

**Киселева
Мария Анатольевна**

**Метаболизм мембранных липидов у
свободноживущих и симбиотических зеленых
водорослей рода *Pseudococcomyxa*
в условиях дефицита фосфора**

03.00.12 – «Физиология и биохимия растений»

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2008

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Ботаническом институте им. В.Л. Комарова РАН

Научный
руководитель

кандидат биологических наук
Котлова Екатерина Робертовна

Официальные
оппоненты:

доктор биологических наук
Кислюк Ирина Марковна

доктор биологических наук
Розенцвет Ольга Анатольевна

Ведущая
организация:

Санкт-Петербургский
государственный университет

Защита состоится **10 декабря 2008 г. в 15³⁰ часов** на заседании диссертационного совета Д 002.211.02 при Ботаническом институте им. В. Л. Комарова РАН по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 2. Тел. (812) 346-37-42, факс (812) 346-36-43.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ботанического института им. В. Л. Комарова.

Автореферат разослан 8 ноября 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного
совета,
кандидат биологических
наук



О.С. Юдина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Фосфор является одним из важнейших элементов, необходимых для роста и развития живых организмов. Это неотъемлемый компонент таких ключевых молекул как АТФ, нуклеиновые кислоты, фосфолипиды. Фосфор играет важную роль в фотосинтезе и дыхании, участвует в процессах передачи генетической информации, рецепции и трансдукции клеточного сигнала, энергетическом обмене (Raghothama, 1999). Недостаток фосфора в среде или невозможность его эффективного извлечения приводят к разнообразным нарушениям, включая снижение интенсивности синтеза соединений, метаболически связанных с образованием глутаминовой, аспарагиновой и шикимовой кислот, торможение трансляции, ослабление фотосинтеза, замедление процессов передачи сигнала и клеточной пролиферации (Bölling, Fiehn, 2005; Moseley et al., 2006).

В ходе эволюции у высших растений выработались разнообразные морфологические и биохимические механизмы, направленные на более эффективное извлечение, утилизацию и экономное использование фосфора (Andersson et al., 2003; Hernandez et al., 2007). Один из таких механизмов связан с модификацией мембранных структур и изменением скорости и направленности метаболизма входящих в их состав соединений. В частности, показано, что при дефиците фосфора может происходить частичная замена фосфорсодержащих липидов на гликолипиды (Jouhet et al., 2004; Andersson et al., 2005). При этом в стрессовых условиях активируются альтернативные пути синтеза гликолипидов, связанные с работой особых синтазных комплексов (Kobayashi et al., 2004).

В отличие от высших растений, древние группы фотосинтезирующих организмов (бактерий, водорослей) могут выдерживать гораздо более жесткие условия фосфорного голодания (Spijkerman, Coesel, 1996; Spijkerman, 2007). Однако пути их адаптации к недостатку этого элемента изучены недостаточно. В частности, требует более детального исследования обнаруженная недавно способность водорослей использовать при синтезе гликолипидов более широкий круг жирнокислотных субстратов, в том числе бетаиновые липиды и триглицериды (Khozin-Goldberg et al., 2006).

Способы адаптации к недостатку фосфора свободноживущих и симбиотических видов могут существенно отличаться. Как правило, растения, живущие в симбиозе с грибами, имеют более совершенные механизмы извлечения и утилизации фосфора, однако хуже приспособляются к условиям вынужденного фосфорного голодания (Harrison et al., 2002; Schünmann et al., 2004; Javot et al., 2007). Есть основание полагать, что их возможности адаптации к дефициту фосфора, в том числе за счет модификаций мембранных структур, более ограничены. Так, например, у водорослей, являющихся фотобионтами лишайников, компенсаторное замещение редуцированных фосфолипидов может быть не связано с

индукцией синтеза липидов бетаинового типа, как это происходит у многих представителей древних групп свободноживущих фотосинтезирующих организмов (Guschina et al., 2003). В связи с этим сравнительное изучение биохимических механизмов адаптации свободноживущих и симбиотических видов представляется особенно актуальным. Не исключено, что в ходе подобных исследований будут выявлены другие, альтернативные способы адаптации симбиотических организмов к недостатку фосфора, в том числе и на уровне мембранных липидов.

Цель и задачи исследования. Целью исследования было выявить возможные способы адаптации к дефициту фосфора на уровне мембранных липидов у зеленых водорослей рода *Pseudococcomyxa* и определить их особенности у свободноживущих и симбиотических видов.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- 1) выяснить, как влияет недостаток фосфора на рост и морфологические характеристики водорослевых культур;
- 2) определить роль гликолипидов в адаптации свободноживущих и симбиотических зеленых водорослей к дефициту фосфора;
- 3) выяснить, связан ли процесс адаптации к недостатку фосфора с индукцией синтеза бетаиновых липидов;
- 4) определить особенности роста, морфологии и липидного состава водорослей в условиях длительного фосфорного голодания;
- 5) на модельной культуре водорослей с гетеротрофным типом питания выяснить, функционируют ли в условиях дефицита фосфора альтернативные пути синтеза гликолипидов.

Научная новизна. В настоящей работе впервые проведен сравнительный анализ состава мембранных липидов у свободноживущих и симбиотических видов одноклеточных зеленых водорослей рода *Pseudococcomyxa*. Показано, что по составу индивидуальных классов мембранных липидов свободноживущие и симбиотические виды не имеют принципиальных отличий, однако галактолипиды симбиотических водорослей, как правило, характеризуются более высокой степенью ненасыщенности.

Впервые показано, что адаптация к недостатку фосфора может сопровождаться длительным поддержанием или увеличением исходной концентрации ФХ*, причем подобная реакция была характерна для видов, наиболее успешно адаптирующихся к условиям фосфорного голодания.

Впервые проведено сравнительное изучение особенностей адаптации к дефициту фосфора авто- и гетеротрофных культур. Установлено, что при недостатке фосфора в условиях гетеротрофного питания многократно

* Принятые сокращения: ДГДГ – дигалактозилдиацилглицериды, ДГТС – диацилглицерилтриметилгомосерины, ЖК – жирные кислоты, МГДГ – моногалактозилдиацилглицериды, СХДГ – сульфохиновозилдиацилглицериды, ФГ – фосфатидилглицерины, ФИ – фосфатидилинозиды, ФК – фосфатидные кислоты, ФХ – фосфатидилхолины, ФЭ – фосфатидилэтаноламины.

увеличивается содержание гликолипидов МГДГ и липидов бетаинового типа ДГТС. Анализ жирнокислотного состава этих соединений указывает на участие ДГТС в синтезе гликолипидов.

Практическая значимость результатов. Дефицит фосфора является одним из основных абиотических стрессов, лимитирующих рост и продуктивность растений, в т.ч. сельскохозяйственных. Новые данные об особенностях метаболизма толерантных к недостатку фосфора организмов способствуют пониманию основ устойчивости и могут быть полезны в селекционной работе, а также при создании трансгенных растений, устойчивых к данному воздействию.

Апробация работы. Результаты и основные положения диссертации доложены на I (IX) Международной конференции молодых ботаников в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2006), II Международном симпозиуме «Сигнальные системы клеток растений: Роль в адаптации и иммунитете» (Казань, 2006), IV Европейском конгрессе по липидам (Испания, Мадрид, 2006), 48-й Международной конференции по фундаментальным исследованиям липидов (Финляндия, Турку, 2007), 18-м Международном симпозиуме по липидам растений (Франция, Бордо, 2008) и Международном симпозиуме «Липиды и оксипирины растений» (Казань, 2008).

Публикации. Основные положения диссертации опубликованы в 7 работах, в том числе в 1 статье.

Структура и объем диссертации. Диссертация включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение и выводы. Список литературы включает 195 наименований, в том числе 158 на иностранных языках. Работа изложена на 130 страницах, содержит 19 таблиц, 40 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования.

Объекты исследования. В качестве объектов исследования были использованы штаммы 6 видов одноклеточных зеленых водорослей, принадлежащих, по данным коллекции SAG, к роду *Coccomyxa* (отдел *Chlorophyta*, порядок *Chlorococcales*, семейство *Chlorellaceae*), в т.ч. свободноживущие *C. chodatii* (SAG, 216-2), *C. simplex* (SAG, 216-9a), *C. elongata* (SAG, 216-3b) и симбиотические *C. peltigera variolosae* (SAG, 216-6), *C. mucigena* (SAG, 216-4), *C. solarina bisporae* (SAG, 216-10). Согласно современным представлениям все вышеуказанные виды относятся к роду *Pseudococcomyxa* (Kostikov et al., 2002; Kostikov et al., in press). Данное название рода используется и в настоящей работе.

Используемые в работе виды водорослей отличаются по экологии и географическому распространению. *P. chodatii* (Jaag) Kostikov, Darienko et Hoffmann и *P. simplex* (Mainx) Fott – широко распространенные виды, обитающие в водоемах, в т.ч. загрязненных, на поверхности почвы, а также растительных и каменистых субстратах. (Андреева, 1998; Костиков и др.,

2001; Nemjová, 2007). *P. elongata* (Jaag) Kostikov, Darienko et Hoffmann, ad int. – редкий вид, встречающейся в пресноводных водоемах Европы. *P. variolosae* (Jaag) Kostikov, Darienko et Hoffmann, ad int. и *P. mucigena* (Jaag) Kostikov, Darienko et Hoffmann, ad int. – симбионты лишайников *Peltigera leucophlebia* (Nyl.) Gyeln. и *P. apthosa* (L.) Willd., соответственно, обитающих в Арктике и бореальной зоне на почве, камнях, среди мхов (Vitikainen., 1994). *P. solorinae-bisporae* (Jaag) Kostikov, Darienko et Hoffmann, ad int. – симбионт лишайника *Solorina bisporae* Nyl., встречающегося на горных породах, содержащих известь (Блум и др., 1975).

Постановка эксперимента. Культуры водорослей выращивали в стеклянных колбах на минеральной среде Болда (Deason and Bold, 1960) при 8°C и постоянном освещении 1000 лк в течение 48-60 сут (в экспериментах по влиянию длительного фосфорного голодания – 120 сут). Использовали стационарный метод культивирования (без дополнительной аэрации воздухом, обогащенным CO₂). Дефицит фосфора создавали путем полного исключения из среды фосфорсодержащих солей. В эксперименте по влиянию дефицита фосфора на метаболизм липидов гетеротрофной культуры, водоросли выращивали на среде Болда с 2% сахарозой при аналогичном температурном режиме, в темноте в течение 60 сут.

Экстракция, разделение и идентификация липидов. Липиды экстрагировали с помощью изопропанола и хлороформа по методу В. Nichols (1963) с модификациями. Индивидуальные компоненты липидов анализировали методом двумерной высокоэффективной тонкослойной хроматографии на стеклянных пластинах (Merck, Германия). Разделение липидов проводили в системе растворителей: хлороформ/метанол/вода (65:25:4 по объему) – первое направление и хлороформ/ацетон/метанол/уксусная кислота/вода (50:20:10:10:5 по объему) – второе направление (Venning et al., 1995). Индивидуальные классы липидов идентифицировали, используя стандартные свидетели и реагенты на отдельные функциональные группы (Кейтс, 1975).

Анализ содержания индивидуальных классов липидов. Количество индивидуальных классов фосфо-, глико- и бетаиновых липидов определяли на денситометре Денскан (Ленхром, Россия). Хроматограммы анализировали в режиме линейной аппроксимации по калибровочным кривым, используя ФХ (Sigma, Германия) и МГДГ (Larodan, Швеция) в качестве стандартов.

Анализ жирных кислот. Жирные кислоты анализировали в виде их метиловых эфиров методом капиллярной газо-жидкостной хроматографии на хроматографе Кристалл 5000.1 (Россия) с использованием капиллярной колонки НР-23 (30 м x 0.32 мм x 0.25 мкм) при программировании изменений температуры термостата: 3 мин при 170°C, затем повышение до 220°C со скоростью 4°C/мин. Температура испарителя – 250°C, детектора – 230°C. Газ-носитель – азот. ЖК идентифицировали, сравнивая относительное время удерживания полученных пиков со стандартами, а также по масс-спектрам с помощью газо-жидкостного хроматографа Agilent 6850 с масс-спектрометрическим детектором Agilent 7975В (США). Относительное

содержание ЖК в пробе (в % от общего количества ЖК) рассчитывали по площади пиков с помощью программы Хроматек-Аналитик 1. (Россия). В таблицах, приведенных в разделе Результаты и обсуждение, представлены только основные кислоты, содержание которых превышало 3% от суммы ЖК. Индекс ненасыщенности вычисляли по формуле:

$$ИИ = \frac{\sum \%C_{N:1} + (\sum \%C_{N:2}) \times 2 + (\sum \%C_{N:3}) \times 3 + (\sum \%C_{N:4}) \times 4}{100\%}$$

Определение интенсивности обмена липидов. Суспензию водорослей инкубировали со 185 кБк [^{14}C]-ацетата натрия при 20°C и освещении 500 лк в течение 1ч 30мин. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике LS-100С «Beckman» (США) и выражали в имп/ (мин г сухой массы).

Статистическую обработку материалов проводили по стандартным методикам с использованием офисных программ Microsoft Excel 2000. Полученные данные выражали в виде средней арифметической и ошибки средней арифметической. Достоверность различий между контролем и опытом оценивали по критерию Стьюдента при доверительном уровне $P_I=95\%$. Количество независимых биологических повторностей – от 3 до 5.

Результаты и обсуждение.

Влияние дефицита фосфора на рост и морфологические характеристики свободноживущих и симбиотических водорослей рода *Pseudococcomyxa*.

Рост водорослей на полной питательной среде и в условиях дефицита фосфора. Изучение интенсивности ростовых процессов показало, что два свободноживущих вида водорослей (*P. chodatii*, *P. simplex*) отличаются достаточно активным ростом в культуре. После 48 сут культивирования на полной питательной среде концентрация их клеток достигала порядка $12 \times 10^6/\text{см}^3$. В условиях дефицита фосфора интенсивность роста культур снижалась приблизительно в 1.5 раза. В результате плотность колоний к концу срока наблюдений уменьшалась до $6 \times 10^6/\text{см}^3$ у *P. chodatii* и $3 \times 10^6/\text{см}^3$ у *P. simplex*.

У *P. elongata* интенсивность роста в культуре оказалась ниже. К 48 сут плотность культуры, выращенной на полной питательной среде, достигала порядка $7 \times 10^6/\text{см}^3$, в условиях недостатка фосфора – $3 \times 10^6/\text{см}^3$.

При исследовании роста симбиотических видов рода *Pseudococcomyxa* выявили два типа поведения водорослей в культуре. Так, если для *P. variolosae* были характерны достаточно активный рост в оптимальных условиях (концентрация клеток после 48 сут культивирования составляла $7 \times 10^6/\text{см}^3$) и резкое торможение процесса пролиферации при недостатке фосфора (плотность культуры снижалась до $2 \times 10^6/\text{см}^3$), то два других вида отличались крайне слабым ростом вне зависимости от концентрации фосфора в питательной среде (плотность 48 сут культуры не превышала

$2 \times 10^6 / \text{см}^3$).

Морфология водорослей, выращенных на полной питательной среде и в условиях дефицита фосфора. В условиях недостатка фосфора, у исследованных видов водорослей рода *Pseudococcomyxa*, изменялись форма и размер клеток, объем хлоропласта, а также содержание и размер цитоплазматических включений.

У двух свободноживущих видов (*P. chodatii*, *P. simplex*), происходило увеличение размеров клеток, уменьшался объем хлоропласта. Существенно увеличивались количество и размер включений.

Клетки *P. elongata*, напротив, резко уменьшались в размерах. Количество внутриклеточных гранул не изменялось или даже снижалось.

Изменения в клеточной морфологии симбиотических видов водорослей, также как у большинства свободноживущих видов, были связаны с увеличением размеров и изменением формы клеток. Однако эти реакции у фотобионтов были менее выражены по сравнению со свободноживущими видами. Размер хлоропласта увеличивался (*P. variolosae*) или оставался без изменений (*P. mucigena*, *P. solorinae-bisporae*), появлялось большое количество мелких включений.

Состав мембранных липидов свободноживущих (*P. chodatii*, *P. simplex*, *P. elongata*) и симбиотических (*P. variolosae*, *P. mucigena*, *P. solorinae-bisporae*) водорослей рода *Pseudococcomyxa*.

Анализ мембранных липидов показал, что в клетках зеленых водорослей рода *Pseudococcomyxa* доминируют гликолипиды, представленные МГДГ, ДГДГ и СХДГ (рис. 1). На их долю, в зависимости от вида, приходилось от 75 до 95% (от суммы мембранных липидов).

Среди фосфолипидов были идентифицированы ФХ, ФЭ, ФГ, ФИ и ФК. Суммарное содержание фосфолипидов у водорослей рода *Pseudococcomyxa* оказалось небольшим – от 4% у *P. chodatii* до 14% у *P. elongata* и *P. solorinae-bisporae*. Незначительный вклад этих, преимущественно экстрахлоропластных соединений, характерен для многих видов одноклеточных водорослей (Thompson, 1996), клетки которых содержат один хлоропласт, заполняющий $\frac{1}{2}$ - $\frac{2}{3}$ объема клетки и весьма ограниченное количество других субклеточных элементов, в сумме занимающих менее $\frac{1}{4}$ объема клетки.

Наряду с глико- и фосфолипидами у водорослей рода *Pseudococcomyxa* были выявлены бетаиновые липиды - ДГТС, причем их количество существенно варьировало. По содержанию липидов бетаинового типа изученные водоросли можно разделить на три группы: 1) низкий уровень (содержание ДГТС менее 1%) – *P. chodatii* и *P. simplex*; 2) средний уровень (2-3%) – *P. variolosae*, *P. mucigena*; 3) высокий уровень (10% и более) – *P. elongata* и *P. solorinae-bisporae*.

Помимо состава и содержания индивидуальных классов липидов, исследовали жирнокислотный состав МГДГ, ДГДГ, ФХ, ФЭ и ДГТС (табл.1, 2). Было показано, что существенный вклад в состав ЖК галактолипидов

водорослей вносят полиненасыщенные жирные кислоты – 16:3 и 18:3. Анализ распределения этих кислот в липидах представителей *Pseudococcomyxa* показал, что симбиотические виды характеризуются большим относительным содержанием 16:3 в составе МГДГ и 18:3 в составе МГДГ и ДГДГ. Так, количество 18:3 у симбионтов составляло 20-40%, тогда как у *P. chodatii* и *P. simplex* – не достигало 20%. Существенно отличалась в этом отношении свободноживущая *P. elongata*, содержание 18:3 кислоты в галактолипидах которой превышало 30%.

По сравнению с галактолипидами жирнокислотный состав ФХ и ФЭ характеризовался меньшей ненасыщенностью. Так, относительное содержание 18:3 составляло порядка 10% и меньше, 16:3 в большинстве случаев присутствовала в следовых количествах. Состав жирных кислот бетаиновых липидов, как правило, не отличался от состава ФХ и ФЭ. Однако у *P. elongata* и *P. solorinae-bisporae* в составе ДГТС выявлено высокое содержание 16:3 и 18:3 кислот.

Таблица 1. Состав жирных кислот индивидуальных классов гликолипидов свободноживущих водорослей.

ЖК	<i>P. chodatii</i>		<i>P. simplex</i>		<i>P. elongata</i>	
	МГДГ	ДГДГ	МГДГ	ДГДГ	МГДГ	ДГДГ
16:0	36.4±2.4	41.5±2.7	25.0±1.2	34.7±3.0	9.7±2.3	31.2±2.4
16:1	5.0±0.3	14.9±2.5	21.3±1.5	6.6±1.4	2.2±0.1	5.6±0.7
16:3	8.0±1.9	5.8±1.5	1.3±0.4	6.8±1.4	30.7±3.7	12.6±0.4
18:0	6.9±1.8	10.9±1.4	6.5±0.6	8.6±1.7	1.4±0.4	4.8±1.0
18:1	13.0±0.8	16.6±2.4	27.3±1.6	17.5±3.0	4.4±0.3	8.5±0.8
18:2	4.9±0.5	4.1±0.2	6.9±0.4	6.0±1.4	3.3±0.2	2.7±0.1
18:3	18.1±4.4	3.6±1.1	3.0±0.3	15.2±1.8	46.3±1.4	32.7±1.6

Таблица 2. Состав жирных кислот индивидуальных классов гликолипидов симбиотических водорослей.

ЖК	<i>P. variolosae</i>		<i>P. mucigena</i>		<i>P. solorinae-bisporae</i>	
	МГДГ	ДГДГ	МГДГ	ДГДГ	МГДГ	ДГДГ
16:0	14.7±4.9	27.5±0.5	26.4±4.7	37.7±2.0	9.3±0.9	26.0±0.4
16:1	3.5±0.1	5.2±0.2	9.6±2.9	20.3±0.8	4.6±0.6	3.7±0.9
16:3	18.5±5.7	9.3±1.9	11.5±3.7	3.5±0.2	24.1±0.9	9.6±0.2
18:0	6.3±1.7	8.8±0.8	6.4±1.7	8.7±1.2	2.3±0.3	2.5±0.3
18:1	17.8±5.3	13.5±0.9	13.3±1.2	14.5±0.5	8.1±0.7	7.8±0.6
18:2	9.9±1.2	9.8±0.9	7.6±1.0	5.5±0.2	5.8±0.8	2.4±0.4
18:3	28.3±6.0	25.7±3.9	20.1±4.0	9.8±2.8	43.4±0.8	39.7±3.6

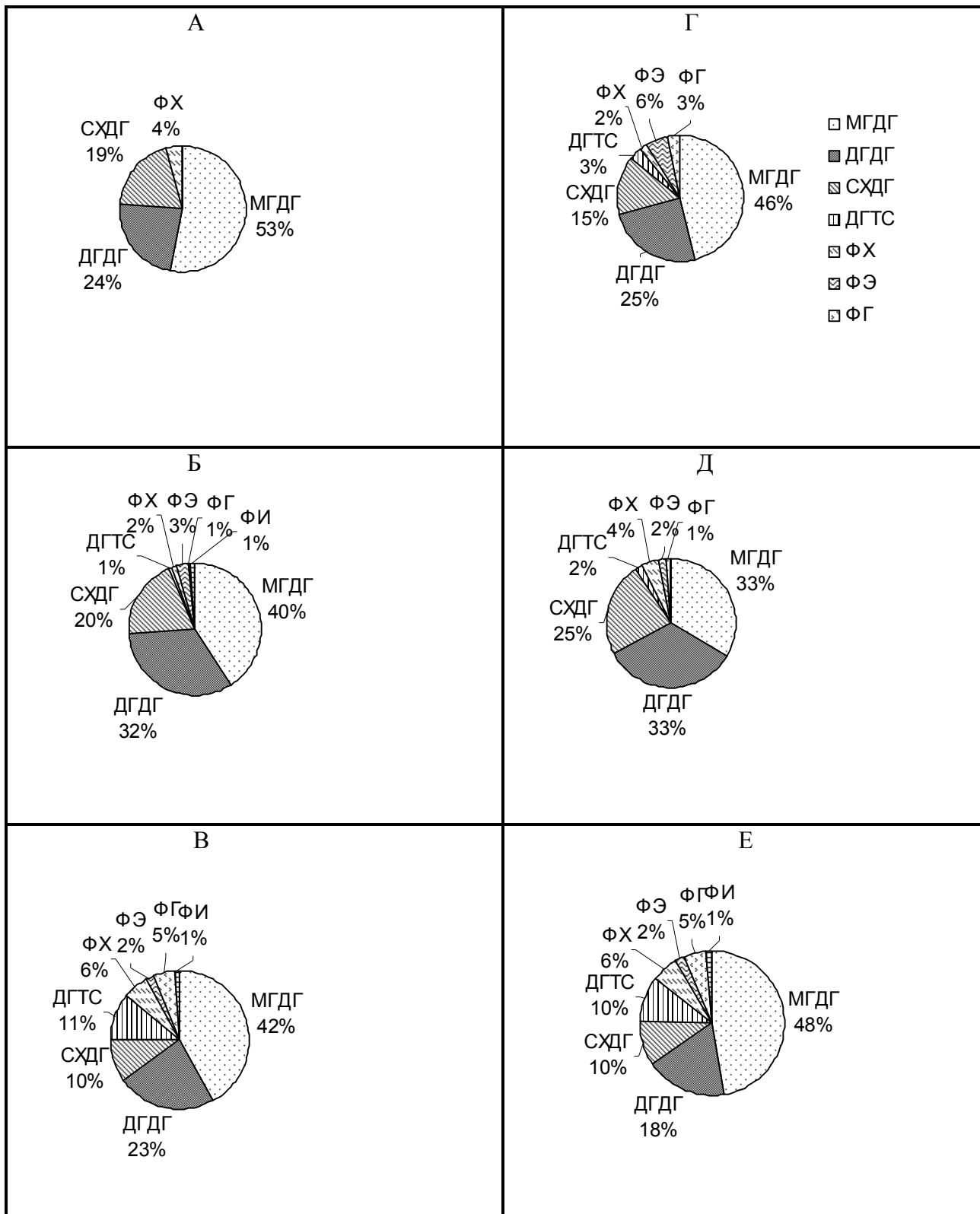


Рис.1. Относительное содержание мембранных липидов у свободноживущих *P. chodatii* (А), *P. simplex* (Б), *P. elongata* (В) и симбиотических *P. variolosae* (Г), *P. mucigena* (Д) и *P. solorinae-bisporae* (Е).

Влияние дефицита фосфора на состав, содержание и метаболизм мембранных липидов у автотрофных культур водорослей рода *Pseudococcomyxa*.

Исследования влияния дефицита фосфора на мембранные липиды водорослей рода *Pseudococcomyxa* показало, что наиболее уязвимыми компонентами, первыми реагирующими на недостаток этого элемента, являются ФЭ, ФГ и ФИ. Количество ФХ, а также бесфосфорных липидов, в т.ч. глико- и бетаиновых, изменялось по-разному, в зависимости от вида водорослей. Обобщение полученных результатов позволило выделить три основных типа ответных реакций.

Ответная реакция *P. chodatii* и *P. simplex*. В условиях дефицита фосфора адаптивная реакция гликолипидов *P. chodatii* и *P. simplex* была связана с сохранением содержания одного из трех индивидуальных классов гликолипидов (МГДГ у *P. chodatii* и ДГДГ у *P. simplex*) (рис. 2). При этом содержание остальных классов гликолипидов резко снижалось. В составе жирных кислот гликолипидов, в т.ч. степени их ненасыщенности, достоверных изменений не происходило (табл. 3).

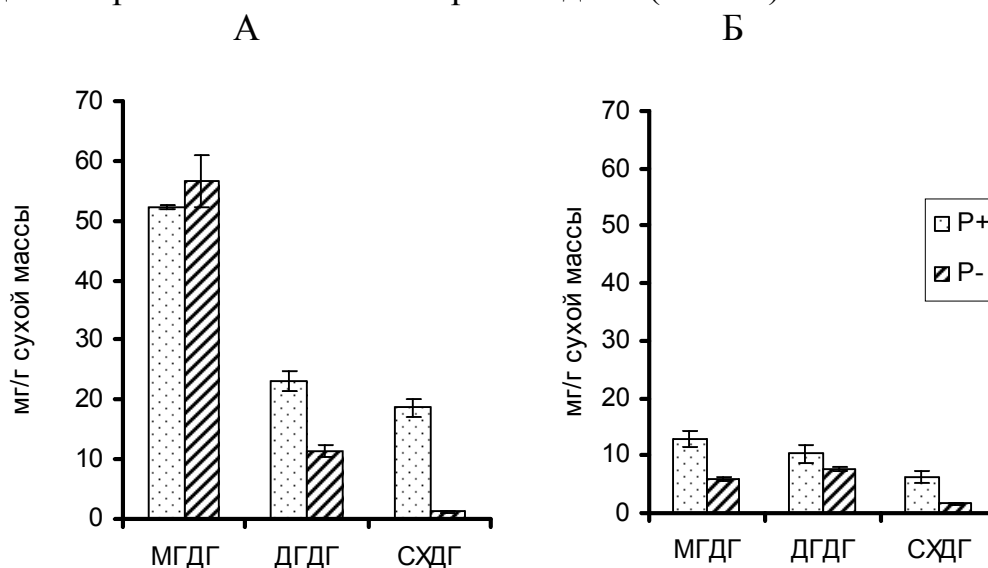


Рис. 2. Содержание индивидуальных классов гликолипидов в мембранах свободноживущих зеленых водорослей *P. chodatii* (А) и *P. simplex* (Б), выращенных на полной питательной среде и в условиях дефицита фосфора.

У обоих видов водорослей, выращенных в условиях недостатка фосфора, полностью редуцировались ФЭ, ФГ и ФИ (рис. 3). Единственным классом фосфолипидов, содержание которых не изменилось в условиях дефицита фосфора, были ФХ. Недостаток фосфора у этих видов водорослей стимулировал небольшое увеличение концентрации ДГТС, которые в контроле присутствовали в значительно меньших количествах.

Снижение содержания индивидуальных классов фосфолипидов отмечено в большинстве работ по изучению влияния недостатка фосфора на состав и содержание липидов (Benning et al., 1993, 1995; Essigmann et

al.,1998; Andersson et al., 2003; Khozin-Goldberg et al., 2006). При этом у некоторых растений было выявлено кратковременное увеличение содержания ФХ (Jouhet et al., 2003). По мнению авторов этой работы, недостаток фосфора может стимулировать синтез ФХ по так называемому альтернативному механизму, путем последовательного трехступенчатого метилирования ФЭ. При этом на фоне редукции предшественников, в том числе ФК и ФЭ, происходит аккумуляция ФХ, которые в дальнейшем, при участии фосфолипазы С, подвергаются гидролизу до диацилглицеридов. Образующиеся диацилглицериды расходуются на синтез гликолипидов, главным образом ДГДГ и/или МГДГ.

Таблица 3. Индекс ненасыщенности индивидуальных классов глико- и бетаиновых липидов *P. chodatii* и *P. simplex*, выращенных на полной питательной среде и в условиях дефицита фосфора.

	<i>P. chodatii</i>			<i>P. simplex</i>		
	МГДГ	ДГДГ	ДГТС	МГДГ	ДГДГ	ДГТС
P+	1.15±0.09a	0.61±0.13a	0.63±0.04a	0.75±0.02a	1.10±0.10a	0.74±0.01a
P-	1.31±0.04a	0.66±0.04a	0.63±0.01a	0.73±0.01a	0.82±0.01a	0.79±0.07a

Примечание: достоверно различающиеся средние значения отмечены разными буквами.

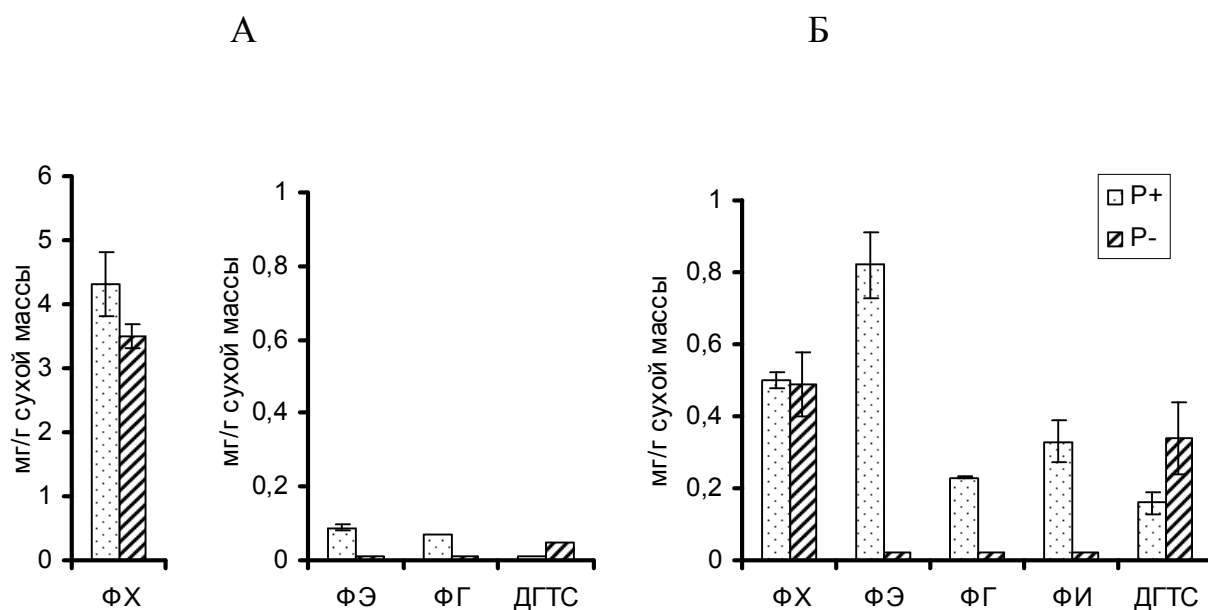


Рис. 3. Содержание индивидуальных классов фосфо- и бетаиновых липидов в мембранах свободноживущих зеленых водорослей *P. chodatii* (А) и *P. simplex* (Б), выращенных на полной питательной среде и в условиях дефицита фосфора.

Для более детального изучения процессов, происходящих с липидами мембран в условиях дефицита фосфора, мы исследовали интенсивность их синтеза. Об интенсивности обмена глико-, фосфо- и бетаиновых липидов судили по включению в них меченого ацетата натрия – предшественника в

синтезе ЖК.

У *P. chodatii*, выращенной при недостатке фосфора, наблюдалось увеличение включения меченого ацетата в МГДГ и СХДГ (табл. 4). При этом снижалась интенсивность синтеза ДГДГ, а активность включения метки в ФХ не изменялась. У *P. simplex* дефицит фосфора привел к резкому усилению синтеза всех гликолипидов, в т.ч. МГДГ и ДГДГ в 3 раза, СХДГ в 8 раз. Интенсивность включения $[2-^{14}\text{C}]$ ацетата натрия в ФХ осталась на прежнем уровне.

Таблица 4. Включение $[2-^{14}\text{C}]$ ацетата натрия в индивидуальные классы липидов *P. chodatii* и *P. simplex*, выращенных на полной питательной среде и в условиях дефицита фосфора.

Индивидуальные классы липидов	Радиоактивность $\times 10^3$ имп/ (мин·г сухой массы)			
	<i>P. chodatii</i>		<i>P. simplex</i>	
	P+	P–	P+	P–
МГДГ	219.0±3.4a	321.4±15.7б	42.5±11.7a	146.6±27.1б
ДГДГ	86.0±7.8a	56.2±1.8б	60.2±2.0a	215.7±41.4б
СХДГ	63.7±6.35a	114.3±9.8б	34.6±7.3a	278.7±4.8б
ДГТС	67.9±3.2a	36.3±2.7б	22.2±2.3a	298.0±60.1б
ФХ	160.8±7.8a	127.7±5.8a	37.7±7.5a	59.3±12.9a
ФЭ	1169.8±85.3	-	663.1±165.8	-
ФГ	534.0±46.6	-	-	-

Примечание: достоверно различающиеся средние значения отмечены разными буквами.

Таким образом, реакция на недостаток фосфора двух свободноживущих видов *P. chodatii* и *P. simplex* включает следующие изменения:

- 1) интенсификацию процессов обмена гликолипидов, сопровождающуюся усилением их синтеза (при этом содержание отдельных классов гликолипидов сохраняется на исходном уровне или снижается);
- 2) поддержание интенсивности синтеза и исходного содержания ФХ;
- 3) увеличение содержания ДГТС.

Ответная реакция *P. variolosae* и *P. mucigena*. В условиях недостатка фосфора у *P. variolosae* и *P. mucigena* происходило двукратное увеличение содержания ДГДГ (рис. 4). Количество МГДГ и СХДГ у *P. variolosae* не изменилось, у *P. mucigena* – наблюдалось повышение содержания МГДГ и уменьшение СХДГ. Во многих работах по изучению влияния дефицита фосфора на состав и содержание липидов высших растений значительная роль в адаптации на уровне мембранных липидов отводится ДГДГ (Essigmann et al., 1998; Yu et al., 2002; Härtel et al., 2000; Andersson et al., 2003). Полагают, что именно ДГДГ участвуют в замещении редуцированных фосфолипидов во внехлоропластных мембранах. У фотосинтетических

бактерий и некоторых видов зеленых водорослей редукция фосфолипидов компенсируется не только ДГДГ, но и липидами бетаинового типа (Benning et al., 1993; 1995). Согласно полученным результатам, ответная реакция симбиотических видов *P. variolosae* и *P. tucigena* наиболее близка к «классическому ответу» на недостаток фосфора, зарегистрированному ранее для других организмов.

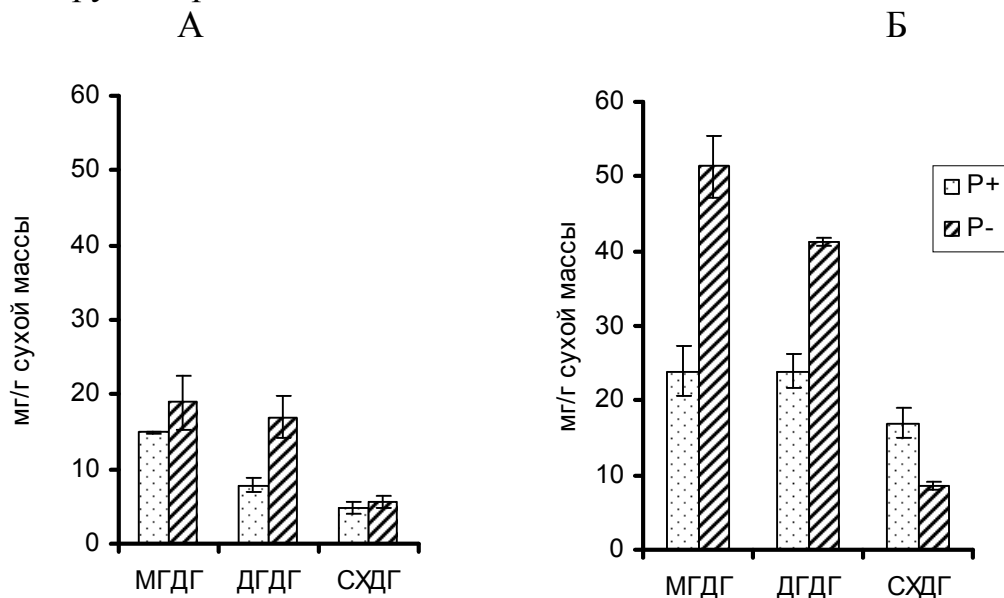


Рис. 4. Содержание индивидуальных классов гликолипидов в мембранах симбиотических зеленых водорослей *P. variolosae* (А) и *P. tucigena* (Б), выращенных на полной питательной среде и в условиях дефицита фосфора.

У обоих видов водорослей также обнаружена редукция ФЭ, ФГ и ФИ (рис.5). Изменения содержания ФХ были различны: у *P. variolosae* – трехкратное увеличение, у *P. tucigena* – полная редукция.

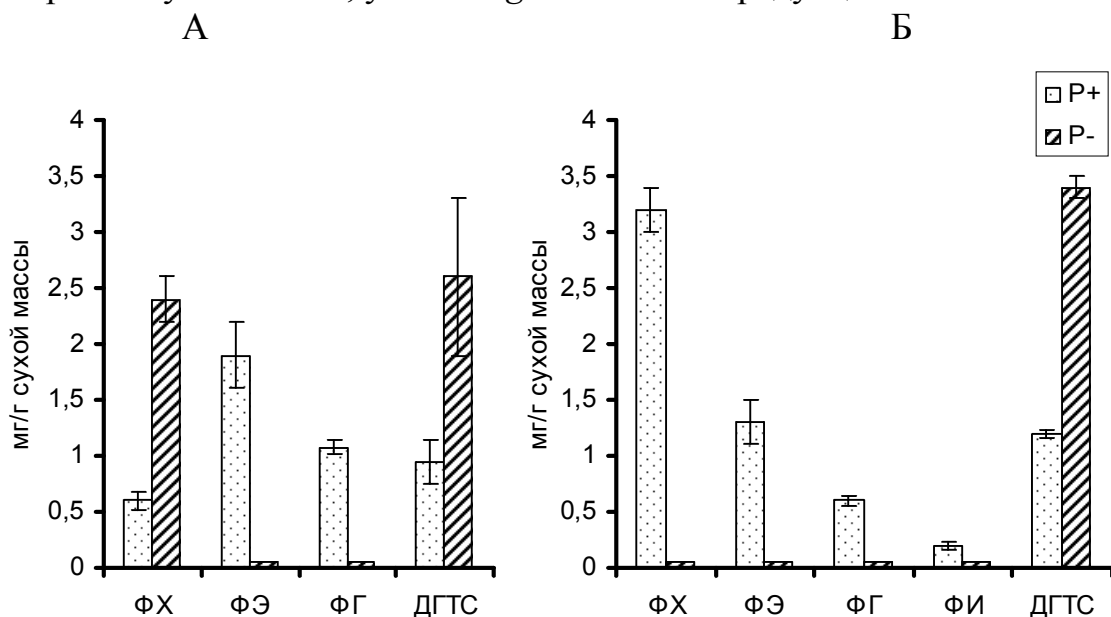


Рис. 5. Содержание индивидуальных классов фосфо- и бетаиновых липидов в мембранах симбиотических зеленых водорослей *P. variolosae* (А) и *P. tucigena* (Б), выращенных на полной питательной среде и в условиях дефицита фосфора.

У данных видов более чем в два раза увеличилось содержание липидов бетаинового типа. Анализ жирнокислотного состава глико- и бетаиновых липидов показал, что в большинстве случаев недостаток фосфора не влияет на степень ненасыщенности липидов. Изменения этого показателя зарегистрированы только для ДГДГ (табл. 5).

Таблица 5. Индекс ненасыщенности индивидуальных классов глико- и бетаиновых липидов *P. variolosae* и *P. mucigena*, выращенных на полной питательной среде и в условиях дефицита фосфора.

	<i>P. variolosae</i>			<i>P. mucigena</i>		
	МГДГ	ДГДГ	ДГТС	МГДГ	ДГДГ	ДГТС
P+	1.45±0.40a	1.63±0.04a	0.78±0.02a	1.34±0.24a	0.86±0.09a	0.66±0.02a
P–	1.43±0.03a	1.19±0.06б	0.81±0.10a	1.41±0.36a	1.21±0.04б	0.69±0.03a

Примечание: достоверно различающиеся средние значения отмечены разными буквами.

Эксперименты с меченым ацетатом показали, что у обоих видов водорослей в условиях дефицита фосфора, интенсивность синтеза большинства гликолипидов остается без изменений (табл. 6). Другой общей ответной реакцией симбиотических видов было увеличение интенсивности включения меченого ацетата в бетаиновые липиды – с 20.8 до 57.8 × 10³ имп/ (мин· г сухой массы) у *P. variolosae* и с 104.8 до 228.3 × 10³ имп/ (мин г сухой массы) у *P. mucigena*.

Таблица 6. Включение [2 -¹⁴C] ацетата натрия в индивидуальные классы липидов *P. variolosae* и *P. mucigena*, выращенных на полной питательной среде и в условиях дефицита фосфора.

Индивидуальные классы липидов	Радиоактивность × 10 ³ имп/ (мин·г сухой массы)			
	<i>P. variolosae</i>		<i>P. mucigena</i>	
	P+	P–	P+	P–
МГДГ	68.8±16.2a	41.6±4.8a	392.1±10.7a	263.1±8.7б
ДГДГ	41.6±9.6a	24.1±2.0a	60.7±11.9a	82.2±34.7a
СХДГ	26.9±0.8a	25.7±1.2a	112.6±22.3a	91.9±40.1a
ДГТС	20.8±0.9a	57.8±5.4б	104.8±6.6a	228.3±53.9б
ФХ	74.3±26.5a	72.8±37.6a	375.4±13.3	-
ФЭ	655.5±48.4	-	1216.4±9.2	-
ФГ	-	-	1724.1±134.7	-

Примечание: достоверно различающиеся средние значения отмечены разными буквами.

Таким образом, ответная реакция симбиотических видов *P. variolosae* и *P. tucigena* на дефицит фосфора в среде включает:

- 1) увеличение содержания одного или нескольких классов гликолипидов на фоне сохранения или снижения интенсивности их синтеза;
- 2) редукцию всех фосфолипидов или увеличение содержания ФХ на фоне снижения содержания остальных фосфолипидов;
- 3) увеличение содержания и интенсивности синтеза ДГТС.

Ответная реакция *P. elongata* и *P. solorinae-bisporae*. Для этого типа реакции характерно резкое снижение содержания всех классов индивидуальных липидов. При этом содержание гликолипидов снизилось в 2-3 раза, бетаиновых – в 4 раза, фосфолипиды, включая ФХ, почти полностью редуцировались (рис. 6, 7). Снижение содержания глико- и бетаиновых липидов, в отличие от водорослей других групп, сопровождалось существенным изменением их жирнокислотного состава. У *P. elongata* на фоне уменьшения относительного содержания триеновых 16:3 и 18:3 кислот увеличивалась доля моноеновых 16:1 и 18:1. У *P. solorinae-bisporae* значительная редукция триеновых кислот в молекулах МГДГ и ДГДГ или только 18:3 кислот в ДГТС компенсировалась увеличением пропорции 16:0. В результате у обоих видов заметно снижался индекс ненасыщенности (табл. 7).

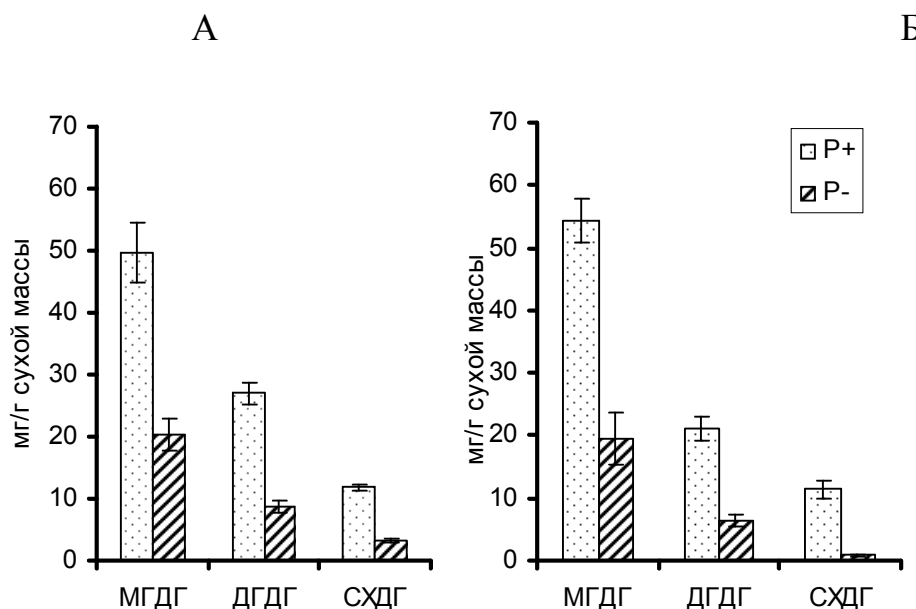


Рис. 6. Содержание индивидуальных классов гликолипидов в мембранах свободноживущей *P. elongata* (А) и симбиотической *P. solorinae-bisporae* (Б), выращенных на полной питательной среде и в условиях дефицита фосфора.

Следует отметить, что даже после значительной редукции мембранных липидов, вызванной недостатком фосфора, содержание большинства гликолипидов и ДГТС в клетках *P. elongata* и *P. solorinae-bisporae* оставалось

довольно высоким, сопоставимым с количеством этих соединений у других водорослей (*P. simplex*, *P. variolosae* и *P. mucigena*), выращенных в оптимальных условиях. Не исключено, что наблюдаемое у *P. elongata* и *P. solorinae-bisporae* резкое снижение содержания мембранных липидов, не имеет серьезных последствий для их жизнеспособности. Это подтверждается результатами исследования роста и морфологии водорослей, а также экспериментами с меченым ацетатом. Действительно, снижение интенсивности синтеза показано только для ДГДГ у *P. elongata*. Интенсивность образования других липидов оставалась без изменений или даже увеличивалась (табл. 8).

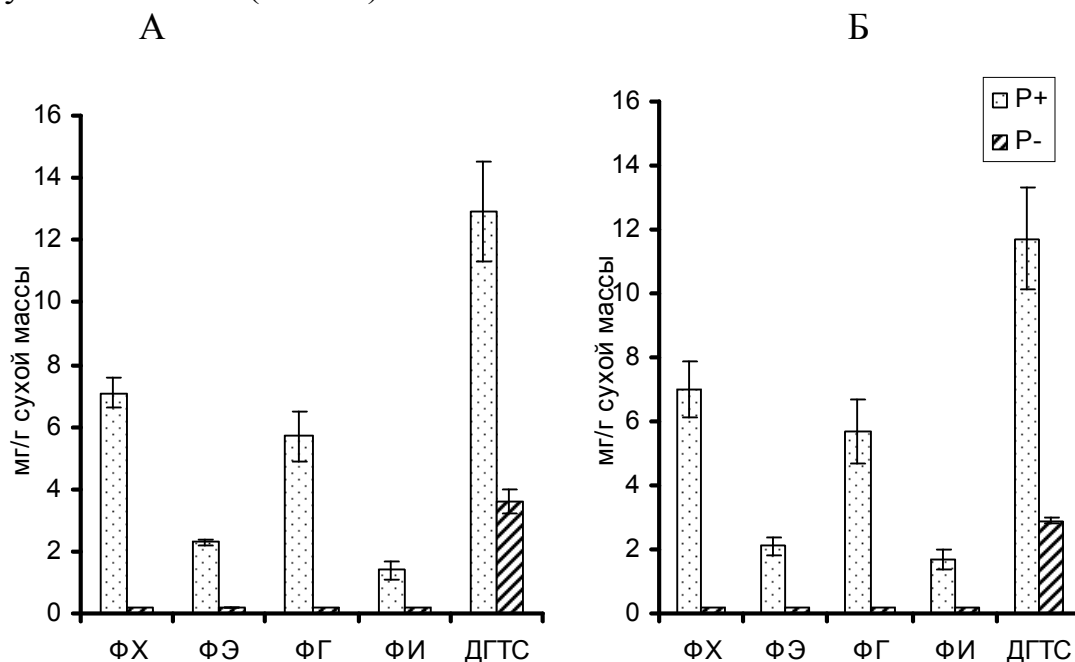


Рис. 7. Содержание индивидуальных классов фосфо- и бетаиновых липидов в мембранах свободноживущей *P. elongata* (А) и симбиотической *P. solorinae-bisporae* (Б), выращенных на полной питательной среде и в условиях дефицита фосфора.

Таблица 7. Индекс ненасыщенности индивидуальных классов глико- и бетаиновых липидов *P. elongata* и *P. solorinae-bisporae*, выращенных на полной питательной среде и в условиях дефицита фосфора.

	<i>P. elongata</i>			<i>P. solorinae-bisporae</i>		
	МГДГ	ДГДГ	ДГТС	МГДГ	ДГДГ	ДГТС
P+	2.60±0.09a	1.65±0.07a	1.75±0.02a	2.30±0.06a	1.83±0.09a	1.61±0.06a
P-	1.69±0.20б	0.79±0.08б	1.23±0.03б	1.60±0.24б	1.47±0.20a	0.58±0.03б

Примечание: достоверно различающиеся средние значения отмечены разными буквами.

Таблица 8. Включение [2 -¹⁴C] ацетата натрия в индивидуальные классы липидов *P. elongata* и *P. solorinae-bisporae*, выращенных на полной питательной среде и в условиях дефицита фосфора.

Индивидуальные классы липидов	Радиоактивностьх10 ³ имп/ (мин·г сухой массы)			
	<i>P. elongata</i>		<i>P. solorinae-bisporae</i>	
	P+	P–	P+	P–
МГДГ	215.6±49.9a	181.7±14.1a	116.2±27.2a	252.6±11.2б
ДГДГ	142.9±13.3a	74.3±4.2б	68.6±20.9a	85.4±9.2a
СХДГ	69.1±10.3a	109.4±1.0б	41.4±4.9a	83.4±3.6б
ДГТС	82.5±8.1a	81.7±5.6a	82.3±32.4a	63.5±2.9a
ФХ	183.2±54.9	-	100.7±18.3	-
ФЭ	803.0±87.7	-	401.0±69.5	-

Примечание: достоверно различающиеся средние значения отмечены разными буквами.

Ответная реакция *P. elongata* и *P. solorinae-bisporae* на недостаток фосфора в основном связана с:

- 1) уменьшением содержания гликолипидов и одновременно, сохранением или увеличением интенсивности их синтеза;
- 2) редукцией фосфолипидов;
- 3) уменьшением содержания бетаиновых липидов на фоне сохранения исходного уровня их синтеза.

Особенности адаптации водорослей рода *Pseudococcomyxa* к длительному фосфорному голоданию.

Особенности адаптации к длительному фосфорному голоданию исследовали на примере свободноживущей *P. chodatii* и двух симбиотических видов, в т.ч. *P. variolosae* и *P. mucigena*. С этой целью водоросли выращивали на полной и бесфосфорной средах в течение 120 сут. За это время увеличение количества клеток в контрольных и опытных вариантах прекращалось, водоросли переходили на стационарную фазу роста.

Следует отметить, что стационарные культуры (120 сут) отличались от культур, находящихся на линейной стадии роста (48-60 сут) как по морфологии, так и по составу липидов. При переходе на стационарную фазу клетки увеличивались в размерах, при этом объем хлоропласта сохранялся или увеличивался. Изменения в составе липидов прежде всего затрагивали фракцию гликолипидов (уменьшение содержания у *P. chodatii*, *P. mucigena*; увеличение у – *P. variolosae*), в меньшей степени – фосфолипидов и ДГТС.

В условиях длительного фосфорного голодания у *P. chodatii* наблюдалось увеличение содержание ДГДГ с 1.3 до 2.3 мг г⁻¹ сухой массы, количество МГДГ не изменялось, а концентрация СХДГ снижалась до минимального значения (рис. 8). Среди фосфолипидов, большая часть которых редуцировалась в условиях длительного фосфорного голодания, выделялась реакция ФХ. Содержание липидов этого класса увеличивалось.

Таким образом, в условиях длительного фосфорного голодания свободноживущий вид более активно адаптируется (на уровне мембранных липидов) к недостатку фосфора. Редукция фосфолипидов, в т.ч. ФЭ, ФГ, компенсируется увеличением содержания гликолипидов ДГДГ и, в меньшей степени, ДГТС.

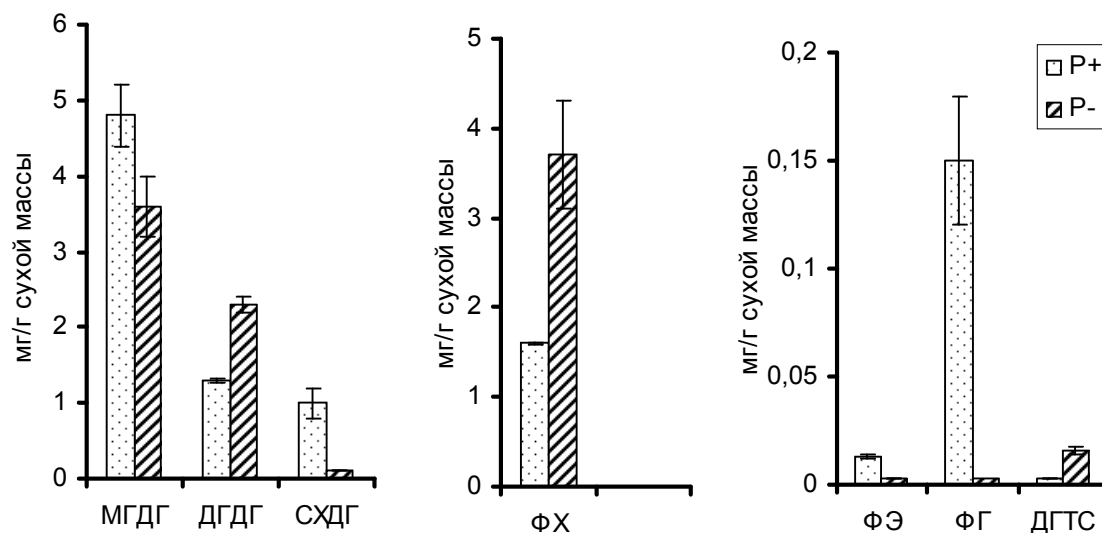


Рис. 8. Содержание мембранных липидов свободноживущей зеленой водоросли *P. chodatii*, выращенной на полной питательной среде и в условиях длительного фосфорного голодания.

У симбиотического вида *P. tucigena*, напротив, длительное фосфорное голодание вызывало снижение содержания всех классов гликолипидов, редукцию ФЭ, ФГ и ФИ, двукратное снижение содержания ФХ (рис. 9).

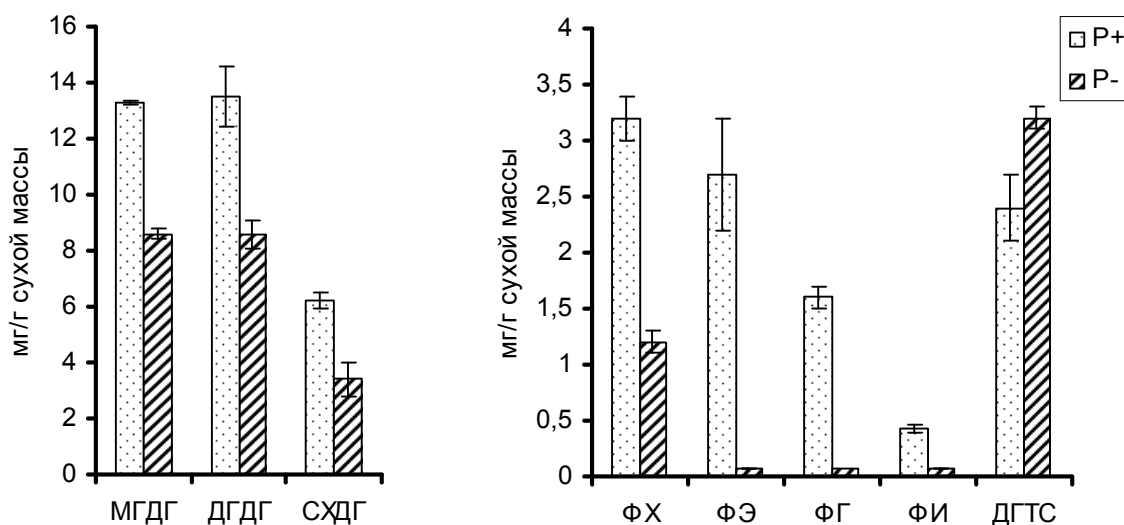


Рис. 9. Содержание мембранных липидов симбиотической зеленой водоросли *P. tucigena*, выращенной на полной питательной среде и в условиях длительного фосфорного голодания.

У *P. variolosae* эта тенденция проявлялась в меньшей степени – среди гликолипидов достоверно уменьшалось только содержание ДГДГ, редуцировались ФЭ и ФИ, концентрация ФХ и ФГ снижалась в два и более раза. Количество бетаиновых липидов у обоих видов водорослей увеличивалось на 25-30%. Таким образом, у симбиотических видов компенсаторные системы, связанные с усиленным образованием гликолипидов, функционируют ограниченное время, постепенно в процессе метаболизма начинают доминировать реакции распада, в результате количество гликолипидов снижается. Компенсаторное замещение редуцированных фосфолипидов осуществляется, по-видимому, в основном за счет липидов бетаинового типа.

Влияние дефицита фосфора на содержание липидов у гетеротрофной культуры *Pseudococcomyxa chodatii*. Альтернативный путь биосинтеза гликолипидов.

По данным литературы усиление синтеза гликолипидов в условиях дефицита фосфора может быть связано с активацией особого типа МГДГ-синтаз 2/3 и ДГДГ-синтаз 2 (Benning, Ohta et al., 2004). Эти синтазы локализованы на наружной мембране хлоропласта и имеют ряд структурных и функциональных особенностей. В частности, они, в отличие от «классических» МГДГ-синтаз 1 и ДГДГ-синтаз 1, не являются светозависимыми. В настоящей части работы мы попытались выяснить, с активностью какого типа синтаз связано накопление гликолипидов в клетках зеленых водорослей. С этой целью был поставлен эксперимент с гетеротрофной культурой *P. chodatii*.

По составу мембранных липидов гетеротрофная культура *P. chodatii*, выращенная на полной питательной среде существенно отличалась от автотрофной. Содержание МГДГ и СХДГ было ниже более чем в 60 раз, количество ДГДГ – в 15 раз. Напротив, содержание ДГТС, ФЭ и ФГ было значительно выше у гетеротрофной культуры. На основании этих результатов, а также данных литературы можно предположить, что образование МГДГ у автотрофной *P. chodatii* сопряжено преимущественно с активностью светозависимых МГДГ-синтаз 1, в то время как в образование ДГДГ помимо ДГДГ-синтаз 1 достаточно активное участие принимают ДГДГ-синтазы 2.

Как и при автотрофном питании, в гетеротрофной культуре *P. chodatii* недостаток фосфора привел к редукции СХДГ, ФЭ, ФГ и ФИ (рис. 10). Концентрация ФХ снизилась незначительно. Основные отличия в реакциях на недостаток фосфора авто- и гетеротрофной культур касались изменений в содержании галакто- и бетаиновых липидов. В гетеротрофной культуре резко увеличивалось содержание МГДГ и ДГТС, количество ДГДГ оставалось без изменений.

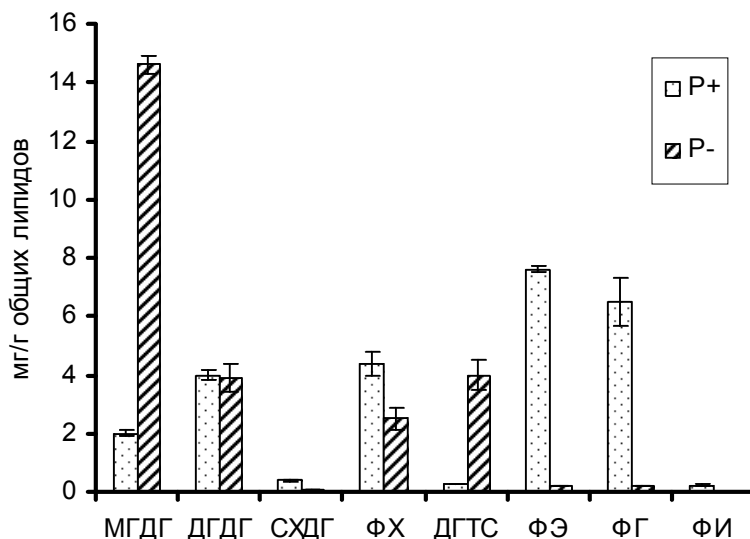


Рис.10. Содержание индивидуальных классов липидов в мембранах гетеротрофной культуры свободноживущей зеленой водоросли *P. chodatii*, выращенной на полной питательной среде и в условиях недостатка фосфора.

Полученные данные позволяют предположить, что недостаток фосфора стимулирует активность МГДГ-синтаз 2/3, в то время как экспрессия ДГДГ-синтаз 2 сохраняется на прежнем уровне. Из литературы известно, что более предпочтительными субстратами для МГДГ-синтаз 2/3 и ДГДГ-синтаз 2 являются «эукариотические» молекулярные виды диацилглицеридов, образующиеся в ЭПР в реакциях синтеза *de novo*, а также из ФХ и других фосфолипидов при участии фосфолипаз (Away et al., 2001). В клетках водорослей субстратом в синтезе гликолипидов могут служить диацилглицериды, образованные путем гидролиза бетаиновых липидов ДГТС (Khozin-Goldberg et al., 2006). Проведенное нами исследование жирнокислотного состава липидов показало, что по составу жирных кислот, синтезированные при недостатке фосфора МГДГ и ДГТС практически не различаются. Не исключено, что в клетках гетеротрофной культуры *P. chodatii* образование МГДГ в условиях дефицита фосфора также идет с участием бетаиновых липидов.

ВЫВОДЫ

1. Свободноживущие виды *Pseudococcomyxa* отличались достаточно активным ростом в культуре. В условиях дефицита фосфора интенсивность их роста снижалась приблизительно в 1.5 раза. Симбиотические виды, за исключением *P. variolosae*, характеризовались крайне слабым ростом вне зависимости от концентрации фосфора в питательной среде.

2. Показано, что состав индивидуальных классов мембранных липидов свободноживущих и симбиотических видов *Pseudococcomyxa*, выращенных на полной питательной среде, не имеет принципиальных отличий, однако

галактолипиды симбиотических водорослей, как правило, характеризуются более высокой степенью ненасыщенности.

3. Установлено, что у свободноживущих и симбиотических видов дефицит фосфора вызывает редукцию большинства фосфолипидов, в т.ч. ФЭ, ФГ и ФИ. Реакция ФХ оказалась неоднородной, было выявлено увеличение (*P. variolosae*), сохранение (*P. chodatii* и *P. simplex*) или снижение (*P. mucigena*, *P. elongata* и *P. solorinae-bisporae*) содержания этого класса липидов.

4. У всех исследованных видов *Pseudococcomyxa* адаптация к дефициту фосфора связана с изменением метаболизма гликолипидов. У свободноживущих видов недостаток фосфора, как правило, стимулировал усиление реакций синтеза и, одновременно, реакций распада гликолипидов (при этом содержание гликолипидов уменьшалось или оставалось без изменений). У симбиотических видов, включая *P. variolosae* и *P. mucigena*, интенсивность синтеза гликолипидов менялась незначительно, происходило накопление гликолипидов.

5. Процесс адаптации к недостатку фосфора у большинства видов зеленых водорослей (*P. chodatii*, *P. simplex*, *P. variolosae* и *P. mucigena*) напрямую связан с индукцией синтеза и/или увеличением содержания бетаиновых липидов. У двух видов *P. elongata* и *P. solorinae-bisporae*, отличающихся наиболее высоким содержанием бетаиновых липидов, интенсивность синтеза ДГТС в условиях дефицита фосфора оставалась без изменений.

6. В условиях длительного фосфорного голодания свободноживущий вид *P. chodatii* более активно адаптируется к недостатку фосфора. Усиливается работа нескольких компенсаторных путей синтеза, в том числе синтез гликолипидов, в меньшей степени синтез бетаиновых липидов. У симбиотических видов *P. variolosae* и *P. mucigena* в этих условиях редукция фосфолипидов компенсируется преимущественно липидами бетаинового типа.

7. На модельном объекте *P. chodatii* установлено, что при недостатке фосфора в условиях гетеротрофного питания многократно увеличивается содержание гликолипидов МГДГ и липидов бетаинового типа ДГТС. Анализ жирнокислотного состава этих соединений указывает на участие ДГТС в альтернативных путях синтеза гликолипидов.

Список публикаций по теме диссертации.

1. Киселева М.А. Изменение соотношения индивидуальных классов мембранных липидов при адаптации *Pseudococcomyxa chodatii* к дефициту фосфора // Материалы I (IX) Международной конференции молодых ботаников в Санкт-Петербурге. Санкт-Петербург, 2006. С. 156.
2. Киселева М.А., Котлова Е.Р., Синютина Н.Ф., Новиков Ф.В. Влияние недостатка фосфора на мембранные глицеролипиды и их жирные кислоты у свободноживущих и симбиотических водорослей рода *Pseudococcomyxa* //

- Сигнальные системы клеток растений: Роль в адаптации и иммунитете. Тез. докл. Второго международного симпозиума. Казань, 2006. С. 181.
3. Kiseleva M., Kotlova E., Sinyutina N. Phosphate deprivation induces accumulation of polyunsaturated molecular species of diacylglycerol trimethylhomoserines in unicellular green algae *Pseudococcomyxa chodatii* and *P. variolosae* // Oils, fats and lipids for a healthier future. Abstracts of 4th Euro Fed Lipid Congress. Madrid, 2006. P. 200.
 4. Kiseleva M.A., Kotlova E.R. The synthesis and utilization of extrachloroplastic lipids in photo- and heterotrophic cultures of the unicellular green algae *Pseudococcomyxa chodatii* grown under phosphate deprivation // Chemistry and Physics of Lipids. 2007. Vol. 149. P. 81.
 5. Киселева М.А., Котлова Е.Р. Влияние длительного фосфорного голодания на мембранные липиды свободноживущей и симбиотических зеленых водорослей рода *Pseudococcomyxa* // Бот. журн. 2008. Т. 93. №1. С. 88-96.
 6. Kiseleva M., Kotlova E., Sinyutina N. Phosphate deficient free-living and symbiotic algae replace membrane phospholipids with glyco- and betaine lipids in different way // 18th International Symposium on Plant Lipid. Bordeaux, 2008. P. 202.
 7. Киселева М.А., Котлова Е.Р., Синютина Н.Ф. Особенности метаболизма гликолипидов у одноклеточной зеленой водоросли *Pseudococcomyxa chodatii* в условиях дефицита фосфора // Липиды и оксилиты растений. Тез. докл. международного симпозиума. Казань, 2008. С. 57.