

УДК 581.17:582.34

О. Т. Демків¹, Е. Л. Кордюм²,
Я. Д. Хоркавців¹, М. Г. Таїрбеков³

¹Інститут екології Карпат НАН України, Львів

²Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ

³ДНЦ РФ — «Інститут медико-біологічних проблем» РАН, Москва, Росія

Умови мікрогравітації — експериментальна база для пізнання закономірностей морфогенезу рослин в гравітаційному полі

Надійшла до редакції 03.04.06

В умовах реальної мікрогравітації в космічному польоті виявлено спіральний ріст гравічутливої протонеми моху *Ceratodon purpureus*. Показано, що спіралізації стolonів передують диференціація каулонем з косими клітинними перетинками та відхилення ростової зони апікальної клітини від горизонтальної осі росту. Нахил клітинних перетинок дає можливість верхівковій клітині обертатися навколо поздовжньої осі, долати опір субстрату і гравітації та закручуватися. На підставі досліджень росту протонеми *C. purpureus*, *Barbula unguiculata* і *Physcomitrella patens* в умовах звичайної гравітації, мікрогравітації та клиностакування при різних умовах освітлення та складі поживного середовища встановлено, що морфогенез протонеми регулюється насамперед ендогенними чинниками, дія яких на Землі маскується гравітацією або світлом.

У 1996 р. в експерименті «Протонема» на борту російського біосупутника «Біон-11» вперше виявлено спіральний ріст протонеми моху *C. purpureus* [2]. На відміну від негативного гравітропного росту в темряві в земних умовах, коли нитки протонеми росли майже паралельно одна до одної, в умовах мікрогравітації формувалися дернинки у вигляді лопатей турбіни, або ж «зоряних туманностей». Пізніше ці дані були підтверджені експериментами з мохами на борту космічних кораблів США у 87-й та 107-й місях [9, 10], але закономірності переходу лінійного росту у спіральний пока що не розкриті. Тому ми поставили за мету дослідити вплив зміненої гравітації (реальної та симульованої клиностау-

ванням) у поєднанні з різними умовами освітлення та складом поживного середовища на характер росту і спіральність протонеми мохів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Стерильні культури протонеми мохів *Ceratodon purpureus*, *Physcomitrella patens* і *Barbula unguiculata* отримували в лабораторних умовах. Відбирали дозрілі коробочки, стерилізували їх 1 хв 0.1 % сулемою, відмивали у дистильованій воді і висівали спори на агаризоване поживне середовище Кнопа у чашки Петрі. Чашки ставили у фітотрон, і протонему вирощували у конт-

рольованих умовах освітлення 2.0—2.5 тис. лк, температури 20—22 °С і вологості 85—90 %. Семиденні дернинки протонеми знімали з агару препаративною голкою і у вигляді клубка розміром 0.2 мм переносили на свіже середовище з 0.15 % глюкозою. Чашки поміщали у чорні картонні коробки і для гравістимуляції протонеми ставили їх вертикально. У такому положенні протонема росла негативно гравітропно пучком паралельних ниток протягом 7 діб.

Для дослідження спірального росту в умовах зміненої гравітації проводили наземні експерименти із застосуванням клиноста та космічний, спільно з ДНЦ РФ «Інститут медико-біологічних проблем РАН», на борту російського супутника «Фотон» (червень, 2005 р.). Чашки з протонемою переносили на горизонтальний клиноста, де вони обертались зі швидкістю 2 об./хв, та доставляли на борт супутника, зберігаючи їхнє вертикальне положення.

B. unguiculata у темряві вирощували на середовищі Гамбурга [1], а на світлі, як і для *C. purpureus* та *P. patens*, — на агаризованому середовищі Кнопа з 15 М глюкозою (або без глюкози). Через те що *B. unguiculata* не реагувала на клиностаування, розвиток протонеми та форму дернинки аналізували лише залежно від умов освітлення та складу поживного середовища. Для клиностаування використовували *C. purpureus* і *P. patens*, у космічному експерименті — *C. purpureus* [2]. Через 14 діб після завершення дослідів (симульована та реальна мікрогравітації) протонему фіксували 3.7 % параформальдегідом і зберігали у фосфатному буфері рН 6.9 у холодильнику при температурі $t = 0-5$ °С. Дернинки фотографували у стереомікроскопі «Stemi-2000» цифровим фотоапаратом Nikon Coolpix 4500. Аналізували форму дернинок та напрям клітинних перетинків апікальних і субапікальних клітин.

Досліджували вплив освітлення, фітогормонів, глюкози і азотнокислого амонію на швидкість росту, галуження стolonів, диференціювання каулонем та спіральний ріст дернинок. У середовище, на якому у темряві росла протонема, додавали нафтилоцтову кислоту (НОК) у концентрації 1.0 мкМ, глюкозу 0.15 М та NH_4NO_3 (6.0 мМ). Ступінь спіралізації дернинок оцінювали за кількістю дугоподібних стolonів у дернинці. Слідкували за появою косих перети-

нок, підраховували кількість каулонемних стolonів і галузок на стolонах. Отримані кількісні дані опрацьовували статистично [5].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Нитчастий гаметофіт мохів формується з двох типів стolonів — хлоронеми і каулонем. Клітини хлоронеми *C. purpureus*, *B. unguiculata* і *P. patens*, як і інших видів мохів, фотосинтетично активніші завдяки численним хлоропластам, тоді як каулонема сприяє розширенню меж дернинки завдяки радіальному і спіральному росту. Відомо, що баланс між хлоронемою і каулонемою залежить від інтенсивності світла та балансу фітогормонів. Утворення каулонем стимулюють високі інтенсивності освітлення, глюкоза і ауксин, але інгібують цитокініни [8, 17].

У гравітаційному полі в наземних експериментах протонема *C. purpureus*, *P. patens* і *B. unguiculata* росте у темряві негативно гравітропно. Досліди з гравістимуляції протонеми виявили, що види, використані у роботі, неоднаково гравічутливі. Найбільш гравічутливою є хлоронема *C. purpureus*, стolони якої через 6 год після гравістимуляції у темряві утворювали згин у 40° (див. кольорову вклейку, рис. VI, а). *B. unguiculata* дещо повільніше реагувала на дію гравітації, і за такий самий час кут згину хлоронемних і каулонемних стolonів дорівнював 30°. У *P. patens* гравічутливими переважно є ризоїди і каулонемні, а не хлоронемні стolони, які згинаються за 6 год гравістимуляції на 30°.

На світлі протонема *C. purpureus* росте плагіотропно, дернинка має симетрично круглу форму, радіальні стolони не вигинаються, і після диференціювання каулонем напрям росту протонеми і форма дернинки не змінюються. Інтеркалярні клітини протонеми галузяться, і новоутворені бокові стolони також ростуть радіально. Окремі каулонемні стolони на світлі не ростуть дугоподібно, тому форма дернинки залишається радіальною. Дернинка *P. patens*, яка утворилася на світлі, теж має радіальну форму, але згодом кінці головних стolonів згинаються в той або інший бік (рис. VI, б, в). Бокові галузки також ростуть спочатку прямолінійно, а потім, як і

головні столони, загинаються в один бік, і дернинка набирає спірального вигляду. На дугоподібних головних столонах розвиваються листкостеблові гаметофори (рис. VI, в). Протонема *B. unguiculata* добре розвивається на світлі, головні столони відразу відхиляються дуговидно і згодом утворюють синхронні спіральні згини, направлені проти годинникової стрілки (рис. I, з). Дернинка має чітко виражену спіральну форму. Якщо у середовище додавали глюкозу, то столони росли протилежно, ніж без глюкози — за стрілкою годинника. Азотокислий амоній істотно не впливав на характер згинів, але пришвидшував процес спіралізації дернинки, очевидно, стимулюючи диференціювання каулонемі. Не спостерігалось активації галуження і утворення столонів.

У дернинках всіх досліджуваних видів, які вирости на світлі, можна виділити центральну і латеральну частини. Центральна частина дернинки складається з ниток хлоронемного типу, які щільно прилягають одна до одної, а поза її межі вибігають окремі каулонемні столони, які утворюють латеральну зону. У *B. unguiculata* і *P. patens* якраз ці столони ростуть дуговидно. Столони з латеральної частини дернинки галузяться, з галузок виростають бокові столони, які теж закручуються, і завдяки зміні напрямку росту дернинка набуває спіральної форми.

У темряві в гравітаційному полі протонема всіх видів мохів, як вже відмічалось, виявляла негативний гравітропізм. Після перенесення негативно гравітропної протонемі в умови реальної мікрогравітації або клиностатування напрямку росту столонів різко змінювався. Під час клиностатування у темряві дернинки *S. purpureus* росли спіральні, і столони загиналися в один бік — за годинниковою стрілкою. Дернинка *S. purpureus* виглядала як зоряна спіральна туманність завдяки тому, що загиналися всі столони — головні і бокові. Частина гравітропних столонів, зокрема крайніх, відхилялася від вертикальної осі росту. Після диференціювання каулонемі з обох боків від пучка ниток утворювалися гвинтовидні спіралі столонів з виявленим латеральним гравітропізмом (рис. VI, д), які закручувалися у різні боки, так що дернинки мали віялоподібний вигляд (рис. VI, е). Спіральні дернинки утворювалися незалежно від напрямку ротації клиностата (за чи проти годинникової стрілки).

Подібні спіральні дернинки *S. purpureus* утворювалися в умовах реальної мікрогравітації в космічному польоті (рис. VI, ж).

Спіральна форма дернинки *P. patens* під час клиностатування формувалася завдяки згинам лише головних столонів. Бокові столони *P. patens* росли повільно, тому головні отримували перевагу — швидше росли, скоріше відбувалося диференціювання каулонемі і розпочинався дуговидний ріст. Протонема *B. unguiculata* на клиностаті в темряві не утворювала спіральних структур, а росла радіально. Лише на світлі столони згиналися дуговидно, і морфологічно дернинка *P. patens*, яка сформувалася на світлі, і дернинка *S. purpureus*, що виростила у темряві, виглядали однаково.

Передумовою спірального росту є диференціювання каулонемі. Особливістю каулонемних клітин є те, що змінюється нахил клітинної стінки з перпендикулярного на косий. З цього розпочинається переорієнтація прямолінійного росту столонів протонемі на дуговидний спіральний. Дослідження диференціювання протонемі різних видів мохів свідчать, що для конверсії хлоронемі у каулонему необхідні певні умови. Каулонема не утворюється при низькій освітленості (500 лк), низькій температурі (5 °C або менше), у рідкому середовищі і т. д. [4, 10]. Для нормального диференціювання протонемі у темряві використовують енергетично збагачене 0.15 М глюкозою середовище ВСЕ або Кнопа [3, 10]. Відомо також, що низькі концентрації ауксину регулюють розвиток каулонемі [8]. Поміж зазначених факторів, важливими для диференціювання протонемі є кількість клітин і погалужень столонів. Очевидно, що клітини виділяють у субстрат речовини, можливо гормони чи ферменти, які підсилюють диференціювання протонемі.

Виходячи з цього, досліджувався вплив світла, глюкози і ауксину на диференціювання каулонемі та галуження клітин головних столонів. Для експерименту використано *B. unguiculata*, тому що протонема цього виду серед інших досліджуваних видів найкраще утворює спіральні структури на світлі. Як і слід було сподіватися, низькі інтенсивності освітлення (6 мкмоль·м⁻²·с⁻¹) стимулювали утворення хлоронемі та затримували диференціювання каулонемі, хоча на субстраті з 0.15 М глюкозою

утворювалися каулонемні столони. Кількість каулонемних столонів інтенсивно зростала на високих інтенсивностях освітлення ($30 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) та під впливом глюкози (рис. 1). Внесення у середовище 1.0 мкМ НОК підвищувало кількість каулонемних столонів у дернинці до 35% порівняно з 20% у контролі. Але порівняно із

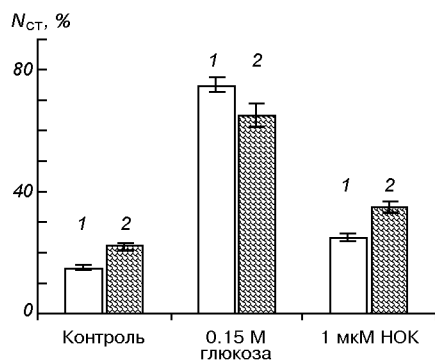


Рис. 1. Кількість $N_{ст}$ утворених каулонемних столонів *Burbula unguiculata* при різних умовах освітлення: 1 — $6 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, 2 — $30 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$

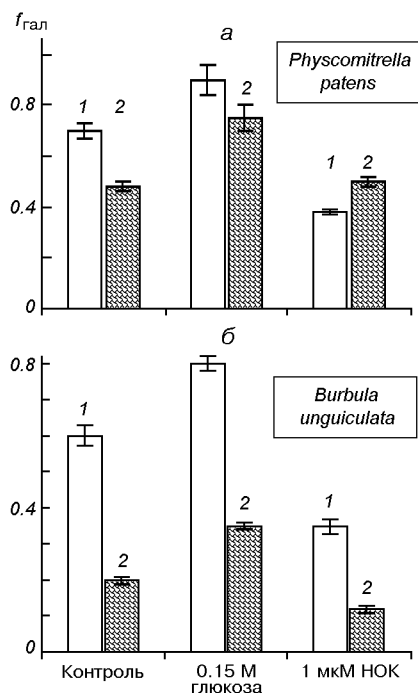


Рис. 2. Частота $f_{гал}$ утворення хлоронемних галузок під час галуження протонеми *Physcomitrella patens* (а) і *Burbula unguiculata* (б): 1 — галуження головних столонів, 2 — бокових столонів протонеми

випадком стимулювання глюкозою каулонемних столонів було набагато менше. Отже, ауксин і глюкоза більше стимулювали диференціювання каулонемні на високих інтенсивностях освітлення і менше на низьких.

Дернинка мохів наростає не лише за рахунок приросту довжини головних столонів, її розміри також збільшуються внаслідок галуження інтеркалярних клітин протонеми. Частота галуження і довжина бокових столонів змінюється залежно від умов вирощування. Для того щоб визначити, як галуження залежить від екзогенних чинників, ми проаналізували вплив глюкози і НОК на утворення і ріст галузок. Результати впливу 0.15 М глюкози і 1.0 мкМ НОК на галуження головних каулонемних столонів і бокових хлоронемних наведено на рис. 2. Використано низьку інтенсивність освітлення, тому що на $30 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ глюкоза і ауксин майже не впливали, або й інгібували частоту галуження і ріст бокових галузок. Як бачимо з рис. 2, головні столони *B. unguiculata* і *P. patens* у контролі галузяться дуже інтенсивно, глюкоза ще більше посилює галуження, а ауксин, навпаки, знижує темп галуження. Зате частота галуження бокових столонів *B. unguiculata* і *P. patens* відрізнялася. Інтенсивніше галузки закладалися у *P. patens*. Відповідно глюкоза і ауксин стимулювали їхнє галуження більше, ніж *B. unguiculata*. Спочатку бокові відгалуження росли радіально, але потім апікальні клітини починали закручуватися, утворювалися витки столонів, досить густі, що посилювало виразність спіралізації дернинки обох видів.

Крім частого галуження головних столонів *B. unguiculata* і *P. patens*, закладаються галузки і на довгих зігнутих столонах ($100\text{--}120$ клітин) переважно на одній опуклій стороні столону, тоді як на прямих столонах, котрі росли радіально, галузки формувалися по чергову з обох боків. Столони з опуклої сторони росли відразу спірално. Але у *P. patens* частіше спіральні витки утворюють довгі, а у *B. unguiculata* — короткі столони ($10\text{--}15$ клітин), яких значно більше, ніж довгих. 90% бокових хлоронемних галузок *B. unguiculata* і *P. patens* росли поволі, їхня довжина сягала $50 \pm 0.4 \text{ мкм}$, і лише 10% столонів мали довжину $170 \pm 9.2 \text{ мкм}$. Тому морфологічна форма і ступінь спіралізації дернинки обох видів відрізнялася.

Чутливість апікальних клітин до гравітації виникає на різних стадіях диференціювання протонеми і неоднакова у різних видів. У *S. purpureus* гравічутливою є хлоронема, у *Funaria hygrometrica* і *B. unguiculata* — каулонема, у *P. patens* гравітропно ростуть ризоїди і каулонема. Отже, стадія каулонеми є обов'язковою умовою спірального росту і гравічутливості, але виконує неоднакову роль у морфогенезі різних видів. У гравітаційному полі в умовах освітлення столони дернинки стеляться по поверхні субстрату, радіально, формуючи симетричні дернинки, а після диференціювання каулонеми і формування бруньок гаметофорів синхронно закручуються у вигляді спіралей. Вперше спіральні дернинки для протонеми *F. hygrometrica*, *Fissidens bryoides*, *B. unguiculata*, *Pottia truncata*, *Bryum spinosum*, *Dicranum scoparium* і *Polytrichum sp.* описали М. Боп і Л. Кофлер [7, 13, 14], а згодом А. С. Лазаренко із колегами [4]. Протонема одних видів, наприклад *P. patens*, загинається за годинниковою стрілкою, а *B. unguiculata* — проти стрілки годинника, але за інших умов нахил спіралі може змінитися на протилежний. Л. Кофлер вважав [14], що причиною спіралізації протонеми є гравітація, і ніякі ендogenous фактори не беруть участі у цьому явищі. Гравітація відіграє важливу роль у спіралізації, але у поєднанні із світлом. М. Боп [7] вказував, що орієнтація спіралі залежить від напрямку та інтенсивності освітлення. Однак зміна орієнтації спіралі під впливом низьких концентрацій глюкози означає, що напрям визначається екзогенно шляхом морфогенетичної дії гексокінази [14]. Е. Синнот [6] допускав, що спіральність ініціюється нахилом клітинної перетинки під час поділу апікальної клітини. Експериментально встановлено, що передумовою спірального росту мохів є диференціювання каулонеми з косими міжклітинними перетинками. Наявність косих перетинок свідчить про те, що апекс апікальної клітини поступово зміщується, а його напрям може визначатися нахилом веретена під час першого клітинного поділу. Припускається, що організація тубулінових елементів цитоскелету в апікальних клітинах може змінюватися під впливом гравітації чи фітогормонів [16]. Ми показали, що клітини спіральних столонів каулонеми після клиностакування мають довгі товсті тяжі мікротрубочок (МТ), які розмі-

щуються паралельно до клітинної стінки [9, 12]. Тобто, спіральна форма клітин каулонеми супроводжується такою ж орієнтацією МТ. С. Тітамаді зі співробітниками припускають, що МТ якимось чином включаються у спіральний ріст і можуть бути частиною механізму контролю за формою росту клітин кореня *Arabidopsis* [18].

У темряві саме через відсутність світла ріст протонеми відбувається строго в одному напрямі — негативно гравітропно. В умовах мікрогравітації або клиностакування нитки сформованого негативно гравітропного пучка «розбігаються» у різні сторони та закручуються [2, 11]. На нашу думку, між окремими столонями протонеми є взаємовпливи, які на фоні поляризаційної дії гравітації морфологічно не проявляються. Крім такої взаємодії, відомої як «груповий ефект», певну роль у цьому явищі може відігравати електрична поляризація клітин протонеми мохів [3]. Поверхня інтеркалярних клітин протонеми заряджена позитивно і розходження столонів може зумовити відштовхування однойменних зарядів.

Чи можна радіальний і спіральний ріст пояснити автономними програмами апікальних клітин або протонеми взагалі? Позитивну відповідь на це питання дають проведені нами лабораторні експерименти, в яких формування спіральних структур у *B. unguiculata* відбувалося на світлі в умовах нормальної гравітації, а у *S. purpureus* у темряві в умовах клиностакування, та унікальні космічні експерименти в умовах реальної мікрогравітації, в яких спіральні дернинки формувалися при відсутності гравітації та світла, тобто виявляли автономність спірального росту від дії гравітації та світла.

Одержані дані свідчать про спадковий характер морфогенезу дернинок мохів та наявність ендogenous регуляторів росту протонеми, прояв яких маскується в земних умовах гравітацією та світлом.

1. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. — М.: Наука, 1964.— 272 с.
2. Демків О. Т., Кордюм Е. Л., Таїрбеков М. Г. та ін. Гравіморфогенез протонеми листяних мохів // Доп. НАН України.—1998.—№ 7.—С. 163—166.
3. Демків О. Т., Федьк Я. Д. Полярність кліткової проникності і її контроль фітохромом // Биофизика.—1977.—22, 5.—С.

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. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990.—352 с.
6. Синнот Э. Морфогенез растений. — М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1963.—603 с.
7. Bopp M. Versuche zur Analyse von Wachstum und Differenzierung des Laubmoosprotonemas // Planta.—1959.—53.—S. 178—197.
8. Bopp M. Developmental Physiology of Bryophytes // New Manual Biology / Ed. R. M. Schuster. — The Hattori Bot. Lab. Nichinan, 1983.—P. 276—324.
9. Demkiv O. T., Khorkavtsiv Ya. D. Pundiak O. I. Changes of protonemal cell growth related to cytoskeleton organization // Cell Biology International.—2003.—27, N 3.—P. 187—189.
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. Kern V. D., Schwuchow J. M., Reed D. W., et al. Gravitropic moss cells default to spiral growth on the clinostat and in microgravity during spaceflight // Planta.—2005.—221.—P. 149—157.
12. Khorkavtsiv O. Ya., Kardash O. R. Gravity-dependent reactions of the moss *Pohlia nutans* // Adv. Space Res.—2001.—27, N 5.—P. 989—993.
13. Kofler L. Croissance spiralee du protonema de *Funaria hygrometrica* (L.) Sibth. — Paris: C. R. Acad. Sci., 1957.—245.—P. 1823—1825.
14. Kofler L. Contribution a l'etude biologique de mousses cultivees in vitro: germination de spores, croissance et developpement du protonema chez *Funaria hygrometrica* // Revue Bryol. Lichen.—1959.—28, N 1-2.—P. 1—202.
15. Nick P. Signaling to the microtubular cytoskeleton in plants // Int. Rev. Cytol.—1998.—184.—P. 140—144.
16. Moore B., Zhou L., Rolland F., et al. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor *HXK1* in nutrient, light and hormonal signalling // Science.—2003.—300.—P. 332—336.
17. Reski R. Development, genetics and molecular biology of mosses // Bot. Acta.—1998.—111.—P. 1—15.
18. Thitamadee S., Tuchiara K., Hashimoto T. Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis* // Planta.—2002.—417.—P. 193.

MICROGRAVITY IS THE EXPERIMENTAL BASIS FOR UNDERSTANDING OF THE PECULIARITIES OF PLANT MORPHOGENESIS IN THE GRAVITATIONAL FIELD

O. T. Demkiv, Ye. L. Kordyum, Ya. D. Khorkavtsiv, M. G. Tairbekov

Spiral growth of the gravisensitive protonema of *Ceratodon purpureus* moss is revealed in real microgravity during space flight. Caulonema differentiation with oblique cell partitions and deviation of an apical cell growth zone from the growth horizontal axis were shown to precede the stolon spiralization. The slope of subapical cell walls enables an apical cell to revolve on its long axis, overcome the substrate and gravity resistance, and become twisted. Investigations of *C. purpureus*, *Burbula unguiculata* and *Physcomitrella patens* protonema growth in the conditions of 1 g, real and simulated microgravity (clinorotation) in darkness and under different light intensity and nutrient medium composition show that protonema morphogenesis is above all regulated by endogenous signals, action of which is concealed by gravity or light on the Earth.