

## МИТОЗ СВОБОДНОЖИВУЩЕГО ЖГУТИКОНОСЦА *BODO SALTANS* ШТАММ PS+ (KINETOPLASTIDEA, BODONIDA)

© М. Н. Малышева,<sup>1</sup> М. С. Карпова,<sup>2</sup> А. О. Фролов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, и

<sup>2</sup> Кафедра цитологии биологического факультета С.-Петербургского государственного университета;  
электронный адрес: *frolal@online.ru*

Изучен митоз у свободноживущих жгутиконосцев *Bodo saltans* из штамма Ps+, характеризующегося наличием прокариотных цитобионтов в перинуклеарном пространстве. Деление ядра *B. saltans* Ps+ проходит по типу закрытого внутриядерного митоза, без конденсации хромосом. На начальных этапах деления в ядре последовательно закладываются два пространственно разобщенных микротрубочковых веретена. Первым формируется веретено, насчитывающее около 20 микротрубочек, затем под углом 30—40° к нему закладывается второе веретено, содержащее вдвое меньше микротрубочек. С микротрубочками первого веретена ассоциированы четыре пары кинетохоров, с микротрубочками второго — две пары. Кинетохоры *B. saltans* Ps+ имеют выраженную слоистую структуру. Оба веретена своими концами упираются во внутреннюю мембрану ядерной оболочки, формируя 4 хорошо выраженных полюса. Экваториальной фазы митоза у *B. saltans* Ps+ не выявлено. Расхождение сестринских кинетохоров к полюсам происходит независимо в каждом из веретен. В фазе удлинения полюсы обоих веретен, смещаясь, объединяются попарно, формируя единую биполярную структуру, состоящую из двух рыхлых пучков микротрубочек. На этом этапе ядерного деления кинетохоры достигают полюсов субверетен и перестают выявляться. На последующих этапах деления ядро постепенно принимает гантелевидную форму. В фазе реорганизации дочерние ядра обособляются. В перинуклеарном пространстве интерфазных ядер *B. saltans* Ps+ присутствуют 1—2 прокариотных цитобиона. В процессе митоза эти организмы интенсивно делятся, при этом их число может достигать более 20 на ядро. При обособлении дочерних ядер «лишние» цитобионты выводятся в цитоплазму в вакуоли, формирующими за счет наружной мембранны ядерной оболочки.

**Ключевые слова:** Kinetoplastidea, Bodonida, *Bodo saltans*, ультраструктура, ядро, митоз, прокариотные цитобионты.

Кинетопластиды широко распространены в природе (Vickerman, 1976). Наиболее известны среди них облигатно паразитические жгутиконосцы трипаносоматиды (отряд Trypanosomatida), многие из которых являются возбудителями опасных заболеваний человека, животных и растений. Ближайшие родственники трипаносоматид бодониды (отряд Bodonida) обитают в морских и пресных водах, а также в почве. По сравнению с трипаносоматидами эти жгутиконосцы изучены гораздо хуже (Heyden et al., 2004). Это касается самых разных аспектов их биологии, в том числе ядерных циклов. В настоящее время митоз изучен только у трех представителей этой группы: у свободноживущих *Bodo curvifilus* и *Dinastigella mimosa* (Frolov et al., 1996; Frolov, Skarlato, 1998) и кровепаразита рыб *Cryptobia* (= *Trypanoplasma*) *borreli* (Skarlato, Lom, 1997). Напротив, митозу трипаносоматид посвящена обширная литература (Bianchi et al., 1969; Vickerman, Preston, 1970, 1976; De Souza, Meyer, 1974; Heywood, Weinman, 1978; Croft, 1979; Solari, 1980a, 1980b, 1982, 1983; Solari, De Souza, 1983; Paterson, Woo, 1984; Triemer et al., 1986; Urena, 1986; Skarlato et al., 1987; Скарлато и др., 1990; Frolov, Karpov, 1995). Митоз в той или иной степени полно исследован у представителей 8 из 10 их родов. У всех изученных кинетопластид

митоз протекает без видимой конденсации хромосом. Это делает невозможным выделение в их ядерных циклах классических фаз митоза — профазы, метафазы, анафазы и телофазы, каждая из которых характеризуется определенным состоянием хромосомного аппарата. Поэтому в литературе, посвященной изучению митоза трипаносоматид, на протяжении уже длительного времени с переменным успехом применяется специальная терминология. Солари (Solari, 1980a, 1983) первым предложил выделять в митозе трипаносоматид 4 фазы — предварительную, экваториальную, фазу удлинения ядра и фазу его реорганизации. В основу этой классификации были положены признаки, характеризующие основные этапы деления ядра трипаносом: состояние хроматина (конденсированный/деконденсированный); особенности локализации кинетохороподобных структур, ассоциированных с митотическим веретеном; изменение формы ядра. Позднее эта классификация с определенными оговорками была использована и при описании митоза у бодонид (Skarlato, Lom, 1997; Frolov, Skarlato, 1998).

*B. saltans* — один из наиболее распространенных в природе видов свободноживущих кинетопластид (Vickerman, 1976; Zhukov, 1991). Благодаря характерной морфологии (наличию мастигонем на переднем жгутике)

и уникальному поведению (периодическому прикреплению к субстрату кончиком заднего жгутика). *B. saltans* до недавнего времени считался одним из немногих «надежных» и легко определяемых видов бодонид (Жуков, 1993; Фролов, 2000). Однако молекулярно-биологические исследования последних лет показали крайнюю генетическую неоднородность разных штаммов *B. saltans* (Callahan et al., 2002; Heyden et al., 2004), что привело некоторых исследователей к выводу о возможности выделения этих штаммов со временем в самостоятельные виды (Heyden et al., 2004).

Морфология отдельных штаммов *B. saltans* исследована довольно подробно. Показано, в частности, что штаммы могут различаться по видовому составу и особенностям локализации прокариотных эндобионтов в хозяине (Brooker, 1971; Карпов, Жуков, 1983), что, впрочем, не отражается на общей организации клеток *B. saltans*. Так же как у большинства других бодонид, ядерный цикл жгутиконосцев *B. saltans* до сих пор не был изучен. В настоящей работе исследован митоз у жгутиконосцев из штамма *B. saltans* Ps+ (=*Pleuromonas jaculans* Perty sensu Карпов, Жуков, 1983), характеризующегося наличием прокариотных симбионтов в перинуклеарном пространстве ядерной оболочки (Карпов, Жуков, 1983).

## Материал и методика

Культура жгутиконосцев *B. saltans* Ps+ была получена из Института биологии внутренних вод РАН от д. б. н. А. П. Мыльникова. Происхождение штамма *B. saltans* Ps+ описано ранее (Карпов, Жуков, 1983). Бодонид культивировали на «злаковой» среде (*cerophyl medium*) с добавлением культуры *Klebsiella aerogenes* (см.: Фролов и др., 1997б).

Для получения синхронно делящихся клеток *B. saltans* Ps+ насыщенную культуру жгутиконосцев в течение 5 сут выдерживали при комнатной температуре. Затем клетки осаждали центрифугированием, а надосадочную жидкость заменяли на свежую среду. После этого жгутиконосцы практически синхронно начинали делиться.

Для исследований в трансмиссионном электронном микроскопе клетки *B. saltans* Ps+ осаждали центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин), после чего фиксировали холодной смесью, содержащей 1.5 % глутаральдегида и 1.5 % OsO<sub>4</sub> в 0.1 М какодилатном буфере (pH 7.2), в течение 30 мин. Затем материал постфиксировали в 2%-ном растворе OsO<sub>4</sub> в 0.1 М какодилатном буфере (pH 7.2) 1 ч. После обезвоживания в серии растворов этанола возрастающей концентрации и в пропиленоксиде материал заключали в смесь Араплита с Эпоном. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме LKB-III, контрастировали водным раствором уранил-ацетата (1 ч) и цитратом свинца (5 мин). Срезы изучали в электронном микроскопе JEM-100 C. Для графической компьютерной реконструкции негативы, полученные с помощью электронного микроскопа, сканировали ручным сканером Primax Hand Scanner 256, графическую реконструкцию выполняли в графическом редакторе Corel Xara 1.5 фирмы Xara Ltd.

## Результаты

Ультраструктура клеток *B. saltans* Ps+. Жгутиконосцы имеют характерную бобовидную форму тела (рис. 1, а). Их покровы сформированы за счет плазмалеммы, которую на апикальном конце клетки подстилают две ленты субмембранных микротрубочек — дорсальная и вентральная (рис. 1, а; 4, б—е). На переднем конце тела бодонид располагаются входные отверстия жгутикового кармана и цитостома. Они разграничены хорошо развитым клювовидным рострумом, загнутым на брюшную сторону жгутиконосца (рис. 1, а). От дна жгутикового кармана *B. saltans* Ps+ отходят два жгутика. Передний жгутик несет мастигонемы (рис. 1, а), поверхность направленного назад рекуррентного жгутика гладкая. Основания кинетосом обоих жгутиков расположены у апикальной поверхности массивного булавовидного митохондриона, расширенная часть которого представляет собой капсулу кинетопласта (рис. 1, а; 4, д, е). Митохондрион залегает под дорсальной поверхностью тела

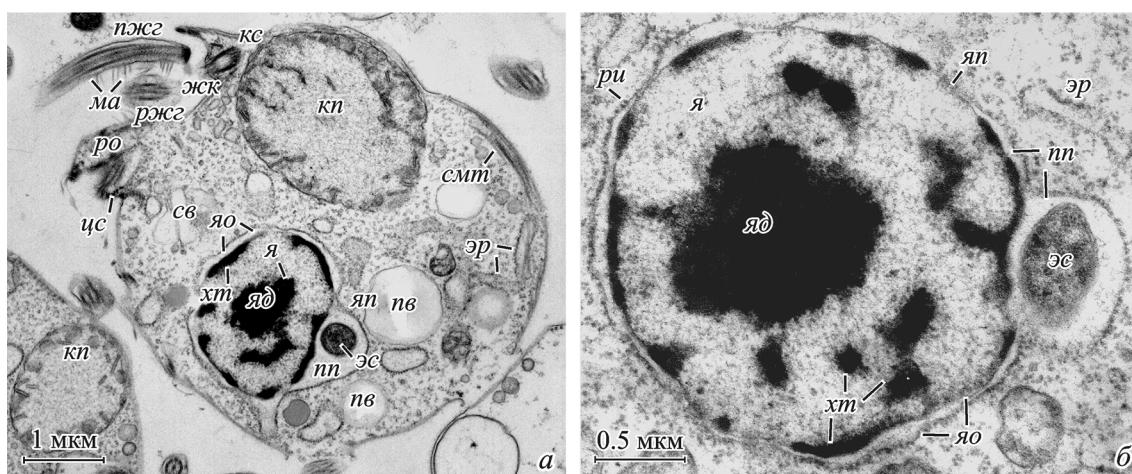


Рис. 1. Ультратонкая организация жгутиконосца *Bodo saltans*.

а — общий вид жгутиконосца; б — строение интерфазного ядра. жк — жгутиковый карман, кп — кинетопласт, кс — кинетосома, ма — мастигонемы, нв — пищеварительная вакуоль, пжс — передний жгутик, нп — перинуклеарное пространство, ржс — рекуррентный жгутик, ри — рибосомы, ро — рострум, смт — субмембранные микротрубочки, хт — хроматин, цс — цитостом, эр — эндоплазматический ретикулум, эс — прокариотный цитобионт, я — ядро, яд — ядрышко, яо — ядерная оболочка, яп — ядерная пора.

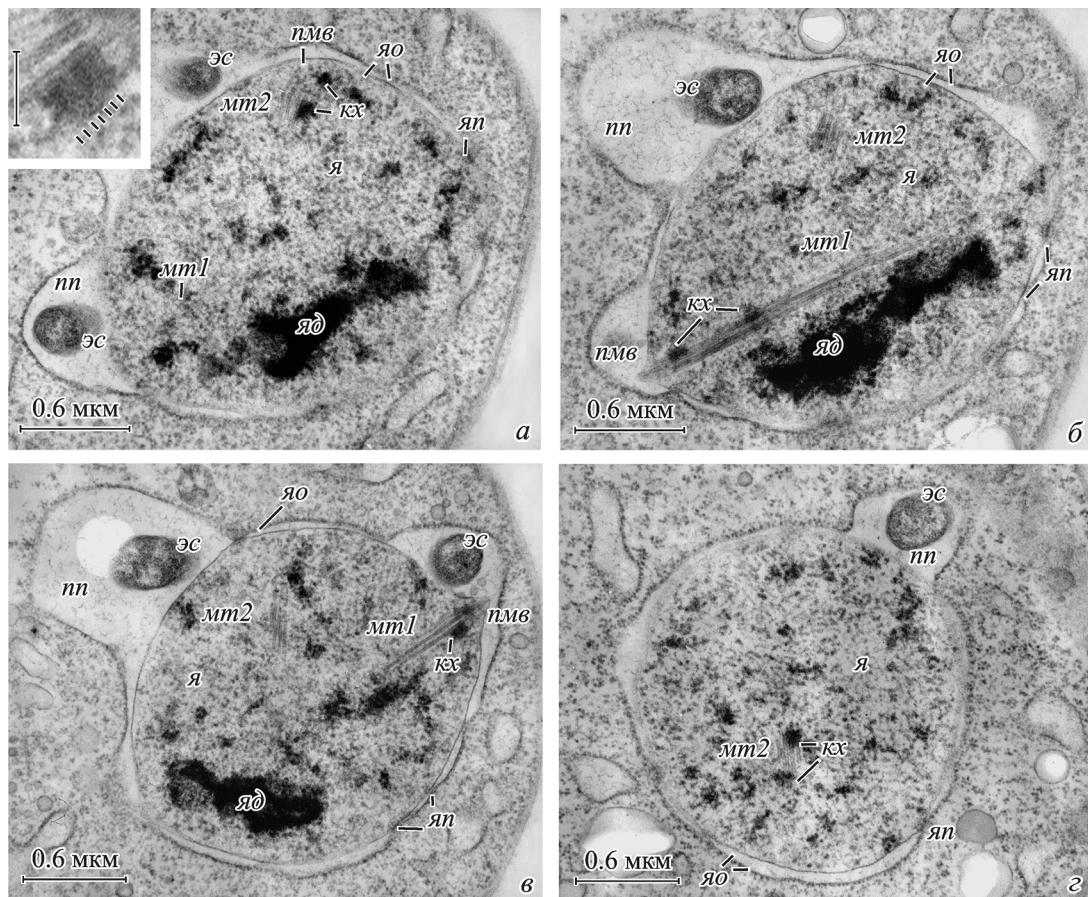


Рис. 2. Митотическое деление ядра *Bodo saltans* на этапе формирования двух веретен.

*a—e*—4 ультратонких среза из 7 последовательных срезов (серии срезов), а именно срезы 1, 3, 6 и 7 соответственно. кх—кинетохор, *mt1*—микротрубочки первого митотического веретена, *mt2*—микротрубочки второго митотического веретена, *пмв*—полюс митотического веретена. На вставке показана слоистая структура кинетохора. Масштабная линейка на вставке — 100 нм. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

жгутиконосца (рис. 4, б). В пространстве, ограниченном дном жгутикового кармана, кинетопластом и ядром, располагаются сократительная вакуоль с системой приводящих каналов (рис. 1, а) и аппарат Гольджи (на рис. 1 не показан). В цитоплазме клетки преобладают цистерны эндоплазматического ретикулума, пищеварительные ва-

куоли, везикулы и включения различной природы (рис. 1, а, б; 4, б—е; 7, б, в).

Интерфазное ядро *B. saltans* Ps+. Ядро находится в средней части тела жгутиконосца и имеет сферическую или слегка эллипсоидную форму (рис. 1, а, б). Диаметр ядра не превышает 2.0—2.5 мкм. Ядерная оболочка состоит из двух мембран, разделенных перинуклеарным пространством. Она несет на поверхности, обращенной к цитоплазме, множество рибосом и пронизана ядерными порами, наружный диаметр которых составляет около 100 нм, а внутренний — около 80 нм (рис. 1, а, б). Кариоплазма выглядит относительно гетерогенной. Кроме отдельных глыбок хроматина она содержит тонкие фибриллы диаметром около 9 нм. Крупное компактное ядрышко обычно расположено почти в центре ядра. Основная масса конденсированного хроматина располагается под ядерной оболочкой в виде электронно-плотных тяжей (рис. 1, а, б). У всех исследованных нами жгутиконосцев из штамма *B. saltans* Ps+ в перинуклеарном пространстве ядерной оболочки были обнаружены прокариотные палочковидные цитобионты (рис. 1, а, б; 2, а—г; 4, а—е; 5, б—г; 7, а, в). Клетки бактерий окружены двумя мембранами и заполнены плотным гетерогенным матриксом. Длина цитобионтов варьирует от 1.0 до 1.5 мкм, ширина — от 0.3 до 0.5 мкм. Как правило, интерфазное ядро содержит пару таких организмов, расположенных друг против друга, по обе стороны от ядра.

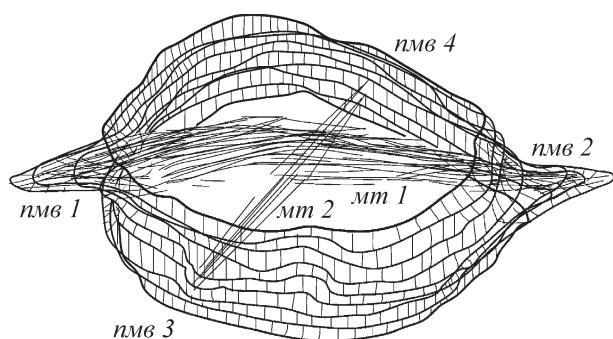


Рис. 3. Графическая трехмерная реконструкция ядра *Bodo saltans* на этапе двух разноориентированных веретен, выполненная по 11 серийным срезам (на рис. 2 представлены 4 среза из этой серии).

Контуры двух срезов, элементы ядрышка и профили наружной мембранны ядерной оболочки и кинетохоров (не показаны). Обозначения те же, что и на рис. 2.

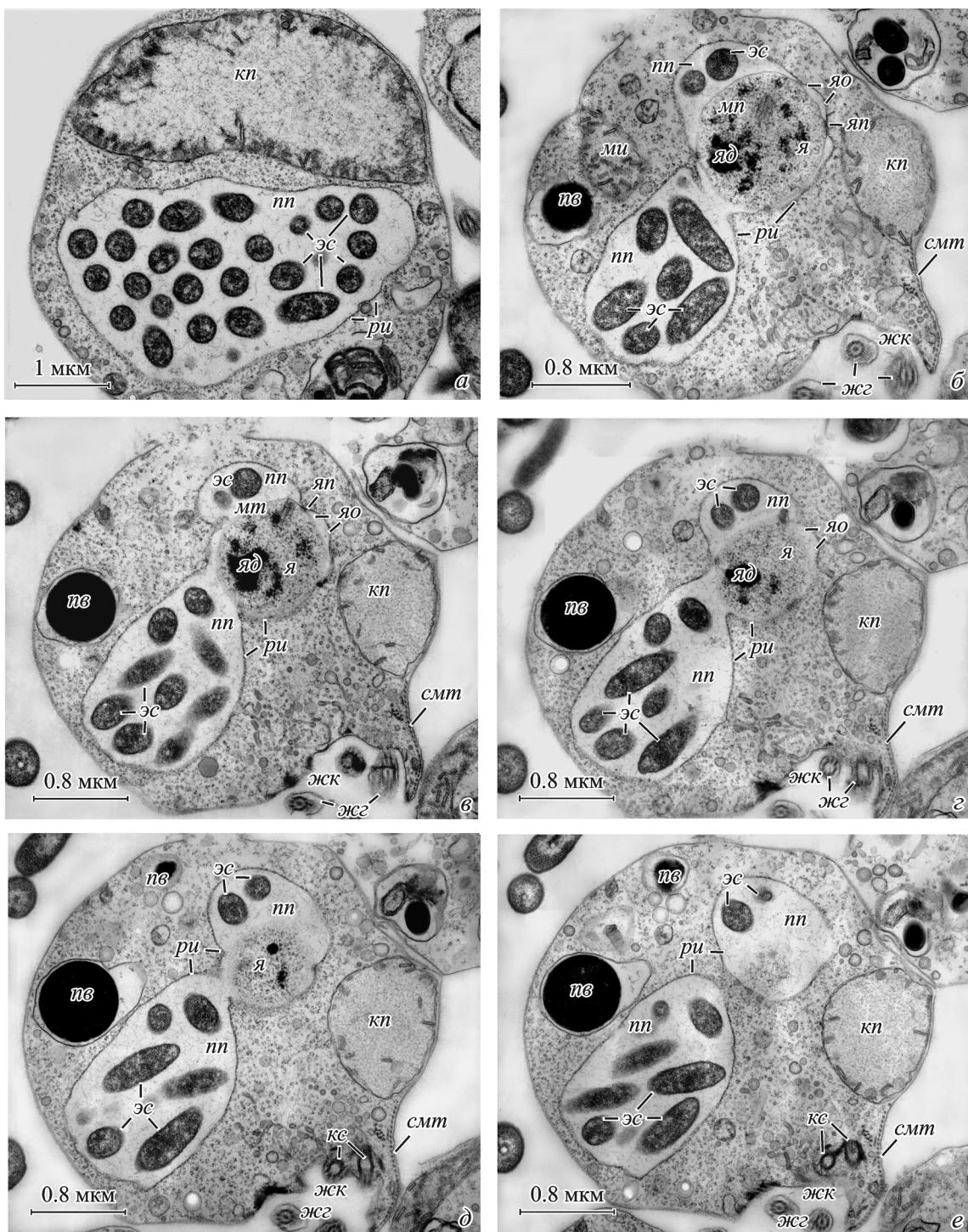


Рис. 4. Прокариотные цитобионты в перинуклеарном пространстве ядерной оболочки *Bodo saltans*.

*a* — вакуоль, образовавшаяся в результате выпячивания в цитоплазму наружной мембрany ядерной оболочки и содержащая цитобионтов; *б—е* — формирование вакуоли с цитобионтами, представлены 5 срезов из 7 последовательных срезов (серии срезов), а именно срезы 1—4 и 7 соответственно. *жс* — жгутик, *ми* — митохондрия, *мт* — микротрубочки митотического веретена. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1—3.

Митотическое деление ядер у жгутиконосцев *B. saltans* Ps+. Предварительной фазы у жгутиконосцев *B. saltans* Ps+ не обнаружено. Во всех случаях (просмотрено более 50 митотических ядер), когда наблюдали ядра этих бодонид, лишенные конденсированного хроматина, в них всегда присутствовали микротрубочки митотических веретен, ассоциированные с кинетохорами. У этих жгутиконосцев в отличие от боль-

шинства изученных до сих пор видов кинетопластид уже на ранних этапах деления обнаруживается не одно, а два пространственно разобщенных биполярных микротрубочковых веретена (рис. 2, *а—г*; 3), которые к тому же закладываются в разное время.

Первым в кариоплазме приступившего к делению ядра обнаруживается веретено из 20 микротрубочек, с которыми ассоциированы 4 пары кинетохоров. Кинето-

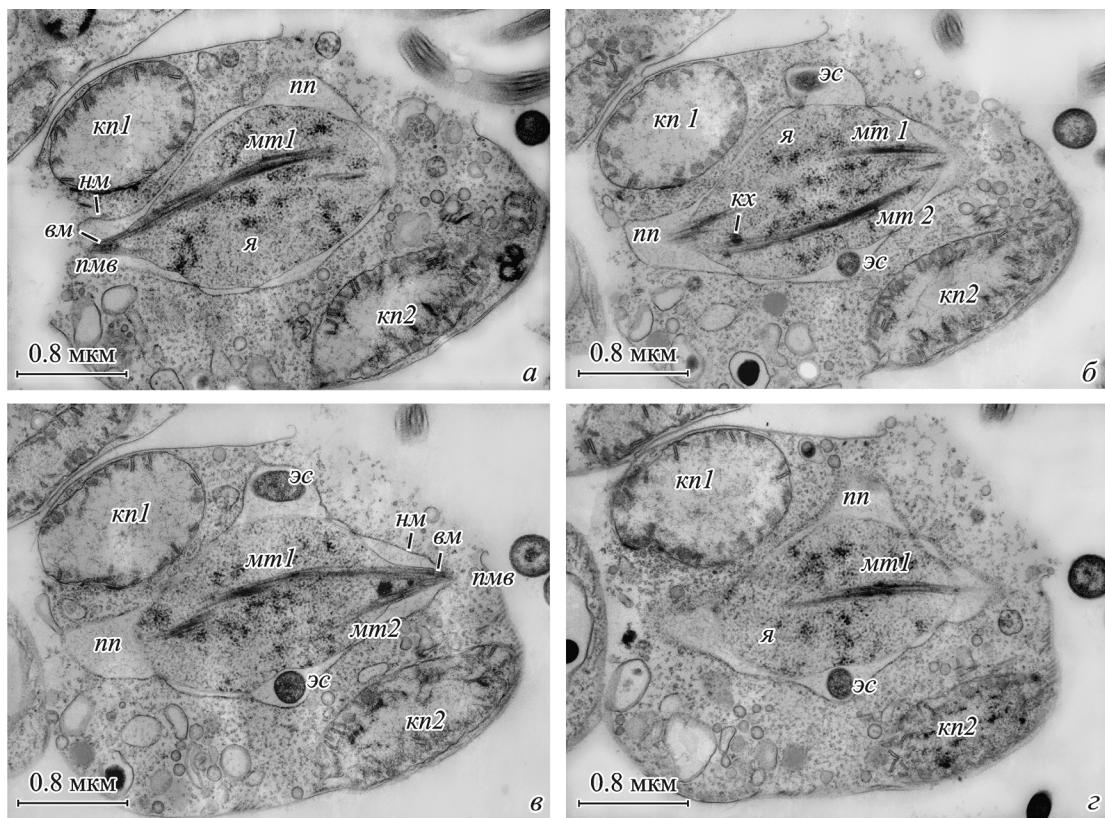


Рис. 5. Фаза удлинения ядра при митозе у *Bodo saltans*.

*a—e*—4 ультратонких среза из 7 последовательных срезов (серии срезов), а именно срезы 3, 5, 7 и 9 соответственно. *вм*—внутренняя ядерная мембрана, *kn1* и *kn2*—дочерние кинетопласти, *нм*—наружная ядерная мембрана. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1—4.

хоры *B. saltans* Ps+ имеют хорошо выраженную слоистую структуру (рис. 2, вставка). В каждом сдвоенном кинетохоре можно различить до 7 чередующихся слоев различной электронной плотности, которые расположены перпендикулярно по отношению к микротрубочкам веретена. Первое веретено проходит практически через центр ядра, упираясь обоими концами в ядерную оболочку, и формирует 2 морфологически выраженных полюса (рис. 2, б, в). Позднее в кариоплазме обнаруживается второе микротрубочковое веретено (рис. 2, а—г). Оно закладывается под углом 30—40° к первому и содержит около 10 микротрубочек. Это веретено также занимает трансполярное положение (рис. 2, а), формируя еще два полюса. Таким образом, ядро *B. saltans* Ps+ на данном этапе деления имеет уникальную квадрипольярную организацию (рис. 3). С микротрубочками второго веретена связаны 2 пары кинетохоров (рис. 2, а, г). Типичная экваториальная фаза митоза у жгутиконосцев *B. saltans* Ps+, таким образом, отсутствует. В каждом из веретен кинетохоры расходятся к полюсам независимо друг от друга: сначала расходятся 4 пары кинетохоров первого (более массивного) веретена, затем 2 пары второго. На сериях поперечных срезов обоих веретен число профилей микротрубочек последовательно возрастает по направлению от конца веретена к его середине от 2 в посткинетохорной области до 4—6 в его центральной области. С каждым кинетохором обычно ассоциированы 3 микротрубочки. Основная масса фрагментированного ядрышкового материала располагается вдоль микротрубочек первого веретена (рис. 2, а—г).

В цитоплазме делящихся клеток *B. saltans* Ps+ можно наблюдать гигантские вакуоли, заполненные прокариотными организмами. На цитоплазматической поверхности мембранны, ограничивающей такую вакуоль, расположены многочисленные рибосомы (рис. 4, а). Количество бактериальных клеток в вакуолях может достигать более 20 (рис. 4, а). Морфологически эти организмы неотличимы от цитобионтов, населяющих перинуклеарное пространство интерфазного ядра *B. saltans* Ps+ (ср. рис. 4, а и 1, а, б). На сериях срезов видно, что такие вакуоли формируются за счет выпячивания наружной мембранны ядерной оболочки жгутиконосцев (рис. 4, б—е). Во время деления клеток *B. saltans* Ps+ цитобионты, локализованные в перинуклеарном пространстве их ядер, интенсивно размножаются. При этом наружная мембрана ядерной оболочки деформируется, формируя своеобразный мешковидный «карман», который вдается в цитоплазму клетки и заполнен бактериями (рис. 4, б—е).

Последующие преобразования делящегося ядра *B. saltans* Ps+ могут быть отнесены к фазе его удлинения. Однако протекают они также по особому сценарию. Оба микротрубочковых веретена, до сих пор залегавшие под углом 30—40° друг к другу, меняют пространственную ориентацию, формируя единую биполярную структуру (рис. 5, а—г; 6). Ядро принимает форму лимона с необычно сильно выраженным полюсами митотического веретена, которое теперь состоит из 2 субверетен (рис. 6). Оболочка ядра при этом остается интактной (рис. 5, а, в). На полюсах веретена каких-либо дополнительных структур не выявляется. В фазе удлинения ядра кинетохоры,

достигшие его соответствующих полюсов (рис. 5, б; 7, а), перестают выявляться. Ядро постепенно вытягивается в длину, а в его экваториальной части становится заметным поперечный перехват (рис. 7, а). В дальнейшем ядро принимает гантелеобразную форму. Дочерние ядра некоторое время еще соединяются тонким каналом, внутри которого проходят остаточные микротрубочки веретена (рис. 7, б). На этом этапе митоза в кариоплазме формирующихся дочерних ядер начинают появляться отдельные массивы хроматина, которые сначала располагаются довольно хаотично, а позднее перемещаются к ядерной оболочке, сохраняющей по-прежнему целостность (рис. 7, б). В это время гигантская вакуоль, заполненная цитобионтами, отшнуровывается от ядерной оболочки одного из дочерних ядер в цитоплазму (рис. 7, в). В перинуклеарном пространстве дочерних ядер остается по паре цитобионтов. Дальнейшая судьба вакуолей, содержащих «лишних» цитобионтов, неясна. Вскоре после завершения деления в дочерних клетках они уже не выявляются.

В фазе реорганизации ядра тонкий канал, связывающий дочерние ядра, исчезает, и они окончательно обособляются (рис. 7, в). В обоих ядрах формируется слой пристеночного хроматина, а хорошо оформленное, компактное ядрышко занимает центральную позицию (рис. 7, в). Вскоре после расхождения ядер завершается и собственно цитокинез.

## Обсуждение

Необычный характер митотического деления ядер трипаносоматид отмечался многими авторами, изучавшими митоз у представителей различных групп низших эукариот (Pickett-Heaps, 1974, 1986; Kubai, 1975; Heath, 1980; Raikov, 1982, 1994). После получения первых данных о митозе бодонид (Skarlatto, 1987; Frolov et al., 1996; Skarlatto, Lom, 1997; Frolov, Skarlatto, 1998) стало возможным говорить об особой форме митоза у кинетопластид в целом (Frolov, Skarlatto, 1998; Фролов, 2000).

Можно выделить следующие характерные признаки митоза кинетопластид.

1. На ранних этапах митоза в ядрах кинетопластид хроматин полностью деконденсируется.
2. Ни на одном из этапов митоза кинетопластид хромосомы морфологическими методами не выявляются.
3. Митотическое веретено (или веретено) располагается внутри ядра.
4. ЦОМТы митотического веретена морфологическими методами не выявляются.

5. В процессе деления ядра кинетопластид к противоположным полюсам расходятся «пустые» кинетохоры, ассоциированные с микротрубочками веретена.

6. Оболочка ядра кинетопластид остается интактной на протяжении всего процесса деления.

Картина митоза *B. saltans* Ps+ в целом укладывается в обобщенную схему деления ядер кинетопластид. Митоз протекает по типу закрытого внутриядерного митоза, не сопровождающегося конденсацией хромосом. Однако наряду с этим имеется и целый ряд особенностей, определяющих индивидуальность митоза *B. saltans* Ps+. В отличие от большинства других кинетопластид у этих бодонид в процессе деления ядра формируется не одно, а два микротрубочных веретена. Анализ пространственной организации митотических веретен изученных ранее

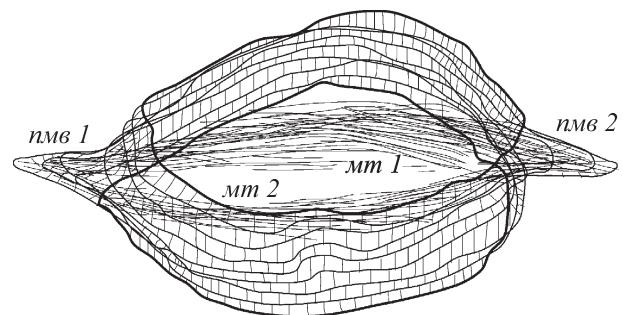


Рис. 6. Графическая трехмерная реконструкция ядра *Bodo saltans* в фазе его удлинения, выполненная по 11 серийным срезам (на рис. 5 представлены 4 среза из этой серии).

Контуры двух срезов, элементы ядрышка и профиль наружной ядерной мембранны (не показаны). Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

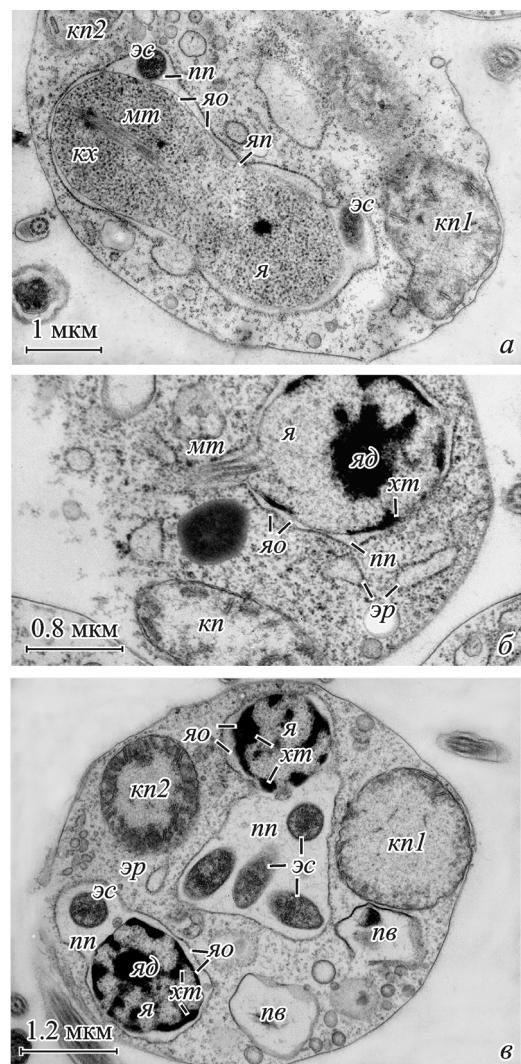


Рис. 7. Поздние этапы митотического деления ядра *Bodo saltans*.

а, б — фаза удлинения ядра; в — виден узкий канал с микротрубочками (мм), соединяющий дочерние ядра; в — фаза реорганизации ядра. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1—5.

кинетопластид показывает, что у большинства из них в митозе формируется одно компактное трансполярное веретено. Такого типа веретена обнаружены, например, в делящихся ядрах трипаносоматид *Leishmania* s. p. p., *Endotrypanum monteroegei* и *Phytomonas* sp. и бодониды *Bodo curvifilus* (Urena, 1986; Frolov et al., 1996; Фролов и др., 1997а). Несколько иной тип веретен формируется в ядрах *Trypanosoma* и паразитических *Cryptobia* (Solari, 1980а; Skarlato et al., 1987; Skarlato, Lom, 1997). У этих трипаносоматид веретена получили название «рыхлых» (Frolov, Karpov, 1995). У *B. saltans* Ps+ веретено также bipolarное, однако оно формируется из нескольких пучков микротрубочек, которые соединяются в единое веретено только вблизи полюсов. В обоих случаях микротрубочки веретен простираются между полюсами ядра, контактируя с внутренней мембраной ядерной оболочки (Solari, 1980а). У кинетопластиды *Dimastigella mimosa* было описано формирование в митотических ядрах 6 независимых микротрубковых веретен, залегающих под произвольным углом друг к другу (Frolov, Skarlato, 1998). Однако ни на одном из этапов деления ядра веретена *D. mimosa* не контактируют с ядерной оболочкой, а находятся в кариоплазме в «подвешенном» состоянии. Таким образом, по способу формирования и организации митотического веретена *B. saltans* Ps+ занимает промежуточное положение между *D. mimosa*, обладающей мультиверетенным митотическим аппаратом, и трипаносомами и криптобиями с их «рыхлыми» митотическими веретенами. С *D. mimosa* жгутиконосцев *B. saltans* Ps+ сближает независимая закладка пространственно разобщенных митотических веретен на ранних этапах ядерного деления, а с трипаносомами и криптобиями — формирование единого трансполярного комплекса субверетен на поздних этапах митоза.

Несколько митотических веретен формируется также у близких родственников кинетопластид — эвгленовых жгутиконосцев (Triemer, Farmer, 1991). Веретена в ядрах эвгленовых занимают трансполярное положение, контактируя с ядерной оболочкой, и сохраняют индивидуальность вплоть до своего исчезновения. Однако в ходе митоза у эвгленовых происходит распределение между дочерними ядрами конденсированных хромосом, которые у них конденсированы и в интерфазе (Triemer, Farmer, 1991).

У *B. saltans* Ps+, так же как и у других кинетопластид, с микротрубочками веретена морфологически связаны плотные структуры с выраженной слоистой организацией. Солари детально исследовал аналогичные «плотные бляшки» (dense plaques) в митотических ядрах *Trypanosoma cruzi* (Solari, 1980а, 1980b; Solari et al., 1985). Морфологическими и цитохимическими методами он доказал, что эти структуры соответствуют кинетохорам других эукариот. Однако в отличие от большинства исследованных кинетопластид у *B. saltans* Ps+ кинетохоры никогда не выявляются в центре веретен, а располагаются на расстоянии 150—200 нм от их полюсов. Ранее подобный феномен был обнаружен у *D. mimosa* (Frolov, Skarlato, 1998). Наиболее вероятное объяснение этому факту — сегрегация кинетохоров путем интеркалярного роста микротрубочек веретена. По понятным причинам при таком механизме расхождения кинетохоров и наличии нескольких пространственно разобщенных митотических веретен характерная для большинства изученных кинетопластид экваториальная фаза митоза, практически соответствующая классической ме-

тафазе эукариот (Solari, 1980а), у *B. saltans* Ps+, как и у *D. mimosa* (Frolov, Skarlato, 1998), отсутствует.

Общее число микротрубочек в митотическом аппарате *B. saltans* Ps+ варьирует от 30 до 36. Это обычное значение для кинетопластид, причем такое количество микротрубочек имеют и свободноживущие бодониды *Bodo curvifilus*, и многие паразитические трипаносоматиды, такие как фитомонасы, эндотрипанум, и некоторые трипаносомы (Vickerman, Preston, 1970, 1976; Skarlato et al., 1987; Frolov, Karpov, 1995; Frolov et al., 1996). Несколько больше микротрубочек обнаружено в митотических веретенах делящихся ядер лейшманий — около 60 (Urena, 1986). А самые мощные веретена формируются в ядрах *T. cruzi* и *Cryptobia borreli*. У этих жгутиконосцев число микротрубочек может достигать 120 (Solari, 1980а; Skarlato, Lom, 1997). Однако в обширной группе трипаносоматид — гомоксенных паразитов насекомых — у представителей таких родов, как *Leptomonas*, *Crithidia*, *Wallaceina* и *Blastocritidida*, число микротрубочек в митотических веретенах не превышает обычно 20—30, а у некоторых видов в веретене насчитывается всего 16 микротрубочек (Solari, 1983; Скарлато и др., 1990; Frolov, Karpov, 1995).

Следует подчеркнуть, что число кинетохоров у кинетопластид не коррелирует с числом микротрубочек веретена. Так например, по 10 кинетохоров получают дочерние ядра *T. cruzi* и *B. curvifilus*, максимальное количество микротрубочек в веретенах которых равно 120 и 30 соответственно (Solari, 1980а; Frolov et al., 1996). К полюсам делящихся ядер изученных видов лейшманий и *B. saltans* Ps+ расходятся по 6 кинетохорам, однако веретена первых содержат около 60 микротрубочек (Urena, 1986), а у *B. saltans* Ps+ их насчитывается не более 36. В то же время у представителей рода *Phytomonas* с веретеном, объединяющим 30 микротрубочек, ассоциирована только 4 кинетохора (Фролов и др., 1997а).

К сожалению, эти морфологические признаки не могут быть использованы для характеристики генома кинетопластид. Число кинетохоров у этих простейших не отражает ни полидности, ни собственно числа хромосом. Об этом свидетельствуют, в частности, результаты сравнения у некоторых из видов количества кинетохоров, выявляемых морфологическими методами, с числом интактных молекул ДНК, регистрируемых, например, методом пульс-электрофореза. Если количество кинетохоров в ядре не превышает у кинетопластид 10, то количество хромосом может исчисляться десятками и даже сотнями (Solari, 1980а; Van der Ploeg et al., 1984, 1989; Скарлато и др., 1990; Марахова и др., 1991; Сомова и др., 1997). Механизмы сегрегации генома кинетопластид пока не вполне ясны. Показано, что мини-хромосомы *Trypanosoma brucei* во время митоза могут взаимодействовать непосредственно с микротрубочками митотического веретена, кинетохоры при этом участвуют, вероятно, только в сегрегации макси-хромосом (Gull et al., 1998). Однако то, как происходит сегрегация генетического материала у большинства других кинетопластид и особенно бодонид и участвует ли в этих процессах, как предполагалось ранее, ядерная оболочка (Skarlato et al., 1987; Skarlato, Lom, 1997), еще предстоит выяснить. Безусловный интерес также представляет исследование в дальнейшем митоза у жгутиконосцев *B. saltans* других штаммов, в частности не содержащих цитобионтов в перинуклеарном пространстве.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48166).

### Список литературы

- Жуков Б. Ф. 1993. Атлас пресноводных гетеротрофных жгутиконосцев (биология, экология и систематика). Рыбинск. 160 с.
- Карпов С. А., Жуков Б. Ф. 1983. Ультратонкое строение *Pleuromonas jaculans* Perty (Kinetoplastida, Zoomastigophorea). В кн.: Простейшие активного ила. Л.: Наука. 53—156.
- Марахова Н. В., Скарлато С. О., Фролов А. О., Цуладзе А. М. 1991. Полиморфизм молекулярных кариотипов низших трипаносоматид. Цитология. 33 (1) : 59—66.
- Скарлато С. О. 1987. Особенности тонкого строения ядра паразитического жгутиконосца *Trypanoplasma borreli* (Kinetoplastida) в интерфазе и митозе. ДАН СССР. 293 (1) : 220—221.
- Скарлато С. О., Паршкова Т. А., Фролов А. О. 1990. Электронно-микроскопическое и молекулярно-биологическое исследование ядра у низших трипаносоматид *Blastocrithidia miridarum* и *Crithidia brevicula*. Цитология. 32 (4) : 317—324.
- Сомова Н. В., Скарлато С. О., Фролов А. О. 1997. Хромосомы свободноживущих жгутиконосцев-кинетопластид. Докл. РАН. 357 (3) : 405—408.
- Фролов А. О. 2000. Класс Kinetoplastidea Honigberg, 1963. В кн.: Протисты. Ч. 1. СПб.: Наука. 211—256.
- Фролов А. О., Малышева М. Н., Подлипаев С. А., Скарлато С. О. 1997а. Электронно-микроскопическое исследование ядер промастигот *Endotrypanum monteroei*, *Leishmania tarentolae* и *Phytomonas* sp. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) в интерфазе и митозе. Цитология. 39 (3) : 278—284.
- Фролов А. О., Мыльников А. П., Малышева М. Н. 1997б. Электронно-микроскопическое исследование нового вида свободноживущего жгутиконосца *Dimastigella mimosa* sp. н. Цитология. 39 (6) : 442—448.
- Bianchi L., Rondanelli E. G., Garosi G., Gerna G. 1969. Endonuclear mitotic spindle in the leptomonad of *Leishmania tropica*. J. Parasitol. 55 : 1091—1092.
- Brooker B. E. 1971. Fine structure of *Bodo saltans* and *Bodo caudatus* (Zoomastigophora, Protozoa) and their affinities with the Trypanosomatidae. Bull. of the British Mus. Natur. Hist. 20 : 89—102.
- Callahan H. A., Litaker R. W., Noga E. J. 2002. Molecular taxonomy of the suborder Bodonina (order Kinetoplastida), including the important fish parasite, *Ichthyobodo necator*. J. Eukaryot. Microbiol. 49 : 119—128.
- Croft S. L. 1979. Ultrastructural study of the nucleus of *Leishmania hertigi*. Protistologica. 15 : 103—110.
- De Souza W., Meyer H. 1974. On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms. Spindle fibers in the dividing nucleus. J. Protozool. 21 : 48—52.
- Frolov A. O., Karlov S. A. 1995. Comparative morphology of kinetoplastids. Цитология. 37 (11) : 1072—1096.
- Frolov A. O., Karlov S. A., Malysheva M. N. 1996. The ultrastructure of mitosis in the free-living kinetoplastid *Bodo curvifilus*. Eur. J. Protistol. 32 : 498—505.
- Frolov A. O., Skarlatto S. A. 1998. Unusual pattern of mitosis in the free-living flagellate *Dimastigella mimosa* (Kinetoplastida). Protoplasma. 201 : 101—109.
- Gull K., Alsford S., Ersfeld K. 1998. Segregation of minichromosomes in trypanosomes: implications for mitotic mechanisms. Trends Microbiol. 6 : 310—323.
- Hearth I. B. 1980. Variant mitosis in lower eukaryotes: indicators of the evolution of mitosis? Int. Rev. Cytol. 64 : 1—80.
- Heyden S., Chao E., Vickerman K., Cavalier-Smith T. 2004. Ribosomal RNA phylogeny of bodonid and diplomonad flagellates and the evolution of Euglenozoa. Eukaryot. Microbiol. 51 : 402—416.
- Heywood P., Weinman D. 1978. Mitosis in the hemoflagellate *Trypanosoma cyclops*. J. Protozool. 25 : 287—292.
- Kubai D. F. 1975. The evolution of the mitotic spindle. Int. Rev. Cytol. 43 : 167—227.
- Paterson W. B., Woo P. T. K. 1984. Ultrastructural studies on mitosis in *Trypanosoma danilewskyi* (Mastigophora: Zoomastigophorea). Can. J. Zool. 62 : 1167—1171.
- Pickett-Heaps J. D. 1974. The evolution of mitosis and the eukaryotic condition. BioSystems. 6 : 37—48.
- Pickett-Heaps J. D. 1986. Mitotic mechanisms: an alternative view. Trends Biochem. Sci. 11 : 504—507.
- Raikov I. B. 1982. The protozoan nucleus. Morphology and evolution. Wien; New York: Springer-Verlag. 474 p.
- Raikov I. B. 1994. The diversity of forms of mitosis in Protozoa: a comparative review. Eur. J. Protistol. 30 : 253—269.
- Skarlatto S. O., Lom J. 1997. Mitosis in the flagellate *Trypanoplasma borreli* (Kinetoplastida: Bodonida). Eur. J. Protistol. 33 : 77—86.
- Skarlatto S. O., Lom J., Nohynkova E. 1987. Fine structural morphology of the nucleus of *Trypanosoma danilewskyi* (Kinetoplastida, Trypanosomatina) during mitosis. Arch. Protistenk. 133 : 3—14.
- Solari A. J. 1980a. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. Chromosoma. 78 : 239—255.
- Solari A. J. 1980b. Function of the dense plaques during mitosis in *Trypanosoma cruzi*. Exp. Cell Res. 127 : 457—460.
- Solari A. J. 1982. Nuclear ultrastructure during mitosis in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*. J. Protozool. 29 : 330—331.
- Solari A. J. 1983. The ultrastructure of mitotic nuclei of *Blastocrithidia triatomeae*. Z. Parasitenk. 69 : 3—15.
- Solari A. J., De Souza W. 1983. Presence and comparative behavior of mitotic plaques in five species of Trypanosomatidae. Microscopia Electronica y Biología Celular. 7 : 28—43.
- Solari A. J., Tandler C. J., Duschak V. 1985. Fine structure and cytochemistry of the mitotic plaques of *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. J. Submicrosc. Cytol. 17 : 583—591.
- Triemer R. E., Farmer M. A. 1991. The ultrastructural organization of the heterotrophic euglenids and its evolutionary implications. In: The biology of free-living heterotrophic flagellates. The Systematics Association. 45 (Special vol.) : 185—204.
- Triemer R. E., Fritz L. M., Herman R. 1986. Ultrastructural features of mitosis in *Leishmania adleri*. Protoplasma. 134 : 154—162.
- Urena F. 1986. Three-dimensional reconstructions of the mitotic spindle and dense plaques in three species of *Leishmania*. Z. Parasitenk. 72 : 299—306.
- Van der Ploeg L. H. T., Cornelissen A. W. C. A., Barry J. D., Borst P. 1984. Chromosomes of Kinetoplastida. EMBO J. 3 : 3109—3115.
- Van der Ploeg L. H. T., Smith C. L., Polvere R. I., Gottesdiner K. M. 1989. Improved separation of chromosome-sized DNA from *Trypanosoma brucei*, stock 427—60. Nucl. Acids Res. 17 : 3217—3227.
- Vickerman K. 1976. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Biology of the Kinetoplastida. London: Acad. Press. 1 : 1—34.
- Vickerman K., Preston T. M. 1970. Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. J. Cell Sci. 6 : 365—383.
- Vickerman K., Preston T. M. 1976. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. In: Biology of the Kinetoplastida. London et al.: Acad. Press. 1 : 35—130.
- Zhukov B. F. 1991. The diversity of bodonids. In: The biology of free-living heterotrophic flagellates. New York: Clarendon Press. 177—184.

MITOSIS IN THE FREE-LIVING FLAGELLATE *BODO SALTANS* STRAIN  
PS+ (KINETOPLASTIDEA, BODONIDA)*M. N. Malysheva,<sup>1</sup> M. S. Karpova,<sup>2</sup> A. O. Frolov<sup>1</sup>*<sup>1</sup> Zoological Institute RAS, St. Petersburg, and <sup>2</sup> Chair of Cytology, St. Petersburg State University;  
e-mail: frolal@online.ru

The mitosis in the free-living flagellate *Bodo saltans* Ps+ with prokaryotic cytobionts in perinuclear space has been studied. The nuclear division in *B. saltans* Ps+ occurs by closed mitosis type without condensation of chromosomes. Two spatially separated mitotic spindles begin to form consistently at the initial stages of nuclear division. The spindle including about 20 microtubules appears first and later the second spindle with half the number of microtubules comes at the angle of 30—40°. Both spindles rest their ends against the inner nuclear membrane and form 4 distinct poles. The microtubules of the first spindle are associated with 4 pairs of kinetochores, the microtubules of the second one are associated with 2 pairs of kinetochores. The divergence of the kinetochores towards the poles occurs independently in each spindle. The equatorial phase is not revealed in *B. saltans* Ps+. The poles of both spindles unite in pairs at the elongation phase of mitosis and form the integrated bipolar structure. At this stage of the nuclear division, the kinetochores reach the poles of subspindles and become indistinguishable. Then the nucleus takes the shape of a dumbbell. The inner nuclear membranes of just formed nuclei have layers of condensed chromatin characteristic of the interphase nuclei of kinetoplastidea. The daughter nuclei separate at the phase of reorganization. There are 1—2 prokaryotic endocytobionts in the perinuclear space of the interphase nuclei in *B. saltans* Ps+. The symbionts multiply during mitosis and their number reaches more than 20 specimens par nucleus.

**Key words:** Kinetoplastidea, Bodonida, *Bodo saltans*, ultrastructure, nucleus, mitosis, prokaryotic cytbionts.