

УДК 581.1

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ В КЛЕТОЧНОМ ЦИКЛЕ СИНХРОННОЙ КУЛЬТУРЫ *CHLORELLA* IPPAS C-1

© 1994 г. Л. В. Назаренко, А. Я. Акыев, В. Е. Семененко

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва

Поступила в редакцию 11.10.93 г.

Изучали особенности динамики индолил-3-уксусной кислоты в клеточном цикле синхронной культуры одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella* sp. K IPPAS C-1. Показано, что взрослые клетки содержали в 1.4 раза больше ИУК, чем автоспоры. Содержание внутриклеточной ИУК коррелировало с увеличением размеров клеток и биосинтезом ДНК в клеточном цикле хлореллы. В среде содержание ИУК было значительно ниже, чем в клетках. По-видимому, ИУК принимает участие в процессах роста клеток растяжением и в прохождении фаз клеточного цикла *Chlorella* sp. K.

Chlorella – клеточный цикл – синхронная культура – фитогормоны

В последние десятилетия накоплен огромный материал по действию ростовых веществ на онтогенез растений [1 - 4]. Проблемы регулирования метаболических процессов в растительном организме с помощью фитогормонов успешно решаются на высших растениях [5 - 7]. Было показано, что водоросли также содержат фитогормоны – индолил-3-уксусную кислоту, абсцизовую кислоту, цитокинины, гиббереллины [8 - 13]. Однако функции ростовых веществ у низших растений изучены слабо. В то же время, низшие растения, особенно зеленые одноклеточные водоросли, представляют собой удобный объект для таких исследований. Для одноклеточных водорослей характерны короткий цикл развития, быстрый рост, интенсивный обмен, лабильный метаболизм, быстрая адаптивная реакция на изменение условий окружающей среды. В настоящее время появляются тенденции использовать одноклеточные растительные организмы, в том числе и хлореллу, для изучения ряда тонких механизмов и процессов на клеточном уровне. Этому способствует появление техники синхронного культивирования водорослей, позволяющей изучать отдельные процессы в онтогенезе клетки.

Целью данного исследования было изучение динамики содержания ИУК в клеточном цикле (онтогенезе) синхронной культуры одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella* для выяснения возможного механизма действия фитогормона у низших фотосинтезирующих организмов.

Адрес для корреспонденции: Назаренко Людмила Владимировна. 127276 Москва, ул. Ботаническая, 35, Институт физиологии растений РАН.

МЕТОДИКА

Объектом исследований была культура одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella* sp. K (*Chlorella vulgaris* Beijer. var. *vulgaris* IPPAS C-1) из коллекции одноклеточных микроводорослей Института физиологии растений РАН. Выращивание микроводорослей проводили, как описано в работе Владимировой и Семененко [14]. Среда выращивания – среда Тамия (1/2 концентрации) с нитратным азотом, на дистиллированной воде, pH 6.0 - 7.0. Для получения синхронной культуры *Chlorella* использовали метод, описанный в работе Цоглина и Клячко-Гурвич [15]. Культуру предварительно выращивали в накопительном режиме в культуральных сосудах при освещении 40 Вт/м², температуре 37°C и при непрерывном продувании суспензии воздухом, содержащим 2% CO₂. Плотность культуры поддерживали на уровне 250 - 300 млн. клеток/мл. Затем культуру переливали в плоский сосуд, объемом 700 мл, с толщиной слоя суспензии 2 см, доводя плотность суспензии до 7 - 10 млн. клеток/мл. Интенсивность света на поверхности сосуда составляла 350 Вт/м². Свет и темноту чередовали 7 и 5 ч, соответственно, что вызывало синхронизацию культуры. После полной синхронизации культуры следовал “рабочий цикл”, в течение которого пробы были взяты в 5 точках. Свет в период “рабочего цикла” не выключали. В этом цикле начальная плотность суспензии была 130 млн./мл. При данной плотности культуры деление происходило на 8 - 9-м часу от начала освещения.

В экспериментах измеряли следующие параметры роста культуры: число клеток, сухую биомассу, размеры клеток, а также содержание в

клетках ДНК и содержание ИУК в клетках и в культуральной среде.

Для определения сухой биомассы клетки водорослей предварительно отделяли от среды выращивания центрифугированием, затем промывали дистиллятом и высушивали при 105°C. Численность клеток определяли путем их счета в камере Горяева. Размер клеток измеряли с помощью окуляр-микрометра. В среднем в каждой точке проведено измерение 50 - 65 клеток.

Для определения ДНК клетки предварительно фиксировали формальдегидом, затем окрашивали акридиновым оранжевым и измеряли их флуоресценцию при 540 нм на микроспектрофлуориметре МСФ-2 [16].

Замороженный растительный материал растирали в ступке при 4°C до гомогенного состояния. Экстракцию свободных ростовых веществ из клеток водорослей проводили этиловым спиртом [7], а из культуральной среды – серным эфиром при pH 3.0 - 4.0 [18]. Содержание ИУК в клетках и в среде определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа [19, 20]. Количественное определение фитогормонов с помощью иммуноферментного анализа основывается на конкуренции за места связывания с антителами между свободным гормоном и гормоном, конъюгированным с белком и сорбированным на полистироловых планшетах. Конъюгат ИУК с овальбумином разводили в 0.05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9.7, наносили по 200 мкл в каждую лунку полистирольного планшета (Опытнo-экспериментальный завод ВНИИ Медтехники Минздрава СССР) и выдерживали в течение ночи при 4°C (сенсбилизация). При этом происходила сорбция конъюгированного гормона стенками планшета. Избыток конъюгата смывали 0.01 М Na-фос-фатным буфером с 0.15 М NaCl, pH 7.4, содержащим 0.05% Тритон X-100. В лунки вносили кроличью антисыворотку, разведенную в том же буфере, с добавкой 0.5% овальбумина, затем добавляли растворы различных веществ, иммунореактивность которых необходимо было оценить. После инкубации в течение 1 ч при 37°C количество антител, специфически связанных на планшете, оценивали при помощи ослиных диагностических антител против иммуноглобулинов кролика, меченных пероксидазой (Институт эпидемиологии и микробиологии, Москва). При определении ферментативной активности связавшейся пероксидазы в качестве субстрата использовали H₂O₂, а в качестве хромогена – ортофенилендиамин. Интенсивность окраски – хромофорный ответ – измеряли при 492 нм на спектрофотометре Multiskan MCC-340 ("Flow", Великобритания).

В работе были использованы ИУК, Тритон X-100 фирмы "Serva" (Германия), остальные реактивы и соли были отечественного производства, квалификации х.ч.

Проведено два эксперимента, в 3-х повторностях. Данные, представленные на рисунках, статистически обработаны. Среднеквадратичная ошибка аналитических повторов при определении ИУК и ДНК не более 5 - 10%, P = 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В синхронной культуре в опытах Lorenzen с авт. [21] на протяжении всего светового периода число клеток не менялось, деление происходило в темноте. На рис. 1 представлена динамика роста клеток культуры *Chlorella* sp. K. При начальной плотности засева 130 млн/мл в течение 8 ч от начала опыта в наших условиях также происходило лишь незначительное увеличение числа клеток в суспензии (5 - 10%), затем к 9-му ч оно резко возрастало, в среднем в 4 раза (рис. 1, кривая 3). Этот факт подтверждает то, что исследуемая в опыте культура микроводорослей *Chlorella* была синхронной.

Как видно из рис. 1 кривая 2, в течение всего клеточного цикла происходило накопление сухой биомассы. Наибольший прирост сухой биомассы наблюдался в конце клеточного цикла, тогда как во многих случаях максимум удельной скорости накопления биомассы приходится на более ранний период [22, 23]. Возможно, это связано с тем, что исходная плотность культуры в наших экспериментах была более высокой.

На рис. 1 (кривая 1) представлено изменение величины сухой массы клетки в течение клеточного цикла. Сухая масса клеток возрастала в течение первых 8 ч клеточного цикла. Отмечено, что после деления сухая масса образовавшихся автоспор примерно равна исходному весу автоспор в начале опыта.

Характерной особенностью синхронно развивающейся культуры является то, что в определенные отрезки времени в ней преобладают клетки одного размера [22]. На рис. 2 представлен график изменения средних размеров клеток хлореллы в течение жизненного цикла. В начале опыта диаметр автоспор составлял в среднем 3 мкм, затем к 8-му ч клетки достигали максимального размера (5.0 мкм). Средние размеры автоспор после деления клеток (9 ч) составляли 2.8 мкм. Размер клеток увеличивался значительно всего в период с 3 до 6 ч. Отмечено соответствие между фазами развития клеток в ходе клеточного цикла и изменением их размеров.

Линькова [24] наблюдала на *Chlorella pyrenoidosa*, что после 3-го часа культивирования происходило увеличение размеров клеток (фаза взрослых клеток). После того, как клетка достигала своего максимального размера (8 - 9 мкм), увеличение размеров прекращалось и в ней происходили структурные изменения, связанные с началом образования дочерних клеток.

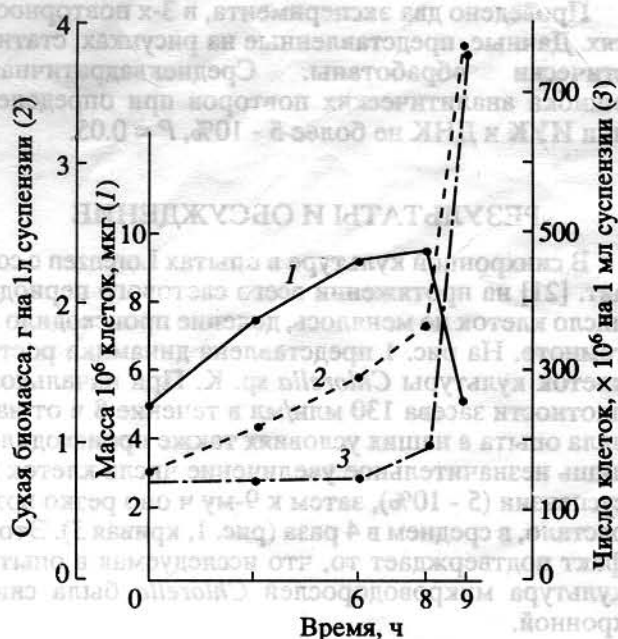


Рис. 1. Динамика роста клеток в ходе клеточного цикла синхронной культуры *Chlorella* sp. K.

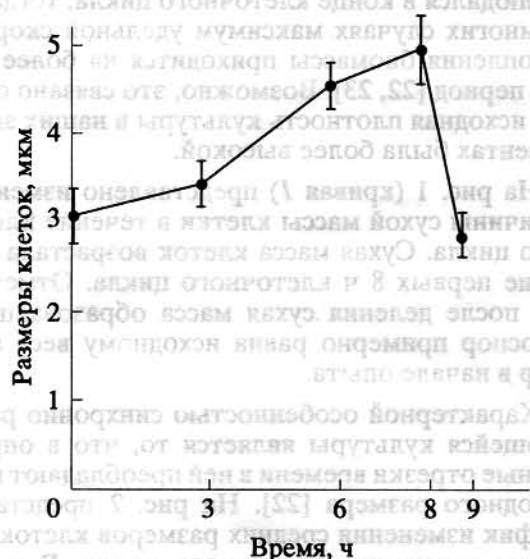


Рис. 2. Изменение средних размеров клеток *Chlorella* sp. K в течение клеточного цикла.

Известно, что клеточный цикл эукариотических организмов состоит из 4 основных частей — деления (фаза D или M), пресинтетической фазы G₁, фазы S, в течение которой реплицируется ДНК, и постсинтетической фазы G₂, после завершения которой клетка делится [22, 25].

Для определения митотических фаз клеточного цикла в клетках *Chlorella* измеряли содержание ДНК (рис. 3). Для этого предварительно фиксированные клетки окрашивали акридиновым оранжевым и просматривали на флуоресцентном микроскопе, как описано выше. Фазы митотического цикла соответствовали фазам клеточного

цикла у *Chlorella* [21]. К 3-му часу клеточного цикла содержание ДНК в клетках не менялось, свидетельствуя, что клетки находились в пресинтетическом периоде (G₁-фазе) митотического цикла.

Далее с 3-го часа отмечалось увеличение содержания ДНК в клетках, которое продолжалось до 8-го часа. Таким образом, клетки проходили с 3 до 8 ч период синтеза ДНК, то есть находились в синтетическом периоде (S-фазе) митотического цикла. Переход клеток к делению после 8 ч клеточного цикла сопровождался снижением содержания ДНК в образовавшихся клетках до исходного, свойственного автоспорам, уровня.

Горюнова и сотр. [22] отмечали, что основное количество ДНК, которое затем будет распределено по всем дочерним клеткам, накапливается в период созревания клетки, до ядерного деления. Wanka [26] предполагал наличие в жизненном цикле хлореллы эндоредупликации ядерного ДНК, приводящей к временному состоянию полиплоидии. Однако дальнейшие работы [27, 28] убедительно доказали последовательное чередование нескольких раундов синтеза ДНК и митозов у хлореллы.

Имея в виду специфику развития и деления клеток *Chlorella*, которая состоит в последовательных делениях на 2-4-8 автоспор и дальнейшим одновременным их выходом из материнской клетки, наблюдаемое линейное возрастание содержания ДНК с 3 по 8 час является на самом деле интегральным показателем. Этот показатель включает в себя ряд последовательных процессов репликации ДНК, G₂-периодов и митозов. Поэтому S_{int} можно записать как ряд последовательно идущих митотических циклов автоспор:

$$S_{int} = S'G_2M' + S''G_2''M'' + \dots + S^nG_2^nM^n.$$

Согласно данным других авторов [22, 25], по динамике содержания ДНК у водорослей обычно выделяют G₁- и S-периоды. Для S-периода характерна функциональная и фотосинтетическая активность клетки [22, 23]. G₂-период выражен неявно или отсутствует вообще, в связи с этим трудно бывает разделить G₂- и M-периоды [22, 25]. В наших опытах также G₂- и M-периоды разделить не удалось. Возможно, это связано с коротким циклом развития у данного штамма *Chlorella*, а также со спецификой самой культуры, в которой клетки образуют автоспоры в результате нескольких последовательных митозов.

Имеется достаточно данных о влиянии ауксинов на рост растяжением и корнеобразование у высших растений [1 - 4]. С помощью культур растительных тканей и клеток также раскрываются многие закономерности биосинтеза и инактивации ауксинов, биохимические основы их действия на деление [29, 30]. Что же касается одноклеточных водорослей, то исследования в этой области ограничиваются изучением влияния экзогенного

ИУК на накопление биомассы и рост числа клеток.

В связи со сказанным и приведенными выше результатами по митотическому циклу было осуществлено исследование динамики содержания ИУК в онтогенезе синхронной культуры *Chlorella* sp. K. Было показано, что в течение клеточного цикла происходило изменение внутриклеточного содержания ИУК (рис. 4). До 3-го часа развития содержание ИУК в клетках изменялось незначительно. Затем происходило увеличение содержания ИУК, которое достигало максимума к 8-му часу клеточного цикла *Chlorella*. Максимальное содержание ИУК отмечено у клеток, находящихся в конце S-фазы клеточного цикла, оно составляло 0.75 мкг/г сухого веса. После клеточного деления содержание фитогормона снижалось. Автоспоры в среднем содержали 0.53 мкг/г сухого веса.

Ранее на синхронной культуре *Chlorella pyrenoidosa* также было показано, что в течение клеточного цикла содержание ИУК менялось. Эндогенный уровень ИУК во взрослых клетках был в два раза выше, чем в автоспорах [9].

Для понимания роли фитогормона в регуляции роста культуры микроводорослей большое значение имеет сопоставление динамики содержания ИУК с динамикой роста культуры и содержания ДНК. Сопоставление этих данных показывает, что содержание ИУК в расчете на индивидуальную клетку практически не изменялось до начала серии последовательных циклов репликации ДНК и митозов. Переход клеток к S_{int}-фазе сопровождался, как видно из рис. 4, резким увеличением содержания ИУК в клетках. После деления материнской клетки и выхода из нее автоспор уровень ИУК в каждой из них приблизился к содержанию гормона в исходной автоспоре, т.е. происходило перераспределение фитогормона между отдельными автоспорами.

Как отмечает Гамбург и сотр. [29], в культуре клеток существенным фактором, оказывающим влияние на динамику содержания ауксинов в клетках, является рост биомассы. На первом этапе выращивания возрастание количества ИУК в культуре обычно превышало скорость роста биомассы, что приводило к увеличению содержания ИУК на единицу массы. Во второй половине ростового цикла в одних случаях не было отмечено уменьшения количества ИУК, и можно полагать, что снижение содержания ИУК происходило за счет ее "разбавления" растущей биомассой. В других случаях происходило уменьшение не только содержания ИУК, но и ее общего количества в культуре. Можно полагать, что в этих случаях помимо "разбавления" изменение содержания ИУК определяется и другими процессами (инактивация, усиленное выделение в среду и др.) [29].

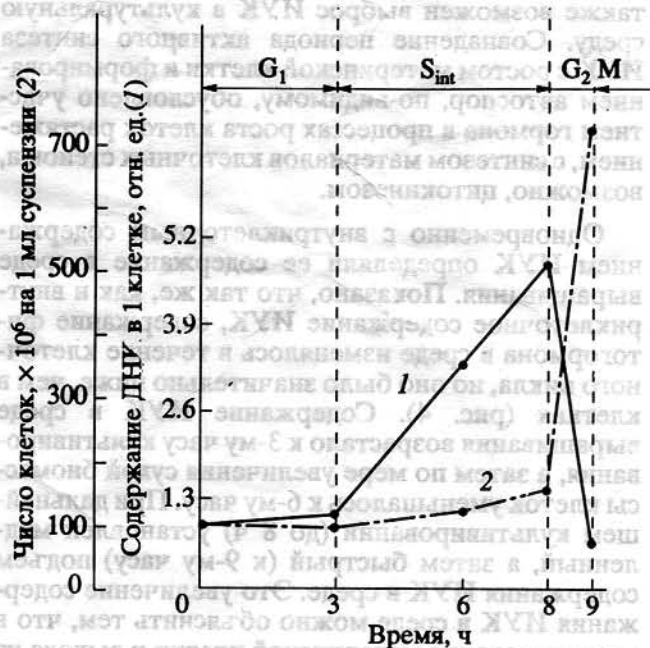


Рис. 3. Изменение содержания ДНК в ходе клеточного цикла *Chlorella* sp. K.

G₁, S_{int}, G₂, M – фазы митотического цикла, соответствующие фазам клеточного цикла.

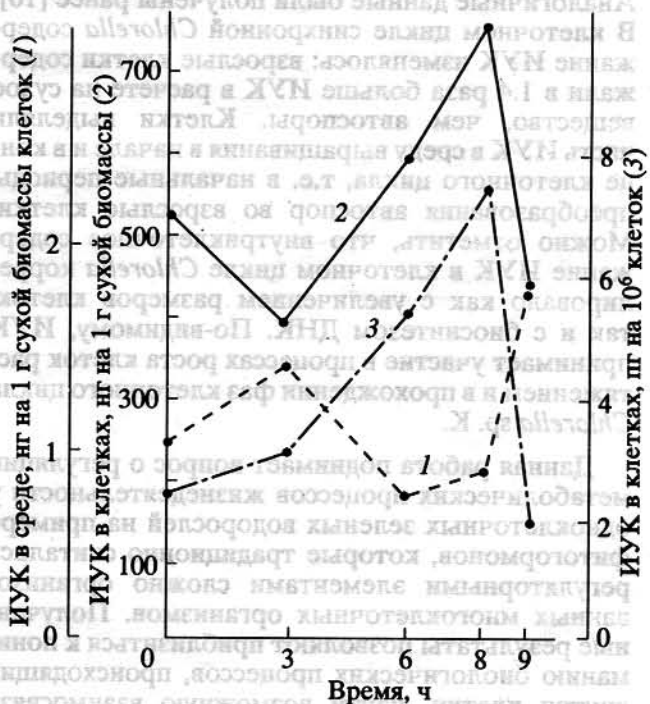


Рис. 4. Динамика содержания ИУК в клеточном цикле синхронной культуры *Chlorella* sp. K.

Отсутствие синтеза ИУК в G₁-периоде митотического цикла *Chlorella* sp. K. подтверждается тем, что не изменяется содержание ИУК в расчете на клетку и снижается – в расчете на сухую массу, свидетельствуя о том, что в этот период идет синтез других компонентов клетки, а

также возможен выброс ИУК в культуральную среду. Совпадение периода активного синтеза ИУК с ростом материнской клетки и формированием автоспор, по-видимому, обусловлено участием гормона в процессах роста клеток растяжением, с синтезом материалов клеточных стенок и, возможно, цитокинезом.

Одновременно с внутриклеточным содержанием ИУК определяли ее содержание в среде выращивания. Показано, что так же, как и внутриклеточное содержание ИУК, содержание фитогормона в среде изменялось в течение клеточного цикла, но оно было значительно ниже, чем в клетках (рис. 4). Содержание ИУК в среде выращивания возрастало к 3-му часу культивирования, а затем по мере увеличения сухой биомассы клеток уменьшалось к 6-му часу. При дальнейшем культивировании (до 8 ч) установлен медленный, а затем быстрый (к 9-му часу) подъем содержания ИУК в среде. Это увеличение содержания ИУК в среде можно объяснить тем, что в момент деления материнской клетки и выхода из нее автоспор возможен частичный выброс ИУК в среду выращивания.

Таким образом, одноклеточная зеленая водоросль *Chlorella* sp. К содержит фитогормон ИУК. Аналогичные данные были получены ранее [10]. В клеточном цикле синхронной *Chlorella* содержание ИУК изменялось: взрослые клетки содержали в 1.4 раза больше ИУК в расчете на сухое вещество, чем автоспоры. Клетки выделяли часть ИУК в среду выращивания в начале и в конце клеточного цикла, т.е. в начальные периоды преобразования автоспор во взрослые клетки. Можно отметить, что внутриклеточное содержание ИУК в клеточном цикле *Chlorella* коррелировало как с увеличением размеров клеток, так и с биосинтезом ДНК. По-видимому, ИУК принимает участие в процессах роста клеток растяжением и в прохождении фаз клеточного цикла *Chlorella* sp. К.

Данная работа поднимает вопрос о регуляции метаболических процессов жизнедеятельности у одноклеточных зеленых водорослей на примере фитогормонов, которые традиционно считались регуляторными элементами сложно организованных многоклеточных организмов. Полученные результаты позволяют приблизиться к пониманию биологических процессов, происходящих внутри клетки, найти возможную взаимосвязь между содержанием фитогормонов и функциональной активностью клетки. Изучение фитогормонов и механизма их действия у низших фотосинтезирующих организмов, представляя большой теоретический интерес, может иметь принципиальное значение в связи с практическим использованием микроводорослей.

Авторы выражают благодарность А.А. Котову за предоставленные сыворотки и А.Г. Мар-

келовой за помощь в освоении методики определения ДНК.

Работа частично финансировалась за счет средств Министерства науки России в рамках международного проекта "Фотоавтотрофные биосинтезы."

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гамбург К.З. Биохимия ауксина и его действие на клетки растений. Новосибирск: Наука, 1976. 271 с.
2. Полевой В.В. Фитогормоны. Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. 248 с.
3. Дёрфлинг К. Гормоны растений. Системный подход. М.: Мир, 1985. 283 с.
4. Davies P.J. Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. Dordrecht: Kluwer Acad. Publish., 1987. 681 p.
5. Муромцев Г.С., Чканников Д.И., Кулаева О.Н. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений. М.: Агропромиздат, 1987. 384 с.
6. Кефели В.И., Власов П.В., Прусакова Л.Д. и др. Природные и синтетические регуляторы онтогенеза растений // Итоги науки и техники / ВИНТИ. Сер. физиология растений. М., 1990. Т. 7. 156 с.
7. Гуськов А.В. Метаболизм ауксинов в растениях и его регуляция. // Итоги науки и техники / ВИНТИ. Сер. физиология растений. М., 1991. Т. 8. 156 с.
8. Jennings R.C. Gibberellins as Endogenous Growth Regulators in Green and Brown Algae // Planta. 1968. V. 80. № 1. P. 34.
9. Grotbeck L., Dwain Vance B. Endogenous Levels of Indole-3-acetic Acid in Synchronous Cultures of *Chlorella pyrenoidosa* // J. Phycol. 1972. V. 8. P. 272.
10. Таумс М.И. Физиологически активные внеклеточные метаболиты хлореллы и явление автостимуляции и автоингибирования роста в культурах микроводорослей: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: ИФР АН СССР, 1974. 36 с.
11. Mooney P.A., van Staden J. Algae and Cytokinins // J. Plant Physiol. 1986. V. 123. № 1. P. 1.
12. Tietz A., Kasprik W. Identification of Abscisic Acid in a Green Alga // Biochem. Physiol. Pflanzen. 1986. V. 181. № 4. P. 269.
13. Hirsch R., Hartung W., Gimmler H. Abscisic Acid Content of Algae under Stress // Botanica acta. 1989. V. 102. № 4. P. 326.
14. Владимирова М.Г., Семенов В.Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. М.: Изд-во АН СССР, 1962. 58 с.
15. Цоглин Л.Н., Клячко-Гурвич Г.Л. Изменение функциональной активности хлоропласта в клеточном цикле хлореллы // Физиология растений. 1980. Т. 27. Вып. 6. С. 1172.
16. Карнаухов В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. М.: Наука, 1978. 209 с.
17. Плотникова И.В. Экстракция и очистка индольных соединений // Рост растений и природные регуляторы. М.: Наука, 1977. С. 65.

18. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Под ред. Топачевского А.В. Киев: Наукова думка, 1975. С. 149.
19. Weiler E.W. Plant Hormone Immunoassays Based on Monoclonal and Polyclonal Antibodies // Modern Methods of Plant Analysis. New Ser. / Eds. Linskens H.F., Jackson J.F. Berlin: Springer-Verlag, 1986. V. 4. P. 1.
20. Катаева Н.В., Александрова И.Г. Карягина Т.Б., Машкова А.Х. Возможности метода иммуноферментного анализа для определения фитогормонов в культивируемых *in vitro* побегах // Физиология растений. 1990. Т. 37. Вып. 4. С. 813.
21. Lorenzen H., Hesse M. Synchronous Cultures // Algae Physiology and Biochemistry / Ed. Stewart W.D.P. Oxford: Black Well Sci. Publ., 1974. P. 894.
22. Горюнова С.В., Герасименко Л.М., Пушева М.А. Роль нуклеотидпептидов в клеточном делении водорослей. М.: Наука, 1980. 199 с.
23. Акыев А.Я., Цоглин Л.Н. Влияние кислорода на O_2 -газообмен и на рост биомассы клетки в цикле развития *Chlorella* // Физиология растений. 1992. Т. 39. Вып. 3. С. 495.
24. Линькова Е.А. Изучение морфологических фаз в жизненном цикле синхронной культуры хлореллы // Управляемый биосинтез. М.: Наука, 1966. С. 136.
25. Десницкий А.Г. Регуляция делений и синтеза ДНК у одноклеточных водорослей // Цитология. 1989. Т. 31. № 2. С. 148.
26. Wanka F. The Use of Colchicine in Investigation of the Life Cycle of *Chlorella* // Arch. Microbiol. 1965. V. 52. № 4. P. 305.
27. Wanka F., Mulders P.F.M. The effect of Light on DNA Synthesis and Related Processes in Synchronous Cultures of *Chlorella* // Arch. Microbiol. 1967. V. 58. № 3. P. 257.
28. John P.C.L., McCullough W., Atkinson A.W. et al. The Cell Cycle in *Chlorella* // The Cell Cycle in Development and Differentiation. Cambridge: Univ. Press, 1973. P. 61.
29. Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г. Ауксины в культурах тканей и клеток растений. Новосибирск: Наука, 1990. 243 с.
30. Гудков И.Н. Действие фитогормонов на продолжительность митотического цикла в клетках меристем // Регуляция клеточного цикла растений. Киев: Наукова думка, 1985. С. 6.

Представлено В.С. Дзюбенко