

УДК 593.195+576.3.31+578.086.3

© 1993

## СТРОЕНИЕ МИКРОСПОРИДИИ NOSEMA MELIGETHI И ВЫДЕЛЕНИЕ НОВОГО РОДА ANNCALIHA

И. В. Исси, С. В. Крылова, В. М. Николаева

Изучено ультратонкое строение стадий развития и спор *Nosema meligethi*. На основании особенностей морфологии паразитического простейшего и его взаимоотношений с клеткой хозяина обоснован новый род *Anncaliha*, к которому отнесены виды, ранее входившие в род *Nosema*: *A. meligethi* и *A. varivestis*.

Микроспоридии жуков — интенсивно изучаемая экологическая группа этих простейших. Интерес к ним исследовательских центров разных стран обусловлен тем, что многие виды жуков серьезно вредят запасам сельскохозяйственной продукции, сельскому и лесному хозяйству; поиски паразитов жуков в перспективе могут привести к созданию новых биологических средств защиты от них.

Наибольшее число видов микроспоридий жуков, родовая принадлежность которых установлена светооптическими, реже электронно-микроскопическими методами, отнесено к роду *Nosema* (70 %), широко представленному у всех наземных насекомых.

Микроспоридия *N. meligethi*, выявленная у жуков рапсового цветоеда *Meligethes aeneus* в пригородах С.-Петербурга, была описана только на световом уровне (Исси, Радищева, 1979). Впоследствии эта микроспоридия найдена в природных популяциях цветоеда в Финляндии, в Прибалтике и на Украине. В эксперименте она заразила гусениц капустной белянки *Pieris brassicae* (Крылова, 1988). Таким образом, нам представилась возможность изучения ультратонкой морфологии микроспоридии *N. meligethi* из разных точек ареала насекомого-хозяина и из разных хозяев с целью определения изменчивости ее видовых признаков.

Результаты этих исследований и составляют содержание настоящей статьи.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Микроспоридию *Nosema meligethi* изучали на ультратонких срезах тканей инвазированных ею насекомых — жуков рапсового цветоеда из естественно зараженных природных популяций и гусениц капустной белянки, экспериментально зараженных в лабораторных условиях. Провели сравнительное изучение морфологии микроспоридии из двух географически удаленных популяций жуков (пригород С.-Петербурга и с. Дымер, 50 км севернее Киева) и из несвойственного ей насекомого-хозяина.

Для электронно-микроскопического исследования небольшие кусочки зараженных тканей насекомых фиксировали в 2.5%-ном глутаральдегиде на фосфатном буфере (рН 7.2) в течение 2 ч при температуре 0°. Постфиксацию проводили 1%-ным раствором OsO<sub>4</sub> при той же температуре. Затем материал обез-

воживали, проводя через серию спиртов возрастающей концентрации и абсолютный ацетон, и заливали в аралдит. Срезы делали на ультрамикротоме LKB. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом, окрашивали цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе Hitachi H-300.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Описание паразита на светооптическом уровне сделано ранее (Исси, Радищева, 1979), поэтому в этой статье мы приводим результаты только электронного микроскопирования.

### УЛЬТРАТОНКОЕ СТРОЕНИЕ *NOSEMA MELIGETHI*

На ультратонких срезах найдены стадии мерогонии и спорогонии (рис. 1, А, Б; см. вкл.).

Преспоральные стадии развития (рис. 1). Меронты представлены округлыми клетками с 1—2 диплокарионами. Ядра по своей электронной плотности не отличимы от цитоплазмы, только при больших увеличениях видна ограничивающая их оболочка (рис. 1, В). Нуклеоплазма ядер однородно гранулирована, скоплений хроматина не наблюдается. Цитоплазма умеренно электронноплотная, с редкими каналами эндоплазматической сети. К плазматической мембране снаружи прилегает дополнительный слой оболочки, образованный рядами тонких трубочек, промежутки между которыми заполнены мелкогранулированным материалом (рис. 1, В, Г). Такой же материал окружает клетки паразитов. Толщина оболочки клетки равна 30—50 нм.

В процессе образования споронта развивается эндоплазматическая сеть, резко увеличивается число рибосом и, как следствие, повышается электронная плотность цитоплазмы (рис. 1, Г, Д). Плазматическая мембрана утолщается свойственным споронтам электронноплотным слоем (начало его откладки видно на рис. 1, В). Мелкогранулированный материал дополнительного слоя оболочки перераспределяется вокруг тонких трубочек, утолщая их стенки (рис. 1, Д — стрелки). Такие же трубочки в массе появляются в пространстве, окружающем паразитов (рис. 1, Б, Д, Е). Хроматин ядер диплокариона образует скопления — формируются хромосомы (рис. 1, Д). Ядра диплокариона делятся и мигрируют к противоположным полюсам удлиненной клетки споронта, затем споронт делится на 2 споробласта (рис. 1, Е). В клетках споронтов нередко видны 1—2 серповидные структуры высокой электронной плотности, размещенные между ядрами и стенкой клетки (рис. 1, Д). После разделения споронта на 2 споробласта наблюдаются сильная деформация клетки паразита и быстрый морфогенез аппарата экстрезии (рис. 1, Ж).

Спора (рис. 2; см. вкл.; рис. 3). Споробласт превращается в молодую спору почти правильной удлиненно-овальной формы с более узким передним полюсом. У этой стадии полностью отсутствуют эндоспора и передняя пластинчатая часть поляропласта. Экзоспора образована электронноплотным гомогенным материалом, ее толщина 40 нм (рис. 2, А). У зрелых спор эндоспора развита сильно, ее толщина 120 нм при минимальной толщине 30 нм над полярным диском. Экзоспора достигает значительной толщины (до 60 нм) и состоит из двух слоев: внутреннего высокой электронной плотности и внешнего, менее электронноплотного (рис. 2, Б, В, Е).

Даже при обычном микроскопировании обращает на себя внимание необычная толщина оболочки спор (Исси, Радищева, 1979). При больших увеличениях видно, что менее плотный внешний слой образован трубочками, расположенными поперечно к продольной оси споры. На некоторых участках споры (на переднем и заднем полюсах и на экваториальной части) они обильно отхо-

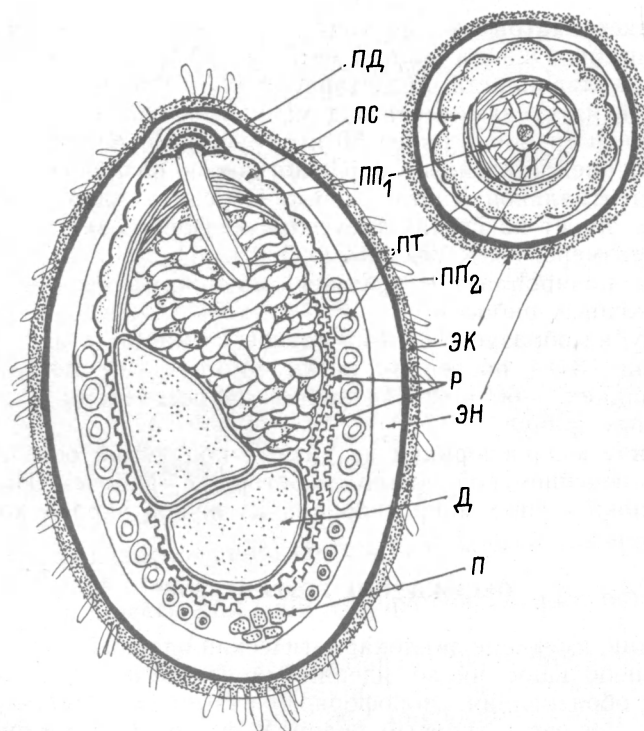


Рис. 3. Схема строения споры рода *Anncaliia*.

Fig. 3. The genera scheme of the structure of the genus *Anncaliia* spores.

Д — ядро диплокариона; О — оболочка ядра; П — постеросома; ПД — полярный диск; ПП<sub>1</sub> — пластинчатый участок поляропласта; ПП<sub>2</sub> — трубчатый участок поляропласта; ПС — полярный сак; ПТ — полярная трубка; СС — серповидная структура; Р — спирали рибосом; СГ — секреторные гранулы; СТ — секреторные трубочки; ХП — хромосомы паразита; ЭК — экзоспора; ЭС — эндоплазматическая сеть; С — спора; СБ — споробласт; СП — споронт; ЭН — эндоспора.

дят от поверхности в глубь цитоплазмы клетки хозяина. Сперва трубчатые и четковидные выросты лежат вблизи стенки споры (рис. 2, Е; 3), затем отодвигаются от нее, скапливаясь на границе между электронно-прозрачным пространством, где лежит спора, и цитоплазмой клетки хозяина или пространством, где расположена другая особь паразита (рис. 1, Б). Такая интенсивная секреторная активность — редкое явление у микроспоридий, развивающихся без образования спорофорного пузырька. Следует отметить, что на экзоспоре зрелых спор сохраняются регулярно расположенные места отхождения секреторных трубочек (рис. 2, И). Очень редко можно видеть, что некоторые из них пронизывают насквозь эндоспору.

Полярный диск грибовидной формы и достигает в поперечнике 370 нм (рис. 2, Б, В).

Интересную форму и большие размеры имеет полярный сак. От полярного диска он простирается назад до переднего ядра диплокариона. Электронно-плотный слой прикрывает тонкий слой умеренной электронной плотности и затем слой большей толщины и слабой электронной плотности (рис. 2, Б, Ж; 3). Эта структура в виде купола включает переднюю половину поляропласта, ее толщина равна 120 нм. На некоторых участках под слоем слабой электронной плотности виден тонкий слой высокой электронной плотности.

Поляропласт занимает около половины объема споры, достигая экваториальной части заднего ядра диплокариона (рис. 2, Б). Купол полярного сака

подстиляется пластинчатой частью поляропласта, образованной плотно уложенными пластинами. Она составляет не более 15 % объема этой органеллы. Основная часть поляропласта представлена сложной системой переплетающихся трубочек и на срезах имеет вид мелкоячеистой или мелкопузырчатой структуры. Диаметр трубочек равен 50 нм (рис. 2, Б, В).

Диплокарион, представленный морфологически различающимися ядрами, расположен в центральной части споры. Переднее ядро, лежащее рядом с поляропластом, имеет на срезах треугольную форму, заднее ядро — форму полусферы. Их размеры 700×500 и 600×500 нм.

Диплокарион, поляропласт и полярный сак окружены 1—3 рядами спирально расположенных рибосом.

Полярная трубка образует 13—14,5 витков, лежащих в один слой, и имеет сложное строение; 3—4 последних витка заметно уже передних (диаметр передних 120, задних — 60 нм). На заднем полюсе споры видно несколько электронноплотных гранул.

Все признаки у микроспоридий из разных популяций оставались неизменными, за исключением количества секреторных трубочек. Их было значительно больше вокруг спор микроспоридий из жуков украинской популяции.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Микроспоридии, имеющие диплокариотический ядерный аппарат у всех стадий развития, небольшое число ядерных делений и диспоробластическую спорогонию без образования спорофорного пузырька, в большинстве своем отнесены к роду *Nosema* с типовым видом *N. bombycis* из чешуекрылых.

Современный диагноз рода *Nosema*, включающий признаки ультратонкой морфологии, дан Кали (Cali). В настоящее время род *Nosema* — самый объемный по числу включенных в него видов (не менее 1/5 всех известных) и, по мнению некоторых авторов, сборный (Loubès, Maurand, 1978; Sprague, 1978; Исси, 1986).

Предположения о сборном характере рода *Nosema* базируются на том, что, во-первых, он включает в себя паразитов животных самых разных типов

Т а б л и ц а 1

Сравнительная характеристика родов *Nosema* и *Anncaliia*  
Comparative character of the genera *Nosema* and *Anncaliia*

Признак	Особенности ультратонкого строения стадий и спор	
	<i>Nosema</i>	<i>Anncaliia</i>
Оболочка меронта	Плазматическая мембрана (ПМ)	ПМ, покрытая рядами трубчатых структур или гранул
Оболочка споронта	ПМ с электронноплотным слоем снаружи	ПМ с электронноплотным слоем, покрытые рядами трубчатых структур или гранул
Экзоспора споробластов и спор	Мембранного типа, иногда орнаментированная мелкими гранулами	Из поперечных рядов трубчатых структур, на определенных участках отходящих в цитоплазму клетки хозяина
Поляропласт	2-частный, из плотно и редко уложенных пластин	2-частный, арковидный пластинчатый и трубчатый
Полярная трубка	Изофилярная	Анизофилярная (последние витки заметно уже и другого строения)
Ядра диплокариона спор	Одинаковые	Разные
Реакция клетки хозяина	Отсутствует до спорогенеза, затем образуется электронно-прозрачный ореол	Уже вокруг меронтов образуется электронно-прозрачная зона, заполненная трубчатыми структурами паразитов

и, во-вторых, к нему нередко относят микроспоридий со сложными циклами развития, часть которых во многом совпадает с циклом развития нозем.

Кроме нозем, такие же признаки имеет род *Ichthyosporidium* Schwartz, 1963, выделенный в самостоятельный род на основании образования под его воздействием у позвоночного животного-хозяина (рыб) цист особого ультра-тонкого строения (Sprague, Vernick, 1974). Другой род *Hirsutusporos*, очень близкий к ноземе, был описан недавно из мошек в Новой Зеландии (Batson, 1983). Единственное, но яркое отличие его от нозем — развитие волосовидных придатков на спорах при завершении их морфогенеза.

Анализируя полученный нами материал, мы пришли к выводу, что ультра-тонкое строение *N. meligethi* существенно отличается от строения типового вида рода — *N. bombycis*. Эти различия сгруппированы нами в табл. 1.

По нашему мнению, эти различия настолько существенны, что изучаемый нами вид не может быть отнесен к роду *Nosema*, а должен быть выделен в самостоятельный род, близкий родам *Nosema*, *Ichthyosporidium* и *Hirsutusporos*, представляющим подсем. Nosematinae.

#### Подсем. NOSEMATINAE

Микроспоридии с диплокариотическим ядерным аппаратом на всем протяжении развития. Многоядерные вегетативные стадии не образуются. Спорогония диспоробластическая без формирования спорофорного пузырька.

##### Род NOSEMA Naegeli, 1857

Микроспоридия с диплокариотическим ядерным аппаратом у всех стадий, образует свободные споры без придатков, не вызывает разрастания тканей и не продуцирует секрет в полость клетки.

Более 200 видов этого рода паразитирует у животных всех типов, из них более 150 — у чешуекрылых.

Типовой вид: *N. bombycis* Naegeli, 1857 из тутового шелкопряда *Bombyx mori* (Insecta, Lepidoptera).

##### Род ICHTHYOSPORIDIUM Schwartz, 1963

Микроспоридия, строение стадий и цикл развития которой такие же, как у рода *Nosema*. Единственный вид паразитирует у рыб, вызывая сильное разрастание соединительной ткани.

Типовой вид: *I. giganteum* Schwartz, 1963 из рыбы *Leiostomus xanthurus*.

##### Род HIRSUTUSPOROS Batson, 1983

Микроспоридия, строение преспоральных стадий и цикл развития которой такие же, как у рода *Nosema*. В конце развития образует споры с филаментозными придатками, сконцентрированными пучком на заднем полюсе и в виде пояса между экватором и передним полюсом. Описан 1 вид.

Типовой вид: *H. austrosimulii* Batson, 1983, из мошки *Austrosimulium* sp. (Insecta, Diptera).

##### Род ANNCALIA gen. n.

Микроспоридия, цикл развития которой такой же, как у ноземы. Стадии мерогонии, спорогонии и споры имеют дополнительный внешний слой оболочки из трубчатых структур и гранул секрета. Споробласты и созревающие споры обильно выделяют трубчатый секрет, поляропласт пластинчато-трубчатый,

Т а б л и ц а 2

Сравнительная характеристика видов рода *Anncaliia*  
Comparative character of two species of the genus *Anncaliia*

Вид рода <i>Anncaliia</i>	Автор и год	Насекомое-хозяин	Локализация	Характеристика спор			
				размеры (мкм)	форма	количество витков поляр- ной трубки	угол накло- на вит- ков, в°
<i>A. meligethi</i> comb. n.	Исси, Ради- щева, 1979	<i>Meligethes</i> <i>aeneus</i> (Coleo- ptera Nitiduli- dae)	Жировое тело, редко мускула- тура	4—4.8×2—3 (жив.)	Овальная	13—14 (10.5—11— —2.5—3.5)	60
<i>A. varivestis</i> comb. n.	Brooks e. a., 1985	<i>Epilachna vari- vestis</i> (Coleo- ptera, Chryso- melidae)	Мальпигиевы сосуды, затем все ткани, кроме эпителия кишечника	3.6—4.8× ×2.4 (окр.) 4.7±0.06× ×2.6±0.03	От эллип- сойдной до слегка гру- шевидной	17—19 (14—4)	50

трубка слегка анизотропная. Цитоплазма клетки хозяина подвергается силь-  
ному разрушению.

Род назван в честь Ann Cali, давшей современное описание типового вида  
рода *Nosema*.

В состав рода мы включаем два вида микроспоридий: типовой вид *A. meli-  
gethi* comb. n. (*Nosema meligethi*) и *A. varivestis* comb. n. (*Nosema varivestis*  
Brooks, Hazard, Becnel, 1985), обе микроспоридии паразитируют у жуков.  
Их сравнительная характеристика дана в табл. 2.

Мы полагаем, что по мере накопления данных по ультратонкой морфоло-  
гии представителей рода *Nosema*, паразитирующих у насекомых разных отря-  
дов, будет продолжена дальнейшая группировка видов на основе особенностей  
их морфологии и выделение их в новые роды.

#### Список литературы

- Исси И. В. Микроспоридии как тип паразитических простейших // Протозоология. Вып. 10.  
Л.: Наука, 1986. С. 6—136.
- Исси И. В., Радищева Д. Ф. Микроспориозы жуков-вредителей крестоцветных куль-  
тур в Ленинградской области // Бюл. Всесоюз. НИИ защиты растений. 1979. № 46. С. 19—23.
- Крылова С. В. Выявление возможностей адаптации микроспоридии *Nosema meligethi* из рапс-  
ового цветка к чешуекрылым с целью использования ее как биологического агента  
борьбы // Ускорение научно-технического прогресса в цветоводстве и горном садоводстве.  
Тез. докл. Сочи: ВНИИЦиГС, 1988. С. 32.
- Batson B. S. A light and electron microscopic study of *Hirsutusporus austrosimulii* gen. n.,  
sp. n. (Microspora: Nosematidae), a parasite of *Austrosimulium* sp. (Diptera, Simuliidae)  
in New Zealand // Protistologica. 1983. Vol. 19, N 2. P. 263—280.
- Brooks W. M., Hazard E. I., Becnel J. Two new species of *Nosema* (Microsporida:  
Nosematidae) from the mexican bean beetle *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae) //  
J. Protozool. 1985. Vol. 32, N 3. P. 525—535.
- Loubès C., Maurand J. Remarques sur le «Diplocaryon» des Microsporidies // 4th Intern.  
Congr. Parasitol. Sect. B. Warszawa, 1978. P. 12.
- Sprague V., Vernick S. H. Fine structure of the cyst and some sporulation stages of *Ichthyosporidium* (Microsporida) // J. Protozool. 1974. Vol. 21, N 5. P. 667—677.
- Sprague V. Characterization and composition of the genus *Nosema* // Misc. Publ. Entomol.  
Soc. Amer. 1978. N 11. P. 5—16.

Институт защиты растений,  
Санкт-Петербург, г. Пушкин

Поступила 17.04.1992

# THE ULTRASTRUCTURE OF THE MICROSPORIDIUM NOSEMA MELIGETHI AND ESTABLISHMENT OF THE NEW GENUS ANNCALIHA

I. V. Issi, S. V. Krylova, V. M. Nicolaeva

**Key words:** microsporidia, ultrastructure, *Nosema*, *Anncaliha*, *A. meligethi*, *Meligethes aenus*.

## SUMMARY

The ultrastructure study of the microsporidium *Nosema meligethi* from *Meligethes aenus* (Coleoptera) revealed some peculiarities of its organization. This species is a disporous, all stages of its development have a diplocaryon. The cytoplasm of invaded host cells contains numerous secretory tubular products.

There are some essential distinctions between *N. meligethi* and the type species of the genus *Nosema* — *N. bombycis*. *N. meligethi* is characterized by: 1) the plasma membrane of presporial stages is covered with a coat of tubular and granular structures, 2) the exospore is covered with tubular structures directing into the host cell cytoplasm, 3) the polar filament is slightly anisofilar, 4) the polaroplast consists of the anterior small lamellar part and posterior most tubular part, 5) the host cell cytoplasm is heavily destroyed around parasite cells.

As a result the new *Anncaliha* has been established. The former *Nosema meligethi* has been transferred to that genus.



Вклейка к ст. И. В. Исси и др.

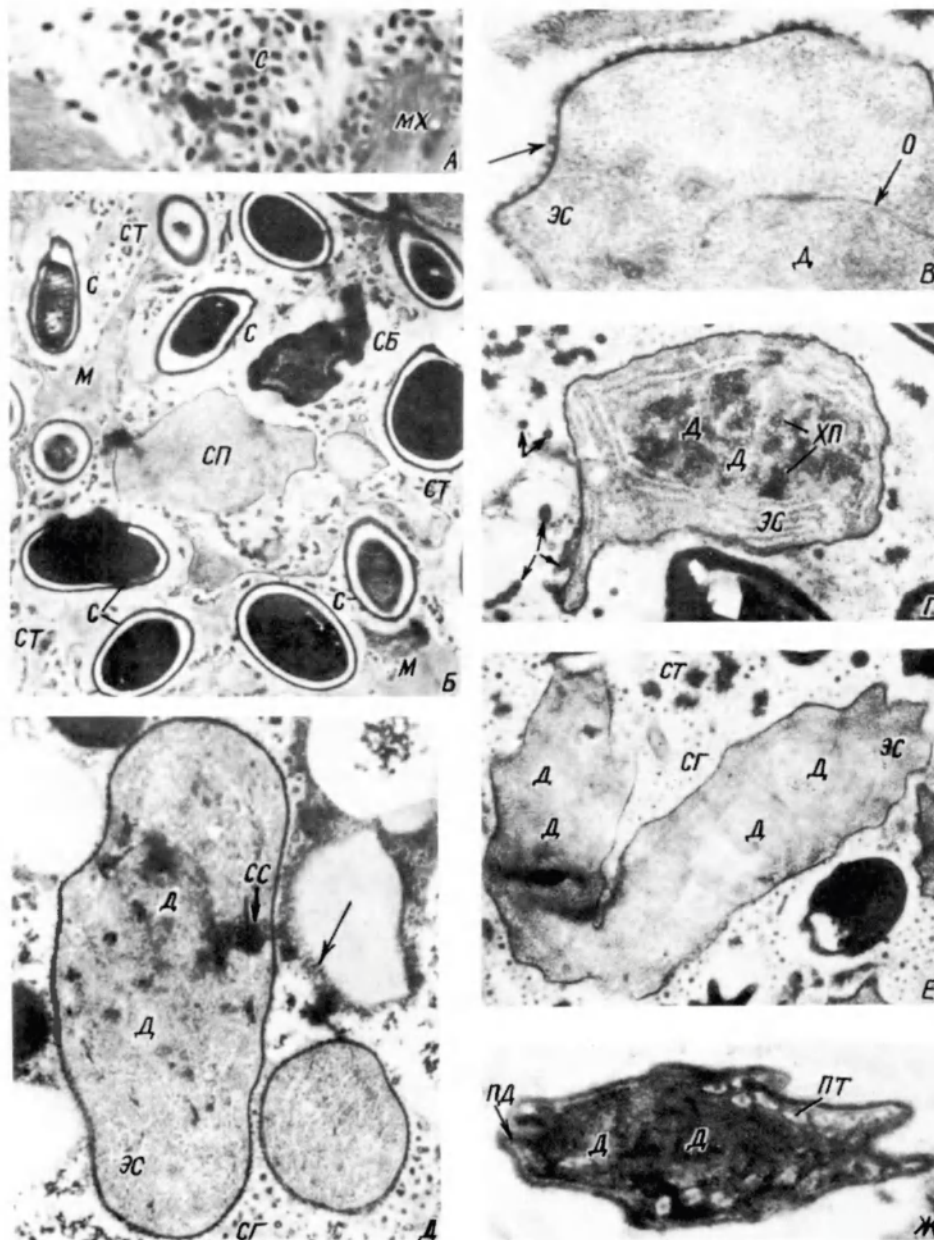


Рис. 1. Строение стадий развития *Nosema meligethi*.

Fig. 1. The structure of the *Nosema meligethi* developmental stages.

А — участок инвазированной мышцы (полутонкий срез); Б — участок инвазированной клетки: видны стадии развития микроспоридии, многочисленные секреторные гранулы и трубочки; В — часть клетки позднего меронта, видна дополнительная оболочка из трубочек и гранул (стрелка); Г — споронт с сильно развитой эндоплазматической сетью; Д — споронты, на косых срезах видно строение дополнительной оболочки (стрелка); Е — деление споронта на 2 споробласта; Ж — споробласт с почти сформированным аппаратом экстрюзии. Увел. А — 1200×; Б — 9 800×; В — 44 000×; Г — 24 000×; Д — 16 000×; Е — 12 000×; Ж — 28 000×.

Обозначения такие же, как на рис. 3.



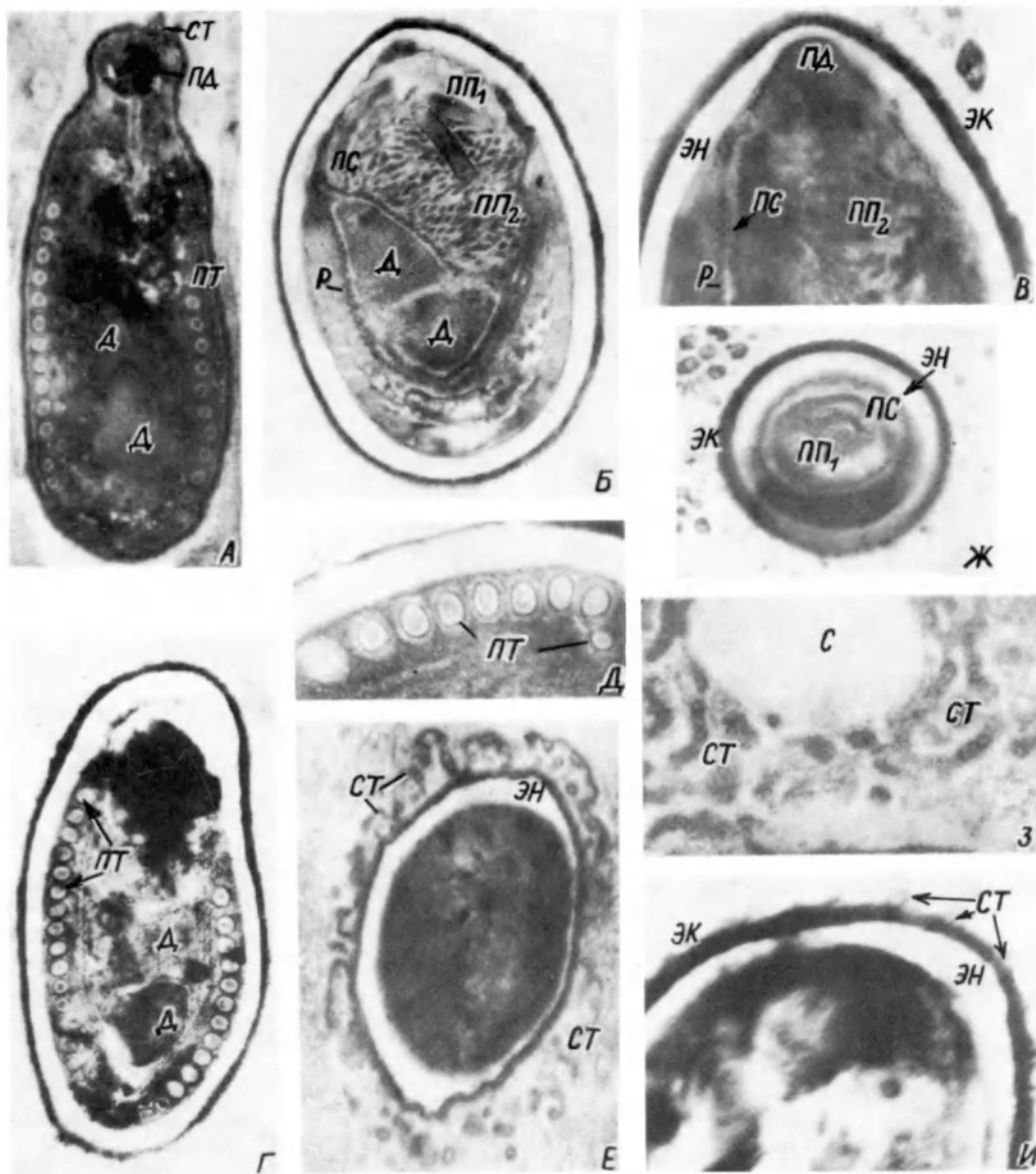


Рис. 2. Строение споры *Nosema meligethi*.

Fig. 2. The structure of the *Nosema meligethi* spores.

А — молодая спора; Б — зрелая спора; В — передний полюс зрелой споры; видны грибовидный полярный диск, сильно развитый полярный сак, небольшой пластинчатый и большой трубчатый участки полярно-пласта; Г — зрелая спора с полностью сформированной полярной трубкой; Д — полярная трубка; Ж — поперечный срез споры через полярнопласт; Е, З — секреторные трубочки вокруг созревающей споры; И — то же, вокруг созревшей споры. Увел.: А — 30 000×; Б — 26 000×; В — 32 000×; Д — 53 000×; А — 28 000×; Е — 33 000×; Ж — 22 000×; З — 30 500×; И — 70 000×.

Обозначения такие же, как на рис. 3.