

УДК 576.593.161.13.012.4

© 1993

СВОБОДНОЖИВУЩИЕ РАССЕЛИТЕЛЬНЫЕ СТАДИИ
ТРИПАНОСОМАТИД ИЗ ВОДНЫХ НАСЕКОМЫХ

М. Н. Малышева, А. О. Фролов

Свето- и электронно-микроскопически исследованы свободноживущие расселительные стадии трех видов трипаносоматид: *Crithidia fasciculata*, *Blastocrithidia gerridis* и *Leptomonas jaculum*. Экспериментально установлена продолжительность выживания этих стадий трипаносоматид в воде. Показаны сходство и отличие свободноживущих расселительных стадий трипаносоматид с цистоподобными амастиготами и эндомастиготами.

Большинство низших трипаносоматид — моноксенные паразиты насекомых. Завершая свое развитие в хозяевах, эти жгутиконосцы формируют расселительные стадии, которые выводятся непосредственно во внешнюю среду и в зависимости от биологии хозяина либо попадают на сухой субстрат, либо в воду. Трипаносоматиды из наземных насекомых-хозяев формируют цистоподобные амастиготы (роды *Leptomonas* и *Blastocrithidia*) и эндомастиготы (род *Proteomonas*). Эти стадии могут переносить длительное высушивание (Schaub, Pretsch, 1981; Фролов, Малышева, 1992). Ультратонкая организация цистоподобных амастигот и эндомастигот изучена у *Blastocrithidia triatomaе* (Mehlhorn e. a., 1979; Schaub, Pretsch, 1981), *B. familiaris* (Tieszen e. a., 1985), *Leptomonas lygaei* (Tieszen e. a., 1989b), *L. mycophilus* (Фролов, Скарлато, 1990) и *L. jaculum* (Фролов и др., 1991).

Расселительные стадии трипаносоматид из водных насекомых изучены гораздо хуже. Известно, что *Crithidia fasciculata* из личинок и имаго ряда комаров (Clark e. a., 1964) и *B. gerridis* из клопов-водомеров (Tieszen e. a., 1989a) заражают своих хозяев через воду. Роль расселительных стадий у этих трипаносоматид выполняют свободноживущие формы. Такие же стадии обнаружены нами наряду с цистоподобными амастиготами у *L. jaculum* из водяного скорпиона *Nepa cinerea*.

Предлагаемая работа посвящена дальнейшему изучению свободноживущих расселительных стадий трех видов трипаносоматид: *Blastocrithidia gerridis*, *Leptomonas jaculum* и *Crithidia fasciculata*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культура жгутиконосцев *Crithidia fasciculata* ведется в лаборатории на жидкой питательной среде КГДЭ. Трипаносоматид из культуры после трехкратного отмывания осаждали центрифугированием при 3000 об./мин, помещали в воду и через 24 ч фиксировали.

Для изучения свободноживущих стадий *Leptomonas jaculum* зараженных клопов *Nepa cinerea* помещали в отстоянную водопроводную воду. После появления в воде трипаносоматид их осаждали центрифугированием (3000 об./мин) и фиксировали.

Формирование расселительных стадий *Blastocrithidia gerridis* изучали на срезах задних отделов кишечника *Gerris lacustris*.

Материал фиксировали 1.5%-ным глутаральдегидом в 0.1 М какодилатном буфере (1—2 ч, 0°) с последующей промывкой в трех сменах 0.1 М какодилатного буфера, содержащего 5 % сахарозы (1 ч). Постфиксировали 2%-ным OsO_4 (1 ч, 0°). После обезвоживания материал заключали в смесь аралдита с эпоном. Срезы готовили на ультрамикротоме ЛКВ III, окрашивали насыщенным водным раствором уранил-ацетата (3 ч) и цитратом свинца (5 мин) и изучали в электронном микроскопе JEM-100S.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология свободноживущих стадий *Leptomonas jaculum*, *Crithidia fasciculata* и *Blastocrithidia gerridis* в световом микроскопе несколько отличается от морфологии тех же жгутиконосцев из кишечника насекомых-хозяев и лабораторной культуры (рис. 1). Особи первых двух видов, попадая в воду, округляются, а эпимастиготы *B. gerridis*, напротив, принимают узковеретеновидную форму. В воде жгутиконосцы очень активны, а *C. fasciculata* в течение 4 сут сохраняют способность к размножению. Продолжительность выживания трипаносоматид в воде неодинакова у разных видов. Тисзен с соавторами указывают, что *B. gerridis* живут в воде не менее 48 ч (Tieszen e. a., 1989a). По нашим данным, этот вид трипаносоматид выдерживает более длительное пребывание в воде — до 72 ч. От 72 до 96 ч сохраняют жизнеспособность свободноживущие стадии *L. jaculum*. И наконец, у *C. fasciculata* подвижные клетки наблюдаются через 168 ч после помещения жгутиконосцев в воду.

Жизнеспособность свободноживущих стадий трипаносоматид была изучена у *C. fasciculata*. Эксперимент заключался в последовательном переводе в куль-

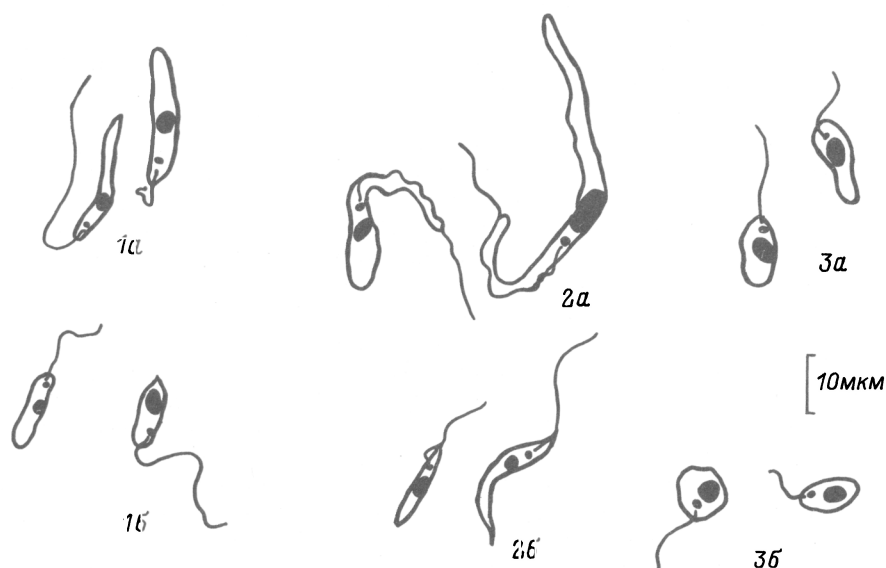


Рис. 1. Трипаносоматиды, формирующие свободноживущие расселительные стадии (окраска по Романовскому—Гимза, рисовальный аппарат, линейка 10 мкм).

1 — *Leptomonas jaculum*: а — жгутиконосцы в кишечнике клопа *Nepa cinerea*, б — жгутиконосцы из воды (72 ч); 2 — *Blastocrithidia gerridis*: а — жгутиконосцы из кишечника клопа *Gerris lacustris*, б — жгутиконосцы из воды (72 ч); 3 — *Crithidia fasciculata*: а — критидии в культуре (среда КГДЭ), б — жгутиконосцы из воды (72 ч).

Fig. 1. Trypanosomatids forming a free-living disseminating instar (Coloured after Romanovsky—Gimza, scale 10 micrometers).

туру жгутиконосцев, помещенных в воду. Положительный результат дали посе­вы на среду КГДЭ через 24, 48, 72, 96, 120, 144 и 168 ч после начала опыта. Эти данные подтверждают, что свободноживущие стадии трипаносоматид после длительного пребывания в воде могут вновь включаться в нормальный цикл развития.

Очевидно, что жгутиконосцы, способные выдерживать резкие изменения, связанные со сменой среды обитания, должны отличаться от кишечных стадий. Эти отличия выявляются на ультраструктурном уровне. Общей чертой в организации свободноживущих стадий всех изученных видов трипаносоматид является резкое увеличение электронной плотности цитоплазмы. Это связано с появлением мелкозернистого матрикса средней электронной плотности (рис. 2, 1; см. вкл.), заполняющего зоны прозрачной цитоплазмы между органоидами и клеточными включениями. Вследствие чего у свободноживущих стадий исчезает выраженная дифференцировка цитоплазмы, которая у культуральных и кишечных форм проявляется в наличии особых ее участков, в которые не заходят рибосомы. Это слой специализированной субпелликулярной цитоплазмы (рис. 2, 2, 3), в которую погружены субпелликулярные микротрубочки, цитоплазма, окружающая кинетосомы и обращенную к ним часть кинетопласта, а также цитоплазма жгутика (рис. 2, 4, 5). Мелкозернистый матрикс маскирует как микротрубочки, так и цитоплазматические мембраны, вследствие чего ряд органоидов перестает выявляться. В клетках свободноживущих жгутиконосцев, кроме того, резко возрастает количество липидных включений (рис. 2, 1). Остальные изменения в организации этих стадий носят более частный характер. Так, у *C. fasciculata* на поверхности образуются многочисленные складки, в которые заходит цитоплазма с субпелликулярными микротрубочками (рис. 2, 3). Расстояние между центрами соседних микротрубочек у таких критидий варьирует от 64 до 136 нм, в то время как у *C. fasciculata* в культуре эта величина постоянна и составляет 65 нм. Часть субпелликулярных микротрубочек у свободноживущих *C. fasciculata* погружается в глубину цитоплазмы (рис. 2, 3). На поверхности плазматической мембраны жгутиконосцев *B. gerridis* формируется слой неструктурированного гликокаликса, толщиной приблизительно 11 нм (рис. 2, 5).

У свободноживущих *C. fasciculata* лента ДНК становится более плотной и компактной, ее длина уменьшается до 0.5 мкм, в то время как у критидий из культуры она достигает 1 мкм (рис. 3, 1, 2; см. вкл.). Напротив того, у свободноживущих форм *L. jaculum* ДНК-содержащая часть кинетопласта «распушается», увеличивается в размерах, заполняя собой всю капсулу кинетопласта (рис. 3, 3, 4). В капсуле кинетопласта так же, как и в других частях митохондрия, кристы не выявляются.

Обычно округлое или овальное ядро трипаносоматид у помещенных в воду *C. fasciculata* приобретает неправильные очертания (рис. 3, 5, 6). Кариоплазма становится более электронноплотной. Пристеночный хроматин по периферии ядра сохраняется, в то время как ядрышко плохо дифференцируется.

Изменения, происходящие в процессе формирования свободноживущих расселительных стадий во многом сходны с преобразованиями, наблюдающимися при дифференцировке цистоподобных амастигот и эндоастигот. Так, образование «цист» в родах *Leptomonas* и *Blastocritidia* и эндоастигот у представителей рода *Proteomonas* всегда сопровождается изменениями в организации поверхностных структур (Schaub, Pretsch, 1981; Reduth, Schaub, 1988; Tieszen e. a., 1989b; Фролов, Скарлато, 1990; Фролов, Малышева, 1992). В частности, формируется плотный слой специализированной субпелликулярной цитоплазмы, в котором располагаются микротрубочки. Увеличение электронной плотности наружного, прилежащего к плазматической мембране слоя цитоплазмы отмечено также и у изученных нами свободноживущих стадий *L. jaculum*, *C. fasciculata* и *B. gerridis*.

В процессе формирования «цист» *L. mycophilus* происходит погружение субпелликулярных микротрубочек в глубь цитоплазмы, а по мере созревания «цист» микротрубочки полностью исчезают (Фролов, Скарлато, 1990). Погружение части субпелликулярных микротрубочек наблюдается и у жгутиковых расселительных стадий *C. fasciculata*. Подобное расположение субпелликулярных микротрубочек уже отмечалось у *C. fasciculata* при очень сильной инвазии кишечника хозяина (Brooker, 1972). Брукер связывает это явление с чисто физическими факторами — давлением клеток трипаносоматид друг на друга, в результате чего происходит изменение формы и размеров тела жгутиконосцев и «лишние» микротрубочки уходят в глубь цитоплазмы. Очевидно, что свободноживущие жгутиконосцы не испытывают подобного давления. Однако погружение части субпелликулярных микротрубочек в цитоплазму, по всей видимости, также связано с изменением формы тела трипаносоматид.

Обнаруживается сходство жгутиковых расселительных стадий с цистоподобными амастиготами и эндоастиготами и по такому признаку, как конденсация цитоплазмы, в результате чего перестают выявляться системы внутренних мембран (Reduth, Schaub, 1988; Фролов, Скарлато, 1990; Фролов, Малышева, 1992).

Что касается структуры кинетопласта у «цист» и эндоастигот, то тут можно выделить два типа преобразований. В «цистах» *B. triatomae* и эндоастиготах *Proteomonas inconstans* ДНК-содержащая часть кинетопласта «разрыхляется» и приобретает сетчатую структуру (Mehlhorn e. a., 1979; Reduth, Schaub, 1988; Фролов, Малышева, 1992), сходную картину мы наблюдали у *L. jaculum*. В процессе формирования «цист» *L. lygaei*, напротив, происходит конденсация ДНК (Tieszen e. a., 1989b), как и у свободноживущих *C. fasciculata*. В ядрах эндоастигот и «цист» *L. mycophilus* и *L. jaculum* происходит более сильная конденсация хроматина, чем у свободноживущих расселительных форм и конденсированный хроматин у них занимает практически весь объем ядра (Фролов, Скарлато, 1990; Фролов и др., 1991; Фролов, Малышева, 1992). А в так называемых «жгутиковых цистах» родов *Blastocritidia* и *Leptomonas* конденсированный хроматин образует характерные лабиринтовидные структуры (Mehlhorn e. a., 1979; Schaub, Pretsch, 1981; Tieszen e. a., 1989b).

В целом преобразования, происходящие в процессе формирования всех типов расселительных стадий у низших трипаносоматид, имеют сходный характер. Степень дифференцировки этих стадий, в частности их поверхностных структур, жгутикового аппарата, комплекса кинетопласт—митохондрия и ядра, прогрессивно усложняется в ряду от свободноживущих форм к эндоастиготам рода *Proteomonas* и далее к цистоподобным амастиготам родов *Leptomonas* и *Blastocritidia*, что, вероятно, отражает основное направление в эволюции расселительных стадий низших трипаносоматид.

Список литературы

- Фролов А. О., Скарлато С. О. Дифференцировка цистоподобных клеток паразитического жгутиконосца *Leptomonas mycophilus* in vitro // Цитология. 1990. Т. 32, № 10. С. 985—992.
- Фролов А. О., Скарлато С. О., Шаглина Е. Г. Морфология цистоподобных клеток жгутиконосцев *Leptomonas jaculum* // Цитология. 1991. Т. 33, № 10. С. 960—969.
- Фролов А. О., Малышева М. Н. Эндоастиготы — особый тип расселительных стадий трипаносоматид рода *Proteomonas* // Паразитология. 1992. Т. 26, вып. 4. С. 351—353.
- Brooker B. E. Modifications in the arrangement of the pellicular microtubules of *Crithidia fasciculata* in the gut of *Anopheles gambiae* // Z. Parasitenkd. 1972. Bd 40. S. 271—280.
- Clark T. B., Kellen W. R., Lindegren J. E., Smith T. A. The transmission of *Crithidia fasciculata* Leger 1902 in *Culiseta incidens* (Thomson) // J. Protozool. 1964. Vol. 11. P. 400—402.
- Mehlhorn H., Schaub G. A., Peters W., Haberkorn A. Electron microscopic studies on *Blastocritidia triatomae* Cerisola et al., 1971 (Trypanosomatidae) // Tropenmed. Parasit. 1979. Bd 30. S. 289—300.

- Reduth D., Schaub G. A. The ultrastructure of the cysts of *Blastocrithidia triatomae* Cerisola et al., 1971 (Trypanosomatidae): a freeze—fracture study // Parasitol. Res. 1988. Vol. 74. P. 301—306.
- Schaub G. A., Pretsch M. Ultrastructural studies on the excystment of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) // Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg. 1981. Vol. 75. P. 168—171.
- Tieszen K. L., Molyneux D. H., Abdel-Hafez S. K. Ultrastructure of cyst formation in *Blastocrithidia familiaris* in *Lygaeus pandorus* (Hemiptera: Lygaeidae) // Z. Parasitenkd. 1985. Bd 71. S. 179—188.
- Tieszen K. L., Kenneth L., Molyneux D. H. Transmission and ecology of trypanosomatid flagellates of water striders (Hemiptera: Gerridae) // J. Protozool. 1989a. Vol. 36. P. 519—523.
- Tieszen K. L., Molyneux D. H., Abdel-Hafez S. K. Host-parasite relationships and cyst of *Leptomonas lygaei* (Trypanosomatidae) in *Lygaeus pandorus* (Hemiptera: Lygaeidae) // Parasitology. 1989b. Vol. 98. P. 395—400.

ЗИН РАН, Санкт-Петербург

Поступила 5.11.1992

FREE-LIVING DISSEMINATING INSTARS OF TRYPANOSOMATIDS
FROM WATER INSECTS

M. N. Malysheva, A. O. Frolov

Key words: Trypanosomatidae, disseminating instar, water insect

Free-living instars of three trypanosomatid species, namely *Crithidia fasciculata*, *Blastocrithidia gerridis* and *Leptomonas jaculum*, have been examined by means of light and electron microscope. The time of surviving in the water has been discovered for these instars in experiment. Times of surviving were as follows: *B. gerridis* — 72 hours, *L. jaculum* — 96 and *C. fasciculata* — 168 hours. Similarities of free-living disseminating instars of tripanosomatids to cyst-like amastigotes and endomastigotes and also differences from these ones have been demonstrated.

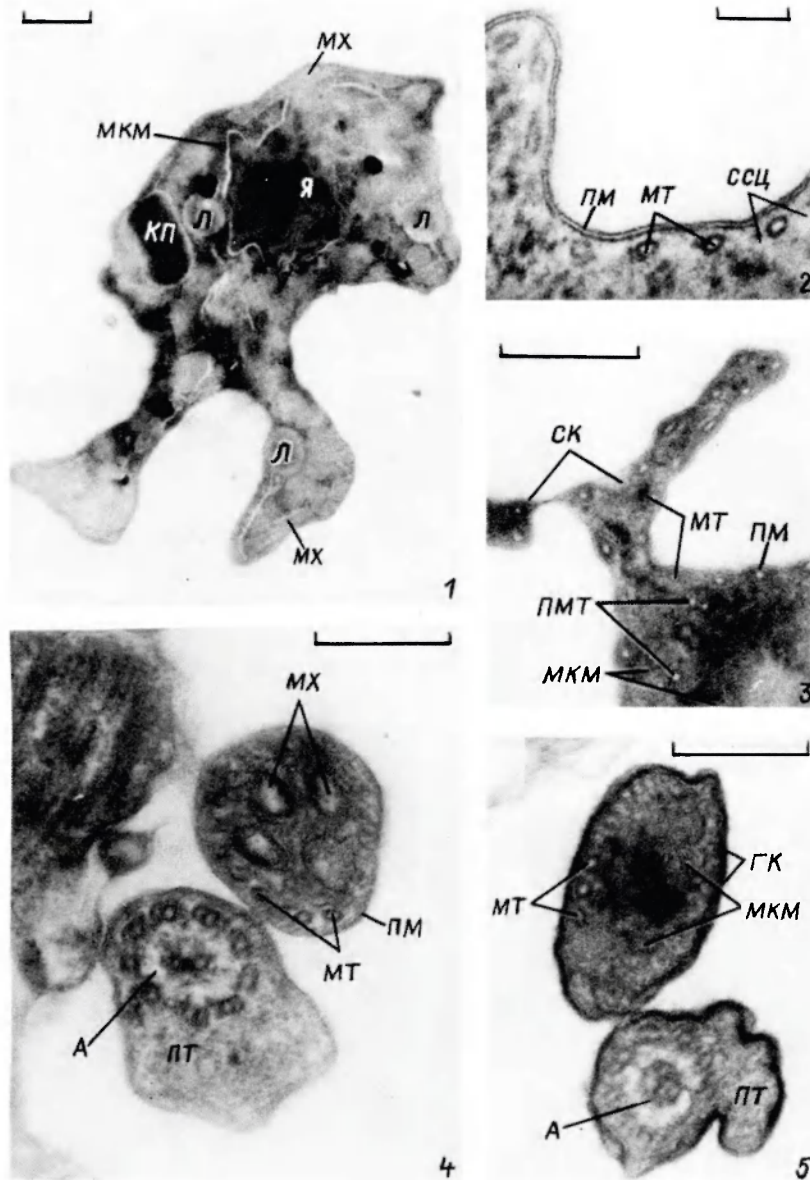


Рис. 2. Ультраструктура трипаносоматид, формирующих свободноживущие расселительные стадии.

1—3 — *Crithidia fasciculata*: 1 — общий вид критидии из воды, 2, 3 — различия в морфологии критидий из культуральной среды (2) и воды (3); 4, 5 — *Blastocrithidia gerridis* — различия в морфологии: 4 — кишечных и свободноживущих жгутиконосцев (5); А — аксонема; ГК — гликокалик; КП — кинетопласт; Л — липидные включения; МКМ — мелкозернистый матрикс; МТ — микротрубочки; МХ — митохондрия; ПМ — плазматическая мембрана; ПМТ — микротрубочки, погруженные в глубь цитоплазмы; ПТ — паразитальный тяж; СК — складки на поверхности клетки; ССЦ — специализированная субпелликулярная цитоплазма; Я — ядро. Масштабная линейка: 1, 2 — 0,6 мкм, 3 — 0,3, 4, 5 — 0,2 мкм.

Fig. 2. Ultrastructure of trypanosomatids forming a free-living disseminating instar.

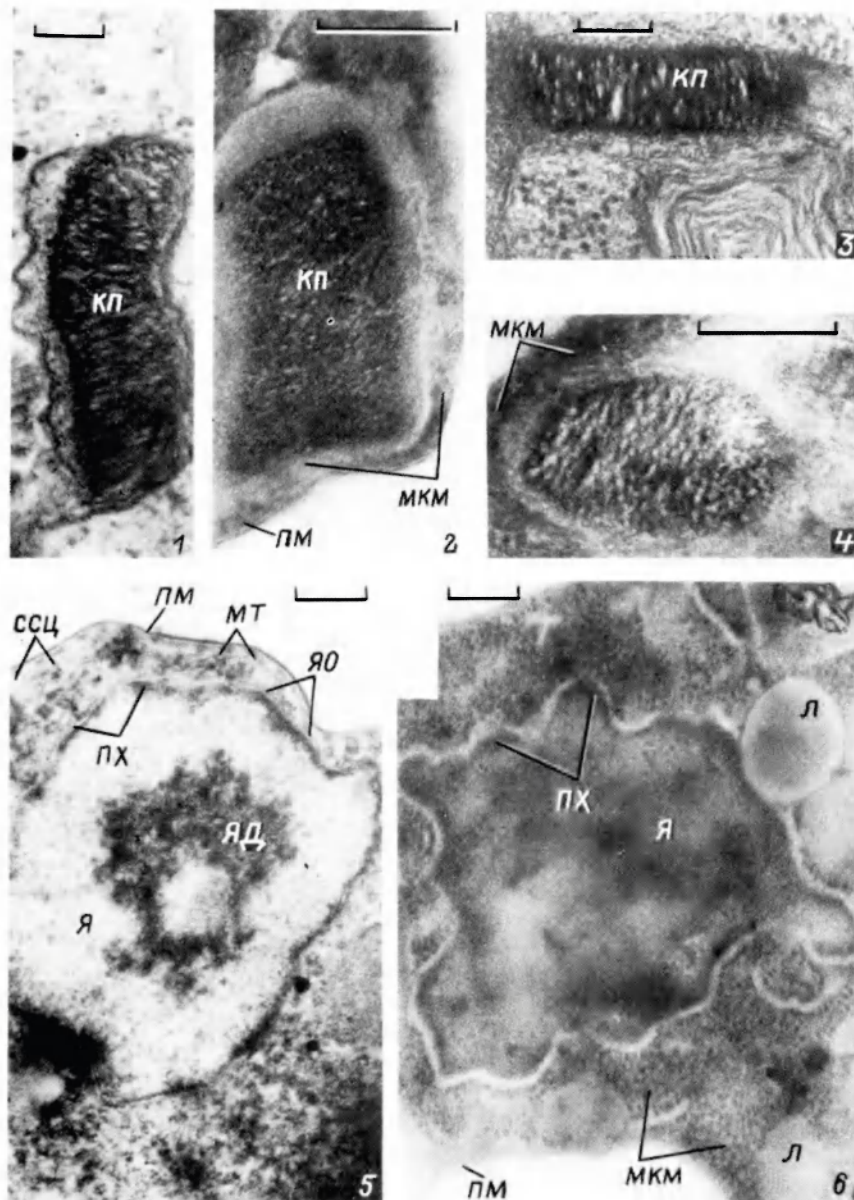


Рис. 3. Ультраструктура трипаносоматид, формирующих свободноживущие расселительные стадии.
 1, 2, 5, 6 — различия в морфологии *Crithidia fasciculata* из культуры (1, 5) и воды (2, 6); различия в морфологии *Leptomonas jaculum* из кишечника клопа *Nepa cinerea* (3) и воды (4); ПХ — пристеночный хроматин; ЯД — ядрышко; ЯО — ядерная оболочка. Масштабная линейка: 1—4, 6 — 0,2, 5 — 0,3 мкм.
 Остальные обозначения такие же, как на рис. 2.

Fig. 3 Ultrastructure of trypanosomatids forming a free-living disseminating instar (continuation).