

## ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.1

Е. Р. Тараховская, Ю. И. Маслов

ВЛИЯНИЕ РЯДА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ  
НА РАЗВИТИЕ АССИМИЛЯЦИОННОГО АППАРАТА  
У ЭМБРИОНОВ *FUCUS VESICULOSUS* L.

Широко распространенный представитель бурых водорослей порядка Fucales фукус пузырчатый (*Fucus vesiculosus* L.) является одним из наиболее многочисленных видов, населяющих литораль северных морей. Средняя биомасса этих водорослей по берегам Белого моря составляет 6 кг/м<sup>2</sup> (местами до 10 кг/м<sup>2</sup>) [1]. Несмотря на огромную роль, которую играют бурые макрофиты как первичные продуценты литоральных экосистем, в настоящее время особенности формирования и функционирования их ассимиляционного аппарата очень мало изучены. В основном это относится к ранним стадиям развития водорослей, которые являются критическими для их выживания.

Как и многие другие многолетние морские водоросли, *F. vesiculosus* активно фотосинтезирует круглый год в очень широком диапазоне температур и освещения [1, 12]. Все обитатели литоральной зоны в период отлива оказываются на осушке, и фукус способен к фотосинтезу на воздухе, при этом интенсивность воздушного и водного фотосинтеза практически одинакова [16]. Фукусовые относятся к группе *Chromophyta*, для которой характерен светособирающий комплекс, содержащий хлорофиллы *a* и *c*,  $\beta$ -каротин и большое разнообразие специфических ксантофиллов. У фукуса пузырчатого основными ксантофиллами являются фукоксантин и виолаксантин [21]. По-видимому, фукус – растение светового типа. В течение суток фотосинтез и дыхание изменяются по одновыпуклой кривой с максимумом в 11–12 ч, что соответствует максимуму фотосинтетически активной радиации. Максимум дыхания отмечается в ночное время [1, 17]. Главным продуктом фотосинтеза и главным субстратом дыхания является маннит, а также в меньших количествах аланин, аспартат, глутамат и малат. Яйцеклетки и особенно спермии продуцируют больше аминокислот, чем эмбрионы и взрослые растения. Образование сложных полисахаридов в темноте происходит из запасного маннита, а на свету, вероятно, из каких-либо общих предшественников или из небольшого изолированного пула маннита, отделенного от главных клеточных ресурсов [10, 18].

Пигментированы и способны к фотосинтезу не только взрослые растения, но и яйцеклетки и спермии. *F. vesiculosus* – двудомное растение; во время прилива созревшие гаметы выходят из концептакулов в воду, где и происходят процессы оплодотворения яйцеклеток и прорастания зигот. Таким образом, на всех стадиях развития зиготы не связаны с материнскими тканями и легко доступны для исследований. Размножение происходит в период с середины июля по начало сентября, и в это время возможно получение больших количеств яйцеклеток и антерозоидов. Яйцеклетки могут быть практически одновременно оплодотворены, а полученная таким образом синхронная культура зигот и эмбрионов поддерживается

длительное время (до нескольких месяцев). Вследствие способности к фотосинтезу яйцеклетки могут несколько дней жить самостоятельно. «Старые» яйцеклетки (24 ч и более после выхода из оогониев) фотосинтезируют несколько слабее. Спермии фотосинтезируют менее интенсивно, чем яйцеклетки, и продолжительность их жизни не превышает нескольких часов. Зиготы и эмбрионы полностью фотосинтетически компетентны. Известно, что после оплодотворения (ПО) фотосинтетический метаболизм яйцеклеток изменяется: сразу ПО количество фиксируемого  $\text{CO}_2$  немного падает, а затем скорость фотосинтеза начинает возрастать [18]. Однако точная динамика изменений фотосинтетических параметров *F. vesiculosus* в эмбриогенезе до сих пор не исследована. Кроме того, остаются совершенно не изученными возможные эндогенные факторы, регулирующие развитие и деятельность ассимиляционного аппарата водорослей.

Целью настоящего исследования явилось изучение динамики фотосинтетических параметров у гамет, зигот и эмбрионов *F. vesiculosus* и действия ряда экзогенных фитогормонов и других физиологически активных веществ на развитие ассимиляционного аппарата водорослей.

В качестве объекта использовали спермии, яйцеклетки, зиготы и эмбрионы фукуса пузырчатого (*Fucus vesiculosus* L.), собранные в районе Морской биологической станции СПбГУ (Белое море). Сбор материала проводили в июле–августе 2002–2003 гг. Зрелые рецептакулы собирали в средней и нижней зонах литорали во время отлива, промывали чистой морской водой, обсушивали фильтровальной бумагой и хранили в течение 2–3 недель в темноте при температуре 4–10°C. Получение гамет и оплодотворение осуществляли в основном по стандартной методике [15, 19]. В дальнейшем развивающиеся зиготы и эмбрионы содержали в фильтрованной морской воде в чашках Петри на свету при температуре 12–16°C.

Для изучения динамики фотосинтетических параметров использовали спермии (1 ч после выхода из антеридиев), яйцеклетки (2, 12, 24 ч после выхода из оогониев), зиготы (3, 6, 12 ч ПО) и эмбрионы (1, 2, 5, 10, 15 суток ПО). Средняя плотность суспензии спермиев составляла 1–2 млн/мл, яйцеклеток и зигот – 6–10 тыс./мл, эмбрионов – 1–5 тыс./мл. Прикрепившиеся к субстрату зиготы и эмбрионы ресуспендировали током воды: предварительные опыты (данные не приводятся) показали, что такая процедура не оказывает существенного влияния на фотосинтетическую активность водорослей.

Определяли интенсивность фотосинтеза и темнового дыхания, активность фотосистем (ФС) I и II и соотношение ФС I/ФС II. Все измерения проводили при температуре 16°C в камере объемом 13 мл с помощью кислородного электрода Кларка и полярографической установки. Активность фотосинтеза, дыхания и ФС II измеряли в суспензии интактных клеток или эмбрионов. Активность ФС II определяли с использованием в качестве акцептора электронов 1,4-п-бензохинона (Fluka) [7], активность ФС I – на препарате тилакоидных мембран по стандартной методике [2].

В опытах по изучению влияния физиологически активных веществ на интенсивность фотосинтеза зиготы обрабатывались фитогормонами (индолил-3-уксусная кислота, кинетин, 1 мг/л) и трофическими агентами (глюкоза, маннит, 5 г/л). Обработку производили следующим образом. Сразу же после оплодотворения зиготы в чашке Петри несколько раз промывали раствором соответствующего вещества, затем заливали тем же раствором и оставляли на 24 ч, после чего определяли активность фотосинтеза, дыхания и ФС I и II.

Опыты проводились в 4 биологических повторностях. На гистограммах представлены средние арифметические значения величин и доверительные интервалы для 95%-ной вероятности. Активности приведены в расчете на тысячу клеток – для яйцеклеток и зигот, на тысячу особей – для эмбрионов и на 50 млн клеток – для спермиев (спермии *F. vesiculosus* приблизительно в 50 тыс. раз мельче яйцеклеток).

Полученные нами данные (рис. 1) показывают, что интенсивность газообмена и соотношение активностей ФС I и II существенно изменяются в ходе эмбриогенеза. Соотношение интенсивности фотосинтеза и темного дыхания в пересчете на одинаковый объем материала у яйцеклеток и спермиев существенно различается (рис. 1, А). Особенно заметно различие по интенсивности поглощения кислорода: спермии дышат более чем в 3 раза активнее яйцеклеток. Вероятно, это связано с гораздо меньшей продолжительностью жизни спермиев (3–4 ч после выхода из антеридиев). Они имеют ограниченный запас дыхательных субстратов, который полностью используется в эти часы для работы жгутиков и активного движения в поисках яйцеклеток [18].

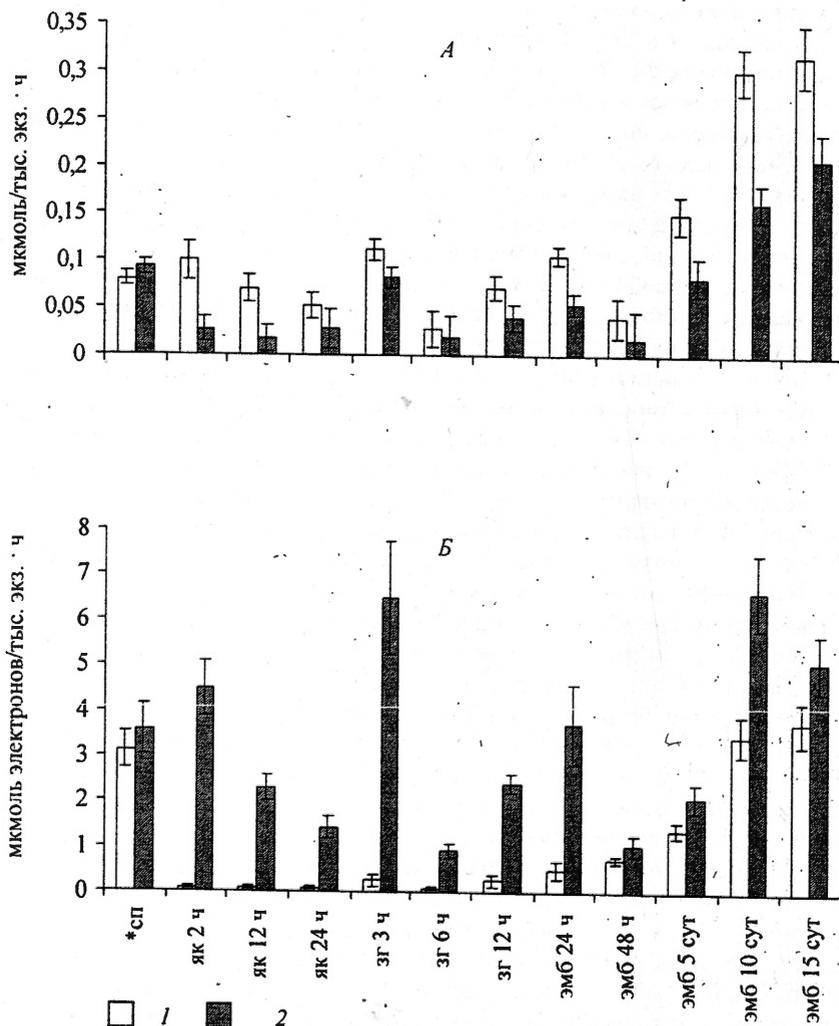


Рис. 1. Динамика интенсивности фотосинтеза и дыхания (А) и активностей фотосистем I и II (Б) у гамет, зигот и эмбрионов *F. vesiculosus*.

А: 1 – фотосинтез; 2 – дыхание; Б: 1 – фотосистема I; 2 – фотосистема II (то же для рис. 2); сп – спермии; як – яйцеклетки; зг – зиготы; эмб – эмбрионы; \* – для спермиев значения приведены в расчете на 50 млн клеток (пояснения в тексте).

Что касается выделения кислорода, то, в отличие от яйцеклеток, у спермиев совершенно отсутствует «видимый» фотосинтез, хотя степень сопряжения фотосистем у них значительно выше (рис. 1, Б). Возможно несколько вариантов объяснения этого явления. Известно, что ФС I может функционировать без подключения ФС II, синтезируя АТФ в процессе циклического фосфорилирования. При этом не происходит выделения кислорода. Работа же ФС II не ведет напрямую к образованию энергии, а приводит к накоплению субстратов дыхания. Можно предположить, что наблюдаемая нами потенциальная активность ФС II у спермиев в действительности не реализуется полностью, поскольку для них предпочтительнее более прямой и короткий путь получения АТФ. Почти полное компенсирование поглощения кислорода у спермиев в этом случае может быть следствием не фотосинтеза, а подавления дыхания на свету [3].

Однако возможен и другой вариант – у спермиев действительно происходит фотосинтез с участием обеих ФС, который вносит вклад в генерацию энергии для поддержания жизнедеятельности клетки и работы жгутиков. Интенсивность же работы фотосинтетического аппарата невысока, поскольку основным источником энергии являются все же запасные питательные вещества. Активность газообмена и ФС I и II яйцеклеток фукуса максимальна в первые 2 ч после выхода клеток из оогониев. В дальнейшем происходит постепенное снижение интенсивности фотосинтетических процессов. Известно, что продолжительность жизни яйцеклеток в редких случаях превышает 48 ч [18, 19], и даже 24-часовые гаметы, как правило, не способны к успешному оплодотворению. Вероятно, к этому времени деградация ассимиляционных систем достигает такого уровня, при котором клетки уже не могут обеспечить нормальное развитие зиготы.

В дальнейшем динамика газообмена и активности систем световой фазы фотосинтеза развивающихся зигот и эмбрионов имеет волнообразный характер, с максимумами через 3 и 24 ч ПО. Примерно в это же время происходят первые решающие события в развитии фукуса. Через 3 ч ПО зиготы начинают выделять адгезивный материал, необходимый для прикрепления клетки к субстрату, и приобретают способность воспринимать внешние полярирующие факторы, под действием которых формируется первичная ось полярности организма, закладывающая основу для дальнейшего морфогенеза [14, 19, 20]. А приблизительно через 20 ч ПО происходит первое деление зиготы, формирующее две морфологически и функционально различные клетки, дающие начало таллому и ризоиду водоросли [19, 20].

Таким образом, можно предположить, что периодическое повышение активности ассимиляционных систем зигот и эмбрионов фукуса служит для дополнительного обеспечения клеток энергией и субстратами для биосинтезов во время важнейших событий эмбриогенеза. Начиная с 5 суток ПО интенсивность работы ассимиляционного аппарата непрерывно возрастает. Это период, когда мелкие клетки, образовавшиеся в ходе дробления зиготы, активно дифференцируются, и одна из крупных внутренних клеток начинает расти, формируя первый апикальный волосок эмбриона. Апикальные волоски растут за счет интеркалярной меристемы в основании, и одна из базальных клеток волоска в конце концов становится апикальной меристематической клеткой взрослого растения [13]. Отношение активностей ФС I и II в эмбриогенезе непрерывно возрастает. Если у яйцеклеток и у «молодых» зигот эта величина не превышает 0,1, то через 15 суток после оплодотворения она достигает 0,75. Очевидно, это свидетельствует о растущей степени сопряжения фотосистем и повышении доли потенциальной активности ФС II, используемой при генерации восстановителей для синтетических процессов.

Полученные нами данные показывают, что экзогенное воздействие на зиготы *F. vesiculosus* фитогормонами и трофическими агентами оказывает существенное влияние на интенсивность работы ассимиляционного аппарата (рис. 2). Обработка зигот цитокинином приводит к значительному увеличению интенсивности фотосинтеза и дыхания (рис. 2,

А) и активности ФС I (рис. 2, Б). Также возрастает и отношение ФС I / II (от 0,13 (в контрольном варианте) до 0,53), что означает большую степень использования потенциальной активности ФС II (рис. 2, Б).

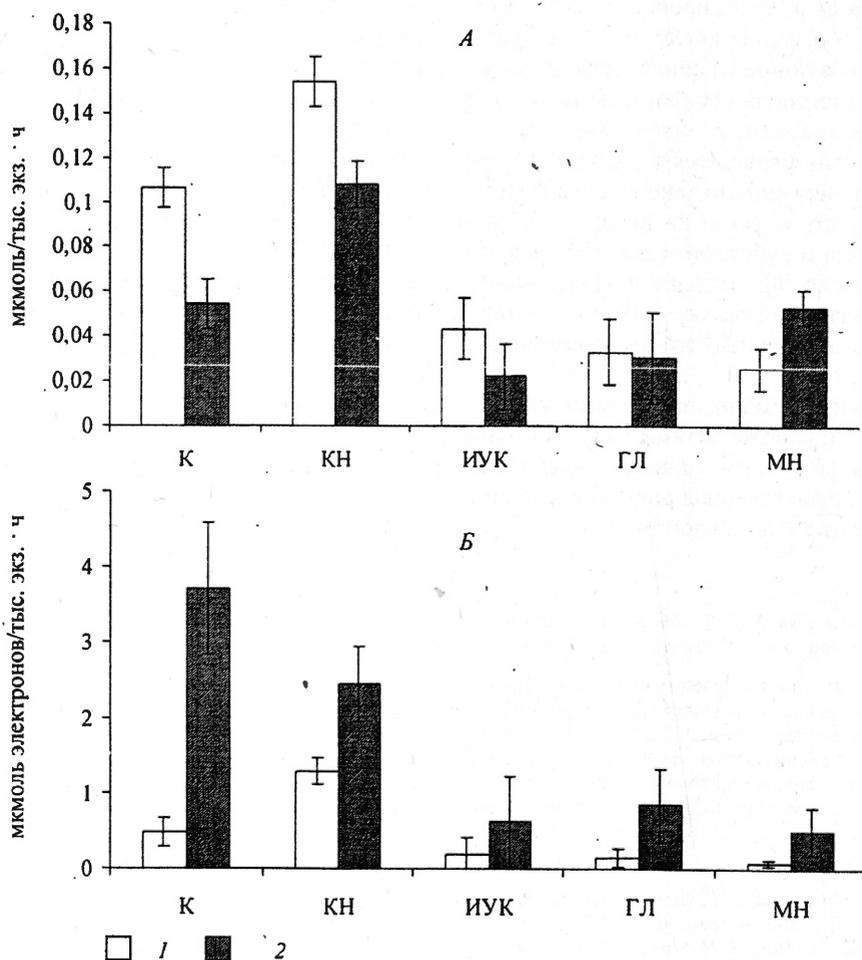


Рис. 2. Влияние физиологически активных веществ на интенсивность фотосинтеза и дыхания (А) и активность фотосистем I и II (Б) у 24-часовых эмбрионов *F. vesiculosus*.

К – контроль; КН – кинетин (1 мг/л); ИУК – индолил-3-уксусная кислота (1 мг/л); ГЛ – глюкоза (5 г/л); МН – маннит (5 г/л).

Известно, что у высших растений цитокинины регулируют ряд физиологических процессов, связанных с деятельностью ассимиляционного аппарата, таких как старение листьев и образование пластид [4, 9, 11]. Экзогенная обработка цитокининами подавляет деградацию хлорофилла и фотосинтетических белков и стимулирует дестеиоляцию. Эти гормоны влияют на многие белки, закодированные в ядерном и пластидном геномах, в том числе на малую субъединицу Рубиско и ряд хлорофилл-связывающих белков светособирающего комплекса [9, 22]. Вероятно, подобные функции стимулирования фотосинтетических процессов цитокинины могут выполнять и у бурых водорослей, в которых они также

были обнаружены [23, 24]. Индолил-3-уксусная кислота в наших экспериментах, напротив, действовала как ингибитор всех фотосинтетических процессов. Объяснение такого эффекта представляется на данный момент весьма проблематичным. Можно высказать предположение, что под влиянием ауксина основная часть ресурсов клетки затрачивается на усиление процессов дифференцировки и роста, а не на обслуживание фотосинтетического аппарата. Индолил-3-уксусная кислота была обнаружена как в вегетативных тканях, так и в гаметах фукусовых в концентрациях, сравнимых с содержанием гормона в тканях высших растений [5, 8], и экзогенная обработка этим гормоном действительно способствует ускорению дифференцировки зигот *F. vesiculosus* [5, 6].

Использовавшиеся в данном исследовании трофические агенты (глюкоза и маннит) вызывали снижение интенсивности фотосинтеза и активности ФС I и II, однако не оказывали значимого эффекта на интенсивность дыхания. Маннит является основным продуктом фотосинтеза и субстратом дыхания у фукусовых [10, 18], и при повышении его концентрации, вероятно, происходит ингибирование фотосинтетических процессов по принципу обратной связи. Поскольку сходная реакция получена и в случае обработки зигот глюкозой, можно предположить, что она также может усваиваться фукусом и служить субстратом для дыхания.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что динамика интенсивности работы ассимиляционного аппарата зигот и эмбрионов *F. vesiculosus* отражает основные физиологические и морфогенетические процессы раннего развития водоросли. Вероятно, существенная роль в регуляции деятельности фотосинтетических систем принадлежит растительным гормонам.

## Summary

Tarakhovskaya E. R., Maslov Y. I. The influence of some physiologically active substances on assimilation apparatus development of *Fucus vesiculosus* L. embryos

The dynamics of photosynthesis and respiration intensity and Photosystem I and II activity was investigated during the *F. vesiculosus* L. embryo development. Also the phytohormones (indole-3-acetic acid (IAA) and kinetin, 1 mg/l) and nutrients (sucrose, mannitol, 5 g/l) influence on the embryos photosynthetic parameters was studied. Kinetin increases the activity of photosynthesis and respiration systems; IAA has the opposite effect. Sucrose and mannitol decrease the photosynthesis intensity and have no influence on cells respiration. It is supposed that plant hormones play an important role in the regulation of the fucus embryos photosynthetic processes.

## Литература

1. Возжинская В. Б. Донные макрофиты Белого моря. М., 1986.
2. Методы изучения мембран растительных клеток // Л., 1986.
3. Мокроносоев А. Т., Гавриленко В. Ф. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты. М., 1992.
4. Полевой В. В. Фитогормоны. Л., 1982.
5. Полевой В. В., Тараховская Е. П., Маслов Ю. И., Полевой А. В. Роль ауксина в индукции полярности у зигот *Fucus vesiculosus* L. // Онтогенез. 2003. Т. 34, № 6. С. 432–437.
6. Тараховская Е. П., Маслов Ю. И., Полевой В. В. Влияние некоторых физиологически активных веществ на прорастание зигот *Fucus vesiculosus* L. // Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 3. 2002. Вып. 4 (№ 27). С. 125–129.
7. Allakhverdiev S. I., Atsushi S., Yoshitaka N., Norio M. Inactivation of Photosystems I and II in Response to Osmotic Stress in *Synechococcus*. Contribution of Water Channels // Plant Physiol. 2000. Vol. 122. P. 1201–1208.
8. Basu S., Sun H., Brian L., Quatrano R. L., Muday G. K. Early embryo development in *Fucus distichus* is auxin sensitive // Plant Physiol. 2002. Vol. 130, N 1. P. 292–302.
9. Benkova E., Witters E., Van Dongen W., Kolar J., Motyka V., Brzobohaty B., Van Onckelen H. A., Machackova I. Cytokinins in Tobacco and Wheat Chloroplasts. Occurrence and Changes Due to Light/Dark Treatment // Plant Physiol. 1999. Vol. 121. P. 245–251.
10. Bidwell R. G. S. Photosynthesis and metabolism in marine algae. VII. Products of photosynthesis in fronds of *Fucus vesiculosus* and their use in respiration // Can. J. Bot. 1967. Vol. 45, N 9. P. 1557–1565.
11. Binns A. N. Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic and molecular approaches // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1994. Vol. 45. P. 173–196.
12. Collen J., Davison I. R. Seasonality and thermal acclimation of reactive oxygen metabolism in *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae) // J. Phycol. 2001. Vol. 37. P. 474–481.
13. Galun E., Torrey J. G. Initiation and suppression of apical hairs of *Fucus* embryos // Dev. Biol. 1969. Vol. 19. P. 447–459.
14. Hable W. E., Kropf D. L. Roles of secretion and cytoskeleton in cell adhesion and polarity establishment in *Pelvetia compressa* zygotes // Devel. Biol. 1998. Vol. 198. P. 45–65.
15. Jaffe L. F., Neuscheler W. On the

mutual polarization of nearby pairs of Fucaceous eggs // *Develop. Biol.* 1969. Vol. 19, N 6. P. 549–565. 16. Kawamitsu Y., Boyer J. S. Photosynthesis and carbon storage between tides in a brown alga, *Fucus vesiculosus* // *Marine Biology*. 1999. Vol. 133. P. 361–369. 17. McLachlan J. Effects of temperature and light on growth and development of embryos of *Fucus edentatus* and *F. distichus ssp. distichus* // *Can. J. Bot.* 1974. Vol. 52, N 5. P. 943–951. 18. McLachlan J. Photosynthesis of eggs, sperm, zygotes and embryos of *Fucus serratus* // *Can. J. Bot.* 1978. Vol. 56, N 4. P. 371–373. 19. Quatrano R. S. Developmental biology: development in marine organisms // *Experimental marine biology* / Ed. by R. N. Mariscal. New York; London. 1974. 20. Quatrano R. S. Development of cell polarity // *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 1978. Vol. 29. P. 487–510. 21. Passaquet C., Thomas J. C., Caron L. et al. Light-harvesting complexes of brown algae. Biochemical characterization and immunological relationships // *FEBS Lett.* 1991. Vol. 280, N 1. P. 21–26. 22. Shu-Qing C., Rong-Xian Z., Wei L., Zhi-Rui D., Qi-Ming Z. The Involvement of Cytokinin and Abscisic Acid levels in roots in the regulation of photosynthesis function in flag leaves during grain filling in super high-yielding Rice (*Oryza sativa*) // *J. Agronomy & Crop Science*. 2004. Vol. 190. P. 73–80. 23. Stirk W. A., Van Staden J. Isolation and identification of cytokinins in a new commercial seaweed product made from *Fucus serratus* L. // *J. Applied Phycol.* 1997a. Vol. 9. P. 327–330. 24. Stirk W. A., Van Staden J. Comparison of cytokinin- and auxin-like activity in some commercially used seaweed extracts // *J. Applied Phycol.* 1997b. Vol. 8. P. 503–508.

Статья поступила в редакцию 17 июня 2004 г.