

Уникальная адаптация к миниатюризации: полная редукция вспомогательных клеток сенсилл у имаго *Megaphragma viggianii* (Hymenoptera, Trichogrammatidae)

А. В. Дьякова*, К. Т. Абу Дийак, А. А. Полилов

Биологический факультет Московского государственного университета

имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*e-mail: anndiakova@yandex.ru

Чувствительные сенсиллы имеют важное значение для взаимодействия насекомых с окружающей средой, обеспечивая восприятие раздражителей различных модальностей. У крупных насекомых подробно изучена ультраструктура сенсилл, однако ранее не было исследовано масштабирование ультраструктуры и ее адаптация к миниатюризации. В данной работе мы изучили ультраструктуру сенсилл у паразитического наездника *Megaphragma viggianii* (длина тела около 200 мкм) с использованием метода FIB-SEM. Были исследованы четыре типа сенсилл: кампаниформные сенсиллы (CS), беспоровые трихонидные сенсиллы второго типа (TS2-AP), трихонидные (TS) и базиконические сенсиллы (BS). Установлено, что у *M. viggianii* наблюдается полная редукция вспомогательных клеток у механорецепторных сенсилл (CS, TS2-AP и TS), в то время как у вкусовых сенсилл (BS) сохраняются структуры, возможно, являющиеся рудиментами вспомогательных клеток. Это первый случай описания полной редукции вспомогательных клеток у насекомых. Подобная редукция является адаптацией к миниатюризации, аналогичной ранее описанному лизису ядер нейронов мозга у *M. viggianii*. Полученные результаты важны для понимания эволюции сенсорных систем у насекомых и механизмов адаптации к экстремальной миниатюризации.

Введение

Значительную часть информации об окружающем мире насекомые получают с помощью кутикулярных чувствительных органов, сенсилл. Они зачастую состоят из небольшого числа клеток, но могут быть весьма многочисленны и обладать высокой чувствительностью к различным раздражителям, таким как вкус, запах, механические

воздействия, температура и влажность. Сенсиллы всех модальностей содержат биполярные рецепторные клетки, а также три вспомогательные клетки – тормогенную, трихогенную и текогенную, выполняющие опорные, трофические и другие функции, в том числе секрецию кутикулы сенсиллы (Иванов, 2000). Между вспомогательными клетками и кутикулой находится внеклеточная полость сенсиллы, заполненная отличающейся по составу от гемолимфы жидкостью.

Внутреннее строение сенсилл в большинстве случаев исследуют с применением трансмиссионной электронной микроскопии. На основании серий поперечных срезов авторы реконструируют ультраструктуру сенсилл, что позволяет с высокой точностью определять их функциональную специализацию (Blöchl & Selzer, 1988; Chiappini et al., 2001; Kuhbandner, 1985). При этом ни у одного из насекомых не была обнаружена полная редукция вспомогательных клеток. Несмотря на значительное количество работ, посвященных ультраструктуре сенсилл насекомых, тема влияния миниатюризации на ультраструктуру сенсилл не была изучена. Появление ультрачувствительных методов визуализации, таких как FIB-SEM, позволило детально исследовать ультраструктуру сенсилл даже у столь маленького объекта, как паразитические наездники *Megaphragma viggianii*, длина тела которых составляет около 200 мкм (Polilov, 2017). Изучение адаптации ультраструктуры сенсилл к миниатюризации стало основной задачей данной работы.

Материалы и методы

Материал

Имаго *Megaphragma viggianii* Fusu, Polaszek, and Polilov 2022 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) были выведены из яиц *Heliothrips haemorrhoidalis* (Bouché, 1833) (Thysanoptera: Thripidae).

FIB-SEM

Детальный протокол можно найти в предыдущей публикации (Polilov et al., 2021). Голову отделяли от тела в холодном фиксаторе и сразу же переносили в свежий фиксатор при температуре 4°C на 1 час. Фиксатор состоял из 1% глутарового альдегида (GA) и 1% оксида осмия (OsO₄) в 0.1М какодилатном буфере (pH = 7.2). После этого материал промывали в том же буфере и фиксировали в течение 2 часов в 2% GA в буфере при температуре 4°C. Затем материал снова промывали в буфере и проводили постфиксацию в 2% OsO₄ в буфере в течение 16 часов при 4°C. После фиксации материал промывали бидистиллированной водой (ddH₂O), а затем обрабатывали 1% раствором уранилацетата (UA) в ddH₂O в течение ночи при 4°C, после чего помещали (в том же растворе) в

термостат на 2 часа при 50°C. Затем образцы промывали в ddH₂O и контрастировали раствором аспарата свинца по Уолтону (2 часа, 50°C). После этого материал снова промывали в ddH₂O. Далее проводили обезвоживание материала с использованием этанола и ацетона. Материал помещали в смесь заливочной среды (Epon, Sigma) и ацетона (1:2) на 2 часа при комнатной температуре (RT), а затем в смесь 1:1 на ночь при RT, после чего образцы переносили в заливочную среду на 5 часов при RT. В конечном итоге образцы помещали в силиконовые заливочные формы со свежим Epon и оставляли в термостате на 48 часов при 60°C.

Образцы *M. viggianii* исследовали с использованием FIB-SEM (сканирующий электронный микроскоп Zeiss Merlin, оснащенный фокусированным ионным пучком Zeiss Capella) (Xu et al., 2017). Для визуализации всей головы использовали скорость сканирования 2 МГц с первичным электронным пучком силой 2 нА, при этом конечные воксели имели размеры 8 × 8 нм по осям x и y, а срез выполнялся с шагом 8 нм. Были получены стеки изображений для трех образцов (один самец и две самки).

3D реконструкция

3D реконструкция была выполнена в VAST Lite (Volume Annotation and Segmentation Tool) (Berger et al., 2018). Рендеринг анимаций был сделан в программе Blender.

Результаты и обсуждение

Были реконструированы четыре типа сенсилл *M. viggianii* – расположенные на педицеллуме антенн кампаниформные сенсиллы (CS) и беспоровые трихоидные сенсиллы второго типа (TS2-AP), а также расположенные на нижней губе трихоидные (TS) и базиконические сенсиллы (BS) (номенклатура и описание типов сенсилл см. Diakova et al., 2018, 2022). В полости педицеллума находятся 4 эпителиальные клетки, выстилающие его внутреннюю поверхность, клетки хордотональных органов (джонстонова и центрального органов), глиальные клетки хордотональных органов, а также чувствительные нейроны (Diakova et al., 2022). Тщательное исследование позволило установить отсутствие вспомогательных клеток для 8-ми исследованных сенсилл педицеллума (3 CS и 5 TS2-AP) (Рис. 1А, В, Видео 1, 2). В нижней губе не было обнаружено эпителиальных клеток. У TS вспомогательные клетки полностью отсутствуют (Рис. 1С), в то время как вокруг ресничек дендритов чувствительных нейронов BS обнаруживаются мембранные структуры, возможно, являющиеся остатками тормогенной клетки (Рис. 1С, Видео 3). В месте расположения базальных телец ресничек их окружает безъядерная клетка с крупными вакуолями, предположительно, тормогенная либо глиальная (Рис. 1D, Видео 3).

Торможенные клетки с большим количеством крупных вакуолей были ранее описаны у *Drosophila* (Shanbhag et al., 2000). Возможно, что наличие рудиментов вспомогательных клеток у BS объясняется разницей в модальности: судя по морфологии и ультраструктуре, эти сенсиллы являются вкусовыми, в то время как для CS, TS2-AP и TS предполагается механорецепторная функция.

У насекомых ранее не была описана полная редукция вспомогательных клеток сенсилл. Зачастую у зрелых механорецептивных сенсилл наблюдается отсутствие трихогенных клеток, так как они подвергаются апоптозу после формирования кутикулярной стенки сенсиллы (Hartenstein, 2005). Также в литературе есть упоминания о редукции торможенных клеток механорецепторов у личинки *Forcipomyia nigra* (Diptera: Ceratopogonidae) (Urbanek & Kapusta, 2016). Частичная редукция вспомогательных клеток описана для мутантов *Drosophila* по гену *Hairless*. При этом возможны два варианта редукции: лизис трихогенной и торможенной клеток (в таком случае кутикулярная часть сенсиллы не развивается), либо развитие трихогенной клетки во вторую торможенную (в таком случае развивается два углубления в основании сенсиллы) (Bang & Posakony, 1992).

Так как вспомогательные клетки выполняют важные функции, в том числе опорные, трофические и секрецию кутикулы сенсиллы, можно предположить, что их редукция происходит после формирования сенсиллы, и является адаптацией к миниатюризации. Для *M. viggianii* ранее было показано, что в процессе метаморфоза происходит лизис 97% ядер нейронов мозга, что приводит к уменьшению объема мозга в 5 раз (Makarova et al., 2022). Видимо, лизис вспомогательных клеток также вызван потребностью в уменьшении размеров органа.

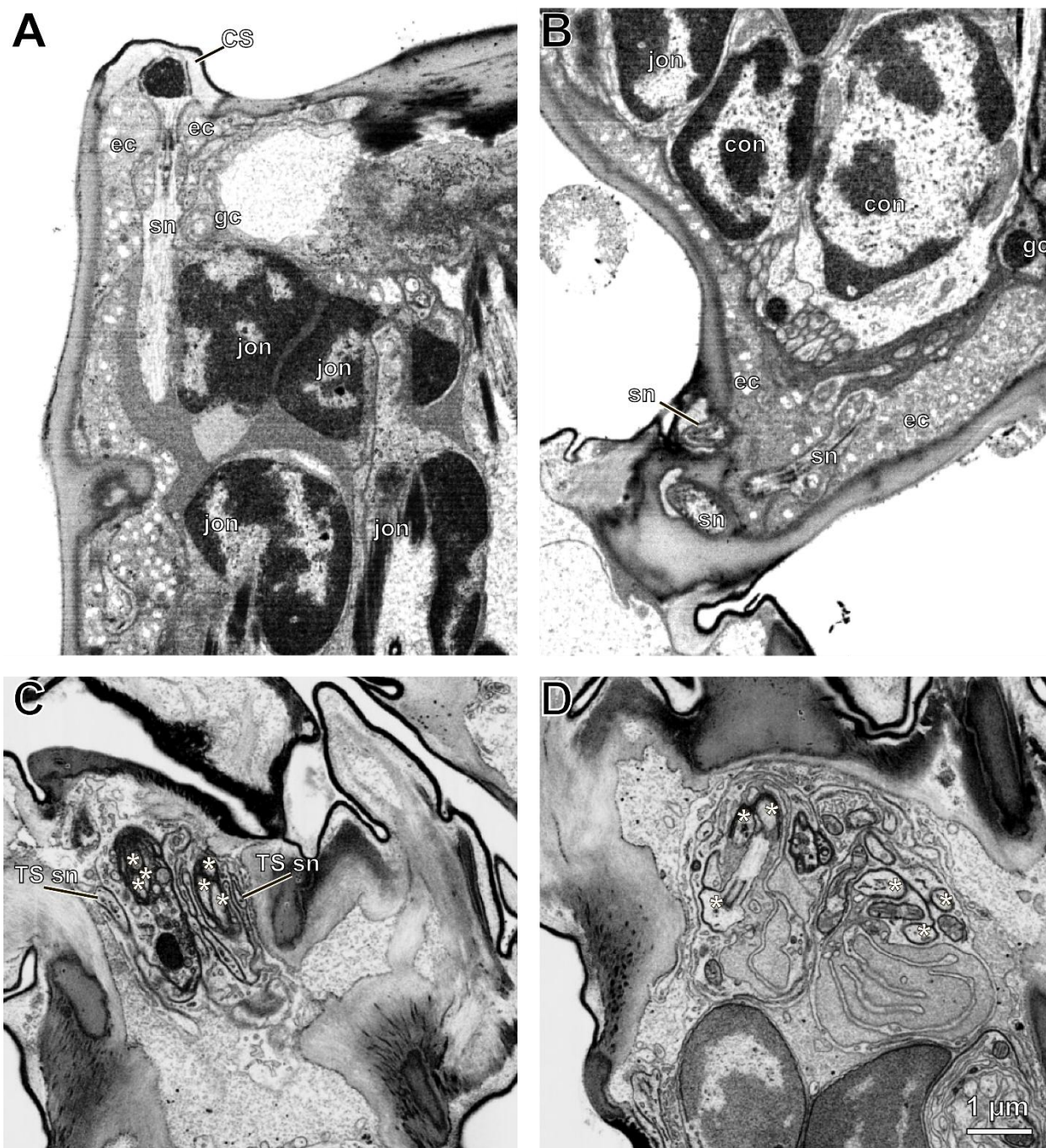


Рисунок 1. Ультраструктура сенсилл самца *Megaphragma viggianii* на продольных срезах педицеллума (А – В) и нижней губы (С – D) (FIB-SEM). А: чувствительный нейрон CS окружен эпителиальными клетками (ec) и соседствует с крупной глиальной клеткой (gc), формирующей полость. В: дендриты TS-AP подходят к основанию кутикулярных волосков сенсилл в окружении эпителиальных клеток. С: Дендриты чувствительных нейронов двух BS (отмечены знаком *) идут группами по три. Они окружены мембранными структурами, в то время как дендриты нейронов TS находятся снаружи структур. D: Две безъядерные клетки, содержащие крупные вакуоли, окружают группы дендритов чувствительных нейронов BS (отмечены знаком *) в месте расположения базальных телец ресничек. con – клетка центрального органа, ec – эпителиальная клетка,

gs – глиальная клетка, jop – клетка джонстонова органа, sn – чувствительный нейрон сенсиллы.

Приложение

Видео 1. Серия продольных срезов педицеллума самца *Megaphragma viggianii* (FIB-SEM), демонстрирующая ультраструктуру CS.

Видео 2. Серия продольных срезов педицеллума самца *Megaphragma viggianii* (FIB-SEM), демонстрирующая ультраструктуру TS-AP.

Видео 3. Серия продольных срезов нижней губы самца *Megaphragma viggianii* (FIB-SEM), демонстрирующая ультраструктуру TS и BS.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке Некоммерческого Фонда развития науки и образования «Интеллект».

Библиография

- Bang, A. G., & Posakony, J. W. (1992). *The Drosophila gene Hairless encodes a novel basic protein that controls alternative cell fates in adult sensory organ development*.
- Berger, D. R., Seung, H. S., & Lichtman, J. W. (2018). VAST (Volume Annotation and Segmentation Tool): Efficient Manual and Semi-Automatic Labeling of Large 3D Image Stacks. *Frontiers in Neural Circuits*, 12, 88. <https://doi.org/10.3389/FNCIR.2018.00088>
- Blöchl, R., & Selzer, R. (1988). Embryogenesis of the connective chordotonal organ in the pedicel of the American cockroach: Cell lineage and morphological differentiation. *Cell and Tissue Research*, 252(3), 669–678. <https://doi.org/10.1007/BF00216655>
- Chiappini, E., Solinas, C., & Solinas, M. (2001). Antennal sensilla of *Anagrus atomus* (L.) (Hymenoptera: Mymaridae) female and their possible behavioural significance. *Entomologica*, 35, 51–76.
- Diakova, A. V., Makarova, A. A., Pang, S., Xu, C. S., Hess, H., & Polilov, A. A. (2022). The 3D ultrastructure of the chordotonal organs in the antenna of a microwasp remains complex although simplified. *Scientific Reports*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24390-4>

- Diakova, A. V., Makarova, A. A., & Polilov, A. A. (2018). Between extreme simplification and ideal optimization: antennal sensilla morphology of miniaturized *Megaphragma* wasps (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *PeerJ*, 6, e6005. <https://doi.org/10.7717/peerj.6005>
- Hartenstein, V. (2005). Development of Insect Sensilla. In L. I. Gilbert (Ed.), *Comprehensive Molecular Insect Science* (pp. 379–419). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-44-451924-6/00012-0>
- Kuhbandner, B. (1985). Ultrastructure and ontogeny of the double-walled sensilla on the funicle of *Calliphora erythrocephala* Meigen (Diptera : Calliphoridae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 14(4), 227–242. [https://doi.org/10.1016/0020-7322\(85\)90056-X](https://doi.org/10.1016/0020-7322(85)90056-X)
- Makarova, A. A., Veko, E. N., & Polilov, A. A. (2022). Metamorphosis and denucleation of the brain in the miniature wasp *Megaphragma viggianii* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Arthropod Structure and Development*, 70. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2022.101200>
- Polilov, A. A., Makarova, A. A., Pang, S., Shan Xu, C., & Hess, H. (2021). Protocol for preparation of heterogeneous biological samples for 3D electron microscopy: a case study for insects. *Scientific Reports*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83936-0>
- Shanbhag, S. R., Müller, B., & Steinbrecht, R. A. (2000). Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster* 2. Internal organization and cellular architecture of olfactory sensilla. *Arthropod Structure and Development*, 29(3), 211–229. [https://doi.org/10.1016/S1467-8039\(00\)00028-1](https://doi.org/10.1016/S1467-8039(00)00028-1)
- Urbanek, A., & Kapusta, M. (2016). Atypical mechanoreceptors in larvae of biting midges *Forcipomyia nigra* (Diptera: Ceratopogonidae). *Micron*, 88, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2016.06.006>
- Xu, C. S., Hayworth, K. J., Lu, Z., Grob, P., Hassan, A. M., García-Cerdán, J. G., Niyogi, K. K., Nogales, E., Weinberg, R. J., & Hess, H. F. (2017). Enhanced FIB-SEM systems for large-volume 3D imaging. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.25916>
- Иванов, В. П. (2000). *Органы чувств насекомых и других членистоногих* (ред. Орлова Г.М.) Наука.