

УДК 582.272

А.Н. Кашутин¹, Е.А. Шадрин², Р.Г. Болотова¹

¹ Камчатский государственный технический университет,
Петропавловск-Камчатский, 683003;
² СШ № 4 им. А.М. Горького, Петропавловск-Камчатский, 683000
e-mail: Kashutin-an@yandex.ru

ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *FUCUS DISTICHUS* (PHAEOPHYCEAE, FUCALES) ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОЙ ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

В условиях лабораторного эксперимента изучено влияние низкой отрицательной температуры на жизнеспособность и скорость роста бурой водоросли *Fucus distichus* sub sp. *evanescens*. После 382 суток нахождения эмбрионов и проростков фукуса при температуре -23°C и отсутствия освещения их развитие не прекращалось. До инкубирования в экстремальных условиях их абсолютная скорость роста составляла 30,65 мкм/сут, после инкубирования и реконсервации она снизилась до 8,4 мкм/сут. Стадии морфогенеза проростков протекали значительно медленнее, чем в культуре фукуса, развивавшегося без длительного низкотемпературного воздействия. Развитые ризоиды у них сформировались только на 23-е сутки после размораживания, многослойные талломические пластины – на 30-е сутки. Полученные результаты позволяют понять стратегию развития фукуса в зимнее время года, а также указывают на чрезвычайную устойчивость его эмбрионов и проростков к неблагоприятным условиям среды.

Ключевые слова: *Fucus distichus* sub sp. *evanescens*, проростки фукуса, абсолютная скорость роста, отрицательная температура.

A.N. Kashutin¹, E.A. Shadrin², R.G. Bolotova¹

¹ Kamchatka State Technical University,
Petropavlovsk-Kamchatsky, 683003;
² Secondary school № 4 named after A.M. Gorky,
Petropavlovsk-Kamchatsky, 683000
e-mail: Kashutin-an@yandex.ru

POSTEMBRYONAL DEVELOPMENT OF BROWN ALGAE *FUCUS DISTICHUS* (PHAEOPHYCEAE, FUCALES) AFTER PROLONGED EXPOSURE OF LOW NEGATIVE TEMPERATURE

The effect of low negative temperature on the viability and growth rate of brown algae *Fucus distichus* sub sp. *evanescens* was studied in a laboratory experiment. The development of embryos and germlings of alga at a temperature of -23°C and without light did not stop. Before incubation in extreme conditions, their absolute growth rate was 30,65 $\mu\text{m}/\text{day}$, after incubation and reconservation, it decreased to 8,4 $\mu\text{m}/\text{day}$. The stages of morphogenesis of seedlings were much slower than in the culture of fucus, that developed without long-term low-temperature exposure. Developed rhizoids were formed only on the 23rd day after defrosting, multilayer thalломic blades were formed on the 30th day. The obtained results allow to understand the strategy of *F. distichus* development in winter season, and also they indicate the extreme resistance of its embryos and germlings to adverse environmental conditions.

Key words: *Fucus distichus* sub sp. *evanescens*, fucus germlings, absolute growth rate, negative temperature.

В дальневосточных морях России встречается только один из трех подвидов *Fucus distichus* – *F. distichus* subsp. *evanescens* [1, 2]. Он характеризуется высокой скоростью роста и растянутым в течение всего года периодом размножения [3, 4].

Известно, что ранние стадии развития многолетних бурых водорослей являются уязвимыми к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, что, несомненно, влияет на их распространение [5]. Одними из важнейших факторов, влияющих на рост и развитие проростков

бурой водоросли *F. distichus*, являются лед и низкая температура воды. У берегов Камчатки, в частности в Авачинской губе (юго-восточная Камчатка), этот вид в течение нескольких месяцев вегетирует при отрицательных температурах, часто вмерзает в припайный лед, присутствующий в разных районах губы от 3 до 5 месяцев [6, 7].

Авачинская губа представляет собой закрытую бухту, весьма своеобразной конфигурации и происхождения. Наличие ледового покрова и низких температур оказывает существенное влияние на формирование в ней физико-химических условий среды обитания и продукционно-деструкционные экосистемные процессы. Возможность длительного существования фукоидов в условиях отсутствия освещения связана с их способностью к поглощению растворенных органических веществ (РОВ) [8]. РОВ используются макрофитами для поддержания энергетического обмена, поскольку было показано поглощение из среды карбонат-ионов при отсутствии освещения и световой фиксации CO_2 [9]. Проведенные М.В. Макаровым и Г.М. Воскобойниковым многолетние наблюдения за развитием фукуса в естественной среде, полевые и лабораторные эксперименты в Баренцевом море, позволили им утверждать, что влияние на батиметрическое распределение водорослей во многом зависит от их способности адаптироваться к смене освещения от полярного дня до полярной ночи.

Температура, как и световой режим, является одним из основных факторов, определяющих границы ареалов и глубины распространения водорослей [9–11]. Зимой во время отлива клетки фукуса под воздействием отрицательной температуры воздуха испытывают промерзание. Стресс от замерзания, которому подвергается фукус, произрастающий в литоральной зоне, редко приводит к летальному исходу. Это подтверждают данные наших исследований и результаты изучения зимнего развития *F. vesiculosus* на берегах северо-западной Атлантики [12–14]. Однако при воздействии отрицательных температур выход созревших к этому времени половых продуктов и их оплодотворение у водорослей прекращаются [15]. Вопрос о том, как переживают длительное промерзание эмбрионы и ювенильные проростки *F. distichus*, успевшие начать свое развитие до становления льда и резкого сокращения светового довольствия подо льдом, до сих пор никем не изучался.

Анализ научной литературы, затрагивающий различные аспекты эмбрионального развития *F. distichus* [14–19], показывает, что, несмотря на длительную историю изучения особенностей вегетации фукуса в природной среде, способность его эмбрионов сохранять жизнеспособность и жизнедеятельность при длительном замораживании, как и способность к развитию после перенесенного холодового стресса, до сих пор не изучалась. Между тем понять биологию развития фукуса и особенности его вегетации в зимнее время без знания этих вопросов невозможно. Для выяснения устойчивости эмбрионов *F. distichus* к воздействию отрицательных температур были проведены лабораторные эксперименты, ответившие на этот вопрос. Описание и обсуждение полученных в ходе их проведения результатов приведено ниже.

Для получения зигот и эмбриональных растений *F. distichus* были использованы маточные растения со зрелыми концептакулами, собранные 7 ноября 2018 г. в литоральной зоне бух. Сероглазка (Авачинская губа, юго-восточная Камчатка). Они представляли собой двухлетние кустики 16–22 см высоты, с 8–11 дихотомическими разветвлениями и множественными рецептакулами, находящимися в разной стадии созревания. Самые зрелые из них были взяты для высева зигот и получения эмбрионов фукуса в лабораторных культурах.

Питательную среду для культивирования осевших зигот готовили на основе морской воды с соленостью 28‰, отобранной в месте сбора маточных растений *F. distichus*. Морскую воду предварительно стерилизовали и обогащали необходимыми витаминами, микро- и макроэлементами, согласно протоколу для приготовления IMR-среды [20]. Суспензию с развивающимися зиготами поместили в две чашки Петри, которые экспонировали при температуре 10°C и фотопериоде 12 : 12 ч в течение 9 сут. После появления в них многоклеточных эмбрионов одну из чашек (серия № 1) переместили в морозильную камеру с постоянной температурой –23°C и отсутствием света, где ее содержали в течение 382 сут. По истечении указанного выше срока содержимое чашки Петри было разморожено при температуре воздуха 21°C и перемещено в обновленную питательную среду. После этого проростки фукуса содержали в инкубаторе при температуре 7°C и условиях короткого дня (8 ч света и 16 ч темноты). Интенсивность освещения составляла 30 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$.

Эмбрионы фукуса во второй чашке Петри (серия № 2), появившиеся после девяти дней, в течение последующих 50 дней содержали при температуре 8°C и фотопериоде 8 : 16 ч и также как размороженные растения измеряли через каждые семь суток или чаще. Наблюдения за развитием эмбрионов и проростков *F. distichus* вели с помощью стереомикроскопа Olympus SZX10 с цветной фотокамерой DP27 (Olympus, Japan). Для определения их линейных размеров использовали программное обеспечение CellSens Entry (Olympus, Japan). За общую длину проростков принимали сумму значений длины их ризоидальной и талломической частей. Измерения проростков фукуса после размораживания были проведены восемь раз через каждые семь суток. Количество измеренных растений всякий раз превышало 30 шт. Полученные значения длины усредняли и высчитывали стандартное отклонение. Абсолютную скорость роста (AGR, мкм/сут) рассчитывали по формуле [21]:

$$AGR = \frac{(L_{\text{общ}})_2 - (L_{\text{общ}})_1}{t_2 - t_1},$$

где $(L_{\text{общ}})_1$ – начальная и $(L_{\text{общ}})_2$ – конечная длина проростка; $(t_2 - t_1)$ – период времени между двумя последовательными измерениями, выраженный в сутках. Статистическую обработку и построение графиков выполняли в Microsoft Office Excel 2013. Общая продолжительность эксперимента составила 440 дней, из которых 382 дня пришлось на фазу низкотемпературного воздействия. Общий период заморозки учитывался в лабораторных измерениях как одни сутки, с 9-го по 10-й день наблюдения.

Глубокому замораживанию были подвергнуты растения фукуса, едва начавшие свое эмбриональное развитие. У них на этот момент уже произошло первое деление зиготы, и у образовавшихся после этого клеток была хорошо выражена первичная дифференциация и поляризация: одна из них была более крупной и округлой – талломической, другая более вытянутой – ризоидальной. Первое деление у зиготы произошло через сутки после оплодотворения яйцеклеток.

На 7-е сутки выращивания при температуре 7°C и условиях короткого дня проростки *F. distichus* состояли уже из 3–8 клеток. Необходимо отметить, что в этот период у них наблюдался наиболее активный цитокинез и рост. Средняя длина эмбрионов фукуса достигла 144,5 мкм (рис. 1). На 9-е сутки их длина уже составляла 205,8 мкм, за двое суток абсолютная скорость роста (AGR) равнялась 30,7 мкм/сут. После этого проростки фукуса из серии № 1 были подвержены продолжительному холодному воздействию.

На рис. 1 приведены данные по изменению длины проростков, развивавшихся без замораживания (серия № 2) и после многодневного замораживания (серия № 1). Через неделю после размораживания и смены питательной среды, на 16-е сутки, длина проростков из серии № 1 увеличилась на 59,8% и составила 328,8 мкм. Развитие проростков из серии № 2 за этот же период проходило интенсивнее, прирост их линейных размеров составил 92,3%. За этот период гиалиновые волоски не сформировались – это указывает на то, что они еще не достигли физиологической зрелости.

Дальнейшее наблюдение за развитием проростков фукуса из серии № 1 в инкубационном шкафу в условиях, близких к холодному времени года, показали, что они формировали многослойную талломическую пластину только на 30-е сутки (рис. 2). Хорошо выраженные ризоиды

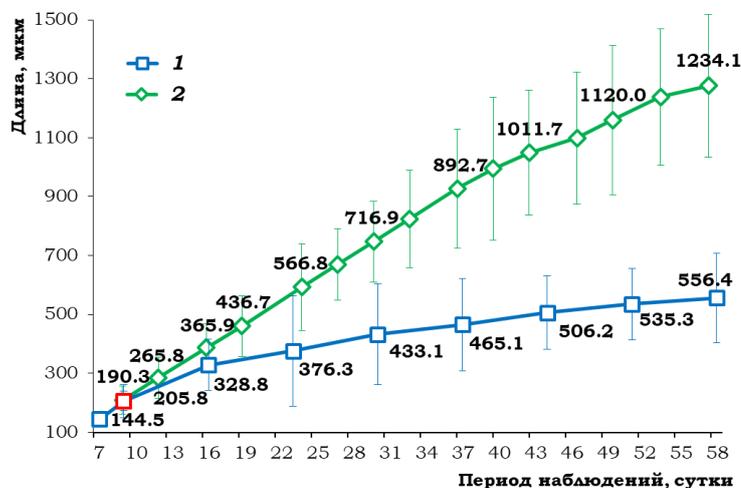


Рис. 1. Развитие проростков *Fucus distichus* subsp. *evanescens* в лабораторных условиях. (1) – серия № 1, после длительного воздействия низкой отрицательной температуры и отсутствия освещения, красным цветом выделен период заморозки; (2) – серия № 2, выращенная при температуре 8°C и коротком световом дне

были заметны на 23-е сутки культивирования. У проростков, развивавшихся без низкотемпературного воздействия, объемная талломическая пластина была заметна уже на 11-е сутки. Данные по развитию проростков из серии № 2 хорошо согласовались с полученными нами ранее результатами по развитию фукуса в изменяющихся условиях температуры и фотопериода [7]. Скорость роста проростков из серии № 1 в первую неделю выращивания после размораживания составила 17,6 мкм/сут. В дальнейшем она плавно снижалась и за последнюю неделю эксперимента уже не превышала 3 мкм/сут.

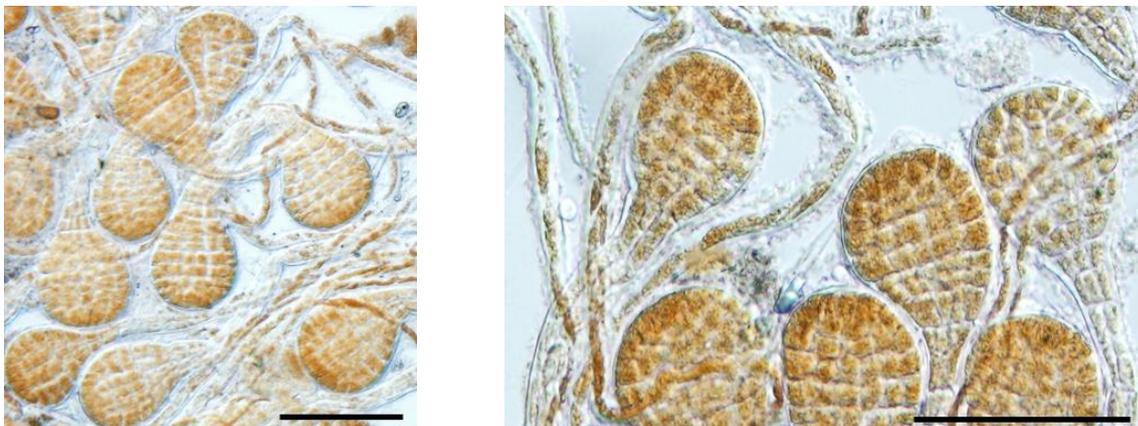


Рис. 2. Проростки *Fucus distichus* subsp. *evanescens* на 30-е сутки эксперимента с объемной талломической частью и хорошо выраженным ризоидом. Масштабная линейка – 100 мкм

Скорость морфофункциональной дифференциации клеток у эмбрионов фукуса из разных серий также различалась. Гиалиновые волоски у проростков из серии № 1 к окончанию эксперимента так и не сформировались, в то же время у проростков из серии № 2 они были отмечены на 23-е сутки. Очевидно, что длительное воздействие низкой температуры и отсутствие света способствовали значительному замедлению развития эмбрионов *F. distichus*. Однако, несмотря на значительно медленный рост и задержку процессов дифференциации клеток у эмбрионов, прирост их длины был, тем не менее, постоянным на протяжении всего эксперимента. Абсолютная средняя скорость роста проростков из серии № 1 за период после размораживания и до окончания эксперимента, т. е. 49 сут, составила 8,4 мкм/сут. Скорость роста проростков в серии № 2 была существенно выше, в 2,5 раза. Таким образом, на основании изложенного выше можно сделать вывод, что в зимний период эмбрионы *F. distichus* не только устойчивы к длительному воздействию экстремально низких температур и отсутствию света, но и продолжают расти и развиваться в жизнеспособные проростки. Проведение дальнейших экспериментов по выявлению адаптивных реакций ранних стадий развития фукуса после холодного шока позволит разработать способ его криоконсервации для последующего использования в целях марикультуры.

Литература

1. Петров Ю.Е. *Fucus distichus* L. emend. Powell и *Fucus evanescens* C. Ag. // Новости систематики низших растений. – 1965. – Т. 2. – С. 64–70.
2. A mtDNA-based phylogeny of the brown algal genus *Fucus* (Heterokontophyta; Phaeophyta) / J.A. Coyer, G. Hoarau, M.-P. Oudot-Le Secq et al. // Mol. Phylogenet. Evol. – 2006. – Vol. 39, iss. 1. – P. 209–222.
3. Клочкова Н.Г., Березовская В.А. Макрофитобентос Авачинской губы и его антропогенная деструкция. – Владивосток: Дальнаука, 2001. – 208 с.
4. Капустин А.Н., Климова А.В., Клочкова Н.Г. Сезонная динамика роста *Fucus distichus* subsp. *evanescens* (C. Agardh) Н.Т. Powell, 1957 (Phaeophyceae: Fucales) в Авачинской губе (юго-восточная Камчатка) // Биология моря. – 2019. – Т. 45, № 4. – С. 231–239.
5. Камнев А.Н. Структура и функции бурых водорослей. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 200 с.
6. Капустин А.Н., Климова А.В., Клочкова Т.А. Воздействие ледового покрова на межгодовые изменения состояния литоральных зарослей бурой водоросли *Fucus distichus* subsp. *evanescens* в Авачинской губе (юго-восточная Камчатка) // Вестник КамчатГТУ. – 2018. – № 44. – С. 88–99.

7. Климova A.B., Каишутин A.H., Клочкова T.A. Развитие проростков *Fucus distichus* subsp. *evanescens* (Phaeophyceae, Fucales) в изменяющихся условиях солености, температуры и фотопериода // Вестник КамчатГТУ. – 2019. – № 49. – С. 65–75.
8. Хайлов К.М., Мониha T.Л. Органотрофия у морских макрофитов как функция плотности их популяции в условиях эксперимента // Биология моря. – 1977. – Т. 2. – С. 11–18.
9. Макаров M.B., Воскобойников Г.М. Влияние освещения и температуры на макроводоросли Баренцева моря // Океанология. Труды Кольского научного центра РАН. Вып. 1. – 2013 (14). – С. 95–111.
10. Vandenhoeck C. World-wide latitudinal and longitudinal seaweed distribution patterns and their possible causes as illustrated by the distribution of *Rhodophytan* genera // Helgoland Mar. Res. – 1984. – Vol. 38, № 2. – P. 227–257.
11. Macroecology meets macroevolution: evolutionary niche dynamics in the seaweed *Halimeda* / H. Verbruggen, L. Tyberghein, K. Pauly et al. // Global Ecology and Biogeography. – 2009. – Vol. 18, № 4. – P. 393–405.
12. Bird C.J., McLachlan J. Cold-hardiness of zygotes and embryos of *Fucus* (Phaeophyceae, Fucales) // Phycologia. – 1974. – Vol. 13. – P. 215–25.
13. Chapman A.R.O. Functional ecology of fucoid algae: twenty-three years of progress // Phycologia. – 1995. – Vol. 34. – P. 1–32.
14. Pearson G.A., Davison I.R. Freezing rate and duration determine the physiological response of intertidal fucoids to freezing // Mar. Biol. – 1993. – Vol. 115. – P. 353–62.
15. Pearson G.A., Brawley S.H. Reproductive ecology of *Fucus distichus* (Phaeophyceae): an intertidal alga with successful external fertilization // Mar. Ecol. Prog. Ser. – 1996. – Vol. 143. – P. 211–23.
16. Воскобойников Г.М. Технология плантационного выращивания макрофитов в Баренцевом море: многофункциональная направленность // Инновационный потенциал Кольской науки. – Апатиты: Изд-во КНИЦ РАН, 2005. – С. 284–288.
17. Рыжик И.В., Макаров M.B., Воскобойников Г.М. Физиологическое состояние литоральных бурых водорослей *Fucus serratus* Linnaeus, 1753 и *Fucus distichus* Linnaeus, 1767, произрастающих на плантации-биофилтре в Баренцевом море // Биология моря. – 2014. – Т. 40, № 2. – С. 131–136.
18. Quatrano R.S. Gamete release, fertilization, and embryogenesis in the Fucales. In Handbook of Phycological Methods: Developmental and Cytological Methods, E. Gantt, ed. – Cambridge: Cambridge University Press, 1980. – P. 60–68.
19. Motomura T. Electron and immunofluorescence microscopy on the fertilization of *Fucus distichus* (Fucales, Phaeophyceae) // Protoplasma. – 1994. – Vol. 178. – P. 97–110.
20. Biology of a terrestrial green alga *Chlorococcum* sp. (Chlorococcales, Chlorophyta) collected from the Miruksazi stupa in Korea / T.A. Klochkova, S.-H. Kang, G.Y. Cho, C.M. Poeschel, J.A. West, G.H. Kim // Phycologia. – 2006. – Vol. 45. – P. 115–124.
21. Hunt R. Absolute growth rates // Basic Growth Analysis. – Springer, Dordrecht, 1990. – P. 17–24 [Electronic resource]. – URL: https://doi.org/10.1007/978-94-010-9117-6_2.