

На правах рукописи

КЛОЧКОВА Татьяна Андреевна

**ФОРМИРОВАНИЕ И ЗНАЧЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ
В РЕГЕНЕРАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ СИФОНОВ НЕКОТОРЫХ
СИФОНОВЫХ И СИФОНОКЛАДОВЫХ МОРСКИХ
ЗЕЛЕННЫХ
ВОДОРΟΣЛЕЙ**

03 00.25 - Гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток

2003

Научный руководитель:

доктор биологических наук Вараксин А.А.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Долматов И.Ю.

доктор биологических наук Реунов А.В.

Ведущая организация:

Дальневосточный государственный университет

Защита состоится 19 сентября 2003 г. в 10 часов на заседании
диссертационного совета Д 208.007.01 при Владивостокском
государственном медицинском университете по адресу: 690950, г.
Владивосток, проспект Острякова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Владивостокского государственного медицинского университета (г.
Владивосток, проспект Острякова, 2).

Автореферат разослан «13» августа 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 208.007.01
доктор медицинских наук

Рева Г.В.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Сифоновые и сифонокладовые водоросли относятся к древним, первично морским зеленым водорослям класса Siphonophyceae и принципиально отличаются от других групп Chlorophyta тем, что не имеют настоящего клеточного строения. Их слоевища - это либо одна гигантская, обычно многоядерная клетка-сифон, либо сифон, разделенный перегородками на многоядерные сегменты. Уникальное цитологическое строение этих водорослей определило возможности использования их как модельных объектов для изучения внутриклеточных и молекулярных процессов (Menzel, 1988; Graham, Wilcox, 2000). Появление новых сведений о жизнедеятельности и адаптации к окружающей среде гигантских клеток интересно как для расширения представлений о разнообразии проявлений жизни, так и для дальнейшего развития клеточной биологии.

Среди растительных организмов очень немногие не имеют типичного клеточного строения. Как и многоклеточные растения они подвержены травматизму. Но для последних даже обширные травмы не смертельны. У них в месте повреждения формируются прилегающие к ране защитные и восстановительные ткани, а восстановление отдельных поврежденных клеток становится маловажным (Lipetz, 1976; Buggeln, 1981). Выживание организма, представленного гигантской клеткой-сифоном либо несколькими крупными клеточными сегментами, напротив, зависит от их способности к регенерации.

Способы регенерации частично поврежденных сифонов и клеточных сегментов сифонофициевых водорослей начали изучать давно. Почти все проводившиеся в этом направлении исследования касались выяснения способов устранения небольших разрывов клеточной стенки и восстановления частично деформированной плазматической мембраны, когда почти вся протоплазма оставалась внутри клетки. При этом полагали, что в случае обширного повреждения слоевища, вызывающего вытекание протоплазмы в морскую воду, жизнь растения прекращается (Menzel, 1988).

Уникальную способность вытекшей протоплазмы сифоновой водоросли *Bryopsis plumosa* образовывать протопласты *in vitro* впервые обнаружили японские ученые

(Tatewaki, Nagata, 1970; Kobayashi, Kanaizuka, 1985). Детали процесса на молекулярном и клеточном уровнях они не изучили, но показали, что несовместимое с жизнью повреждение сифона приводит к появлению большого количества новых клеток, способных прорасти в обычные растения. Это интересное открытие поставило перед учеными новые вопросы: уникально ли обнаруженное явление для сифоновых водорослей и свойственно ли си-фнокладовым, существуют ли закономерности процесса формирования протопластов и в чем они проявляются? Проведенное исследование дает ответ на поставленные вопросы.

Цель и задачи исследования. Целью работы было изучение формирования протопластов и их дальнейшего значения в регенерации клеточных сифонов у сифоновых и сифнокладовых морских зеленых водорослей.

Для достижения поставленной цели было необходимо решение следующих задач:

- 1) с целью определения закономерностей и специфических особенностей процессов формирования протопластов представителей класса Siphonophyceae на основе изучения их разнообразия и распространения выбрать для изучения виды с разным уровнем морфологической организации таллома;
- 2) изучить процесс формирования протопластов сифоновых водорослей, определить, имеет ли место формирование протопластов у сифнокладовых водорослей;
- 3) определить механизм агглютинации клеточных компонентов с помощью методов цитохимического и молекулярного анализа;
- 4) установить последовательность процессов агглютинации клеточных компонентов и формирования плазматической мембраны протопласта у разных видов водорослей;
- 5) определить корреляцию между размерами образовавшихся протопластов и их выживаемостью и изучить влияние факторов среды на течение процессов формирования протопластов;
- 6) изучить процессы формирования протопластов у разных по морфологической сложности представителей класса Siphonophyceae и определить их общие закономерности;
- 7) оценить значение феномена для воспроизводства

жизнеспособного потомства и сохранения видового разнообразия в изученных таксономических группах.

Научная новизна. Впервые для 13 видов сифонофициевых водорослей проведено изучение процессов формирования протопластов на молекулярном и клеточном уровнях, определена последовательность этих процессов, их специфика и общие закономерности, показана роль протопластов в воспроизводстве видов. Данные исследования углубляют знания о способах воспроизводства гигантских клеток зеленых водорослей и сохранения их биологического разнообразия. Они меняют представление о том, что полное разрушение плазматической мембраны приводит к гибели клетки, и показывают, что в ходе формирования протопластов существует период, когда жизнь некоторое время может продолжаться в структурах, не имеющих плазматических мембран. Открытие этого явления было отмечено журналом «Science» (2001. Vol. 292) в разделе «Editor's choice».

До настоящего исследования было известно, что агглютинация клеток и клеточных консорциумов осуществляется посредством комплементарной лектинно-углеводной связи. Автор обнаружила, что в мире живой природы имеет место агглютинация *клеточных компонентов* (органел, ядер и жидкого вещества протоплазмы), и осуществляется она с помощью того же механизма. У *Bryopsis plumosa* в этот процесс вовлечен обнаруженный нами лектин бриохилин (Bryohealin). Это первый лектин водорослей с экспериментально определенной биологической ролью.

Теоретическое и практическое значение работы. Данные изучения формирования протопластов сифоновых и сифонокладовых водорослей объясняют особенности их исторического развития. Они могут дополнить учебные курсы альгологии и клеточной биологии. Данные о влиянии условий среды на выживание протопластов в морской воде могут быть использованы для разработки методов борьбы с биообрастанием субстратов. Разработанный автором метод подготовки деструктурированной водорослевой массы для определения специфических лектинов, участвующих в агглютинации клеточных компонентов, с незначительными модификациями может быть использован для их выявления у других водорослей. Лектин бриохилин,

обладающий способностью агглютинировать эритроциты крови, может использоваться для проведения исследований в медицине.

Теоретическое значение выполненного исследования было отмечено оргкомитетом Тихоокеанского азиатского фикологического форума «Algae 2002» (Тсукуба, Япония, 2002) присуждением высшей награды (Grand Prix).

Личный вклад автора. Автор собрала основную часть изученных видов и осуществляла их культивирование в лабораторных условиях; провела все микроскопические хронологические исследования и фотографирование объектов; выполнила эксперименты по определению состава первичной оболочки протопластов и ее последующей трансформации, определению роли плазматической мембраны материнского растения в формировании мембран протопластов, воздействию среды на развитие протопластов; разработала метод экстракции протоплазмы с подавленной способностью к агглютинации. При проведении гелевого электрофореза и определении лектина участие автора выразилось в подготовке материала для исследования и подборе химических реактивов и буферных растворов.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы докладывались или представлялись на научно-практической конференции «Проблемы защиты и рационального использования биоресурсов Камчатки» (Петропавловск-Камчатский, 1999); конференции молодых ученых «Биомониторинг и рациональное использование морских и пресноводных гидробионтов» (Владивосток, 1999); на 54-й ежегодной конференции корейской ассоциации биологических наук (Тэджон, Южная Корея, 1999); ежегодной конференции корейского ботанического общества (Пайсаи, Южная Корея, 2000); совместном корейско-японском симпозиуме по молекулярному развитию растений (Конджу, Южная Корея, 2000); XV-й ежегодной конференции корейского альгологического общества (Канрын, Южная Корея, 2001); VII-м международном альгологическом симпозиуме (Фессалоники, Греция, 2001); XVI-й ежегодной конференции корейского альгологического общества (Конджу, Южная Корея, 2001); на тихоокеанском азиатском фикологическом форуме «Algae 2002» (Тсукуба, Япония, 2002); на заседании кафедры биологических наук Токийского национального университета

(Токио, Япония, 2002), на заседании Камчатского отделения Российского Ботанического Общества (Петропавловск-Камчатский, 2002).

Основные положения, выносимые на защиту.

- 1) агглютинация вытекших *in vitro* клеточных компонентов (органел, ядер и жидкого вещества протоплазмы) в протоплазматические массы происходит посредством образования комплементарной лектинно-углеводной связи;
- 2) у протопластов в течение нескольких часов с момента их формирования отсутствует плазматическая мембрана. Ее регенерация происходит в 3 этапа (1 - появление полисахаридной либо полисахаридно-белковой оболочки; 2 - ее преобразование в полисахаридно-липидную оболочку; 3 - формирование липидно-белковой мембраны). При этом используется разрушенная плазматическая мембрана материнского растения;
- 3) у изученных сифоновых и сифонокладовых водорослей наиболее высокую выживаемость имеют те из образовавшихся протопластов, размеры которых близки к размерам зооспор соответствующих видов;
- 4) процесс дальнейшего развития появившихся из протопластов клеток зависит от морфологической сложности талломов исходных растений;
- 5) сформированные *in vitro* протопласты сифоновых и сифонокладовых морских зеленых водорослей выполняют регенеративную и репродуктивную функции.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ (7 статей и 8 тезисов), из них 13 - за рубежом. 2 статьи приняты к печати в зарубежные журналы.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из 6 глав, изложена на 147 страницах, включает 42 рисунка и 15 таблиц. Список литературы включает 159 публикаций, из них 99 иностранных.

Благодарности. Выражаю глубокую благодарность своему научному руководителю, д.б.н. А.А. Вараксину за оказанную им помощь. Особо я признательна профессору Национального университета Конджу (Южная Корея) Г.Х. Киму (Ph.D., Prof. Kim Gwang Hoon, Kongju National University, Korea), в лаборатории которого мне посчастливилось работать, за его постоянное

внимание к моим исследованиям, возможность использовать научное оборудование, необходимые материалы и научную литературу. Выражаю благодарность заведующей лабораторией альгологии КФ ТИГ д.б.н. Н.Г. Ключковой за консультации по вопросам морской фитогеографии и экологии водорослей.

Работа выполнена в рамках плановой темы НИР КФ ТИГ ДВО РАН «Изучение водорослей-макрофитов Северо-Западной Пацифики» (шифр: 2.33.1, 2.33.6). Цитохимические и молекулярные исследования проводились при финансовой поддержке KOSEF (grant H00010, руководитель Г.Х. Ким).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили водоросли, собранные автором в разных районах Японского и Желтого морей. Дополнительно использовали материал из коллекции водорослевых культур профессора Университета Мельбурна (Австралия) Джона Веста (Ph.D., West John A.). Для выращивания культур водорослей использовали инкубационные шкафы фирмы Biovision емкостью 2 м³, поддерживающие постоянную температуру и освещение.

Протопласты получали путем выдавливания на предметное стекло в небольшое количество морской воды протоплазмы из клеточных сегментов и сифонов водорослей. Некоторую ее часть переносили стерильной пипеткой в чашку Петри 10x2 см с морской водой и инкубировали при тех же условиях, что и материнские растения. Контроль за развитием в чашках Петри протопластов до стадии взрослых растений проводили через каждые 24 ч с помощью инверсионного микроскопа (Olympus IX70). Для изучения ранних стадий развития протопластов предметные стекла с оставшейся протоплазматической массой, в зависимости от решаемой задачи, просматривали через разные промежутки времени под разными микроскопами: световым и флуоресцентным (Olympus BX50), лазерным сканирующим (Fluoview, v. 2.0.28, Olympus) и инверсионным. Для фотографирования использовали фотонасадку фирмы Polaroid.

О влиянии размеров протопластов на их выживание судили по результатам сравнения процентных долей оставшихся в живых после 24 ч инкубирования с момента формирования живых протопластов в каждой выделенной размерной группе.

При этом первоначальное количество протопластов в каждой размерной группе принималось за 100 %.

Для приготовления искусственной морской воды использовали дистиллированную воду - 100 мл; NaCl - 2,63 г; MgCl₂ - 0,609 г; MgSO₄ - 0,193 г; KCl - 0,074 г; CaCl₂ - 0,11 г; C₄H₁₁NO₃ (Triz) - 0,1 г. Понижая и повышая концентрацию NaCl, изменяли соленость; удаляя некоторые соли, - ионный состав воды, добавляя NaOH или HCl, регулировали pH. Выдавливая протоплазму в среду с разным составом ингредиентов, изучали влияние условий среды на процессы агглютинации клеточных компонентов и формирование протопластов. Чтобы определить долю плазматической мембраны материнского растения, задействованной в формировании мембран протопластов, проводили сравнение площади поверхности материнского растения, равной площади его мембраны, и суммарной площади поверхностей всех протопластов, образовавшихся из его протоплазмы. Для расчета этих площадей использовали обычные геометрические формулы.

В ходе изучения способности различных углеводов блокировать агглютинацию клеточных компонентов протоплазму выдавливали на предметное стекло со счетной камерой объемом 1 см³, наполненной раствором исследуемого углевода в морской воде, и выдерживали 1 ч. О его влиянии на преобразование протоплазмы судили по соотношению появившихся в счетной камере протопластов с первичными оболочками, протоплазматических сгустков без оболочек и отдельных хлоропластов.

Для получения концентрированного водорослевого экстракта 10 г водорослей измельчали в 10 мл искусственной морской воды с pH 6 и соленостью 900 ммоль NaCl. Этим предотвращали агглютинацию клеточных компонентов. Смесь процеживали, собирали в пластиковые пробирки и центрифугировали 10 мин на скорости 12,000 g. Удаляли осевшие органеллы и ядра и повторно центрифугировали 30 мин на скорости 1,700 g. Затем добавлением дистиллированной воды понижали соленость экстракта до 450 ммоль, а pH доводили до 8. Полученный экстракт загружали в фильтр Amicon 8200 с показателем давления 5,3 кг/см⁻² (Millipore Corp., Bedford, MA) и концентрировали до объема 2 мл.

Для изучения ингибирования гемагглютинативной способности водорослевого экстракта различными углеводами в качестве тестера использовали отмытые солевым раствором эритроциты человеческой крови. Экстракт с понижающимся градиентом концентрации заливали в углубления специальной пластинки, туда же добавляли суспензию эритроцитов в солевом растворе. Ингибирование активности присутствующих в водорослевом экстракте лектинов различными углеводами проводили следующим образом. В каждую из ячеек пластинки помещали растворенный в дистиллированной воде исследуемый углевод с понижающейся концентрацией. Затем в них добавляли суспензию эритроцитов в солевом растворе и водорослевый экстракт. В обоих опытах пластинки инкубировали 1 ч при комнатной температуре и затем определяли результаты.

Препараты окрашивали флуорохромными красителями компаний Vector Laboratories (Burlingame, CA) и Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A.). Мембраны хлоропластов и ядер окрашивали с помощью флуорохрома Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated lectins; актин в рассеянном талломе *B. plumosa* - с помощью FITC-conjugated phalloidin (Oparka, Read, 1994). Для окрашивания внутриклеточных липидов и плазматической мембраны протопластов использовали флуорохромы Nile Red (Nile Blue A Oxazone; Oparka, Read, 1994) и TMA-DPH, 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-a, 3,5-hexatriene (Mulders *et al*, 1986); ядер - DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole); целлюлозной клеточной стенки - Calcofluor White M2R. Для определения целостности плазма-леммы протопластов использовали флуоресцентный диацетат (ФДА) и йодид пропидиума (Oparka, Read, 1994). ФДА широко используется для окрашивания живых клеток и определения целостности плазмалеммы. Йодид пропидиума окрашивает ядерную ДНК мертвых клеток, мембраны которых, как известно, проницаемы. Окрашенные препараты изучали под флуоресцентным и лазерным сканирующим микроскопами.

Специфический лектин, вовлеченный в процесс агглютинации клеточных компонентов *B. plumosa*, был выделен в ходе аффинной хроматографии (Bollag, Edelstein, 1991) с использованием N-ацетил-глюкозамин-агарозной аффинной колонки. В начале эксперимента готовили концентрированный водорослевый экстракт *B. plumosa*. Подготовленный

водорослевый экстракт заливали в колонку и выдерживали в ней в течение 10-12 ч. Далее экстракт удаляли, колонку промывали искусственной морской водой для удаления всех веществ протоплазмы за исключением специфического N-ацетил-глюкозамину лектина, и следом лектин элюировали раствором N-ацетил-глюкозамина в искусственной морской воде. В ходе этой процедуры каждую из фракций промывки собирали в отдельные пробирки. Затем проводили электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) для того, чтобы определить наличие лектина в фракциях (Laemmli, 1970; Bollag, Edelstein, 1991).

Фракция, содержащая исследуемый лектин, отделялась, после чего проводился ее повторный электрофорез. Перед электрофорезом лектин обрабатывали 2-меркаптоэтанолом для уменьшения количества дисульфидных связей. Белки на фореграмме окрашивали раствором Coomassie brilliant blue R. В ходе этого эксперимента использовали химические реактивы компании Bio-Rad Laboratories (Hercules, U.S.A.).

Лизирование оболочки у протопластов осуществляли растворами в морской воде разных гидролитических ферментов. Их концентрацию подбирали опытным путем. По результатам действия ферментов определяли химический состав оболочек протопластов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение таксономического разнообразия, цитологической и морфологической организации и географического распространения сифонофициевых водорослей позволило включить в настоящее исследование виды с разной по сложности морфологической организацией. Для выяснения того, насколько особенности процессов формирования протопластов обусловлены таксономическим положением вида, были выбраны представители разных семейств. Чтобы определить, являются ли эти процессы родоспецифическими, исследовались виды, принадлежащие к одному и тому же роду. Изучение процессов образования протопластов и их последующего развития у видов *B. plumosa*, *Chaetomorpha aerea* и *Microdictyon umbilicatum* было проведено наиболее детально на молекулярном и клеточном уровнях. При исследовании остальных видов главное внимание уделялось выяснению способности вытекшей протоплазмы к агрегированию и формированию протопластов, определению условий их выживания и дальнейшего развития

новообразованных клеток, а также изучению воздействия факторов среды на агглютинацию клеточных компонентов.

Формирование и роль протопластов у сифоновой водоросли *Bryopsis plumosa* (Huds.) Ag.

Слоевище данного вида представляет собой гигантскую многоядерную клетку. Цитоплазма в ней находится в постоянном круговом движении. При повреждении клеточной стенки она мгновенно устремляется во внешнюю среду, и сифон спадает. Вытекшая масса разбивается на множество отдельных рыхлых массивов неопределенной формы. В течение первых секунд в каждом из них происходит активное круговое движение клеточных компонентов, и в результате «скручивания» они сжимаются в компактные плотные образования округлой формы. На поверхности агглютинирующей массы постепенно формируется целостная обертка, названная нами *первичной оболочкой*. Весь процесс от вытекания протоплазмы до появления протопластов в первичной оболочке занимает от 10 до 20 мин.

Агглютинация компонентов клетки происходит достаточно беспорядочно, и значительная часть протоплазмы материнского растения теряется на самых ранних стадиях ее посттравматического преобразования. Сформированные протопласты часто содержат неполный набор органелл и ядер. Одни из них имеют множественные хлоропласты, но не имеют ядер, другие, напротив, содержат лишь несколько хлоропластов и многочисленные ядра. Отсутствие ядер обуславливает нежизнеспособность протопластов, однако множественное их присутствие не оказывает существенного влияния на уровень их выживаемости. Протопласты диаметром 20-50 мкм содержат обычно по 1-5 ядер.

Эксперименты по изучению воздействия рН и солености среды на агглютинацию компонентов выдавленной протоплазмы и последующее формирование из нее протопластов показали, что эти процессы успешно протекают при рН 7-8 и солености 400-500 ммоль, что соответствует нормальным рН и солености морской воды. Негативное воздействие на протекание этих процессов оказывает дефицит кальция и магния.

Выживаемость образовавшихся протопластов во многом зависит от их размеров. Исследования показали, что у наиболее жизнеспособных из них диаметр равен 30-40 мкм, что приблизительно соответствует размерам зооспор этого вида, которые колеблются в пределах 10-30 мкм.

Важнейшим этапом формирования протопластов является агглютинация вытекших из сифона в морскую воду компонентов клетки и образование компактных протоплазматических сгустков. Мы предположили, что это

осуществляется с помощью комплементарной лектинно-углеводной связи, и для подтверждения этого провели серию экспериментов. Эксперименты по изучению способности различных углеводов блокировать агглютинацию клеточных компонентов *B. plumosa* показали, что она не происходила в присутствии в морской воде N-ацетил-галактозамина, N-ацетил-глюкозамина, D(+)-галактозамина и D(+)-глюкозамина (табл. 1).

Таблица 1

Количество протоплазматической массы, агрегированной в протопласты, при разрушении растений изученных видов в 0,1 М. растворах разных углеводов в морской воде (%)*

Углевод	Виды		
	<i>Bryopsis plumosa</i>	<i>Chaetomorpha aerea</i>	<i>Microdictyon umbilicatum</i>
Контрольная среда**	93,3 ± 2,2	83,1 ± 3,0	79,8 ± 4,6
D(+)-галактоза	72,4 ± 3,6	80,0 ± 3,9	79,2 ± 4,3
D(+)-глюкоза	75,8 ± 2,6	81,8 ± 2,4	79,5 ± 2,3
N-ацетил-глюкозамин	8,1 ± 3,2	75,2 ± 4,5	78,2 ± 4,6
N-ацетил-галактозамин	11,1 ± 4,1	80,4 ± 3,1	78,6 ± 3,8
L-фукоза	79,5 ± 2,8	79,6 ± 2,9	72,2 ± 5,8
D(+)-галактозамин	1,2 ± 0,7	16,1 ± 5,0	7,2 ± 2,3
D(+)-глюкозамин	1,1 ± 0,7	9,2 ± 4,3	6,0 ± 3,3
D(+)-манноза	73,9 ± 2,4	29,8 ± 9,1	3,9 ± 2,3

* В этой и следующей таблице 2 представлены средние значения 10-15кратных повторностей для каждого реактива. Знак ± обозначает стандартное отклонение по выборке. ** Морская вода, не содержащая углеводов.

Окрашивание отделенных от жидкого вещества протоплазмы органел и ядер различными флуоресцентными лектинами показало, что лектины, являющиеся комплементарными этим активным углеводам, окрасили мембраны хлоропластов (*Dilichos biflorus* agglutinin, Peanut agglutinin, Soybean agglutinin и Wheat germ agglutinin). Концентрированный водорослевый экстракт *B. plumosa* эффективно агглютинировал взвешенные в солевом растворе эритроциты человеческой крови, что также свидетельствует о наличии в нем лектинов. Однако, когда вместе с водорослевым экстрактом к эритроцитам добавляли растворы различных углеводов, то в присутствии четырех вышеуказанных сахаридов их агглютинация не происходила. На основании результатов этих и других описанных выше экспериментов был разработан метод выделения из

протоплазмы специфического лектина, участвующего в агглютинации клеточных компонентов *B. plumosa*.

Для получения фракции протоплазмы, содержащей исследуемый лектин, подготовленный специальным образом водорослевый экстракт инкубировали в N-ацетил-глюкозамин-агарозной аффинной колонке, и затем полученную фракцию подвергли электрофорезу в полиакриламидном геле (рис. 1).



Рис. 1. Результаты электрофореза в полиакриламидном геле: 1 - стандартные маркеры молекулярного веса (97,4 кДа, 67,0 кДа, 41,0 кДа, 31,0 кДа, 21,0 кДа, 14,4 кДа); 2 - свободное от органелл и ядер вещество протоплазмы; 3 - фракция промывки; 4 - очищенный в ходе аффинной хроматографии лектин бриохилин

В результате проведенных экспериментов был выделен лектин и определено, что его молекула состоит из двух субъединиц, соединенных дисульфидными мостиками.

Полученный лектин обладал высокой гемагглютинативной активностью, которая ингибировалась N-ацетил-глюкозаминном. Он также агглютинировал отмытые от жидкого вещества протоплазмы хлоропласты *B. plumosa*. Полученный лектин - бриохилин является в настоящее время первым лектином водорослей, для которого удалось экспериментально определить функциональную роль в жизни клетки. По своим биохимическим характеристикам он ближе к лектинам наземных растений, поскольку: а) состоит из 2 субъединиц, б) имеет аффинитет с сахарами, с) обладает достаточно высоким молекулярным весом (53,73 кДа). Дивалентные катионы для его активирования не нужны.

Окрашивание внутриклеточных липидов и оболочек протопластов флуорохромом Nile Red показало, что первичная оболочка протопластов в самом начале их существования не является липидной мембраной. Ее химический состав определили с помощью различных гидролитических ферментов (табл. 2). Исследования показали, что основными структурными элементами первичной оболочки протопластов в первый час их существования являются полисахариды. Затем в нее начинают

встраиваться липиды, и еще через несколько часов она полностью заменяется липидной мембраной.

Количество протопластов *Bryopsis plumosa* с неповрежденной оболочкой после 5-минутного инкубирования в растворах разных ферментов в морской воде, %

Фермент	Возраст протопласта, ч				
	1	3	6	9	12
Контрольная среда*	56,4 ± 2,0	59,5 ± 5,9	56,8 ± 2,0	56,0 ± 6,1	52,0 ± 2,4
α-маннозидаза	9,8 ± 0,7	26,5 ± 4,0	36,2 ± 0,5	43,1 ± 2,9	52,6 ± 3,9
β-глюкуронидаза	41,8 ± 2,4	55,2 ± 5,3	50,1 ± 2,4	57,0 ± 4,8	53,6 ± 2,9
β-глюкозидаза	32,4 ± 8,4	22,3 ± 2,5	32,4 ± 8,3	28,6 ± 10,7	52,0 ± 2,4
Целлюлаза	22,5 ± 2,1	24,4 ± 3,7	22,5 ± 2,1	53,3 ± 3,5	49,9 ± 3,5
Пектиназа	25,8 ± 4,1	22,6 ± 4,5	25,8 ± 4,1	54,4 ± 6,2	48,3 ± 2,6
Протеиназа К	57,6 ± 6,0	59,6 ± 7,2	57,6 ± 6,0	50,0 ± 4,1	48,6 ± 3,5
Липаза	54,8 ± 4,8	38,3 ± 6,1	15,8 ± 3,2	48,1 ± 4,8	50,7 ± 2,8

* Морская вода, не содержащая ферменты.

Расчет доли мембран протопластов от мембраны материнского растения показал, что общая площадь мембран протопластов не превышает ее площадь у материнского растения (табл. 3). Мы полагаем, что плазматическая мембрана всех протопластов формируется из остатков разрушенной плазматической мембраны материнского растения. Дополнительным аргументом в пользу этого предположения служит то, что в протоплазматических массах изначально присутствует большое количество липидного материала.

|

Вид *C. aerea* был включен в число изучаемых объектов в связи с тем, что он имеет крупные клеточные сегменты с неподвижной цитоплазмой (рис. 2. 1). При повреждении клеточных стенок гигантских многоядерных сегментов в морской воде происходила почти мгновенная фрагментация их содержимого.

Вначале выдавленная во внешнюю среду протоплазма представляла собой множество отдельных рыхлых массивов. В течение первых 2-3 сек с момента травмы они выглядели как однослойная мелкоячеистая сеть, состоящая из множественных, рыхло связанных между собой органел и ядер, погруженных в прозрачное студенистое вещество. Попадая в морскую воду, такая сеть начинала стягиваться, уплотняться и формировала компактную плотную массу округлой формы. Через 10-30 мин на ее поверхности образовывалась первичная оболочка (рис. 2. 2-4).

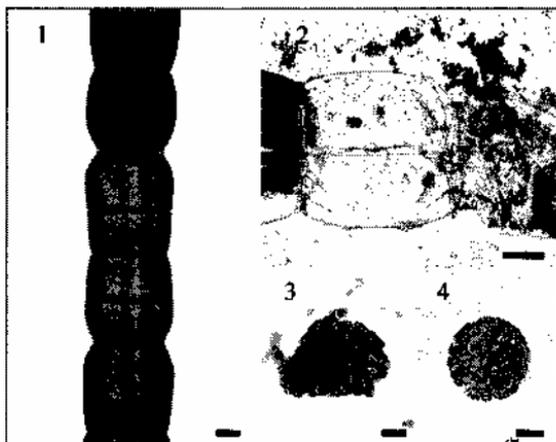


Рис. 2. Процесс образования протопласта у *Chaetomorpha aerea*:

- 1 - фрагмент нити растения; 2 - разрушенные клеточные сегменты с вытекшей протоплазмой; 3 - агглютинация протоплазмы в протоплазматическую массу через 1 мин после ранения растения; 4 - протопласт в первичной полисахаридной оболочке через 20 мин после агглютинации протоплазмы (масштаб = 10 мкм)

У *C. aerea* из 1 мкл протоплазмы образовывалось около 200 протопластов различных размеров. Их выживаемость напрямую зависела от размеров. Наиболее жизнеспособными оказывались протопласты с поперечником 50-60 мкм, но они составляли только около 2,5 % от общего количества всех появившихся структур. Через 12 ч после формирования протопластов на их поверхности начинала концентрироваться целлюлоза. Формирование клеточной стенки завершилось через 24 ч после появления протопластов. Затем новые клетки начали увеличиваться в размерах. В течение

следующих 24 ч большинство новообразованных клеток увеличились в размерах в 2-2,5 раза. Однако это увеличение объема клеток возникало в результате поглощения ими воды, но не их роста, поскольку количество хлоропластов и ядер в них оставалось неизменным. Цитоплазма внутри новых клеток распределялась неравномерно. В течение следующего дня у многих из них начали появляться проростковые трубки. Размер каждой следующей трубки, как и количество в ней цитоплазмы, был меньшим, чем у предыдущей. Проростковые трубки, появившиеся в числе последних, часто представляли собой небольшие пустые или полупустые везикулы. Изменение условий содержания культур не оказывали влияния на особенности развития протопластов и сформировавшихся из них клеток. Выросшие при любой температуре (15, 20, 25°C) «растения» характеризовались крайней редуkcией и не были похожи на исходные материнские слоевища *C. aerea*.

Многочисленные растения обычной морфологии появлялись в результате других процессов. В течение первых 4-х дней в образовавшихся из протопластов клетках формировались апланоспоры (рис. 3). В ходе их последующего развития появлялись нитчатые талломы.

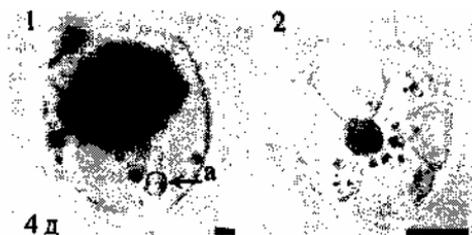


Рис. 3. Формирование апланоспор в клетке, образовавшейся из протопласта у *Chaetomorpha aerea*: 1 - появление апланоспор (а) на 4-й день после формирования протопласта; 2 - покинувшая материнскую клетку апланоспора (масштаб: 1 = 15 мкм, 2=10 мкм)

С появлением апланоспор стало понятно, почему из всех образовавшихся протопластов успешнее всего выживали более крупные. Именно в них мог сосредоточиться клеточный материал и энергоресурс, достаточный для формирования апланоспор. Покинув материнскую клетку, апланоспоры делились на 8 дочерних клеток, которые затем отделялись друг от друга и некоторое время находились в неподвижном состоянии. Через несколько часов все образовавшиеся дочерние клетки расправляли жгутики и становились подвижными. Поскольку их генетическая природа была неизвестна, мы называем их свормерами. После периода активного движения они оседали на субстрат и начинали прорастать в талломы видоспецифичной морфологии.

Следующий изученный нами вид *M. umblicatum*, в отличие от *S. aerea*, имеет очень мелкие клеточные сегменты также с неподвижной цитоплазмой. При разрушении сегментов из каждого вытекало небольшое количество протоплазмы. Размеры протоплазматических комочков никогда не превышали 45 мкм. Плавающие в воде сгустки протоплазмы имели неопределенную форму и представляли собой смесь ядер и оргanel, но уже через одну минуту они начали стягиваться (рис. 4).

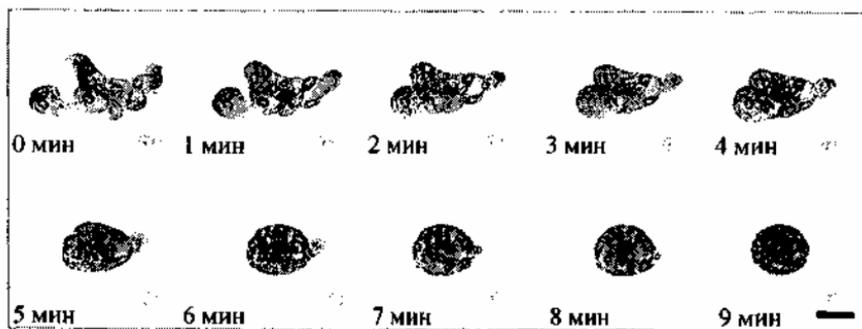


Рис. 4. Последовательность формирования протопласта у *Microdictyon umblicatum* (масштаб = 10 мкм)

Особенностью формирования протопластов у *M. umblicatum* было то, что они, в отличие от таковых у ранее рассмотренных видов, формировались за значительно более короткое время - от 5 до 10 мин, в зависимости от размера. Из протоплазмы одного клеточного сегмента формировалось в среднем от 10 до 20 протопластов. Их размеры всегда были постоянными - в среднем от 10 до 20 мкм в диаметре. Размах их колебания лежал в пределах 10-45 мкм. Протопласты больше этого размера никогда не формировались. Лучше всего выживали протопласты в размерной группе 15-25 мкм.

Изучение компоновки в протопластах хлоропластов и ядер показало, что количество ядер в них было неодинаковым и варьировало даже у протопластов одинакового размера. У тех из них, которые имели минимальные размеры (около 10 мкм) было не более одного ядра. У более крупных их было от 1 до 3 и более. Результаты этого исследования указывают на то, что у представителей Siphonophyceae хлоропласты и ядра увязываются не в строго определенном порядке, а произвольно.

Критическим периодом существования протопластов *M. umbilicatum* является время с момента их образования до 3-го часа жизни. К 12-му часу все нежизнеспособные протопласты дегенерировали, а оставшиеся в живых (около 40 % от их первоначального количества) практически все продолжили дальнейшее развитие. Формирование целлюлозной клеточной стенки протопластов начиналось через 20 ч и заканчивалось через 48-50 ч после их образования. Как только этот процесс завершался, появлявшиеся клетки имели все шансы на выживание.

В течение последующей недели они в несколько раз увеличили свой объем за счет деления органелл и ядер. Самые крупные из них достигли 140 мкм в поперечнике. Дальнейшее развитие этих клеток протекало по двум сценариям. В одном случае через неделю они выпускали четырехжгутиковые свормеры, с максимальной эффективностью используя все свое внутреннее содержимое. Одна клетка давала их в среднем до 100 штук. Максимально зарегистрированное количество свормеров равнялось 345.

В другом случае клетки начали рост и деление, и через 1 месяц культивирования появлялись талломы, состоящие из 10-20 клеточных сегментов. В дальнейшем некоторые из них становились репродуктивными и формировали такие же свормеры. Они, как и свормеры, появлявшиеся из одиночных клеток, выходили наружу через специальную пору в клеточной стенке. Соотношение количества клеток, развивавшихся по разным сценариям, составляло 70 и 30 % соответственно. Судя по сходству способов испускания свормеров и по тому, как полно они использовали клеточный материал, одноклеточное образование, появившееся из протопласта и выпустившее свормеры, в цикле развития *M. umbilicatum* можно уподобить одноклеточному фертильному растению (рис. 5).

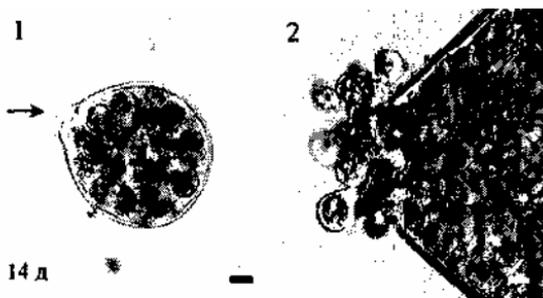


Рис. 5. Образование свормеров в одноклеточном фертильном растении, появившемся из протопласта *Microdictyon umbilicatum*: 1 - формирование поры; 2 - выход свормеров из клетки во внешнюю среду (масштаб: 10 мкм)

Свормеры, появившиеся из одно- и многосегментных растений, имели овальную форму. Их размеры колебались от 10 до 15 мкм. Примечательно, что близкие размеры были у большинства сформировавшихся протопластов (10-20 мкм). После недолгого периода пелагической жизни свормеры сбрасывали жгутики и оседали на субстрат. При их прорастании появлялись талломы, отличающиеся от многосегментных растений, развившихся из закончивших формирование протопластов, наличием ризоидальных выростов на вентральной части.

Агглютинация клеточных компонентов и последующее формирование плазматической мембраны протопластов

Агглютинация клеточных компонентов и формирование протопластов у *C. aerea* и *M. umbilicatum* происходили наиболее успешно при показателях рН 7-8 и солености 400-500 ммоль. Дефицит ионов кальция, магния, калия и серы не оказывал существенного негативного влияния на процесс агглютинации. Однако кальций и магний в последующем лимитировали формирование первичной оболочки. В растворах, не содержащих эти ионы, протопласты, сумевшие сформировать оболочку, вскоре погибали.

Для того чтобы определить, задействован ли у этих видов в процессе агглютинации клеточных компонентов механизм лектинно-углеводной связи, была выполнена серия таких же, как и для *B. plumosa*, экспериментов. Интересным оказалось то, что агглютинация клеточных компонентов у *C. aerea* и *M. umbilicatum*

ингибировалась одинаковыми углеводами: D(+)-галакто-замином, D(+)-глюкозамином и D(+)-маннозой (табл. 1). Несмотря на то, что у *C. aerea* в среде с добавлением этих углеводов все-таки происходило образование немногих мелких протопластов, они, как показали дальнейшие наблюдения, были нежизнеспособными и вскоре деградировали и погибали.

Три лектина, Concanavalin A, Peanut agglutinin и *Ricinus communis* agglutinin, являющиеся комплементарными указанным выше активным углеводам, окрасили мембраны хлоропластов *C. aerea* и *M. umbilicatum*, и один лектин, Peanut agglutinin, - мембраны ядер *C. aerea*. Напомним, что у *B. plumosa* также имело место окрашивание мембран хлоропластов.

Эти результаты наводили на мысль, что при смешивании протоплазмы *C. aerea* и *M. umbilicatum* можно получить беспорядочную агглютинацию их клеточных компонентов. Однако проведенные эксперименты, направленные на выяснение этой возможности, дали отрицательный результат. Это могло произойти из-за отсутствия нужных условий проведения эксперимента, но мы также не исключаем того, что здесь сработали еще неизвестные в науке внутриклеточные механизмы опознавания собственных органел, обеспечивающие видовую изоляцию.

Концентрированный водорослевый экстракт *C. aerea* и *M. umbilicatum* агглютинировал взвешенные в солевом растворе эритроциты крови. Когда вместе с экстрактом к эритроцитам добавляли растворы углеводов, тогда в присутствии трех вышеуказанных сахаридов, ингибирующих агглютинацию клеточных компонентов, агглютинация эритроцитов не происходила. На основе результатов всех проведенных экспериментов был сделан вывод о том, что в протоплазме *C. aerea* и *M. umbilicatum*, так же как и в протоплазме *B. plumosa*, присутствуют лектины, а на мембранах внутриклеточных структур - комплементарные им углеводы.

Выше указывалось, что у обоих видов сифонокладовых по мере преобразования протоплазматической массы также появляется протопласт в первичной оболочке. Для того чтобы определить ее способность к селективному транспорту, использовали окрашивание флуорохромами ФДА и йодид пропидиума. Когда протопласты погружали в раствор морской воды с добавлением ФДА, у всех живых протопластов

окрашивание регистрировали по всему внутреннему объему. Картина окрашивания разновозрастных протопластов была разной. Так, у *C. aerea* спустя 6 ч после их образования флуоресценция наблюдалась уже только по периферии (рис. 6).

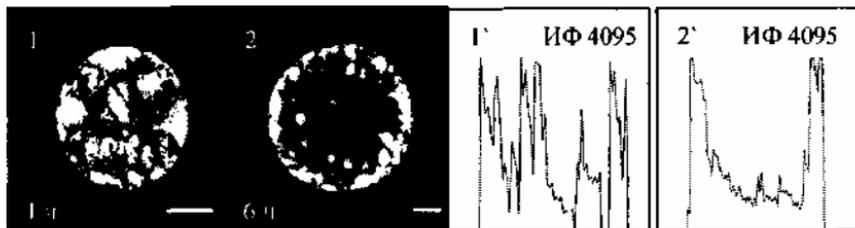


Рис. 6. Прижизненное окрашивание протопластов *Chaetomorpha aerea* флуоресцентным диацетатом: 1-2 - микрофотографии протопластов через разные промежутки времени после формирования (лазерный микроскоп); 1'-2' - компьютерный анализ интенсивности флуоресценции тех же протопластов (P — расстояние, ИФ — интенсивность флуоресценции; масштаб = 10 мкм)

У *M. umblicatum* это происходило позже, только через 10 часов с момента образования протопластов. Это указывало на завершение процессов упорядочивания внутриклеточного материала и формирование центральной вакуоли. Таким образом, цитоплазматическое содержимое протопластов *C. aerea* и *M. umblicatum* становилось организованным только по прошествии 6 и 10 ч, соответственно,

некоторое время. Параллельно с процессом ее формирования имело место образование клеточной стенки.

Чтобы определить состав первичных оболочек протопластов, на них воздействовали различными гидролитическими ферментами. По результатам этих экспериментов было определено, что у *C. aerea*, как и у *B. plumosa*, первичная оболочка протопластов в течение, как минимум, первых трех часов в качестве главных структурных компонентов включает полисахариды.

Для *M. umbilicatum* в ходе экспериментов были получены иные, чем для *B. plumosa* и *C. aerea*, данные. Если у двух последних видов в начале формирования протопластов их оболочки лизировались при воздействии ферментов, расщепляющих полисахариды, то у *M. umbilicatum* наряду с ними высокой гидролитической активностью обладал фермент протеиназа К, расщепляющий белки. Это показало, что в состав первичной оболочки протопластов *M. umbilicatum* входят полисахариды и белки. Затем эти полисахаридные или полисахаридно-белковые оболочки протопластов трансформируются в полисахаридно-липидные и спустя еще несколько часов заменяются плазматическими мембранами.

Определение общей площади поверхности появившихся протопластов и последующий расчет соотношения площади поверхности слоевища материнского растения и всех протопластов показал, что в построении мембран протопластов у *C. aerea* и *M. umbilicatum* задействовано в среднем 21,6 и 15,5 % материнской мембраны соответственно.

Таким образом, самые ранние этапы формирования протопластов *C. aerea* и *M. umbilicatum* близки к таковым у *B. plumosa*. Они протекают по одной схеме и различаются только скоростью тех или иных процессов. Что касается дальнейшего развития клеток, появившихся из протопластов, то оно у изученных видов оказалось разным. Чтобы понять причины этого явления и дать ему удовлетворительную интерпретацию, были изучены другие виды сифоновых и сифонокладовых водорослей.

Процессы формирования протопластов у других представителей сифоновых и сифонокладовых водорослей

Для изучения способности к формированию протопластов и особенностей этих процессов у других представителей указанных порядков были взяты виды, отличающиеся жизненными циклами, экологией, распределением. Исследования показали, что у них в разной мере проявляется способность к посттравматическому преобразованию протоплазмы. Эти процессы в общих чертах сходны с таковыми у описанных выше видов и в то же время имеют

специфические особенности. Сравнительная характеристика некоторых из них приведена в таблице 4. Отметим, что в настоящей таблице виды расположены нами в порядке усложнения их морфологической организации.

Изучение воздействия на процессы агглютинации клеточных компонентов и формирование протопластов условий среды показывают, что у всех видов они протекали наиболее успешно при показателях рН 7-8 и солености 400-500 ммоль, что соответствует нормальным значениям рН и солености морской воды.

У представителей сифонокладовых водорослей, в отличие от сифоновых, эффективность использования материнской мембраны и степень выживаемости образовавшихся протопластов имели противоположные значения. Так, у видов рода *Cladophora* протоплазма при разных условиях экспериментов использовалась очень эффективно. Однако далее для построения мембран протопласты этих видов используют менее 1 % липидного материала материнской мембраны, вероятно поэтому через 1 ч подавляющее количество появившихся в течение первых 30 мин протопластов погибает. У видов рода *Valonia* процессы формирования протопластов осуществлялись медленно и в целом были малоэффективными. Для построения мембран протопластов виды этого рода используют 3,0 - 4,6 % липидного материала материнской мембраны.

Результаты изучения особенностей развития протопластов у представителей обеих изучаемых групп представлены в таблице 5.

Данные таблицы показывают, что всем образовавшимся у изученных сифоновых водорослей клеткам свойственно прямое прорастание, их рост и деление приводят к появлению растений обычной видоспецифичной морфологии. Только у *Codium fragile* все протопласты погибали еще до формирования плазмалеммы, поэтому они не дали полноценных клеток.

У сифонокладовых водорослей, как видно из таблицы, наблюдается разный тип прорастания клеток, ~~РСИДЛЯЮЩИЕ~~

Характерные особенности ранних стадий формирования протопластов из протоплазмы материнских растений у изученных видов водорослей

Вид	Эффективность использования протоплазмы материнского	Выживаемость протопластов	Время образования протопластов, мин	Размеры протопластов, мкм	Наличие и тип первичной оболочки протопласта
<i>Derbesia</i> sp.	Высокая	Высокая	5-10	10-40	+ (не изучена)
<i>Bryopsis plumosa</i>	Высокая	Высокая	10-20	10-100 (< 200)	+ (полисахаридная)
<i>Codium fragile</i>	Очень низкая	Очень низкая	10-15	10-15	+ (не изучена)
<i>Ventricaria ventricosa</i>	Низкая	Низкая	20-40	10-100 (до 200)	+ (не изучена)
<i>Microdictyon umbilicatum</i>	Средняя	Высокая	5-10	10-40	+ (полисахаридно-белковая)
<i>Struwea</i> sp.	Средняя	Высокая	10-30	10-50	+ (не изучена)
<i>Chaetomorpha aerea</i>	Высокая	Средняя	10-30	10-100 (200)	+ (полисахаридная)
<i>Chaetomorpha moniligera</i>	Высокая	Средняя	10-30	10-100 (200)	+ (не изучена)
<i>Cladophora sakaii</i>	Высокая	Низкая	10-30	10-50	+ (не изучена)
<i>Cladophora wrightiana</i>	Высокая	Низкая	10-30	10-45	+ (не изучена)
Род <i>Valonia</i> (3 вида)	Низкая	Низкая	20-40	10-55	(не изучена)

В третьем, самом сложном, случае наблюдается трехступенчатый процесс преобразования клеток, появившихся в результате формирования протопластов. Он был обнаружен у *C. aerea* и *C. moniligera*. У этих видов клетки вначале увеличиваются в размерах, потом дают апланоспоры; те, в свою очередь, формируют свормеры, и только после прорастания свормеров образуются растения свойственной виду морфологии. У представителей родов *Cladophora* и *Valonia* прорастания появившихся из протопластов клеток не наблюдалось. В то же время необходимо отметить, что эти клетки в течение долгого времени, иногда до 2-х месяцев, сохраняли жизнеспособность. Отсутствие тенденции к формированию

полноценных клеток из протопластов имеет свое объяснение. Так, у видов рода *Valonia* внутри материнского клеточного сегмента происходит образование множественных зачатков дочерних талломов, и это обеспечивает успех их вегетативного размножения. Талломы представителей рода *Cladophora* образованы мелкими клеточными сегментами, окутанными толстыми, прочными клеточными стенками. Опасность их травмирования невелика.

Таблица 5

Развитие протопластов у изученных видов зеленых водорослей

Вид	Тип прорастания сформированн	Появившаяся структура	Тип роста появившейся структуры	Второе поколение
<i>Derbesia</i> sp.	Прямое	Обычное растение	Вытягивание сифона	Видоспецифическая форма
<i>Bryopsis plumosa</i>	Прямое	Обычное растение	Вытягивание сифона	Видоспецифическая форма
<i>Codium fragile</i>	Клетка не появляется	-	-	-
<i>Ventricaria ventricosa</i>	Прямое	Обычное растение	Вытягивание сифона	Видоспецифическая форма
<i>Microdictyon umbilicatum</i>	Прямое и свормерами	Обычное растение	Диффузный	Видоспецифическая форма
<i>Struvea</i> sp.	Прямое и свормерами	Обычное растение	Апикальный, позднее диффузный	Видоспецифическая форма
<i>Chaetomorpha aerea</i>	Апланоспоры	Свормеры	Апикальный, позднее диффузный	Видоспецифическая форма
<i>Chaetomorpha moniligera</i>	Апланоспоры	Свормеры	Апикальный, позднее диффузный	Видоспецифическая форма
<i>Cladophora sakaii</i>	Не прорастает	-	-	-
<i>Cladophora wrightiana</i>	Не прорастает	-	-	-
Род <i>Valonia</i>	Не прорастает	-	-	-

Таким образом, проведенные исследования показывают, что общая схема раннего развития протопластов у всех сифоновых и сифонокладовых водорослей одинакова. Детали этого процесса, а главное, тип последующего развития клеток, сформировавшихся из протопластов, достаточно разные и во многом определяются особенностями морфологической организации материнских растений. Чем она сложнее, тем ниже способность к формированию протопластов и появлению из них полноценных клеток.

Изученным водорослям свойственны дигенетические дипло-гапобионтные циклы развития, в которых наблюдается сложная смена форм развития. В некоторых случаях они представлены одноклеточными стадиями. Чему можно уподобить клетки, появившиеся из протопластов и каково их место в жизненном цикле видов? Нам представляется, что они аналогичны бесполом спорам, образовавшимся *in vitro*, потому что они, так же как зооспоры, сформировавшиеся *in vivo*, т.е. внутри материнского сифона, дают новые растения, и потому что лучше среди всех образовавшихся протопластов выживают те, которые имеют размеры, близкие к размерам зооспор тех же видов.

Подводя итог обсуждению материалов, отметим, что обнаруженные в ходе исследования открытия углубляют представления о механизмах функционирования и воспроизводства гигантских клеток морских зеленых водорослей и позволяют понять, почему сифонофициевые пережили все исторические катаклизмы и сохранили колоссальное биологическое разнообразие в теплых водах Мирового океана вплоть до наших дней.

ВЫВОДЫ

1. Образование протопластов из протоплазмы материнского растения сопровождается агглютинацией компонентов клетки (органел, ядер и жидкого вещества протоплазмы). Она осуществляется посредством лектинно-углеводной связи. Углеводы находятся на мембранах хлоропластов, лектины - в жидкой фракции протоплазмы. Несмотря на то что у изученных видов задействован один и тот же механизм агглютинации, связываются между собой только клеточные компоненты одного и того же вида.

2. В агглютинации клеточных компонентов *B. plumosa* задействован найденный в ходе исследования лектин бриохилин.

3. Процессы агглютинации у всех изученных видов протекают по одному сценарию: протоплазма во внешней среде образует отдельные сгустки; далее они стягиваются, ужимаются и приобретают округлую форму, затем одеваются первичной полисахаридной или полисахаридно-белковой оболочкой, которая со временем замещается плазматической мембраной. Одновременно формируется целлюлозная стенка, и

протопласт превращается в полноценную растительную клетку.

4. Первичная оболочка обладает способностью к селективному транспорту и, следовательно, некоторое время не выполняет функцию плазматической мембраны. Открытие феномена существования жизни у структуры, не имеющей плазмалеммы, меняет общепринятое представление о том, что жизнь при ее отсутствии невозможна.

5. Для построения мембран протопластов используется 3-24 % липидного материала материнской клетки.

6. Протопласты могут иметь разные размеры. У каждого вида они укладываются в определенные границы. У изученных сифоновых и сифонокладовых водорослей (исключая виды, образующие апланоспоры) наиболее высокую выживаемость имеют те из образовавшихся протопластов, размеры которых близки к размерам зооспор соответствующих видов.

7. Течение процессов формирования протопластов у представителей обоих порядков во многом определяется уровнем их морфологической организации. У видов с более примитивной организацией эффективнее используется протоплазма материнского растения, высока выживаемость протопластов, образовавшиеся клетки производят нормальные растения. У видов с более сложной организацией могут появляться апланоспоры, продуцирующие свормеры, и только они дают нормальные растения. У высокоорганизованных видов протопласты либо не образуются, либо не прорастают.

8. Формирование протопластов у исследованных видов, при общем сходстве, отличается временем протекания разных этапов, эффективностью использования материнской протоплазмы и степенью выживаемости протопластов. У сифонокладовых это родоспецифический процесс.

9. Появление из сформированных клеток новых растений позволяет рассматривать протопласты как аналоги органов бесполого и вегетативного размножения, сформировавшиеся *in vitro*.

10. Наличие у сифоновых и сифонокладовых водорослей специфических морфологических, цитологических и физиолого-биохимических приспособлений для защиты от травмирующего воздействия, а также образование от *in vitro* структур, выполняющих репродуктивную функцию, объясняет успех их исторического развития и современного процветания во флоре Мирового океана.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Klochkova N.G., Klotchkova T.A. Long-term changes of vegetative communities and benthic algaeflora in the Avacha Bay // In: Monographs on the ecology and environment of the Avacha Bay (Southeast Kamchatka). Petropavlovsk-Kamchatsky-Tokyo. 1998. P. 137-149.
2. Клочкова Т.А. Характеристика распространения массовых и промысловых водорослей в Корфо-Карагинском районе // Тез. докл. конф. «Проблемы защиты и рационального использования камчатских биоресурсов». - Петр.-Камч.: Госкамчатэкология. - 1999. С. 63-65.
3. Kim G.H., Klotchkova T.A. Life without a cell membrane: Regeneration of protoplasts from disintegrated cells of the marine green alga *Bryopsis plumosa* // Proc. 14th Ann. Meeting Korean Soc. Phycol. 2000. P. 5.
4. Kim G.H., Klotchkova T. A., Kang Y.-M. Regeneration of protoplasts from disintegrated cell of *Bryopsis plumosa* (Derbesiales, Chlorophyta) // Journ. of Phycol. 2000. Vol. 36 (Suppl.). P. 106. Phycol. Soc. America. San Diego.
5. Klotchkova T.A., Kim G.H. Regeneration of protoplasts from disintegrated cells of the marine green alga *Chaetomorpha aerea* (Chlorophyta) // Proc. Ann. Meeting Korean Bot. Soc. 2000. P. 89.
6. Kim G.H., Klotchkova T.A., Kang Y.-M. Life without a cell membrane: Regeneration of protoplasts from disintegrated cells of the marine green alga *Bryopsis plumosa* // Journ. Cell Sci. 2001. Vol. 114(11). P. 2009-2014.
7. Kim G.H., Klotchkova T.A., Kang Y.-M. Life without life (ed.) // G. Chin in Editor's Choice. Science. 2001. Vol. 292 (5523). P. 1799.
8. Kim G.H., Klotchkova T.A., Lee B.-Ch., Kim S.-H. FITC-Phalloidin staining of F-Actin in *Aglaothamnion oosumiense* and *Griffithsia japonica* (Rhodophyta) // Bot. Mar. 2001. Vol. 44(5). P. 501-508.
9. Kim G.H., Klotchkova T.A., Suh M.Ch. The effect of chemical treatments on biodeterioration of stone cultural properties // Korean Journ. Environ. Biol. 2001. Vol. 19(2). P. 101-105.
10. Klochkova N.G., Klotchkova T.A. Floristics and biogeography of marine benthic algae on the coast of Kamchatka and Commander islands // Algae. 2001. Vol. 16(1). P. 119-128.

11. Klotchkova T.A., West J.A., Kim G.H. From protoplasm to swarmer: Protoplasts regeneration from disintegrated cells of the marine green alga *Microdictyon umbilicatum* // Proc. 15th Ann. Meeting Korean Soc. Phycol. 2001. P. 24.

12. Klotchkova T.A., West J.A., Kim G.H. From protoplasm to swarmer: Protoplasts regeneration from disintegrated cells of the marine green alga *Microdictyon umbilicatum* // Proc. 7th Int. Phycol. Congress. Thessaloniki, Greece. 2001. Phycologia. Vol. 40(4 Suppl.). P. 25.

13. Lee K.-P., Yoon S.-S., Klotchkova T.A., Kim G.H. Purification and characterization of a lectin, Bryohealin, involved in protoplast regeneration of a marine green alga *Bryopsis plumosa* // Proc. 7th Int. Phycol. Congress. Thes. saloniki, Greece. 2001. Phycologia. Vol. 40 (4 Suppl.). P. 78.

14. Klotchkova T.A., Chah O.-K., Kim G.H. Cytochemical and ultrastructural studies on protoplast formation from disintegrated cells of a marine green alga *Chaetomorpha aerea* (Chlorophyta) // Proc. 16th Ann. Meeting Korean Soc. Phycol. 2002. P. 17.

15. Kim G.H., Klotchkova T.A., West J.A. From protoplasm to swarmer: Protoplasts regeneration from disintegrated cells of the marine green alga *Microdictyon umbilicatum* (Chlorophyta) // Jour. Phycol. 2002. Vol. 38. P. 1-10.

16. Kim G.H., Klotchkova T.A. Development of the protoplasts induced from wound-response in fifteen marine green algae // Jpn. Jour. Phycol., в печати.

17. Klotchkova T.A., Chah O.-K., West J.A., Kim G.H. Cytochemical and ultrastructural studies on protoplast formation from disintegrated cells of a marine green alga *Chaetomorpha aerea* (Chlorophyta) // Eur. Jour. Phycol., в печати.

Клочкова Татьяна Андреевна

**ФОРМИРОВАНИЕ И ЗНАЧЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ
В РЕГЕНЕРАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ СИФОНОВ НЕКОТОРЫХ
СИФОНОВЫХ И СИФОНОКЛАДОВЫХ МОРСКИХ ЗЕЛЕННЫХ
ВОДОРОСЛЕЙ**

*Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук*

Редактор Скрыпкина И.В. Технический редактор
Бабух Е.Е.

Набор текста Клочкова Т.А. Верстка, оригинал-
макет Бабух Е.Е.

Лицензия ИД № 02187 от 30.06.00 г. Подписано в печать 06.08.2003 г.

Формат 61*86/16. Печать офсетная. Гарнитура Times New Roman

Авт. . 1,24. Уч.-изд. . 1,4. Ус . печ. . 1,7

Тираж 100 экз. Заказ № 134

Редакционно-издательский отдел Камчатского государственного
технического университета

Отпечатано по графическим участком РИО КамчатГТУ 683003, г.
Петропавловск-Камчатский, ул. Ключевская, 35