

УДК 581.17:581.84

Гравічутлива протонема моху — модельний об'єкт космічної біології

О. Т. Демків, Я. Д. Хоркавців, О. Р. Кардаш, Х. І. Чабан

Інститут екології Карпат НАН України, Львів

Надійшла до редакції 07.03.97

Поряд із статочитами коренів і пагонів квіткових рослин, гравічутливими виявилися нитчасті структури з полярним ростом, у яких легко спостерігати за ростовими рухами і седиментацією амілопластів *in vivo* і тому стало можливим дослідження їх у деталях. В умовах гравітаційного поля Землі протонема мохів *Ceratodon purpureus* і *Pottia intermedia* на світлі росте по поверхні субстрату, а в темряві орієнтується негативно гравітропно. Сприйняття граві- і фотостимулів, як і диференційований ріст, зосереджені у верхівці апікальної клітини. Реакція протонем на бокове світло залежить як від якості, так і від інтенсивності світла. Низькі інтенсивності світла зумовлюють позитивний фототропний ріст, високі — негативний. Крім граві- та фототропізму, для протонем властивий автотропізм, який протидіє зміні напрямку росту, а також відновлює його після припинення дії збуджуючого фактора. Тому що сприйняття і реалізація гравістимулу відбуваються в одній і тій же апікальній клітині столону і не ускладнені ланцюгом проміжних сигнальних систем, була встановлена каузальність гравітропної реакції від кількості й розподілу амілопластів, а також вплив клиностагування на їх формування. Дослідження, які плануються здійснити на космічному кораблі «Колумбія», дадуть можливість перевірити правильність такого припущення.

В епоху науково-технічного прогресу значно зросла зацікавленість до інформації про рівні та діапазон чутливості живих систем до мінливості геофізичних факторів, вплив яких може істотно відрізнятись від звичайних умов життєдіяльності рослин. Крім того, значно розширилися експериментальні можливості досліджень реакцій рослин на дію геофізичних факторів.

Специфіка умов автономних космічних польотів дає можливість конструювати відмінні від земних системи екзогенних факторів та аналізувати їх інтегральний вплив в умовах мікрогравітації (Сытник и др., 1984), які неможливо відтворити на Землі.

Гравітація завжди була невід'ємним компонентом довкілля, вона супроводжувала еволюцію живих систем і тому залишила глибокий слід у різних проявах їх життєдіяльності й формуванні структур. Серед розмаїття об'єктів дослідження гравітропних

реакцій рослин набули визнання як квіткові рослини, так і безсудинні організми (Sack, 1991). У квіткових рослин гравічутливими є не всі клітини, а лише статочити коренів і пагонів (Sievers et al., 1996). У безсудинних, представлених різними систематичними групами — від водоростей (*Chara*), до мохо- та папоротеподібних, гравічутливими є верхівкові клітини нитчастих структур. Апікальні клітини ризоїдів *Chara* і протонем мохів сприймають і реалізують гравістимул, як і інші стимули, у межах верхівки ростучої клітини (Sack, 1993; Чабан, 1996). Принцип дії гравістимулу в обох групах рослин однотипний і реалізується за участю статолітів, седиментація яких під впливом гравітації створює асиметричний їх розподіл, на що клітина реагує просторовою зміною ростової активності. Однак у водорості *Chara* функцію статолітів виконують кристали барію, а в протонемі мохів — амілопласти. Характер реакції також різний: у

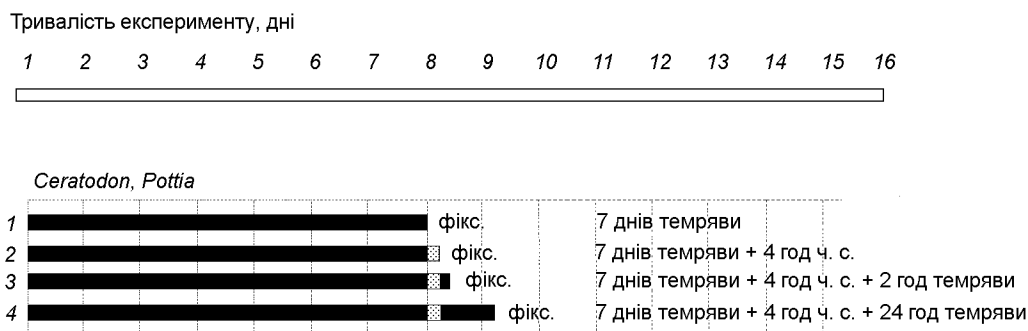


Рис. 1. Програма космічного експерименту на американському космічному кораблі «Колумбія»: 1 — контроль (7 днів темряви) — фіксація; 2 — 7 днів темряви + 4 год ЧС — фіксація; 3 — 7 днів темряви + 4 год ЧС + 2 год темряви — фіксація; 4 — 7 днів темряви + 4 год ЧС + 24 год темряви — фіксація

Chara спостерігається позитивна гравітропна реакція ризоїдів, а в протонемі — негативна гравітропна реакція зеленої фотосинтезуючої протонемі.

Негативний гравітропізм протонема проявляється тільки у темряві, на світлі вона росте по поверхні субстрату (Demkiv et al., 1996). У зв'язку з цим метою роботи було дослідити кінетику ростових рухів (тропізмів) протонемі мохів в умовах гравітаційного поля Землі та в умовах мікрогравітації і на цій основі визначити внесок кожного із стимулів у загальний процес ростових рухів і природу їх взаємодії.

У роботі використано два види мохів: *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. та *Pottia intermedia* (Turn.) Fűrnr. Вид *C. purpureus* широко застосовується при дослідженнях механізмів гравітропізму (Hartmann, 1984; Lamparter et al., 1995; Sack, 1993; Walker, Sack, 1990), у той час як *P. intermedia* вивчена значно слабше (Чабан, 1996). *P. intermedia* в основному застосовувалася для досліджень механізмів морфогенезу, в тому числі переходу гаметофітного шляху розвитку на спорофітний (Рипецкий, 1985).

Для досліджень ростових рухів використовували ювенільну стадію мохів — протонему, яку вирощували зі спор на агаризованому середовищі Кноп П з мікроелементами (Kofler, 1967), у контрольованих умовах освітлення (2.0—2.2 тис. лк), температури (20—22 °С) і вологості (80—95 %). Джерелом білого світла були лампи денного світла ЛБ-30, синього та зеленого — ртутно-кварцева лампа СВД-120А, із фільтрами СС-15 та ЗС-11. Джерелом червоного світла служили світлові діоди LED - E₁₈₄. 7-денну протонему знімали з агару і переносили у чашки зі свіжим середовищем, у яке додатково вносили 0.2 % глюкози. Чашки поміщали у

непрозорі контейнери (BRIC) таким чином, щоб надати їм вертикального положення.

Американські інженери розробили унікальну систему освітлення кожної окремої чашки: у бокову стінку BRIC (контейнера для вирощування рослин у темряві) вмонтовані світлові діоди LED-E₁₈₄, які випромінюють червоне світло (ЧС) з довжиною хвилі 660 нм та інтенсивністю до 3.0 Вт/см². Таке джерело бокового світла створює крутий градієнт освітленості. Протонему *C. purpureus*, що росла гравітропно у темряві, насвітлювали 4 год боковим ЧС згідно з розробленою програмою (рис. 1) і аналізували її ріст під впливом світла й темряви після насвітлення. Після 7-денного росту протонемі у темряві першу групу чашок (по три кожного виду) фіксували, і вони служили темновим контролем. Другу насвітлювали 4 год ЧС і відразу фіксували. Третю теж насвітлювали 4 год ЧС, після чого витримували 2 год у темряві й фіксували. Останню (четверту) групу чашок фіксували після 24-годинного витримання у темряві і 4 год насвітлення. Префіксацію протонемі проводили сумішшю 1 %-го формаліну і 2.5 %-го глютаральдегіду на фосфатному буфері (рН 7.2), після того 2 %-м розчином OsO₄ на тому ж буфері при температурі 4 °С (Сытник и др., 1984).

У темряві в умовах гравітації протонема обох видів проявляє негативний гравітропізм і тому всі нитки орієнтувалися паралельно і росли вверх (негативно гравітропно). За 7 днів при середній швидкості росту 28.3±0.3 мкм/год протонема *C. purpureus* видовжувалася на 3.5—5.5 мм, а протонема *P. intermedia*, швидкість росту якої 19.3 ± 0.2 мкм/год, дещо менше — 2.7—3.5 мм. Було встановлено, що протонема *P. intermedia* реагує позитивно фототропно на бокове світло з усіх ділянок спектру (Demkiv et al., 1996). Бокове світло



Рис. 2. Позитивний фототропізм (на синє світло) верхівок апікальних клітин *Pottia intermedia*, що росла 7 днів негативно гравітропно у темряві. Тут і далі стрілкою позначена орієнтація світла

викликало поступове викривлення верхівок протонемі і фототропно позитивний ріст у напрямку до джерела світла (рис. 2).

На червоному світлі характер згину якісно відрізнявся від синього різким згином верхівки до джерела світла (рис. 3).

Крім довжини хвилі, на характер реакції істотно впливає інтенсивність освітлення. З допомогою BRIC можна дослідити і цю особливість впливу світла. Інтенсивність свічення діодів LED експоненційно збільшувалась з напругою від 0.2 Вт/м² при напрузі 13 В до 3.0 Вт/м² при 15 В. Інтенсивність бокового свічення істотно впливала на фототропні реакції протонемі *P. intermedia*. Високі інтенсивності світла (2.5–3.0 Вт/м²) викликали однозначну негативно фототропну реакцію (рис. 4), яка мало змінювалась з віддаллю від джерела світла. Зниження інтенсивності світла до

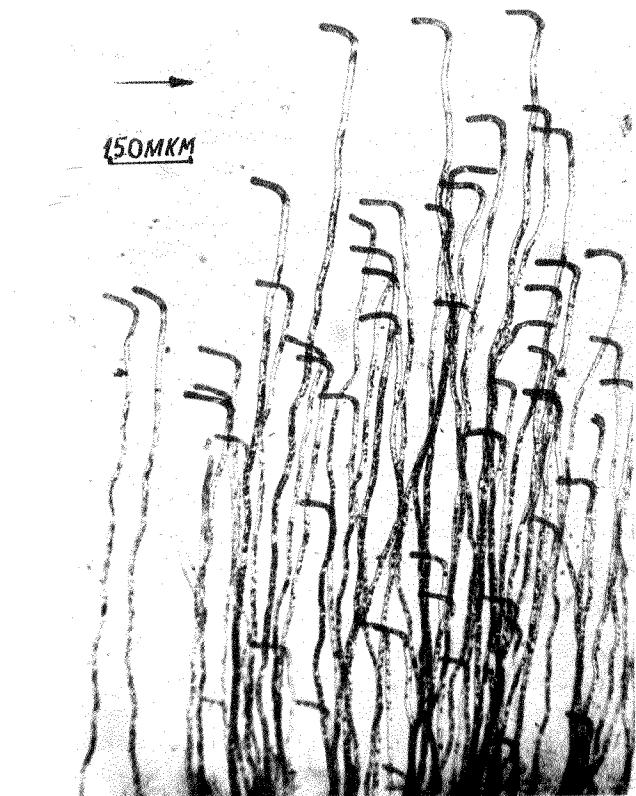


Рис. 3. Реакція протонемі *Ceratodon purpureus*, що росла 7 днів негативно гравітропно у темряві, на 4 годинне бокове ЧС

0.9 Вт/м² викликало неоднозначну реакцію — частина стolonів росла до світла (позитивно фототропно), а інша — від світла (негативно фототропно). Із віддаллю від джерела світла збільшувалась кількість стolonів, які орієнтувалися до світла, але одночасно з цим зменшувалися кути загину.

В умовах низької інтенсивності світла (0.2 Вт/м² при 13 В) для протонемі *P. intermedia* ми одержали тільки позитивну фототропну реакцію, хоча з віддаленням від джерела світла ця реакція ставала менш вираженою. Згладження фототропної реакції з віддаленням від джерела світла, очевидно, зв'язане з розсіюванням червоного світла в агарі. Кількісно ця реакція не залежала від орієнтації світла і тому реакція на світло, орієнтоване зверху чи знизу, відрізнялася тільки знаком, за абсолютним значенням кути згину істотно не відрізнялися (Demkiv et al., 1996).

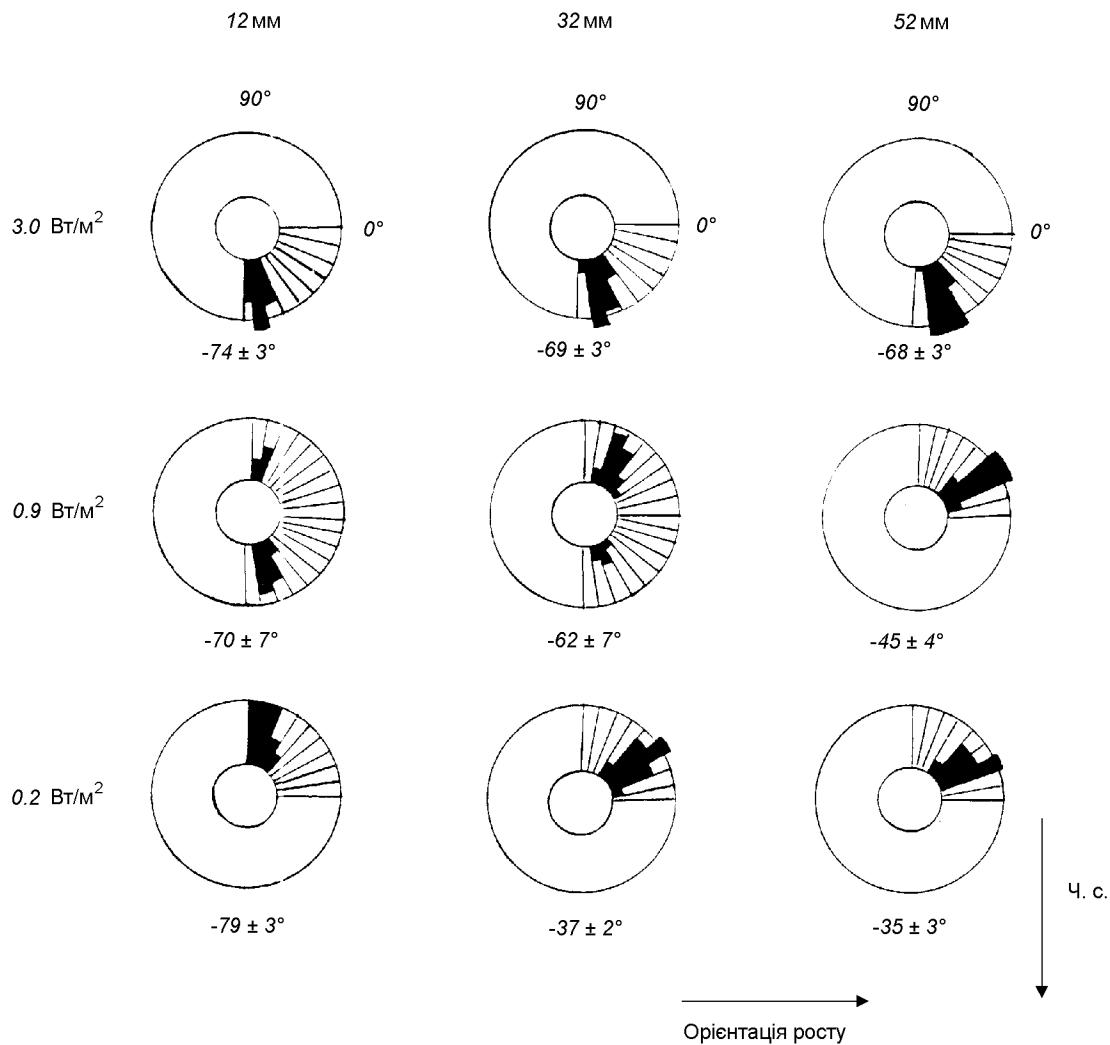


Рис. 4. Схема зміни кутів фототропного згину протонеми *S. purpureus* в залежності від інтенсивності освітлення (0.2, 0.9, 3.0 Вт/м²) та віддалі до джерела світла (12, 32, 52 мм)

Якісно відмінна реакція протонеми на ЧС послужила причиною пошуку механізмів дії ЧС і причетності до неї фітохромної системи реакцій червоного — далекого червоного світла. У темряві після наświetлення протонема продовжувала рости, але не у напрямі до джерела світла; верхівка апікальної клітини скривлялася, відновлюючи напрямку росту протонеми, який був до її наświetлення ЧС. Відновлення напрямку росту (автотропізм) чітко проявлялося лише після наświetлення протонеми ЧС (рис. 5). Така післясвітлова реорієнтація росту протонеми відбувалася дуже швидко. Не виключено, що і різка реакція протонеми на світло, і післясвітлове відновлення напрямку росту зв'язані з цис-транс-ізомеризацією фітохрому. Вважають,

що під дією червоного світла відбувається де-струкція внутрішньоклітинних градієнтів активного фітохрому (Lamparter et al., 1995). У темряві градієнт активного фітохрому швидко відновлюється, що й призводить до зміни напрямку росту протонеми. Цей процес відбувався протягом 10—15 хв (Lamparter et al., 1995). Однак це не кінцевий напрямку росту протонеми у темряві після наświetлення її ЧС. Через 8—10 годин протонема знову змінювала напрямок росту, орієнтуючись негативно гравітропно (рис. 6).

Складні ростові рухи протонеми у темряві після її наświetлення боковим червоним світлом в умовах гравітаційного поля Землі спричинили необхідність аналізу цього явища в умовах мікрогравітації.

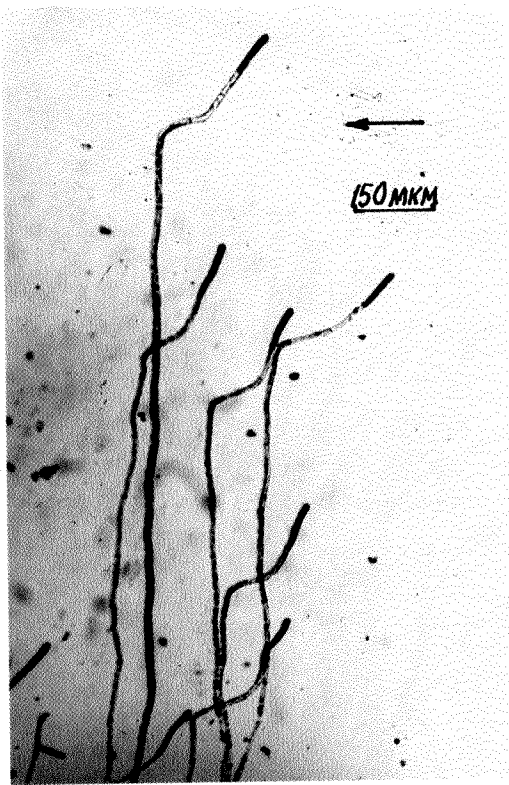


Рис. 5. Відновлення орієнтації росту протонеми *S. purpureus*, що росла 7 днів у темряві і 4 год на ЧС

На підставі проведених досліджень було зроблено висновок про те, що орієнтація росту протонеми контролюється декількома різними стимулами: граві-, фото- і автостимулом. Загин протонеми в темряві вверх, тобто негативно гравітропно, відбувався поступово, що може свідчити про співучасть хоча би двох стимулів — граві- і автостимулу. На синьому світлі також спостерігалось поступове викривлення ниток до джерела світла, тобто і тут чітко проявляється взаємодія щонайменше двох стимулів — фото- і автостимулу. На червоному світлі не проявлялася дія ні авто-, ні гравістимулу, що може свідчити про блокування ЧС як граві-, так і автостимулу.

Таким чином, досліджуючи взаємодію фото- і гравістимулу, ми зіткнулися ще з одним стимулом, який, як правило, залишався поза увагою дослідників, хоча саме він виконував функцію внутрішньоклітинного регулятора, який не тільки запобігав зміні просторового статусу організму, але й відновлював його після виключення збуджуючого фактора. Як ця кібернетична система з негативним зворотним зв'язком працюватиме в умовах мікрогравітації, вдасться виявити тільки після завершення спільного українсько-американського експерименту «Shuttle'97».

У клітинах протонеми гравітропні реакції тісно зв'язані з формуванням, розподілом і седиментацією амілопластів (Young, Sack, 1992; Sievers et al., 1996). На світлі гравітропізм протонеми не проявляється і це явище тісно скорельоване із

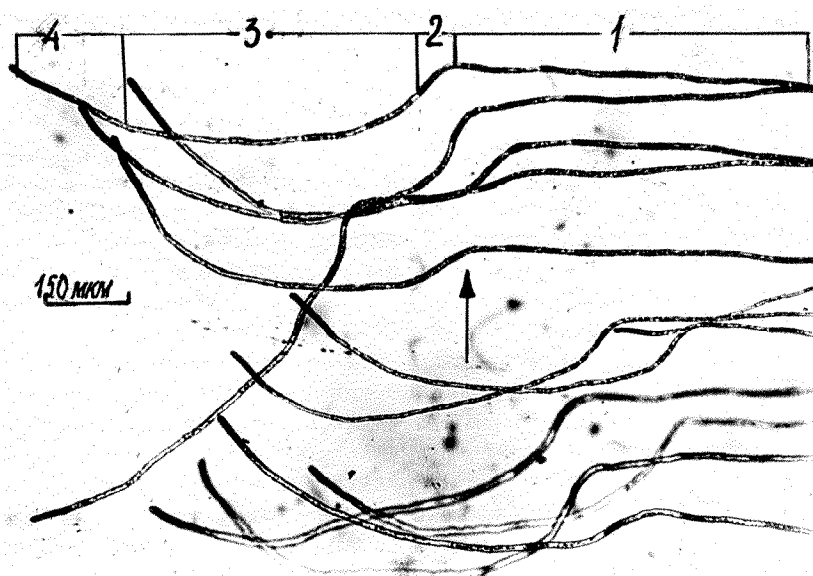


Рис. 6. Послідовний прояв авто- і гравітропізму у темряві (44 год) після 4 год наświetлення ЧС протонеми *S. purpureus*: 1 — гравітропний ріст у темряві; 2 — позитивний фототропний ріст до ЧС; 3 — автотропний ріст; 4 — гравітропний ріст

Вплив світла й горизонтального клинотатування на вміст амілопластів в апікальних клітинах протонеми *Ceratodon purpureus* (Hedw) Brid.

Умови вирощування	Кількість проаналізованих клітин	Кількість амілопластів в апікальних клітинах
Темрява	79	60.5±5.1
Біле світло (2.0 тис. лк)	67	13.4±1.6
Червоне світло (0.9 Вт/м ²)	91	17.9±2.0
Клинотатування	56	37.2±4.0

зменшенням вмісту і величини амілопластів в апікальних клітинах протонеми *C. purpureus* (таблиця). Однак виявилось, що й горизонтальне клинотатування протонеми у темряві також призводить до істотного зниження вмісту амілопластів у апікальних клітинах. Експерименти, які плануються провести на космічному кораблі «Колумбія», дозволять перевірити наявність тісного взаємного зв'язку амілопластів й гравітропізму у рослин. Крім цього, ми сподіваємося одержати інформацію про природу структурно-функціональних процесів, які супроводжують ростові рухи, і в першу чергу про зміну форми та розподілу органел, безпосередньо причетних до ростових рухів протонеми. Новим недослідженим явищем, і не тільки для нитчастих структур з полярним ростом, залишається реорієнтація росту (автотропізм) та механізми її реалізації.

Рипецкий Р. Т. Экспериментальный апомиксис у мхов и проблема устойчивости детерминированного и дифференцированного состояния // Онтогенез.—1985.—16, № 3.—С. 229—241.

Сытник К. М., Кордюм Е. Л., Недуха Е. М. и др. Растительная клетка при изменении геофизических факторов. — К.: Наук. думка, 1984.—136 с.

Чабан Х. І. Структурно-функціональна організація апікальної клітини протонеми *Pottia intermedia* в умовах гравістимуляції: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 1996.—20 с.

Demkiv O. T., Kordyum E. L., Khorkavtsiv Ya. D., Chaban Ch. I. Gravi- and photostimuli in moss protonema growth movements // Abstracts 31st Sci. Ass. Cospar (14—21 July, 1996), Birmingham, England.—1996.—P. 314.

Hartmann E. Influence of light on phototropic bending of moss protonemata of *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. // J. Hattori Bot. Lab.—1984, N 55.—P. 87—98.

Kofler L. Polarisation et geotropisme des spores de *Funaria hygrometrica* en presence d'hydrate de chloral // Bull. de la societe Botanique de France.—1967.—S. 138—150.

Lamparter T., Podlowski S., Mittmann F. et al. Phytochrome from protonemal tissue of the moss *Ceratodon purpureus* // J. Plant Physiol.—1995.—47, N 3.—P. 243—256.

Sack F. D. Plant gravity sensing // Inter. review of cytology.—1991.—127.—P. 193—252.

Sack F. D. Gravitropism in protonema of the moss *Ceratodon* // Mem. Tarrey Bot. Club.—1993.—25, N 1.—P. 36—44.

Sievers A., Buchen B., Hodick D. Gravity sensing in tip-growing cells // Plant Cell.—1996.—1, N 8.—P. 273—279.

Walker L. M., Sack F. D. Amyloplasts as possible statoliths in gravitropic protonemata of the moss *Ceratodon purpureus* // Planta.—1990.—181, N 1.—P. 71—77.

Young J. C., Sack F. D. Time-lapse analysis of gravitropism in *Ceratodon* protonemata // Amer. J. Bot.—1992.—79, N 12.—P. 1348—1358.

GRAVITY SENSITIVE MOSS PROTONEMA — A MODEL OBJECT OF THE SPACE BIOLOGY

O. T. Demkiv, Ya. D. Khorkavtsiv,
O. R. Kardash, and Kh. I. Chaban

In addition to the statocytes of roots and shoots, a number of tip-growing cells are also sensitive gravity, which affects cell growth and development. Since these tip-growing cells are highly suitable for observations in vivo, the movement and sedimentation of their statoliths can be studied in detail. Protonemata of the moss *Ceratodon purpureus* and *Pottia intermedia* were the object of the investigation of grew kinetics. The moss protonemata grown along the surface of nutrient-supplemented media in the light, and dark-grown moss protonemata were negatively gravitropic. Both gravitropic sensing and differential growth (curvature) occur in or close to the tip of the apical cell, and the tip growth is closely linked to tip orientation. The protonemata reaction on the lateral illumination depended on the quality as well as the quantity of light. The low-intensity light induced a positive phototropism of the protonemata, the high-intensity light produced a negative gravitropic growth. Besides the photo- and gravitropism of the moss protonema, the autotropism was established as an ability of protonema tip to renew the original growth direction and orientation in space after the factor inducing the tropism ceases to act. It was established experimentally that the protonema growth movements are controlled by a few stimuli at the same time, and it was suggested that disappearance even of one of them might reflect on the growth movement character. The experiments which we plan to realize during the Shuttle-97 experiment will enable us to examine the validity of this hypothesis.