

УДК 576.893

МОЖНО ЛИ НАЗЫВАТЬ СПОРУ МИКРОСПОРИДИЙ ПОКОЯЩЕЙСЯ СТАДИЕЙ?

© И. В. Исси, В. В. Долгих, Ю. С. Токарев

Всероссийский НИИ защиты растений
Санкт-Петербург—Пушкин, 196608,
шоссе Подбельского, д. 3
E-mail: jumacro@yahoo.com
Поступила 15.06.2011

Споры бактерий, грибов, микроспоридий и других протистов традиционно рассматриваются как покоящиеся стадии, приспособленные к длительному переживанию во внешней среде и активации (у паразитических форм) при заражении нового хозяина. Однако в процессе работы на популяционном, организменном, клеточном и молекулярном уровнях с энтомопатогенными микроспоридиями у нас сложилось представление о спорах как о весьма активной стадии развития, весь потенциал которой направлен на быстрое и успешное заражение нового хозяина при контакте с ним. В работе обобщены оригинальные данные, демонстрирующие: 1) необходимость быстрой активации споры микроспоридий при контакте с хозяином, 2) бесперспективность длительного сохранения жизнеспособности спорами многих микроспоридий после выхода из организма хозяина и попадания в окружающую среду, 3) специфичное накопление метаболитических ферментов в «спящих» спорах, но не в активно пролиферирующих деспоровых стадиях развития. На основании этих данных делается вывод о том, что максимальное снижение сроков пребывания паразитов вне организма своих хозяев достигается путем повышения вероятности заражения нового хозяина в предельно короткое время за счет использования разнообразных способов передачи инфекционного начала от особи к особи, накопления максимально возможного количества инфекционных спор и быстрой мобилизацией аппарата экстрезии споры.

Ключевые слова: микроспоридии, споры покоя, споры размножения, экстрезия.

Жизненные циклы микроспоридий отличаются большим разнообразием, но при всем этом неизменными составляющими циклов любого типа являются пролиферативные стадии, развивающиеся внутриклеточно, и споры, покидающие клетку и организм хозяина. Наиболее полное изучение жизненных циклов от споры до споры стало возможным для микроспоридий, содержащихся в лабораторных культурах насекомых. Значительно хуже обстоит дело с изучением природного материала. При этом наименее изученным отрезком жизненного цикла микроспоридий остается период от выхода спор из организма одного хозяина до их попадания в

другую восприимчивую особь. В частности, сроки сохранения спорами микроспоридий способности заражать новых хозяев при встрече с ними в природном биотопе практически неизвестны в отношении абсолютного большинства видов. Следует отметить, что этот отрезок жизненного цикла плохо воспроизводится и в лабораторных экспериментах.

Другим интересным моментом в изучении циклов развития микроспоридий можно считать то, что у исследователей не сложилось четкого представления о наличии (или отсутствии) покоящихся стадий у этой группы паразитов. По аналогии с другими организмами состояние покоя микроспоридий ассоциируется с их спорами (Gill et al., 2010). Это единственная стадия в развитии этих паразитов, когда прекращены их обменные процессы с клеткой хозяина, зародыш облачен в толстую прочную оболочку, благодаря чему способен какое-то время просуществовать вне организма животного-хозяина. Соответственно возникает аналогия прежде всего со спорами покоя бактерий, а также некоторых протистов (Apicomplexa) и грибов (Zygomycota), обладающих толстой оболочкой и способных к анабиозу, что позволяет им длительно переносить неблагоприятные условия. Кроме спор существуют и другие формы, обладающие толстой сложной устроенной оболочкой, которые также служат для переживания неблагоприятных условий в состоянии анабиоза — цисты покоя бактерий и протистов. Однако, по нашему мнению, прямая аналогия между структурами с толстой и прочной оболочкой, образующимися у разных организмов в состоянии покоя, и спорами микроспоридий, не вполне корректна. В процессе работы с микроспоридиями, паразитирующими у массовых видов насекомых, у нас сложилось представление о спорах как о весьма активной стадии развития микроспоридий, весь потенциал которой направлен на быстрое и успешное заражение нового хозяина при контакте с ним. В настоящей работе обобщены материалы, свидетельствующие в пользу этой точки зрения.

Заражение новых хозяев паразитами различных систематических групп осуществляется с использованием одной из двух стратегий: активного поиска или пассивного нахождения в среде, где наиболее вероятна встреча с особью хозяина. В случае реализации второй стратегии повышение вероятности заражения достигается за счет увеличения либо количества инфекционных (инвазионных) стадий паразита, либо срока нахождения во внешней среде (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003). Споры микроспоридий не обладают способностью к активному движению и поиску хозяина и «обречены» исключительно на пассивное нахождение в окружающей среде. Однако означает ли стратегия пассивного ожидания хозяина состояние покоя паразита? В результате многолетних наблюдений за проявлениями микроспоридиозов и течением вызванных микроспоридиями эпизоотий в природных популяциях насекомых, а также на основе биохимических исследований, мы пришли к выводу, что существующие представления о спорах микроспоридий, как о покоящихся стадиях в реализации жизненного цикла этих паразитов, не соответствуют действительности.

К настоящему времени накопилось немало данных, говорящих, с одной стороны, об активном состоянии спор микроспоридий в период от выхода их из организма одного хозяина до встречи с новым хозяином, а с другой — о бесперспективности, тупиковом характере для большинства мик-

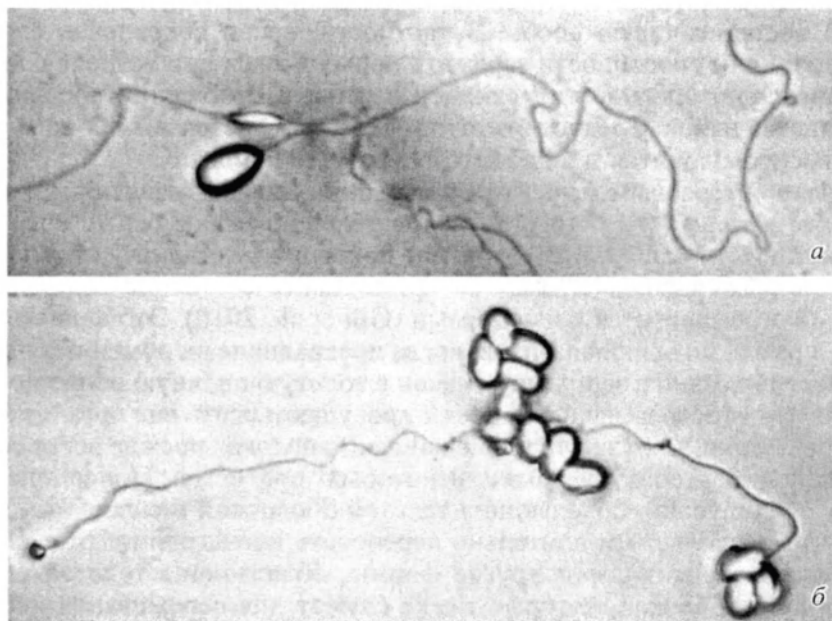


Рис. 1. Световая микроскопия спор микроспоридий *Vairimorpha hybomitrae* (а), *Tabanispora hybomitrae* (б) из *Tabanus* spp. (Diptera: Tabanidae), зафиксированных в момент выброса полярной трубки.

роспоридий длительного сохранения спорами жизнеспособности (состояния покоя) после их выхода из организма хозяина и попадания в окружающую среду (Исси, 1980, 1998, 2002, 2005).

Одно из главных свойств спор микроспоридий заключается в том, что при попадании в организм новых хозяев споры выстреливают полярную трубку, вводя зародыши в клетки хозяев. При длине споры в 4—5 мкм длина полярной трубки энтомопатогенных микроспоридий может превышать 200—300 мкм (рис. 1), что обеспечивает попадание хотя бы некоторых из выброшенных трубок непосредственно в ткани, восприимчивые для заражения (Исси, 1986). Хорошо известен тот факт, что экструзия, т. е. выброс полярных трубок спорами микроспоридий происходит мгновенно при попадании спор в условия, стимулирующие этот процесс. Стимулы для экструзии достаточно разнообразны, но условием активации спор микроспоридий самых разных видов обычно выступает резкое изменение условий окружающей среды, будь то осмотический шок, сильный сдвиг pH в щелочную или кислотную области, либо обводнение обезвоженных спор (Vávra, Maddox, 1976; Pleshinger, Weidner, 1985; Семенов, 2004). Мгновенный выброс полярных трубок наблюдался *in vivo* при попадании спор микроспоридии *Anncaliia* (*Brachiola*, *Nosema*) *algerae* (Vávra, Undeen, 1970) в средний отдел кишечника личинки комара (Chioralia et al., 1998), а также *in vitro* при контакте спор микроспоридии *Paranosema* (*Antonosporea*, *Nosema*) *locustae* (Canning, 1953) с вытяжкой средней кишки кобылок (Undeen, Erski, 1990). Оболочки пустых (экструдировавших) спор *P. locustae* и *Paranosema* (*Nosema*) *grylli* (Sokolova et al., 1994) отмечены в фаголизосомах гемоцитов перелетной саранчи *Locusta migratoria* L. и двупятнистого сверчка

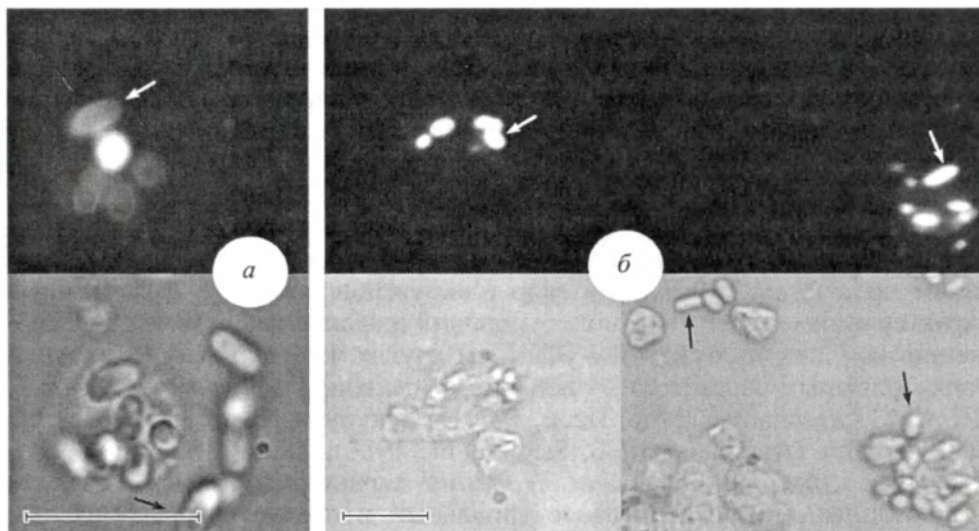


Рис. 2. Флюоресценция спор микроспоридий в красной части спектра свидетельствует о закислении фаголизосом у меченных акридиновым оранжевым гемоцитов, захвативших споры (большие стрелки), в тесте на фагоцитоз *in vitro*. Споры, не фагоцитированные гемоцитами, не флюоресцируют (маленькие стрелки).

a — споры *Paranosema grylli* в гемоцитах *Gryllus bimaculatus*; *б* — споры *Paranosema locustae* в гемоцитах *Locusta migratoria*. Верхняя часть изображения — красная флюоресценция; нижняя — светлое поле. Масштабная линейка = 10 мкм.

ка *Gryllus bimaculatus* Deg. (Токарев, 2003). При этом мечение спор акридиновым оранжевым демонстрирует закисление фаголизосом в гемоцитах, захвативших споры (рис. 2). На основании этих наблюдений можно сделать заключение, что мгновенное «выстреливание» спор микроспоридий в ответ на стимуляцию служит реакцией на попадание в условия, подходящие для заражения, и одновременно приспособлением, позволяющим избежать переваривания в химически агрессивном содержимом пищеварительного сока кишечника или фаголизосомального пространства гемоцитов насекомых. Таким образом, стоит спорам микроспоридий попасть в подходящее для заражения место в организме хозяина, процесс экстружии запускается сразу же. Остается рассмотреть вопрос о судьбе спор на предыдущем этапе, до попадания в организм хозяина.

Наблюдения в 1961—1987 годах за эпизоотиями микроспоридиоза (вайриморфоза), вызванными микроспоридией *Vairimorpha (Nosema) mesnili* (Paillot, 1918) в популяциях капустной белянки *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera, Pieridae) и охватившими весь Северо-Запад европейской части России, показали, что при горизонтальной передаче успешное существование паразита в популяции хозяина обеспечивается максимальным сокращением сроков пребывания спор вне организма своих насекомых-хозяев. Горизонтальная передача микроспоридий капустной белянки осуществляется следующим образом. После выхода из яиц гусеницы одной кладки обгрызают лист, образуя ряд из 15—20 особей, тесно контактирующих друг с другом. Характерная для этих гусениц защитная реакция способствует быстрому распространению паразитов. При сотрясении листа или при прикосновении гусеница приподнимает переднюю треть туловища и, сделав

несколько резких покачиваний, выплевывает большое количество слюны. Слюнные железы — одно из первых мест инвазии микроспоридий, поэтому слюна содержит большое количество спор паразита. Их достаточно, чтобы одна зараженная гусеница заразила всех, входящих с нею в одну группу. В распространении микроспоридий активно участвуют также перепончатокрылые паразиты *Apanteles glomeratus* L., *Pteromalus puparum* L. и гиперпаразит *Dibrachys cavus* Walk., но в этих случаях как при передаче спор от белянки насекомым-паразитам, так и от последних белянке заражение происходит без выхода спор в окружающую среду. Аналогичный характер взаимоотношений микроспоридий и насекомых отмечен и в отношении паразитарных систем с участием других чешуекрылых (и их перепончатокрылых паразитов) — непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L. (Исси, Масленникова, 1966; Исси, 1971) и кукурузного мотылька *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Andreadis, 1986; Siegel et al., 1988).

Для вертикальной передачи *V. mesnili* характерны главным образом трансвариальный, псевдотрансвариальный и псевдотранспермальный пути. Пероральная передача наблюдается крайне редко и только в тех случаях, когда гусеницы второго поколения питаются на тех же растениях, что и первого, притом что зараженные гусеницы первого поколения живут на 20—25 дней больше, чем здоровые. Теоретически этого срока достаточно, чтобы они успели встретиться с гусеницами второго поколения, вылупляющимися из яиц, и заразить их спорами, выделяющимися с экскрементами или из тканей погибшего к этому времени насекомого. Однако и в агроценозах и в естественных биоценозах первое и последующие поколения капустной белянки, как правило, развиваются на разных растениях, а именно: первое поколение приурочено к диким крестоцветным, таким как сурепка, и капусте ранних сортов, тогда как последующие поколения развиваются на капусте поздних сортов (Исси, 1980). У тех видов поливольтинных насекомых-фитофагов, которые весь сезон питаются в посевах растений одних и тех же видов и сортов (например, кукурузный мотылек на кукурузе), питание разных поколений приурочено к разным органам или частям растений (Фролов, 1993), из-за чего опять-таки минимизируется вероятность встречи насекомых с зараженными особями предыдущего поколения.

Таким образом, взаимоотношения партнеров паразито-хозяинной системы поддерживаются двумя путями: 1) пероральным заражением, предполагающим выход спор в окружающую среду при тесном контакте здоровых и больных насекомых-хозяев в пределах одного поколения; 2) непосредственной передачей паразитов от зараженного насекомого новым особям хозяина без выхода спор в окружающую среду как вертикально, так и горизонтально — посредством паразитических насекомых (Исси, Масленникова, 1966).

Рассмотренная выше паразитарная система представляет такой случай, когда круг хозяев микроспоридии ограничен несколькими видами белянок рода *Pieris* и паразитирующих в них наездников. В связи с этим важно рассмотреть процесс эпизоотии, вызванный микроспоридиями со значительно более широким кругом чешуекрылых насекомых-хозяев. В 1960—1980-х годах в центральных и южных регионах России массовые эпизоотии микроспоридиоза, вызванные микроспоридией *Endoreticulatus*

(*Pleistophora*) *schubergi* (Zwölfer, 1927), охватили популяции нескольких видов чешуекрылых. В качестве хозяев этой микроспоридии в естественных условиях были определены непарный шелкопряд, златогузка *Euproctis chrysorrhoea* L., дубовый походный шелкопряд *Thaumetopoea processionea* L., лунка серебристая *Phalera bucephala* L., ивовая волнянка *Stilpnotia salicis* L., боярышница *Aporia crataegi* L., зеленая дубовая листовертка *Tortrix viridana* L. и еще несколько не определенных нами видов листоверток. В лабораторных условиях споры, выделенные из непарного шелкопряда, успешно заражали гусениц всех перечисленных видов насекомых, а также свыше 10 видов совок. В природных условиях зараженные насекомые более активно, чем здоровые, перемещались в верхние ярусы растений, предположительно вследствие модификации поведения хозяев под воздействием паразита, способствующей более широкому распространению последнего в данном биотопе. В результате диареи, вызванной заражением клеток эпителия средней кишки гусениц, листья кормовых растений были обильно покрыты жидкими экскрементами, содержащими массу спор микроспоридии. Такую картину наблюдали в течение месяца, затем проливные дожди смыли с листьев и споры, и приклеенные к листьям экскрементами трупы насекомых. Ранний листопад (после 20 июля) окончательно ликвидировал все следы эпизоотии в привычных местах обитания восприимчивых хозяев. Инфекционный материал сохранился только в клетках эпителия средней кишки слабо зараженных гусениц и в куколках. Однако, учитывая, что в лабораторных условиях споры этой микроспоридии легко заражали гусениц совок, нельзя исключить возможности заражения в природе этих насекомых, обитающих в нижнем ярусе леса на травянистых растениях (Исси, 1968, 1971). Что же касается инфекционного начала, попавшего в почву и в лесную подстилку, то в силу того, что на протяжении всего жизненного цикла основные хозяева этой микроспоридии не контактируют с почвенным слоем, встреча паразита с хозяином в этих условиях крайне маловероятна. Кроме того, наши лабораторные исследования показывают, что споры микроспоридий чувствительны к бактериальной контаминации и быстро гибнут в присутствии размножающихся бактерий. По-видимому, в почве и лесной подстилке, где, как известно, интенсивно размножающиеся бактерии составляют существенную долю организмов-редуцентов, длительное выживание спор микроспоридий также мало вероятно.

Стоит отметить, что все природные хозяева этой микроспоридии относятся к моновольтинным насекомым. У моновольтинных чешуекрылых насекомых четко различаются время и способы горизонтальной и вертикальной передачи микроспоридий. Горизонтальная передача осуществляется пероральным способом внутри одного поколения, а вертикальная — трансвариальным, как наиболее надежным при значительном временном разрыве между активными фазами развития двух последующих поколений. У многих видов насекомых, особенно у ведущих одиночный изолированный образ жизни, трансвариальная передача становится основным способом сохранения и распространения паразитов в популяции насекомых-хозяев. Так, для гусениц подсолнечниковой огневки *Homoeosoma nebulellum* Hb., развивающихся в толще цветочной корзинки подсолнечника, при плотности популяции 1 гусеница на 20 растений описана заражен-

ность более 80 % особей вследствие передачи микроспоридий трансвариальным способом (Weiser, 1965). При этом трансвариальная передача способствует сохранению в популяции хозяина наименее вирулентных форм облигатных внутриклеточных паразитов, что можно рассматривать как благоприятное обстоятельство с точки зрения выживания хозяина, а значит и паразитарной системы в целом (Гулий, Голосова, 1975; Исси, 1986; Dunn, Smith, 2001). Однако нам известен факт, когда даже такой наиболее безопасный с точки зрения сохранения паразита и хозяина способ передачи микроспоридий завершился гибелью обоих партнеров паразито-хозяинной системы. В 1980-е годы на Южном Урале массовое размножение непарного шелкопряда завершилось массовой же откладкой яиц — осенью стволы деревьев на высоту 2 м от земли были покрыты кладками вредителя. Весной в ожидаемые сроки из кладок не вышло ни одной гусеницы. Проведенный нами анализ поступивших в институт материалов показал, что слюнные железы гусениц, полностью сформировавшихся внутри оболочки яиц, были заполнены спорами микроспоридии *Vairimorpha (Nosema) lymantriae* (Weiser, 1957). И хотя во время проведения анализа и хозяин, и паразиты были еще живы, гусеницы не были способны прогрызть хорион и выйти из яиц.

Таким образом, длительные наблюдения в природе за функционированием естественных паразитарных систем «микроспоридии—наземные насекомые» привели нас к выводу о том, что в силу экологических условий споры микроспоридий, покинувшие организм хозяина, не выполняют функцию длительного сохранения в окружающей среде инфекционного материала, способного заразить новых хозяев через значительный промежуток времени. Они играют другую роль — обеспечивают максимально быстрый процесс заражения новых особей насекомого-хозяина. Длительное сохранение спорами микроспоридий жизнеспособности вне организма наземного хозяина в большинстве случаев лишено биологического смысла, так как насекомые-хозяева следующих поколений не имеют шанса встретиться с этими спорами.

Можно предположить, что сходная ситуация в паразито-хозяинных отношениях микроспоридий и членистоногих наблюдается и в водной среде. Так, споры многих микроспоридий, паразитирующих в личинках мошек и кровососущих комаров (т. е. пелагических насекомых) имеют придатки (*Caudospora*, *Hirsutosporos*, *Ringueletium*), или сцепленные друг с другом пучком (*Pegmatheca*) или цепочкой (*Parapleistiphora*) спорофорные пузырьки, или покрыты сильно разбухающими при попадании в воду слизистыми капсулами (*Crispospora*). Все эти приспособления направлены на задержание попавших в воду спор в биотопе насекомого-хозяина, чтобы насекомое успело проглотить инфекционный материал до того, как его унесет течением или он утонет. Задержка в развитии зараженных микроспоридиями личинок симулирует на несколько месяцев, позволяющая личинкам следующего поколения заразиться микроспоридиями непосредственно от них, рассматривается как адаптивный механизм, позволяющий паразиту избежать длительного ожидания восприимчивого насекомого-хозяина следующего поколения в окружающей среде (Рубцов, 1966). Альтернативная ситуация складывается в отношении пресноводных бентосных организмов. Наиболее богатый видовой состав микроспоридий регистрируется у

донных фильтраторов — личинок хирономид (Воронин, 1999; Tokarev et al., 2010a, b). Анализ филогенетического положения разных видов паразитов личинок комара-звонца *Chironomus plumosus* L., с одной стороны, демонстрирует их принадлежность к различным филогенетическим ветвям и к разным систематическим, а с другой — указывает на частую смену хозяев в ходе эволюции микроспоридий, включая переходы из наземной среды обитания в пресноводную (Tokarev, 2010). Эти обстоятельства косвенным образом указывают на то, что такие обитатели илистого слоя дна стоячих водоемов, как *C. plumosus*, успешно аккумулируют споры микроспоридий, попадающие на дно из самых разных источников, включая наземные. Наоборот, у пелагических членистоногих-хозяев возможности для горизонтальной передачи паразитов сильно ограничены, из-за чего вертикальная передача становится основным способом закрепления паразитов в популяциях хозяев, что сопровождается формированием тесных коэволюционных связей микроспоридий и водных членистоногих (Dunn et al., 2001).

Все сведения о достаточно длительном сохранении спорами активного состояния получены по результатам хранения спор в лабораторных условиях, не адекватных тем, в которых они находятся в природе. Обычно в лабораторных условиях споры микроспоридий хранят в воде с добавлением антибиотиков, в физиологическом растворе или дистиллированной воде при низких положительных температурах (+4 °C), замораживают до относительно низких температур (–20 °C) или помещают в жидкий азот. Тот факт, что высвобожденные из организма насекомых споры в природе погибают быстро, подтвердил один из наших экспериментов. Мы воспроизвели в лаборатории условия, в определенной мере сходные с теми, в которые попадают споры после выхода из организма насекомого-хозяина. Настольная электрическая лампа на расстоянии, поддерживающем 22—28 °C в течение рабочего дня (8—9 ч), освещала поверхность с предметными стеклами. Из плеквок гусениц белянки IV возраста, зараженных микроспоридиями, было приготовлено по 5 мазков на стекло. Просмотр мазков проводили на каждый пятый день. В конце каждого 5-го рабочего дня на одно из стекол наливали воду, хранившуюся в холодильнике при температуре, близкой к нулю. Резкая смена температуры и влажности приводила к массовому выбросу полярных трубок. На каждом мазке учитывали состояние 20 спор, получая, таким образом, для каждого стекла результаты по 100 спорам (рис. 3). Уже на 10-й день споры начали выбрасывать полярные трубки с четкой патологией, свидетельствующей о невозможности заражения нового хозяина. Они не могли расправиться в длину и образовывали комки из спутанных участков трубки. Однако воздействие света и тепла электрической лампы — лишь слабое подобие солнечного света, ультрафиолетовое и инфракрасное излучения которого значительно сильнее нагревают поверхность листьев растений. По данным Вейзера (Weiser, 1963), сухость и солнечный свет убивают споры в течение всего 3—5 дней.

Все это, по нашему мнению, говорит о том, что споры микроспоридий, закончившие свое развитие в организме хозяина и покинувшие его, не покоящаяся (dormant) стадия развития, а стадия, предназначенная для моментального заражения нового хозяина. Это, на наш взгляд, является важнейшим условием выживания вида паразита. Образно говоря, аппарат экс-

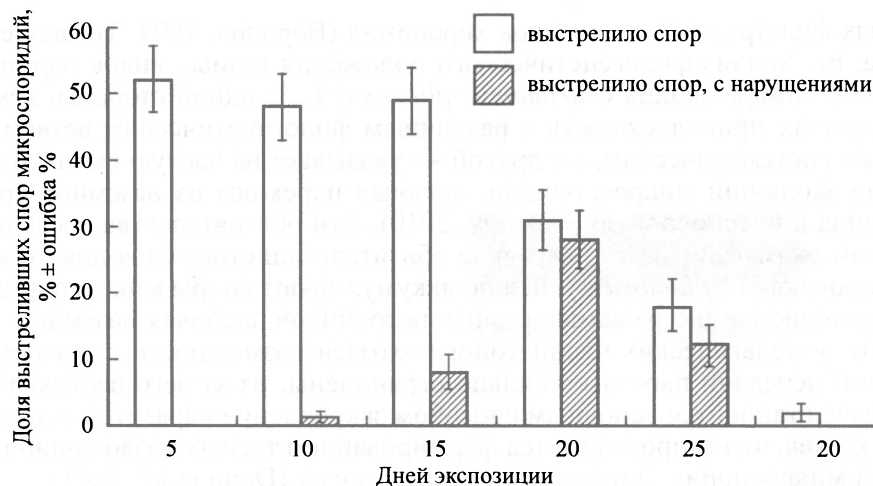


Рис. 3. Влияние длительности высушивания спор микроспоридии *Vairimorpha mesnili* вне организма насекомого-хозяина при температуре +22—28 °С на их выстреливание при искусственной стимуляции.

трузии спор можно сравнить с луком, тетива которого натянута для моментального выстрела при первом же контакте с насекомым-хозяином.

Постоянная готовность спор микроспоридий к быстрой активации при заражении нового хозяина подтверждается и на молекулярно-биохимическом уровне. Еще в 1970 г. в спорах микроспоридии *Nosema apis* Zander, 1909 было обнаружено высокое содержание трегалозы (Wood et al., 1970). Позже высокая концентрация этого дисахарида, составляющая около 0.4 М, была выявлена в спорах других изученных видов паразитов (Undeen et al., 1987; Undeen, van der Meer, 1999; Долгих, Семенов, 2003). Накопление трегалозы внутри споры приводит к значительному повышению осмотического давления, что в настоящее время рассматривается в качестве движущей силы процесса экструзии (Undeen, 1990). Иными словами, высокая концентрация запасного дисахарида может играть роль пружины, удерживаемой в сжатом состоянии благодаря наличию толстой непроницаемой оболочки споры.

Почти одновременно с обнаружением трегалозы, в спорах микроспоридий была выявлена активность трегалазы — фермента, гидролизующего это соединение с образованием двух молекул глюкозы (Vandermeer, Gochpauer, 1971). Более того, у трех изученных видов микроспоридий *Edhazardia aedis* (Kudo, 1930), *Vavraia culicis* (Weiser, 1947), *A. algerae*, чьи хозяева обитают в водной среде, экструзия полярной трубки и выброс зародыша (спороплазмы) сопровождалась резким снижением содержания трегалозы (примерно в 3 раза) и значительным повышением концентрации глюкозы внутри споры (Undeen et al., 1987; Undeen, van der Meer, 1999). Это позволило предположить, что в «спящих» спорах микроспоридий наблюдается не только накопление трегалозы, но и высокая активность ряда метаболических ферментов. Наряду с трегалазой (Долгих, Семенов, 2003), мы обнаружили в спорах микроспоридии *P. grylli* активность фосфоглюкомутазы (ФГМ), глицерол-3-ФДГ, глюкозо-6-ФДГ и 5 ферментов гликолиза (Dol-

gikh et al., 1997). При этом активность глицерол-3-ФДГ оказалась сопоставимой с активностью фермента хозяина (жирового тела сверчка), а активность фосфоглюкоизомеразы (ФГИ) в спорах оказалась в 2 раза выше, чем в зараженных клетках. Сравнение выявленной активности с результатами анализа активности 10 ферментов в деспоровых стадиях внутриклеточного развития (меронтах и споронтах) подтвердило высокую метаболическую активность «покоящейся» стадии жизненного цикла микроспоридий (Dolgikh, 2000; Долгих и др., 2002). В частности, ФГМ и фосфофруктокиназа (ФФК) не выявлялись в стадиях внутриклеточного развития, в то время как в спорах обнаруживалась достоверная активность обоих ферментов. Кроме того, в спорах была обнаружена очень высокая активность ФГИ, а в стадиях активность этого фермента была ниже приблизительно в 50 раз. В деспоровых стадиях по сравнению со спорами в 2 раза была снижена и активность глюкозо-6-ФДГ, фосфоглицераткиназы, пируваткиназы. Поскольку интенсивно размножающиеся меронты и споронты нуждаются в значительно большем количестве АТФ, чем покоящиеся зрелые споры, более низкая активность гликолитических ферментов в этих стадиях, на первый взгляд, кажется неожиданной. Однако в настоящее время показано, что микроспоридии используют АТФ клетки хозяина, транспортируемый с помощью уникальных АТФ/АДФ-переносчиков, встроенных в их цитоплазматическую мембрану (Katinka et al., 2001; Tsaousis et al., 2008). В последние годы нам удалось получить антитела к ряду белков микроспоридии *P. locustae*, наработанных в бактериях *Escherichia coli* (Migula, 1895), и сравнить их содержание в зрелых спорах и стадиях внутриклеточного развития паразитов (Dolgikh et al., 2009; Dolgikh et al., 2011). По результатам этих исследований, 5 изученных ферментов углеводного и энергетического обмена паразитов (ФФК, альфа и бета субъединицы E1 фермента пируватдегидрогеназного комплекса (ПДГ), альтернативная оксидаза и митохондриальная форма глицерол-3-ФДГ) отсутствовали в деспоровых стадиях внутриклеточного развития паразитов и специфично накапливались в спорах. В то же время белки, не участвующие в обменных процессах (молекулярные шапероны семейства Hsp70, Sec13 субъединица COP II, SNA-RE-белок синтаксин), присутствовали в клетках паразита на всем протяжении жизненного цикла. Исходя из приведенных выше данных, можно заключить, что при внутриклеточном развитии микроспоридии полностью полагаются на обменные процессы хозяина, однако на стадии споры они вынуждены использовать собственный метаболический аппарат. Таким образом, в физиологическом отношении спору можно назвать не просто активной, а наиболее метаболически активной стадией жизненного цикла микроспоридий.

Одной из предполагаемых функций метаболической системы спор микроспоридий может быть быстрая активация транскрипционной активности хроматина при заражении нового хозяина. У изученных паразитов этой группы обнаружены ферменты, обеспечивающие ацетилирование и деацетилирование гистоновых белков (Katinka et al., 2001) и, вероятно, играющие важную роль в регуляции уровня транскрипции генов микроспоридий. Ацетилирование остатков лизина в молекулах гистонов с помощью фермента гистон-ацетилтрансферазы приводит к частичной нейтрализации положительного заряда и ослабляет связь нуклеосом с ДНК. Поэтому раз-

личные участки генома становятся более доступными для взаимодействия с транскрипционными факторами (Sterner, Berger, 2000). Важную роль в этом процессе в качестве субстрата играет ацетил-КоА. Однако микроспоридии лишены АТФ цитрат лиазы — ключевого фермента, ответственного за синтез этого соединения в нуклеоцитозольном компартменте. По-видимому, ферменты гликолиза, две субъединицы пируватдегидрогеназы и обнаруженная в их геноме ацетил-КоА синтетаза образуют единую метаболическую систему в цитоплазме спор. В ответ на внешний сигнал, стимулирующий процесс экстрюзии, эта система может обеспечить быстрый синтез АТФ и ацетил-КоА.

ВЫВОДЫ

Таким образом, на основании изложенного выше материала можно сделать два основных вывода.

1. Длительное сохранение жизнеспособности спор многих видов микроспоридий после их выхода из организма хозяина и попадания в условия его биотопа бесперспективно. Большая часть попадающего в окружающую среду инфекционного материала не участвует в заражении новых особей как моновольтинных, так и поливольтинных видов хозяев, особенности биологии которых обуславливают пространственную разобщенность потенциальных хозяев и инвазионного начала.

2. Сохранение популяции микроспоридий в популяциях насекомых обеспечивается активным состоянием спор, готовых к экстрюзии зародыша и заражению насекомых при первом же контакте с новой восприимчивой особью. Это их свойство отличает споры микроспоридий от спор покоя бактерий, зигомицетов и протистов и сближает их со спорами размножения анаморфных грибов и споровых растений. Об активном состоянии спор свидетельствует и высокая активность метаболических ферментов по сравнению с активностью, наблюдаемой в dospоровых стадиях внутриклеточного развития паразитов и в клетках хозяина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования поддержаны грантами РФФИ № 10-04-00284 и 08-04-01358.

Список литературы

- Воронин В. Н. 1999. Микроспоридии пресноводных беспозвоночных и рыб России: Автореф. дис. ... док-ра. биол. наук. СПб. 47 с.
- Гулий В. В., Голосова М. А. 1975. Вирусы в защите леса от вредных насекомых. М.: Лесная промышленность. 167 с.
- Долгих В. В., Семенов П. Б. 2003. Особенности катаболизма трегалозы в спорах микроспоридии *Nosema grylli*. Паразитология. 37 (4) : 372—377.
- Долгих В. В., Семенов П. Б., Григорьев М. В. 2002. Особенности энергетического обмена микроспоридии *Nosema grylli* при внутриклеточном развитии. Паразитология. 36 (6) : 493—501.

- Исси И. В., Масленникова В. А. 1966. Роль *Apanteles glomeratus* L. (Hymenoptera, Braconidae) в трансмиссии *Nosema polyvora* Blunck (Protozoa, Microsporidia). Энто-мол. обозр. 45 (3) : 494—499.
- Исси И. В. 1968. Влияние микроспоридиоза на плодовитость непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera, Orgyidae) в ряду поколений. Тр. ВИЗР. 31 : 331—339.
- Исси И. В. 1971. Об использовании спор микроспоридии *Pleistophora schubergi* против гусениц капустной совки. В кн.: «Биологические методы защиты плодовых и овощных культур». Кишинев. 150—151.
- Исси И. В. 1980. Эпизоотология микроспоридиоза капустной белянки *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera, Pieridae). В кн.: «Перспективы использования микроорганизмов в защите растений». Тр. ВИЗР. 5—16.
- Исси И. В. 1986. Микроспоридии как тип паразитических простейших. В сб.: «Микро-споридии. Сер. Протозоология». 10 : 6—135.
- Исси И. В. 1998. Синхронизация жизненных циклов микроспоридий и насекомых. В кн.: «Паразиты в природных комплексах и рисковые ситуации». Новосибирск. 65.
- Исси И. В. 2002. Паразитарные системы микроспоридий. Описание и вопросы терминологии. Паразитология. 36 (6) : 478—492.
- Исси И. В. 2005. Паразитоценоз капустной белянки *Pieris brassicae* L. (Pieridae) в условиях агроэкосистемы Северо-Запада России и паразитарная система микроспоридии *Vairimorpha mesnili* (Nosematidae). В кн.: «Биологические средства защиты растений, технологии их изготовления и применения». СПб. 230—240.
- Рубцов И. А. 1966. Взаимные отношения хозяина и паразита (ответные реакции мошек на микроспоридий). Журн. общ. биол. 26 (6) : 647—661.
- Семенов П. Б. 2004. Особенности структурных белков спор микроспоридии *Paranosema grylli*, паразитирующей в сверчке *Gryllus bimaculatus*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб. 20 с.
- Токарев Ю. С. 2003. Защитные реакции гемолимфы прямокрылых насекомых при микро-спориidioзе: Автореф. ... дис. канд. биол. наук. СПб. 21 с.
- Фролов А. Н. 1993. Изменчивость кукурузного мотылька и устойчивость к нему куку-рузы: Автореф. дис. ... д-ра. биол. наук. СПб. 41 с.
- Andreadis T. 1986. Dissemination of *Nosema pyrausta* in feral populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. Journ. Invertebr. Pathol. 48 : 335—343.
- Chioralia G., Trammer T., Maier W. A., Seitz H. M. 1998. Morphologic changes in *Nosema algerae* (Microspora) during extrusion. Parasitol. Res. 84 (2) : 123—131.
- Dolgikh V. V. 2000. Activities of enzymes of carbohydrate and energy metabolism of the in- tacellular stages of the microsporidian *Nosema grylli*. Protistology. 1 (3) : 87—91.
- Dolgikh V. V., Seliverstova E. V., Naumov A. M., Senderskiy I. V., Pavlo- va O. A., Bezoussenko G. V. 2009. Heterologous expression of pyruvate dehydro- genase E1 subunits of the microsporidium *Paranosema (Antonospora) locustae* and im- munolocalization of the mitochondrial protein in amitochondrial cells. FEMS Microbiol. Lett. 293 : 285—291.
- Dolgikh V. V., Senderskiy I. V., Pavlova O. A., Naumov A. M., Bezoussenko G. V. 2011. Immunolocalization of alternative respiratory chain in *Antonospora (Pa- ranosema) locustae* spores: mitosomes retain their role in microsporidia energy metabo- lism. Eukaryot. Cell. (in press).
- Dolgikh V. V., Sokolova J. J., Issi I. V. 1997. Activities of enzymes of carbohydrate and energy metabolism of the spores of the microsporidian, *Nosema grylli*. Journ. Euk. Mic- robiol. 44 : 246—249.
- Dunn A. M., Smith J. E. 2001. Microsporidian life cycles and diversity: the relationship be- tween virulence and transmission. Microbes Infect. 3 (5) : 381—388.
- Dunn A. M., Terry R. S., Smith J. E. 2001. Transovarial transmission in the microsporidia. Adv. Parasitol. 48 : 57—100.
- Galaktionov K. V., Dobrovolskiy A. A. 2003. The Biology and Evolution of Tremato- des. An Essay on the Biology, Morphology, Life Cycles, Transmissions, and Evolution of Digenetic Trematodes. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 620 p.

- Gill E. E., Lee R. C., Corradi N., Grisdale C. J., Limpricht V. O., Keeling P. J., Fast N. M. 2010. Splicing and transcription differ between spore and intracellular life stages in the parasitic microsporidia. *Mol. Biol. Evol.* 27 (7) : 1579—1584.
- Katinka M. D., Duprat S., Cornillot E., Metenier G., Thomarat F., Prensier G., Barbe V., Peyretailade E., Brottier P., Wincker P., Delbac F., El Alaoui H., Peyret P., Saurin W., Gouy M., Weissenbach J., Vivares C. P. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*. 414 : 450—453.
- Siegel J. P., Maddox J. V., Ruesink W. G. 1988. Seasonal progress of *Nosema pyrausta* in the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis*. *Journ. Invertebr. Pathol.* 52 (1) : 130—136.
- Sterner D. E., Berger S. L. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 : 435—459.
- Pleshinger J., Weidner E. 1985. The microsporidian spore invasion tube. IV. Discharge activation begins with pH-triggered Ca²⁺ influx. *Journ. Cell Biol.* 100 (6) : 1834—1838.
- Tokarev Y. S. 2010. Molecular phylogeny of entomopathogenic microsporidia, a review of the last five years of study. *Euroasian Entomol. Journ.* 9 : 571—576.
- Tokarev Y. S., Voronin V. N., Seliverstova E. V., Dolgikh V. V., Pavlova O. A., Ignatieva A. N., Issi I. V. 2010a. Ultrastructure and molecular phylogeny of *Anisofilariata chironomi* sp.n. g.n. (Microsporidia: Terresporidia), a microsporidian parasite of *Chironomus plumosus* L. (Diptera: Chironomidae). *Parasitol. Res.* 106 : 1381—1389.
- Tokarev Y. S., Voronin V. N., Seliverstova E. V., Pavlova O. A., Issi I. V. 2010b. Life cycle, ultrastructure and molecular phylogeny of *Crispospora chironomi* g. n. sp. n. (Microsporidia: Terresporidia), a microsporidian parasite of *Chironomus plumosus* L. (Diptera: Chironomidae). *Parasitol. Res.* 107 : 39—46.
- Tsaousis A. D., Kunji E. R., Goldberg A. V., Lucocq J. M., Hirt R. P., Embley T. M. 2008. A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*. 453 : 553—556.
- Undeen A. H. 1990. A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores. *Journ. Theor. Biol.* 142 : 223—235.
- Undeen A. H., ElGazzar L. M., van der Meer R. K., Narang S. 1987. Trehalose levels and trehalase activity in germinated and ungerminated spores of *Nosema algerae* (Microspora: Nosematidae). *Journ. Invertebr. Pathol.* 50 : 230—237.
- Undeen A. H., Epski N. 1990. In vitro and in vivo germination of *Nosema locustae* (Microspora: Nosematidae) spores. *Journ. Invertebr. Pathol.* 56 (3) : 371—379.
- Undeen A. H., van der Meer R. K. 1999. Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. *Journ. Invertebr. Pathol.* 73 : 294—302.
- Vandermeer J. W., Gochnauer T. A. 1971. Trehalase activity associated with spores of *Nosema apis*. *Journ. Invertebr. Pathol.* 17 : 38—41.
- Vávra J., Maddox J. V. 1976. Methods in microsporidiology. *Compar. Pathobiol.* 1. New York; London. 281—319.
- Weiser J. 1963. Sporozoan Infections. *Insect Pathology (an advanced treatise)*. 2. New York; London. 291—334.
- Weiser J. 1965. Influence of Environmental Factors on Protozoan Disease of Insects. *Proc. XII Internat. Congr. Entomol.* 726.
- Wood P. J., Siddiqui I. R., Vandermeer J. W., Gochnauer T. A. 1970. Carbohydrates of *Nosema apis* spores. *Carbohyd. Res.* 15 : 154—158.

SHOULD THE MICROSPORIDIAN SPORES BE TREATED AS DORMANT STAGES?

I. V. Issi, V. V. Dolgikh, Yu. S. Tokarev

Key words: Microsporidia, dormant spores, reproductive spores, extrusion.

SUMMARY

Spores of bacteria, fungi, microsporidia and other protists are traditionally treated as dormant stages, intended to the long-term survival in the environment and to activation of parasitic forms during the infestation of a new host. However, in the process of examination of insect microsporidia at the molecular cellular levels and also at the level of organisms and populations, we came to a conclusion that spores are very active developmental stages with the entire potential directed to the rapid and successful infestation of new hosts during contact with the later. The work summarizes the original data demonstrating (1) the necessity of the rapid activation of microsporidian spores during host contact, (2) hopelessness of the long retaining of viability by spores of many microsporidia in the environment after leaving host organism; and (3) specific accumulation of metabolic ferments in «dormant» spores, but not in actively proliferating prespore developmental stages. On the basis of these data we conclude that microsporidian spores tend to shorten the period when they stay outside host organism to the maximal degree. The probability of host infestation within the limited time period increases due to diverse modes of transmission of pathogens, accumulation of maximally possible volume of infective spores, and the rapid mobilization of the extrusion apparatus.