

О.В. ЛОБАЧЕВСЬКА

Інститут екології Карпат НАН України
вул. Стефаніка, 11, м. Львів, 79000

НОВІ ВИДИ МОХІВ З ГРАВІТРОПНОЮ ПРОТОНЕМОЮ

ключові слова: мохоподібні, протонема, амілопласти, гравічутливість
key words: bryophytes, protonemata, amyloplasts, gravisensitivity

O.V. LOBACHEVSKA

NEW MOSS SPECIES WITH GRAVITROPIC PROTONEMATA

Institute of Ecology of the Carpathians NAS of Ukraine
11 Stephanyk Str., Lviv, 79000, Ukraine

8 new gravitropic species were found: *Bryum argenteum*, *B. caespiticium*, *B. intermedium*, *Leptobryum pyriforme*, *Dicranella cerviculata*, *D. heteromalla*, *D. varia*, *Pottia truncata*. It was established that the increase of gravisensitivity directly correlates with increase of growth rate of gravistimulated bends. On the basis of comparative analysis of the gravitropic protonemal stolons it was established that gravisensitivity of mosses increase with extending of the length of the zone maximum sedimentation plastids and decreasing the value of ratio lengths of apical cell and of zone with amyloplasts.

Уперше гравітропні реакції були виявлені та проаналізовані у гравітропних органах (пагонах і коренях) квіткових рослин [6]. Пізніше було встановлено [7], що не тільки органи вищих рослин, але й водорості можуть проявляти чутливість до гравітації. Гравітропізм органів квіткових рослин і нитчастих структур – ризоїдів водоростей *Chara* фундаментально відрізняються між собою організацією клітин та природою статолітів. В органах квіткових рослин роль статолітів виконують амілопласти, а в клітинах водорості *Chara* – кристали $BaSO_4$. З часом число об'єктів, в яких виявили гравічутливість, збільшилося завдяки гравітропній протонемі небагатьох видів мохів. У клітинах протонемі мохів, як і в гравічутливих органах квіткових рослин, є амілопласти, які седиментують під дією гравітації.

Особливість протонемі, як й інших структур з апікальним ростом, сприймати та реагувати на гравітацію єдиною апікальною клітиною, посприяла її швидкому запровадженню у дослідження механізмів гравітропізму. Найчастіше дослідники використовували протонему *Ceratodon purpureus* [4], аж поки не дослідили протонему *Funaria hygrometrica* та *Pottia intermedia* [3], а потім *Pohlia nutans* [5]. Виявилось, що у всіх видів мохів протонема містить амілопласти, які седиментують під впливом гравітації на нижню сторону бокової стінки, якщо протонему зорієнтувати горизонтально. Установлено, що в усіх випадках орієнтації пластиди осідають регулярно, переміщаючись донизу.

Крім анатоμο-морфологічних відмінностей протонемі мохів різних видів властиві специфічні морфогенетичні реакції у відповідь на дію

гравітації, які зумовлені різницями довжини зони седиментації, числа та величини амілопластів. Так, зі спор *Funaria hygrometrica* під час проростання перший ризоїдальний проросток орієнтується позитивно гравітропно, а другий – у протилежну сторону (негативно гравітропно). Після цього чутливість не тільки ризоїдів, але й хлоронеми різко знижується [1]. На відміну від *F. hygrometrica*, проростання спор протонеми *P. nutans* нечутливе до гравітації, але її чутливість поступово зростає з ростом та розвитком протонеми [2]. У протонемі *P. intermedia*, крім гравітропізму, проявляється також гравіморфоз, коли під впливом низької інтенсивності світла апікальні клітини гравітропної протонеми перетворюються у бруньки гаметофорів [8].

Обмежена кількість видів, які використовують для експериментальних досліджень гравітропізму, спонукала нас до пошуку нових об'єктів, придатних для вивчення механізмів гравірецепції на клітинному рівні. У зв'язку з цим, ми провели збори нових видів мохів для аналізу їх чутливості до гравітації та встановлення нових проявів гравітропних реакцій у ростових рухах протонеми мохів.

Об'єкти та методи досліджень

Бріологічний матеріал збирали в природі (у Львівській та Тернопільській областях). Стерильну лабораторну культуру різних видів мохів отримували зі спор. Зі зразків, зібраних у природі, для посіву відбирали закриті коробочки. Перед посівом коробочки стерилізували 0,1% розчином сулеми 1 хв., промивали декілька разів стерильною водою та відкривали над бюксиком з 1-2 мл дистильованої води. Суспензію спор у бюксикі струшували, щоби спори рівномірно розподілилися у розчині та висівали у чашки Петрі на поживне середовище Кноп-П з 0,75% бакто-агаром. Краї чашок обгортали парафіном і виставляли у люмінестат на біле світло.

Культури вирощували у контрольованих умовах освітлення (2,0-2,2 тис. лк), температури (20-22,5° С), вологості (90-95%) і в 16-годинному світловому режимі. Спостереження за характером проростання та росту спор проводили під мікроскопом „Jenaval” безпосередньо в чашках Петрі, не порушуючи стерильності матеріалу.

Для дослідження гравічутливості моху на стадії проростання, спори з простерилізованих закритих коробочок висівали на агаризоване середовище з 0,2% глюкозою. Чашки поміщали у чорні пакети й орієнтували під кутом 90° до горизонтальної площини. Для аналізу гравічутливості протонеми на 7-10 день протонемні нитки, що виростили зі спор на білому світлі, знімали препаративною голкою з агару й у вигляді клубка переносили на агаризоване середовище, в яке додавали 0,2% глюкози. Чашки поміщали у темряву у вертикально орієнтовані чашки. Для аналізу гравічутливості пагонів, гаметофори, що утворилися на світловій протонемі, знімали пінцетом і клали горизонтально на агар з 0,2% глюкозою. Чашки вставляли у чорні пакети, а пакети ставили вертикально. У темряві, у вертикально орієнтованих чашках, протонема росла по агару вгору. Через 5-7 днів утворювався пучок густих столонів, орієнтованих негативно гравітропно, які використовували в усіх наступних експериментах. Гравістимуляцію протонеми, тобто зміну її положення відносно вектора гравітації, здійснювали шляхом повертання чашок на 90° на

17-20 год., унаслідок чого протонема виявлялася у горизонтальному положенні.

Величина кута згину верхівок апікальних клітин була параметром, за допомогою якого оцінювали ефективність гравітропної ростової реакції. Кут вимірювали у зеленому світлі на мікроскопі МБИ-6. Одночасно вимірювали довжину згину і вираховували швидкість росту як частку від ділення довжини ниток після згину на час, за який він утворився. Цитохімічні дослідження апікальних клітин проводили з використанням методів вибіркового фарбування крохмалю. Наявність та розподіл крохмальних зерен (амілопластів) у різних зонах клітини визначали після їх фарбування розчином K_2I й аналізували під мікроскопом „Jenaval”.

Усі експерименти й аналізи проводили у 5 повторностях, аналізуючи не менше 25 столонів і не менше 50-ти клітин у кожному з них.

Результати досліджень та їх обговорення

Стерильну культуру протонеми зі спор отримали для 48 видів листко-стеблових мохів (36 верхоплідних видів і 12 бокоплідних). Установлено, що більшість проаналізованих видів негравічутливі як на стадії проростання спор, так протонеми, і пагонів. Гравічутливими визначено 8 верхоплідних видів: *Bryum argenteum*, *B. caespiticium*, *B. intermedium*, *Leptobryum pyriforme*, *Dicranella cerviculata*, *D. heteromalla*, *D. varia*, *Pottia truncata*. Усі параметри гравічутливості цих видів (кількість негативно гравітропних ниток, утворених на клубок протонеми чи пагону, кут гравітропного згину) порівнювали з показниками гравічутливого моху *Ceratodon purpureus* (як контролю).

Для 8 нових гравічутливих видів дослідили кореляцію між кількістю, розподілом амілопластів та гравітропним ростом апікальних клітин (табл. 1). Амілопласти в апікальній клітині мали різні розміри та форму: від округлих і овальних до веретеноподібних, від великих (2,5-3,0 мкм) до дуже дрібних (0,3-0,5 мкм). Вони по-різному розташовувалися у клітинах: окремо один від одного або щільно, майже злипалися між собою. Великі округлі амілопласти найчастіше перерозподілялися під час зміни напрямку гравістимулу і зосереджувалися переважно в зоні седиментації, тоді як дрібні, круглі та веретеноподібні майже не змінювали свого положення і не осідали. У більшості досліджених видів верхівка апікальної клітини вільна від пластид. Установлено, що у *Ceratodon purpureus* [9] у цій зоні знаходяться тільця Гольджі, які постачають екзоцитозні везикули для росту клітинної стінки в апексі верхівкової клітини. У досліджених нами *Dicranella cerviculata*, *Leptobryum pyriforme*, *Bryum intermedium* часто знаходили один великий, рідше два амілопласти у зоні верхівки апікальної клітини, де не спостерігається седиментації, аналогічно як у *C. purpureus* [10]. Гравітропна протонема *Dicranella cerviculata* найчастіше (до 50%) має верхівковий амілопласт в апікальній клітині каулонеми і хлоронеми, в інших видів амілопласти переважно відсутні. Наявність таких верхівкових амілопластів не впливала на ступінь гравічутливості клітин і не виявляла зв'язку зі седиментацією пластид.

В апікальних клітинах досліджених нами видів виявлено зони пластид, які не седиментували під час гравістимуляції. У більшості вертикально й го-

ризонтально ростучих клітин такі зони знаходилися базальніше від місця седиментації амілопластів. Для *C. purpureus* і *Physcomitrium pyriforme* показано, що амілопласти, які не осідають, знаходяться перед зоною седиментації [10].

У всіх гравістимульованих видів спостерігали седиментацію амілопластів до нижньої стінки в горизонтальних клітинах (бічна седиментація) й уздовж довжини апікальної клітини (осьова седиментація). Особливо виділялася зона седиментації великих, круглих пластид у мохів з вищою гравічутливістю. Серед досліджених нами видів седиментація амілопластів найкраще виражена у *Dicranella cerviculata*, *Leptobryum pyriforme*, *Bryum argenteum*. У видів *Dicranella varia*, *D. heteromalla*, *Bryum intermedium* седиментацію амілопластів визначали за наявністю вузької полоски у цитозолі вздовж верхньої клітинної стінки або за скупченням седиментуючих пластид у зоні перед ядром.

В апікальних клітинах вертикальної гравітропної протонеми амілопласти седиментували уздовж осі клітини у напрямі до ядра, і в жодному випадку не спостерігали осідання пластид ні донизу, ні до апексу клітини, що характерно для статоцитів квіткових рослин.

Підрахунок амілопластів в апікальних клітинах мохів показав, що їх кількість істотно не відрізнялася між видами і не залежала від ступеня гравічутливості моху (табл. 1). Проведені дослідження підтверджують думку, що кількість амілопластів не визначає гравічутливість видів.

На підставі отриманих результатів можна стверджувати, що гравічутливість мохів зростає з підвищенням довжини зони седиментації амілопластів (віддаль до ядра) і зменшенням величини співвідношення довжини клітини до довжини зони з амілопластами (D/d) (табл. 1).

Спори більшості досліджуваних мохів не проростали у темряві. У *Pohlia elongata*, *Brachythecium salebrosum*, *Didymodon rigidulus*, *Fissidens bryoides* спори проростали лише на 5-7 день, але росли повільно та неполярно, тобто незалежно від дії гравістимулу. Переважно первинні ростки цих видів швидко припиняли ріст і поступово відмирили. У таких видів як *Dicranella cerviculata*, *Leucobryum pyriforme*, *Bryum caespiticium* і *B. argenteum* під час проростання спор перший росток, як і ростки, які утворилися набагато пізніше, росли негативно гравітропно. Для таких видів як *Dicranella heteromalla* і *D. varia* характерна висока дисперсія кутів згину як негативно, так і позитивно гравітропних первинних ростків.

Кожна спора перед проростанням містила переважно по 5-8 амілохлоропластів (табл. 2). Протягом формування ростків загальна кількість амілохлоропластів у спорі зростала внаслідок їх поділу у спорі. Згодом вони переміщалися у первинний ризоїд і хлоронему. На стадії протонеми після 18-20 год гравістимуляції встановлені такі значення кута гравітропного згину: *Pottia truncata* ($65,6 \pm 2,9$); *Leptobryum pyriforme* ($65,7 \pm 1,2$); *Bryum argenteum* ($41,1 \pm 4,3$); *B. caespiticium* ($37,2 \pm 1,7$); *B. intermedium* ($33,3 \pm 3,4$); *Dicranella cerviculata* ($66,8 \pm 1,8$); *D. heteromalla* ($36,2 \pm 1,7$) і *D. varia* ($36,7 \pm 1,6$).

Таблиця 1.

Показники гравічутливості апікальних клітин мохів

Назва виду	Кут граві- тропного згину	Швидкість росту, мкм/год	Довжина клітини (D), мкм	Довжина зони з амілопластами (d), мкм	К-сть аміло- пластів, штук	D/d
<i>Ceratodon urpureus</i>	85,5±16,5	30,0	189,6±10,8	113,2±8,0	32,3±1,5	1,67
<i>Dicranella cerviculata</i>	66,8±3,2	25,1	185,2±12,0	80,0±4,1	27,5±4,0	2,31
<i>Leptobryum pyriforme</i>	65,9±1,8	24,2	211,2±14,9	88,5±4,3	26,0±4,5	2,38
<i>Pottia truncata</i>	65,6±2,9	20,0	198,0±9,6	94,0±8,0	27,1±3,2	2,10
<i>Bryum argenteum</i>	41,1±5,3	10,7	129,2±4,7	54,9±4,3	24,3±1,1	2,35
<i>B. caespiticium</i>	37,2±1,7	18,0	130,0±24,1	54,0±3,2	25,1±1,3	2,41
<i>B. intermedium</i>	33,3±3,4	17,3	110,7±6,0	44,8±16,0	25,8±1,8	2,47
<i>Dicranella varia</i>	36,7±1,6	15,2	101,5±2,0	36,4±2,0	23,5±1,5	2,79
<i>D. heteromalla</i>	36,2±1,7	23,3	167,3±5,7	39,2±17,5	24,0±1,4	4,27

Розподіл амілохлоропластів у проростаючих спорах гравічутливих мохів

Назва виду	Кількість амілохлоропластів:		
	у спорі перед проростанням	у пророслій спорі з двома ростками	у двох первинних ростках
<i>Bryum argenteum</i>	4,1±0,3	5,2±0,3	5,7±0,4
<i>B. caespiticium</i>	4,6±0,3	5,9±0,2	6,3±0,4
<i>Leptobryum pyriforme</i>	6,0±0,3	8,7±0,2	9,7±0,4
<i>Dicranella cerviculata</i>	8,5±0,3	10,0±0,3	13,3±0,5
<i>D. heteromalla</i>	5,6±0,4	6,7±0,4	7,2±0,2
<i>D. varia</i>	4,9±0,3	5,5±0,4	6,7±0,4
<i>Pottia truncata</i>	8,2±0,4	9,9±0,5	12,1±0,5
<i>Ceratodon purpureus</i>	7,5±0,4	10,1±0,4	11,6±0,5

Ці види між собою відрізняються за кількістю та швидкістю утворення гравітропних ниток і за гравічутливістю від *Ceratodon purpureus* (85,5±0,7).

Гравічутливість проаналізованих видів змінювалася залежно від стадії розвитку гаметофіту. Листкостеблові пагони *Leptobryum pyriforme* виявилися менше гравічутливими (32,3°±1,3°), ніж протонема. Гравічутливість ниток, які утворилися у темряві з пагонів, на відміну від тих, що виростили з протонем, знижувалася й у *Bryum argenteum* (39,2°±4,1°) і *Dicranella varia* (24,9°±1,8°). Тоді як у *Bryum caespiticium* (59,9°±1,5°) і *Pottia truncata* (70,6°±2,1°) гравічутливішими виявилися столони протонем з пагонів. У *B. caespiticium* утворювалася велика кількість ниток гравітропної протонем вздовж усього пагона (33,8±3,7 шт.), а в інших видів нитки росли переважно полярно – лише на верхівці і в основі стебла, але не більше 10 на 1 пагін. У лабораторній культурі *Dicranella cerviculata* і *D. heteromalla* гаметофорів утворювалося мало, вони повільно розвивалися, тому визначити їх гравічутливість нам не вдалося.

Гравічутливість протонем з пагонів *Bryum caespiticium* зростала з підвищенням швидкості їх росту (25,5 мкм/год), порівняно зі столонами з протонем (18,0 мкм/год). У *Pottia truncata* швидкість росту гравітропних столонів збільшувалася від 20,0 мкм/год. (протонема) до 22,3 мкм/год (пагони), тоді як у *Dicranella varia* швидкість росту протонем з пагонів знижувалася майже вдвічі – від 14,1 мкм/год до 7,8 мкм/год. На основі порівняльного аналізу росту гравітропних столонів встановлено, що підвищення гравічутливості протонем з пагонів корелює зі зростанням швидкості росту столонів.

Висновки

Виявлено 8 нових видів, чутливих до гравітації: *Bryum argenteum*, *B. caespiticium*, *B. intermedium*, *Leptobryum pyriforme*, *Dicranella cerviculata*, *D. heteromalla*, *D. varia*, *Pottia truncata*, гравічутливість яких змінюється залежно від стадії розвитку. Швидкість гравітропного згину протонемних столонів цих видів залежить від розміру зони седиментації амілопластів та їх величини. Для апікальних клітин протонем, які ростуть у темряві негативно

гравітропно, параметри кількості, розмірів і розміщення амілопластів дуже мінливі та змінюються залежно від віку гравічутливої протонеми, типу протонемних стolonів (каулонемного чи хлоронемного), та тривалості дії гравістимулу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пундяк О., Демків О., Хоркавців Я., Багрій Б. Полярність проростання спор *Funaria hygrometrica* Hedw. // Космічна наука і технологія. – 2002. – 8, № 1. – С. 96-100.
2. Хоркавців О.Я., Демків О.Т., Хоркавців Я.Д. Роль кальцію у гравітропізмі протонеми *Pohlia nutans* Hedw. (Lindb.) // Космічна наука і технологія. – 2002. – 8, № 1. – С. 90-95.
3. Chaban Ch.I., Kern V.D., Ripetskyj R.T. et al. Gravitropism in caulonemata of the moss *Pottia intermedia* // J. Bryology. – 1998. – 20 – P. 287-299.
4. Cove DJ, Schild A, Ashton NW, Hartmann E. Genetic and physiological studies of the effect of light on the development of the moss *Physcomitrella patens* // Photochem Photobiol. – 1978. – 27. – P. 249-254.
5. Demkiv O.T., Kordyum E.L., Kardash O.R. Khorkavtsiv O.Ya. Gravitropism and phototropism in protonemata of the moss *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. // Adv. Space Res. – 1999. – 23, № 12. – P. 1999-2004.
6. Knight T.A. On the direction of the radicle and germen during the vegetating of seeds // Philos. Trans. Roy. Soc. London. – 1806. – 96. – P. 99-128.
7. Pilet P.E., Greppin H., Bonzon M. Action de l'acide gibberellique sur la densité des amyloplastes racinaires. // C.r. Acad. Sci. Paris, 1971. – 272, № 13. – P. 1760-1763.
8. Ripetskyj R.T., Kit N.A., Chaban C.I. Gravity Effects on the Growth and Development of Moss Secondary Protonemata // Adv. Space Res. – 1998. – 21, № 8/9. – P. 1135-1139.
9. Sack F.D. Plant gravity sensing // Int. Rev. Cytol. – 1991. – 127. – P. 193-252.
10. Schwuchow J., Kern V., White N., Sack F.D. Conservation of the plastid sedimentation zone in all moss genera with known gravitropic protonemata // Journ. of Plant Growth Regulation. – 2002. – 21. – P. 146-155.