

WPŁYW WARUNKÓW ANAEROBOWYCH NA METABOLIZM ODDYCHANIA GAMETOFORÓW MCHÓW

Andrzej Rzepka, Jan Krupa, Grzegorz Rut

Instytut Biologii, Akademia Pedagogiczna im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie

Wstęp

Zdecydowana większość roślin wyższych to organizmy aerobowe. Tlen jest niezbędny do oddychania i wielu procesów oksydacyjnych. Ograniczenie poziomu tlenu lub całkowity jego brak może prowadzić do wielu zmian w metabolizmie komórki. W warunkach naturalnych czasami możemy się spotkać z ograniczeniem w dostępie tlenu (hipoksja) lub całkowitym jego brakiem (anoksja) [DREW 1997]. Organizmy roślinne wykształciły pewne cechy, które powodują, że występuje u nich okresowa tolerancja na warunki anareobowe [SEDBROOK i in. 1996], które wiążą się z wieloma zmianami w metabolizmie komórki. Biochemiczne mechanizmy reakcji na ograniczony dostęp tlenu są powiązane głównie z procesami przemian węglowodanów podczas oddychania [GALINA i in. 1995]. Indukcja zmian w metabolizmie komórki wywołana niedoborem tlenu lub całkowitym jego brakiem związana jest z produkcją ATP i regeneracją zredukowanych ekwiwalentów [KATO-NOGUCHI 1999]. Konsekwencją braku tlenu, jako końcowego akceptora elektronów w mitochondrialnym oddychaniu, jest wzmożenie procesów fermentacyjnych. Końcowymi produktami tych procesów są etanol lub kwas mlekowy, które mogą stanowić zagrożenie dla normalnego funkcjonowania komórki [CHIANG i in. 2000].

Większość dotychczasowych badań nad wpływem deficytu tlenu na rośliny wiąże się ze zrozumiałych względów głównie z systemem korzeniowym roślin. System korzeniowy roślin lądowych jest narażony często na okresowy brak tlenu związany z zalaniem wodą. Użyte do doświadczeń gametofory *Polytrichum commune* L. w naturalnych warunkach podlegają, w całości razem z organami asymilacyjnymi, okresowemu zalaniu wodą pochodzącą z opadów atmosferycznych.

Celem podjętych badań było określenie reakcji tych egzystujących w specyficznych warunkach roślin na ograniczony dostęp tlenu spowodowany odcięciem dostępu powietrza przez wodę. Zastosowanie wody destylowanej zawierającej jony Ca^{+2} wiąże się z ich rolą jako transduktora sygnałów dla procesów transkrypcji i translacji. Pożywka MENON i LAL [1974] również zawiera w swoim składzie jony wapnia obok innych składników. Jej zastosowanie do doświadczeń wydaje się być również interesujące z punktu widzenia reakcji mchów na anoksje oraz hipoksję.

Materiał i metody

Gametofory *Polytrichum commune* L. zebrane z naturalnego siedliska zostały umieszczone w komorach klimatyzacyjnych o stałych warunkach temperatury ($15^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) i 12 godz. oświetleniu. Natężenie strumienia świetlnego (świetłówki „Flora Osram”) wynosiło $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Po 2 miesiącach adaptacji w tych warunkach odcinano 1,5 cm odcinki łodyżki i umieszczano je w otworach płytek wykonanych z pleksiglasu. Płytki z równomiernie rozmieszczonymi gametoforami umieszczano w naczyniach o objętości około 1 dcm^3 , a następnie zalewano: wodą destylowaną, pożywką Menon i Lal [MENON, LAL 1974] lub wodą destylowaną zawierającą $0,1 \text{ mmol CaCl}_2 \cdot \text{dm}^{-3}$ po czym umieszczano w komorach klimatyzacyjnych. Po różnym czasie od momentu zalania gametoforów dokonano pomiarów oddychania ciemniowego w powietrzu zawierającym 21% tlenu (R_{21}) lub w argonie (R_0).

Stężenie CO_2 wynoszące 300–400 lub 1300–1400 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ uzyskiwano poprzez dodanie odpowiedniej ilości tego gazu do układu zamkniętego. Objętość całego układu, składającego się z komory z płaszczem wodnym, systemu nawilżającego powietrze, wynosiła $0,644 \text{ dcm}^3$ i była połączona z analizatorem gazowym ADC-225-MK-3. Ilość wydzielonego dwutlenku węgla mierzono w temperaturze 25°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) i przeliczono na jednostkę suchej masy po zakończeniu całego doświadczenia. Wartości średnie i wartość standardowego odchylenia (SD) wyliczono z 3–5 powtórzeń. Do statystycznego opracowania danych wykorzystano program „Statistica”.

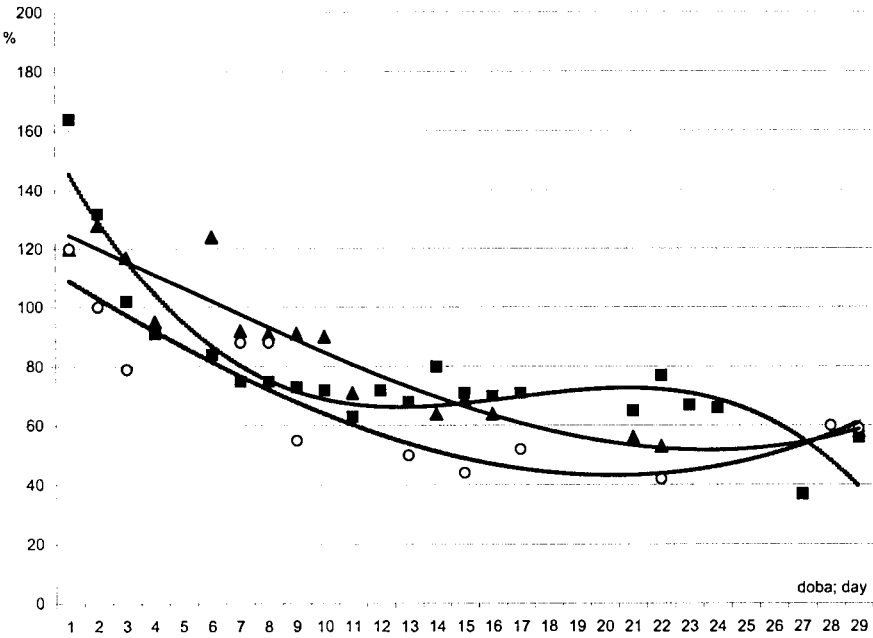
Wyniki i dyskusja

Natężenie oddychania ciemniowego (R_{21}) gametoforów *Polytrichum commune* hodowanych w komorach klimatyzacyjnych, mierzone w powietrzu zawierającym 21% tlenu i 300–400 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$, wynosi średnio $23 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{sm} \cdot \text{h}^{-1}$. Podwyższenie stężenia dwutlenku węgla do 1300–400 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ nieznacznie obniża ilość wydzielonego CO_2 . Zatopienie gametoforów w wodzie destylowanej początkowo (1–3 dzień) powoduje bardzo wyraźny wzrost intensywności badanego procesu (rys. 1).

Ilość wydzielonego dwutlenku węgla mierzona w atmosferze zawierającej 300–400 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ w pierwszym dniu hodowli jest wyższa od wartości przed zalaniem gametoforów wodą. Jednak po 3 dobach przetrzymywania łodyżek pod wodą wartość R_{21} obniża się do wartości początkowej przyjętej jako kontrolna. Przedłużenie czasu ekspozycji prowadzi do obniżenia ilości wydzielonego CO_2 . Umieszczenie gametoforów w pożywce powoduje początkowo mniejsze zmiany w ilości wydzielonego CO_2 . Po 3 dobach hodowli w tych warunkach wartość R_{21} przez następne 5 dni jest średnio o 10% niższa od intensywności oddychania przyjętej jako kontrolna i stopniowo obniża się do zakończenia eksperymentu. Jednak ostatecznie ilość wydzielonego CO_2 jest tylko o 36% niższa od wartości początkowej. Podobnie jak w przypadku zatopienia mchów w pożywce, stres wywołany zanurzeniem gametoforów w wodzie destylowanej z dodatkiem jonów wapnia jest większy niż spowodowany wodą destylowaną (rys. 1).

Już po 2 dobach, natężenie oddychania ciemniowego gametoforów spada do poziomu kontrolnego przed ekspozycją. Przez następne 5 dni utrzymuje się na

poziomie 80–90% pierwotnej wartości i ostatecznie po 29 dobach hodowli w tych warunkach jest o 41 % niższe.



Gametofory przed pomiarem były przykryte; Gametophores before measurements were covered with:
 ■ wodą destylowaną; distilled water
 ▲ pożywką; nutrient
 ○ wodą destylowaną z CaCl₂; distilled water with CaCl₂

Rys. 1. Natężenie oddychania ciemniowego gametoforów *Polytrichum commune* L. wyrażone w procentach wartości kontrolnej mierzone w atmosferze 21% tlenu (R₂₁) i stężeniu 300–400 μmol CO₂·mol⁻¹

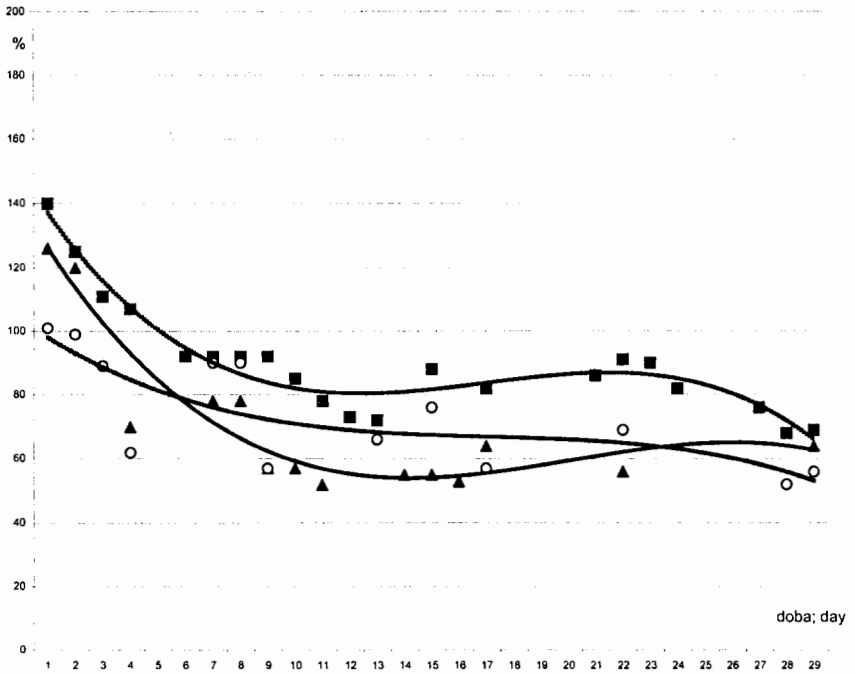
Fig. 1. Intensity of CO₂ evolution in gametophytes of *Polytrichum commune* L. expressed in % of initial value measured in 21% of oxygen (R₂₁) and 300–400 μmol CO₂·mol⁻¹

Umieszczenie gametoforów w wodzie destylowanej lub pożywce, a następnie pomiar ilości wydzielonego CO₂ w atmosferze pozbawionej tlenu (R₀) i zawierającej 300–400 μmol CO₂·mol⁻¹ pokazuje, że natężenie procesów prowadzących do produkcji CO₂ wyraźnie wzrasta przez pierwsze 3 doby (rys. 2).

Po tym czasie następuje dość łagodny spadek ilości wydzielonego CO₂ do 16 doby hodowli. Ostatecznie po 29 dobach hodowli ilość wydzielonego CO₂ mierzona w atmosferze beztlenowej jest o 31% niższa od wartości kontrolnej. Początkowy wzrost intensywności wydzielania CO₂ mierzony w atmosferze argonu stwierdzono również dla gametoforów zalanych pożywką, a dalszy przebieg tego procesu jest podobny do opisanego powyżej.

Uzyskane wyniki wskazują, że w warunkach tych ma miejsce uruchomienie procesów fermentacyjnych, które w miarę przedłużania się stresu ulegają zahamowaniu. Początkowo ilość wydzielonego CO₂ w porównaniu do wartości kon-

tronej jest mniejsza niż tych, które były zalane wodą destylowaną. Nie stwierdzono natomiast początkowych szokowych zmian w ilości wydzielonego CO_2 jeżeli gametofory zostały zalane wodą z chlorkiem wapnia (rys. 2).



Gametofory przed pomiarem były przykryte; Gametophores before measurements were covered with:
 ■ wodą destylowaną; distilled water
 ▲ pożywką; nutrient
 ○ wodą destylowaną z CaCl_2 ; distilled water with CaCl_2

Rys. 2. Natężenie wydzielania dwutlenku węgla przez gametofory *Polytrichum commune* wyrażone w % wartości kontrolnej. Pomiar w atmosferze argonu (0% tlenu (R_0)) przeprowadzono przy stężeniu $300\text{--}400 \mu\text{mol CO}_2\text{mol}^{-1}$

Fig. 2. Intensity of CO_2 evolution in gametophytes of *Polytrichum commune* expressed in % of control. Measurements in argon (0% oxygen) and CO_2 concentration $300\text{--}400 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$

Jednak po 29 dobach hodowli gametoforów w tych warunkach ilość wydzielonego CO_2 jest o 44% niższa od początkowej. Podobne zmiany stwierdzono jeżeli pomiar wydzielania CO_2 mierzono w atmosferze beztlenowej, ale zawierającej $1300\text{--}1400 \mu\text{mol CO}_2\text{mol}^{-1}$. W tych warunkach jedynie gametofory, które zalano wodą destylowaną z jonami Ca^{+2} wydzielają aż o 64% mniej CO_2 po 29 dobach hodowli.

Zestawienie danych dotyczących bezwzględnych ilości wydzielonego CO_2 przez gametofory hodowane w różnych pożywkach pokazują, że zmiany w znacznym większym stopniu dotyczą głównie natężenia procesów mierzonych w warunkach tlenowych. Natomiast początkowy wzrost ilości wytworzonego CO_2 mierzonego w atmosferze beztlenowej przez gametofory hodowane w wodzie z dodatkiem jonów wapniowych jest prawie niewidoczny. Można przypuszczać, że obec-

ność jonów Ca^{++} hamuje intensyfikację procesów fermentacyjnych. Powyższe wyniki wskazują w oczywisty sposób, że stres wywołany ograniczonym dostępem tlenu powoduje znacznie większe zmiany w oddychaniu tlenowym niż beztlenowym. Prawdopodobnie wzrost poziomu kwasu mlekowego lub alkoholu w komórkach jest związany z brakiem tlenu jako końcowego akceptora elektronów oddychania mitochondrialnego. Adaptacja roślin do warunków anerobowych wiąże się z uruchomieniem mechanizmów detoksykacji powstałych metabolitów. Mechanizm reakcji na stres braku tlenu jest więc związany z różnym poziomem organizacji i funkcjonowaniem rośliny.

W indukcji tych zmian pośredniczyć mogą również jony wapniowe, których stężenie w cytozolu wzrasta, jeżeli ograniczy się dostęp tlenu do komórki roślinnej [VARTAPETIAN, JACKSON 1997]. Wapń stanowić może transduktor sygnału dla procesów transkrypcji i translacji [CHANG i in. 2000]. Po krótkim okresie przetrzymywania roślin w warunkach ograniczonego dostępu tlenu wzrasta poziom białek, które określa się jako białka anerobowe [FOX i in. 1995].

Ekspozowanie gametoforów *Polytrichum commune* w warunkach hipoksji wywołuje stres, który jednak nie wywołuje drastycznych zmian w natężeniu oddychania ciemniowego i prowadzi do przedłużenia aktywności rośliny przez dłuższy czas działania tego czynnika co świadczy o dużych zdolnościach adaptacyjnych. Można spodziewać się, że dochodzi do wzrostu poziomu transkrypcji dehydrogenazy alkoholowej, dekarboksylazy pirogronianowej oraz aldolazy i enolazy [FEENOY, BAILEY-SERRES 1995].

Mechanizmy adaptacyjne tych roślin wynikają prawdopodobnie z faktu aktywacji genów anoksji o czym świadczy reakcja gametoforów *Polytrichum commune* na zalanie wodą destylowaną zawierającą jony wapnia. Warunki hipoksji pomniejszają również pulę ATP, który w przypadku roślin zielonych może być uzupełniany w wyniku fosforylacji fotosyntetycznej, co niewątpliwie obniża skutki stresu wywołane dostępem tlenu [FEENOY, BAILEY-SERRES 1995]. Istotnym dla funkcjonowania tych roślin w warunkach hipoksji jest wysoki udział oddychania beztlenowego przy pełnym dostępie tlenu oddychania beztlenowego. Jest to specyficzna cecha tych roślin co przy istnieniu innych mechanizmów adaptacyjnych wyjaśnia możliwość przetrwania przy ograniczonym dostępie tlenu.

Wnioski

1. Natężenie procesów oddechowych jest silnie zmienione w warunkach hipoksji.
2. Stres wywołany ograniczonym dostępem tlenu powoduje znacznie większe zmiany w oddychaniu tlenowym niż beztlenowym.
3. Obniżenie stężenia tlenu jest silnym czynnikiem stresowym dla gametoforów *Polytrichum commune* L.

Literatura

CHANG W.P., LAN HUANG., MIN SHEN., WEBSTER C., BURLINGAME A.L., ROBERTS J.K.M. 2000. *Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seed-*

lings acclimated to a low-oxygen environment and identification of proteins by mass spectrometry. *Plant Physiol.* 122: 295–317.

DREW M.C. 1997. *Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia.* *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 48: 223–250.

FEENOY S.L., BAILEY-SERRES J. 1995. *Posttranscriptional regulation of gene expression in oxygen-deprived roots of maize.* *Plant J.* 7: 287–295.

FOX T.C., MUJER C.V., ANDREWS D.L., WILLIAMS A.S., COBB B.G. 1995. *Identification and gene expression of anaerobically induced enollase in Echinochloa phyllopogon and Echinochloa crus-gavonis.* *Plant Physiol.* 109: 433–443.

GALINA A., REIS M., ALBUQUERQUE M.C., PUYOU A.G. PUYOU M.T.G. 1995. *Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots.* *Biochem. J.* 309: 105–112.

KATO-NOGUCHI H. 1999. *Effect of anaerobiosis on alcohol dehydrogenase in seedlings.* *Acta Physiol. Plant.* 21: 341–344.

MENON M.K.C., LAL M. 1974. *Morphogenetic role of kinetin and abscisic acid in the moss Physcomitrium.* *Planta* 115: 319–329.

SEDBROOK J.C., KRONEBUSCH P.J., BORISY G.G., TREWAVAS A.J., MASSON P.H. 1996. *Transgenic Auqorin reveals organ-specific cytosolic Ca^{+2} responses to anoxia in Arabidopsis thaliana seedlings.* *Plant Physiol.* 111: 243–257.

VARTAPETIAN B.B., JACKSON M.B. 1997. *Plant adaptations to anaerobic stress.* *Annals of Botany* 79: 3–20.

Słowa kluczowe: *Polytrichum commune* L., hypoksja, anoksja, oddychanie, stężenie CO_2 , gametofory mechów

Streszczenie

Rośliny lądowe są zazwyczaj organizmami aerobowymi. Okresowo może pojawić się ograniczenie w dostępie tlenu (hipoksja) lub całkowity jego brak (anoksja). Przyczyną tych zmian jest częste zalanie wodą całych roślin lub systemu korzeniowego. Tolerancja na okresowe anareobowe warunki wiąże się z wieloma zmianami w metabolizmie komórki. Przypuszcza się, że obniżenie poziomu tlenu powodować może aktywację genów specyficznych dla hipoksji czy anoksji. Celem podjętych badań było określenie reakcji tych roślin na ograniczony dostęp tlenu spowodowany zalaniem wodą. Natężenie oddychania ciemniowego mierzone w powietrzu zawierającym 21% tlenu oraz w argonie pod nieobecność tlenu.

Gametofory zalane wodą destylowaną przez pierwsze 2 dni wykazują oddychanie o 64% wyższe od tych na początku eksperymentu, gdy pomiar wykonano w atmosferze 21% tlenu. Natomiast w atmosferze argonu jest tylko o 25% wyższe. Po tym czasie następuje stopniowy spadek ilości wydzielonego CO_2 . Po 30 dniach przetrzymywania gametoforów w tych warunkach oddychanie jest tylko o 35% niższe od wyjściowego. Dodanie jonów Ca^{+2} do wody ogranicza szok spowodowany ograniczonym dostępem tlenu. Intensywność tego procesu mierzona po

1 dniu w atmosferze 21% tlenu jest o 20% wyższa od wyjściowej wartości oddychania. Podobnie jak w przypadku z wodą destylowaną przedłużenie czasu ekspozycji prowadzi do spadku oddychania tak tlenowego jak i beztlenowego, które po 30 dniach jest o 41% niższe od początkowego.

Zalanie gametoforów pożywką powoduje podobne zmiany jak w przetrzymywanych w wodzie z jonami wapnia. Po 30 dniach intensywność oddychania mitochondrialnego jest tylko około 20% niższa od początkowego.

Umieszczenie gametoforów *Polytrichum commune* L. w warunkach hipoksji wywołuje stres, który nie prowadzi do drastycznych zmian w oddychaniu ciemnym, a zdolności przetrwania tych roślin do warunków hipoksji wykazują jeszcze rośliny po 30 dniach eksperymentu.

THE INFLUENCE OF ANAEROBIC CONDITIONS ON THE DARK RESPIRATION OF MOSS GAMETOPHYTES

Andrzej Rzepka, Jan Krupa, Grzegorz Rut

Institute of Biology, Pedagogical Academy, Kraków

Key words: *Polytrichum commune* L., hypoxia, anoxia, respiration, CO₂ concentration, moss gametophytes

Summary

Land plants are generally aerobic organisms. Periodically, limitation of the access to oxygen (hypoxia) or total lack of it (anoxia) can occur. The changes are caused by flooding of the whole plants or the root system. Periodic tolerance of anaerobic conditions is connected with numerous changes in cell metabolism. Oxygen deficit causes activation of genes which code specific polypeptides.

Even typical land mosses undergo total flooding with rainwater or dew. The research aimed at estimation of these plants' reaction to limited access to oxygen caused by flooding with water. The intensity of dark respiration was measured in the air containing 21% of oxygen and in argon with 0% oxygen concentration.

The gametophores flooded with distilled water demonstrate – for the first two days – respiration by 64% higher than those at the beginning of the experiment, when the measurement was done in the atmosphere containing 21% of oxygen, whereas in the atmosphere of argon it is higher by only 25%. After this period there is a gradual drop in the amount of evolution of carbon dioxide. After 30 days of storing gametophores under these conditions, respiration is only by 35% lower than initially. The addition of Ca⁺² ions to water limits the shock caused by limited access to oxygen. The intensity of the process measured after 1 day in the atmosphere containing 21% of oxygen is by 20% higher than the original respiration value. As it is in the case of distilled water, extension of the flooding period leads to a drop in respiration – both aerobic and anaerobic, and after 30 days it is by 41% lower than initially.

Flooding gametophores with culture medium causes changes similar to those occurring when they are kept in water containing calcium ions. After 30 days, the intensity of mitochondrial respiration is only by about 20% lower than

at the beginning.

Polytrichum commune gametophores under the hypoxia conditions are subjected to stress, which does not lead to drastic changes in dark respiration. The fact that they stay alive for 30 days is a proof of their adaptiveness.

Dr Andrzej **Rzepka**

Instytut Biologii

Akademia Pedagogiczna im. Komisji Edukacji Narodowej

ul. Podbrzezie 3

31-054 KRAKÓW

e-mail: rzepkazf@wsp.krakow.pl