

З В І Т

про виконання наукового проекту

“ОСОБЛИВОСТІ ФОРМОТВОРЧИХ ПРОЦЕСІВ МОХІВ В УМОВАХ ГРАВІТАЦІЇ ТА НЕВАГОМОСТІ”

Відповідно до Цільової комплексної програми НАН України з наукових космічних досліджень на 2012–2016 рр.

етап 3: “Дослідження особливостей гравітаційного розвитку мохів на різних стадіях онтогенезу”

ВСТУП

У Космосі мікрогравітація для рослин є новим об'єктивним фактором, впливу якого вони не зазнавали впродовж життєвої історії і до якого починають пристосовуватися за допомогою певних органо-специфічних відповідей. На Землі, в умовах постійної величини g , абіотичним стресом є кліноостатування, на що рослини реагують тропізмами і фізіологічними реакціями. Першими на короткотривалий стрес мікро– і симульованої гравітації (від секунд до годин) реагує Ca^{2+} , ліпідна і рН– сигнальна система. Пізніше на стадії утворення активних форм кисню і інших радикалів настають різкі зміни у метаболізмі і функціонуванні ауксинів. Надалі після довготривалого терміну дії зміненої гравітації (від днів до місяців) рослини акліматизовуються до стресу посиленням інших тропічних реакцій. Помітним штрихом у фенотипі наземних рослин і першочерговою необхідністю на кожній стадії розвитку є гравітропізм (Mouliа, Fournier, 2009). Тому систематичний аналіз регуляторної сітки різних рівнів (від молекулярного до гравічутливості репродуктивної системи) допоможе з'ясувати природу неспецифічних і специфічних адаптивних реакцій рослин до різної сили тяжіння.

ЕФЕКТ ПОЛЯРИЗУЮЧОЇ ДІЇ ГРАВІТАЦІЇ НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ЯДЕР ПІД ЧАС ГАЛУЖЕННЯ КЛІТИН ПРОТОНЕМИ

Попередніми дослідженнями встановлено, що кут нахилу латеральних гілок мохів змінюється залежно від векторної направленості сили тяжіння і градієнтного розподілу ауксину (Хоркавців та ін., 2015). Генератором галуження протонеми є ядро і підвищена функціональна активність апікальних і інтеркалярних клітин, в яких відбувається диференційний ріст. У зв'язку з цим досліджували рух ядра під час галуження клітин протонеми і формування гравізалежного кута нахилу латеральних гілок *Ceratodon purpureus* (Brid.) Hedw.

У гравітропній протонемі ядро часто знаходилося біля місця закладання ростка ще перед його утворенням, випереджаючи ріст клітинної стінки. Після поділу ядра утворювалася клітинна перетинка і ядро поверталось назад у центральну частину клітини. Під час росту протонеми на кліноостаті рух ядра відрізнявся: клітина погалузилася і вже був сформований росток, а ядро ще продовжувало рухатися у напрямку до нього. Подібно як на кліноостаті, під час галуження протонеми на світлі ядро перебувало у динамічному русі, мігруючи до місця стимуляції росту, очевидно, унаслідок послаблення світлом поляризуючої дії гравітації. Отже, контроль ядра за процесами поділу і росту змінюється, між ними існує тісна кореляція, однак вона модифікується впливом світла і гравітації

У літературі чимало неоднакових пояснень координації росту і проліферації під впливом мікрогравітації, напр. клітинного циклу, формування клітинної стінки, видовження клітин. Вважають, що ріст і поділи „роз’єднані” унаслідок скорочення G₂ фази, у іншому варіанті – більшого видовження клітин (Mattia et al., 2010; Paul et al., 2012; Kordyum, 2014).

У темряві ріст гравітропної протонеми *C. purpureus* пришвидшувався і розміри клітин були більші, але їх було значно менше, ніж у контролі і після кліноротації (рис. 3).

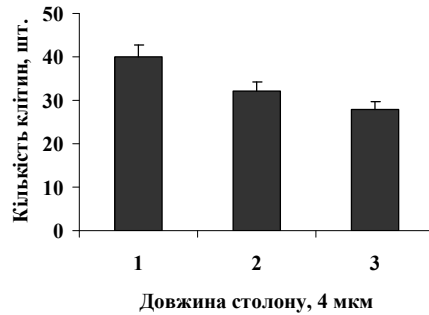


Рис. 6. Кількість клітин у столоні протонеми *Ceratodon purpureus* (Brid.) Hedw., довжина столону 4 мм: контроль, протонема росла на світлі (1), протонема після кліностатування (2), після гравістимуляції (3).

Кількість клітин могла зменшуватися унаслідок розтягання, яке випереджало мітоз, хоча тривалість проліферативного циклу могла й не змінюватися. Не виключено, що за цей період зросла активність ядерець і біогенез рибосом, оскільки встановлено, що умови зміненої гравітації призводять до порушень нуклеолярної активності (Kordyum, 2014; Misso et al., 2014). Таким чином, дослідження з *C. purpureus* підтверджують, що гравітація є важливим поляризуєчим чинником, який підсилює участь ядра у функціональних і морфогенетичних процесах клітин.

ВПЛИВ ГРАВІТАЦІЇ НА РЕПРОДУКТИВНИЙ РОЗВИТОК МОХІВ

Освоєння Космосу вимагає ефективного біоенергетичного життєзабезпечення і визначення можливих реакцій рослин на зміну гравітації чи взаємодію з іншими чинниками, що потенційно може затримувати завершення циклу рослин. Після узагальнень результатів досліджень розвитку насіння у Космосі доцільно було проаналізувати онтогенез деяких видів мохів, позаяк гравітація та інші екологічні фактори відіграють важливу роль у регуляції морфогенезу бріофітів на різних стадіях їх розвитку (Chaban et al., 1998; Schwuchow et al., 2002; Демків та ін., 2009; Лобачевська, Хоркавців, 2014).

Моделлю для вивчення впливу зміненої гравітації був індивідуальний цикл розвитку стерильного лабораторного клону *Physcomitrella patens*, який за сприятливих умов завершується за 2,5 – 3 місяці. Зважаючи, що репродуктивна стадія *P. patens* надзвичайно

чутлива до кліматичних змін, для експериментального дослідження були підібрані оптимальні умови культивування — низькі температури (-1° – $+5^{\circ}$ C) і висока вологість ($-0,5$ – $-1,0$ МПа),.

P. patens вирощували у люмінестаті на горизонтальному кліностаті і стаціонарних умовах 1g. Гравічутливість органів *P. patens* змінювалася залежно від стадій онтогенезу. На стадії протонеми *P. patens* утворювала спіральну дернину і гравітропні столони, на гаметофітній стадії гравічутливими були гаметофори, що, очевидно, слід розглядати як прояв адаптивної стратегії життєвого циклу. Подібні зміни гравіреакцій виявлено у *Bryum pseudotriquetrum* із двох кліматично різко відмінних природних локалітетів, що свідчить про фенотипні модифікації і диференціацію адаптаційного потенціалу впродовж філогенезу виду (Лобачевська, Хоркавців, 2014).

У лабораторних умовах у односпорових клонах *P. patens* на двостатевих пагонах розвивалися зрілі чоловічі і жіночі статеві органи і онтогенез завершувався утворенням спорогонів із диференційованою спорогенною тканиною і життєздатними спорами (табл. 1; рис.1).

Таблиця 1

Оцінка статевої продуктивності *Physcomitrella patens*, n =25

Умови дослідю	Кількість			
	гаметангіїв, шт.		% статевих пагонів від загальної кількості рослин	% спорогонів від кількості фертильних рослин
	чоловічі	жіночі		
Контроль	$85 \pm 2,4$	$230 \pm 3,5$	$67,8 \pm 1,7$	$88,6 \pm 0,9$
Кліностат	$79 \pm 1,8$	$158 \pm 2,7$	$62,7 \pm 1,7$	$79,9 \pm 0,9$

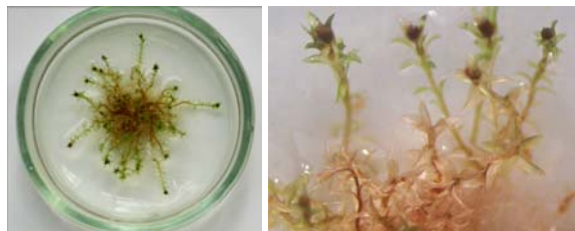


Рис. 1. Лабораторна культура *Physcomitrella patens* із спорогонами у контролі і після кліностатування

Дані щодо статевої продуктивності насамперед свідчать, що чоловічі гаметангії, порівняно з жіночими, швидше дозрівали на кліностаті, їх кількість була більшою, ніж у контролі (табл. 1), але вони чутливіші до зміни гравітації і серед них більше недорозвинутих або з певними морфологічними відхиленнями. Проте, як у контролі, так і після кліностації у дернині переважали чоловічі гаметангії, але кількість несформованих антеридіїв після кліностації збільшилася у 1,5 раза, порівняно з контролем. Зазвичай, андроцеї у 2–3

рази продуктивніші, ніж гіноцеї, тому різниця між кількістю спорогонів у контролі та досліді була неістотна. Слід зазначити, що після кліностакування відсоток спорогонів був більший, але їх утворення затримувалося майже на 10 днів порівняно з контролем. Окрім того, кількість абортивних спор була на 5–10 % більшою та зменшувалася кількість спор, що проростали. У першому поколінні протонемна дернина розвивалася повільніше, гаметофорів було менше, хоча різниця між контролем була неістотна.

Отже, чутлива до екстремальних зовнішніх впливів статева структура *P. patens* змінювалася залежно від гравітації. У такому разі не виключено, що гравізалезний розвиток рослин в умовах зміненої гравітації призводить до відхилень у співвідношенні кількості чоловічих і жіночих гаметангіїв, сповільнення темпів дозрівання спор та їх проростання.

Досліджували вплив гравітації на просторову орієнтацію та морфогенез спорофіту мохів. З'ясовано, що спорогони формуються як біполярна структура з апікальним і базальним центрами росту, напрям якого змінюється відносно вектора гравітації. Унаслідок базального росту спорофіт востає у тканини гаметофіту і на цій стадії орієнтується негативно гравітропно. Активація апікального ростового центру співпадала з припиненням базального росту і переорієнтацією позитивно гравітропної реакції на негативну (Lobachevska et al., 1998). На відміну від мохів з нахиленою коробочкою, згин якої формується унаслідок переорієнтації негативно гравітропного росту на позитивний, у ефемерного виду *P. patens* онтогенез завершувався утворенням зрілих спорогонів із прямостоячими коробочками і життєздатними спорами. Очевидно, для одних видів мохів гравізалезною є просторова вертикальна орієнтація спорогону, для інших – формування видоспецифічних нахилених коробочок.



Рис. 2. Формування гравізалезного згину спорогонів *Bryum argenteum*; стрілками вказано на локалізацію статоцитів і місце згину

У видів, які поселяються першими на порушених субстратах, із нахилених коробочок спори висіваються поблизу батьківських дернин і завдяки локальному заселенню та розростанню дернини це сприяє швидкому поширенню на значні території.

СТАН ПРО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ МОХІВ В УМОВАХ ЗМІНЕНОЇ СИЛИ ТЯЖІННЯ

Гравітація діє на ростові рухи і впливає на формотворчі процеси гаметофіту і спорофіту мохів (Demkiv et al., 1999), хоча механізми різносторонньої участі гравітації у життєдіяльності мохів досліджені недостатньо. Не виключено, що у тропізмах можуть бути задіяні загальні реакції про-антиоксидантної системи і з'ясування проблеми гравітропізму з точки зору неспецифічних реакцій допоможе розширити знання про природу ростових процесів, зокрема гравітропізму. Тому актуальними є дослідження перебігу стресової реакції та активності ферментів-протекторів у пагонах мохів в умовах зміненої сили тяжіння.

Досліджено вміст активних форм кисню та стан про-антиоксидантної рівноваги у пагонах моху *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. в умовах реальної гравітації і під час кліноостатування. Показано участь ферментативної системи в адаптації рослин до дії зміненої сили тяжіння. Встановлено, що на початкових стадіях кліноостатування (2 – 24 год) індуктором активації антиоксидантної системи був пероксид водню, що корелювало з підвищенням кількості дієнових кон'югатів – перших продуктів ПОЛ. Вірогідне збільшення кількості кінцевого метаболіту ліпопероксидації (малонового диальдегіду) зафіксовано на 7 добу впливу кліноостатування унаслідок часткового виснаження резервного пулу антиоксидантів (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив кліноостатування на вміст пероксиду водню та продуктів ліпопероксидації
в пагонах моху *P. nutans*

Тривалість кліноостатування	Вміст H ₂ O ₂ , мг/г с.м.	Вміст дієнових кон'югатів, од. абсорб.	Вміст малонового диальдегіду, нмоль/1 г сирої маси
Контроль (без кліноостату)	0,54 ± 0,02	10,5 ± 0,8	124,6 ± 3,5
2 год	0,83 ± 0,04*	15,8 ± 0,7*	115,2 ± 2,2*
24 год	0,59 ± 0,02	14,6 ± 0,8*	119,3 ± 3,2
48 год	0,61 ± 0,03	15,2 ± 0,4*	129,2 ± 5,1
7 діб	0,94 ± 0,06*	16,7 ± 0,4*	143,2 ± 5,6*

Примітка: * – різниця порівняно до контролю статистично достовірна при $p < 0,05$.

Під час експериментальних досліджень встановлено фазну закономірність зміни системи про-/антиоксидантної рівноваги, що відповідає стадіям загального адаптаційного синдрому. Для першої фази (2 год кліноостатування) характерно збільшення вмісту пероксиду та низька активність ферментів-антиоксидантів. Другій фазі стресової реакції (через 24 – 48 год після кліноостатування) властива певна стабілізація рівноваги між накопиченням активних форм кисню та функціонуванням антиоксидантної системи унаслідок підвищення каталазної та пероксидазної активності (табл. 2). Такий період можна розглядати як стан підвищеної резистентності рослин в умовах стресу. На третій фазі післядії кліноостатування

(7 діб) відбулася вторинна індукція ПОЛ, яка проявилася як у повторному збільшенні вмісту пероксиду водню, так і накопиченні пагонами *P. nutans* малонового діальдегіду. На початкових стадіях впливу зміненої сили тяжіння активну роль у ліквідації пероксиду водню має аскорбатпероксидаза, а згодом зниження її активності компенсувалося підвищеною реакцією каталази. Після припинення впливу кліностакування функціональна активність про-антиоксидантної системи відновилася майже до рівня контролю, що свідчить про зворотність дестабілізаційних процесів у клітинах мохів в умовах зміненої сили тяжіння.

Таблиця 3

Вплив кліностакування на активність ферментів антиоксидантного захисту
в пагонах моху *P. nutans*

Тривалість кліностакування	Активність каталази, мкМ H_2O_2 /мг білка/хв	Активність гваякол-пероксидази, відн. од./1 г сирової маси/хв	Активність бензидин-пероксидази, відн. од./1 г сирової маси/хв	Активність аскорбат-пероксидази, (мкмоль аскорб. к-ти/мг білка/хв
Контроль (без кліностаату)	0,198±0,022	32,546±2,7	16,821±1,8	0,198±0,012
2 год	0,182±0,019	30,067±3,3	13,854±1,2*	0,229±0,021*
24 год	0,362±0,041*	30,642±3,7	18,162±1,5*	0,185±0,019
48 год	0,273±0,017*	32,916±2,8	17,611±1,8	0,177±0,023*
7 діб	0,169±0,018*	52,617±2,9*	11,666±0,9*	0,179±0,016*

Примітка: * – різниця порівняно до контролю статистично достовірна при $p < 0,05$.

Отже, ранні реакції мохів на порушення векторної направленості сили тяжіння подібні до впливу на рослинні організми інших абіотичних стресових чинників (напр., дефіциту вологи, важких металів). Така неспецифічність реакцій зумовлена активацією сигнальних систем, які функціонують за єдиним принципом та індукують відповідь рослин на стресори різної природи. Тому захисні реакції мохів можна розглядати як зручну модель для екофізіологічних досліджень росту рослин, включаючи гравічутливість і гравітропізми, в умовах зміненої дії сили тяжіння.

ВИСНОВКИ

1. Віхою космічної біології є успішне завершення розвитку в умовах мікрогравітації, тому оцінка ролі гравітації для статевої продуктивності мохів, утворення спор та вегетативного розмноження є вагомим доповненням до репродуктивної стратегії рослин та їх конкурентної спроможності.

2. Рух ядра під час утворення бокових галузок корелює з ініціацією зони росту, а поляризуюча дія гравітації пришвидшує транспорт ядра і мітотичний цикл компетентних до галуження клітин.

3. На ранніх стадіях дії зміненої сили тяжіння індуктором активації антиоксидантної системи був пероксид водню, що корелювало з підвищенням кількості дієнових кон'югатів – первинних продуктів ПОЛ. Встановлено фазний характер реакцій про-/антиоксидантної рівноваги в умовах кліноостатування та зворотність процесів у післястресовий період.

1. Демків О.Т., Хоркавців Я.Д., Пундяк О.І. Гравітація як формотворчий фактор розвитку мохів / Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку. – Київ: Логос, 2009. – **2**. – С. 403–408.
2. Лобачевська О.В., Хоркавців Я.Д. Гравічутливість в онтогенезу мохів // Косм. наука і технол. – 2014. – **20**, 5 (90). – С. 55–61.
3. Хоркавців Я.Д., Кияк Н.Я., Кіт Н.А. Роль ауксину в гравііндукції галуження клітин протонеми мохів / 15-а українська конференція з космічних досліджень: тези доповідей конференції (Одеса, 24 - 28 серпня 2015 р.). – Київ, 2015. – С. 54.
4. Chaban Ch.I., Kern V.D., Ripetskyj R.T. et al. Gravitropism in caulonemata of the moss *Pottia intermedia* // J. of Bryol. – 1998. – **20**. – P. 287–299.
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. Kordyum E.L. Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity // Plant Biology. – 2014. – **16**, N1. – P. 79–90.
7. Lobachevska O.V., Demkiv O.T., Ripetskyj R.T. Influence of gravity on spatial orientation and morphogenesis of moss sporophytes // Adv. Space Res. – 1998. – **21**, № 8/9. – P. 1141–1144.
8. Matia I., Gonzalez-Camacho F., Herranz R. et al. Plant cell proliferation and growth are altered by microgravity conditions in spaceflight // J. of Plant Physiol. – 2010. – **167**. – P. 184–193.
9. Micco V., Pascale S., Paradiso R. et al. Microgravity effects on different stages of higher plant life cycle and completion of the seed-to-seed cycle // Plant Biology. – 2014. – **16**. – P. 31–38.
10. Moulia B., Fournier M. The power and control of gravitropic movements in plants: a biomechanical and systems biology view // Exp. Bot. – 2009. – **60**, N 2. P. 461–486.
11. Paul A.-L., Amalfitano C.E., Ferl R.J. Plant growth strategies are remodeled by spaceflight // Plant Biology. – 2012. – **12**. – P. 2–14.
12. Schwuchow J.M., Kern V.D., White N.J., et al. Conservation of the plastid sedimentation zone in all moss genera with known gravitropic protonemata // J. Plant Growth Regul. – 2002. – **21**. – P. 146–155.