

УЛЬТРАСТРУКТУРА МИКРОСПОРИДИИ NOSEMA
DIPLOSTOMI — ГИПЕРПАЗИТА ТРЕМАТОД
РОДА DIPLOSTOMUM

Н. Г. Шигина, Л. П. Дьяконов

Всесоюзный институт гельминтологии им. К. И. Скрябина,
и Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии, Москва

Микроспоридия *Nosema diplostomi* Schigina et Grobov, 1972 была обнаружена в 1938 г. в метацеркариях трематод рода *Diplostomum*, паразитирующих в хрусталиках глаз пресноводных рыб из водоемов Московской обл. Данная работа является обобщением материалов по ультраструктуре этой микроспоридии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для электронного микроскопирования использовали пораженных микроспоридиями *N. diplostomi* метацеркарий трематод рода *Diplostomum*, извлеченных из хрусталиков глаз рыб: форели — *Salmo irideus*, плотвы — *Rutilus rutilus* (естественное заражение) и верховки — *Leucaspis delineatus* (экспериментальное заражение). Рыб с пораженными метацеркариями отлавливали в водоемах рыбхоза «Сходня» Московской обл.

Пораженных метацеркарий и споры микроспоридий предварительно фиксировали 10%-м формалином, приготовленным на веронал-ацетатном буфере (Pease, 1964), или 1%-м раствором глютеральдегида (Sabatini, 1963). Затем материал в течение трех часов тщательно промывали буферным раствором и фиксировали осмиевым фиксатором по Шестранду (Sjöstrand, 1953), применяемым для холоднокровных животных. Фиксатор должен иметь pH 7.2. К буферному раствору осмия добавляли сахарозу в количестве 0.045 г/мл. Материал фиксировали осмием в течение двух часов. Фиксированный материал обезвоживали этанолом возрастающей концентрации, затем пропитывали смесью метакрилатов (бутил- и метил-метакрилат) в соотношении 4 : 1 и заливали в желатиновые капсулы с добавлением катализатора перекиси бензоила (0.2—1%). Уплотнение блоков проходило в термостате при 56° в течение суток.

Срезы получали на ультратоме LKB и контрастировали по Рейнольдзу (Reynolds, 1963). После промывки в бидистиллированной воде препарат подсушивали и просматривали в электронном микроскопе JEM-7A (напряжение 80 кВ). Инструментальное увеличение 4—30 тыс.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного исследования была изучена ультраструктура одноядерного шизонта, стадий развития споробласта и споры *N. diplostomi*.

Одноядерные шизонты (рис. 1, рис. 1—14 см. на вкл.) представляют собой округлые по форме клетки диаметром 1.0—1.1 мкм. Их цитоплазма средней электронной плотности, богата рибосомами и

отделена от цитоплазмы клетки хозяина двухконтурной электронно-плотной мембраной. Мелко гранулированное ядро диаметром 0.5—0.6 мкм по плотности почти не отличается от цитоплазмы шизонта.

С п о р о б л а с т. Ранний споробласт компактен, имеет неправильную угловатую форму и 2 крупных ядра (рис. 2). Величина споробласта равна 1.1×0.72 мкм. Оболочка одиночная (элементарная). В цитоплазме четко различим эндоплазматический ретикулум в виде канальцев из сближенных парами параллельных мембран. В большинстве случаев эти канальцы располагаются параллельно поверхности отдельных участков клетки; в некоторых местах они образуют скопления в виде петель. Мелкозернистые, но электронно-плотные ядра окаймлены узкой светлой зоной; их величина по срезам равна: 1) 0.47×0.23 мкм и 2) 0.37×0.34 мкм.

При дальнейшем развитии споробласты становятся более правильными в очертаниях и приобретают, как видно на продольном срезе (рис. 3), овально-удлиненную форму с вытянутым и более узким передним концом и расширенным задним. Длина молодого споробласта 2.23, ширина 0.86 мкм. На этой стадии наблюдается закладка наружных мембран. Тонкая электронно-плотная наружная мембрана толщиной 57 Å плотно смыкается с цитоплазмой клетки хозяина. Внутренняя электронно-плотная цитоплазматическая мембрана более заметна и на переднем конце толщина ее равна 60 Å, на заднем — 88 Å. Между этими мембранами располагается довольно широкий слой электронно-прозрачного материала, и толщина его колеблется от 171 до 855 Å. В центральной части споробласта расположены два осмиофильные ядерные образования. Одно из них, лежащее ближе к переднему концу, величиной 0.54×0.26 мкм содержит редкие осмиофильные зерна. Другое на срезе имеет правильную овальную форму и зернистую структуру. Оно окружено специализированным электронно-плотным участком цитоплазмы, резко отграниченной от остальной менее плотной цитоплазмы. Последняя содержит массу извитых канальцев эндоплазматического ретикулума. Признаков образования поляропласта или полярной нити нет.

На более позднем этапе развития споробластов наружная мембрана оболочки приобретает волнистое строение (рис. 4). Ее толщина 185 Å. Толщина среднего осмиофобного слоя 555 Å, а внутренней цитоплазматической мембраны — 74 Å. В центральной части споробласта заметен крупный кольцевой канал. Предположительно, это полярная нить на продольном срезе. На данном этапе развития споробласта, очевидно, происходит закладка и формирование витков полярной нити. Кроме этого, в цитоплазме споробласта были видны скопления изогнутых ветвящихся трубочек на электронно-прозрачном фоне, а также другие неопределенные нами мембранные структуры. Аналогичные трубковидные образования наблюдал Ишихара (Ishichara, 1968) в спороплазме *Nosema bombycis*.

С п о р а. Исследование спор в электронном микроскопе показало, что их оболочка, как и у споробластов, состоит из 3 слоев. Своеобразным строением отличается наружный слой, усеянный короткими микротрубочками. Высота их 230 Å. На срезе эти микротрубочки образуют волнистость или фестоны (рис. 5, 6). Средний — осмиофобный гомогенный, составляющий основную часть стенки споры, и, наконец, изнутри спора одета тонкой цитоплазматической мембраной. Последняя, как видно на некоторых снимках (рис. 7), трехслойная. У молодых спор основной электронно-прозрачный слой оболочки развит слабо, но по мере созревания он утолщается. Толщина оболочки незрелой споры — 77.5 нм, зрелой — 151.5 нм (см. таблицу).

Средняя длина фиксированных спор, по данным световой микроскопии, равна 3.12, средняя ширина — 1.78 мкм. При электронной микроскопии величина продольных срезов спор всегда оказывалась меньше этих величин. Изучение продольных, поперечных и косых срезов спор позволило представить расположение внутренних структур в споре.

Средние размеры органелл споры

Органеллы споры	Величина (в нм)
Поляропласт	500×420
Вакуоль	930×540
Ядро	520×400
Диаметр полярной нити:	
в спирали	106
в поляропласте	83
Слои оболочки споры:	
наружный с микротрубками	39.3
средний осмиофобный	102.2
внутренний трехслойный	10.0

В ее верхней суженной части расположен поляропласт, представленный в виде скопления из концентрически сложенных канальцев или двойных мембран. На срезе поляропласт имеет вид округлого или овального образования размером 0.50×0.42 мкм. Диаметр трубочек, составляющих поляропласт, равен 100 Å; они расположены на расстоянии 57 Å друг от друга (рис. 8). В средней части споры расположено ядро величиной 0.52×0.40 мкм (рис. 10). В центре и по периферии ядра видны скопления осмиофильных гранул. Основная субстанция ядра представлена равномерным гранулированным материалом. В задней расширенной части споры расположена крупная вакуоль, ее величина 0.93×0.45 мкм (рис. 8 и 10). Вокруг нее тонким слоем лежит спороплазма и полярная нить.

Полярная нить в споре образует 4—4.5 витка и располагается с обеих сторон вакуоли одним слоем (рис. 5, 8, 9 и 10). Один конец полярной нити проходит через центр поляропласта (рис. 11). На поперечном срезе полярной нити видны концентрические слои диаметром 100, 82, 62 и 18 нм (рис. 12). Диаметр полярной нити, проходящей через поляропласт, равен 826 Å, а в спирали — 1057 Å.

На продольном срезе молодой споры (рис. 5) можно видеть шероховатый эндоплазматический ретикулум, на поверхности канальцев которого рибосомы упакованы в виде полисом. Его канальцы диаметром 250 Å расположены на расстоянии 125 Å друг от друга. Эти мембраны простираются на $\frac{1}{2}$ длины споры в виде лент и занимают ее среднюю часть. На поперечном срезе спор можно видеть срез этих мембран в виде кольца, окружающего центральный участок споры. Оно располагается внутри витков полярной нити (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени в той или иной мере изучена ультраструктура более 30 видов микроспоридий, относящихся к 9 родам, в том числе 13 видов из интересующего нас рода *Nosema*. Поэтому имеется возможность провести сравнительный анализ некоторых структур и стадий развития *N. diplostomi* с другими микроспоридиями. Первые сообщения об ультраструктуре *N. diplostomi* сделаны в 1971 г. (Дьяконов с соавт., 1971; Шигина, 1971).

Самыми ранними формами *N. diplostomi*, изученными под электронным микроскопом, были одноядерные шизонты. Они весьма характерны для микроспоридий и имеют много сходных признаков с шизонтами других видов. Близкие по строению шизонты были обнаружены у *N. orthodadii* (Coste-Mathez et Manier, 1968), у *N. sp.* (Weidner, 1970), *N. vivieri* (Vinckier et al., 1971), *N. (Encephalitozoon) cuniculi* (Sprague a. Vernick, 1971). Шизонты и последующие стадии *N. diplostomi*, как правило,

располагаются в клетках хозяина, тесно прилегая к их цитоплазме, в чем они обнаруживают сходство с выше перечисленными видами за исключением *N. cuniculi*, у которого все стадии развития образуют вокруг себя вакуоль. В цитоплазме шизонтов *N. diplostomi* не обнаружено каких-либо скоплений пузырьков типа аппарата Гольджи или внутренних мембран. Отметим, что у некоторых шизонтов наружные мембраны не гладкие, а слегка волнистые.

Следующей формой *N. diplostomi*, изученной под электронным микроскопом, была двухъядерная форма, отнесенная к молодому споробласту (рис. 2). Эти ранние споробласты обычно компактны и имеют неправильную, несколько угловатую форму. Аналогичные споробласты наблюдали Спраг и Верник (Sprague a. Vernick, 1968) у *Glugea weissenbergi*, Вавра и Ундин (Vavra a. Undeen, 1970) у *N. algerae*. Нами прослежены последующие стадии развития споробласта (рис. 3 и 4), закладка наружных мембран и начальный момент формирования полярной нити (рис. 4).

Как показывают наши данные по ультраструктуре спор *N. diplostomi*, их тонкое строение вполне отвечает общему плану строения микроспоридий. Однако в деталях строения отдельных органелл наблюдаются некоторые, а иногда существенные, особенности.

Характерным признаком для спор *N. diplostomi* является то, что поверхность спор не гладкая, а покрыта короткими микротрубочками, образующими рельефность споровой оболочки. Скульптурность или волнистость наружной споровой мембраны описана также у спор *N. la-phygma* (Weiser, 1959), *N. cuniculi* (Petri a. Schiodt, 1966), *N. apis* (Liu, 1973), но эти описания значительно отличаются от наших наблюдений. Характерные для споровой мембраны микротрубочки были описаны у споробластов и спор *N. michaelis* (Sprague et al., 1968) и тщательно изучены (Weidner, 1970; Dwyer a. Weidner, 1973). Эти микротрубочки напоминают щетинки и значительно длиннее тех, которые мы наблюдали у *N. diplostomi*.

Вопрос выявления ядра в спорах микроспоридий является наиболее трудным. Представленный нами материал не дает возможности точно определить, сколько ядер в споре — одно или два. На одних срезах спор мы наблюдали одно четкое ядро (рис. 9), а на других оно было представлено двойной структурой (рис. 5), также как и в раннем споробласте (рис. 2). Не дает четкой границы ядра в спорах и реакция Фельгена, испытанная нами ранее (Шигина и Гробов, 1972).

Полярные нити спор разных видов микроспоридий имеют разную длину и соответственно образуют неодинаковое число оборотов в спирали. Так, длинная полярная нить (250 мкм) спор *N. apis* образует в спирали 44 витка (Scholtyssek, Daneel, 1962), полярная нить средней длины (75—156 мкм) в спорах *N. locustae* уложена в спираль из 18 витков (Huger, 1960), и короткая нить спор *N. cuniculi* образует всего 5 витков (Petri a. Schiodt, 1966). Полярная нить спор *N. diplostomi* короткая (44 мкм), она образует один слой спирали из 4—4.5 витков. Этот признак для спор данного вида является весьма устойчивым и характерным. По этому признаку споры *N. diplostomi* отличаются от близких по величине спор *N. spelotremae*, паразитирующих в личинках трематод (Stanier et al., 1968), у которых полярная нить может быть уложена в несколько слоев. Мы считаем, что число витков полярной нити, образующих спираль в спорах микроспоридий, может служить видовым критерием.

Наблюдаемые нами полярные нити в процессе выбрасывания как в световом, так и в электронном микроскопе подтверждают гипотезу выворачивания полярной нити и прохождения через нее спороплазмы (Lom a. Vavra, 1961). На продольном срезе частично выброшенная полярная нить выглядит в виде трубки с довольно толстыми стенками (рис. 14). Мы предполагаем, что на этой микрофотографии зафиксирован момент выбрасывания и выворачивания полярной нити. Короткий и довольно широкий отрезок полярной нити, очевидно, представляет собой проксимальный (или базальный) ее участок, содержащий внутри себя

дистальный ее отрезок, и лишь самый дистальный конец полярной нити находится еще внутри споры. На конце выброшенного участка видна светлая капля жидкости, по-видимому, спороплазмы. Диаметр выброшенного участка полярной нити у выхода из споры равен 1700 Å, а диаметр дистального, еще не выброшенного — 600 Å, т. е. в 3 раза меньше.

Обнаруженные нами в спорах *N. diplostomi* структуры в виде длинных цитоплазменных мембран с рибосомами в форме полисом до сих пор не описывались у микроспоридий, однако сходные структуры были обнаружены в спорах *Heterosporis finki* (Schubert, 1969) и у *Hessea squamosa* (Ormieres a. Sprague, 1973). Ячеистая пластинка, обнаруженная на одном из срезов споры *N. diplostomi* (рис. 13), напоминает решетчатую структуру спор *Glugea weissenbergi*. Верник с соавторами (Vernick et al., 1969) принимали ее за специализированный участок полярнопласта, образованный складчатостью мембран. В то же время эта пластинка может напоминать поперечный срез микротрубочек, покрывающих наружный слой оболочки споры.

Таким образом, в спорах *N. diplostomi* при электронномикроскопическом исследовании были выявлены почти все структуры, характерные для микроспоридий. Своеобразными оказались четко выраженные внутрицитоплазменные мембраны с рибосомами в виде пакетов полисом, наружная споровая мембрана с микротрубочками, образующими четкий рельеф, и наличие 4—4.5 витков полярной нити. Митохондрии у *N. diplostomi*, как и у всех микроспоридий, отсутствовали, что указывает на анаэробный характер метаболизма.

Л и т е р а т у р а

- Дьяконов Л. П., Гробов О. Ф., Надточей Г. А., Шигина Н. Г. 1971. Электронная микроскопия *Nosema apis* Zander и *Nosema diplostomi* Schigina et Grobov. Матер. I Съезда Всесоюз. общ. пророзоологов. Баку : 282—283.
- Шигина Н. Г. 1971. Морфологическое изучение спор *Nosema diplostomi* Schigina et Grobov (Microsporidia: Nosematidae). Тез. докл. на 2-й Всесоюз. конфер. молодых ученых по ветеринарии, 14—17 дек., М. : 56—58.
- Шигина Н. Г., Гробов О. Ф. 1972. *Nosema diplostomi* sp. n. (Microsporidia: Nosematidae) — гиперпаразит трематод рода *Diplostomum* из глаз рыб. Паразитол., 6 (5) : 469—475.
- Coste-Mathes F., Manier J. F. 1968. *Nosema orthodadii* n. sp. (Microsporidia: Nosematidae) parasite of *Orthocladus lignicola* larvae (Diptera—Chironomidae). Bull. de la Soc. Zool. de France, 90 (1) : 127—133.
- Dwyer D. M., Weidner E. 1973. Microsporidian extrasporular microtubules, ultrastructure, isolation and electrophoretic characterization. Z. Zellforsch. 140 (2) : 177—186.
- Huger A. 1960. Electron microscope study on the cytology of a microsporidian spore by means of ultrathin sectioning. J. Insect Pathol., 2 (2) : 84—105.
- Ishihara R. 1968. Some observations on the fine structure of sporoplasm discharged from spores of a microsporidian *Nosema bombycis*. J. Invertebr. Pathol., 12 (3) : 245—258.
- Liu T. P. 1973. The fine structure of the frozen-etched spore of *Nosema apis* Zander. Tissue and Cell, 5 (2) : 315—322.
- Lom J., Vavra J. 1961. Niektore wyniki badan nad ultrastruktura spor parazyta ryb *Plistophora hyphessobryconis* (Microsporidia). Wiadomosci Parzytologiczne, 7 (4—6) : 828—832.
- Ormieres R., Sprague V. 1973. A new family, new genus and new species allied to the Microsporidia. J. Invert. Pathol., 21 (3) : 224—240.
- Pease D. S. 1964. Histological techniques for electron microscopy. 2d ed., Acad. press, 51—56.
- Petri M., Schiodt T. 1966. On the ultrastructure of *Nosema cuniculi* in the cells of the Yoshida rat ascites sarcoma. Acta pathol. et microbiol. scand., 66 (4) : 437—446.
- Reynolds E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron—opaque strain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 17 : 209—212.
- Sabatini D. D., Bench K., Barnett R. L. 1963. Cytochemistry and electron microscopy. J. Cell. Biol., 17 : 49—58.
- Scholtyssek E., Daneel R. 1962. Über die Feinstruktur der Spore *Nosema apis*. Deut. Entomol. Z., 9 (5) : 471—476.

- Schubert G. 1969. Ultracytologische Untersuchungen an der Spore der Microsporidienart, *Heterosporis finki* gen. n., sp. n. Parasitenkunde, 32 (4) : 59—79.
- Sjöstrand F. D. 1953. The ultrastructure of the outer segments of rods and corses of the eye revealed by the electron microscope. J. Cellul. Comp. Physiol., 42 : 15.
- Sprague V., Vernick S. H. 1968. Light and electron microscope study of a new species of *Glugea* (Microsporida, Nosematidae) in the 4-spined sticklback *Apeltes quadracus*. J. Protozoolog., 15, (3) : 547—571.
- Sprague V., Vernick S. H. 1971. The ultrastructure of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporida, Nosematidae) and its taxonomic significance. J. Protozoolog., 18 (4) : 560—569.
- Sprague V., Vernick S. H., Lloyd B. J. 1968. The fine structure of *Nosema* sp. Sprague, 1965 (Microsporida, Nosematidae) with particular reference to stages in sporogony. J. Invertebr. Pathol., 12 (1) : 105—117.
- Stanier J. E., Woodhouse M. A., Griffin R. L. 1968. The fine structure of the spore of *Nosema spelotremae*, a Microsporidian parasite of a *Spelotrema* metacercaria encysted in the crab *Carcinus maenas*. J. Invertebr. Pathol., 12 (1) : 73—82.
- Vavra J., Undeen A. N. (1970). *Nosema algerae* n. sp. (Cnidospora, Microsporida) a pathogen in a laboratory colony of *Anopheles stephensi* Liston (Diptera, Culicidae). J. Protozoolog., 17 (2) : 240—249.
- Vernick S. H., Sprague V., Lloyd B. J. 1969. Further observation on the fine structure of the spores of *Glugea weissenbergi* (Microsporida, Nosematidae). J. Protozoolog., 16 (1) : 50—53.
- Vinckier D., Devauchelle G., Prensier G. 1971. Etude ultrastructurale du developpement de la microsporidie *Nosema vivieri* (V. D. et P. 1970). Protistologica, 7 (2) : 273—287.
- Weidner E. 1970. Ultrastructural study of microsporidian development. I. *Nosema* sp. Sprague, 1965 in *Callinectes sapidus* Rathbun. Z. Zellforsch., 105 (1) : 33—54.
- Weiser J. 1959. *Nosema laphygmae* n. sp. and the internal structure of the microsporidian spore. J. Insect Pathol., 1 : 52—59.

THE FINE STRUCTURE OF NOSEMA DIPLOSTOMI, HYPERPARASITE
OF TREMATODES OF THE GENUS DIPLOSTOMUM

N. G. Shigina, L. P. Djakonov

S U M M A R Y

Studies were undertaken of the fine structure of microsporidian, schizont, sporoblast and spore of *Nosema diplostomi* Schigina et Grobov, 1972 parasitic in metacercariae of fish eyes. The spore wall with outer membrane of the nuclear substance, polar filament, polaroplast, sporoplasm and rough endoplasmic reticulum are described. The diameter of a partially ejected filament is larger than the polar filament inside the spore.

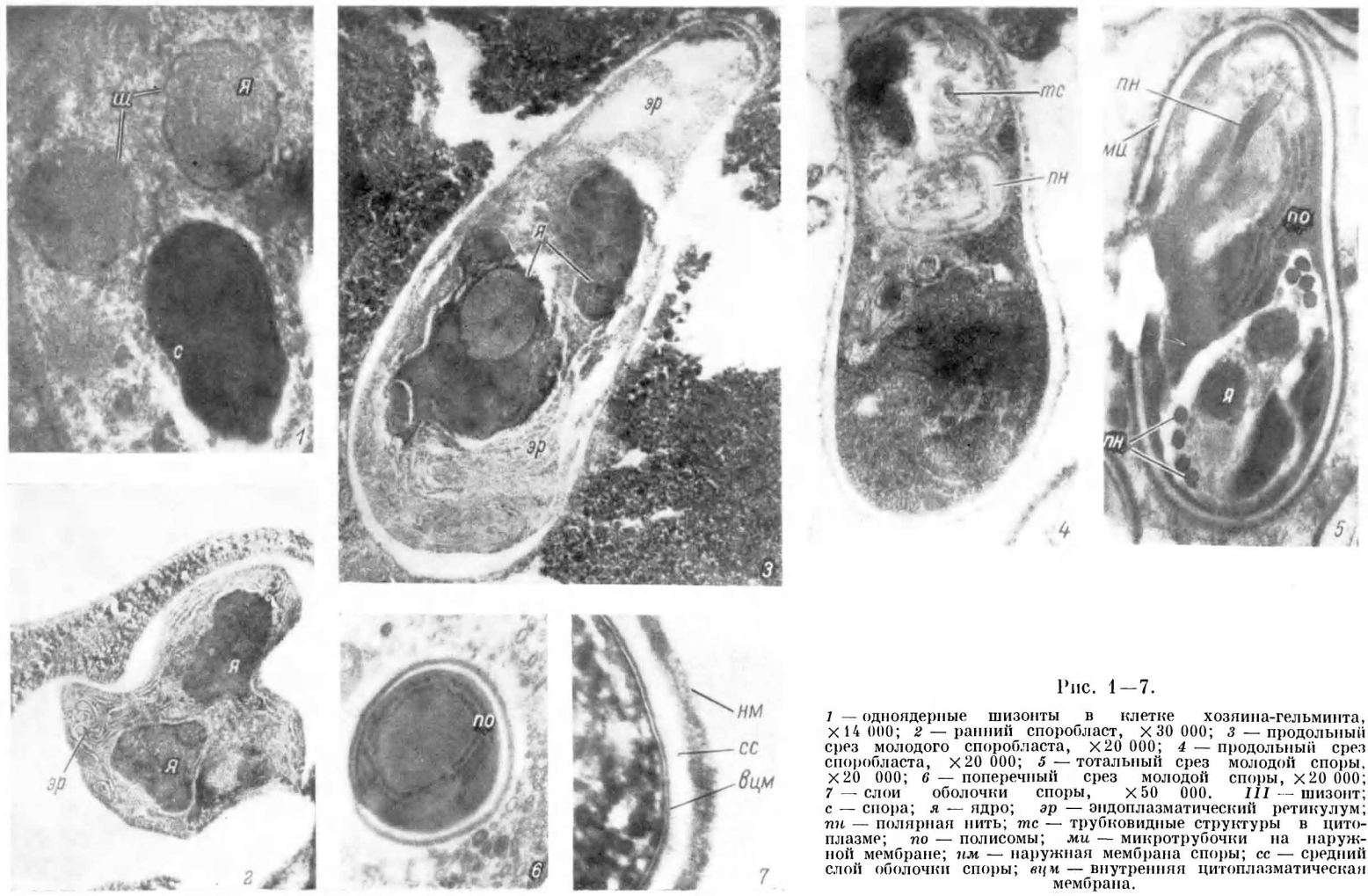


Рис. 1—7.

1 — одноядерные шизонты в клетке хозяина-гельминта, $\times 14\ 000$; 2 — ранний споробласт, $\times 30\ 000$; 3 — продольный срез молодого споробласта, $\times 20\ 000$; 4 — продольный срез споробласта, $\times 20\ 000$; 5 — тотальный срез молодой споры, $\times 20\ 000$; 6 — поперечный срез молодой споры, $\times 20\ 000$; 7 — слои оболочки споры, $\times 50\ 000$. III — шизонт: с — спора; я — ядро; эр — эндоплазматический ретикулум; тс — полярная нить; тс — трубковидные структуры в цитоплазме; по — полисомы; ми — микротрубочки на наружной мембране; нм — наружная мембрана споры; сс — средний слой оболочки споры; вцм — внутренняя цитоплазматическая мембрана.

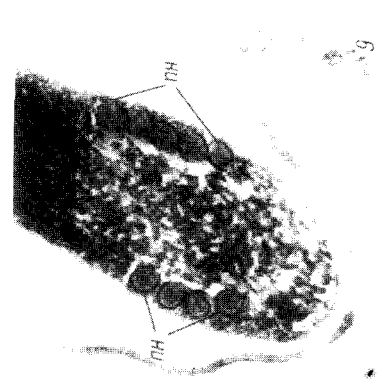
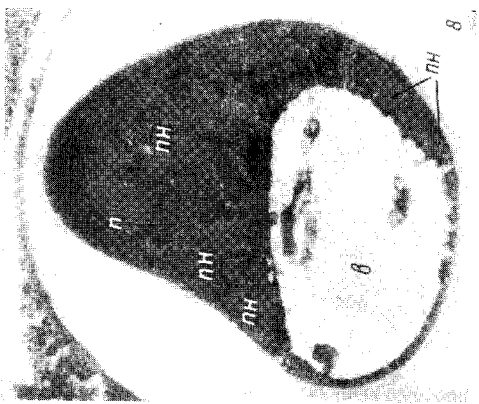
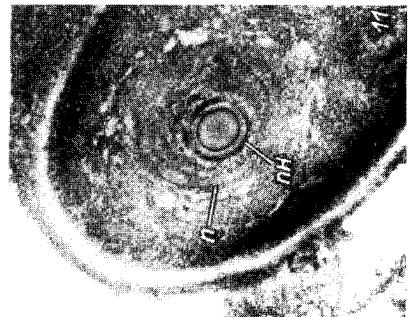
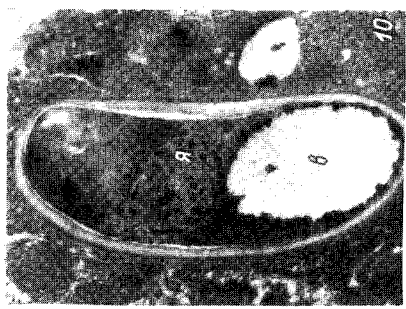
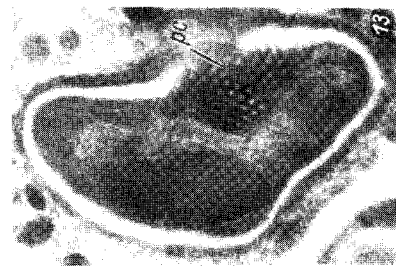
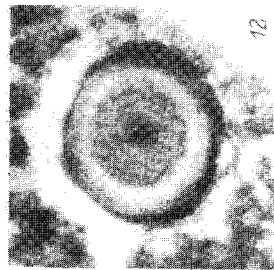
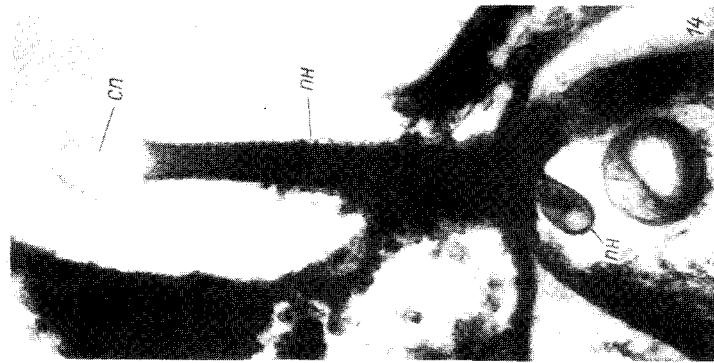


Рис. 8—14.

8 — поперечный срез споры, $\times 30\ 000$; 9 — продольный срез споры, $\times 20\ 000$; 10 — молодая спора на продольном срезе, $\times 15\ 000$; 11 — срез споры в области подспорной пластинки, $\times 50\ 000$; 12 — поперечный срез споры в области подспорной пластинки, $\times 50\ 000$; 13 — тангентальный срез споры, $\times 40\ 000$; 14 — продольный срез через частично выброшенную из споры подспорную пластинку, $\times 40\ 000$. ПП — подспорная; в — вакуоль; сн — спорная пластинка; я — решетчатая структура. Остальные обозначения такие же, как на рис. 1—7.