

УДК 576.895.771

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЕСТЕСТВЕННЫХ ПАРАЗИТОВ – ГРИБОВ
И МИКРОСПОРИДИЙ – В ПОПУЛЯЦИИ ЛИЧИНОК
МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ (DIPTERA: CULICIDAE) ДО И ПОСЛЕ
ИНФИЦИРОВАНИЯ ЭНТОМОПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИЕЙ
BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENسيس

© В. А. Бурлак, Т. Ф. Панкова

Исследовали специфичность распределения микроспоридий и паразитических грибов у личинок малярийных комаров 4-го возраста *Anopheles messeae* Fall. с разными инверсионными генотипами и *An. beklemishevi* Stegny et Kab. из природной популяции. Паразитический гриб неизбирательно поражал особей обоих видов и всех инверсионных генотипов, имеющих в данной популяции *An. messeae*. Микроспоридия *Parathelohania messeae* поражала в основном самцов обоих видов, но избирательности в отношении инверсионных генотипов также не демонстрировала. Инфицирование энтомопатогенной бактерией *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) личинок 4-го возраста *An. messeae* и *An. beklemishevi* приводило к гибели особей, пораженных паразитическим грибом. Процент зараженности микроспоридией *P. messeae* после обработки *Bti* снизился от 1.1 ± 0.5 до 0.5 ± 0.3 % у *An. messeae* и от 1.3 ± 1.3 до 0.7 ± 0.5 % – у *An. beklemishevi*. *An. beklemishevi* впервые отмечен как хозяин *P. messeae*. Обработки *Bti* могут нарушить сбалансированность естественных отношений между малярийными комарами и их паразитами в природных популяциях.

Для природных экосистем характерна сбалансированность отношений между паразитом и хозяином. Паразиты выступают в роли фактора, регулирующего численность хозяина и стабилизирующего видовой состав экосистемы (Беклемишев, 1956; Воронин, 1991).

У малярийных комаров Западной Сибири отмечен ряд паразитов – микроспоридий и грибов (Кальвиш, Кухарчук, 1974; Лужкова и др., 1988). Однако при этом не всегда известна специфичность конкретного паразита по отношению к одному из двух видов хозяев – *Anopheles messeae* Fall. 1926 и *An. beklemishevi* Stegny et Kab. 1976, личинки которых часто развиваются в одних и тех же водоемах. Это связано с трудностями идентификации этих двух видов. Наиболее надежным методом определения малярийных комаров является анализ политенных хромосом, который и применяли в настоящем исследовании. Особенности распределения микроспоридий в популяциях *An. messeae* с разными инверсионными генотипами также до настоящего момента не изучались.

Энтомопатогенная бактерия *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) известна как один из наиболее перспективных регуляторов численности комаров на личиночной фазе развития. Однако сведения о влиянии обработок *Bti* на сохранение естественных паразитов в личинках до сих пор крайне немногочисленны. В настоящем исследовании изучали специфичность поражения грибом и микро-

споридией личинок малярийных комаров двух видов, а также влияние инфицирования *Bti* на сохранение этих паразитов в природной популяции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалами к настоящему сообщению послужили выборки личинок 4-го возраста из популяции пос. Тегульдет (Томская обл.), а также эксперименты, проведенные в 1990 г. на особях этой популяции. Личинок фиксировали спирту-уксусной смесью (3 : 1). Препараты политенных хромосом готовили по лактоацеторсеиновому методу. В качестве маркеров использовали хромосомные последовательности *An. messeae* XL₁, XL₂, 3R₀, 3R₁, 3L₀ и 3L₁ (Стегний, 1991). Присутствие паразитов определяли, растирая брюшко фиксированных личинок, на окрашенных по Гимза–Романовскому или лактоацеторсеином препаратах под световым микроскопом. Часть личинок была зафиксирована в 40 %-ном глицерине. Этих личинок высевали на среду Чапека для определения видовой принадлежности грибов. Обработку личинок в биотестах проводили клоном Р (7) *Bti* из коллекции ИСиЭЖ. Исходную суспензию (концентрация *Bti* составила 3.7 мг/мл) готовили по методу, описанному ранее (Бурлак, Сибатаев, 1995). Инфицирование личинок малярийных комаров проводили в пластиковых кюветах 22 × 10 см². Концентрация патогена при инфицировании составила 0.02 мкл исходной суспензии *Bti* на 1 мл воды для старших личинок и 0.01 мкл/мл – для младших. Всего обследовано свыше 2 тыс. особей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Личинки 4-го возраста *An. messeae* и *An. beklemishevi* в контроле оказались заражены спорами паразитического гриба, таксономическую принадлежность которого окончательно установить не удалось. В последующие годы (1991–1995) присутствия этого гриба в популяции отмечено не было. При высевах фиксированных в 40 %-ном глицерине личинок на среде Чапека часть проб не прорастала, часть – давала в результате посевов грибы *Trichoderma* sp. и *Penicillium* sp. Симптомами заболевания у личинок обычно были почернение брюшка личинки в районе дыхальца и покраснение покровов. Очаги поражения *Penicillium* sp. локализовались на слюнных железах личинок.

Таблица 1

Зараженность паразитическим грибом личинок 4-го возраста *An. messeae* в контроле и после обработки *Bti*

Table 1. Invasion by parasitic fungus of 4-th instar larvae *An. messeae* in control and after *Bti* treatment

	Число личинок, n	Концентрация <i>Bti</i> , мкл/мл	Смертность, M ± Sm, %	Оуклилось, M ± Sm, %	Заражено грибом, M ± Sm, %
Контроль	100	–	1.0 ± 1	26 ± 4.4	38.5 ± 6
Опыт	200	0.02	41.0 ± 3.5	8.0 ± 1.9	–

Таблица 2

Хромосомный состав зараженных и не зараженных грибами личинок *An. messeae* в контроле и после обработки *Bti*

Table 2. Chromosomal composition of infected and noninfected larvae of *An. messeae* in control and after *Bti* treatment

Вариант хромосомы	Частота хромосом, $f \pm sf$, %		
	контроль		опыт n 84
	зараженные n 25	незараженные n 40	
Самцы			
XL ₁	28 ± 9	20 ± 6.3	36.9 ± 5.3
XL ₂	—	7.5 ± 4.2	9.5 ± 3.2
Самки			
XL ₁₁	44 ± 9.9	50 ± 7.9	31 ± 5
XL ₁₂	28 ± 9	22.5 ± 6.6	22.6 ± 4.6
Аутосомы			
3R ₀₀	24 ± 8.5	25 ± 6.8	23.8 ± 4.6
3R ₀₁	52 ± 10	55 ± 7.7	53.6 ± 5.4
3R ₁₁	24 ± 8.5	20 ± 6.3	22.6 ± 4.6
3L ₀₀	72 ± 9	77.5 ± 6.6	84.5 ± 3.9
3L ₀₁	20 ± 8	22.5 ± 6.6	13.1 ± 3.7
3L ₁₁	8 ± 5.4	—	2.4 ± 1.7

Таблица 3

Распределение микроспоридий по видам личинок малярийных комаров в контроле и после обработки *Bti*

Table 3. Distribution of microsporidia in species of anofelines larvae in control and after *Bti* treatment

Вид	Число личинок	Количество генотипов	Процент инвазии	Доля самцов, %
<i>An. messeae</i>				
контроль	13	12	1.1 ± 0.5	84.6 ± 10
опыт	3	1	0.5 ± 0.3	100
<i>An. beklemishevi</i>				
контроль	4	1	1.3 ± 1.3	100
опыт	2	1	0.7 ± 0.5	100

Таблица 4

Хромосомный состав зараженных и не зараженных микроспоридиями личинок *An. messeae* в контроле и после инфицирования *Bti*

Table 4. Chromosomal composition of infected and noninfected by microsporidia of *An. messeae* larvae in control and after *Bti* treatment

Вариант хромосомы	Частота хромосом, $f \pm sf$, %			
	контроль		опыт	
	незараженные n 439	зараженные n 13	незараженные n 654	зараженные n 3
Самцы				
XL ₁	31.4 ± 2.2	53.8 ± 13.8	37.5 ± 1.9	100
XL ₂	7.7 ± 1.3	30.8 ± 12.8	6 ± 0.9	
Самки				
XL ₁₁	38.3 ± 2.3	7.7 ± 7.4	37.8 ± 1.9	
XL ₁₂	20.7 ± 1.9	7.7 ± 7.4	16.2 ± 1.4	
XL ₂₂	1.6 ± 0.6		0.6 ± 0.3	
Аутосомы				
3R ₀₀	24.4 ± 2	23.1 ± 11.7	27.4 ± 1.7	
3R ₀₁	54.4 ± 2.4	46.2 ± 13.8	49.2 ± 2	100
3R ₁₁	21.2 ± 2	30.8 ± 12.8	21.9 ± 1.6	
3L ₀₀	80.6 ± 1.9	69.2 ± 12.8	79.4 ± 1.6	100
3L ₀₁	18 ± 1.8	30.8 ± 12.8	19.3 ± 1.5	
3L ₁₁	1.4 ± 0.6		1.4 ± 0.5	

Гриб, поразивший личинок, не имел специфичности действия ни в видовом, ни в генотипическом отношении: споры отмечены у личинок малярийных комаров обоих видов, а также у особей *An. messeae* с разными инверсионными генотипами, которые присутствовали в этой популяции. Можно отметить тенденцию к поражению грибом особей с генотипом 3L₁₁. У личинок, выживших после инфицирования энтомопатогенной бактерией *Bti*, споры гриба не обнаруживались. Самцы *An. messeae* в этой популяции оказались более устойчивыми к *Bti*, чем самки этого вида (значение „хи-квадрат” составило $\chi^2 = 4.68$, число степеней свободы $df = 1$, $p < 0.05$). Изменения в частотах аутосом после обработки *Bti* не были обнаружены, хотя имелась тенденция к возрастанию частоты генотипа 3L₀₀ (табл. 1, 2).

Во взятых выборках обнаружено 2 вида микроспоридий: *Issia globulifera* Issi et Pankova, 1983 и *Parathelohania messeae* (Исси, Панкова, 1983; Лужкова и др., 1988). *I. globulifera* была найдена лишь у двух особей – самца и самки *An. messeae*. *P. messeae* поражала в основном самцов обоих видов малярийных комаров (для *An. messeae* $\chi^2 = 8.9$, $df = 1$, $p < 0.01$). Распределение *P. messeae* среди самцов *An. messeae* с разными инверсионными генотипами также не было специфичным. После инфицирования *Bti* личинок двух видов малярийных комаров частота

инвазированных микроспоридией особей снизилась незначимо. При этом выжили лишь пораженные микроспоридией *P. messeae* самцы *An. beklemishevi* и *An. messeae* с генотипом XL₁2R₁₁3R₀₁3L₀₀ (табл. 3, 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Инфицированные паразитическим грибом личинки малярийных комаров оказались менее устойчивыми к *Bti*, чем незараженные. Это позволяет предположить, что обработка *Bti* создает угрозу элиминации этого гриба из популяций малярийных комаров и нарушения их естественных взаимоотношений. Возможно, это также окажется характерным для других грибов, паразитирующих в личинках комаров. При этом наибольшей угрозе подвергаются виды грибов, имеющие узкий спектр хозяев, в то время как виды с широким спектром хозяев могут иметь запасные резервуары в виде организмов, относящихся к другим таксонам. Элиминация естественных паразитов (шире – симбионтов) из популяций малярийных комаров может создать неблагоприятную в эпидемиологическом отношении обстановку, обусловив как вспышки численности комаров, так и вспышки заболеваний (в том числе малярии) у человека.

Неизбирательное инфицирование личинок *An. messeae* с разными инверсионными генотипами могло быть следствием как способа заражения личинок грибом, так и результатом длительной коадаптации паразита и хозяина. Такое распределение инвазии в популяции могло оказаться также следствием стратегии взаимоотношения хозяина и паразита, являющегося „медленным” патогеном, в отличие от „быстрого” патогена *Bti* (Фуха, 1987). Действие *Bti* на личинок *An. messeae* из этой популяции привело к снижению доли генотипов с инверсией XL₂ (Гордеев, Бурлак, 1992).

Неизбирательность распределения гриба не является свидетельством отсутствия влияния паразита на генетический гомеостаз популяции хозяина. Оно может сказаться, например, на сексуальном поведении имаго и привести к нарушению систем спаривания (Thompson, 1987; Lucarotti, Klein, 1988; Воронин, 1991).

Микроспоридии имеют сходную с грибами стратегию взаимодействия с хозяином (Фуха, 1987; Дьяков, 1992). Они так же, как и грибы, не имели избирательности в поражении особей с каким-либо определенным инверсионным генотипом в данной ситуации. Преимущественное поражение микроспоридиями рода *Parathelohani* самцов личинок комаров ранее неоднократно отмечалось (Лужкова и др., 1988).

К настоящему времени у малярийных комаров Западной Сибири отмечено 4 вида микроспоридий: *I. globulifera*, *P. messeae*, *P. illinoisensis* var. *messeae* и *Hialinocysta anophelis* (Исси, Панкова, 1983; Лужкова и др., 1988; Панкова и др., 1991). Трудности идентификации малярийных комаров привели к тому, что все 4 вида считаются паразитами *An. messeae*. Результаты нашего исследования показывают, что хозяином *P. messeae* также является и недавно описанный вид *An. beklemishevi* (Стегний, Кабанова, 1976). Необходимо подчеркнуть, что таксономический статус *P. messeae* требует уточнения с применением методов электронной микроскопии, применение которых сейчас обязательно (Исси, 1986).

Микроспоридия *I. globulifera* встретилась только у личинок *An. messeae*. В настоящее время мы не можем сделать окончательный вывод о специфичности распределения этой микроспоридии как в отношении видов и полов одного вида, так и в отношении инверсионных генотипов.

После инфицирования личинок энтомопатогенной бактерией *Bti* мы обнаружили у выживших зараженных микроспоридией самцов *An. messeae* только один

инверсионный генотип $XL_{12}R_{11}3R_{01}3L_{00}$. Ранее сообщалось, что микроспоридии снижают чувствительность хозяина к *B. thuringiensis* на ранних стадиях своего развития (Исси, Онацкий, 1984). Этим они отличались от грибов, паразитирующих у личинок. Наши результаты также показывают, что чувствительность хозяина связана и с его генотипом.

Следует отметить, что работ, посвященных генотипической приуроченности микроспоридий, не так много, хотя, по-видимому, эти знания важны как в теоретическом, так и в практическом отношении. Можно отметить исследования на уровне ферментных систем насекомых (Долгих и др., 1995). Полученные в подобных исследованиях данные проливают свет на процессы, протекающие в организме хозяина при микроспоридиозах. Ситуация с инверсионным полиморфизмом несколько иная. Инверсионный полиморфизм имеет адаптивную природу (Стегний, 1991). Поэтому, анализируя распределение микроспоридий в популяциях малярийных комаров, необходимо учитывать, каким способом происходило заражение паразитами – трансвариальным или пероральным. Только во втором случае можно реально говорить о чувствительности особей с тем или иным генотипом к микроспоридиям.

Снижение зараженности личинок малярийных комаров следует отнести к неблагоприятным последствиям действия *Vti*, поскольку *P. messeae* не передается алиментарным путем (Панкова, 1985). Поэтому недостижение зрелости микроспоридии не смогут продолжить свой жизненный цикл и постепенно элиминируются из популяции. Другим способом передачи микроспоридий является трансвариальный (Лужкова и др., 1988). Однако микроспоридии в самках завершают свой цикл развития перед откладкой яиц, а на стадии личинки обнаруживаются с трудом. Поэтому мы можем лишь предположить, что зараженные личинки самок получают некоторое преимущество в условиях инфицирования *Vti*.

Авторы выражают признательность Т. К. Кальвиш за определение таксономического статуса паразитических грибов.

Работа финансировалась грантом INTAS-93-22 и РФФИ 96-0.4-50264.

Список литературы

- Беклемишев В. Н. Возбудители болезней как члены биоценозов // Биоценологические основы сравнительной паразитологии. М., 1970 (1956). С. 334–352.
- Бурлак В. А., Сибатаев А. К. Абсолютная и относительная чувствительность личинок двух видов малярийных комаров из природных популяций к *Bacillus thuringiensis israelensis* и *Bacillus thuringiensis fukuokaensis* // Сиб. эколог. журн. 1995. Т. 2, № 5. С. 448–456.
- Воронин В. Н. Роль паразитов в регуляции популяций водных беспозвоночных // Паразитология. 1991. Т. 25, вып. 2. С. 89–98.
- Гордеев М. И., Бурлак В. А. Инверсионный полиморфизм малярийного комара *Anopheles messeae*. Сообщ. XI. Групповой эффект при инфицировании личинок бактерией *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* // Генетика. 1992. Т. 28, № 7. С. 82–88.
- Долгих В. В., Григорьев М. В., Соколов Ю. Я., Исси И. В. Влияние заражения микроспоридией *Nosema grylli* и кокцидией *Adelina sp.* на активность и состав изоферментов лактатдегидрогеназы в жировом теле сверчков *Gryllus bimaculatus* // Паразитология. 1995. Т. 29, вып. 6. С. 520–524.

- Дьяков Ю. Т. Жизненные стратегии фитопатогенных грибов и их эволюция // Микология и фитопатология. 1992. Т. 26, вып. 4. С. 309–317.
- Исси И. В. Микроспоридии как тип паразитических простейших. Микроспоридии // Паразитология. Вып. 10. Л.: Наука, 1986. С. 6–136.
- Исси И. В., Онацкий Н. М. Особенности взаимоотношений микроспоридий и насекомых на ранних этапах заболевания // Паразито-хозяйственные отношения. Л., 1984. С. 102–113 (Паразитология. Вып. 9).
- Исси И. В., Панкова Т. Ф. Новый вид микроспоридий *Issia globulifera* sp. n. из малярийного комара *Anopheles maculipennis* // Паразитология. 1983. Т. 17, № 3. С. 189–194.
- Кальвиш Т. К., Кухарчук Л. П. Патогенная микрофлора кровососущих насекомых Западной Сибири и Дальнего Востока // Мед. паразитол. 1974. Т. 43. С. 57–64.
- Лужкова А. Г., Вечер Л. Ф., Мертвцова О. А., Панкова Т. Ф., Фоминых В. Г., Франц Т. Г. Естественные враги гнуса бассейна Средней Оби. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988. 125 с.
- Панкова Т. Ф. Экспериментальное изучение передачи микроспоридий кровососущих комаров юга Западной Сибири // Паразитология. 1985. Т. 19. С. 296–300.
- Панкова Т. Ф., Исси И. В., Крылова С. В. Микроспоридия *Parathelohania illinoisensis* var. *messeae* (Amblyosporidae) из личинок *Anopheles messeae* в Томской области // Паразитология. 1991. Т. 25. С. 258–264.
- Стегний В. Н. Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров. Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1991. 136 с.
- Стегний В. Н., Кабанова В. М. Цитозкологическое изучение природных популяций малярийного комара на территории СССР. I. Выделение нового вида *Anopheles* в комплексе *maculipennis* методом цитодиагностики // Мед. паразитол. 1976. Т. 14, вып. 2. С. 192–196.
- Фука J. R. Ecological considerations for the use of entomopathogenes in IPM // Annu. Rev. Entomol. 1987. Vol. 32. P. 225–251.
- Lucarotti C. F., Klein M. B. Pathology of *Coelomomyces stegomyiae* in adult *Aedes aegypti* ovaries // Can. J. Bot. 1988. Vol. 66. P. 877–884.
- Thompson J. N. Symbiont-induced speciation // Biol. J. Linn. Soc. 1987. Vol. 32, N 4. P. 385–393.

Институт систематики и экологии животных СО РАН,
Новосибирск, 630091;
Томский государственный университет,
Томск, 634050

Поступила 17.07.1996

DISTRIBUTION OF NATURAL PARASITES – FUNGI AND MICROSPORIDIES –
IN THE MALARIA MOSQUITOES LARVAE POPULATION (DIPTERA: CULICIDAE)
BEFORE AND AFTER TREATMENT BY ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA
BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENSIS

V. A. Burlak and T. F. Pancova

Key words: malaria mosquitoes, microsporidia, fungi, *Bacillus thuringiensis israelensis*, nature population.

SUMMARY

The distribution specificity of fungi and microsporidies in natural population of *Anopheles messeae* Fall. and *A. beklemishevi* Stegny et Kab. and those which survived after treatment them by *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) were observed. Parasitic fungus nonselectively affected individuals of both species and all inversion genotypes of *A. messeae*. Microsporidia *Parathelohania messeae* affected males and it has not species and genotypic specificity. The 4-th instar larvae of both species infected by parasitic fungus after treatment them by *Bti* did not survive. The level of microsporidian infection of *A. messeae* and *A. beklemishevi* after *Bti* treatment was reduced from 1.1 ± 0.5 to 0.5 ± 0.3 % and from 1.3 ± 1.3 to 0.7 ± 0.5 % accordingly. *A. beklemishevi* was registered as *Parathelohania messeae* host for the first time. The harmonious relationships between malaria mosquitoes and their parasites in natural populations may be destructed by the *Bti* treatments.
