

УДК 580.7:581.44 (477)
КП 34
РК 0113U001433

Національна академія наук України
Інститут екології Карпат
(ІЕК НАН України)
790266 м. Львів, вул. Козельницька, 4, тел./факс (032) 2707430

“ЗАТВЕРДЖУЮ”
Директор Інституту,
д.б.н.,с.н.с.
М.П. Козловський

З В І Т
ПРО ВИКОНАННЯ НАУКОВИХ РОБІТ
“ОСОБЛИВОСТІ ФОРМОТВОРЧИХ ПРОЦЕСІВ МОХІВ В УМОВАХ
ГРАВІТАЦІЇ ТА НЕВАГОМОСТІ”

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

Керівник робіт,
завідувач відділу
екоморфогенезу рослин,
канд. біол. наук

О.В. Лобачевська

„19” грудня 2016 р.

Львів –2016

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, зав. відділу, к.б.н.	_____	О.В. Лобачевська (вступ, підсумки, розд. 1; 1,2; 2; 2.1; 2,2; 3,2; 3,3; 4,1; 4,2; 5,1)
	« ___ » _____ 2016	
Відповідальні виконавці:		
С.н.с., к.б.н.	_____	Я.Д. Хоркавців (реферат, підсумки, розд. 1; 1,1; 1,3; 3; 3,1;3,2; 4; 4,3; 5,1; 5,2; 6,1)
	« ___ » _____ 2016	
С.н.с., к.б.н.	_____	Н.Я. Кияк (підсумки;реферат, розд. 1,4; 2,1; 2,2; 3,3; 3,4; 5,1; 5,2; 6; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4)
	« ___ » _____ 2016	
М.н.с.	_____	Н.А. Кіт (розд. 1; 1,3; 3; 3,2; 3.3; 4,1; 4,2)
	« ___ » _____ 2016	

РЕФЕРАТ

Різносторонні дослідження гравічутливості мохів виконані переважно на ювенільній протонемній стадії. Робіт про гравізалежність і тропізми інших органів, і на різних стадіях онтогенезу доволі небагато, тому це стало підставою для пошуку гравічутливих видів і дослідження їх реакцій на зміну гравітації. Визначено гравічутливість нових видів мохів, проаналізовано особливості їхніх гравіморфозів у процесі онтогенезу, з'ясовано участь сили тяжіння у репродуктивному розвитку окремих видів та проаналізовано активність про-антиоксидантної системи в умовах зміненої гравітації.

Встановлено, що гаметофори не завжди реагують на вплив гравітації, натомість частіше гравічутливою є вторинна регенеративна протонема, яка значно швидше розвивається і утворює гаметофори – власне рослини мохової дернини. Визначено, що гравічутливість органів гаметофіту змінюється залежно від екологічних умов. Так, дві форми *Bryum pseudotriquetrum* (Hedw.) P. Gaertn., B. Mey. & Scherb. із кліматично відмінних природних локалітетів по-різному реагували на вплив гравітації: у *B. pseudotriquetrum* з Антарктики гравічутливими були пагони, з околиць м. Львова гравітропно росла протонема. Після гравістимуляції у пазухах листків пагонів антарктичної екоморфи утворювалися численні виводкові бульбочки, а у львівської – на ризоїдних столонах. Очевидно, адаптація до умов короткого вегетаційного періоду Антарктики сприяла підвищенню гравічутливості гаметофорів моху, на яких закладалися органи вегетативного розмноження. Відповідно, залежно від екологічних умов сформувалися спеціалізовані гравіреакції різних органів – клітин протонеми і листкостеблових пагонів, що стало вирішальним для виживання, утворення мохового покриву і поширення *B. pseudotriquetrum* у різко відмінних кліматичних умовах.

Уперше встановлено, що розвиток виводкових тілець *Leptobryum pyriforme* Schimp. як органів вегетативного розмноження і запасання поживних речовин – явище гравізалежне. На нашу думку, *L. pyriforme* слід виділити серед проаналізованих видів завдяки високій швидкості росту і розвитку та різноманітності гравізалежних реакцій.

Проаналізовано генеративне розмноження двох видів мохів в умовах зміненої гравітації і встановлено, що гравіреакції є видоспецифічними. Моделлю для дослідження був однокімнатний вид *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. і двокімнатний вид *Bryum argenteum* Hedw. Аналіз статевої експресії *P. patens* свідчить, що антеридії, порівняно з архегоніями, швидше дозрівали на клиностації, їх утворювалося менше, ніж у контролі, і вони були чутливішими до зміни гравітації – кількість незрілих антеридіїв збільшувалася у 1,5 рази. Істотного впливу клиноротації на формування спорогонів не відзначено, проте абортівних спор утворювалося більше, а відсоток спор, які проростали, зменшувався. У першому

покоління після клиноротації мохова дернина розвивалася повільніше, гаметофорів утворювалося менше, проте у наступній генерації різниці між контролем і дослідом не встановлено. На відміну від *P. patens*, елімінація векторної дії гравітації виявилася навіть ефективною для чоловічих рослин *B. argenteum* – після клиностатування архегоніїв у мохових дернинах утворилося менше, а антеридіїв – більше. Більш характерною як для дводомних видів, так однодомних видів мохів, є протандрія – антеридіїв закладається більше і дозрівають вони раніше від архегоніїв, саме в такий спосіб гарантується більша ймовірність запліднення. Для *P. patens* властиві також специфічні гравіреакції на різних стадіях розвитку: в умовах 1g *P. patens* утворювала гравітропні протонемні столони, гравічутливі гаметофори і спіральну форму росту дернини. Такі фенотипні модифікації, без сумніву, розширили систему адаптації виду до специфічних умов місцезростань, зокрема на вологих переораних ґрунтах.

Як свідчать результати аналізу кількісного складу пігментів та інтенсивності фотосинтезу фертильних рослин *B. argenteum* формування гаметангіїв залежить від енергетичного забезпечення клітин і вищої енергетичної залежності чоловічих рослин, ніж жіночих.

Отже, гравічутливість гаметофітної і спорофітної стадій є особливістю біології бріофітів і функціональним наслідком впливу абіотичних стресових умов. У такому разі не виключено, що якраз гравізалежний розвиток рослин стимулює відхилення у співвідношенні чоловічих і жіночих гаметангіїв, формуванні спорогонів, тривалості дозрівання та проростання спор у різних екологічних умовах. Перевага гаплоїдних мохів полягає у тому, що їх фертильність визначається чоловічими і жіночими хромосомами, тоді як у диплоїдних рослин розвиток різних статевих органів індукується експресією багатьох генів жіночих і чоловічих хромосом (Cove et al., 2006; Norrell et al., 2014).

Встановлені особливості закладання латеральних галузок протонемі моху *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid., кут нахилу яких змінювався залежно від векторної направленості сили тяжіння і світла, а також градієнтного розподілу ауксину. Інгібування полярного транспорту ауксину за участю N-1-нафтилфталомової кислоти (НФК) призводило до зменшення протидії гравітації та плагіотропного росту латеральних галузок. Галуженню протонемі передувало переміщення ядра до нової зони росту, а рух ядра пришвидшувався унаслідок поляризуючої дії гравітації. Встановлено, що під впливом гравітації порушувалася координація росту і поділу клітин, хоча тривалість мітотичного циклу не змінювалася. Ще до візуального галуження відбувалася локальна активація динамічних МТ, які оточували ядро упродовж його переміщення, виконуючи сигнальну і транспорту функції.

Новим підходом для з'ясування механізму гравітропного росту є значення епігенетичних процесів у гравісприйнятті. Встановлено, що деметилювання ДНК хроматину 5-азацитидином вплинуло на тривалість гравііндукції, сповільнило проліферацію клітин та загальмувало автотропні процеси. Як наслідок, відновленню гравітропного росту передувало латентний період, часто досить тривалий. Отже, метилювання ЦГ-локусів ДНК ініціювало посттрансляційні зміни, що призвели до зміни тривалості мітозів апікальних клітин протонеми. Для різновікових дернин 7 і 21-денної протонеми після дії інгібітора метилювання ДНК істотної різниці у гравітропізмі не виявили, однак, сигнал про гравііндукцію у молодшій протонемі зберігався довше, ніж у старшій. Можливо, причиною є зміни у метилюванні ДНК, зумовлені старінням клітин. Отже, якщо зміну положення рослини, залежного від вектора гравітації, розглядати як абіотичний стрес, „пам'ять” про його дію реалізується унаслідок епігенетичних змін. Однак, незважаючи на виключну роль метилювання ДНК хроматину для розвитку рослин, до його експериментальних змін варто ставитися неоднозначно, оскільки клітина сама може ефективно контролювати такий епігенетичний сигнал.

Для рослин *P. nutans* визначено фазну закономірність зміни прооксидантно/антиоксидантної рівноваги залежно від тривалості дії зміненої сили тяжіння. Індуктором активації антиоксидантної системи є пероксид водню. На початкових етапах впливу гравітаційного стресу активну роль у ліквідації пероксиду водню виконувала аскорбатпероксидаза, а згодом зниження її активності компенсувалося підвищеною реакцією каталази. Тому в умовах зміненої сили тяжіння каскадний характер ферментативних реакцій є регулятивним чинником стійкості і одним із механізмів розвитку толерантності. Після припинення клиностагування функціональна активність антиоксидантної системи відновилася до рівня контролю, що свідчить про зворотність фізіологічних процесів, які можуть бути важливим індуктором адаптивної стратегії рослин у змінених екологічних умовах. Слід наголосити, що спричинений зміною гравітаційного поля стрес не є загрозою для життя мохів.

ЗМІСТ

СПИСОК АВТОРІВ.....	2
РЕФЕРАТ.....	3
ЗМІСТ.....	6
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	8
ВСТУП	9
ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	11
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	15
РОЗДІЛ 1. ПОРІВНЯЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ГРАВИЧУТЛИВОСТІ МОХІВ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ ОНТОГЕНЕЗУ.....	15
1.1. Аналіз сенсорної системи і гравітропізму проростків спор та апікальних клітин протонеми	15
1.2. Характеристика гравічутливості на гаметофітній (гаметофори) і спорофітній (спорогони) стадіях розвитку мохів. Просторова орієнтація спорофіту.....	19
1.3. Вплив гравітації на фенотипну мінливість гаметофіту.....	21
1.4. Особливості гравіреакцій мохів залежно від екологічних умов.....	22
РОЗДІЛ 2. ВИВЧЕННЯ РЕПРОДУКТИВНОГО РОЗВИТКУ МОХІВ В УМОВАХ СТАЛОЇ І ЗМІНЕНОЇ ВЕКТОРНОЇ ДІЇ ГРАВИТАЦІЇ.....	25
2.1. Аналіз вегетативного розмноження <i>Leptobryum pyriforme</i> Schimp. у різних умовах сили тяжіння.....	25
2.2. Статева структура і продуктивність одnodомного – <i>Physcomitrella</i> <i>patens</i> (Hedw.) B.S.G. і дводомного – <i>Bryum argenteum</i> Hedw. видів мохів....	27
РОЗДІЛ 3. УЧАСТЬ СВІТЛА І ГРАВИТАЦІЇ У ГРАВИМОРФОГЕНЕЗІ МОХІВ	31
3.1. Взаємодія впливу світла і гравітації у гравітропізмі протонеми мохів. Реверсія гравітропізму під впливом світла.....	31
3.2. Вплив гравітації на морфогенез протонеми мохів.....	33
3.3. Вплив світла і фітогормонів на гравізалежний морфогенез апікальних клітин протонеми.....	34
3.4. Значення рН середовища для гравітропізму протонеми <i>Pohlia nutans</i> (Schreb.) Lindb.....	37
РОЗДІЛ 4. ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ І ГОРМОНАЛЬНИЙ КОНТРОЛЬ ГРАВИЗАЛЕЖНОГО ГАЛУЖЕННЯ І ВЕЛИЧИНИ КУТА НАХИЛУ БОКОВИХ ГАЛУЗОК	39
4.1. Галуження клітин протонеми залежно від умов дії світла і гравітації..	39
4.2. Гормональний контроль гравізалежного галуження протонеми і формування кута згину (gravity point angle) галузок.....	42
4.3. Регуляторна роль метилювання у збереженні апікальними клітинами протонеми „пам'яті” про гравістимул.....	44
РОЗДІЛ 5. ЦИТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ГРАВИТРОПНИХ РЕАКЦІЙ МОХІВ.....	46
5.1. Функціональна роль ядра у гравітропному рості апікальних клітин протонеми <i>Ceratodon purpureus</i> (Hedw.) Brid.....	46
5.2. Участь мікротрубочок цитоскелету у реакціях апікальних клітин <i>Ceratodon purpureus</i> (Hedw.) Brid. на векторну дію гравітації.....	49
РОЗДІЛ 6. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПРО-АНТИОКСИДАНТНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ЯК СИСТЕМИ ЗАХИСТУ ВІД ГРАВИТАЦІЙНОГО	51

СТРЕСУ	
6.1. Вивчення динаміки про-антиоксидантних реакцій фертильних рослин <i>Bryum argenteum</i> Hedw.	51
6.2. Стан фотосинтетичного апарату фертильних рослин <i>Bryum argenteum</i> Hedw. в умовах змодельованої мікогравітації.	52
6.3. Вплив теплового стресу на стійкість гравітропних реакцій на різних стадіях онтогенезу моху <i>Bryum argenteum</i> Hedw.	55
6.4. Оцінка антиоксидантної системи у гаметофіті моху <i>Pohlia nutans</i> (Hedw.) Lindb. в умовах клиностатування.	57
ВИСНОВКИ	63
СПИСОК	64
ЛІТЕРАТУРИ	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АДГ – алкогольдегідрогеназа

АФК – активні форми кисню

ДАPI – 4',6-діамідино-2-феніліндол

ДК – дієнові кон'югати

ІОК – індолілоцтова к-та

КГ – карбонільні групи

ПЕГ – поліетиленгліколь

ПОЛ – перекисне окислення ліпідів

МТ – мікротрубочки

МДГ – малоновий диальдегід

НФК – N-1-нафтилфталамова к-та

ВСТУП

Живі організми здатні сприймати і перетворювати сигнали природного середовища і відповідно на них реагувати. В умовах постійної дії гравітації упродовж тривалого періоду життя на Землі сенсорні механізми рослин удосконалювалися таким чином, що разом з колообігом відповідних сигнальних систем, стали тригером специфічних клітинних реакцій. Тому здатність рослин адаптуватися до умов середовища і гравітаційного поля Землі залежить від внутрішніх властивостей організму, що ґрунтуються на топології (неперервності) сигнальних перетворень та включаються у реакції-відповіді на зовнішні впливи. У трансдукції сигнальних систем рослин інтегральну роль виконують фітогормони, які регулюють процеси розвитку, зокрема, на стадії тропізмів та морфогенезу.

У фенотипі наземних рослин першочерговою ростовою реакцією на кожній стадії розвитку є гравітропізм (Mouliа, Fournier, 2009). У Космосі мікрогравітація для рослин є новим об'єктивним фактором, впливу якого вони не зазнавали впродовж життєвої історії, але пристосовуються за допомогою певних органо-специфічних реакцій. На Землі, в умовах постійної величини g , абіотичним стресом є клиностатування, на що рослини реагують зміною тропізмів і фізіологічних процесів. Першими на короткотривалий стрес мікро- і симульованої гравітації (від секунд до годин) реагує Ca^{2+} , ліпідна і рН-сигнальна система. На пізніших стадіях утворюються активні форми кисню та інших радикалів і відбуваються зміни у метаболізмі та функціонуванні ауксинів. Надалі після довготривалого терміну дії зміненої гравітації (від днів до місяців) рослини пристосовуються до стресу підсиленням інших функцій.

Зразковим прикладом різномаяття гравіреакцій в онтогенезі рослин є бріофіти (Kern, Sack, 1999; Schwuchow et al, 1994; Chaban et al., 1998; Demkiv et al., 1999; Cove et al., 2006; Демків и др., 1997; Демків та ін., 2009; Хоркавців та ін., 2015). Загалом проведені дослідження підтвердили роль мохів як експериментальної моделі у дослідженнях гравіморфогенезу. Тому аналіз системи регуляції гравічутливості мохів на різних рівнях – від молекулярного контролю до репродуктивного розвитку є об'єктивною частиною досліджень природи неспецифічних і специфічних адаптивних реакцій рослин в умовах зміненої сили земного тяжіння.

Тривалі дослідження гравіморфогенезу бріофітів сприяли детальному експериментальному вивченню гравіреакцій на різних стадіях онтогенезу мохоподібних (Ripetskyj et al., 1998; Демків та ін., 2009; Лобачевська, Хоркавців, 2014). Продовжуються роботи довготривалого вирощування рослин у Космосі з метою успішної реалізації послідовних генерацій та отримання дозрілого насіння, що обмежене умовами літальних апаратних засобів і мікрогравітації (Kordyum, 2014). Тому важливо проаналізувати найбільш

вразливі до стресорного впливу стадії репродуктивного розвитку різних рослин та визначити потенційно найстійкіші до умов мікрогравітації цикли генеративної системи.

Ключові слова: *мохи, гравіморфогенез, галуження, фітогормони, ядро, цитоскелет, репродуктивний розвиток, гаметангії, антиоксидантна система*

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом дослідження були природні зразки та лабораторні культури таких видів мохів: *Bryum argenteum* Hedw., *Bryum pseudotriquetrum* (Hedw.) P. Gaertn., B. Mey. & Scherb., *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid., *Leptobryum pyriforme* Schimp., *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G., *Pohlia nutans* (Schreb.) Lindb. Усі зразки мохів відібрано в околицях м. Львова в майже однакових кліматичних умовах, окрім *B. pseudotriquetrum*, один зразок якого був зібраний в Антарктиді, а інший – у Львівській області.

Лабораторну стерильну культуру мохів отримували із спор або регенерацією пагонів на поживному середовищі Кноп П з 0,2 % глюкозою в чашках Петрі і вирощували у люмінестаті з 16 год фотоперіодом у контрольованих умовах: освітлення $70 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{сек}^{-1}$, температура 20–22°C, відносна вологість 85–90 % (Демків и др., 1997). Через 7 днів протонемні дернини збирали у клубки і переносили на 5–7 днів у темряву для гравістимуляції. Для моделювання мікрогравітації використовували горизонтальний клиностат, який обертався зі швидкістю 2 об. / хв.

Досліджували галуження і поділ клітин протонемі *Ceratodon purpureus*, яку вирощували із спор. 7-денні дернини знімали препарувальною голкою і переносили на середовище з 0,2 % глюкозою. Чашки з культурою ставили вертикально у темряву і через 5 днів отримували негативно гравітропну протонему, яку використовували для подальших досліджень.

Для аналізу кутів згину апікальних клітин в одному досліді чашки встановлювали відносно горизонтальної поверхні під кутами — від 0° до 90° і освітлювали 3 год червоним світлом інтенсивністю $0,2 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{сек}^{-1}$. Після цього одну групу чашок з протонемою переносили у темряву на горизонтальний клиностат, а другу – клали горизонтально на стіл в умови сталої 1g сили тяжіння. Через 18 год вимірювали кут нахилу латеральних галузок відносно головного столону. В іншому варіанті досліді чашки з протонемою виставляли так, щоби вектори світла і гравітації були орієнтовані паралельно або перпендикулярно. Умови досліді і аналізу кутів були як у попередньому варіанті, лише без використання клиностату.

В експерименті з фітогормонами використали 1,0 мкМ ауксин і 10 мкМ N–1-нафтил-фталамову кислоту. Гравітропну протонему *C. purpureus* протягом 7 днів вирощували на середовищі з 1,0 мкМ ІОК, тоді у чашки з протонемою додавали 1 мл 10 мкМ розчину НФК і залишали рослини у темряві на 8 год. Після цього виставляли чашки на низькі інтенсивності білого світла (100 лк) і через 24 год аналізували галуження протонемі і кут нахилу галузок.

Цитохімічні дослідження спорогонів *Bryum argenteum* здійснювали на різних стадіях розвитку і для аналізу крохмалю у статочитах фарбували спорогони розчином I_2KI .

Визначали зони розподілу амілопластів вздовж ніжки спорогону та під час формування коробочки на світлі і після клиностакування .

Для аналізу ядер застосували методику флуоресцентного фарбування барвником 4',6-діамідино-2-феніліндол – DAPI (Chazotte, 2011) і відзначали положення ядер у клітинах столону і латеральних гілках протонеми Для імунофлуоресценції мікротрубочок (МТ) використали методику Д. Швухова, модифіковану для протонеми мохів (Schwuchow, Sack, 1994; Demkiv et al., 2003). Зафарбовані препарати ядер і МТ аналізували на мікроскопі „АХІО Image M1” та фотографували камерою AxioCam HRm.

Визначали вплив 5-азацитидину на гравітропний ріст апікальних клітин протонеми *S. purpureus*. Готували водний розчин 25 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ 5-азацитидину, заливали розчин у чашки з 7-денною гравітропною протонемою і залишали при +5°C на 8 год у темряві у горизонтальному положенні. Тоді розчин зливали, чашки з протонемою промивали дистильованою водою і ставили для гравістимуляції при 0°C. Через 24 год чашки повертали у першопочаткове положення і витримували 6 год у темряві при 20°C. Після цього візуально оцінювали форму гравітропізму, вимірювали кут гравітропного згину і положення ядра в апікальній клітині.

Для визначення активності алкогольдегідрогенази (АДГ) використали методики (Porterfield et al.; 2003; Benz et al., 2007; Войцеховская и др., 2013; Рогожин, Рогожина, 2016). Для стимуляції гіпоксії чашки з 30-денною культурою *B. argenteum* заливали на 24 год дистильованою водою, а опісля переносили на 12 год на клиностаг. АДГ-реакцію проаналізували окремо у жіночих і чоловічих рослинах моху після гіпоксії і клиностакування на спектрофотометрі Analytic Jena Specord 210 Plus, $\lambda=510$ нм.

Аналізували стан прооксидантної системи у пагонах *B. argenteum* перед формуванням гаметангіїв і на стадії їх утворення: визначали вміст пероксиду водню, дієнових кон'югатів (ДК) та малонового діальдегіду (МДГ) за стандартними методиками (Мусяенко и др., 2001).

Активність прооксидантно-антиоксидантної системи в умовах гравітації та після клиностакування аналізували у гаметофіті моху *Pohlia nutans*. Для визначення вмісту пероксиду водню пагони *P. nutans* гомогенізували, екстрагували у 50 мМ калій-фосфатному буфері (рН 7,0) та інкубували з 0,1 % $Ti(SO_4)_2$. Оптичну густину розчинів визначали на спектрофотометрі Specord 210 Plus при 410 нм. За контроль брали суміш, що містила 3 мл буферу і 1 мл дистильованої води. Вміст пероксиду водню встановлювали за калібрувальною кривою і виражали в мкмоль/г маси сирової речовини (Gechev, Hille, 2005).

Пероксидне окислення ліпідів оцінювали за вмістом первинних продуктів – дієнових кон'югатів, кінцевого продукту ліпопероксидації – малонового діальдегіду та карбонільних груп білків (КГ білків). Для визначення кількості дієнових кон'югатів рослини гомогенізували у 0,1 М калій-фосфатному буфері (рН 7,0), додавали суміш гептан-

ізопропанол (1:1) та екстрагували протягом 20 хв. Вміст ДК визначали спектрофотометрично у гептановому шарі, $\lambda = 232$ нм, та виражали у відносних одиницях абсорбції (Гаврилов и др., 1983). Для визначення концентрації МДА рослинний матеріал гомогенізували у 20 % розчині трихлороцтової кислоти та інкубували з 0,5 % розчином тіобарбітурової кислоти. Вміст МДА визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 532 нм і виражали в нМ на 1 г маси сирової речовини (Мусяенко и др., 2003).

Для визначення вмісту карбонільних груп білків наважку рослинного матеріалу гомогенізували в 50 мМ калій-фосфатному буфері (рН 7,0). Отриманий після центрифугування (10 хв, 5000 г) осад розчиняли у 10 мМ розчині 2,4-динітрофенілгідразину, та інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі. Суміш центрифугували в попередньому режимі, а отриманий осад розчиняли в 6 М гуанідингідрохлориді. Вміст КГ білків визначали у супернатантах спектрофотометрично за довжини хвилі 370 нм, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання $22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Лушак та ін., 2004).

Для визначення активності каталази рослини екстрагували у 0,05 М трис-НСІ буфері (рН 7,8) за температури 0 – 4°C. Гомогенат центрифугували протягом 15 хв за 5000 об/хв. Активність ферменту визначали спектрофотометрично з використанням 4 % розчину молібдату амонію за довжини хвилі 410 нм. Для розрахунків застосовували коефіцієнт поглинання молібденового комплексу ($\epsilon = 22,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) і виражали активність ферменту в мкМ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{мг білка/хв}$ (Королюк и др., 1988).

Активність пероксидаз визначали після екстракції матеріалу в 0,1 М ацетатному буфері (рН 5,4). Гомогенат центрифугували протягом 15 хв за 5000 об/хв. Активність ферментів визначали спектрофотометрично з використанням, як субстрату, бензидину та гваяколу й виражали у відносних одиницях на 1 г маси сирової речовини за хвилину (Методы биох. исслед. растений, 1987).

Активність аскорбатпероксидази оцінювали за зменшенням оптичної густини при 290 нм унаслідок окиснення аскорбату (коефіцієнт екстинції $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) та виражали в мкМ аскорб. к-ти/мг білка/хв (Nakano, Asada, 1981). Концентрацію білка визначали за методом М. Бредфорда (Bradford, 1976).

Аналізували утворення виводкових ризоїдних бульбочок на 20-денній протонемі *L. puriforme* після гравістимуляції і клиностатування – визначали тривалість їх закладання та підраховували кількість бульбочок на одну дернину.

У лабораторній культурі *P. patens* і *B. argenteum* проаналізували статеву структуру і продуктивність: фертильних рослин визначили кількість жіночих і чоловічих рослин, жіночих і чоловічих гаметангіїв та спорогонів в умовах сталої дії 1g і після клиностатування. Для визначення життєздатності спор *P. patens*, що утворилися у лабораторних умовах, спори

висівали на агаризоване середовище, підраховували кількість пророслих спор та аналізували ріст і розвиток протонемних дернин.

Усі експериментальні дослідження повторювали тричі, вірогідність різниці між середніми значеннями показників встановлювали за критерієм Ст'юдента. Відмінності вважали вірогідними при значенні $p < 0,05$ (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

РОЗДІЛ 1. ПОРІВНЯЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ГРАВІЧУТЛИВОСТІ МОХІВ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ ОНТОГЕНЕЗУ

1.1. Аналіз сенсорної системи і гравітропізму проростків спор та апікальних клітин протонеми

З розвитком космічної біології як об'єкт досліджень гравічутливості рослин почали використовувати мохи (Sack, 1991; Chaban et al., 1998; Demkiv et al., 1999; Лобачевська, 2006; Демків та ін., 2009). Бріофіти, як і судинні рослини, в ході еволюції виробили специфічні реакції на вплив гравітації і протягом онтогенезу інколи кардинально змінюють орієнтацію росту відносно векторної дії земного тяжіння. На світлі, якщо вектори світла і гравітації зорієнтовані перпендикулярно до площини росту протонеми, столони плагіотропно стеляться по поверхні субстрату, а у темряві ростуть негативно гравітропно, що є найкоротшим шляхом до світла. Не виключено, що саме паралельна направленість факторів зумовлює незалежний як від світла, так і від гравітації прямолінійний радіальний напрям росту. У темряві саме через відсутність світла ріст відбувається строго в одному напрямі – негативно гравітропно. В умовах клиностатування чи мікрогравітації столони дернинки виявляють певну автономність від гравітації та світла і різні види ростуть неодинако – прямолінійно або спірально. Перевагою мохів є й те, що гравіперцепція і ростова реакція на стадії протонеми не роз'єднані просторово і відбуваються в одній апікальній клітині.

Листкостеблові пагони (гаметофори) верхоплідних бріофітів орієнтуються негативно гравітропно. Не змінюється напрям росту і на початку формування спорофіту, тоді як на завершальних стадіях, під час диференціації спорогенних тканин і формування коробочки у деяких гравічутливих видів ріст коробочки переорієнтовується на позитивно гравітропний. Зміна форми та просторової орієнтації спорогонів набули у мохів особливого значення, окрім того є важливою таксономічною ознакою виду. Досліди на російському супутнику БИОН-11 і американській станції COLUMBIA за програмою Shuttle'97 підтвердили перспективність дослідження клітинних механізмів гравіморфогенезу бріофітів: уперше було виявлено гравізалежні феномени – спіральний ріст протонеми та утворення бруньок гаметофорів із апікальних клітин протонеми (Демків та ін., 1998; Демків та ін., 2005; Ripetskyj et al., 1999; Kern et al., 2005).

Різносторонні дослідження гравічутливості проводили переважно на ювенільній протонемній стадії розвитку (Демків и др., 1997; Демків та ін., 2006; Sack, 1991; Shwuchow et al., 2002), проте робіт про гравітропні реакції в процесі онтогенезу мохів значно менше (Ripetskyj et al., 1999; Chaban et al., 1998). Невелика кількість видів бріофітів, які досі

використовували в експериментальних дослідженнях гравіреакцій, спонукала до пошуку нових гравічутливих видів, придатних для вивчення ролі гравітації в життєвій стратегії цієї групи вищих рослин.

Визначено гравічутливість у 8 нових видів мохів. На підставі результатів аналізу цитологічних особливостей гравічутливих апікальних клітин – розміру й форми амілопластів, їх зонального розподілу і седиментації, швидкості росту – з'ясовано відмінності у диференціації та розвитку гаметофіту і спорофіту мохів. Для нових гравічутливих видів визначено кореляцію між кількістю, розподілом амілопластів та швидкістю росту апікальних клітин (табл. 1.1.1). Установлено, що величина кута гравітропного згину прямо залежить від довжини зони седиментації амілопластів та швидкості росту стolonів протонеми.

Таблиця 1.1.1

Показники гравічутливості апікальних клітин мохів

ВИД	Кут гравітропного згину, °	Швидкість росту, мкм/год	Довжина клітини (D), мкм	Довжина зони з амілопластами (d), мкм	Кількість амілопластів, штук	D/d
<i>Ceratodon purpureus</i>	85,5±165	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>Tortula 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. caespitium</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

Амілопласти в апікальній клітині були різних розмірів і форми: від округлих і овальних до веретеноподібних, від великих (2,5–3,0 μm) до дрібних (0,3–0,5 μm). Пластиди розподілялися по-різному: окремо один від одного або у вигляді скупчень. Великі округлі амілопласти переважали в зоні седиментації, вони осідали найактивніше під час зміни напрямку гравістимулу, тоді як дрібні, круглі пластиди зосереджені перед ядром і лише частково змінювали своє положення, а веретеноподібні поза ядром майже не осідали.

У кожній спорі перед проростанням визначали переважно по 5–8 амілохлоропластів, які ділилися, тому у ростках їх кількість зростала до 10–12 (табл. 1.1.2). Установлено, що в апексі верхівкової клітини більшості досліджених видів є зона без пластид, де інколи міститься багато тілець Гольджі, які постачають екзоцитозні везикули до зони росту (Chaban et al., 1998). У видів *Dicranella cerviculata* (Hedw.) Schimp., *Leptobryum pyriforme*, *Bryum*

intermedium (Brid.) Brandow у зоні верхівки апікальної клітини часто виявляли один великий, рідше два амілопласти, які не седиментували.

Таблиця 1.1.2

Вміст амілохлоропластів у спорах і ростках гравічутливих видів

Назва виду	Кількість амілохлоропластів, шт.:		
	перед проростанням спор	у 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. caespiticiium</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>Tortula 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

Визначено, що майже 50 % апікальних клітин гравітропної протонеми *Dicranella cerviculata* мають верхівковий амілопласт, що не впливає на ступінь гравічутливості клітини і швидкість седиментації пластид. У *Dicranella cerviculata*, *Leptobryum pyriforme*, *Bryum argenteum* чітко проявляється седиментація амілопластів, у інших видів – *Dicranella varia* (Hedw.) Schimp., *D. heteromalla* (Hedw.) Schimp., *Bryum intermedium* вона незначна, що корелює з нижчою гравічутливістю протонеми.

Величина кута гравітропного згину у *Leptobryum pyriforme*, який вирізняється серед інших видів пришвидшеним ростом, за 8 год гравістимуляції досягав 60° (рис. 1.1.1). Початок згину у *L. pyriforme* та переміщення пластид у напрямку дії сили тяжіння візуально можна було побачити через 0,5–1 год після гравістимуляції. Із збільшенням тривалості гравістимуляції зростала кількість амілопластів, які осідали донизу.

Підрахунок амілопластів в апікальних клітинах свідчить, що їх кількість істотно не відрізнялася між видами і не залежала від ступеня гравічутливості моху (табл. 1.1.1). Проведені дослідження підтверджують думку, що кількість амілопластів не визначає гравічутливості видів. Можна також стверджувати, що гравічутливість мохів зростає із підвищенням довжини зони седиментації пластид і зменшенням співвідношення довжин клітини і зони з амілопластами (D/d, табл. 1.1.1)



Рис. 1.1.1. Негативно гравітропна протонема (а) і гравітропний згин (б) столонів *Leptobryum pyriforme*

Гравізалезний ріст протонеми є видоспецифічною ознакою. У *Funaria hygrometrica* Hedw. і *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. гравічутливими є проростки спор (Пундяк та ін. 2002), а у *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb., *Dicranella heteromalla*, *Barbula unguiculata* Hedw. лише з розвитком протонеми клітини починають реагувати на гравітацію (Лобачевська, 2006). Для таких видів мохів як *Dicranella heteromalla* і *D. varia* характерною є висока дисперсія кутів згину як негативно, так і позитивно гравітропних первинних ростків. Залежним від гравітації і світла для багатьох мохів є галуження клітин та кут нахилу галузок відносно осі росту ортотропного протонемного столону (Хоркавців та ін., 2014).

Як відомо, напрям росту рослин регулюється спільною дією світла та гравітації. Дослідження О.Т. Демкова (1997), Р.Т. Ріпецького (1999), Я.Д. Хоркавців (2000), К.D.L. Millar (2010) із співавторами свідчать, що світло не лише задає напрям росту, але й модулює гравічутливість рослин, в тому числі проростання спор *F. hygrometrica*, *C. purpureus* (Пундяк та ін., 2002), галуження протонеми і кут нахилу бокових галузок (Хоркавців та ін., 2015) за участю системи фітохром, чутливого до червоного світла, та фоторецепторів синього світла, криптохром і фітотропінів (Хоркавців, Демків, 2003; Lariguet, Fankhauser, 2004).

Початково аполярні одноклітинні спори *C. purpureus* у темряві проростали позитивно гравітропним ризоїдом, а через добу з протилежного боку утворювався другий негативно гравітропний хлоронемний росток. Спостереження за проростанням спор мохів ілюструє важливість гравіморфізму. Вісь першого поділу закладалася відповідно до вектора гравітації, але залежно від умов гравістимуляції: якщо змінили положення чашок із спорами відносно вектора гравітації на 90° або 360° , другий проросток утворювався в іншому місці – перпендикулярно до першого або поряд з ним (рис. 1.1.2).

Перед поділом клітин спостерігали гравізалезну міграцію ядра до місця майбутнього ростка. Порушення системи мікротрубочок антитубуліновими блокаторами інгібувало рух ядра і утворення ростка, що свідчить про участь цитоскелету у переміщенні ядра (Demkiv et

al., 2003). Подібний механізм гравіморфізму встановлено для детермінації дорзовентральної осі яйцеклітини *Fucus distichum* L. (Qu, Sun, 2008; Nick, 2013). Гравізалежний ріст як першого ризоїдного, так й другого хлоронемного ростків, слід розглядати як адаптивну реакцію, що сприяє закріпленню невеликих мохових рослин у субстраті, а головне, виходу на світло автотрофних клітин протонеми.

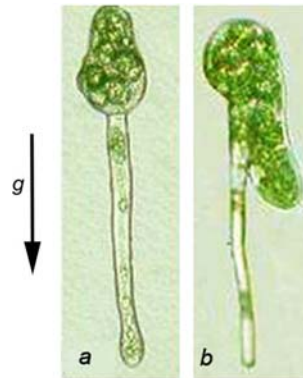


Рис. 1.1.2. Орієнтація проростків *Ceratodon purpureus* залежно від вектора гравістимулу: *a* – спора з ризоїдом, який направлений донизу, та хлороневою, що росте ввверх; *b* – після переорієнтації чашки на 360° утворився хлоронемний росток, який росте паралельно до ризоїда.

1.2. Характеристика гравічутливості на гаметофітній (гаметофори) і спорофітній (спорогони) стадіях розвитку мохів. Просторова орієнтація спорофіту

Гравічутливість різних видів відрізнялася на стадіях розвитку гаметофіту і спорофіту. Листкостеблові пагони *Leptobryum pyriforme* були менше гравічутливими ($32,3 \pm 1,3^\circ$), ніж протонема ($65,9 \pm 1,8^\circ$). Гравічутливість регенеративної протонеми, яка утворилася з пагонів, порівняно з протоневою із спор, знижувалася у *Bryum argenteum* і *Dicranella varia*. У *Bryum caespiticium* Hedw. і *Tortula truncata* (Hedw.) Mitt., навпаки, гравічутливішою була регенеративна протонема з пагонів. Численні гравічутливі столони вторинної протонеми утворювалися у темряві внаслідок регенерації гаметофорів *Tortula modica* R.H.Zander (рис. 1.2.1).

У зафарбованих J₂KJ ізольованих молодих спорогонах амілопласти переважно нагромаджувалися у клітинах стопи і верхньої апікальної ростової зони. На ніжках сформованих спорогонів виділялися локальні клітини (статоцити) з амілопластами (статолітами). Під час росту ніжки спорогону статоцити розміщувалися окремими зонами, а перед формуванням коробочки відбувався перерозподіл статоцитів і крохмальні зерна максимально нагромаджувалися у шийці коробочки (рис. 1.2.2 а). Надалі саме у цій зоні

ніжка спорогону згиналася і найбільше амілопластів було на випуклому боці, а найменше – на увігнутому.



Рис. 1.2.1. Унаслідок регенерації гаметофорів *Tortula modica* утворюється вторинна гравічутлива протонема (стрілка вказує на клітини основи листка, що регенерують найчастіше).

Досліджували вплив гравітації на просторову орієнтацію та морфогенез спорофіту мохів. Встановлено, що спорогони формуються як біполярна структура з апікальним і базальним центрами росту, напрям якого змінюється відносно вектора гравітації. Унаслідок базального росту спорофіт вростає у тканини гаметофіту і на цій стадії орієнтувався негативно гравітропно. Активація апікального ростового центру співпадала з припиненням базального росту і переорієнтацією позитивно гравітропної реакції на негативну (Lobachevska et al., 1998). Результатом такого росту є нахилена форма коробочок, наприклад у *B. argenteum* і *Grimmia anomala* (рис. 1.2.2). Для одних видів мохів гравізалежною є просторова орієнтація коробочок, для інших – формування видоспецифічних коробочок. Окрім того, що форма і просторова орієнтація коробочки є таксономічною ознакою, утворення схиленої коробочки є гравіадаптивною ростовою реакцією (Лобачевська, Хоркавців, 2014).

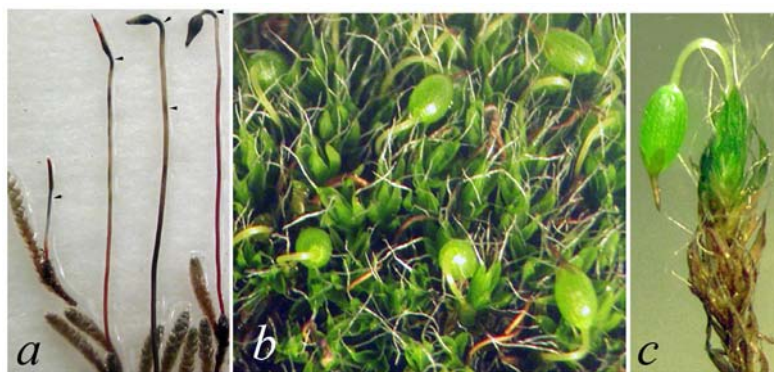


Рис. 1.2.2 *a*) – формування згину спорогону *Bryum argenteum* в умовах 1 g; стрілками позначені місця максимального нагромадження крохмалю у статочитах ніжки спорогону та шийки коробочки; *b*) – природна дернина *Grimmia anomala* Hampe із нахиленими коробочками; *c*) – окремий спорогон з нахиленою коробочкою

Горизонтальне кліностагування гаметофорів на стадії формування коробочки не лише знижувало реорієнтацію ніжки спорогону, а й інгібувало диференціацію тканин коробочки. Це впливало на завершення формування тканин коробочки і, як наслідок, утворювалися лише ззовні зрілі коробочки з недиференційованою спорогенною тканиною або стерильними спорами. Після кліностагування часто змінювалася форма коробочки. У *Pohlia nutans* та *Bryum intermedium* утворювалися майже прямовисні коробочки без видимого згину ніжки спорогону, у *Bryum argenteum* замість симетрично-видовжених – кулясті, часто викривлені коробочки. Таким чином, гравізалежною є просторова орієнтація коробочок одних видів мохів, для інших – гравізалежним є формування видоспецифічних коробочок. Окрім того, що форма і просторова орієнтація коробочки є таксономічною ознакою, утворення схиленої коробочки є гравіадаптивною ростовою реакцією. У видів, які поселяються першими на порушених субстратах, із нахилених коробочок спори висіваються поблизу батьківських дернин, що завдяки локальному закріпленню і розростанню дернини, сприяє швидкому заселенню мохами більшої території.

11.3. Вплив гравітації на фенотипну мінливість гаметофіту

Іншим прикладом гравізалежного морфогенезу для деяких видів є спіральна форма росту протонеми мохів. Спіральні протонемні дернини спочатку знайшли у культурі односпорових мохових дернин. У звичайних умовах освітлення і гравітації протонема росла радіально, формуючи симетричні дернини, а після диференціації каулонемі і закладання бруньок гаметофорів синхронно закручувалася у вигляді спіралей. Вперше спіральну форму дернин протонеми *Funaria hygrometrica*, *Fissidens bryoides*, *Burbula unguiculata*, *Pottia truncate*, *Bryum spinosum*, *Dripanum scoparium* і *Polytrichum sp.* описали М. Бопп і Л. Кофлер (Bopp, 1983; Kofler 1959), а згодом А.С. Лазаренко із співавторами (Лазаренко та ін., 1961).

В умовах мікрогравітації вперше на російських біосупутниках „Біон-11” і „Фотон”, а пізніше на борту космічних кораблів США „Columbia” виявлено спіральний ріст дернини *Ceratodon purpureus*, а згодом й інших видів (Демків та ін., 2006). У контрольованих умовах на світлі дернина *Barbula unguiculata* і *Leptobryum pyriforme* набуває спіральної форми (рис. 1.3.1). Унікальні дослідження в умовах мікрогравітації, де спіральна форма розвивалася за відсутності світла і гравітації, свідчать, що морфогенез регулюється, насамперед, ендегенно. Спіральність ініціюється нахилом клітинної перетинки під час мітозу апікальної клітини та диференціацією каулонемі з косими міжклітинними перетинками, що детермінує напрям спірального росту. Встановлено, що радіальний ріст протонемної дернини *Leptobryum pyriforme* Schimp. на низьких інтенсивностях білого світла і вищій концентрації мінерального середовища змінювався на спіральний фенотип дернини. І те, що спіральний фенотип не завжди виявляється у життєвій формі мохів, є результатом впливу світла, гравітації та умов

середовища. Тому для одних видів це граві-, а для інших світлозалежний морфогенез (Демків та ін., 2009).

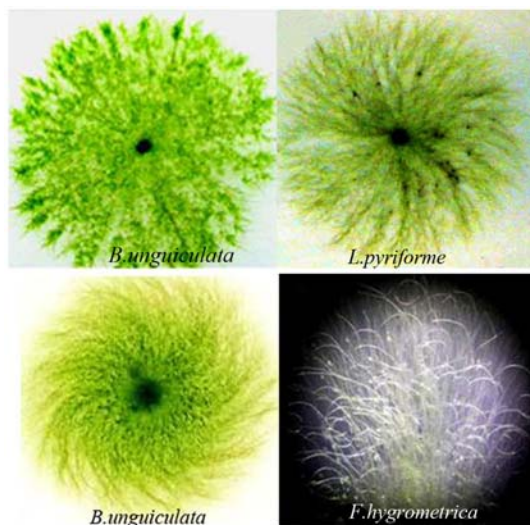


Рис. 1.3.1. Радіальна і спіральна форма дернин мохів: радіальна дернина *Barbula unguiculata* і спіральна дернина *Leptobryum pyriforme* сформувалися на світлі; дугоподібні столони *Funaria hygrometrica* утворилися після клиностатування і мікрогравітації.

Розвиток космічної техніки створив умови для досліджень росту рослин і, зокрема, мохів в умовах мікрогравітації. На підставі отриманих результатів було встановлено, що спіральність протонеми мохів є спадковим проявом морфологічної форми дернинки, яку можна виявити завдяки спільній дії ендо- і екзогенних специфічних факторів. Визначено також, що спіральний ріст розпочинається після диференціації каулонеми і для багатьох видів є гравізалезним явищем: негравічутливі столони *C. purpureus* ростуть у змінених умовах гравітації спіралью, а гравічутлива каулонема *B. unguiculata* спіральних структур не утворює. Тому, можемо переконливо стверджувати, що спіральний чи плагіотропний ріст протонеми є результатом взаємного впливу світла і гравітації, у якому світло обмежує асиметричну дію гравітації.

1.4. Особливості гравіреакцій мохів залежно від екологічних умов

Наглядним взірцем того, що у різних екологічних умовах під впливом гравітації формуються специфічні тропізми є *Bryum pseudotriquetrum*. Установлено, що дві форми моху *B. pseudotriquetrum* із кліматично відмінних природних локалітетів (Антарктики і Львівської обл.) по-різному реагували на гравітацію. Зазвичай для багатьох видів мохів гравічутливою є ювенільна стадія – протонема, тоді як гаметофори можуть і не проявляти тропізму. Проте, у *B. pseudotriquetrum* з Антарктики гравічутливими були гаметофори (рис. 1.4.1 а), з околиць м.

Львова гравітропно росла протонема, а гаметофори менше реагували на гравітацію (рис. 1.4.1 *b*). Після гравістимуляції у пазухах листків гаметофорів антарктичної екоморфи моху утворювалися численні виводкові бульбочки, а у львівської – на ризоїдних столонах (рис. 1.4.1 *a,b*).

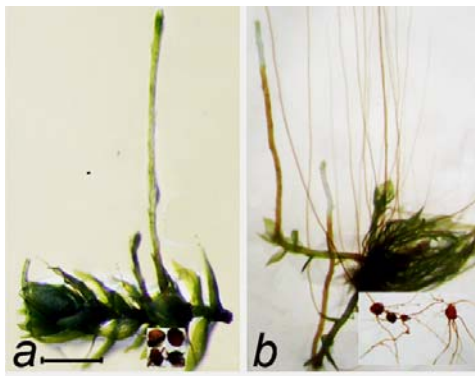


Рис. 1.4.1. Дві екоморфи *B. pseudotriquetrum* з різною гравічутливістю органів гаметофіту:

a) – антарктична популяція з гравічутливими гаметофорами, в основі яких утворилися виводкові бульбочки; *b*) – львівська популяція з гравічутливою протонемою і менш чутливими пагонами та ризоїдними бульбочками на протонемних столонах. Штрих = 1,5 см

У відповідь на переорієнтацію гравітропної протонеми і гаметофорів *B. pseudotriquetrum* з вертикального у горизонтальне положення поступово згиналася верхівка протонеми або пагона унаслідок зміщення ростової зони. Величина кута згину верхівок пагонів і апікальних клітин протонеми була показником чутливості рослин до гравітації (табл. 1.4.1). Як виявилось, протонема і гаметофори обидвох зразків *B. pseudotriquetrum* по-різному реагували на вплив гравітації. Негативний гравітропізм властивий гаметофорам антарктичної і протонемі львівської екоморф, тоді як протонема і гаметофори зразків, відповідно, з Антарктики і ок. Львова не проявляли чіткого тропізму.

Таблиця 1.4.1

Вплив гравітації на величину кута згину верхівки протонеми і пагонів моху *Bryum pseudotriquetrum* з різних кліматичних зон; тривалість гравістимуляції 12 год

Варіанти досліджу	<i>B. pseudotriquetrum</i> , φ, град	
	з Антарктики	з околиць м. Львова
Протонема	0	84, 7 ± 2,1
Пагони	79,3 ± 4,3	2,8 ± 0,2

Отже, гравічутливість протонеми і гаметофорів *B. pseudotriquetrum* сформувалася залежно від екологічних умов. Мабуть, адаптація до умов короткого вегетаційного періоду Антарктики сприяла підвищенню гравічутливості гаметофорів моху, на яких закладалися органи вегетативного розмноження. Завдяки тропізмам і пришвидшенню розмноження гравівідчуття гаметофорів мають переваги у життєвій стратегії *B. pseudotriquetrum* у стресових умовах Антарктики, наприклад потепління і затоплення. Лише утворення над субстратом негативно гравітропних гаметофорів змогло енергетично забезпечити швидке вегетативне розмноження виводковими бульбочками, що сприяло виживанню рослин і розмноженню під час короткотривалого весняного періоду Антарктики. Тобто, у відмінних екологічних умовах сформувалися спеціалізовані гравіреакції, що мало вирішальне значення для стратегії виживання, утворення мохового покриву і поширення *B. pseudotriquetrum* у різних кліматичних умовах. У трав'яних рослин, напр., щучника *Deschampsia antarctica* Desv., в умовах Антарктики утворилася атипова структура мезофілу з численними везикулами, що екранують УФ-радіацію, і розвинулися інші морфогенетичні захисні реакції (Таран та ін., 2007). Отже, тому що в Антарктиці рослини протягом вегетаційного періоду зазнають тривалого впливу низьких температур, надмірного УФ опромінення, затоплення, а також за участю гравітації, появилися специфічні механізми, що в таких умовах забезпечили їх виживання.

РОЗДІЛ 2. ВИВЧЕННЯ РЕПРОДУКТИВНОГО РОЗВИТКУ МОХІВ В УМОВАХ СТАЛОЇ І ЗМІНЕНОЇ ВЕКТОРНОЇ ДІЇ ГРАВІТАЦІЇ

2.1. Аналіз вегетативного розмноження *Leptobryum pyriforme* Schimp. у різних умовах сили тяжіння

Окрім того, що гравітація та інші екологічні фактори беруть участь у регуляції морфогенезу бріофітів на різних стадіях онтогенезу (Ripetskyj et al. 1999; Schwuchow et al., 2002; Демків та ін., 2005), земне тяжіння впливає і на репродуктивну стратегію мохів. Важливою формою репродуктивної біології мохів є регенераційна здатність як найпростіший і водночас найпоширеніший спосіб вегетативного розмноження (Glime, 2006; Graf, Rochefort, 2008). З огляду на морфогенез, суть регенерації мохів полягає в тому, що у певних умовах будь-яка ізольована клітина гаметофіту чи спорофіту може утворити вторинну протонему (зі спорофіту диплоїдну), на якій швидше, ніж на первинній протонемі зі спор, розвиваються листкостеблові пагони і відновлюється цілісність дернин.

Аналіз репродуктивного розвитку деяких видів мохів завершує цикл робіт про вплив земного тяжіння на онтогенез бріофітів (Демків та ін., 2009; Лобачевська, Хоркавців, 2014; Кияк, Хоркавців, 2015). Як правило, більшість мохів розмножується як вегетативно, так і генеративно, однак статеве розмноження і розсівання спор мохів часто обмежене кліматичними умовами і тоді безстатєва репродукція стає визначальною стадією життєвої історії та ефективним механізмом швидкого локального заселення і закріплення моху на певній території (Glime, 2006; Frey, Kürschner, 2010).

Для гравічутливого виду *Leptobryum pyriforme* уперше експериментально встановлено, що розвиток виводкових тілець, які є органами вегетативного розмноження і запасання поживних речовин, явище гравізалєжне. Показано, що під час гравістимуляції, виводкові тільця *L. pyriforme* утворювалися на протонемі значно швидше і було їх удвічі більше, ніж на світлі (рис. 2.1.1). Після клиностатування виводкові тільця *L. pyriforme* закладалися із запізненням і менше, порівняно з гравістимульованою протонемною дерниною.

Отже, унаслідок різної чутливості стадій онтогенезу і акселерації вегетативного розмноження гравітація модифікує репродуктивну стратегію мохів, сприяючи їх виживанню в несприятливих умовах.

В екстремальних умовах водного дефіциту вегетативне розмноження спеціалізованими безстатєвими органами забезпечує не лише локальне поширення моху, полегшує поглинання і утримання води, а й підтримку популяції завдяки тривалому збереженню банку життєздатних діаспор (Лобачевська, Рабик, 2012).

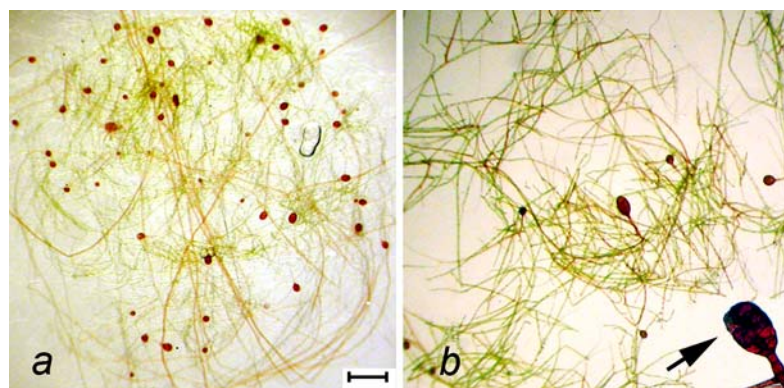


Рис. 2.1.1. Протонема *Leptobryum pyriforme* з виводковими тільцями: інтенсивніше утворення виводкових тілець на гравітропній протонемі (а), ніж на світлі (b); стрілкою вказано на виводкове тільце моху. Штрих = 500 мкм (a,b)

У стресових умовах посухи осмотично активний пролін сприяє підвищенню водного потенціалу клітин рослин і зменшує рівень їх пошкодження (Кордюм и др., 2003; Вайнер и др., 2014). Визначено взаємовплив проліну і ПЕГ–6000 на гравізалежне утворення виводкових тілець виду моху *L. pyriforme*, що здебільшого трапляється на зволоженому ґрунті (табл. 2.1.1).

Таблиця 2.1.1

Вплив осмотично активних речовин на гравізалежне формування виводкових тілець на 20-денній протонемі *Leptobryum pyriforme*

Умови досліджу	Кількість виводкових тілець / 1 дернину, шт.		
	після гравістимуляції	після клиностагування	на світлі
Пролін, 1 мМ	70,3 ± 1,3	61,6 ± 3,3	65,4 ± 2,1
ПЕГ, 3 %	84,1 ± 2,7	56,4 ± 3,1	40,2 ± 2,5
ПЕГ, 5 %	18,2 ± 0,9	9,0 ± 0,7	4,6 ± 0,2
Пролін + 5 % ПЕГ	50,3 ± 3,1	32,4 ± 1,2	30,7 ± 2,8
Гравітропна протонема	60,8 ± 2,4	37,3 ± 2,9	—
Протонема на світлі (контроль)	—	—	30,4 ± 2,0

Визначено, що виводкових тілець в усіх варіантах досліджу утворювалося більше після гравістимуляції, ніж на світлі (табл. 2.1.1). 3 % ПЕГ стимулював формування виводкових тілець найбільше на гравітропній протонемі, порівняно з протонемою зі світла і після клиностагування. Відзначено, що незначна втрата води у субстраті є стимулюючим фактором для утворення спеціалізованих органів вегетативного розмноження, проте вплив

5 % ПЕГу на формування виводкових тілець *L. pyriforme* був набагато токсичнішим. Його інгібуюча дія зменшувалася завдяки проліну і гравітації (табл. 2.1.1). Раніше для *B. argenteum* встановлено, що ПЕГ, АБК та сахароза ініціювали утворення гем на повітряній розгалуженій хлоронемі на світлі (Лобачевська, Рабик, 2012).

Отже, в умовах водного дефіциту поляризуюча дія гравітації може виконувати осморегуляторну функцію та бути активним чинником для ініціації відновлення і посилення вегетативного розмноження. У такий спосіб більша всмоктувальна сила численних апікальних клітин гравітропної протонемі до певної міри могла підтримати водний баланс і, очевидно, стимулювати розвиток спеціалізованих виводкових органів. У несприятливих екологічних умовах це сприяє підвищенню осмотичного тиску в клітинах рослин на початку їх виживання, оптимізує репродуктивну спроможність та забезпечує збільшення мохового покриву.

Таким чином, гаметофітна стадія розвитку мохів адаптується до гравітації та інших екологічних чинників унаслідок зміни морфологічної структури – збільшення інтенсивності галузнення, кількості бруньок і органів вегетативного розмноження, пришвидшення їх розвитку та переходу радіального росту в спіральний.

2.2. Статева структура і продуктивність однодомного *Physcomitrella patens* (Hedw.)

В. S. G. і дводомного *Bryum argenteum* Hedw. видів мохів

Моделлю для дослідження генеративного розмноження в умовах зміненої гравітації був однодомний вид *Physcomitrella patens*, онтогенетичний цикл якого у лабораторній культурі тривав два місяці. Для моху властива висока гравічутливість та специфічні гравіреакції на різних стадіях розвитку: в умовах 1g *P. patens* утворювала гравітропні протонемні столони, гравічутливі гаметофори та спіральну дернину (Демків та ін., 2009). Такі фенотипні модифікації, без сумніву, розширили систему адаптації виду до специфічних умов місцезростань, зокрема на вологих переораних ґрунтах.

Гравічутливість *P. patens* визначали у стаціонарних умовах 1g та після 14-денного горизонтального клиностакування. Як у контролі, так і після клиноротації, на пагонах однодомної дернини переважали голі (без перигональних листків) чоловічі статеві органи (табл. 2.2.1), хоча їх утворення затримувалося на 9–10 днів. Результати аналізу статевої експресії свідчать, що антеридії, порівняно з архегоніями, швидше дозрівали на клиностаті, їх утворювалося менше, ніж у контролі, і вони були чутливішими до зміни гравітації – кількість незрілих антеридіїв збільшувалася у 1,5 рази. Істотного впливу клиноротації на формування спорогонів не відзначено (рис. 2.2.1). Проте абортівних спор утворювалося на 5–10 % більше, а відсоток спор, які проростали, зменшувався від 75 до 60.

Оцінка статевої продуктивності моху *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G.; проаналізовано 250 пагонів

Умови дослідю	Кількість статевих органів, шт.		Кількість, %	
	архегоніїв	антеридіїв	фертильних пагонів	спорогонів
Контроль	85,2 ± 2,4	230,0 ± 3,5	67,8 ± 1,7	88,6 ± 3,9
Клиноостатування	79,7 ± 1,8	158,6 ± 2,7	59,7 ± 2,1	79,9 ± 4,1

У першому поколінні після клиноротації мохова дернина розвивалася повільніше, гаметофорів утворювалося менше, проте у наступній генерації різниці між контролем і дослідом не виявляли.

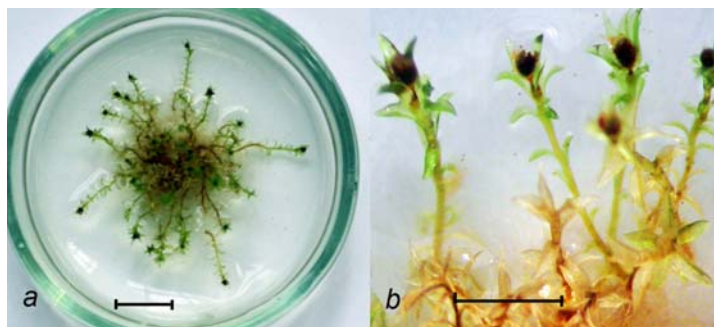


Рис. 2.2.1. Однодомна дернина *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. із зануреними у перихеціальні листки круглястими коробочками:

a – контроль; *б* – після клиноостатування. Штрих = 2 мм (*a*, *b*)

Як свідчать наведені у табл. 2.2.2 результати аналізу розвитку генеративних органів та статевої структури дводомного виду *Bryum argenteum*, після клиноостатування кількість чоловічих рослин із гаметангіями збільшувалася, а жіночих – зменшувалася, хоча загальна кількість фертильних рослин не змінювалася. Крім того, антеридії закладалися швидше, порівняно з контролем та жіночими рослинами з архегоніями. На відміну від *P. patens*, елімінація векторної дії гравітації виявилася навіть ефективною для чоловічих рослин *B. argenteum* – після клиноостатування архегоніїв у мохових дернинах утворилося менше, а антеридіїв – більше. Відомо, що як для однодомних бріофітів, так і дводомних, характерною є протандрія – антеридіїв закладається більше і дозрівають вони раніше від архегоніїв, саме в такий спосіб гарантується більша ймовірність запліднення.

Для *B. argenteum* гравітропізм властивий регенеративній протонемі та спорофіту (Лобачевська, 2006), хоча, зазвичай, у бріофітів гравічутливими є протонемна дернина зі

спор і гаметофори. Встановлено, що швидкість росту і кут гравізігну протонеми, отриманої унаслідок регенерації жіночих гаметофорів, були дещо більшими, ніж із чоловічих.

Таблиця 2.2.2

Статева структура та продуктивність дводомного виду моху *Bryum argenteum* Hedw.;
проаналізовано 250 рослин

Умови дослідю	Кількість фертильних рослин, шт.		Кількість гаметангіїв /1 пагін, шт.	
	♀	♂	♀	♂
Контроль	95,6 ± 3,2	110	7,2 ± 0,1	11,0 ± 0,2
Після клиностагування	79,4 ± 2,7	125	7,0 ± 0,5	12,4 ± 0,4

Слід зазначити, що вторинна протонема швидше дедиференціює у хлоронему і каулонему, значно толерантніша до висушування та затримує більше вологи, що сприяє галуженню і утворенню бруньок у несприятливих природних умовах. Окрім того, гравітація індукує морфогенетичні процеси, стимулюючи гравіморфози бруньок на апікальних клітинах вторинної гравітропної протонеми мохів (Ripetskyj et al., 1999). Отже, гравіреакції є видоспецифічними і не виключено, що гравічутливість вторинної регенеративної протонеми *B. argenteum* і *P. patens* може бути адаптивною функцією у життєвій стратегії бріофітів.

У багатьох видів мохів статеве розмноження можливе лише за наявності водної плівки, тому висока вологість середовища є об'єктивною необхідністю їхньої життєдіяльності (Glime, 2006). Часто рослини моху знаходяться під водою і відчують нестачу кисню. Гіпоксія, як стресовий чинник, до певної міри нівелюється активністю дегідрогеназ пентозного циклу, зокрема, алкогольдегідрогеназою (АДГ).

У зразках *B. argenteum*, які були затоплені, визначено вищу активність АДГ, порівняно з рослинами, що росли у звичних умовах зволоження. Ми проаналізували ефект гравітації на АДГ-активність чоловічих і жіночих рослин *B. argenteum* після гіпоксії (рис. 2.2.2).

Встановлено, що активність АДГ фертильних рослин відрізняється – вища ферментативна активність чоловічих, ніж жіночих рослин, очевидно зумовлена більшими енергетичними витратами на формування антеридіїв, яких утворюється значно більше, ніж архегоніїв. Після клиностагування активність ферменту обидвох статей підвищувалася приблизно в 1,4 рази. Відомо (Taylor et al., 2007), що статевий диморфізм мохів, зумовлений різною швидкістю росту, метаболізмом, біомасою і тривалістю дозрівання гаметангіїв,

забезпечується, насамперед, процесами фотосинтезу та дихання, а більша кількість у дернині чоловічих рослин залежить якраз від їх інтенсивності.

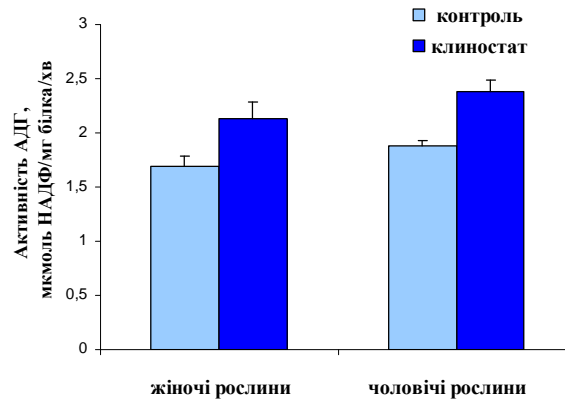


Рис. 2.2.2. Активність алкогольдегідрогенази (АДГ) різностатевих рослин *Bryum argenteum* Hedw. залежно від зміни вектора гравітації

Очевидно, завдяки активності АДГ в умовах гіпоксії відбулася перебудова фізіологічних функцій, що сприяло швидшому утворенню чоловічих рослин з антеридіями та розвитку толерантності моху.

РОЗДІЛ 3. УЧАСТЬ СВІТЛА І ГРАВІТАЦІЇ У ГРАВІМОРФОГЕНЕЗІ МОХІВ

3.1. Взаємовплив світла і гравітації у гравітропізмі протонеми мохів. Реверсія гравітропізму під впливом світла.

Рослини коректують свій ріст відносно світла і гравітації завдяки фото- та гравітропізмам, що є визначальним для детермінації габітусу рослин. Форму галуження і орієнтацію росту латеральних гілок вищих рослин визначає гравізалежний кут нахилу гілок. Встановлено, що разом з іншими екологічними факторами, гравітація впливає на біологію розвитку та біо-і екоморфу мохових рослин.

На світлі протонема мохів росте плагіотропно, орієнтуючись перпендикулярно до напрямку освітлення і гравітації, утворюючи радіально симетричні дернини. У темряві формується густий пучок вертикальних стolonів, орієнтованих негативно гравітропно до напрямку дії сили тяжіння. У природному середовищі протонема адаптується до впливу мінливих екологічних чинників зміною морфологічної структури – збільшенням інтенсивності галуження, пришвидшеним розвитком бруньок і органів вегетативного розмноження. У стресових умовах розвиток гаметофіту забезпечується підвищеною активністю реакцій антиоксидантного захисту (Кияк, 2015).

Ростові рухи протонеми мають виражений адаптивний характер. На світлі така форма росту мохів забезпечує максимальне використання освітлення, а у темряві є найкоротшим шляхом до світла. Система апікальних та інтеркальних клітин протонеми функціонує як інтегрований орган, їх диференціація і морфогенез гаметофіту перебувають під контролем світла і сили гравітації (Демкив и др., 1997).

Дотепер увага цілого ряду дослідників була зосереджена на гравіреакціях протонеми мохів, тоді як пріоритетними можуть стати роботи із вивчення спільної морфогенетичної дії світла і гравітації. У вищих рослин світло і гравітація взаємодіють з гравітропізмом, що виявляється у габітусі або формі крони дерев, а їх різноманітність розглядають як прояв адаптації. Відносно проста нитчаста форма гаметофіту мохів є ідеальною системою для моніторингу росту, диференціації та морфогенезу на клітинному рівні. Саме тому важливо з'ясувати дію світла різної інтенсивності та направленості на ріст і морфогенез гравітропної протонеми мохів.

Для дослідження взаємозв'язку між граві- та фототропізмом використали низькі інтенсивності ефективного для розвитку мохів червоного та синього світла. На інтенсивностях від 0,2 до 1,0 мкмоль·м⁻²·сек⁻¹ червоного світла гравітропізм статистично переважав фототропізм. В умовах мікрогравітації на низькій 50 нм·м⁻²·сек⁻¹ інтенсивності червоного світла 70 % верхівок апікальних клітин *Ceratodon purpureus* орієнтувалися до

світла, тоді як в умовах 1 g така інтенсивність була пороговою для фототропізму (Kern, Sack, 1999). Як показали наші дослідження світло чітко виявляло морфогенетичну дію, індукуючи масове формування бруньок на протонемі *Tortula modica* вже на інтенсивності $0,37 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сек}^{-1}$, причому морфогенетичний ефект світла залежав від напрямку його дії (Ripetsky et al., 1999; Демків та ін., 2006). Червоне світло спрямоване проти вектора гравітації ініціювало утворення значно більшої кількості бруньок, ніж якщо вектори світла і гравітації співпадали. Утворення бруньок на коротких 2–3-клітинних бокових відгалуженнях протонеми *T. modica* корелювало з інтенсивністю росту апікальних клітин. Для диференціації бруньок необхідне гальмування росту клітин (довжина апікальної клітини не повинна бути більшою, ніж 80 мкм), в іншому випадку продовжується нитчастий ріст. Тому відсутність бруньок в умовах мікрогравітації під час опромінення червоним світлом є наслідком інтенсивного фототропного росту, що інгібувало морфогенетичну дію світла.

Синє світло, на відміну від червоного, крім того, що знижувало гравітропну реакцію *C. purpureus*, змінювало напрям росту протонеми (рис. 3.1.1 а,б).

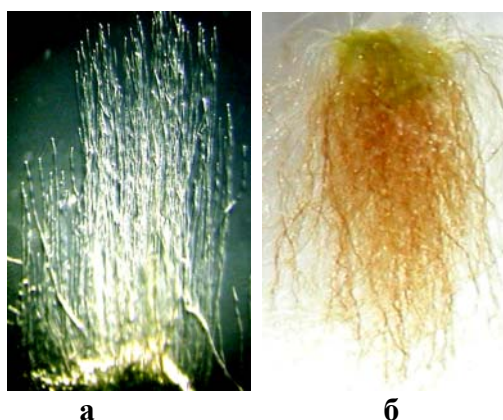


Рис. 3.1.1. Негативно (а) і позитивно (б) гравітропний фенотип протонемної дернинки *Ceratodon purpureus*.

Якщо зорієнтували синє світло інтенсивністю $6 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сек}^{-1}$ перпендикулярно до площини росту, тобто розділили фото– і гравітропний ріст, протонема, замість негативного, виявляла позитивний гравітропізм дещо рандомічно орієнтованих вниз стolonів (Хоркавців, Демків, 2009). Отже, апікальні клітини зберегли чутливість до поляризуючої дії гравітації, проте змінили напрям росту. Відомо, що низькі інтенсивності світла порушували регенерацію протопластів *C. purpureus* і клітини втрачали здатність до полярного утворення позитивно чи негативно фототропних ростків (Wagner, Sack, 1998). Таким чином, до системи гравічутливості апікальних клітин протонеми слід включити два процеси: відчуття вектора гравістимулу і орієнтацію росту.

Очевидно, модуляція гравітропізму під впливом червоного і синього світла, здійснюється, принаймні, через дві фоторецепторні системи, які діють різними шляхами.

Червоне світло через фітохромну систему інгібує гравітропізм, а синє, впливаючи через криптохром або інший рецептор синього світла, не тільки послаблює гравітропізм, а й змінює його напрям.

Нестійку зміну гравітропізму спостерігали під час поділу клітин *C. purpureus*. Подібний ефект відомий також для столонів *Physcomitrella patens*, які після клиностатування змінили гравітропну реакцію. Для обох видів використали мутантні лінії з порушеним хромофором фітохрому і показали, що гравітропізм – генетично закріплена форма росту, а генний продукт, відповідальний за гравітропізм дикої форми, є світло залежний білковий репресор (Lamparter et al., 1997; Cove et al., 2006).

3.2. Вплив гравітації на морфогенез протонеми мохів

Післядія гравітації сприяє також пришвидшеному закладанню бруньок і формуванню листостеблових пагонів у *T. modica*. Якщо перенесли протонему із темряви на низькі інтенсивності освітлення, на апікальних клітинах головних столонів вже на третю добу поступово утворювалися бруньки гаметофорів, тоді як у контролі – на 7–10 день.

Одним із проявів гравіморфозів у мохів є формування на апікальних клітинах бруньок гаметофорів (рис. 3.2.1). Уперше це явище було відзначене для протонеми *T. modica* у досліді на космічному кораблі Shuttle'97, а згодом для інших видів в умовах 1 g і після клиностатування (Ripetskyj et al., 1999; Демків та ін., 2005, 2009).

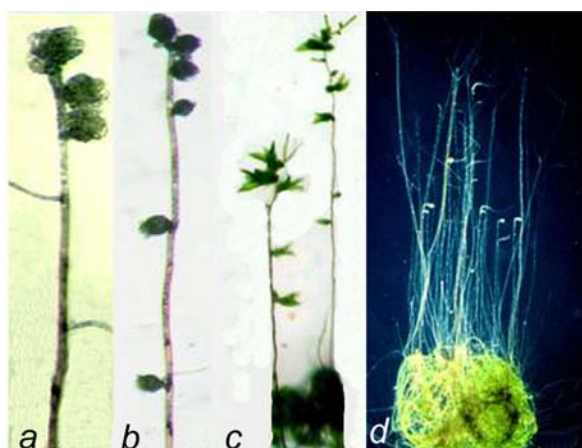


Рис. 3.2.1. Утворення бруньок гаметофорів у *Tortula modica* R.H.Zander залежно від дії гравітації: *a, b, d* – на верхівкових клітинах гравістимульованої протонеми в умовах 1 g; *c*, – вздовж протонемних столонів після клиностатування.

Після гравістимуляції і перенесення протонеми із темряви на світло спостерігали масове утворення бруньок на апікальних клітинах (рис. 3.2.1 *a, d*), чого зазвичай у нормі не

відбувається. Гравітація індукувала полярний транспорт цитокініну до верхівки апікальної клітини, що сприяло фізіологічній поляризації і локальній диференціації бруньок. Якщо вектор гравітації знімали клиностатуванням, унаслідок послаблення полярного транспорту фітогормонів бруньки закладалися по всій довжині столонів (рис. 10 в, с). Раніше встановлено, що гравіморфогенез двох цитотипів *T. modica* істотно відрізняється співвідношенням фітогормонів, і на гаплоїдній протонемі активація бруньок була сильнішою, ніж на диплоїдній (Демків та ін., 2006).

Обов'язковою передумовою брунькоутворення є диференціація клітин протонемі з косими перетинками і утворення ризоїдів, що регулюється фітогормонами. Гравітація пришвидшила розвиток гаметофіту, оминаючи послідовність цих стадій. Однак після клиностатування бруньки гаметофорів закладалися по всій довжині столону, а не лише у верхівковій частині. Можна припустити, що градієнтний розподіл фітогормонів, що сформувався під впливом сили гравітації, створив полярний потік метаболітів і специфічну активність апікального атрагуючого центру, що стало передумовою компетенції верхівкових клітин гравітропної протонемі до брунькоутворення.

3.3. Вплив світла і фітогормонів на гравізалежний морфогенез апікальних клітин протонемі

Проаналізовано ефект різних спектрів світла на утворення бруньок на гравітропній протонемі *Pohlia nutans* (Hedw). Lindb. 16-год освітлення гравітропної протонемі червоним світлом посилювало брунькоутворення, порівняно з контролем. Бруньки закладалися на один день швидше, зростала їх кількість, насамперед, на апікальних клітинах протонемі (табл. 3.3.1, рис. 3.3.1). Освітлення синім світлом інгібувало апікальне брунькоутворення, але, натомість, в апексі верхівкових клітин протонемі формувалися численні ростові ініціали, з яких надалі розвивалися латеральні галузки. Причиною різного ефекту червоного і синього світла може бути їх взаємодія з фітогормонами. Одним із механізмів дії червоного світла є активізація акропетального клітинного транспорту цитокінінів і ауксинів. Мабуть, під впливом червоного світла посилилася атрагуюча дія апексу верхівкових клітин протонемі, що індукувало підвищення вмісту цитокінінів і компетенцію клітин до формування апікальних бруньок. Синє світло, навпаки, зруйнувало градієнтний апікальний розподіл фітогормонів, унаслідок чого бруньки утворювалися, переважно, вздовж гравітропних столонів.

Зелене світло пригнічувало ріст столонів, їх галуження та сповільнювало гравіморфогенез протонемі (табл. 3.3.1). Закладання бруньок на апікальних клітинах затримувалося на 5-6 днів, порівняно з контролем, і більшість бруньок утворювалося на

інтеркалярних клітинах. Оскільки зелене світло активує збільшення вмісту абсцизової кислоти і знижує рівень цитокінінів, ІОК та гіберелінів в клітинах (Головацкая, 2009), це, мабуть, зумовило інгібуючий вплив світла на морфогенез протонеми *P. nutans*.

Таблиця 3.3.1

Вплив світла різного спектрального складу на формування бруньок гаметофорів на гравітропній протонемі *Pohlia nutans*

№	Варіант досліду	Проаналізовано		Кількість бруньок	
		гаметофорів	столонів	апикальних	субапикальних
1	Контроль (біле світло)	50	260	113	85
2	Червоне світло (16 год)	50	275	138	58
3	Синє світло (16 год)	50	320	34	45
4	Зелене світло (16 год)	50	255	26	38
5	Кінетин (10^{-6} М)	50	270	168	101
6	Кінетин (10^{-6} М) + зелене світло (16 год)	50	255	43	84

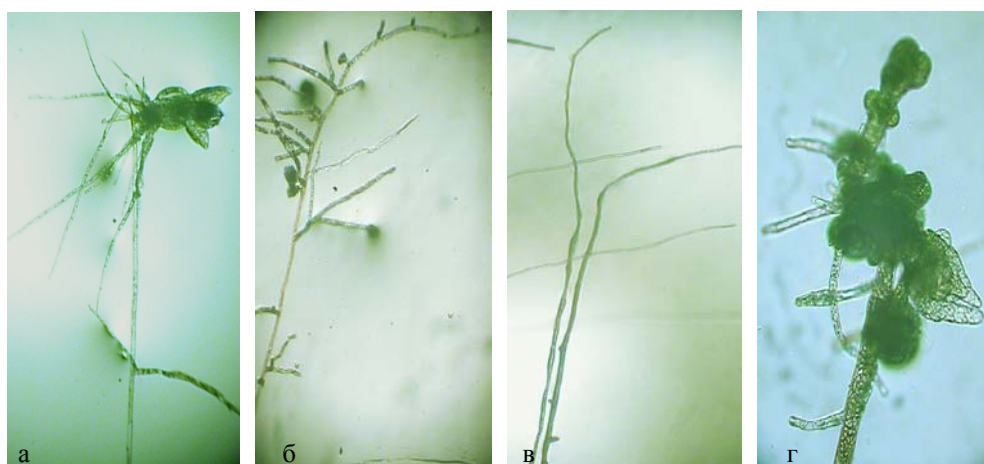


Рис. 3.3.1. Вплив 16-год освітлення та кінетину на формування бруньок на гравітропній протонемі моху *Pohlia nutans*: а – червоне світло, б – синє світло, в – зелене світло, г – $1,0 \mu\text{M}$ кінетин.

Екзогенний кінетин істотно стимулював формування бруньок на гравітропній протонемі. Їх кількість зростала майже в 1,5 рази, порівняно з контролем. Окрім того, на окремих столонах утворювалося по 2-4 бруньки з однієї апікальної клітини. У випадку спільного впливу кінетину і зеленого світла істотно зменшувався негативний вплив світла. Це підтверджує, що в основі регуляторної морфогенетичної дії зеленого світла є зміна транспорту та перерозподіл фітогормонів у клітинах гаметофіту мохів.

Сенсорами гравітаційного стимулу є амілопласти. В апікальних клітинах *P. nutans* нараховано близько $38,3 \pm 0,8$ амілопластів. Аналіз їх локалізації в клітинах свідчить, що основна кількість амілопластів седиментувала під впливом гравітації на нижню сторону бокової стінки (якщо протонему зорієнтувати горизонтально) та уздовж осі клітини у напрямі до ядра. Вони мали сферичну форму. Ближче до базального кінця виявлено поодинокі амілопласти, їх форма змінювалася на витягнуту, веретеноподібну. У верхівці апікальної клітини *P. nutans* зафіксовано декілька (3-4) великих округлих амілопластів, які не седиментували. Світло різного спектрального складу впливало на кількість, розподіл і форму амілопластів. Насамперед, зменшувалася їх кількість (рис. 3.3.2).

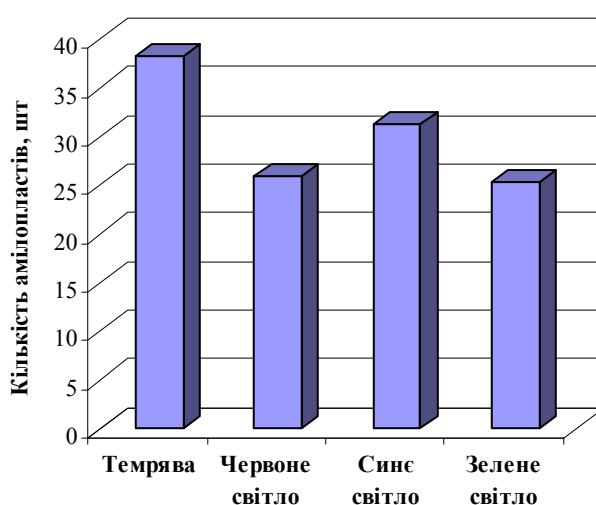


Рис. 3.3.2. Вплив світла різного спектрального складу на кількість амілопластів в апікальних клітинах *Pohlia nutans*

Світло впливало також на величину і форму пластид. Після освітлення червоним світлом утворювалося багато дрібних округлих пластид, а на синьому і зеленому світлі форма і розмір амілопластів майже не змінювалися. Розпад на червоному світлі великих амілопластів на чисельні дрібні частково міг відбутися внаслідок підвищеної α -амілазної активності. Під впливом освітлення пластиди розподілялися по всій апікальній клітині та не утворювали локальних скупчень, як у гравістимульованій протонемі.

Таким чином, світло різних ділянок спектра істотно впливало на гравіморфогенез протонемі *P. nutans*: червоне – активувало апікальне брунькоутворення, синє – пришвидшувало закладання бруньок переважно на інтеркалярних клітинах, зелене – інгібувало розвиток бруньок на клітинах протонемі. Модифікація кінетином ефекту світла свідчить, що гормональна система контролює фоторегуляцію гравіморфогенезу мохів.

Отже, світло і гравітація взаємодіють у тропізмах протонеми мохів, змінюють гравічутливість та просторову орієнтацію столонів та виявляють спільну морфогенетичну дію під час брунькоутворення.

3.4. Значення рН середовища для гравітропізму протонеми *Pohlia nutans* (Schreb.) Lindb.

Важливим ендогенним чинником внутрішньоклітинного метаболізму є рН цитозолу. Відомо, що зміна рН середовища на 1 од. призводить до зміни інтрацелюлярного рН_i на 0,1 од. (Felle, 1988). Величина рН_i відіграє важливу роль на ранніх стадіях сприйняття гравістимулу (Fasano et al., 2001). Визначено, що зниження рН_i від 5,5 до 4,5 протягом перших 2 хв гравістимуляції у клітинах кореневого чохлака *Arabidopsis thaliana* впливало на гравііндукований сигналінг, який пов'язаний з Ca²⁺-залежною регуляторною системою, цитоскелетом, ендоплазматичним ретикулумом та активністю ферментів (Johannes et al., 2009).

Встановлено, що оптимальним для реалізації гравітропної реакції *Pohlia nutans* є рН 7,0 (табл. 3.4.1). Через 24 год після гравістимуляції підлужнення середовища до 9,0 призводило до зниження гравічутливості протонеми. Інгібуючий ефект на гравітропну реакцію протонеми *P. nutans* підвищувався і на середовищі з рН 4,5. Підвищення кислотності середовища до 5,5 у статочитах кореневого чохлака *Zea mays* гальмувало осідання амілопластів та знижувало гравічутливість коренів (Johannes et al., 2009).

Таблиця 3.4.1

Вплив рН середовища на гравічутливість протонеми *P. nutans* та активність гваяколпероксидази у гравістимульованій протонемі

Варіант досліджу	Довжина протонемних фрагментів, мкм	Кут згину протонеми, град	Активність гваяколпероксидази, відн. од. / г маси с.р. / с
рН 4,5	289,1±1,7	27,1±0,1 ⁰	74,5±5,3
рН 7,0	735,2±5,4	67,3±0,5 ⁰	35,8±2,1
рН 9,0	611,8±4,8	41,2±0,3 ⁰	52,5±2,2

Важливу функціональну роль у реакції-відповіді на гравістимул виконує гваяколпероксидаза. Фермент локалізується у різних клітинних компартментах – цитозолі, вакуолях, клітинній стінці, задіяний у процесах росту і розвитку рослини, у реакціях стресу (Prasad et al., 1995; Vreeland, Kwan, 1999). Істотне підвищення пероксидазної активності у гравістимульованій протонемі *P. nutans* встановлено як унаслідок збільшення, так і зменшення рН середовища (табл. 3.4.1). Найбільшу активність ферменту в гравітропній

протонемі та найменший кут гравітропного згину визначено на середовищі з рН 4,5. Очевидно, функціональна лабільність ферменту в умовах порушення клітинного гомеостазу активує компенсаторні внутрішньоклітинні системи, що підтримують сенсорну систему перцепції гравісигналу за дії негативних чинників. Участь пероксидази у гравітропних реакціях клітин протонемі *P. nutans* може бути проявом адаптаційних реакцій гаметофіту до зміни величини рН субстрату.

РОЗДІЛ 4. ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ І ГОРМОНАЛЬНИЙ КОНТРОЛЬ ГРАВІЗАЛЕЖНОГО ГАЛУЖЕННЯ І ВЕЛИЧИНИ КУТА НАХИЛУ БОКОВИХ ГАЛУЗОК

4.1. Галуження клітин протонеми залежно від умов дії світла і гравітації

Габітус рослин визначається передусім типом галуження головних і бокових гілок різного порядку. Кут нахилу бокових гілок рослин є фундаментальний детермінант форми, він залежить від поляризуючої дії гравітації і коректується ІОК. Це – загальнобіологічне явище і приклад самоорганізації розвитку, що контролює структурну специфіку кута впродовж періоду онтогенезу рослин (Hangarter, 1997; Kiss et al., 2003; Kordyum, 2014; Roouchoudhry et al., 2013). Поляризууючу дію гравітації рослини використовують для корекції свого положення у просторі і сприйняття імпульсів світла. Взаємодія світла і гравітації виявляється у ростових рухах, формі галуження, гравіморфозах рослин.

Те, що просторова орієнтація бокових галузок залежить від гравітаційного вектора, показано в досліджах, у яких силу тяжіння модифікували, встановлюючи чашки під кутами від 0° до 90° щодо горизонталі (табл. 4.1.1). Кут нахилу гілок відносно головної осі росту пропорційно збільшувався із дозою гравітаційної дії, клиностатування також послабляло силу гравітації в усіх варіантах. Таким чином, залежно від вектора гравітації кут латеральних галузок змінювався, ініціюючи переорієнтацію росту від граві– до плагіотропного.

Таблиця 4.1.1

Величина кутів латеральних галузок протонеми *Ceratodon purpureus* залежно від векторної дії гравітації

Кут нахилу чашок відносно горизонтальної поверхні, °	Орієнтація латеральних галузок, °	
	контроль, 1g	після клиностатування
0	82,0 ± 3.1	87,0 ± 5.6
30	68,0 ± 3.4	79,0 ± 3.8
60	45,0 ± 3.2	61,0 ± 5.2
90	18,0 ± 0.8	43,0 ± 2.5

Проаналізовано вплив світла і гравітації на форму протонемної дернини *Tortula modica*: галуження і кут нахилу бокових галузок відносно ортотропної осі росту материнської клітини. Встановлено, що локальне місце галуження можна контролювати за участю гравітації. Протонема мохів у темряві не галузиться тому для активації галуження потрібне світло. Мінімально низька інтенсивність червоного світла індукувала галуження *T.*

modica без видимого фототропного росту, що дало можливість експериментально розділити граві- і фототропізм. Активували галуження низькою інтенсивністю червоного світла ($0,2 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сек}^{-1}$), не стимулюючи фототропізм, і змінювали положення протонемі щодо вектора гравітації – паралельно або перпендикулярно до освітлення. Галузки закладалися залежно від дії обох чинників (рис. 4.1.1). Однонаправлена дія ініціювала галуження з двох боків столону (рис. 4.1.1 а, в). Коли вектори світла і гравітації були перпендикулярні і сила дії гравітації $1 g$, галузки домінували з одного боку – у напрямі дії гравітації (рис. 4.1.1 б). У контролі на білому світлі вектори світла і гравітації паралельні і галузки, як і на гравітропній протонемі, утворилися з обох боків клітин протонемі (рис. 4.1.1 в).



Рис. 4.1.1. Напрямок росту латеральних галузок протонемі *Ceratodon purpureus* залежно від орієнтації векторів світла (ϵ) та гравітації (g): а — паралельно, б — перпендикулярно, в — контроль — протонема росла на світлі, вектори світла і гравітації паралельні.

Характерною особливістю листяних мохів є їх здатність до регенерації, яка може відбуватися як на світлі, так і в темряві. Гравітація не впливає на процес регенерації, а лише визначає локалізацію і напрям росту протонемі. Гравітропно негативна протонема виду *Tortula modica* в темряві не галузиться, проте фототропно неактивна низька інтенсивність червоного світла (1 і $2 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сек}^{-1}$) індукувала галуження протонемі та утворення на ній бруньок гаметофорів, причому місце закладання галузок й напрям їх подальшого росту залежав від орієнтації протонемі щодо вектора гравітації і світла.

Якщо вертикально орієнтовану темнову протонему освітлювали червоним світлом інтенсивністю $2 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сек}^{-1}$ збоку, $96,9 \pm 2,2 \%$ бокових відгалужень утворювались на освітленому боці і росли до світла. У випадку освітлення горизонтально орієнтованої протонемі світлом знизу на освітленому боці виникали і росли фототропно лише $68,1 \pm 5,5 \%$ столонів протонемі, а решта – $31,9 \pm 2,6 \%$ утворювались на затіненному боці і росли вверх, що неодмінно зумовлено впливом гравітації (табл. 4.1.2). Під час освітлення вертикально-орієнтованої протонемі збоку червоним світлом інтенсивністю 1

мкмоль·м⁻²·сек⁻¹ фототропно росли 68,3 ± 3,9 % бокових відгалужень протонеми й бруньок, решта – 31,7 ± 3,9 % негативно фототропно.

Таблиця 4.1.2

Вплив червоного світла і гравітації на місце закладання бокових відгалужень протонеми *Tortula modica*

Умови досліджу			% столонів, що росли	
Положення чашок відносно площини	Інтенсивність освітлення, $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	Напрямок освітлення	позитивно фототропно	негативно фототропно
Горизонтальне	1,0	знизу	76,9 ± 2,4	23,1 ± 1,8
Вертикальне	1,0	збоку	68,3 ± 3,9	31,7 ± 2,2
Горизонтальне	1,0	зверху	62,9 ± 3,1	37,1 ± 3,3
Горизонтальне	2,0	знизу	68,1 ± 5,5	31,9 ± 2,5
Вертикальне	2,0	збоку	96,9 ± 2,2	3,1 ± 0,3

Негативний фототропізм протонеми під впливом освітлення червоним світлом низької інтенсивності визначено для інших видів мохів, зокрема протонеми *Ceratodon purpureus* (Kern, Sack, 1999). Характерно, що під час освітлення горизонтально орієнтованої протонеми 1 мкмоль·м⁻²·сек⁻¹ інтенсивністю червоного світла знизу, кількість бокових відгалужень, що закладалися на верхньому боці (76,9 ± 2,4 %) і росли вверх негативно гравітропно істотно нижча у випадку освітлення протонеми зверху (62,9 ± 3,1 %). Відмінність між кількістю галузок і напрямом їх росту можна пояснити посиленням ефекту гравітації. Очевидно в умовах освітлення знизу гравітація посилює вплив світла, що, можна вважати, є результатом співпадання напрямку світла та градієнту гравітаційного тиску.

Встановлено, що формування кута нахилу бокових галузок, після того, як гравітропну протонему насвітили червоним світлом і перенесли у темряву, не залежить від напрямку дії світла і гравітації. Згин галузок відбувався у два етапи: активація світлом стимулювала ріст клітинної стінки під прямим кутом до поздовжньої осі столону незалежно від вектора гравітації. Індукція світлом робить клітини метаболічно активними, але нечутливими до гравітації, і стінка дочірної клітини майже 4 год росте перпендикулярно до осі материнської клітини, що відповідає ½ клітинного поділу, й лише після цього напрям росту у темряві стає гравізалежний.

Відомо, що під час мітозу припиняється або ж настає короткотривала реверсія гравітропного росту унаслідок реорганізації МТ цитоскелету, що порушує механізми перцепції гравістимулу (Cove et al., 2006). Очевидно, це може бути однією з причин, чому ріст галузки до завершення першого поділу відбувався перпендикулярно до материнської клітини. На наступному етапі після поділу і відділення дочірної клітини кут нахилу

зменшувався від 90° до 50° і напрям росту галузки набував фіксованої гравізаальної орієнтації. Таким чином, лише після мітозу клітина ставала чутливою до гравітації. На білому світлі протонема також галузиться під кутом $45\text{--}50^\circ$ до осі головного столону, внаслідок чого фенотип протонемної дернини багатьох видів мохів подібний (Hangarter, 1997; Demkiv et al., 1999; Kern et al., 2005).

Встановлено, що відновлення кута і напрям росту після декапітації апікальної клітини протонемі відбувається завдяки елементів цитоскелету і мікрофібрил целюлози, структурно-динамічний стан яких регулюється, зокрема, активністю цГМФ-залежного фосфорилування (Демків та ін., 2009). Можна припустити, що направлений ортотропний ріст зумовлений, зокрема, збереженням детермінованої просторової організації мікрофібрил целюлози клітинної стінки і кортикальних МТ. Крім того, ріст бокових галузок і кут їх нахилу зрівноважується дією сили тяжіння та світла і контролюється ендогенно – автотропним ростом. Ці чинники взаємодіють на різних стадіях онтогенезу мохів й визначають їх структурну будову і габітус у природних умовах.

4.2. Гормональний контроль гравізаальної галуженні протонемі і формування кута згину (gravity point angle) галузок

Апікальна клітина протонемі – автономна система синтезу ауксину, який разом з іншими метаболітами інгібіторної дії транспортується в субапікальні клітини, створює там гальмівне поле, унаслідок чого починає галузитися 3–4 клітина столону. На світлі кут згину протонемі *C. purpureus* змінювався вздовж головного столону від $30\text{--}40^\circ$ до $60\text{--}80^\circ$ і в основі ставав плагіотропний (рис. 4.2.1). Така схема галуженні зумовлена поступовим зниженням протидії силі тяжіння, що в свою чергу регулюється гормонально унаслідок послаблення апікального домінування. Причиною нижчої гравічутливості і різної орієнтації бокових галузок є вміст ауксину, синтез якого зростає у клітинах, що галузилися, і в апікальних клітинах нових гілок (Хоркавців, Демків, 2003).

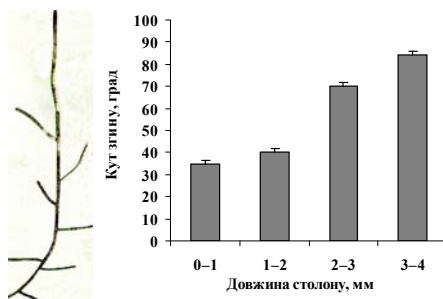


Рис. 4.2.1. Зміна кута нахилу бокових галузок *Ceratodon purpureus* (Brid.) Hedw. в апікально-базальному напрямі вздовж гравітропного столону

Проаналізували вплив ауксину та інгібітора ауксинового транспорту НФК на утворення гравізалежного кута нахилу латеральних гілок протонеми *C. purpureus*. Проведені дослідження свідчать, що їх орієнтація залежить від дії ауксину. Під впливом 1,0 мкМ ІОК істотно підвищувався кут згину гілок, а НФК гальмувала антигравітропну дію ауксину, унаслідок чого кут зменшувався майже на 10° (рис. 4.2.2).

Клиноштатування стимулювало збільшення кута згину і втрата поляризуючої дії гравітації мала навіть більший інгібуючий вплив, ніж дія ауксину (рис. 4.2.2). Отже, редукція полярного транспорту ІОК, її вмісту чи зміна векторної дії гравітації призводили до зменшення протидії силі земного тяжіння, і як наслідок – плагіотропного росту латеральних гілок протонеми.

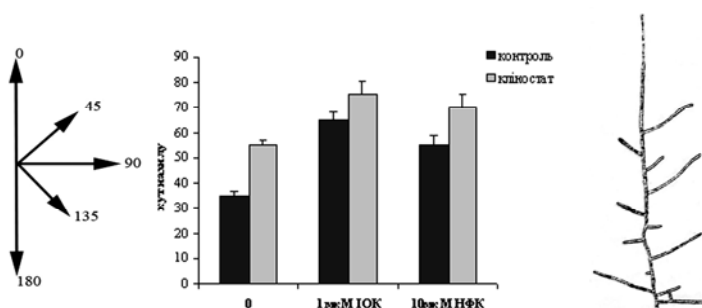


Рис. 4.2.2. Вплив фітогормонів на величину кута нахилу латеральних гілок *Ceratodon purpureus* (Brid.) Hedw. в умовах сталої і зміненої гравітації

У дослідях з *Ceratodon purpureus* і *Physcomitrella patens* з'ясовані питання комплексної участі ауксину у гравіреакціях мохів, пов'язані з транспортом гормонів та активністю Ca^{2+} (Хоркавців, Демків, 2003; Cove et al., 2006). Витоку іонів ІОК передуює перерозподіл Ca^{2+} -каналів і швидший вхід іонів Ca^{2+} у клітину, який корегує потік ІОК і апікальне домінування, порушене дією екзогенної ІОК. Тому в гравітропізмі протонеми мохів сигнальна система ауксину з іонами Ca^{2+} виконує поляризуючу функцію. Для латерального галушення ауксин є індуктором росту пагона, здійснює контроль за гравізалежним кутом згину та автотропізмом (Rouchoudhry et al., 2013; Хоркавців та ін., 2014). Кут згину органу у певних екологічних умовах набуває для рослин особливого значення, щоби дістатися до джерел живлення – поживних речовин та води в ґрунті чи світла на поверхні субстрату.

4.3. Регуляторна роль метилювання у збереженні апікальними клітинами протонеми „пам'яті” про гравістимул

Автотропізм відіграє ключову роль в орієнтації органів та сприяє відновленню початкового напрямку росту завдяки збереженню "пам'яті" про ортотропний ріст.

Природу клітинної „пам'яті” пояснюють посттрансляційними змінами ДНК, що зберігаються у клітинних поділах і можуть успадковуватися нащадками. Новим підходом для з'ясування механізму гравітропного росту є дослідження епігенетичних процесів у гравісприйнятті. Для визначення участі клітинної „пам'яті” у збереженні дії гравістимулу використали інгібітор 5-азациитидин, який регулює стан метилювання ДНК унаслідок модифікації комплементарного дуплету ЦГ–ГЦ. Експериментально визначено температурний режим (+2° С), що блокував ріст, але не впливав на сприйняття гравістимулу, що згодом у сприятливих умовах (+ 22° С) реалізувався як гравітропізм завдяки клітинній „пам'яті”. Якщо протонему *Ceratodon purpureus* преінкубували у 25 мкмоль, 50 мкмоль і 100 мкмоль розчинах 5–азациитидину протягом 6 год, відсоток клітин, що прореагували на гравііндукцію гравітропним ростом, збільшився із 20 % у контролі до 23 %, 35 % і 54 % в експерименті відповідно до збільшення концентрації інгібітора метилювання. Крім того, деметилювання ДНК хроматину вплинуло на тривалість гравііндукції, сповільнило проліферацію клітин та загальмувало автотропні процеси. Як наслідок, під час наступної гравістимуляції, порівняно з необробленою 5–азациитидином протонемою, відновленню гравітропного росту передувало латентний період. Отже, метилювання ЦГ–локусів ДНК призвело до посттрансляційних змін, що вплинуло на тривалість мітозів апікальних клітин протонемі. Для різновікових дернин 7 і 21-денної протонемі після дії інгібітора метилювання ДНК істотної різниці у гравітропізмі не виявили, однак, сигнал про гравііндукцію у молодшій протонемі зберігався довше, ніж у 21-денній. Можливо, причиною є зміни у метилюванні ДНК, зумовлені старінням клітин.

Згідно з результатами аналізу активності ядерної ДНК, зафарбованої ДАРІ, не виявлено різниці між контролем і деметилюваними зразками. Без сумніву, слід мати на увазі, що ”запам'ятовування” може бути результатом експресії окремих генів, що ініціює множинні транскрипційні процеси, які не супроводжуються стійкою активністю геному. Так, для ртуть-резистентних клонів моху *Tortula modica* визначення вмісту ДНК з поєднанням ДНКаз 1 свідчить про незначне збільшення некодуєчої ДНК (Хоркавців та ін., 2009).

Отже, якщо зміну положення рослини залежно від вектора гравітації розглядати як абіотичний стрес, „пам'ять” про його дію реалізується унаслідок епігенетичних змін. Однак, незважаючи на виключну роль метилювання ДНК хроматину для розвитку рослин, до його експериментальних змін варто ставитися неоднозначно, оскільки клітина сама може ефективно контролювати такий епігенетичний сигнал.

РОЗДІЛ 5. ЦИТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ГРАВІТРОПНИХ РЕАКЦІЙ МОХІВ

5.1. Функціональна роль ядра у гравітропному рості апікальних клітин протонеми *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid.

Генератором галуження протонеми є ядро і підвищена функціональна активність клітин, в яких відбувається диференційний ріст. Найбільш імовірно, що місце закладання ростка – процес стохастичний, а програма галуження клітин немає чіткої часової залежності. Однак експериментально можна ініціювати передумови для галуження. Під впливом світла і за участю гравітації у певній ділянці відбувається структурна і функціональна поляризація клітини, а множинна взаємодія клітинних компонентів призводить до локального росту клітинної стінки. Одним з таких компонентів на шляху сприйняття і трансдукції сигналу є ядро, яке чітко мігрує до місця галуження.

Якщо нахиляли чашки зі спорами моху *C. purpureus*, *P. patens* або водоростей *Onoclea* чи *Fucus* відносно горизонтальної поверхні, ядро рухалося до місця локалізації ризоїда, напрям росту якого в таких умовах сили тяжіння змінювався залежно від вектора гравітації (Пундяк та ін., 2002; Nick, 2013).

Встановлено, що саме гравітація впливає на направленість руху ядра *Ceratopteris richardii*, оскільки відеоспостереження в експерименті на Shuttle свідчить про рандомічну міграцію ядра замість поляризованого руху до основи клітини (Roux et al., 2003; Chebli, Geitmann, 2011). Отже, рух ядра перебуває під дією гравітаційної сили, яка енергетично мобілізує транспортні системи для його переміщення (Cove et al, 2006; Herranz, Medina, 2014).

В апікальній клітині ядро, очевидно, не є статолітом, як амілопласти, тому що не мігрувало до основи клітини, коли вектор гравітації змінили на 180° (Schwuchow et al., 2002). Однак чітко стверджувати, що ядро в інтеркалярних клітинах не задіяне у реакції на гравістимул не можна. Показано, що ядро у субапікальній та інтеркалярній клітині *C. purpureus* знаходиться ближче до верхньої перетинки, ніж у центрі (рис. 5.1.1).

Можливо тому, що ядро є чутливою клітинною органелою як до слабких сигналів, так і швидкої зміни сигналу, також механічні стимули включаються у контроль за положенням ядра та утворенням клітинної перетинки (Qu, Sun, 2008).

У ростучих клітинах і під час галуження протонеми ядро постійно перебуває у динамічному русі, мігруючи до місця стимуляції росту (рис. 5.1.2).

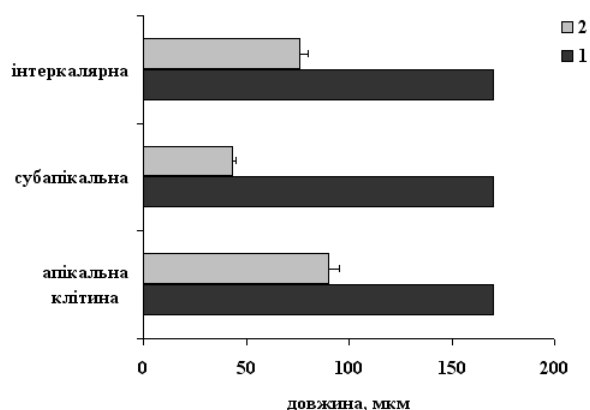


Рис. 5.1.1. Розміщення ядер у клітинах протонемі *Ceratodon purpureus* після гравістимуляції: 1 – довжина клітин 170 мкм; 2 – відстань ядра до клітинної перетинки, мкм

У гравітропній протонемі ядро часто знаходилося біля місця закладання ростка ще перед його утворенням, випереджаючи ріст клітинної стінки (рис. 5.1.2 — 2), швидко ділилося (рис. 5.1.2 — 3,4) і поверталось назад в центр клітини (5.1.2 — 5). У протонемі після кліностагування і у протонемі, що росла на світлі, рух ядра відрізнявся: галузка була сформована, а ядро ще переміщалося до ростка (рис. 5.1.2 — 1,6,7). Очевидно, змінився контроль ядра за повним клітинним циклом – ростом і мітозом, між якими існує кореляція, однак не настільки міцна, щоби не залежати від екологічних факторів. Це може також стосуватися дії зовнішніх факторів як на гормональне співвідношення, так і генну експресію (Matia et al., 2010).

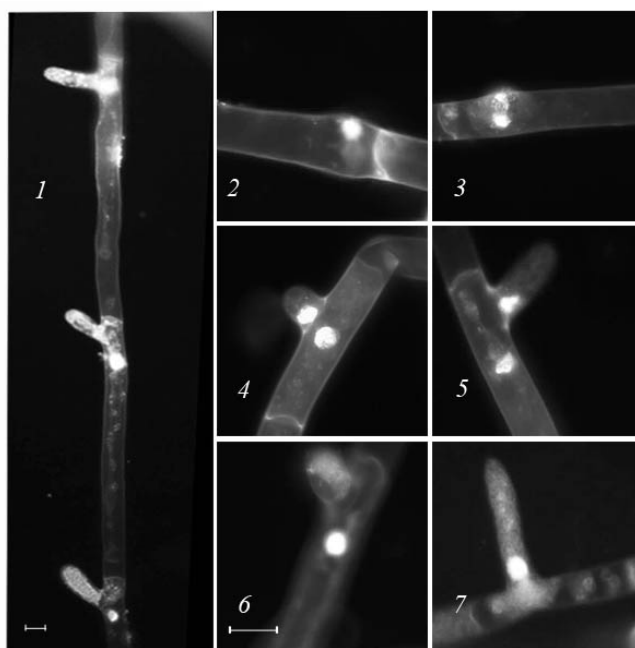


Рис. 5.1.2. Розміщення ядер під час галуження клітин протонемі *Ceratodon purpureus*: 1 — протонема із світла; 2–5 — гравітропна протонема; 6–7 — протонема після кліностагування; штрих = 20 мкм; барвник DAPI.

У літературі чимало відмінних пояснень координації росту і проліферації під впливом мікрогравітації (напр., клітинного циклу, розвитку клітинної стінки, видовження клітин). Зокрема, у Космосі проліферація може підвищуватися, а тривалість росту клітин зменшуватися (Matia et al., 2010; Korδυum, 2014). Вважають, що ріст і поділ „роз’єднані”, унаслідок скорочення G_2 фази, що призводить до акселерації клітинної поділу і формування коротких і чисельних клітин. У іншому варіанті, в експерименті у Космосі епідермальних клітин *Arabidopsis thaliana* було більше, ніж у контролі на Землі, унаслідок підвищення видовження клітин (Paul et al., 2012).

Під впливом гравітації 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. 5.1.3). 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 (Matia et al., 2010; Korδυum, 2014; Micco et al., 2014). Таким чином, дослідження з *C. purpureus* підтверджують, що гравітація є важливим поляризуючим чинником, який підсилює участь ядра у функціональних і морфогенетичних процесах клітин.

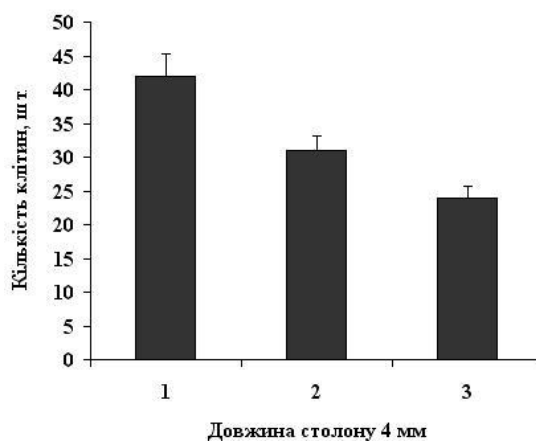


Рис. 5.1.3. Кількість клітин у столоні протонеми *Ceratodon purpureus*, довжина столону 4 мм: (1) — контроль із світла; протонема після кліностатування (2), після гравістимуляції (3)

По-іншому, а навіть навпаки, відбувався процес поділу — росту під час ініціації галуження: поділ ядра інколи завершувався ще до візуального росту галузки (рис. 5.1.2 — 3). Тому клітинний цикл слід розглядати як сукупність ймовірних і детермінованих процесів, які контролюють часову упорядкованість циклу і відрізняються у морфогенезі різних органів (Goodwin, 1979). Однак рух ядра — це відповідь не лише на зовнішні фактори середовища, а

й мікроумови клітини, тому чітка міграція ядра є передумовою підтримання просторової орієнтації поділів і типової форми клітин (Cove et al., 2006; Qu, Sun, 2008). Варто уваги й те, що затримка клітин *Physcomitrella patens* на стадії G₂ клітинного циклу, які містять 2С набір ДНК, розглядається як важлива стратегія виживання гаплоїдного організму (Cuming, 2009).

Взаємозв'язки між ДНК, РНК і синтезом білка складні й ідентифікувати фізіологічні сигнали, які регулюють переходи з одного стану в інший або синтез, важко. Узагальнені дані про вплив гравітації на систему поділ –ріст клітин свідчать, що такі основні клітинні функції не мають прямого відношення до гравіперцепції, але частково змінюються унаслідок порушення гравітаційної сили (Kordyum, 2014). Можна вважати, що мікрогравітація і зміна величини гравітаційної сили є стресовою екологічною умовою, що впливає на механізми росту і клітинного циклу.

5.2. Участь мікротрубочок цитоскелету у реакціях апікальних клітин *Ceratodon purpureus* на векторну дію гравітації

До зони ініціації галузки ядро завжди мігрує в оточенні білків цитоскелету (рис. 5.2.1). Локальне скупчення МТ цитоскелету знайдено у місці поділу клітини ще перед візуальним ростом клітинної стінки (рис. 5.2.1 — 2). Пучки МТ з'являлися між ядром і місцем майбутнього поділу, істотно потовщувалися і скорочувалися під час руху ядра (рис. 5.2.1 — 3).

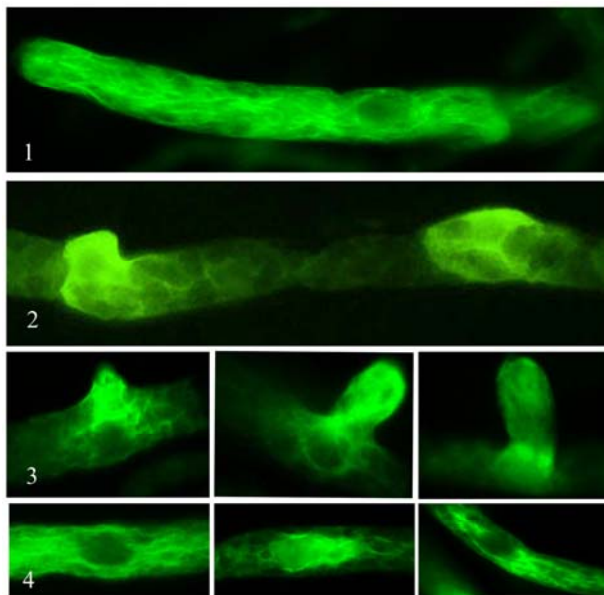


Рис. 5.2.1. Імунофлуоресценція МТ цитоскелету в клітинах *Ceratodon purpureus*: 1 — поздовжня орієнтація в апікальній клітині; 2, 3 — інтенсивна локалізація в клітинах, що галузяться, і навколо ядра — 4

Встановлено, що білки цитоскелету функціонально активніші під час цитокінезу, а полімеризація тубуліну таксолом інгібувала переміщення ядра і порушувала орієнтацію клітинної перетинки (Demkiv et al., 2003). МТ контролюють також переміщення ауксинів, виконуючи сигнальну і транспортну функції (Nick, 2013). Визначено, що імунофлуоресценція тубуліну підвищувалася під впливом низьких інтенсивностей червоного світла, тому слід вважати, що світло контролює локалізацію активного тубуліну (Korodyum et al., 2009). Ймовірно білки цитоскелету скоріше виконують сигнальну функцію, включаючись у гравіреакцію через орієнтацію поділів і упорядкування мікрофібрил целюлози, а також є ланкою транспортної системи ядра. Надалі специфічна популяція МТ долучалася до системи регуляції росту та гравіморфізму латерального пагона. Однак не з'ясованим залишається питання про метаболічні шляхи, через які гравітація впливає на динаміку та перебудову елементів цитоскелету під час руху ядра і галуження клітин протонеми.

РОЗДІЛ 6. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПРО-АНТИОКСИДАНТНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ МОХІВ ЯК СИСТЕМИ ЗАХИСТУ ВІД ГРАВІТАЦІЙНОГО СТРЕСУ

6.1. Вивчення динаміки про-антиоксидантних реакцій фертильних рослин *Bryum argenteum* Hedw.

Як свідчать результати експериментальних досліджень та оглядових робіт, мікрогравітація і зміна вектора гравітації, як стресовий чинник, ініціює збільшення активності компонентів антиоксидантної системи (Недуха, 2015; Porterfield, 2003; Chebli, Geitmann, 2011; Kordyum, 2014). Одним із модуляторів метаболізму в умовах стресу є активація пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), як перша ланка у розвитку реакцій, що запускають системи захисту клітин та організму в цілому (Кордюм и др., 2003). На сьогодні відсутня інформація про зміни активності про-антиоксидантної системи у мохів залежно від сили тяжіння.

З цією метою визначили вміст пероксиду водню як індуктора антиоксидантної захисної системи та динаміку первинних і кінцевих продуктів ліпопероксидації у гаметофорах *B. argenteum* без гаметангіїв і на стадії формування статевих органів. Проаналізовано вміст пероксиду водню залежно від стадії онтогенезу, тривалості клиностагування та визначено вищу чутливість пагонів до зміненої гравітації під час формування статевих органів (рис. 6.1.1).

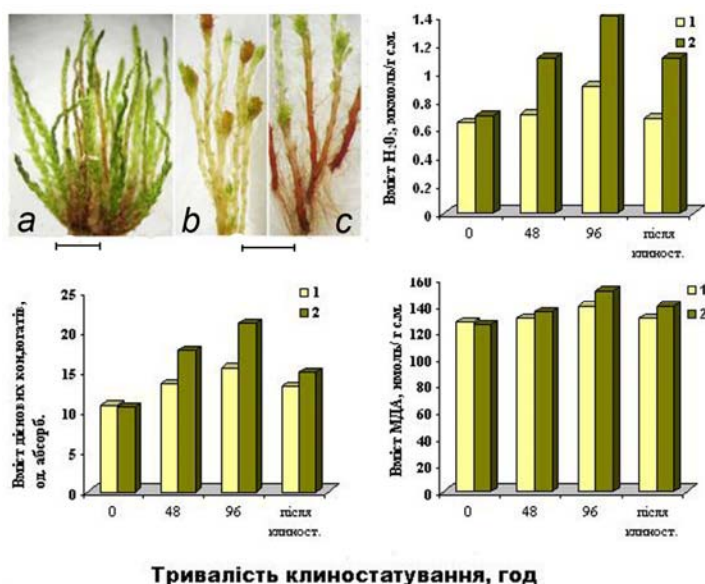


Рис 6.1.1. Вміст пероксиду водню, дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду у пагонах *Bryum argenteum* залежно від тривалості клиностагування: (1) – перед формуванням статевих органів, (2) – на стадії дозрівання гаметангіїв; дернина без гаметангіїв (a), з антеридіями (b) та архегоніями (c). Штрих = 2,5 мм

У контролі вміст H_2O_2 у гаметофорах з гаметангіями не відрізнявся від рослин, які не утворили статевих органів (рис. 6.1.1). Однак, вже 48-годинне клинонстатування виявилось стресовим чинником, особливо для рослин з гаметангіями, унаслідок чого різко підвищився вміст пероксидів. Про активацію процесів ліпопероксидації свідчить істотне збільшення вмісту первинних продуктів – дієнових кон'югатів та та незначне підвищення МДА після 96 год клинонстатування (рис. 6.1.1).

Встановлено, що упродовж усього періоду клинонстатування вміст дієнових кон'югатів на стадії формування статевих органів був на 40 – 50 % вищим, ніж у рослинах без гаметангіїв, а збільшення концентрації МДА розпочалося на 4 добу в обидвох варіантах досліду (рис. 6.1.1). Тобто, під впливом зміненої сили тяжіння збільшився вміст початкових продуктів ПОЛ, а кількість кінцевих метаболітів ліпопероксидації упродовж 2 діб клинонстатування зберігалася на рівні контролю. Очевидно, така тривалість гравітаційного стресу ще знаходилася в межах толерантності рослин *B. argenteum* до окиснювальних процесів. Вірогідне збільшення кількості МДА було зафіксовано лише на 4 добу клинонстатування, що, очевидно, могло бути зумовлене частковим виснаженням ресурсів антиоксидантної системи унаслідок утворення нових радикалів. Значно чутливіші до гравітаційного стресу були пагони на пізнішій стадії розвитку – з гаметангіями, унаслідок чого, відповідно, була вищою інтенсивність оксидантних реакцій.

Отже, залежно від стадії розвитку рослин і впливу гравітації на диференціацію гаметангіїв змінювалася реакційність системи окиснення *B. argenteum*. Після дистресу активність прооксидантного пулу зменшилася майже до рівня контролю, що є показником зворотності деструктивних процесів, які виникли у зв'язку із зміною векторної дії гравітації та розвитком толерантності до підвищення окиснювального потенціалу.

6.2. Стан фотосинтетичного апарату фертильних рослин *Bryum argenteum* Hedw. в умовах змодельованої мікрогравітації

У мохоподібних ініціація і дозрівання чоловічих та жіночих гаметангіїв контролюються і генетично, і фізіологічно. Відомо, що жіночі рослини у період дозрівання статевих клітин мають вищу інтенсивність фотосинтезу та дихання, швидше регенерують та характеризуються більшим приростом біомаси, порівняно з чоловічими особинами (Hanson, Rice, 2014). Крім того, жіночі рослини є стійкішими до різноманітних абіотичних стресів (Stark et al., 2010). Порівняння результатів кількісних і якісних змін пігментів пластид та інтенсивності асиміляції вуглекислоти в рослинах загалом, а також впливу зміненої сили тяжіння на ці процеси розкриває суть пластичності чи консервативності обмінних реакцій, виявляє ступінь пристосованості рослин до умов існування.

Досліджували вплив змодельованої гравітації на пігментний апарат та інтенсивність фотосинтезу у фертильних рослинах моху *Bryum argenteum* Hedw. (табл. 6.2.1). У контролі (без клиностатування) у чоловічих рослинах визначено більший вміст хлорофілу *a*, порівняно з жіночими. За кількістю хлорофілу *b* та каротиноїдів різностатеві рослини істотно не відрізнялися. В умовах клиностатування виявлено часову динаміку показників фотосинтетичної активності фертильних рослин. Насамперед, це стосувалося вмісту хлорофілу *a*. Його кількість суттєво знижувалася в чоловічих і жіночих рослинах на початку впливу зміненої сили тяжіння (24 год). Середню фазу тривалості клиностатування (96 год) можна розглядати, як період акліматизації, оскільки зафіксовано компенсаторне збільшення вмісту хлорофілу *a*. Однак, у жіночих рослинах його кількість зросла майже в 1,6 разів, а в чоловічих пагонах підвищення було менше – в 1,2 рази. Вміст каротиноїдів на початковій фазі клиностатування знижувався, але надалі підвищувався, й більшою мірою у жіночих рослинах (в 1,5 рази).

Таблиця 6.2.1

Вплив клиностатування на вміст пігментів (мг/г маси с. р.)
у фертильних рослинах *Bryum argenteum*

Варіанти досліджу	Хлорофіл <i>a</i>			Хлорофіл <i>b</i>			Каротиноїди		
	24 год	96 год	8 діб	24 год	96 год	8 діб	24 год	96 год	8 діб
Контроль (чол. р.)	0,62±0,02	0,61±0,01	0,63±0,01	0,43±0,01	0,40±0,01	0,44±0,01	0,46±0,01	0,48±0,01	0,46±0,01
Контроль (жін. р.)	0,54±0,01	0,58±0,01	0,61±0,01	0,41±0,01	0,39±0,01	0,42±0,01	0,44±0,01	0,42±0,01	0,42±0,01
Клиностат (чол. р.)	0,44±0,01	0,53±0,02	0,55±0,01	0,38±0,01	0,36±0,01	0,39±0,01	0,51±0,02	0,56±0,01	0,59±0,01
Клиностат (жін. р.)	0,42±0,01	0,67±0,02	0,69±0,02	0,39±0,01	0,41±0,01	0,40±0,01	0,56±0,01	0,66±0,01	0,64±0,01

У складі фотосистем каротиноїди не лише виконують роль додаткових світлозбиральних пігментів, а й знешкоджують синглетний кисень та інші вільні радикали в умовах окиснювального стресу. Невисоке збільшення вмісту каротиноїдів після клиностатування може свідчити про незначне стресове навантаження на рослини в умовах зміненої сили тяжіння, тоді як за впливу інших стресових чинників (наприклад температури, високої інсоляції) кількість пігментів у пагонах *B. argenteum* збільшувалася у 3-4 рази (Кияк, 2015). Вміст хлорофілу *b* суттєво не змінювався упродовж усього періоду клиностатування.

За інтенсивністю фотосинтезу чоловічі та жіночі рослини відрізнялися як у контролі, так і в умовах змодельованої гравітації (рис. 6.2.1). Для чоловічих рослин контролю (без клиностатування) визначено вищу інтенсивність фотосинтетичних процесів (2,28±0,01 мг CO₂ / г маси с. р./год), порівняно з жіночими (1,60±0,01 мг CO₂ / г маси с. р./год). Очевидно, така відмінність зумовлена специфікою формування та дозрівання гаметангіїв *B. argenteum*.

У досліді використано клони чоловічих і жіночих рослин однакового віку, але чоловічі рослини були вже з дозрілими антеридіями, тоді як жіночі перебували лише на стадії формування архегоніїв. Тому енергетичні витрати на цьому етапі формування статевих органів були більшими у чоловічих особин, що підтверджують результати аналізу фотосинтетичної активності.

Зміна сили тяжіння по-різному вплинула на рослини обох статей: визначено поступове підвищення фотосинтетичної активності у жіночих рослинах, що корелювало зі збільшенням вмісту хлорофілу *a* і на 8 добу клиностагування цей показник був найбільшим. Чоловічі рослини значно чутливіші до зміни вектора гравітації, що проявлялося у сповільненні фотосинтетичних процесів. Упродовж клиностагування інтенсивність фотосинтезу чоловічих рослин знизилася майже в 1,3 рази, що свідчить про нижчу чутливість фотосинтезу у жіночих рослинах до зміни вектора гравітації, ніж у чоловічих.

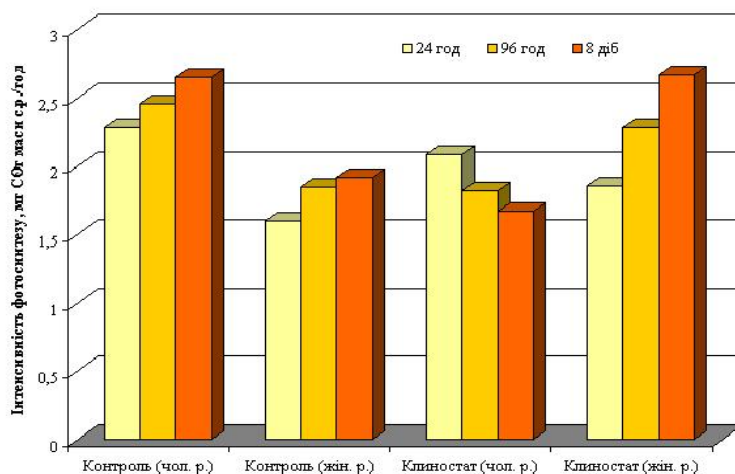


Рис. 6.2.1. Вплив клиностагування на інтенсивність фотосинтезу (мг CO₂ / г маси с. р./год) у фертильних рослинах *Bryum argenteum*

У природних умовах для багатьох дводомних видів мохів також виявлено значне зменшення кількості чоловічих особин або їх відсутність у несприятливих умовах навколишнього середовища. Наприклад, у *Polytrichum alpestre* Норре та *P. alpinum* Hedw. в умовах арктичного клімату чоловічих особин не знаходили, тоді як у субарктичній зоні вони рясно ростуть (Stark et al., 2010). У Північній Америці на тихоокеанському узбережжі у видів *Plagiochilion mayebarae* S. Hatt., *Takakia ceratophylla* (Mitt.) Grolle та *T. lepidozoides* S. Hatt. & Inoue чоловічі особини також не розвиваються (Glime, 2006). В умовах експерименту у деяких видів роду *Macromitrium* Brid. (Orthotrichaceae) встановлено більшу чутливість чоловічих особин до температурного стресу та висушування (Une, 1985).

Отже, аналіз кількісного складу пігментів та особливостей фотосинтезу фертильних рослин *Bryum argenteum* свідчить про залежність процесів формування гаметангіїв від

енергетичного забезпечення клітин та вищу чутливість чоловічих рослин до зміни сили тяжіння.

6.3. Вплив теплового стресу на стійкість гравітропних реакцій на різних стадіях онтогенезу моху *Bryum argenteum* Hedw.

Із цілого комплексу неспецифічних реакцій рослин на дію найрізноманітніших стресорів важливе значення має активація молекулярного кисню та розвиток окиснювального стресу в рослинних клітинах. Ступінь розвитку стресу значною мірою визначається силою та тривалістю дії фактора, чутливістю рослин і стадією їх розвитку. Досліджували вплив теплового стресу на гравітропної реакції моху *Bryum argenteum* на стадії спорової протонеми та гаметофорів.

У *B. argenteum* гравічутливою є як протонеми зі спор, так і регенеративна (вторинна) протонема, отримана регенерацією гаметофорів, котра виявляла значно чіткішу гравітропну реакцію (табл. 6.3.1). Через 24 години після початку гравістимуляції кут загину спорової протонеми становив $40,3 \pm 1,5^\circ$, а через 2 доби після початку гравістимуляції – $52,1 \pm 0,7^\circ$. У протонемі з гаметофорів 24-годинна гравістимуляція індукувала більший кут загину ($69,9 \pm 1,8^\circ$), який через 48 годин досягав $86,2 \pm 0,9^\circ$.

Дослідили стійкість гравітропних реакцій *B. argenteum* після теплового стресу ($+42^\circ\text{C}$, 2 год). Гравічутливішою була протонема зі спор, про що свідчить невеликий кут загину апікальної клітини після гравістимуляції (табл. 6.3.1). Гравітропна реакція регенеративної протонеми була стійкішою до впливу стресу і її гравічутливість повністю відновилася після 48 год. гравістимуляції.

Зміна гравіреакції могла бути зумовлена процесами ПОЛ, унаслідок яких накопичуються ТБК-активні продукти, що є критичними для функціонування клітини та цілісності її компартментів. Як показник стресу, дослідили вміст малонового діальдегіду та карбонільних груп білків.

Таблиця 6.3.1

Гравітропний загин апікальних клітин протонемі та пагонів *B. argenteum* через 24 та 48 годин після початку гравістимуляції, кут загину, $^\circ$

№п/п	Варіант досліджу	Контроль		Післядія теплового стресу ($+42^\circ\text{C}$, 2 год)	
		після 24 год. гравістимулу	після 48 год. гравістимулу	після 24 год. гравістимулу	після 48 год. гравістимулу
1	Спорова протонема	$40,3 \pm 1,5$	$72,1 \pm 0,7$	$32,2 \pm 0,6$	$52,1 \pm 1,2$
2	Регенеративна протонема	$69,9 \pm 1,8$	$86,2 \pm 0,9$	$63,5 \pm 1,1$	$82,4 \pm 0,9$

На обидвох стадіях розвитку гаметофіту *B. argenteum* зафіксовано достовірне збільшення вмісту МДА відразу після впливу високої температури, однак, вищий показник ліпопероксидації визначено у клітинах протонеми. Через 1 добу після стресу окиснювальні процеси у клітинах протонеми продовжували наростати, тоді як у пагонах *B. argenteum* рівень ліпопероксидації знизився майже до рівня контролю (рис. 6.3.1).

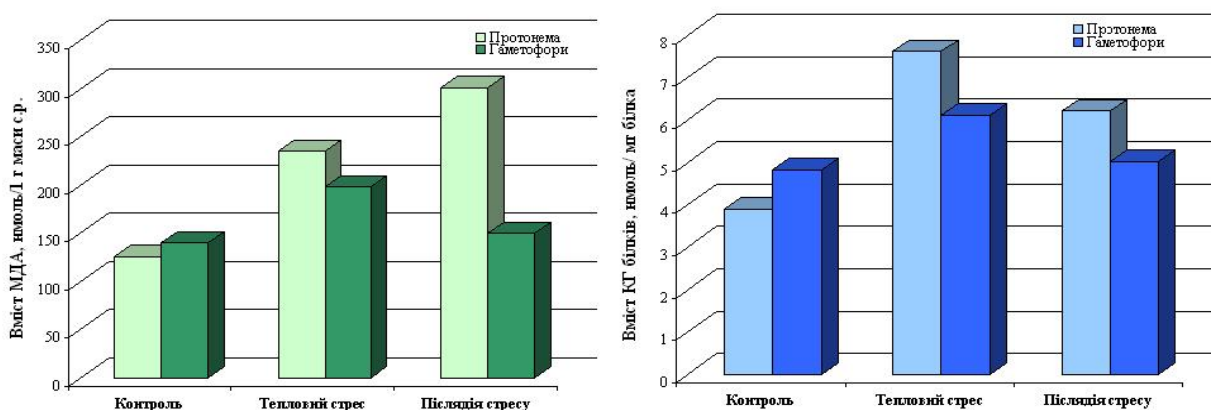


Рис. 6.3.1. Вплив теплового стресу на вміст малонового діальдегіду та карбонільних груп білків на різних стадіях онтогенезу моху *Bryum argenteum*.

Якщо визначення вмісту МДА часто використовують як показник оксидного стресу, то оцінка степеню окисленості білків – карбонільних груп білків ще не набула широкого застосування. Під час окисної модифікації білків змінюється їх гідрофобність, ізоелектрична точка, термостабільність, втрачається ферментативна активність. Детально вивченою модифікацією білкових молекул в умовах дії активних форм кисню є утворення додаткових карбонільних груп в бічних ланцюгах амінокислот (Stadtman, Berlett, 1999).

У наших досліджах тепловий стрес індукував підвищення вмісту КГ білків на обидвох стадіях розвитку гаметофіту *B. argenteum*. У цьому випадку також відзначено чітку залежність окисної модифікації білків від стадії онтогенезу моху. Більшу кількість КГ білків визначено у протонемі як відразу після впливу високої температури, так і в період післядії стресу, що, очевидно, можна пояснити наростанням деструктивних змін у клітинах протонеми. Відомо, що ліпіди мембран досить ефективно захищають ліпопероксидази та низькомолекулярні антиоксиданти, внаслідок чого пероксиди ліпідів швидко метаболізуються, а відновлення окислених білків практично не відбувається, оскільки вони стають мішенню для дії специфічних протеаз (Луцак та ін., 2004). Тому, процеси пероксидації *B. argenteum* взаємопов'язані та суттєво модулюють гравічутливість виду на різних стадіях онтогенезу і пропорційно змінюються із тривалістю та інтенсивністю стресу.

Показано, що стійкість гравітропної реакції в процесі розвитку моху *B. argenteum* підвищується від протонеми до гаметофорів. В умовах теплового стресу гравічутливість моху залежала від активації окиснювальних процесів, що проявлялося в ефективнішому інгібуванні ліпопероксидації та окисної модифікації білків у гаметофорах, порівняно зі споровою протоневою, тому це сприяло швидшому післястресовому відновленню гравітропізму регенеративної протонеми із гаметофорів.

Таким чином, перебіг процесів окиснювального стресу в несприятливих умовах неоднозначний і у кожному конкретному випадку необхідно враховувати і рівень стресового впливу, і рівень диференціації організму.

6.4. Оцінка антиоксидантної системи реакцій у гаметофіті моху *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. в умовах клиностатування

Після фундаментального відкриття гравічутливості рослин вивчення механізмів стійкості до впливу зміненої гравітації залишається актуальною проблемою космічної біології (Кордюм та ін., 2003; Sack, 1991; Demkiv et al., 1999; Kordyum, 2014). В умовах зміненої сили тяжіння відбуваються суттєві структурно-функціональні перебудови клітин, які призводять до порушень клітинного метаболізму і регуляції генної експресії. Так, в умовах мікрогравітації виявлено зміни ультраструктури органел, зміни ліпідного та жирнокислотного складу мембран, посилення вільнорадикального окислення та збільшення активності компонентів антиоксидантної системи (Бараненко, 2003; Nikawa et al., 2004). Культивування клітин *Arabidopsis thaliana* в умовах мікрогравітації призводило до активації експресії генів аскорбатпероксидази, глутатіонпероксидази, каталази та супероксиддисмутази (Hausmann et al., 2014), що свідчить про індукцію неспецифічних реакцій на стресову дію гравітації. Одним із модуляторів у такій системі метаболізму є активація процесів ПОЛ. Збалансованість між пероксидним окисленням та антиоксидантною активністю є важливою умовою збереження життєдіяльності клітин, оскільки зміщення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги як першої неспецифічної ланки у розвитку стрес-реакції є тією біологічно важливою зміною ендogenous середовища рослинної клітини, що запускає наступні механізми захисту.

Важливу роль у трансдукції сигналу запуску захисних реакцій відіграють активні форми кисню (Neill et al., 2002). Пероксид водню, як один із індукторів стрес-реакції, задіяний і в реакціях рослинного організму на зміну сили тяжіння. Показано, що в умовах мікрогравітації у культурі клітин *Arabidopsis thaliana* відбувалося суттєве збільшення вмісту H_2O_2 , якому передувало нагромадження цитозольного Ca^{2+} та відбувалася Ca^{2+} -залежна активація НАДФН-оксидази (Hausmann et al., 2014).

Мохи впродовж тривалого часу є зручною моделлю дослідження гравічутливості рослин. Незважаючи на морфологічну та функціональну специфічність організації, принципово важливим є те, що мохи виробили аналогічні з іншими вищими рослинами механізми сприйняття гравістимулу та його реалізацію відповідно до особливостей росту і будови своїх органів. Встановлена різностороння участь гравітації у життєдіяльності мохів, включаючи тропічні ростові рухи, морфогенез гаметофіту та спорофіту, репродуктивну активність (Лобачевська, Хоркавців, 2014; Ripetskyj et al., 1998; Demkiv et al., 1999). Показано, що в умовах зміненої сили тяжіння відбувається модуляція просторової орієнтації та морфогенезу мохів, змінюється градієнтний розподіл фізіологічно активних речовин у клітинах (Хоркавців, Демків, 2003; Демків та ін., 2005; Лобачевська та ін., 2015). Виявлено істотні структурні і функціональні зміни на клітинному та субклітинному рівнях в організмі мохів як в умовах реального космічного польоту, так і при симуляції ефектів мікрогравітації на клиностахах. У дослідях з культурою моху *Funaria hygrometrica* Hedw. показано, що мікрогравітація впливає на структуру клітинних стінок, цитоплазматичних органел, форму клітин. Структурні зміни клітинних стінок супроводжувалися деструкцією хлоропластів, збільшенням кількості та розміру пероксисом, що неминуче призводило до старіння клітин під час тривалої дії мікрогравітації (Недуха, 2015). Отже, мікрогравітація і зміна величини гравітаційної сили є стресовим екологічним чинником, від якого залежать процеси цитокінезу, росту і розвитку. У систему захисту від окиснювальної деструкції включаються неспецифічні антиоксидантні реакційні схеми.

У зв'язку з тим, важливо було дослідити динаміку вмісту первинних і кінцевих ТБК-активних продуктів ліпопероксидації й особливості активності антиоксидантних ферментів у пагонах моху *Pohlia nutans* в умовах клиностатування, а також оцінити можливу участь пероксиду водню як індуктора захисних реакцій.

В умовах освітлення і гравітаційного поля Землі протонема *Pohlia nutans* росла по поверхні субстрату і формувала радіально симетричну дернинку (6.4.1, а), притому, що так само симетрично закладалися бруньки, формуючи на протонемній дернині радіальне кільце гаметофорів. Якщо чашки Петрі з рослинами перенесли на клиностат і зняли векторну дію гравітації, гаметофори відхилялися вбік від початкового вертикального напрямку росту. Через 14 діб після клиностатування утворювалися різнонаправлені (за і проти годинникової стрілки) згини гаметофорів і радіальна симетрія дернинки втрачалася (рис. 6.4.1, б). Можна допустити, що тропізми і просторова переорієнтація росту є результатом морфогенетичних змін внаслідок стресової дії зміненої сили тяжіння, що могло призвести також до порушень прооксидантно-антиоксидантного балансу клітин.

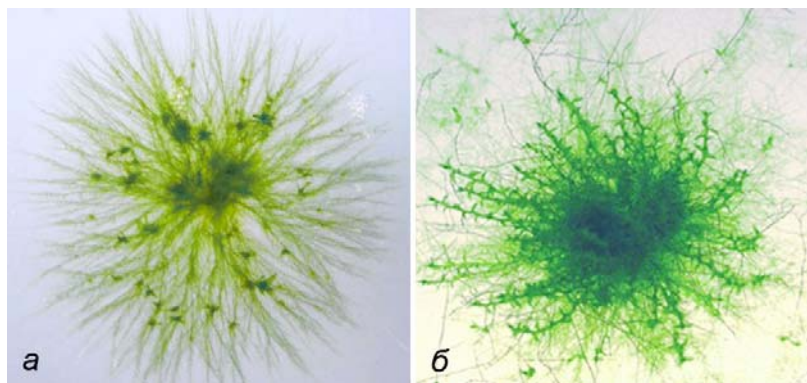


Рис. 6.4.1. Протонемна дернинка *Pohlia nutans* з бруньками гаметофорів, яка росла в умовах гравітації і освітлення (а); дернинка *Pohlia nutans* з гаметофорами після 14-добового клиностакування (б).

На сьогодні робіт, проведених з бріофітами, про активність ферментативних антиоксидантів як специфічних інгібіторів АФК в умовах зміненої векторної дії сили тяжіння недостатньо. Відомо, що метаболічні перетворення пероксиду у мохів регулюються пероксидазою і каталазою, які стимулюються іонами Ca^{2+} , Cu^{2+} та деякими амінокислотами (Barkasdjieva et al., 2009) у зв'язку з чим, ми проаналізували активність каталази і пероксидаз із різною субстратною специфічністю.

Каталаза специфічна лише до пероксиду водню і відповідає за видалення його надлишку в умовах біогенного та абіогенного стресів (Дмитрієв, Кравчук, 2005). Мікрогравітація суттєво вплинула на модифікацію каталазної активності: на початку клиностакування (2 год) зафіксовано активність на рівні контролю, через 24 та 48 год встановлено її підвищення в 1,4 – 1,8 разів і на 7 добу впливу зміненої сили тяжіння відбувся спад активності (табл. 6.4.1), що свідчить про зменшення конститутивного пулу фермента. Тобто, аналізуючи динаміку вмісту пероксиду водню та каталазну активність, встановлено зв'язок між тривалістю клиностакування, концентрацією пероксиду та активністю каталази.

Пероксидази – багатофункціональні ферменти, які беруть участь у захисті організму від окиснювального стресу, контролюють ріст рослин, їх диференціацію та розвиток упродовж різних стадій онтогенезу (Ghamsari et al., 2007). Відомо, що індивідуальні пероксидази відрізняються за специфічністю до субстрату, що пов'язане зі зміною заряду і конфігурації фермента та каталітичними властивостями субстрату при різних значеннях рН (Газарян та др., 2006). У роботі використали 3 типи субстрату: бензидин, до якого вищу специфічність мають аніонні пероксидази, гваякол – для катіонних пероксидаз та аскорбат – для оцінки активності аскорбатпероксидази. На початкових етапах росту рослин в умовах мікрогравітації (2 год) реакція гваяколпероксидази та бензидинпероксидази була подібною, за винятком незначного зниження активності, порівняно з контролем.

Вплив клиностатування на активність ферментів антиоксидантного захисту
в пагонах моху *Pohlia nutans*

Тривалість клиностатування	Активність каталази, мкМ Н ₂ О 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, (мкМ аскорб. к- ти/мг білка/хв
Контроль (без кліностату)	0,198±0,022	32,5±2,7	16,8±1,8	0,198±0,012
2 год	0,182±0,019	30,1±3,3	13,9±1,2*	0,269±0,021*
24 год	0,362±0,041*	39,6±3,7	18,2±1,5	0,285±0,019
48 год	0,273±0,017*	48,9±2,8	17,6±1,8	0,237±0,023*
7 діб	0,169±0,018*	51,6±2,9*	11,7±0,9*	0,189±0,016*
24 год після кліностатування	0,185±0,011	44,2±3,6*	12,4±1,1*	0,191±0,002*

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

Через 24 та 48 годин після клиностатування відзначено поступове підвищення пероксидазної активності, причому активність гваяколпероксидази збільшувалася істотніше (табл. 6.4.1). Відмінності у пероксидазній активності виявлені й на 7 добу впливу клиностатування: знижувалася активність бензидин-залежної пероксидази, тоді як активність гваяколпероксидази залишалася високою.

Відомо, що гваяколпероксидаза локалізується у цитозолі, вакуолях, клітинній стінці, задіяна у процесах росту й розвитку рослини та відіграє ключову роль у поляризації клітин як відповідь на гравістимул, впливаючи на реорганізацію мікрофібрил целюлози клітинної стінки (Vreeland, Kwan, 1999). Підвищення активності гваяколпероксидази в умовах зміненої гравітації свідчить про участь пероксидаз в адаптації рослин до гравітаційного стресу і може бути зумовлене як наростанням процесів вільнорадикального окислення, що також було встановлено у численних дослідках при моделюванні ефектів мікрогравітації (Бараненко, 2003; Martzivanou et al., 2006), так і засобом пристосування організму до зміни положення відносно вектора гравітації.

У групі пероксидаз важливу роль у мінімізації окисного пошкодження за дії стресорів різної природи виконує фермент аскорбат-глутатионового циклу – аскорбатпероксидаза, що каталізує відновлення пероксиду водню до води за участю аскорбінової кислоти як специфічного донора протонів. Вона є одним із основних ферментів, що утилізує пероксид водню в рослинах (Nakano, Asada, 1981). Реакція цього фермента на вплив зміненої сили тяжіння відрізнялася від каталазної та пероксидної активності на початкових етапах клиностатування. Показано, що у пагонах *P. nutans* збільшувалася активність аскорбатпероксидази відразу з перших годин досліду і досягала максимуму на 24 годину.

Надалі активність поступово спадала і вже на 7 добу клинонстатування була на рівні контролю.

Співставивши динаміку активності антиоксидантних ферментів із вмістом пероксиду водню та інтенсивністю ліпопероксидації, які виявлено в умовах впливу зміненої сили тяжіння на рослини *P. nutans*, можна зробити висновок про стресову природу дії клинонстатування та участь захисної ферментативної системи в адаптації рослин до гравітаційного стресу. Індуктором активації антиоксидантної системи може бути пероксид водню, оскільки у наших експериментах простежувалося суттєве збільшення його вмісту на початкових етапах впливу змодельованої мікрогравітації. Впродовж дослідів виявлено фазний характер змін про-/антиоксидантної рівноваги. Для першої фази (2 год клинонстатування) характерно збільшення вмісту пероксиду та низька активність ферментів-антиоксидантів. У другій фазі стресової реакції (24-48 год клинонстатування) певна стабілізувалася рівновага між накопиченням АФК та функціонуванням антиоксидантної системи унаслідок підвищення каталазної та пероксидазної активності. Цей період можна розглядати як стан підвищеної резистентності рослин до стресу. Під час третьої фази (7 діб клинонстатування) у пагонах *P. nutans* включалася вторинна індукція ПОЛ, яка проявилася як у повторному збільшенні вмісту пероксиду водню, так і накопиченні малонового діальдегіду, що свідчить про виснаження резервного пулу антиоксидантів. Хоча на цій стадії зафіксовано підвищену активність гваяколпероксидази, рівень прооксидантної активності виявився досить високим. Результати аналізу показників активності ферментів свідчать, що на початкових етапах клинонстатування функцію ліквідації пероксиду водню виконувала аскорбатпероксидаза, а зниження її активності компенсувалося активізацією інших механізмів, насамперед, підвищеною активністю каталази. Очевидно, каталазі належить ключова роль у знешкодженні пероксиду у пагонах *P. nutans*, оскільки динаміка активності ферменту чітко відтворює зміни концентрації пероксиду водню у пагонах рослин під час клинонстатування.

Раніше фазність змін про-/антиоксидантної рівноваги судинних рослин під впливом мікрогравітації встановлена В.А. Барабой зі співавт. (1991). Фази гравітаційного стресу автори порівнювали із фазами загального адаптаційного синдрому Г. Сельє і дійшли висновку, що медіатором запуску такої стресової реакції є продукти перекисного окислення ліпідів. Подібні результати отримані у випадку формування теплостійкості після короткотривалого впливу гіпертермії на рослини (Карпец, Колупаєв, 2009). Отже, ранні реакції мохів на порушення векторної направленості сили тяжіння подібні до впливу на рослинні організми інших абіотичних чинників. Очевидно, така неспецифічність реакцій зумовлена активацією сигнальних систем, які функціонують за спільним принципом та індукують відповідь рослин на стресори різної природи. Тому захисні реакції мохів можна

розглядати як зручну модель для екофізіологічних досліджень розвитку рослин в умовах зміненої дії сили тяжіння, включаючи гравічутливість і гравітропізми.

Варто уваги й те, що після клиностатування наставала стабілізація стану про-антиоксидантної системи, функціональна активність ключових ферментів антиоксидантного захисту поверталася майже до рівня контролю, що свідчить про репарацію фізіологічних і метаболічних клітинних процесів після гравітаційного стресу і підвищення індивідуальної стійкості до зміни вектора гравітаційної сили.

ВИСНОВКИ

1. Просторова орієнтація органів гаметофіту і спорофіту мохів є гравізалежним процесом.
2. Визначено особливості гравіреакцій мохів на різних стадіях онтогенезу, які сприяють формування нового фенотипу і підвищенню фенотипної пластичності. Встановлено, що гаметофітна стадія розвитку мохів адаптується до гравітації та інших екологічних чинників унаслідок зміни морфологічної структури – збільшення інтенсивності галуження, кількості бруньок і органів вегетативного розмноження та пришвидшення їх утворення, переходу радіального росту в спіральний, а також функціональною мінливістю, що має вирішальне значення для адаптаційних реакцій у мохів.
3. Орієнтація росту бокових галузок протонеми визначається кутом їх нахилу відносно вектора земного тяжіння та сигнальною системою ІОК. Рух ядра корелює з ініціацією нової зони росту та активністю тубулінового цитоскелету, а гравісигнал пришвидшує переміщення ядра і мітотичний цикл компетентних до галуження клітин.
4. Вперше встановлено, що генеративне (статева структура і продуктивність) та вегетативне розмноження різних видів мохів є гравізалежним процесом. Визначено, що формування статевих рослин та органів, переважно чоловічих, є чутливішим до впливу екологічних чинників – зміни гравітації та окиснювального стресу, оскільки потребує значних енергетичних ресурсів. Це – вагоме доповнення для з'ясування механізмів репродуктивної стратегії і біології розвитку бріофітів в умовах сталої і зміненої векторної дії гравітації.
5. В умовах зміненої сили тяжіння встановлено фазну закономірність зміни про-/антиоксидантної рівноваги залежно від тривалості клиностатування. Після припинення впливу імітованої мікрогравітації функціональна активність антиоксидантної системи відновилася до рівня контролю, що свідчить про зворотність фізіологічних процесів як важливого фактора адаптивної стратегії рослин у змінених екологічних умовах.
6. Індуктором активації антиоксидантної системи є пероксид водню. На початкових етапах впливу гравітаційного стресу активну роль у ліквідації пероксиду водню виконувала аскорбатпероксидаза, а згодом зниження її активності компенсувалося підвищеною реакцією каталази. Отже, каскадний характер ферментативних реакцій є важливим фактором регулятивних процесів в умовах зміненої сили тяжіння, а захисні реакції мохів є зручною моделлю для екофізіологічних досліджень розвитку рослин в умовах зміненої дії сили тяжіння, включаючи гравічутливість і гравітропізми.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Барабой В.А., Жадько С.И., Кордюм Е.Л., Сидоренко П.Г. Перекисное окисление липидов растений различного уровня организации при микрогравитационном стрессе // Известия АН СССР. Серия Биологическая. – 1991. – **3**. – С. 368–375.
- Бараненко В. В. Пероксидне окиснення ліпідів та активність супероксиддисмутази в рослинах гороху за умов кліностагування : Автореф. дис. канд. біол. наук : 03.00.11 – К., 2003. – 24 с.
- Вайнер А.А., Колупаев Ю.Е., Обозный А.И. Влияние экзогенного пролина на содержание пероксида водорода в проростках пшеницы и формирование индуцированной теплоустойчивости // *Физиол. растений и генетика*. – 2014. – **46**(3). – С. 252–258.
- Войцеховская С.А., Юмагулова Э.Р., Сурнина Е.Н., Астафурова Т.П. Исследование физиолого-биохимических показателей хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) болотных и лесных популяций // Вестник Томского гос. ун-та. Биология. – 2013. – **23**(3). – С. 111–119.
- Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1983. – **3**. – С. 33–35.
- Газарян И.Г., Хушпульян М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биологической химии. – 2006. – **46**. – С. 303–322.
- Головацкая И.Ф. Регуляция гиббереллинами роста, развития и гормонального баланса растений *Arabidopsis* на зеленом и синем свету / И.Ф. Головацкая // Физиология растений. – 2009. – **55**(3). – С. 348–354.
- Демкив О.Т., Хоркавцив Я.Д., Кардаш А.Р и др. Взаимодействие света и гравитации в ростовых движениях протонемы мхов // Физиол. растений. – 1997. – **44**(2). – С. 205–211.
- Демкив О.Т., Хоркавцив Я.Д., Кардаш А.Р. Полярность и клеточная дифференцировка в процессе развития архегониальных растений // Аналитические аспекты дифференцировки. – М.: Наука, 1991. – С. 121–132.
- Демків О. Т., Хоркавців Я. Д., Кияк Н. Я., Кіт Н. А. Вплив гравітації на фотоморфогенез протонемі *Pottia intermedia* (Turn.) Furnr., Pottiales // Укр. ботан. журн. – 2005. – **62**(3). – С. 329–336.
- Демків О.Т., Кордюм Е.Л., Таїрбеков М.Г., Сак Ф., Кардаш О.Р., Керн Ф. Гравіморфогенез протонемі листяних мохів // Доп. НАНУ, 1998. – **7**. – С. 163–166.
- Демків О.Т., Кордюм Е.Л., Хоркавців Я.Д., Таїрбеков М.Г. Умови гравітації – експериментальна база для пізнання закономірностей морфогенезу рослин в гравітаційному полі // Космічна наука і технологія. – 2006. – **12**(5/6). – С. 30–35.

- 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.
- Дмитрієв О.П., Кравчук Ж.М. Активні форми кисню та імунітет рослин // *Цитологія и генетика* – 2005. – 4. – С. 64–74.
- Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е. Ответ растений на гипертермию: молекулярно-клеточные аспекты // *Вестник Харьков. нац. аграр. ун-та. Сер. Биология*. – 2009. – 1(16). – С. 19–38.
- Кияк Н.Я. Особливості фізіологічних показників водного режиму у бріофітів із різною толерантністю до дефіциту вологи // *Вісник Львівського ун-ту. Серія Біологія*. – 2015. – Вип. 70. – С. 214–223.
- Кияк Н.Я., Хоркавців Я.Д. Адаптація бріофітів до водного дефіциту на території відвалу видобутку сірки // *Укр. ботан. журн.* – 2015. – 72, 6. – С. 645–651.
- Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В., Белявская Н.А., Климчук Д.А., Недуха Е.М. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях / Ред. Е.Л. Кордюм – К.: Наук. думка, 2003. – 290 с.
- Королюк К.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы // *Лабораторное дело*. – 1988. – 1. – С.16–19.
- Лазаренко А.С., Коваленко А.П., Пашук Х.Т. Деякі спіральні структури протонеми листяних мохів // *Укр. ботан. журн.*, 1961. – 18, 6. – С. 89–98.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Изд-во Высшая школа, 1990. – 352 с.
- Лобачевська О.В. Нові види мохів з гравітропною протонемою // *Наукові основи збереження біотичної різноманітності: Тематичний збірник Інституту екології Карпат НАН України*. – Львів: Ліга-Прес, 2006. – Вип. 7 – С. 137 – 143.
- Лобачевська О.В., Рабик І.В. Особливості вегетативного розмноження мохоподібних на відвалах сірчаного видобутку // *Вісник Львів. ун-ту. Серія біол.* – 2012. – Вип. 60. – С. 75–88.
- Лобачевська О.В., Хоркавців Я.Д. Гравічутливість в онтогенезі мохів // *Косм. наука і технол.* – 2014. – 20(5). – С. 55–60.
- Лобачевська О.В., Хоркавців Я.Д., Кияк Н.Я., Кіт Н.А., Данилків І.С. Гравіморфогенез гаметофіту мохів // *Космічна наука і технологія*. – 2015. – 21(6). – С. 49–56.
- Луцак В.І., Багнюкова Т.В., Луцак О.В. Показники оксидативного стресу. 1. Тіобарбітуратактивні продукти і карбонільні групи білків // *Укр. біохім. журн.* – 2004. – 71(5). – С. 112–117.
- Методы биохимического исследования растений / Под ред. Ермакова А.И. – 3 изд., перераб. и доп. – Л.: Агропромиздат. Ленинградское отделение, 1987. – 430 с.
- Мусяенко М.М., Паршикова Т. В., Славный П.С. Спектрофотометрические методы в

- практике физиологии, биохимии и экологии растений. – К.:Фитосоциоцентр, 2001.– 200 с.
- Недуха О.М. *Клітинна оболонка рослин і фактори середовища* / Відпов. ред. Н.О. Білявська. – Київ: Альтерпрес, 2015. – 289 с.
- Пундяк О.І., Демків О.Т., Хоркавців Я. Д., Багрій Б.Б. Полярність проростання спор моху *Funaria hygrometrica* Hedw. // *Космічна наука і технологія*. — 2002. – **8**. – С. 96–100.
- Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Практикум по биохмии сельскохозяйственной продукции. Санкт-Петербург: СПб.:ГИОРД, 2016. – 480 с.
- Таран Н.Ю., Бацманова Л.М., Оканенко О.А. Адаптаційні реакції *Deschampsia antarctica* Desv. за умов Антарктики на дію оксидного стресу // *Укр. бот. журн.* – 2007 – **64**(2). – С. 279–289.
- 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.
- Хоркавців Я.Д. Кордюм Є.Л., Лобачевська О.В., Кияк Н.Я., Кіт Н.А. Галуження протонеми *Ceratodon purpureus* в умовах зміненої сили тяжіння // *Укр. бот. журн.* – 2016 – **72**(6). – С. 588–595.
- Хоркавців Я.Д., Демків О.Т. Вплив інгібіторів ауксинового транспорту на гравітропізм протонеми *Pohlia nutans* (Hedw.) // *Косм. наука і технол.* – 2003. – **9**(2/3). – С. 77–82.
- Хоркавців Я.Д., Кияк Н.Я., Кіт Н.А. Гравізалежний морфогенез мохів // 14-та укр. конф. з космічних досліджень 2–8 вересня, 2014, Ужгород, Україна). – Київ, 2014. – С. 71.
- Хоркавців Я.Д., Кордюм Є.Л., Лобачевська О.В., Кияк Н.Я., Кіт Н.А. Галуження протонеми *Ceratodon purpureus* в умовах зміненої сили тяжіння // *Укр. ботан. журн.* – 2015. – **72**(6). – С. 588 – 595.
- Хоркавців Я.Д., Пундяк О.І. Вплив світла і тривалої темряви на стан пластид гравітропної протонеми // *Укр. бот. ж.* – 2000. – **57**(6). – С. 724–732.
- Хоркавців Я.Д., Ріпецький Р.Т., Баїк О.Л. Фенотипна та епігенетична адаптація клону моху до ртуті // *Цитологія і генетика*. – 2009. – **43**(5). –С. 22–27.
- Barkasdjieva N.T., Chrostov K.N., Christina K.N. Effect of calcium and zinc on the activity and thermostability of superoxide dismutase and peroxidase // *Biol. Plant.* – 2009. – **43**. – pp. 73–78.
- Benz V.R., Rhode J.M., Cruzan M.B. Aerenchyma development and elevated alcohol dehydrogenase activity as alternative responses to hypoxic soils in the *Piriqueta carolina* complex // *Amer. J. of Bot.*, 2007, **94**(4). – pp. 542–550.
- Bopp M. Development Physiology of Bryophytes // *New Manual* / Ed. R.V. Schuster. – The Hattori Bot. Lab. Nichinan, 1983. – pp. 276–324.
- Bradford M.A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding // *Anal Biochem.* – 1976. – **72**. – pp. 248–254.

- Chaban Ch.I., Kern V.D., Ripetskyj R.T. et al. Gravitropism in caulonemata of the moss *Pottia intermedia* // J. of Bryol. – 1998. – **20**. – pp. 287–299.
- Chazotte B. Labeling Nuclear DNA Using DAPI // Cold Spring Harbor Protocols. – 2011. – pp. 83–86.
- Chebli Y., Geitmann A. Gravity research on plants: use of single-cell experimental models // *Plant science*. 2011, **2** – pp. 1–10.
- Cuming A.C. Mosses as Model Organisms for Developmental, Cellular and Molecular Biology / Bryophyte Biology. Eds. Coffinet B., Shaw A.J., 2nd edn. – Cambridge University Press, Cambridge. – 2009. – pp. 199–236.
- Cove D., Bezanilla M., Harries Ph., Quatrano R. Mosses as model systems for the study of metabolism and development // *Ann. Rev. Plant Biol.* – 2006. – **57**. – pp. 497–520.
- Demkiv O.T., Khorkavtsiv Ya.D., Pundiak O.I. Changes of protonemal cell growth related to cytoskeleton organization // *Cell biol. Intern.* – 2003. – **27**. – pp. 187–189.
- 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). – pp. 1999–2004.
- 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). – pp. 1999–2004.
- Fasano J. M., Swanson S. J., Blancaflor E. B., Dowd P. E., Kao T., Gilroy S. Changes in root cap pH required for the gravity response of the Arabidopsis root // *Plant Cell*. – 2001. – **13**. – pp. 907–921.
- Felle H. Short-term pH regulation in plants // *Plant Physiol.* – 1988. – **74**. – P. 583–591.
- Frey W., Kürschner H. Asexual reproduction, habitat colonization and habitat maintenance in bryophytes, *Flora*, 2010, **4**(20): pp. 1–12.
- Gechev T.S., Hille J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death // *J. Cell. Biol.* – 2005. – **168**(1). – pp. 17–20.
- Ghamsari L., Keyhani E., Golkhoo S. Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting // *Iranian Biomedical Journal*. – 2007. – **11**(3). – pp. 137–146.
- Glime G.M. Physiological of Ecology of development In: *Bryophyte ecology* // 2006, vol. 1, available at <http://www.bryoecol.mtu.edu> (accessed 15.08.2015).
- Goodwin B.C. *Analytic Physiology of cells and developing organisms*, London: Academic Press, 1979.–287 p.
- Graf M., Rochefort L. Moss regeneraton for fern restoration: field and greenhouse experiments // *Restoration Eology*.– 2008. – **18**. – pp. 121–130.
- Hangarter R.P. Gravity, light and plant form // *Plant Cell Environ.* – 1997. – **20**. – pp. 796–800.

- Hanson D.T., Rice S.K. What can we learn from bryophyte photosynthesis? In Photosynthesis of Bryophytes and Early Land Plants. / Hanson et Rice (eds.). Springer, Dordrecht, The Netherlands. – 2014. – pp. 1–8.
- Hausmann N., Fengler S., Hennig A., Franz-Wachtel M., Hampp R., Neef M. Cytosolic calcium, hydrogen peroxide and related gene expression and protein modulation in *Arabidopsis thaliana* cell cultures respond immediately to altered gravitation: parabolic flight data // Plant Biol (Stuttg). – 2014. – **16**. – pp. 120–128.
- Herranz R., Medina F.J. Cell proliferation and plant development under novel altered gravity development // *Plant Biology*, 2014, **16** – pp. 23–30.
- Johannes E., Collings D. A., Rink J. C., Allen N. S. Cytoplasmic pH dynamics in Maize pulvinal cells induced by gravity vector changes // *Plant Physiol.* – 2009. – **127**. – pp. 119–130.
- Kern V.D., Sack F.D. Radiance-dependent regulation of gravitropism by red light in protonemata of the moss *Ceratodon purpureus* // *Planta*, 1999. – **209**. – pp. 299–307.
- Kern V.D., Schwuchow J.M., Reed D.W., Nadeau J.A., Lucas J., Skripnikov A., Sack F.D. Gravitropic moss cells default to spiral growth on the clinostat and in microgravity during spaceflight // *Planta*, 2005. – **221**. – pp. 149–157.
- Kiss J.Z., Correll M.J., Mullen J.L., Mullen J.L., Hangarter R.P., Edelmann R.E. Root phototropism: how light and gravity interact in shaping plant form // *Grav. Space Biol. Bull.* – 2003. – **16**. – pp. 55–60.
- Kofler L. Contribution à l'étude biologique de Mousses cultivées in vitro: germination de spores, croissance et développement du protonema chez *Funaria hygrometrica* // *Revue Bryol. et Lichen.* – 1959. – **28**(1/2). – pp. 1–202.
- Kordyum E.L. Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity // *Plant biology.* – 2014. – **16**(1) – pp. 79–90.
- Kordyum E.L., Shevchenko G.V., Kalinina I.M., Demkiv O.T., Khorkavtsiv Ya.D. The plant cytoskeleton: a key tool for agro biotechnology. Eds. Y.B. Blume, W.V. Baird, A.I. Yemets, D. Breviario, Berlin, Germany, Springer, 2009. – pp. 173–196.
- Lamparter T., Esch H., Cove D. et al. Phytochrome control of phototropism and chlorophyll accumulation in the apical cells of protonemal filaments of wild type and an aphototropic mutant of the moss *Ceratodon purpureus* // *Plant Cell Physiol.* – 1997. – **38**. – pp. 51–58.
- Martzivanou M., Babbick M., Cogoli-Greuter M., Hampp R. Microgravity-related changes in gene expression after short-term exposure of *Arabidopsis thaliana* cell cultures // *Protoplasma.* – 2006. – **27**. – pp. 229–239.
- Matia I., González-Camacho F., Herranz R., Kiss J.Z., Gasset G., Loon J., Marco R., Medina F. J. Plant cell proliferation and growth are altered by microgravity conditions in spaceflight // *J. of Plant Physiol.* – 2010, **167** – pp. 184–193.

- Micco V.De., Pascale S.De., Paradiso R., Aronne G. Microgravity effects on different stages of higher plant life cycle and completion of the seed-to-seed cycle // *Plant Biology*, 2014, **16**, pp. 31–38.
- Millar K.D.L., Kumar P., Correll M.J., Mullen J.L Hangarter R.P., Edelman R.E., Kiss J.Z. A novel phototropic response to red light is revealed in microgravity // *New Phytologist*. – 2010. – **186**. – pp. 648–656.
- Miller G., Shulaev V., Mittler R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress // *Physiologia Plantarum*. – 2008. – **133**. – pp. 481–489.
- Mouliá N., Fournier R. The power and control of gravitropic movements in plants: a biochemical and system biology view. // *J. Exp.* – 2009. – **60**(2). – pp. 461–486.
- Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // *Plant Cell Physiol.* – 1981. – **22**(5). – pp. 867–880.
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants // *J. of Exper. Bot.* – 2002. – **53**. – pp. 1237–1247.
- Nick P. Microtubules, signaling and abiotic stress // *The Plant Journal*, – 2013. – **75**. – pp. 309–323.
- Nikawa T., Ishidoh K., Hirasaka K., Ishihara I., Ikemoto M., Kano M., Kominami E., Nonaka I., Ogawa T., Adams G.R., Baldwin K.M., Yasui N., Kishi K. & Takeda S. Skeletal muscle gene expression in space-flown rats // *FASEB Journal* – 2004. – **18**. – pp. 522–524.
- Norrell T.E., Jones K.L., Payton A.C., McDaniel S.M. Meiotic sex ratio variation in natural populations of *Ceratodon purpureus* (Ditrichaceae) // *Amer. J. of Bot.* – 2014. – **101**(9). – pp. 1572–1576.
- Paul A.-L., Amalfitano C.E., Ferl R.J. Plant growth strategies are remodeled by spaceflight // *Plant Biology*, 2012, **12** – pp. 2–14.
- Porterfield D.M., Dreschel T.,W., Musgrave E. A ground-based comparison of nutrient delivery technologies originally developed for growing plants in the spaceflight environment, *Hort Technology*, 2003, **10**(1): – pp. 179–185.
- Prasad T.K., Anderson M.D., Stewart C.R. Localization and Characterization of Peroxidases in the Mitochondria of Chilling-Acclimated Maize Seedlings // *Plant Physiol.* – 1995. – **108**. – pp. 1597–1605.
- Qu L.-H., Sun M.-X. The nucleus as a chief cellular organizer and active defender in response to mechanical stimulation // *Plant Signaling and Behavior*. – 2008. – **3**(9). – pp.678–680.
- 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). – pp. 1135–1139.
- Ripetskyi R.T., Kit N.A., Chaban Ch.I. Influence of gravity on the photomorphism of secondary moss protonemata // *Adv. Space Res.* – 1999. – **23**(12). – pp. 2005-2010.

- Roux S.J., Chatterjee A., Hillier S., Cannon T. Early development of fern gametophytes in microgravity // *Advances in Space Research.*, 2003, **31**. – pp. 215–220.
- Roychoudhry S., Bianco M.D., Kieffer M. et al. Auxin control gravitropic setpoint angle in higher plant lateral branches // *Current Biology*. – 2013. – **23**. – pp. 1497–1504.
- Sack F.D. Plant gravity sensing // *Int. Rev. Cytol.* – 1991. – **127**. – pp. 193–252.
- Schwuchow J., Sack F.D. Microtubules restrict plastid sedimentation in protonemata of the moss *Ceratodon* // *Cells Motil. Cytoskeleton*. – 1994. – **29**. – pp. 366–374.
- Schwuchow J.M., Kern V.D., White N.J., Sack F. Conservation of the plastid sedimentation zone in all moss genera with known gravitropic protonemata // *J. Plant Growth Regul.* – 2002. – **21**. – pp. 146–155.
- Stadtman E.R., Berlett B.S. Reactive Oxygen Species in Biological Systems / Eds. D.I. Gilbert, P. Colton. – New York: Kluwer Academic, 1999. – pp. 657–675.
- Stark L.R., McLetchie Nicholas.D., Eppley S.M. Sex ratios and the shy male hypothesis in the moss *Bryum argenteum* (Bryaceae) // *Bryologist*. – 2010. – **113**(4). – pp. 788–797.
- Taylor P. J., Eppley S. M., Jesson L. K. Sporophytic inbreeding depression in mosses occurs in a species with separate sexes but not in a species with combined sexes // *Am. J. Bot.* – 2007. – **94**(11). – pp. 1853–1859.
- Une K. Sexual dimorphism in the Japanese species of *Macromitrium* Brid. (Musci: Orthotrichaceae) // *J. Hattori Bot. Lab.* – 1985. – **59**. – pp. 487–513.
- Vreeland V., Kwan N. Marine Algal Vanadium Peroxidase: Substratum Adhesion and Active Recombinant Catalytic Domain // Thesis of Conference “Peroxidase 99” (July 17–21, 1999, Columbus, Ohio USA). – pp. 234–235.
- Wagner T.A., Sack F.D. Gravitropism and gravimorphism during regeneration from protoplasts of moss *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. // *Planta*. – 1998. – **205**. – pp. 352–358.