

УДК 581.17+582.34

Я. Д. Хоркавців, О. Т. Демків

Інститут екології Карпат Національної академії наук України, Львів

Вплив інгібіторів ауксинового транспорту на гравітропізм протонеми *Pohlia nutans* (Hedw.)

Надійшла до редакції 01.04.03

Досліджували гравітропізм протонеми моху *Pohlia nutans* після дії інгібіторів ауксинового транспорту. Фітотропін НФК (N-1-нафтилфталамова кислота), відомий як блокатор виходу ауксину з клітин вищих рослин, інгібував гравітропний згин 40—60 % клітин протонеми; 1-нафтилоцтова кислота знімала дію фітотропіну. Інші синтетичні ауксини блокували апікальне домінування, унаслідок чого галузилися апікальна і субапікальна клітини. Екзогенна індолілоцтова кислота навіть у високих концентраціях не знижувала гравітропізму. Відповідно до отриманих результатів, обговорюється роль ауксинового транспорту для гравітропізму апікальних клітин протонеми.

Скорочення:

ІОК — індолілоцтова кислота;
1-НОК — 1-нафтилоцтова кислота,
НФК — N-1-нафтилфталамова кислота
ПХІМК — ρ -хлорфеноксізомаєляна кислота
2,4-Д — 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота
ТІБК — 2,3,5-триїодбензойна кислота

Ростові рухи осьових органів багатоклітинних рослин — фото- і гравітропізм — тісно корелюють з латеральним переміщенням індолілоцтової кислоти (ІОК) [5, 6]. Для нитчастих структур з апікальним ростом участь ІОК у ростових рухах не виглядає настільки очевидною, як для квіткових рослин. Протонема мохів синтезує ІОК, має транспортну систему ауксину, і давно показана роль ІОК для росту та диференціації гаметофіту [3, 10]. ІОК регулює швидкість росту апікальних клітин, корелятивне гальмування галуження інтеркалярних клітин, диференціацію каулонемі і закладання бруньок гаметофорів [18, 20]. З використанням міченої ІОК підтверджено базипетальний транспорт ІОК у каулонемі й ризоїдах *Funaria hygrometrica*, гаметофіті *Plagiomnium undulatum* [21, 22]. Вміст ендогенної ІОК у протонемі *Funaria hygrometrica*, *Physcomitrella patens*, *Polytrichum formosum* виявився нижчим, ніж у квіткових рослинах [7, 10, 17]. Про участь ауксинів у гравітропній реакції протонеми моху відомо дуже мало, тому ми поставили завдання дослідити роль ІОК у гравітропізмі,

використовуючи для цього інгібітори полярного транспорту ІОК і синтетичні ауксини.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використано стерильну гравітропну протонему моху *Pohlia nutans*, яку отримували зі спор, висіяних на агаризоване середовище Кнопа з мікроелементами [1]. Рослини вирощували у люмінестаті (фотоперіод 16 год) в контрольованих умовах освітлення ($25\text{—}30\text{ мкмоль}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$), температури ($20\text{—}22^\circ$) і вологості ($80\text{—}90\%$). Мох *P. nutans* збирали у лісовому масиві Львівської області (сел. Брюховичі) на відкритому, добре освітленому піщаному схилі.

Розчини фітогормонів готували перед самим експериментом. Усі реактиви — ІОК, 1-НОК, НФК, 2,4-Д, ТІБК і ПХІМК розчиняли у етанолі і готували однаково 1 мМ вихідну концентрацію на дистильованій воді. Із таких розчинів робили розведення і отримували робочі концентрації реактивів в межах 0.1—100 мкМ.

Для усіх експериментів брали протонему, яка росла негативно гравітропно у темряві протягом шести днів. Чашки відкривали на зеленому світлі у стерильних умовах і вносили фітогормони у чашки, зверху на дернинки протонеми. Інкубація з фітогормонами тривала 30 хв. Тоді протонему промивали дистильованою водою, повертали чашки на 90°

і витримували у такому положенні 6 год. Протонему фіксували 1 % формальдегідом (40 хв при кімнатній температурі) і вимірювали кути згинів апікальних клітин на мікроскопі «Jenaval».

Частину чашок з протонемою після інкубації у розчинах фітогормонів використовували для аналізу швидкості росту протонемі і спостережень за галуженням клітин, які також робили на мікроскопі «Jenaval».

Досліди повторювали тричі і у кожному варіанті аналізували не менше 50 клітин. Отримані дані оброблено з використанням стандартних програм статистичного аналізу [4].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Протонема *P. nutans*, так само як і інших гравічутливих видів мохів, росте у темряві густим пасмом стolonів, які орієнтуються догори. Гравічутливі апікальні клітини такої протонемі мають характерний зональний розподіл пластид, що седиментують у субапікальній частині клітини під час гравістимуляції, на віддалі 40 мкм від верхка клітини і майже 100 мкм по довжині клітини. Згин верхків стolonів візуально з'являється через 30—45 хв після гравістимуляції, а через 6 год він досягає 15—20°.

На гравічутливість і гравітропний ріст протонемі впливають фітогормони, які специфічно інгібують полярний транспорт ауксинів, та синтетичні аналоги ауксину. Ми проаналізували дію різних ростових речовин на гравітропізм. Результати досліджень наведено у таблицях та графіках.

Фітогормон НФК у межах концентрацій 0.1—3.0 мкМ не змінював форми верхівки апікальної клітини, не порушував зонального розподілу амі-

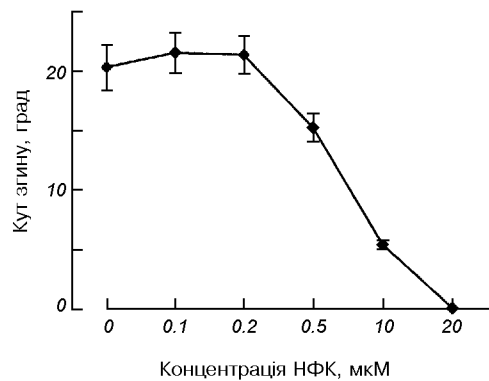


Рис. 1. Вплив різних концентрацій фітогормону НФК на гравітропний згин апікальних клітин протонемі *Pohlia nutans*

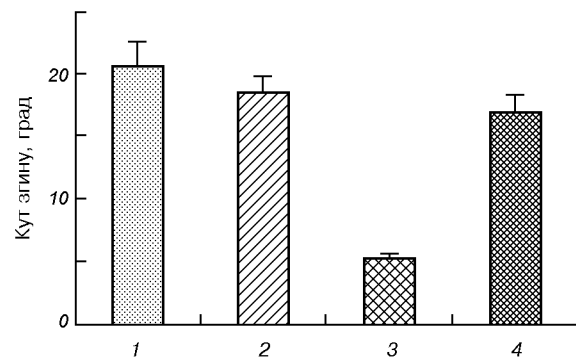


Рис. 2. Дія фітогормону (2), фітогормону (3) та їхніх сумішей (4) на гравітропізм протонемі *Pohlia nutans*; 1 — контроль

лопластів, не знижував істотно частку згинів і значення кута гравітропного згину. Вища (10 мкМ) концентрація НФК впливала на розподіл пластид і інгібувала гравітропний ріст. Результати аналізу впливу різних концентрацій НФК на гравітропний згин приведені на рис. 1.

Починаючи з 0.5 мкМ розпочиналось різке зменшення кута гравітропного згину, одночасно зменшувалась частка гравічутливих клітин аж до повної втрати гравічутливості на високих концентраціях. Частково дію НФК знімав аналог ауксину 1-НОК. Якщо у середовище вносили суміш обох фітогормонів, то інгібаторний вплив НФК зменшувався, а гравітропний ріст з часом відновлювався (рис. 2). У суміші явний ростовий ефект отримали, коли концентрація НФК була 10 мкМ, а 1-НОК — 20 мкМ. На таких концентраціях гравічутливість відновлювали майже 80 % клітин, і кут згину збільшувався до 16° порівняно з 5° на середовищі з НФК.

Таблиця 1. Вплив фізіологічно активних речовин на гравітропний ріст протонемі *Pohlia nutans*

Діюча речовина	Концентрація, мкМ	Частка згинів, %	Кут згину, град
Контроль	0	93.7±4.1	18.6±1.4
ЮК	20	95.0± 9.2	19.7± 1.9
	40	42.7±4.8	7.5 ± 1.1
НФК	3	61.2±6.3	14.4± 1.4
	10	40.1±4.8	5.3 ± 1.0
1-НОК	20	88.5±8.3	18.7± 1.8
	40	30.2±2.2	12.1± 1.2
ТІБК	3	79.3±7.2	18.0± 2.0
	10	39.8±3.0	8.5±0.9
2.4-Д	20	74.2±7.1	15.8± 1.9
	40	34.5±3.1	8.5± 0.9
ПХІМК	10	61.3±5.9	11.3± 1.2

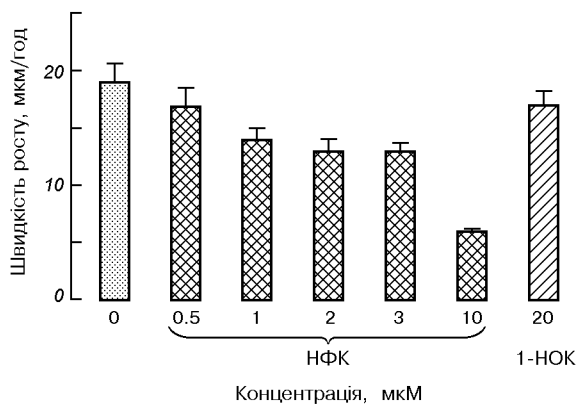


Рис. 3. Вплив НФК і 1-НОК на швидкість росту протонеми *Pohlia nutans*

НФК гальмувала також ріст протонеми. Як показано на рис. 3, збільшення концентрації від 0.5 до 1.0 мкмоль редукувало швидкість росту: при 1 мкмоль НФК — приблизно на 26 %, а при 10 мкмоль — на 69 %. Концентрація 20 мкм НОК порівняно з НФК виявляла слабший інгібіторний ефект, зменшуючи швидкість росту лише на 10 % порівняно з контролем.

Інші фітотропіни також інгібували гравітропізм (табл. 1). Концентрація 10 мкм ТЙБК знижувала гравітропну реакцію 60 % апікальних клітин, а 2,4-Д інгібувала гравітропізм лише на концентраціях — 40 мкм.

Антагоніст ауксину ПХІМК, так само як і ТЙБК, виявляв меншу інгібуючу дію на гравігін верхівок апікальних клітин. Виходячи з попередніх досліджень впливу анти-ауксину на ріст протонеми мохів, а також ролі полярного транспорту ауксинів в апікальному домінуванні, ми проаналізували дію ростових речовин (ІОК, НФК і ПХІМК) на галузнення клітин протонеми (табл. 2).

Таблиця 2. Вплив фізіологічно активних речовин на галузнення інтеркалярних клітин протонеми *Pohlia nutans*

Концентрація	Швидкість росту, мкм/год	Номер клітини, що галузиться*	Коефіцієнт галузнення**
Контроль	13.1±1.2	4.2±0.1	38.7±4.2
ІОК, 1 мкм	16.0±0.1	5.8±0.1	10.8±2.8
НФК, 5 мкм	10.0±1.2	2.8±0.1	51.4±3.1
ПХІМК, 5 мкм	9.8±1.0	3.3±0.1	45.3±3.0

* Номер клітини, рахуючи від апікальної.

** Відношення кількості клітин, що погалузилися, до загальної кількості клітин у столонах.

На відміну від анти-ауксину і фітотропіну, ІОК гальмувала галузнення інтеркалярних клітин. Дію ж НФК і ПХІМК можна розглядати як специфічну для галузнення. Якщо у нормі галузилася четверта клітина, то під впливом фітотропіну і анти-ауксину галузнення перемістилося вперед і погалузилася апікальна і субапікальна клітини (рис. 4). Швидкість росту протонеми на підібраних нами концентраціях НФК і ПХІМК істотно не знижувалася, за винятком ІОК, яка трохи активувала видовження клітин. Вищі ж концентрації НФК і ПХІМК гальмували ріст апікальних клітин. Отже, можна припустити, що під впливом НФК і ПХІМК зменшився вміст ендogenous ауксину у другій (субапікальній) клітині, що зняло інгібіторний вплив ІОК на галузнення інтеркалярних клітин.

Якщо порівняти дію ІОК і аналога ауксину 1-НОК на гравітропний ріст, то тільки високі концентрації обох фітогормонів послаблювали гравітропну реакцію. Концентрація 40 мкм ІОК інгібувала як кількість згинів, так і величину кута. 1-НОК істотно знижувала лише відсоток згинів і менше впливала на гравітропний кут (табл. 1). Як показано в роботі [26], 1-НОК не впливала на напрям росту позитивно гравітропного мутанта *Ceratodon purpureus*, на відміну від дикої форми. Так само не зменшувалася кількість клітин, які росли гравітропно. У той же час НФК викликала дезорієнтацію гравітропного росту столонів дикої форми, в результаті чого напрям росту міг змінитися аж на 180°.

Мохи синтезують ауксин з початкових стадій розвитку. Ендogenous фітогормони діють безпосередньо у регуляції росту і розвитку гаметофіту [2, 9, 19]. Експериментально показано, що ІОК гаметофіту мохів має широкий спектр дії: стимулює ріст апікальних клітин, контролює галузнення інтеркалярних клітин [3], активує диференціацію каулонем, утворення ризоїдів [18] та закладання бруньок [9, 13].

Базипетальний транспорт ІОК відбувається у низці поодиноких клітин хлоронеми й каулонемі [21, 22] і у листкостеблових пагонах мохів [26]. Аналіз базипетального транспорту ІОК в клітинах каулонемі та ризоїдів *Funaria hygrometrica* і *Plagiomnium undulatum* свідчить про наявність у клітинах специфічних переносників входу і виходу ауксину. Функціонування переносників виходу ІОК показано для протопластів протонеми *Funaria hygrometrica* [11, 14]: фітотропіни НФК і ТЙБК інгібували вихід ІОК, у зв'язку з чим вміст ІОК у протопластах збільшувався.

Проведені нами дослідження впливу фітогормонів, фітотропінів і антиауксину на гравітропізм

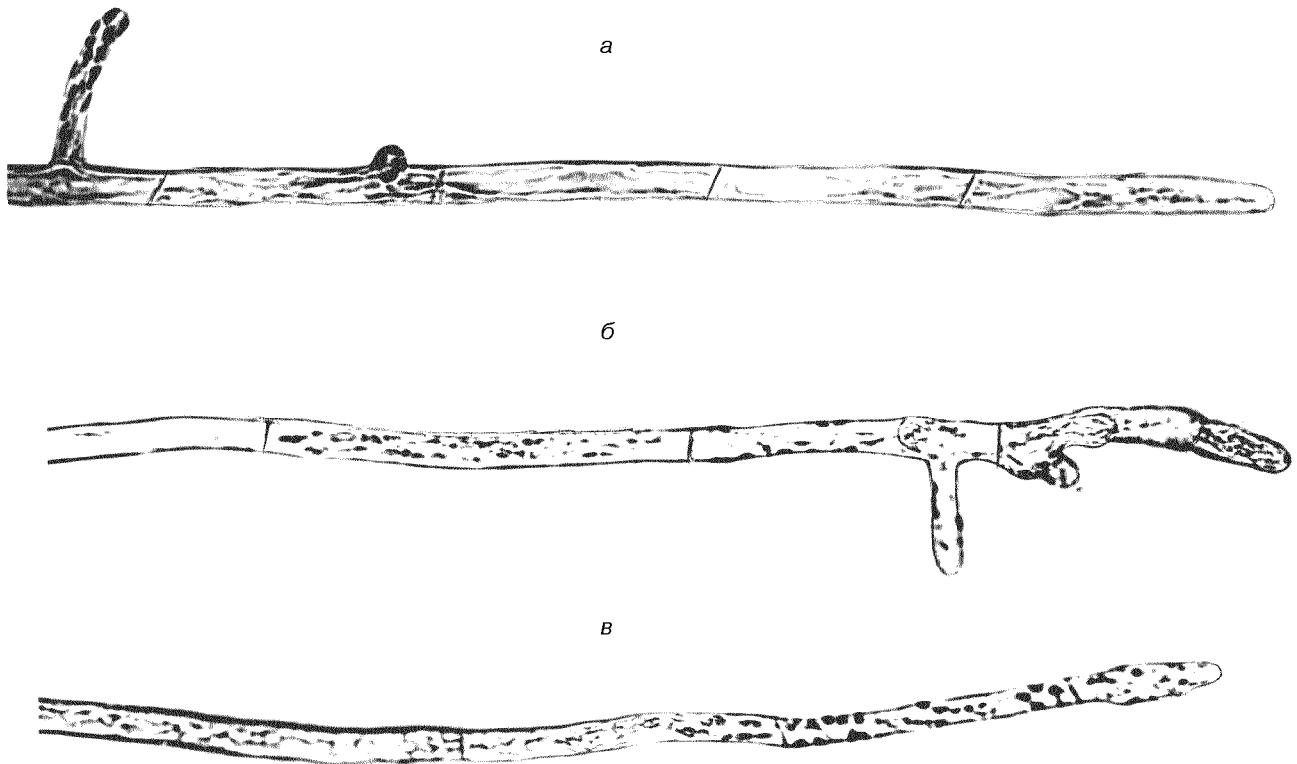


Рис. 4. Вплив фітотропіну НФК (N-1-нафтилфталомова кислота) і ауксину ІОК (індолілоцтова кислота) на галузнення клітин протонеми *Pohlia nutans* (Hedw.): *a* — контроль, галузиться четверта інтеркалярна клітина; *б* — під впливом НФК галузиться апікальна і субапікальна клітини; *в* — ІОК загальмувала галузнення інтеркалярних клітин. Зб. 300^x

протонеми *Pohlia nutans* свідчать про участь базипетального транспорту ІОК у трансдукції гравістимулу в одній верхівковій клітині протонеми мохів. Високі концентрації екзогенної ІОК істотно гальмували галузнення інтеркалярних клітин та інгібували кут гравітропного згину. Синтетична І-НОК не лише знижувала частку негативно гравітропних стolonів та кут згину, але й порушувала орієнтацію росту, стимулюючи позитивно гравітропний згин. Можна думати, що високі концентрації як ІОК, так і І-НОК призводять до надлишку фітогормонів у клітинах, а також, ймовірно, що їхній негативний вплив зумовлений деструкцією апікально-базального градієнту ІОК в апікальних клітинах протонеми. Такий висновок підсилюється й реакцією клітин протонеми на вплив фітотропінів НФК і ТІБК, які, як відомо, зв'язуються зі специфічними переносниками ІОК і блокують вихід ІОК з клітин, що впливає на характер градієнту ауксину в рецепторних апікальних клітинах і орієнтацію росту. Подібні результати про вплив фітотропінів на гравітропізм одержано для протонеми *Ceratodon purpureus* [26]. На підставі наших та

інших даних можна зробити висновок про участь полярного транспорту ІОК у гравітропізмі нитчастих структур з апікальним ростом.

Молекулярний механізм дії ауксину після зв'язування з рецептором невідомий. Але виходячи із специфічності взаємодії субстрат/ліганд, у транспортній системі ауксину сайти виходу і дії ауксину дуже подібні. Відповідно стверджують про ідентичність, або дуже близьку гомологію білків-переносників і білків-транспорттерів ауксину [16, 25]. На противагу цьому специфічність переносників входу і виходу ІОК відрізняється. Наприклад, відомо, що І-НОК активніше стимулює транспорт ауксину і має дуже низьку спорідненість до переносників входу ауксину [12]. Тобто, природа селективної транспортної системи ауксину неоднорідна, хоча є спільні рецептори-медіатори дії ауксину. Так само функціонує транспортна система ауксинів у мохів [21]. Загалом транспорт ауксину є необхідним елементом встановлення і підтримання полярності клітин. Порушення у транспорті ауксину ведуть до редукції апікального домінування та інших ауксин-залежних фенотипічних змін. НФК,

як і екзогенна ПХІМК чи І-НОК, стимулювала підвищення ауксину в апікальній клітині до субоптимальної концентрації, що знімало дію апікального домінування і активувало галуження клітин, у тому числі й апікальних. Протидію на інгібіторний ефект НФК виявляла І-НОК. Природа конкурентної взаємодії між НФК і І-НОК невідома, але, очевидно, І-НОК могла стимулювати функціонування транспортерів виходу ІОК з клітини. Як повідомлялось в роботі [23], екзогенна АТФ, яка змінює нормальний градієнт АТФ на плазматичній мембрані, інгібує витік ауксину з клітин і пригнічує гравітропізм. Вважають також, що експортером ауксину може бути АТФ-залежна помпа.

Дані, які ми отримали тут, свідчать, що фітотропін НФК інгібує гравітропний згин трохи більше, ніж ріст протонеми. Якщо 3 мкМ НФК інгібувала згин майже 40 % клітин, то ріст клітин сповільнювався на 32 %, як це можна бачити з табл. 1 і рис. 3. Тобто, НФК діяла навіть дещо специфічніше на гравізгин, ніж на ріст. Але оскільки НФК інгібувала швидкість росту протонеми і швидкість гравітропного згину, то буде неправомірно розділяти ці два ефекти.

Як показано на рис. 1, низькі концентрації фітотропіну НФК, на відміну від І-НОК, можуть навіть трохи стимулювати гравітропізм, але стимулююча дія фітотропіну має дуже вузьке вікно, бо вже концентрації більші від 0.5 мкМ блокують гравітропізм. І-НОК завдяки спорідненості до рецепторів, які переносять ауксин із клітини, знімала інгібіторний вплив НФК на міжклітинний транспорт ауксинів і, таким чином, зберігався апікально-базальний градієнт потоку фітогормонів, а гравітропний ріст відновлювався.

Перетворення механічної енергії у гравітропний згин пояснюють статолітною дією амілопластів, яка підтверджена у багатьох працях [1, 8, 24]. Рух і/або тиск амілопластів у гравітаційному полі передається на елементи цитоскелету, які пересилають сигнал на переносники виходу ауксину на сусідніх мембранах [15].

Особливістю протонеми мохів є те, що градієнт ендогенної ІОК і градієнт Ca^{2+} в апікальних клітинах мають однаково апікально-базальну направленість. Якщо врахувати специфіку згину апікальних клітин (зміна орієнтації росту відбувається внаслідок переміщення зони росту в куполі апікальної клітини, а не диференційного росту), то гіпотези гравітропізму, які розробляються для багатоклітинних органів квіткових рослин [16], не можна безпосередньо переносити на протонему мохів. Базипетальний транспорт ІОК в апікальній клітині поляризує її функціонально і є чутливим

сенсором до ендогенних змін, у тому числі седиментації амілопластів [6]. Показано, що седиментація амілопластів викликає локальне підвищення Ca^{2+} -АТФаз у зоні осідання пластид і місцях контакту з ендомембранами [1]. Тому можна припустити, що активація Ca^{2+} -АТФаз буде індукувати латеральну вісь транспорту Ca^{2+} і відповідне переміщення Ca^{2+} -каналів на плазматичній мембрані клітини. Рівнодійна базипетального і латерального потоків Ca^{2+} буде зміщуватися від центра на бік апекса верхівкової клітини, ініціюючи новий потік іонів кальцію. Зміна полярного транспорту Ca^{2+} відкоректує потік ІОК [5], і його наслідком стане зміщення ростової зони. Якщо порушити транспорт ауксину фітотропінами, то це заблокує ріст і сприйняття гравістимулу. Отже, у гравітропізмі апікальної клітини протонеми домінує поляризаційна, а не ростова функція ІОК

1. Демків О. Т., Хоркавців Я. Д., Кардаш А. Р. и др. Взаимодействие света и гравитации в ростовых движениях мхов // Физиол. растений.—1997.—44, № 2.—С. 205—211.
2. Демків О., Хоркавців Я., Кардаш О. Гормональний контроль розвитку гаметофіту мохів // Праці наукового товариства імені Шевченка. — Львів, 1999.—3.—С. 39—49.
3. Лазаренко А. С., Демків О. Т. Корелятивне гальмування росту протонеми *Funaria hygrometrica* Hedw. // Доп. АН УРСР. Сер. Б.— 1968.—№ 8.—С. 763—765.
4. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990.—352 с.
5. Медведев С. С. Физиологические основы полярности растений. — Санкт-Петербург: Кольна, 1996.—159 с.
6. Меркис А. И. Сила тяжести в процессах роста растений // Проблемы космической биологии. — М.: Наука, 1990.—68.—185 с.
7. Ashton N. W., Chulze A., Hall P., Bandurski R. S. Estimation of indole-3-acetic acid in gametophytes of the moss *Physcomitrella patens* // Planta.—1985.—164.—P. 142—144.
8. Barlow P. W. Gravity perceptions in plants: a multiplicity of systems derived by evolution // Plant Cell and Environment.—1995.—18.—P. 951—962.
9. Bopp M. Die Wirkung von Heteroauxin auf Protonemawachstum und Knospentbildung von *Funaria hygrometrica* // Z. Bot.—1953.—41.—P. 1—16.
10. Bopp M. The hormonal regulation of morphogenesis in mosses // Proceedings in Life Sciences. Plant Growth Substances 1979 / Ed. F. Skoog. — Berlin: Springer, 1980.—P. 351—361.
11. Bopp M., Geier U. Protoplast and transport // Methods in Bryology / Bryol. Methods Workshop. Mainz. — Proc. Hattori Bot. Lab. Nichinan.—1988.—P. 89—97.
12. Delbarre A., Muller P., Imhoff V., Guern J. Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells // Planta.—1996.—198.—P. 532—541.
13. Chopra R. N., Vashistha B. D. The effect of auxins and antiauxins on shoot-bud induction and morphology in the moss *Bryum antroviensis* Will. ex Brid // Austral. J. Bot.—1990.—38.—P. 177—184.

14. Geier U., Werner O., Bopp M. Indole-3-acetic acid uptake in isolated protoplasts of the moss *Funaria hygrometrica* // *Physiol. plant.*—1990.—**80**.—P. 584—592.
15. Godbole R., Michalke W., Nick P., Hertel R. Cytoskeleton drugs and gravity-induced lateral auxin transport in rice coleoptiles // *Plant Biol.*—2000.—N 2.—P. 176—181.
16. Hertel R. The mechanism of auxin transport as a model for auxin action // *Plant Physiol.*—1983.—**112**.—P. 53—67.
17. Jayaswal R. K., Johri M. M. Occurrence and diosynthesis of auxin in protonema of the moss *Funaria hygrometrica* // *Phytochemistry.*—1985.—**24**, N 6.—P. 1211—1214.
18. Johri M. M., Desai S. Auxin regulation of cauloneama formation in moss protonema // *Nature. New Biol.*—1973.—**245**.—P. 223—224.
19. Kofler L. Contribution a l'etude biologique des mousses cultivees in vitro: germination des spores, croissance et developement du protonema chez *Funaria hygrometrica* // *Rev. bryol. et lichenol.*—1959.—**28**, N 1-2.—P. 1—202.
20. Lehnert B., Bopp M. The hormonal regulation of protonema development in mosses. I. Auxin-cytokinin interaction // *Z. Pflanzenphysiol.*—1983.—**110**.—P. 379—391.
21. Rose S., Bopp M. Uptake and polar transport of indoleacetic acid in moss rhizoids // *Physiol. Plant.*—1983.—**58**.—P. 57—61.
22. Rose S., Rubery, Bopp M. The mechanism of auxin uptake and accumulation in moss protonemata // *Physiol. Plant.*—1983.—**58**.—P. 52—56.
23. Roux S. J., Tang W. Q., Sun Y. Extracellular ATF inhibits root gravitropism at concentrations that inhibit polar auxin transport // *Gravitation and Space. Biol. Bull.*—2001.—**15**.—P. 31.
24. Sack F. D. Plastids and gravitropic sensing // *Planta.*—1997.—**203**.—P. 63—68.
25. Swarup R., Marchant A., Bennett M. J. Auxin transport: providing a sense of direction during plant development // *Biochem. Soc. Trans.*—2000.—**28**.—P. 481—485.
26. Schwuchow J., Michalke W., and Hertel R. An auxin transport inhibitor interferes with unicellular gravitropism in protonemata of the moss *Ceratodon purpureus* // *Plant Biol.*—2001.—N. 3.—357—363.

THE EFFECTS OF AUXIN TRANSPORT INHIBITORS ON GRAVITROPISM IN PROTONEMATA OF THE MOSS *Pohlia nutans* (Hedw.)

Y. D. Khorkavtsiv, O. T. Demkiv

Gravitropism of the protonemata of the moss *Pohlia nutans* (Hedw.) is studied after the treatment with auxin transport inhibitors and auxin-related substances. The phytohormone NPA (naphthylphthalamic acid) known to block auxin efflux in higher plants inhibited gravitropic curvature of apical protonemal cells. The auxin 1-NAA (N-1-naphthylphthalamic acid) did not impair gravitropism of protonemata but reduced the inhibitory effect of NPA. IAA (indole-3-acetic acid), even at high concentrations, did not interfere with protonemal gravitropism. In line with our results, the auxin transport and action in a unicellular graviresponse system are discussed.