

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ ГИББЕРЕЛЛИНОВ ВОДОРΟΣЛЕЙ

Установлено наличие гиббереллинов в черноморских макрофитах *Gracilaria verrucosa* (A₂, A₄, A₉), *Ceramium rubrum* (A₃, A₂), *Ulva rigida* (A₂, A₄, A₉), смеси *Cystoseira barbata*+*Gracilaria verrucosa* (A₂, A₃, A₄, A₇, A₉). Получены экспериментальные данные по влиянию модельного ростового вещества гиббереллина A₃ на рост клеток и интенсивность флуоресценции хлорофилла "a" в культурах одноклеточных водорослей *Gymnodinium kowalevskii*, *Peridinium triquetrum*, *Dunaliella salina*, *Platimonas viridis*, *Olistodiscus luteus*. Показано, что ответные реакции водорослей зависят как от концентрации гиббереллина A₃, так и от сроков экспозиции.

Гиббереллины макрофитов (A₁, A₃, A₅, A₆) впервые были выделены из *Fucus vesiculosus* [17]. Впоследствии гиббереллиноподобные вещества были обнаружены у многих представителей Chlorophyta, Phaeophyta, Chrysophyta и Cyanophyta. Данных по содержанию гиббереллинов в черноморских макрофитах не имеется.

Целью настоящей работы является поиск методов для исследования экологической роли ростовых веществ в межорганизменных отношениях между макрофитами, которые являются источником гиббереллинов, и одноклеточными водорослями. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

- определить наличие гиббереллинов в черноморских макрофитах;
- оценить степень влияния гиббереллина A₃ на одноклеточные водоросли.

Наличие в макрофитах растворимых в морской воде гиббереллинов.

Известно, что содержание гиббереллинов в разных видах водорослей составляет 1-100 мкг·кг⁻¹ сырой массы. Однако до настоящего времени отработанной и рекомендуемой для работы с макрофитами методики выделения гиббереллинов не существует. Для выделения, очистки и разделения гиббереллинов разные исследователи применяют как разные экстрагенты, так и разные массообменные процессы [3,4,8,10,11]. Исходя из этого, нами были модифицированы и адаптированы под имеющиеся реактивы и оборудование различные этапы процесса из известных методик. При выделении гиббереллинов особое внимание мы уделяли процессу очистки, поскольку наличие ингибиторов может привести к отрицательному результату, который и был получен группой авторов [12] при исследовании гиббереллинов водорослей.

Гиббереллины в растениях находятся не только в форме соединений с различными физико-химическими свойствами, но и в свободном состоянии в виде кислот. В экспериментах с черноморскими макрофитами *Cystoseira barbata*, *Ceramium rubrum*, *Gracilaria verrucosa* и *Ulva rigida* мы использовали технику экстракции, которая предусматривает выделение всех групп гиббереллиноподобных веществ. Поскольку нас в первую очередь интересовали растворимые в морской воде гиббереллины, свежеобранные макрофиты после гомогенизации экстрагировали морской водой. После этого проводили осаждение белков этиловым спиртом, добавляя его к экстракту в соотношении 2:1. Осадок отделяли центрифугированием и отгоняли спирт под вакуумом на ротаторном испарителе, при температуре не превышающей 40°С. Водный остаток проверяли на pH и при необходимости корректировали до pH 7,0 фосфатным буфером (1 М, pH 8,0). Затем к пробе добавляли этилацетат (соотношение к водной фазе 1:3), в который переходит часть примесей и пигменты. Экстракцию повторяли несколько раз, затем водную фазу подкисляли серной кислотой до pH 2,5 и экстрагировали гиббереллиноподобные вещества этилацетатом.

Известно, что увеличение ионной силы раствора позволяет более полно экстрагировать гиббереллины этилацетатом. Поэтому молярность раствора изменяли фосфатным буфером, или добавлением NaCl. По окончании экстракции отгоняли большую часть этилацетата, пробу замораживали при -10°С в течение 12 часов. При этом вода вымораживалась в виде отдельных кристаллов, что позволило отделить жидкую

фазу (этилацетат с гиббереллиноподобными веществами). Окончательное удаление воды проводили сульфатом натрия. После отгонки этилацетата сухой остаток растворяли в этиловом спирте и использовали для тонкослойной хроматографии. Хроматографию проводили на пластинках Sulufol F254 размером 5x15 см. Предварительно пластинки промывали этилацетатом, высушивали и активировали при 120° С в течение 10 мин. После этого пластинку погружали вертикально в стакан с 5-ти % раствором серной кислоты в этиловом спирте на 20 сек, вынимали, встряхивали, подсушивали и использовали для хроматографии.

Для хроматографической очистки и разделения гиббереллинов на бумаге, в тонком слое силикагеля и кизельгура предложен ряд систем, однако для пластинок Sulufol F254 информация в литературе отсутствует. Поэтому нами были испытаны следующие системы: метанол-хлороформ (1:1 и 3:8), хлороформ, вода и этилацетат. Наиболее хорошее качество разделения было получено на этилацетате, который и был выбран для последующей работы.

В качестве свидетеля использовали стандартный очищенный препарат гиббереллина A_3 кристаллического (производство комбината «Синтез», ТУ 64-3-103-75, содержание A_3 82 %). Фактор разделения (R_f) свидетеля A_3 во всех случаях составлял 0,4-0,5.

При анализе пластинок в ультрафиолете показано, что в исследованных макрофитах, возможно, содержатся следующие гиббереллины: *Gracilaria verrucosa* - A_2 , A_4 , A_9 ; *Ceramium rubrum* - A_3 , A_2 ; *Ulva rigida* - A_2 , A_4 , A_9 ; Смесь *Cystoseira barbata*+*Gracilaria verrucosa* - A_2 , A_3 , A_4 , A_7 , A_9 .

Для окончательной идентификации обнаруженных гиббереллинов и их количественной оценки необходимо проведение дополнительных исследований с использованием специальных биотестов и аппаратуры для физико-химического анализа. При таких исследованиях надо иметь в виду, что содержание гиббереллинов в макрофитах может варьировать в зависимости от целого ряда факторов. Например, известно [19], что при исследовании активности гиббереллина A_3 в экстрактах из макрофитов *Ascophyllum nodosum*, *Fucus serratus*, *F. vesiculosus*, *Laminaria digitata*, *L. hyperborea* и *L. saccharina* были обнаружены характерные сезонные изменения. В качестве биотеста использовали удлинение coleoptилей салата. Показано, что в экстрактах *Fucaceae* (*A. nodosum*, *F. serratus* и *F. vesiculosus*) максимум активности гиббереллина A_3 выражен в октябре, а три исследованных вида *Laminaria* имели самую высокую активность гиббереллина A_3 в июле.

Действие экзогенных гиббереллинов на водоросли. Большинство работ по ростовым веществам водорослей посвящено пониманию физиологических потребностей культур и регулирующей роли ростовых веществ. К настоящему времени накоплен значительный объем информации по исследуемому вопросу, поэтому отметим лишь некоторые из обзорных работ [9,13,16].

В экспериментах мы использовали гиббереллин A_3 (производство комбината «Синтез», ТУ 64-3-103-75, содержание A_3 82%) в концентрациях 10, 50 и 100 мкг·л⁻¹. Опыты проводили на 5 культурах одноклеточных водорослей *Gymnodinium kowalevskii*, *Peridinium triquetrum*, *Dunaliella salina*, *Platimonas viridis*, *Olistodiscus luteus*. Культуры водорослей предоставлены из коллекции отдела экологической физиологии водорослей. Все измерения проводили по отношению к контролю в трех повторностях. Гиббереллин вносили однократно в начале эксперимента. Водоросли выращивали на среде Гольдберга при естественном освещении и комнатной температуре. При выполнении экспериментов и обработке данных использовали стандартные приемы.

Рост культур определяли по изменению численности клеток, которую измеряли с помощью счетчика микрочастиц "Пикоскель PS-4". Калибровку счетчика проводили на культуре *P. viridis*. Влияние гиббереллина A_3 оценивали также по изменению интенсивности флуоресценции хлорофилла "a" на фоне обработки культур водорослей диуроном. Интенсивность флуоресценции клеток измеряли на микроспектрофлуориметре [2] в модификации В.Б. Владимирова.

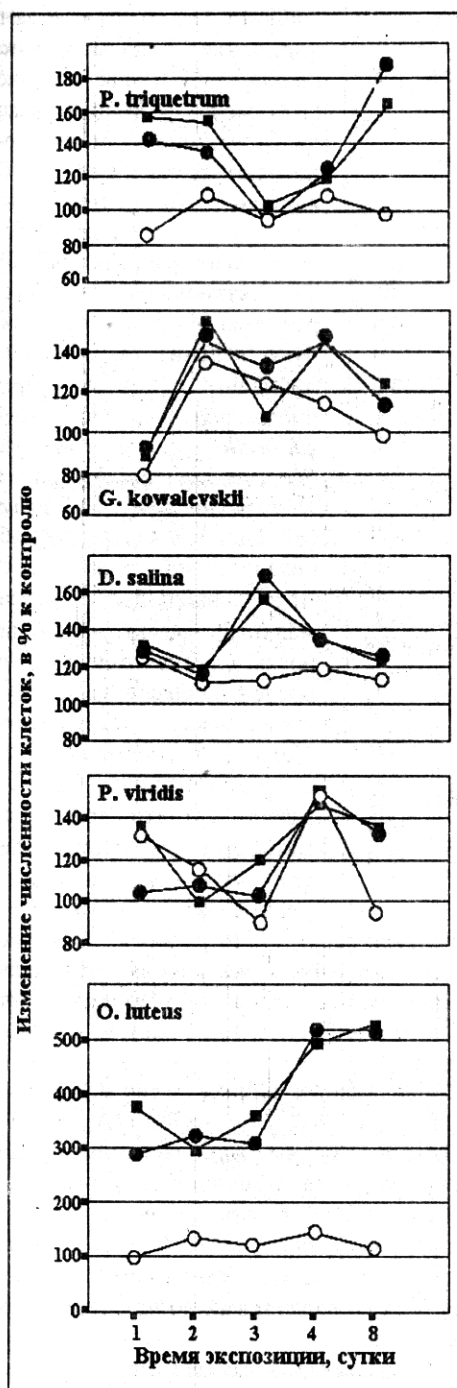


Рис. Влияние различных концентраций гиббереллина A_3 на изменение численности клеток в культурах 5 видов одноклеточных водорослей (пояснения в тексте).
Fig. The effect of gibberellin GA_3 concentration on the abundance of cells in cultures of five unicellular algae species.

На рис. приведены относительные величины (в %) изменения численности клеток в культурах исследованных видов одноклеточных водорослей по отношению к контролю (ось ординат) при различных сроках экспозиции (ось абсцисс). На графиках представлены концентрации гиббереллина A_3 10 (○), 50 (●) и 100 (■) $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$.

Как видно на рисунке, практически во всех культурах водорослей, начиная с первых суток эксперимента и при всех исследованных концентрациях, численность клеток значительно возросла. В некоторых случаях, на которых мы остановимся более подробно, наблюдали отклонение от общей тенденции.

Так, для *P. triquetrum* отмечено снижение стимулирующего эффекта на третьи сутки для концентраций 50 и 100 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$. Для концентрации 10 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ результаты не отличались от контроля, причем в первые сутки было отмечено ингибирующее действие гиббереллина A_3 . В опытах с *G. kowalevskii* в первые сутки для всех исследованных концентраций было отмечено ингибирование роста клеток по отношению к контролю. Для 10 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ на восьмые сутки данные не отличались от контроля. В эксперименте с *P. viridis* данные, полученные при 10 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ (5,8 сутки), 50 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ (1-3 сутки) и 100 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ (2 сутки), от контроля отличались мало.

При исследовании *O. luteus* установлено, что при концентрации гиббереллина A_3 10 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ изменения численности клеток значительно не отличались от контроля, тогда как при концентрациях 50 и 100 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ наблюдали стимулирование роста культуры.

В таблице приведены результаты измерения динамики интенсивности флуоресценции хлорофилла "а" под влиянием различных концентраций гиббереллина A_3 . Как видно, гиббереллин A_3 при всех исследованных концентрациях оказывает в основном стимулирующее влияние на интенсивность флуоресценции.

Обсуждая полученные результаты следует отметить, что в целом наши данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями. Наряду с многочисленными сообщениями о кратковременном повышении интенсивности фотосинтеза, можно найти и работы, в которых отмечается нейтральное,

или ингибирующее действие гиббереллинов. Обычно низкие концентрации гиббереллинов усиливают рост водорослей в длину, что имитирует уменьшение содержания хлорофилла (эффект разбавления). Имеются сведения, что гибберелловая кислота в концен

Таблица. Изменение интенсивности флуоресценции хлорофилла «а» (в относительных единицах) водорослей в зависимости от концентрации гиббереллина A_3 (C , $mg \cdot l^{-1}$) и сроков экспозиции (сутки)

Table. Changes of chlorophyll "a" fluorescence intensity (in relative units) of algal cells depending on gibberelline A_3 concentration (C , $mg \cdot l^{-1}$) and exposition period (days)

Вид водорослей	C , $mg \cdot l^{-1}$	Время экспозиции, сутки				
		1	2	3	4	8
<i>G. kowalevskii</i>	0	3,5	4,5	8,0	8,0	15,0
	10	3,8	4,5	6,5	8,0	14,0
	50	3,8	5,0	6,5	8,0	13,0
	100	3,0	4,0	7,0	7,0	13,0
<i>P. triquetrum</i>	0	3,0	5,0	5,5	7,0	7,0
	10	3,0	5,0	6,0	7,0	6,0
	50	4,0	6,0	6,5	10,0	8,0
	100	3,5	5,5	6,5	8,0	8,0
<i>D. salina</i>	0	19,0	32,0	35,0	34,0	78,0
	10	19,0	32,0	50,0	41,0	79,0
	50	20,0	30,0	48,0	49,0	95,0
	100	21,0	30,0	57,0	54,0	93,0
<i>P. viridis</i>	0	26,0	70,0	92,0	164,0	216,0
	10	32,0	70,0	116,0	188,0	208,0
	50	25,0	92,0	118,0	194,0	236,0
	100	50,0	97,0	104,0	180,0	248,0
<i>O. luteus</i>	0	8,0	7,0	12,5	13,0	12,0
	10	9,0	10,0	13,0	14,0	13,0
	50	14,0	12,0	15,0	19,0	34,0
	100	13,0	12,0	13,0	19,0	28,0

трации $0,1 \text{ mg} \cdot l^{-1}$ вызывает удлинение талломов *Ulva lactuca* [15]. Более высокие ($100 \text{ mg} \cdot l^{-1}$) концентрации гиббереллинов заметно подавляют фотосинтез [1]. О влиянии гиббереллинов на рост водорослей указывается во многих работах [6,7,10]. Так, установлено, что гиббереллины A_3 и A_7 стимулируют деление клеток и увеличивают сухой вес трех видов зеленых водорослей *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda* и *Dictyosphaerium pulchellum* [5]. При концентрации гиббереллиновой кислоты $1-10 \text{ mg} \cdot l^{-1}$ наблюдали максимальный эффект увеличения роста одноклеточных водорослей *Chlorella vulgaris*, *C. pyrenoidosa*, *Scenedesmus obliquus*, *S. quadricauda* [18]. С другой стороны, было показано [14], что время размножения и размеры клеток одноклеточных водорослей *Gymnodinium breve*

при действии гибберелловой кислоты мало отличались от контрольных. Основное влияние было выражено в сокращении латентного периода и увеличении количества клеток. Механизм действия гиббереллинов до настоящего времени не установлен, хотя имеются данные, что они являются промоторами многих ферментных систем, в частности увеличивают активность β -амилазы и пероксидазы [7].

Выводы. Нами определено наличие гиббереллинов в черноморских макрофитах *Gracilaria verrucosa* (A_2 , A_4 , A_9), *Ceramium rubrum* (A_3 , A_2), *Ulva rigida* (A_2 , A_4 , A_9), смеси *Cystoseira barbata*+*Gracilaria verrucosa* (A_2 , A_3 , A_4 , A_7 , A_9). Экспериментально установлено влияние гиббереллина A_3 на рост клеток и интенсивность флуоресценции хлорофилла «а» в культурах одноклеточных водорослей *Gymnodinium kowalevskii*, *Peridinium triquetrum*, *Dunaliella salina*, *Platimonas viridis*, *Olistodiscus luteus*. Показано, что ответные реакции водорослей зависят как от концентрации гиббереллина A_3 , так и сроков экспозиции. Полученные данные согласуются со сведениями по влиянию гиббереллинов на другие виды одноклеточных водорослей.

Автор выражает признательность Баншац Р.В. за помощь в экспериментальной работе по идентификации гиббереллинов из макрофитов.

1. Гавриленко В.Ф., Гусев М.В., Никитина К.А., Хоффман П. Избранные главы физиологии растений.-М.: Изд-во МГУ.,1986. - 440с.
2. Карнаухов В.Н., Кулаков В.Н., Мельникова Е.В., Яшин В.А. Микроспектрофлуориметр на базе стандартных деталей и узлов //Цитология - 1968. - 10, №5. - С. 654-657.
3. Муромцев Г.С., Агнистикова В.Н. Гиббереллины. - М., 1984. - 208 с.
4. Муромцев Г.С., Агнистикова В.Н., Дубовая Л.П. Определение гиббереллиноподобных веществ в растениях // Сб. Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов и гербицидов. - М., 1973.- С.59-62.

5. *Burkiewicz K.* The influence of gibberellins and cytokinins on the growth of some unicellular Baltic algae // *BOT.-MAR.* - 1987. - 30, № 1. - P. 63-69.
6. *Buschmann A.H.* Efecto de reguladores de crecimiento en *Gracilaria* sp. (Rhodophyta, Gigartinales) // *GAYANA-BOT.* - 1988. - 45, № 1-4. - P. 351-355.
7. *Devi-Prasad P.V.* Effect of some growth substances on three fresh-water green algae // *Cryptogamie: Algologie.* - 1982. - 3, № 4. - P. 315-321.
8. *Fujisawa S., Yamaguchi I., Park K.-H., Kobayashi M., Takahashi N.* Qualitative and semi-quantitative analyses of gibberellins in immature seeds of *Pharbitis purpurea* // *Agr. biol. chem.* - 1985. - 49, № 1. - P. 27-33.
9. *Huang R., Boney A.D.* Growth interactions between littoral diatoms and juvenile marine algae // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* - 1984. - 81, № 1. - P. 21-45.
10. *Jennings R.C., McComb A.J.* Gibberellins in the red alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamour. // *Nature.* - 1967. - 215, № 5103. - P. 872-873.
11. *Jones D.F.* Examination of the gibberellins of *Zea mays* and *Phaseolus multiflorus* using thin-layer chromatography // *Nature.* - 1964. - 202, № 4939. - P. 77-78.
12. *Kato J., Purves W.K., Phinney B.O.* Gibberellin-like substances in plants // *Nature.* - 1962. - 196, № 4855. - P. 686-687.
13. *Mowat J.A.* Gibberellin-like substances in algae // *Nature.* - 1963. - 200, № 4905. - P. 453-455.
14. *Paster Z., Abbott B.C.* Gibberellic acid: a growth factor in the unicellular alga *Gymnodinium breve* // *Science.* - 1970. - 169, № 3945. - P. 600-601.
15. *Provasoli L.* Effect of plant hormones on *Ulva* // *Biol. Bull.* - 1958. - 114, № 3. - P. 375-84.
16. *Provasoli L., Carlucci A.F.* Vitamins and growth regulators // In: *Algal physiology and biochemistry.* - Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1974. - P. 741-787.
17. *Radley M.* Gibberellin-like substances in plants // *Nature.* - 1961. - 191, № 4789. - P. 684-685.
18. *Saono S.* Effect of gibberellic acid on the growth and multiplication of some soil microorganisms and unicellular green algae // *Nature.* - 1964. - 204, № 4965. - P. 1328-1329.
19. *Wildgoose P.B., Blunden G., Jewers K.* Seasonal variations in gibberellin activity of some species of *Fucaceae* and *Laminariaceae* // *Bot.-Mar.* - 1978. - 21, 1. - P. 63-65

Институт биологии южных морей НАНУ,
г. Севастополь

Получено 18.06.99

V. E. EROKHIN

PRELIMINARY DATA ON THE STUDIES OF ALGAE GIBBERELLINS

Summary

Presence of gibberellins has been determined in the following Black sea macrophytes: *Gracilaria verrucosa*, *Ceramium rubrum*, *Ulva rigida*, mixture of *Cystoseira barbata*+*Gracilaria verrucosa*. Experimental data on an influence of the model growth substance - gibberellin GA₃ on the growth of cells and intensity of chlorophyll "a" fluorescence in the cultures of unicellular algae *Gymnodinium kowalevskii*, *Peridinium triquetrum*, *Dunaliella salina*, *Platimonas viridis*, *Olistodiscus luteus* have been obtained. The algae response reactions depended on concentrations of gibberellin A₃ and the exposition terms as well. The data obtained correlate with literary data on gibberellin influence on the other species of unicellular algae.