

СВЕТО- И ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ *PELOMYXA FLAVA* SP. N. (ARCHAMOEBAE, PELOBIONTIDA)

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

¹ Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург

и ² Кафедра зоологии беспозвоночных С.-Петербургского государственного университета;

*электронный адрес: frolov@yandex.ru

Методами световой и электронной микроскопии изучена морфология нового вида пеломиксоидных амёб *Pelomyxa flava*. Покровы *P. flava* представлены плазмалеммой, несущей на своей наружной поверхности мощный слой слабо структурированного гликокаликса. Многочисленные жгутики часто расположены на вершинах коротких конических псевдоподий. Кинетосомы жгутиков, достигающие в длину 0.9 мкм, полые, с выраженным центральным филаментом. Корешковая система представлена тремя группами микротрубочек — радиальной, базальной и микротрубочками латерального корешка. Переходная зона короткая, не выходит за уровень поверхности клетки, аксонема характеризуется нестабильным набором микротрубочек. Трофические стадии цикла развития *P. flava* представлены двуядерными клетками, плазмотомия осуществляется на четырехъядерной стадии. Ядра имеют гранулярное строение. В кариоплазме отмечено наличие фибриллярных ядерных телец. Оболочка ядер имеет сложную организацию. Наружная мембрана несет на своей поверхности слой электронно-плотного материала, с которым контактируют короткие микротрубочки, располагающиеся у поверхности ядерной оболочки в один ряд. Кнаружи от микротрубочек расположены пузырьки и цистерны эндоплазматического ретикулума, производные ядерной оболочки. В эндоплазме *P. flava* отмечено наличие структурных и пищеварительных вакуолей, зерна гликогена. Выявлены три вида прокариотных цитобионтов. Впервые описаны крупные, достигающие 5 мкм в диаметре мультимембранные органеллы. Обсуждаются особенности морфологии и биологии *P. flava* в сравнении с ранее изученными видами пеломикс.

Ключевые слова: пелобионты, морфология, *Pelomyxa flava* sp. n., ультраструктура.

В отряд Pelobiontida объединяют обладающих жгутиками амёбоидных протистов, обитающих в илах стоячих или слабопроточных водоемов в анаэробных и микроаэробных условиях. Клетки пелобионтид характеризуются рядом специфических признаков, наличие которых определяет таксономическую целостность этой группы. Жгутики пелобионтид имеют одну непарную кинетосому, в их клетках отсутствуют такие органеллы, как митохондрии, гидрогеносомы и диктиосомы аппарата Гольджи. Традиционно пелобионтид разделяют на два таксона ранга семейства на основании особенностей организации их жгутикового аппарата. Мاستигамебиды (сем. Mastigamoebidae) обладают единственным подвижным жгутиком, обычно выполняющим локомоторную функцию. Клетки пеломиксид (сем. Pelomyxidae) имеют множество неподвижных или малоподвижных жгутиков, функционально не связанных с двигательной активностью клетки. Пеломиксиды — наименее изученная группа пелобионтид. До недавнего прошлого в литературе доминировала концепция монотипии рода *Pelomyxa* Greef, 1874, согласно которой все ранее описанные виды пеломикс сводились в синоним типового вида *P. palustris* Greef, 1874 и рассматривались в качестве стадий полиморфного жизненного цикла единственного вида (Whatley, Chapman-Andresen, 1990; Brugerolle, Patterson, 2002). Ошибочность данной концепции была доказана (Frolov et al., 2004, 2005, 2006;

Фролов и др., 2005) путем реизоляции, изучения ультраструктуры и циклов развития двух «забытых» видов пеломикс *P. binucleata* (Gruber, 1884) и *P. prima* (Gruber, 1884) и путем описания новых видов *P. corona* и *P. gruberi*. Эти исследования, кроме того, продемонстрировали уникальное разнообразие организации многих клеточных органелл у разных видов пеломикс, в ряде случаев ставящее под сомнение целесообразность объединения изученных организмов в один род *Pelomyxa* (Frolov, 2007). Предлагаемая работа посвящена изучению морфологии нового вида пеломикс *P. flava*, обнаруженного в водоемах Северо-Запада России.

Материал и методика

Исследования *P. flava* проводили на Северо-Западе России в 2006—2008 гг. Клетки получали из проб прибрежных илов стоячих и слабопроточных пресных водоемов, расположенных в районе пос. Ляды (Псковская обл.; около 58° 35' N, 28° 55' E) и пос. Сосново (Ленинградская обл.; 60° 30' N, 30° 30' E). В герметично закрытых сосудах емкостью 300 мл, 1/3 объема которых составлял ил, а 2/3 вода, амёбы выживали в лаборатории до 8 мес при 10—15 °C. Живые клетки изучали в закрытых микроаквариумах емкостью 2.5 мл³ или в капле воды

из той же пробы, под покровным стеклом с ножками. Исследования проводили в световом микроскопе Leica, который был снабжен системой визуализации, собранной на базе телекамеры Panasonic 650 CCTV, цифрового фотоаппарата Canon EOS350D и компьютера PC P4 с видеоадаптером NVIDIA GeForce FX5200. Все измерения выполнены на живых организмах с использованием системы анализа изображений IT v.3.0 (UTHSCSA). Для электронной микроскопии амёб фиксировали смесью, содержащей 5 % глутаральдегида (Sigma-Aldrich, Германия) и 0.5 % OsO₄ (Fluka, Германия), в 0.1 М какодилатном буфере (Serva, Германия). Фиксацию проводили на тающем льду и в темноте (4 ч) с полной заменой фиксатора через 15 мин после начала процедуры. Затем амёб промывали в 0.1 М какодилатном буфере (15 мин) и постфиксировали в 2%-ном растворе OsO₄ в 0.1 М какодилатном буфере (1 ч, в темноте на тающем льду). После обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации материал заключали в смесь Аралдита с Эпоном (Fluka, Германия). Для облегчения процедуры получения ультратонких срезов клетки, залитые в смолу, обрабатывали раствором, содержащим 10 % плавиковой кислоты. Срезы готовили при помощи ультрамикротомы Reichert и изучали в электронном микроскопе Tesla BS-300. Оцифровку негативов проводили с помощью широкоплечного слайд-модуля HP Scan Jet 5370C при 600 dpi.

Результаты

Pelomyxa flava sp. n.

Диагноз. Подвижные пеломиксы с цилиндрической формой тела. Цитоплазма прозрачная, за счет включений окрашена в интенсивно желтый или желто-зеленый цвет. Размер клеток от 100 (молодые особи) до 300 (взрослые локмотонные формы) мкм. Гиалоплазма не выражена. В жизненном цикле преобладает двуядерная стадия, плазматомия происходит на четырехъядерной стадии. Ядра гранулярного типа, фрагментированный материал ядрышка располагается по периферии ядра. На всех стадиях цикла оболочка ядра окружена микротрубочками, расположенными в один ряд. Жгутики неподвижные, аксонема с нестабильным набором микротрубочек, отличным от 9+2. Базальная часть жгутика глубоко погружена в цитоплазму и ассоциирована с тремя группами микротрубочковых дериватов. Переходная зона короткая и лишена каких-либо дополнительных элементов. Эндосимбиоты представлены крупными палочковидными бактериями с выраженной продольной бороздкой (cleaft) и двумя видами более мелких палочковидных бактерий.

Местообитание и особенности поведения. *P. flava* обитают в заболочиваемых стоячих и слабопроточных пресных водоемах на глубине 20—50 см. Питаются главным образом одноклеточными водорослями. В пищеварительных вакуолях особенно многочисленны представители хлорофитовых и ксантофитовых.

Дифференциальный диагноз. От большинства известных видов пеломикс в световом микроскопе *P. flava* хорошо отличается прозрачной цитоплазмой, окрашенной в ярко-желтый или золотисто-зеленый цвет, и наличием двух ядер. От двуядерных *P. binucleata* надежно отличается организацией ядер (гранулярные у *P. flava* и пузырьковидные у *P. binucleata*), вдвое меньшим их размером (около 20 и 40 мкм соответственно) и отсутствием выраженной зоны гиалоплазмы.

Световая микроскопия. *P. flava* была обнаружена в небольших слабопроточных водоемах, зарастающих сфагнумом, в Псковской и Ленинградской областях. В пробах ила клетки *P. flava* выделяются своей подвижностью и яркой желтой окраской. Находящиеся в движении пеломиксы имеют цилиндрическую форму тела (рис. 1, а). Длина крупных особей достигает при этом 300 мкм. Цитоплазма прозрачная, в ней хорошо заметны ядра, пищевые включения и многочисленные светопреломляющие мелкие гранулы желтого цвета. Основу пищевого рациона *P. flava* составляют одноклеточные водоросли. Среди них преобладают представители хлорофитовых и ксантофитовых (рис. 1, б, в), значительно меньшая доля приходится на диатомовые водоросли. Кроме мелких форм в пищеварительных вакуолях *P. flava* постоянно встречаются свернутые в спираль крупные клетки ксантофитовых водорослей *Ophyocytium* sp. (рис. 1, а—в). Гиалоплазма не выражена ни у пассивных, ни у активно передвигающихся особей *P. flava*. Форма уроида варьирует от бульбовидной до ризоидовидной (рис. 1, з). Система структурных вакуолей хорошо развита, однако, вакуоли упакованы неплотно. В цитоплазме присутствует множество палочковидных бактерий. Гликоген найден только в клетках, имеющих более 2 ядер. Его зерна имеют более или менее правильную овальную форму, величина продольной оси которых варьирует от 10 до 45 мкм. Количество гликогеновых включений в клетке невелико и обычно исчисляется 3—4 десятками на клетку. В природных популяциях *P. flava* около 95 % клеток имеют 2 ядра, остальные особи обладают 3 или 4 морфологически сходными ядрами. Свободно перемещающиеся с токами цитоплазмы ядра *P. flava* имеют гранулярное строение (рис. 1, д). В центре ядер находится зона относительно гомогенной нуклеоплазмы. По их периферии располагается материал средней оптической плотности, в котором локализуются сферические нуклеолоподобные тельца. Диаметр ядер, измеренных в живых, не компрессированных клетках *P. flava*, варьировал от 19 до 23 мкм (среднее 20.41 ± 1.94 мкм). Одноядерных *P. flava* в процессе исследований не было обнаружено. Однако в августе—сентябре 2006—2008 гг. в пробах из водоемов Псковской обл. мы изредка встречали мелких (около 65 мкм в диаметре) пеломикс с прозрачной цитоплазмой, окрашенной в желтый цвет, у которых при наблюдении в световом микроскопе ядра не выявлялись вовсе.

Электронная микроскопия. Поверхность клеток *P. flava* сформирована за счет плазматической мембраны, несущей на своей наружной поверхности слой филаментозного гликокаликса (рис. 2, а, ж). Этот слой может достигать в толщину 1 мкм и более. Тонкие (5—7 нм) филаменты, являющиеся его основным компонентом, располагаются рыхло, на значительном расстоянии друг от друга. На большем своем протяжении плазмалемма граничит непосредственно с эндоплазмой. Эктоплазма обнаруживается локально, в местах формирования виллей, главным образом в зоне уроида (рис. 2, ж). Эндоплазма содержит большое количество структурных и пищеварительных вакуолей, в пространствах между которыми находятся остальные клеточные органеллы и включения. У *P. flava* обнаружены три вида прокариотных цитобионтов (рис. 2, б—з). Эти организмы, как правило, не образуют смешанных субпопуляций, а располагаются в цитоплазме *P. flava* обособленными гнездами, количество особей в которых может исчисляться десятками. Все три вида цитобионтов хорошо различаются меж-

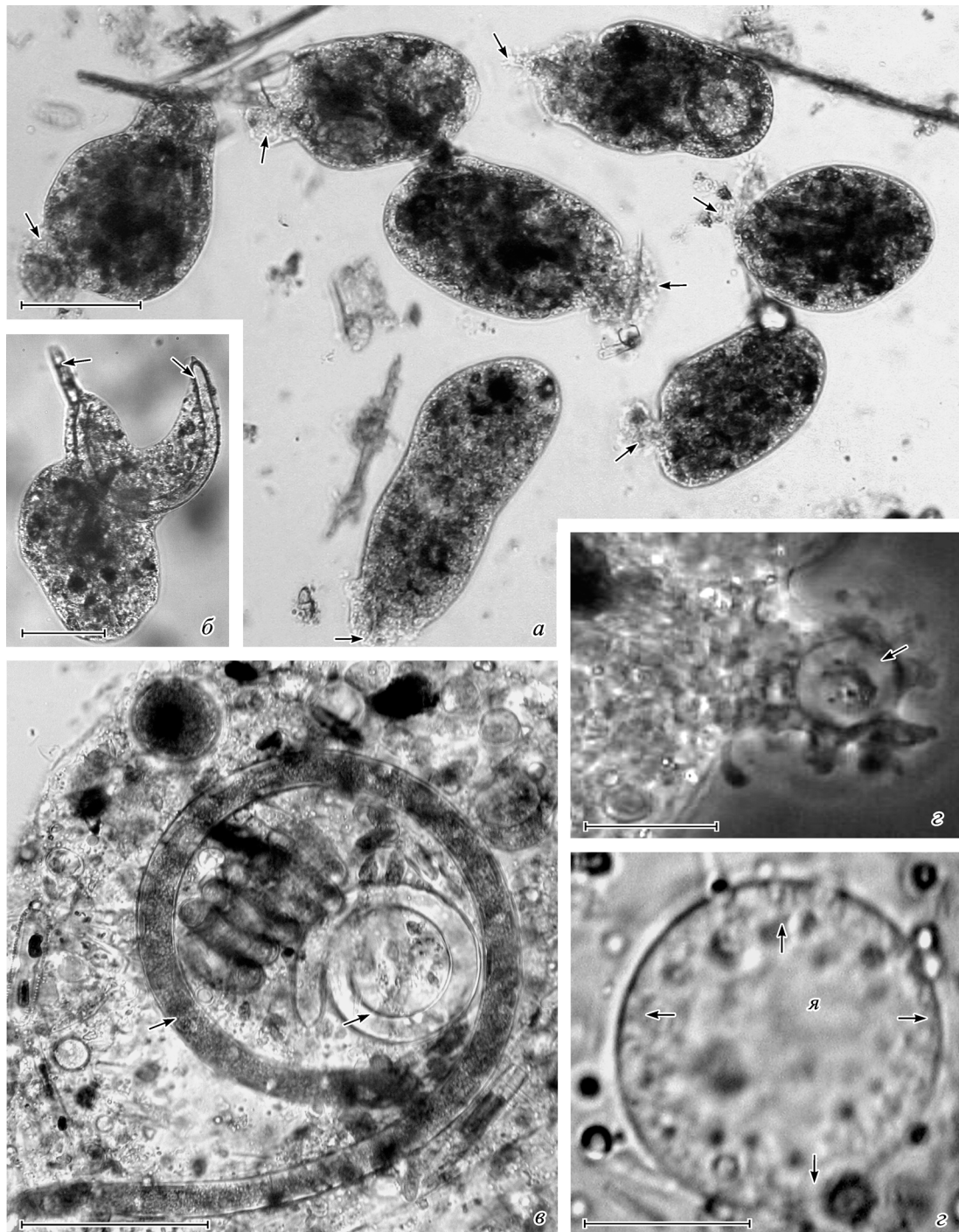
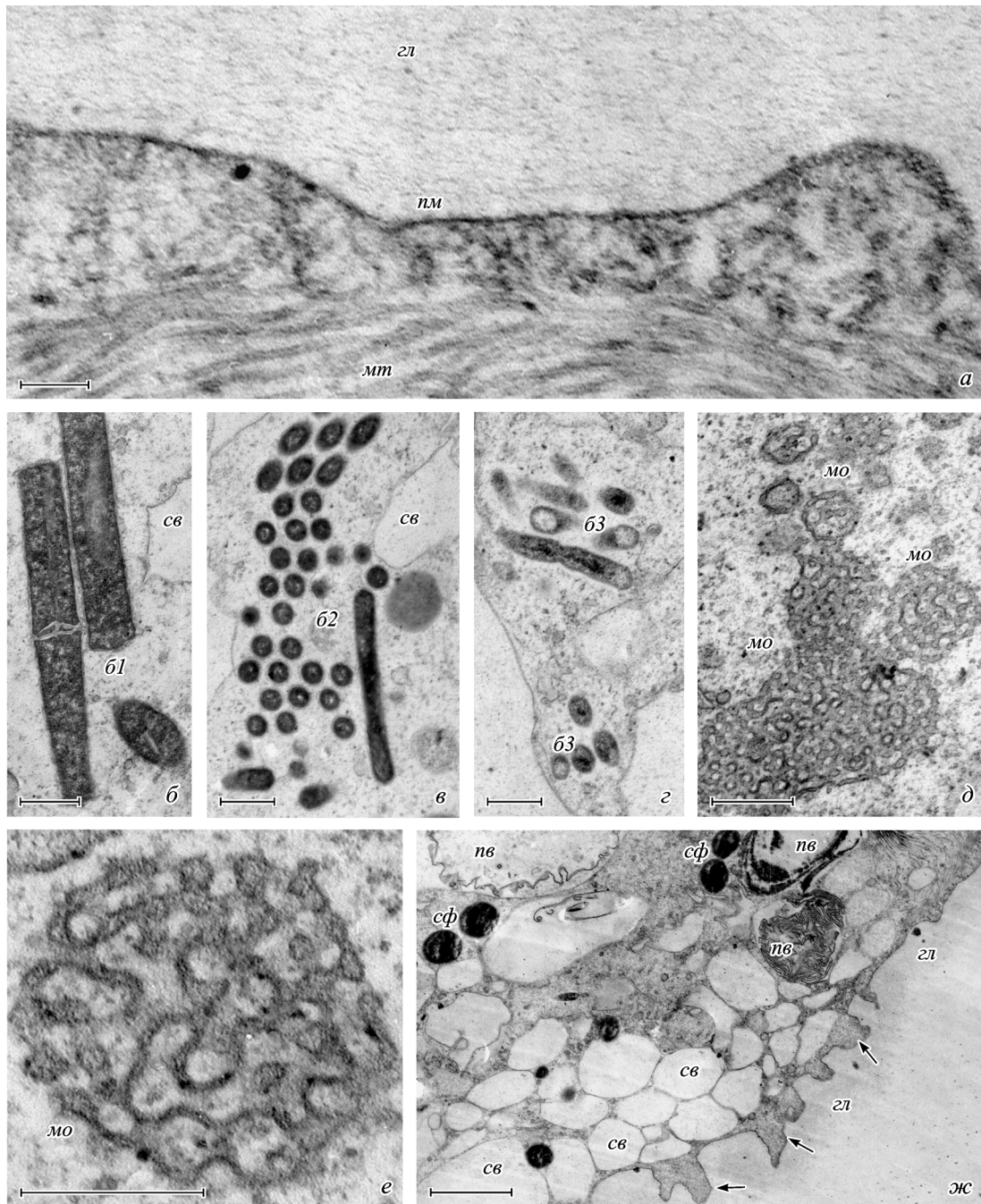


Рис. 1. Морфология клеток *Pelomyxa flava* в световом микроскопе.

a — клетки *P. flava* in vivo с различной степенью выраженности уроида (стрелки); *б* — захват клеткой *P. flava* ксантофитовой водоросли *Ophyocytium* sp. (стрелки); *в* — цитоплазма *P. flava* с пищеварительными вакуолями, содержащими клетки *Ophyocytium* sp. (стрелки); *г* — уرويد *P. flava* со сформированной фагоцитозной вакуолью (стрелка); *д* — ядро (*я*) *P. flava* с периферически расположенным гранулярным материалом (стрелки). Увел.: *а, б* — об. 10×, ок. 10×; *в, д* — об. 100×, ок. 10×; *г* — об. 40×, ок. 10×. Масштабные отрезки: *а, б* — 100 мкм; *в, г* — 15 мкм; *д* — 10 мкм.

ду собой по морфологии и представляют собой три отчетливых размерных класса. Наиболее крупные бактерии достигают в длину 6.0 мкм при диаметре 0.8 мкм. Их отличительной чертой является наличие щелевидного продольного впячивания оболочки (так называемого *cleft*), которое может достигать центра клетки (рис. 2, б). Второй вид прокариотных цитобионтов представлен более мелкими палочковидными бактериями. Их длина не

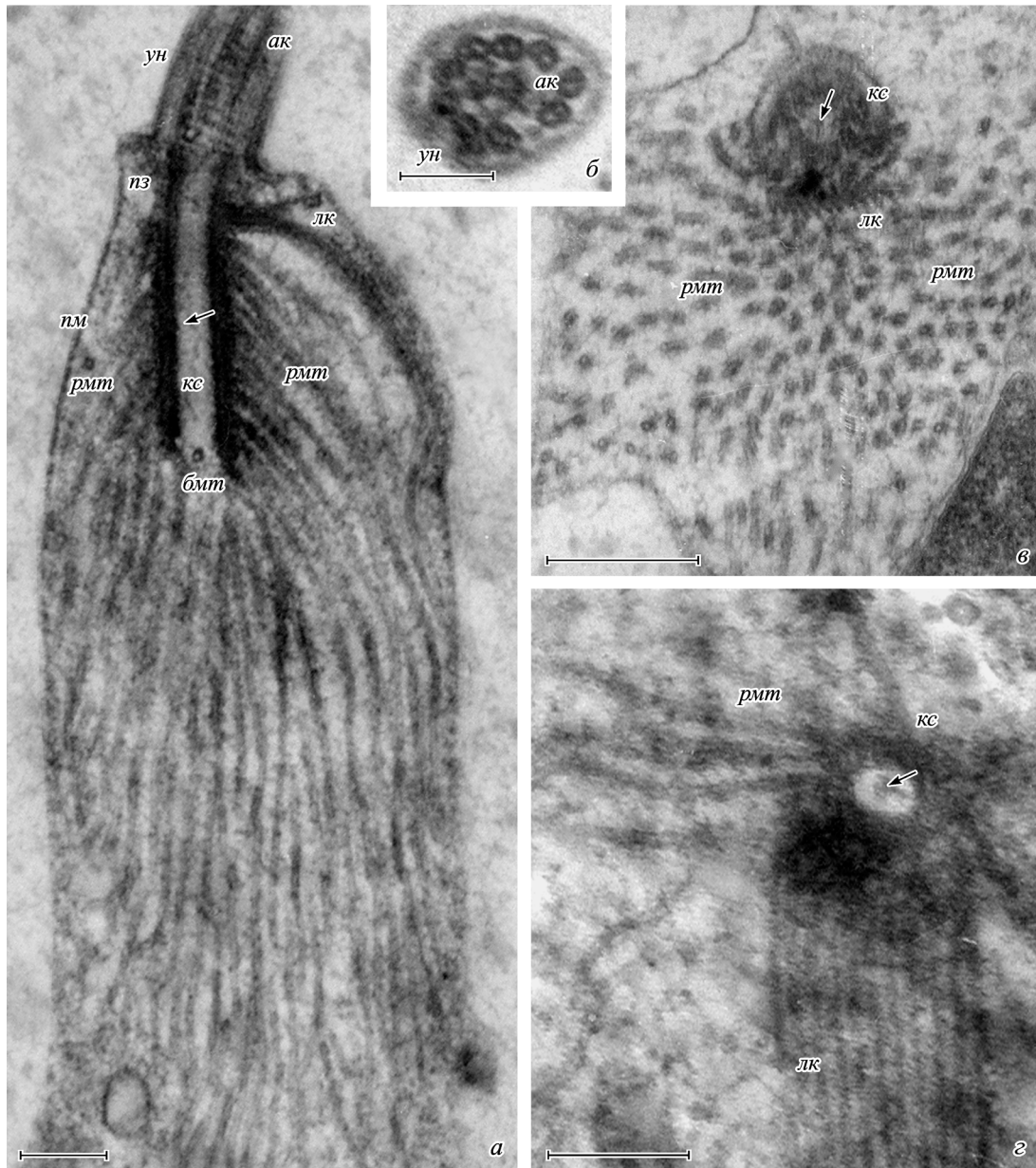
превышает 3 мкм, а диаметр 0.3 мкм. Внутриклеточный матрикс этих организмов отличается высокой электронной плотностью (рис. 2, в). Третий вид цитобионтов также представлен палочковидными бактериями. Их клетки имеют длину 1.5 мкм при диаметре 0.3 мкм. Внутриклеточный матрикс этих организмов электронно-прозрачный, в центре клетки вдоль ее продольной оси располагается хорошо выраженный нуклеоид (рис. 2, г). Еще одним

Рис. 2. Ультраструктура *Pelomyxa flava*.

a — фрагмент поверхности клетки *P. flava*; *б–г* — три типа прокариотных цитобионтов, обитающих в цитоплазме *P. flava*; *д, е* — мультимембранные органеллы в цитоплазме *P. flava*; *ж* — фрагмент поверхности клетки *P. flava* в зоне формирования уроида (стрелки). *б1* — крупные палочковидные бактерии с продольным втягиванием поверхности клетки, *б2* — метаногенные бактерии *Metanobacterium formicicum*, *б3* — мелкие палочковидные бактерии с выраженным нуклеоидом. *зл* — гликокаликс, *мо* — мультимембранные органеллы, *мт* — микротрубочки, *пв* — пищеварительные вакуоли, *пм* — плазмалемма, *св* — структурные вакуоли, *сф* — электронно-плотные сферические включения. Масштабные отрезки: *a* — 0.2 мкм; *б–д* — 1 мкм; *е* — 0.5 мкм; *ж* — 3 мкм.

компонентом цитоплазмы *P. flava* являются крупные, до 1.5 мкм в диаметре, сферические включения высокой электронной плотности (рис. 2, *ж*). Они не окружены мембраной и, вероятно, соответствуют светопреломляющим гранулам, видимым под световым микроскопом. Возможно, эти включения имеют липидную природу. В цитоплазме *P. flava* также обнаружены необычные мультимембранные органеллы (рис. 2, *д, е*). Их профили, имеющие диаметр от 0.5 до 5 мкм, встречаются на срезах

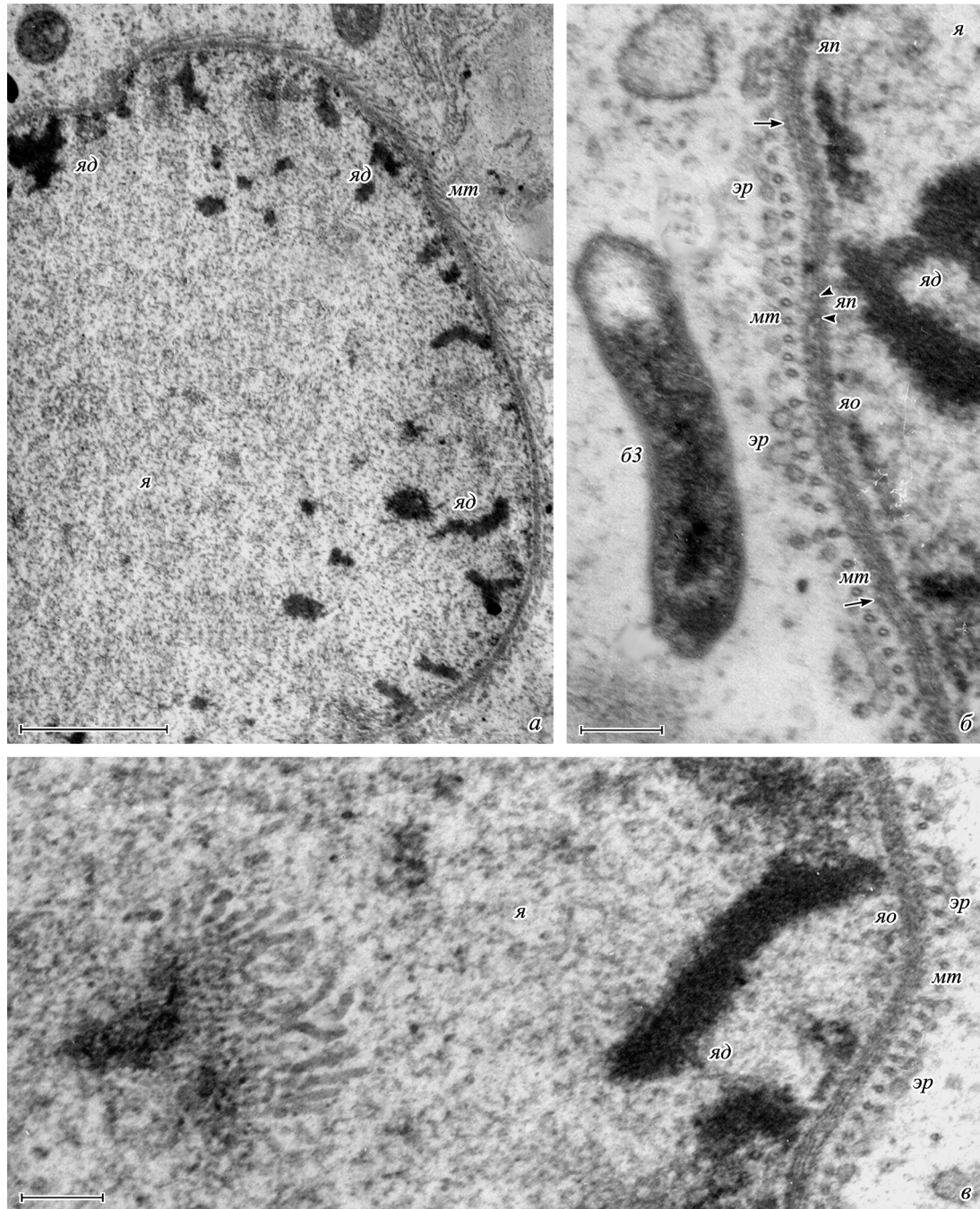
различных участков клетки. Одиночные органеллы имеют сферическую форму и средний диаметр около 1 мкм (рис. 2, *е*). Более крупные имеют неправильную форму (рис. 2, *д*). На срезах часто можно видеть, как в непосредственной близости от крупных органелл располагаются более мелкие формы, а иногда и наблюдать «отпочковывание» последних (рис. 2, *д*). Эти необычные структуры имеют сложную пространственную организацию. Они представляют собой совокупность концентрически распо-

Рис. 3. Жгутики *Pelomyxa flava*.

a — базальная часть жгутика *P. flava*, расположенного на вершине конической псевдоподии; *б* — поперечный срез ундулиподии; *в, г* — поперечный срез через кинетосому жгутика на уровне формирования латерального корешка. *ак* — аксонема, *бмт* — группа базальных микротрубочек, *км* — кинетосома, *лк* — микротрубочки латерального корешка, *пз* — переходная зона жгутика, *рмт* — радиальные микротрубочки, *ун* — ундулиподия жгутика; стрелками обозначен центральный филамент кинетосомы. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2. Масштабные отрезки: *a, в, г* — 0,2 мкм; *б* — 0,1 мкм.

ложенных, ограниченных мембранами ламелл, заполненных электронно-плотным матриксом. Ламеллы пронизаны множеством отверстий и могут анастомозировать друг с другом. Таким образом, внутри органелл создается единая лакунарная система, заполненная цитоплазмой пеломиксы. Клетки *P. flava* обладают многочисленными жгутиками. В периферической цитоплазме в значительном количестве обнаруживаются базальные тела жгутиков и многочисленные микротрубочки их дериватов. Жгутики могут локализоваться как на неизменных участках поверхности клеток, так и на вершинах небольших конических псевдоподий (рис. 3, *a*), спонтанно возникающих главным образом в задней части тела пеломикс. Для жгутиков *P. flava* характерно наличие очень длинных, дости-

гающих 0,9 мкм полых кинетосом с выраженным центральным филаментом (рис. 3, *a, в, г*). Кинетосомы полностью погружены в цитоплазму. Три группы микротрубочек морфологически связаны с этим отделом жгутиков *P. flava* (рис. 3, *a, в, г*). От боковой поверхности кинетосомы в цитоплазму отходит около 130 радиальных микротрубочек (рис. 3, *a, в*). Они располагаются в 8—10 рядов по 10—15 микротрубочек в каждом от границы с переходной зоной до основания базального тела. В дистальной части кинетосомы в рядах радиальных микротрубочек имеется брешь, заполненная электронно-плотным материалом, в котором берут начало 11 микротрубочек латерального корешка (рис. 3, *a, в, г*). В виде компактной ленты эти микротрубочки отходят от кинетосомы и лока-

Рис. 4. Ядро *Pelomyxa flava*.

a — тонкое строение *P. flava*; *б* — строение ядерной оболочки *P. flava*; *в* — ядерное тельце в нуклеоплазме ядра *P. flava*. *яд* — ядрышко, *яо* — ядерная оболочка, *яп* — ядерная пора, *эр* — эндоплазматический ретикулум; *стрелками* обозначен электронно-плотный материал на поверхности ядерной оболочки. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1—3. Масштабные отрезки: *a* — 3 мкм; *б*, *в* — 0.25 мкм.

лизуются под плазмалеммой клетки. Еще 10—15 микротрубочек формируют рыхлый базальный пучок, который отходит от основания кинетосомы. Глубоко в цитоплазму микротрубочки ни одной из этих групп не проникают. Переходная зона жгутиков не превышает в длину 250 нм и располагается непосредственно под поверхностью клетки. В ней сохраняется центральный филамент, однако, никаких дополнительных структур не обнаруживается. Ундулиподия достигает в диаметре 400 нм. Аксонема имеет нестандартную аранжировку микротрубочек (рис. 3, *б*), отличную от классической формулы $9 \times 2 + 2$.

Оба ядра двуядерных особей *P. flava* имеют сходную ультраструктурную организацию (рис. 4, *a—в*). Оболочка ядер построена за счет двух тесно прилегающих друг к другу мембран, пронизанных порами. На наружной поверхности ядерной оболочки находится слой электронно-плотного войлокоподобного материала, толщина которого составляет около 30 нм. Кнаружи от него на расстоянии 30—40 нм локализованы микротрубочки (рис. 4, *a—в*). Они располагаются строго параллельно друг другу в один ряд, с промежутками в 40—50 нм. Свободные концы микротрубочек могут продолжаться за границу ядер-

ной оболочки на 1.0—1.5 мкм. На срезах отчетливо виден фибриллярный материал, соединяющий микротрубочки с наружным электронно-плотным слоем ядерной оболочки (рис. 4, б, в). Непосредственно над микротрубочками, также в один ряд, располагаются цистерны эндоплазматического ретикулума (ЭПР) диаметром 30—70 нм. Часто можно наблюдать, как фибриллярный материал проникает в пространство между микротрубочками и контактирует с мембранами ЭПР. Никаких иных структур, кроме наружного слоя ядерной оболочки, которые могли бы претендовать на роль центров организации микротрубочек (ЦОМТ), ассоциированных с ядром микротрубочек, в окооядерной цитоплазме *P. flava* нами не обнаружено. Центральная часть ядра заполнена относительно гомогенной, электронно-светлой кариоплазмой (рис. 4, а, в). По периферии ядра в кариоплазме расположены электронно-плотные тяжи ядрышкоподобного материала, местами прилегающие к внутренней мембране ядерной оболочки (рис. 4, а—в). В непосредственной близости от них обнаружены ядерные тельца, представленные клубками фибрилл различного диаметра (рис. 4, в).

Обсуждение

До настоящего времени методами световой и электронной микроскопии была изучена морфология 6 видов пеломикс. Накопленные в этих исследованиях факты позволили более четко определить признаки, которые можно рассматривать как специфические для данной группы простейших. К числу таковых в первую очередь следует отнести сочетание в одной клетке двух различных морфофункциональных двигательных систем: периферического цитоскелета, обеспечивающего амебоидное движение, и развитого жгутикового аппарата, не выполняющего, однако, двигательной функции. Другой характерной особенностью клеток пеломикс является их многоядерность в сочетании с многожгутиковостью. На основании этих двух групп признаков принадлежность того или иного организма к роду *Pelomixa* может быть установлена уже методами световой микроскопии. К числу характерных ультраструктурных признаков группы относятся отсутствие в клетках пеломикс митохондрий, диктиосом аппарата Гольджи и наличие в цитоплазме прокариотных цитобинтов. Таким образом, *P. flava*, изученная в процессе данной работы, по своей морфологии полностью отвечает критериям, установленным для представителей рода *Pelomixa*, и должна быть включена в его состав. Наряду с этим *P. flava* обладает целым рядом специфических черт, существенно отличающих этот организм от других известных видов пеломикс. Ранее мы уже обсуждали вероятную связь окраски цитоплазмы пелобинтов со специфичностью их питания (Frolov et al., 2005, 2006). Так, преобладающая зеленая окраска цитоплазмы *P. binucleata* связана с наличием в пищеварительных вакуолях этой пеломиксы большого числа одноклеточных зеленых водорослей, длительное время сохраняющих пигментацию, а бежево-коричневая окраска *P. gruberi* объясняется питанием этой пеломиксы мелкодисперсным детритом (Frolov et al., 2005, 2006). Основу пищевого рациона *P. flava* составляют различные представители хлорофитовых и ксантофитовых водорослей. При этом пигментные включения, обеспечивающие желтую окраску цитоплазмы пеломиксы, обнаруживаются и в клетках перевариваемых водорослей, и в цитоплазме амеб. Заслуживает внимания

выявленный факт узкой пищевой специализации *P. flava*, связанный с избирательным захватом довольно крупного организма, каким являются ксантофитовые водоросли рода *Ophyocytium*. Эти водоросли обитают главным образом в сфагновых болотах, и питание ими *P. flava* в этом биотопе не выглядит неожиданным, даже если учесть, что другие массовые виды болотных пеломикс, например, *P. binucleata* и *P. corona*, способные захватывать крупные нитчатые водоросли, клетки *Ophyocytium* игнорируют. Замечательно, однако, что и в других биотопах, например, в озерах Карельского перешейка с твердыми песчаными берегами, в которых и *Ophyocytium*, и *P. flava* встречаются чрезвычайно редко, в цитоплазме этих пеломикс всегда удается обнаружить клетки *Ophyocytium*. Как уже не раз отмечалось, одной из характерных черт организации пеломикс является их многоядерность. При этом условно можно выделить три группы пеломикс, различающихся по этому признаку. К первой, характеризующейся небольшим количеством ядер (менее 8), до настоящего времени принадлежал единственный вид *P. binucleata* (Gruber, 1884; Frolov et al., 2005). Вторая группа, представленная *P. gruberi* и *P. tertia*, включает в себя виды, многоядерные стадии которых могут содержать от 8 до 64 ядер (Gruber, 1884; Frolov et al., 2006). И наконец, третья, и самая многочисленная группа, объединяет пеломикс, таких как *P. palustris*, *P. corona* и *P. prima*, зрелые стадии которых способны формировать сотни и даже тысячи ядер (Whalley, Chapman-Andresen, 1990; Brugerolle, 1991; Brugerolle, Patterson, 2002; Гудков и др., 2004; Frolov et al., 2004, 2005). По этому признаку *P. flava* оказывается в одной группе с *P. binucleata*. У обоих видов наиболее продолжительными стадиями развития являются двуядерные амебы. Однако следует заметить, что двуядерные стадии этих видов негомологичны с точки зрения их места в жизненных циклах пеломикс. Если у *P. binucleata* двуядерными стадиями цикл завершается (Gruber, 1884; Frolov et al., 2005) и следующая далее плазмотомия приводит к формированию одноядерных амеб, то у *P. flava* двуядерные стадии являются начальными стадиями развития, а плазмотомия происходит лишь по достижении пеломиксами четырехядерного состояния. Таким образом, двуядерность доминирующих в циклах развития этих пеломикс стадий не может использоваться в качестве признака, сближающего оба вида. Наряду с отмеченными особенностями, новый вид отличает и своеобразная организация жгутикового аппарата. Основание жгутиков у всех исследованных ранее видов пеломикс представлено одиночной кинетосомой. Можно выделить две группы пеломикс, жгутики которых обладают либо короткими, либо длинными кинетосомами. Короткие кинетосомы (длина в среднем составляет 100—200 нм) характерны для *P. palustris*, *P. stagnalis* и *P. binucleata*. Длинные кинетосомы (длина которых может достигать 1.2 мкм) обнаружены у *P. prima*, *P. gruberi* и *P. flava*. С кинетосомами жгутиков у пеломикс связано определенное количество микротрубочковых дериватов, причем этот признак заметно варьирует в пределах группы. Исходным, по всей видимости, может считаться вариант строения, характерный для большинства одножгутиковых пелобинтов (Walker et al., 2001). В этом случае с кинетосомой связаны три группы микротрубочек: латеральный корешок, радиальные микротрубочки и ядерный конус микротрубочек. Три типа микротрубочковых дериватов характерны для пеломикс, жгутики которых обладают длинными кинетосомами: *P. prima*, *P. gruberi* и *P. flava*. Кинетосомы жгутиков этих пеломикс

оказаны электронно-плотным, войлокоподобным материалом, из которого берут начало радиальные микротрубочки. При этом у *P. prima* и *P. flava* с кинетосомой связаны все три группы микротрубочек (Фролов и др., 2005) — латеральный корешок, радиальные микротрубочки и базальные микротрубочки (вероятный аналог ядерного конуса мастигагеб). У *P. gruberi* отсутствует латеральный корешок, однако, имеются не один, а два пучка базальных микротрубочек (Frolov et al., 2006). В противоположность этим трем видам, для жгутиков таких пеломикс, как *P. binucleata* и *P. palustris*, характерно наличие коротких кинетосом, с которыми ассоциирована единственная группа немногочисленных радиальных микротрубочек (Griffin, 1988; Frolov et al., 2005). Анализ выявленных различий позволяет сделать вывод о том, что строение корешковой системы базальной части жгутикового аппарата *P. flava*, *P. prima* и *P. gruberi* в большей степени схоже с таковым одножгутиковых пелобионтов, чем со строением базальной части жгутиков остальных пеломикс. Однако если в качестве оценочного критерия выбрать такой параметр, как длина кинетосом, то вывод поменяется на противоположный, поскольку именно *P. binucleata*, *P. stagnalis* и *P. palustris*, не имеющие развитой корешковой системы жгутиков, обладают короткими кинетосомами, типичными для одножгутиковых пелобионтид (Walker et al., 2001).

Наибольшее разнообразие бактериальных эндосимбионтов обнаружено у представителей рода *Pelomyxa* (Van Bruggen et al., 1983, 1985, 1988; Frolov et al., 2004, 2005, 2006; Frolov, 2007). При этом в цитоплазме пеломикс одновременно встречается несколько различных видов симбионтов. У исследованных к настоящему времени видов были обнаружены следующие симбиотические бактерии: 1. Так называемые *large-type*-симбионты; крупные бактерии (длина от 3 мкм и более, диаметр 0.8 мкм), их характерной особенностью является наличие щелевидного впячивания клеточной стенки, которое может достигать середины бактерии. 2. Бактерии с электронно-плотной бактериоплазмой, их длина в среднем составляет 2.5 мкм, диаметр — 0.2 мкм. Для *P. palustris* было показано, что эти симбионты — грамположительные метаногенные бактерии, относящиеся к виду *Metanobacterium formicicum* (Van Bruggen et al., 1988). При этом *large-type*-симбионты обнаружены у пяти, а *M. formicicum* — у семи из восьми изученных видов пеломикс. Кроме того, в цитоплазме *P. palustris* обнаружены грамотрицательные метаногенные бактерии, морфологически сходные с *M. formicicum*, но имеющие более закругленные концы клеток (Van Bruggen et al., 1988). У *P. stagnalis* отсутствуют *large-type*-симбионты, однако, обнаружены другие симбиотические бактерии. Для них характерна бактериоплазма средней электронной плотности, в которой хорошо заметен нуклеоид (Чистякова и др., 2005). У *P. binucleata* симбиотические бактерии морфологически сходны с *large-type*-симбионтами и метаногенами *M. formicicum*, однако имеют гораздо большие размеры (Frolov et al., 2005). Длина обоих видов бактерий варьирует от 3 до 30 мкм. У *P. flava* помимо *large-type*-симбионтов и метаногенов был обнаружен третий вид цитобионтов. Это палочковидные бактерии, их клетки имеют длину 1.5 мкм при диаметре 0.3 мкм. Внутриклеточный матрикс этих организмов электронно-прозрачный, в центре клетки, вдоль ее продольной оси располагается хорошо выраженный нуклеоид. Таким образом, у различных представителей рода *Pelomyxa* было обнаружено по меньшей мере пять морфологически различных видов симбиотических

бактерий. При этом только два из них, *large-type*-симбионты и метаногены *M. formicicum*, встречаются у подавляющего большинства пеломикс, остальные цитобионты, по-видимому, видоспецифичны.

Организация ядерного аппарата пеломикс также весьма разнообразна. Традиционно в этой группе организмов выделяют два основных морфотипа ядер — пузырьковидные и гранулярные. В ядрах первого типа ядрышковый материал сосредоточен преимущественно в центре ядра, такие ядра характерны для *P. prima*, *P. binucleata*, *P. gruberi* и *P. stagnalis*. В ядрах гранулярного типа ядрышковый материал локализуется по периферии ядра в виде множества мелких нуклеолоподобных телец. *P. flava* обладает ядрами именно данного типа, характерными кроме нее для *P. palustris* и *P. tertia*. Следует отметить отсутствие каких-либо корреляций между типом ядер и другими признаками, позволяющими выделять в пределах рода *Pelomyxa* те или иные группировки видов, как это было рассмотрено выше на примерах строения жгутикового аппарата и степени многоядерности пеломикс. Тонкое строение ядер *P. flava* отличается от строения ядер всех изученных до сих пор видов пеломикс. Ранее перманентная связь ядерной оболочки с цитоплазматическими микротрубочками была выявлена у *P. prima* и *P. gruberi* (Фролов и др., 2005; Frolov et al., 2006). Однако ядерная оболочка этих пеломикс имеет простое двухмембранное строение, и пучки микротрубочек подходят к ядерной оболочке из глубины цитоплазмы. Морфологически эти пучки идентичны базальным кинетосомальным пучкам микротрубочек. У *P. flava* ядерная оболочка имеет сложное, многослойное строение. Короткие микротрубочки, окружающие ядро, не погружаются глубоко в цитоплазму. Дистальные концы микротрубочек не связаны ни с какими структурами, в то время как базальные погружены в электронно-плотный материал, расположенный на поверхности ядерной оболочки, который, вероятно, исполняет роль общего центра организации всех околоядерных микротрубочек.

Исследование нового вида пеломикс *P. flava* в очередной раз продемонстрировало большое разнообразие видоспецифичных признаков, характерное для всех без исключения представителей этой своеобразной группы протистов. Одним из объяснений этого феномена, вероятно, может служить гипотеза о независимом происхождении большинства ее представителей (Frolov, 2007). Согласно этой гипотезе, полимеризация ядерного и жгутикового аппаратов могла происходить независимо в ряде групп исходно одножгутиковых и одноядерных пелобионтов из родов *Mastigamoeba* и *Mastigella*; в этом случае очевидно, что род *Pelomyxa* в его современной трактовке не может рассматриваться как монофилетическая группировка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00176).

Список литературы

- Гудков А., Чистякова Л., Серавин Л., Фролов А. 2004. Краткая история и современное состояние концепции пелобионтов (класс Peloflagellata). Зоол. журн. 83 (6) : 646—654.
- Фролов А., Гудков А., Чистякова Л., Мальшиева М. 2005. Свето- и электронно-микроскопическое исследование *Pelomyxa prima* Gruber, 1884 (Pelobiontida). Цитология. 47 (1) : 89—99.

Чистякова Л. В., Скарлато С. О., Сабанеева Е. В., Фролов А. О., Гудков А. В. 2005. Структурная организация ядерного аппарата амебидного протиста *Pelomyxa stagnalis* (Peloflagellata, Pelobiontida). Цитология. 47 (9) : 832.

Brugerolle G. 1991. Cell organization in free-living amotoc-hondriate heterotrophic flagellates. In: The biology of free-living heterotrophic flagellates. Oxford: Clarendon Press. 133—148.

Brugerolle G., Patterson D. 2002. Order Pelobiontida Page, 1976. In: An illustrated guide to the protozoa. Lawrence: Allen Press. 2 : 1097—1103.

Frolov A. 2007. Comparative morphology of pelobiontids. J. Protistol. 5 : 31.

Frolov A. O., Chystjakova L. V., Goodkov A. V. 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., Goodkov A., Chystjakova L., 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.

Gruber A. 1884. Studien uber Amoben. Zeit. Wiss. Zool. 41 : 186—225.

Van Bruggen J. J. A., Stumm C. K., Vogels G. D. 1983. Symbiosis of metanogenic bacteria and sapropelic protozoa. Arch. Microbiol. 136 : 89—95.

Van Bruggen J. J. A., Stumm C. K., Zwart K. B., Vogels G. D. 1985. Endosymbiotic metanogenic bacteria of the sapropelic amoeba *Mastigella*. FEMS Microbiol. Ecol. 31 : 187—192.

Van Bruggen J. J. A., van Rens G. L. M., Geertman E. G. M., Stumm C. K., Zwart K. B., Vogels G. D. 1988. Isolation of a metanogenic endosymbiont of the sapropelic amoeba *Pelomyxa palustris* Greeff. J. Protozool. 35 : 20—23.

Walker G., Simpson A. 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 protoctista. Boston: Jones and Bartlett Publishers: 167—185.

Поступила 19 II 2010

LIGHT- AND ELECTRON-MICROSCOPICAL STUDY OF *PELOMYXA FLAVA* SP. N.
(ARCHAMOEBAE, PELOBIONTIDA)

A. O. Frolov,¹* L.V. Chystjakova,² M. N. Malysheva¹

¹ Zoological Institute RAS, St. Petersburg, and ² Invertebrate Zoology Department of St. Petersburg State University;
* e-mail: frolov@yandex.ru

Using light and electron microscopy, the morphology of a new species of pelobionts *Pelomyxa flava* was studied. The coverings of *P. flava* are represented by plasma membrane bearing the thick layer of weakly structured glycocalyx on its outer surface. Numerous flagella are often located on the tops of short conical pseudopodia. Kinetosomes of flagella reach a length of 0.9 μm and are hollow with a pronounced central filament. Rootlet system is represented by three groups of microtubules: the radial, basal and microtubules of lateral root. The transition zone is short and does not exceed the level of cell surface; the axoneme is characterized by an unstable set of microtubules. Trophic stages of *P. flava* life cycle are presented by binuclear cells; plasmotomy is performed at the tetranuclear stage. Nuclei have a granular structure. Fibrillar nuclear bodies were revealed in karyoplasm. The nuclei shell has a complex organization. On its surface, the outer membrane has a layer of electron-dense material which contacts with short microtubules, located in a row at the surface of the nuclear envelope. The bubbles and cisterns of endoplasmic reticulum, which are the derivatives of the nuclear envelope, are located outward from the microtubules. The presence of structural and digestive vacuoles and grains of glycogen was noticed in *P. flava* endoplasm. Three types of prokaryotic cytobionts were revealed. Large multi-membranous organelles reaching 5 μm in diameter were described for the first time. We discuss morphology and biology features of *P. flava* in comparison with the previously studied *Pelomyxa* species.

Key words: pelobionts, morphology, *Pelomyxa flava*, ultrastructure.