

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИСТ *PELOMYXA PALUSTRIS* GREEFF, 1874

© А. О. Фролов,^{1,*} Л. В. Чистякова,² А. В. Гудков,³ М. Н. Малышева¹

¹ Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург,

² Биологический научно-исследовательский институт С.-Петербургского государственного университета

и ³ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

* электронный адрес: frolal@online.ru

Pelomyxa palustris Greeff, 1874 — единственный представитель пеломиксоидных амёб, в жизненном цикле которого обнаружены цисты покоя. С использованием световой и электронной микроскопии изучена морфология цист *P. palustris*. Инцистирование пеломикс в климатических условиях северо-запада России происходит в августе—сентябре. Покоящиеся цисты имеют сложную, трехслойную оболочку. Наибольшего развития достигают два внутренних слоя — электронно-плотная бесструктурная эндоциста и слоистая мезоциста, толщина каждого из которых может достигать 0.6—0.7 мкм. Толщина поверхностного, электронно-плотного, слоя экзоцисты обычно не превышает 0.1—0.2 мкм. Инцистированная пеломикса имеет уникальную организацию. Около 60 % объема ее клетки занимает располагающаяся в центре гигантская вакуоль, заполненная прокариотными цитобионтами. В этой вакуоли также обнаруживаются ограниченные мембранами вакуоли и везикулы различной природы, автофагосомы и липидные капли. Цитоплазма амёбы занимает пространство между внутренней поверхностью эндоцисты и центральной вакуолью. В ней отсутствуют какие-либо включения, прокариотные цитобионты и большинство клеточных органоидов. В цитоплазме лежат 4 крупных ядра, заполненных относительно гомогенной кариоплазмой. В кариоплазме описаны ядерные тельца. Ядерная оболочка формирует множество длинных трубчатых выростов, пронизывающих цитоплазму и подстилающих мембрану центральной вакуоли. В таком состоянии инцистированные пеломиксы переживают до начала эксцистирования. Эксцистирование у *P. palustris* в изученном регионе происходит весной, во второй половине апреля—начале мая. Цисты претерпевают сложные морфофункциональные изменения, связанные с реорганизацией оболочки и формированием молодых многоядерных амёб. Из трех слоев оболочки к моменту эксцистирования остается один. Центральная вакуоль разрушается, и ее содержимое проникает в цитоплазму. Ядра пеломиксы дважды делятся. Прокариотные цитобионты локализируются в цитоплазме и в околоядерной области. Вышедшие из цист молодые многоядерные особи *P. palustris* по своей организации не отличаются от взрослых форм.

Ключевые слова: пелобионты, *Pelomyxa palustris*, жизненный цикл, цисты, ультраструктура.

Pelomyxa palustris Greeff, 1874 — широко распространенный в северном полушарии представитель многоядерных пелобионтов (Whatley, Chapman-Andresen, 1990). Это типовой вид и самый крупный представитель рода *Pelomyxa*. На протяжении долгого времени вопрос о структуре жизненного цикла *P. palustris* если и возникал в протистологической литературе, то он сводился главным образом к обсуждению способов деления этой гигантской амёбы или особенностей реорганизации ее ядерного аппарата (Hollande, 1945; Kudo, 1957, 1959; Daniels et al., 1966). В 1971 г. Чепмен-Эндресен впервые описала феномен формирования цист у *P. palustris* (Chapman-Andresen, 1971). Позднее она продолжила изучение этого явления, предложив в 1978 г. схему жизненного цикла *P. palustris* (Chapman-Andresen, 1978). В кратком сообщении исследовательница привела следующие факты, касающиеся обнаруженных ею особенностей ин- и эксцистирования *P. palustris* (Chapman-Andresen, 1978). По ее данным, инцистирование происходит у *P. palustris* сразу вслед за процессом плазмотомии. На стадии предцисты у амёб исчезают структурные вакуо-

ли, неусвоенные остатки пищи выводятся путем экзоцитоза, затем образуется двойная оболочка цисты, а реорганизация ядерного аппарата приводит к формированию 4 крупных ядер. Эндосимбионты формируют палисад под оболочкой эндоцисты. Формирование зрелой цисты занимает около 7 сут, цисты *P. palustris* сохраняют жизнеспособность до 7 лет. При эксцистировании из цист выходят небольшие амёбы, имеющие немногочисленные ядра, полный набор симбионтов, однако лишенные гликогеновых зерен и минеральных включений (Chapman-Andresen, 1978). В более поздних работах был сделан ряд уточнений и дополнений к этому описанию, которые касались главным образом сезонной приуроченности и динамики формирования отдельных стадий пеломикс (Whatley, Chapman-Andresen, 1990). В частности, сообщалось, что инцистирование у *P. palustris* происходит поздней осенью и, как правило, только у части индивидов в популяции. Аналогично эксцистирование, приходящееся по времени на раннюю весну, происходит только у части имеющих в популяции инцистированных особей (Whatley, Chapman-Andresen, 1990).

Изучая пеломиксоидных амёб на северо-западе России (Frolov et al., 2004, 2005, 2006; Фролов и др., 2005), мы постоянно встречали в пробах, полученных из различных водоемов, крупные цисты, которые по морфологии соответствовали цистам *P. palustris*, описанным Чепмен-Эндресен (Chapman-Andresen, 1971, 1978). Учитывая дефицит сведений об организации этих стадий пеломикс, мы провели в 2002—2006 гг. сбор и изучение обнаруженных цист. Результаты этих исследований суммированы в данной статье.

Материал и методика

Цисты пеломикс собирали в период с сентября по май в 2002—2004 гг. в оз. Осиновское, расположенном в районе пос. Сосново Ленинградской обл. (60°30' N, 30°16' E) и в оз. Белое, расположенном в районе пос. Ляды Псковской обл. (58°39' N, 28°55' E). Цисты хранили в стеклянных чашках Петри в дистиллированной воде при 10 °C. Исследования проводили в световом микроскопе Leica (Германия), снабженном системой визуализации на базе Panasonic 650 CCTV + Canon EOS350D и PC P4. Все морфометрические измерения выполнены на живых организмах с использованием системы анализа изображений IT v. 3.0 (UTHSCSA). Для электронной микроскопии цисты фиксировали коктелем, включающим в себя 5%-ный глутаральдегид и 1%-ный OsO₄ на 0.1 M какодилатном буфере. Фиксацию проводили на тающем льду, в темноте в течение 6 ч с полной заменой фиксатора через 1 и 3 ч после начала. Затем цисты промывали 3 раза по 20 мин в 0.1 M какодилатном буфере и постфиксировали 2%-ном OsO₄ на 0.1 M какодилатном буфере в темноте и на тающем льду (3 ч). После проводки через спирты возрастающей концентрации материал заключал в Эпон—Аралдит. Перед заливкой в смолу оболочку цисты прокалывали микрокапилляром. Ультратонкие срезы готовили при помощи ультрамикротомы Reichert (Англия) и просматривали в электронном микроскопе Tesla BS-300 (Чехословакия).

Результаты

Цисты *Pelomyxa palustris* можно обнаружить в местах массового обитания пеломикс. К таковым относятся иловые отложения прибрежной зоны стоячих и слабопроточных постоянных водоемов. В период весеннего паводка, сопровождающегося разливом рек и ручьев и перемещением больших масс талой воды, цисты *P. palustris*, по нашим наблюдениям, могут переноситься в другие типы водоемов. С этим фактом связано спонтанное обнаружение *P. palustris* в поймах рек и во временных лужах, остающихся после схода паводковых вод, однако высушивания эти стадии жизненного цикла *P. palustris* не переносят и гибнут после пересыхания таких временных водоемов. В водоемах северо-запада России цисты *P. palustris* встречаются на протяжении всего года, хотя их численность заметно варьирует в различные сезоны. Наибольшее количество цист можно обнаружить в пробах, взятых с сентября по апрель. В летних пробах, напротив, встречаются лишь единичные цисты *P. palustris*.

Световая микроскопия. Организация зрелых цист *P. palustris* крайне специфична (рис. 1, а, б). В цис-

те можно выделить три основных компартмента: сложную оболочку, «центральное тело» и периферическую цитоплазму с ядрами. Диаметр цист варьирует от 260 до 300 мкм (среднее 279.58 ± 12.21), а диаметр «центрального тела» — от 160 до 240 мкм (среднее 219.96 ± 20.21). Оболочка, абсолютно гладкая снаружи, несет многочисленные складки на своей внутренней поверхности (рис. 1, а, б). При разрушении стенки цисты становится очевидным, что «центральное тело», занимающее до 60 % ее объема, представляет собой гигантскую вакуоль, которая в ряде случаев может быть изолирована из основной цитоплазмы без нарушения целостности окружающей ее мембраны. Основным компонентом содержимого этой вакуоли являются прокариотные цитобионты, представленные крупными и мелкими палочковидными бактериями. В ней также обнаруживаются многочисленные светопреломляющие гранулы, мелкие липидные капли и различные везикулы. Ограниченная плазмалеммой цитоплазма инцистированной пеломиксы занимает пространство между мембраной центральной вакуоли и внутренней поверхностью эндочисты. Когда центральная вакуоль располагается в центре цисты (рис. 1, а), это расстояние обычно составляет 22—35 мкм (среднее 29.05 ± 7.23). Однако часто центральная вакуоль располагается эксцентрично. Цитоплазма пеломиксы выглядит прозрачной и относительно гомогенной, в ней располагаются 4 крупных ядра, диаметр которых достигает 33.32 ± 4.11 мкм. В кариоплазме ядер присутствует множество мелких телец (рис. 1, в). Ядра могут иметь округлую или овальную форму. Овальная форма характерна для ядер, диаметр которых превышает расстояние от центральной вакуоли до эндочисты.

Морфология зрелых цист претерпевает существенные изменения при вступлении в фазу эксцистирования (рис. 1, з—е). Большинство процессов, связанных с реорганизацией основных компартментов цисты, протекают при этом практически синхронно. Оболочка цисты истончается и утрачивает складчатость на своей внутренней поверхности (ср. рис. 1, а, б и з, д). Одновременно в цитоплазму начинает поступать содержимое центральной вакуоли (рис. 1, з), которое поначалу располагается здесь в виде дискретных островков. «Перемешиванию» содержимого вакуоли и цитоплазмы способствуют проявления двигательной активности у формирующейся пеломиксы. Сначала они выглядят довольно хаотичными и осуществляются в виде спонтанной пульсации отдельных участков цитоплазмы. Однако уже вскоре (по нашим наблюдениям, это происходит в течение нескольких часов) такое неорганизованное метаболизирование клетки сменяется типичной для *P. palustris* формой клеточной подвижности, сопровождающейся упорядоченным током эндоплазмы. К этому времени контуры центральной вакуоли полностью исчезают и оптическая плотность цитоплазмы оказывается довольно однородной (рис. 1, д). Существенные изменения затрагивают ядерный аппарат формирующейся пеломиксы. Каждое из четырех ядер цисты делится минимум дважды. При этом если первые деления ядер происходят практически синхронно, то последующие могут осуществляться с небольшим сдвигом во времени и количество ядер у готовых к выходу из цист организмов может варьировать от 8 до 16 (редко более). Диаметр ядер уменьшается до 18—24 мкм (среднее 20.60 ± 2.18 мкм). В кариоплазме становятся хорошо заметными сферические ядрышки,

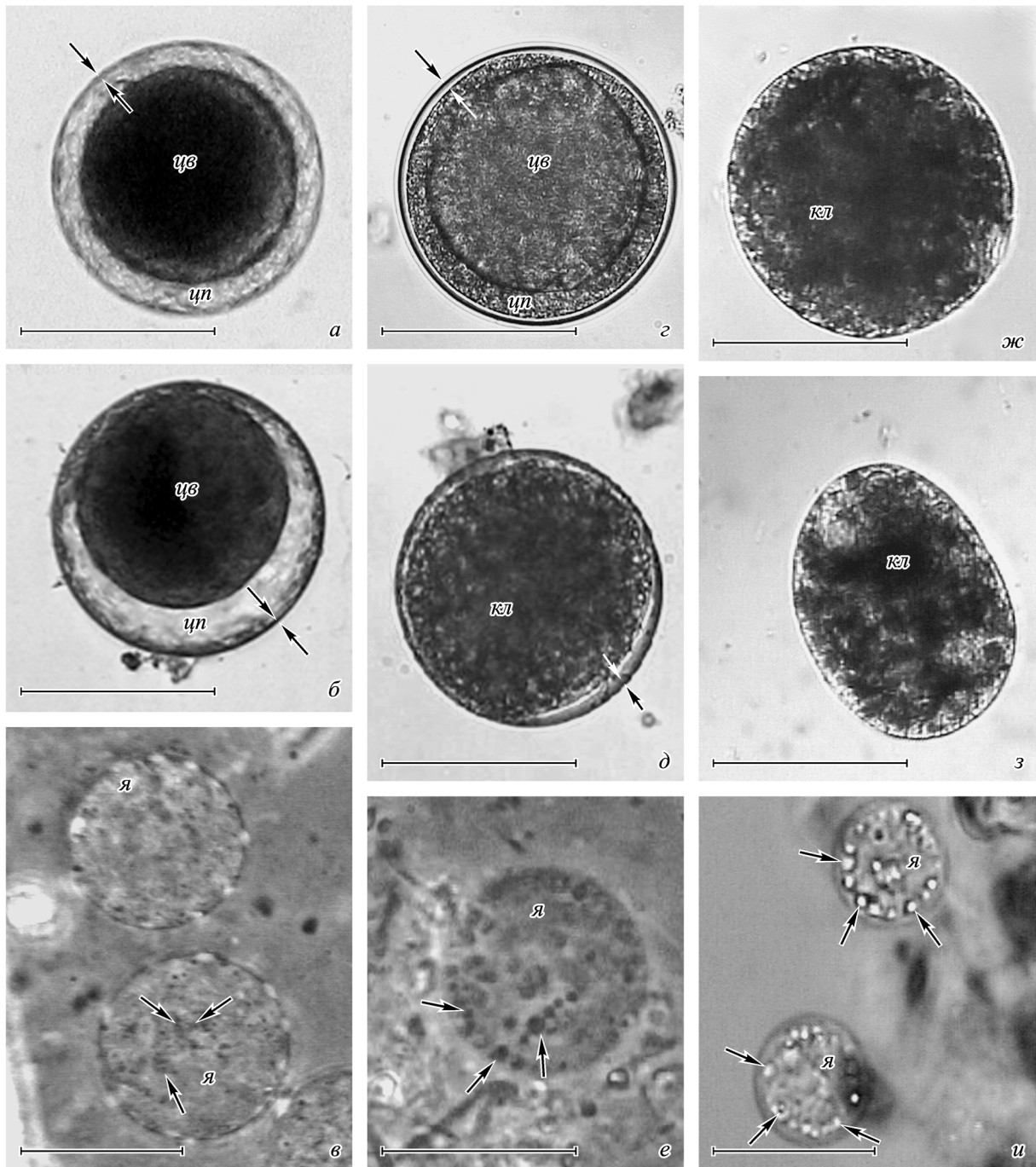


Рис. 1. Микрофотография живых клеток *Pelomyxa palustris* на стадии цист покоя и в процессе эксцистирования.

a, б — одновозрастные цисты покоя с различным положением центральной вакуоли; *стрелки* показывают контур стенки цисты. *в* — ядра инцистированной *P. palustris*; *стрелки* показывают ядерные тельца (фазовый контраст). *г* — циста на стадии разрушения центральной вакуоли и проникновения ее содержимого в цитоплазму клетки; *стрелки* показывают контур стенки цисты. *д* — циста с полностью сформировавшейся пеломиксой; *стрелки* показывают контур стенки цисты. *е* — 1 из 8 ядер, изолированных из клетки (показано на фото *д*); *стрелки* показывают ядерные тельца (фазовый контраст). *ж, з* — молодые клетки *P. palustris* вскоре после выхода из цист. *и* — 2 из 18 ядер, изолированных из клетки (показана на фото *ж*); *стрелки* показывают ядерные тельца. *кп* — полностью сформировавшиеся клетки *P. palustris*, *цв* — центральная вакуоль, *цп* — цитоплазма инцистированной клетки *P. palustris*, *я* — ядро. Масштабные отрезки: *a, б, г, д, ж, з* — 200 мкм; *в, е, и* — 30 мкм.

располагающиеся по периферии ядра (рис. 1, *е*). Вскоре молодые сформировавшиеся особи *P. palustris* покидают цисты (рис. 1, *ж, з*). От взрослых пеломикс их отличают меньшие размеры, бо́льшая подвижность, отсутствие в цитоплазме пищеварительных вакуолей и зерен гликогена. Однако их ядра уже имеют характерное для *P. palustris* гранулярное строение (рис. 1, *и*).

Электронная микроскопия. Исследовали ультраструктуру цист *P. palustris* в период покоя и в фазе эксцистирования, а также организацию молодых *P. palustris* вскоре после их выхода из цист.

Зрелые цисты *P. palustris* окружены сложной оболочкой, состоящей из трех слоев различной электронной плотности (рис. 2, *а*). По аналогии с цистами других про-

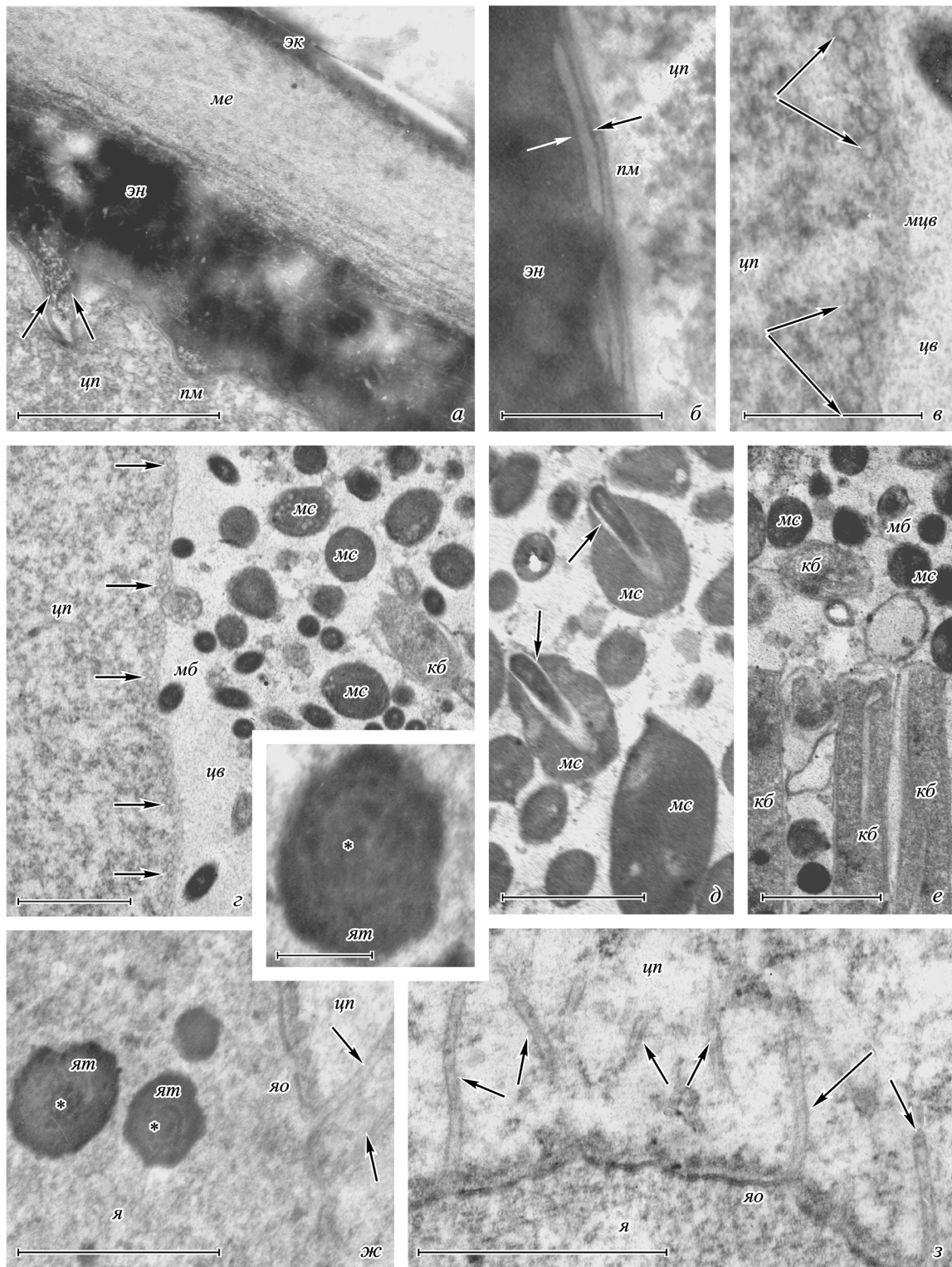


Рис. 2. Тонкое строение цист покоя *Pelomyxa palustris*.

a — трехслойная оболочка цисты; *стрелки* показывают складку на внутренней поверхности эндоцисты. *б* — внутренняя поверхность эндоцисты; *стрелки* показывают мембраны, формирующие лауну в базальной части эндоцисты. *в, г* — граница между цитоплазмой инцистированной клетки и центральной вакуолю; *стрелки* показывают трубчатые структуры, подстилающие мембрану центральной вакуоли. *д, е* — прокариотные цитобionты и плотные мешковидные структуры в центральной вакуоли; *стрелки* показывают мелкие палочковидные цитобionты, частично погруженные в мешковидные структуры. *ж, з* — организация ядер инцистированных *P. palustris* в фазе покоя; *стрелки* показывают трубчатые выросты поверхностной мембраны ядерной оболочки. *Вставка*: ядерное тельце, *звездочками* обозначены клубки фибрилл, локализованные в ядерных тельцах. *кб* — крупные бактерии с продольным шелевидным вмячиванием оболочки, *мб* — мелкие палочковидные бактерии, *ме* — мезоциста, *мс* — электронно-плотные мешковидные структуры, *мцв* — мембрана центральной вакуоли, *пм* — плазмалемма, *эк* — эктоциста, *эн* — эндоциста, *яо* — ядерная оболочка, *ят* — ядерные тельца; остальные обозначения те же, что и на рис. 1. *Масштабные отрезки*: *a, г-з* — 1 мкм; *б, в* — 0.5 мкм; *вставка* — 0.25 мкм.

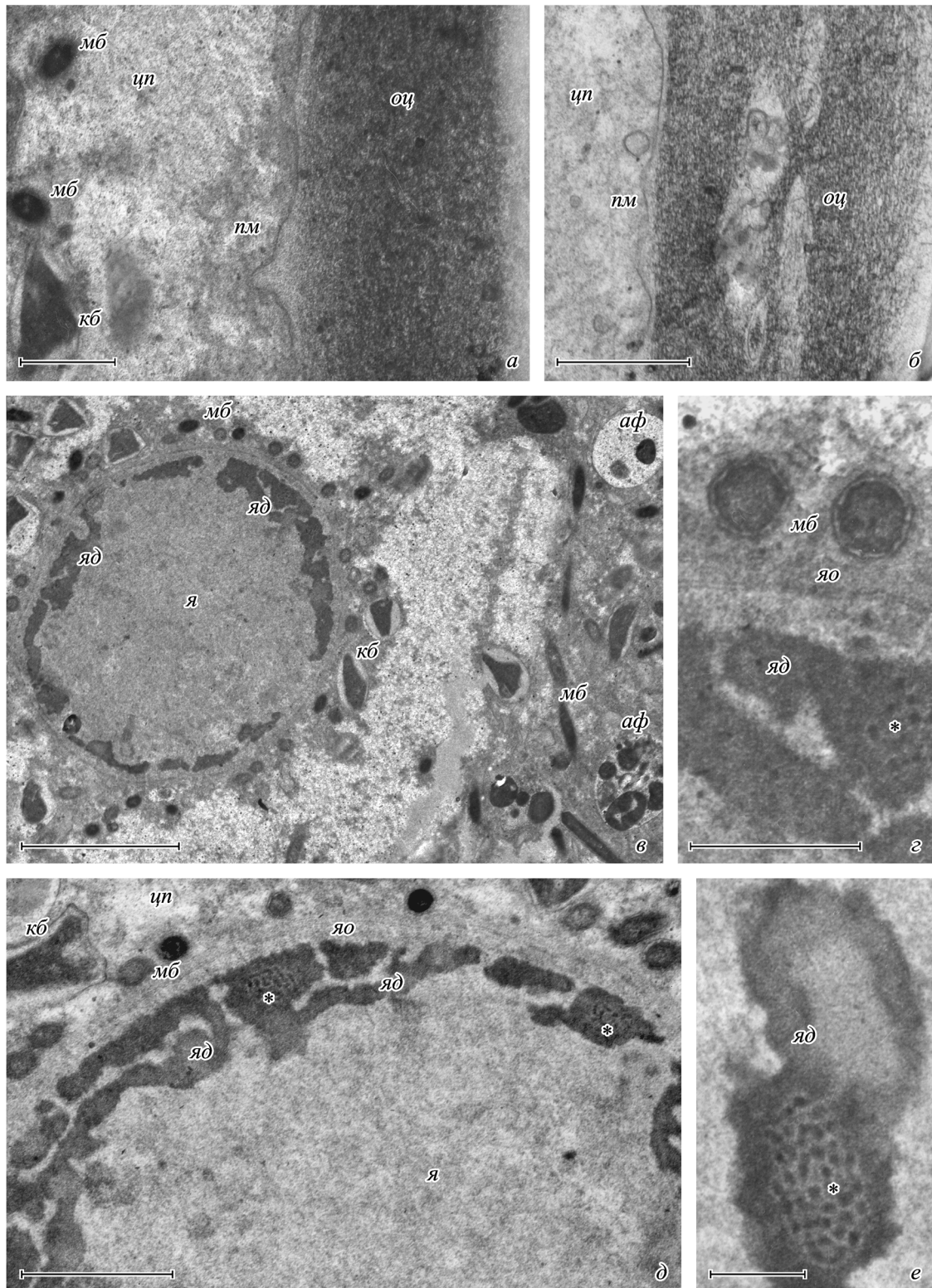


Рис. 3. Тонкое строение цист *Pelomyxa palustris* в фазе эксцистирования.

a, б — однослойная оболочка цисты; *в* — участок цитоплазмы с ядром; *г, д* — организация ядер *P. palustris*; *е* — фрагмент ядрышка, звездочками обозначены клубки фибрилл, локализованные в ядрышках. *аф* — автофагосомы, *оц* — оболочка цисты, *яд* — ядрышки; остальные обозначения те же, что и на рис. 1, 2. Масштабные отрезки: *a, б* — 0.5 мкм; *в* — 2 мкм; *г* — 0.4 мкм; *д* — 1 мкм; *е* — 0.3 мкм.

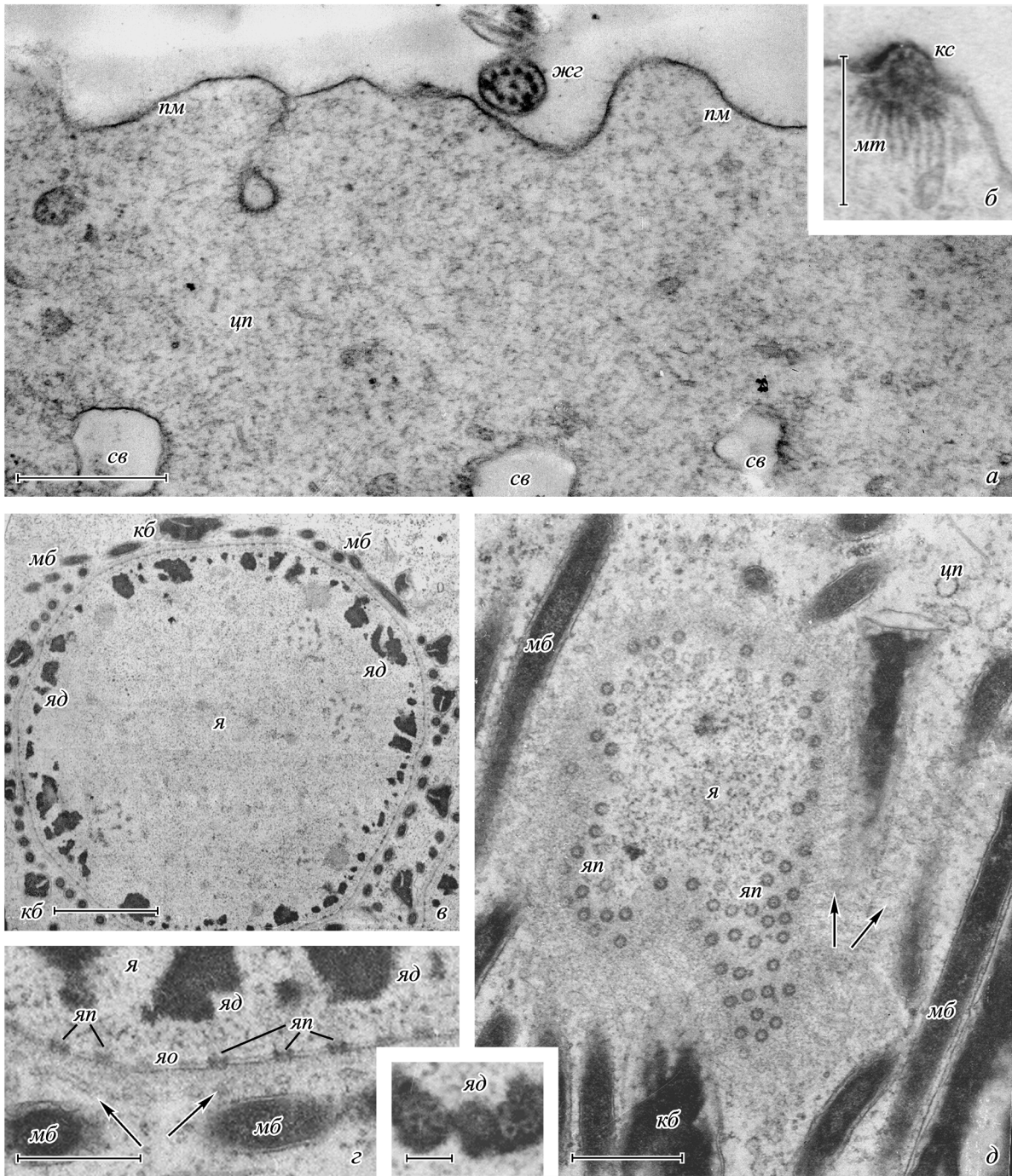


Рис. 4. Тонкое строение молодых *Pelomyxa palustris*.

a — участок поверхности клетки со жгутиком. *б* — кинетосома жгутика. *в—д* — организация ядер; *стрелки* показывают трубчатые выросты поверхностной мембраны ядерной оболочки; на *вставке* — организация ядрышка. *жсг* — жгутик, *кс* — кинетосома жгутика, *мт* — радиальные микротрубочки, *св* — структурные вакуоли, *яп* — ядерные поры; остальные обозначения те же, что и на рис. 1—3. Масштабные отрезки: *a, б, д* — 0.5 мкм; *в* — 2 мкм; *г* — 0.4 мкм; *вставка* — 0.2 мкм.

тистов мы рассматриваем эти слои как эндо-, мезо- и экто-оболочки цисты. Эндоциста *P. palustris* представляет собой слой электронно-плотного материала, достигающего толщины 0.7 мкм (рис. 2, *a*). Она имеет слоистое строение, которое наиболее отчетливо выражено у ее наружной поверхности. Базальная часть эндоцисты представлена двумя мембранами, пространство между которыми заполнено материалом средней электронной плотности. В одних участках эндоцисты эти мембраны могут

быть сближены (рис. 2, *a*), а в других формируют характерные лакуны (рис. 2, *б*). Внутренняя поверхность эндоцисты несет многочисленные складки, или гребни, заполненные материалом высокой электронной плотности (рис. 2, *a*). Мезоциста по толщине сравнима с эндоцистой. Эта оболочка формируется за счет электронно-плотных ламелл, вероятно производных эндоцисты, которые погружены в матрикс средней электронной плотности. Внешние участки мезоцисты представлены

рыхло располагающимися ламеллами, а у границы с эктоцистой ламеллы практически отсутствуют (рис. 2, а). Эктоциста достигает в толщину не более 0.2 мкм. Ее основу составляет относительно гомогенный материал высокой электронной плотности. Эктоциста граничит непосредственно с внешней средой (рис. 2, а).

Наружная мембрана инцистированных *P. palustris* плотно прилегает к базальной поверхности эндоцисты, повторяя ее сложный рельеф (рис. 2, а, б). Цитоплазма амёб слабо дифференцирована, в ней обнаруживаются рибосомы (рис. 2, а—з), редко фрагменты ретикулума и отдельные липидные капли. Центральная вакуоль занимает основной объем клетки инцистированной пеломиксы. Она окружена плазматической мембраной, цитоплазматическая поверхность которой подстилается трубочками ретикулума, имеющими диаметр около 60 нм (рис. 2, в, з). Трубочки располагаются в один ряд, обычно плотно прилегая друг к другу, но иногда в их ряду обнаруживаются значительные по протяженности бреши (рис. 2, в, з). Происхождение этих структур мы связываем с трубчатыми выростами наружной мембраны ядерной оболочки, которые имеют идентичный диаметр и отходят от поверхности ядра в цитоплазму (рис. 2, ж, з). Центральная вакуоль заполнена бесструктурным матриксом низкой электронной плотности (рис. 2, з—е). Среди включений преобладают два вида прокариотных цитобионтов: мелкие (диаметром 0.18—0.20 мкм), палочковидные, грамположительные бактерии (рис. 2, з, д) и крупные (диаметром 0.4—0.6 мкм) палочковидные бактерии (рис. 2, е), оболочка которых формирует характерное продольное впячивание (cleaft). Еще одним распространенным компонентом центральной вакуоли являются окруженные мембранами мешковидные структуры, заполненные в различной степени вакуолизированным электронно-плотным матриксом (рис. 2, з—е). Часто внутри этих структур оказываются частично или полностью погружены мелкие палочковидные бактерии (рис. 2, д). Кроме перечисленных компонентов в центральной вакуоли можно обнаружить фрагменты различных мембранных структур, мелкие везикулы и липидные включения. Четыре крупных ядра расположены в цитоплазме инцистированной пеломиксы в непосредственной близости друг от друга. Характерной чертой этих ядер являются трубчатые выросты их оболочки (рис. 2, ж, з) и наличие в относительно гомогенной кариплазме ядерных телец (рис. 2, ж, вставка). Последние представляют собой небольшие (0.20—0.40 мкм в диаметре) плотные глобулы, вероятно продукты фрагментации ядрышек. В центре каждой такой глобулы располагается клубок фибрилл, имеющих диаметр около 30 нм (рис. 2, ж, вставка).

Подготовка к инцистированию связана с существенными преобразованиями в организации как оболочки цисты, так и инцистированных *P. palustris*. Оболочка цисты утрачивает свою трехслойную структуру и истончается (рис. 3, а, б). Из трех слоев остается один, его толщина не превышает 1 мкм. Оболочка не выглядит однородной из-за пронизывающих ее многочисленных лакун (рис. 3, б). Значительные изменения происходят в организации клеток пеломикс. Во многом они связаны с разрушением центральной вакуоли и проникновением ее содержимого в цитоплазму (рис. 3, в). Цитоплазма выглядит крайне гетерогенной, с чередующимися участками различной плотности, что связано с постепенным и неравномерным поступлением в нее содержимого цент-

ральной вакуоли (рис. 3, в). Обращает на себя внимание множество автофагосом, в которых оказываются заключенными в том числе и отдельные прокариотные цитобионты (рис. 3, в). Ядра формирующейся пеломиксы делятся минимум дважды. Вероятно, эти процессы протекают очень быстро, так как нам ни разу не удалось наблюдать какие-либо фазы их деления. Вокруг ядра обособляются участки цитоплазмы, насыщенные каналами ретикулума и прокариотными цитобионтами (рис. 3, в—д). Последние представлены крупными бактериями, имеющими характерное продольное впячивание оболочки, и мелкими грамтрицательными палочковидными бактериями (рис. 3, в—д). Трубочатые выросты ядерной оболочки не выражены. Ядрышковый материал, в котором обнаруживаются хроматиновые блоки и клубки фибрилл диаметром 30 нм, занимает пристеночное положение (рис. 3, з—е).

Молодые пеломиксы, покинувшие цисту, имеют типичную для *P. palustris* организацию. Их клетки покрыты плазмалеммой, несущей на своей поверхности слой слабоструктурированного гликокаликса (рис. 4, а). От взрослых пеломикс они отличаются почти полным отсутствием пищеварительных вакуолей, однако структурные вакуоли встречаются в цитоплазме в значительном количестве (рис. 4, а). Клетки обладают многочисленными жгутиками (рис. 4, а, б). Как и у взрослых пеломикс, жгутики молодых особей демонстрируют случайный набор микротрубочек в аксонеме, отличный от классической формулы 9 + 2 (рис. 4, а). Короткие кинетосомы жгутиков формируют небольшое количество радиальных микротрубочек, веером расходящихся в цитоплазму (рис. 4, б). Ядра характерного гранулярного типа (рис. 4, в, з). Многочисленные ядрышки располагаются по периферии, не прилегая, однако, к внутренней мембране ядерной оболочки (рис. 4, в, з). Фибриллы диаметром 30 нм в виде клубков локализованы внутри ядрышек и, кроме того, обнаруживаются в окружающей кариплазме (рис. 4, з, вставка). Наружная мембрана ядерной оболочки формирует трубчатые выросты диаметром 60 нм (рис. 4, з, д). По крайней мере часть этих трубочек принимает участие в формировании мембран цитобионтофорных вакуолей прокариотных цитобионтов, локализующихся вокруг ядер (рис. 4, д).

Обсуждение

Несмотря на то что в последнее время список видов, входящих в род *Pelomyxa*, существенно расширился (Frolov et al., 2004, 2005, 2006; Фролов и др., 2005), *P. palustris* остается единственным видом многожгутиковых, многоядерных пелобионтов, у которого в жизненном цикле обнаружена стадия цисты. Можно полагать, что наличие стадии, способной сохранять в водной среде жизнеспособность на протяжении длительного времени (до 7 лет; по: Whatley, Chapman-Andresen, 1990), в значительной мере определяет широкое распространение *P. palustris* (Whatley, Chapman-Andresen, 1990; Гудков и др., 2004). Среди ближайших родственников пеломикс (одножгутиковых пелобионтов — мастигамеб) формирование цист покоя, возможно, получило более широкое распространение, чем среди пеломикс. Однако из почти 20 известных видов этих протистов цисты пока изучены только у 2 (Chavez et al., 1986; Simpson et al., 1997; Walker et al., 2001). При этом надо отметить, что никаких об-

щих черт в организации цист *P. palustris* и цист мастигамеб нам выявить не удалось. *Mastigamoeba balamuthi* и *M. schizophrenia* (Chavez et al., 1986; Simpson et al., 1997) формируют однослойную (100—200 нм), а не трехслойную, как *P. palustris*, стенку цисты. Собственно морфология инцистированных мастигамеб отличается от морфологии их трофических стадий менее развитой вакуолярной системой и наличием большого числа цистерн шероховатого ретикулума. Амебы полностью сохраняют жгутиковый аппарат, центральная вакуоль отсутствует (Simpson et al., 1997).

Таким образом, можно полагать, что стадия цисты независимо возникала в жизненных циклах представителей двух филогенетических ветвей пелобионтид. Полученные нами данные о сезонной динамике процессов инцистирования *P. palustris* в условиях северо-запада России в целом хорошо согласуются с исследованиями, выполненными ранее на пеломиксах из водоемов Дании (Whatley, Chapman-Andresen, 1990). Небольшие расхождения касаются лишь определения времени пика инцистирования пеломикс, который, по нашим данным, приходится на начало осени, а не на ее конец, как сообщают авторы (Whatley, Chapman-Andresen, 1990). Вероятнее всего, это может быть связано с разницей в климатических условиях двух регионов. Гораздо труднее объяснить существенные различия в данных, полученных при изучении морфологии цист *P. palustris* нами и нашими предшественниками. Надо отметить, что в опубликованных ранее работах, посвященных изучению цист *P. palustris*, практически отсутствует иллюстративный материал (Chapman-Andresen, 1971, 1978; Whatley, Chapman-Andresen, 1990). Это в значительной мере затрудняет корректное обсуждение выявленных противоречий. Тем не менее, чтобы в дальнейшем избежать путаницы, связанной с двумя противоречивыми описаниями одной и той же стадии развития у одного вида простейших, мы вынуждены привести в этой работе анализ вероятных причин выявленных несоответствий.

Наиболее полное описание цист *P. palustris* опубликовано в последней из процитированных выше работ (Whatley, Chapman-Andresen, 1990). Авторы, в частности, приводят следующие данные: *P. palustris* формирует сферические цисты (диаметр 150—250 мкм), которые имеют светопреломляющую, скульптурированную стенку толщиной 25 мкм, темное содержимое цист лежит внутри двойной фиброзной оболочки, циста содержит грубозернистый материал неизвестного происхождения, 4 крупных ядра (диаметром около 30 мкм) и 3 вида бактериальных эндосимбионтов (Whatley, Chapman-Andresen, 1990). Поскольку единственная в данной работе микрофотография цисты *P. palustris* (fig. 5, f. Whatley, Chapman-Andresen, 1990) полностью соответствует изображению цист, изученных в настоящей работе (рис. 1, а, б), у нас нет оснований полагать, что речь может идти о цистах разных организмов. Это подтверждается и морфометрическими данными. Кроме того, и упомянутые авторы, и мы наблюдали выход из этих цист молодых *P. palustris*.

Наиболее серьезные разногласия выявляются в описаниях строения оболочки цист *P. palustris*. Чепмен-Эндресен описывает ее как двойную (Chapman-Andresen, 1978) или двойную фиброзную оболочку, светопреломляющую и скульптурированную, толщиной около 25 мкм (Whatley, Chapman-Andresen, 1990). По нашим данным, оболочка цисты *P. palustris* обычно не превы-

шает 1.5 мкм. Чтобы выяснить причину столь значительного расхождения в описаниях одной и той же структуры, мы выполнили измерения по опубликованной микрофотографии (Whatley, Chapman-Andresen, 1990: здесь масштаб для fig. 5, f (Mature cyst), вероятно, указан с ошибкой, поскольку в соответствии с ним диаметр изображенной цисты равен 120 мкм и не укладывается в границы варибельности этого признака, приведенные самими авторами (150—250 мкм). Поэтому в дальнейших расчетах мы принимали за основу средний диаметр цист *P. palustris*, равный по этим авторам 200 мкм). Мы обнаружили, что у цисты со средним диаметром 200 мкм 20—25 мкм составляет зона, занимающая пространство от границы центральной вакуоли до наружной поверхности стенки цисты. Это подтверждают и результаты наших исследований, приведенные выше. Таким образом, с большой долей уверенности можно считать, что за оболочку цист авторы (Chapman-Andresen, 1971, 1978; Whatley, Chapman-Andresen, 1990) в своей работе принимали совокупность структур, расположенных снаружи от мембраны центральной вакуоли, т. е. цитоплазму инцистированной пеломиксы до плазмалеммы включительно, плюс пространство от плазмалеммы до эндоцисты, плюс собственно оболочку цисты.

Этот вывод позволяет разрешить еще одно противоречие — обнаружение «эндосимбионтов, располагающихся в виде палисада у внутренней стенки эндоцисты» (Chapman-Andresen, 1978). По нашим данным, прокариотные цитобионты не могут проникать в цитоплазму пеломиксы из центральной вакуоли вплоть до завершающих этапов эксцистирования, связанных с ее разрушением, и соответственно не могут располагаться у стенки эндоцисты. Однако если учесть, что за «внутреннюю поверхность эндоцисты» Чепмен-Эндресен (Chapman-Andresen, 1971, 1978), вероятно всего, принимала мембрану центральной вакуоли, то в этом случае никакого противоречия с нашими данными не возникает (см. рис. 2, з).

Неясной пока остается судьба жгутикового аппарата у инцистированных *P. palustris*. Нам не удалось обнаружить его элементы у особей, находящихся внутри цист, однако у вышедших из цист молодых амеб уже имеются многочисленные типичные для этого вида пелобионтов жгутики (Серавин, Гудков, 1987; Griffin, 1988).

Ядра пеломикс претерпевают существенные изменения в процессе подготовки к эксцистированию. Нами отмечены три состояния ядер, характерных для покоящихся стадий, для пеломикс, готовых к эксцистированию, и для активных трофозоитов. Покоящиеся стадии имеют 4 ядра (Chapman-Andresen, 1978). Нами была впервые изучена их тонкая организация. Наиболее характерными признаками этих ядер являются длинные трубчатые выросты наружной мембраны ядерной оболочки, отходящие глубоко в цитоплазму, и ядерные тельца, хаотично располагающиеся в кариоплазме. Первые подстилают мембрану центральной вакуоли и, весьма вероятно, участвуют в ее формировании. В процессе эксцистирования при разрушении центральной вакуоли организованные трубочки перестают выявляться, а у наружной поверхности ядра формируется сложный мультимембранный комплекс, с которым ассоциированы многочисленные цитобионты. Этот комплекс более массивный и менее скульптурированный, чем у взрослых пеломикс (Daniels et al., 1966). У вышедших из цист пеломикс оболочка ядер

Список литературы

имеет типичную для взрослых особей организацию (Daniels et al., 1966). Наружная мембрана ядерной оболочки формирует трубчатые каналы, локализующиеся вокруг ядра, поперечные профили которых Дэниелс с коллегами не вполне удачно назвали мелкими везикулами (minute vesicles) (Daniels et al., 1966). Между тем трубчатая структура этих образований и их связь с мембраной цитобинтофорных вакуолей хорошо прослеживаются на срезах прошедших по касательной к поверхности ядер (см. рис. 4, д). Оценивая динамику этих процессов, можно предположить, что рассмотренные нами три варианта организации мембранных структур, ассоциированных с ядерной оболочкой, с одной стороны, и мембранами цитобинтофорных вакуолей — с другой, на самом деле демонстрируют различные состояния одной и той же эндомембранной системы пеломикс и что такая уникальная органелла, как центральная вакуоль (депо цитобинтофов), также является элементом этой системы.

Ядерные тельца, обнаруженные нами в ядрах инцистированных амёб, морфологически идентичны «нуклеолам с включениями», которые Дэниелс с коллегами описали в ядрах взрослых пеломикс (Daniels et al., 1966). Различия касаются лишь локализации тех и других. В ядрах покоящихся особей нуклеолы распределены по всей кариоплазме, а в разделившихся ядрах эксцистирующихся и уже покинувших цисту пеломикс, так же как и у взрослых амёб (Daniels et al., 1966), нуклеолы располагаются в непосредственной близости от внутренней мембраны ядерной оболочки.

Подводя итог, необходимо еще раз подчеркнуть уникальность организации цист *P. palustris*, основными чертами которой являются наличие сложной трехслойной оболочки цисты, формирование гигантской центральной вакуоли, в которую оказываются заключенными все прокариотные цитобинтофы, а также присутствие в цитоплазме 4 ядер, оболочка которых несет длинные трубчатые выросты, ассоциированные с мембраной центральной вакуоли.

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

Гудков А., Чистякова Л., Серавин Л., Фролов А. 2004. Краткая история и современное состояние концепции пелобинтофов (класс Peloflagellata). Зоол. журн. 83 (6) : 643—654.

Серавин Л. Н., Гудков А. В. 1987. Жгутики пресноводной амёбы *Pelomyxa palustris*. Цитология. 29 (7) : 721—724.

Фролов А., Чистякова Л., Мальшиева М., Гудков А. 2005. Свето- и электронно-микроскопическое исследование *Pelomyxa prima* Gruber, 1884 (Pelobiontida). Цитология. 47 (1) : 89—99.

Chapman-Andresen C. 1971. Biology of the large amoebae. Annu. Rev. Microbiol. 25 : 27—48.

Chapman-Andresen C. 1978. The life cycle of *Pelomyxa palustris* J. Protozool. 25 : 42A.

Chavez L. A., Balamuth W., Gong T. 1986. A light and electron microscopical study of a new, polymorphic free-living amoeba, *Phreatamoeba balamuthi* n. g., n. sp. J. Protozool. 33 : 397—404.

Daniels E. W., Breyer E. P., Kudo R. R. 1966. *Pelomyxa palustris* Greeff. II. Its ultrastructure. Z. Zellforsch. 73 : 367—383.

Frolov A., Chystjakova L., Goodkovi A. 2004. A new pelobiont protist *Pelomyxa corona* sp. n. (Peloflagellata, Pelobiontida). Protistology. 3 : 233—241.

Frolov A., Chystjakova L., Goodkov A. 2005. A light- and electron-microscopical study of *Pelomyxa binucleata* (Gruber, 1884) (Peloflagellata, Pelobiontida). J. Protistol. 4 : 57—73.

Frolov A., Chystjakova L., Goodkov A., Skarlato S. 2006. Structure and development of *Pelomyxa gruberi* sp. n. (Peloflagellata, Pelobiontida). Protistology. 4 : 227—244.

Griffin J. L. 1988. Fine structure and taxonomic position of the giant amoeboid flagellate *Pelomyxa palustris*. J. Protozool. 35 : 300—315.

Hollande A. 1945. Biologie et reproduction des rhizopodes des genres *Amoeba* et *Pelomyxa* et cycle évolutif de l'*Amoebophilus destructor* nov. gen. nov. sp., Chytridinée (?) parasite de *Pelomyxa palustris* Greeff. Bull. Biol. France et Belgique. 79 : 31—66.

Kudo R. R. 1957. *Pelomyxa palustris* Greeff. 1. Cultivation and general observations. J. Protozool. 4 : 154—164.

Kudo R. R. 1959. *Pelomyxa* and related organisms. Ann. N. Y. Acad. Sci. 78 : 474—486.

Simpson A. G. B., Bernard C., Fenchel T., Patterson D. J. 1997. The organization of *Mastigamoeba schizophrenia* n. sp.: more evidence of ultrastructural idiosyncrasy and simplicity in pelobiont protists. Eur. J. Protistol. 33 : 87—98.

Walker G. A., Simpson G. B., Edgcomb V. P., Sogin M. L., Patterson D. J. 2001. Ultrastructural identities of *Mastigamoeba punctachora*, *Mastigamoeba simplex*, and *Mastigella commutans* and assessment of hypotheses of relatedness of the pelobionts (Protista). Eur. J. Protistol. 37 : 25—49.

Whatley J. M., Chapman-Andresen C. 1990. Phylum karyoblastea. In: Handbook of protocista. Boston: Jones and Bartlett Publ. 167—185.

Поступила 23 VIII 2006

THE MORPHOLOGICAL STUDY
OF THE CYSTS *PELOMYXA PALUSTRIS* GREEFF, 1874

A. O. Frolov,^{1,*} L. V. Chystjakova,² A. V. Goodkov,³ M. N. Malysheva¹

¹ Zoological Institute RAS, St. Petersburg, ² Biological Research Institute of St. Petersburg State University, and ³ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: frolov@online.ru

Pelomyxa palustris Greeff, 1874, is the only species of pelomixoid amoebas with the rest cysts in its life cycle. The morphology of the *P. palustris* has been studied by the light and electronic microscopy. Encystation of *P. palustris* under climatic conditions of North-West of Russia occurs within August—September. Rest cysts have a complex, trilaminar wall. Two inner lamina are the dense endocyst and the laminated mesocyst, thickness of each layer runs up to 0.6—0.7 μm. Thickness of the electron-dense ectocyst usually does not exceed

0.1—0.2 μm . The encysted cell of *P. palustris* has the unique structure. About 60 % of the cell volume are occupied by a huge vacuole placed in the center and filled up with the prokaryotic cytobionts. Different vacuoles, small vesicles of various nature, autophagosomes and lipid drops could be found inside that huge vacuole. The amoebae cytoplasm occupies the space in between endocyst's inner surface and the central vacuole. No any inclusions, prokaryotic cytobionts and most of cell organelles are absent in the cytoplasm. There are 4 large nuclei filled with relatively homogeneous karyoplasm lying in the cytoplasm. Nuclear envelope forms a lot of long tubular channels, running through the cytoplasm and lining the membrane of the central vacuole. Encysted pelomixoid stay in this state up until the beginning of excystation. Excystation of *P. palustris* in the studied region occurs in spring, during the latter half of April and the beginning of May. Cysts undergo complex morphofunctional changes, related to the reorganization of the wall and formation of young multinucleate amoebas. Only one wall lamina of the 3 initial ones is left up to the moment of excystation. The central vacuole endures ruination and its content penetrates into the cytoplasm. Pelomixoid nuclei divide twice. Prokaryotic cytobionts are localized in cytoplasm and in the perinuclear area. Young multinuclear species of *P. palustris* coming out of the cysts do not differ in their structure from the adult forms.

Key words: pelobionts, *Pelomyxa palustris*, life cycle, cysts, ultrastructure.
