

УДК 576.893.195 : 595.729

## МИКРОСПОРИДИОЗ КРАСНОГРУДОЙ ПЬЯВИЦЫ *OULEMA MELANOPUS* (COLEOPTERA)

© И. В. Исси, С. В. Крылова, Е. В. Моржина,<sup>1</sup> Ю. Я. Соколова

Дано описание стадий жизненного цикла нового вида микроспоридии *Unikaryon oulemi* sp. n. из эпителия средней кишки взрослых жуков *Oulema melanopus*. Коротко-цилиндрические споры этого вида имеют размеры 2.7—2.9 × 1.2—1.4 мкм (на ультратонких срезах), одиночное ядро и полярную трубку, уложенную в 11.5—12.5 витков в один слой. Редко встречаются споры овальной формы с меньшим числом витков полярной трубки.

Микроспоридии жуков — сравнительно мало изученная группа паразитов. Описания новых видов в основном охватывают паразитов хозяйственно важных видов — либо энтомофагов, либо вредителей леса, сельскохозяйственных растений или запасов. Мы обнаружили заражение жуков красногрудой пьявицы *Oulema melanopus* в период массового размножения популяции этого вредителя в Краснодарском крае. В статье приведены данные по строению микроспоридии и по патологии инвазированных ею клеток.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Взрослые жуки красногрудой пьявицы были собраны нами на посевах пшеницы в июле 1986 г., а также присланы нам летом 1987 г. сотрудником Всероссийского НИИ биологической защиты растений (г. Краснодар) В. Н. Смирновым.

Жуков вскрывали и отпрепаровывали инвазированную микроспоридиями среднюю кишку. Из зараженного органа делали серию отпечатков на предметных стеклах для изучения стадий в световом микроскопе. Маленькие кусочки зараженных тканей фиксировали в 2.5%-ном глутаральдегиде на кокадилатном буфере (рН 7.2) для электронно-микроскопических исследований. Постфиксацию производили 1.5%-ным раствором четырехоксида осмия, затем материал обезвоживали, проводя через серию спиртов возрастающей концентрации и абсолютный ацетон и заливали в эпон-аралдит. Ультратонкие срезы, приготовленные на ультратоме Reichert—Young, контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца, после чего просматривали в электронный микроскоп Hitachi 300. Полутонкие срезы для световой микроскопии окрашивали метиленовым синим по методике, разработанной Логиновым (1987).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На полутонких и ультратонких срезах обнаружены стадии поздней мерогонии, спорогонии и споры микроспоридии, которую мы описываем как новый вид (см. рисунок, 1, 2; см. вкл.).

<sup>1</sup> Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, С.-Петербург—Пушкин

Хозяин: взрослые жуки (имаго) *Oulema melanopus* (Chrysomelidae).

Локализация: клетки эпителия средней кишки.

Место сбора материала: посевы пшеницы в Краснодарском крае.

Время сбора: июль 1986 г., лето 1987 г.

Описание стадий развития. В цитоплазме зараженных клеток хозяина лежат немногочисленные стадии поздней мерогонии. Они представляют собой амебоидные одноядерные клетки, в цитоплазме которых видны многочисленные рибосомы и плоские цистерны гранулированной эндоплазматической сети. Иногда меронты образуют цепочки, состоящие из 6—8 клеток (3). Размеры меронтов от 2.5 до 3.6 мкм, их ядер — 2—2.5 мкм. Образование споронтов сопровождается утолщением клеточной оболочки и появлением в цитоплазме клеток аппарата Гольджи (4), от трансзоны которого отпочковываются структуры, содержащие гранулы гликопротеидов, формирующие полярную трубку, и, по-видимому, гомологичные окаймленным пузырькам. Начало формирования и регулярной укладки витков полярной трубки и полярного якорного диска характеризует переход паразита в стадию споробласта (5). Размер молодых споробластов 5—5.4 × 2—2.3 мкм. На рисунке (6) представлены поздние споробласты — так называемые «звездчатые клетки», характерные для ультраструктурных описаний многих изученных видов микроспоридий. Деформация оболочек этих клеток и плохая сохранность внутренней структуры являются, вероятно, следствием перестроек, происходящих на ранних этапах спорогенеза в оболочке паразита (или его гибели). Мы предполагаем, что при этом ухудшается проницаемость оболочек для буферных и фиксирующих растворов, что приводит к неравномерному сжатию последней. В любом случае данная форма клеток — это артефакт метода электронно-микроскопического анализа, так как клетки подобной формы никогда не наблюдаются в световой микроскоп при просмотре нефиксированного материала.

Зрелые споры микроспоридии (7, 8) коротко-цилиндрической формы, 2.7—2.9 × 1.2—1.4 мкм. Они имеют одиночное ядро, лежащее на границе между средней и задней третями споры, тонкую (60—70 нм) изофилярную полярную трубку, образующую 11.5—12.5 витков, расположенных в один слой. Угол наклона переднего витка трубки к длинной оси составляет 55°. Поляропласт состоит из многочисленных тонких, плотно уложенных пластин (10, 12). У заднего полюса споры расположена задняя вакуоль, образованная несколькими концентрическими слоями мембран (11). Волнистая экзоспора (8, 12), толщиной около 100 нм, образована двумя слоями умеренной электронной плотности, покрытыми снаружи слоем аморфного материала. Эндоспора сравнительно тонкая и не превышает 50—70 нм (8, 9).

Реже встречаются споры овальной формы (9). Они имеют такое же строение, как и коротко-цилиндрические споры, за исключением числа витков полярной трубки, равного у них 7—9.

Цитоплазма зрелых спор заполнена спиралями рибосом (10). Изучение внутренней структуры спор данного вида выявило единство мембранных структур полярного сака, поляропласта и задней вакуоли, связанных в единую систему мембран аппарата экструзии, которая выворачивается наружу при выбросе полярной трубки (Weidner e. a., 1995) и заключает в себе ядро паразита с узкой зоной цитоплазмы (10—12). Вероятно, подобная связь характерна для всех микроспоридий, однако до сих пор она не была продемонстрирована столь наглядно. На рисунке (9) видно, что спороплазма (ядро с прилежащим тонким слоем цитоплазмы), которая будет выброшена вместе с полярной трубкой для осуществления инвазии очередного хозяина, явно отделена от остальной части споры мембраноподобными образованиями, объединяющими поляропласт и заднюю вакуоль.

Дифференциальный диагноз. К настоящему времени из жуков описаны 5 видов микроспоридий рода *Unikaryon*, характерными признаками которого явля-

Характеристика микроспоридий рода *Unikaryon* из жуков (Coleoptera)  
 Characteristics of microsporidians of the genus *Unikarion* from beetles (Coleoptera)

Вид рода <i>Unikaryon</i> , авторы	Вид и семейство жука-хозяина	Локализация паразитов	Характеристика спор
<i>U. bouixe</i> , Toguebaye, Marchand, 1983	<i>Euryope rubra</i> (Chrysomelidae)	Мальпигиевы сосуды, кишечник	Яйцевидные, 1.6—2.5 × 1.3—1.6 мкм, 3—4 витка ПТ
<i>U. euzeti</i> , Toguebaye Marchand, 1988	<i>Mylabris vestita</i> (Meloidae)	Кишечник, жировое тело, мальпигиевы сосуды, мышцы	Яйцевидные, 2.22 × 1.38 мкм, 7—9 витков ПТ
<i>U. matteii</i> , Toguebaye Marchand, 1984	<i>Nisotra</i> sp. (Chrysomelidae)	Та же	Овальные, 3.72 × 1.96 мкм, 15—12 витков ПТ
<i>U. minutum</i> , Knell, Allen, 1978	<i>Dendroctonus frontalis</i> (Scolytidae)	»	Цилиндрические, 2.3 × 0.9 мкм, 6 витков ПТ
<i>U. nisotra</i> , Toguebaye Marchand, 1989	<i>Nisotra sjoestedti</i> (Chrysomelidae)	Кишечник, жировое тело	Яйцевидные, 2.03 × 1.66 мкм, 5—6 витков ПТ
<i>U. oulemi</i> sp. n.	<i>Oulema melanopus</i> (Chrysomelidae)	Кишечник	Коротко-цилиндрические, 2.7—2.9 × 1.2—1.4 мкм, 11.5—12.5 витков ПТ

ются развитие в прямом контакте с цитоплазмой клетки хозяина, одиночные ядра у всех стадий жизненного цикла, отсутствие розетковидных споронтов и образование одиночных спор (см. таблицу).

Сравнительный анализ признаков описываемого и ранее известных видов микроспоридий показал четкие отличия микроспоридии из красногрудой пьявицы от других видов. По числу витков описываемая микроспоридия ближе всего к *U. matteii*, от которой отличается меньшими размерами и формой спор, а также значительно более тонкой эндоспорой и двухслойной толстой экзоспорой. Это дает основание рассматривать описываемую микроспоридию как новый вид.

Положение микроспоридии в системе. Род *Unikaryon* по своим основным признакам идентичен роду *Encephalitozoon*, отличаясь от него главным образом иной реакцией клетки хозяина на заражение — формированием паразитофорной вакуоли. Поэтому было предложено рассматривать этот род в качестве младшего синонима описанного ранее рода *Encephalitozoon* в сем. *Pereziidae* (Исси, 1986). Это семейство в дальнейшем было разделено на три: *Pereziidae*, *Tetramicridae* и *Encephalitozoonidae* (Voronin, 1989), с включением в последнее рода *Unikaryon* как младшего синонима. Однако в последней из систем микроспоридий (Sprague e. a., 1992) этот род отнесен к сем. *Unikaryonidae* Sprague, 1977.

Патология клетки и тканевая локализация. Цитоплазма энтероцитов, инвазированных микроспоридиями, мало изменяется до созревания спор (14). В зоне, окружающей клетку паразита, видны трубчатые структуры (9, 13, 16). Нам не удалось выявить связи данных структур с клетками паразита, однако по размерам и локализации данные структуры напоминают тубулярную сеть, выявляемую вокруг клеток других видов микроспоридий и интерпретируемую как секрет микроспоридий (Darwish e. a., 1989; Соколова, Исси, 1997). Вокруг зрелых спор образуются

незначительные в сравнении с другими видами «пустоты» (14, 16, 17), вызванные, вероятно, быстрым обезвоживанием и уменьшением размеров клетки паразита при созревании спор (Соколова и др., 1988). Значительные изменения происходят в ядрах зараженных клеток: нуклеоплазма просветляется, а хроматин концентрируется главным образом под оболочкой ядер. Сами ядра нередко оттесняются на периферию клетки (14). Часто более молодые стадии и споры, развивающиеся в непосредственной близости от ядра, образуют впячивания в его оболочке. Узкая зона цитоплазмы клетки хозяина между оболочкой ядра и прилежащей клеткой паразита становится структурированной (15), однако качество препарата и разрешение микроскопа не позволяют более детально исследовать зону контакта.

Из всех изученных органов (жировое тело, эпидермис, мальпигиевы сосуды, мышцы) зараженными оказались лишь клетки эпителия средней кишки — энтероциты. Бокаловидные клетки и гладкая мускулатура кишечника оставались свободными от микроспоридий даже при значительной зараженности кишечного эпителия (2, 17).

Эпизоотология. В годы наблюдений зараженность популяции жуков микроспоридиями была очень высокой, достигая на некоторых полях 80—95 %. На следующий год на этих участках пьявица встречалась единично. Весьма вероятно, что микроспоридии вносят существенный вклад в регуляцию численности этого вредителя зерновых, снижая жизнеспособность жуков, в частности вызывая гибель зимующих особей (Соколов, 1996).

Данная работа поддержана грантом РФФИ 96-04-48578.

#### Список литературы

- (Воронин) Voronin V. N. The ultrastructure of *Lanatospora macrocyclopi* (Protozoa, Microsporida) from the cyclope *Macrocyclops albidus* (Jur.) (Crustacea, Copepoda) // Arch. Protistenkd. 1989. Vol. 137, N 4. P. 357—366.
- Исси И. В. Микроспоридии как тип паразитических простейших // Серия «Протозология». Л., 1986. N 10. С. 6—136.
- Логинов Е. В., Соколова Ю. Я., Громов А. Я. Ускоренный способ окраски полугонких срезов тканей, залитых в аралдит // Цитология. 1987. Т. 29, N 11. С. 1314—1317.
- Соколов И. М. Красногрудая пьявица на озимой пшенице: колонизация, расселение, вредоносность: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. СПб., 1996. 24 с.
- Соколова Ю. Я., Исси И. В. О роде *Nosema* (Microspora) в связи с новыми данными по *Nosema mesnili* // Паразитология. 1997. Т. 31, вып. 4. С. 307—313.
- Соколова Ю. Я., Тимошенко С. А., Исси И. В. Морфогенез и ультратонкое строение микроспоридии *Nosema mesnili* на разных стадиях жизненного цикла // Цитология. 1988. Т. 30, N 1. С. 26—33.
- Darwish A., Weidner E., Fuxa J. *Vairimorpha necatrix* in adipose cells of *Trichoplusia ni* // J. Protozool. 1989. Vol. 36, N 3. P. 308—311.
- Knell J. D., Allen G. E. Morphology and ultrastructure of *Unikaryon minutum* sp. n. (Microsporida: Protozoa), a parasite of the southern pine beetle, *Dendrolimus frontalis* // Acta Protozoologica. 1978. Vol. 17, N 2. P. 271—278.
- Sprague V., Becnel J. J., Hazard E. I. Taxonomy of phylum Microspora // Critical Reviews in Microbiology. 1992. Vol. 18, N 5/6. P. 285—395.
- Toguebaye B. S., Marchand B. Developpment d'une microsporidie du genre *Unikaryon* Canning, Lai et Lie, 1974 chez un coleoptere *Chrysomelidae*, *Euryope rubra* (Latreille, 1807): etude ultrastructurale // Protistologica, 1983. Vol. 19, N 3. P. 371—383.
- Toguebaye B. S., Marchand B. Etude ultrastructurale de *Unikaryon matteii* n. sp. (Microsporida, Unikaryonidae), parasite de *Nisotra* sp. (Coleoptera, Chryso-

- melidae) et remarques sur la validite de certaines Nosema d'insectes // J. Protozool. 1984. Vol. 31, N 3. P. 339—346.
- Toguebaye B. S., Marchand B. Cytologie et taxonomie d'une microsporidie du genre Unikaryon (Microspora, Unikaryonidae), parasite du Mylabris vestita (Coleoptera, Meloidae) // Canad. J. Zool. 1988. Vol. 66, N 3. P. 364—367.
- Toguebaye B. S., Marchand B. Etude en microscopie electronique des stades de developpement, d'Unikaryon nisotrae n. sp. (Microspora, Unikaryonidae) parasite de Nisotra sjoestedti (Jacoby, 1903) (Coleopora, Chrysomelidae) // Revue Zool. Afr. — J. Afr. Zool. 1989. Vol. 103, N 3. P. 303—309.
- Weidner E., Manale S. B., Halonen S. K., Lynn J. W. Protein-membrane interaction is essential to normal assembly of the Microsporidian spore invasion tube // Biol. Bull. 1995. N 188. P. 128—135.

ВИЗР, Санкт-Петербург, 189620;  
 Всероссийский НИИ с.-х. микробиологии,  
 Санкт-Петербург—Пушкин 189620

Поступила 31.12.1996

## MICROSPORIDIOSIS OF THE CEREAL LEAF BEETLE OULEMA MELANOPUS (COLEOPTERA)

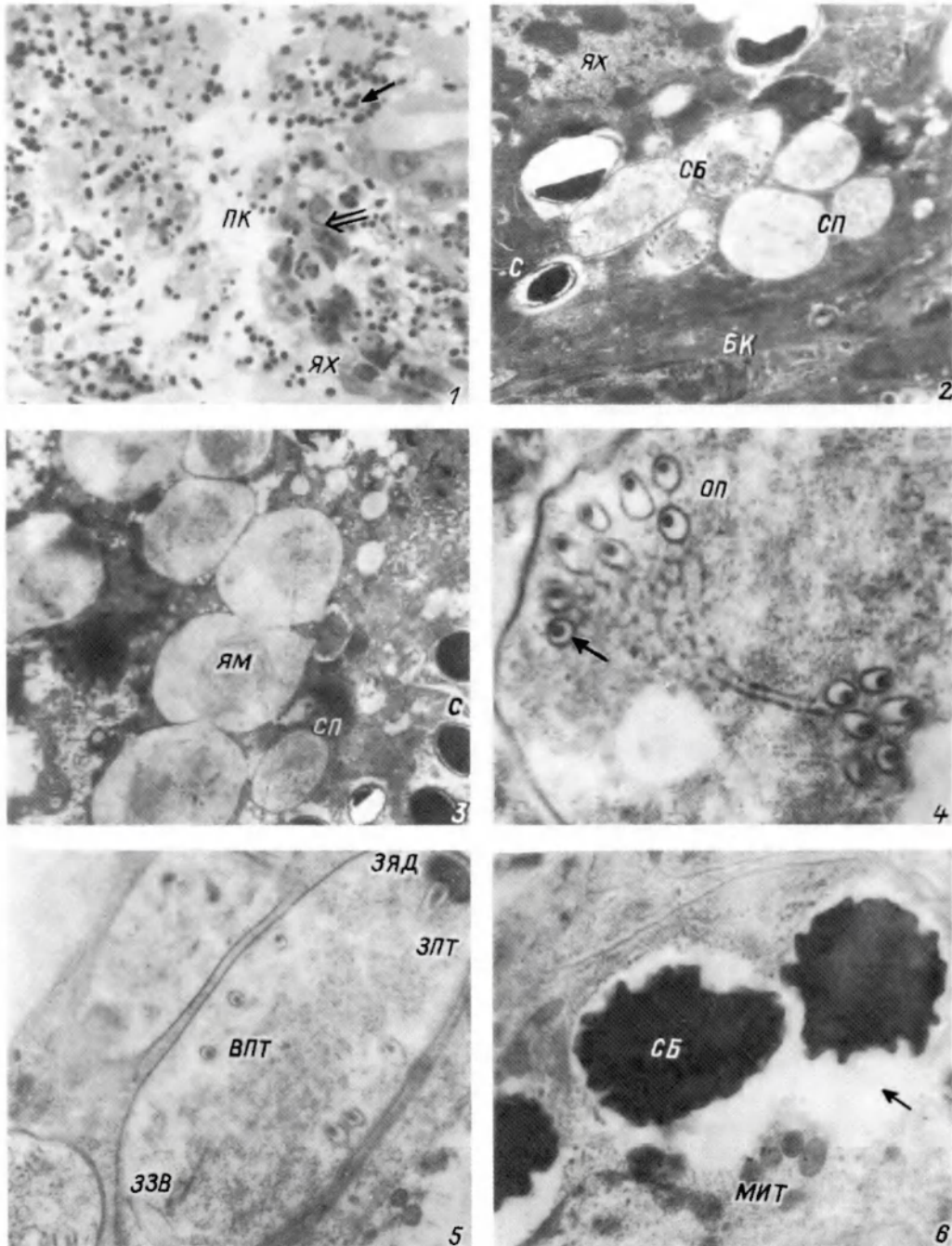
I. V. Issi, S. V. Krylova, E. V. Morzhina, Yu. Ya. Sokolova

*Key words:* microsporidiosis, *Unikarion oulemi* sp. n., *Oulema melanopus*.

### SUMMARY

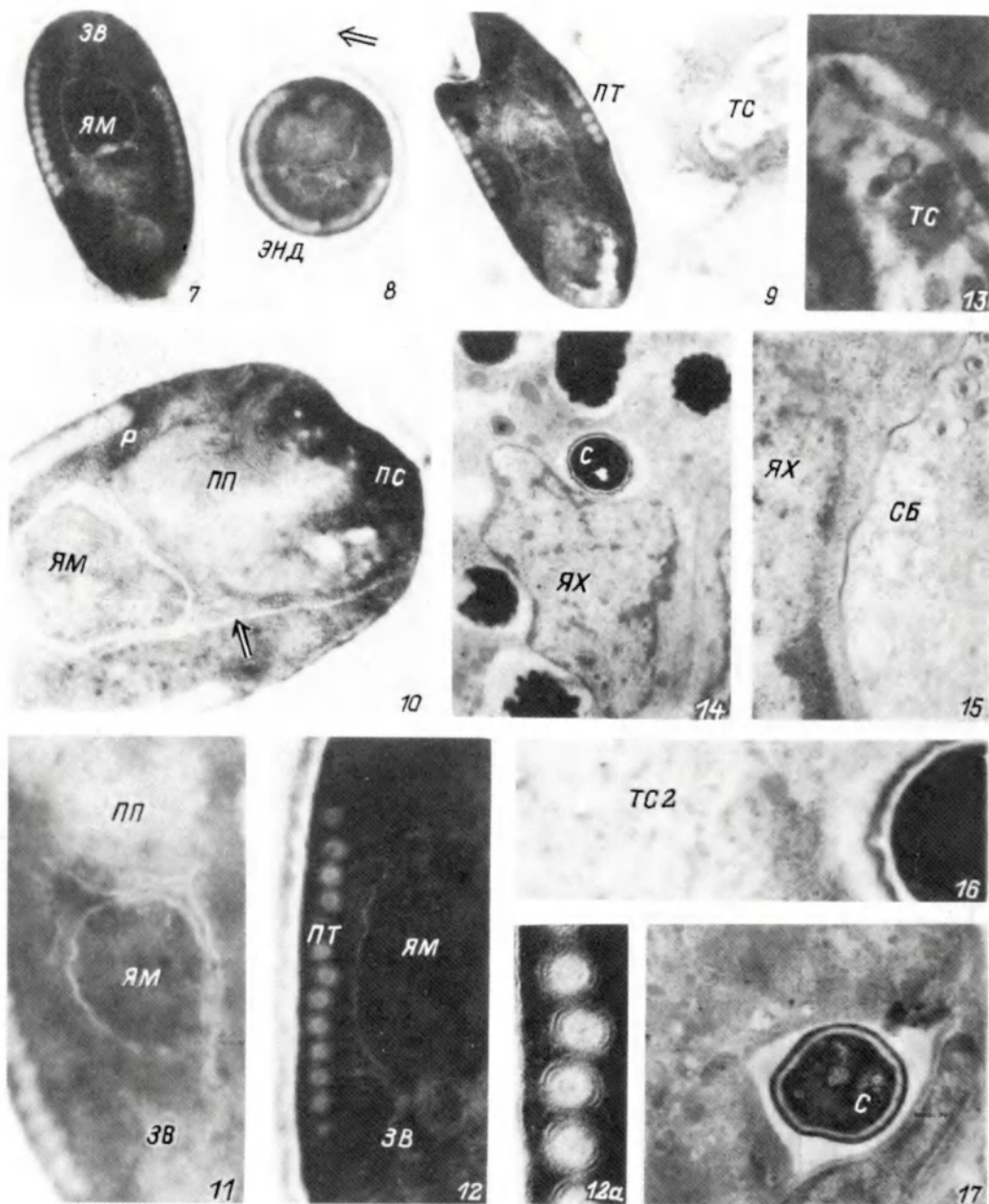
The life cycle of a microsporidian from the midgut of imagoes of *Oulema melanopus* has been studied in light and electron microscopes. On the basis of ultrastructural peculiarities of spores, host specificity and tissue location this microsporidian is described as a new species *Unikaryon oulemi* sp. n. Spores of this microsporidian measured  $2.7\text{--}2.9 \times 1.2\text{--}1.4 \mu\text{m}$  on ultrathin sections, are short-cylindrical. They possess one nucleus and a polar filament forming 11.5—12.5 coils arranged in one row. The line connecting the anterior polar filament rows is tilted 55 degrees to the longest spore axis. Polaroplast is composed of thin lamellae. Posterior vacuole seems to be formed of concentric membranelike layers. Exospore is c. 100 nm, endospore is 50—70nm thick. The spores of oval shape with less number of polar filament coils can be also rarely met. Both types of spores have the same internal structure except the number of coils. The linkage between of the membrane-like structures of polar sac, polaroplast and posterior vacuole are obviously seen on cross sections of the spores.

Membranes of these organelles isolate the spore nucleus from the rest of the spore. All intracellular stages — meronts, sporonts and sporoblasts, possess a single nucleus and develop without a parasitophorous vacuole. Tubular structures of two types (50—60nm and 30—40nm in diameter) are visible around intracellular stages of microsporidians in the host cell cytoplasm. The comparative analysis of the species of the genus *Unikarion* from Coleoptera is given. In the Krasnodar region the extensivity of infection of the field populations of cereal leaf beetles with *Unikaryon oulemi* varied in different years from 1—2 to 80—95%, that might indicate to the participation of microsporidians in natural control of this pest.



Стадия развития микроспоридии *Unikaryon oulemi* sp. n. и патология клетки хозяина.

1 — клетки эпителия средней кишки жуков краснорудой пиявцы, инвазированные микроспоридиями (полутонкий срез); споры (одинарные стрелки) и стадии меро- и спорогонии (двойные стрелки); ПК — просвет кишечника; ЯХ — ядра клеток хозяина. 1800 X; 2 — ультратонкий срез через энтероцит, зараженный микроспоридиями; споронты (СП), споробласты (СБ) и споры (С) микроспоридий лежат в непосредственном контакте с клеткой хозяина; БК — бокаловидная клетка кишечника, ЯМ — ядро паразита, 7 000 X; 3 — цепочка из 6 поздних меронтов (М), каждый из которых содержит по одному



Продолжение рисунка.

ядру (ЯМ); 5 100 X; 4 — срез через ранний споробласт, аппарат Гольджи. В отпочковавшихся от секреторных (транс) цистерн окаймленных пузырьках (ОП) локализованы гранулы гликопротеида, формирующие сердцевину полярной трубки (стрелки), 33 750 X; 5 — срез через споробласт; зачатки полярного якорного диска (ЗЯД), базальной части полярной трубки (ЗПТ), задней вакуоли (ЗЗВ) уже заняли свои места. Витки полярной трубки (ВПТ) сформированы лишь частично, 24 000 X; 6 — «звездчатые клетки» — поздние споробласты с характерной для этой стадии сильной деформацией клетки; электронно-прозрачные участки — «пустоты» — вокруг споробластов (стрелки), Мит — митохондрии клетки хозяина, 14 700 X.

Остальные обозначения такие же, как на 2.

7, 8 — продольный и поперечный срезы коротко-цилиндрических спор, ЗВ — задняя вакуоль, ЭНД — эндоспора, экзоспора указана стрелкой, 18 900 X.

Остальные обозначения такие же, как на 3.

9 — продольный срез овальной споры; полярoplast и задняя вакуоль соединены мембраноподобной структурой, *ПТ* — полярная трубка, *ТС* — тубулярные структуры диаметром 50—60 нм, заполняющие электроннопрозрачные участки цитоплазмы вблизи спор и стадий развития микроспоридий, 20 000 X; 10 — тангенциальный срез переднего участка споры со сформированным пластинчатым полярoplastом (*ПП*) и спиральями рибосом (*Р*) в цитоплазме, окружающей ядро; мембраноподобная структура (стрелка) соединяет полярный сак (*ПС*) и оболочку ядра споры, 37 000 X.

Остальные обозначения такие же, как на 3.

11 — тангенциальный срез споры; полярoplast и задняя вакуоль объединены в единую мембранную систему (стрелка); скопления мембран в районе задней вакуоли, 39 400;

Остальные обозначения такие же, как на 3.

12 — строение оболочки споры, состоящей из плазмалеммы электронно-прозрачной эндоспоры и электронноплотной экзоспоры; оболочка споры соединена с задней вакуолью и образует «миелиновую структуру» у заднего полюса ядра, 48 300 X.

Остальные обозначения такие же, как на 3, 7, 9.

12a — увеличенный фрагмент 12 — поперечный срез полярной трубки, 90 000 X; 13 — фрагмент 9 при большем увеличении — тубулярные структуры диаметром 50—60 нм в цитоплазме, окружающей стадии развития и споры паразита, 42 000 X.

Обозначения такие же, как на 9.

14 — энтероцит, инвазированный микроспоридиями; хроматин ядер конденсируется на оболочках; оболочки ядер деформированы развивающимися микроспоридиями, 7 100 X.

Остальные обозначения такие же, как на 1, 2.

15 — зона контакта между ядром клетки хозяина и споробластом, 40 000 X.

Остальные обозначения такие же, как на 1, 2.

16 — цитоплазма инвазированной клетки хозяина, содержащая тубулярные структуры (*ТС2*) меньшего диаметра (по сравнению с показанными на 9), 30 000 X; 17 — срез через кишечник, интенсивно зараженный микроспоридиями; гладкая мускулатура остается сводобной от паразитов 13 125 X.

Обозначения такие же, как на 2.

Development of microsporidia *Unikaryon oulemi* sp. n. and pathology of host cells.