

## ОПИСАНИЕ НОВОГО ТИПА ПОЛЯРОПЛАСТА МИКРОСПОРИДИЙ ИЗ КОПЕПОД *MESOCYCLOPS LEUCKARTII* (COPEPODA: CYCLOPIDAE)

© А. В. Симакова, В. В. Лукьянцев

Обособленное структурное подразделение «Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета»;  
электронный адрес: omikronlab@yandex.ru

Поляропласт микроспориций из копепод *Mesocyclops leuckartii* был изучен при помощи электронной микроскопии. Поляропласт отличается по структуре от всех ранее описанных типов.

Ключевые слова: микроспориции, копеподы, ультраструктура, морфология спор, поляропласт.

Классификация микроспориций основана на особенностях жизненных циклов и ультраструктурных характеристик стадий развития и зрелых спор (Vavra, Larsson, 1999). Основные ультраструктурные особенности зрелых спор: формы споры, строение оболочки и поляропласта, число витков и строение полярной трубки.

Зрелые споры окружены толстой трехслойной оболочкой и содержат ядро и аппарат экструзии, необходимый для проникновения паразита в клетку хозяина. Наиболее сложно устроенным компонентом аппарата экструзии микроспориций является поляропласт. По структуре он делится на пластинчатый, везикулярный и фибриллярный. По составу его можно разделить на одно-, двух-, трех- и четырехчастный.

Ранее было выделено и описано 9 типов строения поляропласта (Vavra, Larsson, 1999).

В задачи настоящего исследования входят детальное изучение ультраструктуры споры микроспориций из циклопов *Mesocyclops leuckartii* Claus, 1857 и сравнение строения поляропласта с ранее описанными типами.

### Материал и методика

Сбор ракообразных проводили сачком на литорали в постоянном пойменном водоеме (старица р. Томь в черте г. Томска). Живых ракообразных в течение 20 мин доставляли в лабораторию, где проводили разбор пробы. Копепоид просматривали в темном поле микроскопа МБС-10 при увеличении 25×. Из всех ракообразных готовили мазки и окрашивали по общепринятой методике (Воронин, Исси, 1974).

Для электронной микроскопии ракообразных фиксировали 2.5 ч при 4 °С 2.5%-ным глутаральдегидом на 0.1 М какодильном буферном растворе (рН 7.4). Затем дважды промывали 0.1 М какодильным буферным раствором (рН 7.4) 15 мин при комнатной температуре. Копепоид постфиксировали в 1%-ным OsO<sub>4</sub> в 0.1 М какодильном буферном растворе (рН 7.4) 2 ч при комнатной температуре. После двукратной промывки дистиллиро-

ванной водой в течение 15 мин копепоид обезжизивали в серии растворов этанола возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне и заключали в Эпон—Аралдит (Ultradeen, Vavra, 1997).

Ультратонкие срезы толщиной 60—100 нм готовили на ультратоме Ultratome III (LKB, Швеция). Полученные срезы контрастировали 2%-ным раствором уранил-ацетата на 50%-ном этаноле (10—20 мин при 37 °С) и цитратом свинца (от 3 до 10 мин при комнатной температуре) по Рейнольдсу (Reynolds, 1963). Полученные препараты просматривали в электронном микроскопе JEM-100 CXII (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Все размеры устанавливали при 30 измерениях.

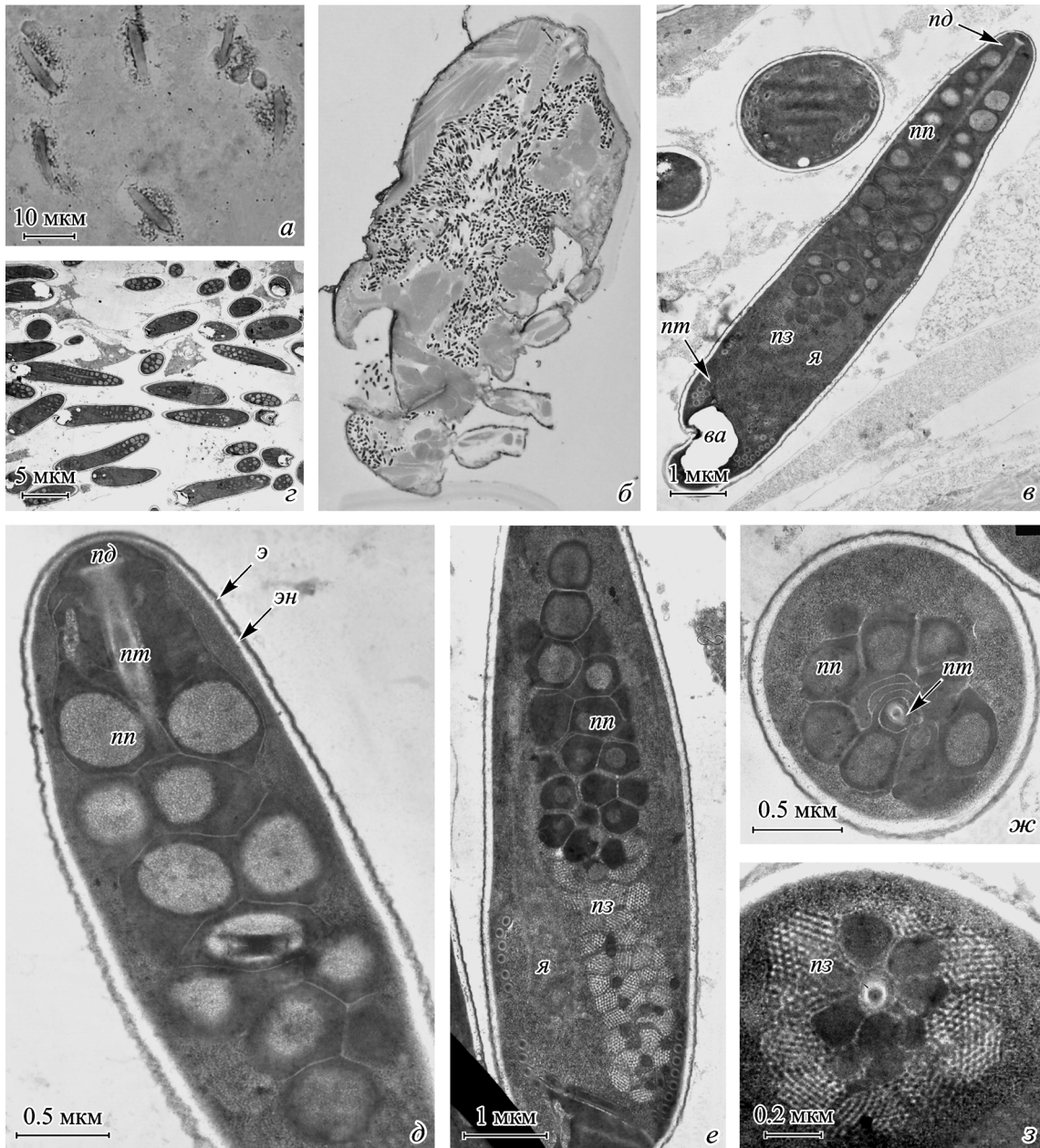
Использованные реактивы: глутаральдегид, OsO<sub>4</sub>, Аралдит 502, Эпон 812, DDSA, DMP-30 и цитрат свинца (Fluka, Швейцария); какодильнат натрия и уранил-ацетат (Merck, Германия).

### Результаты

В ракообразных с явными признаками заражения были обнаружены только зрелые споры микроспориций, на препаратах из копепоид без явных признаков заражения из тех же проб стадий развития не обнаружено, поэтому мы не можем установить систематическую принадлежность этой микроспориции и относим ее в сборную группу *Microsporidium*.

Описание паразита *Microsporidium* sp. Световая микроскопия (см. рисунок, а—б). В мазке присутствовали только зрелые одиночные споры паразита. Оболочка спорофорного пузырька не просматривалась. На заднем полюсе споры видна задняя вакуоль округлой формы. Споры были интенсивно окрашены в фиолетовый цвет и имели булавовидную форму. Размер фиксированных спор составлял  $(13.3 \pm 0.8) \times (3.8 \pm 0.6)$  мкм.

Электронная микроскопия (см. рисунок, в—з). Зрелые споры лежат поодиночке в спорофорном пузырьке. Его оболочка имеет мембранное строение, она непрочная, фрагментарная. Эписпиральное про-



Локализация паразита в теле хозяина и ультраструктура спор *Microsporidium* sp. из копепоид *Mesocyclops leuckartii* с новым типом полярплоста.

*a* — зрелые споры (световая микроскопия), *б* — споры в гемоцеле, *в* — зрелая спора (электронная микроскопия), *г* — зрелые споры, *д* — продольный срез передней части полярности, *е* — продольный срез задней части полярплоста, *ж* — поперечный срез передней части полярплоста, *з* — поперечный срез задней части полярплоста, *ва* — задняя вакуоль, *пд* — полярный якорный диск, *пз* — задняя часть полярплоста, *пт* — передняя часть полярплоста, *пт* — полярная трубка, *э* — экзоспора, *эн* — эндоспора, *я* — ядро.

странство однородное; вероятно, вокруг спор имеется слизистое вещество. Спорофорные пузырьки со спорами паразита плотно прилегают друг к другу, заполняя почти всю клетку хозяина. Зрелые споры булавовидные. Передний полюс немного сужен. Оболочка споры толщиной 110 нм. Она состоит из трех частей. Экзоспора (30 нм) слегка волнистая и состоит из двух частей: первая — электронно-плотная, вторая — умеренной электронной плотности. Эндоспора электронно-прозрачная, толщиной 80 нм. Внутреннее содержимое споры выстлано тонкой плазматической мембраной. Ядро расположено ближе к заднему полюсу споры, прижато к ее боковой

стенке. Оно вытянуто вдоль оси споры и имеет амебовидную форму. На переднем полюсе споры расположен полярный якорный диск. Он имеет грибовидную форму, окружен собственной мембраной, электронно-плотный, имеет мелкозернистое внутреннее содержимое. Полярный сак небольшой.

Полярплост занимает около 3/4 объема споры и имеет очень сложное строение. В нем можно выделить две части. В переднем полюсе споры полярплост представлен крупными камерами диаметром до 0.6 мкм. Эта часть составляет половину полярплоста. Камеры имеют амебовидную форму. Каждая камера окружена собствен-



ной мембраной и имеет сложное внутреннее строение. Центральную часть камеры занимает округлое «ядро» диаметром до 0.5 мкм. Оно имеет зернистое внутреннее содержимое умеренной электронной плотности и окружено тонким слоем электронно-плотного зернистого вещества. Остальное пространство заполнено однородным веществом умеренной электронной плотности. Части камеры не отделены друг от друга мембранами. По мере продвижения к заднему полюсу камеры «ядра» уменьшаются.

Вторая часть представляет наибольший интерес. Она состоит из двух фрагментов. Полярную трубку окружают мелкие, почти округлые камеры с однородным электронно-плотным внутренним содержимым. Далее вокруг них расположены камеры, также окруженные собственными мембранами. Каждая камера заполнена строго ориентированным веществом, расположенным подобно пространственной решетке. Нити, из которых построена решетка, электронно-плотные, остальное пространство умеренной электронной плотности. Каких-либо мембранных структур внутри камер не наблюдается.

Полярная трубка изофилярная, имеет 11.0—11.5 витка (130—140 нм). Она тонкая и короткая в сравнении с размерами споры и состоит из нескольких слоев, которые хорошо просматриваются в поперечном срезе. Наружный слой тонкий, электронно-прозрачный, окружен собственной мембраной, следующий слой тонкий, электронно-плотный, далее идут слой умеренной электронной плотности, тонкий электронно-плотный слой, более толстый, почти электронно-прозрачный слой, после него расположен толстый слой умеренной электронной плотности, сердцевина электронно-плотная. Последние 1—2 витка, расположенные ближе к заднему полюсу споры, отличаются от остальных более электронно-плотными слоями (внутренним содержимым). Витки не расположены в один ряд. Обычно на продольном срезе споры с одной стороны 4 витка расположены в один ряд, затем наблюдается промежуток между витками, а оставшиеся витки лежат в два ряда. С другой стороны несколько витков расположены в один ряд, а ближе к задней вакуоли — в несколько рядов.

На заднем полюсе споры находится задняя вакуоль. Обычно она немного уплощена, иногда имеет округлую форму. Ее полость электронно-прозрачная.

### Обсуждение

Все ранее описанные типы поляропластов были систематизированы (Vavra, Larsson, 1999). Мы провели сравнительный анализ с известными типами поляропластов. Поляропласт, образованный крупными шаровидными камерами, был описан у триморфных видов рода *Amblyospora* Hazard, Oldacre, 1975, которые развиваются с участием кровососущих комаров (основных хозяев) и копепод (промежуточных хозяев). При этом в ракообразных образуются удлиненные споры с однородным поляропластом, целиком образованным шаровидными мешками (Sweeney et al., 1989; Becnel, Sweeney, 1990; Becnel, 1992, 1994; Becnel, Andreadis, 1998). Кроме того, похожие споры с поляропластом подобного типа образуются у диморфных или триморфных паразитов комаров родов *Culicospora* Weiser, 1977 (Becnel et al., 1987), *Culicosporella* Weiser, 1977 (Becnel, Fukuda, 1991) и *Edhazardia* Becnel, Sprague, Fukuda, 1989 (Becnel et al., 1989).

Поляропласт, содержащий большие шаровидные камеры, обнаружен у *Microsporidium fluviatilis* (Воронин, 1994). Однако он состоит не только из крупных камер. В переднезаднем направлении выявляются следующие зоны: свободно расположенные пластины, плотно упакованные пластины, большие шаровидные камеры и задние пластины.

Споры с поляропластом, представляющим собой крупные камеры неправильной формы, описаны также для родов *Duboscqia* Perez, 1908 (Sweeney et al., 1993) и *Hyalinocysta* Hazard, Oldacre, 1975 (Andreadis, Vossbrinck, 2002) из промежуточных хозяев микроспоридий кровососущих комаров — копепод. Строение передней части описываемого нами поляропласта подобно строению поляропласта микроспоридий рода *Amblyospora* из копепод. Однако задняя часть отличается по структуре от всех ранее описанных типов. Вещество, заполняющее крупные камеры, имеет строгую ориентацию, что хорошо видно при сравнении продольного и поперечного срезов спор. Это явление нетипично для органелл. Отсутствие стадий развития не позволило нам определить место этого вида в системе микроспоридий. Возможно, описываемый нами вид относится к роду *Amblyospora*, а ракообразные являются промежуточными хозяевами микроспоридий из комаров *Aedes/Ochlerotatus*.

Авторы выражают благодарность А. А. Миллеру за помощь в проведении электронно-микроскопических исследований.

### Список литературы

- Воронин В. Н. 1994. *Microsporidium fluviatilis* sp. n. (Protozoa Microsporidia) из циклопа *Eucyclops serrulatus* (Fisch.) с описанием нового типа поляропласта. Паразитология. 28 (1) : 48—51.
- Воронин В. Н., Исса И. В. 1974. О методах работы с микроспоридиями. Паразитология. 6 (3) : 272—273.
- Andreadis T. G., Vossbrinck C. R. 2002. Life cycle, ultrastructure and molecular phylogeny of *Hyalinocysta chapmani* (Microsporidia: Thelohaniidae) a parasite of *Culiseta melanura* (Diptera: Culicidae) and *Orthocyclops modestus* (Copepoda: Cyclopidae). J. Euk. Microbiol. 49 : 350—364.
- Becnel J. J. 1992. Horizontal transmission and subsequent development of *Amblyospora californica* (Microsporidia: Amblyosporidae) in the intermediate and definitive hosts. Dis. Aquat. Org. 13 : 17—28.
- Becnel J. J. 1994. Life cycles and host-parasite relationships of Microsporidia in culicine mosquitoes. Folia Parasitologica. 41 : 91—96.
- Becnel J. J., Andreadis T. G. 1998. *Amblyospora salinaria* n. sp. (Microsporidia: Amblyosporidae): parasite of *Culex salinarius* (Diptera: Culicidae), its life stages in an intermediate host and establishment as a new species. J. Invertebr. Pathol. 71 : 258—262.
- Becnel J. J., Fukuda T. 1991. Ultrastructure of *Culicosporella lunata* (Microsporidia: Culicosporellidae) in the mosquito *Culex pilosus* (Diptera: Culicidae) with new information on the developmental cycle. Eur. J. Protistol. 26 : 319—329.
- Becnel J. J., Hazard E. I., Fukuda T., Sprague V. 1987. Life cycle of *Culicospora magna* (Kudo, 1920) (Microsporidia: Culicosporidae) in *Culex restuans* Theobald with special reference to sexuality. J. Protozool. 34 : 313—322.
- Becnel J. J., Sprague V., Fukuda T., Hazard E. I. 1989. Development of *Edhazardia aedis* (Kudo, 1930) n. g. n. comb. (Microsporidia: Amblyosporidae) in the mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). J. Protozool. 36 : 119—130.

Becnel J. J., Sweeney A. W. 1990. *Amblyospora trinus* n. sp. (Microsporida: Amblyosporidae) in the Australian mosquito *Culex halifaxi* (Diptera: Culicidae). J. Protozool. 37 : 584—592.

Reynolds E. S. 1963. The use of lead nitrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17 : 208—212.

Sweeney A. W., Doggett S. L., Gullick G. 1989. Laboratory experiments on infection rates of *Amblyospora dyxenoides* (Microsporida: Amblyosporidae) in the mosquito *Culex annulirostris*. J. Invertebr. Pathol. 53 : 85—92.

Sweeney A. W., Doggett S. L., Piper R. G. 1993. Life cycle of a new species of *Dubosqia* (Microspora: Thelohaniidae) infecting the

mosquito *Anopheles hilli* and an intermediate copepod host *Apocyclops dengizicus*. J. Invertebr. Pathol. 62 : 137—146.

Undeen A. H., Vavra J. I. 1997. Research methods for entomopathogenic Protozoa. In: Lacey L. A. (Ed.). Manual of techniques in insect pathology. San Diego: Acad. Press. 117—151.

Vavra J., Larsson J. I. R. 1999. Structure of the microsporidia. In: The Microsporidia and Microsporidiosis. Washington: Amer. Soc. Microbiol. 7—84.

Поступила 12 XII 2006

DESCRIPTION OF THE NEW TYPE OF POLAROPLAST OF MICROSPORIDIA  
FROM *MESOCYCLOPS LEUCKARTII* (COPEPODA: CYCLOPIDAE)

A. V. Simakova, V. V. Loukiantsev

Research Institute of Biology and Biophysics of Tomsk State University;  
e-mail: omikronlab@yandex.ru

The polaroplast of microsporidium from copepod *Mesocyclops leuckartii* was studied by transmission electron microscopy. The polaroplast differs from all previously described types by complex structure.

Key words: Microsporidia, ultrastructure, spore morphology, polaroplast.