

УДК 576.893.195

**ЗАРАЖЕННОСТЬ МИКРОСПОРИДИЯМИ (MICROSPORIDIA)  
НИЗШИХ РАКООБРАЗНЫХ (COPEROIDA, CLADOCERA)  
ЗАПАДНОЙ СИБИРИ**

© В. В. Лукьянцев,<sup>1</sup> А. В. Симакова<sup>2</sup>

Национальный исследовательский Томский государственный университет

<sup>1</sup> НИИ биологии и биофизики ТГУ,

<sup>2</sup> кафедра зоологии беспозвоночных  
пр. Ленина, 36, Томск, 634050

<sup>1,2</sup> E-mail: omikronlab@yandex.ru

Поступила 13.10.2014

При изучении жизненных циклов микроспоридий кровососущих комаров сем. Culicidae и поиске их дополнительных хозяев у 19 видов низших ракообразных Западной Сибири обнаружены виды, проходящие в ракообразном либо полный жизненный цикл, либо один из этапов сложного жизненного цикла. Данные секвенирования мсрРНК микроспоридий из копепод показали, что *Acanthocyclops venustus* Norman, Scott может быть промежуточным хозяином для *Amblyospora rugosa* Simakova, Pankova, 2005 из комара *Ochlerotatus cataphylla* Dyar, а *Acanthocyclops reductus* (Chappuis) — для *Trichostosporea pygopellita* Larsson, 1994 из комара *Oc. excrucians* (Walker). Микроспоридии из дафний *Daphnia cristata* Sars и *D. pulex* Leydig по ультраструктурным признакам отнесены к родам *Bervaldia* Larsson, 1981 и *Agglomerata* Larsson, Yan, 1988. Зараженность природных популяций рачков низкая, около 2%. Максимальная зараженность отмечена во временных водоемах с конца апреля до середины мая.

*Ключевые слова:* микроспоридии, ультраструктура, морфология, эпизоотология, молекулярная филогения, Coperoda, Cladocera.

К настоящему времени у копепод описано 50 видов микроспоридий 9 родов (Bronnvall, Larsson, 2001), у кладоцер — 30 видов 9 родов (Larsson et al., 1996). Согласно литературным данным, микроспоридии из рачков относятся к 3 группам. Две из них представлены видом, родственным или не родственным микроспоридиям комаров, но свойственным именно этим хозяевам (Видтманн, Соколова, 1994; Vavra, Larsson, 1994; Friedrich et al., 1996; Larsson et al., 1996; Voronin, 1996; Vavra et al., 1997, 2005; Refardt et al., 2002; Refardt et al., 2008; Freeman, Sommerville, 2009), к третьей принадлежат виды, один из этапов сложного триморфного цикла которых проходит в ракообразном — дополнительном хозяине, что подтверждает-

ся экспериментальными и молекулярно-генетическими исследованиями сложных циклов микроспориций кровососущих комаров (Andreadis, 1985, 1988; Swenney et al., 1985, 1988, 1989, 1990, 1993; Avery, Undeen, 1990; Becnel, 1992; White et al., 1994; Becnel, Andreadis, 1998; Vossbrinck et al., 1998; Micieli et al., 2000; Andreadis, Vossbrinck, 2002; Vossbrinck et al., 2004).

Описания микроспориций из низших ракообразных ведутся главным образом по ультраструктурным особенностям стадий жизненного цикла, развивающихся в яичниках и/или гемоцеле рачков и приводящих к их гибели, а также по данным ДНК-анализа. Вопросам экологии и эпизоотологии, как правило, уделяется мало внимания.

В настоящей работе приводятся 20-летние данные по зараженности микроспоридиями природных популяций низших ракообразных на территории Западной Сибири, а также по видовому разнообразию, экологии и эпизоотологии этих микроспориций.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования проведены в течение 1992—2012 гг. на территориях Томской, Кемеровской и Новосибирской областей Западной Сибири. Обследованы водоемы 4 основных групп: материковые постоянные; материковые временные, образовавшиеся после таяния снега, луговые и лесные заболоченности; пойменные постоянные водоемы; пойменные временные водоемы.

На зараженность микроспоридиями исследованы низшие ракообразные 3 отрядов: Cladocera — 112 200 экз. (Daphniidae: *Daphnia* Muller), Calanoida — 12 600 экз. (Diaptomidae: *Diaptomus* Westwood), Cyclopoida — 76 660 экз. (Cyclopidae: *Mesocyclops* Sars, *Macrocyclus* Claus, *Acanthocyclops* Kiefer и *Eucyclops* Claus).

Ракообразных отряда Cladocera определяли по определителю Е. Ф. Мануйловой (1964) и по определителю пресноводных беспозвоночных европейской части СССР (1977), ракообразных отряда Cyclopoida по определителю В. Р. Алексеева (1995).

В лаборатории водных гидробионтов просматривали на темном фоне микроскопа МБС-10 для выявления особей, зараженных микроспоридиями. Особей с измененной окраской прокалывали тонкой иглой для проверки наличия спор паразита.

Мазки фиксировали метиловым спиртом 1—2 мин, затем красили азур-эозином, по Гимза-Романовскому (Воронин, Исси, 1974). Для световой микроскопии использованы микроскоп МБ-30S при увеличении  $\times 1000$  и «AxioStar plus» (Zeiss, Германия) при увеличении  $\times 1200$ . Размеры окрашенных спор, стадий развития и спорофорных пузырьков устанавливали при 25 измерениях с помощью окулярмикрометра или программного обеспечения AxioVision.Rel.1.0.

Для электронной микроскопии использованы общепринятые методы (Уикли, 1975; Undeen, Vavra, 1997; Миллер, Симакова, 2009). Ультратонкие срезы толщиной 60—100 нм готовили на ультратоме «Ultratome III» («LKB», Швеция). Препараты просматривали в электронном микроскопе

«JEM-100 CXII» («JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Все размеры устанавливали при 30 измерениях.

Для молекулярно-генетических исследований использованы стандартные методы исследований (Vossbrinck et al., 1998; Simakova et al., 2008). Для молекулярно-филогенетических исследований проведено секвенирование 7 изолятов микроспоридий.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Эпизоотология микроспоридиозов низших ракообразных

На территории Западной Сибири микроспоридии обнаружены в природных популяциях 19 видов ракообразных: *Acanthocyclops americanus* (Marsh), *A. reductus* (Chappuis), *A. venustus* (Norman et Scott), *A. vernalis* (Fisher), *Cyclops insignis* Claus, *C. scutifer* Sars, *C. strenuus* Fisher, *Diacyclops bicuspidatus* (Claus), *D. limnobioides* Kiefer, *Macrocyclops albidus* Jurine, *Megacyclops viridis* (Jurine), *Mesocyclops leuckartii* (Claus), *Thermocyclops asiaticus* Kiefer, *Th. dybowskii* (Lande), *Th. rylovi* (Smirnov), *Metacyclops minutus* (Claus), *Daphnia pulex* Leydig, группа видов *D. cristata* Sars.

Специфичными обитателями временных водоемов со снеговым или дождевым питанием, пересыхающих летом, являются *Cyclops strenuus*, *Acanthocyclops vernalis*, *Metacyclops minutus*; остальные виды характерны для литорали крупных и мелких водоемов. У всех видов количество генераций меняется в зависимости от погодных условий: рачки переносят высыхание водоема на разных стадиях (науплиальных, копеподитных, в яйцевых мешках), взрослые самцы и самки после оттаивания водоемов появляются очень быстро. С этого же времени в них обнаруживаются зрелые споры паразитов.

Сезонная динамика зараженности хорошо прослеживается лишь во временных водоемах, где экстенсивность заражения популяций ракообразных весной и в начале лета оказалась максимальной: в апреле и начале мая во временных водоемах заражены (в разные годы исследований) у *Cyclops scutifer*, *Thermocyclops rylovi*, *Th. asiaticus* — до 2.5 % особей; у *Diacyclops limnobioides* и *D. bicuspidatus* — до 2.25 %, у *Acanthocyclops reductus*, *A. vernalis*, *C. strenuus* — от 1.5 до 2 %. С середины мая зараженность начинает снижаться, в июне—июле встречаются лишь единичные зараженные экземпляры (водоемы пересыхают). Характерно, что в расположенных рядом постоянных водоемах более разнообразен видовой состав зараженных ракообразных, но показатели зараженности по отдельным видам значительно ниже. В августе, сентябре и октябре зараженные рачки не обнаружены.

Появление зараженных рачков сразу после таяния снега говорит об уходе инфицированных особей с ранними стадиями развития паразита в диапаузу при повышении температуры воды или пересыхании водоема в предыдущем сезоне.

Зараженные микроспоридиями особи рода *Daphnia* встречаются во всех исследуемых водоемах (временных и постоянных, материковых и

пойменных) в весенне-летний период. Экстенсивность заражения природных популяций во все годы исследований незначительная и составляет в среднем 0.01 %.

Изучение внешних симптомов заболевания показало, что зараженные микроспоридиями ракообразные имеют матово-белую либо слегка оранжевую окраску. При этом у рачков меняется структура органов, наблюдается отсутствие крупных жировых отложений. Четкие признаки проявления микроспоридиаза наблюдаются только с началом спорогенеза. Согласно гистологическим исследованиям, клетки паразитов заполняют преимущественно весь гемоцель хозяина, а иногда локализуются в яичниках взрослых самок (вероятно, они представляют собой стадии трансовариальной передачи).

#### Состав микроспоридий у низших ракообразных

Поскольку в сборах отсутствовали рачки со стадиями развития паразитов (а преимущественно были особи со зрелыми спорами), видовая идентификация микроспоридий оказалась затруднена. Однако изучение ультраструктуры зрелых спор показало их большое разнообразие, что позволило разделить исследованные виды микроспоридий из копепод на 8 групп, обозначаемых как *Microsporidium*, так как их таксономическая принадлежность окончательно не определена. Выделенные группы изолятов, образуя споры преимущественно веретеновидной формы и крупных размеров до 10—14 мкм, различаются между собой по морфологическим и ультраструктурным признакам (табл. 1; рис. 1, *a—e*, см. вкл.; рис. 2, *a, б*, см. вкл.).

Согласно данным по ультраструктуре спор, среди микроспоридий, выявленных нами у копепод, могут быть как представители видов со сложными жизненными циклами триморфных родов *Amblyospora* Hazard, Oldacre, 1975, *Parathelohania* Codreanu, 1966 и *Trichoctosporea* Larsson, 1994, так и виды, свойственные рачкам и не относящиеся к микроспоридиям комаров, возможно, специфичные для ракообразных. Так, например, *Microsporidium* sp.2 (изоляты № 1446, 1447) из *Acanthocyclops vernalis* имеет *Tuzetia*-подобную спорогонию и образуют *Tuzetia*-подобные споры (рис. 2, *a*), а *Microsporidium* sp.3 (изоляты № 1481, 1517) из *Diacyclops bicuspidatus* и *Mesocyclops leukarti* — *Bohuslavia*-подобные споры (рис. 2, *б*).

Изучение ультраструктуры спор микроспоридий из рачков рода *Daphnia* показало их меньшее морфологическое разнообразие. Так, у группы видов *Daphnia cristata* Sars мы обнаружили микроспоридии, по ультраструктуре относящиеся к родам *Bervalidia* Larsson, 1981, а у *D. pulex* Leydig — к *Agglomerata* Larsson et Yan, 1988 (рис. 2, *в, г*).

В целях поиска промежуточных хозяев микроспоридий кровососущих комаров, имеющих сложные жизненные циклы, или же для подтверждения того, что обнаруженные нами у рачков микроспоридии относятся к специфичным паразитам этих хозяев, нами проведены молекулярно-генетические исследования микроспоридий из низших ракообразных, собранных в водоемах Западной Сибири.

Данные по нуклеотидным последовательностям участка гена малой субъединицы рибосомальной РНК (мсрРНК) получены для 6 изолятов

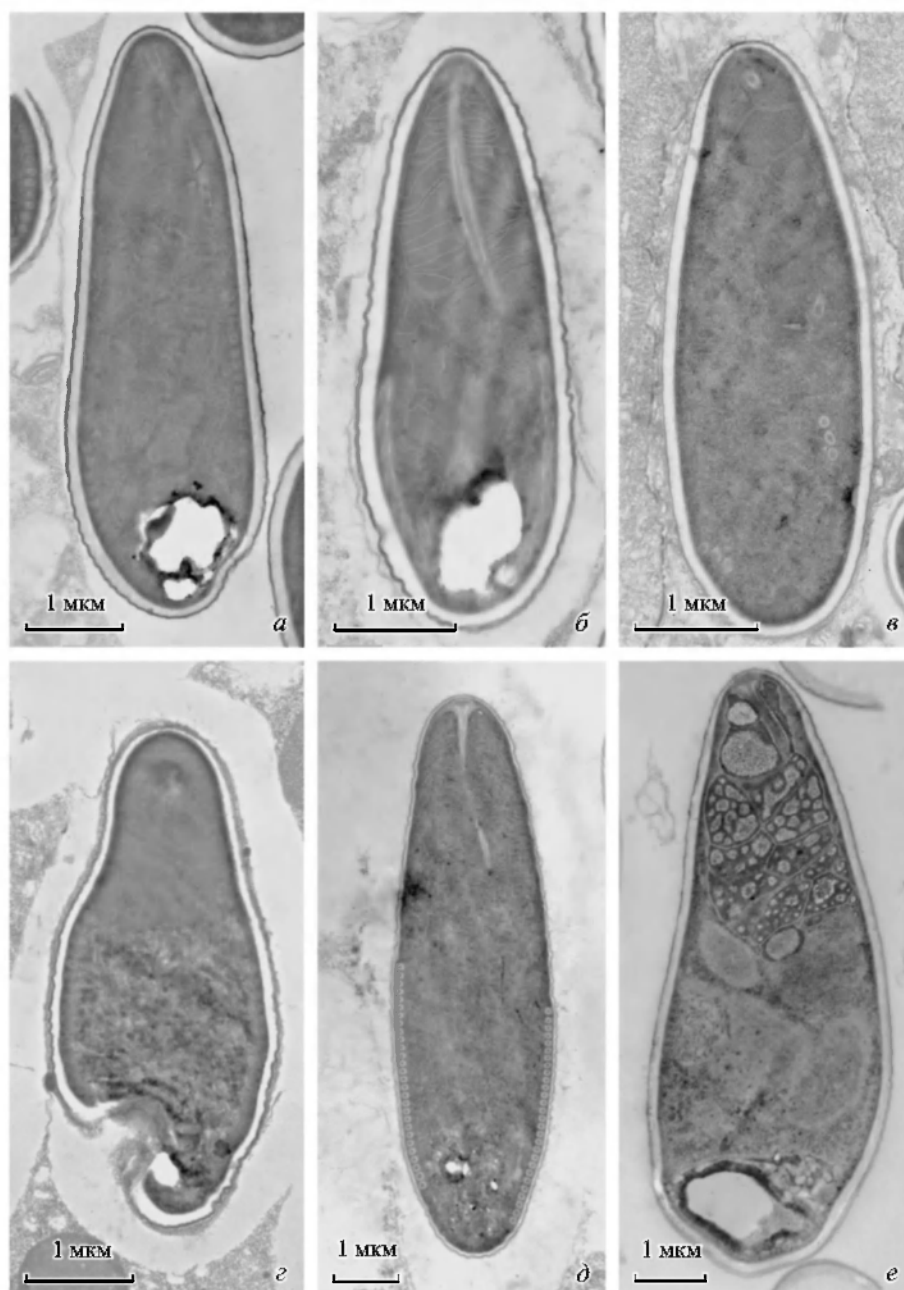


Рис. 1. Ультраструктура неидентифицированных спор микроспоридий из низших ракообразных Западной Сибири.

*a* — *Microsporidium* sp. 1 из *Diacyclops bicuspidatus* *Acanthocyclops vernalis*; *б* — *Microsporidium* sp. 4 из *Diacyclops bicuspidatus*, *Cyclops strenuus*, *Mesocyclops leukarti*; *в* — *Microsporidium* sp. 5 из *Acanthocyclops vernalis*; *г* — *Microsporidium* sp. 6 из *Cyclops scutifer*; *д* — *Microsporidium* sp. 7 из *Acanthocyclops venustus*; *е* — *Microsporidium* sp. 8 из *Cyclops scutifer*.

Fig. 1. Ultrastructure of unidentified microsporidian spores from lower crustaceans in Western Siberia.

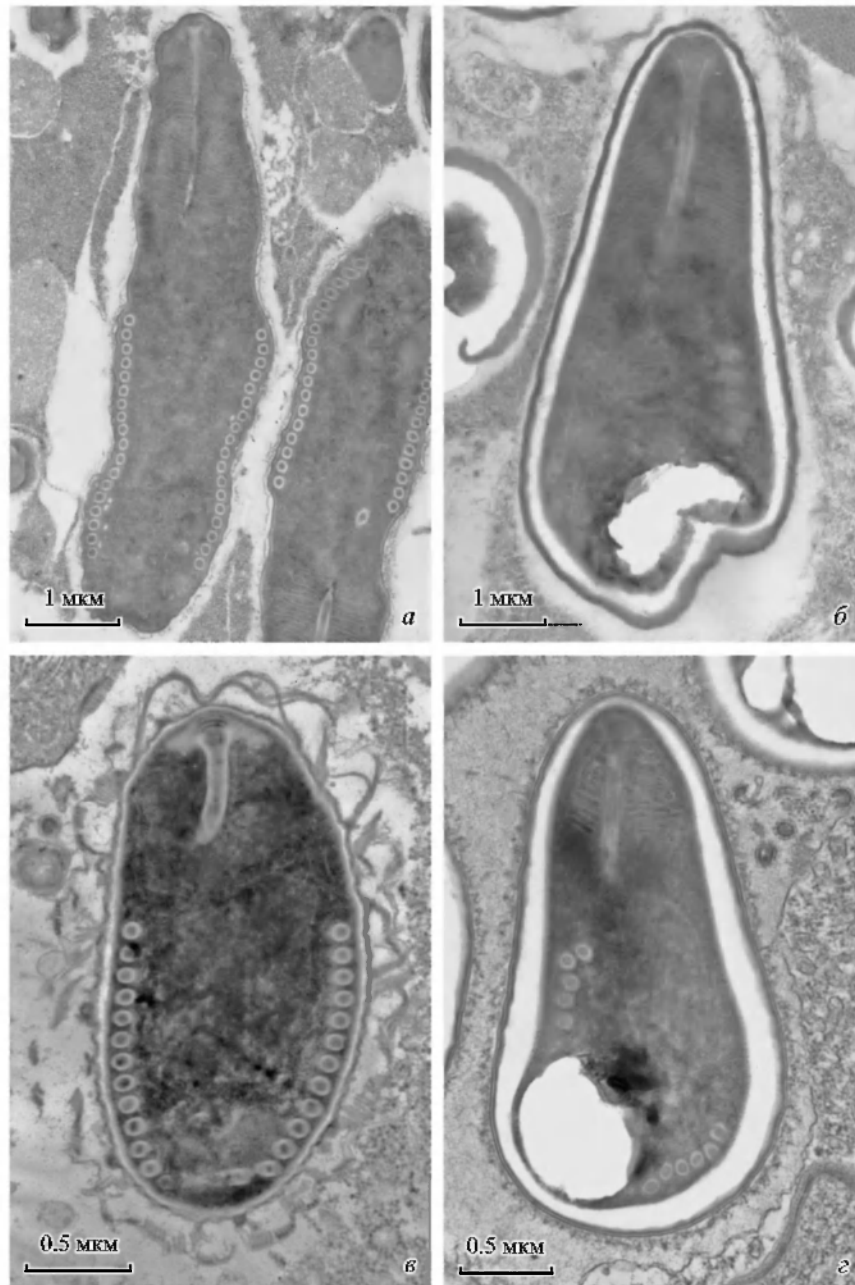


Рис. 2. Ультраструктура идентифицированных спор микроспоридий из низших ракообразных Западной Сибири.

*a* — *Tuzetia*-подобные споры из *Acanthocyclops vernalis*; *б* — *Bohuslavia*-подобные споры из *Mesocyclops leukarti*; *в* — *Bervaldia*-подобные споры из *Daphnia cristata*; *г* — *Agglomerata*-подобные споры из *Daphnia pulex*.

Fig. 2. Ultrastructure of identified microsporidian spores from lower crustaceans in Western Siberia.

Таблица 1

Характеристика микроспоридий из низших ракообразных Западной Сибири

Table 1. Characteristics of microsporidians from lower crustaceans in Western Siberia

Вид микроспоридий и № изолятов	Хозяин	Место и время обнаружения	Секрет эписпорального пространства	Размеры фиксированных спор, мкм	Число и форма спор	Толщина оболочки спор, нм	Число витков ПТ, (диаметр, нм)	ПП (количество частей)
<i>Microsporidium</i> sp. 1 (изоляты 1427, 1431, 1454, 1459, 1461, 1462, 1467, 1483, 1486, 1490), рис. 1, а	<i>Diacyclops bicuspidatus</i> , <i>Acanthocyclops vernalis</i>	Временные материковые и постоянные пойменные водоемы, апрель—май	Зернистый секрет, образующий хлопьевидные скопления, и трубчатый секрет, иногда связанный с оболочками споронтов	9.8—9.9× 3.1—3.3	Удлиненно-овальные по 16 в СП	150 эк — 30 эн — 120	11—14 (120)	(2) крупно-пластинчатый, плотнопластинчатый
<i>Microsporidium</i> sp. 2 (изоляты 1446, 1447) <i>Tuzetia</i> -подобные, рис. 2, а	<i>Acanthocyclops vernalis</i>	Временный материковый водоем, лесная заболоченность, апрель	?	9.7—9.8× 4.4—4.5	Удлиненно-овальные (ближе к «бутылковидной») по 1 в СП	80 эк — 40 эн — 40	22½ 18 (150) 4½ (120)	(2) плотно-пластинчатый, везикулярный
<i>Microsporidium</i> sp. 3 (изоляты 1481, 1517) — <i>Bohuslavia</i> -подобные, рис. 2, б	<i>Diacyclops bicuspidatus</i> , <i>Mesocyclops leukarti</i>	Постоянный пойменный водоем, май	Зернистый и трубчатый секрет, занимающий практически всю полость СП	4.6—4.7× 1.9—2.0	Грушевидные по 16—32 в СП	120 эк — 40 эн — 80	5 (110)	(1) плотно-пластинчатый
<i>Microsporidium</i> sp. 4 (изоляты 1463, 1514, 1515, 1519, 1522, 1523, 1524, 1535), рис. 1, б	<i>Diacyclops bicuspidatus</i> , <i>Cyclops strenuus</i> , <i>Mesocyclops leukarti</i>	Временные материковые, постоянные пойменные водоемы, май	Зернистый и трубчатый	8.6—8.7× 5.2—5.3	Овальные по 1 в СП	170 эк — 30 эн — 140	8½ (100)	(2) крупно-пластинчатый, плотнопластинчатый

<i>Microsporidium</i> sp. 5 (изоляты 1559, 1577), рис. 1, в	<i>Acanthocyclops vernalis</i>	Сфагновое бо- лото, Том- ская обл., май	Зернистый, ино- гда образую- щий хлопье- видные скоп- ления, либо лежащий сво- бодно в поло- сти пузырька ?	8.1—8.3× 2.5—2.6	Овальные, ино- гда немного изогнутые по 16 в СП	100 эк — 20 эн — 80	3 (100)	(2) крупнока- мерный, плотнопла- стинчатый
<i>Microsporidium</i> sp. 6 (изолят 1491), рис. 1, г	<i>Cyclops scutifer</i>	Постоянный пойменный водоем, май	?	9.5—10.8× 4.7—5.7	Грушевидные, с небольшой вогнутостью на заднем по- люсе по 1 в СП	120 эк — 20 эн — 100	18 (110)	(1) плотнопла- стинчатый
<i>Microsporidium</i> sp. 7 (изолят 1717), рис. 1, д	<i>Acanthocyclops venustus</i>	Временный ма- териковый водоем, лес- ная заболо- ченность, май	?	10.9—11.0× 3.6—3.9	Удлиненно- овальные по 16 в СП	110 эк — 30 эн — 80	28 (110)	(1) пластинча- тый
<i>Microsporidium</i> sp. 8 (изоляты 1918, 1919), рис. 1, е	<i>Cyclops scutifer</i>	Временные и постоянные материко- вые и пой- менные во- доемы, май	Эписпиральное пространство однородное, вероятно, во- круг спор име- ется слизистое вещество	13.3—13.5× 3.8—4.0	Удлиненно-яй- цевидные по 16 в СП	160 эк — 20 эн — 140	16—17 (130)	(2) крупнока- мерный с не- однородным содержимым, среднекамер- ный с зерни- стым содер- жимым

Примечание. ? — нет данных, СП — спорофорный пузырек, ПТ — полярная трубка, ПП — полярoplast, эк — экзоспора, эн — эндоспора.



микроспоридий из копепод (табл. 2). Установлено, что каждый изолят *Microsporidium diacyclops* (№ 1765), *M. thermocyclopy* (№ 1766), *M. americanus* (№ 1768), *M. limnobiis* (№ 1769) из ракообразных *Diacyclops* sp., *Thermocyclops* sp., *Acanthocyclops americanus* и *D. limnobiis* соответственно, согласно ДНК-анализу, представляет собой специализированный вид (видовые названия микроспоридий даны по родовым и видовым названиям хозяев-копепод). Эти виды ранее не были изучены и описаны, они близкородственны микроспоридиям из других ракообразных, для которых получены данные секвенсов гена рРНК (*Binucleata daphniae* Refardt et al., 2008; *Berwaldia schaefernai* Vavra et Larsson, 1994, *Larssonia obtusa* Widtmann et Sokolova, 1994, *Gurleya daphniae* Friedrich et al., 1996, *G. vavrai* Green, 1974 — паразитов дафний, а также *Marssoniella elegans* Vavra et al., 2005 — паразита рачка *Cyclops vicinus* Uljanin). К сожалению, в настоящее время не удалось получить данные по ультраструктуре стадий жизненного цикла выявленных нами видов, поэтому завершить их полноценное описание не представилось возможным. Однако данные секвенирования мсрРНК свидетельствуют о том, что это новые виды паразитов.

По литературным данным, промежуточные хозяева выявлены у 12 видов микроспоридий, относящихся к 4 родам со сложными циклами: 1 вид рода *Hyalinocysta* Hazard et Oldacre, 1975 (Andreadis, Vossbrinck, 2002); 9 видов *Amblyospora* Hazard et Oldacre, 1975 (Andreadis, 1986, 1988; Swenney et al., 1988, 1989, 1990; Becnel, 1992; White et al., 1994; Vossbrinck et al., 1998; Vossbrinck et al., 2004), 1 вид *Parathelohania* Codreanu, 1966 (Avery, Undeen, 1990) и 1 вид *Duboscqia* Perez, 1908 (Swenney et al., 1993). Эти паразиты заражают в качестве промежуточных хозяев 10 видов ракообразных. Установлено, что каждый вид микроспоридий со сложным циклом развития может заражать только один вид окончательного хозяина — комара, но несколько видов промежуточных хозяев — ракообразных. Так, данные секвенирования мсрРНК микроспоридий из копепод показали, что по крайней мере два вида рачков служат промежуточными хозяевами для двух паразитов рода *Amblyospora*: *Acanthocyclops vernalis* и *Diacyclops bicuspidatus* являются промежуточными хозяевами для *Amblyospora cinerei* Andreadis, 1994 и *A. stimuli* Andreadis, 1994 соответственно (Vossbrinck et al., 2004).

Тем не менее наши многочисленные экспериментальные заражения не выявили промежуточных хозяев для видов микроспоридий родов *Amblyospora*, *Parathelohania* и *Trichoctosporea* Larsson, 1994.

Экспериментальный поиск промежуточных хозяев микроспоридий комаров велся в двух направлениях: споры микроспоридий неидентифицированных видов из массовых видов копепод использовали для заражения личинок комаров, а спорами микроспоридий идентифицированных видов из личинок комаров заражали ракообразных.

При постановке экспериментов учитывались возраст хозяина и доза спор при заражении. Известно, что микроспоридии более успешно заражают животное-хозяина в младших возрастах, течение болезни и спорообразование проходят тем быстрее, чем выше доза спор (Псси, 1974). Поэтому мы использовали личинок комаров первого и второго возраста и ракообразных всех стадий развития. Учитывая, что для прохождения полного жизненного цикла паразиту необходимо минимум два года, опыты прове-

Таблица 2

Виды микроспоридий из копепод Западной Сибири, для которых получены данные нуклеотидных последовательностей мсрРНК

Table 2. Microsporidian species from copepods in Western Siberia, for which the nucleotide sequences of ssrDNA were obtained

Вид ракообразного	Вид микроспоридии	Основной хозяин	Место и время обнаружения копепод	Место и время обнаружения комаров
<i>Acanthocyclops venustus</i>	<i>Amblyospora rugosa</i>	<i>Oc. cataphylla</i>	Луговая заболоченность, г. Северск, 06.05.2007 г.	Лесная заболоченность, г. Томск, 14.05.2005 г.
<i>Ac. reductus</i>	<i>Trichoctosporea pygopellita</i>	<i>Oc. excrucians</i>	Лесная заболоченность, г. Томск, 26.05.2007 г.	Лесная заболоченность, г. Томск, 30.05.2006 г.; луговая заболоченность, г. Северск, 18.05.2008 г.
<i>Diacyclops</i> sp.	<i>Microsporidium diacyclopy</i>	Нет	Лесная заболоченность, г. Томск, 30.04.2007 г.	Нет
<i>Thermocyclops</i> sp.	<i>Microsporidium thermocyclopy</i>	»	Круглое оз., г. Томск, 06.05.2007 г.	»
<i>Ac. americanus</i>	<i>Microsporidium americanus</i>	»	Луговая заболоченность, пос. Бакчар Томской обл., 20.05.2007 г.	»
<i>D. limnobius</i>	<i>Microsporidium limnobius</i>	»	Луговая заболоченность, пос. Тимирязево Томской обл., 06.05.2007 г.	»

дены в различных сочетаниях: заражение в тот же сезон свежими спорами или заражение осенью, либо следующей весной спорами, содержащимися в холодильнике или при комнатной температуре. Для перекрестных заражений составляли пары из совместно обитающих в природных условиях видов хозяев. Для заражения личинок комаров использованы споры из массовых видов циклопов (*Cyclops scutifer*, *C. strenuus*, *Thermocyclops rylovi*, *T. asiaticus*, *Diacyclops limnobioides*, *D. bicuspidatus*, *Acanthocyclops reductus*, *A. vernalis*) (табл. 3). Для заражения копепоид использованы споры микроспоридий, принадлежащих родам *Amblyospora*, *Parathelohania* и *Trichoctosporea* из личинок комаров *Aedes cinereus* Meigen, *Ochlerotatus excrucians* (Walker), *Oc. cantans* Meigen, *Oc. caspius* (Pallas), *Oc. communis* (De Geer), *Oc. punctator* (Kirby), *Anopheles beklemishevi* Stegnii et Kabanova, *An. messeae* Falleroni (табл. 4).

Все варианты опытов сопровождались контролем без внесения спор паразита. Визуальные наблюдения, а также свето- и электронно-микроскопический анализ личинок комаров и низших ракообразных, погибших во время проведения экспериментов и по их окончании, не выявили зараженных особей. На мазках и ультратонких срезах стадии мерогонии и спорогонии, а также зрелые споры микроспоридий не обнаружены. Однако с помощью ДНК-анализа нами выявлены в качестве потенциальных промежуточных хозяев микроспоридий из комаров рода *Ochlerotatus* Lynch et Arribalzaga два вида низших ракообразных рода *Acanthocyclops* Kiefer.

Нуклеотидные последовательности участков гена микроспоридий из копепоид *Acanthocyclops venustus* Norman et Scott оказались идентичны последовательностям гена мсрРНК микроспоридии *Amblyospora rugosa* Simakova et Pankova, 2005 из комаров *Oc. cataphylla* Dyar. Таким образом, мы нашли подтверждение тому, что микроспоридия *A. rugosa* использует в качестве основного хозяина комаров *Oc. cataphylla* и может использовать в качестве промежуточного хозяина копепоид *A. venustus* (табл. 2) (Симакова и др., 2011).

Нами установлено также, что нуклеотидные последовательности участков гена мсрРНК микроспоридий из копепоид *Acanthocyclops reductus* (Charpui) идентичны последовательностям гена микроспоридии *Trichoctosporea pygopellita* Larsson, 1994, паразита комаров *Oc. excrucians*. Этот факт говорит о том, что у микроспоридии *T. pygopellita* из комаров *Oc. excrucians* промежуточным хозяином может быть циклоп *Ac. reductus* (табл. 2) (Симакова и др., 2011).

Таким образом, изучение микроспоридий низших ракообразных на территории Западной Сибири показало, что экстенсивность заражения природных популяций рачков низкая и составляет около 2 %. Максимальная зараженность наблюдается во временных водоемах в период от конца апреля до середины мая. Зараженные рачки отличаются от здоровых матово-белой или оранжевой матовой окраской. Паразиты локализуются в гемоцеле и/или яичниках самок.

Ультраструктурные исследования выявили большое видовое разнообразие микроспоридий, паразитирующих у низших ракообразных. Однако полное описание микроспоридий и определение их видовой и родовой принадлежности нуждаются в дополнительных исследованиях из-за отсут-

Таблица 3

Условия заражения спорами микроспоридий из низших ракообразных личинок комаров сем. Culicidae  
(во всех вариантах получен отрицательный результат)

Table 3. Conditions of infection of mosquito larvae of fam. Culicidae by spores of microsporidia from lower crustaceans  
(negative result was obtained in all the cases)

Вид микроспоридии	Хозяин	Виды комаров	Время проведения опыта, дни	Температура, °С и время хранения спор	Температура, °С, (количество повторностей)
<i>Microsporidium</i> sp. 1	<i>Daphnia pulex</i>	<i>Anopheles atroparvus</i>	До гибели личинок	Свежие споры	+28 (2)
<i>Microsporidium</i> sp. 2	<i>Cyclops insignis</i>	<i>Anopheles atroparvus</i>	То же	1 мес. от 0 до +5	+23 (10)
<i>Microsporidium</i> sp. 3	<i>Acanthocyclops</i> sp.	<i>Ae. cinereus</i> , <i>Oc. excrucians</i> , <i>cantans</i> , <i>caspius</i> , <i>communis</i> , <i>punctor</i>	14	Свежие споры	от +18 до +23 (1)
<i>Microsporidium</i> sp. 4	<i>Cyclops insignis</i> , <i>Microcyclops</i> sp.	<i>Oc. communis</i>	14	То же	То же
<i>Microsporidium</i> sp. 5	<i>Mesocyclops leuckarti</i>	<i>Oc. excrucians</i>		» »	» »
<i>Microsporidium</i> sp. 6	<i>Diacyclops limnobius</i> , <i>bicuspidatus</i>	<i>Oc. euedes</i> , <i>Oc. cantans</i>	18	» »	от +20 до +23 (4)
<i>Microsporidium</i> sp. 7	<i>Cyclops</i> sp.	<i>Oc. excrucians</i>	8	» »	от +20 до +23 (1)
<i>Microsporidium</i> sp. 8	<i>Cyclops</i> sp., <i>Thermocyclops</i> sp.	<i>An. messeae</i>	До гибели личинок или выплода имаго	1 мес. при комнатной температуре	от +23 до +25 (2)

Таблица 4

Условия заражения спорами микроспоридий из личинок комаров сем. Culicidae сопутствующих им гидробионтов  
(во всех вариантах получен отрицательный результат)

Table 4. Conditions of infection of associated aquatic organisms by spores of microsporidians from mosquito larvae of the family Culicidae  
(negative result was obtained in all the cases)

Вид микроспоридии	Хозяин	Виды гидробионтов	Время проведения опытов, дни	Время и температура, °С хранения спор	Температура, °С, (количество повторностей)
<i>Parathelohania formosa</i>	<i>Anopheles messeae</i>	<i>Acanthocyclops gigas</i> , <i>Ac. viridis</i> , <i>Macrocyclops albidus</i> , <i>Eucyclops serrulatus</i> , <i>Cyclops</i> sp.	14	1 мес. от 0 до +5	от +20 до +23 (2)
<i>P. tomski</i>	<i>An. messeae</i>	<i>Ac. gigas</i> , <i>M. albidus</i> , <i>Cyclops</i> sp., <i>Daphnia pulex</i>	14	6 мес. от 0 до +5	от +15 до +17 (2)
<i>P. teguldeti</i>	<i>An. beklemishevi</i>	<i>Ac. gigas</i> , <i>Ac. viridis</i> , <i>Ac. vernalis</i> , <i>M. albidus</i> , <i>E. serrulatus</i> , <i>Cyclops</i> sp., <i>Mesocyclops</i> sp., <i>D. pulex</i>	35	3 мес. от 0 до +5	от +18 до +23 (2)
<i>P. teguldeti</i>	<i>An. beklemishevi</i>	<i>Coenagrion vernale</i> , сем. Coenagrionidae, <i>Cloen dipterum</i> , сем. Baetidae	19	3 мес. от 0 до +5	от +18 до +23 (6)
<i>Amblyospora caspius</i>	<i>Ochlerotatus caspius</i> , <i>communis</i>	<i>Ac. gigas</i> , <i>Ac. viridis</i> , <i>M. albidus</i> , <i>D. pulex</i>	14	1 мес. при +23 и свежие	от +25 до +28 (9)
<i>Amblyospora</i> sp.	<i>Oc. excrucians</i> , <i>flavescens</i>	<i>Ac. vernalis</i> , <i>Ac. viridis</i> , <i>Microcyclops</i> sp., <i>Daphnia abtusa</i>	19	2 мес. при +4	от +18 до +23 (3)
<i>Amblyospora</i> sp.	<i>Oc. excrucians</i>	<i>Mesocyclops leucarti</i>	19	То же	от +18 до +23 (1)
<i>Amblyospora</i> sp.	<i>Oc. flavescens</i> , <i>punctator</i>	<i>Ac. vernalis</i> , <i>Ac. viridis</i>	19	» »	от +18 до +23 (2)
<i>Amblyospora</i> sp.	<i>Oc. excrucians</i>	<i>Ac. gigas</i> , <i>Ac. vernalis</i> , <i>Ac. viridis</i> , <i>M. crassus</i> , <i>M. leucarti</i> , <i>Paracyclops fimbriatus</i> , <i>Daphnia abtusa</i> , <i>Cyclops insignis</i>	19	» »	от +18 до +23 (9)
<i>Amblyospora</i> sp.	<i>Oc. flavescens</i>	<i>Ac. vernalis</i> , <i>Ac. viridis</i> , <i>M. crassus</i> , <i>M. leucarti</i> , <i>Paracyclops fimbriatus</i>	19	» »	от +18 до +23 (3)
<i>Amblyospora</i> sp.	<i>Oc. punctator</i>	<i>M. crassus</i> , <i>Daphnia obtuse</i>	19	» »	от +18 до +23 (5)

<i>Amblyospora</i> sp.	<i>Oc. excrucians</i>	<i>Macrocyclus albidus, Ma. fuscus, Cyclo- lops lacusticus, Simocephalus lusaticus</i>	7	4 мес. при +4	от +23 до +25 (1)
<i>Amblyospora</i> sp.	<i>Oc. excrucians</i>	<i>Macrocyclus albidus</i>	24	То же	от +23 до +25 (2)
<i>Amblyospora</i> sp.	<i>Oc. excrucians</i>	<i>Ac. viridis, Ma. albidus, Ma. fuscus, C. in- signis, C. strenuus, Simocephalus lusa- ticus</i>	14	» »	То же
<i>Trichostopora co- lorata</i>	<i>Oc. euedes</i>	<i>Mesocyclops crassus, Ac. carilatus</i>	19	2 мес. при +4	от +18 до +23 (2)
<i>T. pygopellita</i>	<i>Oc. flavescens</i>	<i>Ac. vernalis, M. crassus, Daphnia obtusa</i>	19	То же	То же
<i>T. pygopellita</i>	<i>Oc. flavescens</i>	<i>C. strenuus, Ac. viridis, Ma. albidus</i>	24	4 мес. при +4	от +23 до +25 (2)

ствия в настоящее время данных либо по молекулярной филогении, либо по ультраструктуре внутриклеточных стадий паразита.

Морфологические и молекулярно-генетические исследования, проведенные нами, показали, что микроспоридии низших ракообразных Западной Сибири представлены всеми экологическими группами паразитов, описанными в Европе: а) специализированными видами, родственными другим микроспоридиям рачков; б) видами, образующимися в результате разрыва ареалов основного и промежуточного хозяина и близкородственными видам паразитов со сложными циклами из кровососущих комаров; в) видами, один из этапов сложного жизненного цикла которых проходит в дополнительном промежуточном хозяине — рачке, а полный жизненный цикл завершается с участием основного хозяина — кровососущего комара сем. Culicidae.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Т. G. Andreadis, С. F. Vossbrinck (Agricultural Experiment Station, New-Haven, CT, USA) за помощь в проведении молекулярно-генетических исследований, А. А. Миллера (ЦКП «Нанотех» ИФПМ СО РАН, Томск, Россия) за помощь в проведении электронно-микроскопических исследований, Т. Ф. Панкову (ТГУ, Томск, Россия) за помощь в обсуждении результатов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта президента Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ № НШ-1279.2014.4; Программы повышения конкурентоспособности ТГУ; результаты получены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России № 2014/233.

### Список литературы

- Алексеев В. Р. 1995. Веслоногие раки. В кн.: С. Я. Цалолыхин (ред.). Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. Т. 2. Ракообразные. СПб.: Изд-во ЗИН РАН, 75—128.
- Видтманн С. С., Соколова Ю. Я. 1994. Описание нового рода *Larssonia* на основании изучения ультраструктуры *Microsporidium (Pleistophora) obtusa* из *Daphnia pulex* (Cladocera). Паразитология. 28 (3) : 202—213.
- Воронин В. Н., Псси И. В. 1974. О методиках работы с микроспоридиями. Паразитология. 8 (3) : 272—273.
- Псси И. В. 1974. Применение микроспоридий для биологической борьбы с насекомыми, вредящими сельскому хозяйству. В кн.: Биологические средства защиты растений. М.: Наука. 360—373.
- Мануйлова Е. Ф. 1964. Ветвистоусые рачки фауны СССР. М.; Л.: Наука. 318 с.
- Миллер А. А., Симакова А. В. 2009. Использование метода ОТЕ-контрастирования ультратонких срезов на примере микроспоридий (Protozoa: Microsporidia). Цитология. 51 (9) : 741—747.
- Определитель пресноводных беспозвоночных европейской части СССР 1977. Л.: Гидрометеоздат. 213—260.
- Симакова А. В., Лукьянцев В. В., Vossbrinck C. R., Andreadis T. G. 2011. Выявление *Amblyospora rugosa* и *Trichoctospora pygopellita* (Microsporidia: Amblyosporidae), микроспоридий — паразитов кровососущих комаров, у *Acanthocyclops vernalis* и *Acanthocyclops reductus* (Copepoda: Cyclopoidae), основанное на анализе малой субъединицы рибосомальной ДНК. Паразитология. 45 (2) : 140—146.
- Уикли Б. 1975. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир. 326 с.
- Andreadis T. G. 1985. Life cycle, epizootiology and horizontal transmission of *Amblyospora* (Microspora: Amblyosporidae) in a univoltine mosquito, *Aedes stimulans*. Invertebrate Pathology. 46 : 31—46.
- Andreadis T. G. 1988. Comparative susceptibility of the copepod, *Acanthocyclops vernalis* to a microsporidian parasite, *Amblyospora connecticus* from the mosquito, *Aedes cantator*. Invertebrate Pathology. 52 : 73—77.
- Andreadis T. G., Vossbrinck C. F. 2002. Life cycle, ultrastructure and molecular phylogeny of *Hyalinocysta chapmani* (Microsporidia: Thelohaniidae) a parasite of *Culiseta melanura* (Diptera: Culicidae), and *Orthocyclops modestus* (Copepoda: Cyclopidae). Eukaryotic Microbiology. 49 : 350—364.
- Avery S. W., Undeen A. H. 1990. Horizontal transmission of *Parathelohania obesa* (Protozoa: Microspora) to *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae). Invertebrate Pathology. 53 : 424—426.
- Becnel J. J. 1992. Horizontal transmission and subsequent development of *Amblyospora californica* (Microsporidia: Amblyosporidae) in the intermediate and definitive hosts. Diseases Aquatic Organisms. 13 : 17—28.
- Becnel J. J., Andreadis T. G. 1998. *Amblyospora salinaria* n. sp. (Microsporidia: Amblyosporidae) : parasite of *Culex salinarius* (Diptera: Culicidae), its life stages in an intermediate host and establishment as a new species. Invertebrate Pathology. 71 : 258—262.
- Bronnvall A. M., Larsson J. I. R. 2001. Ultrastructure and light microscopic cytology of *Agglomerata lacrima* n. sp. (Microspora, Dubosqiidae) a microsporidian parasite of *Acanthocyclops vernalis* (Copepoda, Cyclopidae). European Journ. of Protistology. 37 : 89—101.
- Freeman M. A., Sommerville C. 2009. *Desmozon lepeophtherii* n. gen., n. sp., (Microsporidia: Enterocytozoonidae) infecting the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). Parasites and Vectors. 2 : 58.
- Friedrich C., Winder O., Schaffler K., Reinthaler F. F. 1996. Light and Electron microscope study on *Gurleya daphnia* sp. nov. (Microspora, Gurleyidae), a parasite of *Daphnia pulex* (Crustacea, Phyllozoa). European Journ. of Protistology. 32 : 116—122.
- Larsson J. I. R., Ebert D., Vavra J., Voronin V. N. 1996. Redescription of *Pleistophora intestinalis* Chatton, 1907, a microsporidian parasite of *Daphnia magna* and *Daphnia pu-*

- lex*, with establishment of the new genus *Glugoides* (Microspora: Glugeidae). *European Journ. of Protistology*. 32 : 251—261.
- Miceli M. V., Garcia J. J., Becnel J. J. 2000. Life cycle and description of *Amblyospora camposi* n. sp. (Microsporidia: Amblyosporidae) in the mosquito *Culex renatoi* (Diptera: Culicidae) and the copepod *Paracyclops fimbriatus fimbriatus* (Copepoda: Cyclopidae). *Eukaryotic Microbiology*. 47 : 575—580.
- Refardt D., Canning E. U., Marthis A., Cheney S. A., Lafranchi-Tristem N. J., Ebert D. 2002. Small subunit ribosomal DNA phylogeny of microsporidia that infect *Daphnia* (Crustacea: Cladocera). *Parasitology*. 124 : 381—389.
- Refardt D., Decaestecker B., Jonson P. T. J., Vavra J. 2008. Morphology, Molecular Phylogeny, and Ecology of *Binucleata daphniae* n. g., n. sp. (Fungi: Microsporidia), a Parasite of *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea: Branchiopoda). *Eukaryotic Microbiology*. 55(5) : 393—408.
- 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). *Invertebrate Pathology*. 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*. *Invertebrate Pathology*. 46 : 98—102.
- Sweeney A. W., Graham M. F., Hazard E. I. 1988. Life cycle of *Amblyospora dyxenoides* sp. nov. in the mosquito, *Culex annulirostris* and the copepod *Mesocyclops albicans*. *Invertebrate Pathology*. 51 : 46—57.
- Sweeney A. W., Doggett S. L., Gullick G. 1989. Bioassay experiments on the dose response of *Mesocyclops* sp. to meiospores of *Amblyospora dyxenoides* produced in *Culex annulirostris* mosquito larvae. *Invertebrate Pathology*. 53 : 118—120.
- Sweeney A. W., Doggett S. L., Piper R. G. 1993. Life cycle of a new species of *Duboscqia* (Microsporidia: Thelohaniidae) infecting the mosquito *Anopheles hilli* and an intermediate copepod host, *Apocyclops dengizicus*. *Invertebrate Pathology*. 62 : 137—146.
- 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. *Invertebrate Pathology*. 55 : 428—434.
- Vavra J., Larsson J. I. R. 1994. *Bervaldia schaefermai* (Jirovec, 1937) comb. n. (Protozoa, Microsporidia), fine structure, life cycle and relationship to *Bervaldia singularis* Larsson, 1981. *European Journ. of Protistology*. 30 : 45—54.
- Vavra J., Larsson J. I. R., Baker M. D. 1997. Light and electron microscopic cytology of *Trichotuzetia guttata* gen. and sp. n. (Microspora, Tuzetiidae) a microsporidian parasite of *Cyclops vicinus* Uljain, 1875 (Crustacea, Copepoda). *Archiv für Protistenkunde*. 147 : 293—306.
- Vávra J., Hylis M., Obornik M., Vossbrinck C. R. 2005. Microsporidia in aquatic microcrustacea: the copepod microsporidium *Marssoniella elegans* Lemmermann, 1900 revisited. *Folia Parasitology*. 52 : 163—172.
- Voronin V. N. 1996. Ultrastructure and horizontal transmission of *Gurleya macrocyclopis* (Protozoa, Microspora) to *Macrocylops albidus* (Crustacea, Copepoda). *Invertebrate Pathology*. 67 : 105—107.
- Vossbrinck C. R., Andreadis T. G., Debrunner-Vossbrinck B. A. 1998. Verification of intermediate hosts in the life cycles of microsporidia by small subunit rDNA sequencing. *Eukaryotic Microbiology*. 45 : 290—292.
- Vossbrinck C. R., Andreadis T. G., Vavra J., Becnel J. J. 2004. Molecular phylogeny and evolution of mosquito parasitic Microsporidia (Microsporidia: Amblyosporidae). *Eukaryotic Microbiology*. 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*. *Invertebrate Pathology*. 63 : 19—25.



INFESTATION OF LOWER CRUSTACEANS (COPEPODA, CLADOCERA)  
WITH MICROSPORIDIANS (MICROSPORIDIA) IN WESTERN SIBERIA

V. V. Lukyantsev, A. V. Simakova

*Key words:* microsporidia, ultrastructure, morphology, epizootology, molecular phylogeny, Copepoda, Cladocera.

SUMMARY

The search for intermediate hosts of microsporidians of bloodsucking mosquitoes of the family Culicidae with complicated two-host developmental cycles in Western Siberia resulted in revealing of 19 microsporidian species in crustaceans. Crustacean microsporidians are represented as by specialized parasites of crustacean, being or being not related to microsporidians parasitizing mosquitoes, and by parasites of mosquitoes having only a part of their complicate life cycle in crustaceans. Sequencing of ssrDNA of microsporidians from copepods had demonstrated that *Acanthocyclops venustus* Norman et Scott can be an intermediate host of *Amblyospora rugosa* Simakova et Pankova, 2005 from mosquitoes *Oc. cataphylla* Dyar., and *Acanthocyclops reductus* (Chappuis) can be an intermediate host of *Trichoctosporea pygopellita* Larsson, 1994, a parasite of the mosquito *Oc. excrucians* (Walker). According to their fine structure, microsporidians from *Daphnia* Muller belong to the genera *Bervaldia* Larsson, 1981 and *Agglomerata* Larsson et Yan, 1988. The infestation rate in natural population of crustaceans was low, constituting about 2 %. The maximal infestation rate was observed in temporary reservoirs since late April till early May.

---