

Л.В. ВОЙТЕНКО, Л.І. МУСАТЕНКО

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, Київ, 01001, Україна
hormon@botany.kiev.ua

РОЗПОДІЛ ЦИТОКІНІНІВ У ТАЛОМІ *CHARA CONTRARIA* A. BR. (*CHLOROPHYCEAE*)

Ключові слова: цитокініни, *Chara contraria*

Вступ

Цитокініни (ЦТК) як невід'ємні складові регуляторних систем, що забезпечують ріст, морфогенез і репродукцію вищих рослин, знайдено у водоростей різних систематичних груп [8, 11, 22, 25, 26]. Проте є лише незначна кількість праць, присвячених дослідженню якісного складу ЦТК [8, 17, 25, 27]. Перша хімічна ідентифікація ЦТК за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та газової хроматографії-мас-спектрометрії (ГХ-МС), здійснена в 1987—1988 рр., дозволила виявити у *Chara globularis* (Chlorophyta) ізопентеніладенозин (іПА) у кількості 0,4 мкг/кг маси сирої речовини (мсп) [27]. Пізніше у зелених водоростей *Caulerpa taxifolia* (N10-215) і *Valoniopsis pachynema* (N10-212) знайдено зеатин (З) та ізопентеніладенін (іП), а в *Udotea indica* (N10-213) — зеатинрибозид (ЗР) та іП. Показано також наявність нового цитокініну — 2-гідрокси-1'-метилзеатину в зеленій водорості (N10-143) [8]. У ціанобактерії *Arthronema africanum* (Schwabe et Simons) Komdrek et Lukavsky цими ж методами було ідентифіковано іП та його деривати [25]. Використання більш чутливих методів ВЕРХ/МС з різними детекторами дало можливість визначити 37 ендогенних ЦТК у 31 виду макроводоростей (Chlorophyta, Rhodophyta, Phaeophyta) та 10 мікроводоростей (Chlorophyta) із 3 родів (*Protococcus*, *Chlorella*, *Scenedesmus*) [17, 18, 24]. Показано, що основними ізопреноїдними ЦТК у них були іП, З та їх деривати з переважанням цис-ізомерів над транс-ізомерними формами, тоді як серед О-глюкозидів домінували транс-ізомери. Ароматичні ЦТК представлені бензиладеніном, бензиладенозином та дериватами гідроксибензиладеніну («topolins») — мета- і орто-ізомерами, при цьому їх сумарний вміст був значно нижчим, ніж ізопреноїдних ЦТК. Припускають, що шляхи регуляції концентрації ЦТК у мікро- і макроводоростей є зовсім іншими, ніж у вищих рослин [17, 21, 23].

Вважається, що ЦТК впливають не лише на механізми поділу і розтягання клітин, вміст протеїнів і фотосинтетичних пігментів, морфогенез й органогенез, а й на загальний метаболізм клітин водоростей [7, 14, 16]. ЦТК виступають у ролі пускового механізму мітозу, який регулюється критичним

© Л.В. ВОЙТЕНКО, Л.І. МУСАТЕНКО, 2005

рівнем фітогормонів [10]. При цьому вирішальну роль у регуляції фізіологічних процесів відіграють не стільки концентрації окремих гормонів, скільки їх співвідношення. Мета роботи полягала в дослідженні комплексу ЦТК та градієнта розподілу їх вільних форм у різних частинах головного пагона фертильного талому хари у зв'язку з їх участю в ростових та формотворчих процесах.

Матеріали і методи досліджень

Об'єктом досліджень була зелена прісноводна водорість *Chara contraria* A. Br., основний пагін якої складався із 9–10 міжвузлів і вузлів з кільцями (мутовками) так званих листків. Досліджували стерильний (статеві незрілий) і фертильний (статеві зрілий) цілі таломі, ооспори, ризоїди з бульбочками, кільця листків з червоними зрілими антеридіями I–III нижніх (від ризоїдів) вузлів, листки IV–VI середніх вузлів, на яких розташовані чорні оогонії із заплідненою яйцеклітиною, і верхню (з чотирма нижче розташованими вузлами) частину головного пагона фертильного талому хари, на листках яких знаходилися об'єднані гаметангії — антеридії та оогонії.

Хару збирали в лісовому озері Шапарня (Конча-Заспа, Київська обл., заказник «Лісники») у 2000–2002 рр. Фітогормони екстрагували із свіжозібраного матеріалу 80 %-м етанолом і фракціонували за раніше розробленою методикою [2]. Аліквоту розмороженого водного залишку доводили розчином 1N NaOH до рН 8,0 і центрифугували 30 хв при 15 тис. g. Із супернатанта тричі екстрагували ЦТК водонасиченим бутанолом (співвідношення 1:1). Об'єднані бутанольні екстракти упарювали досуха на вакуумному ротацийному випарнику при +60 °C. ЦТК очищували методом іонообмінної хроматографії на колонках DOWEX 50Wx8 у H⁺-формі 0,1N аміаком і ТШХ у системі розчинників н-бутанол : аміак : вода (86:5:9). Зони, що відповідали R_f стандартів З, ЗР, іП та іПА, тричі елюювали 96 %-м етанолом під вакуумом. Кількісне визначення фітогормонів здійснювали на високоефективному рідинному хроматографі фірми Руч Unicam 4000. Цифровий матеріал обробляли статистично (P ≤ 0,05).

Результати досліджень та їх обговорення

Аналіз отриманих результатів засвідчив наявність у хари З, ЗР, іП та іПА з переважанням ЗР. Їх рівні змінювалися у процесі росту та розвитку водоростей. У стерильному таломі хари серед знайдених форм ЦТК домінували ЗР та іПА, у фертильному — ЗР (рис. 1). Показано, що рівні різних форм ЦТК у період репродуктивного розвитку водорості були майже у 10 разів вищими, ніж під час вегетативного росту. При цьому зафіксовано більше накопичення З, ЗР та іП, ніж іПА. Аналогічний розподіл ЦТК виявлено у деяких представників морських водоростей. Зокрема, найвищі рівні цитокініноподібних речовин встановлено у домінуючих видів фітоценозів Чорного моря: у *Cystoseira barbata* (Good et Wood) Ag. (Phaeophyta) — взимку, коли закладалися органи розмноження (концептакули), в *Ulva rigida* Ag. (Chlorophyta) —

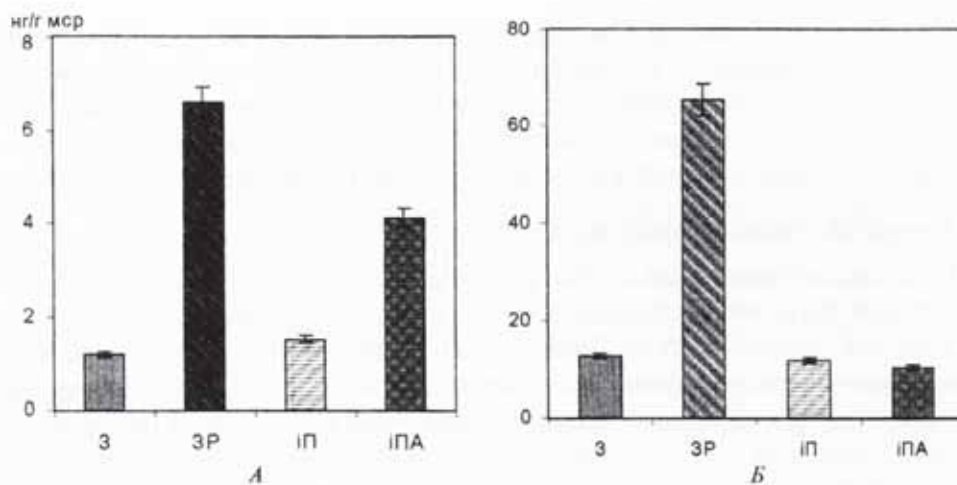


Рис. 1. Вміст цитокінінів у стерильному (А) та фертильному (Б) цілих таломках *Chara contraria* A.Br., нг/г мсп

Fig. 1. The content of cytokinins in sterile (A) and fertile (B) thalloses of the *Chara contraria* A. Br., ng/g f.w.

влітку, в період найінтенсивнішого спороношення [3]. Відомо, що ЦТК беруть участь у формуванні та розвитку генеративних органів як у вищих, так і нижчих рослин [6]. Показано, що БАП інгібував ріст протонеми моху *Politrichum commune* і сприяв закладанню бруньок гаметофора [4]. В екстрактах квіткових рослин найпоширенішими і домінуючими ЦТК є З та його похідні, а саме ЗР, зеатинриботид, дигідрозеатин (ДГЗ) та їхні глюкозиди. іП та іПА у вищих рослин поширені менше і часто зовсім не визначаються [19]. Проте вважається, що у водоростей саме іП та іПА є домінуючими і найактивнішими [14]. Слід зауважити, що функціональні відміни між різними формами ЦТК поки не з'ясовані. Можливо, високі рівні вільних форм ЦТК у репродуктивному таломі хари зумовлені підвищеною інтенсивністю метаболічних перетворень, пов'язаних з розвитком гаметангіїв.

Ми досліджували якісний склад та вміст ЦТК у різних частинах головного пагона фертильного талому хари (табл.). У верхніх молодих листках

Цитокініни у різних частинах фертильного талому *Chara contraria* A. Br., нг/г мсп

Зразок	З	ЗР	іП	іПА
Ризоїди з бульбочками	2,2 ± 0,4	11,2 ± 2,4	4,5 ± 0,2	3,7 ± 0,20
I–III нижні (від ризоїдів) зрілі листки з антеридіями	1,1 ± 0,1	5,3 ± 1,2	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,03
IV–VI середні листки із заплідненими оогоніями	10,5 ± 2,1	8,5 ± 1,6	4,1 ± 1,2	7,5 ± 1,40
Листки (з об'єднаними гаметангіями) верхньої частини пагона	11,5 ± 3,2	57,7 ± 4,1	13,5 ± 2,7	15,4 ± 2,70

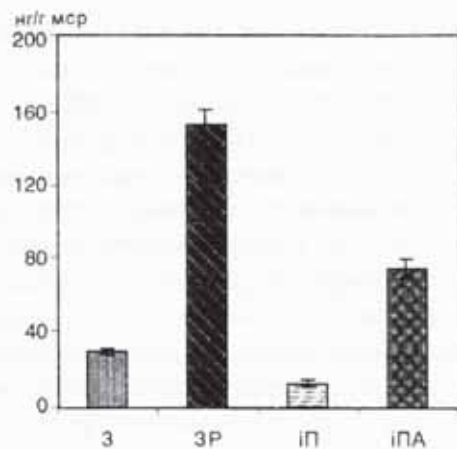


Рис. 2. Цитокиніни у зрілих ооспорах *Ch. contraria*
 Fig. 2. Cytokinins in oospores of the *Ch. contraria*

високою є концентрація ЗР, а рівні З, іП та іПА були нижчими і майже однаковими. У листках середньої частини пагона виявлено значно менші кількості ЗР, іП та іПА. У нижніх зрілих листках рівень усіх форм ЦТК був незначним. У ризоїдах на фоні низьких кількостей З, іП та іПА спостерігали дещо підвищений вміст ЗР.

Таким чином, вміст ЦТК поступово зменшувався від верхніх молодих (з гаметангіями) до нижніх зрілих (з антеридіями) листків. Виявлений розподіл ЦТК у таломі хари, можливо, пов'язаний не лише з ростовими процесами у клітинах (поділ, розтягування), а й з формуванням та розвитком репродуктивних органів. Можливо, активну участь у формотворчих процесах та метаболічних перетвореннях у верхніх і середніх листках водорості беруть З та ЗР, вміст яких був найвищим. Подібний розподіл ЦТК встановлений у деяких морських водоростей. Зокрема, у верхніх, середніх і нижніх листках талому бурої водорості *Macrocystis pyrifera* (L.) S.Ag. кількість ЦТК корелювала з їх ростом: найвищий рівень вільних ЦТК та їх рибозидів і найнижчий О-глюкозидних форм знайдено у верхніх молодих листках з інтенсивним ростом [15]. У середніх зрілих та нижніх старіючих листках спостерігали поступове зниження вільних і накопичення запасних форм О-глюкозидів. Базальна третина молодого листка, яка найбільш інтенсивно росте і містить інтеркалярну меристему, характеризувалася найвищою загальною цитокініноподібною активністю. Молодий листок, який швидко росте, мав високий рівень вільних основ та рибозидів і низький — передбачуваних О-глюкозидів, тоді як у відмираючого старого листка високим був вміст О-глюкозидів і низьким — вільних основ та рибозидів. Встановлені кількісні та якісні кореляції між ростом й активністю ЦТК дозволили авторам зробити висновок, що у водоростей, як і у вищих рослин, ЦТК також відіграють роль ендогенних регуляторів росту. Саме про це свідчать і виявлені нами кореляції між інтенсивністю ростових і формотворчих процесів у різних частинах головного пагона хари та рівнем у них ЦТК.

Крім того, є відомості про те, що якісний та кількісний вміст ЦТК у різних частинах талому бурих морських водоростей корелював із сезонною та місячною періодичністю їх росту, розвитку й репродукції. Зокрема, у літніх зразках *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenf. висока активність ЦТК була зумовлена присутністю транс-З, цис- і транс-ЗР, ДГЗ та іП, у зимових — глюкозидних форм ЦТК [9]. Переважне накопичення ЦТК виявлено у тканинах *Sargassum heterophyllum* (Turn.) J. Ag., що інтенсивно ростуть, а максимальний їх вміст у репродуктивних гілках цієї водорості був пов'язаний з ритмічними процесами утворення (фази повного і нового місяця) та виділення (перед і після останньою чвертю місяця) гамет [12, 13]. Відомо також, що значний вміст ЦТК спостерігається у меристематичних тканинах вищих рослин з високою інтенсивністю поділу клітин: верхівці кореня, у клітинах листків, які ростуть розтягуванням, у статевих органах та насінні [5].

Проведені нами дослідження показали, що високим накопиченням ЦТК характеризуються зрілі ооспори *Ch. contraria*, які відділилися від материнської рослини (рис. 2). Серед виявлених ЦТК домінуючими формами були ЗР ($146,4 \pm 8,3$ нг/г мсп) та іПА ($67,9 \pm 4,8$ нг/г мсп). Можливо, ооспори водоростей, як і насіння вищих рослин, можуть бути місцем синтезу ЦТК *de novo* [1, 20]. Крім того, високі рівні ЦТК в ооспорах хари можна розглядати як атрагуючий чинник, здатний притягувати та мобілізувати запасні асиміляти (крохмаль, жири тощо), необхідні для подальших метаболічних перетворень при їх проростанні за сприятливих умов.

Висновки

Встановлено, що різні частини головного пагона (верхні, середні, нижні листки та ризоїди з бульбочками) фертильного талому *Chara contraria* відрізняються за характером накопичення та розподілу виявлених цитокинінів. Найвищим є вміст активних форм цитокинінів (З, ЗР, іП та іПА) у верхніх молодих листках, які характеризуються інтенсивним ростом, найнижчим — у нижніх зрілих листках, ріст яких уповільнюється з віком. У зрілих ооспорах *Ch. contraria* виявлено найбільшу кількість цитокинінів, серед яких домінуючими були ЗР та іПА. Таким чином, у фізіологічних процесах різних частин головного пагона фертильного талому хари превалює дія переважаючих у кількісному співвідношенні вільних форм цитокинінів, рівні яких залежать від етапу розвитку і типу росту клітин.

1. Веденичева Н.П., Мусатенко Л.И. Цитокинины в семенах при созревании и прорастании // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1990. — 22, № 4. — С. 327—335.
2. Методические рекомендации по определению фитогормонов. — Киев: Наук. думка, 1988. — 78 с.
3. Падун А.О. Фитогормоны морских водоростей-макрофитов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — К., 1993. — 24 с.
4. Панкратов С.Ю., Хрянин В.Н. Роль цитокининов и гиббереллинов в процессах роста, развития и проявления пола у *Polytrichum commune* // Тез. IV съезда ОФР России. Т. 2. — М.: Пушино НЦ РАН, 1999. — С. 660—661.

5. Ситник К.М., Мусатенко Л.І., Васюк В.А. та ін. Гормональний комплекс рослин і грибів. — К., 2003. — 186 с.
6. Хрянин В.Н. Роль фитогормонов в дифференциации пола у растений // Физиол. раст. — 2002. — 49, № 4. — С. 608—614.
7. Burkiewicz K. The influence of gibberellins and cytokinins on the growth of some unicellular Baltic algae // Bot. Mar. — 1987. — 30. — P. 317—321.
8. Farooqi A., Shukla Y., Shukla A., Bhakuni D. Cytokinins from marine organisms // Phytochemistry. — 1990. — 29, № 7. — P. 2061—2063.
9. Featonby-Smith B.C. & J. van Staden. Identification and seasonal variation of endogenous cytokinins in *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenf. // Bot. Mar. — 1984. — 27. — P. 527—531.
10. Hall R.H. Cytokinins as a probe of developmental processes // Ann. Rev. Plant Physiol. — 1973. — 24. — P. 415—444.
11. Kingman A.R. & Moore J. Isolation, purification and quantitation of several growth regulating substances in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyta) // Bot. Mar. — 1982. — 25. — P. 149—153.
12. Mooney P.A. & J. van Staden. Seasonal changes in levels of endogenous cytokinins in *Sargassum heterophyllum* (Phaeophyceae) // Bot. Mar. — 1984. — 27. — P. 437—442.
13. Mooney P.A. & J. van Staden. Lunar periodicity of the levels of endogenous cytokinins in *Sargassum heterophyllum* (Phaeophyceae) // Bot. Mar. — 1984. — 27. — P. 457—472.
14. Mooney P.A. & J. van Staden. Algae and cytokinins // J. Plant Physiol. — 1986. — 123. — P. 1—21.
15. Nys R., Jameson P.E., Chin N. et. all. The cytokinin as endogenous growth regulators in *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Ag. (Phaeophyceae) // Bot. Mar. — 1990. — 33. — P. 467—475.
16. Nys R., Jameson P.E., Brown M.T. The influence of cytokinins on the growth of *Macrocystis pyrifera* // Bot. Mar. — 1991. — 34. — P. 465—467.
17. Ördög V., Stirk W., J. van Staden et. all. Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the Chlorophyta // J. Phycol. — 2004. — 40. — P. 88—95.
18. Ördög V., Strnad M., Drimalová D. et. all. Plant hormones in synchronous cultures of some *Chlorella* strains // 2nd International symposium on microalgae and seaweed products in plant/soil-systems. — Mosonmagyaróvár, Hungary, 2004. — P. 10.
19. Palmer M.V., Horgan R., Wareing P.F. Cytokinin metabolism in *Phaseolus vulgaris* L. III: Identification of endogenous cytokinins and metabolism of [8-¹⁴C]-dihydrozeatin in stems of decapitated plants // Planta. — 1981. — 153. — P. 279—283.
20. J. van Staden. Seeds and cytokinins // Physiol. Plant. — 1983. — 58, № 3. — P. 340—346.
21. J. van Staden, Stirk W.A., Ördög V., Strnad M. The role of hormones in algal growth and development // 2nd International symposium on microalgae and seaweed products in plant/soil-systems. — Mosonmagyaróvár, Hungary, 2004. — P. 4.
22. Stirk W. & J. van Staden. Screening of some South African seaweeds for cytokinin-like activity // S. Afr. J. Bot. — 1997. — 63, № 3. — P. 161—164.
23. Stirk W., Novák O., Strnad M. & J. van Staden. Cytokinins in macroalgae // 13th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology. — Crete, Greece, 2002. — P. 768.
24. Stirk W., Novák O., Strnad M. & J. van Staden. Cytokinins in macroalgae // Plant Growth Regul. — 2003. — 41. — P. 13—24.
25. Stirk W., Ördög V. & J. van Staden. Identification of the cytokinin isopentenyladenine in a strain of *Arthronema africanum* (Cyanobacteria) // J. Phycol. — 1999. — 35. — P. 89—92.
26. Stirk W., Ördög V., J. van Staden & Jäger K. Cytokinin- and auxin- like activity in *Cyanophyta* and microalgae // J. of Applied Phycology. — 2002. — 14. — P. 215—221.
27. Zhang W., Yamane H., Takahashi N. et. all. Identification of a cytokinin in the green alga *Chara globularis* // Phytochemistry. — 1989. — 28, № 2. — P. 337—338.

Рекомендує до друку
К.М. Ситник

Надійшла 18.07.2005

Л.В. Войтенко, Л.И. Мусатенко

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, г. Киев

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОКИНИНОВ В ТАЛЛОМЕ
CHARA CONTRARIA A. BR. (*CHLOROPHYCEAE*)

Исследовали качественный состав и содержание цитокининов (ЦТК) в целых талломах зелёной пресноводной водоросли *Chara contraria* A. Br. (стерильном и фертильном), в ооспорах, ризоидах с клубеньками, в листьях нижней, средней и верхней частей главного побега фертильного таллома. Показано, что верхняя часть стебля хары с молодыми листьями, на узлах которых находятся объединённые гаметангии, характеризуется наибольшим содержанием ЦТК, а нижние зрелые мутовки листьев — наименьшим.

L.V. Voytenko, L.I. Musatenko

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

DISTRIBUTION OF CYTOKININS IN THE THALLI
OF THE *CHARA CONTRARIA* A. BR. (*CHLOROPHYCEAE*)

The research was carried out in the quality and quantity composition of cytokinins in sterile and fertile thallies of the green freshwater alga *Chara contraria* A. Br., in oospores, ryzoids, in leaves of bottom, middle and apical part of the main stem of the fertile thalli. It was found that upper part of the main stem of chara with an apical cell and new leaves with have joint gametangia on them which are characterized with high cytokinins content and bottom maturity leaves — low.