

ГРАВІЗАЛЕЖНА ПОЛЯРИЗАЦІЯ СПОР МОХУ *FUNARIA HYGROMETRICA* HEDW.

О.І. Пундяк

Інститут екології Карпат НАН України, вул. Стефаника, 11, Львів, 79000
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua

Досліджено гравізаляжну поляризацію спор моху *Funaria hygrometrica* Hedw., що проростають на поверхні твердого поживного середовища. За допомогою нахилання чашок зі спорами, а також кліностаування з'ясовано залежність гравістимульованості спор від величини гравістимулу. Отримані дані узгоджуються з гіпотезою про те, що теплові флуктуації суттєво впливають на поляризацію спор.

Особливістю всіх живих організмів, що розвиваються, є наявність осей росту, які визначають орієнтацію органу чи організму, напрям градієнтів фізико-хімічних характеристик. Така характерна будова організму називається полярністю. Переважно ріст вздовж осі відбувається швидше, ніж перпендикулярно до неї. Вісь росту є необхідною для розвитку всього організму. Тому дослідження процесу виникнення осей росту на ранніх етапах розвитку є актуальною проблемою біології [7]. У нижчих рослин індукція полярності краще за все досліджена на поодиноких клітинах, що є спершу аполярними. Відомими об'єктами є зиготи водоростей *Fucus* та *Pelvetia* [8]. Так само, як і у випадку яйцеклітин бурих водоростей, спори мохів поляризуються за межами материнського організму, і тому цей процес легко досліджувати. Наші дослідження показали, що поляризація спори *F. hygrometrica* відбувається гравізаляжно [6]. Показано, що рецептором гравітаційного поля у більшості рослин, включаючи спори *F. hygrometrica*, є внутрішньоклітинні тільця – амілопласти [2, 6]. Гравітаційне поле призводячи до зміщення наповнених крохмалем амілопластів, впорядковує процес виникнення осей росту у початково сферичній спорі – направляє перший проросток (ризойд) донизу, а другий (хлоронему) – догори. Із

хлоронеми розвивається доросла особина, а ризоїд служить для закріплення організму в ґрунті. Внаслідок того, що переважно всі проростки формуються напрямленими по поверхні субстрату, розподіл напрямів їх росту визначається гравістимулом – складовою вектора гравітації паралельною до поверхні субстрату. Величину гравістимулу можна змінювати змінюючи орієнтацію чашок зі спорами в просторі [6]. Внаслідок того, що густина амілопластів (1,5 г/мл) більша за густину рідкого вмісту клітини – цитоплазми (1 г/мл), а їх маса становить близько 10^{-12} кг [3], зміщення статолітів, обумовлені тепловими флуктуаціями знаходяться в нанометровому діапазоні. Такі незначні зміни неможливо вловити за допомогою світлового мікроскопа, проте вони можуть призвести до відчутних структурних перебудов макромолекул цитоскелету, мембран, клітинної стінки, з якими амілопласти пов'язані й спровокувати поляризацію клітини. Експерименти показують, що зміна величини гравістимулу видимо впливає на просторовий розподіл амілопластів у клітині [2, 6]. Це відбувається внаслідок розтягу пружного цитоскелету, на якому амілопласти «підвішені» [9]. Зростання гравістимулу призводить до зростання розтягу цитоскелету і статоліти зміщуються донизу. Проте існує суттєвий відсоток спор, які

ростуть „всупереч” гравістимулу: ризоїди – догори, а хлоронеми – донизу. Зменшення гравістимулу до 0,17g призводило до достовірного зростання відсотка таких проростків [6]. Це заперечує генетичну відмінність між спорами, що формують проростки різної направленості: догори чи донизу. Така відмінність має характер теплових флуктуацій. Отож можна припускати, що певному напрямку росту проростка (догори чи донизу) відповідає певне усереднене значення потенціальної енергії амілопластів у гравітаційному полі. Тоді, згідно із канонічним розподілом Гібса, величина логарифму відношення ймовірностей того, що проростки ростуть догори чи донизу (гравістимульованість) має лінійно залежати від різниці усереднених потенціальних енергій амілопластів $\Delta\bar{E}$ у положеннях, які можуть викликати процес поляризації спори у згаданих напрямках:

$$K \equiv \left| \ln \frac{n \uparrow}{n \downarrow} \right| = \sum_i |\Delta\bar{E}_i| / k_b T - \Pi, \quad (1)$$

де $n \uparrow$ – кількість проростків, що ростуть догори; $n \downarrow$ – кількість проростків, що росте донизу; E_i – потенціальна енергія i -того амілопласта; k_b – константа Больцмана; T – абсолютна температура; риска вгорі – знак усереднення по ансамблю ідентичних систем; Π – поправка з урахуванням невизначеності, що виникає внаслідок дисипаційних процесів [3] у системі взаємодіючих частинок (у нашому випадку – амілопластів), що рухаються у в’язкому середовищі. Вважаючи, що амілопласти за допомогою структур цитоскелету пружно прикріплені до каркасу клітини, рівняння (1) можна переписати у вигляді:

$$K = (\mathbf{g} \left| \sum_i \Delta\overline{m_i \mathbf{x}_i} \right| + \left| \sum_i k_i \Delta(\mathbf{x}_i - \mathbf{R}_i)^2 \right| + \left| \sum_i \sum_j k_{ij} \Delta(\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j - \mathbf{R}_{ij})^2 \right|) / k_b T - \Pi, \quad (2)$$

де \mathbf{g} – вектор гравітації; m_i – маса i -го амілопласту; \mathbf{x}_i – вектор координати i -го

амілопласта; k_i – коефіцієнт пружності зв’язку i -го амілопласта з каркасом клітини; \mathbf{R}_i – вектор рівноважного положення i -го амілопласта; k_{ij} – коефіцієнт пружності зв’язку i -го амілопласта з j -м амілопластом; \mathbf{R}_{ij} – вектор рівноважного положення i -го та j -го амілопласта. Оскільки пружні сили зв’язку врівноважують у спорах гравітаційну силу, коефіцієнти пружності k_i та k_{ij} є того самого порядку, що й маси амілопластів. Це означає, що за нанометрових відхилень від положення рівноваги другим і третім членами рівності (2) можна знехтувати. Величина Π може знаходитись в діапазоні значень від 0 до

$$D, \quad D \equiv \frac{1}{3} \sum_i \sum_j \mu_{ij} \beta_{ij} \overline{\delta x_{ij} |\dot{r}_{ij}|} / k_b T, \quad \text{де } \mu_{ij} -$$

зведений центр мас i -го та j -го амілопластів ($\sim 10^{-12}$ кг); β_{ij} – різниця зведених коефіцієнтів тертя амілопластів ($\sim 10^6$ Н·м/кг·с); δx_{ij} – флуктуаційні відхилення відстані між i -м та j -м амілопластами від рівноважного положення (близько 10^{-9}); $|\dot{r}_{ij}|$ – усереднений модуль швидкості центру мас i -го та j -го амілопластів ($\sim 10^{-5}$ м/с). Отож, $D \approx 3$, згідно з (2), значення величини $Z \equiv \left| \sum_i \Delta\overline{m_i \mathbf{x}_i} \right| / k_b T$ буде

знаходитись у межах від $Z_{min} = K/g$ до $Z_{max} = (K+3)/g$ і має бути незалежним від величини гравістимулу.

Нахиляючи чашки, ми змінюємо характеристики гравітаційного поля в системі координат, пов’язаній з поверхнею субстрату, проте не змінюємо характеристик гравітаційного поля, що діє на спори. Завдяки обертанню рослин у кліностаті з’являється можливість змінювати усереднене по часу гравітаційне поле у системі відліку, пов’язаній із рослинним організмом. За повільного обертання кліностата відцентровими силами можна знехтувати. Вважається, що періодичність дії гравітаційного поля на рослини в кліностаті майже не впливає на їх ріст і розвиток [3]. Характеристики гравітаційного поля в кліностаті змінюються залежно від

орієнтації осі обертання: у горизонтальному положенні усереднене пришвидшення вільного падіння рівне нулю, а у вертикальному положенні – $9,8 \text{ м/с}^2$. Метою нашої експериментальної роботи було знайти підтвердження нашої гіпотези про те, що теплові флуктуації мають суттєвий вплив на поляризацію спор *F. hygrometrica*. Для цього ми співставляли величини K , Z_{min} та Z_{max} для спор у нахилених чашках у стаціонарному положенні та у кліностаці за однакового гравістимулу $1,7 \text{ м/с}^2$.

Методика експерименту

Об'єктом досліджень були спори широко розповсюдженого листяного моху – *Funaria hygrometrica* Hedw. Спори пророщували на твердому агаризованому середовищі Кноп-ІІ з $0,2\%$ глюкозою в інтервалі температур від 20 до $22 \text{ }^\circ\text{C}$ та відносній вологості $85-90\%$ [1, 6]. Спостереження за проростанням спор проводили під світловим мікроскопом "Jenaval" з використанням об'єктивів $3,2\times$; $12,5\times$ безпосередньо в стерильних чашках Петрі. Для порівняльної оцінки гравістимульованості використовували запропонований нами критерій K – модуль натурального логарифму відношення кількості проростків, що ростуть догори до кількості проростків, що ростуть донизу. Для перевірки гіпотези про флуктуаційну природу виникнення осей полярності у гравітаційному полі використовували критерії Z_{min} та Z_{max} : $Z_{min}=K/g$; $Z_{max}=(K+1)/g$.

Чашки зі спорами орієнтували під кутами 90° та 10° до горизонтальної площини, що відповідає гравістимулу (складовий вектора гравітації у площині субстрату – \mathbf{g}_r) рівному відповідно $9,8 \text{ м/с}^2$ та $1,7 \text{ м/с}^2$. Чашки Петрі із висіяними спорами в циліндричних темних коробках поміщали в кліностаці, період обертання якого становив 16 секунд так, щоб вісь обертання була паралельною поверхні субстрату і нахилена під кутом 10° до горизонталі, що відповідає усередненому гравістимулу

$1,7 \text{ м/с}^2$. У кліностаці складова вектора гравітації, паралельна осі обертання, не нівелюється. Дві інші складові вектора гравітації відносно системи відліку, пов'язаною зі спорою – перпендикулярна та паралельна до поверхні субстрату – за період півоберту стають протилежно напрямленими. Тому їх усереднене по часу значення рівне нулеві.

Результати досліджень

У темряві, перед початком формування проростків спори *F. hygrometrica* Hedw., залишаючись сферично симетричними, помітно збільшувалися в діаметрі (приблизно 40 мкм , рис. 1) порівняно з тільки-що висіяними спорами ($\sim 12 \text{ мкм}$). Через $1-2$ доби після висіву спори утворювали ризоїд діаметром близько $10-12 \text{ мкм}$ (рис. 2). Після початку формування ризоїда діаметр спори помітно не зростає. Ще через добу частина сферичної поверхні спор, починала випинатись, утворюючи наступний циліндричний проросток (хлоронему) (рис. 3). Діаметр хлоронем становив близько 22 мкм . У вертикально орієнтованих чашках Петрі ризоїди формувалися напрямленими переважно донизу. Наступний проросток – хлоронема – орієнтувалася, як правило, догори.



Рис. 1. Спора моху *F. hygrometrica* перед проростанням: видно седиментацію пластид. Стрілочками вказано напрямок дії сили тяжіння. Збільшення $\sim 250\times$.

Зменшення гравістимулу від $9,8 \text{ м/с}^2$ до $1,7 \text{ м/с}^2$ внаслідок нахилання чашок зі спорами, призводило до достовірного зменшення гравістимульованості спор *F. hygrometrica* як на стадії

формування ризоїдів, так і на стадії формування хлоронем.

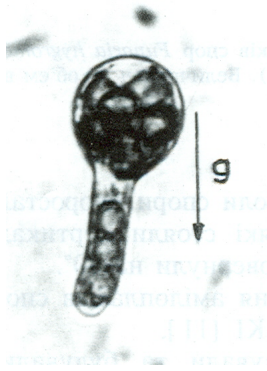


Рис. 2. Спора *F. hygrometrica* із щойно сформованим ризоїдальним проростком, напрямленим донизу. Стрілочками вказано напрямок дії сили тяжіння. Збільшення ~ 250×.

За однакового гравістимулу, рівного $1,7 \text{ м/с}^2$ гравістимульованість спор була достовірно меншою у нахиленому кліно-статі порівняно із спорами у стабільно нахилених чашках (табл. 1). Діапазон значень величини Z за двох варіантів гравістимулу $1,7 \text{ м/с}^2$ перекривався з діа-

пазоном значень цієї величини у вертикально орієнтованих чашках для спор як на стадії утворення хлоронемі так і на стадії утворення ризоїда. Це підтверджує нашу гіпотезу про те, що теплові флуктуації мають вплив на виникнення осей росту у спорах *F. hygrometrica*.

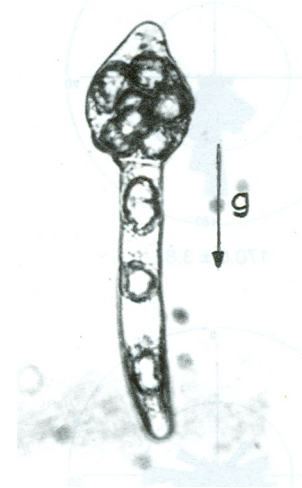


Рис. 3. Наступна стадія проростання спори *F. hygrometrica*: утворення випуклості, з якої розвинеться хлоронемний проросток. Стрілочками вказано напрямок дії сили тяжіння. Збільшення ~ 250×.

Таблиця 1.

Вплив гравістимулу характеристики розподілу напрямів росту проростків спор *F. hygrometrica*

$g, \text{ м/с}^2$	Положення чашок	Стадія формування ризоїда			Стадія формування хлоронемі		
		K	$Z_{min}, \text{ с}^2/\text{м}$	$Z_{max}, \text{ с}^2/\text{м}$	K	$Z_{min}, \text{ с}^2/\text{м}$	$Z_{max}, \text{ с}^2/\text{м}$
9,8	стабільне	$2,9 \pm 0,4$	$0,30 \pm 0,04$	$0,40 \pm 0,04$	$4,6 \pm 0,1$	$0,47 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,01$
1,7	стабільне	$0,8 \pm 0,2$	$0,47 \pm 0,12$	$2,23 \pm 0,12$	$1,5 \pm 0,3$	$0,88 \pm 0,17$	$1,18 \pm 0,17$
	кліно-стат	$0,2 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,01$	$1,88 \pm 0,01$	$0,2 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,01$	$1,88 \pm 0,01$

Висновки

1. Зменшення гравістимулу від $9,8 \text{ м/с}^2$ до $1,7 \text{ м/с}^2$ призводило до достовірного зменшення гравістимульованості спор *F. hygrometrica*, як у стабільному положенні, так і в кліно-статі.

2. За двох варіантів гравістимулу $1,7 \text{ м/с}^2$ діапазони значень величини Z перекривалися з діапазонами значень цієї величини у вертикально орієнтованих чашках для спор як на стадії утворення хлоронемі так і на стадії утворення ризоїда.

Література

1. О.Т.Демків, К.М.Сытник, Морфогенез архегоніат (Наук. думка, Київ, 1985).
2. С.С.Медведев, Физиологические основы полярности растений (Кольна, Санкт-Петербург, 1996).
3. А.И. Меркис, Сила тяжести в процессах роста растений (Наука, Москва, 1990).
4. О.І.Пундяк, Тематичний збірник "Наукові основи збереження біотичної різноманітності", 3, 156 (2004).
5. О.І.Пундяк, Вісник Ужгородського Університету. Серія фізика, 10, 225 (2001).
6. О.І.Пундяк, О.Т.Демків, Я.Д.Хоркавців, Б.Б.Багрій, Космічна наука і технологія, 8, 96 (2001).
7. Э.Синнот, Морфогенез растений (Изд. ин. лит., Москва, 1963).
8. F.W. Bentrup, *Planta*, 94, 319 (1970).
9. M.Palmieri, J.Z.Kiss, *Journal of Experimental Botany*, 56, 2539 (2005).

GRAVI-DEPENDENT POLARIZATION OF SPORES OF MOSS *FUNARIA HYGROMETRICA* HEDW.

O.I Pund'ak

Institute of Ecology of Karpathians, Ukr. Nat. Acad. Sci.,
Stephanyka St. 11, L'viv, 79000
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua

Gravi-dependent polarization of *Funaria hygrometrica* Hedw. moss spores has been investigated. The dependence of the spores gravisensitivity on the quantity of gravistimulus has been elucidated by means of regulation of orientation of dishes with the spores or by means of clinorotation. The obtained data are in accordance with the hypothesis that the thermal fluctuations considerably influence the spores polarization.