

УДК 576.895.131.2

**УЛЬТРАСТРУКТУРА КУТИКУЛЫ ПРЕСНОВОДНЫХ  
ВОЛОСАТИКОВ *GORDIONUS ALPESTRIS* (VILLOT, 1885)  
(NEMATOMORPHA)**

© Е. А. Гузеева,<sup>1</sup> \* Б. Д. Ефейкин,<sup>1</sup> В. Ю. Шматко,<sup>2</sup> С. Э. Спиридонов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН  
Ленинский пр., 33, Москва, 119071

\* E-mail: guzeyeva@mail.ru

<sup>2</sup> Институт аридных зон ЮНЦ РАН  
пр. Чехова, 41, Ростов-на-Дону, 344006  
Поступила 02.12.2014

В сканирующем и трансмиссионном электронных микроскопах изучено строение кутикулы взрослых особей волосатиков *Gordionus alpestris* (Villot, 1885), собранных в июне 2013 г. в р. Сук близ пос. Никель Республики Адыгея (Россия). В данной местности эти волосатики паразитируют в многоножках-диплоподах *Pachyiulus krivolutskiy* Golovatch, 1977 (Diplopoda). Обсуждаются особенности строения кутикулы *G. alpestris* в сравнении с другими волосатиками, для которых имеются данные по ультраструктуре и тонкому строению поверхности тела.

*Ключевые слова:* волосатики, систематика, морфология, кутикула, ультраструктура.

Волосатики — это первичнополостные черви, паразитирующие в различных членистоногих (Heinze, 1941). Их взрослые свободноживущие стадии могут быть найдены в морских и пресных водах. Морские волосатики паразитируют в ракообразных, а пресноводные в основном в насекомых, хотя известны случаи их паразитирования в диплоподах (Baker, 1985; Schmidt-Rhaesa et al., 2009) и паукообразных (Acholonu, 1968). Ныне существующая систематика волосатиков основана на немногих морфологических признаках их наружного строения: организации хвостового конца самцов и самок, а также скульптуре поверхности тела (Heinze, 1941). Такая ограниченность в выборе морфологических признаков определяется в первую очередь, непрозрачностью тела взрослых особей волосатиков, исключаяющей возможность изучения их внутренних органов. Широкое распространение в современной биологии «молекулярных» методов побуждает использовать их и для решения вопросов таксономии данной группы. К настоящему времени получено лишь несколько последовательностей участков 18S и 28S рибосомальной ДНК волосатиков (Bolek et al., 2010;

Looney et al., 2012). В некоторых случаях филогенетические схемы, полученные на основе анализа нуклеотидных последовательностей, вступают в противоречие с существующей классификацией. Так, по результатам анализа двух участков рибосомальной ДНК, представители рода *Gordionus Müller, 1927* существенно отличаются от всех остальных пресноводных волосатиков, для которых имеются молекулярные данные, и связаны с базальными узлами филогении данной группы (Spiridonov, Schmatko, 2013). Надежные представления о филогении волосатиков могут быть получены лишь анализом нескольких локусов ядерной и митохондриальной ДНК. Тем не менее становится очевидной необходимость углубленного изучения строения волосатиков рода *Gordionus*. Одним из путей получения новых морфологических признаков для использования в систематике волосатиков являются электронно-микроскопические исследования. До настоящего времени нет никаких сведений по ультраструктуре представителей рода *Gordionus*. В этом сообщении приводятся результаты изучения волосатиков *Gordionus alpestris* (Villot, 1885), собранных в северо-западной части Кавказа, в сканирующем и трансмиссионном электронных микроскопах.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Волосатики были собраны В. Ю. Шматко в июне 2013 г. в р. Сюк близ поселка Никель Республики Адыгея, РФ (44°10'20.8" с. ш. 40°09'56.4" в. д.).

Для изучения в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) тело самца волосатика *G. alpestris*, фиксированного 4%-ным формалином, разрезали на отдельные кусочки под разными углами в продольном и поперечном сечениях, проводили в серии спиртов с повышающейся концентрацией (7, 15, 30, 50, 70 и 96 %) и последующим обезвоживанием ацетоном. Объекты высушивали методом «критической точки» в аппарате HCP-2 (Hitachi, Япония), монтировали на микроскопные столики-подложки и напыляли золотом в вакуумной ионно-распылительной установке SC502 (Bio-Rad, США) в атмосфере аргона при давлении 0.1 мм рт. ст. Образцы изучали, используя сканирующий электронный микроскоп TM 3000 (Hitachi, Япония) с ускоряющим напряжением 15 кВ.

Для изучения в трансмиссионном электронном микроскопе (ТЭМ) живых особей волосатика разрезали на кусочки длиной 2—3 мм, фиксировали в 2.5%-ном растворе глутарового альдегида на 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.2—7.4) в течение 12 ч при температуре 4 °С. Затем материал промывали буферным раствором и вторично фиксировали в 1%-ном растворе четырехоксида осмия на том же буфере. После осмирования образцы помещали на 1—2 ч в 1%-ный водный раствор уранилацетата. Дегидратировали в спиртах повышающейся концентрации (5, 10, 15, 30, 50, 70, 90 и 96 %), инфильтрацию осуществляли в растворах этанола и эпоксидной смолы Спурр [Spurr] (EMS, США) в соотношениях 1:1 (2 ч) и 1:3 (3—4 ч); затем 12 ч выдерживали в чистой заливочной среде, приготовленной согласно прописи компании-производителя. Полимеризацию блоков проводили в течение 2 сут в термостате при температуре 60 °С. Полутонкие и тонкие срезы получали на ультрамикротоме Leica EM UC6 (Leica Micro-

systems, Германия) с использованием стеклянных ножей. Срезы помещали на бленды, покрытые пленкой-подложкой из формвара, и окрашивали 1%-ным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу (Уикли, 1975). Материал изучали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Zeiss LIBRA 120 (Carl Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 120 кВ. Панорамы собирали с помощью программы iTEM.

Электронно-микроскопические исследования проводились на базе Дальневосточного центра электронной микроскопии при ИБМ ДВО РАН и Межкафедральной лаборатории электронной микроскопии Биологического факультета МГУ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Кутикула половозрелого самца *G. alpestris* представлена двумя основными слоями: поверхностным (или ареолярным) и массивным слоем перекрещивающихся волокон. Кроме того, можно выделить еще один тонкий (0.15—0.2 мкм) базальный слой, имеющий гомогенное строение и меньшую, чем волокна, осмиофильность.

Содержащий волокна слой, как видно при изучении его срезов в СЭМ, состоит из 13—15 слоев, прилегающих к эпидермису волокон, толщиной около 0.2—0.3 мкм (рис. 1, А, см. вкл.), и 30—35 слоев волокон, сечением 0.45—0.6 мкм. Общая толщина данного слоя составляет 17.0—18.0 мкм. Через всю толщу волокнистого слоя проходят радиальные тяжи (рис. 1, Б—Г), толщиной 0.1—0.2 мкм, которые, начинаясь от наружной границы клеток эпидермиса и проходя через все слои перекрещивающихся волокон кутикулы, непосредственно переходят в столбчатые образования ареолярного слоя. На рис. 3 (см. вкл.) можно видеть, как один из тяжей разделяется на несколько столбчатых образований.

Поверхность кутикулы волосатика имеет своеобразную, состоящую преимущественно из гексагональных элементов, структуру (рис. 1, Г). Каждый из таких гекса- или пентагональных участков (т. н. ареол) имеет размеры в пределах 11—15×13—19 мкм. Ареолы отделены друг от друга межареолярными бороздками, глубиной около 1 мкм. На поперечных срезах в СЭМ видно, что основная толща ареолы состоит из губчатой ткани, а непосредственно на поверхности залегает гомогенный слой (рис. 2, см. вкл.). При изучении срезов кутикулы в ТЭМ в ареолярном слое различимы столбчатые структуры средней электронной плотности, толщиной около 50 нм, ориентированные перпендикулярно к поверхности тела.

Лежащий под кутикулой эпидермис может быть подразделен на два слоя. Основную часть эпидермального слоя составляет гомогенный слой, толщиной около 3—4 мкм, с расположенными в нем ядрами (рис. 4, см. вкл.). Непосредственно к кутикуле прилегает слой разветвляющихся филаментов, образующий четкую границу с базальным слоем кутикулы. Между филаментами расположены электронно-прозрачные полости или вакуоли. Толщина слоя разветвляющихся филаментов — 0.5—0.8 мкм. К эпидермису прилегают слой внеклеточного матрикса и слой продольных мышечных клеток.

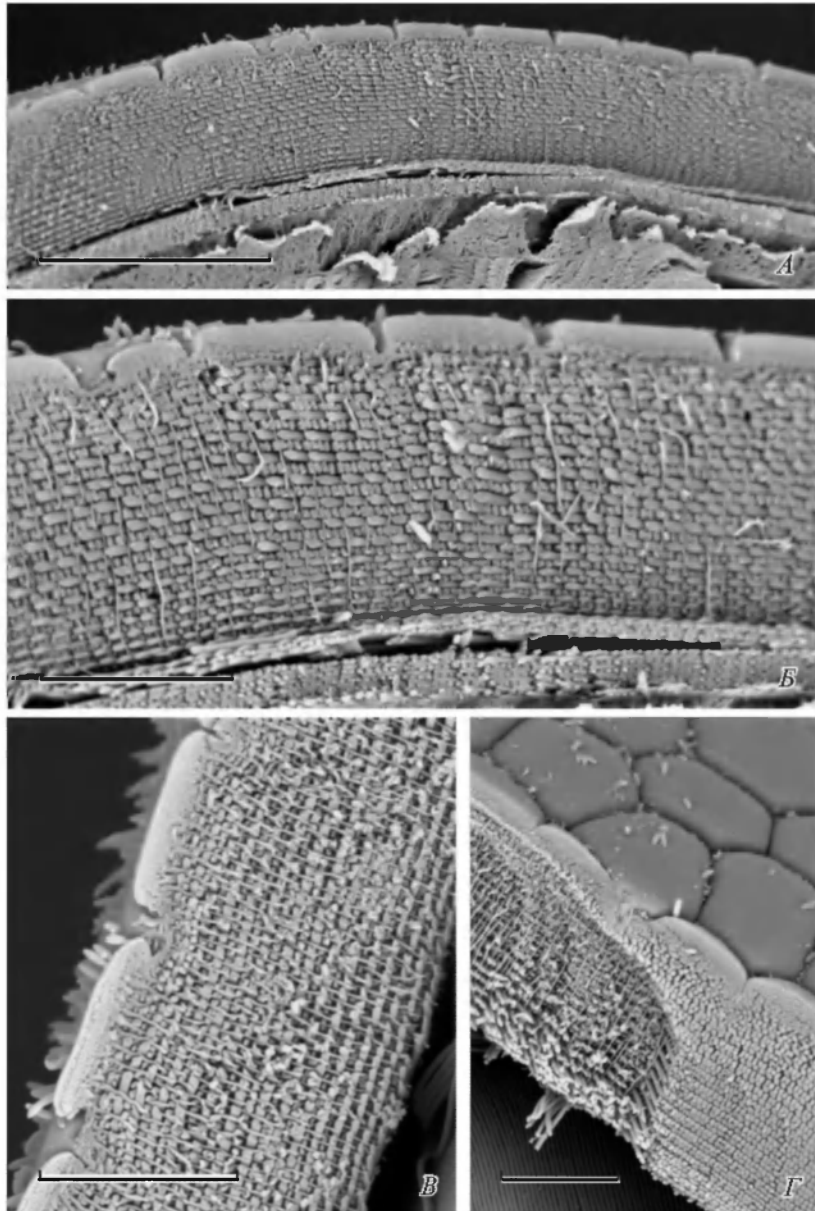


Рис. 1. Тонкая морфология кутикулы волосатика *Gordionus alpestris* (СЭМ).

*A* — общий вид стенки тела от ареолярного слоя кутикулы до мышечного слоя; *B* — основные слои кутикулы: ареолы и волокна (основные и более тонкие, прилегающие к эпидермису); *B* — радиальные тяжи среди слоев перекрещивающихся волокон кутикулы; *Г* — организация поверхности кутикулы и подлежащих слоев. Масштабные линейки, мкм: *A* — 25, *B—Г* — 10.

Fig. 1. Fine structure of the cuticle of *Gordionus alpestris* (SEM).

*A* — general view through the body wall from areolar layer to muscular layer; *B* — main cuticular layers: areoles and fibers (regular and finer fibers, adjacent to the epidermis); *C* — radial strands between cuticular fibers; *D* — structure of the cuticle surface and underlying layers. Scale bars,  $\mu\text{m}$ : *A* — 25, *B—Г* — 10.

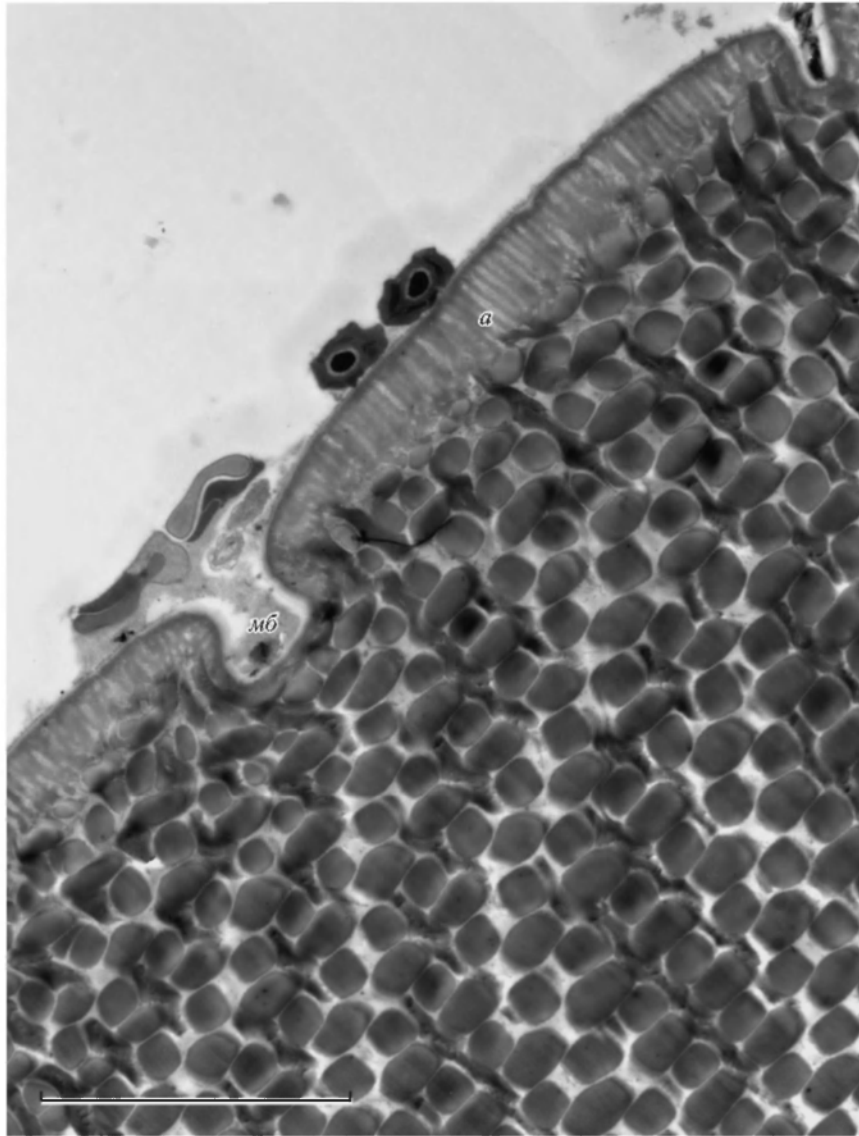


Рис. 2. Ареолярный слой кутикулы волосатика *Gordionus alpestris* (ТЭМ).  
*a* — ареола; *мб* — межареолярная бороздка. Масштабная линейка — 5 мкм.

Fig. 2. Areolar layer of the cuticle of *Gordionus alpestris* (TEM).  
*a* — areole, *мб* — interareolar furrow. Scale bar — 5  $\mu$ m.

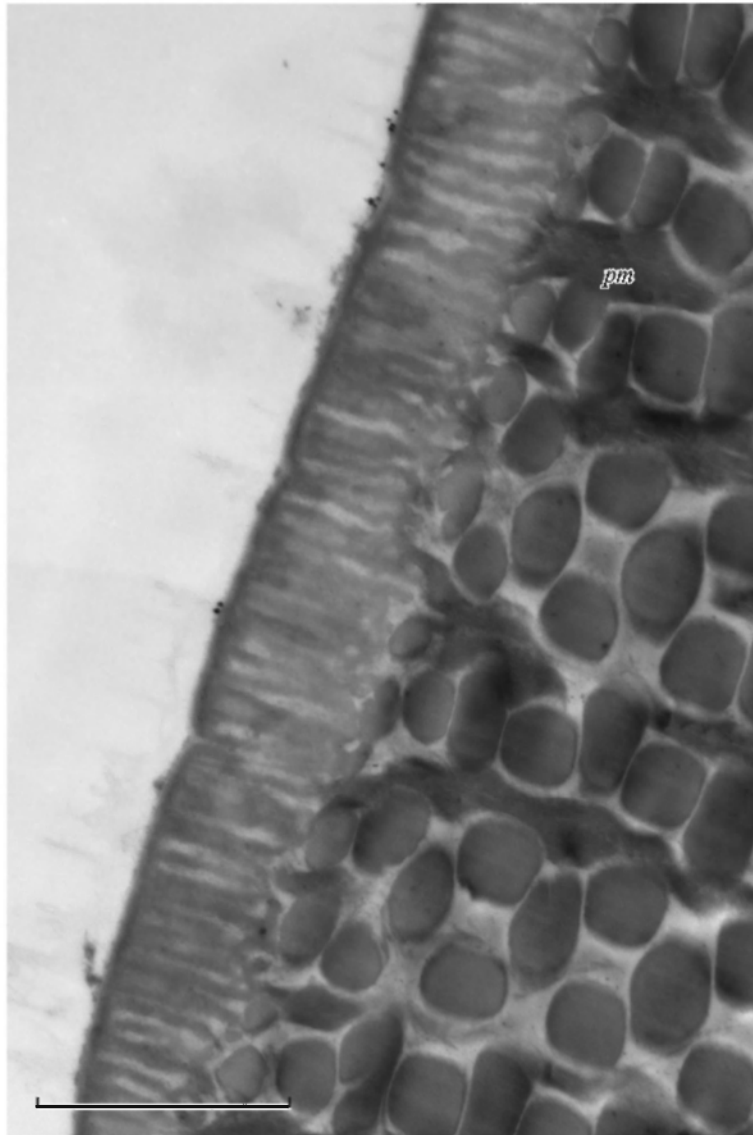


Рис. 3. Организация ареолярного слоя кутикулы волосатика *Gordionus alpestris* (ТЭМ).

*pt* — радиальный тяж кутикулы. Масштабная линейка — 2 мкм.

Fig. 3. Areolar layer of the cuticle of *Gordionus alpestris* (TEM).

*pt* — radial strand of the cuticle. Scale bar — 2  $\mu$ m.

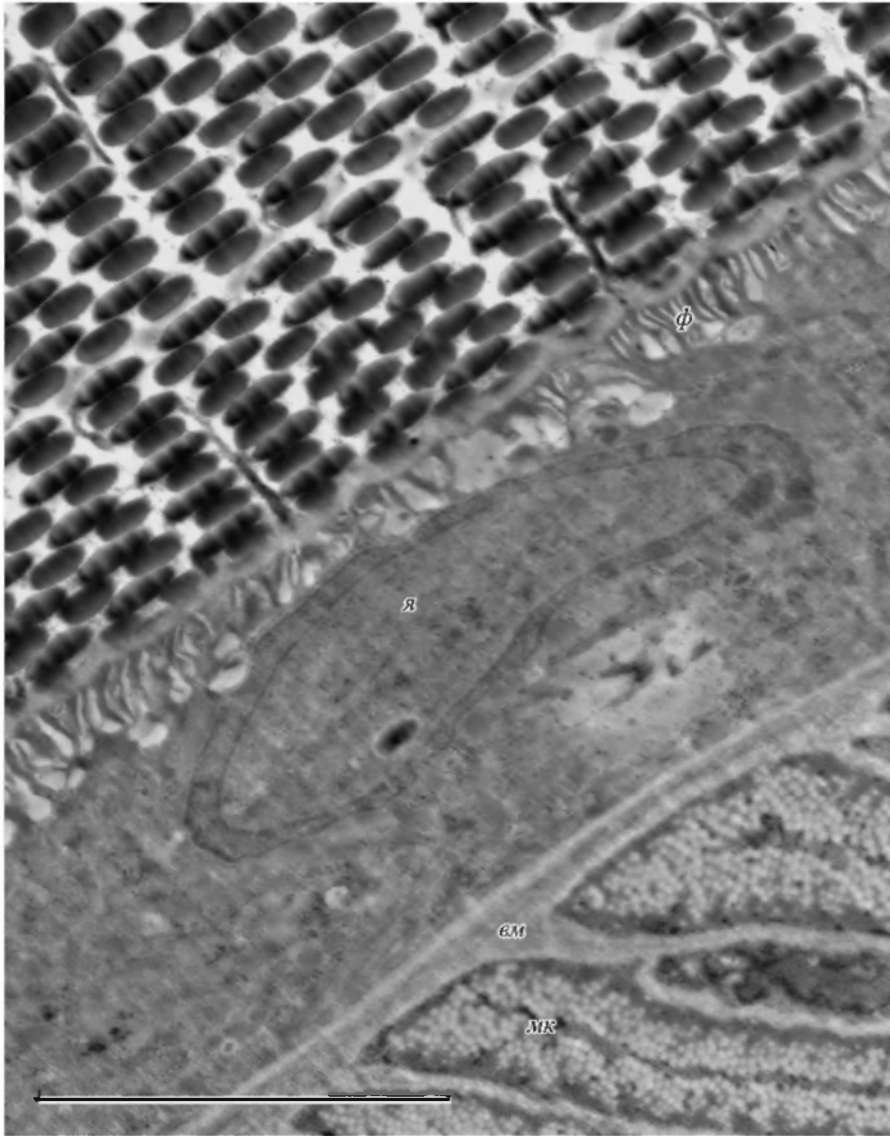


Рис. 4. Субкутикулярные структуры волосатика *Gordionus alpestris* (ТЭМ).  
вм — внеклеточный матрикс, мк — мышечная клетка, φ — слой филаментов на границе эпидермиса и кутикулы, я — ядро эпидермальной клетки. Масштабная линейка — 5 мкм.

Fig. 4. Subcuticular structures of the cuticle of *Gordionus alpestris* (TEM).  
вм — extracellular matrix, мк — muscle cell, φ — filamentous layer on the border of epidermis with cuticle, я — nucleus of the epidermal cell. Scale bar — 5 μm.



## ОБСУЖДЕНИЕ

Данные по ультраструктуре имеются лишь для представителей нескольких родов волосатиков. Имеются подробные данные по ультраструктуре поверхности морских волосатиков рода *Nectonema* Verrill, 1873 (Schmidt-Rhaesa, 1996). Среди пресноводных волосатиков изучены представители рода *Gordius* Linné, 1758 (Eakin, Brandenburger, 1974; Schmidt-Rhaesa, 1996), *Paragordius* Camerano, 1897 (Zapotosky, 1971; Schmidt-Rhaesa, 2004, 2005), *Pseudochordodes* Carvalho, 1942 (de Villalobos, Restelli, 2001) и *Chordodes* (Schmidt-Rhaesa, Gerke, 2006). В последней из этих работ А. Шмидт-Реза и С. Герке (Schmidt-Rhaesa, Gerke, 2006) обобщают данные по ультраструктуре покровов волосатиков, сравнивая в том числе и общую организацию кутикулы ранее изученных форм.

Исследованный нами *G. alpestris* по особенностям организации кутикулы сходен с волосатиками родов *Gordius* и *Pseudochordodes* (Eakin, Brandenburger, 1974; de Villalobos, Restelli, 2001). Сходным образом у представителей этих родов устроен ареолярный слой кутикулы: имеется поверхностное гомогенное покрытие и губчатая толща ареолы, состоящая из столбчатых или наклонных электронно-плотных элементов. Заметим, что выявляются существенные ультраструктурные различия между отдельными представителями рода *Gordius*. У видов рода *Gordius*, характеризующихся наличием ареол (у *G. albopunctatus* и *G. impressus*), организация ареолярного слоя мало отличается от такового у *G. alpestris* (Schmidt-Rhaesa, 1996). Например, волосатик, изученный Р. М. Икином и Дж. Л. Бранденбургером (Eakin, Brandenburger, 1974) и определенный ими как *Gordius* sp., имеет хорошо развитый ареолярный слой с выраженными столбчатыми элементами. В то же время у *G. aquaticus* с кутикулой, лишенной ареол, снаружи от слоя пересекающихся волокон имеется лишь тонкий (0.5 мкм) слой с пальчатыми выступами (Schmidt-Rhaesa, Gerke, 2006). Сходное строение свойственно и единственному виду морских волосатиков, для которого есть ультраструктурные данные — *Nectonema munida* (Schmidt-Rhaesa, 1996). Остается неясным, является ли отсутствие ареолярного слоя у некоторых видов *Gordius* вторичной его редукцией у этих пресноводных волосатиков или особенностью, унаследованной от общего с морскими волосатиками предка. Значительное сходство в строении данного слоя может быть отмечено между *G. alpestris* и *P. bedriagae* (de Villalobos, Restelli, 2001). Отличия в строении кутикулы между представителями родов *Gordius*, *Pseudochordodes* и *Gordionus* выявляются в основном в толщине и ориентации отдельных элементов кутикулы. Так, у *G. alpestris* толщина ареолярного слоя составляет около 1 мкм, а столбчатые структуры средней электронной плотности в наружном слое кутикулы ориентированы перпендикулярно поверхности тела, за исключением краевых частей ареол. Кроме того, у изученного нами волосатика 10—15 прилегающих к эпидермису слоев кутикулы содержат волокна заметно меньшего диаметра по сравнению с волокнами основной толщи кутикулы. Последняя особенность, однако, требует исследования на большем количестве особей.

Организация поверхностного слоя кутикулы волосатиков других родов существенно отличается от ее строения у трех вышеупомянутых родов. Так, у *Paragordius varius* имеются значительные по размеру «подушковид-



ные» (cushion-like) структуры (Zapotosky, 1971; Schmidt-Rhaesa, 2004, 2005). В толще ареолярного слоя кутикулы этого вида располагаются крупные электронно-плотные включения, размером около 8—10 мкм. На внешней границе поверхностного слоя *P. varius* имеются и столбчатые осмиофильные структуры, направление оси которых, однако, очень изменчиво. Расположенные более или менее перпендикулярно к поверхности кутикулы эти структуры образуют переплетающиеся, хаотично ориентированные пучки на краях ареол и внутри отдельных бугорков кутикулы (особый элемент на поверхности кутикулы этого вида). Еще более выраженные отличия от гордионусов обнаруживаются в строении поверхностного слоя кутикулы волосатиков рода *Chordodes* — *C. nobilii* (Schmidt-Rhaesa, Gerke, 2006). Тело ареолы состоит из мощного осмиофильного выступа, высота которого во много раз превышает толщину всего поверхностного слоя кутикулы. Под сильно выступающими ареолами у хордодесов также различимы «подушковидные» структуры. Как у *Paragordius varius*, так и у *Chordodes nobilii* с этими структурами связан двойной проток, идущий от субкутикулярных структур с невыясненной функцией.

Основную толщу кутикулы волосатиков составляет слой пересекающихся волокон. Этот слой есть у всех, в том числе и у морских волосатиков. Как было показано ранее (Schmidt-Rhaesa, 1996), общее количество слоев перекрещивающихся волокон изменчиво даже на протяжении тела одной особи: на головном конце слоев меньше (20—30), чем в середине тела (35—45). Форма сечения волокон на отдельных электронно-микроскопических срезах различается в зависимости от угла, под которым был сделан срез. Соответственно различается и общий вид сечения всей средней части кутикулы. В то же время выявить какие-либо существенные отличия между отдельными родами волосатиков в строении волокнистого слоя кутикулы не удастся. Сходно у разных волосатиков строение слоя мышечных клеток и внеклеточного матрикса.

Таким образом, наиболее явные различия между отдельными родами волосатиков обнаруживаются лишь в ультраструктуре поверхностного слоя кутикулы. По особенностям строения кутикулы изученный нами волосатик рода *Gordionus* сходен с южно-американским видом *Pseudochordodes bedriagae*, а также с теми изученными *Gordius* sp., у которых имеются ареолы (Schmidt-Rhaesa, Gerke, 2006). Существенные различия с волосатиками родов *Paragordius* и *Chordodes* состоят в отсутствии у гордионусов некоторых хорошо заметных структур внутри и на поверхности кутикулы. В целом кутикула у представителей двух этих родов устроена более сложно. Заметим, что традиционная систематика (Heinze, 1941) разделяет пресноводных волосатиков на 2 семейства: Gordiidae с родами *Gordius* и *Acutogordius* и Chordodidae, объединяющее представителей всех остальных родов. Имеющиеся к настоящему времени молекулярные данные указывают на определенную обособленность рода *Gordionus*, тогда как особенности строения кутикулы говорят о сходстве с родами *Gordius* и *Pseudochordodes*. Таким образом, обе группы признаков (молекулярно-таксономические и ультраструктурные) не поддерживают традиционную классификацию этой группы первичнополостных червей, что указывает на необходимость дальнейшего накопления таксономических признаков с последующей ревизией данной группы паразитических червей.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны сотрудникам ИБМ ДВО РАН (Владивосток, Россия) Ю. К. Зографу, В. В. Юшину и Д. В. Фомину за помощь в проведении электронно-микроскопических исследований.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№ 14-04-31561-мол\_а и 14-04-00334-а).

## Список литературы

- Уикли Б. 1975. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир. 324 с.
- Acholonu A. D. 1968. *Neochordodes* sp. (Nematomorpha) as a parasite of the spider (*Ctenus bryrrbus*) in Costa Rica. Journ. of Parasitol. 54 (6) : 1233—1234.
- Baker G. H. 1985. Parasites of the millipede *Ommatoiulus moreletii* (Diplopoda, Iulidae) in Portugal, and their potential as biological control agents in Australia. Australian Journ. of Zool. 33 (1) : 23—32.
- Bolek M. G., Schmidt-Rhaesa A., Hanelt B., Richardson D. J. 2010. Redescription of the African *Chordodes albibarbus* Montgomery 1898, and description of *Chordodes janovyi* n. sp. (Gordiida, Nematomorpha) and its non-adult stages from Cameroon, Africa. Zootaxa. 2631 (32) : 36—50.
- Eakin R. M., Brandenburger J. L. 1974. Ultrastructural features of a Gordian worm (Nematomorpha). Journ. of Ultrastructure Research. 46 (3) : 351—374.
- Heinze K. 1941. Saitenwürmer Oder Gordioidea (Nematomorpha) In: F. Dahl (ed.). Die Tierwelt Deutschlands. Jena, Gustav Fischer. 39 : 1—78.
- Looney C., Hanelt B., Zack S. 2012. New records of nematomorph parasites (Nematomorpha: Gordiida) of ground beetles (Coleoptera: Carabidae) and camel crickets (Orthoptera: Raphidophoridae) in Washington State. Journ. of Parasitol. 98 (3) : 554—559.
- Schmidt-Rhaesa A. 1996. Zur Morphologie, Biologie und Phylogenie der Nematomorpha: Untersuchungen an *Nectonema munidae* und *Gordius aquaticus*. Göttingen, Cuvillier. 276 p.
- Schmidt-Rhaesa A. 2004. Ultrastructure of an integumental organ with probable sensory function in *Paragordius varius* (Nematomorpha). Acta Zoologica. 85 (1) : 15—19.
- Schmidt-Rhaesa A. 2005. Morphogenesis of *Paragordius varius* (Nematomorpha) during the parasitic phase. Zoomorphology. 124 (1) : 33—46.
- Schmidt-Rhaesa A., Gerke S. 2006. Cuticular ultrastructure of *Chordodes nobilii* Cameron, 1901, with a comparison of cuticular ultrastructure in horsehair worms (Nematomorpha). Zoologischer Anzeiger. 245 (3—4) : 269—276.
- Schmidt-Rhaesa A., Farfan M. A., Bernard E. C. 2009. First record of Millipeds as hosts for horsehair worms (Nematomorpha) in North America. Northeastern Naturalist. 16 (1) : 125—130.
- Spiridonov S. E., Schmatko V. Yu. 2013. Morphological and molecular characterization of *Gordionus alpestris* (Nematomorpha) from the North-West Caucasus, Russia. Helminthologia. 50 (1) : 67—72.
- Villalobos de L. C., Restelli M. A. 2001. Ultrastructural study of the cuticle and epidermis in *Pseudochordodes bedriagae*. Cell Tissue Research. 305 (1) : 129—134.
- Zapotosky J. E. 1971. The cuticular ultrastructure of *Paragordius varius* (Leidy, 1851) (Gordioidea: Chordodidae). Proc. Helm. Soc. Wash. 38 (2) : 228—236.

CUTICLE ULTRASTRUCTURE OF THE FRESH-WATER HORSEHAIR WORM  
GORDIONUS ALPESTRIS (VILLOT, 1885) (NEMATOMORPHA)

E. A. Guzeeva, B. D. Efeykin, V. Yu. Schmatko, S. E. Spiridonov

*Key words:* horsehair worms, systematics, morphology, cuticle, ultrastructure.

SUMMARY

The cuticular structure of the horsehair worm *Gordionus alpestris* (Villot, 1885) was studied under scanning and transmission electron microscopes. Adult worms were collected in the Syuk River near Nickel' Village in the Republic of Adygea (Russia) in June 2013. In the sampling area, the *G. alpestris* juveniles parasitize diplopods *Pachyiulus krevolutskyi* Golovatch, 1977. Similarities with other Nematomorpha species with the known cuticle ultrastructure are discussed.