

О.І. ПУНД'ЯК

Інститут екології Карпат НАН України
вул. Стефаника, 11, м. Львів, 79000

**ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОРОСТАННЯ СПОР МОХУ *FUNARIA
HYGROMETRICA* HEDW. У ГРАВІТАЦІЙНОМУ ПОЛІ**

ключові слова: гравічутливість, спори, пероксидаза
key words: *gravisensitivity, spores, peroxidase*

O.I. PUND'AK

**INVESTIGATION OF MOSS *FUNARIA HYGROMETRICA* HEDW.
SPORES GERMINATION IN THE GRAVITY FIELD**

Institute of Ecology of the Carpathians NAS of Ukraine
11 Stephanyc Str., Lviv, 79000, Ukraine

In vertical Petry dishes, spores of moss *F. hygrometrica* germinated, forming primary rhizoids growing downward and primary chloronemas growing upward. Growth velocity of the rhizoids did not depend on its direction. Growth velocity of the chloronemas was bigger for the direction cloth to the vertical. 60 mkM lanthanum did not inhibit gravisensitivity of *F. hygrometrica* spores. But with 1,25 mkM peroxidase, 60mkM lanthanum inhibited considerably gravisensitivity of the rhizoids.

Гравітація є сталим фізичним екзогенним чинником, під впливом якого формується рослина. Тому дослідники значну увагу приділяють вивченню гравічутливості, тобто здатності рослин реагувати на дію гравітації [3]. Гравічутливість рослин є необхідним пристосуванням для їх виживання. На початкових стадіях розвитку в темряві під поверхнею ґрунту реакція на гравітаційне поле допомагає рослині досягнути поверхні ґрунту, без чого неможливий її подальший розвиток організму.

Мохи є зручною моделлю для дослідження гравічутливості рослин. Адже за їх ростом і розвитком на клітинному рівні можна легко спостерігати за допомогою мікроскопа, не пошкоджуючи одновимірних організмів на стадії протонеми [2]. Сприйняття гравітації та ростова відповідь протонеми мохів на її дію добре вивчена та відбувається в апікальній клітині, точка верхівкового росту якої зміщується відповідно до напрямку дії гравістимулу. Серед багатьох досліджених видів мохів у нашій лабораторії, найменше гравічутливим видом на стадії протонеми виявилася *F. hygrometrica*. Можна було припустити, що для компенсації цього *F. hygrometrica* матиме високу гравічутливість на стадії проростання спор, а також гравічутливість могла би проявитися у нерівномірному розподілі швидкостей росту проростків залежно від їх напрямку. І дійсно, як виявили наші попередні дослідження [4], сферична спора *F. hygrometrica* набухає не змінюючи своєї форми. Згодом спора формує вип'ячування, з якого розвивається первинний ризоїд, напрямлений донизу, а ще через добу-дві – напрямлену догори хлоронему. Ризоїд та хлоронема

F. hygrometrica майже зовсім не здатні змінювати напрямок свого росту під впливом гравітації. Можна сказати, що проростання спор *F. hygrometrica* – це виникнення осі росту проростків. У даному випадку немає аналогії з насінною, яка вже має вісь полярності. Виникнення нової осі росту залежно від гравітаційного поля відбувається в момент галузнення плагіотропних хлоронем мохів (що досліджували у нашій лабораторії), галузнення гіф грибів [8], коренів судинних рослин, а також у момент утворення такими коренями бруньок пагонів (гравіморфоз) [5]. Проте найкраще досліджений процес виникнення осі росту на прикладі розвитку зигот бурих водоростей *Fucus* та *Pelvecia* [10]. Вони є ідеальними об'єктами для вивчення поляризації клітини, бо на відміну від зигот інших організмів розвиваються у зовнішньому середовищі, осідаючи на морське дно. Поляризація цих клітин є фотозалежною, а не гравізалежною. Тут виникає одна вісь росту, а в спорі *F. hygrometrica* – виникають послідовно дві осі поляризації. Загалом, поляризація початково аполярних клітин як рослин, так і тварин є дуже актуальною проблемою ембріогенезу, морфогенезу та онтогенезу.

За декілька годин після запліднення зигот бурих водоростей, Jaffe [9] спостерігав асиметричні потоки кальцію: іони цього елемента проникають із нижнього боку клітини, де має утворитися ризоїд, у верхній. Це відбувається за рахунок просторового перерозподілу кальцієвих каналів на плазматичній мембрані клітини: вони концентруються у нижній їх частині. Проте, градієнти кальцію не завжди відіграють ключову роль у процесах виникнення осей росту. Так, галузнення гіф гриба *Achlya*, індуковане локальним градієнтом фенілаланіну в поживному середовищі не супроводжувалося виникненням помітних внутрішньоклітинних градієнтів кальцію, а блокатори іонів кальцію – лантан і гадоліній не тільки не погіршували, але покращували цей процес [8]. Слід зауважити, що іони рідкоземельних металів конкурують за сайти зв'язування кальцію з біополімерами клітинної стінки, блокують кальцієві канали [1] та активують пероксидазу [16]. Показано, що фермент пероксидаза бере активну участь у поляризації клітин. Так, В. Вреланд [15] показала, що фермент пероксидаза концентрується з нижнього боку клітини зиготи фукуса, де незабаром має утворитися ризоїд. Пероксидаза, продукуючи активні форми кисню, сприяє розриву поперечних ланцюгів полімерів клітинної стінки, локально змінюючи її еластичність [11].

Метою роботи було дослідити та описати гравізалезний просторовий розподіл імовірностей виникнення осей росту під дією різних чинників (наприклад, під дією різних концентрацій іонів кальцію та їх конкурентів – іонів лантану) на одноклітинній моделі проростання спор моху *F. hygrometrica*.

Об'єкти та методи досліджень

Об'єктом досліджень були спори широко розповсюдженого листяного моху фунарії вологомірної (*Funaria hygrometrica* Hedw.). Спори пророщували на твердому агаризованому середовищі Кноп-II із 0,2% глюкозою в інтервалі температур від 20 до 22 С⁰ та відносній вологості 85-90%. Чашки Петрі зі спорами орієнтували вертикально й поміщали в темні коробки. Спостереження за проростанням спор проводили під світловим мікроскопом „Jenaval” з використанням об'єктивів 3,2; 12,5^x безпосередньо в стерильних чашках

Петрі. Величину кута напряму росту проростків спор вимірювали за допомогою з'єднаного з окуляр-мікрометром транспортира та визначали його, як кут між початковим напрямом росту проростка і вертикаллю.

Для початково сферичних спор *F. hygrometrica* характеризувати їх гравічутливість кутом згину не вдається. Для порівняльної оцінки гравічутливості використовували запропоновані нами критерії G_{160}^{200} та G_{-20}^{20} – надлишкові ймовірності росту проростків донизу у діапазоні кутів від 160^0 до 200^0 та догори від -20^0 до 20^0 (Пундяк, 2004). Вертикальний ріст догори відповідає напрямку 0^0 , а вертикальний ріст донизу відповідає напрямку 180^0 . Критерій гравічутливості обчислювали за формулою:

$$G_{160}^{200} = 1,12 \cdot (x_{160}^{200} - 11,1);$$

$$G_{-20}^{20} = 1,12 \cdot (x_{-20}^{20} - 11,1);$$

де x_{160}^{200} та x_{-20}^{20} – відсотки проростків, що ростуть у даному інтервалі напрямків; 11,1 – відсоток проростків, що росли би в інтервалі кутів від 160^0 до 200^0 (або від -20^0 до 20^0) за умови повної відсутності гравічутливості; 1,12 – коефіцієнт, який відповідає умові одночасної рівності $G_{160}^{200} = 100$; $x_{160}^{200} = 100$ чи $G_{-20}^{20} = 100$; $x_{-20}^{20} = 100$.

Для порівняння швидкостей формування проростків спор, що ростуть у різних напрямках відносно вектора гравітації на третю добу після посіву спор визначали й порівнювали величини гравічутливостей G_{160}^{200} для ризоїдів довжиною 1 більше-рівне 0,1 мм та для ризоїдів довжиною менше 0,1 мм. Такі самі виміри, обчислення та порівняння проводили для гравічутливості G_{-20}^{20} хлоронемних проростків (порівняльна величина для них становила $l=0,06$ мм). Для досліджень полярності формування проростків спор у градієнті іонів кальцію, наносили на поверхню агаризованого поживного середовища, що містило 2,1 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ із висіяними минулої доби спорами, агаризоване поживне середовище, що містило 10,5 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. У спорах, що опинилися під нанесеним середовищем, градієнт іонів кальцію виникає, переважно, у напрямку, перпендикулярному до площини денця чашки Петрі. Реагуючи на даний градієнт, проростки можуть відхилитися від площини колишньої поверхні субстрату, в напрямку денця або кришки чашки Петрі. Визначали такі відхилення, наводячи різкість на світловому мікроскопі спочатку на материнській клітині спори, а потім на верхівці проростка. Зміщення мікрометричного гвинта мікроскопа в останньому випадку слугували критерієм оцінки відхилення росту проростків за градієнтом концентрації кальцію.

Фермент пероксидазу додавали до твердого агаризованого поживного середовища Кноп-II з 0,2%-ю глюкозою на першу добу після висіву спор, наносячи рівномірно тоненький шар розчину пероксидази. Розчин пероксидази готували у розчині Кноп-II з 0,2%-ю глюкозою у концентраціях відповідно 1,25; 5; 10 мкМ. Паралельно цю саму кількість пероксидази розчиняли у середовищі Кноп-II з 0,2%-ю глюкозою, який не містив солей кальцію й аналогічним чином наносили на тверде агаризоване середовище Кноп-II з 0,2%-ю глюкозою, без солей кальцію.

Результати досліджень та їх обговорення

Гравічутливість ризоїдів не залежала від їх довжини. Гравічутливість хлоронем довших за 0,06 мм достовірно перевищувала гравічутливість хлоронем коротших за 0,06 мм (табл. 1). Це означає, що швидкість росту ризоїдів *F. hygrometrica* не залежить від напрямку, а швидкість росту хлоронем є вищою у напрямках, близьких до вертикалі. Це, на нашу думку, сприяє швидкому закріпленню спор і вибору ними правильного напрямку росту.

Таблиця 1.

Гравічутливість різних за розмірами проростків спор *F. hygrometrica*

Тип проростка	Гравічутливість усіх проростків, %	Гравічутливість проростків довжиною >1, %	Гравічутливість проростків довжиною <1, %
Хлоронема, G_{-20}^{20}	60,7±4,9	73,7±9,2	32,4±12,3
Ризоїд, G_{160}^{200}	43,0±5,3	37,4±6,5	49,3±6,7

Примітка: порівняльна величина l для хлоронем становить 0,06 мм, а для ризоїдів $l=0,1$ мм. Жирним шрифтом позначено величини гравічутливості, що достовірно відрізняються від контролю.

Для спор, що проростали в товщі субстрату між його шарами з різним вмістом кальцію (2,1 та 10, 5 мМ, відповідно), проростки головним чином орієнтувалися у напрямі градієнту іонів кальцію. (78,0±4,8% хлоронематичних проростків моху *F. hygrometrica* заглиблювалися в шар агару з вищою концентрацією іонів кальцію). У наших дослідах відсутність різних неорганічних солей (у тому числі солей кальцію) у поживному середовищі з 0,2% глюкозою помітно не впливала на гравічутливість спор моху *F. hygrometrica*. Навіть п'ятикратний надлишок солей іонів кальцію (10,5 мМ) не призводив до помітних змін гравічутливості проростків *F. hygrometrica* (табл. 2).

Таблиця 2.

Гравічутливість проростків спор у середовищах з різними концентраціями кальцію

Тип проростка	Гравічутливість усіх проростків, %		Гравічутливість проростків, довжиною >1, %	
	2,1 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	10,5 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	2,1 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	10,5 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
Хлоронема, G_{-20}^{20}	60,7±4,9	66,0±4,9	73,7±9,2	54,8±9,6
Ризоїд, G_{160}^{200}	43,0±5,3	44,3±6,2	27,9±7,2	51,3±6,1

Примітка: жирним шрифтом позначено величини гравічутливості, що достовірно відрізняються від контролю.

Мох *F. hygrometrica* є наземним видом. Концентрація кальцію в ґрунтах

може сильно коливатися залежно від природних умов (кількості опадів і т.д.). Тому автономність щодо кількості кальцію у зовнішнім середовищі є важливим моментом пристосування.

Іони лантану за концентрації 60 мкМ помітно покращували гравічутливість первинного ризоїда порівняно з контролем, не впливаючи на гравічутливість первинної хлоронеми. Можна припустити, що активуючи нерівномірно розподілену зовнішньоклітинну пероксидазу, іони лантану сприяють локальній зміні пружності клітинної стінки.

Вплив ферменту пероксидази, яку вносили у поживне середовище, на гравічутливість спор *F. hygrometrica* істотно залежала від концентрації іонів лантану. У звичайному середовищі Кнопа-П з 0,2% глюкозою гравічутливість первинних ризоїдів *F. hygrometrica* під впливом пероксидази достовірно не змінювалася. Достовірне зниження гравічутливості під дією 1,25 мкМ пероксидази спостерігали для спор на поживному середовищі Кнопа із 60 мкМ хлориду лантану (табл. 3).

Таблиця 3.

Вплив пероксидази на гравічутливість проростків спор *F. hygrometrica*

Середовище вирощування спор	Концентрація пероксидази в інкубаційному середовищі, мкМ	Гравічутливість ризоїда, G_{160}^{200} , %
Контроль	0	43,6±5,3
60 мкМ LaCl ₃	0	74,0±4,2
Контроль	1,25	34,6±5,1
60 мкМ LaCl ₃	1,25	2,8±4,7

Примітка: жирним шрифтом позначено величини гравічутливості, що достовірно відрізняються від контролю.

Можливо, що активована лантаном форма пероксидази хрому, яку додавали до поживного середовища частково нівелює градієнт пероксидазної активності, який може утворюватися на поверхні спори завдяки адсорбції пероксидаз шаром пектинів. Пероксидаза в концентраціях 5 чи 10 мкМ блокувала утворення первинної хлоронеми, не впливаючи на розвиток первинного ризоїда.

Висновки

Швидкості формування первинних хлоронем, що ростуть вертикально вгору є достовірно більшими за швидкості формування первинних хлоронем, початковий напрямок росту яких істотно відхиляється від вертикалі.

Зовнішньоклітинна концентрація іонів кальцію не впливає на гравічутливість спор *F. hygrometrica*.

Швидкості формування первинних ризоїдів є близькими в усіх напрямках.

Хлорид лантану у концентрації 60 мкМ достовірно покращував гравічутливість первинного ризоїда у порівнянні із контролем, не впливаючи суттєво на гравічутливість первинної хлоронеми.

Пероксидаза у присутності іонів лантану значно інгібувала гравічутливість ризоїдальних проростків.

ЛІТЕРАТУРА

1. **Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е.** Флюоресцентные зонды в исследованиях биологических мембран. – М.: Наука, 1980. – 320 с.
2. **Демків О.Т., Хоркавців Я.Д., Кардаш О. Р., Чабан Х.І.** Гравічутлива протонема моху – новий об'єкт космічної біології // Космічна наука і технологія. – 1997. – 3, 3/4. – С.34-39.
3. **Меркис А.И.** Сила тяжести в процессах роста растений. – М.: Наука, 1990. – 184 с.
4. **Пундяк О.І., Демків О.Т., Хоркавців Я. Д., Багрій Б.Б.** Полярність проростання спор моху *Funaria hygrometrica* Hedw. // Космічна наука і технологія. – 2001. – Т. 8, № 1. – С. 96-100.
5. **Уоринг Ф., Филипс И.** Рост растений и дифференциация. – М: „Мир”, 1984. – 512 с.
6. **Driss-Ecole D., Vassy J., Rembur J., Guivarc'h A., Prouteau M., Dewitte W. and Perbal G.** Immunolocalization of actin in root statocytes of *Lens culinaris* L. // Journal of Experimental Botany. – 2000. – Vol. 51, No. 344. – P. 521-528.
7. **Grolig F., Herkenrath H., Pumm T., Gross A., Galland P.** Gravity susception by buoyancy: floating lipid globules in sporangiophores of *Phycomyces* // Planta. – 2004. – 218, № 4. – P. 658-667.
8. **Jackson S. L., Morris J. S., Garrill A.** Hyphal branching and the induction of cell polarity// Cell biology of plant and fungal tip growth / Geitmann A. et al. (Eds.). – IOS Press. – 2001. – P. 69-79.
9. **Jaffe L. F.** Control of development by ionic currents // Membrane transduction mechanisms / Eds. R. A. Cone and J. E. Dowling. New York: Raven, 1979. P. 199-231.
10. **Kropf D., Darryl L.** Establishment and expression of cellular polarity in fucoid zygotes // Microbiol. Rev. – 1992. – 56. – P. 316-339.
11. **Lampont D.** Roles for peroxidase in cell wall genesis. / In: H.Greppin, C.Penel, T.H.Gaspar (eds.), Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. – 1986. – P. 199-208.
12. **Schimek C., Eibel P., Grolig F., Horie T., Ootaki T., Galland P.** Gravitropism in *Phycomyces*: a role for sedimenting protein crystals and floating lipid globules//Planta. – 1999. – 210. – P. 132-142.
13. **Sievers A, Volkmann D.** Verursacht differentieller Druck der Amyloplasten auf ein komplexes Endomembransystem die Geoperzeption in Wurzeln?// Planta. – 1972. – 102. – P. 160-172.
14. **Volkmann D., Winn-Borner U., Waberzeck K.** Gravidresponsiveness of cress seedlings and structural status of presumptive statocytes from the hypocotyls // J. Plant Physiol. – 1993. – 142. – P. 710-716.
15. **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). – P. 234-235.
16. **Zhang L. Zeng F., Xiao R.** Effect of Lanthanum Ions (La^{3+}) on the Reactive Oxygen Species Scavenging Enzymes in Wheat Leaves // Biological Trace Element Research. – 2003. – Vol. 91, № 3. – P. 243-252.