

На правах рукописи



КАЛИТА Татьяна Львовна

**ИНФРАДИАННЫЕ РИТМЫ РОСТА, ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК И
РЕПРОДУКЦИИ У МОРСКИХ ВОДОРΟΣЛЕЙ**

03.00.18 – гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2007

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность изучения биоритмов физиологических процессов очевидна, так как успешная онтогенетическая и филогенетическая адаптации организмов к условиям окружающей среды невозможны без быстрого восприятия организмом ритмических изменений таких факторов среды, как свет, температура, осушение (или обводнение), космическая радиация, гравитация и др. В настоящее время наиболее глубоко изучены циркадианные - суточные (24 ч) ритмы движения хлоропластов, скорости фотосинтеза, уровня м-РНК фотосинтетических белков, деления клеток и скорости роста морских водорослей. Характеристики годовых - цирканнуальных (1 год) ритмов роста и репродукции, циркасемилунарных - полулунных (14 сут) ритмов репродукции у макрофитов изучены не достаточно. Инфраниантные циркасеπτанные (1 неделя) ритмы репродукции описаны для зеленой водоросли *Ulva pseudocurvata*, для других видов водорослей констатируется только наличие такой периодичности репродукции. Циркасемисептанные - полунедельные ($1/2$ недели) и циркасеπτанные – недельные ритмы других физиологических процессов описаны только у животных и человека, характеристики этих ритмов практически не изучены.

Цель работы. Установить наличие инфраниантных биоритмов в процессах роста, деления клеток и репродукции у морских водорослей и исследовать влияние экзогенных и эндогенных факторов на эти ритмы.

Задачи исследования: 1) изучить ритмические изменения скорости роста талломов, деления и растяжения клеток, цито- и кариокинеза у морских макроводорослей, а также деления и дегградации одноклеточных симбиотических водорослей герматипных кораллов (зооксантелл) и установить наличие инфраниантных биоритмов этих процессов; 2) определить наиболее благоприятное время суток для регистрации параметров инфраниантных биоритмов у водорослей; 3) исследовать характерные особенности инфраниантных биоритмов роста низко- и высокодифференцированных макроводорослей и провести сравнительный анализ: а) изучить влияние температуры, освещенности и фотопериода на инфраниантные ритмы роста и репродукции водорослей для выявления вероятных триггерных механизмов; б) установить взаимосвязь между инфраниантными ритмами скорости роста и процессами фотосинтеза, клеточного деления у морских водорослей;

в) выявить синхронизирующий агент, запускающий инфрадианные ритмы у водорослей.

Научная новизна. В настоящей работе впервые описаны инфрадианные циркасемисептанные (2-3 сут) и циркасептанные (6 сут) ритмы продукционных и репродуктивных процессов у водорослей. Предложен вероятный синхронизирующий агент циркасемисептанных ритмов роста талломов, деления и растяжения клеток макроводорослей, а также деления и деградации зооксантелл. Впервые обнаружены инфрадианные ритмы растяжения клеток у макроводорослей.

Теоретическая значимость. Описание инфрадианных биоритмов у водорослей вносит существенный вклад в понимание механизмов адаптации живых организмов к циклическим изменениям среды обитания, что существенно расширяет знания в области хронобиологии, а также в понимании процессов микро- и макроэволюции.

Практическая значимость. Результаты исследований могут быть использованы для: 1) получения синхронных культур (вегетативные клетки, споры или гаметы водорослей), которые могут служить материалом для физиологических исследований; 2) в марикультуре для: а) выбора оптимальных условий культивирования и определения времени сбора урожая макроводорослей с наибольшим количеством полезных веществ; б) создания временного аномально высокого содержания в слоевищах водорослей необходимых человеку веществ через искусственное нарушение ритмики физиологических и биохимических процессов.

Апробация. Материалы и результаты исследования докладывались и обсуждались на научно-методологических семинарах лаборатории «Физиологии водных растений» ИБМ имени А.В. Жирмунского ДВО РАН, на годовых конференциях ИБМ имени А.В. Жирмунского ДВО РАН в секциях «Цитологии, биохимии и физиологии» в 2006 г., «Гидробиологии, ихтиологии и заповедного дела» в 2007 г. и на 4-ом Европейском фикологическом конгрессе в Испании (The 4-th European Phycological Congress, Spain, 2007). Материалы диссертации легли в основу трех статей в отечественном и одной статьи в иностранном журналах.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 165 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов и

списка литературы (153 источника, из них 105 на английском языке). Работа содержит 48 рисунков, 9 таблиц и 16 схем.

Благодарности. Считаю приятным долгом выразить глубокую признательность д.б.н., профессору Эдуарду Антониновичу Титлянову, осуществляющему руководство в постановке экспериментов и при написании диссертации, а также к.б.н. Ирине Михайловне Яковлевой, к.б.н. Анне Владимировне Скрипцовой и Тамаре Викторовне Титляновой за неоценимую помощь и моральную поддержку в проведении экспериментов. Большое спасибо инженеру Павлу Викторовичу Буторину за техническое обеспечение, без его самоотверженного труда не состоялся бы ни один эксперимент. Хочется поблагодарить всех тех сотрудников ИБМ имени А.В. Жирмунского ДВО РАН, с кем продуктивно работали в течение этих лет, за доброжелательное отношение и поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1. Общие положения хронобиологии

В разделе рассматриваются основные положения хронобиологии, отраженные в работах К. Линнея, У. Гарднера, Х. Алларда, Э. Бюннинга, А.Л. Чижевского, Ф. Халберга, А. Рейнберга, Ю. Ашоффа, Б. Свиней (Sweeney), Н.И. Моисеевой, В.И. Сысуева, Б.С. Алякринского. Дан исторический экскурс становления хронобиологии, как науки, описаны ее задачи, классификация биоритмов, процессы синхронизации и захватывания, возможные синхронизирующие агенты (Зейтгеберы) биоритмов, а также классификация, принятая автором в работе (табл. 1).

2. Биологические ритмы физиологических процессов

К настоящему времени проведены многочисленные исследования циркадианных и суточных, цирканнуальных и годовых, циркасемилунарных и полулунных биоритмов (Aschoff, 1981; Lakin-Thomas, 2006; Lüning, 1993, 2007; McClung, 2003; Millar, 1999; Mizoguchi, 2002; Sweeney, 1987; и др. ученые). Однако работы выполнены в основном на высших растениях, сведения об этих ритмах у водорослей недостаточны. Инфраниантные биоритмы описаны только у высших растений, животных и человека (Spruyt et al., 1987; Buda et al., 2003;

Оловников, 2003). Различают циркасеπτанные - недельные и циркасемисептанные – полунедельные биоритмы. Известно, что репродукция у водорослей часто находится под контролем циркасеπτанного осциллятора (Lüning et al., 2007). У высших растений синхронизирующим агентом этих биоритмов может быть лунный свет (Spruyt et al., 1987). У животных и человека эти ритмы позволяют диагностировать различные заболевания (Куприянович, 1976; Marques et al., 1994). Циркасемисептанные - полунедельные биоритмы у человека и животных, по мнению А.М. Оловникова (2003), синхронизируются изменениями гравитационного поля Луны, что роль этих ритмов заключается в контроле за ходом биологического времени в онтогенезе организмов.

Анализ литературных источников, касающихся динамики продукционных и репродуктивных процессов у водорослей позволяет заключить, что наиболее

Таблица 1. Классификация биоритмов, принятая в работе и составленная автором.

Название, средний период τ		Диапазон периода, $\pm \tau$	Литературный источник	
Экологические	Циркатайдальные и приливные – 12.4 ч	Circatidal and tidal	8 - 25 ч Тюрин, 1977 Aschoff, 1981	
	Циркадианные и суточные – 24 ч	Circadian and daily	20 ч – < 28 ч Halberg, Reinberg, 1967 Тюрин, 1977	
	Циркасемилунарные и полулунные - 14,75 сут	Circasemilunar and semilunar	11 - < 17 сут Тюрин, 1977 Aschoff, 1981	
	Циркалунарные и лунные - 29.53 сут	Circalunar and lunar	28 - 32 сут	
	Цирканнуальные и годовые 12 мес	Circannual and annual	8 – 15 мес Алякринский, Степанова, 1985; Алякринский, 1983	
Высокочастотные		< 0,5 ч	Halberg, Reinberg, 1967	
Ультрадианные		0,5 ч - 20 ч		
Функциональные	Инфрадианные Infradian	Циркасемисептанные и полунедельные - ½ недели	Circasemiseptan and semiseptan	28 ч – < 5 сут Yamashita et al., 1999 Takekawa et al., 2002 Оловников, 2003
		Циркасеπτанные и недельные – 7 сут	Circaseptan and septan	5 – 10 сут Aschoff, 1981 Spruyt et al., 1987 Margues et al., 1994 Halberg et al., 2003 Оловников, 2003
	Циркавижintiдианные и двадцатисуточные – 20 сут	Circavigintidian and vigintidian	17 – < 23 сут Halberg, Reinberg, 1967 Ашофф, 1984	
	Циркаквартерные и кварталные – 3 мес	Circaquarter and quarter	1 – < 4 мес нет	
	Циркасемианнуальные и полугодовые – 6 мес	Circasemiannual and semiannual	4 - < 8 мес нет	

глубоко изучены суточные - циркадианные ритмы миграции пластид, скорости потенциального фотосинтеза, уровня м-РНК фотосинтетических белков, деления клеток и роста морских растений. Изучение годовых - цирканнуальных ритмов находится на начальной стадии сбора данных о существовании и характере этих ритмов, наиболее детально исследованы ритмы роста и репродукции. Ритмы скоростей продукционного и репродуктивного процессов с длиной периода 1-14 сут хотя и выявлены у морских макроводорослей, однако практически не изучены.

Глава II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Объекты исследования. Одноклеточные симбиотические водоросли герматипных кораллов *Seriatopora caliendrum*, *Stylophora pistillata* и колониального гидроида *Millepora intricata*: *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal (Dinoflagellata). Многоклеточные низкодифференцированные морские водоросли, имеющие диффузный тип роста слоевищ: *Ulva fenestrata* Postels et Ruprecht, *U. pseudocurvata* Koeman et Hoek (Chlorophyta), *Porphyra umbilicalis* Linnaeus (Rhodophyta), *Punctaria plantaginea* (Roth) Greville (Ochrophyta). Многоклеточные высокодифференцированные морские водоросли: *Sparlingia pertusa* (Postels et Ruprecht) Saunders, Strachan, Kraft – апикальный тип роста и *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Ochrophyta) – интеркалярный тип роста талломов.

2. Характеристика районов полевых работ и мест взятия материала для лабораторных исследований. Сбор экспериментального материала для полевых и лабораторных исследований проводили в низко бореальной зоне Тихого океана в районе м. Красный, (Амурский залив, Японское море, 43°10' с.ш. и 132°10' в.д.), в высоко бореальной зоне Атлантического океана на юго-восточном побережье о. Гельголанд (Северное море, 53°56' с.ш. и 14°05' в.д.) и в субтропической зоне Тихого океана на побережье о. Сесоко (Восточно-китайское море, 26°38' с.ш. и 127°52' в.д.).

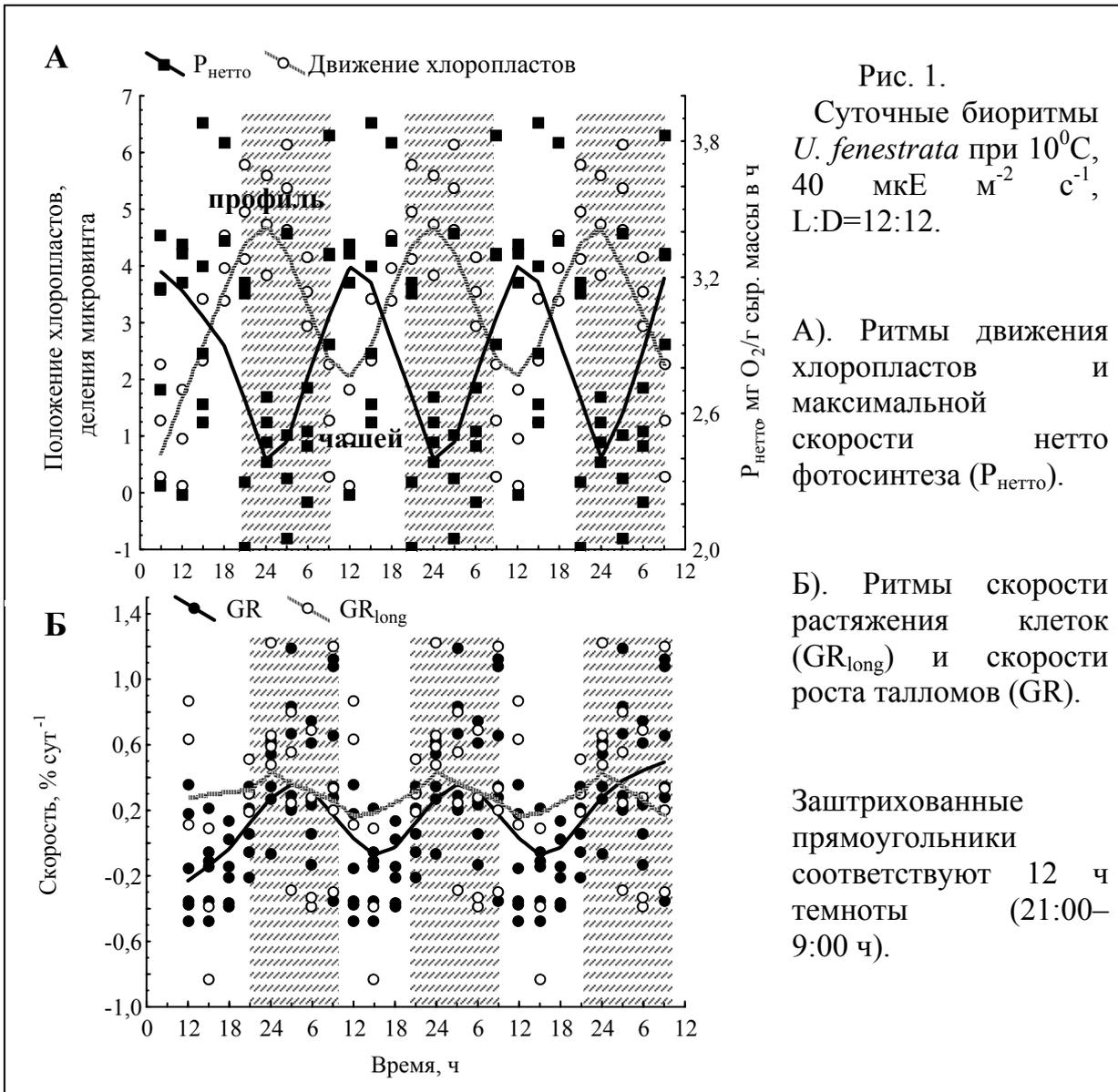
3. Схемы экспериментов и измеряемые параметры. Представлены схемы, проведенных исследований, суточных и инфрадианных ритмов скорости роста и скорости фотосинтеза талломов, скорости растяжения клеток, карио- и цитокинеза, суточные ритмы движения хлоропластов у макроводорослей, а также деления и деградации зооксантелл и обозначены измеряемые параметры.

4. Методы исследования. Морфологию и анатомию водорослей в онтогенезе, цито- и кариокинез исследовали при помощи световой микроскопии. Измерение скорости нетто фотосинтеза проводили методом полярографии (Granbom et al., 1999). Биомассу у водорослей измеряли стандартным методом на торсионных весах. Определение стадий митоза, путем окрашивания ядерной ДНК красителем DAPI проводили цитофлюорометрическим методом (Lüning et al., 1997). Для фиксации морфологических и анатомических параметров водорослей на разных стадиях онтогенеза, для вычисления скорости роста по площади и скорости растяжения индивидуальных клеток, изучения цитокинеза и составления фильма из полученных кадров по росту клеток водорослевых фрагментов использовали метод фотографии. Статистическую обработку данных производили с помощью программы StatSoft/v.6. (вычисление основных статистических параметров, проведение трех- и двухфакторного дисперсионного анализа, анализ Фурье временных рядов, нелинейный регрессионный анализ, достоверность различий оценивали t-критерием Стьюдента, F-критерием Фишера и T-критерием Вилкоксона). Показатели силы влияния факторов на изучаемые физиологические процессы определяли по методу Снедекора (Снедекор, 1961). Аппроксимация кривых изменения биомассы с помощью линии тренда производили в программе Microsoft Excel.

В работе используется следующий принцип обозначения условий культивирования: $5^0/310E$ - высечки содержали в аквариумах при температуре воды 5^0C и освещенности $310 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$.

Глава IV. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование суточной ритмики движения хлоропластов, скорости нетто фотосинтеза, скорости роста талломов и скорости растяжения клеток *Ulva fenestrata* и цито-, кариокинеза у *U. pseudocurvata* и *Porphyra umbilicalis* показало, что ритмические изменения скорости растяжения клеток протекали в противофазе с ритмическими изменениями скорости нетто фотосинтеза. Максимальные скорости растяжения клеток были зарегистрированы в полночь, а минимальные – в полдень. В полночь пристеночное положение хлоропластов («профиль») совпадало с максимальными значениями скорости растяжения клеток таллома и минимальной скоростью нетто фотосинтеза водорослей. Максимальная скорость роста талломов



Ulva fenestrata была зарегистрирована в 3:00 ч ночи, а минимальная - в 15:00 ч дня. Разница между пиками ритма скорости роста талломов и пиками ритма скорости нетто фотосинтеза составляла 15 ч. Фазовый сдвиг между максимальными значениями скорости растяжения клеток и скорости роста талломов составлял 3 ч. Рост слоевищ *U. fenestrata* достигал наибольшей скорости спустя 3 ч после миграции хлоропластов в пристеночное положение (рис. 1). Исследование карิโอ- и цитокинеза у *U. pseudocurvata* и *Porphyra umbilicalis* показало, что разница между пиками этих процессов составляет 12 ч и 9 ч, соответственно.

Исследование условий протекания основных стадий онтогенеза зеленой водоросли *U. fenestrata* показало, что рост ее высечек осуществлялся по экспоненте (рис. 2). Биомасса этих высечек при температуре воды 10⁰С увеличивалась в 3 раза быстрее по сравнению с другими температурными условиями (5, 15, 20, 25⁰С). На

вегетативный рост высечек сильное влияние оказывали освещенность (обуславливала 63% изменчивости скорости роста) и температура (30%), а также их комбинированное воздействие (3%). Скорость роста высечек из талломов *Ulva fenestrata* была минимальной при 5⁰С и составляла в среднем 3.35±0.4 и 6.68±0.71 % сут⁻¹ (40 и 60 мкЕ м⁻² с⁻¹, соответственно), и максимальной - при температуре 10⁰С и составляла 6.56±0.31 и 8.96±0.65 % сут⁻¹ (40 и 60 мкЕ м⁻² с⁻¹, соответственно) В вариантах 5⁰/30-250Е процессы споро- и гаметогенеза не наблюдались. В варианте 10⁰/40Е формирование гамет на высечках происходило не синхронно, на трех из шести дисках репродуктивных процессов не встречено, а доля репродуктивной поверхности от всей площади высечек составляла в среднем 6%. Наибольшую площадь высечки (71% от всей площади высечки) репродуктивная ткань занимала в варианте 15⁰/40Е. В варианте 10⁰/60Е периодическое формирование гамет и зооспор наблюдалось в среднем каждые 10 сут. В варианте 15⁰/60Е образование фертильных клеток регистрировали через каждые 6 сут, а в варианте 20⁰/40-60Е - с периодом 5 суток (рис. 3). Фертильная кайма, на долю которой приходилось от 1 до 25% поверхности диска, достоверно не влияла на скорость роста высечек *U. fenestrata*. Установлены следующие оптимальные условия репродукции и роста талломов *U. fenestrata*: 5⁰/40Е – минимальный вегетативный рост, 10⁰/40Е – максимальный вегетативный рост и 15⁰/40Е – максимальное количество репродуктивных клеток.

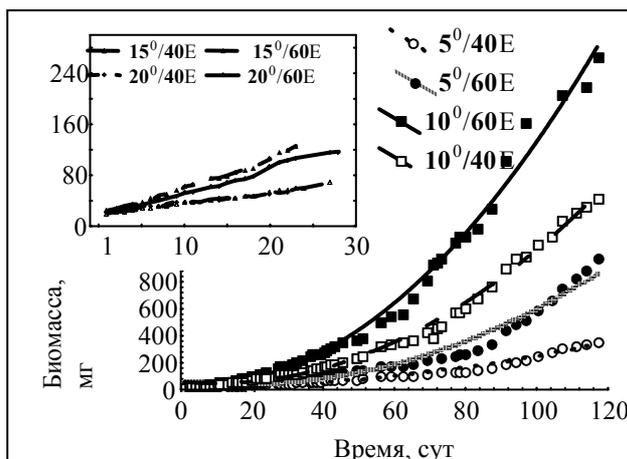


Рис. 2. Изменение биомассы высечек *U. fenestrata* в различных условиях культивирования.

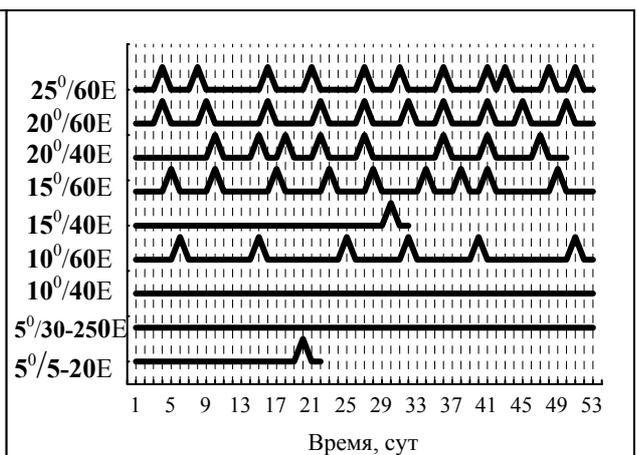


Рис. 3. Ритмы репродукции *U. fenestrata* в различных условиях культивирования

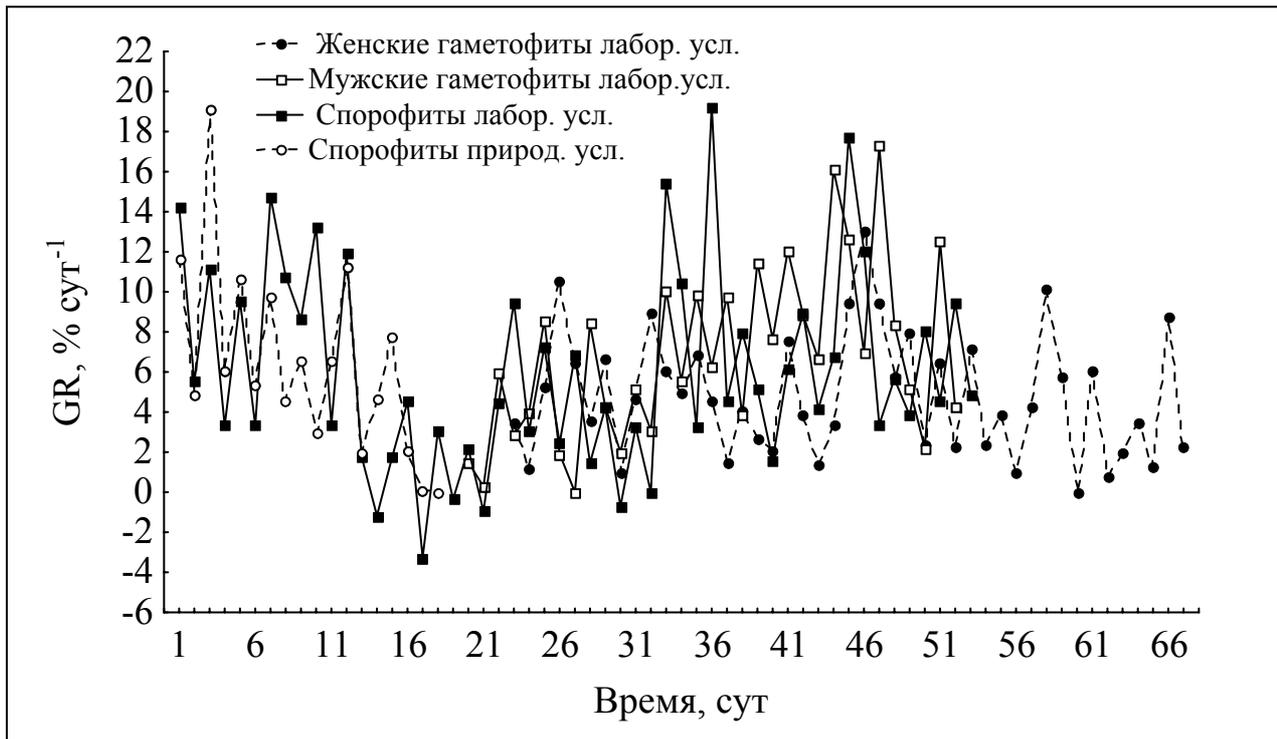


Рис. 4. Скорость роста (GR) разных генераций *U. fenestrata* в лабораторных (25°C , $60 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, L:D=12:12) и природных условиях культивирования, $n=9$.

В ходе исследования ритмических изменений скорости роста *Ulva fenestrata* и *Punctaria plantaginea*, а также деления клеток у *U. pseudocurvata*, *Porphyra umbilicalis* было обнаружено два типа инфрадианных ритмов: циркасептантные – недельные (период равен 6 сут) и циркасемисептантные – полунедельные (период равен 2-3 сут). При постоянном действии света 6 сут ритмы сохранялись до двух циклов, а 2-3 сут ритмы – до пяти циклов.

Исследование ритмики скорости роста слоевищ высококодифференцированных макроводорослей *Sparlingia pertusa* и *Undaria pinnatifida* показало, что скорость роста высечек из стерильных частей таллома (вне меристем) изменяется с периодом 2 сут и представляет собой циркасемисептанный ритм (табл. 2), тогда как циркасептантные ритмы роста у этих макрофитов выявлены не были. Изучение процессов деления и деградации зооксантелл в герматипных кораллах также показало, что эти процессы изменяются с периодичностью 2 сут (полунедельные ритмы) и 6 сут (недельные ритмы).

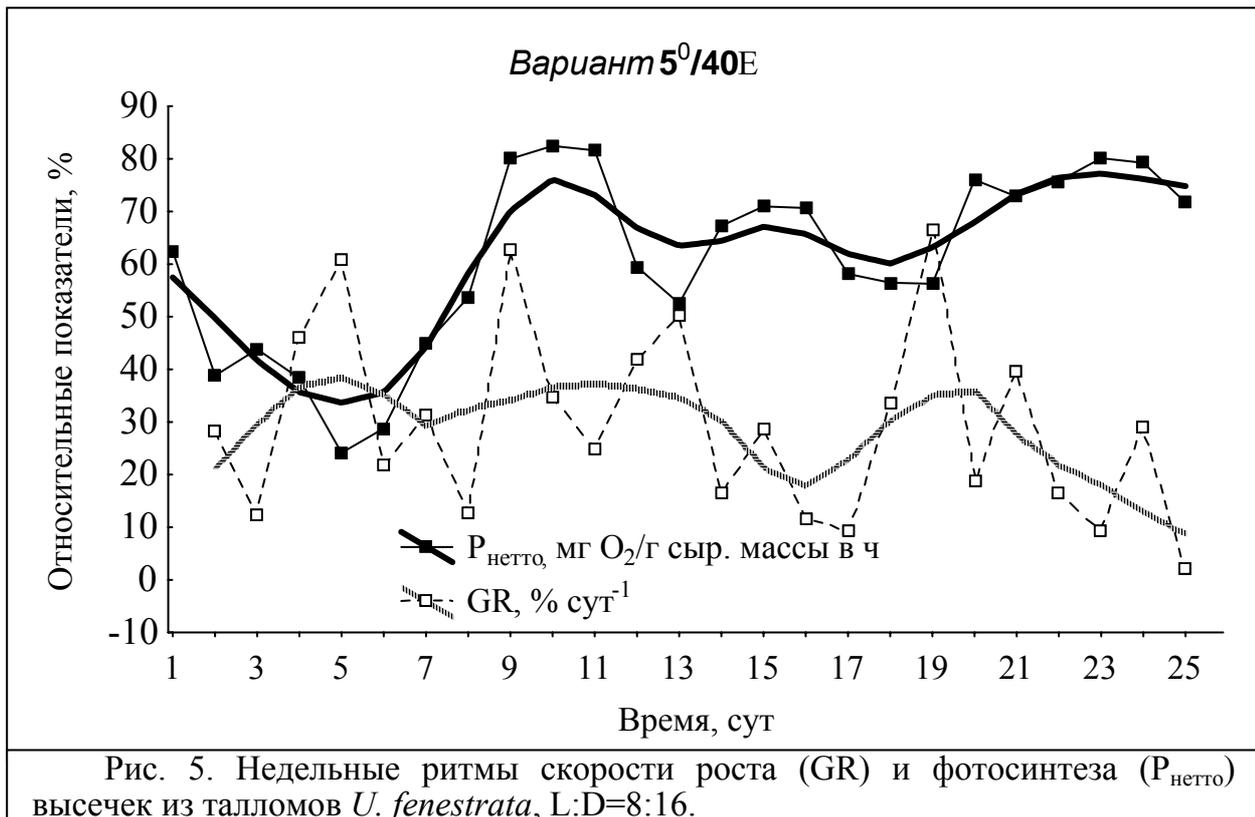
Влияние температуры, освещенности и фотопериода на длину периода инфрадианных ритмов исследовали на примере *U. fenestrata* и зооксантелл. Было обнаружено, что при низких температурах воды ($5-10^{\circ}\text{C}$) доминировал вегетативный рост талломов и 3 сут циклы в кривой скорости роста высечек, тогда

Таблица 2. Длина периода инфрадианных ритмов продукционных процессов у водорослей.

Водоросли	Ритм	Условия, $^{\circ}\text{C}/\text{мкЕ м}^{-2} \text{с}^{-1}$	Период, сут
<i>Ulva fenestrata</i>	скорость роста	5/40, 5/60, 10/40, 10/60, 5/30, 5/160, 5/250	2.7±0,5 и 6.5±1.5
		15/40, 15/60, 20/40, 20/60, 25/60, 5/5, 5/15, 5/310	2.1±0.3 и 6.1±1.2
	скорость растяжения клеток	10/20	2.5±0.6 и 5.9±0.3
<i>Ulva pseudocurvata</i>	скорость роста	10/40	3.2±0.1 и 6.6±1.5
	митотический индекс		3.2±0.9 и 6.4±1.4
<i>Porphyra umbilicalis</i>	скорость роста	10/100	2.3±0.1 и 6±0.2
	митотический индекс		2.1±0.1 и 5.8±0.4
<i>Sparlingia pertusa</i>	скорость роста	5/40	2.2±0.1
<i>Punctaria plantaginea</i>	скорость роста	5/40	2.8±0.5 и 6.1±1.1
<i>Undaria pinnatifida</i>	скорость роста	5/40	2.1±0.3
<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	деление и деградация	22/30,95 % ФАР _п	2.1±0.1 и 6.1±0.9

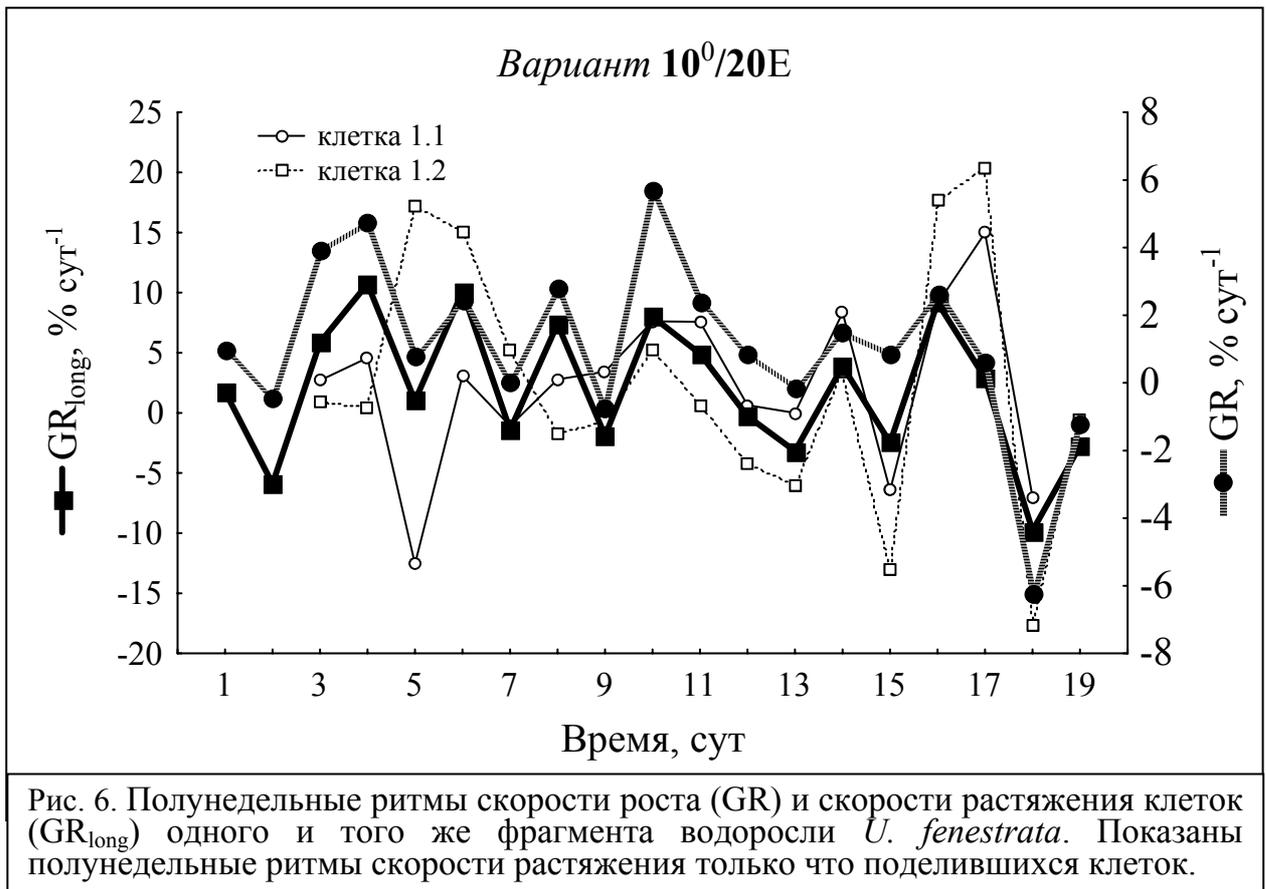
как при высоких температурах воды (15-25⁰С) наблюдались периодические репродуктивные процессы и преобладали 2 сут циклы изменения скорости роста дисков между репродукциями. Температура воды обуславливала 43% изменчивости длины периода скорости роста дисков (показатель силы влияния температуры по Снедекору). Влияние освещенности было несколько слабее, на ее долю приходилось около 30% изменчивости длины периода. Вегетативный рост высечек был зарегистрирован в диапазоне освещенности 30-250 мкЕ м⁻² с⁻¹. В этих условиях преобладали 3 сут циклы в кривой скорости роста высечек *U. fenestrata*. Доминирование 2 сут циклов в росте дисков наблюдали при низких (5-20 мкЕ м² с¹) и высоких (310 мкЕ м⁻² с⁻¹) интенсивностях света. В первом случае было зарегистрировано формирование репродуктивных клеток на всех дисках одновременно, а во втором – высечки погибали в результате обесцвечивания хлорофилла *a* на 9 сут после начала эксперимента. Фотопериод не влиял на длину периода циркасемисептанных биоритмов скорости роста водорослей. Действие факторов среды на длину периода циркасемисептанных (6 сут) ритмов у всех водорослей обнаружено не было.

Показано, что освещенность не оказывает влияния на длину периода полунедельных ритмов деления и деградации зооксантелл. Установлено, что резкое изменение световых условий культивирования кораллов уже на следующие сутки



оказывало влияние, как на индекс деления, так и на индекс деградации зооксантелл. При переносе кораллов с яркого на слабый свет (30% ФАР_п) наблюдали временное увеличение индекса деления и уменьшение индекса деградации микроводорослей. У адаптированных к низким интенсивностям света, и перенесенных на яркий свет кораллов (95 % ФАР_п) индекс деления зооксантелл снижался, а индекс деградации зооксантелл повышался.

Изучение влияния эндогенных факторов на инфраниантные ритмы *Ulva fenestrata* показало, что скорость нетто фотосинтеза высечек из талломов водорослей изменялась с периодом 6 сут. Этот ритм протекал в противофазе с недельным ритмом скорости роста этих же высечек, фазовый сдвиг между этими ритмами составлял в среднем 3 сут. Анализ Фурье позволил выделить также полулунный ритм скорости нетто фотосинтеза с периодом 11.33 ± 2 сут. Полулунный ритм скорости роста дисков (12 сут) был зарегистрирован у трех из девяти высечек (рис. 5). Были обнаружены полунедельные и недельные ритма скорости растяжения клеток и скорости роста высечек *U. fenestrata*. Показано, что эти ритмы совпадают по фазе (рис. 6). Рост дочерних клеток сразу после деления значительно различался по скоростям растяжения этих клеток, в некоторых случаях полунедельный ритм скорости растяжения дочерних клеток протекал в



первые несколько суток в противофазе. Через неделю скорость растяжения недавно поделившихся клеток достоверно не отличалась от скорости растяжения клеток всего таллома (рис. 6). Также было обнаружено, что при делении клеток, объем материнских клеток больше суммы дочерних клеток в среднем на 4.09 ± 3.54 %.

Глава IV. ОБСУЖДЕНИЕ

Характерные черты суточных и циркадианных биоритмов похожи у всех организмов: их период приблизительно равен 24 ч, они чувствительны к изменению освещенности и имеют температурно-компенсаторный механизм длины периода. Большинство суточных и циркадианных ритмов физиологических процессов у водорослей протекают параллельно, независимо друг от друга, гармонично согласуясь между собой во времени (Sweeney, 1987; Millar, 1999; Suzuki, Johnson, 2001).

Нами было показано, что в световую фазу суток вся жизнедеятельность талломов водорослей подчинена выполнению фотосинтетических (максимальная скорость нетто фотосинтеза в полдень, хлоропласты переходят в положение «чаша»), а в темновую фазу – ростовых процессов (митотическое деление клеток

и/или рост клеток растяжением в полночь, рост талломов и/или цитокинез в конце ночи – ранним утром). Доминирование этих процессов в разное время суток, видимо, обеспечивает нормальную жизнедеятельность растений. К такому же заключению пришли К. Люнинг и Э.А. Титлянов с коллегами, изучая рост и деление клеток в талломах *Ulva pseudocurvata* и *Porphyra umbilicalis* (Titlyanov et al., 1996a; Lüning et al., 1997). Суточная смена дня и ночи, фиксируемая водорослями за счет работы фитохром и криптохром подобных фоторецепторов, синхронизирует внутренние часы растений, и обеспечивает им возможность точно распределять во времени светозависимые и темновые процессы (рост и репродукцию) (Mizoguchi et al., 2002).

Изучение временной структуры суточных ритмов фотосинтетических, ростовых и репродуктивных процессов у водорослей позволило установить, что исследование инфрадианных ритмов этих физиологических процессов необходимо производить в утренние часы, когда продукционные показатели водорослей близки к максимальным значениям.

В результате наших исследований у различно организованных морских водорослей впервые были обнаружены инфрадианные ритмы в росте талломов, делении и растяжении клеток, а так же в скорости нетто фотосинтеза с периодами 2-3 сут (полунедельные и циркасемисептанные ритмы) и 6 сут (недельные и циркасептанные ритмы). Сохранение обнаруженных ритмических изменений скорости роста и митотической активности талломов при постоянном действии света и температуры в течение 5 и 2 циклов свидетельствует об эндогенной природе этих ритмов.

В наших экспериментах полунедельные и циркасемисептанные биоритмы были присущи всем водорослям, тогда как недельные ритмы физиологических процессов были зарегистрированы только у низкодифференцированных водорослей (зооксантеллы, *Ulva fenestrata*, *U. pseudocurvata*, *Porphyra umbilicalis*, *Punctaria plantaginea*). Предполагается, что недельные ритмы роста характерны только для тканей макрофитов с регулярным клеточным делением. Используемые в наших экспериментах высечки *Sparlingia pertusa* и *Undaria pinnatifida* отличались отсутствием делящихся митозом клеток, и их рост осуществлялся в большинстве случаев за счет растяжения, что может объяснить отсутствие у них этой ритмики.

Исследование периодических изменений роста высечек из меристематических зон талломов высокоорганизованных водорослей требует дальнейшего изучения.

Характерной чертой циркасемисептанной и полунедельной ритмики ростовых процессов у низкодифференцированных водорослей было доминирование 3 сут циклов роста, если наблюдался вегетативный рост талломов, и преобладание 2 сут циклов роста, если водоросли переходили к репродукции или разрушались.

Наши эксперименты показали, что температура воды оказывала сильное влияние (объясняла 43% изменчивости длины периода) на длину периода циркасемисептантных ритмов скорости роста, скорости растяжения и митотической активности клеток у макрофитов с диффузным типом роста. Низкие температуры воды (5-10⁰С) удлинляли период этих ритмов до 3 сут, тогда как высокие значения температуры воды (15-25⁰С) сокращали длину периода до 2 сут. У высокодифференцированных водорослей зависимости длины периода от температуры обнаружено не было. Влияние температуры воды на длину периода циркасемисептантных биоритмов является неожиданным результатом, так как для циркадианных ритмов общепризнано наличие температурной компенсации.

Освещенность оказывала менее существенное влияние на длину периода циркасемисептантных биоритмов (около 30 % изменчивости). Как правило, низкие интенсивности света обеспечивали длину периода в 3 сут, а высокие – в 2 сут. Было установлено, что у *Ulva fenestrata* 3 сут циклы в циркасемисептанном ритме скорости роста преобладали в диапазоне освещенности 30-250 мкЕ м⁻² с⁻¹. Действие высоких интенсивностей света (60-100 мкЕ м⁻² с⁻¹) на длину периода циркасемисептантных ритмов скорости роста, митотического индекса и скорости растяжения клеток также было обнаружено нами у водорослей с диффузным типом роста *U. pseudocurvata*, *Porphyra umbilicalis* и *Punctaria plantaginea*. Однако, доминирования «длинного» (3 сут) цикла при низкой интенсивности света в росте слоевищ высокодифференцированных макроводорослей *Sparlingia pertusa* и *Undaria pinnatifida*, а также в делении и деградации одноклеточной водоросли *Symbiodinium microadriaticum* найдено не было.

Таким образом, у низкодифференцированных водорослей пониженные температуры воды 5-10⁰С и освещенность в диапазоне 30-250 мкЕ м⁻² с⁻¹ способствовали остановке развития водорослевых дисков на стадии вегетативного

роста и преобладанию 3 сут циклов в циркасемисептанном ритме скорости роста. Культивирование высечек при температуре воды в 15–25⁰С приводило к доминированию 2 сут циклов роста и периодическому формированию на дисках репродуктивных клеток или разрушению водорослей.

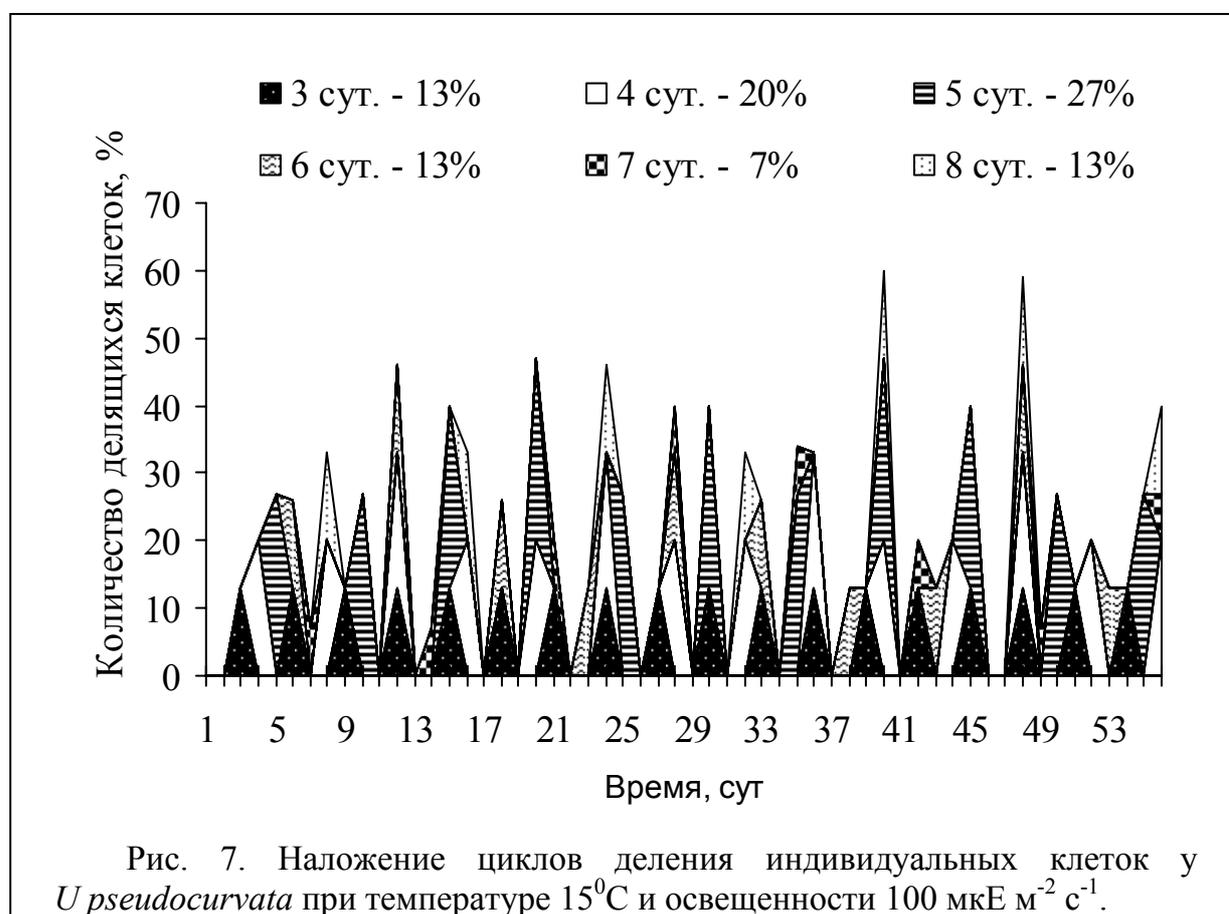
В наших экспериментах какого-либо влияния факторов среды (освещенность, температура и фотопериод) на длину периода циркасептаных ритмов скорости роста, скорости растяжения клеток, митотического индекса, а также деления и деградации зооксантелл обнаружено не было. Видимо, этот тип ритмики полностью обусловлен действием эндогенных процессов у морских водорослей. К такому же предположению пришел К. Люнинг с коллегами (2007), изучая периодичность репродуктивных процессов у *Ulva pseudocurvata*.

Факторы внешней среды обуславливали около 73% изменчивости длины периода инфрадианных ритмов роста. Это позволило предположить, что 27% изменчивости длины периода объясняется действием эндогенных факторов. Учитывая тот факт, что фотосинтез является центральным звеном всех метаболических процессов растений, первым этапом в изучении эндогенных факторов, контролирующих рост и репродукцию водорослей, стало исследование инфрадианных ритмов скорости нетто фотосинтеза. Нами был обнаружен недельный ритм скорости нетто фотосинтеза *U. fenestrata*, который протекал в противофазе с циркасептаным ритмом скорости роста высечек. Период этих ритмов был около 6 сут и фазовый сдвиг между этими ритмами составлял в среднем 3 сут. Все подъемы и спады этих ритм соответствовали друг другу. На основании этих фактов, мы предположили, что недельный ритм скорости нетто фотосинтеза высечек из талломов водорослей лежит в основе недельной ритмики скорости роста высечек.

Другим эндогенным фактором, который мог бы влиять на длину периода инфрадианных ритмов, вероятно, является процесс деления клеток митозом. Было известно, что 13% клеток в талломе *U. pseudocurvata* имеет время генерации 3 сут, 20% - 4 сут, 27% - 5, 13% - 6, 7% – 7, 13 % - 8 сут и более при температуре 15⁰С и интенсивности света 100 мкЕ м⁻² с⁻¹ (Titlyanov et al., 1996a). В талломах *Porphyra umbilicalis* при 15⁰С и освещенности 60 мкЕ м⁻² с⁻¹ время генерации равно 2 сут встречалось у 15%, 3 сут – у 70% клеток (Lüning et al., 1997). Если предположить,

что процентное соотношение клеток с разным временем генерации в слоевище водорослей постоянно во времени, то наложение циклов деления отдельных групп клеток друг на друга могло бы объяснить возникновение инфрадианных биоритмов митотического индекса и, как следствие, инфрадианных ритмов скорости роста у макрофитов (рис. 7). Однако изучение деления клеток и роста талломов *Ulva fenestrata* показало, что на фоне инфрадианных ритмов роста клеточное деление отсутствовало. Исследование одних и тех же полей в течение 25 сут показало, что клетки увеличивались в объеме, т.е. наблюдался рост клеток путем растяжения. Полунедельные и недельные ритмы скорости растяжения клеток полностью совпадали с инфрадианными ритмами скорости роста слоевищ по количеству пиков и их длине. Другими словами, нами впервые описаны инфрадианные ритмы растяжения клеток, и мы предполагаем, что эти ритмы лежат в основе инфрадианных ритмов роста водорослей.

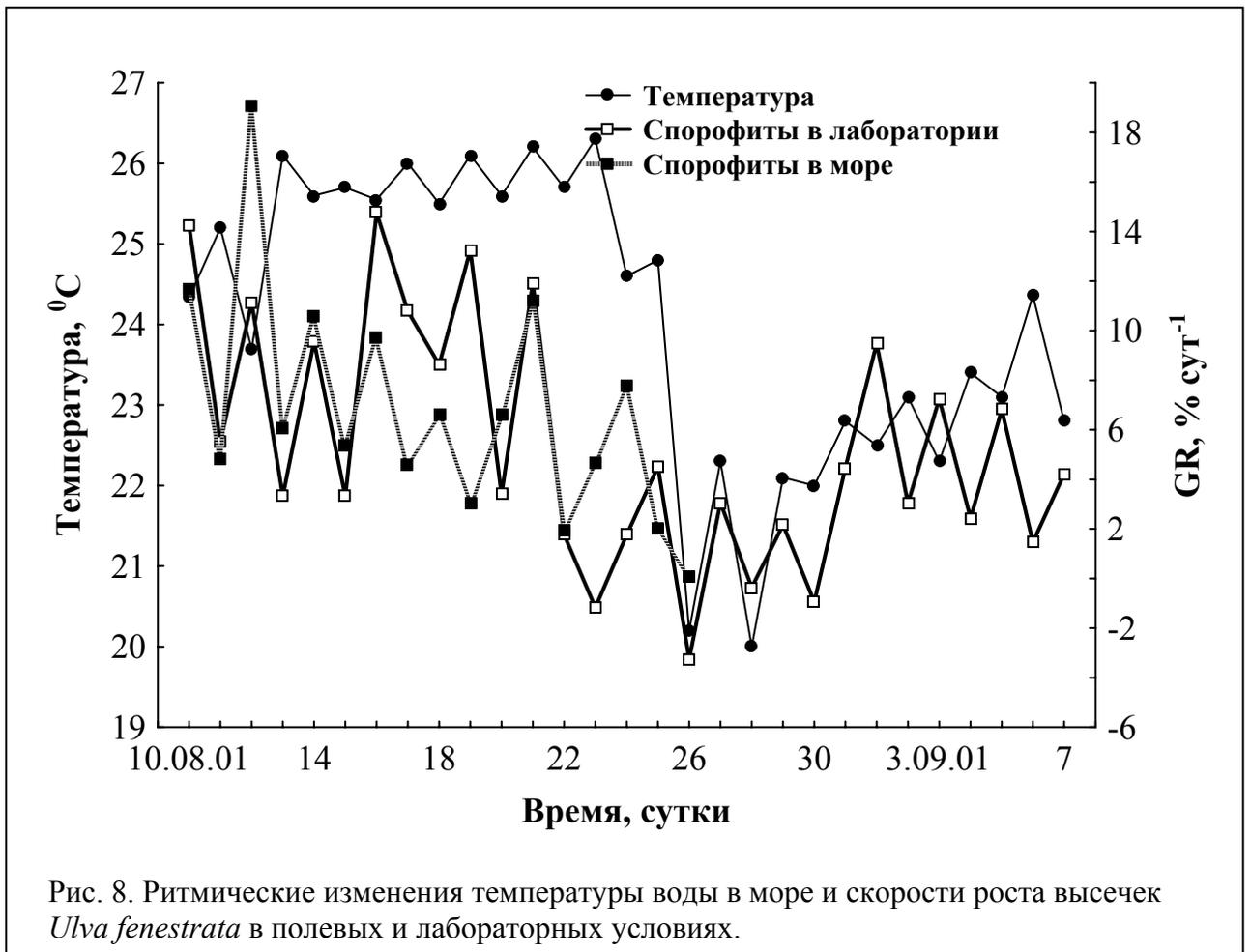
Таким образом, исходя из результатов нашего исследования, мы можем предположить, что скорость вегетативного роста, скорость растяжения клеток, митотический индекс цито- и кариокинеза у макроводорослей с диффузным типом



роста, а также деление и деградация зооксантелл находятся под контролем инфранианного (ого) (циркасемисептанного и циркасептанного) осцилляторов(а), тогда как у высокоорганизованных макрофитов скорость роста талломов вне меристематических зон регулируется, по-видимому, только циркасемисептанным осциллятором.

Нами было установлено, что в благоприятных условиях (15-25⁰/40-60E) период между отдельными репродуктивными процессами у *Ulva fenestrata* в среднем равен 5 сут, а в неблагоприятных (5-10⁰/5-40E) – 10, 20 и 30 сут. Этот факт свидетельствует о том, что в неблагоприятных условиях среды у водорослей пропускается один или несколько репродуктивных циклов. Наши выводы подтверждаются результатами других исследователей (Lüning et al., 2007), которые связывают периодичность формирования репродуктивных клеток с эндогенными процессами в талломе водоросли. Они предполагают, что 14 сут (полулунный) репродуктивный период возникает не вследствие влияния приливов-отливов, а в результате действия неблагоприятных факторов (низких температур воды и освещенностей) и пропуска одного репродуктивного цикла (равного неделе), а лунный свет только синхронизирует выход репродуктивных клеток. Кроме того, недельные ритмы репродукции были обнаружены у *Halicystis*-фазы *Derbesia marina* (Ziegler-Page, Kingsbury, 1968), у *Ulva pseudocurvata* (Lüning et al., 2007), *U. pertusa* (Okuda, 1984), *U. rigida* (Antica, Marcenko, 1984), *U. fenestrata*, *Enteromorpha linza* (Титлянова, 1990) в лаборатории или в природе в верхней сублиторальной зоне летом, где действие неблагоприятных факторов среды минимально.

Впервые обнаруженные нами циркасемисептанные ритмы скорости роста, скорости растяжения клеток, митотического индекса цито- и кариокинеза у макрофитов, а также деления и деградации зооксантелл, по нашему мнению, синхронизируются циклическими изменениями температуры воды. Это предположение основано на результатах наших исследований, проведенных в Амурском заливе в августе 2001 г. на глубине 0.5 - 1 м. Нами были зарегистрированы 2 сут изменения температуры воды в диапазоне 0.1 – 4.1⁰С (в течение месяца температура воды изменялась в диапазоне 18-26⁰С), (рис. 8). Скорость роста высечек из талломов *U. fenestrata* повышалась на следующие сутки



после увеличения среднесуточной температуры воды, или, наоборот, понижалась на следующие сутки после уменьшения температуры воды в море. Наше предположение подтверждается так же сообщением К.Е. Кеньён (1996) о двух суточной периодичности метеорологических показателей вдоль параллели 35⁰ с.ш. в Тихом океане (температура воздуха, давление, скорость и направление ветра, облачность). Автор полагал, что главной причиной обнаруженной ритмики является неравномерность прогрева низких и высоких широт, в результате чего возникает горизонтальный переток тепла в атмосфере с периодом 2 сут. Таким образом, 2 сут изменения температуры воздуха являются таким же атмосферным феноменом, как смена дня и ночи (определяющая циркадианную ритмику) или годовой ход длины дня (цирканнуальная ритмика), поэтому логично предположить, что у всех организмов, населяющих нашу планету должны выработаться механизмы для адаптации к такому изменению метеорологических параметров.

ВЫВОДЫ

1. Впервые выявлены инфрадианные циркасемисептанные (2-3 сут) ритмы роста талломов, деления и растяжения клеток у всех макроводорослей, а также деления и деградации зооксантелл, которые характеризуются длиной периода 2-3 сут и температурным контролем длины периода. Предполагается, что синхронизирующим агентом циркасемисептанных биоритмов являются глобальные 2 сут циклы изменения температуры воздуха.

2. Впервые описаны циркасептанные (6 сут) ритмы роста талломов, деления и растяжения клеток только у низкодифференцированных макроводорослей (с диффузным типом роста), а также циркасептанные ритмы деления и деградации зооксантелл. Установлено, что эти ритмы характеризуются длиной периода около 6 сут, обладают температурно-компенсаторным механизмом и запускаются эндогенными факторами.

3. Установлено, что изучение инфрадианных биоритмов физиологических процессов у морских водорослей необходимо производить в утренние часы, когда продукционные показатели водорослей близки к максимальным значениям.

4. Впервые показано, что у низкодифференцированных водорослей пониженные температуры воды 5-10⁰С и освещенность в диапазоне 30-250 мкЕ м⁻² с⁻¹ тормозят репродуктивные процессы и способствуют вегетативному росту талломов с преобладанием 3 сут циклов. Высокие температуры воды 15-25⁰С содействуют периодическому формированию репродуктивных клеток и доминированию 2 сут циклов в росте клеток водоросли между репродукциями.

5. Предполагается, что инфрадианные циркасемисептанные (2-3 сут) и циркасептанные (6 сут) ритмы скорости растяжения индивидуальных клеток *Ulva fenestrata* лежат в основе инфрадианных циркасемисептанных и циркасептанных ритмов скорости роста талломов, а также что недельный ритм скорости нетто фотосинтеза *U. fenestrata* лежит в основе недельной ритмики скорости роста талломов.

6. Выявлены оптимальные условия культивирования зеленой водоросли *U. fenestrata*: освещенность 40 мкЕ м⁻² с⁻¹ и температура воды 5⁰С – минимальный вегетативный рост (для сохранения вегетативной массы водоросли в коллекциях), и температура воды 10⁰С – максимальный вегетативный рост (для быстрого накопления вегетативной массы водоросли), и температура воды 15⁰С – максимальное количество репродуктивных клеток.

Содержание диссертации отражено в следующих публикациях автора:

1. Калита Т.Л., Титлянов Э.А. Влияние температуры и освещенности на рост и репродукцию зеленой водоросли *Ulva fenestrata* // Биол. Моря. – 2003. – Т. 29 (5). - С. 351-357.
2. Titlyanov E.A., Titlyanova T.V., Kalita T.L., Yakovleva I.M. Rhythmicity in division and degradation of symbiotic dinoflagellates in the hermatypic coral *Stylophora pistillata* // Symbiosis. – 2004. – Vol. 36. – P. 211-224.
3. Титлянов Э.А., Титлянова Т.В., Яковлева И.М., Калита Т.Л. Ритмические изменения в процессах деления и деградации у симбиотических водорослей герматипных кораллов // Биол. Моря. – 2006. – Т. 32 (1). – С.17-25.
4. Калита Т.Л., Титлянова Т.В., Титлянов Э.А. Обнаружение новых периодических изменений в делении клеток и росте низко дифференцированных слоевищ зеленых и красных макроводорослей // Биол. Моря. – 2007. – Т. 33 (4). – С. 245-252.
5. Kalita T.L., Titlyanov E.A. New type of periodical variation of growth rate in the marine green macroalga *Ulva fenestrata* / Abstracts of the 4-th European Phycological Congress. – Oviedo, Spain, 2007. - P. 118.

