

УДК 576.893.195

**ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРОСПОРИДИЙ *AMBLYOSPORA RUGOSA*
И *TRICHOCTOSPOREA PYGOPELLITA* (MICROSPORIDIA:
AMBLYOSPORIDAE) — ПАРАЗИТОВ КРОВОСОСУЩИХ КОМАРОВ
У *ACANTHOCYCLOPS VENUSTUS* И *ACANTHOCYCLOPS REDUCTUS*
(COPEPODA: CYCLOPIDAE) НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА
МАЛОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ РИБОСОМАЛЬНОЙ ДНК**

© А. В. Симакова,¹ В. В. Лукьянцев,¹
С. Р. Воссбринк,² Т. Г. Андреадис²

¹ Томский государственный университет, кафедра зоологии беспозвоночных
пр. Ленина, 36, Томск, 634050
E-mail: omikronlab@yandex.ru

² The Connecticut Agricultural Experiment Station
123 Huntington Street, New Haven, CT 06511, USA
Поступила 14.09.2010

Идентичные мсрДНК последовательности были получены для микроспоридий *Amblyospora rugosa* из личинок кровососущих комаров *Ochlerotatus cantans* и *Oc. cataphylla* и копепод *Acanthocyclops venustus*; а также для *Trichoctosporea pygopellita* из личинок комаров *Ochlerotatus cyprius* и *Oc. excrucians* и копепод *Acanthocyclops reductus*.

Данные по молекулярной филогении и экологическим исследованиям показывают, что на территории Сибири паразиты родов *Amblyospora* и *Trichoctosporea* имеют сложные циклы развития, включающие копепод рода *Acanthocyclops* как потенциальных промежуточных хозяев. Жизненный цикл паразитов синхронизирован с фенологией их хозяев.

Филогенетический анализ показывает, что род *Trichoctosporea* должен быть перемещен из сем. *Thelohaniidae* в сем. *Amblyosporidae*.

Ключевые слова: микроспоридии, промежуточные хозяева, жизненные циклы, кровососущие комары, копеподы, *Amblyospora*, *Trichoctosporea*.

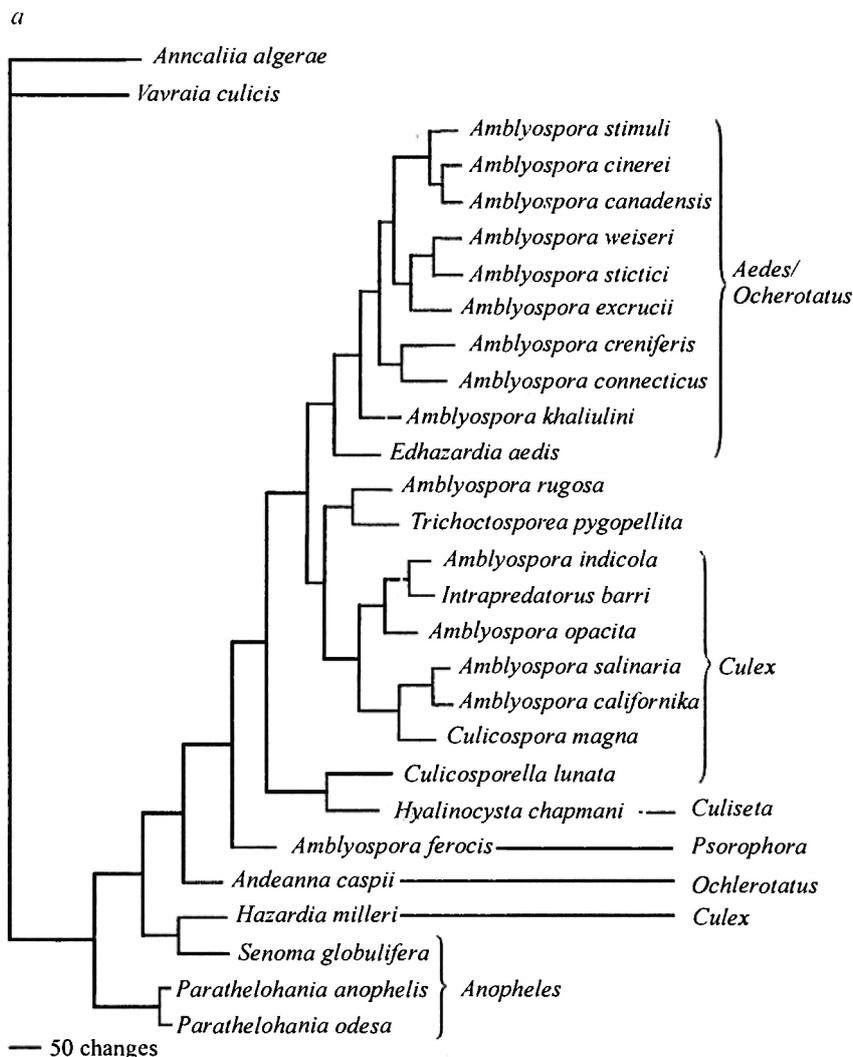
На территории Западной Сибири у кровососущих комаров обнаружено 7 родов микроспоридий: *Amblyospora* Hazard, Oldacre, 1975; *Andreanna* Simakova et al., 2008; *Crepidulospora* Simakova et al., (2003), 2004; *Dimeiospora* Simakova et al., 2003; *Parathelohania* Codreanu, 1966; *Trichoctosporea* Larsson, 1994; *Senoma* Simakova et al., 2005. Известно, что микроспоридии родов *Amblyospora* и *Parathelohania* имеют сложные триморфные циклы

развития с использованием в качестве промежуточных хозяев низших ракообразных, что было подтверждено экспериментальными перекрестными заражениями (Andreadis, 1985, 1989, 2005, 2007; Swenney et al., 1985, 1988, 1990; Vecnel, 1992; White et al., 1994; Micieli et al., 2000). Данные секвенирования генов малой субъединицы рибосомальной ДНК (мсрДНК) подтвердили предыдущие лабораторные исследования, что, по крайней мере, два вида копепод *Acantocyclops vernalis* и *Diacyclops bicuspidatus* являются промежуточными хозяевами микроспоридий *Amblyospora cinerei* Andreadis, 1994 и *A. stimuli* Andreadis, 1994 соответственно (Vossbrinck et al., 2004).

Экспериментальные исследования по перекрестному заражению микроспоридиями *Amblyospora*, *Parathelohania* и *Trichoctosporea* из комаров и микроспоридиями неопределенного таксономического статуса из копепод, изолированными на территории Западной Сибири, дали отрицательный результат. Поэтому нами были проведены электронно-микроскопические и молекулярно-генетические исследования микроспоридий, выделенных из кровососущих комаров и низших ракообразных с целью поиска промежуточных хозяев, а также определения таксономического статуса исследуемых паразитов на изучаемой территории. В исследованиях были использованы методы, аналогичные ранее опубликованным (Simakova et al., 2008).

Идентичные мсрДНК последовательности были получены для трех изолятов микроспоридий из личинок комаров *Ochlerotatus cantans* и *Oc. cataphylla* и копепод *Acanthocyclops venustus*. Изучение ультраструктуры мейоспор микроспоридий комаров показало, что это ранее описанный вид *Amblyospora rugosa* Simakova, Pankova, 2005. Полученные результаты показывают, что микроспоридии *Amblyospora rugosa* используют в качестве основных хозяев комаров *Ochlerotatus cantans* и *Oc. cataphylla*, а в качестве промежуточных могут использовать копепод *Acanthocyclops venustus* (см. рисунок; см. таблицу).

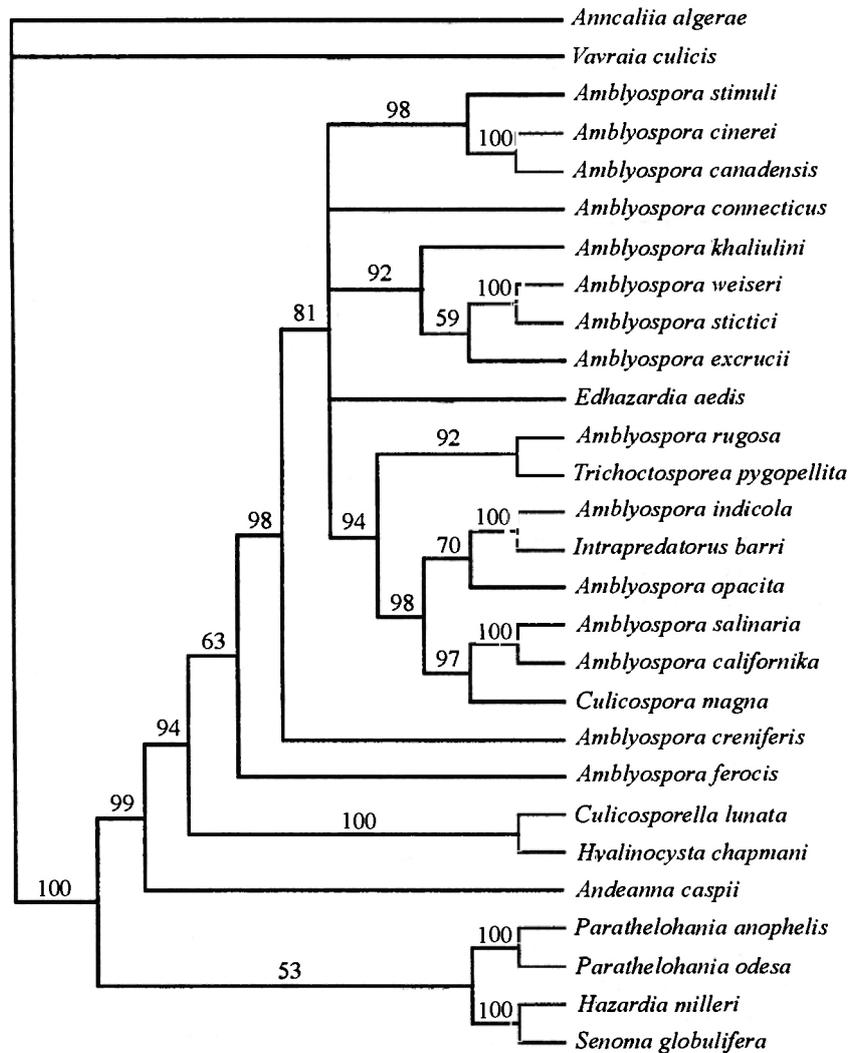
Род *Trichoctosporea* и два его вида (*Trichoctosporea pygopellita* Larsson, 1994 и *T. colorata* Simakova, Pankova, 2004) были описаны на основании уникальных особенностей ультраструктуры мейоспор из жирового тела личинок кровососущих комаров, в то время как жизненный цикл и пути передачи оставались неизвестными (Larsson, 1994; Симакова, Панкова, 2004). Род был отнесен к семейству Thelohaniidae, для которого триморфные циклы развития не описаны. Филогенетический анализ, проведенный нами, показал, что род *Trichoctosporea* попадает в одну кладу с *Amblyospora* (см. рисунок). Однако он имеет ряд морфологических отличий, позволяющих рассматривать его как отдельный род. Морфология стадий развития *T. pygopellita* и *T. colorata* подобна представителям рода *Amblyospora*. Мерогональные стадии диплокариотические. Споронты претерпевают мейотическое деление, в результате которого в спорофорном пузырьке образуется 8 споробластов и затем 8 одноядерных спор. Деление споронта розетковидное. Но мейоспоры имеют ряд характерных морфологических отличий: зрелые споры овальные; оболочка спор толстая, волнистая экзоспора имеет фибриллярные выросты в виде «хвостов». Полярный пласт двухчастный (пластинчатый, везикулярный), полярная трубка анизофилярная. Спорофорный пузырек заполнен секретом фибриллярной структуры,



Филогенетические древа, демонстрирующие родство *Amblyospora rugosa* и *Trichoctosporea pygopellita* с 10 близкородственными таксонами микроспоридий — паразитов кровососущих комаров на основе последовательностей мсрДНК. В качестве аутгрупп используются представители двух отдаленно-родственных родов *Anncaliia algerae* и *Vavraia culicis*.

a — одно из двух древ построено на основе метода максимальной экономии с использованием иерархического метода PAUP; *б* — бутстреп-анализ основан на методе связывания ближайших соседей (NJ) (1000 повторов).

Phylogenetic trees showing the relationships of *Amblyospora rugosa* and *Trichoctosporea pygopellita* to 10 closely related mosquito-parasitic microsporidian taxa based on small subunit rDNA sequence data. Microsporidian outgroups included two distally related genera from mosquitoes, *Anncaliia algerae* and *Vavraia culicis*.



Продолжение рисунка.

имеющим связь с «хвостами», отходящими от оболочек споронтов, споробластов и спор (Larsson, 1994; Симакова, Панкова, 2004).

Результаты секвенирования мсрДНК показали, что 2 изолята из личинок комаров *Ochlerotatus cyprius* и *Oc. excrucians* и один изолят из рачков *Acanthocyclops reductus*, собранные на территории Сибири, являются одним видом микроспоридий (см. рисунок; см. таблицу). По ультраструктуре стадий развития и мейоспор изоляты из комаров *Ochlerotatus cyprius* и *Oc. excrucians* — микроспоридии *Trichoctosporea pygopellita*. Согласно полученным данным, мы можем предположить, что микроспоридии *T. pygopellita* имеют сложный цикл развития, включающий копепода в качестве промежуточных хозяев. В свою очередь представители рода *Trichoctosporea* должны быть отнесены к сем. Amblyosporidae.

Хозяева и номера GenBank последовательностей
мсрДНК микроспоридий

Hosts and GenBank numbers of the small subunit rDNA sequences
of the microsporidia *Amblyospora rugosa* and *Trichoctosporea pygopellita*
obtained in the phylogenetic analysis

Микроспоридии	Хозяева	GenBank №
<i>Amblyospora rugosa</i>	<i>Ochlerotatus cataphylla</i>	HM594264
	<i>Ochlerotatus cantans</i>	HM594265
	<i>Acanthocyclops venustus</i>	HM94266
<i>Trichoctosporea pygopellita</i>	<i>Ochlerotatus cyprius</i>	HM94267
	<i>Ochlerotatus excrucians</i>	HM94268
	<i>Acanthocyclops reductus</i>	HM94269

Таким образом, основываясь на данных секвенирования генов мсрДНК микроспоридий из комаров и копепод, а также на многочисленных экологических наблюдениях, можно заключить, что на территории Сибири микроспоридии родов *Amblyospora* и *Trichoctosporea* имеют сложные триморфные циклы развития, где основными хозяевами являются моновольтинные комары рода *Ochlerotatus* и потенциальными промежуточными хозяевами — копеподы рода *Acanthocyclops*. Жизненный цикл паразитов сопряжен с фенологией хозяев. Микроспоридии зимуют на ранних стадиях (меронты) в копеподах и в зараженных яйцах комаров. В вышедших из диапаузы копеподах в середине—конце апреля паразит начинает быстро развиваться в яичниках и/или гемоцеле, достигая зрелого состояния и приводя к гибели рачков в конце апреля—начале мая. В это время наблюдается самая высокая экстенсивность заражения природных популяций низших ракообразных как во временных, так и в постоянных водоемах (до 2.5 %). В результате в водоем высвобождаются одноядерные споры, инвазионные для личинок комаров.

В это же время водоемы заселяются личинками моновольтинных комаров родов *Aedes* и *Ochlerotatus*, которые заражаются поедая свежие споры из копепод. Зараженные личинки способны окукливаться и доживать до взрослого состояния. В них микроспоридии осуществляют цикл трансовариальной передачи. Зараженные самки откладывают инфицированные яйца в различные водоемы. Так происходит распространение инфекции по территории Сибири, о чем свидетельствует нахождение зараженных одними и теми же видами микроспоридий комаров и их промежуточных хозяев в территориально отдаленных водоемах.

Кроме того, параллельно в весенний период в водоемах происходит развитие микроспоридий в личинках, зараженных трансовариально предыдущей весной. Паразиты развиваются в клетках жирового тела: после мегогонии происходит мейоз, затем в результате спорогонии образуются октомейоспоры. Такие личинки не способны окукливаться. Они погибают на стадии 4-го возраста, когда в водоемах происходит массовое окукливание и вылет здоровых имаго (конец мая—начало июня). В это время показатели зараженности личинок максимальны (2—6.5 %). Мейоспоры инвазионны для ракообразных, численность которых в этот период бывает значительной. В дальнейшем временные водоемы начинают пересыхать,

и зараженные копеподы уходят в диапаузу с ранними стадиями развития паразита до следующего весеннего сезона. Мы не обнаружили рачков с явными признаками микроспориоза в поздне-летний и осенний периоды во всех типах водоемов. Вероятно, в зараженных копеподах микроспоридии приостанавливают свое развитие до выхода хозяев из диапаузы в следующий сезон.

Список литературы

- Симакова А. В., Панкова Т. Ф. 2004. Микроспоридии рода *Trichoctosporea* (Microspora: Thelohaniidae) из кровососущих комаров (Diptera: Culicidae) Западной Сибири. Вестн. Томск. гос. ун-та (приложение). 10 : 116—122.
- Andreadis T. G. 1985. Experimental transmission of a microsporidian pathogen from mosquitoes to an alternate copepod host. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82 : 5574—5577.
- Andreadis T. G. 1989. Infection of a field population of *Aedes cantator* with a polymorphic microsporidium, *Amblyospora connecticus* via release of the intermediate copepod host, *Acanthocyclops vernalis*. Journ. Am. Mosq. Control Assoc. 5 : 81—85.
- Andreadis T. G. 2005. Evolutionary strategies and adaptations for survival between mosquito-parasitic microsporidia and their intermediate copepod hosts: a comparative examination of *Amblyospora connecticus* and *Hyalinocysta chapmani* (Microsporidia: Amblyosporidae). Folia Parasitologica. 52 : 23—35.
- Andreadis T. G. 2007. Microsporidian parasites of mosquitoes. In: Floore T. G. (Ed.), Biorational Control of Mosquitoes. Bull. N 7. Am. Mosq. Control Assoc. 23 : 3—29.
- Becnel J. J. 1992. Horizontal transmission and subsequent development of *Amblyospora californica* (Microsporidia: Amblyosporidae) in the intermediate and definitive hosts. Dis. Aquat. Org. 13 : 17—28.
- Larsson R. J. I. 1994. *Trichoctosporea pygopellita* gen. et sp. nov. (Microspora, Thelohaniidae), a microsporidian parasite of the mosquito *Aedes vexans* (Diptera, Culicidae). Arch. Protistenkd. 144 : 147—161.
- Mieli M. V., Garcia J. J., Becnel J. J. 2000. Horizontal transmission of *Amblyospora albifasciati* Garcia and Becnel, 1994 (Microsporidia: Amblyosporidae) to a copepod intermediate host and the neotropical mosquito, *Aedes albifasciatus* (Macquart, 1837). Journ. Invertebr. Pathol. 75 : 76—83.
- Simakova A. V., Vossbrinck C. R., Andreadis T. G. 2008. Molecular and ultrastructural characterization of *Andreanna caspii* n. gen., n. sp. (Microsporidia: Amblyosporidae), a parasite of *Ochlerotatus caspius* (Diptera: Culicidae). Journ. Invertebr. Pathol. 99 : 302—311.
- Sweeney A. W., Hazard E. I., Graham M. F. 1985. Intermediate host for an *Amblyospora* sp. (Microspora) infecting the mosquito, *Culex annulirostris*. Journ. Invertebr. Pathol. 46 : 98—102.
- Sweeney A. W., Graham M. F., Hazard E. I. 1988. Life cycle of *Amblyospora dyxenioides* sp. nov. in the mosquito, *Culex annulirostris* and the copepod *Mesocyclops albicans*. Journ. Invertebr. Pathol. 51 : 46—57.
- Sweeney A. W., Doggett S. L., Piper R. G. 1990. Life cycle of *Amblyospora indicola* (Microspora: Amblyosporidae), a parasite of the mosquito *Culex sitiens* and of *Apocyclops* sp. copepods. Journ. Invertebr. Pathol. 55 : 428—434.
- Vossbrinck C. R., Andreadis T. G., Vavra J., Becnel J. J. 2004. Molecular phylogeny and evolution of mosquito parasitic Microsporidia (Microsporidia: Amblyosporidae). Journ. Euk. Microbiol. 51 : 88—95.
- White S. E., Fukuda T., Undeen A. H. 1994. Horizontal transmission of *Amblyospora opacita* (Microspora: Amblyosporidae) between the mosquito, *Culex territans*, and the copepod, *Paracyclops fimbriatus chiltoni*. Journ. Invertebr. Pathol. 63 : 19—25.

IDENTIFICATION OF MOSQUITO-PARASITIC MICROSPORIDIA,
AMBLYOSPORA RUGOSA AND TRICHOCTOSPOREA PYGOPELLITA
(MICROSPORIDIA: AMBLYSPORIDAE), FROM ACANTHOCYCLOPS
VENUSTUS AND ACANTHOCYCLOPS REDUCTUS (COPEPODA:
CYCLOPIDAE), BASED ON SMALL SUBUNIT rDNA ANALYSIS

A. V. Simakova, V. V. Lukiantsev, C. R. Vossbrinck, T. G. Andreadis

Key words: Microsporidia, intermediate hosts, life cycles, blood-sucking mosquitoes, copepods, *Amblyospora*, *Trichoctosporea*.

S U M M A R Y

Identical small subunit rDNA sequences were obtained for microsporidia *Amblyospora rugosa* from blood-sucking mosquitoes larvae *Ochlerotatus cantans*, *O. cataphylla* and copepods *Acanthocyclops venustus*, as well as for *Trichoctosporea pygopellita* from mosquitoes larvae *Ochlerotatus cyprius*, *O. excrucians* and copepods *Acanthocyclops reductus*. The data on molecular phylogeny and ecological researches show that in Siberia mosquito-parasitic microsporidia of the genera *Amblyospora* and *Trichoctosporea* have complex life cycle involving likely intermediate hosts, *Acanthocyclops* copepods. Life cycle of parasites is synchronized with phenology of their hosts. The phylogenetic analyses shows, that genus *Trichoctosporea* should be transferred from the family Thelohaniidae to the family Amblyosporidae.
