

УДК 581.192 + 582.26

В.А. ВАСЮК, Л.В. ВОЙТЕНКО, Л.И. МУСАТЕНКО

Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
Украина, 01601 Киев, ул. Терещенковская, 2**ГИББЕРЕЛИНОПОДОБНЫЕ ВЕЩЕСТВА CHARA
CONTRARIA A. BR. (CHLOROPHYCEAE)**

Исследован количественный и качественный состав свободных и конъюгированных форм гибберелиноподобных веществ (ГПВ) в стерильном и фертильном талломах зеленой пресноводной водоросли *Chara contraria* A.Br. Изучали уровни ГПВ в ооспорах, ризоидах, двух нижних междоузлиях, в листьях средней и апикальной частей фертильного таллома водоросли. Показано, что листья верхней части главного побега репродуктивного таллома хары характеризуются высоким содержанием гибберелинов (в основном за счет связанных форм).

Ключевые слова: водоросли, гибберелиноподобные вещества, *Chara contraria*.

Введение

Гибберелины, широко распространенные среди представителей цветковых растений, найдены у мхов, папоротников, водорослей и грибов (Radley, 1961; Kato et al., 1962; Полевой, 1982; Муромцев, Агнестикова, 1984; Муромцев и др., 1987; Падун, 1993; Мусатенко, 2001; Ситник та ін., 2003). Сведения об их количестве и качественном составе у водорослей различных систематических групп ограничены и часто противоречивы. Активность гибберелиноподобных веществ (ГПВ) определена у представителей различных одно- и многоклеточных морских и пресноводных водорослей (Падун, 1993; Мусатенко, 2001; Ситник та ін., 2003). Идентифицированы гибберелины ГК₁, ГК₃-ГК₇ и ГК₉, соотношения которых зависят от условий роста и стадий развития водорослей (Mowat, 1963; Jennings, Mc Comb, 1967; Jennings, 1968; Kazmierczak, 1999; Kazmierczak et al., 1999; Kazmierczak, Rosiak, 2000). Биотестовыми методами определено содержание гибберелловой кислоты (ГК₃) у зеленых водорослей *Enteromorpha prolifera* (O.F. Muller) J.Ag – около 100 мкг/кг массы сырого вещества (м. сыр. в.) и *Tetraselmis* sp. – 1,0-60,0 мкг/кг массы сухого вещества (м. сух. в.), у бурой водоросли *Fucus spiralis* L. – 0,3-3,0 мкг/кг м. сух. в., однако у бурой водоросли *Macrocystis purifera* (L.) C.Ag. и зеленой *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. присутствие ГПВ не выявлено (Kato et al., 1962; Mowat, 1963; Jennings, 1968). Методом капиллярного электрофореза и биотестовым определена в апикальной части таллома *Chara vulgaris* L. ГК₃, уровень которой (до 60 мг/кг м. сыр. в.) был значительно большим, чем у сосудистых растений (Kazmierczak, 1999).

Экзогенное применение ГПВ позволило выявить их разнообразное действие. Так, при концентрации ГК₃ 100 мг/л увеличивались количество и объем клеток *Chlorella pyrenoidosa* Chick., у *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kütz. повышалась активность ферментов пероксидазы и α-амилазы, у *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp., *Trichodesmium erythraeum*, *Melosira sulcata*, *Gymnodinium brebe* Ballantine активировалась скорость деления клеток, а у *Scenedesmus quadricauda*

©В.А. Васюк, Л.В. Войтенко, Л.И. Мусатенко, 2004

(Turp.) Bréb. увеличивалось содержание сухого вещества, белка и хлорофилла (Ермолаев, Федоров, 1964; Bendana, Fried, 1967; Buczer et al., 1975).

Гиббереллины участвуют в формировании и развитии репродуктивных органов у сосудистых и споровых растений (Banks, 1997; Хрянин, 2002). Показано, что экзогенная обработка ГК₃ в концентрации 10⁻⁸ М вызывала в антеридиях *Ch. vulgaris* увеличение количества клеток антеридиальных филаментов (до 45 %) и сперматозоидов (до 20 %), а также ускоряла созревание оогониев и формирование ооспор. Одновременно со стимулирующим действием гиббереллина на развитие генеративных органов наблюдалось замедленное растяжение междоузлий главной оси и листьев боковых стеблей (Godlewski, 1977; Godlewski, Kwiatkowska, 1980; Kwiatkowska, Godlewski, 1988). Одинаковые концентрации ГК₃ по-разному влияли на морфологические изменения высших растений и водорослей. Так, при низкой концентрации ГК₃ (до физиологической) рост сосудистых растений ускорялся, а при внесении таких же концентраций гормона в культуральную среду *Enteromorpha prolifera* (O.F. Muller) J.Ag. и *Ecklonia radiata* (C.Ag.) J.Ag. наблюдалось их замедленное развитие (Jennings, 1968). Известно, что при такой обработке также замедлялся рост и развитие *Ulothrix* и некоторых одноклеточных зеленых водорослей (Conrad et al., 1959; Saona, 1964).

Для определения участия ГПВ в процессах роста и развития водорослей мы исследовали особенности изменений количественного содержания и качественного состава свободных и конъюгированных форм гиббереллинов и их распределение в различных частях стерильного и фертильного талломов и ооспорах хары.

Материалы и методы

Объектом исследования была зеленая пресноводная водоросль *Chara contraria* A. Br., основной побег которой состоял из последовательно расположенных 9-10 клеток (междоузлий) и узлов с кольцами т.н. листьев. Каждое междоузлие – это одна многоядерная клетка, длина которой может достигать 25 см. Исследовали стерильный (не половозрелый) и фертильный (половозрелый) целые талломы, ооспоры, ризоиды, два нижних междоузлия главной оси побега без листьев, кольца (мутовки) листьев IV-VI средних узлов от ризоидов, на которых расположены черные оогонии с оплодотворенными яйцеклетками, и верхнюю апикальную часть главного побега (с четырьмя узлами и апикальной клеткой), на листьях которой находились объединенные гаметангии – антеридии и оогонии.

Хару собирали в лесном озере Шапарня (Конча-Заспа, Киевская обл., заказник “Лесники”) в 2000-2002 гг. Фитогормоны экстрагировали из свежесобранного материала 80 %-ным этанолом и фракционировали по ранее разработанной методике (Методические ..., 1988). Дополнительную очистку экстрактов ГПВ от фенольных соединений проводили с помощью Polyclar AT фирмы “Sigma” (США) (Процко, Гонтаренко, 1984). Из очищенного водного остатка ГПВ экстрагировали этилацетатом и бутанолом при pH 2,8. В этилацетатную фракцию (ЭФ) переходили свободные формы ГПВ, а в бутанольную (БФ) – преимущественно связанные. Разделение ГПВ с помощью тонкослойной хроматографии на пластинах «Silufol UV-254» в системе растворителей (изопропанол : аммиак : вода – 10 : 1 : 1). В качестве маркера

использовали стандартный раствор ГК₃ фирмы «Sigma». Активность ГПВ определяли методом биотеста по удлинению гипокотилей салата Кучерявец одесский (Муромцев, Агнстикова, 1984; Методические ..., 1988). Все анализы проведены в 3 повторностях. Результаты обработаны статистически.

Результаты и обсуждение

Определяли уровень гибберелинов в стерильном и фертильном целых талломах хары (рис. 1). Показано, что фертильный таллом содержал большее количество гибберелинов, чем стерильный, и уровень конъюгированных форм в нем был выше. В БФ обоих талломов преобладали вещества с Rf 0,4-0,6. Согласно литературным данным, это гибберелины ГК₃, ГК₄, ГК₇, ГК₉ (Полевой, 1982; Муромцев, Агнстикова, 1984; Муромцев и др., 1987). Такой характер распределения ГПВ в талломе фертильных растений, очевидно, связан с активным развитием репродуктивных органов на боковых мутовках листьев хары. Высокое содержание связанных гибберелинов, возможно, является резервом функционально активных свободных форм, которые контролируют активирование физиологических процессов роста и развития (Полевой, 1982; Муромцев, Агнстикова, 1984; Иванова и др., 1999).

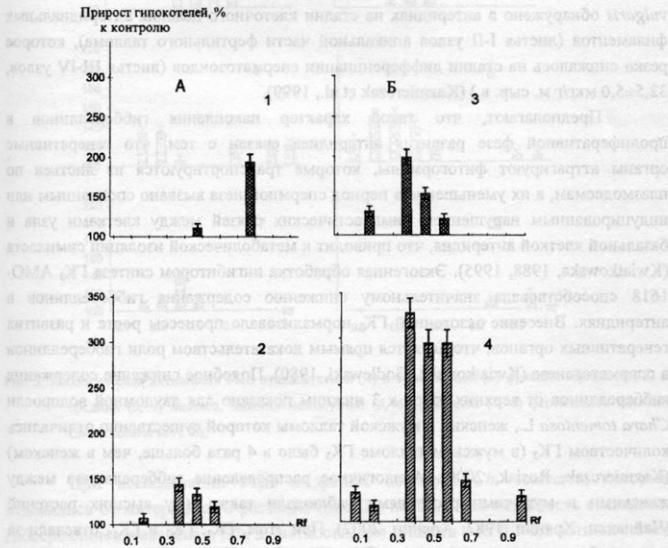


Рис. 1. Биологическая активность ГПВ этилацетатной (1,3) и бутанольной (2,4) фракций стерильного (А) и фертильного (Б) талломов *Chara contraria* А. Вр.

Нами был исследован качественный состав и количество гиббереллинов в разных частях главного побега фертильного таллома хары. В результате мы установили, что содержание ГПВ ЭФ и БФ в верхних молодых листьях значительно выше, чем в расположенных ниже, а также в старых междоузлиях и ризоидах (рис. 2). Среди гиббереллинов ЭФ апикальной части побега высокую активность проявляли вещества с Rf 0,1 и 0,4-0,6 (198 % к контролю), в БФ – 0,2 и 0,4-0,5 (359 % к контролю). Содержание этих веществ в средних листьях было ниже. В ЭФ и БФ из старых нижних междоузлий выявлен более широкий спектр ГПВ, однако активность их была низкой. Следует отметить, что ГПВ ризоидов представлены лишь веществами с Rf 0,4 (ЭФ) и 1,0 (БФ). Таким образом, содержание ГПВ постепенно уменьшалось от верхних (с молодыми гаметангиями) к средним листьям (со зрелыми и оплодотворенными гаметангиями). Наименьшее количество ГПВ выявлено в междоузлиях, рост которых прекратился, и ризоидах. Выявленное распределение ГПВ, возможно, связано с разной интенсивностью ростовых процессов частей таллома и подготовкой водорослей к формированию и развитию репродуктивных органов (оогониев, антеридиев). Кроме того, высокий уровень ГПВ в листьях апикальной части главного побега хары, очевидно, обусловлен повышенным содержанием гиббереллинов в репродуктивных органах водорослей. Так, высокое содержание ГК₃ (512,0±95,0 мкг/г м. сыр. в.) у *Ch. vulgaris* обнаружено в антеридиях на стадии клеточного деления антеридиальных филаментов (листья I-II узлов апикальной части фертильного таллома), которое резко снижалось на стадии дифференциации сперматозоидов (листья III-IV узлов, 32,5±5,0 мкг/г м. сыр. в.) (Kazmierczak et al., 1999).

Предполагают, что такой характер накопления гиббереллинов в пролиферативной фазе развития антеридиев связан с тем, что генеративные органы аттрагируют фитогормоны, которые транспортируются из листьев по плазмодесмам, а их уменьшение в период спермиогенеза вызвано спонтанным или индуцированным нарушением симпластических связей между клетками узла и базальной клеткой антеридия, что приводит к метаболической изоляции симпласта (Kwiatkowska, 1988, 1995). Экзогенная обработка ингибитором синтеза ГК₃ АМО-1618 способствовала значительному снижению содержания гиббереллинов в антеридиях. Внесение экзогенной ГК₃ нормализовало процессы роста и развития генеративных органов, что является прямым доказательством роли гиббереллинов в сперматогенезе (Kwiatkowska, Godlewski, 1980). Подобное снижение содержания гиббереллинов от верхних узлов к 3 нижним показано для двудомной водоросли *Chara tomentosa* L., женский и мужской талломы которой существенно отличались количеством ГК₃ (в мужском талломе ГК₃ было в 4 раза больше, чем в женском) (Kazmierczak, Rosiak, 2000). Аналогичное распределение гиббереллинов между женскими и мужскими растениями наблюдали также и у высших растений (Чайлахян, Хрянин, 1982; Хрянин, 2002). При этом, ГК₁, ГК₃ и ГК₁₉ отвечали за рост стебля высших растений, а ГК₄, ГК₉, ГК₂₄, ГК₃₄ и ГК₅₁ участвовали в формировании репродуктивных органов (Kato et al., 1962; Banks, 1997; Полевой, 1982).

Таким образом, верхние молодые листья *Ch. contraria*, на которых развивались репродуктивные органы, характеризовались высоким содержанием свободных и связанных форм ГПВ, а листья средней части главного побега со зрелыми и оплодотворенными гаметаангиями – низким. Вероятно, это обусловлено транспортом ГПВ к ризоидам по междоузлиям, в которых и выявлен широкий спектр гиббереллинов.

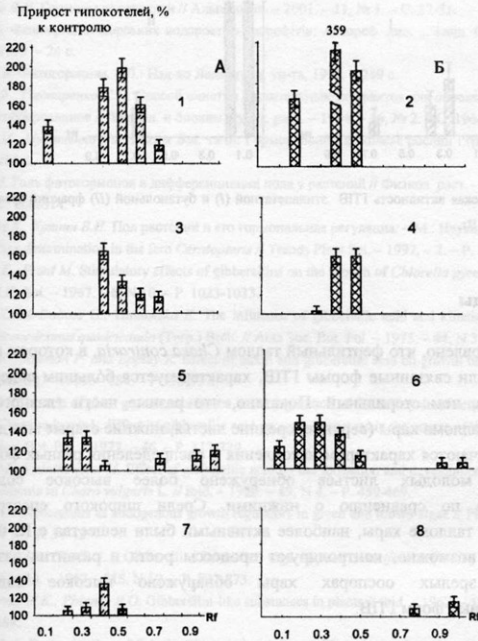


Рис. 2. Биологическая активность ГПВ этилацетатной (А) и бутанольной (Б) фракций верхних (1, 2) и средних (3, 4) листьев, нижних междоузлий (5, 6), ризоидов (7, 8) фертильного таллома *Chara contraria* A. Br.

При исследовании ГПВ в зрелых ооспорах *Ch. contraria*, которые отделились от материнского растения (рис. 3), наибольшая активность связанных гибберелинов выявлена в БФ, в частности, для веществ с Rf 0,1-0,2 активность их составляла 150 % контроля. Таким образом, зрелые ооспоры хары, как и семена высших растений и споры папоротников (Муромцев, Агнестикова, 1984; Banks, 1997; Ситник та ин., 2003), характеризуются повышенным содержанием

конъюгированных ГПВ. Вероятно, накопление этих форм гиббереллинов в ооспорах в дальнейшем необходимо для их прорастания в благоприятных условиях.

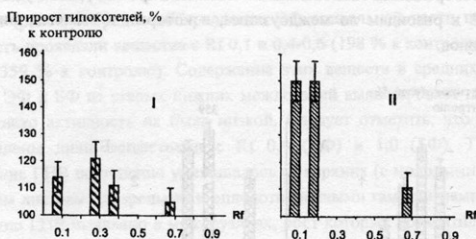


Рис. 3. Биологическая активность ГПВ этилацетатной (I) и бутанольной (II) фракций зрелых ооспор *Chara contraria* A.Br.

Выводы

Установлено, что фертильный таллом *Chara contraria*, в котором наиболее активными были связанные формы ГПВ, характеризуется большим содержанием гиббереллинов, чем стерильный. Показано, что разные части главного побега фертильного таллома хары (верхние, средние листья, нижние старые междоузлия и ризоиды) отличаются характером накопления и распределения разных форм ГПВ. У верхних молодых листьев обнаружено более высокое содержание гиббереллинов по сравнению с нижними. Среди широкого спектра ГПВ, выявленных в талломе хары, наиболее активными были вещества с Rf 0,4, 0,5 и 0,6, которые, возможно, контролируют процессы роста и развития разных его частей. В зрелых ооспорах хары обнаружено высокое содержание конъюгированных форм ГПВ.

V.A. Vasyuk, L.V. Voytenko & L.I. Musatenko

N.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine,
2, Tereshchenkovskaya St., 01601 Kiev, Ukraine

GIBBERELLIN-LIKE SUBSTANCES IN *CHARA CONTRARIA* A. BR. (CHLOROPHYCEAE)

The research was carried out in the quality and quantity composition of free and conjugated forms of gibberellin-like substances (GLS) in sterile and fertile thallies of the green freshwater alga *Chara contraria* A. Br. The levels of GLS in oospores, ryzoids, two lower internodes were studied in leaves of both middle and apical parts of the fertile thalli of the algae. It was found that the leaves of the upper part of the main stem of the reproductive chara thalli are characterized with high gibberellin content (due mainly to the bound forms).

Key words: algae, GLS, *Chara contraria*.

- Иванова А.Б., Анцыгина Л.Л., Ярин А.Ю. Современные аспекты изучения фитогормонов // Цитология. – 1999. – 41, № 10. – С. 835-847.
- Ермолаева Л.И., Федоров В.Д. О влиянии гиббереллина на развитие водорослей // Биол. науки. – 1964. – № 1. – С. 133-135.
- Методические рекомендации по определению фитогормонов. – Киев: Наук. думка, 1988. – 78 с.
- Муромцев Г.С., Агнестикова В.Н. Гиббереллины. – М.: Наука, 1984. – 208 с.
- Муромцев Г.С., Чкаников Д.И., Кулаева О.Н., Гамбург К.З. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений. – М.: Агропромиздат, 1987. – 383 с.
- Мусатенко Л.И. Гормоны водорослей // Альгология. – 2001. – 11, № 1. – С. 37-51.
- Падуи А.О. Фітогормони морських водоростей-макрофітів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 1993. – 24 с.
- Полевой В.В. Фитогормоны. – Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. – 249 с.
- Процко Р.Ф., Гончаренко С.Н. Способ очистки растительных экстрактов для определения эндогенных гиббереллинов // Физиол. и биохим. культ. раст. – 1984. – 16, № 2. – С. 196-200.
- Ситник К.М., Мусатенко Л.И., Васюк В.А. та ін. Гормональний комплекс рослин і грибів. – К., 2003. – 186 с.
- Хрянин В.Н. Роль фитогормонов в дифференциации пола у растений // Физиол. раст. – 2002. – 49, № 4. – С. 608-614.
- Чайлахия М.Х., Хрянин В.Н. Пол растений и его гормональная регуляция. – М.: Наука, 1982. – 176 с.
- Banks J.A. Sex determination in the fern *Ceratopteris* // Trends Plant Sci. – 1997. – 2. – P. 175-180.
- Bendana F.E., Fried M. Stimulatory effects of gibberellins on the growth of *Chlorella pyrenoidosa* (Chick.) // Life Sci. – 1967. – 6, N 10. – P. 1023-1033.
- Buczer J., Kubik-Dobosz G., Tatkowska E. The influence of gibberellic acid and kinetin on the growth of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. // Acta Soc. Bot. Pol. – 1975. – 44, N 3. – P. 421-451.
- Conrad H.M., Saltman P. and Eppley R. Effect of auxin and gibberellic acid on growth of *Ulothrix* // Nature (Lond.). – 1959. – 184. – P. 556-557.
- Godlewski M. The role of plant growth substances in the regulation of the cell cycle in antheridial filaments of *Chara vulgaris* L. Effect of gibberellic acid on some processes in the course of the cell cycle // Acta Soc. Bot. Pol. – 1977. – 46. – P. 317-329.
- Godlewski M., Kwiatkowska M. Effect of gibberellic acid on the formation and development of antheridia and oogonia in *Chara vulgaris* L. // Ibid. – 1980. – 49, N 4. – P. 459-469.
- Jennings R.C. Gibberellins as endogenous growth regulators in green and brown algae // Planta. – 1968. – 80, N 1. – P. 34-42.
- Jennings R.C., Mc. Comb A.J. Gibberellins in the red alga *Hypnea musciformis* (Wulf.) Lamour. // Nature (Lond.). – 1967. – 215, N 19. – P. 872-873.
- Kato J., Purves W.K., Phinney B.O. Gibberellin-like substances in plants // Ibid. – 1962. – 196, N 17. – P. 687-688.
- Kazmierczak A. Determination of GA₃ in *Chara vulgaris* by capillary electrophoresis system // Acta Physiol. Plant. – 1999. – 21, N 4. – P. 345-348.
- Kazmierczak A., Kwiatkowska M., Poplonska K. GA₃ content in antheridia of *Chara vulgaris* at the proliferative stage and in spermiogenesis estimated by capillary electrophoresis // Folia Histochem. Cytobiol. – 1999. – 37, N 1. – P. 49-52.
- Kazmierczak A., Rosiak M. Content of gibberellic acid in apical parts of male and female thalli of *Chara tomentosa* in relation to the content of sugars and dry mass // Biol. Plant. – 2000. – 43. – P. 369-372.
- Kwiatkowska M. Symplasmic isolation of *Chara vulgaris* antheridium and mechanisms regulating the process of spermatogenesis // Protoplasma. – 1988. – 142, N 2/3. – P. 137-146.
- Kwiatkowska M. Effect of symplasmic isolation and antigibberellin treatment on morphogenesis in *Chara* // Folia Histochem. Cytobiol. – 1995. – 33. – P. 133-137.

- Kwiatkowska M., Godlewski M. Effect of gibberellic acid and AMO-1618 on the development of vegetative systems in generatively matured thalli of *Chara vulgaris* L. // Acta Soc. Bot. Pol. – 1980. – 49, N 4. – P. 445-458.
- Kwiatkowska M., Godlewski M. Studies on the role of gibberellins in the regulation of spermatogenesis in *Chara vulgaris* L. // Ibid. – 1988. – 57, N 4. – P. 547-553.
- Mowat J.A. Gibberellin-like substances in algae // Nature (Lond.). – 1963. – 200, N 4905. – P. 453-455.
- Mowat J.A. A survey of results on the occurrence of auxins and gibberellins in algae // Bot. Mar. – 1965. – 8, N 1. – P. 189-195.
- Radley M. Gibberellin-like substances in plants // Nature (Lond.). – 1961. – 191, N 4789. – P. 453-455.
- Saona F. Effect of gibberellic acid on the growth and multiplication of some soil microorganisms and unicellular green algae // Ibid. – 1964. – 204. – P. 1328-1329.

Получена 20.07.04

Подписал в печать С.П. Вассер