

Бедошвили Екатерина Джамбулатовна

Bedoshvili Yekaterina Dzhambulatovna

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

candidate of biological Sciences, senior researcher

Попова Мария Сергеевна

Popova Maria Sergeevna

аспирант

PhD-student

Лихошвай Елена Валентиновна

Likhoshway Yelena Valentinovna

заведующая отделом, профессор

a head of department, Prof.

Лимнологический институт Сибирского отделения

Российской Академии наук

Limnological Institute of the Siberian Branch

of the Russian Academy of Sciences

СТРОЕНИЕ КЛЕТКИ И МОРФОГЕНЕЗ КРЕМНЕЗЕМНЫХ СТВОРОК ЦЕНТРИЧЕСКОЙ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ *STEPHANODISCUS MEYERI*

CELL STRUCTURE AND VALVE MORPHOGENESIS OF A CENTRIC DIATOM *STEPHANODISCUS MEYERI*

Аннотация на русском языке: С помощью конфокальной и просвечивающей электронной микроскопии описано строение клеток и морфогенез кремнеземной створки с центрической симметрией у пресноводной диатомовой водоросли *Stephanodiscus meyeri*, выделенной в культуру из оз. Байкал. Охарактеризованы последовательные стадии формирования кремнеземных ультраструктур, определяющие видовую принадлежность этой диатомеи. Полученные данные важны для понимания эволюции диатомей, направленной на создание огромного разнообразия генетически запрограммированных структур из биогенного кремнезема, и для развития биоинспирированных технологий.

The summary in English: Cell structure and the siliceous cell wall morphogenesis of a freshwater diatom *Stefanodiscus meyeri* cultured from Lake Baikal was studied using confocal microscopy and transmission electron microscopy. We have described the stages of building the siliceous ultrastructures which are characteristic for this species. The data acquired in this work is important for understanding the diatom evolution that created the great variety of genetically determined silica structures, as well as for the development of bioinspired technologies.

Ключевые слова: диатомовые водоросли, цитология, морфогенез, биогенный кремнезем, ультраструктура

Key words: diatoms, cytology, morphogenesis, biosilica, ultrastructure

ВВЕДЕНИЕ

Диатомовые водоросли – одноклеточные автотрофные эукариоты, широко распространенные в водной среде, покрытые кремнеземным панцирем

многообразной структуры, состоящим из створок и поясковых ободков. Строение створок диатомей видоспецифично, на основе данных о симметрии и деталях их строения построена таксономия и систематика этой группы организмов: с радиальной и биполярной симметрией – центрические, а с билатеральной симметрией – пеннатные, которые по наличию или отсутствию шва (щели в панцире), в свою очередь, делятся на шовные и бесшовные [1]. Элементы кремнеземного панциря формируются внутри клетки, в специальной везикуле [2, 3]. Симметрия створки определяется на самой ранней стадии морфогенеза, у центрических диатомей это – кольцо, или аннулюс, которое в последствии зарастает кремнеземом [4]. Морфогенез разделен на последовательные стадии [5-7], это: (1) формирование аннулюса, небольшого кольца из кремнезема, с радиально расходящимися от него ребрами; (2) образование ареол (отверстий в клеточной стенке), благодаря частичному зарастанию промежутков между ребрами кремнеземом; (3) дифференциация наружной поверхности створки – формирование двугубых выростов, выростов с опорами, шипов и других элементов ультраструктуры, как на лицевой части створки, так и на ее загибе.

Обычно исследования морфогенеза створки проводятся на препаратах кремнеземных створок, отмытых от всей органики путем жесткой обработки окислителем, например серной кислотой. В этом случае о роли клетки в морфогенезе створки нельзя судить даже по косвенным признакам. Поскольку элементы кремнеземных панцирей формируются внутри клетки, очевидно, что для понимания механизмов морфогенеза необходимы исследования на клеточном уровне. В настоящее время такие исследования редки и охватывают всего несколько видов диатомей [8, 9].

В настоящей работе нами было исследовано строение клетки пресноводной колониальной центрической диатомеи *Stephanodiscus meyeri*

Genkal & Popovskaya, эндемика оз. Байкал, на разных стадиях морфогенеза ее створки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток *Stephanodiscus meyeri* выделена из природной популяции оз. Байкал и выращена на среде DM [10] при температуре 4 °С и естественном освещении.

Для окрашивания формирующихся створок в культуральную среду добавляли прижизненный флуоресцентный краситель Lysotracker Yellow НСК-123 до концентрации 0,3 мкМ. Этот краситель включается в синтезируемую створку вместе с кремнеземом и светится зеленым светом. Клетки, выращенные в присутствии прижизненного красителя Lysotracker Yellow НСК-123, фиксировали 4 % параформальдегидом в течение 30 мин, после этого дважды отмывали фосфатным буфером и заключали в ProLong Gold на предметном стекле. Исследование препаратов проводили с помощью лазерного сканирующего микроскопа (ЛСМ) LSM 710 (Zeiss, Германия) с иммерсионным объективом Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27 (Zeiss, Германия). Флуоресценция красителя возбуждалась лазером с длиной волны 488 нм, эмиссия регистрировалась в диапазоне 496-647 нм.

Для исследования створок на разных стадиях морфогенеза клетки диатомей трижды инкубировали в 6 % SDS (Unger Fabrikker AS, Norway) по 0,5 часа на водяной бане (100 °С), отмывали 5 раз дистиллированной водой с осаждением клеток центрифугированием. Осадок в пробирках заливали концентрированной азотной кислотой (ООО Реактив, Россия) и инкубировали 1 час на водяной бане (95 °С). Сливали кислоту, осадок три раза отмывали этанолом с осаждением центрифугированием, заливали концентрированной соляной кислотой (ОАО Каустик, Россия) на сутки, затем осадок отмывали водой не менее 5 раз. Суспензии очищенных створок наносили на медные сетки с формваровой пленкой-подложкой.

Для исследования строения клеток с помощью трансмиссионной микроскопии (ТЭМ) подготовку проб и изготовление ультратонких срезов проводили, как описано ранее [11].

Исследование очищенных кислотами створок и ультратонких срезов клеток проводили на ТЭМ Leo 906E (Zeiss, Germany) при ускоряющем напряжении 80 kV. Микрофотографии получены камерой Mega View II Zeiss.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конфокальная микроскопия (рис. 1), показала, что цитоплазма в клетках исследованного вида прижата к клеточным стенкам, в каждой клетке имеется несколько небольших дисковидных хлоропластов. Окраска прижизненным красителем Lysotracker Yellow выявила, что в колониях из лабораторной культуры возрастом 4 недели, деление и морфогенез створки, а также синтез одного пояскового ободка, в течение 1 сут. происходит у половины клеток. Окраска позволила выявить аннулюс у створок на ранних стадиях морфогенеза.

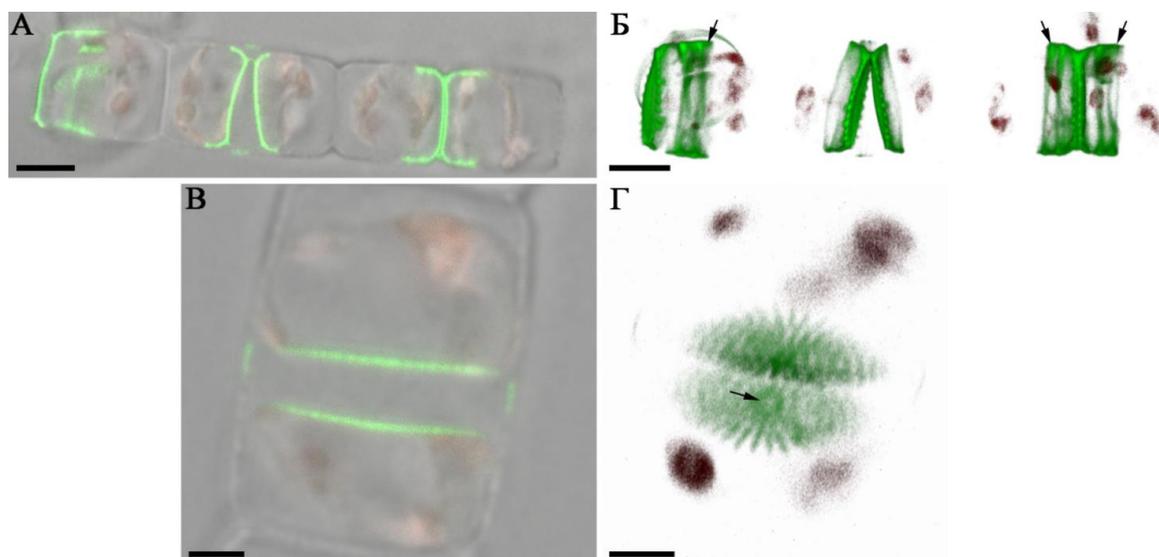


Рис. 1. Формирование створок и поясковых ободков в колониях *Stephanodiscus meyeri* (ЛСМ). А-Б – колония *S. meyeri* с уже сформированными створками и поясковыми ободками (стрелки); В-Г – створки сестринских клеток на ранней стадии морфогенеза, стрелкой показан аннулюс. Зеленая флуоресценция – окраска Lysotracker Yellow, красная – автофлуоресценция хлоропластов. Масштаб: А, Б – 4 мкм; В, Г – 2 мкм.

Просвечивающая электронная микроскопия ультратонких срезов выявила особенности в строении клетки исследуемого вида (рис. 2). Ядро в интерфазе может прилежать как к створке, так и к поясковым ободкам, что, по всей видимости, обусловлено его миграцией в течение клеточного цикла. Ядрышко одно, диктиосомы прижаты к ядру, в их сторону обращено большинство ядерных пор. Ядрышко одно, диктиосомы прижаты к ядру, в их сторону обращено большинство ядерных пор.

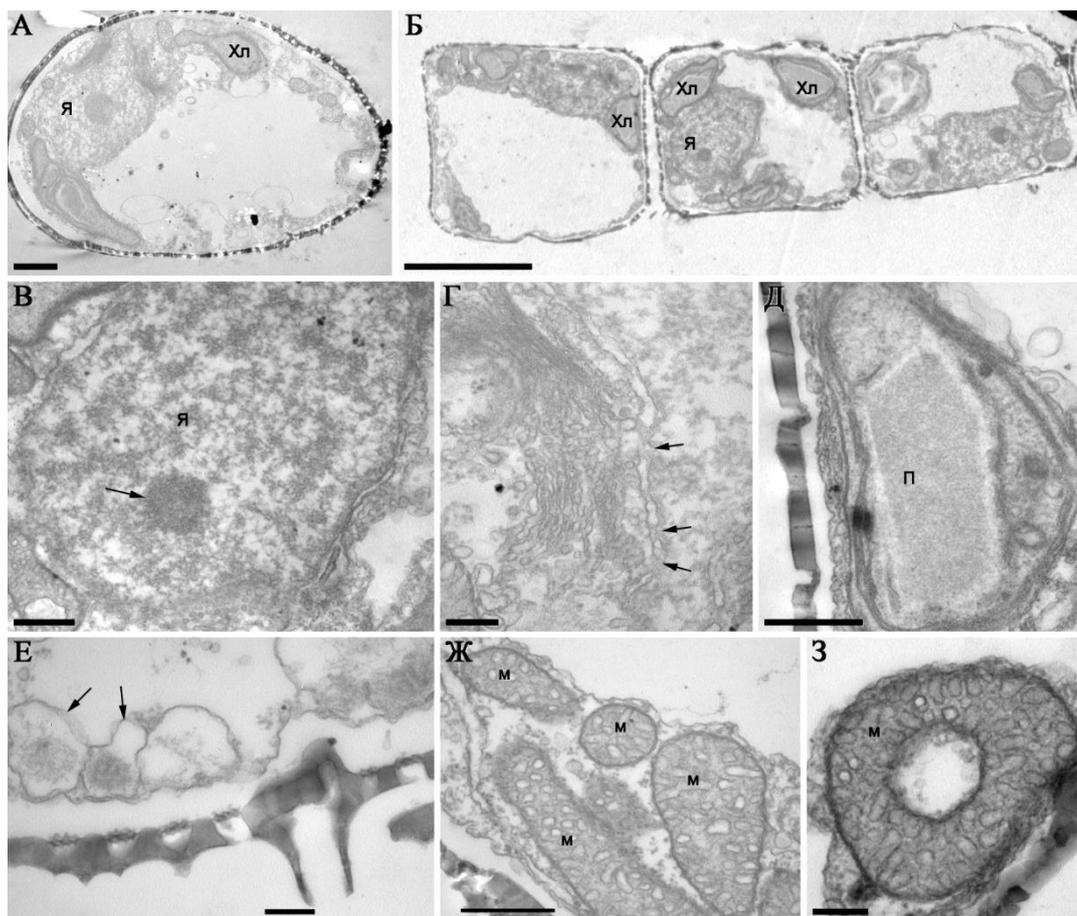


Рисунок 2. Строение клетки *Stephanodiscus meyeri* (ТЭМ)

А – поперечный срез клетки; Б – продольный срез через колонию; В – срез ядра, стрелкой показано ядрышко; Г – срез через диктиосомы, стрелками показаны ядерные поры; Д – хлоропласт; Е – везикулы (стрелки) с электронно-плотным содержимым рядом с краевым выростом с опорами; Ж – скопление митохондрий; З – одиночная митохондрия в виде кольца. Условные обозначения: м – митохондрия; П – пиреноид; Хл – хлоропласт; Я – ядро. Масштаб: А – 1 мкм; Б – 5 мкм; В, Д, Ж – 500 нм; Г, Е, З – 200 нм.

Несколько тилакоидов в хлоропластах организованы в две или три стопки и не образуют грани, как это характерно для всех диатомовых

водорослей [12], однако, связаны друг с другом анастомозами. Пиреноид крупный и занимает большую часть хлоропласта. Опоясывающая ламелла не выражена. Перипластидный ретикулум может быть обращен к плазмалемме и даже к ней прижат. На срезах хлоропластов встречались по 1-2 осмиофильные глобулы. Многочисленные митохондрии разнообразной формы прижаты к клеточной стенке, как и вся цитоплазма, некоторые на срезах имеют форму кольца. В районе краевых выростов с опорами видны везикулы с электронно-плотным содержимым, по форме и размеру, сходные с везикулами, описанными у некоторых пеннатных видов [13]. Общеизвестно, что такие везикулы путем экзоцитоза выделяют свое содержимое наружу клетки и, скорее всего, несут в себе слизь [7].

К настоящему моменту опубликованы результаты цитологических исследований другого доминирующего в весеннем фитопланктоне вида диатомей – *Aulacoseira baicalensis* (K. Meyer) Sim. [11, 14]. Это также вид с центрической симметрией панциря, и в строении клеток можно обнаружить несколько общих особенностей. Так, цитоплазма в клетках *A. baicalensis* также прижата к клеточной стенке, и в хлоропластах *Aulacoseira baicalensis* наблюдается образование большого количества анастомозов.

Исследования суспензий очищенных створок *S. meyeri* с помощью ТЭМ позволило выделить следующие стадии их морфогенеза:

1. формирование небольшого аннулюса, размер отверстия которого не превышает 1 мкм, и отходящих от него в радиальном направлении 12 ребер (рис. 3А);
2. морфогенез системы ареол, в результате которого количество ребер увеличивается до 27-35; одновременно с синтезом новых ребер начинается заполнение промежутков между ними кремнеземом, а незаполненные области превращаются в ареолы; в ходе этих событий кремнезем заполняет центральное отверстие

аннулюса; становится четко различимо отверстие центрального выроста с опорами (рис. 3Б);

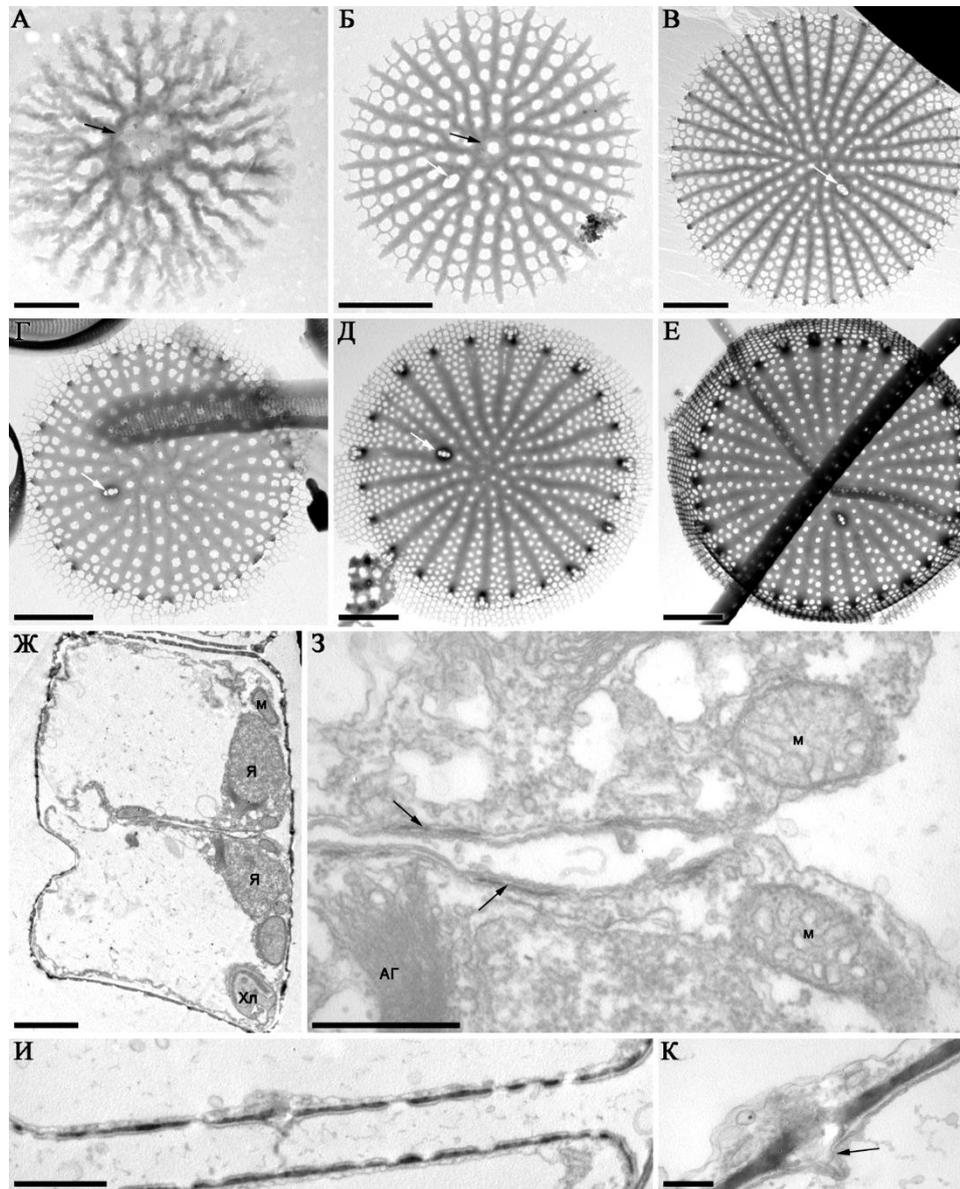


Рисунок 3. Стадий морфогенеза створки *Stephanodiscus meyeri* (ТЭМ)

А-Е – очищенные створки на разных стадиях морфогенеза, черными стрелками показан аннулюс, белыми стрелками – центральный вырост с опорами; Ж-К – ультратонкие срезы клеток: Ж – продольный срез сестринских клеток на ранней стадии формирования новых створок; З – увеличенный фрагмент рисунка 3Ж, черными стрелками показаны формирующиеся створки; И – продольный срез двух створок со сформированным загибом; К – увеличенный фрагмент рисунка 3И, стрелкой показан центральный вырост с опорами. Условные обозначения: АГ – аппарат Гольджи; м – митохондрия; Хл – хлоропласт; Я – ядро. Масштаб: А, И – 1 мкм; Б-Е, Ж – 2 мкм; З – 500 нм; К – 200 нм.

3. одновременно с началом формирования загиба створки на концах ребер закладываются шипы и двугубый вырост (рис. 3В);
4. под шипами на формируются краевые выросты, каждый из которых представляет собой трубочку, поддерживаемую тремя опорами (рис. 3Г);
5. одновременно с формированием краевых выростов с опорами образуется загиб створки в виде тонкой сеточки (рис. 3Г, Д).
6. морфогенез завершается образованием кривумов, очень тонких кремнистых перфорированных структур, в виде купола прикрывающих ареолы (рис. 3Е).

На срезах разделившихся клеток со створками, находящимися на одной из ранних стадий морфогенеза видно, что ядра в это время еще прижаты к поясковым ободкам (рис. 3Ж), а толщина стенки новой створки не превышает 10 нм (рис. 3З). Симметричное расположение митохондрий (рис. 3Ж-З) в сестринских клетках может свидетельствовать о том, что митохондрии, как и хлоропласты у некоторых видов [1], могут разделяться в процессе формирования борозды деления.

Для многих видов в результате исследований очищенных створок показано, что сначала происходит, так называемый, горизонтальный рост створки – строится ее общий план, и только после того, как образуется загиб створки, начинается ее утолщение, или вертикальный рост. На рисунках 3И-К видно, что образование трубки центрального выроста с опорами происходит после того, как загиб створки уже сформирован, несмотря на то, что отверстие этого выроста становится узнаваемым, когда происходит образование отверстий ареол. Это наблюдение соответствует стадиям дифференцировки структур на створке, выделенных ранее для другого вида центрических диатомей *Thalassiosita eccentrica* (Ehrenberg) Cleve [5].

Таким образом, в настоящей работе показаны основные особенности строения клеток у эндемичного байкальского вида *Stephanodiscus meyeri*, выявлено сходство с другими видами центрических диатомей. Охарактеризованы последовательные стадии морфогенеза створок. Ранняя дифференцировка определенных кремнеземных структур, являющихся видовыми признаками, и, следовательно, генетически детерминированных, подчеркивает важность выполняемых ими функций. Накопление знаний о морфогенезе створок у широкого круга видов с разной ультраструктурой будет способствовать пониманию картины эволюции диатомовых водорослей, а определение ключевых клеточных механизмов контроля морфогенезом обеспечит развитие биоинспирированных технологий.

Благодарности. Работа выполнена в рамках проекта ФАНО № 0345–2015–0031 «Клеточные и молекулярные механизмы морфогенеза диатомей» на приборах ЦКП «Электронная микроскопия» ОЦКП «Ультрамикроанализ» ЛИН СО РАН.

Литература:

1. Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. The diatoms. – Bristol, Cambridge University Press, 1992. – 747 pp.
2. Drum R.W., Pankratz S. Pyrenoids, raphes, and other fine structure in diatoms // Am. J. Bot. – 1964. – V. 51. – P. 401–418.
3. Reimann B. Deposition of silica inside a diatom cell // Exp. Cell Res. – 1964. – V. 34. – P. 605–608.
4. Mann D.G. An ontogenetic approach to diatom systematics // Proc. of the 7th Intern. Diatom Symp. / Mann D.G. (ed.). Koeltz, Koenigstein, Germany, 1984. – P. 113–144.
5. Schmid A.-M., Schulz D. Wall morphogenesis in diatoms: deposition of silica by cytoplasmic vesicles // Protoplasma. – 1979. – V. 100. – P. 267–288.

6. Schmid A.-M.M., Volcani B.E. Wall morphogenesis in *Coscinodiscus wailesii* Gran and Angst. I. Valve morphology and development of its architecture // J. Phycol. – 1983. – V. 19. – P. 387–402.
7. Pickett-Heaps J., Schmid A.-M., Edgar L. The cell biology of diatom valve formation // Progress in Phycological Research / Round F.E., Chapman D.J. (eds), Biopress, Bristol, 1990. – Vol 7. – P. 1–168.
8. Tanaka A., De Martino A., Amato A., Montsant A., Mathieu B., Rostang P., Tirichine L., Bowler C. Ultrastructure and membrane traffic during cell division in the marine pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* // Protist. – 2015. – V. 166. – P. 506–521.
9. Flori S., Jouneau P.H., Finazzi G., Marechal E., Falconet D. Ultrastructure of the periplastidial compartment of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* // Protist. – 2016. – V. 167. – P. 254–267.
10. Thompson A.S., Rhodes J.C., Pettman I. Culture collection of algae and protozoa: Catalogue of strains. – Kendal, Titus Wilson and Son, Cumbria, U.K., 1988. – 164 pp.
11. Bedoshvili Ye.D., Likhoshvay Ye.V. The cell ultrastructure of diatoms – implications for phylogeny? // The Transmission Electron Microscope / Khan Maaz (ed.). – InTech, Croatia, 2012. – P. 147–160.
12. Schmid A.-M. M. Value of pyrenoids in the systematics of the diatoms: their morphology and ultrastructure // Proc. of the 16th Intern. Diatom Symp. – Amvrosiou Press, Athens, 2001. – P. 1–32.
13. Edgar L.A., Pickett-Heaps J.D. The mechanism of diatom locomotion. I. An ultrastructural study of the motility apparatus // Proc. R. Soc. Lond. – 1983. – V. 218. P. 331–343.
14. Бедошвили Е.Д., Попкова Т.П., Лихошвай Е.В. Ультраструктура хлоропластов нескольких видов диатомовых водорослей из разных классов // Цитология. – 2009. – Т. 51. – С. 346–357.