КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ КЛЕТОК ДИМОРФНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ СТРЕССА.

[1]Зароченцева И.А., [2]Белостоцкая Г.Б., [1] Богомолова Е.В., [1] Панина Л.К.

[1]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

[2]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, Санкт-Петербург

Процессы стресс-ответа у клеток низших эукариот - полиморфных микромицетов - сопровождаются морфологическими преобразованиями различного характера и интенсивности. Обработка цифровых снимков культур микромицета Phaeococcomyces chersonesos с использованием возможностей программы ВидеоТесТ-Морфология 4.0 позволила показать, что доступность азота, осмолярность и ионный состав среды принадлежат к важнейшим управляющим параметрам при изменении формы роста у этого вида.

Изменение формы клеток и стратегии роста колонии - универсальный механизм ответа полиморфных микроскопических дрожжевых грибов на различные виды стресса. Многие микромицеты способны существовать в достаточно жестких условиях, непосредственно сталкиваясь с колебаниями температуры, химического состава среды и т.п. Считается, что эволюция этих низших эукариот шла по пути усовершенствования внутриклеточных систем восприятия, координации и интерпретации внешних сигналов, возрастания физиологической и морфологической пластичности при неизменном общем уровне организации [1,3]. Таким образом, микромицеты являются достаточно интересным объектом для исследования различных аспектов стресс-ответа эукариотической клетки.

При изучении морфологических преобразований, сопровождающих процессы адаптации полиморфных микромицетов, необходимы точные измерения большого количества клеток по нескольким выбранным параметрам. Исследуемые выборки с необходимостью должны быть достаточно велики для получения достоверных результатов, так как для объекта характерен некоторый разброс морфологических параметров даже на одной среде. Поэтому наиболее качественные результаты с более чем значительной экономией времени позволяет получить только компьютерный анализ изображений.

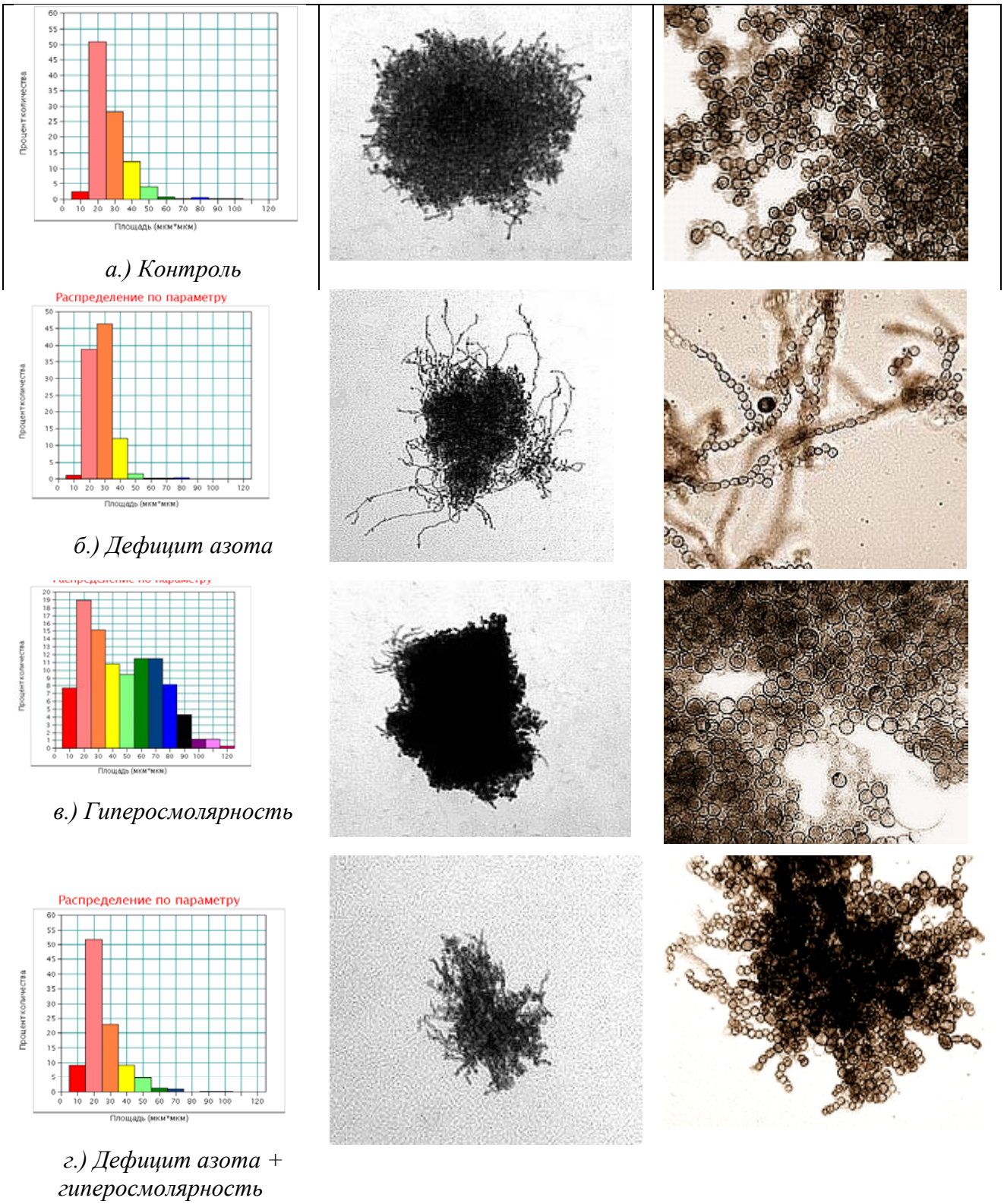
Анализ снимков экспериментальных культур микромицета *Phaeococcomyces chersonesos*, полученных при помощи цветной цифровой фотокамеры LEICA DC 300F (на базе светового микроскопа H605T (WPI, USA)), позволил показать, что доступность азота, осмолярность и ионный состав среды принадлежат к важнейшим управляющим параметрам при изменении формы роста у этого диморфного вида. Недостаток азота стимулирует развитие мицелия, составленного из длинных цепочек клеток, наряду с формированием толстостенных хламидоспор большого размера. Гиперосмолярность (0,5 – 1,2M NaCl) не дает ярко выраженных внешних эффектов. Однако на фоне дефицита азота осмостресс вызывает видимое укорочение цепочек мицелия, появление клеток увеличенного размера, аберрантных форм.

С использованием возможностей программы ВидеоТесТ-Морфология 4.0 (ООО ВидеоТесТ, С.-Петербург, Россия) были получены морфометрические данные клеток экспериментальных культур P. chersonesos и проведена автоматическая статистическая обработка большого количества изображений. Было проанализировано всего около 345 изображений; на каждом из снимков снимались данные по выбранным параметрам в среднем для 200 клеток. Гистограммы распределения клеток по классам по параметру «площадь» приведены на рис.1(а – г). Границы классов (ширина шага) были подобраны эмпирически, таким образом, чтобы в контроле отчетливо выделялись доминирующие классы.

Установлено, что при осмотическом стрессе общий средний размер клеток гриба увеличен (46, 15 ± 2,36 мкм^2) по сравнению с контролем (27, 13 ± 0,95 мкм^2), максимальное же значение составляет 125 мкм^2, что значительно превышает данные контроля - 96, 91 мкм^2. При недостатке азота средний размер практически не отличается от контроля (27,76 ± 0.53 мкм^2); максимальное значение по параметру самое низкое -75, 51 мкм^2, что фактически соответствует формированию небольшого количества крупных переживающих хламидоспор на общем фоне более мелких клеток. Состояние классов значительно меняется при осмострессе и дефиците азота. Для контроля характерно преобладание (около 80%) клеток классов 2 и 3 (15 – 25 мкм^2 и 25 – 35 мкм^2). Этот процент снижен при осмострессе (менее 35%), и несколько повышен при недостатке азота (около 85%). При осмострессе происходит наполнение крайних классов: примерно 55% клеток имеют площадь более 35 мкм^2 (в контроле около 20%) и около 8% - меньше 15 мкм^2 (в контроле около 3%). В контроле и при недостатке азота практически полностью отсутствуют клетки площадью более 85 мкм^2, тогда как при осмострессе появляется больший процент этих классов (классы 9 – 12). При недостатке азота только около 12% клеток имеют размер более 35 мкм^2, около 1% - менее15 мкм^2.

На комбинированной среде (дефицит азота плюс гиперосмолярность) картина распределения по классам напоминает контроль, и ближе к среде с дефицитом азота, чем к среде с осмострессом: только незначительно снижен процент наполненности средних классов (около 75%) и процент клеток очень большого (16%) размера, примерно соответствует осмострессу процент клеток очень малого размера (9%). Практически отсутствуют клетки классов 6 – 11 (больше 75 мкм^2).

Распределение по классам в данном эксперименте в целом отражает критический размер клеток объекта при переходе к делению. Таким образом, дефицит азота, возможно, приводит к более частым делениям; при одновременном переходе к мицелиальному (т.е. направленному, в отличие от беспорядочного дрожжевого) росту это может обеспечивать гораздо более быстрое распространение по субстрату (стратегия поиска более благоприятных условий). При осмотическом стрессе размер клеток увеличен, возможно, из-за задержки делений, вызванной необходимостью накопления достаточных количеств осмолитика внутри клетки (для выравнивания осмотического давления и избежания оттока воды из клетки). Кроме того, при увеличении размеров сферической дрожжевой клетки значение ее внутреннего объема возрастает значительно быстрее площади поверхности, что может играть роль в своеобразном физиологическом отграничении от внешней неблагоприятной среды [2]. Одновременное воздействие стресс-факторов с противоположными эффектами, очевидно, нарушает последовательную стратегию развития колонии и тем самым способствует снижению жизнеспособности, появлению аберрантных форм мицелия и отдельных клеток неправильной формы, снижению общей интенсивности роста.



а.) Контроль

б.) Дефицит азота

в.) Гиперосмолярность

г.) Дефицит азота + гиперосмолярность

Рисунок 1. Распределение по параметру площадь в культурах P. chersonesos. Класс 1 (красный) включает клетки площадью 5 – 15 мкм^2, класс 2 (розовый): 15 – 25 мкм^2, и т.д. (шаг 10 мкм^2). Отчетливо доминирующие классы 2 (розовый) и 3 (оранжевый), очевидно, представляют основную массу растущих и зрелых клеток стандартного размера. Рядом с каждой гистограммой приведены соответствующие снимки микроколоний в световом микроскопе (×130 и ×1300, масштаб сохранен приблизительно).

Литература

1. *Palecek S.P., Parikh A.S., Kron S.J.* Sensing, signaling and integrating physical processes during Saccharomyces cerevisiae invasive and filamentous growth.// Microbiology, 2002, N148, pp 893-907.
2. *Панина Л.К.* Структурно-функциональная реорганизация микромицетов в процессах формообразования и роста на труднодоступных субстратах. //автореферат дисс. на соиск. уч.ст. д.б.н., СПб, 2000.
3. *Тахтаджян А.Л.* Вопросы эволюционной морфологии растений. Л., 1954.