

УДК 581.17+581.84

Ю. І. Лесняк, О. Т. Демків

Інститут екології Карпат НАН України, Львів

Сприйняття і реалізація гравістимулу у протонемі мохів

Надійшла до редакції 10.03.05

Експериментально показано, що в умовах низьких температур перцепція гравістимулу відбувається, але ріст апікальних клітин блокується. Перенесення протонемі у звичайні умови середовища призводить до реалізації гравітропного згину. Встановлено, що реалізацію гравістимулу можна експериментально заблокувати інгібіторами: кальцієвих каналів верапамілом у концентрації 100 і 1000 мкМ і кальцієвих pomp ортованадатом натрію — 10—100 мкМ. Екзогенні фітогормони ІОК і α -НОК у концентрації 0.1 і 1 мкМ неістотно впливали на ріст і гравітропний згин апікальних клітин протонемі, фітогормон НФК у концентрації 100 мкМ пригнічував гравітропно залежний згин і не сильно впливав на швидкість росту верхівкових клітин протонемі.

Рослинні організми сформували тонкі механізми, за допомогою яких вони здатні постійно корегувати положення свого тіла у просторі відносно вектора сили тяжіння. У спеціалізованих рослинних клітинах просторова корекція відбувається за участю амілопластів, які під дією сили тяжіння седиментують на нижню поверхню клітинної стінки. У протонемі листяних мохів амілопласти також виконують роль статолітів. Ризоїди листяних мохів і печіночників мають здатність реагувати на гравітацію, хоча статоліти виявлені тільки у клітинах листостеблових мохів, а у ризоїдах печіночників їх немає. Не менш важливою особливістю гравічутливих клітин вважають [6] полярну структуру статочитів (чутливі до гравітації клітин), а не наявність крохмалю в амілопластах. Однак Дж. Кісс із співробітниками [9] встановили, що для коренів арабідопсису мутантної форми, у якої немає амілопластів, гравітропна реакція відбувається набагато повільніше, ніж у дикого штаму, що може свідчити про необхідність амілопластів для перцепції гравітропного стимулу.

Аналогічні результати були отримані для ризоїдів водорості *Chara* [8]. Зміною поживного середовища вдалося збільшити у 5—10 разів кількість статолітів у верхівковій клітині, ніж їх буває у нормі. У цих умовах гравітропний згин ризоїдів, які виростили на спеціальному поживному середовищі, збільшився у 3-4 рази порівняно з ризоїдами контрольних рослин. Крім кількості амілопластів у гравітропізмі важливу роль відіграють також їхні розміри, бо

тільки часточки, більші від 1.0 мкм у діаметрі, здатні седиментувати у в'язкому середовищі цитозолю [10].

Апікальні клітини протонемі мохів строго поляризовані верхівковим ростом, метаболічним і функціональним апікально-базальним градієнтом [2] та апікально-базальним транспортом ІОК [11, 12]. Вони містять у субапикальній гравічутливій зоні амілопласти, які здатні седиментувати як в умовах горизонтальної орієнтації, так і в умовах реверсного положення.

Якщо чашки з протонемою, що росте у темряві, негативно гравітропно повернути на 90° таким чином, щоб протонема опинилася у горизонтальному положенні, то вже через 10—15 хв апікальні клітини загинаються, відновлюючи негативно гравітропний ріст. Особливість реакції протонемі гравітропних видів зумовлена тим, що сприйняття гравітації і її реалізація відбувається верхівкою апікальної клітини [7]. Зміна орієнтації росту здійснюється у результаті зміщення ростової активності у границях ростового апекса [1]. Крім того, протонема мохів сприймає апікальними клітинами, не тільки граві-, але й фотостимул. Цією ж клітиною здійснюється й реалізація обох стимулів у ростовий процес.

Експериментально було встановлено, що ріст протонемі мохів, як й інших вищих рослин залежить від температури. Хоча температурний максимум у мохів і менший, все ж при температурі, близькій до нуля, ріст припиняється.

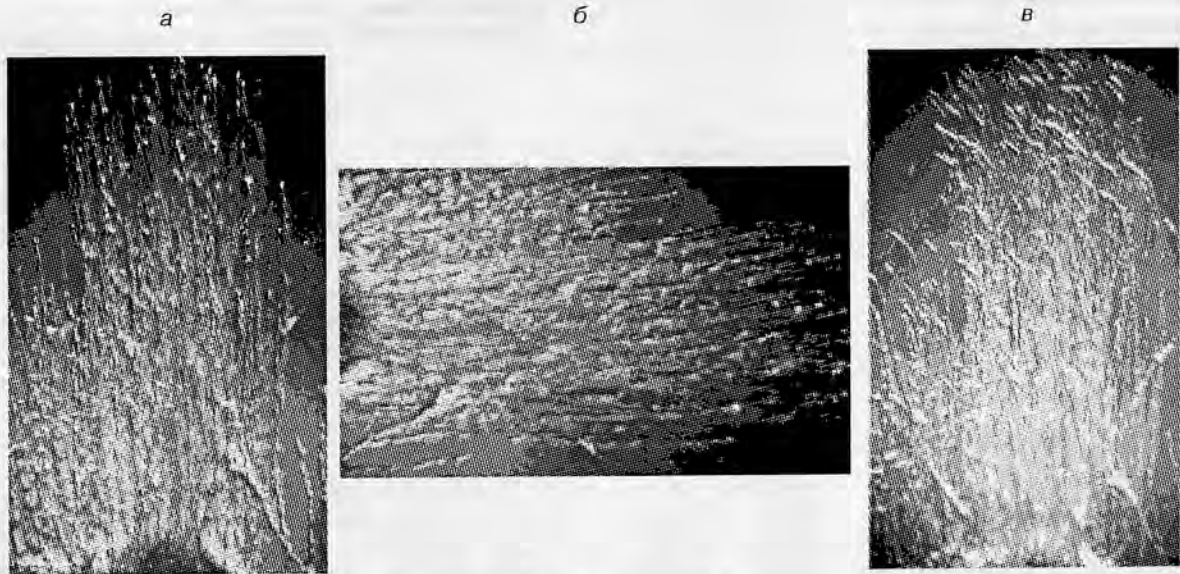


Рис. 1. Схема експерименту із гравітропною протонеєю *Ceratodon purpureus*: а — контроль; б — 12 год гравістимуляції в умовах низької температури (2 °С); в — згин верхівки протонемі після 12 год витримування в умовах кліностакування (20 °С)

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі використовували протонему моху *Ceratodon purpureus*, яку вирощували у контрольованих умовах освітлення 2000 ± 200 лк, температури 20—22 °С на 16-годинному світловому дні. Семиденну протонему препарувальною голкою знімали з агару і переносили в нові чашки Петрі на агаризоване середовище, в яке додатково вносили 0.2 % глюкозу, чашки загортали темним папером і ставили вертикально. У темряві протонема росла негативно-гравітропно, утворюючи пасмо паралельних ниток. Через сім діб протонему повертали на 90° і ставили в холодильник при 2 °С. Після цього протонему переносили на кліностаг в умови нормальної температури, і через 4—12 год аналізували характер ростових рухів. Фітогормони, фітотропіни та блокатори кальцієвих каналів вносили в агар перед перенесенням протонемі у темряву. Після завершення експерименту протонему фіксували розчином Карнуа, і під мікроскопом виміряли довжину столонів та кути їхнього згину. У кожному експерименті аналізували не менше 100 столонів, з результатів вимірів яких визначали середнє арифметичне і стандартну помилку.

Виявилось, що протонема сприймала гравістимул у темряві в умовах низької температури і реалізувала його на кліностаг під час обертання. Якщо протонему 12 год витримували на кліностаг в умовах 2 °С, то ніякого гравітропного згину виявити не вдалося. Згин проявлявся лише в умо-

вах кімнатної температури, при якій протонема мала змогу рости і одночасно з цим згинатися.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

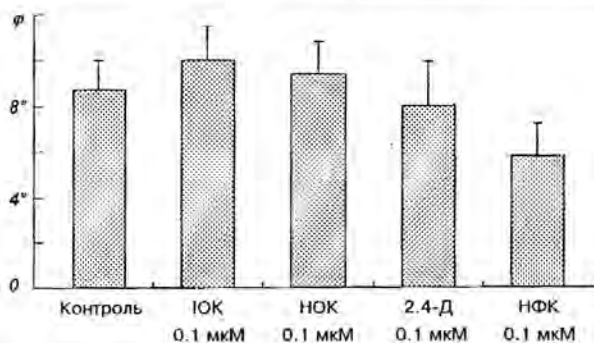
Мікроскопічним аналізом протонемі виявили, що не в усіх чашках спостерігалася седиментація амілопластів; вони зміщувалися на нижню сторону клітини лише у чашках, які зазнали 4-годинної гравістимуляції. Порівняльними аналізами локалізації у субапикальній зоні апікальних клітин ми не виявили змін між чашками, які витримували більш ніж 4 год в умовах гравістимуляції, та чашками, що додатково витримувалися в умовах 2 °С на кліностаг. Отримані результати можуть свідчити про те, що гравістимул може не тільки сприйматися, але й деякий час знаходитися у «законсервованому» стані у клітинах із заблокованим ростом.

На рис. 1 представлена принципова схема проведеного експерименту із протонеєю *Ceratodon purpureus*. Тривалість гравістимуляції слабо впливала на кут загину протонемі, не впливала також тривалість витримування протонемі на кліностаг в умовах 2 °С, однак тривалість росту протонемі і кути загину поступово збільшувалися із тривалістю росту протонемі в умовах нормальної температури (20 °С). Сприйняття гравістимулу і його «консервацію» ми оцінювали кутом загину.

Обробка протонемі різними концентраціями ІОК та НОК виявила, що концентрації, які стимулюють

Таблиця 1. Вплив фізіологічно активних речовин на швидкість росту протонеми *Ceratodon purpureus*

Діюча речовина	Концентрація, мкМ	Швидкість росту, мкм/год
Контроль	—	29.2±2.5
ІОК	0.1	24.4±6.9
	1	28.0±3.6
НОК	0.1	26.9±6.7
	1	27.0±4.5
НФК	0.1	22.8±3.9
	1	17.5±2.2
	10	12.3±2.1

Рис. 2. Вплив фізіологічно активних речовин на гравітропний ріст протонеми *Ceratodon purpureus*

ріст протонеми, стимулювали також її загини під впливом гравістимулу, сприйнятого клітинами в умовах низької температури. Блокатори Ca^{2+} -АТФ-фази — ванадат натрію та Ca^{2+} -каналів — верапаміл гальмували швидкість росту і кути загину протонеми (рис. 3, табл. 1, 2).

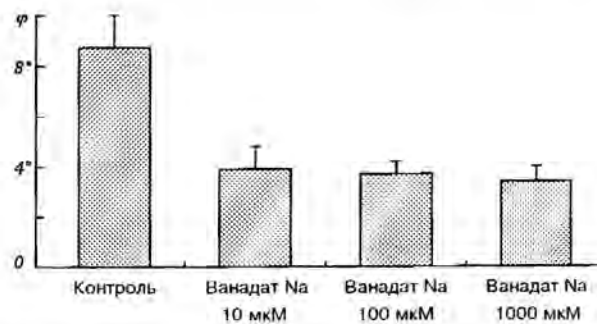
Стимулюючі концентрації ІОК сприяли гравітропному згину апікальних клітин протонеми. Фітотропін НФК (нафтилфталамінова кислота) у низьких концентраціях не порушував зональний розподіл амілопластів, неістотно знижував відсоток і величину кута гравітропного згину. Починаючи з концентрації 1.0 мкМ розпочиналось зменшення кута гравітропного згину. Вища (10 мкМ) концентрація НФК впливала на розподіл пластид та інгібувала гравітропний згин протонеми.

Фізіологічно активні речовини, у тому числі 0.1—1.0 мкМ ІОК порівняно з контролем сприяли збільшенню кута загибу; НОК у такій же концентрації діяла аналогічно, але дещо слабше; 2,4-Д незначно зменшувала кут порівняно з контролем, у той час як під впливом НФК досить чітко спостерігалось зменшення кута загибу, зумовленого гравістимуляцією (рис. 2, табл. 1).

Проведені дослідження впливу фітогормонів, фітотропнів на гравітропізм протонеми *Ceratodon purpureus* свідчать про участь базипетального тран-

Таблиця 2. Вплив фізіологічно активних речовин на швидкість росту протонеми *Ceratodon purpureus*

Діюча речовина	Концентрація, мкМ	Швидкість росту, мкм/год
Контроль	—	29.2±2.5
Ванадат Na	10	28.5±3.7
	100	26.0±5.5
	1000	18.7±3.7
Верапаміл	1	29.3±4.7
	10	27.5±4.3
	100	18.8±5.8

Рис. 3. Вплив ортованадату натрію на гравітропний ріст протонеми *Ceratodon purpureus*

спорту ІОК у трансдукції гравістимулу в одній верхівковій клітині протонеми мохів. Клітини протонеми під впливом фітотропіну НФК [13], який, як відомо, зв'язується зі специфічними переносниками ІОК, блокує вихід ІОК з клітин, що впливає на характер градієнта ауксину в рецепторних апікальних клітинах і орієнтацію росту. На підставі наших та інших даних можна зробити висновок про участь полярного транспорту ІОК у гравітропізмі нитчастих структур з апікальним ростом [4].

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

Особливістю протонеми мохів є те, що градієнт ендогенної ІОК і градієнт Ca^{2+} в апікальних клітинах мають однакову апікально-базальну направленість. Якщо врахувати специфіку згину апікальних клітин, яка полягає в тому, що 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, не можна безпосередньо переносити на протонему мохів. Базипетальний транспорт ІОК в

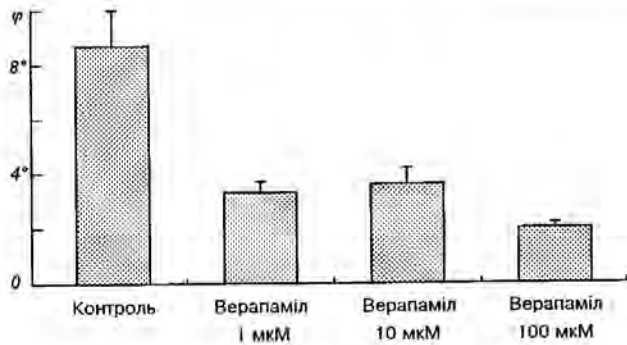


Рис. 4. Вплив верапамілу на гравітропний ріст протонемі *Ceratodon purpureus*.

апикальній клітині поляризує її функціонально і є чутливим сенсором до ендогенних змін, у тому числі седиментації амілопластів. Показано, що седиментація амілопластів викликає локальне підвищення Ca^{2+} -АТФаз у зоні їхнього осідання у місцях контакту з ендомембранами [5]. Тому можна допустити, що активація Ca^{2+} -АТФаз буде індукувати зміну осі базипетального транспорту Ca^{2+} і відповідне переміщення Ca^{2+} -каналів на плазматичній мембрані клітини. Базипетальний потік Ca^{2+} буде зміщуватися від його входу в апексі верхівкової клітини.

Зміна полярного транспорту Ca^{2+} відповідним чином відкоректує потік ІОК і його наслідком стане зміщення ростової зони. Якщо порушити транспорт ауксину фітотропінами, то це заблокує ріст і сприйняття гравістимулу. Отже, у гравітропізмі апикальної клітини протонемі домінує поляризаційна, а не ростова функція ІОК.

ВИСНОВКИ

1. Експериментально встановлено, що сприйняття гравістимулу апикальними клітинами може відбуватися при низьких температурах (2 °C), однак гравістимул реалізується лише в умовах, сприятливих для росту протонемі (20 °C).

2. Низькі концентрації фітогормонів стимулюють вираженість гравістимулу.

3. Реалізація гравітропного згину здійснюється за участю потоків Ca^{2+} : блокатори кальцієвих каналів і кальцієвих помп пригнічують вираженість гравітропного згину апикальних клітин протонемі (рис. 3, 4, табл.2).

цаємості и ее контроль фитохромом // Биофизика.—1977.—22, № 5.—С. 824—828.

- Демків О. Т., Федик Я. Д. Метаболічні градієнти і морфогенез протонемі *Funaria hygrometrica* Hedw. // Укр. ботан. журн.—1972.—29, № 4. —С. 434—438.
- Демків О., Хоркавців Я., Кардаш О. Гормональний контроль розвитку гаметофіту мохів // Праці Наук. Товариства ім. Шевченка.—1999.—3.—С. 39—49.
- Хоркавців О. Я., Демків О. Т., Хоркавців Я. Д. Участь кальцію у гравітропізмі протонемі моху *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. // Космічна наука і технологія.—2003.—8, № 1.—С. 89—95.
- Busch M. B., Sievers A. Hormone treatment of roots causes not only a reversible loss of starch but also of structural polarity in statocytes // Planta.—1990.—181.—P. 358—364.
- Chaban Ch. I., Kern V. D., Ripetskyj R. T., et al. Gravitropism in caulonemata of the moss *Pottia intermedia* // J. Bryology.—1998.—20.—P. 287—299.
- Kiss J. Z. The response to gravity is correlated with the number of statoliths in Chara rhizoids // Plant Physiol.—1994.—105, N 3.—P. 937—940.
- Kiss J. Z., Hertel L., Sack F. D. Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana* // Planta.—1989.—177, N 2.—P. 198—206.
- Pollard E. C. Theoretical studies on living systems in the absence of mechanical stress // J. Theor. Biol.—1965.—8.—P. 113—123.
- Rose S., Bopp M. Uptake and polar transport of indoleacetic acid in moss rhizoids // Physiol. Plant.—1983.—58.—P. 57—61.
- Rose S., Rubery, Bopp M. The mechanism of auxin uptake and accumulation in moss protonemata // Physiol. Plant.—1983.—58.—P. 52—56.
- Schwuchow J., Michalke W., Hertel R. An auxin transport inhibitor interferes with unicellular gravitropism in protonemata of the moss *Ceratodon purpureus* // Plant Biol.—2001.—N 3.—P. 357—363.

PERCEPTION AND REALIZATION OF GRAVISTIMULATION IN PROTONEMA OF MOSSES

Yu. I. Lesnyak, O. T. Demkiv

The protonema of mosses perceives and realizes gravistimulation by apical cells of stolones. The function of gravireceptors is executed by amyloplasts, which are sedimented on the bottom part of a lateral side under the influence of gravitation. The character of distribution of amyloplasts and dynamics of sedimentation are described for different kinds of mosses. Nevertheless, the processes of transduction of gravistimulation in growth process remain unexplored. It is experimentally shown that in conditions of low temperatures the perception of gravistimulation takes place, but the growth of apical cells is blocked. When gravistimulate protonemata are transferred to natural conditions of environment, gravitropic bend is realized. It is established that the realization of gravistimulation can be experimentally blocked by inhibitors: of calcium's canals by verapamils with a concentration of 10^{-4} and 10^{-3} M and calcium's pumps by ortovanadats natriums with a concentration of 10^{-5} to 10^{-4} M. Exogenous phytohormones of indole-3-acetic acid (IAA) and α -naphthyl acetate acid (NAA) with a concentration of 10^{-7} and 10^{-6} M influenced insignificantly growth and gravitropic bend of apical cells of protonema. Nevertheless, phyto tropin NPA with a concentration of 10^{-4} oppressed considerably gravitropic-dependent bend and scarcely affected growth rate of apical cells of protonema.

1. Демків О. Т., Сытник К. М. Морфогенез архегоніат. — К.: Наук. думка, 1985.—204 с.

2. Демків О. Т., Федик Я. Д. Полярность клеточной прони-