

О.Т. ДЕМКІВ, Я.Д. ХОРКАВЦІВ,
Н.Я. КИЯК, Н.А. КІТ

Інститут екології Карпат НАН України
вул. Козельницька, 4, Львів, 79026, Україна

ВПЛИВ ГРАВІТАЦІЇ НА ФОТОМОРФОГЕНЕЗ ПРОТОНЕМИ *POTTIA INTERMEDIA* (TURN.) FÜRNR., POTTIALES

Ключові слова: бруньки, фітогормони, фітотропіни, гравітація.

Тривале вирощування протонеми мохів у темряві сприяє швидшому закладанню бруньок гаметофорів на світлі. Експериментальні дослідження розвитку регенеративної гаплоїдної і диплоїдної протонем *Pottia intermedia* (Turn.) Fürng. свідчать про те, що обидва цитотипи реагують на дію гравітації прискореним формуванням бруньок в апікальній частині стolonів. На диплоїдній протонемі активація бруньок була слабшою, ніж на гаплоїдній. Нами встановлена відмінність у послідовності етапів закладання бруньок залежно від плоїдності: на стolонах гаплоїдної протонемі спочатку закладаються бруньки гаметофорів, а вже при їх основі утворюються ризоїдальні відгалуження. Диплоїдні стolони наперед галузилися, а потім всередині відгалужень формувалися бруньки гаметофорів. Розвиток бруньок стимулювали екзогенні фітогормони — кінетин та індолілоцтова кислота (ІОК). Кінетин активував закладання бруньок гаметофорів в обох цитотипах *P. intermedia*, але у диплоїда дія фітогормону була сильнішою, ніж у гаплоїда. Вплив ІОК на брунькоутворення показано за допомогою фітотропіну НФК (N-1-нафтилфталомова кислота), який інгібує транспорт білків-переносників ауксину. НФК блокувала формування бруньок, а інгібуючий вплив фітотропіну усував синтетичний ауксин 1-НОК (1-нафтилоцтова кислота). Таким чином, під впливом гравітації і за участю ауксинів та цитокінінів прискорюється розвиток гаметофіта *P. intermedia*.

Розвиток мохів включає різні етапи диференціювання. На ювенільній стадії розвивається протонема, яка диференціюється на хлоронему і каулонему. Завершується розвиток протонемі формуванням листостеблових пагонів — гаметофорів. Встановлено, що диференціювання клітин протонемі відбувається поступово, завдяки їх здатності набувати компетенції до розвитку [2, 7]. Гаметофіт моху *P. intermedia* розвивається як і в інших видів мохів, за винятком хіба що прискореного утворення бруньок гаметофорів переважно у центрі дернинки [8].

Наші дослідження розвитку гаметофіта *P. intermedia* засвідчили, що формування бруньок можна значно стимулювати [11]. Після перенесення гравітропної протонемі з темряви на світло апікальні клітини під впливом освіт-

лення низької інтенсивності безпосередньо перетворювалися на бруньки гаметофорів без формування розгалуженої протонемної дернинки. Бруньки гаметофорів дуже рясно розвивалися на кожному столоні гравітропної протонеми: часом по декілька бруньок закладалося на одній апікальній клітині, а також на бічних відгалуженнях субапікальних клітин. З нижніх клітин бруньок утворювалися ризоїди, а самі бруньки розвивалися у листостеблові пагони. Інтеркалярні клітини гравітропних столонів, як правило, не галузилися. Шляхом регенерації спорофіта мохів, зокрема й *P. intermedia*, можна отримати гаметофіт з подвоєним числом хромосом, тобто диплоїд [5]. Диплоїди розвиваються так само, як і гаплоїди, хіба що ростуть повільніше.

Нашою метою було дослідити, чи впливає рівень плоідності гаметофіта на гравізалежне формування бруньок, а також розкрити роль фітогормонів у реалізації розвитку бруньок на апікальних клітинах гаплоїдної і диплоїдної протонем *P. intermedia*.

Матеріал і методика досліджень

Дернинки *P. intermedia* зі спорогонами збирали неподалік від с. Батятичі під Львовом. Завдяки високій регенераційній здатності з листків пагонів отримали гаплоїдну протонему, а зі спорогонів — диплоїдну. Листостеблові пагони і спорогони стерилізували 5 %-м розчином хлораміну протягом 2 хв, тричі відмивали стерильною дистильованою водою, розрізали матеріал на шматочки і клали для регенерації на агаризоване живильне середовище Кнопа в чашки Петрі. Роботу виконували стерильно в ламінарі. Регенеративна протонема розвивалася у люмінестаті в контрольованих умовах освітлення 2500—3000 лк, яке забезпечувалося лампами БЛ-40, і 16-годинному фотоперіоді [1].

Через 14—18 діб на гаплоїдній і диплоїдній протонемах утворилися гаметофори, які ізолювали і клали для регенерації на середовище з 0,2 %-ною глюкозою. До живильного середовища додавали окремо $5 \cdot 10^{-7}$ — 10^{-5} М кінетину і $3 \cdot 10^{-6}$ — 10^{-5} М НФК, а також суміш $3 \cdot 10^{-6}$ М НФК + 10^{-6} М 1-НОК. Чашки обгортали чорним папером і ставили вертикально на 7—10 діб, щоб отримати гравітропну протонему. Частину чашок розмістили на горизонтальному кліностаті, який обертався зі швидкістю 2 об./хв. У вертикально орієнтованих чашках протонема мала вигляд паралельних столонів, які росли вгору по агару. На кліностаті протонема росла у різні боки, формуючи радіально симетричну дернинку. Чашки з гаплоїдною і диплоїдною протонемами *P. intermedia* виставляли на 3 доби в умови низької інтенсивності освітлення (50—100 лк), підраховували загальну кількість бруньок на дернинці й окремих гравітропних столонах та аналізували їх розташування.

Результати досліджень та їх обговорення

Ізолювані листостеблові пагони регенерують протонемою, яка росте у темряві негативно гравітропно. Ріст протонеми відбувається за рахунок видоуження і поділів апікальних клітин. Середня швидкість її росту становить 20—

30 мкм/год і за 7 діб довжина столонів досягає 4 мм. У темряві столони *P. intermedia* не галузяться. З апікальних клітин головних столонів гравітропної протонеми після перенесення культури на біле світло поступово утворюються бруньки гаметофорів (рис. 1).

Насамперед бруньки закладаються тільки на апікальній клітині і їх може бути 2—4 або навіть більше, а через 10—15 діб вони розвиваються й на інших клітинах уздовж усього столону. На гаплоїдній протонемі диференціювання бруньок у гаметофори відбувається водночас з галузненням протонеми і формуванням ризоїдів. На диплоїдній протонемі *P. intermedia* бруньки також утворюються на апікальних клітинах, однак диплоїдна протонема спочатку галузиться — у цьому полягає відмінність між гаплоїдною і диплоїдною протонемами. Лише після цього в центрі розгалуження закладається брунька. Отже, послідовність етапів диференціювання ризоїдів і бруньок на гаплоїдній та диплоїдній протонемах є різною. Якщо на гаплоїдній протонемі спершу закладаються бруньки гаметофорів, а потім утворюються ризоїди, то диплоїдна спочатку густо розгалужується, а вже наступним етапом є формування бруньок. Прискорений розвиток як гаплоїдної, так і диплоїдної гравітропної протонеми може бути зумовлений тим, що у темряві під впливом спрямованої дії сили тяжіння посилюється атрагуюча здатність апікальної клітини, внаслідок чого саме в апікальній клітині нагромаджуються сполуки, які роблять її компетентною до брунькоутворення.

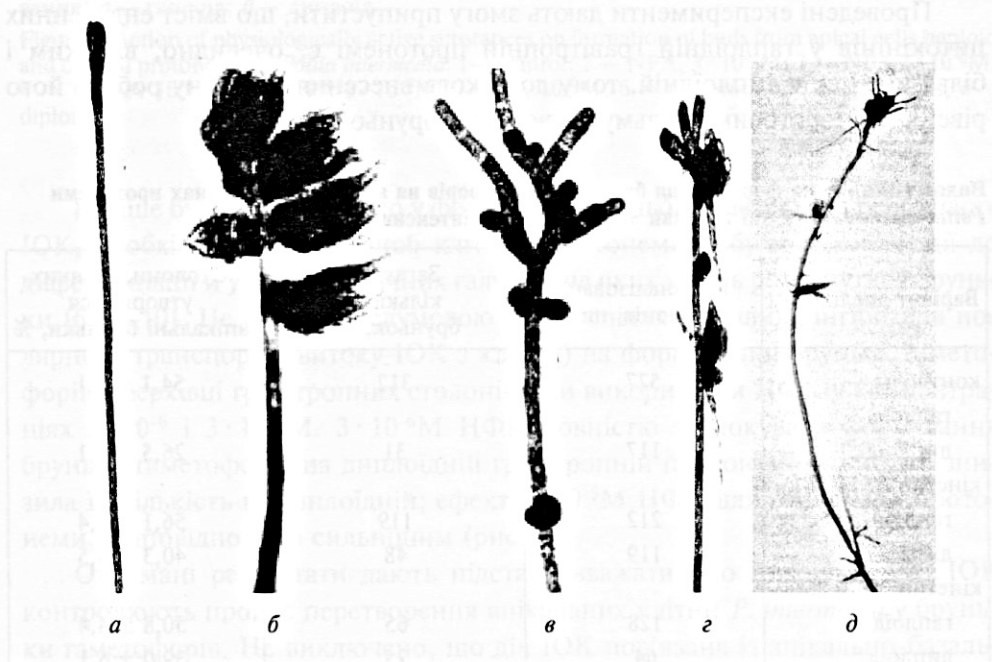


Рис. 1. Формування бруньок гаметофорів на гаплоїдній (а, б) і диплоїдній (в, з) протонемах та на гаплоїдній протонемі після кліностакування (д). Зб.: а, б, в, з — $\times 125$; д — $\times 50$
 Figure 1. Formation of buds gametophores from apical cells on haploid (a, b), diploid (v, z) and after clinostatation (d) gravitropic protonemata *Pottia intermedia*. a, б, в, з — $\times 125$; д — $\times 50$

Щоб зняти вплив гравітації ми використали кліноSTAT і проаналізували утворення бруньок на протонемі, яка виросла після кліноSTATування. Як виявилось, незалежно від рівня плідності характер морфозів такої протонемі відрізнявся від гравітропної. У стаціонарних умовах земного тяжіння 1 g бруньки гаметофорів здебільшого закладалися на верхівці гравітропної протонемі, а після кліноSTATування — по всій довжині столону. Максимальною кількістю бруньок була посередині кожного столону. В обох випадках на гаплоїдній протонемі закладалося значно більше бруньок, ніж на диплоїдній.

Досліджуючи диференціювання протонемі, М. Бопп [6] показав, що кінетин вибірково активує закладання бруньок гаметофорів. Ми виходили з цього факту, досліджуючи вплив кінетину на формування бруньок на гаплоїдній і диплоїдній протонемах *P. intermedia* (таблиця).

Всі концентрації кінетину ($5 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-6}$ і $5 \cdot 10^{-5}$ М) стимулювали утворення бруньок гаметофорів на гравітропній протонемі диплоїдної лінії *P. intermedia* значно сильніше, ніж гаплоїдної. Низька концентрація фітогормону ($5 \cdot 10^{-7}$ М) стимулювала утворення бруньок лише на диплоїдній протонемі. Кінетин у концентрації $5 \cdot 10^{-5}$ М справляв стимулюючу морфогенетичну дію на диплоїдній протонемі і кількість бруньок на дернину порівняно з контрольним варіантом була вищою. Проте для гаплоїдної протонемі така концентрація виявилася надоптимальною й істотно інгібувала брунькоутворення ($t_{\text{експ}} = 3,02$).

Проведені експерименти дають змогу припустити, що вміст ендогенних цитокінінів у гаплоїдній гравітропній протонемі є, очевидно, високим і більшим, ніж у диплоїдній, тому додаткове внесення кінетину робить його рівень надпороговим і гальмує утворення бруньок.

Вплив кінетину на формування бруньок гаметофорів на апікальних клітинах протонемі *Pottia intermedia* (7 діб темряви + 72 год світла інтенсивністю 100 лк)

Варіант досліджу	Проаналізовано столонів, шт.	Загальна кількість бруньок, шт.	Столони, на яких утворилися апікальні бруньки, %
контроль:			
гаплоїд	577	312	54,1 ± 2,1
диплоїд	117	31	26,5 ± 4,1
кінетин $5 \cdot 10^{-7}$ М:			
гаплоїд	212	119	56,1 ± 3,4
диплоїд	119	48	40,3 ± 4,5
кінетин $5 \cdot 10^{-6}$ М:			
гаплоїд	128	65	50,8 ± 4,4
диплоїд	64	25	39,0 ± 6,1
кінетин $5 \cdot 10^{-5}$ М:			
гаплоїд	157	64	40,8 ± 3,9
диплоїд	139	58	41,7 ± 4,2

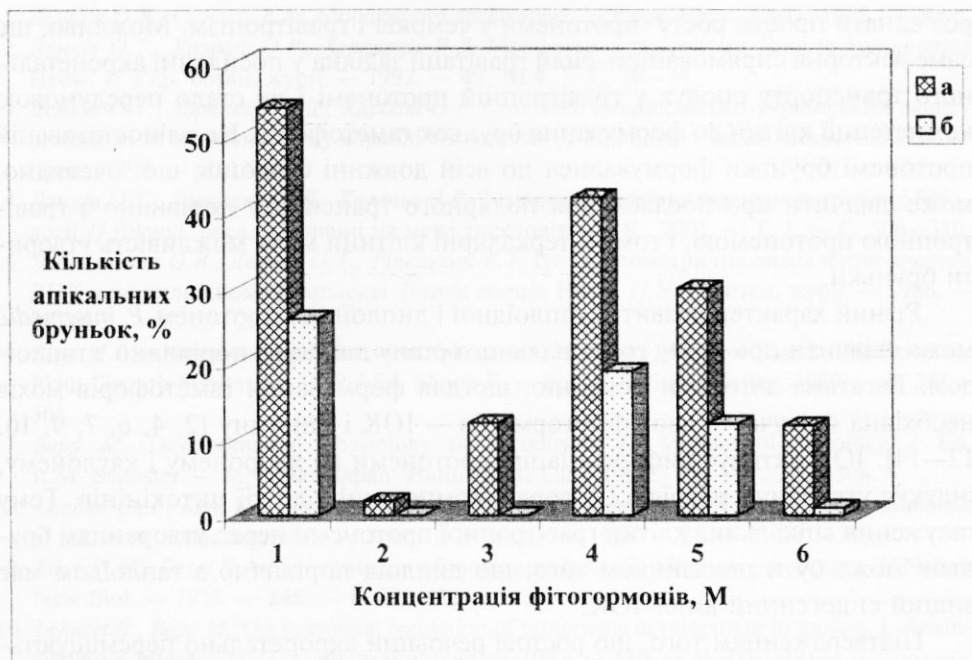


Рис. 2. Вплив фізіологічно активних речовин на формування бруньок з апікальних клітин гаплоїдної і диплоїдної протонем *Pottia intermedia*: 1 — контроль; 2 — НФК $3 \cdot 10^{-5}$ М; 3 — НФК $3 \cdot 10^{-6}$ М; 4 — 1-НОК 10^{-6} М; 5 — НФК $3 \cdot 10^{-6}$ М + 1-НОК 10^{-6} М; 6 — кліностратування; а — гаплоїд; б — диплоїд

Figure 2. Action of physiologically active substances on formation of buds from apical cells haploid and diploid protonema of *Pottia intermedia*: 1— control; 2 — NPA, $3 \cdot 10^{-5}$ М; 3 — NPA $3 \cdot 10^{-6}$ М; 4 — 1-NAA 10^{-6} М; 5 — NPA $3 \cdot 10^{-6}$ М+1-NAA 10^{-6} М; 6 — clinorotation; a — haploid, b — diploid

Раніше було показано, що у формуванні бруньок гаметофорів бере участь ІОК, необхідна для того, щоб клітини протонемі набули компетенції до диференціації й утворення бічних галузок, на яких мають розвинутися бруньки [6, 9, 10]. Це стало передумовою для досліджень впливу інгібіторів полярного транспорту (витоку ІОК з клітин) на формування бруньок гаметофорів у верхівці гравітропних стolonів. Ми використали НФК у концентраціях $3 \cdot 10^{-6}$ і $3 \cdot 10^{-5}$ М. $3 \cdot 10^{-6}$ М НФК повністю заблокувала формування бруньок гаметофорів на диплоїдній гравітропній протонемі та істотно знизила їх кількість на гаплоїдній; ефект $3 \cdot 10^{-5}$ М НФК для гаплоїдної протонемі, відповідно, був сильнішим (рис. 2).

Отримані результати дають підстави вважати, що цитокініни та ІОК контролюють процес перетворення апікальних клітин *P. intermedia* у бруньки гаметофорів. Не виключено, що дія ІОК пов'язана із апікально-базальним градієнтом ІОК у клітинах. Можна припустити, що саме розподіл фітогормонів детермінує напрям потоків речовин і активність атрагуючого центру в апікальній клітині стolonів. Досліди з кліностратуванням дали можливість

роз'єднати процес росту протонеми у темряві і гравітропізм. Можливо, що саме векторна спрямованість сили гравітації задіяна у посиленні акропетального транспорту сполук у гравітропній протонемі і це стало передумовою компетенції клітин до формування бруньок гаметофорів. На кліностатованій протонемі бруньки формувалися по всій довжині столонів, що, очевидно, може свідчити про послаблення полярного транспорту порівняно з гравітропною протонемою, і тому інтеркалярні клітини мали можливість утворити бруньки.

Різний характер розвитку гаплоїдної і диплоїдної протонем *P. intermedia* може свідчити про зміну гормонального стану диплоїда порівняно з гаплоїдом. Багатьма авторами показано, що для формування гаметофорів мохів необхідна співучасть двох фітогормонів — ІОК і кінетину [2, 4, 6, 7, 9, 10, 12—14]. ІОК активує диференціацію протонеми на хлоронему і каулонему, індукує утворення ризоїдів і створює компетенцію до дії цитокінінів. Тому галуження апікальних клітин гравітропної протонеми перед утворенням бруньок може бути показником того, що диплоїд порівняно з гаплоїдом має вищий ендогенний вміст ІОК.

Підтвердженням того, що ростові речовини акропетально переміщуються по столонах гравітропної протонеми, є досліди на кліностаті. Кліностатована протонема росла у різні боки, формуючи радіально симетричну дернинку, яка не галузилася [3]. На такій протонемі порівняно з гравістимульованою також прискорено формувалися бруньки гаметофорів з тією різницею, що вони закладалися уздовж столону, майже через 4—5 інтеркалярних клітин, а не лише на апікальній клітині. Тобто якщо зняти спрямовану дію гравітації, то відновиться типова радіальна форма росту протонеми. Крім того, протонема, яка росла у темряві, незважаючи на відсутність галуження, зберігала ритмічну внутрішньоклітинну метаболічну активність. Це підтверджується тим, що після її перенесення на світло на різних клітинах столону розвивалися бруньки гаметофорів. На кліностаті, як і в умовах векторної дії гравітаційного поля Землі, гаплоїдний гаметофіт регенерував значно краще проти диплоїдного; відповідно, із сповільненим ростом диплоїдної протонеми корелює й утворення бруньок, кількість яких на диплоїді менша, ніж на гаплоїді.

Висновки

1. Встановлено, що апікальні клітини гравітропної протонеми *P. intermedia* на світлі розвиваються у бруньки гаметофорів.
2. Підтверджена участь фітогормонів у диференціюванні протонеми і формуванні бруньок гаметофорів *P. intermedia*.
3. Експериментальні дослідження дають підстави стверджувати, що гаплоїдний і диплоїдний гаметофіти *P. intermedia* мають різне співвідношення ендогенних фітогормонів.

1. Демків О.Т., Сьтник К.М. Морфогенез архегоніат. — Київ: Наук. думка, 1985. — 204 с.
2. Демків О.Т., Кардаш О.Р., Хоркавців Я.Д. Морфогенез протонеми *Funaria hygrometrica* Hedw. // Укр. ботан. журн. — 1992. — 49, № 4. — С. 70—74.
3. Демків О.Т., Хоркавців Я.Д., Кардаш О.Р. Спільний американсько-український експеримент SPM на космічному кораблі «Columbia» // Пр. наук. т-ва ім. Шевченка. III. — Львів, 1999. — С. 13—18.
4. Демків О.Т., Хоркавців Я.Д., Кардаш О.Р. Фізіологічні основи експериментальної бріології // Фізіол. росл. в Україні на межі тисячоліть. — К., 2001. — Т. 1. — С. 306—310.
5. Лобачевська О.В., Демків О.Т., Ріпєцький Р.Т. Цитофотометричне визначення ядерної ДНК у поліплоїдному комплексі *Tortula muralis* Hedw. // Укр. ботан. журн. — 1986. — 43, № 6. — С. 23—26.
6. Bopp M. The hormonal regulation of morphogenesis in mosses // Proceedings in Life Sciences. Plant Growth Substances 1979 / Ed. Skoog F. — Berlin: Springer Verlag, 1980. — P. 351—361.
7. Bopp M. Developmental physiology of bryophytes // Manual of Bryology / Ed. R.M. Schuster. — Miyazaki, Japan: Hattori Bot. Lab., 1983. — I. — P. 276—308.
8. Chaban Ch.I., Kern V.D., Ripetskyj R.T., Demkiv O.T., Sack F.D. Gravitropism in caulonemata of the moss *Pottia intermedia* // Jour. of Bryology. — 1998. — 20. — P. 287—299.
9. Johri M.M., Desai S. Auxin regulation of caulonema formation in moss protonema. // Nature New Biol. — 1973. — 245. — P. 223—224.
10. Lehnert B., Bopp M. The hormonal regulation of protonema development in mosses. I. Auxin-cytokinin interaction // Z. Pflanzenphysiol. — 1983. — 110. — P. 379—391.
11. Ripetskyj R.T., Kit N.A., Chaban Ch.I. Influence of gravity on the photomorphism of secondary moss protonemata // Adv. Space Res. — 1999. — 23, № 12. — P. 2005—2010.
12. Rose S., Bopp M. Uptake and polar transport of indoleacetic acid in moss rhizoids // Physiol. Plant. — 1983. — 58. — P. 57—61.
13. Rose S., Rubery, Bopp M. The mechanism of auxin uptake and accumulation in moss protonemata // Physiol. Plant. — 1983. — 58. — P. 52—56.
14. Schwuchow J., Michalke W., Hertel R. An auxin transport inhibitor interferes with unicellular gravitropism in protonemata of the moss *Ceratodon purpureus* // Plant Biol. — 2001. — № 3. — P. 357—363.

Рекомендує до друку
Є.Л. Кордюм

Надійшла 01.11.2004

О.Т. Демків, Я.Д. Хоркавців, Н.Я. Кияк, Н.А. Кум

Институт екології Карпат НАН України, г. Львів

ВЛИЯНИЕ ГРАВИТАЦИИ НА ФОТОМОРФОГЕНЕЗ ПРОТОНЕМЫ *POTTIA INTERMEDIA* (TURN.) FÜRNR., POTTIALES

Установлена зависимость ускоренного образования почек гаметофоров мха *P. intermedia* на гравитропной протонеме от плоидности. На апикальных клетках гравитропной гаплоидной протонемы сначала закладываются почки гаметофоров, а потом в их основании возникают ризоидные столоны. Диплоидная гравитропная протонема прежде ветвится и лишь тогда в центре боковых ответвлений образуются почки гаметофоров. Отличия в последовательности этапов развития протонемы гаплоидного и диплоидного цитотипов могут быть обусловлены различным содержанием фитогормонов. Показано, что кинетин и ИУК стимулируют развитие почек гаметофоров, а фитотропин НФК ингибирует почкообразование.

O.T. Demkiv, Ya.D. Khorkavtsiv, N.Ya. Kyiak, N.A. Kit

Institute of Ecology of the Carpathians,
National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv

EFFECT OF GRAVITY ON PHOTOMORPHOGENESIS OF PROTONEMATA
POTTIA INTERMEDIA (TURN.) FÜRNR., POTTIALES

It has been experimentally established that protonemata having grown in darkness accelerates its development in light. Accelerated development is manifested in intensive protonemata branching and active transformation its tip cells into gametophore buds. Formation of buds from tip protonemal cells on periphery of a growth expansion do not correspond in full to normal development during which buds lay down, as a rule, in the center of protonemal mat. Tip formation of buds is in the best way expressed in haploid dark-grown protonemata of *Pottia intermedia*, diploid aposporic protonema regenerates and grows weaker than haploid one in darkness. Both haploid and diploid protonemata start to develop intensively after being transferred into light. However, the haploid protonema differs from diploid one in succession of bud formation. Rhizoids of haploid gametophores arise from basal cells of buds. In diploid protonema at first filaments of rhizoid type appear and only afterwards in a centre of filament bundles buds develop. The experiments with 10^{-7} - $5 \cdot 10^{-5}$ M of exogenous kinetin have shown that kinetin effect, being intensified with elevation of kinetin concentration, is still stronger expressed on diploid protonemata. Auxins were also found to participate in bud formation. It was established that acid $3 \cdot 10^{-6}$ - $3 \cdot 10^{-5}$ M phytotropin NPA (naphthylphthalamic acid) blocks bud formation and the addition of 10^{-6} M 6-NAA (naphthaleneacetic acid) eliminates the inhibitory effect of NPA.