

УДК 576.893.195

© 1993

УЛЬТРАСТРУКТУРА TUZETIA CORYNIFORMIS  
(PROTOZOA: MICROSPORIDIA) С ПЕРЕСМОТРОМ  
РОДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ВИДА

В. Н. Воронин

Приводятся материалы по ультратонкому строению стадий спорогонии и спор микроспоридии *Tuzetia coryniformis* Voronin, 1986. На основании экзоспорового происхождения околоспоровой оболочки и особенностей строения внутриспоровых органелл вид переносится из рода *Tuzetia* в род *Cougourdella*.

На раннем светооптическом уровне исследований форма спор микроспоридий широко использовалась в систематике этих паразитов. Поэтому не удивительно, что в 1935 г. были созданы два рода *Cougourdella* и *Pyrotheca*, единственным диагностическим признаком которых была необычная форма спор. К роду *Cougourdella* были отнесены два вида микроспоридий, имеющих удлинненно-грушевидные споры, напоминающие по форме плоды *Lagenaria cougourda* Seg., а к роду *Pyrotheca* — микроспоридия с удлинненными спорами в форме пороховницы (poire a poudre), один из концов которых был как бы раздутый, а другой более или менее заостренный (Hesse, 1935). В дальнейшем диагноз рода *Pyrotheca* был дополнен 4-споровой спорогонией, что ряд исследователей поддержали (Исси, 1986; Xie, Canning, 1986), а другие прогнозировали (Maugand e. a., 1972). Ларссон (Larsson, 1989), изучивший подробно ультраструктуру микроспоридии со спорами характерной *Cougourdella*-подобной формы и 4-споровой спорогонией, отметил ее почти полное морфологическое сходство при несколько меньших размерах с ранее описанной *Pyrotheca hydropsycheae* (Xie, Canning, 1986). Считая форму спор основополагающим диагностическим признаком, он не только отнес найденный им вид к роду *Cougourdella*, но и высказал мнение, что и вид *P. hydropsycheae* также должен быть отнесен к этому роду. Таким образом, близкая форма спор у микроспоридий родов *Cougourdella* и *Pyrotheca* и различный подход исследователей к диагностической ценности 4-споровой спорогонии создали весьма запутанную ситуацию в разделении этих родов. Учитывая необходимость получения новых данных для решения этой проблемы, нами была повторно и более детально изучена ультраструктура микроспоридии *Tuzetia coryniformis* Voronin, 1986, имеющей споры, близкие по форме к представителям родов *Cougourdella* и *Pyrotheca*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Циклопы *Macrocylops albidus* Jur., зараженные *Tuzetia coryniformis*, были отловлены в литоральной зоне оз. Врево Ленинградской обл. Выявление зараженных особей проводили путем просмотра живой планктонной пробы под стереомикроскопом МБС-1. Рачков, имеющих беловатый цвет тела, отбирали пипеткой на предметное стекло и микроскопировали. В случае наличия

микроспоридий готовили тушевые и водные препараты, а также мазки, которые фиксировали в метаноле и окрашивали по Романовскому—Гимза. Для электронно-микроскопического исследования циклопов целиком помещали в 2.5%-ный раствор глутаральдегида на какодилатном буфере на 2 ч, затем отмывали в 0.2 М буфере и дофиксировали 1.5%-ным раствором четырехокси осмия 2 ч. Весь процесс осуществляли при температуре 5—6°. Зафиксированный материал доводили до 70-градусного спирта, в котором его хранили несколько суток, после чего осуществляли его окончательное обезвоживание в восходящем ряду этанола и ацетоне и заключали в эпон-аралдитовые блоки. Ультратонкие срезы контрастировали 3 ч в насыщенном водном растворе уранилацетата и 5 мин в цитрате свинца и просматривали на электронном микроскопе JEM-100 С.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

В материале, изученном посредством световой и электронной микроскопии, преобладали споры и частично споробласты и споронты. Стадий мерогонии, наиболее ранних и предшествующих спорогонии, не наблюдали.

**С п о р о н т ы.** К наиболее ранним споронтам отнесены 1—2-ядерные клетки, в цитоплазме которых присутствовали относительно немногочисленные и равномерно распределенные рибосомы, а также шероховатый ретикулум, лежащий в несколько параллельных рядов между ядром и клеточной стенкой (рис. 1, а; см. вкл.). У некоторых таких стадий на ядерной оболочке утолщенные электронноплотные участки с примыкающими к ним со стороны цитоплазмы тонкостенными мелкими везикулами, что можно рассматривать как детали центриольных пластинок (рис. 1, а). Клеточная стенка ранних споронтов помимо типичной плазмалеммы включала в себя внешнюю очень тонкую и местами прерывистую оболочку (рис. 1, б). Многоядерные споронты были уже полностью окружены тонкой оболочкой, которую мы рассматриваем как производную спорофорного пузырька. Последняя присутствовала и при розетковидном делении 4—8-ядерных плазмодиев на споробласты, частично окружала молодые споры (рис. 1, в), но затем исчезала. В результате зрелые споры лежали свободно. Паразитофорная вакуоль также отсутствовала.

**С п о р о б л а с т ы.** Молодые споробласты, образующиеся сразу после деления многоядерного плазмодия, в значительной мере сохраняли внутреннее строение споронта. Более зрелые споробласты представляли собой клетки с деформированными стенками и электронноплотным содержимым. Стадии с зачатками споровых органелл отнесены к молодым спорам.

**С п о р ы.** Живые споры удлиненно-грушевидной формы имели размеры 7.8 (7.0—8.5) × 2.8 (2.6—3.5) мкм. На округлом конце споры четко выделялась задняя вакуоль (рис. 1, в). Добавление туши к споровой суспензии позволило выявить наличие вокруг каждой споры светлой зоны. Посредством электронной микроскопии удалось изучить расположение и строение отдельных споровых органелл, а также их морфогенез. Установлено, что всю переднюю суженную часть споры занимают крупный поляропласт и ядро, а заднюю расширенную — витки полярной трубки и вакуоль. У молодой споры на стадии еще не сформированной эндоспоры все внутриспоровые органеллы уже хорошо дифференцированы, хотя и недоразвиты (рис. 1, д). Интересно отметить, что на этой стадии развития споры поляропласт представлен только передней крупнопузырчатой и задней мелкокамерной частями, а полярная трубка имеет только 10—11 витков (рис. 1, д). Снаружи стенка молодой споры покрыта слоем рыхлого гранулярного материала, плотно прилегающего к многослойной экзоспоре (рис. 1, е). У зрелой споры поляропласт в своей основе состоит из двух компонентов: тонких электронно-прозрачных пластин, подразделенных в свою очередь на две тончайшим электронноплотным слоем, и мелкогранулярного электронноплот-

ного вещества, заполняющего просветы между пластинами (рис. 2, а; см. вкл.). По расположению пластин и их соотношению с электронноплотной субстанцией полярпласт четко подразделяется на 3 части. В передней части, прилегающей к якорному диску, редкие электронно-прозрачные пластины берут начало от основы, покрывающей полярную трубку и идут вдоль нее параллельными рядами. В средней части пластины также находятся на значительном расстоянии друг от друга, но уже лежат перпендикулярно полярной трубке. В задней части полярпласта электронно-прозрачные пластины близко расположены друг к другу и лежат косо по отношению к продольной оси споры (рис. 2, а). В целом среднюю часть полярпласта можно рассматривать как переходную от передней, редкопластинчатой, части к задней, мелкопластинчатой.

Полярная трубка в зрелой споре делает 15—17 витков (в среднем 16), причем первые 10—11 несколько толще и иного строения, чем 5—6 последних (рис. 2, б). Кроме того, прямая базальная часть полярной трубки также несколько толще (120—130 нм), чем свернутая в витки (90—100 нм). Таким образом, из-за различий в толщине и строении различных участков полярной трубки ее можно рассматривать как гетерофилярную (Воронин, 1989) или слабоанизофилярную по терминологии Ларссона (Larsson, Yan, 1988).

Ядро в споре одно, крупное и располагается между полярпластом и витками полярной трубки (рис. 1, д; 2, б). Как в молодых, так и в зрелых спорах в их задней расширенной части присутствует скопление компактного электронноплотного материала, что можно рассматривать как постеросому (рис. 1, д; 2, б).

Стенка зрелой споры состоит из обычных для микроспоридий трех слоев: внутренней плазмалеммы, средней электронно-прозрачной эндоспоры и внешней экзоспоры. Эндоспора хорошо развита и ее максимальная толщина достигает 220—240 нм. К переднему концу споры эндоспора постепенно истончается и ее толщина не превышает 40 нм. Экзоспора в целом тонкая и состоит из двух электронноплотных слоев, из которых внутренний несколько тоньше наружного. Рыхлый мелкогранулярный слой, покрывающий молодую спору, при ее созревании отходит от экзоспоры и внешне напоминает оболочку спорофорного пузырька, причем в случае близкого расположения к экзоспоре он сохраняет часть мелкогранулярного материала, а при значительном отдалении представлен только тонкой электронноплотной оболочкой (рис. 2, в).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

В 1986 г. было опубликовано краткое описание микроспоридии *Tuzetia coryniformis* sp. n. из циклопа *Macrocylops albidus* (Воронин, 1986). Удлиненно-грушевидная форма спор у данного вида варьировала в широких пределах, по этому признаку он мог быть отнесен как к роду *Cougourdella*, так и *Pyrotheca*. Дополнительно электронная микроскопия вокруг каждой споры паразита позволила выявить индивидуальную оболочку, создающую впечатление спорофорного пузырька, характерного для рода *Tuzetia*. Таким образом, найденная микроспоридия сочетала в себе признаки сразу трех родов. Желание подчеркнуть наличие у паразита индивидуальной околоспоровой оболочки послужило основанием для отнесения ее к роду *Tuzetia*. Настоящее, более тщательное электронно-микроскопическое исследование показало, что оболочка спорофорной вакуоли, образующейся вокруг многоядерного споронта, является непрочной и исчезает в процессе созревания спор. В то же время индивидуальная околоспоровая оболочка, наблюдаемая у зрелых спор, имеет экзоспоровое происхождение. Последнее обстоятельство, по мнению Ларссона, исключает возможность отнесения данной микроспоридии к *Tuzetia* и другим близким родам, у представителей которых околоспоровая оболочка по су-

шеству представляет собою стенку спорофорного пузырька (Larsson, 1983). Таким образом, таксономическая значимость околоспоровой оболочки у данного паразита снижается с родового уровня до видового и, как следствие, его отнесение к роду *Tuzetia* невозможно. В то же время по строению поляропласта, полярной трубки и экзоспоры он удивительно сходен с видами *Cougourdella polycentropi* (Larsson, 1989) и *Pyrotheca hydropsycheae* (Xie, Canning, 1986), что свидетельствует о тесной связи ультраструктуры с *Lagenaria*-подобной формой спор у этих микроспоридий. С другой стороны, разнообразие эписпоровых образований (от гранулярного экзоспорового покрытия у *C. polycentropi* (Larsson, 1989) до четкой околоспоровой оболочки у *T. coryniformis*) свидетельствует о малой консервативности данных образований и, следовательно, их второстепенной таксономической значимости. В настоящее время различия между родами *Cougourdella* и *Pyrotheca* сводятся к особенностям спорогонии и носят явно дискуссионный характер (Larsson, 1989). В то же время по морфологии спор они очень близки. Принимая во внимание, что у описанного нами вида форма спор соответствует диагнозу рода *Cougourdella*, а спорогония нечетко 4-споровая, как у рода *Pyrotheca*, считаем, что в этих условиях более обоснованным будет отнесение его к роду *Cougourdella*. Таким образом, вид описанный нами ранее как *Tuzetia coryniformis* следует рассматривать как *Cougourdella coryniformis* n. comb. Ниже приводится дополненное описание этого вида.

#### ***Cougourdella coryniformis* n. comb.**

Х о з я и н: *Macrocyclops albidus* Jur. (Copepoda).

Л о к а л и з а ц и я: жировое тело.

М е с т о н а х о ж д е н и я: оз. Врево Ленинградской обл.

М е р о г о н и я: не наблюдали

Спорогония: протекает внутри спорофорного пузырька, стенка которого непрочная и разрушается при созревании спор. Деление спорогонального плазмодия (обычно 4—8-ядерного) протекает по типу розетковидного почкования.

Споры: живые размером 7.8 (7.0—8.5)×2.8 (2.6—3.5) мкм., напоминающие по форме плоды *Lagenaria cougourda*, одноядерные. Поляропласт широкопластинчатый в передней части и узкопластинчатый в задней, занимает практически всю суженную часть споры. Полярная трубка гетерофилярного типа, делает 16—17 витков, из которых 10—11 передних на поперечных срезах слегка толще и иного строения, чем 5—6 задних. Имеется задняя вакуоль и постеросома. Эндоспора хорошо развита, толщиной до 240 нм. Экзоспора двойная, дополнительно у молодых спор покрыта мелкогранулярным секретом, который у зрелых спор отделяется от стенки и трансформируется в околоспоровую оболочку.

В заключение считаем необходимым обратить внимание на тот факт, что микроспоридии со спорами удивительно сходной формы и ультраструктуры выделены из хозяев разного систематического положения — циклопов и насекомых (поденок). К тому же споры, близкие по форме к микроспоридиям из группы *Cougourdella* — *Pyrotheca* и имеющие к тому же индивидуальную околоспоровую оболочку, обнаружены в циклопах, выступающих в роли промежуточных хозяев микроспоридий рода *Amblyospora* (Andreadis, 1985; Sweeney e. a., 1985). Единственное различие между спорами этих групп микроспоридий заключается в строении поляропласта, который у представителей *Amblyospora* из циклопов состоит из крупных округлых камер. Дальнейшие исследования должны показать, в какой мере микроспоридии родов *Cougourdella* и *Pyrotheca* являются самостоятельными и не представляют ли они собою одну из стадий в жизненном цикле других микроспоридий.

### Список литературы

- Воронин В. Н. Микроспоридии ракообразных // Микроспоридии. Серия «Протозоология». Вып. 10. Л.: Наука, 1986. С. 137—166.
- Воронин В. Н. Классификация полярных трубок микроспоридий на основе их ультратонкой организации // Цитология. 1989. Т. 31, № 9. С. 1010—1015.
- Исси И. В. Микроспоридии как тип паразитических простейших // Микроспоридии. Серия «Протозоология». Вып. 10. Л.: Наука, 1986. С. 6—136.
- Andreadis T. G. Experimental transmission of a microsporidian pathogen from mosquitoes to an alternate copepod host // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. Vol. 82. P. 5574—5577.
- Hesse E. Sur quelques microsporidies parasites de *Megacyclops viridis* Jurine // Arch. Zool. Exp. Gén. 1935. T. 75. P. 651—661.
- Larsson R. A revisionary study of the taxon *Tuzetia* Maurand, Fize, Fenwick and Michel, 1971 and related forms (Microspora, Tuzetiidae) // Protistologica. 1983. T. 19, N 2. P. 323—355.
- Larsson R., Yan N. D. The ultrastructural cytology and taxonomy of *Duboscqia sidae* Jirovec, 1942 (Microspora, Dubosqiidae) with establishment of the new genus *Agglomerata* gen. nov. // Arch. Protistenk. 1988. Vol. 135. P. 271—288.
- Larsson R. On the Cytology and life cycle of *Cougourdella polycentropi* Weiser, 1965 with comments on the taxonomy of the genus *Cougourdella* Hesse, 1935 (Microspora, Cougourdellidae) // Europ. J. Protistol. 1989. Vol. 25, N 1. P. 33—44.
- Maurand J., Fize A., Michel R. et Fenwick B. Quelques données sur les Microsporidies parasites de Copepodes Cyclopoïdes des eaux continentales de la région de Montpellier // Bull. Soc. Zool. Fr. 1972. T. 97, N 4. P. 707—717.
- Sweeney A. W., Hazard E. I., Graham M. F. Intermediate host for an *Amblyospora* sp. (Microspora) infecting the mosquito, *Culex annulirostris* // J. Invertebr. Pathol. 1985. Vol. 45, N 1. P. 98—102.
- Xie W. D., Canning E. U. *Pyrotheca hydropsycheae* n. sp., a microsporidian parasite of caddis fly larvae, *Hydropsyche siltalai* Döhler, 1963 (Trichoptera, Hydropsychidae) // J. Protozool. 1986. Vol. 33, N 4. P. 462—467.

ГосНИОРХ, Санкт-Петербург

Поступила 13.05.1992

### ULTRASTRUCTURE OF TUZETIA CORYNIFORMIS (PROTOZOA: MICROSPORIDIA) WITH THE GENUS REVISION OF THE SPECIES

V. N. Voronin

*Key words:* microsporidium, ultrastructure, systematic position, *Cougourdella coryniformis* n. comb.

### SUMMARY

The ultrastructure of *Tuzetia coryniformis* Voronin, 1968, a parasite of the copepode *Macrocyclus albidus* Jur., is described with emphasis on the sporophorous vesicle and mature spore. The sporogonial plasmodium is divided by a rosette-like budding, producing 4—8 sporoblasts. Stages of sporogony are limited by a thin and fragile envelope of the sporophorous vesicle. The lageniform, 7—8.5  $\mu\text{m}$  long uninucleate spores have a heterofilar polar filament arranged in 16—17 coils. The polaroplast consists of three lamellar parts. Young spores have the exosporal coat which is transformed into the individual episporal envelope in mature spores. On the basis of the ultrastructural cytology the microsporidium is transferred from the genus *Tuzetia* to the genus *Cougourdella*.



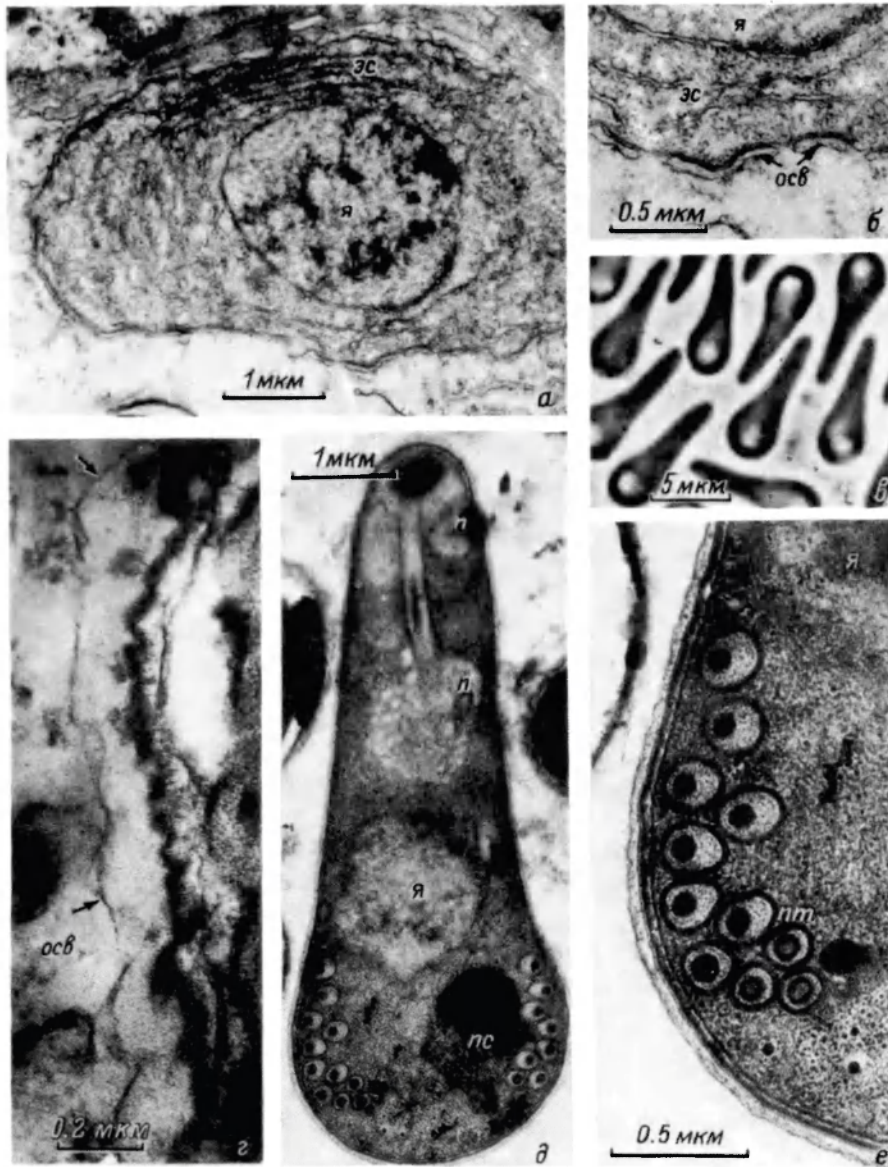


Рис. 1. Строение стадий спорогонии *Cougourdella coryniformis* n. comb.

*a* — фрагмент споронта с формирующейся оболочкой спорофорного пузырька; *б* — стенка того же споронта при большем увеличении; *в* — живые споры; *г* — оболочка спорофорного пузырька рядом с молодой спорой; *д* — продольный срез молодой споры с зачатками внутриспоровых органелл; *е* — стенка молодой споры при большем увеличении; я — ядро; эс — эндоплазматическая сеть; осв — оболочка спорофорной вакуоли (стрелки); пт — полярная трубка; пс — постеросома; п — полярный пласт.

Fig. 1. Ultrastructure of the young sporont and immature spores of *Cougourdella coryniformis* n. comb. (fig. 1B — fresh spores).

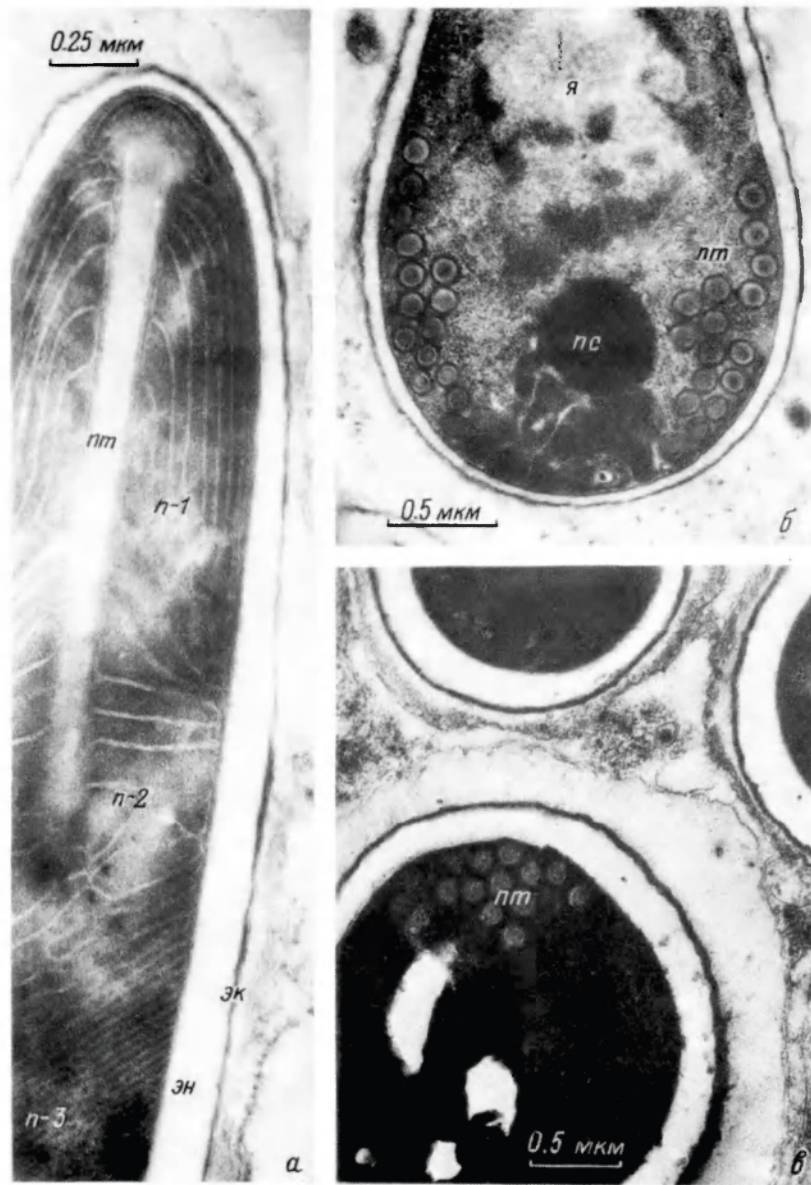


Рис. 2. Ультраструктура споры *Cougourdella coryniformis* n. comb.

*a* — продольный срез переднего конца споры с тремя различными участками поляропласта; *б* — задний конец споры; *в* — участки трех спор с различным проявлением индивидуальной околоспоровой оболочки;

*эн* — эндоспора; *эк* — экзоспора.

Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 2. Ultrastructure of the mature spore of *Cougourdella coryniformis* n. comb.