

## МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 582.262.24

МОРФОЛОГИЯ ПОРОВЫХ КАНАЛОВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ  
У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *EUASTRUM* RALFS (DESMIDIALES)О.В. Анисимова<sup>1,\*</sup>, О.В. Штаер<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Звенигородская биологическая станция и <sup>2</sup>кафедра микологии и альгологии, биологический факультет,  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12  
\*e-mail: anissimova@mail.bio.msu.ru

Было проведено исследование строения клеточной стенки у 10 видов *Euastrum* – *E. ansatum* (Ehrenb.) Ralfs, *E. bidentatum* Näg., *E. binale* (Turp.) Ehrenb. ex Ralfs, *E. dubium* Näg., *E. elegans* (Bréb.) Kütz. ex Ralfs, *E. germanicum* (Schmidle) W. Krieger, *E. oblongum* (Grev.) Ralfs ex Ralfs, *E. pectinatum* Bréb. ex Bréb. in Ralfs, *E. validum* West et G.S.West, *E. verrucosum* (Ehrenb.) ex Ralfs. Изучение ультраструктуры клеточной стенки позволило впервые установить, что поровый канал у 6 из 10 видов всегда имеет в той или иной степени извитую форму. Три представителя (*E. germanicum*, *E. pectinatum* и *E. verrucosum*) имели как извитые, так и прямые поровые каналы, *E. ansatum* – только прямые. Также был отмечен новый тип пор ( $P_7$ ), характерных только для представителей рода *Euastrum*. Отработан простой и эффективный метод подготовки клеток десмидиевых водорослей к исследованию на просвечивающем электронном микроскопе.

**Ключевые слова:** *Euastrum*, клеточная стенка, поровый канал, десмидиевые, таксономия, просвечивающий электронный микроскоп

Плакодермные десмидиевые водоросли – это группа одноклеточных представителей класса Conjugatophyceae, которые характеризуются симметричной формой клеток и специфической орнаментацией клеточной стенки. Особенностью этих водорослей является наличие пор, пронизывающих клеточную стенку. Образование и строение клеточных покровов изучали многие исследователи, начиная еще с конца XIX века, однако появление в XX веке сканирующего (СЭМ) и просвечивающего (трансмиссионного, ТЭМ) электронных микроскопов позволило детально изучить ультраструктуру покровов клеток. Электронно-микроскопические исследования клеточной стенки десмидиевых водорослей показали, что она образована тремя слоями [1, 2]. Наружный слой оболочки, за счет присутствия в нем пектиновых веществ, формирует слизистый чехол. Два внутренних слоя образованы фибриллами целлюлозы [3]. У представителей семейства Desmidiaceae в процессе деления первичная целлюлозная клеточная стенка сбрасывается сразу после формирования вторичной, пронизанной поровыми каналами [4]. К настоящему времени накоплен большой массив данных относительно строения и морфогенеза клеточной стенки и порового аппарата в семействе Desmidiaceae, однако исследования проводили только на нескольких представителях родов: одноклеточных – *Micrasterias* [1, 5], *Cosmarium* [6, 7], *Pleurotaenium* [3], *Oocardium* [8], *Staurastrum* [9], и нитчатых колониальных – *Bambusina*, *Desmidium*, *Hyalotheca*, *Spondylosium*, *Sphaerozosma* [10].

Детальное изучение порового аппарата десмидиевых водорослей с помощью СЭМ позволило описать 6 типов пор:  $P_1$  – двухуровневая поровая система “центральная слизевая пора”;  $P_2$  – поровое отверстие открывается в круглом поровом поле;  $P_3$  – схожие с  $P_2$ , но поровое поле более глубокое и узкое;  $P_4$  – поровое отверстие открывается на уровне клеточной стенки, без специальных углублений;  $P_5$  – поры, расположенные рядом с бородавками, открываются либо в их основании, либо на вершине;  $P_6$  – отверстие поры окружено валиком из клеточной стенки [11]. На примере 23 видов из 8 родов авторы показали, что наибольшее разнообразие поровых аппаратов встречается в родах *Euastrum* ( $P_1$ – $P_5$ ) и *Cosmarium* ( $P_2$ – $P_4$ ); в родах *Staurastrum*, *Micrasterias*, *Tetmemorus*, *Pleurotaenium* и *Xanthidium* встречаются преимущественно поры  $P_4$ , а поры  $P_6$  обнаружены только в роде *Desmidium*.

Ни в одной из публикаций не описано, как поровый канал пронизывает вторичную клеточную стенку десмидиевых водорослей. Из обильного иллюстративного материала, имеющегося в публикациях, можно заключить, что у всех таксонов канал является прямым цилиндрическим и только у *Staurastrum luetkemulleri* Donat at Ruttner [9] можно наблюдать извитой канал. Таким образом, насколько форма порового канала может варьировать у разных таксонов десмидиевых водорослей, остается неясным.

### Материалы и методы

Материалом для исследования послужили культуры 10 видов *Euastrum*, выделенные нами из болот Московской области – *E. bidentatum* Näg., *E. binale* (Turp.) Ehrenb. ex Ralfs, *E. germanicum* (Schmidle) W. Krieger, *E. validum* West et G.S. West, *E. verrucosum* (Ehrenb.) ex Ralfs, а также водоемов Карелии – *E. ansatum* (Ehrenb.) Ralfs, *E. dubium* Näg., *E. elegans* (Bréb.) Kütz. ex Ralfs, *E. oblongum* (Grev.) Ralfs ex Ralfs, *E. pectinatum* Bréb. ex Bréb. in Ralfs. Водоросли выращивали на питательной среде WH [12] с соблюдением следующих условий: фотопериод (свет/темнота, ч) 14/10, искусственное освещение светодиодами лампами (холодный белый) 5400 Лк, температура +12°C. Через 2 мес. культивирования водоросли были зафиксированы и подготовлены к исследованию с помощью ТЭМ (JEOL JEM-100В и JEOL JEM-1011, Япония). Фиксацию проводили 2,5%-ным формальдегидом в течение 1 ч при комнатной температуре, в качестве буфера использовали питательную среду WH (рН 7,0). Постфиксацию проводили 3%-ным раствором перманганата калия (1 ч). Обезвоживали материал в возрастающей концентрации этилового спирта (30%, 50%, 70%, 90%, 96%) по 10 мин. с последующим переносом в 100%-ный ацетон. В смеси смолы эпон и ацетона (1:1) материал выдерживали 24 ч, после чего переносили в смолу с катализатором и выдерживали 24 ч при температуре 37°C и 48 ч при температуре 60 °C. Серии срезов толщиной 80–120 нм были получены на ультрамикротоме Ultratom-3 (ЛКВ, Швеция), помещены на медные бленды и контрастированы цитратом свинца в течение 8 мин. (по Рейнольдсу). Такой метод подготовки материала позволяет хорошо сохранить клеточную стенку и в

минимальной степени нарушить содержание самой клетки.

### Результаты и обсуждение

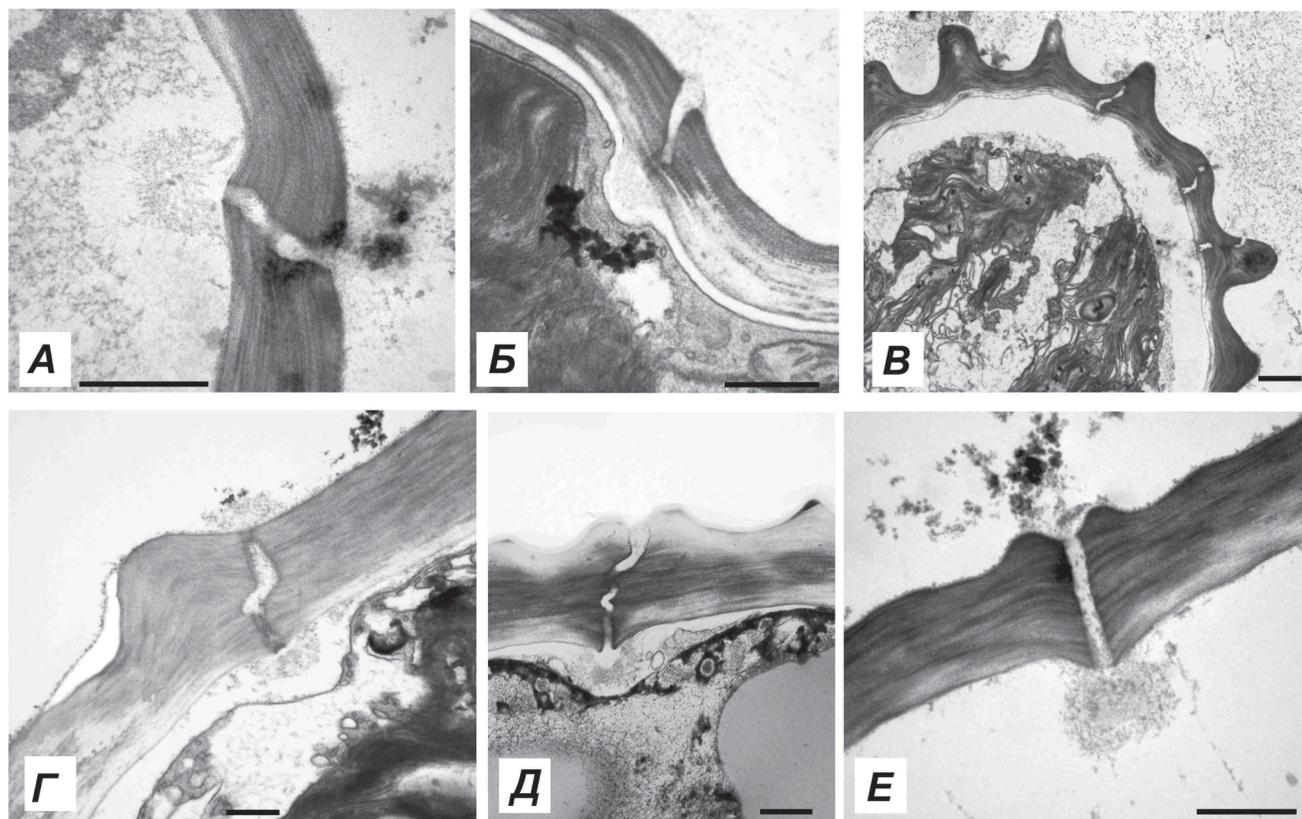
В результате исследования было показано, что форма порового канала у 6 из 10 изученных видов всегда имеет в той или иной степени извитую форму. У двух таксонов встречаются прямые и извитые, а у одного – только прямые каналы (таблица). Наиболее часто встречающийся поровый канал P<sub>4</sub> у разных видов всегда извит и имеет равномерную толщину на всем протяжении (рисунок, А, Б). Поровый канал P<sub>5</sub> всегда связан с бородавками (рисунок, В, Г), располагается в их основании или на вершине и также извит. У всех видов, несущих бородавки, такие поры присутствуют.

Предыдущее наше исследование [13] показало, что для рода *Euastrum* характерно наличие специфических ямок (скробикул, S<sub>1</sub>–S<sub>4</sub>) на поверхности клеточной стенки. При этом расположение и форма скробикул и пор всегда взаимосвязаны. Сопоставляя наши данные с классификацией пор, предложенной ранее [11], мы пришли к выводу, что тип пор P<sub>2</sub> необходимо переопределить. Так, поры типа 7 (P<sub>7</sub>) представляют собой сочетание одного из вариантов поры P<sub>2</sub>, описанной ранее, и скробикулы S<sub>2</sub>: поровый канал пронизывает утолщение клеточной стенки, которое окружено розеткой из нескольких (2–4) углублений-сегментов (рисунок, Д, Е). Такое строение поры встречается только у представителей рода *Euastrum*, поэтому его следует отличать от P<sub>2</sub>. Форма порового канала рассмотрена нами на примере двух видов – *E. ansatum* и *E. oblongum*, у которых скробикулы S<sub>2</sub> покрывают всю поверхность за исключением вершин лопастей и вздутий.

Таблица

Типы скробикул и пор у некоторых видов *Euastrum*

Таксон	Тип скробикул	Тип пор	Форма канала	Длина клетки, мкм	Толщина клеточной стенки, мкм	Диаметр пор, мкм
<i>Euastrum ansatum</i>	S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>4</sub>	P <sub>1</sub> , P <sub>3</sub> , P <sub>7</sub>	Прямой	65–102	0,49–0,65	0,07–0,09
<i>E. bidentatum</i>	S <sub>1</sub> , S <sub>3</sub>	P <sub>4</sub> , P <sub>5</sub>	Извитой	40–65	0,55–0,85	0,07–0,09
<i>E. binale</i>	S <sub>3</sub>	P <sub>4</sub> , P <sub>5</sub>	Извитой	14–36	0,30–0,40	0,05–0,09
<i>E. dubium</i>	S <sub>3</sub>	P <sub>4</sub> , P <sub>5</sub>	Извитой	22–38	0,30–0,40	0,05–0,09
<i>E. elegans</i>	S <sub>3</sub>	P <sub>4</sub> , P <sub>5</sub>	Извитой	24–38	0,37–0,77	0,05–0,09
<i>E. germanicum</i>	–	P <sub>4</sub> , P <sub>5</sub>	Извитой или прямой	52–66	0,58–0,88	0,09–0,14
<i>E. oblongum</i>	S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>4</sub>	P <sub>1</sub> , P <sub>3</sub> , P <sub>7</sub>	Извитой	119–204	0,90–1,20	0,09–0,20
<i>E. pectinatum</i>	–	P <sub>4</sub> , P <sub>5</sub>	Извитой или прямой	57–80	0,60–1,10	0,09–0,10
<i>E. validum</i>	S <sub>3</sub>	P <sub>4</sub> , P <sub>5</sub>	Извитой	24–30	0,20–0,60	0,02–0,07
<i>E. verrucosum</i>	–	P <sub>4</sub> , P <sub>5</sub>	Извитой или прямой	75–118	0,80–0,90	0,09–0,13



**Рисунок.** Порový аппарат  $P_4$ : *A* – *Euastrum elegans*, *Б* – *E. dubium*; порový аппарат  $P_5$ : *В* – *E. germanicum*, *Г* – *E. verrucosum*; порový аппарат  $P_7$ : *Д* – *E. oblongum*, *Е* – *E. ansatum*. Масштабная линейка: *А, Б, Г–Е* – 0,5 мкм, *В* – 1 мкм

У *E. ansatum* порový канал  $P_7$  имеет прямую форму (рисунок, *Е*), в то время как у *E. oblongum* он извитой и не равномерен по толщине: наружу открывается отверстием большего диаметра (рисунок, *Д*).

Существует группа видов *Euastrum*, у которых скробикулы отсутствуют [13]. Исследованные нами *E. germanicum* и *E. verrucosum* имеют бородавки и поры  $P_4$ ; в участках, где бородавок нет, располагаются поры  $P_5$ . Оболочка у *E. pectinatum* ячеистая, и поровые каналы  $P_4$  пронизывают ее равномерно по всей поверхности без взаимосвязи с ячейками. На вершинах всех вздутый имеется одна пора, по своему строению идентичная  $P_5$ . Кроме того, у этих трех видов на вершине полярной лопасти располагается апикальное поровое поле, характерное для рода *Cosmarium*, что также указывает на необходимость пересмотра их таксономического положения.

Сопоставление размеров клеток с толщиной клеточной стенки и диаметром порового канала (таблица) подтверждает гипотезу [11, 14], согласно которой у более крупных клеток толщина оболочки и диаметр пор больше, чем у мелких. Так, у мелкоклеточных видов (длина клеток не более 40 мкм) *E. binale*, *E. dubium*, *E. elegans*, *E. validum* толщина клеточной стенки варьирует от 0,2 до 0,7 мкм, а диаметр пор – от 0,02 до 0,09 мкм. Виды с клетками крупных размеров (более 40 мкм длиной) – *E. ansatum*, *E. bidentatum*, *E. pectinatum*, *E. oblongum*, *E. verrucosum*, имеют в среднем более толстую клеточную стенку и широкий порový канал (от 0,09 мкм).

Учитывая поставленные задачи – исследовать порový аппарат клеточной стенки водорослей, мы опробовали несколько вариантов подготовки образцов к ТЭМ. Классический и универсальный метод двойной фиксации представляет собой последовательную фиксацию в 2,5%-ом глутаровом альдегиде и 1–2%-ном тетраоксиде осмия (на фосфатном буфере pH 7,2–7,4), а также отмывку в дистиллированной воде с последующим контрастированием 2%-ным уранилацетатом. Другой, несколько устаревший, метод с использованием 2,5%-ного формалина и 3%-ного водного раствора перманганата калия, приводит к некоторой деформации эндоэмитриальных структур и органелл клетки. Для нашей работы сохранность внутренней ультраструктуры клетки желательна, но при условии сохранения структуры клеточной стенки, близкой к прижизненной, недостатками химической фиксации можно пренебречь. При сравнении результатов нескольких вариантов пробоподготовки оказалось, что устаревший метод, где вместо буфера мы использовали питательную среду WH, хорошо сохраняет структуру клетки, включая мембранные элементы. Это наиболее подходящие реагенты для работы с водорослевыми клетками (процесс предполагает поштучный отбор исследователем клеток десмидиевых водорослей на каждом этапе подготовки, вплоть до заливки в смолу эпон). Стоит отметить, что использование менее токсичных и летучих реактивов значительно упрощает работу и при этом гарантирует качественный результат (рисунок).

Исследования проведены в рамках госзадания МГУ, ч. 2 (р. 01 10), на оборудовании Центра коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства

образования и науки РФ. Работы, связанные с формированием коллекции культур, выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект №14-50-00029).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Drawert H., Metzner-Kustei J. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. I. Mitteilung. Zellwand- und galleltstrukturen bei einigen arten // *Planta*. 1961. Vol. 56. N 1. P. 213–228.
2. Mix M. Die Feinstruktur der Zellwände bei Mesotaeiaceae und Gonatozygaceae mit einer vergleichenden Betrachtung der verschiedenen Wandtypen der Conjugatophyceae und über deren systematischen Wert // *Arch. Mikrobiol.* 1972. Vol. 81. N 3. P. 197–220.
3. Drawert H., Mix M. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. II. Mitteilung Hüllgallerte und Schleimbildung bei *Micrasterias*, *Pleurotaenium* und *Hyalotheca* // *Planta*. 1961. Vol. 56. N 3. P. 237–261.
4. Brook A.J. The biology of Desmids. Botanical Monographs, vol. 16. Oxford: Blackwell, 1981. 276 pp.
5. Oertel A., Aichinger N., Hochreiter R., Thalhamer J., Lutz-Meindl U. Analysis of mucilage secretion and excretion in *Micrasterias* (Chlorophyta) by means of immunoelectron microscopy and digital time lapse video microscopy // *J. Phycol.* 2004. Vol. 40. N 4. P. 711–720.
6. Lott J.N.A., Harris G.P., Turner Ch.D. The cell wall of *Cosmarium botrytis* // *J. Phycol.* 1972. Vol. 8. N 3. P. 232–236.
7. Cheli F., De Vecchi L. An ultrastructural and cytochemical study on Conjugatophycean cell wall // *Caryologia*. 1989. Vol. 42. N 2. P. 127–137.
8. Rott E., Holzinger A., Gesierich D., Kofler W., Sanders D. Cell morphology, ultrastructure, and calcification pattern of

*Oocardium stratum*, a peculiar lotic desmid // *Protoplasma*. 2010. Vol. 243. N 1–4. P. 39–50.

9. Andersen S., Heldal M., Knutsen G. Cell wall structure and iron distribution in the green alga *Staurastrum luetkemulleri* (Desmidiaceae) // *J. Phycol.* 1987. Vol. 23. N 4. P. 669–672.

10. Gerrath J.F. Studies on the ultrastructure of desmids and its relation to their taxonomy. Vancouver: Univ. British Columbia, 1968. 165 pp.

11. Neuhaus G., Kiermayer O. Formation and distribution of cell wall pores in desmids // *Cytomorphogenesis of plants. Cell biology monographs*, vol. 8 / Ed. O. Kiermayer. Vienna: Springer, 1981. P. 215–231.

12. Schlösser U.G. Origin and function of the culture collection // *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 1982. Vol. 95. N 2. P. 181–276.

13. Anissimova O.V. Architecture of cell wall of *Euastrum* Ralfs: new genus criteria // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 3. P. 155–159.

14. Mix M. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. XII. Zur Feinstruktur der Zellwände und Mikrofibrillen einiger Desmidiaceen vom *Cosmarium*-Typ // *Arch. Mikrobiol.* 1966 Vol. 55. N 2. P. 116–133.

Поступила в редакцию  
06.07.2017

Принята в печать  
11.12.2017

#### MYCOLOGY AND ALGOLOGY

#### MORPHOLOGY OF CELL WALL PORE CHANNELS IN GENUS *EUASTRUM* RALFS (DESMIDIALES)

O.V. Anissimova<sup>1,\*</sup>, O.V. Staer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zvenigorod Biological Station and <sup>2</sup>Department of Mycology and Algology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia  
\*e-mail: anissimova@mail.bio.msu.ru

The study of the cell wall structure was performed for 10 species of *Euastrum* – *E. ansatum* (Ehrenb.) Ralfs, *E. bidentatum* Näg., *E. binale* (Turp.) Ehrenb. ex Ralfs, *E. dubium* Näg., *E. elegans* (Bréb.) Kütz. ex Ralfs, *E. germanicum* (Schmidle) W. Krieger, *E. oblongum* (Grev.) Ralfs ex Ralfs, *E. pectinatum* Bréb. ex Bréb. in Ralfs, *E. validum* West et G.S.West, *E. verrucosum* (Ehrenb.) ex Ralfs. The investigation of the cell wall ultrastructure has established, for the first time, that the pore canal in 6 of 10 species always has to some degree coiled form. Three species (*E. germanicum*, *E. pectinatum* и *E. verrucosum*) have both coiled and straight canals, and *E. ansatum* – only straight ones. Also new type of pores (P<sub>7</sub>), typical only for representatives of the genus *Euastrum*, was noted. Besides, simple and effective method of preparing desmidium algal cells for investigation with transmission electron microscope has been developed.

**Keywords:** *Euastrum*, cell wall, pore canal, Desmidiaceae, taxonomy, transmission electron microscopy

#### Сведения об авторах

Анисимова Ольга Викторовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. Звенигородской биологической станции биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-64; e-mail: anissimova@mail.bio.msu.ru

Штаер Оксана Васильевна – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-64; e-mail: sht-oks@yandex.ru