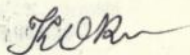


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ ім. ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

КАРДАШ
Олександра Романівна



УДК 582.34:581.143

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА
ОРГАНІЗАЦІЯ РОСТУ І МОРФОГЕНЕЗУ
ГАМЕТОФІТУ МОХІВ**

03.00.12 — фізіологія рослин

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

AB 30.972

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі екоморфогенезу рослин
Інституту екології Карпат НАН України /м.Львів/

Науковий керівник: доктор біологічних наук
ДЕМКІВ Орест Теодорович

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
ТЕРЕК Ольга Іштванівна

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
НЕДУХА Олена Макарівна

Провідна організація: Інститут фізіології рослин
і генетики НАН України

Захист дисертації відбудеться "9" листопада 1994 року
о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради
Д 01.01.07 для захисту дисертацій на біологічному
факультеті Київського університету ім. Тараса Шевченка
за адресою: м. Київ-127, проспект Глушкова, 2.

Повтова адреса: 252601, м.Київ 17, вул.Володимирська, 64.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці університету.

Автореферат розіслано "6" жовтня 1994 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради,
кандидат біологічних наук, професор

О.В.Брайон

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00801430 (G)

Актуальність проблеми. Пізнання механізмів регуляції росту і морфогенезу є однією з найважливіших проблем фізіології розвитку рослин. Протонеми мохів як однієї з найпростіших структур, виявилася перспективним об'єктом, на якому легко можна експериментувати як в окремих клітинках меристематичного типу, так і її похідних, які знаходяться на різних ступенях клітинної диференціації (Демків, Ситник, 1985). Нитчаста форма створила умови для виявлення "в чистому вигляді" основних морфогенетичних проявів, таких як полярність, симетрія, регенерація, диференціація та інших.

Першим кроком розвитку як рослинного (Bentrup, 1984), так і тваринного організму (Белоусов, 1987) є поляризація спочатку аплярних яйцеклітин чи спор і формування на їх основі внутрішньоклітинних градієнтів. Біоелектричне поляризація вертєвкових клітин протонеми відображається на полярному проникненні іонізованих лімфесцентних барників (Демків, Ситник, 1985), а також на наявності біоелектричного поля (Bentrup, 1984). В останні роки сформувалася думка про те, що необхідною ланкою в реалізації енд- і екзогенних стимулів морфогенезу, поряд з Ca^{2+} , є внутрішньоклітинний pH (Busa, Nuccitelli, 1984; Erpel, 1990). Однак залишається відкритим питання, яким чином полярні властивості клітини можуть впливати на вираженість фізіологічних градієнтів, ріст та формування клітинної стінки в процесі розвитку рослинного організму.

Мета і завдання роботи. Мета роботи полягала у вивченні механізмів поляризації клітин, характеру її проявів у процесі росту і диференціації клітин, впливу поляризації на становлення внутрішніх міжклітинних концентраційних і метаболічних градієнтів, зв'язку функціональної із часовою та структурною організацією клітин та впливу екс- і ендогенних факторів на їх вираженість.

У процесі виконання роботи визначились 5 основних напрямків, метою яких було вивчити:

- 1) характер і особливості біоелектричної поляризації функціонально-активних клітин;
- 2) вплив екзогенних фітогормонів на мембранний транспорт іонізованих лімфесцентних барників;
- 3) роль іонів Ca^{2+} і pH_i в процесах полярного росту і диференціації клітин протонеми мохів;

4) часову організацію галушення інтеркалярних клітин і формування бруньок гаметофорів;

5) структурну організацію мікрофібрил целюлози, ядер і хлоропластів, а також їх зміни в процесі диференціації клітин і формування багатоклітинної рослини.

Наукова новизна роботи. У процесі виконання роботи одержано нові, раніше невідомі результати:

1. Встановлено наявність апікально-базального градієнту Ca^{2+} в апікальних клітинах і його відсутність в інтеркалярних. Показано вплив червоного світла на деструкцію наявних і встановлення нових внутрішньоклітинних градієнтів Ca^{2+} .

2. Оцінено рН цитозолу в клітинах протонемі і його зміни в процесі росту, поділу і диференціації клітин.

3. Цитофотометрично проаналізовано характер спорядкування мікрофібрил целюлози в клітинах протонемі, встановлено його зміни на довжину клітини і в процесі диференціації каулонемі.

4. Встановлено ритмічний характер поділу апікальних клітин, галушення інтеркалярних клітин і закладки бруньок гаметофорів.

5. Встановлено участь ризоїдів у гормональній регуляції закладки бруньок гаметофорів.

Практичне значення роботи. Проведені дослідження входили до комплексних планових тем Львівського відділення Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного АН України, які координуються Науковим радом АН України в проблемі 2.33.1. "Біологічні основи раціонального використання, перетворення та охорони рослинного світу" (N держ. реєстрації 0193 и 018316). Результати досліджень дозволяють обґрунтувати необхідність вивчення механізмів реалізації морфогенезу на клітинному та молекулярному рівні. Одержані результати будуть використані для написання монографії "Морфогенез споронних рослин", а також статей з питань морфогенезу і фізіології рослин. Матеріали дисертації будуть використані в лекціях з курсу "Фізіологія рослин" та в спецкурсах "Фізіологія росту і розвитку рослин" в університетах і підінститутах. Розроблені аналітичні і експериментальні підходи застосовуються в науково-дослідних лабораторіях, а також під час виконання студентами курсових і дипломних робіт.

На вахист виносяться:

1. Основні результати дослідження біоелектричної поляризації верхіноквих клітин протонеми фунарії вологомірної і вплив на її прояв фітогормонів та інших речовин.

2. Наслідки дослідження вмісту внутрішньоклітинних рН і Ca^{2+} та їх зміни в процесі росту, поділу і диференціації клітин, а також вплив на них світла і фітогормонів.

3. Результати дослідження часової організації росту і поділу апікальних, галузіння інтеркалярних клітин та закладки бруньок гаметофорів.

4. Результати аналізів структурної організації мікрофібрил целюлози, ядер і хлоропластів у клітинах протонеми.

5. Дослідження гормональної регуляції закладки бруньок гаметофорів і участь ризоїдів у гормональній регуляції морфогенезу.

Апробація роботи. Основні положення і результати роботи доповідалися на засіданнях відділу екоморфогенезу рослини Інституту екології Карпат АН України (1980-1993 рр.), Львівському відділенні УБТ в 1990 р.; на I (Москва, 1991) Всесоюзній конференції з регуляторів росту і розвитку рослин; на I (Київ, 1981), II (Чернігів, 1983), III (Паламба, 1986) і IV (Ужгород, 1989) Всесоюзних нарадах з клітинного циклу рослин; на VII (Донецьк, 1982), VIII (Івано-Франківськ, 1987) і IX (Дніпропетровськ, 1992) в'їздах УБТ та на VIII в'їзді ВЕТ (Алма-Ата, 1988); на VI Всесоюзному симпозіумі "Ультраструктура рослин" (Чернігів, 1988); на VIII конференції зі спорів рослин Середньої Азії та Казахстану (Ташкент, 1989); IV конференції "Електронна мікроскопія і сучасна технологія" (Кишинів, 1990); на I Всесоюзній науковій конференції "Рослини і промислове сарадовиде" (Дніпропетровськ, 1990); на VII в'їзді біологів Центральної і Східної Європи (Кіровоград, 1990); на III молодіжній конференції ботаніків Ленінграду (Святий-Петербург, 1990); на конференції молодих ботаніків м. Львова (Львів, 1990); на конференції, присвяченій 90-річчю від дня народження А.С.Лавренко (Львів, 1991).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковані в 15 статтях і II тезах доповідей.

Структура і об'єм роботи. Дисертаційна робота складається на 175 сторінках машинописного тексту, складається з вступу, 4

розділів, висновків і списку літератури, ілюстрована 17 таблицями і 26 рисунками.

Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У розділі викладені дані про морфогенез гаметофіту у процесі індивідуального розвитку мохів: поляризація, характер росту епікальній і галушення інтеркалярних клітин, цитодиференціація і формування бруньок гаметофорів, про гормональну і фоторегуляцію переходу нитчастого росту у тривимірний та участь внутрішньоклітинних Ca^{2+} і pH_1 , дихроїчних фоторецепторів і впорядкування мікрофібрил целюлози у реалізації гормонально залежного морфогенезу мохів.

Розділ 2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом досліджень була 28-хромосомна раса моху *Funaria hygrometrica* Hedw., а також *Tetraphis pellucida* Hedw.

Вирощували протонему в чашках Петрі в контрольованих умках освітлення (2000-2200 лк), температури (20-22°C) і зволоження (90-96 %), на середовищі Кноп II з мікроелементами (Kofler, 1959)

Темп мітовів визначали діленням приросту кількості клітин на час, за який вони утворилися. Швидкість росту визначали як частку від ділення приросту довжини столонів на час росту. Коефіцієнт галушення (%) визначали як частку від ділення кількості бічних галушок на загальну кількість клітин у столоні (Lagrent-Gournaud, 1969; Демидов и др., 1985).

Розчин фітогормонів вносили в чашки Петрі в концентраціях: ІОК - 0,1 - 1,0 мдМ; антиауксин - 0,6 - 60,0 мдМ, кінетин - 0,2 - 2,0 мдМ (Ворр, 1983).

Катіонний барвник АО використовували в концентрації $2 \cdot 10^{-6}$ г/мл, аніонний уранін - 10^{-4} г/мл на фосфатно-цитратному буфері рН 5,2 (Демидов, Смутник, 1986).

Для визначення впливу фітогормонів на поляриність мембранної проникливості ІОК і 2,4 Д використовували в концентрації від 0,5 до 500,0 мдМ, АБК - 0,4 - 200,0 мдМ, ПХІМК - 5,0 - 500,0 мдМ і 2,4 ДНВ - 5,0 - 500,0 мдМ, розчини яких готували на фосфатно-цитратному буфері рН 5,2 (Демидов и др., 1982).

Для аналізу дифлуоресценції клітинних оболонок, деревинки фарбували протягом 5 хв при кімнатній температурі 0,05%-ним роз-

чином Calcofluor white M2R New, виготовленому на фосфатному буфері рН 7,0. (Демків и др., 1982; Хорканцив и др., 1984).

Аналіз флуоресценції ядер проводили в фіксованих і флуорохромованих акридиновим оранжевим послідовних клітинах протонеми. Поляризованість хлоропластів визначали за рівнем природної дифлуоресценції хлорофілу (Демків и др., 1982).

Вміст мембранно-в'язаного кальцію в клітинах протонеми визначали за інтенсивністю флуоресценції комплексу кальцію з хлор-тетрацикліном (Ca^{2+} -ХТЦ) (Saunders, Herler, 1981).

Для вимірювання рН_i використовували флуоресцеїндиацетат (ФДА), який додавали в середовище до кінцевої концентрації 5 мкМ. (Thomas et al., 1979; Оглобина, Литинская, 1991).

Загальні білки фарбували 0,1% розчином яскраво голубого BS у фосфатному буфері (рН 5,6 - 6,0) при температурі 55 - 60°C протягом 4 год і фотометрували при довжині хвилі 605 нм (Кардаш та ін., 1984).

Цифровий матеріал обробляли статистичними методами. Для кожної вибірки (25-50 вимірів) визначали середнє арифметичне, стандартну похибку і коефіцієнт варіації. Для визначення суттєвості різниці між середніми арифметичними використовували критерій Ст'юдента (Плохинский, 1970).

Розділ 3. ОРГАНІЗАЦІЯ РОСТУ І МОРФОГЕНЕЗУ НА ПЕНІЛЬНИЙ СТАДІЇ РОЗВИТКУ ГАМЕТОФІТУ МОХІВ

Розвиток гаметофіта починається з проростання спор. Одним з перших проявів розвитку є поляризація клітини, що веде до встановлення морфологічних градієнтів, топологічних відмінностей і диференціації. Поляризація індукується під час проростання спор і легко модифікується світлом, гравітацією, фітогормонами і іншими факторами (Кардаш, 1987, 1991а; Демкові и др., 1988а).

У ростучих клітинах протонеми *P. hygrometrica* встановлено полярність мембранної проникливості. Екзогенні ІОК і 2,4 Д — притягують полярний транспорт іонізованих лямінесцентних барвників і їх ефект зростає з концентрацією фітогормонів (Солук, 1981; Кардаш, 1991а). АБК, як і антавуксин ПХІМК, у широкому діапазоні концентрацій також викликає деструкцію полярного транспорту і тим сильнішу, чим вищий вміст фітогормону в субстраті. Включення мембранного транспорту лямінесцентних барвників проявляється те-

нок і під впливом роз'єднувача окислювального фосфорилування і дихання - 2,4 динітрофенолу (2,4 ДНФ). Одержані результати, очевидно, можуть свідчити про те, що полярний транспорт у клітинних протонемі є активним енергозалежним процесом.

Ініціація полярності в процесі проростання спор легко виявляється методом цитофлуориметрії з використанням лімінесцентного вонду ХТЦ (хлортетрациклін) на мембранно-ав'язаний Ca^{2+} (Каримова, Терчовская, 1990). У процесі росту протонемі вхід Ca^{2+} локалізується в зоні росту апікальних клітин. За інтенсивності флуоресценції комплексу Ca^{2+} -ХТЦ в клітинних утворюється внутрішньоклітинний апікально-базальний градієнт.

Максимальна інтенсивність лімінесценції комплексу Ca^{2+} -ХТЦ і найвище крутизна градієнту були встановлені при оптимальних інтенсивностях освітлення (1800-2000 лк). Монохроматичне випромінювання модифікує не лише інтенсивність лімінесценції Ca^{2+} -ХТЦ, але і його розподіл у клітинних (рис. 1).

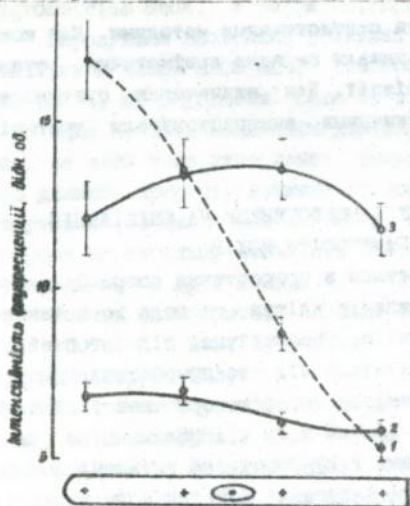


Рис. 1. Розподіл Ca^{2+} в апікальних клітинних протонемі на монохроматичному світлі:
1 - синє ($\lambda_{\text{max}}=436$ нм);
2 - зелене ($\lambda_{\text{max}}=551$ нм);
3 - червоне ($\lambda_{\text{max}}=653$ нм).

4-годинне опромінювання протонемних дериватів червоном світлом викликає росткування ростучих клітин протонемі (Демков и др., 1985а). Морфогенетична дія червоного світла здійснюється за два етапи. На першому етапі відбувається деградація біоелектричної полярності і входу іонів Ca^{2+} . На наступному на бічній стінці

клітини ініціюється росток, який пригнічує верхівковий ріст і активує вхід іонів Ca^{2+} через верхівку і його перерозподіл de novo.

У процесі росту протонеми примордії бокових галузок закладаються ритмічно у 3-4, 6-7, 9-10 інтеркалярних клітинах. Одночасно з ростом відбувається їх диференціація в квулонему, на якій закладаються бруньки гаметофорів. Закладка бруньок і формування гаметофорів завершує квенільну стадію розвитку моху. Ріст столонів протонеми дещо прискорений і диференційований: головні столони ростуть швидше, а бокові галузки повільніше. Різниця між ними поступово збільшується з віком протонеми. Ми встановили (Демків, Кардаш, 1992), що примордії бокових галузок, які закладаються на квулонемі, ростуть не тільки повільніше, але й припиняють ріст на 24-30 год. Зупинка і відновлення росту примордіїв чітко скорельовані з диференціацією бруньок гаметофорів.

Під впливом ІОК і антивукоїну (ПХІМК) швидкість росту апікальних клітин була максимальною в ІОК і мінімальною - в антивукоїном (Солук, 1981; Демківа и др., 1988в). Незважаючи на різну швидкість росту, тривалість мітотичного циклу суттєво не міналась і становила приблизно 8 год (рис. 2).

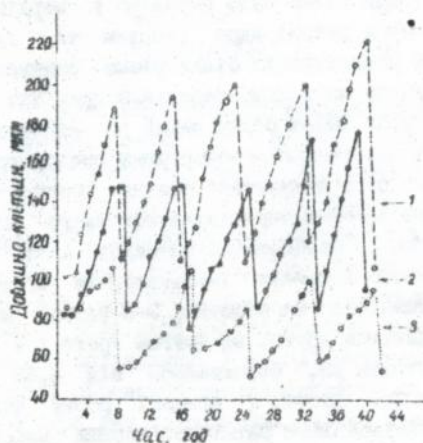


Рис. 2. Вплив фітогормонів на ріст і поділ апікальних клітин протонеми:
1 - ІОК (0,5 мкМ);
2 - контроль;
3 - ПХІМК (5,0 мкМ).

Кінетин у широких межах концентрацій несуттєво впливав на ріст інтактної протонеми і прискорював темп клітинних поділів в ізолюованих столонах, що приводило до збільшення частоти поділів

і зменшення довжини апікальних клітин. Сумісна дія кінетину і антаукозину, поруч з прискоренням темпу клітинних поділів, проявлялась у зникненні швидкості росту отолонів. ІОК опільно в кінетином неістотно впливають на швидкість росту і поділи клітин, а їх довжина суттєво не відрізнялася від контрольних.

Одержані результати свідчать про те, що екзогенна ІОК активує ріст апікальних клітин, інгібує їх страгуючу здатність і гальмує інтеркалярних клітин. Антаукозин у концентрації 6,0 мМ, навпаки, інгібує ріст апікальних і стимулює гальмує інтеркалярних клітин.

Кінетин, введений у період ініціації бруньок гаметофорів, значно стимулює їх закладання і одночасно гальмує диференціацію ризоїдів. Екзогенна ІОК стимулює утворення ризоїдів і бруньок гаметофорів, що підтверджує взаємозалежність цих двох процесів. На підставі одержаних результатів можна зробити висновок, що для утворення бруньок гаметофорів необхідний кінетин і синтез його, очевидно, відбувається в ризоїдах.

У клітинах протонеми біоелектрична поляризація тісно скорелювана з внутрішньоклітинним розподілом основних компонентів клітинного метаболізму: найбільше білка було виявлено у верхній апікальній клітині в максимумі в районі ядра (Кердан та ін., 1984). З віддаленням від ядра концентрація білка різко знижується, внаслідок чого встановлюється апікально-базальний градієнт. У субапікальних неростучих клітинах вміст білка падає до мінімального рівня зі слабо вираженим центрально-периферійним градієнтом. Гальмування інтеркалярних клітин супроводжується різким зростанням вмісту загальних білків і відновленням внутрішньоклітинного концентраційного градієнту. Слідом за метаболічно-активною клітиною йдуть одна-дві маловажкі, тобто депресія інтеркалярних клітин чергується з метаболічною активністю. На відстані 2-3 клітин від першої метаболічної хвилі рухається друга, за другою третя і т.д.

У клітинах протонеми значення pH_2 змінювалося від $6,83 \pm 0,02$ до $7,36 \pm 0,02$ (Демків та др., 1994). У процесі росту апікальній клітині значення pH_2 змінювалося ритмічно: перший максимум ві середнім приростом 1,3 - у фазі G_1 ; другий максимум із середнім значенням класу 1,7 приблизно співпадає із часом синтезу ДНК в апікальних клітинах (Клоор et al., 1969; Демків та др., 1983б). У коротких клітинах максимальне значення pH_2 встановлює

в середній зоні. Субапикальні клітини характеризуються в середньому на 0,3 - 0,4 нижчими значеннями pH_2 (табл. I). В диференційованих клітинах найнижчі значення pH_2 встановлені в апікальних і субапикальних клітинах ризоїдів. У хлоронемі й каулонемі значення pH_2 зросло в середньому на 0,1. Максимальне значення pH_2 встановили в клітинах бруньок гаметофорів, а також в їх ризоїдах.

Таблиця I.

pH цитозолу в диференційованих клітинах гаметофіту *F. hygrometrica*

Клітини	Кількість проаналізованих клітин	Середнє значення pH_2
Ризоїдів: апікальні	102	7,21 ± 0,02
субапикальні	102	6,83 ± 0,02
Хлоронемі: апікальні	421	7,26 ± 0,02
субапикальні	421	6,87 ± 0,02
Каулонемі: апікальні	143	7,26 ± 0,02
субапикальні	143	6,92 ± 0,02
Бруньки гаметофорів	69	7,36 ± 0,02
Ризоїдів гаметофорів:		
апікальні	181	7,29 ± 0,02
субапикальні	181	6,99 ± 0,02

Зміни внутрішньоклітинного pH тісно пов'язані з умовами освітлення, швидкості росту, диференціацією і морфогенезом клітин. Детальний аналіз флуоресценції стінок клітин проконями *Fragaria hygrometrica*, зафарбованих калькофлуором, виявив складну динамічну структуру впорядкування мікрофібрил целюлози (Хорканджян і др., 1985; Kardash, 1990; Кардаш, Демків, 1990). Максимальне значення дифлуоресценції було встановлено в інтеркалярних клітинах, а найбільша варіабільність впорядкування мікрофібрил целюлози - в апікальних. У куполі апікальних клітин мікрофібрили орієнтовані переважно перпендикулярно до осі їх росту. З віддаленням від верхівки хлоронемних клітин відбувається поступова просторова переорієнтація мікрофібрил целюлози, про що свідчать рівень і напрямок дифлуоресценції калькофлуору білого (табл. 2).

У проксимальній ділянці апікальної клітини мікрофібрили целюлози найбільш впорядковані й орієнтовані вдовж осі росту клітини. Таким чином, в апікальних клітинах хлоронемі можна виділити три зони впорядкування: у куполі - перпендикулярну до осі росту,

у дистальній ділянці - поздовжня, в медіальній - зону переходу від поперечного до поздовжнього розміщення мікрофібрил (Кардаш, 1991б; Демків та ін., 1992б).

Таблиця 2.

Впорядкування мікрофібрил целлюлози верхіноквих клітин протонеми *Puparia hygrometrica* Hedw.

Місце в клітині	Хлоронема		Каулонема	
	жива	фіксована	жива	фіксована
Купол клітини	-0,05±0,01	-0,02±0,01	-0,05±0,02	0,01±0,01
Стінка купола	0,41±0,01	0,30±0,01	0,23±0,02	0,19±0,01
Вічна стінка	0,49±0,01	0,32±0,02	0,41±0,02	0,24±0,03
Стінка основи	0,46±0,01	0,30±0,02	0,48±0,02	0,28±0,03
Субапикальна клітина	0,49±0,01	0,35±0,02	0,48±0,02	0,25±0,03
Переділка між клітинами	-0,08±0,01	-0,08±0,01	-0,05±0,02	-0,06±0,02

Особливістю каулономних клітин є поява впорядкованості мікрофібрил целлюлози під кутом 45-60° до осі росту клітини. Наявність орієнтованих і слабо впорядкованих ділянок, мабуть, збільшує гнучкість системи і полегшує зміну моделі з імовірної арочної на спіральну і навпаки.

Флуоресценція хлоропластів також частково поляризована. Аналіз флуоресценції ядер, зафарбованих акридиновим оранжевим (АО) виявив, що поздовжня складова переважає поперечну у всіх досліджуваних клітинах.

Отже встановлюємо, що в клітинах протонеми моку поляриність проявляється вже на рівні органел - ядра (зафарбовані АО) і хлоропласти проявляють дифлуоресценцію під впливом синього світла. Дифлуоресценція виявляється і в клітинних стінках, зафарбованих калькофлуором. Таке впорядкування може частково послабити змінок осмолярності субстрату. Вплив колекціону, який руйнує мікротрубочки, на рівень впорядкування мікрофібрил целлюлози не означається. Із віком протонеми спостерігається зміна кута нахилу мікрофібрил целлюлози, яка тісно пов'язана з диференціацією каулономи і формуванням бруньок гаметофорів.

Розділ 4. СТРУКТУРНО-ЧАСОВА ОРГАНІЗАЦІЯ МОРФОГЕНЕЗУ В ПРОЦЕСІ РОЗВИТКУ МОХОВИХ РОСЛИН

Розвиток складноорганізованої рослини з мелоклітинного за-
родку або з одноклітинної апілярної спори коча й не так строго
детермінований як у тварин (Велюсов, 1987; Лабас и др., 1987),
відбувається впорядковано, виключаючи ряд етапів, які легко роз-
різнити.

Першим візуальним проявом розвитку кочової рослини є поляри-
зація спори, яка проявляється в локалізації ростової активності
і встановленні внутрішньоклітинних концентрацій і метаболічних
градієнтів, у тому числі локалізації входу іонів Ca^{2+} (Демків и
др., 1988 в; Schnepf, 1986). Біоелектрична поляризація ростучих
клітин протонними мохів підтверджується полярним тронисненням у
клітині іонізованих люмінесцентних барвників (Демків, Федик,
1976; Солук, 1981). Катіонні барвники поглинаються зоною росту, а
аніонний - безальнов ділянок апікулярної клітини і воім прото-
півстом інтеркалярних. У протонемі мохів було встановлено, що з
входом у клітину іонів Ca^{2+} запускається с креторня активність
клітин, відбувається ак,петальне переміщення пухирців Гольджі
для синтезу клітинної стінки та встановлюються внутрішньоклітинні
градієнти загальних білків (Кардаш, ІвсЗ; Кардаш та ін., 1984;
Ventur, 1984). Про роль акропетального руху асимілятів не тільки
внутрішньо-, але й міжклітинного, можуть свідчити результати до-
сліджень росту ізольованих столонів (Демків и др., 1985а). Ціле-
спрямовані потоки речовин, які індукуються біоелектрично, полтри-
зацією апікулярних клітин, зумовлюють встановлення міжклітинних
концентраційних градієнтів (Кардаш та ін., 1984) Галуження ін-
теркалярних клітин, як і проростання спор, передусе біоелектрична
поляризація материнської клітини, локальний ріст бокової стінки,
активація внутрішньоклітинного метаболізму, перерозподіл органел
і встановлення внутрішньоклітинних концентраційних і метаболіч-
них градієнтів (Демків, Ситник, 1985). Зовнішні сигнали, такі як
світло чи фітогормони, індукуючи вхід іонів Ca^{2+} , сприяють зрос-
тання його концентрації в цитоплазмі. Вільний Ca^{2+} легко зв'язу-
ється з різними регуляторними білками.

Біоелектрична поляризація і наявність внутрішньоклітинних
градієнтів зумовлюють створення стремучого центру в ростовій зо-
ні клітин, який, у свою чергу, формує цілеспрямований потік ре-

човин із сусідніх клітин. На підставі цих результатів можна зробити висновок про те, що вестача фотосинтетатів у ростовій зоні апікальної клітини є вирішальним фактором для інтеграції соматичних клітин в цілісну систему. На основі одержаних результатів можна пояснити інтеграцію як процес, який настає внаслідок появи лімітуючих факторів.

Лоряд в біоелектричною поляризацією апікальних клітин, має місце анізотропія клітинної стінки і, як наслідок, під час фарбування її люмінесцентними дихроїчними барвниками була виявлена дифлуоресценція (Herth, Schnepf, 1980; Демків и др., 1982). Зміна дифлуоресценції в межах апікальної клітини протонами, мабуть, відображає топологічні перебудови зв'язків зовнішньої клітинної стінки і мембрани, які контролюються цитоскелетом. У зв'язку з цим актуальними залишаються питання не тільки про те, що спричиняє анізотропію целюлози клітинних стінок, але й те, як вони формуються і модифікуються в процесі росту і диференціації клітин. В апікальних клітинах протонами мохів має місце взаємна впорядкованість мікрофібрил целюлози, фоторецепторів, хлоропластів і ядер (Демків и др., 1982).

Як у хлоронемних, так і каулонемних апікальних клітинах мохів чітко простежуються три зони впорядкування мікрофібрил целюлози: верхівкова - з поперечною до осі росту клітин, базальна - з поєдовжньою і перехідна між ними. Зміна моделі впорядкування відбувається тільки під час переорієнтації біоелектричної поляризації клітин (Демків и др., 1985 в, 1988 б). Тому можна думати, що саме остання є вирішальною в організації цитоскелету ростучих клітин протонами. Дослідження цитоплазматичних мікротрубочок імунолюмінесцентним методом і мікрофібрил целюлози електронномікроскопічним виявили аналогічне впорядкування цих структур у верхівкових клітинах протонами півпороти *Adiantum copillus-veneris* L. (Murata, Wada, 1989) і в протоні моху *Funaria hygrometrica* (Wacker, Schnepf, 1990), що підтверджує раніше одержані нами результати (Хорганців та ін., 1984).

Експериментально було встановлено, що характер і рівень дифлуоресценції залежить від осмоларності субстрату, що може свідчити про причетність механічних напружень до впорядкування мікрофібрил рослинних клітин (Мартинов, 1979). У процесі диференціації каулонемні відбувається просторове переорієнтація мікрофібрил це-

ляюся з лінійної на спіральну. У результаті аналізу просторової організації мікрофібрил целюлози, був встановлений ще один вид дивамічної зональності апікальних клітин протонеми, тісно скорельований з біоелектричною поляризацією і апікально-базальними градієнтами. Дабільше слабо впорядкована ростуча зона апікальних клітин полегшує сприйняття і адекватну реакцію клітин на дію екзогенних факторів.

Виходячи з логіки системного підходу, надійніть роботи саморегульованої системи не може здійснюватися без блоку корекції. Роль такого блоку, на нашу думку, може виконувати базальна впорядкована зона апікальної клітини, яка нормалізує будь-які відхилення росту апекса після припинення дії асиметричного фактора.

Поряд з функціонально-структурною, важливого значення надають часовій організації біосистем. А.У.Ігамбердієв (Ігамбердієв, 1985, 1992) розглядає часову організацію біосистем з позицій двох фундаментальних підстав: редукції потенціальних можливостей системи, яка носить неворотної характер і зумовлена квантовою природою біологічних молекулярних процесів, і також наявності ендогенних ритмів, які виконують роль таймера біологічних систем.

Поляризація-деполяризація плазматичної мембрани здійснюється з періодом 3,5-4,0 години. Із зміною швидкості росту і розвитку протонеми відповідно міняється амплітуда, однак ритм коливань залишається стабільним. Ритмічно змінюється крива рН цитозоля. У більшості випадків до клітинного циклу відноситься близько двох циклів рН. Зміна внутрішньоклітинного рН, таким чином, розділяє період клітинного циклу на два, тобто відбувається подвоєння, подібно до гомонічної ієрархії хвилі (Иван, Пречов, 1991; Goodwin, 1987).

Період клітинного циклу, як за нашими, так і за даними інших авторів (Демків та др., 1985 а, 1983; Ворр, Bhatia, 1986), є найбільш стабільним ростовим процесом, однак, незважаючи на це, він також є "нагромаджувачем" внутрішньоклітинних метаболічних циклів. У ростучій протонемі, поряд з періодичними поділами апікальної клітини, були встановлені періодичні зміни вмісту цитоплазматичної РНК, загального білка, функціональної активності ядер і ядерця, активності ферментів (Кардан та ін., 1984), а також зміни метаболічної активності в інтеркалярних клітинах, які тісно скорельовані з морфогенетичним - галузінням (Демків та ін., 1992

в). Одержані результати дають підставу вважати, що найбільш імовірним кандидатом на роль таймера галушення інтеркалярних клітин може бути кількість раундів реплікації ДНК, що відбувається з кількістю клітинних циклів. Боковому галушенню клітин передують та супроводжують їх локалізація входу іонів Ca^{2+} , зростання величини pH_2 і активація внутрішньоклітинного метаболізму. Незважаючи на спряженість метаболічних і морфогенетичних процесів, між ними не існує жорсткої каузальності. Експериментально з допомогою поляризованого білого світла можна легко роз'єднати біохімічні та метаболічні процеси від морфогенетичних, однак ритми автоколивних процесів не міняються.

Детальний аналіз формотворчих процесів гаметофіту свідчать про те, що саме цикли (біохімічні, метаболічні, електрохімічні) є організаторами генерації морфологічних структур. Навіть незначні зміни параметрів циклу ведуть до суттєвої перебудови органогенезу. Так, сповільнення ініціації росту бокових галузок може бути причиною зміщення фази між циклом поділу апікальних клітин і метаболічним ритмом інтеркалярних. Прогресуюча розсинхронізація не тільки інгібує ріст бокових галузок, але й "розтягує" клітинний цикл бокової галузки на два, що може бути причиною складного формотворчого процесу, яким є закладка бруньок гаметофорів. При цьому клітини (на довзі 67-80 мкм), які знаходяться в стані "розтягнутого циклу" стають менш отійсими і можуть легше реалізувати свої компетенції до утворення бруньок. Кінетин, накопичуючись у компетентних клітинах, векторизує морфогенетичний процес і з декількох альтернативних вибирає єдиний - формування бруньок гаметофорів, притягуючи, наприклад, диференціацію ризоїдів. Про підвищення чутливості клітин може свідчити і той факт, що надоптимальні концентрації кінетину саме на цій стадії розвитку протонем ведуть до невпорядкованого росту - калусогенезу.

Таким чином, морфогенез гаметофіту мохів є результатом просторово-часової організації потоків іонів та речовин, клітинної взаємодії і внутрішньоклітинного синтезу. Екзогенні фактори навіть вибірково дії, стимулюючи один процес, притягують інший. Так, екзогенний кінетин, стимулюючи закладання бруньок гаметофорів, водночас інгібує диференціацію ризоїдів. Одержані результати можуть свідчити про те, що ризоїдгенез є адаптивним процесом-відповіддю на відсутність цитокінінів. У своєму

чергу ризоїди, що утворилися, є джерелом синтезу цих речовин.

Розглянувши особливості структурно-функціональної організації в процесі росту і розвитку клітин, зробимо загальні висновки відносно формотворчих процесів. У здійсненні морфогенезу важливу ініціуючу роль відіграють структури, в яких можуть виникати неоднорідності, які започатковують процес самоорганізації (Кернар, Осипов, 1990). Такою структурою є плазматична мембрана, яка, починаючи з ініціації проростання спор і протягом усього періоду росту протонемами, здійснює перерозподіл і депонування зарядів у ростовій зоні, що переводить ритмічні біохімічні зміни на макроскопічний часовий рівень. Біоелектрична поляризація, у свою чергу, започатковує транспорт іонів і метаболітів. Випливає самоелектрофорез всередині клітини, який забезпечує розподіл молекул, у тому числі білків (Кернар та ін., 1984). Тобто, слідом за поляризацією зарядів здійснюється концентраційна і метаболічна поляризація клітин, що є передумовою морфогенетичних процесів (Jaffe, Nicotelli, 1977). Ритмічні зміни мембранної проникливості лабільно вписуються в клітинний цикл, який, у свою чергу, є таймером клітинного гадження і акладки бруньок гаметофорів. З цього випливає, що ритми і морфогенез протонемами тісно пов'язані між собою і ми маємо фундаментальну залежність між "кадрами і годинником" у біології. У зв'язку з цим розгадку морфогенетичних процесів, як вважає В.Гудвін (1979), необхідно шукати у внутрішньоклітинній організації метаболізму. Ритми метаболічного циклу і метаболічної морфогенетичної активності інтеркалярних клітин свідчать про їх хвилеву природу, в результаті взаємодії яких відбувається інтерференція - гасіння сигналів в одних точках морфогенетичного поля і посилення їх в інших. Для такого процесу як позиція бруньок гаметофорів у протонемній ланці, варіаційне значення має розсинхронізація швидкості клітинних поділів, тобто циклів реплікації. З процесом розсинхронізації клітинних поділів зв'язують також морфогенез у процесі розвитку бластули тварин (Игамбердієв, 1992).

ВИСНОВКИ

1. Ріст протонемами мохів здійснюється верхівкою апікальної клітини, тісно скомп'юсований з біоелектричною поляризацією мембранного транспорту лімінованих бар'єрів і встановленням внутрішньоклітинних градієнтів, розподілом Ca^{2+} та величин рН цито-

волю.

2. Біоелектрична поляризація апікальних клітин ініціюється як локальна зміна мембранної проникливості під час проростання спор і зберігається у функціонально-активних клітинах у вигляді апікально-базальних градієнтів росту і метаболізму протягом усього періоду формування протонемної деринки.

3 В інтактних клітинах протонемі встановлено наявність внутрішньо- і міжклітинних градієнтів Ca^{2+} , загального білка; показано тісний зв'язок між виникненням метаболічних градієнтів і ростом та диференціацією клітин.

4. Швидкість росту столонів є енд- та екзогенно залежним процесом і легко модифікується зовнішніми факторами. Темп клітинних поділів - видоспецифічний найстабільніший параметр t , має роль внутрішньоклітинного таймера, який контролює ритм метаболізму, гадуження інтеркалярних клітин і закладання бруньок гаметофорів.

5. Гадуження інтеркалярних клітин протонемі *Fragaria lugotetica* відбувається ритмічно, через 2-3 поділи апікальної клітинки. Закладання бруньок гаметофорів також тісно скорельоване з ритмом клітинних поділів і адієснюється в 6-7 інтеркалярних клітинах, тобто в тих, які перебувають у другому максимумі метаболічної хвилі.

6. Ріст та розвиток гаметофіту мохів тісно скорельований із змінами внутрішньоклітинного рН. Встановлено що величина рН цитозолю змінюється протягом клітинного циклу в процесі диференціації клітин протонемі і формування бруньок гаметофорів.

7. Закладання бруньок гаметофорів є гормонально залежним процесом, ендогенна регуляція якого адієснюється за участі ІОК і цитокінінів. Встановлено роль ризогідів каулонемі як можливої продуцента цитокінінів - безпосереднього індуктора складного формотворчого процесу, яким є формування бруньок гаметофорів на протонемі мохів.

8. Цитофлуориметричним аналізом встановлено, що мікрофібрили целюлози хлоронемі мохів орієнтуються вздовж клітинних оболонок, хоча ступінь їх впорядкування змінюється: найвищий на поєдужаніх стінках інтеркалярних клітин та в основі апікальних, а найнижчий у ростовій зоні апікальних клітин. Диференціація каулонемі пов'язана із зміною кута нахилу мікрофібрил целюлози. В

клетинах протонеми аналогічно орієнтуються ядра і хлоропласти, що може свідчити про зв'язок орієнтації клітинних поділів із структурною організацією клітин.

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ ДИСЕРТАЦІЇ ОПУБЛІКОВАНІ В ТАКИХ ПРАЦЯХ:

1. Демків О.Т., Кардаш А.Р., Хоркавців Ч.Д. Полярність растительных клеток, ее становление и переориентация. // Рост и устойчивость растений. - Новосибирск: Наука, 1988 г. - С. 29-45.

2. Демків О.Т., Кардаш О.Р., Хоркавців Я.Д. Морфогенез протонеми *Funaria hygrometrica* Hedw. // Укр. ботан. журн. - 1992 г. - 49, Т 4. - С. 70-75.

3. Демків О.Т., Кардаш А.Р., Хоркавців Я.Д. Организация клеточных делений на кветильной стадии развития мха. // Физиология и биохимия культурных растений. - 1993. - 25, Т 3. - С. 277-284

4. Демків О.Т., Хоркавців Я.Д., Кардаш А.Р. Особенности действия фитогормонов на рост и межклеточные взаимодействия в протонеме *Funaria hygrometrica* Hedw. // Физиол. растений. - 1985 г. - 32, Т 4. - С. 636-642.

5. Демків О.Т., Хоркавців Я.Д., Кардаш А.Р. Гормональная регуляция роста и деления клеток гаметофита мхов. // Регуляция клеточного цикла растений: Сб. науч. трудов - Киев: Наук. думка, 1986 г. - С. 60-70.

6. Демків О.Т., Хоркавців Я.Д., Кардаш А.Р. Изучение роста и делений изолированных клеточных систем листовых мхов. // Клеточный цикл растений в онтогенезе: Сб. науч. трудов. - Киев: Наук. думка, 1988 г. - С. 66-75.

7. Демків О.Т., Хоркавців Я.Д., Кардаш А.Р. Экспериментальные исследования морфогенеза листовых мхов. // Проблемы бриологии в СССР. - Л.: Наука, 1970. - С. 87-98.

8. Демків О.Т., Хоркавців Я.Д., Кардаш А.Р. Полярность и клеточная дифференцировка в процессе развития архегонияльных растений. // Аналитические аспекты дифференцировки. / Д.А.Воронов, О.Т.Демків, А.А.Зотин и др. - М.: Наука, 1991. - С. 121-132.

9. Демків О.Т., Хоркавців Я.Д., Кардаш О.Р. Организация микрофибрил целлюлозы у протонеме мхов. // Укр. ботан. журн. - 1992 г. - 49, Т 3. - С. 51-55.

10. Демків О.Т., Хоркавців Я.Д., Кардаш А.Р. Динамика внутриклеточного pH в процессе роста и дифференциации клеток

ІНСТИТУТ ІМ. В. СТЕФАНИКА
АН УКРАЇНИ

гаметофита *Funaria hygrometrica*. // Физиология растений. - 1994. - 41, 1. - С. 97-100.

11. Кардаш А.Р. Рост и биоэлектрическая поляризация клеток протонеми мхов. // Бриология в СССР, ее достижения и перспективы. Конф., посвященная 90-летию со дня рождения А.С.Мазаренко (Львов, 10-12 сентября 1991 г.). - Львов, 1991 г. - С. 99-102.

12. Кардаш О.Р. Организация микрофибрил целлюлозы в клеточных стенках на ранних стадиях развития гаметофита мху *Funaria hygrometrica* Hedw. // Актуальные проблемы изучения флоры Западных регионов Украины: Матер. відкритої конф. молодих ботаніків м. Львова (Львів, 2-5 квітня 1990 р.) - Львів, 1991 б. - С. 51-56.

13. Кардаш О.Р., Кит Н.А., Демків О.Т. Значення ризоїдів для гормональної регуляції розвитку гаметофита мхів. // Укр. ботан. журн. - 1992 - 49, Т 5. - С. 99-103.

14. Кардаш О.Р., Хоркавиц Я.Д., Демків О.Т. Цитотометричне визначення білків із застосуванням процінових барвників. // Укр. ботан. журн. - 1984 - 41, Т 5. - С. 58-60.

15. Хоркавиц Я.Д., Кардаш О.Р., Демків О.Т. Застосування флуоресцентного барвника Calcofluor white M2R New для аналізу клітинних стінок протонеми мхів. // Укр. ботан. журн. - 1984. - 41, Т 3. - С. 81-84.

16. Kardash O.R. The arrangement of cellulose microfibrils in the process of the protonema development. // 7 meeting of the Central and East European Bryological Working Group: Abst. - Kirovsk, 1990. - P. 35.

АННОТАЦИЯ

Кардаш А.Р. Структурно-функциональная организация роста и морфогенеза гаметофита мхов.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.12 - физиология растений, Киевский университет, Киев, 1994.

Защищается 26 научных работ, которые содержат результаты экспериментальных исследований, а также рассмотрены вопросы метаболической, временной и пространственной организации формообразовательных процессов в индивидуальном развитии гаметофита мхов. Установлено, что рост и развитие гаметофита тесно сопряжены с биоэлектрической поляризацией мембранного транспорта, становлением

внутриклеточных градиентов белка, Ca^{2+} и pH цитозоля и реализуется с участием гормональной регуляции и структурных преобразований клеток.

BRIEF INFORMATION

Kardash O.R. Structural and functional organization of growth and morphogenesis of the moss gametophyte.

Thesis for competition of scientific degree of the candidate of biological sciences on speciality 03.00.12 - plant physiology. Kiev, 1994.

28 scientific articles are defended which contain results of experimental investigations of the metabolic, temporal and space organization of the morphogenesis of the moss gametophyte. It has been established that the growth and development of the moss gametophyte are tightly connected with the bioelectric polarization of the membrane permeability, formation of the intracellular gradients of the proteins, Ca^{2+} and pH cyt., being realized with the participation of hormone regulation and structure transformation of cells.

Ключові слова: гаметофіт мохів, протоплема, г'ст, розвиток.

Підписано до друку 06.10.94 Формат 60x84/16 Друк офсет. Папір
друк. № 1 Умов друк. арк. 1,16 Умов фарбо-відб. 1,4 Обл.-вид.
арк. 1,0 Тираж 100 прим. Зам. 3025.

Обласна книжкова друкарня 290000, м. Львів, вул. Стефаніке, 11

459375

AB 30.972

AB 30.972