

На правах рукописи

Бедошвили Екатерина Джамбулатовна

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ
ДИАТОМОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ ИЗ РАЗНЫХ КЛАССОВ МЕТОДАМИ
СВЕТОВОЙ И ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

03.00.04 - клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск

2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Лимнологическом институте Сибирского отделения РАН, в отделе ультраструктуры клетки, г. Иркутск

Научный руководитель: доктор биологических наук
Е.В. Лихошвай
Лимнологический институт СО РАН
г. Иркутск

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
И.И. Кикнадзе
Институт цитологии и генетики СО РАН
г. Новосибирск

доктор биологических наук
Ю.В. Науменко
Центральный сибирский ботанический сад
СО РАН
г. Новосибирск

Ведущее учреждение: Сибирский институт физиологии и биохимии
растений
г. Иркутск

Защита диссертации состоится «__»_____2010 г. на утреннем заседании диссертационного совета по защите диссертаций на соискание учёной степени доктора биологических наук Д 003.011.01 в Институте цитологии и генетики СО РАН, в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 10, тел./факс (383)-333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии и генетики СО РАН.

Автореферат разослан «__»_____2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Диатомовые водоросли благодаря способности формировать кремнистый панцирь с тонкими структурами нанометрового размера привлекают внимание специалистов различных профилей, которое активизировалось с развитием нанотехнологий. Исследования процесса отложения кремнезема у диатомовых водорослей ведутся с 60-х годов прошлого века. Были описаны специфические органеллы отложения кремнезема (SDV – silica deposition vesicle; Reimann, 1964; Drum, Pankratz, 1964) и везикулы транспорта кремния (STV – silicon-transport vesicle; Schmid, Schultz, 1979). Недавно было открыто семейство белков SIT (silicon transporter) у морских диатомей (Hildebrand *et al.*, 1997; Hildebrand, Dahlin, Volcani, 1998), а затем и у пресноводных (Грачев и др., 2002; Щербакова и др., 2005), способных транспортировать кремний в виде кремниевой кислоты из водного окружения внутрь клетки. Однако локализация белка SIT пока не определена, механизмы формирования видоспецифических кремнистых структур неизвестны, вопросы внутриклеточного транспорта кремния остаются дискуссионными (Medlin, 2002; Schmid, 2003; Medlin, 2004; Schmid, 2005; Thamatrakoln, Hildebrand, 2007; Vrieling *et al.*, 2007; Grachev, Annenkov, Likhoshway, 2008; Thamatrakoln, Hildebrand, 2008; Thamatrakoln, Kustka, 2009).

Имеющиеся данные о строении клеток диатомовых водорослей разрозненны и не охватывают все крупные систематические таксоны (порядки, семейства) BACILLARIOPHYTA, поэтому новые данные об ультраструктуре диатомовых водорослей, представляющих различные классы, актуальны как для выяснения механизмов, определяющих морфогенез кремнистых структур, так и для систематики диатомей.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы было выявление особенностей строения клеток и морфогенеза кремнистых панцирей нескольких видов диатомовых водорослей, принадлежащих к основным таксономическим группам.

Были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать ультраструктуру клеток диатомовых водорослей, принадлежащих к известным классам (центрических с радиальной симметрией, центрических с биполярной симметрией, пеннатных бесшовных и пеннатных шовных) и к разным филогенетическим кладам (1, 2a и 2b).

2. Исследовать морфогенез кремнистых панцирей в природной популяции в течение годового цикла и в лабораторной культуре на разных стадиях клеточного цикла для некоторых видов.

3. Разработать метод мягкого растворения кремнистых панцирей, не повреждающий ультраструктуру клеток.

4. Локализовать белок транспортер кремния (SIT) в клетках одного из видов диатомей различными методами ИЭМ.

Научная новизна. Описаны особенности строения клеточных органелл диатомовых водорослей *Thalassiosira proschkinae* Makarova, *Aulacoseira baicalensis* (K. Meyer) Simonsen, *Attheya ussurensis* Stonik, Orlova *et* Crawford, *Chaetoceros muelleri* Lemmermann, *Synedra acus* subsp. *radians* (Kützing) Skabitshevsky, *Cymbella ventricosa* Agardh. Впервые показано, что

формирование разделительных створок, потенциально обеспечивающих расселение вида, начинается в подледной стадии развития *Aulacoseira baicalensis* и наиболее активно происходит при максимальной плотности клеток в популяции. Впервые произведена внутриклеточная визуализация белка SIT.

Практическая и теоретическая значимость работы. Данные об изменении морфологии колоний доминирующего в озере Байкал вида *Aulacoseira baicalensis* могут иметь практическое применение в мониторинге за его экосистемой и при построении палеоклиматических реконструкций. Данные об ультраструктуре клеток диатомовых водорослей важны для понимания эволюционных процессов, лежащих в основе формирования крупных таксонов этой группы водорослей. Визуализация белка SIT важна для исследований, направленных на выявление его роли в механизмах, определяющих особенности морфогенеза кремнистых структур. Метод мягкого растворения кремнистого панциря позволяет получать данные о строении клеток диатомей без применения алмазного ножа и исследовать внутриклеточную локализацию белков методами преэMBEDдинга. Получены новые фундаментальные данные о строении клеток диатомовых водорослей, которые могут быть использованы в курсах лекций по цитологии.

Основные защищаемые положения:

1. Признаки ультраструктуры хлоропластов широко варьируют у диатомовых водорослей, принадлежащих ко всем филогенетическим группам.
2. Формирование разделительных створок у диатомовой водоросли *Aulacoseira baicalensis* наиболее активно происходит при переходе популяции в планктонную фазу годового цикла.
3. В клеточном цикле *Synedra acus* subsp. *radians* образование первого пояскового ободка и деление хлоропластов происходят после экзоцитоза сформировавшейся створки.
4. Метод мягкого растворения кремнистого панциря пригоден для исследования ультраструктуры клеток диатомовых водорослей.
5. Антигенные детерминанты белка SIT локализованы в районе ареол и в цитоплазме.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на конференциях: “The living diatom cell” (Irkutsk, September 17-22, 2004); The 19th International Diatom Symposium (Lystvyanka, August 28–September 2, 2006); IX-ой Международной конференции молодых ботаников (Санкт-Петербург, 21-26 мая, 2006); IV-ом съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 11-15 мая, 2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 работ, из них 4 статьи в рецензируемых журналах и 1 глава в монографии на английском языке. В диссертационную работу вошли исследования, поддержанные Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (гранты № 10.3, 10.4, 22.3, 6.3), грантом Президента РФ НШ-4738.2006.4, интеграционным проектом СО-ДВО РАН № 58 и выполненные в рамках темы фундаментальных исследований № 6.1.1.10 «Контроль морфогенеза кремнистых структур на геномном и клеточном уровне», номер гос. регистрации 01.2.00703351

(Приоритетное направление 6.1. «Биология развития и эволюция живых систем». Программа 6.1.1. «Биология развития и эволюция живых систем»).

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 122 страницах, состоит из введения, 4 глав, списка литературы (169 источников, из них 151 на иностранных языках) и приложения; содержит 2 текстовые таблицы, 36 рисунков, включающих 125 микрофотографий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследований. В работе было исследовано шесть видов, представляющие все классы диатомовых водорослей и их известные филогенетические клады (табл.).

Таблица. Виды, исследованные в работе.

Систематическое положение (по Round, Crawford, Mann, 1990)	Отношение к кладе (по Medlin, Kaczmarek, 2004)
класс Coscinodiscophyceae Round <i>et</i> Crawford подкласс Thalassiosirophyceae Round <i>et</i> Crawford порядок Thalassiosirales Glezer <i>et</i> Makarova семейство Thalassiosiraceae Lebuor род <i>Thalassiosira</i> Cleve <i>Thalassiosira proschkinae</i>	2a
подкласс Coscinodiscophycidae Round <i>et</i> Crawford порядок Aulacoseirales Crawford семейство Aulacoseiraceae Crawford род <i>Aulacoseira</i> Thwaites <i>Aulacoseira baicalensis</i>	1
подкласс Chaetocerotophycidae Round <i>et</i> Crawford порядок Chaetocerotales Round <i>et</i> Crawford семейство Chaetocerotaceae Ralfs род <i>Chaetoceros</i> Ehrenberg <i>Chaetoceros muelleri</i>	2a
семейство <i>Attheyaceae</i> Round <i>et</i> Crawford род <i>Attheya</i> T. West <i>Attheya ussurensis</i>	2a
класс Fragilariophyceae Round подкласс Fragilariophycidae Round порядок Fragilariales Silva семейство Fragilariaceae Greville род <i>Synedra</i> Ehrenberg <i>Synedra acus</i> subsp. <i>radians</i>	2b
класс Bacillariophyceae Haeckel подкласс Bacillariophycidae Mann порядок Cymbellales Mann семейство Cymbellaceae Greville род <i>Cymbella</i> Agardh <i>Cymbella ventricosa</i>	2b

Культура клеток *S. acus* subsp. *radians* была выделена из залива Лиственничный оз. Байкал и выращена Т.А. Сафоновой на среде DM1 (Culture Collection ..., 1988). *C. ventricosa* была выделена из популяции Иркутского водохранилища и выращена Т.Н. Башариной на той же среде. *T. proschkinae*, *A. ussurensis*, *C. muelleri* были получены от Н.А. Айздайчер из Института биологии моря ДВО РАН (Владивосток). Отбор проб *A. baicalensis* проводили в

заливе Лиственничный оз. Байкал в период весенней вегетации, а также летом и осенью 2004 года.

Химический анализ биогенных элементов в байкальской воде выполняла М.В. Сакирко колориметрическими методами: кремния в виде кремнемолибденовой гетерополикислоты, фосфатов – с образованием комплексной фосфорно-молибденовой кислоты (Руководящий документ 52.24.382-95, Руководящий документ 52.24.433-95).

Световую микроскопию (СМ) живых клеток проводили с помощью Axiovert 200 («Zeiss», Германия). Для флуоресцентных исследований использовали зеленый фильтр Filter set 15 «Zeiss» (BP 546/12, FT 580, LP 590). Микрофотографии получены с помощью камеры Penguin 600 CL «Pixera» и обработаны в программе ВидеоТест 5.0.

Пробы для **сканирующей электронной микроскопии** (СЭМ) отбирали сетью Джели с глубин 0-25, 25-50 и 50-100 м, фиксировали 70-80% этанолом, наносили на покровные стекла, высушивали и монтировали стекла на столики для СЭМ. Анализ проводился на СЭМ Philips SEM 525M. Разделительный индекс (SVI – separation valve index) для *A. baicalensis* выражали как процент разделительных створок от общего их количества среди 200 случайно встреченных створок. Измерение длины клеток и колоний проводили для 20-50 случайно встреченных колоний.

Для **просвечивающей электронной микроскопии** (ПЭМ) клетки фиксировали в логарифмической фазе роста в 2,5 % глутаровом альдегиде («Sigma-Aldrich», Германия) на 0,066 М фосфатном буфере Соренсена pH 7,0, приготовленного из 39,2 мл 0,066 М KH_2PO_4 («ICN», США) и 60,8 мл 0,066 М Na_2HPO_4 («ICN», США), в течение 12 ч и в 1 % четырех окиси осмия («Merck KGaA», Германия) на том же буфере (2 ч). Затем клетки заключали в 1 % агарозу («Helicon», Москва). Для растворения кремнистого панциря клетки обрабатывали в течение трех мин с последующей двукратной отмывкой в фосфатном буфере 1 М раствором фтористого аммония pH 5,0, приготовленного из 45 % плавиковой кислоты (ООО «Реахимкомплект», Ангарск) и 25 % водного раствора аммиака («Сигма Тек», Москва). Обезвоживание проводили в серии растворов этанола (ООО «Реахимкомплект», Ангарск): 30, 50, 70, 96 %, а затем в обезвоженных над сульфатом меди (ООО «Реахимкомплект», Ангарск) этаноле и ацетоне (ООО «Реахимкомплект», Ангарск) – в каждом по 5 мин. Обезвоженный материал пропитывали в трех смесях эпоксидной смолы Araldite 502 Kit («SPI», США) и ацетона в соотношениях 1:2, 1:1 и 2:1 по 3 ч в каждой, затем в свежей смоле – 12 ч. После этого материал переносили в полипропиленовую капсулу VeemTM в свежую смесь смолы с катализатором (250 мкл DMP-30 («SPI», США) на 20 мл смолы) и полимеризовали в термостате при 60°C (3 сут). Ультратонкие срезы делали алмазным ножом ULTRA 35° («Diatom», Швейцария) на микротоме Ultracut R («Leica», Австрия), срезы клеток, обработанных фтористым аммонием, получали с помощью стеклянных ножей на том же микротоме. Срезы помещали на палладиевые сетки и контрастировали в цитрате свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1963).

Для **иммуно-электронной микроскопии** (ИЭМ) клетки в логарифмической фазе роста концентрировали методом последовательного

центрифугирования и фиксировали в 4 % параформальдегиде («Реахим», Россия) на фосфатном буфере Соренсена при pH 7,4 в течение 30 мин. Затем клетки отмывали от фиксатора тем же буфером и выдерживали в растворе 2 % глицина («Raana», Венгрия). Далее для постэмбеддинга после отмывки в буфере клетки заключали в 1 % агарозу («Helicon», Москва) и проводили обезвоживание материала в серии растворов этанола (30, 50, 70, 96, 100 % – в каждом по 5 мин). Затем материал переносили в смолу UnicrylTM («British BioCell Int.», Великобритания) и выдерживали при температуре 4°C 1 ч, и затем еще 12 ч в свежей смоле. После этого материал переносили в свежую смолу и полимеризовали в холодильной камере 17020-Ax («SPI», США) при -10°C при облучении ультрафиолетом 4 сут. Срезы получали алмазным ножом Diatome 35° («Diatome», Швейцария) на ультрамикротоме Ultracut R («Leica», Австрия), собирали на никелевые сетки с формваровой подложкой и окрашивали с помощью антисывороток к фрагменту SIT CQVNAANSMLDFINNY, представляющему собой один из внемембранных участков исследуемого белка (ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск, разведение 1:100), и раствора коллоидного золота («Биотест», Новосибирск) с частицами диаметром 9 нм, конъюгированного с белком А (разведение 1:100), как описано ранее (Raška, 1988). Для контроля срезы выдерживали в растворе коллоидного золота 1:100 без предварительной обработки антисыворотками. Все препараты контрастировали в 1 % растворе уранилацетата («Sigma-Aldrich», Германия) на 10 % этаноле и цитратом свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1963).

Для преэмбеддинга часть из зафиксированных клеток обрабатывали 1 М фтористым аммонием pH 5,0 в течение 3 мин, а другую часть раздавливали в ступке. После этого полученный материал выдерживали в 1 % растворе BSA («Amresco», США), а затем в растворе антисывороток. Для контроля часть материала антисывороткой не обрабатывали. После отмывки в фосфатном буфере материал выдерживали в растворе коллоидного золота (разведение 1:100), после вторичной отмывки фиксировали в 2,5 % глутаровом альдегиде на фосфатном буфере в течение 1 ч и далее постфиксировали 12 ч в 1 % растворе оксида осмия («Merck KGaA», Германия) на фосфатном буфере. Клетки заключали в 1 % агарозу и обезвоживали в серии растворов этанола (30, 50, 70, 96, 100 % – в каждом по 15 мин), затем в обезвоженном над сульфатом меди ацетоне (ООО «Реахимкомплект», Ангарск). Обезвоженный материал пропитывали в трех смесях эпоксидной смолы Araldite 502 Kit («SPI», США) и ацетона в соотношениях 1:2, 1:1 и 2:1 по 3 ч в каждой, затем в свежей смоле – 12 ч. После этого материал переносили в полипропиленовую капсулу VeemTM в свежую смесь смолы с катализатором (250 мкл DMP-30 («SPI», США) на 20 мл смолы) и полимеризовали в термостате при 60°C (4 сут). Срезы получали алмазным ножом Diatome 35° («Diatome», Швейцария) на ультрамикротоме Ultracut R («Leica», Австрия) и помещали на палладиевые сетки.

Исследование всех препаратов проводили с помощью ПЭМ Leo 906 E («Zeiss», Германия) при ускоряющем напряжении 80 kV. Микрофотографии получены камерой MegaView II («Zeiss», Германия) и обработаны в программе MegaVision.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Ультраструктура клеток нескольких видов диатомовых водорослей разного систематического положения

Несколько видов диатомей исследованы методами СМ и ПЭМ (рис. 1, 2).

Thalassiosira proschkinae. Крупный хлоропласт разделен на две доли (рис. 1А, Б). Опоясывающая ламелла состоит из двух или трех коротких ламелл (рис. 1Н); виден перипластидный ретикулум (рис. 1У). Двояковыпуклый пиреноид окружен оболочкой, его пронизывает одна ламелла с одним тилакоидом (рис. 1Н). Ядро находится рядом с одной из створок (рис. 2А), аппарат Гольджи – вблизи ядерной мембраны (рис. 2А). Митохондрии крупные (рис. 2Ж).

Aulacoseira baicalensis. Хлоропласты многочисленные, дисковидной формы (рис. 1В, Г). По периферии хлоропласта располагаются стопки тилакоидов, уходящие в строму хлоропласта (рис. 1О); виден перипластидный ретикулум (рис. 1Ф). Линзовидный пиреноид пересекает 1-3 ламеллы (рис. 1О). Ядро имеет четко выраженное ядрышко, 1-4 аппарата Гольджи расположены по периферии клетки вблизи ядра (рис. 2Б). Митохондрии имеют сложную разветвленную форму (рис. 2К).

Attheya ussurensis. Хлоропласт имеет несколько долей, расходящихся от центра клетки (рис. 1Д, Е). Опоясывающая ламелла состоит из нескольких фрагментов, в зону пиреноида не заходит (рис. 1Р); виден перипластидный ретикулум (рис. 1Ц). Полупогруженные пиреноиды обращены к центру клетки (рис. 1Р). Ядро с хорошо выраженным ядрышком прижато к поясковым ободкам, 1-2 аппарата Гольджи расположены рядом с ядром (рис. 2Г). Митохондрии удлинённые, на поперечных срезах округлой формы (рис. 2И).

Chaetoceros muelleri. Клетки мелкие, имеют щетинки (рис. 1Ж). Хлоропласт занимает большую часть клетки (рис. 1З), прилегает к ее поверхности, окружен непрерывной опоясывающей ламеллой (рис. 1П); виден перипластидный ретикулум (1Х). Линзообразный пиреноид обращен выпуклой частью к периферии клетки, его пронизывает одна ламелла, состоящая из трех тилакоидов (рис. 1П). Ядро смещено к поясковым ободкам, аппарат Гольджи с многочисленными цистернами прижат к ядерной мембране (рис. 2В). Одна митохондрия сложной разветвленной формы или с инвагинацией (рис. 2З).

Synedra acus subsp. radians. Длинные хлоропласты вытянуты вдоль клетки (рис. 1И, К), окружены опоясывающей ламеллой; виден перипластидный ретикулум (рис. 1Ч). Пиреноид обращен к периферии клетки (рис. 1Т). Ядро располагается диагонально, имеет лопасти и инвагинации, внутрь которых заходят цистерны ЭПР (рис. 2Д; 5Ж). Аппараты Гольджи (рис. 2Д) располагаются вдоль ядра, многочисленные длинные и узкие митохондрии – по периферии клетки (рис. 2Л).

Symbella ventricosa. Хлоропласт разделен на две доли (рис. 1Л, М). Сферический пиреноид имеет оболочку, его пронизывает одна ламелла, состоящая из одного тилакоида, не связанного с другими тилакоидами (рис. 1С). Хлоропласт окружают несколько коротких ламелл (рис. 1С); виден перипластидный ретикулум (рис. 1Ш). Ядро прижато к поясковым ободкам, вокруг него находятся несколько аппаратов Гольджи (рис. 2Е). Длинные и разветвленные митохондрии расположены по периферии клетки (рис. 2М).

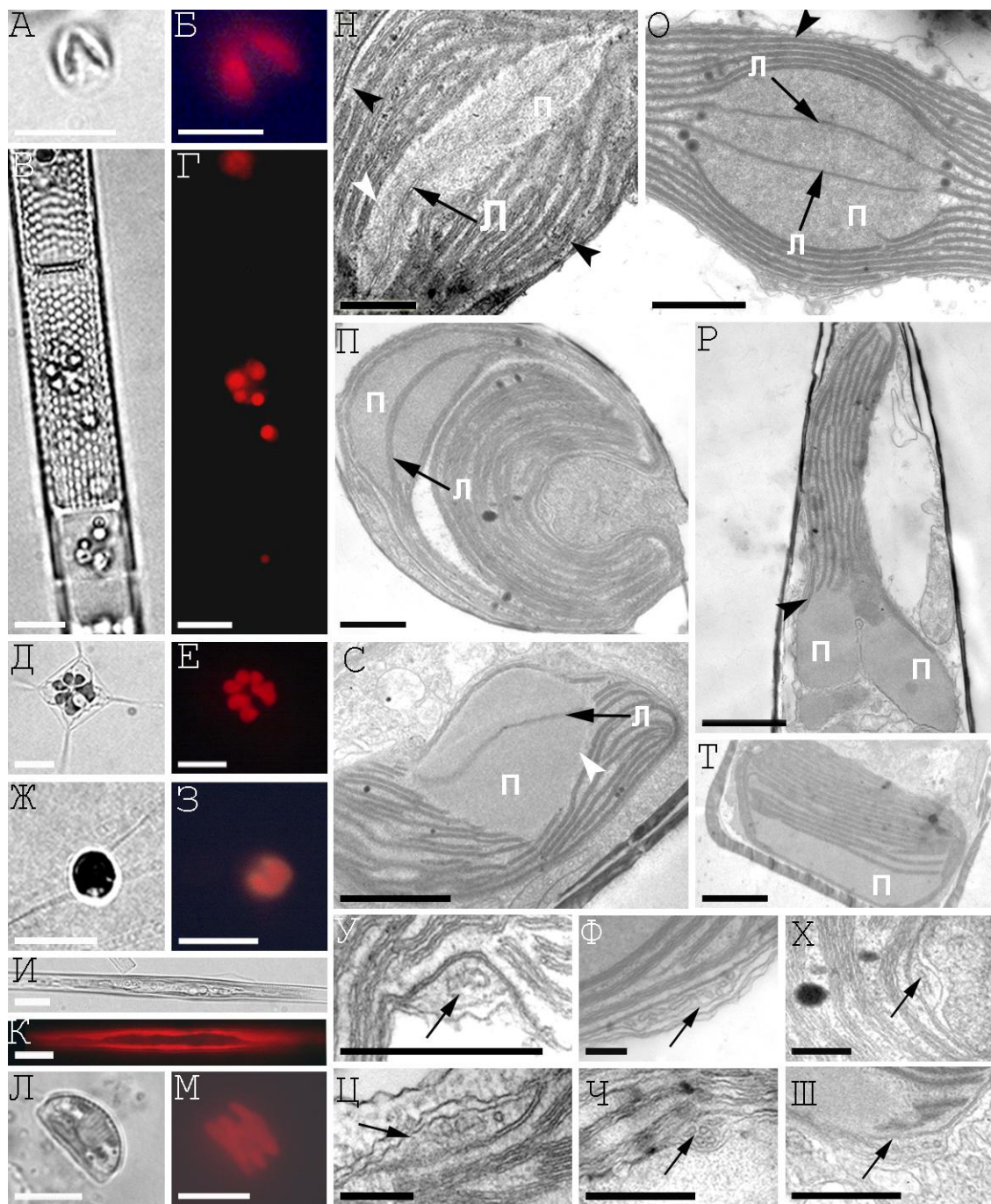


Рис. 1. Строение хлоропластов нескольких видов диатомовых водорослей. А-М – СМ; Н-Ш – ПЭМ. А, Б, Н, У – *T. proschkinae*; В, Г, О, Ф – *A. baicalensis*; Д, Е, Р, Ц – *A. ussurensis*; Ж, З, П, Ч – *C. muelleri*; И, К, Т, Ч – *S. acus* subsp. *radians*; Л, М, С, Ш – *C. ventricosa*. Условные обозначения: П – пиреноид; Л – ламелла пиреноида; длинная стрелка – перипластидный ретикулум; короткая белая стрелка – оболочка пиреноида; короткая черная стрелка – место прерывания опоясывающей ламеллы. Масштаб: А, Б – 5 мкм; В-М – 10 мкм; Н, П, У, Ч, Ш – 500 нм; О, Р-Т – 1 мкм; Ф-Ц – 200 нм.

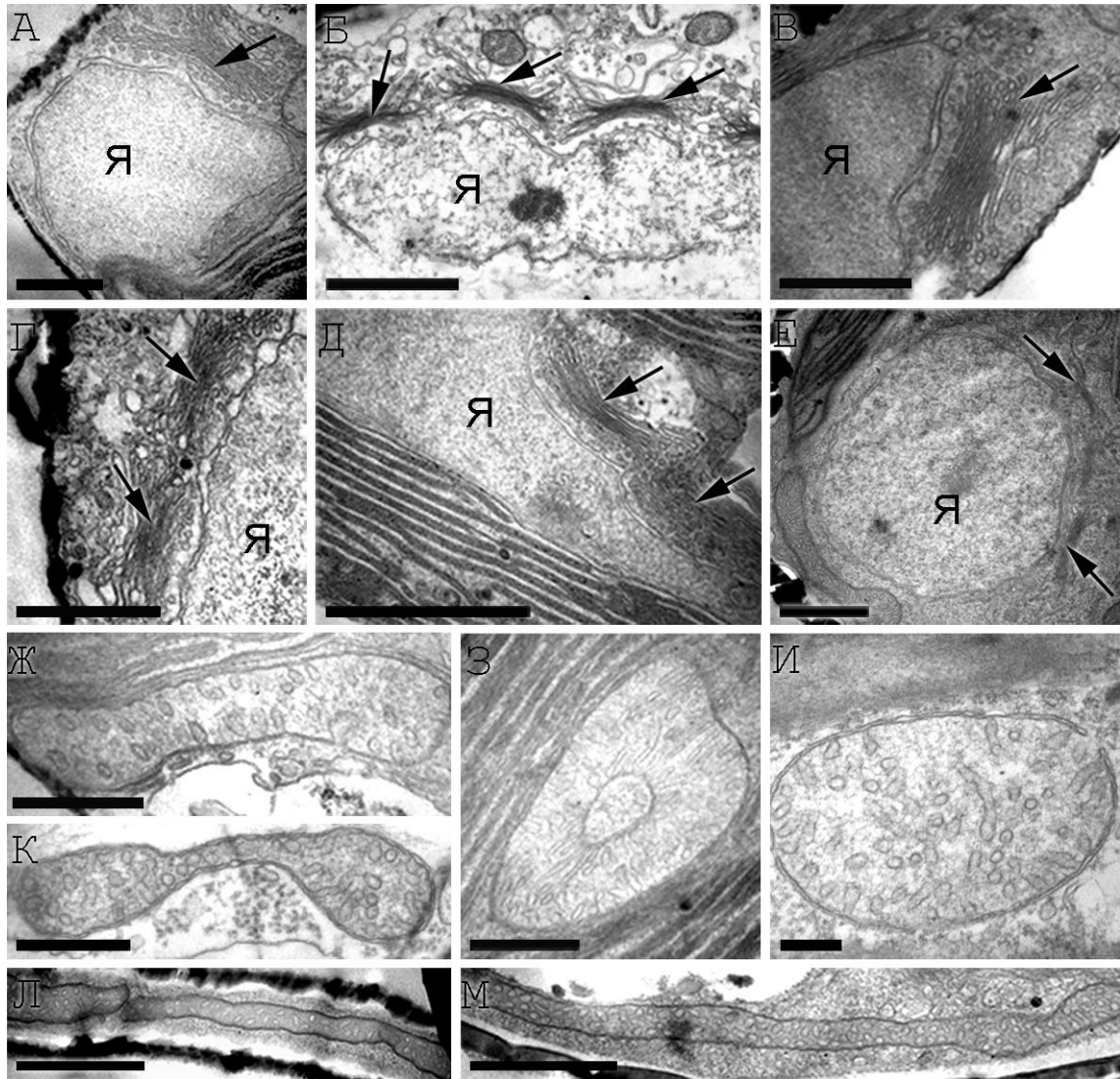


Рис. 2. Ультраструктура клеток диатомовых водорослей нескольких видов. ПЭМ. А-Е – околярное расположение аппаратов Гольджи; Ж-М – строение митохондрий; А, Ж – *T. proshkinae*; Б, К – *A. baicalensis*; В, З – *C. muelleri*; Г, И – *A. ussurensis*; Д, Л – *S. acus* subsp. *radians*; Е, М – *C. ventricosa*. Условные обозначения: стрелка – аппарат Гольджи; Я – ядро. Масштаб: А, В, Ж, З, К – 500 нм; Б – 2 мкм; Г, Д, Е, Л, М – 1 мкм; И, Л – 200 нм.

2. Изменение морфологии колоний планктонной диатомовой водоросли *Aulacoseira baicalensis* на разных стадиях годового цикла в озере Байкал

Исследована сезонная динамика формирования разделительных шипов в колониях клеток вида *A. baicalensis*, доминирующего в оз. Байкал (**рис. 3**). Показано, что на разных стадиях годового цикла количество клеток в колониях *A. baicalensis* изменяется. Формирование разделительных шипов начинается в апреле, в подледный период, а максимальное содержание створок с разделительными шипами (20 %) наблюдается в начале июня в период открытой воды. Вслед за этим, в июле, когда температура верхнего слоя воды повышается до 6-8°C, вид покидает фотическую зону.

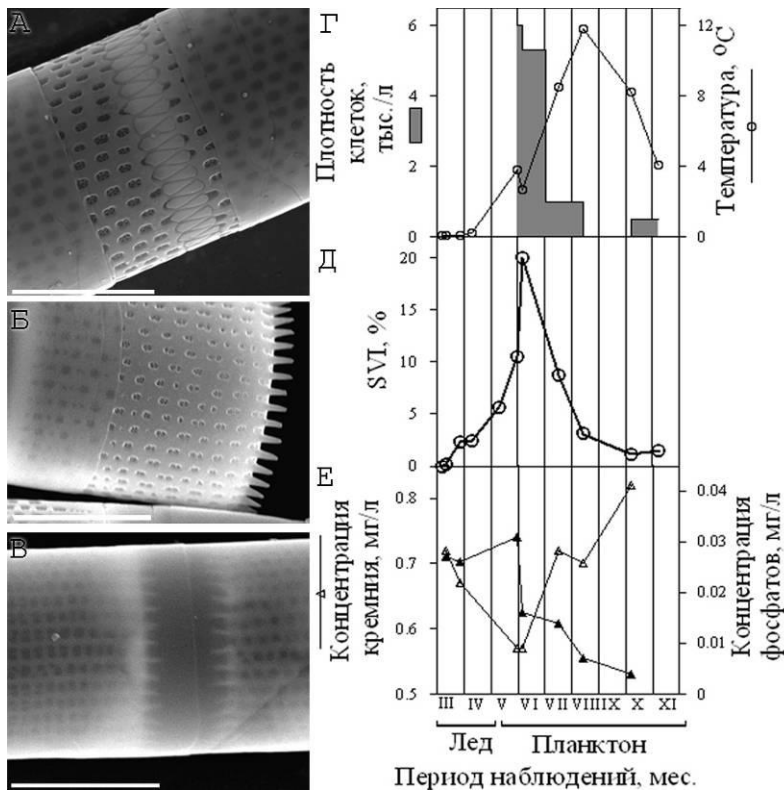


Рис. 3. Морфология колоний *A. baicalensis*. А-В – СЭМ. А – створки с соединительными шипами; Б – створка на конце колонии с разделительными шипами; В – разделительные шипы закрыты поясковыми ободками; Г – концентрация клеток в планктоне и температура в поверхностном слое воды; Д – процент разделительных створок в колониях; Е – концентрация фосфатов и кремния в поверхностном слое воды. Масштаб – 10 мкм.

3. Морфогенез элементов панциря *S. acus subsp. radians* на разных стадиях клеточного цикла

S. acus subsp. radians является объектом молекулярно-биологических исследований, направленных на выяснение механизмов транспорта кремния и отложения кремнезема (Грачев и др., 2002; Щербакова и др., 2005; Grachev, Annenkov, Likhoshway, 2008), поэтому актуальны морфологические данные об особенностях строения клеток этого вида на разных стадиях клеточного цикла. С помощью ПЭМ удалось наблюдать изменение ультраструктуры клеток во время основных этапов морфогенеза элементов панциря этого вида (рис. 4, 5).

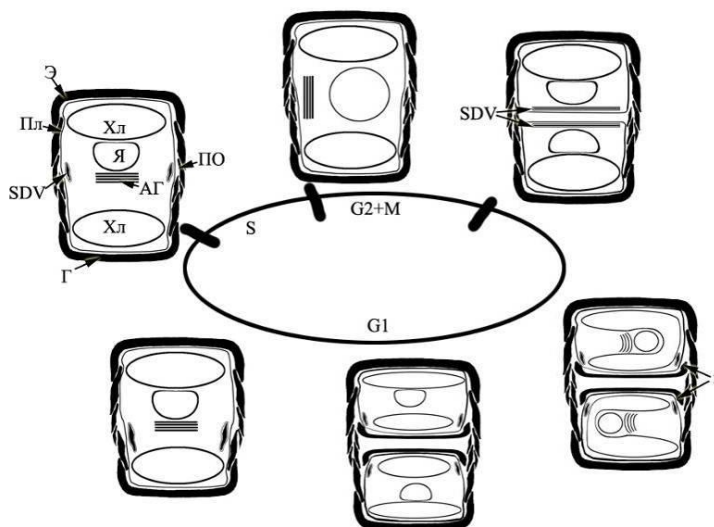


Рис. 4. Схема клеточного цикла *S. acus subsp. radians*. Условные обозначения: Г – гипотека родительской клетки; г – гипотеки дочерних клеток; Пл – плазмалемма; ПО – поясковые ободки; Э – эпитека родительской клетки; SDV – silica deposition vesicle (везикула отложения кремнезема).

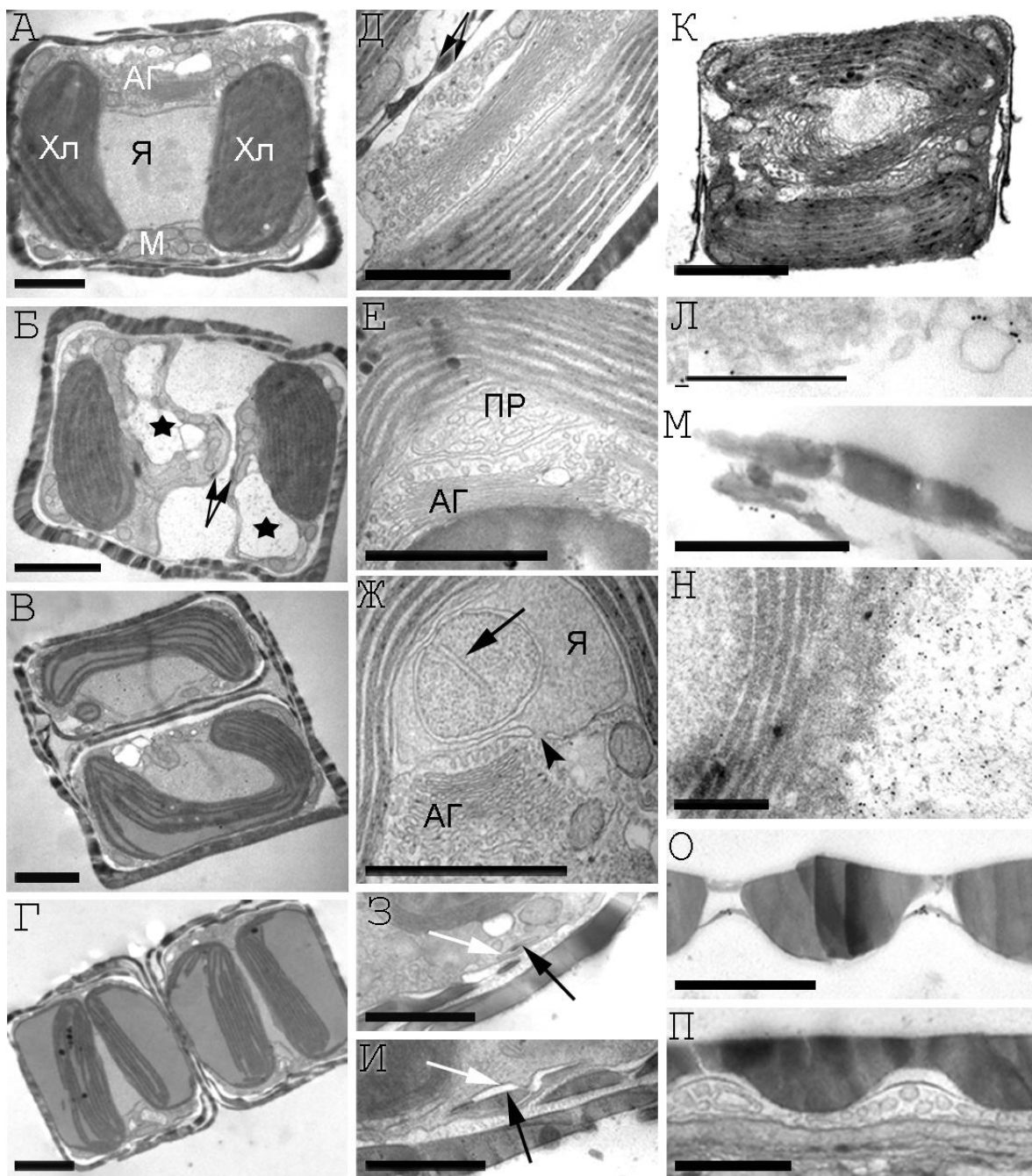


Рис. 5. Ультраструктура клеток *Synedra acus* subsp. *radians*. А-К – ПЭМ; Л-П – ИЭМ, ПЭМ. А – поперечный срез интерфазной клетки перед началом митоза; Б – начальная стадия формирования створок (стрелки), крупные вакуоли внутри клетки (звездочки); В – начальная стадия деления хлоропластов; Г – поперечный срез дочерних клеток с разделившимися хлоропластами; Д – продольный срез через дочерние клетки при морфогенезе створок (стрелки); Е – поперечный срез через хлоропласт и аппарат Гольджи; Ж – поперечный срез через инвагинацию ядра с цистерной шероховатого ЭПР внутри (стрелка), ядерная пора (короткая стрелка); З-И – стадии формирования первого пояскового ободка (черная стрелка) внутри SDV, окруженной силикалеммой (белая стрелка); К – поперечный срез интерфазной клетки после растворения панциря; Л – локализация SIT в клетках с растворенным панцирем; М – метка на обломках створок; Н – срез клетки в интерфазе, в цитоплазме видны частицы коллоидного золота; О – срез створки через ареолы, на диатотекуме видны частицы коллоидного золота. Условные обозначения: АГ – аппарат Гольджи; М – митохондрия; ПР – перипластидный ретикулум; Хл – хлоропласт; Я – ядро. Масштаб: А-Ж, К – 1 мкм; З, И, Л-П – 500 нм.

Перед делением клетки аппарат Гольджи из своего интерфазного положения между ядром и хлоропластом перемещается к поясковым ободкам и располагается параллельно им (**рис. 5А**). Сразу после деления ядра начинается морфогенез створки. Появляется SDV, внутри которой происходит отложение кремнезема; при этом в районе SDV наблюдаются крупные вакуоли (**рис. 5Б**). В процессе морфогенеза происходит рост SDV и утолщение створки.

После экзоцитоза вновь сформировавшихся створок делится хлоропласт, разделение происходит вдоль его оси (**рис. 5В**). Пока деление хлоропласта не закончится, дочерние клетки удерживаются вместе системой поясковых ободков (**рис. 5В**). В дочерних клетках перед разделением хлоропластов при большом увеличении обнаруживаются везикулы аппарата Гольджи, сливающиеся с наружной мембраной хлоропласта (**рис. 5Д**), а в делящемся хлоропласте наблюдается значительное увеличение количества везикул в перипластидном пространстве (**рис. 5Е**).

Одновременно с делением хлоропластов происходит формирование первого пояскового ободка в отдельных SDV (**рис. 5З, И**), при этом силикалемма повторяет очертания формирующегося пояскового ободка, а между силикалеммой и электронно-плотным содержимым SDV наблюдается зазор (**рис. 5И**).

4. Метод мягкого растворения кремнистого панциря фтористым аммонием для исследования ультраструктуры клетки

Жесткий кремнистый панцирь диатомовых водорослей ограничивает исследования их цитологии. В ходе выполнения данной работы был разработан метод обработки клеток *S. acus* subsp. *radians*, позволяющий получать ультратонкие срезы после растворения кремнистого панциря в 1 М фтористом аммонии (рН 5.0). В результате от кремнистого панциря остается органический матрикс, окружающий клетку, а клеточные органеллы сохраняют свою структуру (**рис. 5К**). В дальнейшей работе этот метод был использован наряду с другими в ИЭМ исследованиях.

5. Локализация антигенных детерминант белка SIT в клетках *S. acus* subsp. *radians* методом иммуно-электронной микроскопии

В результате применения различных модификаций ИЭМ удалось выявить антигенные детерминанты белка SIT. При исследовании срезов клеток после растворения панциря антигенные детерминанты белка SIT выявляются по периферии клетки на «тенях» створок, представленных диатотепумом и на мембранных структурах (**рис. 5Л**). При исследовании ультратонких срезов раздавленных клеток показано наличие метки по периферии клетки, а также на фрагментах створок (**рис. 5М**). С применением метода постэмбеддинга антигенные детерминанты белка SIT в большом количестве выявлены в цитоплазме и на диатотепуме в районе ареол (**рис. 5Н, О**).

ОБСУЖДЕНИЕ

1. Формирование разделительных шипов – реакция вида *A. baicalensis* на изменение условий окружающей среды

В данной работе максимальные значения индекса разделительных створок, отмечены в начале июня, когда концентрация клеток в фотическом слое была максимальной. По нашим наблюдениям температура поверхностного слоя воды, являющаяся лимитирующим фактором для данного организма (Скабичевский, 1929, 1960), в начале июня еще была ниже 4°C и не могла служить «сигналом» неблагоприятной обстановки, но вид уже переключился на формирование разделительных створок.

Потребление кремния диатомовыми водорослями в период их массового развития приводит к снижению его концентрации в воде, что соответствует данным литературы (Вотинцев, Мещерякова, Поповская, 1975; Грачев, 2002). Ранее было выяснено, что наиболее важным фактором среды для многих меропланктонных *Aulacoseira* являются высокие концентрации фосфора (Kilham, Kilham, Necky, 1986; Reynolds *et al.*, 1986; Kilham, 1990; Jewson *et al.*, 1993). По всей видимости, существенные изменения в жизни клеток *A. baicalensis* также вызваны изменением концентрации фосфатов (рис. 3В). Формирование разделительных створок с шипами иной формы, чем у соединительных створок, связано с необходимостью более широкого расселения вида и может служить примером управления процессом морфогенеза кремнистых структур в клетке при изменении условий окружающей среды.

2. Особенности ультраструктуры клеток диатомовых водорослей в зависимости от их формы и размера

Некоторые особенности ультраструктуры клеток диатомовых водорослей во многом обусловлены их размерами и формой. Так, виды, относящиеся к разным классам, но имеющие сходные размеры и форму клеток, имеют общие черты строения. Например, в мелких клетках *S. muelleri* и *T. proschkinae* около ядра расположен один аппарат Гольджи, у *A. ussurensis* – один или два, у *A. baicalensis* и *S. ventricosa* – до четырех, а в узких клетках вытянутой формы *S. acus* subsp. *radians* – шесть. Для *S. muelleri* и *T. proschkinae* характерны крупные митохондрии (иногда разветвленные), у крупных видов, таких как *A. baicalensis* и *S. acus* subsp. *radians*, многочисленные длинные и узкие митохондрии вытянуты вдоль клетки. Ядро в клетках *S. acus* subsp. *radians* также удлиненное, в инвагинации ядра можно наблюдать цистерны ЭПР. Такая форма ядра увеличивает его поверхность и обеспечивает лучший контакт с другими клеточными органеллами через ядерные поры, отмеченные в инвагинациях ядерной мембраны. В районе инвагинации ядра наблюдается также массовое слияние везикул от аппарата Гольджи с наружной мембраной ядерной оболочки (рис. 5Ж), свидетельствующее об активном транспорте веществ.

3. Детали строения хлоропластов у исследованных видов

В ходе проведенного исследования показано, что расположение, форма и тонкое строение хлоропластов многообразно и имеет как общие черты строения,

свойственные всем диатомовым водорослям, так и некоторые особенности. У всех исследованных видов тилакоиды собраны в пачки по три и образуют анастомозы. Перипластидный ретикулум, являющийся рудиментом ЭПР эндосимбионта первого порядка, обнаружен у всех исследованных видов: четко видны сферические или овальные мембранные образования между парой внутренних и парой наружных мембран хлоропласта. Можно предположить, что цистерны и везикулы перипластидного ретикулума выполняют роль ЭПР, то есть путем компартиментализации перипластидного пространства разделяют протекающие процессы транспорта и модификации белков, синтезированных в цитоплазме. Об участии перипластидного ретикулума в активном транспорте веществ свидетельствуют наблюдения слияния везикул с наружной мембраной хлоропласта перед его делением (**рис. 5Д**).

Впервые отмечено, что непрерывная опоясывающая ламелла, которая, по данным литературы, не имеет особых признаков строения (Round, Crawford, Mann, 1990; Mann, 1996), встречается не у всех видов диатомовых водорослей.

4. Детали строения пиреноидов у представителей разных филогенетических клад

На основе исследования генов 18S рРНК (Medlin, 1997; Medlin, Kaczmarska, 2004) было показано, что отдел диатомовых водорослей BACILLARIOPHYTA распадается на три монофилетические клады, каждая из которых имеет свои особенности в строении пиреноида. Была предпринята попытка связать филогенетическое древо с данными по ультраструктуре клеток разных видов диатомей (Medlin, 1997; Medlin, Kaczmarska, 2004). С учетом полученных в настоящей работе данных уточнены и расширены признаки строения пиреноидов у представителей разных филогенетических клад:

- клады 1 – один пиреноид, окруженный или не окруженный мембраной, пересекается одной или более ламеллами;
- порядок Thalassiosirales из клады 2a – один окруженный мембраной пиреноид, ламелла, пересекающая пиреноид, часто отсутствует;
- остальные порядки из клады 2a – один пиреноид, может пересекаться ламеллами;
- клада 2b – морфология пиреноидов очень разнообразна, ни один из входящих в эту кладу порядков не может быть охарактеризован единым набором признаков строения пиреноида.

5. Особенности морфогенеза панциря у *Synedra acus* subsp. *radians*

Исследование срезов клеток с помощью ПЭМ позволило выявить основные события клеточного цикла и морфогенеза створки (**рис. 4, 5**). Деление хлоропластов в клетках диатомей может происходить до деления клеток, во время расщепления ядра или после деления клеток. У *S. acus* subsp. *radians* деление хлоропластов происходит после экзоцитоза новых створок одновременно с формированием первого пояскового ободка. Морфогенез второго и третьего поясковых ободков происходит на протяжении всей интерфазы, что может являться четким указанием на эту фазу клеточного цикла. На ранних этапах морфогенеза створок у *S. acus* subsp. *radians* присутствуют

крупные вакуоли, иногда сливающиеся с полостью между дочерними клетками (**рис. 5Б**). Обнаруженные вакуоли могут свидетельствовать в пользу недавно высказанной гипотезы об участии макропиноцитоза в захвате клеткой кремниевой кислоты из водной среды (Vrieling *et al.*, 2007).

6. Достоинства предложенного метода подготовки препаратов диатомей для ПЭМ

Метод получения ультратонких срезов диатомовых водорослей стеклянными ножами после растворения кремнистых створок использовался ранее (Drum, 1963; Громов, Мамкаева, 1981), при этом непосредственно перед приготовлением срезов блоки с материалом рекомендовалось обрабатывать в течение 1-36 часов 10-20 % плавиковой кислотой. Такой метод не получил широкого распространения из-за жесткости воздействия кислоты (pH 1-2) и ограничения выбора заливочных сред, например, эпоксидные смолы в результате обработки плавиковой кислотой становятся полужидкими и непригодными для получения срезов. В данной работе благодаря заключению клеток диатомей в агар и использованию в качестве растворяющего агента 1 М раствора фтористого аммония с pH 5,0 удалось добиться сокращения времени обработки до 3 мин и применить более широкий спектр заливочных сред, при этом элементы ультраструктуры сохранялись в нативном состоянии.

7. Сравнение методов ИЭМ и результатов, полученных с их помощью

До настоящего исследования локализация белка SIT в клетке была неизвестна. Исследование с помощью ИЭМ показало, что в эксперименте с постэмбеддингом антигенные детерминанты белка SIT экспонированы в ареолах на диатотепуме (**рис. 5О**), а также в большом количестве в цитоплазме (**рис. 5Н**), что может отображать как процесс синтеза этого белка, так и его участие во внутриклеточном транспорте кремниевой кислоты или ее комплексов. Фиксация материала с помощью параформальдегида сохраняет антигенные детерминанты и повышает качество иммунохимической реакции, но не способствует сохранности клеточных мембран или окруженных мембранами везикул (Oliver, 1999). Применение метода преэмбеддинга с последующей за иммуноокрашиванием постфиксацией в глутаровом альдегиде и оксиде осмия по стандартной процедуре позволило выявить антигенные детерминанты на мембранных структурах и диатотепуме, выстилающем панцирь (**рис. 4Л, М**).

8. Возможная роль белка SIT в морфогенезе створки

Согласно аминокислотной последовательности белок SIT является мембранным белком (Hildebrand *et al.*, 1997; Щербакова и др., 2005). Однако недавнее исследование показало наличие белка в экстрактах при обработке их как 8 М мочевиной и 2 % SDS, что приводит к разрушению мембран, так и при достаточно мягких условиях при обработке материала 10 mM трис HCl/1 mM CaCl₂ (Петрова и др., 2007). В данном исследовании было показано наличие исследуемого белка не только на плазмалемме, но и на полисахаридном слое, выстилающем кремнистую створку изнутри, что не противоречит предыдущему исследованию. Наличие везикул между плазмалеммой и диатотепумом (**рис. 5П**)

позволяет также предположить, что SiT может доставляться на диатотецум с помощью везикулярного транспорта и участвовать в переносе кремниевой кислоты из окружающей среды в пространство между панцирем и плазмалеммой.

9. Жизнь в стеклянном панцире

Способность усваивать кремний из окружающей среды и использовать его для внутриклеточного синтеза кремнистых элементов панцирей возникла в природе одновременно с появлением группы гетероконтов, к которым и относятся диатомовые водоросли (Medlin, Kachmarska, 2004). Однако среди всех гетероконтов только диатомеи используют эту возможность в полной мере – строят панцирь, закрывающий клетку полностью и постоянно, на всех этапах жизненного цикла. Одно из основных преимуществ, которое дает диатомовым водорослям прочный панцирь, – это возможность избежать выедания консументами или ограничить его (Hamm *et al.*, 2003). Кремнистый панцирь у диатомовых водорослей функционален, и различия в его структуре видоспецифичны. Одним из примеров таких структур являются соединительные и разделительные шипы различной формы, синтезируемые клетками в зависимости от условий окружающей среды. Наряду с хлоропластом (которые у всех видов прижаты к периферии и изогнуты по поверхности клетки для обеспечения максимальной экспозиции) большой объем клетки может занимать вакуоль. Другие клеточные органеллы тесно прижаты друг к другу, располагаясь в узком свободном пространстве между клеточной стенкой и ядром, ядром и хлоропластом, при этом эффективность взаимодействия между компонентами клетки, обеспечивается многочисленными инвагинациями и выпячиваниями, как, например, ядро у *S. acus* subsp. *radians* или митохондрии у *C. muelleri*. Кремнистый панцирь жесткий, сам по себе он не способен растягиваться при увеличении объема клетки. Эта проблема решается тем, что он состоит из двух створок, которые перед делением могут раздвигаться, а клетку во время ее роста закрывают кремнистые поясковые ободки, которые синтезируются в строго определенное время.

ВЫВОДЫ:

1. Проведенное исследование строения клеток видов диатомовых водорослей из разных классов и филогенетических групп (центрических с радиальной симметрией *Aulacoseira baicalensis* и *Thalassiosira proschkiniae*, центрических с биполярной симметрией *Attheya ussurensis* и *Chaetoceros muelleri*, пеннатной бесшовной *Synedra acus* subsp. *radians* и пеннатной шовной *Cymbella ventricosa*) выявило вариации в количестве аппаратов Гольджи, в количестве и строении митохондрий. Наибольшие различия показаны в строении хлоропластов – пиреноида и опоясывающей ламеллы.
2. Установлено, что у *Aulacoseira baicalensis*, доминирующей в весеннем фитопланктоне оз. Байкал, разделительные шипы конической формы появляются в подледный период в начале марта, и процент разделительных створок достигает наиболее высоких значений в начале июня при максимальной плотности популяции в фотическом слое открытой воды.

3. Исследование ультраструктуры клеток на разных стадиях морфогенеза элементов кремнистого панциря у *Synedra acus* subsp. *radians* показало, что после экзоцитоза дочерних створок одновременно с началом формирования первого пояскового ободка происходит деление хлоропластов.
4. Разработанный метод растворения кремнистого панциря не нарушает строение клеточных структур, позволяет получать ультратонкие срезы диатомовых водорослей стеклянным ножом и может быть применен для исследований клеток с помощью ПЭМ и ИЭМ.
5. Впервые несколькими методами иммуно-электронной микроскопии на примере *Synedra acus* subsp. *radians* установлена локализация белка SIT - в цитоплазме клеток, на мембранных структурах и на диатотекуме в районе ареол.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Бедошвили Е.Д., Лихошвай Е.В., Грачев М.А. Ультраструктура диатомеи *Synedra acus* subsp. *radians* по данным трансмиссионной электронной микроскопии после мягкого растворения кремнезема // Изв. АН, Сер. Биол. 2007. № 3. С. 367-371.
2. Бедошвили Е.Д., Бондаренко Н.А., Сакирко М.В., Ханаев И.В., Лихошвай Е.В. Изменение длины колоний планктонной диатомовой водоросли *Aulacoseira baicalensis* на разных стадиях годового цикла в озере Байкал // Гидробиол. журн. 2007. Т. 43, № 3. С. 81-89.
3. Петрова Д.П., Бедошвили Е.Д., Шелухина И.В., Самуков В.В., Корнева Е.С., Верещагин А.Л., Попкова Т.П., Карпышев Н.Н., Лебедева Д.В., Клименков И.В., Лихошвай Е.В., Грачев М.А. Обнаружение белка транспорта кремниевой кислоты в клетках пресноводной диатомеи *Synedra acus* методами иммуноблоттинга и иммуноэлектронной микроскопии // Докл. АН. 2007. Т. 417, № 1. С. 113-116.
4. Likhoshway Ye.V., Sorokovikova E.G., Belykh O.I., Kaluzhnaya OI.V., Belikov S.I., Bedoshvili Ye.D., Kaluzhnaya Ok.V., Masyukova Ju.A., Sherbakova T.A. Visualization of the silicon biomineralization in cyanobacteria, sponges and diatoms // Biosphere Origin and Evolution / Ed. by N. Dobretsov *et al.* – New York: Springer, 2008. P. 219-230.
5. Бедошвили Е.Д., Попкова Т.П., Лихошвай Е.В. Ультраструктура хлоропластов нескольких видов диатомовых водорослей из разных классов // Цитология. 2009. Т. 51, № 4. С. 346-357.