. Отже, якщо змінили направлену дію гравітації внаслідок кліноостатування, то це дало можливість, по-перше, розділити ріст у темряві від гравітропізму, а по друге – ініціювати формування бруньок на усіх інтеркалярних клітинах. Очевидно, векторна направленість сили гравітації посилила акропетальний транспорт речовин, що є передумовою компетенції верхівкових клітин гравітропної протонеми до брунькоутворення.

Іншим проявом гравіморфогенезу є фенотип протонематичної дернинки. На світлі протонемна дернинка проаналізованих мохів мала симетричну форму і бокові столони, як і головні, росли радіально. У *Physcomitrella patens* і *Barbula unguiculata*, залежно від умов освітлення, окремі столони росли дугоподібно або й ціла дернинка мала спіральну форму (рис. 3 а, б).

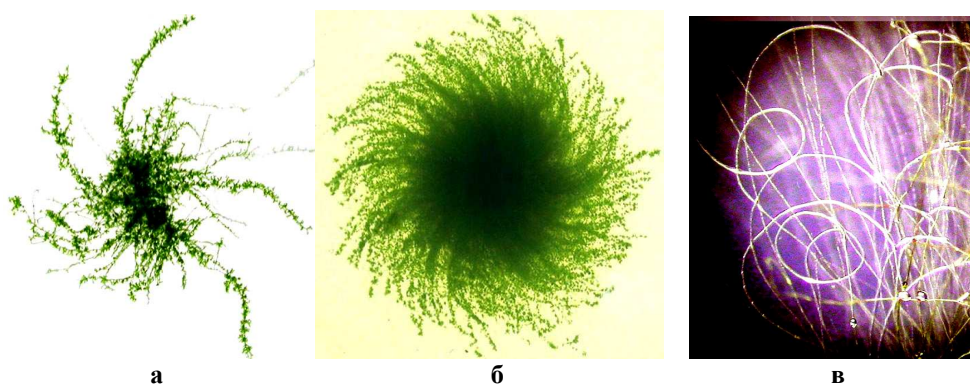


Рис. 3. Дугоподібні столони *Physcomitrella patens* (а), спіральна дернинка *Barbula unguiculata* (б) та гвинтоподібно закручені столони *Ceratodon purpureus* (в). Зб.: а, б – 4×; в – 10×

Протонема *B. unguiculata* добре розвивається на світлі, а після диференціації каулонемами столони синхронно закручуються у вигляді спіралі і завдяки зміні напрямку росту дернинка набуває спіральної форми (3 б). Дернинки *Ceratodon purpureus* у темряві в умовах мікрогравітації або кліноостатування росли спірально, інколи столони утворювали гвинтоподібні спіралі (рис. 3 в) і дернинка мала віялоподібний вигляд. На світлі форма дернинки *C. purpureus* постійно була радіальна. Вперше морфологічну форму спіральної дернинки описали Л. Кофлер і М. Бопп [8, 11], а згодом А.С. Лазаренко і співробітники [3, 4]. М. Бопп і Л. Кофлер вважали, що причиною спіралізації протонеми є гравітація і світло, а ендогенні процеси не беруть у цьому участі. Е. Синнот [6] припускав, що спіральність ініціюється нахилом клітинної перетинки під час мітозу апікальної клітини.

Проведені нами лабораторні експерименти, коли спіральні структури *B. unguiculata* формувалися на світлі в умовах 1g, а у *C. purpureus* – у темряві під час кліностатування, та унікальні досліди у Космосі, коли спіральна форма *C. purpureus* розвивалася за відсутності світла і гравітації, свідчать, що морфогенез регулюється, насамперед, ендегенно, але світло і гравітація контролюють цей процес. Це підтверджує спадкову природу спірального морфогенезу дернінок, домінування якого у життєвій формі росту мохів приховане впливом світла або гравітації.

Висновки

Встановлено, що світло і гравітація взаємодіють у тропізмах протонеми і змінюють гравічутливість та просторову орієнтацію стolonів аж до реверсії гравітропізму. Спіральна форма дернінок є спадковою морфогенетичною ознакою та наслідком взаємовпливу світла і гравітації.

1. Демків О.Т., Хоркавців Я.Д., Кардаш О.Р. // Спільний американсько-український експеримент SPM на космічному кораблі "Columbia" // Праці наукового товариства імені Шевченка. – Львів, 1999. – III – С. 13-18.
2. Демків О.Т., Хоркавців Я.Д., Кияк Н.Я., Кіт Н.А. Вплив гравітації на фотоморфогенез протонеми *Pottia intermedia* (Turn.) Fürng., Pottiales // Укр. ботан. журн. – 2005. – № 3. – С. 329–337.
3. Демків О.Т., Кордюм Е.Л., Хоркавців Я.Д., Таїрбеков М.Г. // Космічна наука і технологія. – 2006. – 12, № 5/6. – С. 30-35.
4. Лазаренко А.С., Коваленко А.П., Пашук Х.Т. Деякі спіральні структури протонеми листяних мохів // Укр. ботан. журн. – 1961. – 18, № 6. – С. 89-98.
5. Минина Е.Г., Ларионова Н.А., Третьякова И.Н. Гравитационные адаптации у лесных древесных растений // Журн. общ. биол. – 1984. – 45, № 5. – С. 687-694.
6. Синнот Э. Морфогенез растений. – М.: ИЛ, 1963. – 603 с.
7. Хоркавців О.Я., Демків О.Т. Гравітропна реакція протонеми моху *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. та її модифікація світлом // Космічна наука і технологія. – 1999. – 5, № 5/6. – С. 110-117.
8. Vopp M. Versuche zur Analyse von Wachstum und Differenzierung des Laubmoosprotonemas // Planta, 1959. – 53. – S. 178-197.
9. Cove D.J., Qutrano R.S. Agravitropic mutants of the moss *Ceratodon purpureus* do not complement mutants having a reversed gravitropic response // Plant, Cell and Environment. – 2006. – 29. – P. 1379-1387.
10. Kern V.D., Sack F.D. Irradiance-dependent regulation of gravitropism by red light in protonemata of the moss *Ceratodon purpureus* // Planta. – 1999. – 209. – P. 299-307.
11. Kofler L. Croissance spiralee du protonema de *Funaria hygrometrica* (L.) Sibth. // C.R. Acad.Sci. – Paris. – 1957. – 245. – P. 1823-1825.
12. Lamparter T., Esch H., Cove D., Hartmann E. Phytochrome control of phototropism and chlorophyll accumulation in the apical cells of protonemal filaments of wildtype and an aphototropic mutant of the moss *Ceratodon purpureus* // Plant Cell Physiol. – 1997. – 38, № 1. – P. 51-58.
13. Ripetskyj R.T., Kit N.A., Chaban Ch.I. Influence of gravity on the photomorphism of secondary moss protomenata // Adv. Space Res. – 1999. – 23, № 12. – P. 2005-2010.
14. Wagner T.A., Sack F.D. Gravotropism and gravimorphism during regeneration from protoplasts of moss *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. // Planta. – 1998. – 205. – P. 352-358.

Інститут екології Карпат НАН України, м. Львів
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua