

УДК 576.

**МИКРОСПОРИДИИ РОДА HELMICHIA
(MICROSPORIDIA: STRIATOSPORIDAE) ИЗ ЛИЧИНОК
КОМАРОВ-ЗВОНЦОВ (DIPTERA: CHIRONOMIDAE)
ВОДОЕМОВ СЕВЕРО-ЗАПАДА РОССИИ**

© В. Н. Воронин

Приведено описание микроспоридий *Helmichia agregata* Larsson, 1982 и *H. lacustris* sp. n. из жирового тела личинок хирономид. Обсуждаются различия в строении поляропластов у микроспоридий рода *Helmichia*.

К настоящему времени из личинок комаров сем. Chironomidae описано более 40 видов микроспоридий, принадлежащих к 21 роду (Bylen, 1994). Особое место среди них занимают формы с одноядерными палочковидными спорами, необычное строение которых послужило основанием для выделения семейств *Cylindrosporidae* Issi et Voronin, 1986 и *Striatosporidae* Issi et Voronin, 1986 (Исси, 1986). Одной из первых микроспоридий с палочковидными спорами, обнаруженных у личинок хирономид и изученных на ультратонком уровне, был вид *Helmichia aggregata* Larsson, 1982. Впоследствии к роду *Helmichia* были отнесены вид *H. glandulicola*, паразитирующий в слюнных железах личинок *Chironomus anthracinus* (Wulker, Weiser, 1991), и вид *H. tetrasticta* из жирового тела личинок *Ablabesmyia ex. gr. tetrasticta* (Кілочницький, Чолан, 1993).

В результате наших исследований в личинках хирономид было обнаружено несколько форм микроспоридий с палочковидными спорами. Изучение их ультраструктуры показало, что два вида принадлежат к роду *Helmichia*. Один вид провизорно отнесен нами к виду *H. aggregata*, а второй рассматривается как новый. В данной работе приводится описание этих видов и обсуждается ряд вопросов, возникших при сравнении нашего материала с литературными данными.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Личинок хирономид, добытых путем промывки грунта через мелкоячеистое сито, доставляли живыми в лабораторию, где их просматривали под стереомикроскопом. Особей, выделяющихся среди общей массы личинок наличием беловатых пятен на теле, отбирали и исследовали индивидуально. Каждую личинку помещали на отдельное предметное стекло в каплю воды и, сделав прокол кутикулы препаровальной иглой, микроскопировали смесь из воды и содержимого белого пятна при больших увеличениях микроскопа. В случае обнаружения спор микроспоридий предметное стекло использовали для приготовления постоянного водного препарата, а тело личинок переносили в 2.5 %-ный раствор глутаральдегида на какодилатном буфере, в котором хранили несколько суток. Постфиксацию проводили в 1.5 %-ном растворе четырехоксида осмия в течение 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 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

Для найденных микроспоридий характерны 8-споровая спорогония, начинающаяся с диплокариотического споронта, и палочковидные одноядерные споры с короткой изофилярной полярной трубкой, что совпадает с диагнозом рода *Helmichia* (Larsson, 1982). Выявленные между микроспоридиями различия в форме и размерах спор, а также длине полярной трубки послужили основанием для отнесения одного паразита провизорно к типовому виду *Helmichia aggregata*, а другого — к новому виду *H. lacustris*.

***Helmichia aggregata* Larsson, 1982 (рис. 1; см. вкл.)**

Хозяин: личинка комара-звонца *Endochironomus* sp.

Локализация: жировое тело.

Места обнаружения: небольшие озера в Ленинградской обл.

Встречаемость: вид отмечен в двух пробах.

Зараженность: 3 и 5 %.

Описание паразита. Меронты представлены диплокарионами. Переход от мерогонии к спорогонии начинается с образования вокруг диплокариона дополнительной тонкой оболочки спорофорного пузырька (рис. 1, а). Спорогония протекает в полости спорофорного пузырька. По ее завершении формируется 8 одноядерных споробластов. Полость спорофорного пузырька крупная, помимо споробластов и спор содержит мелкие гранулы электронноплотного секрета (рис. 1, б).

Живые споры палочковидной формы, иногда слегка согнутые, $4,2(3,5—5,5) \times 1—1,3$ мкм (рис. 1, в). На ультратонком уровне у зрелых спор оболочка относительно тонкая, местами волнистая; экзоспора двухслойная (рис. 1, г). Полярoplast занимает около 1/3 объема споры. В своей передней части, ограниченной полярным саком, он состоит из мельчайших, редко лежащих пластинок. Задняя и большая по размерам часть полярoplastа заполнена преимущественно гранулярным материалом средней электронной плотности, а также немногочисленными мельчайшими пластинками (рис. 1, г). Сравнительно тонкая полярная трубка, доходит, огибая ядро, до заднего конца споры, где и заканчивается. Толщина полярной трубки, составляющая 120—130 нм, одинакова на всем протяжении ее длины. Крупное ядро продолговатой формы, 0,8—0,9 мкм длины, располагается в центральной части споры. Задняя вакуоль и постеросома отсутствуют (рис. 1, г).

Дифференциальный диагноз. Основанием для отнесения найденной микроспоридии к виду *H. aggregata* послужили нахождение в одном виде хозяина, сходный характер спорогонии и почти одинаковая морфология спор. Небольшие различия выявлены только в строении полярoplastа. У *H. aggregata* (согласно первоописанию) передняя часть полярoplastа состоит из многочисленных плотно уложенных тонких пластинок, а в нашем материале пластины не были плотно сжаты. Кроме того, согласно первоописанию задняя граница полярoplastа представлена практически прямой линией, расположенной перпендикулярно к продольной оси споры (Larsson, 1982). У найденной микроспоридии задняя граница полярoplastа не имеет вида четкой прямой линии (рис. 1, г). Выявленные различия не позволяют рассматривать эти микроспоридии как полностью идентичные или как самостоятельные и поэтому найденная форма отнесена к виду *H. aggregata* провизорно.

***Helmichia lacustris* sp. n. (рис. 2—3; см. вкл.)**

Хозяин: личинка *Chironomus plumosus* L. (Diptera, Chironomidae).

Локализация: жировое тело.

Место обнаружения: озеро Ученое в Псковской обл.

Встречаемость: однократно в пробе 1984 г.

Зараженность: 1 %.

Описание паразита. Как и в случае с *H. aggregata*, цитоплазма меронтов содержит большое количество рибосом, а ядра представлены диплокарионом. Начало спорогонии сопровождается формированием оболочки и полости спорофорного пузырька, в котором заключен спорогональный плазмодий. Ядра последнего лежат изолированно, а цитоплазма сравнительно равномерно заполнена рибосомами и шероховатым ретикуломом (рис. 2, а). Споронт делится с образованием 8 одноядерных споробластов. Их оболочка по своему строению сходна с экзоспорой, а наблюдаемый в районе ядра комплекс из пузырьков, очевидно, представляет зачаток полярной трубки (рис. 2, б). В более зрелых споробластах, при хорошо развитом якорном диске и сформированной полярной трубке, зачатки полярнопласта отсутствуют или плохо выражены (рис. 2, в). Полость спорофорного пузырька на начальном этапе спорогонеза заполнена мелкогранулярным материалом, к которому (при окончательном формировании спор) добавляется трубчатый секрет (рис. 2, г). Оболочка спорофорного пузырька тонкая и по завершении спорогонеза разрушается.

Живые споры короткопалочковидные, $3.4(3-3.7) \times 1-1.3$ мкм длины, лежат в группах по 8 или одиночно (рис. 3, а). На электронограмме продольного среза зрелой споры четко просматриваются относительно светлая зона расположения полярнопласта, лежащее за ним удлиненное ядро и на заднем конце споры — поперечный срез полярной трубки (рис. 3, б). Спора имеет относительно тонкую оболочку, около 80 нм толщины, состоящую из внутренней плазмалеммы, электронно-прозрачной эндоспоры и наружной экзоспоры. Важной особенностью является отсутствие истончения эндоспоры на переднем конце споры. Экзоспора двухслойная и ее базальный слой тоньше и более электронноплотный, чем поверхностный (рис. 3, в). Полярнопласт в районе якорного диска и полярного сака представлен немногочисленными и нечеткими пластинами, в то время как вся остальная часть полярнопласта заполнена мельчайшими пластинками, которые трудно различимы из-за одновременного присутствия мелкогранулярного материала (рис. 3, г). Полярнопласт не имеет четкого подразделения на переднюю и заднюю части и в целом занимает от 1/3 до 2/5 объема споры. Якорный диск типичного для других микроспоридий строения. Полярная трубка идет от переднего конца споры, огибая ядро, до заднего, где загибается, образуя полувиток (рис. 3, б). На всем протяжении она имеет относительно равномерную толщину около 110—130 нм, хотя апикальный конец трубки на некоторых срезах значительно тоньше, чем у ее основания (рис. 3, в). По своему внутреннему строению полярная трубка близка к изофилярному типу и состоит из тонкого центрального электронноплотного стержня, вокруг которого располагается не менее 5 слоев, различающихся по своей толщине и электронной плотности (рис. 3, г). Крупное и продолговатое ядро, около 0.5 мкм ширины и от 0.8 до 0.9 мкм длины, расположено преимущественно в задней половине споры (рис. 3, в). Задняя вакуоль и постеросома отсутствуют.

Дифференциальный диагноз. Описанный вид в основном соответствует диагнозу рода *Helmichia* и отличается от ранее описанного вида *Helmichia aggregata* Larsson, 1982 несколько меньшими размерами спор, наличием полувитка полярной трубки в заднем конце споры и другим видом хозяина. От вида *H. glandulicola* его отличает не только другой хозяин и иная локализация, но и значительные различия в строении полярнопласта. Вид *H. tetrasticta* также паразитирует в другом хозяине и имеет не палочковидные, а овальные споры, 2.6×1.27 мкм, с хорошо выраженной задней вакуолью. Приведенные различия свидетельствуют о четком отличии данной микроспоридии от трех ранее описанных видов, что дает основание рассматривать ее как новый вид.

ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении ультраструктуры спор микроспоридий рода *Helmichia* отмечены значительные различия в строении их поляропластов. У типового вида *H. aggregata* поляропласт состоит из двух четко различающихся частей: передней, образованной мельчайшими и плотно уложенными пластинками, и задней — губчатого строения (Larsson, 1982). У вида *H. glandulicola* поляропласт исключительно пластинчатого строения, причем пластинки в передней части лежат более плотно, чем в задней (Wulker, Weiser, 1991). Поляропласт *H. tetrasticta* и нового вида *H. lacustris* состоит преимущественно из мельчайших пластинок, которые трудно выявляются из-за одновременно присутствия большого количества мелкого гранулярного материала. У микроспоридии, отнесенной нами провизорно к виду *H. aggregata*, поляропласт не имеет четкого разделения на переднюю и заднюю части и заполнен преимущественно мелкими гранулами и незначительными по числу мельчайшими пластинками, т. е. по существу является целиком губчатым.

При описании типового вида *H. aggregata* характеристика поляропласта с формулировкой «поляропласт состоит из двух пластинчатых частей» была включена в диагноз рода *Helmichia* (Larsson, 1982). Одновременно в диагнозе вида в той же статье передняя часть поляропласта описывается как пластинчатая, а задняя как губчатая. По-видимому, в тексте первоисточника в диагнозе рода *Helmichia* была допущена неточность и поляропласт должен быть охарактеризован как «пластинчатый в передней части и губчатый — в задней». В то же время у вида *H. glandulicola* передняя и задняя части поляропласта имеют типичное пластинчатое строение, что не соответствует предложенной нами поправке. При этом по всем другим признакам данный вид отвечает диагнозу рода *Helmichia*. Выходом из создавшегося положения может быть расширение рамок признаков рода с формулировкой «поляропласт пластинчатый, губчатый или комбинированный». Подобная формулировка также может быть включена и в диагнозы сем. *Striatosporidae* и *Cylindrosporidae* (Исси, 1986).

В заключение следует отметить, что полиморфизм поляропластов у микроспоридий рода *Helmichia* представляет несомненный интерес и заслуживает дальнейшего изучения. В то же время не исключено, что в ряде случаев различные проявления в строении поляропластов могли быть обусловлены особенностями фиксации материала, на что ранее указывал Ларссон (Larsson, 1986).

Список литературы

- Исси И. В. Микроспоридии как тип паразитических простейших // Микроспоридии. Л.: Наука, 1986. С. 6—136.
- Кілочицький П. Я., Чолан Д. М. Новый вид микроспоридій, виявлений у личинок хірономід // Вісн. Київ. ун-ту. Біологія. 1993. Вип. 25. С. 68—70.
- Bylen E. Ultrastructure and taxonomy of the microsporidia (Protozoa: Microspora) with emphasis on the microsporidia infecting midges (Diptera: Chironomidae) // Thesis doctoral dissertation. Lund, 1994. P. 5—47.
- Larsson J. I. R. Ultrastructure, function and classification of microsporidia // Progress Protistol. 1986. Vol. 1. P. 325—390.
- Larsson J. J. R. Cytology and taxonomy of *Helmichia agregatta* gen. et sp. nov. (Microspora, Thelohaniidae), a parasite of *Endochironomus* larvae (Diptera, Chironomidae) // Protistologica. 1982. Vol. 19. P. 323—355.
- Wulker W. F., Weiser J. *Helmichia glandulicola* sp. nov. (Microspora: Thelohaniidae): morphology, development and influence on salivary glands of *Chironomus anthracinus* (Diptera, Chironomidae) // Parasitol. Res. 1991. Vol. 77. P. 335—340.

НИИ озерного и речного рыбного хозяйства,
Санкт-Петербург, 199053

Поступила 29.12.1997

MICROSPORIDIA OF THE GENUS HELMICHIA (MICROSPORIDIA:
SRIATOSPORIDAE) FROM MIDGE LARVAE (DIPTERA: CHIRONOMIDAE)
FROM WATER BASINS OF THE NORTH-WESTERN RUSSIA

V. N. Voronin

Key words: Microsporidia, *Helmichia*, new species, midges.

SUMMARY

The microsporidia *Helmichia aggregata* Larsson, 1982 from a fat body of *Endochironomus* sp. larvae and *H. lacustris* sp. n. from a fat body of *Chironomus plumosus* larvae are described based on light microscopical and ultrastructural characteristics. The earliest stage observed in both species were diplocaryotic meronts, which were inclosed in parasitophorous vacuoles. The diplocaryotic meronts matured into diplocaryotic sporonts, which divided meiotically producing 8 sporoblasts and spores with single nuclei. The spores of *H. aggregata* were rod-shaped, lightly bent, c. $3.5-5.5 \times 1-1.3$ μm . The short polar filament of this species, which was completely uncoiled, reached the posterior pole of the spore. The spores of *H. lacustris* sp. n. were rodshaped, c. $3-3.7 \times 1-1.3$ μm . The short polar filament reached the posterior pole and had the semi-coil. The ultrastructure of spore wall and polaroplast, which had anterior lammelar and posterior spongius parts, was similar in both species. The some polaroplast differences between *Helmichia* species are discussed.

Вклейка к статье В. Н. Воронина (рис. 1—3)

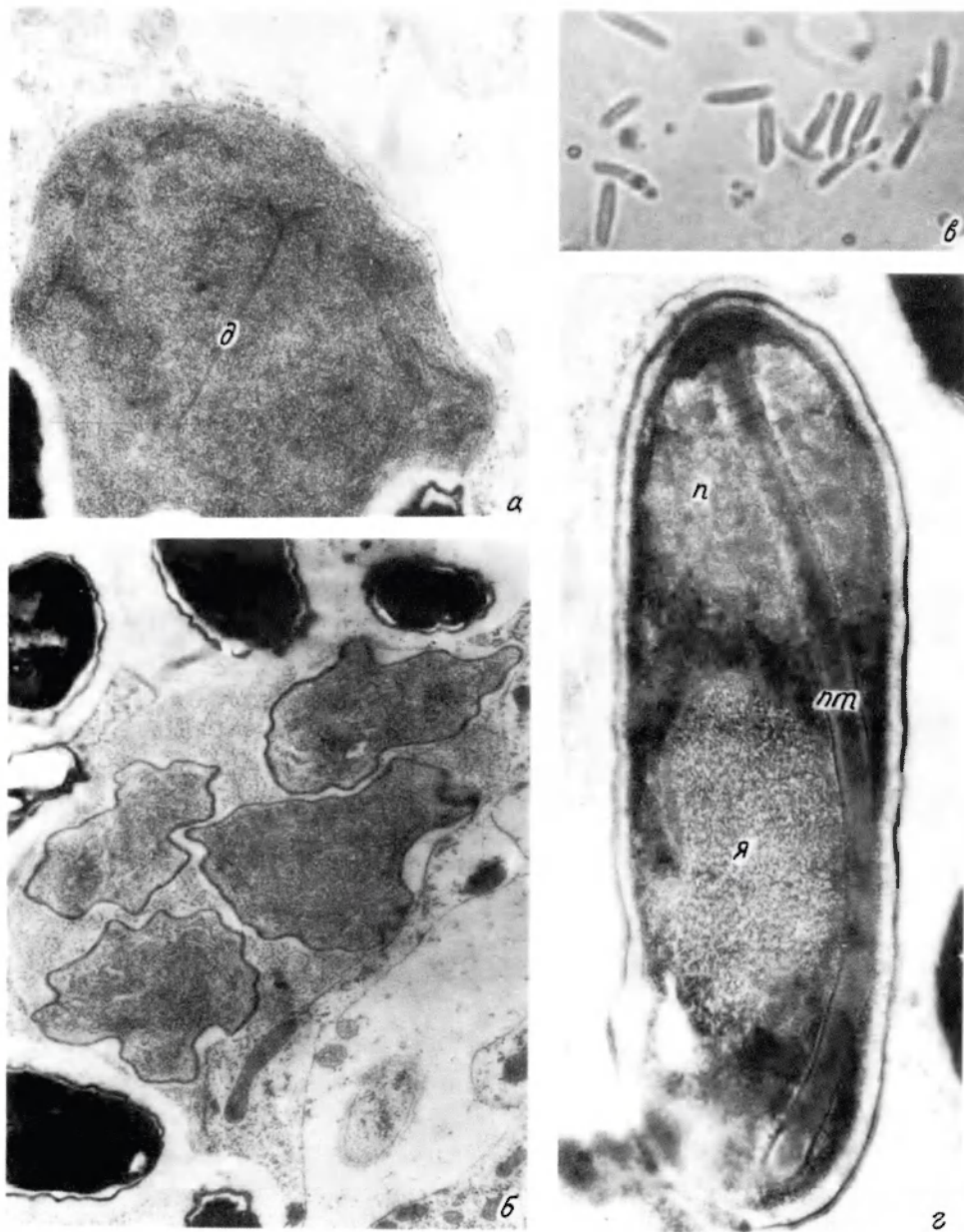


Рис. 1. Стадии развития и споры *Helmichia aggregata*.

a — диплокариотический меронт в паразитоформной вакуоле, $\times 26\ 000$; *b* — спорофорный пузырек с молодыми споробластами и мелкогранулярным секретом, $\times 20\ 000$; *v* — живые споры, $\times 2\ 000$; *z* — продольный срез споры, $\times 46\ 000$; *я* — ядро; *п* — поляропласт; *пт* — полярная трубка; *эк* — экзоспора; *эн* — эндоспора.

Fig. 1. Prespore stages and spores of *Helmichia aggregata*.

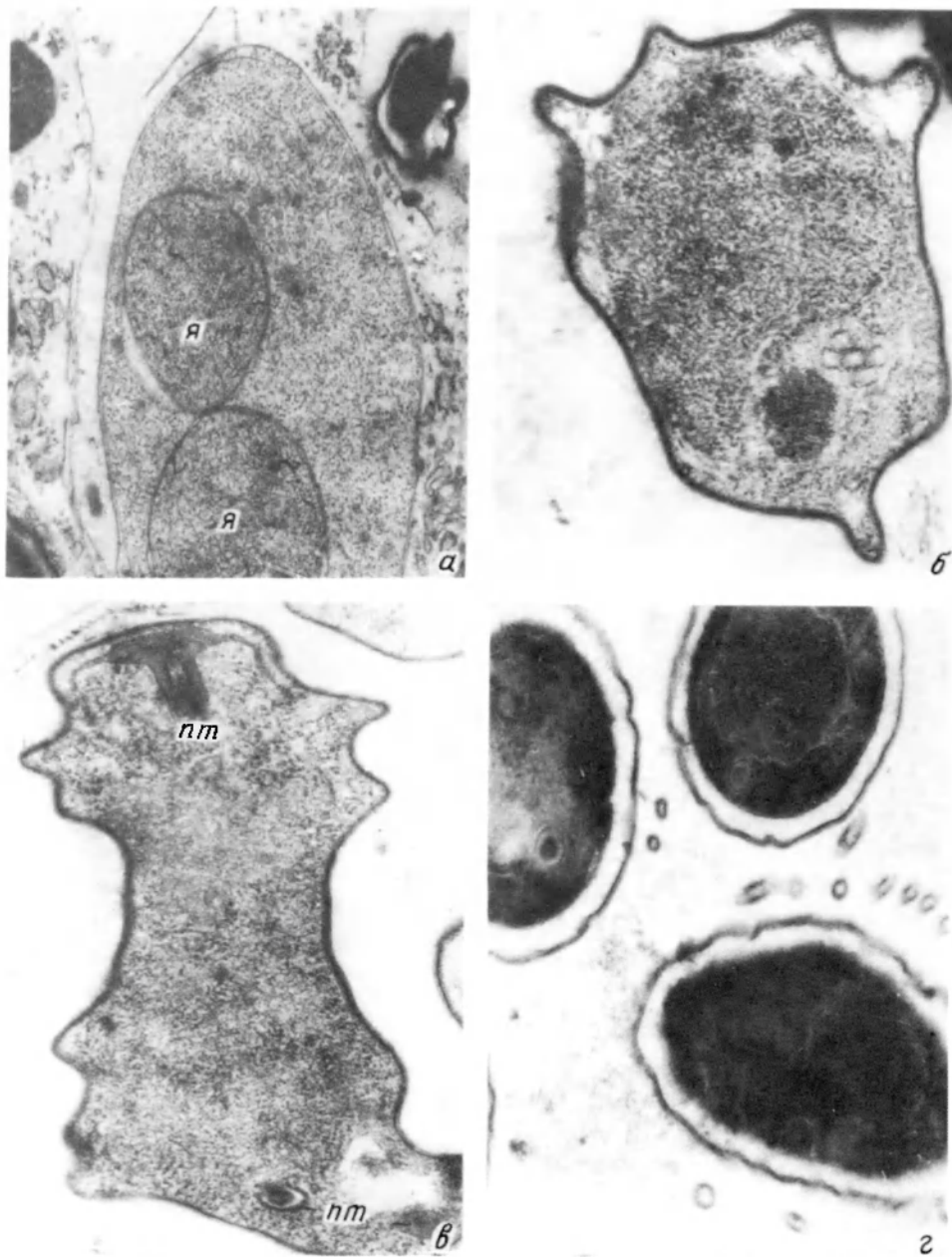


Рис. 2. Стадии развития *Helmichia lacustris* sp. n.

a — двухъядерный споронт в спороформном пузырьке, $\times 30\ 000$; *б* — споробласт с зачатком полярной трубки, $\times 52\ 000$; *в* — поздний споробласт с развитой полярной трубкой при отсутствии полярнопласта, $\times 48\ 000$; *г* — зрелые споры (поперечный срез), трубчатый и гранулярный секрет в полости спороформного пузырька, $\times 40\ 000$.

Обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 2. Presporal stages and spores of *Helmichia lacustris* sp. n.

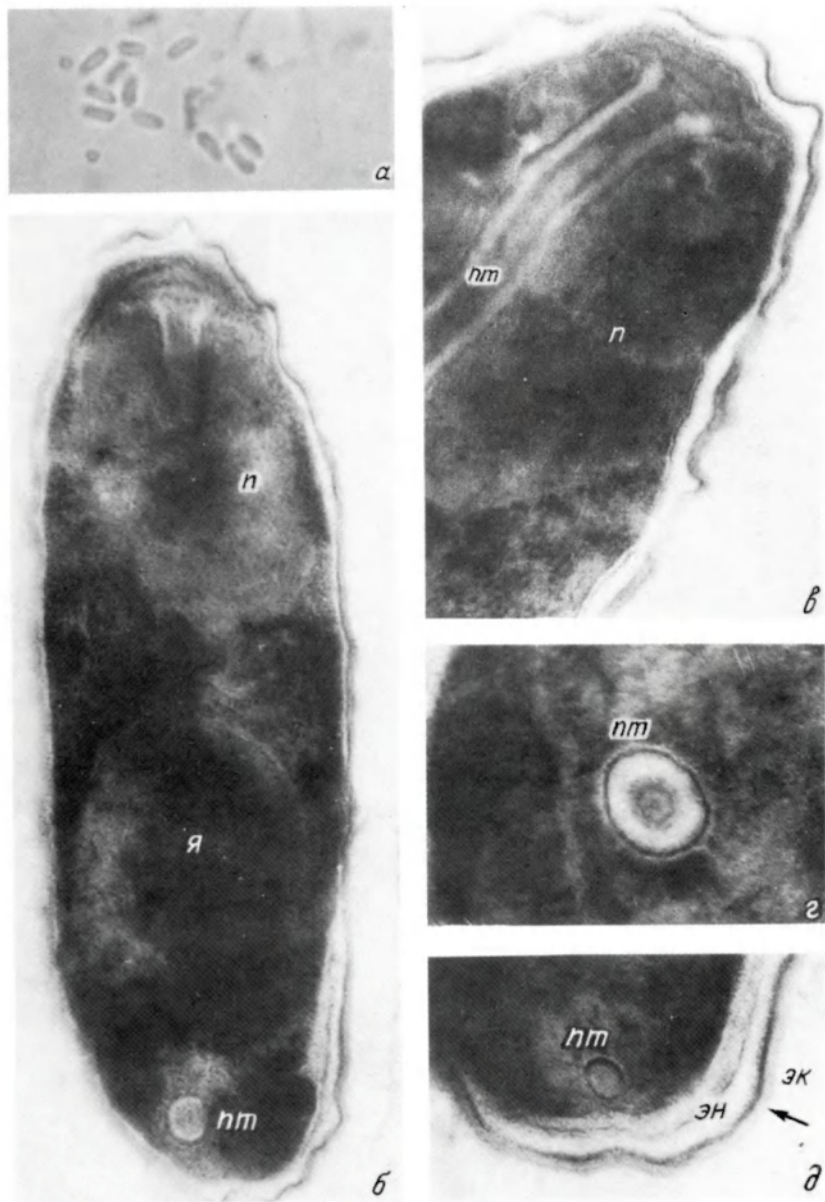


Рис. 3. Морфология спор *Helmichia lacustris* sp. n.
 а — живые споры, $\times 1800$; б — ультраструктура споры при продольном срезе, $\times 63\,000$;
 в — передний конец споры, $\times 90\,000$; г — поперечный срез полярной трубки, $\times 130\,000$;
 д — задний конец споры с истончением полярной трубки, $\times 120\,000$.
 Обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 3. The morphology of mature spores of *H. lacustris* sp. n.