

УДК 576.895.1

**ВЫЯВЛЕНИЕ ЯДЕР ПЛАЗМОДИЯ
INTOSHIA VARIABILIS (ORTHONECTIDA)
МЕТОДОМ DAPI ОКРАШИВАНИЯ**

© Г. С. Слюсарев, О. Г. Манылов, А. С. Черкасов

С помощью окрашивания DAPI исследованы турбеллярии *Macrorhynchus crocea*, зараженные ортонектидой *Intoshia variabilis*. Показано, что ядра паразита существенно отличаются от ядер хозяина как по морфологии, так и по количеству ДНК. Это свидетельствует в пользу гипотезы о паразитарной природе плазмодия.

Ортонектиды — небольшая (17 известных видов) группа паразитических беспозвоночных, круг хозяев которых достаточно широк и включает в себя морских беспозвоночных: плоских червей, немертин, полихет, моллюсков, иглокожих и асцидий. В животном-хозяине развивается паразитическая плазмодиальная стадия — плазмодий, внутри которого развиваются половые особи (самцы и/или самки или гермафродитные особи). Последние покидают хозяина и копулируют во внешней среде, после чего самки отрождают ресничных личинок, заражающих новых хозяев. Одним из ключевых вопросов в изучении ортонектид является вопрос о природе их плазмодия.

В литературе существуют две взаимоисключающие точки зрения на природу плазмодия ортонектид. Большинство авторов рассматривает плазмодий ортонектид как самостоятельный организм, паразитирующий в хозяине и представляющий собой бесполое поколение (Caullery, Mensil, 1901; Caullery, Lavalle, 1912; Caullery, 1961; Малахов, 1990; Slyusarev, Miller, 1998; Слюсарев, Черкасов, 2001). В то же время, по мнению Козлова (Kozloff, 1992, 1994, 1997), плазмодий является модифицированной клеткой хозяина, в которой формируются генеративные клетки и развиваются эмбрионы. Ортонектиды в таком случае должны рассматриваться как внутриклеточные паразиты. Оригинальных работ, посвященных изучению плазмодия ортонектид, чрезвычайно мало; все они указаны выше. В настоящей работе приводятся новые данные о морфологии ядер плазмодия ортонектиды *Intoshia variabilis*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОД

Материалом для данной работы послужили сборы турбеллярий *Macrorhynchus crocea*, зараженных и не зараженных ортонектидой *Intoshia variabilis*. Сбор производился в июне 2000 г. в губе Чупа Белого моря. Методика сбора и содержания зараженных турбеллярий подробно описана Слюсаревым (Slyusarev, 1994). Необходимо подчеркнуть, что в нашем распоряжении были зараженные турбеллярии, содержащие только очень зрелых плазмодиев, в которых подавляющее большинство эмбрионов уже закончило свое развитие. На этой стадии обычно начинается массовый выход самцов и самок.

Часть материала, включающего как зараженных, так и незараженных особей, инкубировали в течение 12 ч в растворе колхицина на морской воде (10^{-3} %). Турбеллярий фиксировали 4 %-ным раствором формальдегида на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4). После этого червей целиком окрашивали DAPI (10^{-4} % на 0.1 М фосфатном буфере) в течение 7—10 мин.

Просмотр тотальных препаратов производили на флуоресцентном микроскопе Leica DMRXA, снабженном системой видеобработки изображений QFish (Исследовательский центр «Хромас» БиНИИ СПбГУ).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ядра клеток внутренних тканей незараженного хозяина — турбеллярии *Macrorhynchus crocea* — варьируют по форме и степени конденсации хроматина (см. рисунок, 1; см. вкл.). Их размеры лежат в пределах от 4 до 7 мкм. Хроматин обычно конденсирован, но иногда он разрыхлен и имеет сетчатую структуру. Отметим, что у турбеллярий, обработанных колхицином, встречаются типичные метафазные пластинки (см. рисунок, 1).

У зараженных хозяев морфология ядер не меняется, однако между ними становятся заметными многочисленные просветы, в которых выявляются группы компактно расположенных мелких ядер (см. рисунок, 2). Общая конфигурация и размеры этих скоплений хорошо соответствуют форме и размерам эмбрионов половых особей ортонектид. Все ядра эмбрионов характеризуются достаточно постоянной, почти шарообразной формой и сильной конденсацией гетерохроматина (см. рисунок, 3, 4). Эти ядра имеют диаметр около 0.2 мкм. По размеру, форме и интенсивности свечения наблюдаемые мелкие ядра очень сходны с ядрами вышедших из хозяина зрелых половых особей, выявляемыми тем же методом (неопубликованные данные).

Мелкие округлые ядра с плотно упакованным хроматином встречаются, однако, и вне описанных выше скоплений. Располагаются они достаточно рыхло. Эти ядра очень похожи на ядра эмбрионов (см. рисунок, 3, 4). Последнее обстоятельство позволяет предполагать, что в этом случае мы имеем дело с ядрами собственно плазмодия.

В эмбрионах ортонектид из турбеллярий, обработанных колхицином, иногда удается увидеть картины, напоминающие деление ядра (см. рисунок, 4). Судить об истинной природе этих образований можно будет лишь после проведения специальных исследований.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты показывают, что ядра клеток *Macrorhynchus crocea* сильно отличаются по морфологии и размерам от ядер, выявляемых в плазмодии *Intoshia variabilis*. Существенные различия в интенсивности свечения позволяют предполагать, что они отличаются также и по количеству содержащейся в них ДНК. По нашим предварительным оценкам, в ядрах клеток хозяина ее примерно на порядок больше, чем в ядрах паразита.

Специального упоминания заслуживают результаты обработки турбеллярий колхицином. Как уже говорилось выше, в тканях таких хозяев можно наблюдать метафазные пластинки (см. рисунок, 1). Вместе с тем ни в ядрах плазмодия, ни в ядрах клеток эмбрионов нам не удалось обнаружить типичных картин митоза.

Полученные нами данные могут свидетельствовать в пользу того, что плазмодии ортонектид представляют собой самостоятельные и целостные организмы и не являются трансформированными клетками хозяина.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 01-04-49788).

Список литературы

- Малахов В. В. Загадочные группы морских беспозвоночных. М.: Изд-во МГУ, 1990. 190 с.
- Слюсарев Г. С., Черкасов А. С. Анализ возможных механизмов выхода ортонектид из их хозяев // Паразитология. 2001. Т. 35, вып. 4. С. 338—343.
- Caullery M. Classe des Orthonectides (Orthonectida Giard, 1877) // P.-P. Grasse (ed.) *Traité de Zoologie*. Т. 4. Paris: Masson, Cie, 1961. P. 695—706.
- Caullery M., Lavallee A. Recherches sur le cycle evolutif des Orthonectides // *Bull. Sci. France—Belgique*. 1912. Т. 46. P. 139—171.
- Caullery M., Mesnil F. Le cycle evolutif des Orthonectides // *C. R. Acad. Sci., Paris*. 1901. Т. 132. P. 1232—1234.
- Kozloff E. N. Phyla Placozoa, Dicyemida, and Orthonectida // Kozloff E. N. *Invertebrates*. 1992. P. 127—199.
- Kozloff E. N. The structure and origin of the plasmodium of *Rhopalura ophiocomae* (phylum Orthonectida) // *Acta Zool. (Stockholm)*. 1994. Vol. 75. P. 191—199.
- Kozloff E. N. Studies on the so-called plasmodium of *Ciliocincta sabellariae* (phylum Orthonectida) with notes on an associated microsporan parasite // *Cah. Biol. Mar.* 1997. Т. 38, N 3. P. 151—159.
- Slyusarev G. S. Fine structure of the female *Intoshia variabilis* (Alexandrov and Slyusarev) (Mesozoa, Orthonectida) // *Acta Zool. (Stockholm)*. 1994. Vol. 75. P. 311—321.
- Slyusarev G. S., Miller D. M. Fine structure of the mature plasmodium of *Intoshia variabilis* (Orthonectida), a parasite of the platyhelminth *Macrorhynchus crocea* // *Acta Zool. (Stockholm)*. 1998. Vol. 79, N 4. P. 319—327.
- СПбГУ. Санкт-Петербург, 199034
- Поступила 20.12.2001

NUCLEI IN THE PLASMODIUM OF INTOSHIA VARIABILIS (ORTHONECTIDA) AS REVEALED BY DAPI STAINING

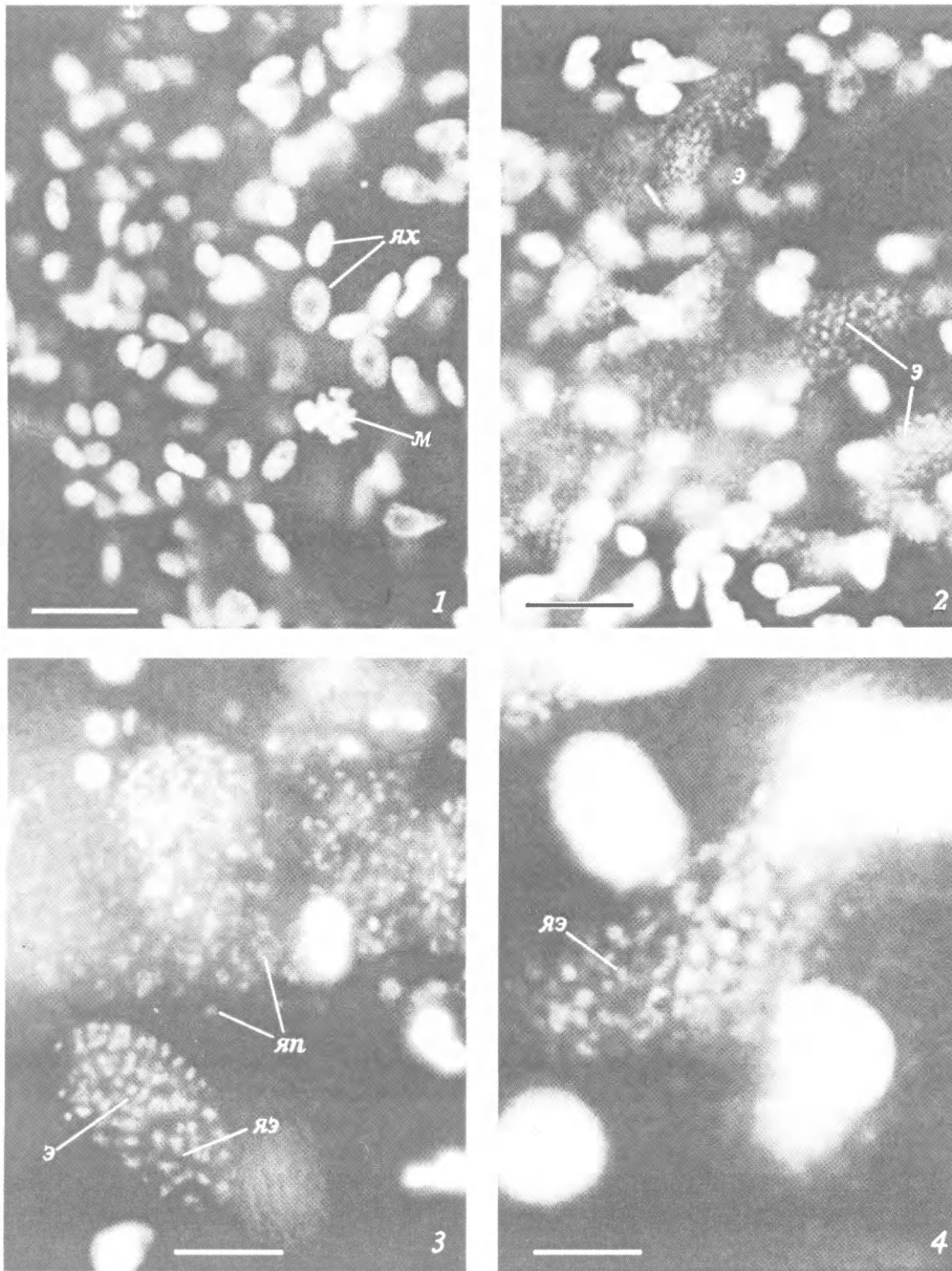
G. S. Slyusarev, O. G. Manylov, A. S. Cherkasov

Key words: Orthonectida, DAPI staining, plasmodium, nuclei.

SUMMARY

DAPI staining of whole mounts was used to reveal the parasitic plasmodium of the orthonectid *Intoshia variabilis* in its host, the turbellarian *Macrorhynchus crocea*. The nuclei of the parasite differ drastically from those of the host in size, morphology, and the estimated DNA content. Our findings indirectly support the idea that the orthonectid plasmodium is a distinct parasitic organism, rather than modified host cells.

Вклейка к ст. Г. С. Слюсарева и др.



Ядра турбеллярии *Macrorhynchus crocea* и ортонектиды *Intoshia variabilis*.

1 — ядра незараженного хозяина *Macrorhynchus crocea*; 2 — хозяин, зараженный *Intoshia variabilis*; 3 — эмбрионы в плазмодии; 4 — деления клеток (?) в плазмодии; м — митоз; э — эмбрион ортонектид; ях — ядро хозяина; яэ — ядра эмбрионов ортонектид; яп — ядра плазмодия.

Nuclei of the turbellarian *Macrorhynchus crocea* and orthonectid *Intoshia variabilis*.