

УДК 632.937.14

**ОСОБЕННОСТИ ОКРАШИВАНИЯ СПОР ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ
МИКРОСПОРИДИЙ ДИАМИДИНФЕНИЛИНДОЛОМ**

© Ю. С. Токарев,¹ Ю. М. Малыш,¹ Ю. А. Захарова,¹ Н. В. Мунтяну,²
И. К. Тодераш,² А. Н. Фролов¹

¹ Всероссийский НИИ защиты растений РАСХН,
шоссе Подбельского, 3, С.-Петербург, Пушкин, 196608

² Институт зоологии АН Молдовы,
ул. Академии, 1, Кишинэу, 2028, Молдова

E-mail: jumacro@yahoo.com

Поступила 15.02.2012

Для диагностики микроспоридий, заражающих позвоночных и беспозвоночных хозяев, используется ряд микроскопических методов и красителей, включая флюорохром ДАФИ, широко применяемый для окрашивания ДНК в клетках прокариот и эукариот как самостоятельно, так и в сочетании с другими гистологическими и флуоресцентными красителями. Мы использовали ДАФИ для окрашивания спор микроспоридий из насекомых и иксодовых клещей. Применение ДАФИ помогает отличить *Nosema*-подобные споры микроспоридий от объектов, внешне похожих на споры, но не содержащих ядерного аппарата. Кроме того, во многих случаях имеет место более слабое окрашивание ДАФИ других компонентов спор микроспоридий: экзоспоры, цитоплазмы и поляропласта. Слабо окрашенные цитоплазма и экзоспора позволяют дифференцировать неокрашенную зону эндоспоры, что также облегчает диагностику моно- и диплокариотических спор микроспоридий в зараженных членистоногих. Окрашивание выброшенной полярной трубки позволяет наблюдать отдельные фазы процесса экструзии спор микроспоридий.

Ключевые слова: микроспоридии, насекомые, диагностика, диамидинфенилиндол, флуоресцентная микроскопия.

Микроспоридии — уникальная группа одноклеточных микроорганизмов, интерес к которым как к облигатным внутриклеточным паразитам животных в последнее время все возрастает. Микроспоридии обладают самым маленьким геномом среди эукариот; структурно-функциональная организация стадий их внутриклеточного развития минимизирована в результате возложения основных жизненных отравлений на клетку хозяина. Споры микроспоридий обладают уникальным аппаратом экструзии, который позволяет инъектировать зародыш непосредственно в цитоплазму клетки, минуя защитные системы организма хозяина. Это делает микроспоридий удобной и интересной моделью для изу-

чения фундаментальных основ внутриклеточного паразитизма (Исси и др., 2005).

Микроспоридии заражают представителей всех известных крупных таксонов царства животных, наибольшее число их видов описано из членистоногих (Соколова, Исси, 2001). Многие микроспоридии высоко патогенны и представляют большой практический интерес с точки зрения защиты растений, ветеринарии и медицины (Исси, 1980, 1986; Henry, Oma, 1981; Гробов и др., 1983; Didier, Bessinger, 1999). В связи с этим эффективная диагностика микроспоридий необходима как для медицинской, так и сельскохозяйственной практики (Ribeiro, Guimaraes, 1998; Koudela et al., 2001; Franzen et al., 2006). Разработке и усовершенствованию рутинных методов диагностики микроспоридий, имеющих медицинское значение, уделяется большое внимание, о чем свидетельствуют не только многочисленные публикации (Ryan et al., 1993; Didier et al., 1995; Ignatius et al., 1997; Sironi et al., 1997; Ferreira et al., 2001), но и Интернет-ресурсы, в которых приводятся и обсуждаются соответствующие материалы (см., например, www.dpd.cdc.gov). Однако лишь небольшое число работ посвящено усовершенствованию методической базы для выявления микроспоридий в природных популяциях вредных членистоногих (Malone, McIvor, 1996; Sokolova et al., 2004). Во Всероссийском НИИ защиты растений ведется анализ зараженности природных популяций и лабораторных культур насекомых микроспоридиями (Воронцова и др., 2004; Токарев, Мовилэ, 2004; Токарев и др., 2004; Соколова и др., 2005; Tokarev et al., 2007a; Фролов и др., 2008). В настоящей работе описаны особенности окрашивания спор микроспоридий флюорохромом ДАФИ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Сбор материала для анализов. В работе использованы насекомые из лабораторных культур инсектария лаборатории микробиометода ВИЗР и членистоногие, собранные в природных условиях. Сверчков *Gryllus bimaculatus* Deg. (Orthoptera: Gryllidae), саранчу *Locusta migratoria* L. (Orthoptera: Acrididae) и мучных хрущаков *Tribolium castaneum* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) разводили в лабораторных условиях и инфицировали спорами микроспоридий *Paranosema* (= *Nosema*) *grylli*, *Paranosema locustae* и *Paranosema whitei* соответственно по стандартным методикам (Sokolova et al., 2005; Tokarev et al., 2007b).

Имаго букарки *Neocoenorrhinus pauxillus* Germar и краснокрылого плодового слоника *Neocoenorrhinus aequatus* Voss (Coleoptera: Rhynchitidae) собирали методами кошения и отряхивания жуков с деревьев на территории Республики Молдова в 2003—2005 гг. и хранили в 70°-ном этаноле (Пойрас, 2006).

Бабочек лугового мотылька *Pyrausta sticticalis* L., гусениц кукурузного мотылька *Ostrinia nubilalis* L. (Lepidoptera: Pyralidae) и хлопковой совки *Helicoverpa armigera* Hbn (Lepidoptera: Noctuidae) собирали на территории Краснодарского края в 2005 и 2006 гг., содержали в лабораторных условиях или сразу умерщвляли, трупы хранили в засушенном виде (Фефелова, Фролов, 2006; Фролов и др., 2008).

Личинки комара-звонца *Chironomus plumosus* L. (Diptera: Chironomidae) с симптомами микроспориоза, собранные в озерах Ленинградской обл. осенью 2008 г. и зафиксированные 96°-ным этанолом, были любезно предоставлены В. Н. Ворониным (Государственный НИИ озерного и речного хозяйства, Санкт-Петербург).

Имаго европейского клеща *Ixodes ricinus* L., собранные в Оргеевском р-не Республики Молдова, и таежного клеща *Ixodes persulcatus* Schultze (Parasitiformes: Ixodidae), собранные в окрестностях Санкт-Петербурга, были любезно предоставлены А. А. Мовилэ (Институт зоологии АН Молдовы, Кишинэу) и Е. В. Дубининой (Институт зоологии РАН, Санкт-Петербург) соответственно в 2004 г.

Подготовка материала для флюоресцентной микроскопии. Для флюоресцентной микроскопии были использованы материалы, подготовленные к анализу разными способами.

1. Образцы спор микроспоридий, выделенных из экспериментально зараженных насекомых, наносили на предметное стекло, фиксировали метанолом и высушивали. В ряде случаев для стимуляции выброса полярных трубок образцы спор предварительно обрабатывали раствором, содержащим 0.01 N KOH и 0.17 M KCl, в течение 40 мин и нейтрализовали раствором, содержащим 25 mM Трис, 0.17 M KCl, 10 mM ЭДТА Na₂, 30 mM глюкозы, pH 8.0, в течение 30 мин (Vavra, Maddox, 1976).

2. Образцы членистоногих, собранных в природе, измельчали в 50 мкл дистиллированной воды в лунках иммунологического планшета пинцетом или стеклянной палочкой, после чего наносили каплю гомогената на предметное стекло. Препараты покрывали покровным стеклом и просматривали в световой микроскоп МБИ-3 (ЛОМО) с объективами ×40 и ×90. При обнаружении в поле зрения объектов, имеющих размеры и очертания спор микроспоридий, мазки фиксировали метанолом и высушивали в вытяжном шкафу.

3. В ряде случаев при работе в полевых условиях, когда не было возможности зафиксировать мазки метанолом, проводили фиксацию этанолом или высушивали нефиксированные мазки и через 2 мес. проводили фиксацию в лаборатории.

4. Часть мазков, приготовленных из бабочек лугового мотылька, использовали для окрашивания вирусных включений. С этой целью мазки, фиксированные смесью этилового спирта (70 %) и формальдегида (4 %) в течение 10 мин, были протравлены 1%-ным раствором NaOH в течение 1 мин. Щелочь смывали водой, препарат окрашивали 5%-ным водным раствором эозина в течение 5 мин и смывали остатки красителя проточной водой (Митрофанов и др., 1985).

5. Фиксированные метанолом мазки, приготовленные из гусениц хлопковой совки и личинок звонцов, были предварительно окрашены азур-эозином по Романовскому-Гимза (Воронин, Исси, 1974). Эти препараты также были использованы для флюоресцентной микроскопии.

Флюоресцентная микроскопия. В качестве флюорохрома использовали 1 или 5 мкМ раствор 4,6-диамидин-2-фенилиндола (ДАФИ, Molecular Probes, Eugene, USA) на забуференном фосфатами физрастворе (ЗФР, pH 7.2). Каплю красителя наносили на фиксированные мазки разных сроков приготовления на 5—10 мин. После этого мазки либо трижды промывали дис-

тиллятом и высушивали, либо сразу накрывали покровным стеклом. Окрашенные препараты просматривали под микроскопом Axioskop-2 (Carl Zeiss) с объективами $\times 40$ и $\times 100$ и эпифлюоресцентной приставкой с применением фильтра широкого диапазона, позволяющего визуализировать ДНК-содержащий материал, окрашенный ДАФИ. Также просматривали фиксированные, но неокрашенные препараты для выявления возможной автофлюоресценции изучаемых объектов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Окрашивание ядерного аппарата. Ядра в клетках эукариот хорошо окрашиваются флюорохромом ДАФИ в концентрациях, меньших 1 мкМ, что отражено в прописях для окрашивания клеток животных и растений (см., например, www.sigmaaldrich.com). Однако при окрашивании фиксированных метанолом спор *P. grylli* 1 мкМ раствором ДАФИ краситель не проникал внутрь споры и окрашивал только оболочку (рис. 1, *a*). Окрашивание ядерного аппарата в спорах микроспоридий наблюдалось при повышении концентрации красителя до 5 мкМ (рис. 1, *b—d*), при этом наблюдалось неспецифическое связывание красителя с другими компонентами клетки (см. далее). Поскольку *Nosema*-подобные споры, обладающие толстой оболочкой, характерны для многих микроспоридий, паразитирующих в наземных членистоногих, для дальнейшего анализа насекомых на зараженность микроспоридиями использовали раствор ДАФИ в концентрации 5 мкМ. Для окрашивания ядер в фиксированных клетках грибов, также обладающих толстыми хитиновыми оболочками, краситель ДАФИ используют в еще больших концентрациях, например, 67 мкМ (Cano et al., 1998).

Практически во всех случаях нам удавалось получить хорошую картину окрашивания спор при фиксации мазков абсолютным метанолом, 96%-ным этанолом или смесью этанола и формалина. Однако, если между высушиванием мазка и его фиксацией спиртом был значительный промежуток времени, то наблюдалось слабое свечение спор микроспоридий на уровне фона без четкой флюоресценции ядерного аппарата, что свидетельствует о необходимости немедленной фиксации препаратов в связи с нарушением целостности структуры ДНК при хранении в нефиксированном виде. По литературным данным, фиксация и окрашивание азур-эозином препаратов из зараженных насекомых позволяет на многие годы сохранить структуру ДНК в спорах микроспоридий для молекулярно-биологического анализа в отличие от нефиксированных мазков (Nylis et al., 2005).

Отмывка излишков флюорохрома водой никак не влияла на качество окрашивания. Очевидно этим этапом вполне можно пренебречь. Кроме того, свечение ДАФИ в спорах микроспоридий было достаточно стабильно для того, чтобы, сфокусировавшись на объекте, можно было его рассмотреть и сфотографировать. Соседние объекты вне поля зрения при этом не выцветали. В связи с этим добавление фенилендиамина (применяемого для предохранения препаратов от преждевременного выцветания) тоже не обязательно. Все это позволило значительно упростить методику выявления микроспоридий методом флюоресцентной микроскопии, использованную нами ранее (Токарев, Мовилэ, 2004; Токарев и др., 2004).

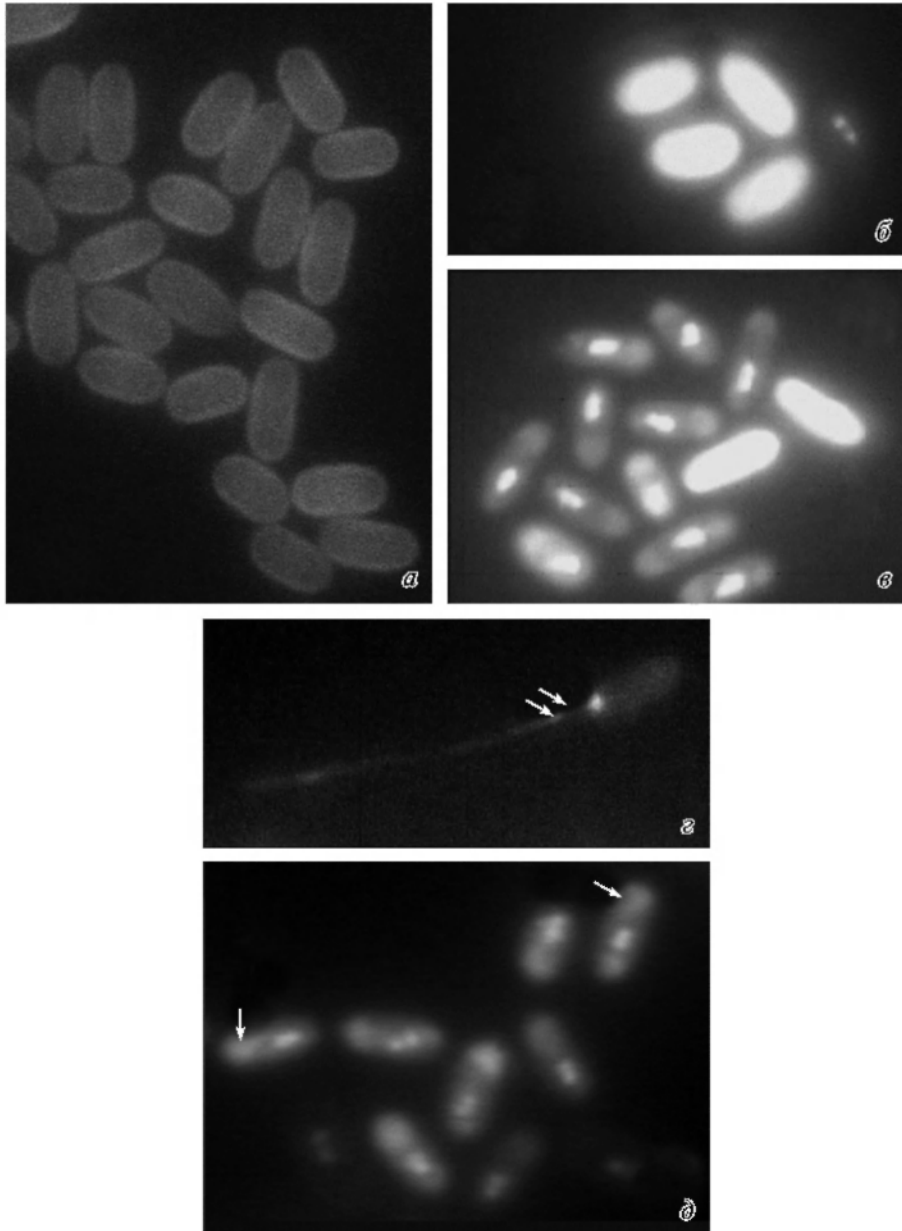


Рис. 1. Окрашивание ДАФИ спор микроспоридий *Paranosema grylli* (a—z) и *P. locustae* (d) в концентрации 1 мкМ (a) и 5 мкМ (б—d).

a, б, d — свежесодержанные споры; в — споры сроком хранения больше года; z — свежесодержанные споры, протравленные щелочью. Стрелка — поляропласт, двойная стрелка — выброшенная полярная трубка. Флюоресценция ДАФИ. Масштабная линейка — 10 мкм.

Fig. 1. DAPI staining of spores of the microsporidia *Paranosema grylli* (a—z) and *P. locustae* (d) in the concentration of 1 μM (a) and 5 μM (b—d).

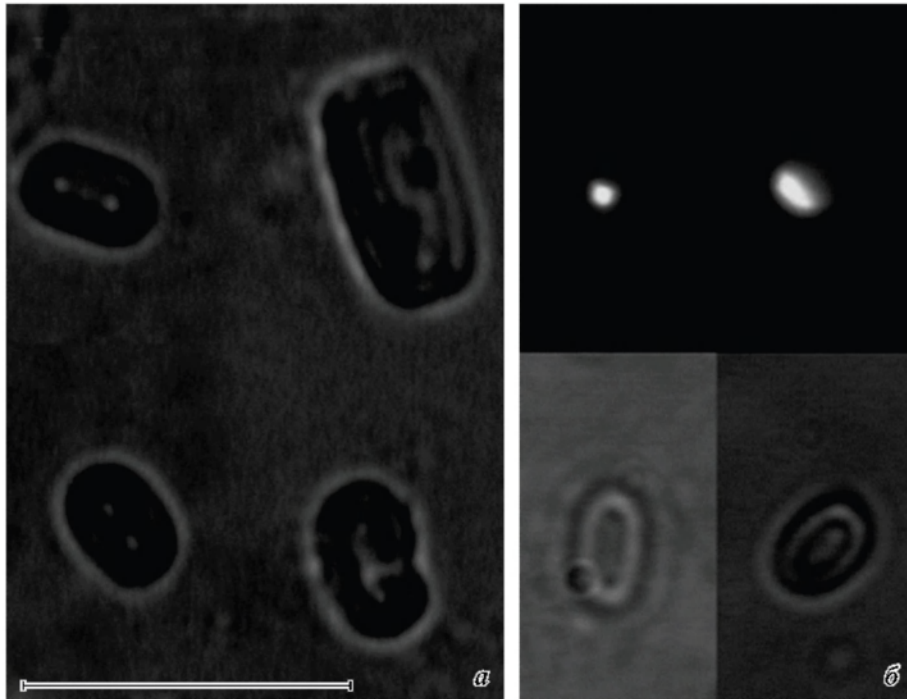


Рис. 2. Структуры на мазках из различных членистоногих, по форме и размерам напоминающие споры микроспоридий.

a — на мазках из лугового мотылька, светлое поле; *b* — на мазках из иксодовых клещей; верхний ряд — флюоресценция ДАФИ, нижний ряд — светлое поле. Масштабная линейка — 10 мкм.

Fig. 2. Structures in smears of various arthropod hosts, resembling microsporidian spores.

Наличие диилокариона позволяет отличить споры диплокариотических форм микроспоридий от объектов, часто засоряющих мазки, приготовленные из членистоногих, особенно собранных в природных условиях. Эти объекты могут иметь такие же размеры и форму, как и *Nosema*-подобные споры микроспоридий, и в светлом поле микроскопа под масляной иммерсией неотличимы от спор микроспоридий благодаря наличию морфологически идентичной оболочки. Мы наблюдали два типа таких структур. Структуры первого типа, очень часто наблюдаемые на мазках из имаго лугового мотылька (рис. 2, *a*), характеризуются разнообразными размерами и формой. Крупные и угловатые варианты этих структур не имеют сходства со спорами микроспоридий, однако более мелкие формы со сглаженными краями выглядят как споры и могут маскировать их присутствие (ср.: рис. 2, *a* и рис. 3, *в*, *д*). Структуры второго типа менее разнообразны по размеру и имеют овальную форму, также очень схожую со спорами микроспоридий, однако в отличие от последних при окрашивании ДАФИ ядерный аппарат в них расположен апикально (ср.: рис. 2, *б* и рис. 3, *в*, *д*).

Применение ДАФИ позволило получить четкие результаты по дифференциации монокариотического ядерного аппарата в спорах микроспоридий двух видов, заражающих личинок комаров-звонцов (рис. 5). При этом при использовании окрашивания азур-эозином не удалось выявить ядерный ап-

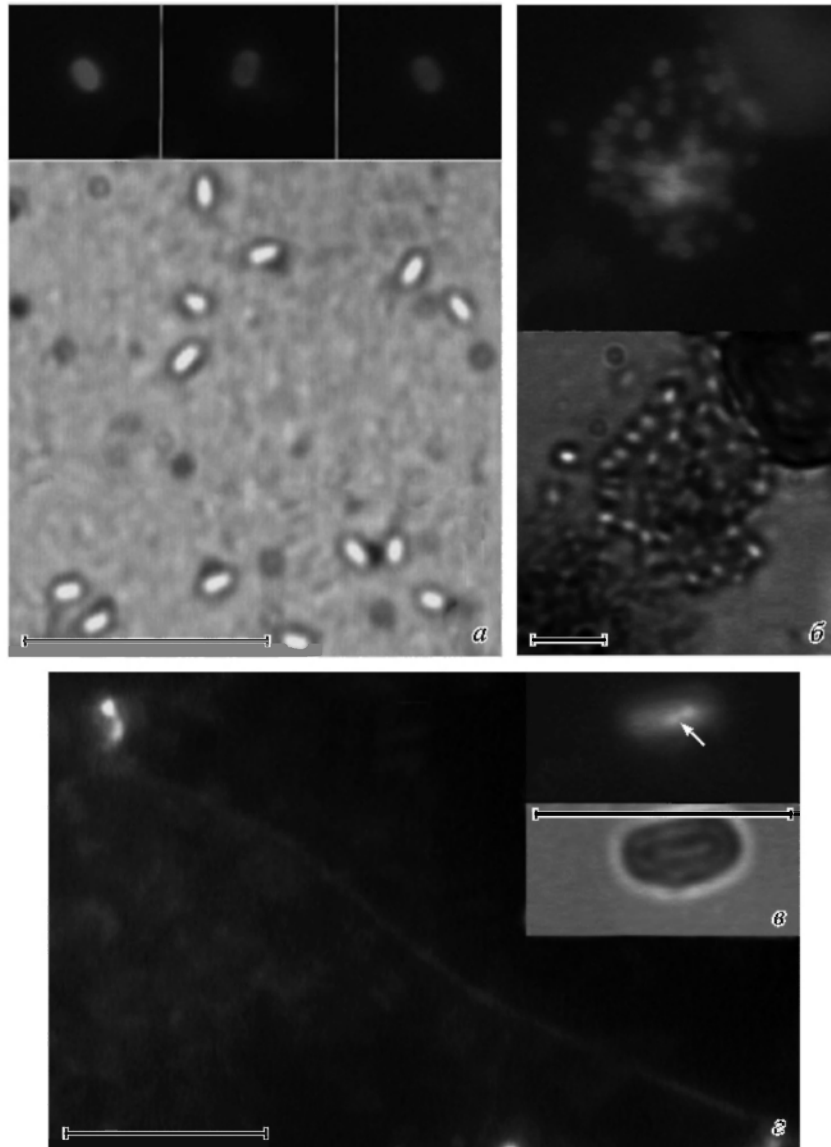


Рис. 3. Световая микроскопия спор микроспоридий из чешуекрылых насекомых-хозяев: лугового мотылька (*a–z*), кукурузного мотылька (*д*) и хлопковой совки (*е*).

a, б, в, д — верхний ряд, окрашивание ДАФИ; нижний ряд, светлое поле; *z* — флюоресценция ДАФИ спор, протравленных щелочью. Звездочка — неокрашенная зона эндоспоры между цитоплазмой и экзоспорой. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1. Масштабная линейка — 10 мкм.

Fig. 3. Light microscopy of microsporidian spores from lepidopteran insect hosts: beet webworm (*a–z*), European corn borer (*д*) and cotton bollworm (*е*).

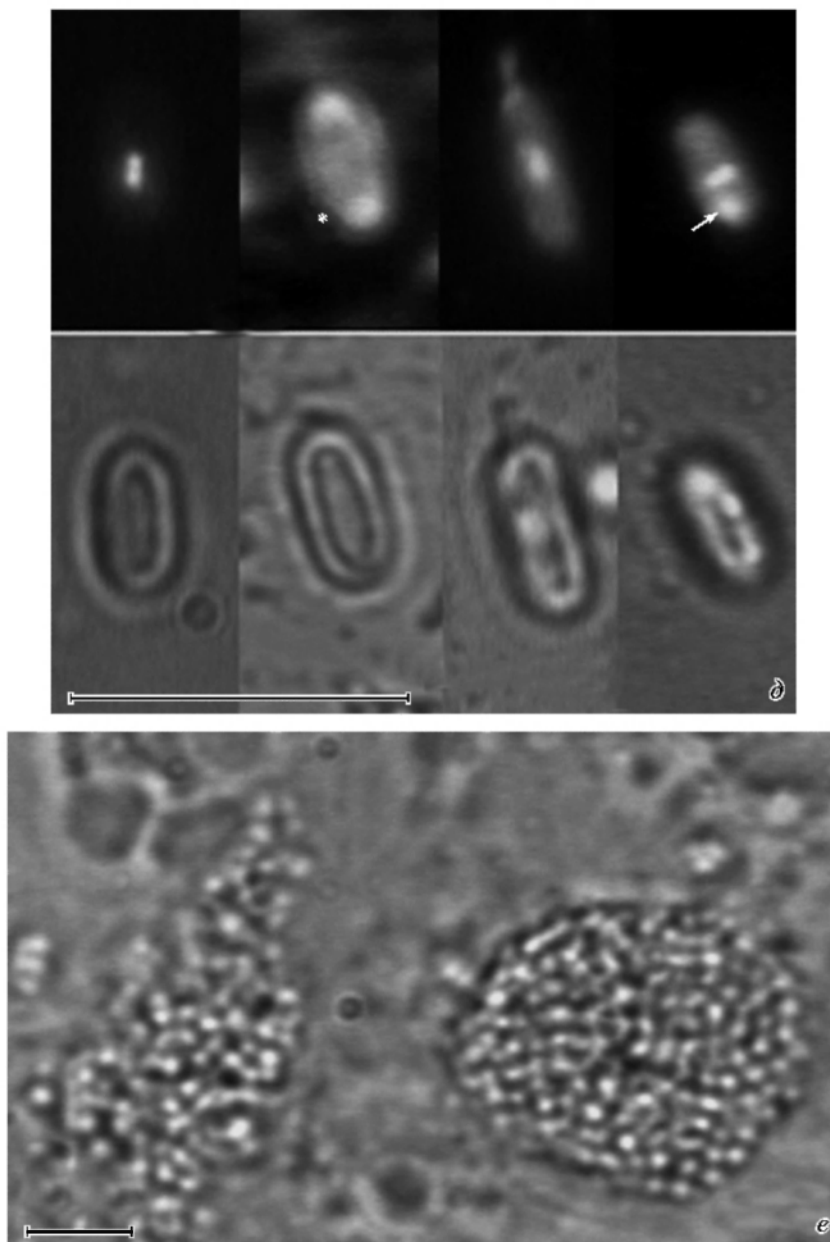


Рис. 3 (продолжение).

парат из-за равномерного окрашивания содержимого этих спор, что свидетельствует о значительном преимуществе использованного флюорохрома перед азур-эозином для светооптической диагностики микроспоридий.

Иногда на флюоресцентных снимках ядра диплокариона в спорах микроспоридий лежат слишком близко и сливаются в одно окрашенное пятно, что не позволяет четко дифференцировать *Nosema*-подобные споры по наличию диплокариона (рис. 1, в; 4, з). В этих случаях при массовом зараже-

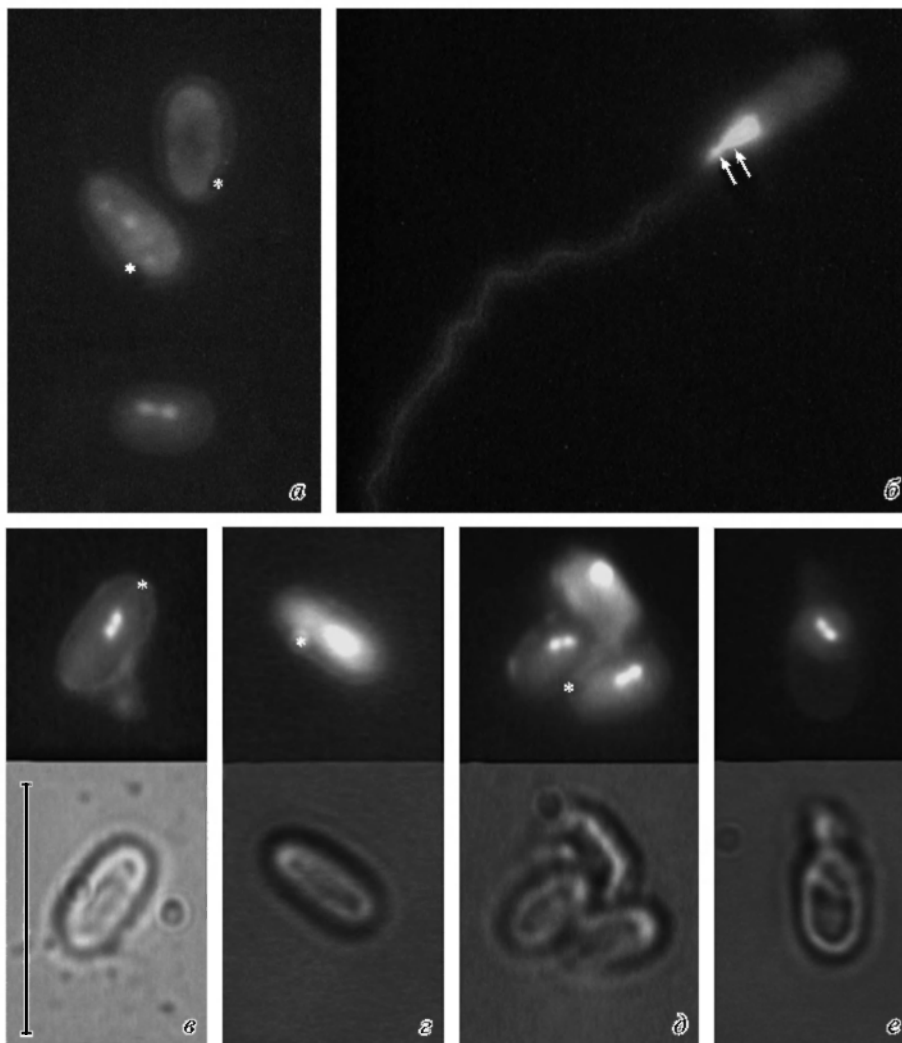


Рис. 4. Световая микроскопия спор микроспоридий из жесткокрылых насекомых-хозяев: малого мучного хрущака (*a, б*) и красногрудого плодового слоника (*в—е*). *а—е* — верхний ряд, флуоресценция ДАФИ; нижний ряд, светлое поле; *г* — флуоресценция ДАФИ. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1 и 3. Масштабная линейка — 10 мкм.

Fig. 4. Light microscopy of microsporidian spores from coleopteran insect hosts.

нии наличие других спор с более отчетливо окрашенным ядерным аппаратом позволяет без труда провести диагностику. При наличии на мазке единичных спор с недостаточно четко окрашенным диплокарионом, а также при работе с микроспоридиями, имеющими монокариотические споры (которые могут выглядеть как клетки других организмов) следует ориентироваться на некоторые другие признаки, описанные ниже.

Окрашивание других клеточных структур. Хотя ДАФИ широко известен как ядерный краситель, он также используется для мечения мембранных структур (Favilla et al., 1993) и белковых комплексов (Mazzini et al., 1994). В наших исследованиях отмечено связывание ДАФИ с цитоплазмой

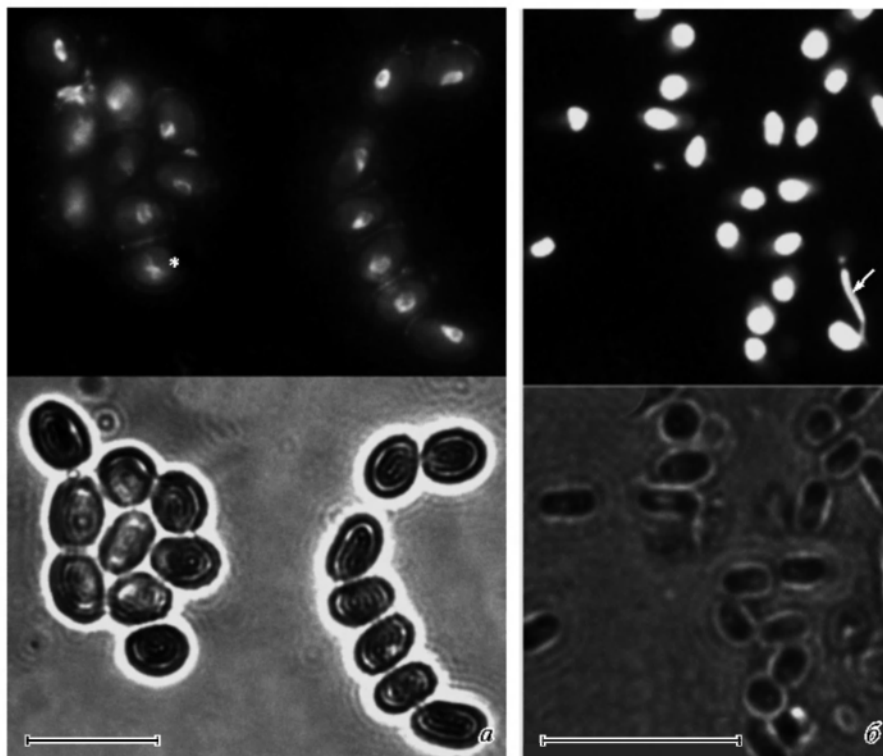


Рис. 5. Световая микроскопия спор микроспоридий *Anisofilariata chironomi* (а) и *Helmichia lacustris* (б) из личинок комара-звонца.

Верхний ряд — окрашивание ДАФИ; нижний ряд — светлое поле. Стрелка — выброшенная полярная трубка. Остальные обозначения те же, что и на рис. 3. Масштабная линейка — 10 мкм.

Fig. 5. Light microscopy of spores from microsporidia *Anisofilariata chironomi* (а) and *Helmichia lacustris* (б) from midge larvae.

зародыша споры и экзоспорой — внешним слоем оболочки спор микроспоридий, вызывающее флюоресценцию этих структур. Интенсивность свечения цитоплазмы и экзоспоры была гораздо слабее в сравнении с таковой диплокариона и в большинстве случаев это не мешало визуализации ядерного аппарата в спорах. Более того, поскольку эндоспора не окрашивалась данным флюорохромом, во многих случаях удавалось наблюдать дифференциальную картину окрашивания оболочки спор с темной полоской эндоспоры между окрашенными слоем экзоспоры и зоной цитоплазмы. Такая картина была характерна для спор микроспоридий, заражающих лугового (рис. 3, в) и кукурузного мотылька (рис. 3, д), мучного хрущака (рис. 4, а), краснокрылого плодового слоника (рис. 4, в), комаров-звонцов (рис. 5), иксодовых клещей (рис. 6). Именно такой характер окрашивания позволил нам четко диагностировать микроспоридий в случаях, когда зараженность членистоногих была на низком уровне, и на мазках встречались только одиночные споры (Tokarev et al., 2007a).

У чешуекрылых двух видов — лугового мотылька и хлопковой совки, мы наблюдали заражение микроспоридиями, имеющими монокариотические *Thelohania*-подобные споры. Эти споры имели более мелкие размеры,

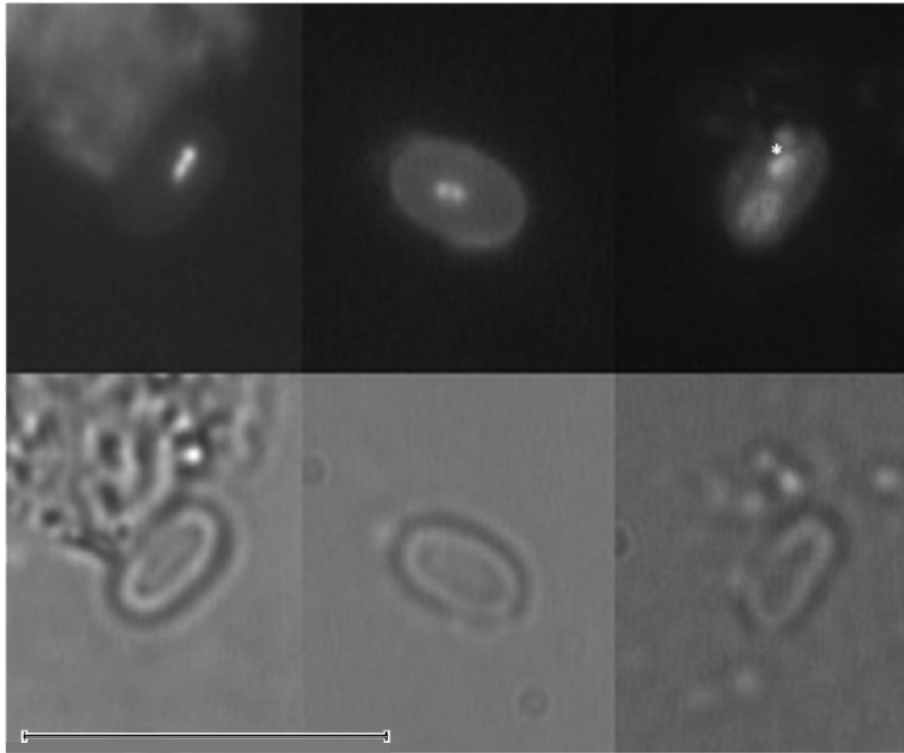


Рис. 6. Световая микроскопия спор микроспоридий из иксодовых клещей. Верхний ряд — окрашивание ДАФИ; нижний ряд — светлое поле. Остальные обозначения те же, что и на рис. 3. Масштабная линейка — 10 мкм.

Fig. 6. Light microscopy of microsporidian spores from ixodid ticks.

чем *Nosema*-подобные споры; окрашивания ядерного аппарата с помощью красителей Романовского-Гимза и ДАФИ в этих спорах наблюдать не удалось, ДАФИ связывался только с оболочкой спор (рис. 3, б, е). Только по наличию большого количества спор одинакового размера и правильной формы, очертания которых были четко обозначены флюорохромом, можно было диагностировать микроспориоз.

Еще одна структура в спорах микроспоридий иногда связывается с ДАФИ и заметна на фоне слабо окрашенной цитоплазмы (рис. 1, д; 5, б). Ее размеры, форма и расположение на переднем полюсе споры позволяют заключить, что это — полярoplast, сложный мембранный комплекс, часть аппарата экстрезии, образующийся из комплекса Гольджи в ходе спорогенеза микроспоридий. Накопление ДАФИ в мембранных структурах производных комплекса Гольджи было показано ранее для других амитохондриальных протистов — жгутиконосцев класса Parabasalia (Dolan, 2000).

Окрашивание спор микроспоридий, выбросивших полярные трубки. Щелочная обработка спор является стимулом для экстрезии у микроспоридий многих видов, паразитирующих преимущественно у наземных насекомых, в особенности у чешуекрылых (Vavra, Maddox, 1976). После щелочной обработки происходит выбрасывание полярных трубок спорами *P. grylli* и *P. whitei*, но не *P. locustae*. При окрашивании ДАФИ выстрелив-

Доля спор *Paranosema grylli* с оболочкой, интенсивно окрашенной ДАФИ (ДАФИ+) в зависимости от срока хранения

Fraction of *Paranosema grylli* spores with the spore wall stained intensively with DAPI (DAPI+), in dependence of the storage period

Срок хранения	Способы обработки	Всего спор, N	Количество ДАФИ+спор, n	Доля ДАФИ+ спор, nN, % ± m%*
1 нед.	Без обработки	446	400	89.7 ± 1.44
1 мес.	» »	509	351	62.9 ± 1.13
1 мес.	Обработка щелочью**	471	30	6.4 ± 1.21
18 мес.	Без обработки	527	41	7.8 ± 1.17

Примечание. * m% — ошибка процента; ** — см.: Материал и методика.

ших спор микроспоридий из прямокрылых (рис. 1, з) и жесткокрылых насекомых (рис. 4, б) на фиксированных мазках наряду с маркированием ядерного аппарата и цитоплазмы можно было наблюдать флюоресценцию выброшенной полярной трубки (рис. 1, з; 4, б). Выброшенная полярная трубка окрашивалась также на протравленных щелочью препаратах спор микроспоридии *Nosema sticticalis* из лугового мотылька (рис. 3, з). В последнем случае, поскольку споры были обработаны щелочью после фиксации, можно предположить, что экструзия произошла в результате подсыхания препарата, что тоже может служить стимулом для активации спор. Однако, поскольку на мазках, приготовленных таким же образом, но без щелочной обработки, полярных трубок не наблюдалось, не исключено, что при спирто-формалиновой фиксации жизнеспособность части спор могла сохраниться.

На ряде препаратов спор микроспоридий из различных насекомых при окрашивании ДАФИ наблюдались начальные этапы экструзии. Часть окрашенного материала — содержимое споры или основание полярной трубки — была расположена за пределами одного из полюсов споры (рис. 3, д; 4, е). Способность к экструзии свидетельствует об инфекционности спор микроспоридий; возможность оценивать этот показатель с помощью ДАФИ дает дополнительное преимущество данному методу диагностики микроспоридий.

Влияние сроков хранения на характер окрашивания спор P. grylli. При окрашивании ДАФИ спор микроспоридии *P. grylli* разных сроков хранения наблюдались значительные различия в характере окрашивания. В свежих образцах, хранившихся не более 1 недели, преобладали споры с интенсивно окрашенной оболочкой (рис. 1, б). Доля спор с интенсивно окрашенной оболочкой составила 90.53 % (общее количество спор N = 446). В спорах, хранившихся в течение года, интенсивность связывания ДАФИ с оболочкой резко снижена (рис. 1, в), доля спор с интенсивно окрашенной оболочкой составила лишь 9.47 % (N = 527), что значительно ниже по сравнению со свежими спорами. Аналогичные результаты были получены при окрашивании ДАФИ спор *P. grylli* (срок хранения 1 мес.) в вариантах с обработкой и без обработки щелочью: в последнем случае доля спор с интенсивно окрашенной оболочкой снизилась в 10 раз по сравнению с интактными спорами (см. таблицу).

Ранее нами было показано, что при щелочной обработке, а также при долговременном хранении с оболочки спор микроспоридии *P. grylli* происходит сход поверхностного белка р40. При этом в первом случае происходит подготовка спор к выбрасыванию полярной трубки, а во втором — утрата способности спор к экструзии, что непосредственно связано с потерей инфекционных свойств микроспоридий. Предполагается, что белок р40 играет важную роль в процессе экструзии спор *P. grylli* (Семенов, 2004). По-видимому, в оболочке спор этого вида ДАФИ связывается именно с белком р40 и поэтому при его сходе после длительного хранения интенсивность окрашивания оболочки спор снижается.

Таким образом, флюоресцентную микроскопию с использованием ДАФИ можно считать вполне адекватным методом диагностики, позволяющим более точно идентифицировать споры микроспоридий, паразитирующих в членистоногих, в том числе при крайне низкой интенсивности заражения, а также наблюдать различные этапы процесса экструзии, что дополнительно позволяет характеризовать инфекционность спор.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны В. Н. Воронину (ГОСНИОРХ, Санкт-Петербург) за предоставленные сборы зараженных микроспоридиями личинок комара-звонца, а также А. А. Мовилэ (Институт зоологии АН Молдовы, Кишинэу) и Е. В. Дубининой (ЗИН РАН, Санкт-Петербург) за предоставленные сборы искодовых клещей. Исследование поддержано грантами РФФИ (проекты № 09-04-00619 и 10-04-00284).

Список литературы

- Воронин В. Н., Исси И. В. 1974. О методиках работы с микроспоридиями. Паразитология. 8: 272—273.
- Воронцова Я. Л., Токарев Ю. С., Соколова Ю. Я., Глупов В. В. 2004. Микроспоридиоз пчелиной огневки *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), вызываемый *Vairimorpha ephestiae* (Microsporidia: Burenellidae). Паразитология. 38: 239—250.
- Гробов О. Ф., Засухин Д. Н., Шигина Н. Г. 1983. Микроспоридиозы животных и человека. Итоги науки и техники. Сер.: Зоопаразитолог. М.: ВИНТИ. 8: 103—148.
- Исси И. В. 1980. Эпизоотология микроспоридиоза капустной белянки *Pieris brassicae* (Lepidoptera, Pieridae). Тр. ВИЗР. Л. 5—16.
- Исси И. В. 1986. Микроспоридии как тип паразитических простейших. Микроспоридии. Сер.: Протозология. Л.: Наука. 10: 6—135.
- Исси И. В., Долгих В. В., Соколова Ю. Я., Токарев Ю. С. 2005. Факторы патогенности микроспоридий — внутриклеточных паразитов насекомых. Вестн. зап. раст. 3: 17—26.
- Митрофанов В. Б., Симонова А. С., Смирнов О. В. 1985. Методические указания по изучению и диагностике виروزов насекомых. Л.: ВИЗР. 20 с.
- Пойрас А. А. 2006. Жесткокрылые надсемейства Curculionoidea (Insecta, Coleoptera) Республики Молдова, их биоразнообразие и значение: Дис. ... д-ра биол. наук. Кишинэу: Ин-т зоологии АН РМ. 290 с.
- Семенов П. Б. 2004. Особенности структурных белков спор микроспоридии *Paranosema grylli*, паразитирующей в сверчке *Grvillus bimaculatus*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: ВИЗР. 20 с.

- Соколова Ю. Я., Исси И. В. 2001. Энтомопатогенные простейшие и особенности патогенеза протозойных заболеваний насекомых. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / Под ред. В. В. Глулова. М.: Круглый год. 76—182.
- Соколова Ю. Я., Семенов П. Б., Токарев Ю. С., Березин М. В. 2005. Протозойные инфекции, выявляемые при лабораторном разведении прямокрылых: двуястного сверчка *Gryllus bimaculatus* и перелетной саранчи *Locusta migratoria*. Зоокультура и биологические ресурсы / Под ред. В. В. Рожнова и др. Матер. науч.-практич. конф. МСХА. М. 135—136.
- Токарев Ю. С., Мовилэ А. А. 2004. Первая находка микроспоридий в иксодовых клещах *Ixodes ricinus* L. (Acarina: Ixodidae) на территории СНГ, Республика Молдова. Паразитология. 38: 552—556.
- Токарев Ю. С., Владимиров К. В., Аль-Шехадат Р. И. 2004. Применение флюоресцентной микроскопии для диагностики энтомопатогенных протистов. РЭТ-Инфо. 49: 54.
- Фефелова Ю. А., Фролов А. Н. 2006. О роли сорных растений в динамике численности хлопковой совки в Краснодарском крае. Пробл. энтомол. Северо-Кавказского региона. Матер. 1-й Всерос. науч.-практич. интернет—конф. Ставрополь. 91—94.
- Фролов А. Н., Малыш Ю. М., Токарев Ю. С. 2008. Особенности биологии лугового мотылька (*Pyrausta sticticalis* L.) в период его низкой численности в Краснодарском крае. Энтомол. обзор. 87: 291—302.
- Cano M. I. N., Cisalpino P. S., Galindo I., Ramirez J. L., Mortara R. A., da Silveira J. F. 1998. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Journ. Clin. Microbiol. 36: 742—747.
- Didier E. S., Orenstein J. M., Aldras A., Bertucci D., Rogers B., Janney F. A. 1995. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. Journ. Clin. Microbiol. 33: 3138—3145.
- Didier E. S., Bessinger G. T. 1999. Host-parasite relationships in microsporidiosis: animal models and immunology. The microsporidia and microsporidiosis (Wittner M., Weiss L., Eds.). Amer. Soc. Protozool., Washington D.C. P. 225—257.
- Dolan M. F. 2000. DNA fluorescent stain accumulates in the Golgi but not in the kinetosomes of amitochondriate protists. Int. Microbiol. 3: 45—49.
- Favilla R., Stecconi G., Cavatorta P., Sartor G., Mazzini A. 1993. The interaction of DAPI with phospholipid vesicles and micelles. Biophys. Chem. 46: 217—226.
- Ferreira F. M., Bezerra L., Santos M. B., Bernardes R. M., Avelino I., Silva M. L. 2001. Intestinal microsporidiosis: a current infection in HIV-seropositive patients in Portugal. Microbes Infect. 3: 1015—1019.
- Franzen C., Nassonova E. S., Scholmerich J., Issi I. V. 2006. Transfer of the members of the genus *Brachiola* (Microsporidia) to the genus *Anncaliia* based on ultrastructural and molecular data. Journ. Eukaryot. Microbiol. 53: 26—35.
- Henry J. E., Oma E. A. 1981. Pest control by *Nosema locustae*, a pathogen of grasshoppers and crickets. Microb. Control Pest and Plant Diseases 1970—1980 / Ed by H. D. Burges. London., S. Francisco: Academic Press. 574—586.
- Hylis M., Weiser J., Obornik M., Vavra J. 2005. DNA isolation from museum and type collection slides of microsporidia. Journ. Invertebr. Pathol. 88: 257—260.
- Ignatius R., Henschel S., Liesenfeld O., Mansmann U., Schmidt W., Koppe S., Schneider T., Heise W., Futh U., Riecken E.O., Hahn H., Ullrich R. 1997. Comparative evaluation of modified trichrome and Uvitex 2B stains for detection of low numbers of microsporidial spores in stool specimens. Journ. Clin. Microbiol. 35: 2266—2269.
- Koudela B., Visvesvara G. S., Moura H., Vavra J. 2001. The human isolate of *Brachiola algerae* (Phylum Microspora): development in SCID mice and description of its fine structure features. Parasitology. 123: 153—162.
- Malone L. A., McIvor C. A. 1996. Use of nucleotide sequence data to identify a microsporidian pathogen of *Pieris rapae* (Lepidoptera, Pieridae). Journ. Invertebr. Pathol. 68: 231—238.
- Mazzini A., Beltramini M., Favilla R., Cavatorta P., Di Muro P., Salvato B. 1994. An oxygenation-sensitive dye binding to *Carcinus maenas* hemocyanin. Biophys. Chem. 52: 145—156.

- Ribeiro M. F., Guimaraes A. M. 1998. *Encephalitozoon*-like microsporidia in the ticks *Amblyomma cajennense* and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Journ. Med. Entomol.* 35: 1029—1033.
- Ryan N. J., Sutherland G., Coughlan K., Globan M., Doultree J., Marshall J., Baird R. W., Pedersen J., Dwyer B. 1993. A new trichrome-blue stain for detection of microsporidial species in urine, stool, and nasopharyngeal specimens. *Journ. Clin. Microbiol.* 31: 3264—3269.
- Sironi M., Bandi C., Novati S., Scaglia M. 1997. A PCR-RFLP method for the detection and species identification of human microsporidia. *Parassitologia.* 39: 437—439.
- Sokolova Yu. Ya., Sokolov I. M., Fuxa J. R. 2004. Identification of Microsporidia infections in nature: light microscopy or PCR? *Protistology.* 3: 273—281.
- Sokolova Y. Y., Issi I. V., Morzhina E. V., Tokarev Y. S., Vossbrink C. R. 2005. Ultrastructural analysis supports transferring *Nosema whitei* Weiser 1953 to the genus *Paranosema whitei*. *Journ. Invertebr. Pathol.* 90: 122—126.
- Tokarev Yu. S., Toderas I. K., Dubinina H. V., Alekseev A. N., Movila A. A. 2007a. Microsporidian infection in a natural population of *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina: Ixodidae) in north-western Russia. *Bul. Acad. Stiint. Moldi. Stiint. Vietii. Chisinau.* 2: 69—75.
- Tokarev Y. S., Sokolova Y. Y., Entzeroth R. 2007b. Microsporidi—insect host interactions: Teratoid sporogony at the sites of host tissue melanization. *Journ. Invertebr. Pathol.* 94: 70—73.
- Vavra J., Maddox J. V. 1976. *Methods in microsporidology. Comparative pathobiology.* New York—London. 1: 281—319.

STAINING OF MICROSPORIDIAN SPORES WITH DIAMIDINE PHENYLINDOLE

Yu. S. Tokarev, Yu. M. Malysh, Yu. A. Zakharova, N. V. Munteanu,
I. K. Toderas, A. N. Frolov

Key words: microsporidia, insects, diagnostics, diamidine phenylenindole, fluorescent microscopy.

SUMMARY

A number of microscopic techniques and dyes are available to diagnose microsporidian infections in invertebrate and vertebrate hosts. Among these, DNA-specific fluorochrome DAPI is widely used to stain DNA in prokaryotic and eukaryotic cells, alone or in combination with other histochemical or fluorescent dyes. Moreover, this dye also binds to membranous structures and protein complexes. In our studies, DAPI was used to stain spores of microsporidia infecting orthopteran, coleopteran, dipteran and lepidopteran insect hosts. DAPI staining of diplokarya helped to discriminate the *Nosema*-like microsporidian spores from spore-shaped bodies lacking this characteristic staining. It was found, moreover, that non-DNA staining occurred in many cases and other components of the spores were stained: the exospore, the cytoplasm, the extruded polar filament and the polaroplast. Staining of these structures was feeble as compared to DNA and in most cases did not interfere with nuclear apparatus staining. Feebly stained cytoplasm and exospore clearly indicated unstained zone of endospore, making it easier to diagnose both mono- and diplokaryotic spores. Staining of extruded polar filament allowed to demonstrate viability and to observe some stages of extrusion process of microsporidian spores.