

УДК 581.18+582.34

О. І. Пундяк, О. Т. Демків, Я. Д. Хоркавців, Б. Б. Багрій

Інститут екології Карпат НАН України, Львів

Полярність проростання спор *Funaria hygrometrica* Hedw.

Показано, що в темряві спори моху *Funaria hygrometrica* Hedw. проростали полярно під впливом гравітації. Спочатку утворювалися ризоїдальні паростки, які росли донизу. Потім з'являлися паростки майбутньої хлоронеми. Більшість з них росла доверху. У горизонтальному положенні чашок Петрі та в умовах кліностакування спори проростали стохастично у різних напрямках.

Одним з визначальних факторів розвитку рослинного організму є його орієнтація у просторі, або поляризація. Поляризація може бути індукована як зовнішніми асиметричними чинниками, так і внутрішніми, які виникають у самому організмі. Найдієвішим поляризуючим чинником є гравітація, тому що напрям та величина гравітаційного стимулу у кожній конкретній точці простору практично не змінюється впродовж розвитку рослинного організму [2]. Рослини сприймають найменші відхилення (5—10°) від вектора сили тяжіння і дуже швидко (за 1-2 хв) реагують на нього гравітропним згином [3]. Індукцію поляризації найпростіше досліджувати на поодиноких клітинах, які початково аполярні, наприклад зиготи водоростей *Fucus* і *Pelvetia* [5, 10], пилкових зернах [11], а також спорах мохів [1]. Негативний гравітропізм протонеми мохів вважають адаптивною функцією виду, яка сприяє найшвидшому виходу ростучих апікальних клітин на світло [6—8]. Одним із найчутливіших до гравітації серед мохів на стадії протонеми вважається широко розповсюджений вид *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. Загальноприйнято, що гравісенсорною системою протонеми мохів є амілопласти — від округлих до еліпсоїдних, діаметром 2-3 мкм, які переважно зосереджені в субапікальній зоні апікальної клітини [15]. Показано, що під час гравістимуляції відбувається седиментація амілопластів на нижню стінку клітини, що корелює з поступовим негативним гравітропним згином [16, 17]. Особливістю протонеми є те, що на світлі вона росте по субстрату і не реагує ні на світло, ні на

гравітацію, хоча обидва фактори орієнтовані перпендикулярно до площини росту. Лише в темряві апікальні клітини піднімаються над агаром, виявляючи негативний гравітропізм. Понижена чутливість протонеми до дії гравітації, властива розповсюдженому світлолюбивому виду *Funaria hygrometrica* Hedw., робить проблематичним його виживання в екстремальних умовах часткового або повного затінення. На даний час в літературі немає даних щодо гравітропізму перших проростків спор мохів, у тому числі й фунарії вологомірної. Адже відомо, що спори мохів містять у великій кількості крохмаль і здатні полярно проростати у поляризованому білому світлі, а також під впливом електричного поля та латерального освітлення [1, 2]. Метою нашої роботи було дослідити гравічутливість ювенільної стадії гаметофіту моху *Funaria hygrometrica* Hedw., починаючи із перших кроків розвитку організму — проростків спор.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

Спори *Funaria hygrometrica* Hedw. висівали стерильно у 4-см чашки Петрі на 0.75 %-й бакто-агар, приготовлений на поживному середовищі Кнопа II з 0.2 %-ю глюкозою. Чашки встановлювали під різними кутами до горизонталі — від 90° до 0° і вирощували протонему у темряві при температурі 20—22 °С і відносній вологості 85—90 %.

Через добу спори утворювали перший росток. Ще через добу можна було спостерігати появу другого

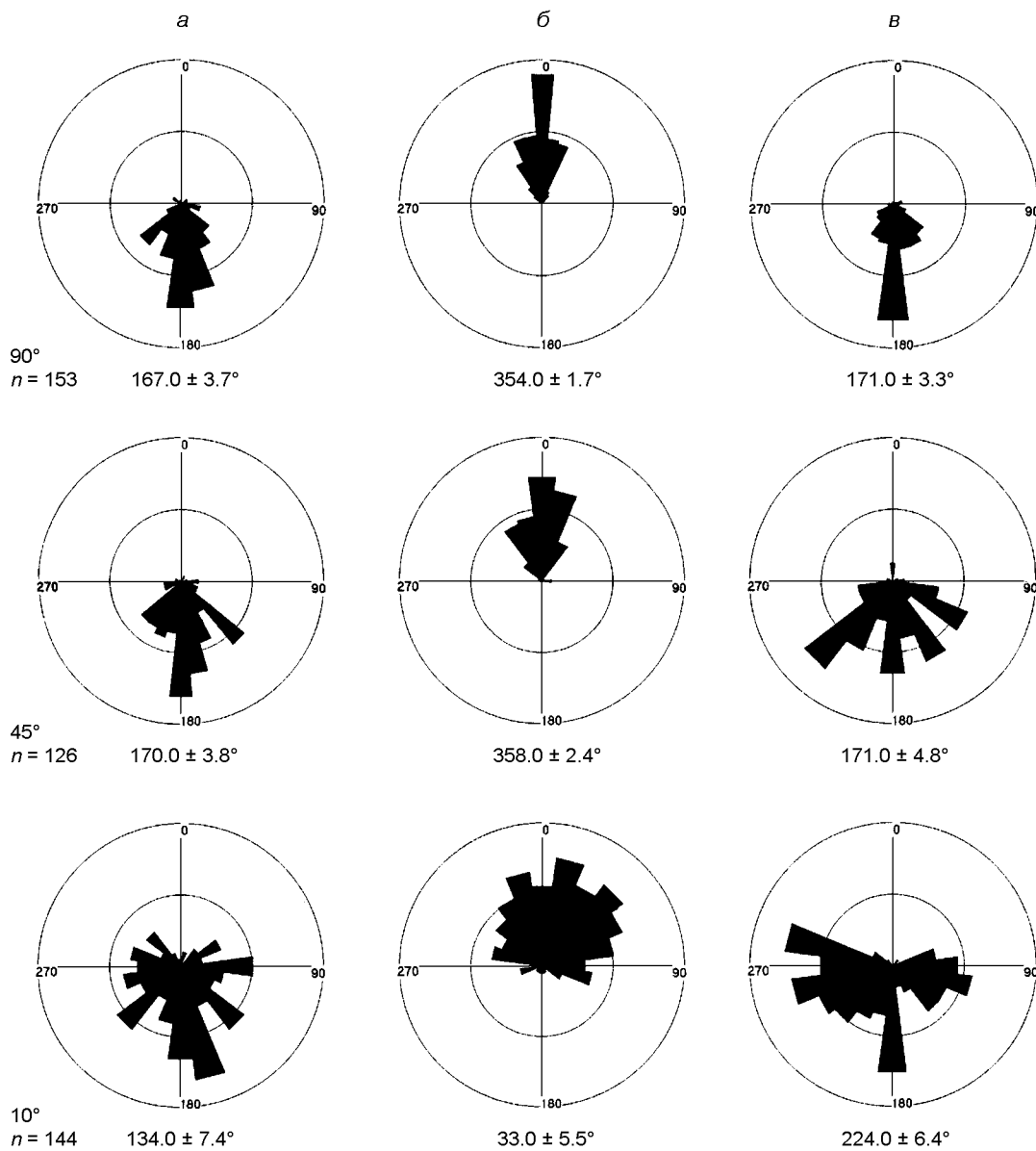


Рис. 1. Гістограма кутів початкових напрямків росту першого (а) і другого (б) проростків спор *Funaria hygrometrica* та кутів між ними (в) в чашках Петрі під різними кутами до горизонталі (зверху донизу 90°, 45°, 10°). Величина n — об'єм вибірки

ростка. Під світловим мікроскопом вимірювали кут між віссю в площині чашки та напрямком росту першого ростка. Потім це саме проводили стосовно другого ростка. Обчислювали кут між ростками.

Дослідження проводили у кількох варіантах:

1) при постійному положенні чашки під 90°, 45°, 10° та 0° до горизонталі протягом всього експерименту;

2) пророщування спор у кліностації в темряві;

3) в умовах, коли спори проростали у темряві в чашках Петрі, які стояли вертикально протягом доби, а тоді їх повернули на 90°.

Для дослідження амілопластів спори зафарбовували розчином I_2KI [11].

Дані опрацьовували та будували діаграми за допомогою програми, спеціально створеної в об'єктно-орієнтованому середовищі Delphi 5 з використанням баз даних Paradox 7, запитів SQL form

2 і дозволяє легко здійснювати обмін даними з різноманітними програмами. Програма опрацьована Б. Багрієм.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Спори фунарії, висіяні на агаризоване середовище у чашках Петрі, розміщених горизонтально у тем-

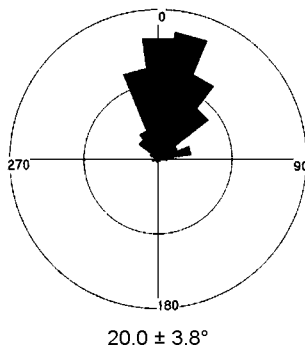


Рис. 2. Гістограма кутів початкових напрямків росту другого ростка спор *Funaria hygrometrica*, коли відразу ж після утворення першого ростка чашку Петрі повернули на 90° у вертикальній площині. Об'єм вибірки — $n = 214$

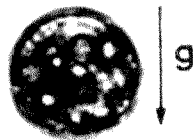


Рис. 3. Спора *Funaria hygrometrica* перед проростанням. Видно седиментацію амілопластів, зб: $250\times$



Рис. 4. Спора *Funaria hygrometrica* із щойно сформованим першим ростком, направленим донизу, зб: $250\times$

ряві, проростали із різною швидкістю і в різних напрямках, тобто часово й просторово гетерогенно. У процесі проростання спочатку закладався, як правило, ризоїдальний проросток, а вслід за ним, приблизно через добу, другий — хлоронематичний. Проростки орієнтувалися під різними кутами один відносно одного, частіше під кутом 90° .

Якщо перед проростанням спор чашки поставити на ребро, щоб вектор гравітації знаходився у площині агару, то під час проростання спор перший ризоїдальний росток орієнтувався, як правило, позитивно гравітропно, у середньому під кутом $167.5^\circ \pm 3.7^\circ$ до вертикалі із середньою дисперсією кутів $\sigma = 34.3^\circ$. Наступний, хлоронематичний росток орієнтувався, як правило, по осі росту першого ростка, але у протилежному напрямку, тобто нега-



Рис. 5. Спора *Funaria hygrometrica* з ризоїдальним ростком і випуклістю, з якої розвинесться хлоронемний росток, зб: $250\times$

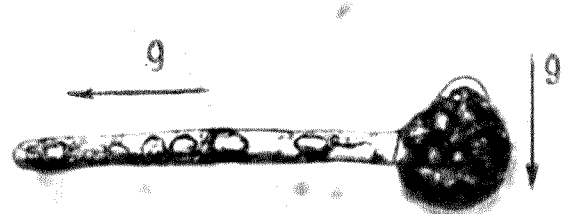


Рис. 6. Спора *Funaria hygrometrica* з двома проростками, орієнтованими під кутом 90° . Позитивно гравітропний ризоїдальний росток утворився у вертикально орієнтованій чашці. Ініціація другого хлоронемного ростка відбулася після повертання чашки на 90° у вертикальній площині. Випуклість, з якої розвивається росток, орієнтується вгору, зб: $250\times$

тивно гравітропно під кутом $354.1^{\circ} \pm 1.7^{\circ}$ із середньою дисперсією кутів $\sigma = 18.1^{\circ}$ (рис. 1, 4, 5).

В умовах, коли чашки Петрі нахилилися під кутом 45° до горизонталі, напрям росту проростків істотно не змінювався: кут становив $170.0^{\circ} \pm 3.6^{\circ}$ для першого ростка і $358.3^{\circ} \pm 2.4^{\circ}$ для другого ростка. У всіх випадках збільшилась дисперсія кутів, особливо між обома ростками.

В умовах, коли спори проростали у нахилених чашках Петрі під кутом 10° до горизонталі, переважна більшість перших проростків орієнтувалися по поверхні агару донизу під кутом $134.0^{\circ} \pm 7.4^{\circ}$, а більшість других хлоронематичних ростків — вверх під кутом $331^{\circ} \pm 5.5^{\circ}$. Різко збільшувалась варіабельність кутів між проростками, середній кут між якими становив $224.0^{\circ} \pm 6.4^{\circ}$ (рис. 1).

Мінімальне значення середнього модуля кута між обома ростками спори досягалося при горизонтальному положенні чашки Петрі, або під час кліно-статування.

Коли на другу добу після висіву спор чашку повертали на 90° вертикально, другий росток у новому положенні виростав догори під кутом $20.0^{\circ} \pm 3.8^{\circ}$ відносно нової вертикалі та приблизно під прямим кутом до першого ростка ($\sigma = 35.6^{\circ}$), який вже видимо диференціювався в ризоїд: його верхівка витягалася й відповідно потоншувалася (рис. 2, б).

Менший розкид кутів росту хлоронематичного ростка порівняно із ризоїдальним в усіх випадках може свідчити про те, що автономна гравічутливість ризоїдального ростка є меншою за гравічутливість хлоронематичного ростка, який має найважливіше завдання — якомога швидше вирости до поверхні ґрунту й дати початок брунькам гаметофору.

У набухлих спорах фунарії вологомірної перед проростанням добре проглядаються великі кулясті пластиди, які фарбувалися I_2KI , і тому ми їх вважаємо амілопластами. У випадку вертикального положення чашок Петрі можна спостерігати седиментацію амілопластів перед проростанням спори і в період, коли перший росток щойно сформувався (рис. 3, 4). Перед проростанням у спорі було в

середньому, сім амілопластів. Розподіл амілопластів у таких спорах представлений в табл. 1.

Візуально це найкраще спостерігати, коли чашки Петрі із висіяними спорами розміщували під кутом 90° до горизонталі. У горизонтальному положенні, як і при кліно-статуванні, асиметрія простежується в мінімальній кількості випадків і її напрямом випадковий. У процесі формування ростків загальна кількість амілопластів збільшується (табл. 1). Асиметрію розподілу амілопластів у спорах видно з табл. 2 і 3.

Наші дані стосовно спор моху *Funaria hygrometrica* підтверджують гіпотезу, що амілопласти функціонують як статоліти в рослинних організмах [14]. Вважають, що амілопласти можуть бути не тільки пасивною масою статолітів. Є. Л. Кордюм та Дж. Гюкам [13] запропонували гіпотезу, згідно з якою амілопласти виконують більш складну роль, взаємодіючи з клітинним ядром, передаючи йому гравітропний сигнал. При проростанні спор *Funaria hygrometrica* видно, що ядро знаходиться всередині маси амілопластів та у градієнті їхнього внутрішньоклітинного просторового розподілу, що може передавати ядру не тільки функціональну, але й просторову інформацію.

Очевидно, що полярність спор фунарії у темряві залежить від просторового розміщення амілопластів у спорі. Тому у темряві, в залежності від орієнтації чашки Петрі, можливі якісно різні варіанти розподілу кутів між ростками:

1) якщо орієнтація чашки Петрі близька до вертикалі, кут між ростками в середньому становить 180° ;

Таблиця 2. Ступінь вираження седиментації амілопластів непророслих спор *Funaria hygrometrica* через 20 год після їхнього висіву

Кут нахилу чашок відносно горизонталі, град	Частка спор, у яких седиментація амілопластів:	
	наявна	відсутня
90	55 ± 5 %	45 ± 5 %
10	38 ± 4.9	62 ± 4.9
0	26 ± 4.4	74 ± 4.4

Таблиця 3. Характер асиметрії амілопластів у спорах *Funaria hygrometrica* на другу добу після проростання

Кут нахилу чашок відносно горизонталі, град	Переміщення амілопластів вздовж осі першого ростка, %	Переміщення амілопластів перпендикулярно до осі першого ростка, %	Асиметрія відсутня, %
90	57 ± 5	33 ± 5	10 ± 3
10	33 ± 5	47 ± 5	20 ± 4
0	33 ± 4.7	42 ± 5	25 ± 4.3

Таблиця 1. Розподіл амілопластів у спорах і ростках *Funaria hygrometrica*

Етапи проростання	Кількість амілопластів	
	у спорі	у ростках
Непророслі спори	6.6 ± 0.2	—
Спори з одним ростком	7.2 ± 0.3	3.1 ± 0.2
Спори з двома ростками	8.2 ± 0.2	9.4 ± 0.9

2) якщо чашки повернути на 90° у вертикальній площині через добу після висіву, або розмістити горизонтально, чи на кліностації, кут між ростками становить в середньому 90°.

Проведені дослідження можуть свідчити про те, що гравітропізм властивий різним видам рослин. Як вважають Дж. Дженкіс зі співробітниками [11], протонема *Funaria hygrometrica* набуває чутливості до гравітації тільки після диференціації каулонемі. Однак одержані нами результати свідчать про те, що у темряві відбувається залежна від вектора гравітації поляризація, яка детермінує просторову орієнтацію спочатку ризоїдального, а пізніше хлоронематичного ростків. Взаємно перпендикулярна орієнтація ризоїдального та хлоронематичного ростків після повороту чашки на 90° у вертикальній площині вказує на те, що встановлену для ризоїда вісь просторової орієнтації можна змінити відповідно до вектора гравітації. Таким чином, наші результати підтверджують думку С. С. Медведєва [2], що гравітація є потужним фактором не тільки поляризації клітин, але й переорієнтації відповідно до зміни гравітаційного вектора.

Як і в багатьох інших гравічутливих клітинах [3], гравісенсорною системою протонемі мохів є амілопласти. Під впливом гравітації відбувається їхня седиментація, що призводить до анізотропії, яка й визначає вісь поляризації. Набухлі спори фунарії вологомірної містять великі 8—10 мкм в діаметрі амілопласти, які майже повністю заповнюють спору. Під впливом гравітації амілопласти осідають на нижню частину спори, в результаті чого верхня частина спори залишається без амілопластів. Візуально седиментація виявляється не у всіх спорах, готових до проростання, однак перша ростова трубка ініціюється на стороні з максимальним вмістом амілопластів.

В ініціації хлоронемної ростової трубки бере участь той самий механізм седиментації амілопластів, що й в ризоїдальних клітинах. Незважаючи на це, седиментацією пластид важко пояснити формування ризоїдальних і хлоронематичних ростків, зокрема їхній протилежно направлений ріст. Отримані результати можуть свідчити про те, що напрям росту тісно корелює із компетенцією клітин реагувати на зміни, викликані гравістимулом адекватно до програми формотворчих процесів, а седиментація амілопластів задіяна на проміжних ланках реалізації цієї програми. Не виключено, що нездатність першого проростка спор фунарії вологомірної впливати на просторову орієнтацію наступного може бути зв'язана з тим, що ризоїди

фунарії, як і інших досліджених видів, не реагують на гравістимул [6].

1. Демків О. Т., Сьтнік К. М. Морфогенез архегоніат. — Київ: Наук. думка, 1985.—203 с.
2. Медведєв С. С. Физиологические основы поляриности растений. — Санкт-Петербург: Кольна, 1996.—160 с.
3. Меркис А. И. Сила тяжести в процессах роста растений // Проблемы космической биологии. — М.: Наука, 1990.—Т. 68.—185 с.
4. Barlow P. W. Gravity perception in plants: a multiplicity of systems derived by evolution? // Plant Cell Environ.—1995.—18 (951).—P. 951—962.
5. Bentrup F. W. Cellular Polarity // Encycl. Plant Physiol.—1984.—17.—P. 472—490.
6. Chaban C. I., Kern V. D., Ripetskyj R. T., et al. Gravitropism in caulonemata of the moss *Pottia intermedia* // J. of Bryology.—1998.—20.—P. 287—299.
7. Chaban C. I., Kordyum E. L., Demkiv O. T., et al. The gravireaction of *Ceratodon* protonemata treated with gibberellic acid // Adv. Space Res.—1999.—24, N 6.—P. 717—721.
8. Demkiv O. T., Kordyum E. L., Khorkavtsiv Ya. D., et al. Behavior of amyloplasts in photo- and gravitropism of the moss protonema // J. of Gravitational Physiology.—1997.—4, N 2.—P. 75—76.
9. 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.—22, N 12.—P. 1999—2004.
10. Goodner B., Quatrano R.S. Fucus embryogenesis: a model to study the establishment of polarity // The plant Cell.—1993.—5, N 10.—P. 1471—1481.
11. Hepler P. K. Tip growth in pollen tubes: calcium leads the way // Trends in Plant Science.—1997.—2.—P. 79—80.
12. Jenkins G., Courtice G., Cove D. Gravitropic responses of wild-type and mutant strains of the moss *Physcomitrella patens* // Plant Cell and Environment.—1986.—9.—P. 637—644.
13. Kordyum E., Guikema J. An active role of the amyloplasts and nuclei of root statocytes in graviperception // Adv. Space Res.—2001.—27, N 5.—P. 951—956.
14. Moor R., Evans M. L. How roots perceive and respond to gravity // Am. J. Bot.—1986.—73.—P. 574—587.
15. Sack F. D. Gravitropism in protonemata of the moss *Ceratodon* // Mem. Torrey Bot. Club.—1993.—25, N 1.—P. 36—44.
16. Walker L. M., Sack F. D. Amyloplasts as possible statoliths in gravitropic protonemata of the moss *Ceratodon purpureus* // Planta.—1990.—181.—P. 71—77.
17. Young J. C., Sack F. D. Time-lapse analysis of gravitropism in *Ceratodon* protonemata // Amer. J. Bot.—1992.—79.—P. 1348—1358.

POLARITY OF SPORE GERMINATION IN FUNARIA HYGROMETRICA HEDW.

O. I. Pundyak, O. T. Demkiv, O. Ya. Khorkavtsiv, B. B. Bagrii

It is shown that in darkness the spores of moss *Funaria hygrometrica* Hedw. germinated polarly under the influence of gravity. At the beginning the rhizoids appeared. They grew downwards. Then future chloronematal stolons started to form a germinating spore. Usually, they grew upwards. Clinorotation or horizontal placing of Petry dishes could discoordinate such a gravisensitivity.