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

[1]Зароченцева И.А.
[2]Белостоцкая Г.Б.
[1]Богомолова Е.В.
[1]Панина Л.К.
[1]Санкт-Петербургский государственный университет
[2]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова

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 осмострессе 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.

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.