

NOWE SZCZEGÓŁY CYKLU ROZWOJOWEGO *MYXOBOLUS CEREBRALIS* NA PODSTAWIE DANYCH Z PIŚMIENICTWA

MARIA PROST

20-075 Lublin, ul. Chmielna 12

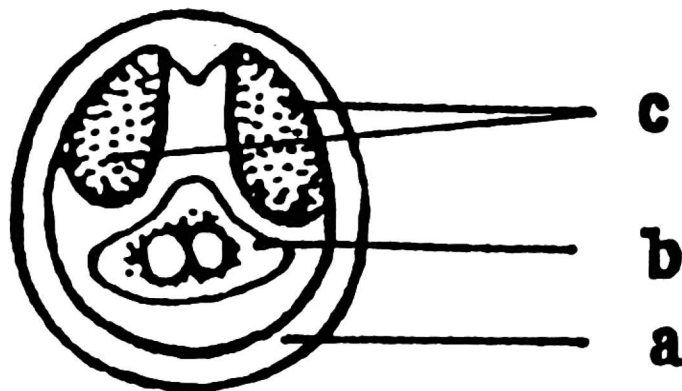
NEW DETAILS OF THE LIFE CYCLE OF *MYXOBOLUS CEREBRALIS* ACCORDING TO THE DATA OF THE LITERATURE

Abstract. The article comprises new details of the life cycle of *Myxobolus cerebralis*, the parasite of the skeleton of salmonids. Although this species has been known since 1903, its complete life cycle has remained unknown till now or it has comprised mistaken details. Recently EL MATBOULI et al. (1995) have described the life cycle of this parasite with numerous new data. *M. cerebralis* provokes in salmonids (especially in rainbow trouts) the whirling disease and heavy economical losses. Therefore the article may be useful for Polish ichthyopathologists. Besides the new description of the life cycle of *M. cerebralis* the authoress of the article gives her own considerations on some topics connected with this life cycle, which still remain insufficiently explained. The considerations concern the mechanism of the specificity of the invasive stages of the parasite to two species of its hosts (*Tubifex tubifex* and *Oncorhynchus mykiss*) and also to tissue specificity, the possibility of better and more effective control of whirling disease in breeding conditions through the knowledge of the complete life cycle of the parasite, the pathogenic activity of the parasite on fish central nervous system in spite of the lack of its lesions noted by EL MATBOULI et al. (1995). The authoress pays attention to the necessity of future studies on the mitotic and meiotic cleavages of the developmental stages of the parasite. She considers also if the very complicated life cycle of *M. cerebralis* determined during the long evolution of this species may be recognized as favourable feature for it.

Myxobolus cerebralis (dawna nazwa *Myxosoma cerebralis*) jest pasożytniczym pierwotniakiem należącym do gromady Myxosporea. Żywicielami tego pasożyta może być 18 gatunków ryb łososiowatych. Spośród nich szczególnie wrażliwy na tę inwazję jest pstrąg tęczowy, u którego *M. cerebralis* wywołuje chorobę zwaną kołowacizną. W warunkach hodowlanych parazytoza ta nie jest rzadkością i może być przyczyną dużych strat ekonomicznych. *M. cerebralis* umieszcza się w chrzęstnym i kostnym układzie szkieletowym pstrągów (szczególnie w chrząstkowym szkielecie czaszki i w kręgach ogonowych). Pomimo że pasożyt ten został uznany jako czynnik etiologiczny kołowacizny już w pierwszych latach naszego stulecia – jego cykl rozwojowy nie był dotychczas dokładnie poznany lub wręcz błędnie interpretowany.

Cechą charakterystyczną Myxosporea jest produkcja spor. Każda z nich

zawiera co najmniej jeden zarodek (zwany sporoplazmą) oraz torebki biegunowe, w których znajdują się spiralnie zwinięte nici czepne. Całość otoczona jest ochronną otoczką. Tak zbudowane spory *M. cerebralis* (ryc. 1) były dotychczas



Ryc. 1. Spora *Myxobolus cerebralis*. a — otoczką; b — zarodek (sporoplazma); c — dwie torebki biegunowe. Rozmiary spory: 1,5–2 × 6–10 μm. Według PLEHN (1924)

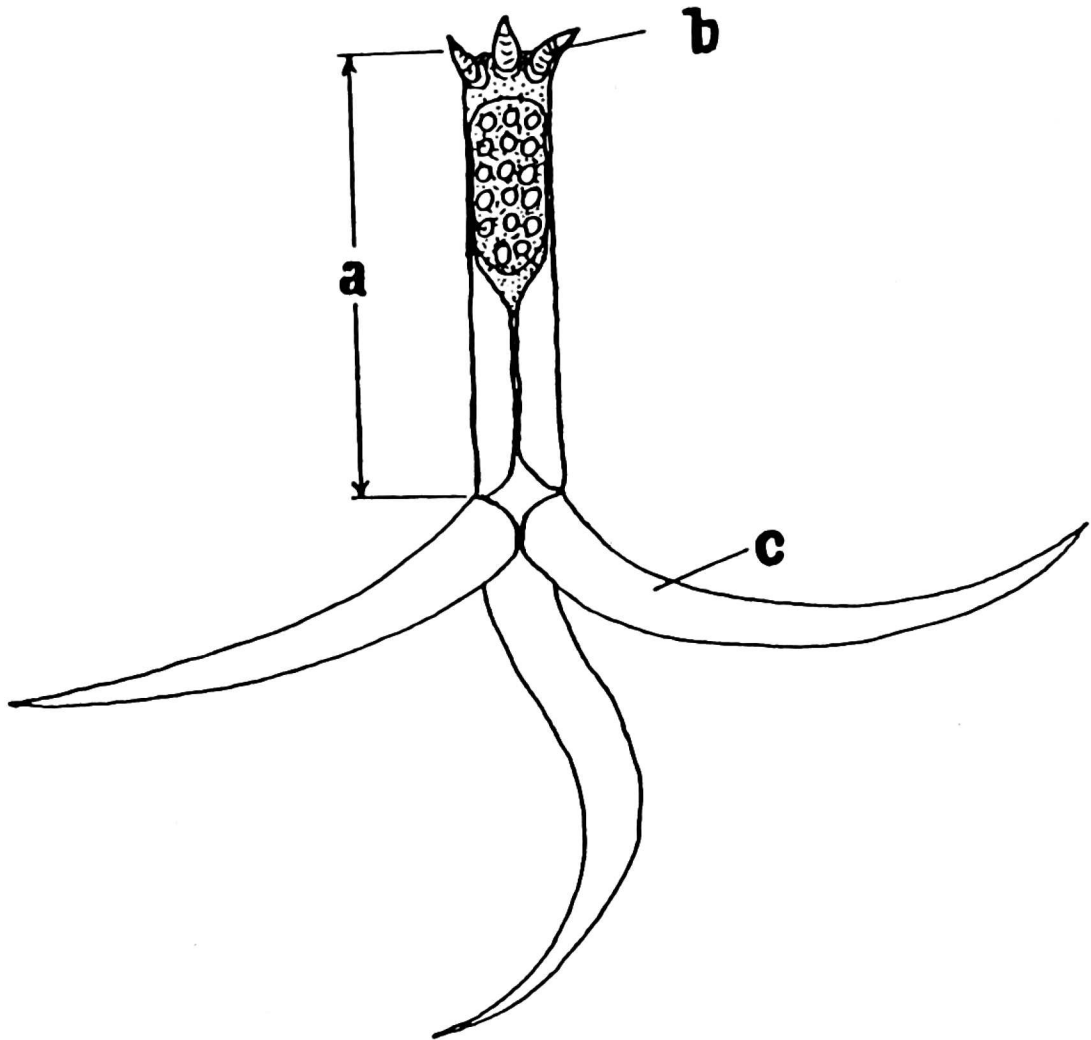
Fig. 1. Spore of *Myxobolus cerebralis*. a — envelope; b — germ (sporoplasm); c — two polar capsules. Dimensions of the spore: 1,5–2 × 6–10 μm. After PLEHN (1924)

uważane za formy inwazyjne dla pstrągów. Po śmierci zarazonej ryby i rozpadzie jej tkanek, spory te mogły wydostać się do środowiska wodnego i zarażać inne pstrągi. Według ogólnie przyjętych poglądów ryby zarażają się połykając inwazyjne spory. W ich jelicie z zarodka wydostającego się ze spory tworzą się formy rozwojowe, które poprzez układ krwionośny docierają do ostatecznego miejsca bytowania, tj. do szkieletu ryby.

W wyniku badań z ostatnich lat ten schemat rozwoju *M. cerebralis* został w dużym stopniu zmieniony, a poznanie jego szczegółów ukazało, że jest on o wiele bardziej złożony, niż dotychczas sądzono.

Pierwsze prace wnoszące nowe szczegóły do rozwoju *Myxobolus cerebralis* ukazały się dopiero w latach osiemdziesiątych (MARKIW i WOLF 1983, WOLF i MARKIW 1984, EL MATBOULI 1988, EL MATBOULI i HOFFMANN 1989). Autorzy udowodnili, że rozwój *M. cerebralis* przebiega z udziałem dwu żywicieli. Eksperymentalnie wykazano, że spory tego pasożyta powstałe w wyniku odbywającego się w rybie procesu sporogenezy nie są zdolne do zarażenia ryb, ale po dostaniu się do środowiska wodnego stają się inwazyjne dla skąposzczetów z gatunku *Tubifex tubifex*. Po ich połknięciu w jelicie tych żywicieli wystrzeliwiają ze spory nici czepne, dotąd spiralnie zwinięte wewnątrz torebek biegunowych, a zarodek opuszcza sporę po otwarciu się jej otoczki. Wnika on do komórek nabłonka jelita skąposzczeta, gdzie się odbywa jego dalszy rozwój. Zarodek, czyli sporoplazma, ulega wielokrotnym podziałom, a powstałe komórki tworzą skupiska otoczone wspólną błoną. Są to formy zwane pansporocystami, stanowiące postacie dojrzałe pasożyta (zwane też trofozoitami). W każdej pansporocystie tworzy się osiem sporoblastów, które dzielą się kilkakrotnie rozpoczynając proces sporogenezy. Ostatecznie w każdej pansporocystie powstaje osiem spor.

Proces sporogenezy w jelicie skąposzczeta trwa 60–90 dni. Powstałe w jego wyniku spory mają bardzo charakterystyczny kształt kotwicy, zupełnie odmienny od spor wytworzonych w procesie sporogenezy odbywanej w organizmie ryby (ryc. 2). W przedniej, rozszerzonej ich części znajduje się



Ryc. 2. Spora triactinomyxon. a – część przednia z wieloma zarodkami wewnątrz; b – trzy torebki biegunowe; c – wyrostki tylne. Rozmiary spory: długość części przedniej 135,6–140 μm , długość tylnych wyrostków 175–200 μm . Według EL MATBOULI (1988)

Fig. 2. Spore triactinomyxon. a – anterior part with the numerous germs inside; b – three polar capsules; c – posterior processes. Dimensions of the spore: length of the anterior part 135,6–140 μm , length of the posterior processes 175–200 μm . After EL MATBOULI (1988)

32–50 zarodków. Na szczycie spory umieszczone są trzy torebki biegunowe zawierające nici czepne, a ku tyłowi odchodzą trzy długie wyrostki. W porównaniu do długości spory powstałej w organizmie ryby (6–10 μm) długość spory powstałej w skąposzczecie jest kilkadziesiąt razy większa (do 340 μm wraz z wyrostkami).

Spory występujące u skąposzczetów znane były od dawna i uważane za pasożyty tylko skąposzczetów; zaliczano je do gromady Actinosporea i rodzaju *Triactinomyxon*, a więc nie podejrzewano zupełnie ich związku z pasożytem ryb *Myxobolus cerebralis*.

Po wydostaniu się spor triactinomyxon (przyjęła się taka nazwa dla spor

wyprodukowanych w skąposzczecie) z nabłonka jelitowego zostają one wydalone do wody. Aby się odbył dalszy rozwój konieczne jest dostanie się ich do organizmu ryby. Te ostatnie zarażają się sporami triactinomyxon albo zjadając zarażonego skąposzczeta, albo też przez aktywne przytwierdzenie się spor znajdujących się w wodzie do nabłonka pokrywającego płetwy, skórę i skrzelą ryby. Spory przyczepiają się do powierzchni ciała ryby za pomocą nici czepnych uwolnionych z ich trzech torebek biegunowych. Jak wykazały ostatnie badania (EL MATBOULI i wsp. 1995), po 5 minutach od osadzenia się spor na rybie wydostają się z nich zarodki (sporoplazmy) i zaczynają wnikać do nabłonka ryby, najczęściej do naskórka. Ich wielkość wynosi 12–18 μm . Początkowo cała grupa uwolnionych ze spor zarodków przez około 60 minut wędruje między komórkami naskórka. Po tym czasie poszczególne sporoplazmy rozpraszają się i pojedynczo wnikają do wnętrza komórek ryby. Tu ulegają podziałowi endogennemu. Z każdej sporoplazmy powstają wtedy dwie komórki, z których jedna zawiera w sobie drugą. Komórka zewnętrzna okrywająca, zwana jest pierwotną, druga zaś, wewnętrzna – wtórną. Komórki wtórne ulegają szybkim podziałom mitotycznym endogennym. W wyniku tego wewnątrz każdej komórki wtórnej powstaje komórka następnego pokolenia. W ten sposób w komórce pierwotnej pasożyta znajduje się wiele podwójnych kompletów komórek wtórnych. Po dwu godzinach od zarażenia całe te komplety w dalszym ciągu tkwią wewnątrz zarażonej komórki ryby. Następnie podwójne komplety komórek wtórnych uwalniają się z komórek pierwotnych i wnikają najpierw do cytoplazmy komórki żywiciela, następnie opuszczają ją przebijając jej błonę zewnętrzną. Wtedy mogą penetrować do sąsiednich komórek nabłonkowych ryby lub też wędrować głębiej do warstwy skóry właściwej i tkanki podskórnej. Tam, po wniknięciu do komórek, mogą powtórzyć podziały dające nowe pokolenie podwójnych kompletów komórek wtórnych.

Po uwolnieniu się z komórek żywiciela pasożyty zaczynają wędrówkę do ostatecznego miejsca bytowania, to jest do tkanki chrzęstnej ryby. W tym czasie (około 4 dni po zarażeniu ryby) w tkance podskórnej znacznie zmniejsza się liczba form rozwojowych pasożyta, natomiast licznie pojawiają się w centralnym układzie nerwowym. W rdzeniu kręgowym można je stwierdzić między 6 a 14 dniem, w mózgu zaś między 16 a 24 dniem po zarażeniu ryby. Wędrówka podwójnych kompletów komórek pasożyta do centralnego układu nerwowego żywiciela odbywa się wzdłuż włókien nerwowych. W czasie tej wędrówki formy rozwojowe pasożyta stają się wydłużone (ich długość wynosi 6,5 μm). Po osiągnięciu tkanki nerwowej układu centralnego zmieniają kształt na bardziej kulisty (średnica około 2,6 μm). Stadia te po 14 dniach od zarażenia ryby osiągają wielkość 2,8–3,8 μm . W rdzeniu kręgowym, rdzeniu przedłużonym oraz w mózgu nie wnikają do komórek nerwowych, ale tworzą skupiska, które zostają otoczone cienką błoną. Są to tzw. plazmodia, czyli formy troficzne pasożyta. Można je też czasami stwierdzić na oponach mózgowych ryby.

Plazmodia mogą się poruszać dzięki pseudopodiom na ich powierzchni. Stąd też możliwe jest ich przedostanie się z tkanki nerwowej do chrzęstnego szkieletu ryby. W czasie wędrówki i przebywania plazmodiów w tkance nerwowej nie obserwowano w niej zmian patologicznych.

Autorzy, którzy pierwsi opisali omówiony tu proces przemian poprzedzający sporogenezę (EL MATBOULI i wsp. 1995), nazywają go rozwojem przedsporogenicznym. Cechą charakterystyczną tego rozwoju, występującego również u niektórych innych Myxosporea, jest odbywanie przemian rozwojowych w innych tkankach żywiciela niż ta, w której ma miejsce proces sporogenezy. Rozwój przedsporogeniczny znany jest np. u *Sphaerospora renicola*, pasożyta karpia. Sporogeneza u tego gatunku odbywa się w nerkach, a poprzedzający ją rozwój przedsporogeniczny w krwi i pęcherzu pławnym ryby.

Pierwsze plazmodia *M. cerebralis* stwierdza się w szkielecie ryby po około 20 dniach od zarażenia. Znajdujące się we wnętrzu plazmodiów liczne podwójne komplety komórek ulegają dalszym podziałom. Jądro każdej komórki zewnętrznej dzieli się wielokrotnie dając liczne jądra wegetatywne, podczas gdy komórki wewnętrzne po podziale tworzą pokolenie komórek generatywnych. Z tych ostatnich, po wydostaniu się z plazmodiów, mogą powstawać nowe pokolenia, lub wewnątrz plazmodiów następuje połączenie się dwu komórek generatywnych rozpoczynających proces sporogenezy. Jedna z nich zostaje otoczona całkowicie przez drugą i tworzy się forma rozwojowa zwana pansporoblastem. W każdym pansporoblaste powstają z komórek generatywnych dwie spory.

Proces sporogenezy w rybie trwa, zależnie od temperatury, od 1,5 do 4 miesięcy. Ostatecznie liczne skupiska spor zalegają w tkance szkieletowej ryby (najczęściej w chrząstkach, a u starszych osobników i w tkance kostnej czaszki). Po śmierci ryby i rozpadzie jej tkanek, spory te wydostają się do środowiska wodnego i stają się formami inwazyjnymi dla skąposzczetów *Tubifex tubifex*.

Po poznaniu przebiegu rozwoju *Myxobolus cerebralis* i uwzględnieniu nowych danych z piśmiennictwa nasuwa się szereg refleksji.

1. Cykl rozwojowy *M. cerebralis* odbywa się u dwu żywicieli: skąposzczeta (*Tubifex tubifex*) i pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). W każdym z nich, w wyniku sporogenezy, tworzą się inwazyjne spory. Formy te powstałe w tkankach skąposzczeta są inwazyjne dla ryby, powstałe zaś w rybie – dla skąposzczeta. Ponieważ w obu tych żywicieli pasożyt odbywa szereg przemian rozwojowych od zarodka do formy dojrzałej – żadnego z nich nie można uznać za żywiciela pośredniego ani też ostatecznego. Zachodzi tu więc bardzo interesujące zjawisko biologiczne: jeden gatunek pasożyta ma dwóch równorzędnych żywicieli, dwie postacie form dorosłych i dwie całkowicie różne morfologicznie formy inwazyjne (spory). Specyficzność spor do jednego z dwu żywicieli gwarantuje odbycie się całości cyklu rozwojowego *M. cerebralis*. Jeśli

zaistniałaby sytuacja, w której nie mogłoby dojść do zarażenia skąposzczeta lub też pstrąga — cały cykl rozwojowy byłby uniemożliwiony. Właśnie ta sytuacja może być wykorzystana w walce z inwazją *M. cerebralis* i chorobą pstrągów — kołowacizną. Przerwanie cyklu rozwojowego poprzez likwidację skąposzczetów *T. tubifex* w stawach hodowlanych może być nową, skuteczną metodą zwalczania tej choroby.

2. Żadna z form rozwojowych *M. cerebralis* nie przedostaje się do układu krwionośnego ryby. Dotychczasowe przypuszczenia o tego rodzaju wędrówce pasożyta do ostatecznego miejsca jego bytowania w rybie — okazały się błędne.

3. Pomimo poznania wielu nowych szczegółów cyklu rozwojowego *M. cerebralis* pozostaje jeszcze wiele związanych z nim zagadnień nieznanymi lub niejasnymi. Dotyczą one głównie mechanizmów, które zapewniają prawidłowy przebieg tak złożonego cyklu rozwojowego pasożyta.

— Nieznane są czynniki decydujące o specyficzności form rozwojowych *M. cerebralis* do każdego z żywicieli. Decydują one o bezbłędnym zarażaniu *T. tubifex* zarodkami tkwiącymi jedynie w sporach wyprodukowanych w organizmie pstrąga tęczowego oraz o zarażaniu tej ryby jedynie zarodkami tkwiącymi w sporach wyprodukowanych w skąposzczecie. Przypuszczać należy, że osobniki inwazyjne dla skąposzczetów i dla pstrągów tęczowych muszą posiadać specyficzne dla nich białka i receptory na błonach komórkowych, które są zdolne odróżnić specyficzne białka występujące u odpowiednich dla nich żywicieli. Substancje te muszą mieć różną budowę chemiczną u obu form inwazyjnych *M. cerebralis*. Podjęcie badań wyjaśniających rolę tych mechanizmów, których działanie odbywa się na poziomie molekularnym, byłoby bardzo potrzebne i interesujące.

— Proces rozwojowy *M. cerebralis* przebiegający w rybie charakteryzuje faza przedsporogeniczna, odbywająca się w zupełnie innych tkankach żywiciela niż faza sporogenezy. Musi więc istnieć jakiś mechanizm (przypuszczalnie również oparty na strukturach molekularnych), który decyduje o tym, że wszystkie osobniki form rozwojowych pasożyta powtarzają zawsze taką samą wędrówkę z zachowaniem jednakowej kolejności w opanowaniu tkanek ryby: naskórek, skóra właściwa, tkanka podskórna, układ nerwowy, układ szkieletowy. Każda z wędrujących form pasożyta musi być zaopatrzona w mechanizm rozpoznawania kolejnych rodzajów tkanek żywiciela, przy czym mechanizm ten musi ulegać zmianom w momencie przechodzenia do następnej w kolejności tkanki ryby. Umiejętność rozpoznawania odpowiedniej tkanki działa bezbłędnie, gdyż wędrujący pasożyt nie „zabłądzi”, np. do wątroby czy układu krwionośnego ryby.

— Przypuszczalnie u *M. cerebralis* występują zarówno podziały mitotyczne faz rozwojowych jak i mejotyczne. Logicznie rozumując, podziały faz rozwojowych począwszy od zarodka i skończywszy wytworzeniem się postaci dojrzałych (plazmocyta u skąposzczeta i plazmodiów u ryb), powinny być mito-

tyczne, a powstałe w ich wyniku komórki — diploidalne. W procesie sporogenezy powstanie zarodka powinno być poprzedzone podziałem mejotycznym. W procesie sporogenezy pasożyta u pstrągów odnosi się to przypuszczalnie do komórek generatywnych w plazmodiach. Po połączeniu się dwóch takich haploidalnych komórek powstałby diploidalny zarodek. Jednakże są to przypuszczenia, zarówno w odniesieniu do sytuacji w skąposzczetach jak i w rybach.

— Autorzy, którym się udało zbadać wędrówkę form rozwojowych *M. cerebralis* w układzie nerwowym pstrąga, nie stwierdzili żadnych zmian patologicznych w tych tkankach. Nie można jednak wykluczyć działania chorobotwórczego pasożyta na tkankę nerwową. Dowodem są objawy, od których powstała nawet nazwa choroby — kołowaczna. Chore pstrągi mają zaburzenia równowagi i wykonują nieskoordynowane ruchy. Objawy te są niewątpliwie wywołane zaburzeniami w układzie nerwowym. Mechanizm tego patogenicznego działania pasożyta nie jest dotychczas znany.

— Nasuwa się pytanie, jakie mogą być przyczyny tak bardzo złożonego cyklu życiowego *M. cerebralis* i, czy nie jest to cecha w jakimś stopniu niekorzystna dla pasożyta. W długim procesie ewolucji tego gatunku musiały zachodzić zmiany genetyczne doprowadzające do najbardziej korzystnych adaptacji, pozwalających na najpewniejsze jego przetrwanie w czasie i przestrzeni. Jest to ogólna zasada ewolucji wszystkich organizmów żywych. Wydaje się, że pomimo złożoności rozwoju *M. cerebralis*, obrany kierunek ewolucyjny spełnia również te warunki i jest korzystny dla przetrwania gatunku. Bardzo małe spory pasożyta, powstałe w organizmie ryby, po dostaniu się do wody początkowo pozostają w niej zawieszane, a następnie opadają na dno. Przyjmując dawną teorię dotyczącą rozwoju *M. cerebralis* zarażenie się kolejnej ryby (pstrąga) musiałyby nastąpić albo przez przypadkowe połknięcie inwazyjnej spory zawieszanej w wodzie, albo przez pobranie jej z dna. Oba te sposoby zarażenia pstrąga miałyby co najmniej dwie naturalne trudności: (1) istniałaby mała możliwość napotkania bardzo niewielkiej spory w dużej przestrzeni wodnej oraz (2) zarażenie się pstrągów sporami opadłymi na dno byłoby niezbyt możliwe ze względu na charakterystyczny dla ryb łososiowatych brak pobierania pokarmu z dna zbiornika wodnego. Stąd też w wyniku procesu ewolucji, w rozwoju *M. cerebralis* pojawiają się dwaj żywicieli: ryba i skąposzczet. Małe spory powstałe w wyniku sporogenezy w organizmie ryby mogą być łatwo pobierane z dna przez skąposzczeta, żywiciela właściwie dobranego w procesie ewolucji, gdyż stanowi on naturalny pokarm ryb. Skąposzczet zawierający spory triactinomyxon zapewnia więc łatwe zarażenie się ryby. Jakby dla zmniejszenia jeszcze ryzyka przypadkowości w procesie zarażenia ryby został ewolucyjnie ustalony jeszcze drugi sposób: aktywne przytwierdzenie się do powierzchni ciała ryby dużych spor triactinomyxon wydalonych ze skąposzczeta.

Złożony proces przemian odbywający się w organizmach obu żywicieli

M. cerebralis zapewnia pomnożenie liczby form rozwojowych, a tym samym liczby dojrzałych osobników; stanowi to ważne zabezpieczenie przetrwania gatunku. W niekorzystnych warunkach istnieje bowiem większa szansa przeżycia spośród dużej liczby osobników choćby części z nich.

Przedstawione argumenty wskazują, że bardzo złożony rozwój *M. cerebralis* jest dla tego gatunku celowym i korzystnym osiągnięciem ewolucyjnym.

LITERATURA

- EL MATBOULI M. 1988. Untersuchungen zum Entwicklungszyklus von *Myxobolus cerebralis* und *Myxobolus cotti* – Übertragung sowie licht- und elektronenmikroskopische Befunde. Inaugural Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- FISCHER-SCHERL T., HOFFMANN R. W. 1992. Present knowledge on the life cycle, taxonomy, pathology and therapy of some Myxosporea spp. important for freshwater fish. *Ann. Rev. Fish. Dis.* 3: 367-402.
- HOFFMANN R. W. 1989. Experimental transmission of two *Myxobolus* spp. developing bisporogeny via tubificid worms. *Paras. Res.* 75: 461-464.
- – MANDOK C. 1995. Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon – sporoplasms of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into rainbow trout cartilage. *J. Fish. Biol.* 46: 919-935.
- MARKIW M. E. 1989. Portals of entry for salmonid whirling disease in rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.* 6: 7-10.
- WOLF K. 1983. *Myxosoma cerebralis* (Myxozoa, Myxosporea) etiologic agent of salmonid whirling disease requires tubificid worms (Annelida: Oligochaeta) in its life cycle. *J. Protozool.* 30: 561-564.
- PLEHN M. 1924. Praktikum der Fischkrankheiten. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- WOLF K., MARKIW M. E. 1984. Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: New discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science* 255: 1449-1452.

Otrzymano 12 X 1995, zaakceptowano 10 IV 1996