

Санкт-Петербургский государственный университет
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ЗООЛОГИИ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

КИРЕЕВА (СТЕЛЬМАШУК) Дарья Сергеевна

Выпускная квалификационная работа

**Генетическое разнообразие и инфекционные свойства
микроспоридий чешуекрылых насекомых**

Уровень образования: магистратура

Направление 06.04.01 «Биология»

Основная образовательная программа ВМ.5514 «Биология»

Научный руководитель:

с.н.с., к.б.н.

Насонова Елена Станиславовна

Научный консультант:

д.б.н., профессор РАН, в.н.с

Токарев Юрий Сергеевич

Санкт-Петербург
2022 г.

Содержание

Введение.....	4
Глава 1. Литературный обзор по теме исследования	7
1.1. Общая характеристика микроспоридий.....	7
1.1.1. Общее строение микроспоридий	7
1.1.2. Жизненный цикл микроспоридий.....	11
1.1.3. Циклы развития микроспоридий.....	13
1.1.4. Пути передачи микроспоридий.....	14
1.1.5. Тканевая локализация и специфичность микроспоридий.....	16
1.2. Защитные реакции насекомых	18
1.3. Геном микроспоридий.....	19
1.4. Филогенетическое положение микроспоридий.....	20
1.5. Практическое значение микроспоридий.....	23
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	27
2.1. Материалы исследования	27
2.1.1. Объект исследования.....	27
2.2. Методы исследования, используемые в работе.....	27
2.2.1. Содержание насекомых в лабораторных условиях	27
2.2.2. Экстракция ДНК с помощью СТАБ.....	29
2.2.3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	30
2.2.4. Электрофорез в агарозном геле.....	31
2.2.5. Выделение и очистка ДНК из агарозного геля (Gene Clean) и определение количества ДНК в пробе	32
Глава 3. Результаты и обсуждение	34
3.1. Изучение видового состава и распространённости микроспоридий в популяциях массовых видов чешуекрылых-фитофагов	34
3.1.1. Молекулярно-филогенетический анализ микроспоридий, выделенных из представителей сем. Noctuidae	34
3.1.2. Филогенетическая реконструкция микроспоридий, выделенных из представителей сборной группы дендрофаги.	40
3.1.3. Молекулярно-филогенетический анализ микроспоридий, выделенных из представителей сем. Pieridae.....	47
3.2. Изучение инфекционных свойств микроспоридий р. <i>Nosema</i>	52
3.2.1. Инфекционные свойства <i>Nosema bombycis</i>	53
3.2.2. Инфекционные свойства <i>Nosema pyrausta</i>	57
3.2.3. Инфекционные свойства <i>Nosema tyriae</i>	59
3.2.4. Инфекционные свойства <i>Nosema polyvora</i>	63
3.3. Изучение взаимоотношения микроспоридий чешуекрылых с энтомофагами.....	69
Заключение.....	74

Выводы.....	78
Благодарности.....	79
Список литературы.....	80
Приложение.....	91
Приложение 1.....	91
Приложение 2.....	96
Приложение 3.....	103
Приложение 4.....	108
Приложение 5.....	113

Введение

Микроспоридии – это одноклеточные облигатные паразиты животных и протистов, в частности членистоногих, интенсивное изучение которых началось сравнительно недавно (Franzen, 2008, Lebert, 1856-1857). Эти патогены выступают в качестве регуляторов численности многих беспозвоночных, особенный интерес вызывает их влияние на массовые виды вредных насекомых из отряда Lepidoptera (Issi, 2020). Зарегистрированы случаи обширных эпизоотий и массовой гибели чешуекрылых насекомых, что позволяет рассматривать этих энтомопатогенов как важный фактор регуляции численности, а также как интродуцентов в природные биотопы для достижения долговременных эффектов на популяции вредителей (Issi, 2020; Solter et al., 1997). В очень многих массовых видах чешуекрылых, имеющих практическое значение, были найдены микроспоридии, причём для многих видов насекомых известно по несколько видов паразитов (Kononchuk et al., 2022; Kyei-Poku et al., 2008; Malysh et al., 2021). В основном, они принадлежат к родам *Nosema*, *Vairimorpha* и *Endoreticulatus*.

В России изучением микроспоридий занимаются на протяжении более 70 лет, и в настоящее время сложились предпосылки для углублённого анализа паразито-хозяйинных отношений с использованием современных методов молекулярно-биологического анализа (Issi, 2020). Энтомопатогены, собранные во вторую половину XX века не были изучены молекулярно-генетическими методами, что позволит дополнить и углубить знания, полученные ранее. В настоящее время филогенетический анализ SSU на основе рРНК микроспоридий стал обязательной частью для описания вида. Сопоставление уже имеющихся данных по биологическим свойствам патогенов с новыми (на основе молекулярно-генетического анализа) позволит углубить знания, полученные ранее (Sokolova et al., 2018).

Особый интерес представляют собой патогенные микроспоридии для ряда вредных чешуекрылых насекомых с точки зрения дальнейших перспектив их использования в борьбе с вредителями (Grushevaya et al., 2021; Issi & Tkach, 1971; Issi, 2020). Большинство микроспоридий вызывают медленное отмирание насекомых, что позволяет им оставаться длительное время в популяции хозяина на достаточном уровне, вызывая снижение жизнеспособности: уменьшается плодовитость, продолжительность жизни насекомых, повышается чувствительность к неблагоприятным факторам (Goblirsch, 2018; Le Brun et al., 2022). Кроме того, микроспоридии передаются также и новому поколению трансвариальным и псевдотрансвариальным путями, что делает их перспективными на длительный период времени в борьбе с вредителями (Goertz & Hoch, 2008; Kashkarova & Khakhanov, 1980; Le Brun et al., 2022). Среди наиболее изученных микроспоридий у

насекомых можно выделить три вида паразитов хозяйственно значимых насекомых – *N. bombycis* из тутового шелкопряда и *V. apis* и *V. ceranae* из медоносной пчелы (Goblirsch, 2018; Pei et al., 2021).

Кроме основных хозяев, микроспоридии чешуекрылых способны заражать перепончатокрылых энтомофагов (паразитоидов). Эти взаимодействия интересны тем, что микроспоридия способна существовать в представителях сразу двух разных отрядов насекомых. Для многих энтомофагов уже изучены естественные (типичные) микроспоридии, которые встречаются в их основных хозяевах (Kermani et al., 2014; Schuld et al., 1999; Simoes et al., 2012) и способны распространяться посредством паразитоидов. Кроме того, энтомопатогены могут оказывать сильное патологическое воздействие на паразитических ос, вызывая смертность на личиночной стадии, снижение жизнеспособности и плодовитости взрослых насекомых. Понимание этих факторов важно для изучения способности наездников быть успешными распространителями микроспоридий в популяциях массовых чешуекрылых, оставаясь на достаточном уровне для регулирования численности насекомых (Kermani et al., 2014; Schuld et al., 1999).

Таким образом, цель работы состоит в изучении разнообразия микроспоридий, выделенных из представителей отряда Lepidoptera, и их способности заражать другие виды чешуекрылых-фитофагов, а также перепончатокрылых энтомофагов.

Для достижения поставленной цели необходимо выполнить следующие задачи.

1. Оценить видовой состав микроспоридий в популяциях массовых видов чешуекрылых-фитофагов;
2. Оценить способность микроспоридий различных видов к заражению модельных насекомых-хозяев при их культивировании в лабораторных условиях;
3. Изучить взаимоотношения микроспоридий чешуекрылых с энтомофагами.

Научная новизна. При выполнении работы были получены новые данные о видовом составе микроспоридий, выделенных из представителей отряда Lepidoptera (в основном из сем. Pieridae, Erebidae, Noctuidae и Bombycoidea). Было получено 26 сиквенсов мсрПНК микроспоридий для проб, хранившихся в коллекции ВИЗР на протяжении 70 лет. Их анализ впервые позволил установить филогенетическое положение ряда изолятов микроспоридий. Кроме образцов, полученных в прошлом веке, были проанализированы гусеницы и бабочки, собранные за 2017-2021 г.г., что позволило обнаружить ещё 7 изолятов микроспоридий. Была изучена инфекционность четырех близкородственных видов микроспоридий в лабораторных условиях по отношению к разным чешуекрылым хозяевам из различных семейств (Crambidae, Nymphalidae, Pieridae, Erebidae, Bombycidae, Pyralidae, Plutellidae, Sphingidae, Yponomeutidae). Кроме того, было изучено влияние микроспоридий

не только на неспецифического чешуекрылого хозяина, но и на его паразитоида, что важно для совершенствования подходов к борьбе с вредными чешуекрылыми насекомыми.

Глава 1. Литературный обзор по теме исследования

1.1. Общая характеристика микроспоридий

Тип *Microsporidia* (микроспоридии) – группа одноклеточных эукариот, родственных грибам (*Fungi*), вместе с другими облигатными внутриклеточными паразитами (*Cryptomycota* и *Aphelidea*) составляющая надтип *Opisthosporidia* (*Holomycota*: *Opisthokonta*) (Karpov et al., 2014). Микроспоридии паразитируют в представителях почти всех крупных таксонов животного мира – от протистов до млекопитающих, но особенно широкое распространение наблюдается в членистоногих. История изучения микроспоридий насчитывает более 160 лет. Открытие микроспоридий и начало работы с ними связано именно с эпизоотией микроспоридиоза у шелкопряда *Bombyx mori*, нанесшей значительный ущерб шелководческой промышленности Европы в начале XIX века (Franzen, 2008, Labert, 1856-1857).

В настоящее время описано около 1300 видов микроспоридий из 220 родов (Park & Poulin, 2021). Несмотря на то, что они были обнаружены у представителей примерно половины типов многоклеточных животных, ожидается, что ещё много видов этих протистов будет открыто в будущем (Keeling & Slamovits, 2004). Кроме того, нередко заражение одного вида-хозяина несколькими видами микроспоридий. Например, в европейской медоносной пчеле *Apis mellifera* было обнаружено три разных вида одного рода – *Vairimorpha* (Chemurot et al., 2017; Goblirsch, 2018). Одни виды микроспоридий узкоспецифичны, другие - могут иметь широкий круг хозяев. К таким можно отнести *Paranosema locustae*, у которой насчитывается свыше 100 видов прямокрылых хозяев (Lange & Azzaro, 2008).

Несмотря на большое разнообразие микроспоридий в природе, жизненные циклы многих видов еще предстоит выяснить, а взаимодействие с их хозяевами требует более точного анализа с использованием современных методов (Keeling & Slamovits, 2004).

1.1.1. Общее строение микроспоридий

Строение спор микроспоридий (Рисунок 1) было предметом почти вековой дискуссии из-за того, что световая микроскопия в силу малой разрешающей способности не позволяла достоверно изучать протистов. Кроме того, они имеют плотную сильно преломляющую свет оболочку, что также затрудняет их изучение. С появлением электронной микроскопии началось более детальное изучение данных патогенов. Спора представляет собой очень компактный продукт дифференцировки одной клетки (Nap & Weiss, 2017). Размер живых спор большинства микроспоридий составляет всего несколько

микрометров, но диапазон размеров весьма значителен. По длине споры бывают от 1-2 мкм до 10-16 мкм, а ширина колеблется от 0,5 до 5 мкм. При этом некоторые виды обладают гигантскими размерами, так *Bacillidium filiferum*, выделенный из пресноводных олигохет, имеет длину около 40 мкм (Larsson, 1989). Споры, заражающие млекопитающих, мельче (1-3 мкм), например, самые маленькие по размеру – $1,2 \times 0,9$ мкм у *Enterocytozoon bieneusi* (Yazar et al., 2013). Зараженные клетки хозяина обычно гипертрофированы и, как следствие, могут быть видны при световой микроскопии, а иногда даже невооруженным глазом. Как предполагают, гипертрофия клетки хозяина направлена на создание для микроспоридий благоприятных условий, включая формирование дополнительного жизненного пространства (Lom & Dyková, 2005; Kent et al., 2014).

Споры имеют чаще всего овальную, реже грушевидную, почковидную, шаровидную или палочковидную форму. Кроме того, некоторые микроспоридии могут иметь споры нескольких морфологических типов. Например, у большинства видов рода *Vairimorpha* наблюдают формирование двух типов спор – одиночных диплокариотических спор и монокариотических октоспор (упакованных по 8 в спорофорный пузырёк), причем споры второго типа не способны инфицировать основного хозяина (например, октоформа спор *V. mesnili* не заражает капустную белянку, *V. disparis* – непарного шелкопряда) (Issi, 2002; Laigo & Paschke, 1966; Sokolova & Entzeroth, 1995; Vavra et al., 2006). У представителей других родов также наблюдаются схожие осложнения жизненного цикла, так, *Nosema pyrausta* формирует два типа спор – моно- и диплокариотические (Grushevaya et al., 2018), поэтому для точного анализа и правильной идентификации вида необходим молекулярно-генетический анализ (Sokolova et al., 2018).

Обязательными компонентами спор микроспоридий любого уровня организации являются зародыш, аппарат экстрезии и оболочка. Зародыш лежит в центре споры между полярным пластом и задней вакуолью, окруженный с боков витками полярной трубки. Он представляет собой ядро (одиночное или диплокарион) с узкой зоной цитоплазмы. Размер ядра меняется в течение жизненного цикла. Ядро типично эукариотического типа. К ядру тесно прилегают 2-6 рядов спирально расположенных полирибосом. Собственной клеточной мембраны зародыш не имеет (Vavra & Lukes, 2013).

У микроспоридий также отсутствуют классические митохондрии, пероксисомы и типичный аппарат Гольджи. Митохондрии редуцированы до митосомы, в которой нет генома, белковых комплексов, участвующих в окислительном фосфорилировании, а также ферментов цикла Кребса. При этом основная функция этой органеллы – биосинтез *Fe-S* кластеров (Dellibovi–Ragheb et al., 2013).

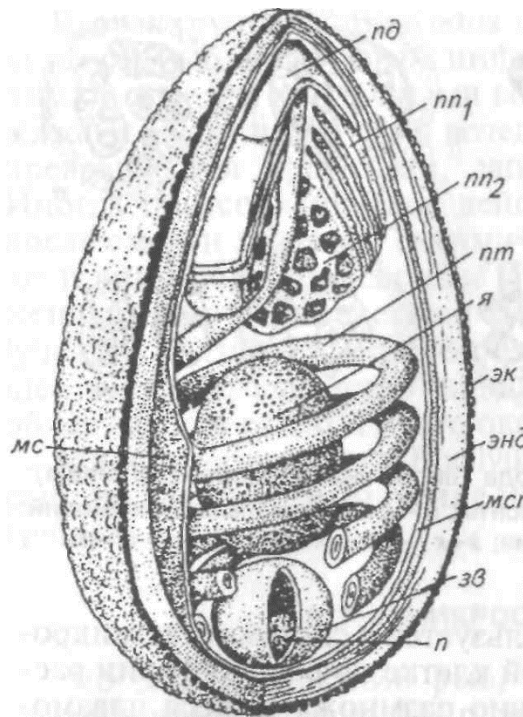


Рисунок 1. Схема ультратонкой организации споры микроспоридий.

ЗВ – задняя вакуоль; МС – мембрана споронта; МСП – мембрана спороплазмы; П – постеросома; ПД – полярный диск; ПП1 – пластинчатый полярoplast; ПП2 – пузырчатый полярoplast; ПТ – полярная трубка; ЭК – экзоспора; ЭН – эндоспора; Я – ядро (Vavra & Lukes, 2013; Vávra & Ronny Larsson, 2014)

Аппарат экструзии состоит из полярной трубки, полярoplastа, полярного якорного диска и задней вакуоли. К полярному якорному диску, расположенному на переднем полюсе споры, прикреплено основание полярной трубки. Полярoplast представляет собой стопку плотно или рыхло упакованных мембран, ориентированных перпендикулярно длинной оси споры и связанных с базальной частью полярной трубки. Упаковка мембран полярoplastа может быть различной и служит родовым или видовым признаком (Delbac et al., 2001; Vavra & Lukes, 2013). Самая характерная для всех микроспоридий органелла – полярная трубка, имеет различное строение при нахождении внутри и после выброса из нее. Кроме того, это единственный компонент инъекционного аппарата, повсеместно присутствующий в спорах микроспоридий, в то время как другие структуры, такие как полярoplast и задняя вакуоль, иногда отсутствуют, что имеет место быть у некоторых предположительно примитивных микроспоридий сем. Metchnikovellida. Полярная трубка формируется в ходе внутриклеточного развития протиста из модифицированного аппарата Гольджи. Внутри споры полярная трубка у большинства микроспоридий выглядит как длинная спирально расположенная цилиндрическая структура. Предполагается, что ее

выброс из споры сопровождается структурной реорганизацией, при этом слои, заполняющие цилиндр, телескопически выдвигаются один из другого и, как следствие, длина полярной трубки увеличивается вдвое (Vavra & Lukes, 2013). Трубка обычно сворачивается в один или несколько витков, чтобы соответствовать объёму споры, причём у некоторых видов она довольно длинная. *E. bienewisi* имеет трубку длиной от 10 до 20 мкм в экструзированном состоянии (Vavra & Lukes, 2013). *Vairimorpha (Nosema) apis* – паразит медоносных пчёл, имеет длину споры 5 мкм, а инъекционная трубка длиной более 300 мкм (Han & Weiss, 2017). Однако около 20% родов микроспоридий имеют прямые, нескрученные, палочковидные трубки, которые в неэкструзированном состоянии не превышают длины споры. Кроме того, *Vairimorpha disparis* образует три типа спор, каждый из которых имеет определенную длину и структуру полярной трубки (в частности, они отличаются числом витков трубки: 5, 12 или 30) (Vavra et al., 2006). Длина выброшенной трубки достигает в среднем от 20-60 мкм до 400-500 мкм, то есть в десятки и сотни раз превосходит длину споры. Процесс выстреливания полярной трубки, через которую будет проходить зародыш-спороплазма длится около двух секунд (Frixione et al., 1992). Более детально процесс выглядит следующим образом – через оболочку проходит сигнал внутрь споры и начинает нарастать давление, кроме того, изменяется конформация белка полярной трубки, разбухание полярного пласта и задней вакуоли. Далее происходит выброс полярного филамента и его превращение в полую трубку и через просвет проходит спороплазма, инфицируя клетку. Происхождение инъекционного аппарата микроспоридий остается неизвестным и, вероятно, выступает в качестве специфической эволюционной апоморфии этих паразитов (Vavra & Lukes, 2013).

Не менее важный компонент зрелой споры – оболочка (=клеточная стенка). Именно она позволяет сохраниться протисту при неблагоприятных условиях и не потерять инфекционные свойства. Кроме того, она играет важное значение при экструзии спор, так как она выдерживает высокое давление при выбросе полярной трубки. Кроме того, благодаря оболочке запускается каскад реакций для экструзии полярной трубки, но эта роль ещё до конца не изучена. Основные раздражители для запуска зачастую видоспецифичны, могут зависеть от экологических адаптаций. Например, может повлиять изменение содержания анионов и катионов при попадании споры вблизи клетки-мишени. Так для микроспоридии *Spraguea lophii* известно, что процесс экструзии активируется сдвигом pH в щелочную сторону, присутствие ионов Ca^{2+} и полианионных молекул типа муцина, которые производятся нервными окончаниями, что приводит к поражению нервной

системы рыб. Именно они являются клетками-мишенями для данной микроспоридии (Colmenero et al., 2015; Pleshinger & Weidner, 1985; Weidner & Halonen 1993).

Оболочка состоит из плазматической мембраны и двух слоёв внеклеточного матрикса толщиной около 7 нм. Средний слой – эндоспора, это электронно-прозрачный слой с хитином в качестве основного компонента. Другой слой, который находится на внешней стороне – электронно-плотная экзоспора, представляет собой преимущественно белки, структурированные в виде фибрилл и гранул (гликопротеиновый слой). Экзоспора опосредует контакт с раздражителями окружающей среды. Это наиболее очевидно у видов из водных хозяев, которые часто несут шипы, трубочки, фибриллы или слизистые слои (Vavra & Lukes, 2013; Vavra & Ronny, 2014).

Задняя вакуоль ограничена оболочкой, у каждого вида микроспоридии она разных размеров. Эта органелла считается важной частью аппарата экстрезии, которая при процессе экстрезии значительно увеличивается (Yazar et al., 2013).

Все эти элементы нужны для передачи генетического материала зародыша – спороплазмы микроспоридии в клетку хозяина. Спороплазма представляет собой ядро, окруженное участком цитоплазмы и без собственной плазматической мембраны. Но при изучении некоторых спор была обнаружена мембрана, но она достаточно тонкая – около 70 нм (подобно мембранам эндоплазматического ретикулума) (Vavra & Lukes, 2013).

Несмотря на то, что микроспоридии были описаны ещё 150 лет назад, нам до сих пор не хватает понимания механизма инвазии, включая роль различных белков полярных трубок, стенок спор и белков клетки-хозяина в формировании и функционировании синапса инвазии (Han & Weiss, 2017).

1.1.2. Жизненный цикл микроспоридий

Единственная стадия жизненного цикла, способная выживать вне клетки-хозяина в течение длительного времени – это спора. Спора обычно попадает в нового хозяина через кишечник, но существует и другие пути передачи (Issi, 2002). Когда спора находится внутри соответствующего хозяина, под действием ряда факторов (соответствующих pH, температуры, влажности, концентрации ионов, пищеварительных ферментов, давления) и некоторых других раздражителей, при которых активируется экстрезия спор, спороплазма вводится в клетку-хозяина через полярную трубку (Рисунок 2). Локализация первичной инфекции зависит от пути передачи и обычно происходит в эпителиальных клетках желудочно-кишечного тракта и дыхательной системы (Yazar et al., 2013).

В клетке хозяина, спороплазмы, высвобождающиеся из спор, инициируют пролиферативную фазу, состоящую из двух стадий: мерогонии и спорогонии. Меронты, образующиеся при попадании спороплазмы в подходящего хозяина, представляют собой округлые или неправильной формы, простые по строению клетки, окруженные однослойной клеточной оболочкой. Они неоднократно делятся, давая начало при каждом делении двум (*Encephalitozoon*, *Nosema*, *Vittaformagenus*) или большому числу (*Enterocytozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*) меронтов, так что в конце мерогонии в одной клетке образуется примерно 50-100 меронтов. Они продолжают свое развитие в различных клетках, таких как энтероциты, макрофаги и мезенхимальные клетки при распространении микроспоридий по организму, например, с гемолимфой насекомых. Развитие паразита происходит в непосредственном контакте с цитоплазмой клетки-хозяина (*Nosema*, *Enterocytozoon*), в паразитофорной вакуоли, образуемой при фагоцитозе клетки хозяина (*Encephalitozoon*), в спорофорной вакуоли, формируемой самим паразитом (*Pleistophora*, *Trachipleistophora*), или в эндоплазматическом ретикулуме клетки хозяина (*Endoreticularis*, *Vittaforma*) (Yazar et al., 2013).

Спорогония начинается с образования споронтов, окруженных электронно-плотным поверхностным покровом на поверхности плазматической мембраны. Споронты размножаются бинарным или множественным делением, трансформируясь в споробласты, которые, в свою очередь, созревают в споры (Vavra & Lukes, 2013).

Когда споры полностью заполняют клетку хозяина, её плазматическая мембрана разрывается, и споры распространяются по организму. Эти споры могут либо заражать новые клетки хозяина, либо инфицировать новых хозяев. Некоторые микроспоридии, поражающие двукрылых, перепончатокрылых и чешуекрылых, образуют особое поколение преждевременно выстреливающих спор, отличающихся по своей структуре и образующихся на ранней стадии инфекции. Такие «ранние» или «первичные» споры имеют тонкие стенки, большие задние вакуоли и относительно короткие инъекционные трубки. Они выстреливают спонтанно, сразу после образования, и внедряют свои спороплазмы в новые клетки хозяина, где формируется следующее поколение паразитов. Микроспоридии, поражающие непарного шелкопряда *Lymantria dispar*, представляют собой пример этой стратегии. Проглоченные «вторичные» споры попадают в гусениц из окружающей среды и выстреливают в просвете среднего кишечника. Первое поколение спор образуется очень быстро (через 30 часов после заражения) в мышечных клетках, окружающих кишечник. Эти ранние споры спонтанно выстреливают при созревании, и их спороплазмы инъецируются в жировое тело, слюнные железы и другие ткани, где образуются «вторичные» споры,

предназначенные для передачи между хозяевами. Эти споры имеют меньшую заднюю вакуоль, более толстые стенки и длинную инъекционную трубку (Maddox et al., 1999; Solter & Maddox, 1998; Vavra et al., 2006).

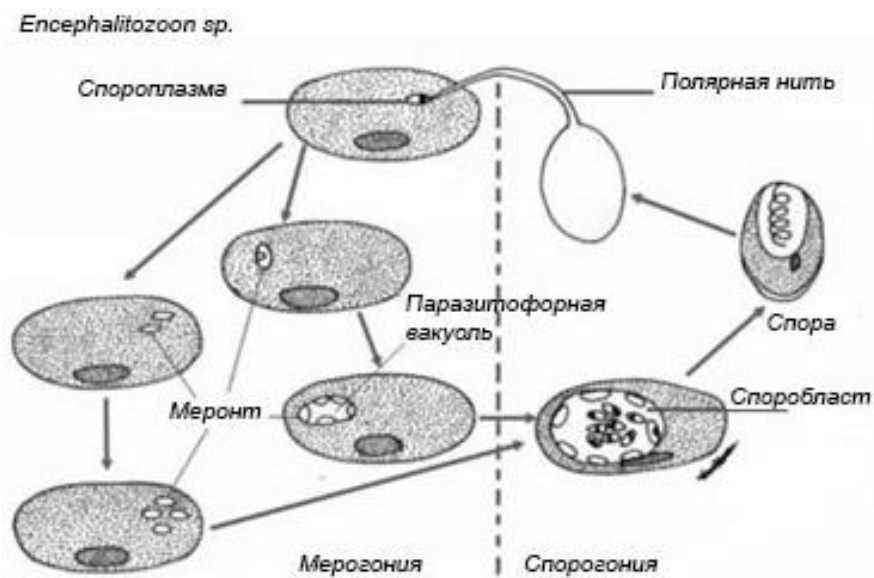


Рисунок 2. Жизненный цикл спор микроспоридий на примере *Encephalitozoon sp.* (Yazar et al., 2013)

Весь жизненный цикл (от спороплазмы до споры) протекает внутри одной клетки хозяина, в которую был введен зародыш; нет никаких признаков активного перемещения вегетативных стадий среди клеток-хозяев. Уникальный характер микроспоридий заключается в том, что они остаются скрытыми внутри клеток хозяев, а их вегетативные стадии остаются защищенными от внеклеточной среды, что ограничивает их распознавание иммунной системой хозяина (Goblirsch, 2018; Vavra & Lukes, 2013; Vávra & Larsson, 2014).

1.1.3. Циклы развития микроспоридий

Среди микроспоридий есть как гомоксенные (развиваются в одном хозяине), так и поликсенные виды, полный цикл развития которых проходит со сменой хозяев. Большинство видов развивается в одном хозяине, и цикл обычно завершается одной спорогонией с образованием одного типа спор (Исси, 1986). Такие циклы различаются:

- строением ядерного аппарата на разных этапах цикла (наличие на всем протяжении развития диплокариотического аппарата (род *Nosema*) или одиночных ядер (род *Unikaryon*));

- особенностями спорогонии, которая протекает с или без образования спорофорного пузырька;
- количеством ядерных делений споронта.

Другие виды микроспоридий, которые проходят полный цикл развития в одном хозяине, имеют спорогонию двух-трёх типов с образованием нескольких типов спор. Чрезвычайная адаптация микроспоридий к особенностям физиологии и жизненного цикла хозяина заключается в том, что даже у гомоксенного вида могут образовываться споры, отличающиеся как физиологически, так и структурно. Например, *Vairimorpha disparis*, паразит непарного шелкопряда *L. dispar* L., образует три типа спор: один для быстрого распространения внутри хозяина и два других типа, служащих для межхозяйинной передачи, причем один из них не заражает самого основного хозяина и его инфекционные свойства не известны (Laigo & Paschke, 1966; Vavra et al., 2006). В жизненном цикле *Amblyospora* sp. участвуют три хозяина: копепода, личинка самца комара и взрослая самка комара. В каждом из этих хозяев формируются споры различного типа (Andreadis, 2007).

Самые быстрые циклы развития присущи видам рода *Nosema* из чешуекрылых насекомых, они длятся 4-5 дней (Pei et al., 2021). В случае, если спорообразование приурочено к определённой фазе развития насекомого, развитие паразита длится от момента заражения до достижения насекомым этой фазы. Например, чаще всего в процессе эмбриогенеза насекомого микроспоридии не развиваются, а остаются на стадии меронта или споронта (Grushevaya et al., 2021). В весенне-летний период развитие может превышать месяц, а в осенне-зимний период, когда насекомое уходит на зимовку – несколько месяцев. Самые длинные сроки развития микроспоридий принадлежат представителям рода *Amblyospora* (Andreadis, 2007).

1.1.4 Пути передачи микроспоридий

Заражение микроспоридиями осуществляется пассивно на организменном уровне. Надёжность встречи паразита с хозяином обеспечивается продукцией громадного количества спор, которые способны оставаться жизнеспособными на протяжении длительного периода времени (Vavra & Lukes, 2013).

Основной путь передачи микроспоридий пероральный, обычно вместе с пищей, контаминированной спорами. Источником заражения также служат выделения больных особей, личинные шкурки, трупы и т.д. (Vavra & Lukes, 2013). Кроме того, существует и псевдотрансовариальный путь передачи микроспоридий. Так, гусеницы капустной

белянки, вылупляясь, поедают хорион. Сами яйца и личинки в них могут быть не инфицированы, при этом на хорионе могут находиться споры из околоплодных тканей самки, которая отложила яйца (Исси, 1964). Споры многих водных видов снабжены слизистыми слоями, споровыми волосками, трубочками или хвостиками, образующимися как выросты экзоспоры. Функция этих придатков – служить вспомогательными средствами для плавучести, тем самым помогая удерживать споры в толще воды и влияя на их доступность для поглощения хозяином (Andreadis, 2007; Vávra et al., 2005).

Многие микроспоридии передаются от особи к особи трансвариальным путём. Это наиболее надёжный способ передачи протистов от одного поколения другому (Dunn et al., 2001). Такой способ, давно выявленный для *Nosema bombycis* из тутового шелкопряда, влечет серьёзные экономические потери для шелководческой промышленности (Han & Watanabe, 1988; Kazuhiro et al., 2004). Трансвариальная передача описана и для многих других микроспоридий – *Nosema destructor* из картофельной моли (Steinhaus & Hughes, 1949), *Nosema pyrausta* из кукурузного мотылька (Grushevaya et al., 2021; Siegel et al., 1988), *Nosema heliothidis* из совки *Heliothis zea* (Gaugler & Brooks, 1975) и других. В яйцах в основном были обнаружены меронты и споронты микроспоридий. Так, до 36% гусениц картофельной совки в природе инфицированы, и такой тип передачи паразитов наиболее эффективный, так как гусеницы этого вида по своей природе – одиночки (Issi & Tkach, 1971). Для массовых видов чешуекрылых такой способ передачи может быть смертельным. Например, наблюдается 100% смертность до выхода из яиц гусениц непарного шелкопряда вследствие разрушения слюнных желез микроспоридией *Vairimorpha (Nosema) lymantriae* (Исси, 1964). С другой стороны, такой способ передачи способствует отбору наименее патогенных форм протиста (Dunn et al., 2001).

При сравнении кладок здоровых и инфицированных бабочек капустной совки было отмечено, что у больных насекомых формируется меньшее количество яиц. При скрещивании насекомых в четырех вариациях (здоровая самка×здоровый самец, здоровая самка×больной самец, больная самка×здоровый самец и больная самка×больной самец) было отмечено, что только здоровая пара чешуекрылых не передает энтомопатогена своему потомству. В трёх других вариантах яйца были заражены на 10-68%. Кроме того, здоровые насекомые способны формировать кладки на протяжении 9 дней, а больные - до 7 дней в зависимости от степени инфицирования организма (Ефименко и др., 1990). Для бабочек капустной белянки было отмечено, что при откладке яиц зараженными насекомыми в начале яйцекладки количество инфицированных яиц невысоко, потом уровень

зараженности увеличивается вдвое. При этом из более поздних яиц реже отрождаются гусеницы (Исси, 1964).

Существует и достаточно специфический способ передачи микроспоридий посредством паразитоида. Энтомофаги могут заражаться теми же видами энтомопатогенов, что и их хозяева-фитофаги. Так, *Vairimorpha mesnili* паразитирует в капустной, репной, горчичной белянках, а также в их паразитоиде – *Cotesia glomerata* и в его гиперпаразите *Dibrachys cavum* (Issi, 2020). Причем развитие микроспоридий в разных хозяевах, несмотря на разное систематическое положение происходит синхронно, что можно объяснить долгими эволюционными взаимоотношениями. Также стоит отметить, что *C. glomerata* способен механически переносить споры на яйцекладе от инфицированной гусеницы здоровой (Husain Khan et al., 2017; Исси и Масленникова, 1966; Исси, 1964).

Наличие у некоторых видов микроспоридий нескольких путей передачи от одной особи хозяина к другой и смена одного пути передачи другим зависят от различных внешних и внутренних факторов, что служит одним из важнейших механизмов стабилизации паразито-хозяинной системы на популяционном уровне взаимоотношений паразита и хозяина (Andreadis, 2007; Issi, 2020; Vavra et al., 2006; Vavra & Lukes, 2013).

1.1.5 Тканевая локализация и специфичность микроспоридий

Продолжительность жизни хозяина - один из наиболее значимых факторов для многих патогенов, включая микроспоридий. Они обычно не причиняют чрезмерного или преждевременного вреда хозяину. Однако физиологическое ослабление иммунной защиты хозяина может привести к усилению вирулентности паразита (Vavra & Lukes, 2013). При массивной инвазии тканей беспозвоночного хозяина он часто становится живым «мешком» со спорами (Andreadis, 2007; Vavra & Lukes, 2013)

За свой жизненный цикл микроспоридии проходят от симбиотических отношений между клеткой хозяина, ведя себя как «безвредный» внутриклеточный комменсал, до резкого антагонизма в период спорообразования паразита (Stentiford et al., 2019). Степень повреждения хозяина на этой последней фазе жизненного цикла микроспоридий зависит от многих факторов, некоторые из которых связаны с самим носителем. Это делает отношения между паразитом и его хозяином сильно зависящими от различных условий, варьирующими между вредными (Solter et al., 2010), более или менее нейтральными (Canning et al., 1999) или даже положительными в некоторых случаях (симбионты в инфузориях) (Fokin, 2012).

Многолетние исследования, проведенные на различных группах хозяев и разных видах микроспоридий, показали, что наиболее часто протисты поражают эпителиальные ткани насекомых: эпителий средней кишки, мальпигиевых сосудов, слюнных желёз, а также внутренней среды – жировое тело и клетки гемолимфы (Canning et al., 1999; Han & Watanabe, 1988). Значительно реже эти патогены поражают мышцы и покровы насекомых. Степень специализации к отдельным тканям различна у разных видов микроспоридий. Например, *V. ceranae* в основном развивается в средней кишке медоносной пчелы (Goblirsch, 2018; Higes et al., 2009), а у микроспоридий вида *N. carpocapsae* тканевая приуроченность отсутствует (Malone & Wigley, 1981).

Кроме тканевой локализации, существует у некоторых видов и специализация по стадии жизненного цикла хозяина. *Pleistophora grossa* развивается только у личинок жуков *Leptinotarsa* sp. При этом локализация может измениться через пассирование через нового хозяина к основному. После пассажа через гусениц капустной совки *P. grossa* стала заражать и самих жуков (Toguebaeye et al., 1988).

Несколько видов микроспоридий, поражающих гаммарид (Crustacea: Amphipoda), в основном передаются вертикально и вызывают феминизацию самцов-хозяев, препятствуя развитию их андрогенных желез, тем самым прекращая выработку гормона, необходимого для развития самцов. При этом увеличение числа самок положительно влияет на паразита, так как протист передается трансовариально через ткани половых желез. Кроме того, такое сотрудничество оказывается выгодным для самого хозяина, поскольку инфицированные самки *Gammarus roeseli* размножаются раньше в репродуктивный период (Haine et al., 2004). При этом положительный эффект зависит от интенсивности заражения: самки гаммарид имеют более высокую плодовитость и большее число репродуктивных циклов только при промежуточной интенсивности инвазии (Ryan & Kohler, 2010).

Микроспоридии способны образовывать так называемые ксеномы на рыбах – гигантские, обычно макроскопические образования, заполненные спорами. Гигантские клетки, индуцированные микроспоридиями, встречаются и у ряда других хозяев, включая олигохет, ракообразных и насекомых (Lom & Dyková, 2005). Ксеномы у рыб могут иметь размеры до нескольких миллиметров, но остаются одной клеткой с одним видоизмененным ядром, цитоплазмой, содержащей стадии развития паразита и зрелые споры. Протист морфологически и физиологически интегрирован в хозяина, и, таким образом, он защищен от иммунной системы. Воспалительная реакция начинается тогда, когда споры в ксеноме достигают зрелости и происходит их высвобождение в окружающую среду (Kent & Speare, 2005).

Среди многочисленных видов микроспоридий, паразитирующих в насекомых, имеются узко специфичные виды, развивающиеся в одном виде хозяина, и виды, заражающие широкий круг хозяев, связанных родственно или экологически. Для ряда видов в экспериментах показана способность переходить с одного хозяина на другого не только между разными отрядами и классами, но также и типами (Invertebrata/Vertebrata). Но так как большинство таких случаев было зарегистрировано в лабораторных опытах, то можно предположить, что они не заражают разных хозяев в природе из-за экологических барьеров. Эти барьеры определяют «экологическую специфичность» возбудителя (Stentiford et al., 2019).

Таким образом, тканевая локализация зависит от вида паразита и хозяина, степени их коадаптации, гистотропизма, генотипа или пола хозяина, условий окружающей среды, путей передачи и многих других факторов.

1.2. Защитные реакции насекомых

В противодействии микроспоридиям важную роль играют перитрофическая мембрана, окружающая содержимое кишечника, предотвращая прямой контакт с эпителием, и pH самого кишечника. Благодаря свойству спор инжектировать спороплазму внутрь клетки хозяина, микроспоридии успешно минуют главный защитный барьер насекомых (Higes et al., 2009). В момент проникновения некоторые из них захватываются фагоцитами, которые скапливаются у кишечника, но развитие паразитов не прекращается. Кроме того, количество фагоцитов у насекомого не увеличивается в том же объеме, что и число паразитов. Вторичный фагоцитоз наблюдается при выходе паразита из клетки в полость (например, в кишечник) и повторном инфицировании, что описано для *V. ceranae* (Franzen, 2004; Goblirsch, 2018). У некоторых насекомых какая-то часть спор из-за фагоцитоза сосредоточена в гиподерме, и они видны под покровами в виде черных кружков, которые при линьки могут со старой шкуркой сбрасываться, что влечет распространение микроспоридий в природе. Также у насекомого может произойти отторжение эпителия средней кишки вместе с микроспоридиями. Но у протистов есть свойство подавлять дифференциацию клеток и препятствовать регенерации эпителия кишечника и отторжению инвазированных тканей (Andreadis, 2007; Renuka & Shamitha, 2013).

Зараженные клетки насекомых, даже имея деструктивные изменения, живут дольше неинфицированных, в то время как нормальные клетки подвергаются в период

метаморфоза лизису. Зараженные клетки без изменений переходят во взрослое насекомое, вероятно, в следствие дефицита в них автолитических ферментов. В частности, нормальный клеточный цикл инфицированных клеток-хозяев блокируется, их деление часто останавливается, а восприимчивость к апоптозу снижается, поскольку паразит ингибирует активацию пути апоптоза. Отсроченный апоптоз позволяет паразиту увеличить свою численность и завершить свое развитие до стадии зрелой споры, такое наблюдается для многих насекомых, в частности для совок, инфицированных *Vairimorpha antheraeae* (Vavra & Lukes, 2013; Ефименко и др., 1990).

Большинство микроспоридии насекомых вызывают инфекции, которые первоначально, по-видимому, незаметны для организма-хозяина, даже когда имеет место массовое размножение паразита в органах. Например, некоторые виды, заражающие гусениц чешуекрылых, постепенно разрушают жировые тела своих хозяев по мере того, как клетки наполняются спорами. Зараженные личинки ещё питаются и ведут себя более или менее нормально; однако они чаще всего погибают во время линьки или окукливания, когда энергетические запасы тканей жирового тела хозяина, необходимые для этих процессов, недоступны (Goertz & Hoch, 2008).

Таким образом, клеточные защитные реакции насекомых не только не эффективны против микроспоридий, но и даже используются паразитом для распространения. Насекомые самые многочисленные в видовом и количественном соотношении, экологически пластичная группа, заселили все возможные пространства. Адаптация микроспоридий к развитию в сильно различающихся формах выражена в многообразии паразит-хозяинных отношений.

1.3. Геном микроспоридий

Уникальность микроспоридий отражается в их генетическом аппарате. Несмотря на то, что он имеет небольшой размер из-за редукции (Corradi & Selman, 2013), в частности характеризуется потерей генов многих метаболических путей, геномы микроспоридий сохраняют высокую степень упорядоченности генов (Keeling & Slamovits, 2004; Slamovits et al., 2004). Кроме того, эти протисты способны использовать метаболические пути хозяев, если они отсутствуют у них самих (Stentiford et al., 2019; Vavra & Lukes, 2013).

Кариотипический анализ показал, что геномы микроспоридий типичны по своей общей структуре (т. е. множественные линейные хромосомы), но очень малы (Keeling & Slamovits, 2004). Несмотря на быструю эволюцию кодирующих последовательностей

(Thomarat et al., 2004), архитектура генома остаётся достаточно стабильной и консервативной. В этих компактных геномах почти нет интронов, наблюдается высокая плотность генов, белки микроспоридий короче, и среди различных видов наблюдается высокая степень консервативности генного состава (Han & Weiss, 2017). С точки зрения эволюции потеря части генов могла произойти из-за внутриклеточного паразитизма. Но кроме потери, микроспоридии смогли приобрести ряд генов вследствие горизонтального переноса, что позволило им стать успешными внутриклеточными паразитами (Heinz et al., 2012; Stentiford et al., 2019; Timofeev et al., 2020).

Одним из первых был получен полный геном микроспоридии *Encephalitozoon cuniculi*, которая может паразитировать в человеке. Размер этого генома составил всего 2,9 млн п.н. (Katinka et al., 2001). Еще более миниатюрным геномом (2,3 млн п.н.) обладает другой патоген человека – *E. intestinalis* (Corradi et al., 2010). Также изучают микроспоридий, вызывающих массовые эпизоотии членистоногих. В частности, геном микроспоридии *Thelohania contejeani*, выделенной из пресноводных раков, составляет 10.4 млн п.н. (Cormier et al., 2021).

Однако различия в размерах геномов микроспоридий не отражаются на числе их генов. Так, наименьшие геномы *E. cuniculi* и *E. enteralis* (2,9-2,3 млн п.н.) содержат 2094 и 1907 генов соответственно, в то время довольно большой геном *Anncaliia algerae* (23 млн п.н.) содержит 2075 генов (Vavra & Lukes, 2013).

Таким образом, данные о геномах микроспоридий важны для понимания биологии и эволюционного происхождения. Однако, еще предстоит изучить и другие аспекты жизни этих протистов, например такие, как генетическое разнообразие внутри и между их естественными изолятами или способ их воспроизводства (Corradi & Selman, 2013).

1.4. Филогенетическое положение микроспоридий

Несмотря на хорошо известное разнообразие микроспоридий, определение филогенетического положения их на древе жизни было сложной задачей, особенно из-за высоких темпов эволюции их последовательностей (в частности, гена мсрРНК), при анализе которые часто сталкиваются с проблемой «притяжения длинных ветвей» (Park & Poulin, 2021; Vavra & Lukes, 2013). Филогенетическое родство микроспоридий с Fungi в настоящее время широко признано. Вместе с Aphelida, Rozellida и Microsporidia они образуют надтип Opisthosporidia (Karpov et al., 2014), которые тесно связаны между собой и разветвляются у основания грибов. Исходя из последних данных, микроспоридии делятся

на 2 большие группы: SB-микроспоридии (*Paramicrosporidium*, *Mitosporidium* и *Nucleophaga*) и LB-микроспоридии (канонические микроспоридии). Первые – это микроспоридии-подобные организмы разошедшиеся между *Rozella* и каноническими микроспоридиями, имеющими короткие ветви на деревьях мсрРНК, поэтому их ещё называют микроспоридиями с короткими ветвями (Doliwa et al., 2021). А вторые, канонические, имеют длинные ветви. В качестве ближайших родственников LB-микроспоридии выступают Metchnikovellidae и Chytridiopsidae, которые генетически были охарактеризованы сравнительно недавно. Кроме того, рибосомы в канонических микроспоридиях значительно уменьшены в размерах и сильно дивергентны из-за редукции (Bass et al., 2018). При этом у их базальных родственников – Metchnikovellidae и Chytridiopsidae рРНК сходны с рРНК других эукариот по структуре и размеру. Несмотря на различия в размерах, эти гены предоставляют ценную информацию о филогенетических отношениях между этими дивергирующими группами. Внутри канонических микроспоридий последовательности мсрРНК использовались в качестве первичных данных для более высокой классификации, поскольку морфологические признаки, традиционно используемые для идентификации, показывают общую гомоплазию (Park & Poulin, 2021).

Первоначально было предложено делить канонических микроспоридий на основе доминирующей среды обитания хозяина. Так, в 2005 году была предложена классификация на основе доминирующей среды обитания хозяина каждой группы: Terresporidia, Aquasporidia и Marinosporidia (Vossbrinck & Debrunner–Vossbrinck, 2005). В дальнейшем, уже в 2014 году была предложена на основе предыдущей классификации новая с пятью кладами. Клады 1 и 3 соответствуют Aquasporidia, клады 2 и 4 соответствуют Terresporidia, а клада 5 соответствует Marinosporidia (Vossbrinck et al., 2014). И эта система пользуется популярностью на протяжении долгого времени для классификации канонических микроспоридий. В неё вносятся доработки, например, отряд Nosematida был пересмотрен для клады 4 (Tokarev et al., 2020). За эти годы накопилось достаточное количество данных для оценки пригодности, полученной предшественниками системы, и в 2021 году предложили сравнительно обновленную филогенетическую реконструкцию. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости пересмотра существующей классификации канонических микроспоридий, что сделать в данный момент непросто из-за нехватки в необходимых объемах данных о разнообразии микроспоридий в целом (Park & Poulin, 2021).

Клада 1 (Aquasporidia) включает только членистоногих хозяев (насекомые и ракообразные). Типичными представителями являются виды семейства *Amblyosporidae*, которые инфицируют комаров (*Culicidae*) (Vossbrinck et al., 2014).

Клада 2 (Terresporidia) заражают наземных хозяев, жизненный цикл которых связан с наземными экотопами. Среди возможных хозяев можно выделить нематод и насекомых (Vossbrinck et al., 2014). К этой группе относится *Paranosema locustae*, единственная микроспоридия, которая используется для борьбы со 100 видами прямокрылых насекомых ((например, препарат «NoLo Bait»: https://biocontrolnetwork-com.3dcartstores.com/NoLo-Bait-Nosema-locustae-5-lbs_p_267.html) (Henry et al. 1981).

Клада 3 (Aquasporidia) включает виды из более широкого круга хозяев (насекомые, ракообразные, мшанки, нематоды и хордовые). Среди этих микроспоридий можно выделить *Anncaliia algerae*, которая была впервые обнаружена в москитах, впоследствии выяснилось, что эти споры способны поражать и человека (Timofeev, 2015).

Клада 4 (Terresporidia) достаточно крупная и её подразделяют на подклады А и В (Park & Poulin, 2021). В подкладе 4А сосредоточены в основном паразиты насекомых (в основном чешуекрылых и жесткокрылых), но также включены некоторые паразиты ракообразных. Среди них есть несколько микроспоридий из р. *Nosema* и *Vairimorpha*, наносящие значительный ущерб шелководству и пасакам (Goblirsch, 2018; Hatakeyama et al., 1997; Pieniasek et al., 1996). В подкладе 4В наблюдается достаточно большое разнообразие хозяев – ракообразные, включая амфипод, десятиногих ракообразных, копепод, аностраков и ветвистоусых. Кроме того, также включены некоторые паразиты двукрылых. Предполагается, что некоторые линии внутри этой клады могут быть в значительной степени связаны с пресноводными экотопами. Но есть предположение, что выборка весьма занижена для этой клады (Williams et al., 2018).

Клада 5 (Marinosporidia) включает в основном водные (морские, морско-пресноводные и пресноводные) виды хозяев. В большинстве эти микроспоридии паразитируют на рыбах и ракообразных. Среди них можно выделить протистов, инфицирующих рыб – семейства *Spragueidae*, *Pleistophoridae* и *Glugeidae* (Kent et al., 2014). Микроспоридии из семейства *Unikaryonidae* поражают амфипод (причём род *Dictyocoela*, наиболее распространенный во всем мире) (Bacela–Spsychalska et al., 2018).

Расширение использования для классификации молекулярных данных, в частности последовательностей мсрРНК, а в настоящее время и геномного секвенирования, привело к переопределению многих родов, а также к созданию новых родов (Stentiford et al., 2019).

Описания новых видов микроспоридий теперь должны включать подробные микроскопические и ультраструктурные изображения, а также подтверждающие молекулярные данные, например, последовательность мсрРНК. Исследования с использованием мсрРНК показали, что некоторые микроспоридии, считающиеся отдельными видами, оказались синонимами, например, *Vairimorpha (Nosema) mesnili* и *Vairimorpha (Thelohania) mesnili* или *Vairimorpha disparis* и *Vairimorpha (Thelohania) disparis* (Sokolova et al., 2018; Vavra et al., 2006). Кроме того, подтвердили, что другие патогены, например, *Vairimorpha (Nosema) mesnili* и *Nosema polyvora*, действительно являются отдельными видами (показано в данной работе).

Привлечение геномных данных для дополнительных репрезентативных групп внутри Opisthosporidia может обеспечить большее разрешение в будущих исследованиях филогенетического положения микроспоридий (Bass et al., 2018).

1.5. Практическое значение микроспоридий

Более 100 лет регистрируются значительные хозяйственные потери на шелководных фермах и пасеках из-за эпизоотий микроспоридиоза. Протозойные инфекции *Vairimorpha (Nosema) bombi* у шмелей, а также *V. apis* и *V. ceranae* у медоносных пчел являются примерами широко распространенных патогенов основных опылителей. *V. ceranae*, изначально обнаруженная у азиатской медоносной пчелы *Apis cerana*, постепенно распространилась по всему миру в колонии пчелы *A. mellifera* (Higes et al., 2009). Этот паразит оказывает значительное патогенное воздействие на своих хозяев. Энтмопатоген нарушает регенерацию тканей и гомеостаз кишечника, а также влияет на ряд физиологических функций кишечника пчел. Кроме того, имеет важное экономическое значение и тот факт, что даже сублетальные уровни остаточных количеств пестицидов значительно повышают чувствительность медоносных пчел к нозематозу и способствуют гибели пчелиных семей (Goblirsch, 2018). Экспериментально доказана способность некоторых микроспоридий млекопитающих инфицировать насекомых-хозяев и наоборот (и, таким образом, возможно, что эти виды патогенов имеют первоначальное происхождение от членистоногих) (Vávra et al., 2011).

Широко распространены микроспоридии у рыб, инвазируя у них мускулатуру, соединительную ткань и кишечник. В связи с продолжающимся ростом аквакультур, культивируемые рыбы особенно восприимчивы к микроспоридиозам из-за высокой плотности. Микроспоридии рыб были описаны из многих географических локаций.

Зачастую эти паразиты рыб оказывают сильное патологическое воздействие, вплоть до летального исхода, что экономически не выгодно для рыбных хозяйств (Kent et al., 2014).

Для птиц *Enterocytozoon bieneusi* является распространенным условно-патогенным микроорганизмом, вызывающим диарею. Однако эпидемиологические данные об инфекциях птиц, вызванных *E. bieneusi*, получены из разных точек земного шара, особенно много случаев описано в Китае. Эти факты вызывают озабоченность, так как именно этот протист способен вызывать различные патологии не только у птиц, но и у млекопитающих, включая человека. Птицы могут играть потенциальную роль в передаче *E. bieneusi* человеку (Zhao et al., 2016).

Особую проблему представляют собой микроспориозы человека. Если относительно недавно описывались единичные случаи заражения при врожденном иммунодефиците, то при распространении СПИДа резко выросло значение микроспоридий как возбудителей болезней. Сейчас описано около 10 видов этих паразитов, которые вызывают у человека хроническую диарею или миопатию с летальным исходом (Timofeev, 2015).

Микроспоридии начали признавать условно-патогенными микроорганизмами во всем мире, в частности в Аргентине, Австралии, Канаде, Германии, Индии, Италии, Японии, Нидерландах, Новой Зеландии, Испания, Швейцария, Великобритания и т.д. Случаи микроспориоза были зарегистрированы во многих развитых и развивающихся странах (Yazar et al., 2013). На данный момент не существует эффективного препарата против микроспориоза. Фумагиллин, одно из немногих веществ, способное подавлять развитие микроспоридий (в частности, его применяли для борьбы с нозематозом пчелиных семей), недавно был запрещен из-за его высокой токсичности как для человека, так и для насекомых (Goblirsch, 2018; Szumowski & Troemel, 2015).

Кроме этого, микроспоридии могут выступать в качестве гиперпаразитов. Так, *Vairimorpha (Nosema) mesnili*, *Nosema polyvora* способна инфицировать не только капустную и репную белянок, но и их паразитоида – *Cotesia glomerata*, а также его гиперпаразитоидов (*Gelis agilis* и *Lysibia nana*) (Исси, 1964). Своеобразный механизм выстреливания, которым обладают микроспоридии, также позволяет им успешно заражать паразитические организмы, не обладающие функциональной пищеварительной трубкой. Представители отряда Metchnikovellida являются примерами такой стратегии, поскольку они живут как гиперпаразиты в грегарирах, населяющих пищеварительный тракт полихет, сипункулид и эхиурид (Frolova et al., 2021; Ronny & Koie, 2006). Известно, что несколько

видов микроспоридий являются гиперпаразитами паразитических ленточных червей и трематод (Dissanaike, 1958; Toguebaye et al., 2014).

Для целого ряда массовых видов чешуекрылых микроспоридии выступают в качестве естественных регуляторов численности, способствуя в том числе предотвращению вспышек массового размножения вредителей сельскохозяйственных культур. Особенно хорошо изучено влияние таких микроспоридий как, *Nosema pyrausta*, *Nosema polyvora*, *Vairimorpha mesnili* и т.д. на вспышки численности вредных насекомых. В частности, для капустной белянки при инфицировании энтомопатогенами рекомендовали снижать количество пестицидов для обработки капусты (Grushevaya et al., 2021; Issi, 2020; Malyshev et al., 2021; Sajar & Lewis, 1988; Siegel et al., 1988). Микроспоридии имеют ряд преимуществ в качестве регуляторов численности своих хозяев и обеспечении внедрения их в популяции вредителей для регуляции численности (Исси, 1986):

- умеренная вирулентность, которая быстро повышается в ответ на увеличение численности и плотности популяции вредного вида;
- высокий потенциал и разнообразие путей как горизонтальной (заражение возбудителем из внешней среды), так и вертикальной (передача возбудителя от родителей потомству) передачи;
- синхронизация развития с развитием хозяина;
- совпадение оптимумов паразита с оптимумами насекомого-хозяина;
- высокий уровень спорообразования;
- длительное сохранение в ряду поколений хозяина слабовирулентных форм для трансвариальной передачи.

Микроспоридии, которые паразитируют на насекомых-вредителях сельскохозяйственного значения, являются перспективными агентами биологической борьбы с этими видами. Сейчас существует единственный препарат на основе спор *Paranosema (Nosema) locustae* – «Нолок», (выпускается под разными коммерческими названиями, например «NoLo Bait»), который рекомендован за рубежом для широкого применения и промышленного производства для снижения численности саранчи (Henry et al 1981). Данный вид микроспоридий заражает большое количество (около 100 видов) насекомых из отряда прямокрылых. Однократное внесение препарата обеспечивает стойкий эффект снижения численности вредителя в течение трех лет. Кроме того, заболевание может распространиться на близлежащие территории вследствие миграций зараженных насекомых (Henry et al 1981; Lange & Azzaro, 2008; Исси, 1986).

Таким образом, многие виды микроспоридий вызывают заболевания, микроспориозы, существенно влияющие на животных-хозяев на клеточном, организменном и популяционном уровнях и оканчивающиеся гибелью зараженных особей, что определяет их большое практическое значение (Исси, 1986). Патогенные свойства микроспоридий при паразитировании на вредных видах членистоногих или гельминтов позволяют рассматривать этих паразитов как перспективных агентов биологического метода борьбы с вредителями.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Все опыты проводились в лаборатории молекулярной защиты растений №8 Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений".

2.1. Материалы исследования

2.1.1. Объект исследования

Объектами исследования были зараженные микроспоридиями вредители сельскохозяйственных культур и лесного хозяйства. В работе были использованы 4 близкородственных вида микроспоридий *Nosema pyrausta* из кукурузного мотылька (Crambidae: *Ostrinia nubilalis*), *N. bombycis* из тутового шелкопряда (Bombycidae: *Bombyx mori*), *N. tyriae* из медведицы крестовниковой (Erebidae: *Tyria jacobaeae*) и *N. polyvora* (Pieridae: *Pieris brassicae*) из коллекции живых культур микроспоридий ФГБНУ ВИЗР, созданной нами и нашими коллегами. Также среди объектов можно выделить 64 образца микроспоридий, выделенных в середине прошлого века из разных представителей чешуекрылых насекомых из коллекции ВИЗР (сем. Noctuidae, Pieridae и сборная группа дендрофагов), созданной в группе Исси И.В.

2.2. Методы исследования, используемые в работе

2.2.1. Содержание насекомых в лабораторных условиях

Для постановки опытов отбирали гусениц одного возраста от одной самки. С одной стороны, количество вариантов сокращается из-за того, что яиц ограниченное количество (например, для капустницы около 30 штук), но благодаря этому гусеницы оказывались выровнены по возрасту, и вероятность контаминации энтомопатогеном от соседних кладок или гусениц была меньше. Также родителей проверяли на наличие протистов.

В основном гусеницы были второго возраста, именно в этот период они наиболее восприимчивы к патогенам, но уже достаточно устойчивы, чтобы не погибнуть от их воздействия. При этом, если наблюдалась высокая смертность от микроспоридиоза, и снижение доз не помогало в решение поставленной проблемы, то использовали гусениц третьего возраста.

Для постановки первичных опытов использовали дозу 1 млн спор на гусеницу (Kononchuk et al., 2021; Tokarev et al., 2018). Эта доза является оптимальной чтобы понять, является ли данная микроспоридия инфекционной для того или иного организма. Если в течение опыта наблюдалась высокая смертность, то дозировку уменьшали в 2, 10, 100 и

1000 раз, чтобы определить необходимое количество спор для изучения воздействия патогена на хозяина.

Гусениц рассаживали в банки небольшими группами от 5 до 30 особей, где в течение некоторого времени они голодали (обычно 2 часа). В это время необходимо подготавливать споры микроспоридий: эппендорфы с энтомопатогеном центрифугировали при 4000 g 5 минут и сливали супернатант, добавляли дистиллированную воду и ресуспендировали этот образец. Эту процедуру нужно повторить несколько раз, чтобы избавиться от бактерий и грибов, которые могли находиться в пробе. Далее споры добавляли в корм или наносили суспензию на поверхность листа, и скармливали гусеницам младших возрастов. Обычно инфицированный корм съедали за сутки. И уже после заражения восстанавливали обычную ежедневную диету.

Для инфицирования гусениц паразитоидами (*Cotesia glomerata*) использовали имаго, вылетевшее в лабораторных условиях. Трупы гусениц (из которых вылетели паразитоиды), а также мёртвые личинки ос просматривали на наличие энтомопатогенов в них. Имаго вылетало в банках 0.5 л, причем сверху они были закрыты шифоновой полупрозрачной тканью для циркуляции воздуха. Основная диета паразитоидов – 5% сахарный сироп, нанесенный на ватные диски, который обновляли каждый день. Примерно три дня необходимо паразитоидам для спаривания и формированию полноценных яиц. По прошествию необходимого времени в банку помещали здоровых гусениц второго возраста. Паразитоиды, в частности *Cotesia glomerata*, предпочитают личинок младших возрастов, так как иммунная система не до конца сформирована, а также они меньше сопротивляются (Issi & Maslennikova, 1966; Junnikkala, 1985; Larsson, 1979; Tanada, 1955). В литературе описано, что на 4 часа необходимо оставлять 4 гусеницы на одну самку паразитоида. В связи с тем, что самки от самцов слабо отличаются ввиду их малых размеров все осы подсаживались к гусеницам на сутки (5 паразитоидов на 12 гусениц). Корм для гусениц был мелко порезан, чтобы они не могли прятаться под ним. По истечению суток гусениц и паразитоидов разъединяли. Всех ос вскрыли для проверки на наличие микроспоридий. После линьки гусениц на третий возраст их инфицировали стандартным методом, описанным ранее (Junnikkala, 1985; Исси и Масленникова, 1966).

По истечению 8 дней все гусеницы были рассажены по одной. По литературным данным *C. glomerata* в среднем выходит на 10-13 сутки (Junnikkala, 1985). Подсчитывали коконы и мертвые личинки, трупы гусениц и паразитоидов, которые не смогли окуклиться, проверяли на наличие микроспоридий. По истечению четырёх дней вылетели имаго, и их содержали на обычной диете с сахарным сиропом 5% (Tanada, 1955).

Первый этап поиска и идентификации зараженных микроспоридиями организмов и тканей – это просмотр мазков зараженных организмов или тканей в световой микроскоп при увеличении 400X и 1000X. Их можно увидеть, как овальные отражающие тела внутри или снаружи клетки. Все приготовления для последующего подсчёта спор были одинаковые – в эппендорфы доливали дистиллированную воду (1 мл) и гомогенизировали гусеницу/куколку пластиковым пестиком. После из массы удаляли пинцетом неразрушенные ткани (например, гусеничные покровы). Центрифугировали при 4000 g 5 минут полученный образец и сливали супернатант, добавляли дистиллированную воду и ресуспендировали. Эту процедуру повторяли несколько раз для избавления от остатков гусеничных покровов, жира и т.д. Далее производили подсчет спор в камере Горяева по формуле (Глунов, 2001):

$$K = \frac{n_1 + n_2 + n_3}{12}$$

Где, K – количество спор в 1 мл суспензии, млн спор;

n_1, n_2, n_3 – количество спор в 1 квадрате.

Завершающим этапом было центрифугирование при 4000 g в течение 5 минут, хранили полученные пробы в холодильнике при +4 °C.

Микроспоридии из коллекции хранили при +4 °C в холодильнике на протяжении длительного периода времени. Часть проб была с жидкостью в пенициллиновых баночках. Во все сухие пробы была добавлена дистиллированная вода, и через некоторое время полученные образцы переносили в новые эппендорфы для более удобной работы с ними. После делали мазки на предметном стекле, чтобы убедиться в наличие энтомопатогена и провести морфометрию спор. Далее центрифугировали при 4000 g 5 минут полученный образец для осаждения спор.

2.2.2. Экстракция ДНК с помощью СТАБ

Хотя световая микроскопия эффективна в диагностике, она не позволяет различить род и вид. Выделения ДНК СТАБ-методом позволяет выполнять экстракцию ДНК из насекомых и их энтомопатогенов для различных целей – изучения молекулярно-биологических особенностей и оценки генетической структуры популяций насекомых-хозяев, анализа на зараженность энтомофагами, идентификации энтомопатогенных микроорганизмов (Malysh et al., 2021; Sambrook et al., 1989).

Ниже перечислены все этапы данного метода:

1. В образцы добавляли порошок оксида алюминия на кончике шпателя (для разрушения мембраны микроспоридий);

2. Образцы гомогенизировали стерилизованными пластиковыми пестиками в 100 мкл лизирующего буфера (СТАБ);
3. К образцам добавляли по 500 мкл лизирующего буфера с β -меркаптоэтанолом (в соотношении 5:1 мкл) и убирали пестики;
4. Смесь инкубировали в термостате при 65°C в течение 2-3 часов, периодически встряхивали;
5. Добавляли равный объем (600 мкл) смеси хлороформа/изоамилового спирта (24:1);
6. Аккуратно перемешивали (переворачивая штатив с закрытыми и закрепленными крышкой штатива пробирками на 180° примерно) в течение 1 мин;
7. Центрифугировали при 4660 g в течение 10 мин;
8. Верхнюю фазу (500 мкл) переносили в новую пробирку;
9. Добавляли равный объем охлажденного хлороформа/изоамилового спирта (24/1);
10. Повторяли процедуры, указанные в пп. 5-8, используя 450 мкл верхней фазы, потом 400 мкл;
11. Повторяли процедуры, указанные в пп. 5-8, используя 350 мкл верхней фазы;
12. Добавляли равный объем охлажденного изопропанола;
13. Аккуратно перемешивали (см. пп. 6) в течение 1 мин и помещали на 8-12 часов в морозильную камеру при -22°C;
14. Образцы размораживали и центрифугировали в заранее охлажденной центрифуге при 10000 g при +4°C в течение 30 мин;
15. Аккуратно удаляли изопропанол и заливали образцы 70%-ным этанолом, предварительно охлажденным при -22°C;
16. Центрифугировали при 10000 g +4°C в течение 15 мин;
17. Один раз повторяли процедуру в соответствии с пп. 15 и 16, используя охлажденный 90%-ный этанол;
18. Удалив этанол после последней отмывки, высушивали осадки ДНК при комнатной температуре в течение нескольких часов, ресуспендировали в 50 мкл сверхочищенной воды и хранили при -22°C.

Полученные пробы разводили в 10 и 100 раз для уменьшения расхода исходной ДНК. Полученные образцы можно хранить при температуре -22°C несколько лет.

2.2.3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Аmplификация проводится в пробирках 0,6 или 0,2 мл с объемом реакционной смеси 50 мкл или 10 мкл, которая содержит следующие компоненты (Kononchuk et al., 2022; Tokarev, et al., 2018)

1. ДНК-матрица – 4 мкл;

2. Два праймера в концентрации 10 М (прямой и обратный) – по 0,5 мкл каждого;
3. ДНК-полимераза DreamTaq Green (Thermo Fisher Scientific) 2X – 5 мкл;
4. Сверхочищенная вода или ДНК – 4 мкл.

В состав полимеразы DreamTaq Green входит реакционная смесь, которая включает ДНК-полимеразу DreamTaq™ Hot Start, буфер DreamTaq Green, магний, утяжеляющий агент и dNTP, что сокращает количество этапов пипетирования.

Также с пробами делали отрицательный контроль (К–), который включает в себя все компоненты реакции, но вместо ДНК в него вносят сверхочищенную воду. Этот контроль необходим для проверки реактивов на отсутствие в них ДНК из-за возможной контаминации. Положительный контроль использовался для проверки на работоспособность реакционной смеси.

Условия цикла были следующими (Malysh et al., 2020): начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин, 35 циклов денатурации при 95°C – 1 мин, отжиг при 54°C – 1 мин, элонгация при 72°C – 1 мин и окончательная элонгация при 72°C в течение 5 мин.

В работе использовали два вида термоциклиров: с нагревом низа и крышки эппендорфа или с нагревом только низа. Во втором случае необходимо было добавлять высококипящее минеральное масло. Объем его в пробе составляет примерно 40 мкл.

Полученные пробы хранили в морозилке при –22°C.

В работе использовали универсальные праймеры, адаптированные для амплификации малой субъединицы рРНК микроспоридий (=small subunit ribosomal RNA) 18f (GTTGATTCTGCCTGACG) и 1047r (AACGGCCATGCACAC) (Weiss & Vossbrinck, 1999).

2.2.4. Электрофорез в агарозном геле

ПЦР-продукты разделяли в 1%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия 0.5 мкг/мл в горизонтальной камере для электрофореза в 1xTAE-буфере при напряжении 120V. В качестве размерного маркера использовали GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Так как в DreamTaq Green (Thermo Fisher Scientific) входит утяжеляющий агент, то количество этапов пипетирования минимально на данном этапе (только раскапывание ПЦР-продукта по лункам в агарозном геле).

Обычно электрофорез завершали, когда бромфеноловый синий доходил до середины между своей лункой и соседней лункой или края геля. Результаты электрофореза просматривали и фотографировали на трансиллюминаторе (длина волны 365 нм).

2.2.5. Выделение и очистка ДНК из агарозного геля (Gene Clean) и определение количества ДНК в пробе

Образцы, определенного размера (900 н.о.) вырезали из геля для последующего выделения и очистки их от агарозы и бромистого этидия. Ниже перечислены все этапы данного метода (Tokarev, et al., 2018):

1. Вырезали из геля кусок, содержащий полосу ДНК;
2. К нему добавляли раствор изотиоцианат гуанидиния (*GITC*) 3M (в соотношение 2 объема раствора к 1 объему образца), ставили в термостат при +60°C до полного растворения геля;
3. Встряхивали силику и добавляли 7 мкл в пробу. Инкубировали при комнатной температуре и периодически встряхивали пробы в течение 5 мин;
4. Центрифугировали 45 сек при 12000 g;
5. Сливали верхнюю жидкость, ресуспендировали осадок в 200 мкл *NEW WASH* (этанол 25 (96%), изопропанол 25 (100%), NaCl 100 mM (5M), Tris HCl (pH 8.0) 10 mM (1M), H₂O);
6. Повторяли пункты 4-5, с 200 мкл *NEW WASH* 2 раза;
7. Повторяли пункты 4-5, с 200 мкл 93% этанола;
8. Слили верхнюю жидкость, давая выветриться спирту 15-20 мин;
9. Ресуспендировали осадок в 10-15 мкл сверхочищенной воды;
10. Ставили в термостат при 55°C на 5 мин;
11. Центрифугировали 5 мин при 11150 g;
12. Переносили супернатант (10–15 мкл) в новую пробирку.

Полученные пробы необходимо проверить на наличие ДНК в них после экстракции из агарозного геля. Для этого использовали иммунологический планшет, в котором смешивали реактивы в соотношении:

1. Вода – 5 мкл;
2. DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Fisher Scientific) с красителем– 1 мкл;
3. ДНК после экстракции из агарозного геля – 1 мкл.

Полученные пробы вносили в лунки 2% геля, и в конце добавляли маркер Massruler (Thermo Fisher Scientific) для того, чтобы определить по яркости свечения маркера примерную концентрацию ДНК в нанограммах в полученных пробах (для секвенирования необходимо от 4 нг ДНК в пробе). Для секвенирования в стрипы (8 пробирок по 0.2 мкл, соединенных вместе) добавляли по 3 мкл воды, 1 мкл праймера прямого или обратного (концентрация праймера 10 M) и 1 мкл ДНК.

Секвенирование полученных ампликонов осуществлено методом обрыва цепи по Сэнгеру (Sanger et al., 1977) на автоматическом секваторе ABI Prism 3500 (Applied Biosystems) согласно инструкции изготовителя. Образцы передавали сотрудникам ЦКП (центр коллективного пользования) «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология». Все полученные ампликоны сравнивались с таковыми, доступными в GenBank на сервере NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), с помощью встроенной BLAST-утилиты. Работу с нуклеотидными последовательностями проводили в приложении BioEdit 7.0.8.0 (Hall, 1999), а филогенетические построения выполняли методом максимального подобия в приложении MEGA7 (Kumar et al., 2016) с привлечением данных GenBank.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Изучение видового состава и распространённости микроспоридий в популяциях массовых видов чешуекрылых-фитофагов

В данной работе были использованы микроспоридии из коллекции ВИЗР, а также новые сборы. Всего было протестировано на наличие энтомопатогенов 64 образца из архивной коллекции ВИЗР, собранной И. В. Исси и коллегами, которые хранились на протяжении 70 лет в холодильнике при +4 С° в разных объемах жидкости. В 31 пробе были обнаружены споры микроспоридий на светомикроскопическом уровне, но геномную ДНК извлекали из всех проб с учетом возможности существования инфекции в латентной форме. Среди новых сборов был рутинно проанализирован ряд проб на наличие энтомопатогенов. В основном анализировали сборы *Pieris brassicae*, *Helicoverpa armigera* и одиночные пробы других насекомых.

В результате выполнения цикла работ методами молекулярно-генетического анализа, получены данные и построены филогенетические реконструкции для трёх групп микроспоридий – из хозяев, принадлежащих семействам Noctuidae и Pieridae, а также сборной группе чешуекрылых листогрызущих дендрофагов.

3.1.1. Молекулярно-филогенетический анализ микроспоридий, выделенных из представителей сем. Noctuidae

Из коллекции ВИЗР отобрали 21 пробу с микроспоридиями, выделенными из семейства Noctuidae. При световой микроскопии было обнаружено 11 положительных образцов, при этом геномную ДНК удалось извлечь только из 8. По результатам филогенетической реконструкции все изоляты заняли своё положение среди представителей трёх родов: *Nosema*, *Vairimorpha* и *Endoreticulatus* (Рисунок 3).

Среди новых сборов насекомых отдельное внимание уделялось гусеницам и бабочкам *Helicoverpa armigera* и *Mamestra brassicae*. 19 гусениц хлопковой совки были собраны в Краснодарском крае коллегами в 2019 году. Такое же количество капустной совки было проанализировано из Ленинградской области за 2020 год. 11 гусениц собраны в пос. Тайцы, пять в г. Пушкин и оставшиеся в пос. Коммунар. В 2021 году были найдены ещё 15 гусениц в пос. Тайцы. Все образцы были индивидуально рассажены в контейнеры (или эппендорфы) и проанализированы с использованием микроскопа. Впоследствии из этих проб выделяли геномную ДНК, и при ПЦР диагностике среди всех проб был получен только 1 положительный сигнал на микроспоридиоз (Рисунок 3) (Kononchuk et al., 2022).

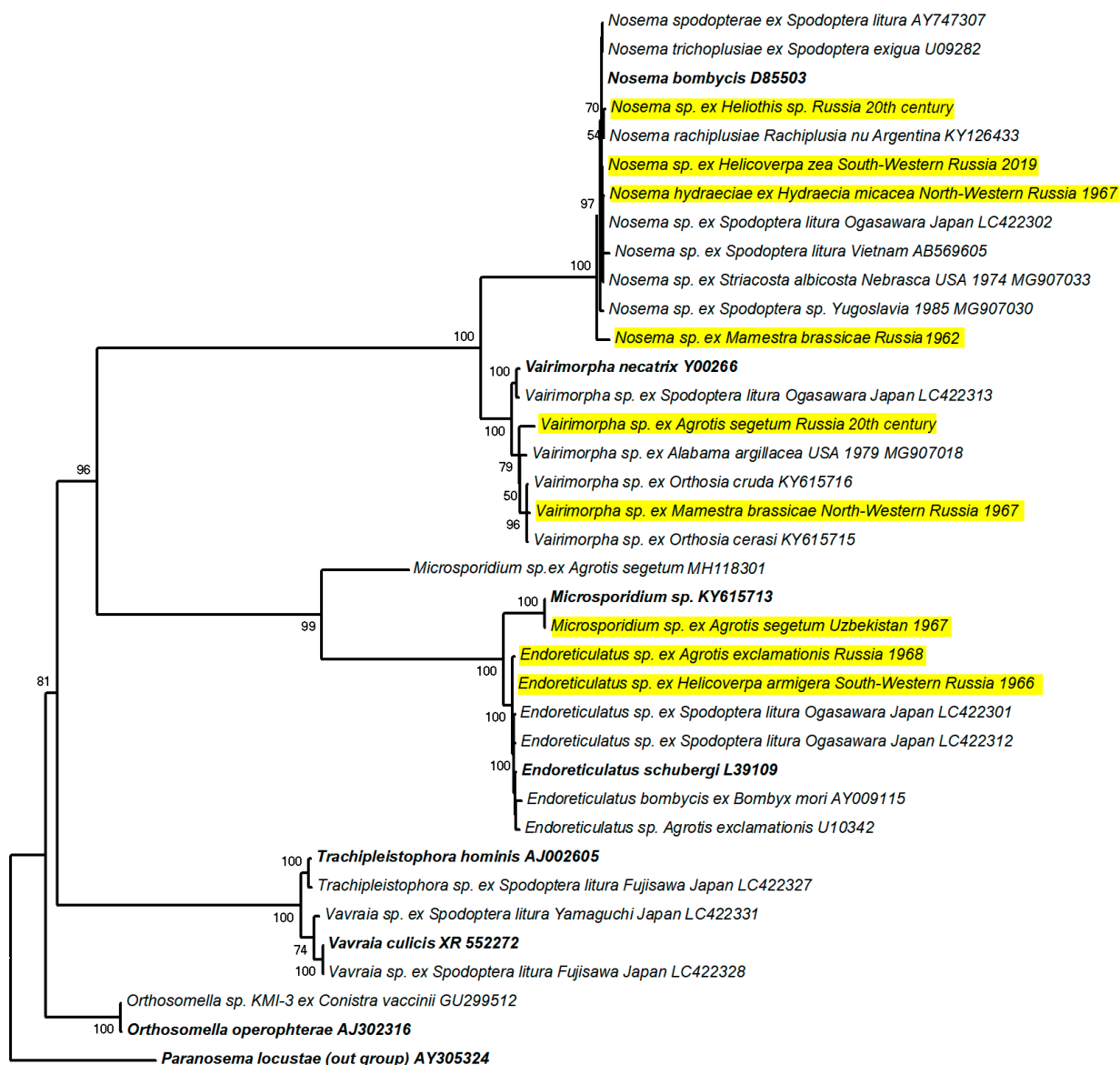


Рисунок 3. Филогенетическая реконструкция на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена мсрРНК микроспоридий, выделенных из представителей сем. Noctuidae

Филограмма построена методом максимального подобия в приложении MEGA7 с использованием модели Tamura-Nei. Числовые индикаторы на развилках указывают бутстрэп-поддержку ветвей.

Полужирным шрифтом выделены типовые виды для каждого рода микроспоридий.

Желтым фоном отмечены изоляты, последовательности которых получены в настоящей работе.

Для построения филогенетической реконструкции (Рисунок 3) на основе мсрРНК микроспоридий были использованы последовательности, доступные в GenBank, которые представлены в Приложении 1 (Таблица 1.1.), а также изоляты, анализируемые в данной

работе (Таблица 1.2.). Все данные по размерам и форме спор, а также степени идентичности с типовыми видами микроспоридий представлены в Таблица 1.2. Также в Приложении 1 в Таблица 1.3.-1.5. представлены данные по сходству и генетическим расстояниям всех анализируемых последовательностей. Световая микроскопия спор микроспоридий из коллекции ВИЗР и новых сборов насекомых за 2017-2021 годы представлена в Приложении 5 (Рисунок 5.1.).

Nosema hydraeciae ex *Hydraecia micacea* North-Western Russia 1967

Одной из наиболее изученных микроспоридий выступает *Nosema hydraeciae* из картофельной совки *Hydraecia micacea*. Погибшие гусеницы были собраны на территории Ленинградской области в 1966 году. Этот энтомопатоген развивается чаще всего в слюнных железах и в мускулатуре кишечника, реже в средней кишке и трахее. Кроме того, этот паразит специфичен и не инфицирует гусениц озимой и капустной совок (Issi & Tkach, 1971). Средние размеры спор данного энтомопатогена 4,2×2,1 мкм (N=20), причём они немного крупнее спор *N. bombycis* (4,04×2,45 мкм, размеры изолята из коллекции ВИЗР (N=30)), но при этом они имеют хорошо выраженную овальную форму. Вторые же споры имеют грушевидную форму. Оказалось, что эта микроспоридия схожа с *N. bombycis* (GenBank AB125664) на 99.9% по мсрРНК, а с типичным представителем рода *Nosema* близка на 99.6% (GenBank D85503) (Таблица 1, Приложение 1 (Таблица 1.2. и 1.3.)) (Hatakeyama et al., 1997; Kazuhiro et al., 2004). Но так как *N. bombycis* способна инфицировать капустную и озимую совок, можно предположить, что это два близкородственных вида, имеющие разные инфекционные свойства (Issi & Tkach, 1971; Kashkarova & Khakhanov, 1980).

Таблица 1. Сходство последовательностей мсрРНК типового видом рода *Nosema* – *N. bombycis* и изолятов, проанализированных в данном исследовании.

№	Название пробы	Сходство последовательностей, в %				
		1	2	3	4	5
1	<i>Nosema bombycis</i> D85503	=	–	–	–	–
2	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Helicoverpa zea</i> South–Western Russia 2019	100	=	–	–	–
3	<i>Nosema hydraeciae</i> ex <i>Hydraecia micacea</i> North–Western Russia 1967	99,7	99,7	=	–	–
4	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Heliothis</i> sp. Russia	99,7	99,7	99,4	=	–
5	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Mamestra brassicae</i> 1962 Russia	97,5	97,5	97,3	97,3	=

Nosema sp. ex *Heliothis* sp. Russia

Микроспоридии из р. *Nosema* были обнаружены в гусенице из р. *Heliothis*. Часть представителей этого рода являются сельскохозяйственными вредителями, такие как люцерновая, гороховая и другие совки. Средний размер спор $4,5 \times 1,9$ мкм (N=10, спор в пробе мало), овальная форма. К сожалению, не удалось найти более полную информацию, но споры из этой совки на 99.9% совпадают с *Nosema rachiplusia* KY126433, выделенной из другого представителя данного семейства – *Rachiplusia ni*. Сходство с типичным представителем данного рода достаточно велико – 99,7% (*N. bombycis* (GenBank AB125664)) (Таблица 1, Приложение 1 (Таблица 1.2. и 1.3.)) (Arneodo & Sciocco-Cap, 2018; Hatakeyama et al., 1997).

Nosema sp. ex *Helicoverpa zea* South-Western Russia 2019

Среди новых сборов за 2017-2021 годы только в одной пробе были обнаружены микроспоридии, в частности в гусенице хлопковой совки из Краснодарского края, собранной в 2019 году. Средние размеры спор данного энтомопатогена $3,9 \times 2,4$ мкм (N=20), что примерно можно соотнести с размерами спор *N. bombycis* ($4,04 \times 2,45$ мкм – размеры изолята из коллекции ВИЗР (N=30)). При этом форма спор варьирует: энтомопатоген из хлопковой совки имеет овальную форму, а из тутового шелкопряда – грушевидную. Генетически этот протист близок на 100% к *N. bombycis* – типовому виду GenBank AB125664 (Таблица 1, Приложение 1 (Таблица 1.2. и 1.3.)). Кроме того, инфекционные свойства данного изолята отличаются от типичного – в частности данный вариант способен заражать только до 10% гусениц кукурузного мотылька, в то время как *Nosema bombycis* поражает гусениц в 100% случаев (Hatakeyama et al., 1997; Kononchuk et al., 2022).

Nosema sp. ex *Mamestra brassicae* 1962 Russia; *Vairimorpha* sp. ex *Mamestra brassicae* North-Western Russia 1967

Капустная совка питается крестоцветными и бобовыми, но особенно предпочитает капусту. А при массовых вспышках численности может поражать и другие растения, вплоть до плодовых деревьев. Из гусениц *M. brassicae* было выделено два изолята, принадлежащие к двум родам: *Nosema* и *Vairimorpha*. В первом образце были обнаружены цилиндрической формой споры размером около $5,45 \times 2,6$ мкм (N=20). Его последовательность на 100% совпала с *V. austropotamobii* (MF344634), но форма и размер спор сильно отличались друг от друга. Судя по морфологии спор и нуклеотидной последовательности, это *Nosema*

polyvora (см. раздел №3.1.3), выделенная из капустной белянки (Таблица 1, Приложение 1 (Таблица 1.2. и 1.3.)) (Issi & Maslennikova, 1966; Исси, 1963). Эти данные позволяют предположить, что *N. polyvora* имеет более широкий круг хозяев, и, возможно, эта микроспоридия может стать более актуальной в качестве биологического препарата, для борьбы с вредителями капусты. Сходство с типовым видом данного рода находится на уровне 97,7% (Таблица 1) (Hatakeyama et al., 1997; Pretto et al., 2018). Другие гусеницы *M. brassicae* были собраны в Москве в 1967 году, в них также были обнаружены споры (средний размер 4,2×2,05 мкм (N=20)), но другого рода, которые близки к *Vairimorpha (Nosema) vespula* (сходство с представленной в GenBank последовательностью U11047 составляет 99.9%). С типичным видом – *Vairimorpha necatrix* (Y00266) споры имели сходство 95,1% (Таблица 2, Приложение 1 (Таблица 1.2. и 1.4.)) (Baker et al., 1995; Vossbrinck et al., 1987).

Таблица 2. Сходство последовательностей мсрРНК типового видом рода *Vairimorpha* – *Vairimorpha necatrix* и изолятов, проанализированных в данном исследовании.

№	Название пробы	Сходство последовательностей, в %		
		1	2	3
1	<i>Vairimorpha necatrix</i> Y00266	=	–	–
2	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Mamestra brassicae</i> North-Western Russia 1967	95,1	=	–
3	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Agrotis segetum</i> Russia	94,7	97,2	=

Vairimorpha sp. ex *Agrotis segetum* Russia

В 1967 году были обнаружены октоспоры из озимой совки *A. segetum*, которые назвали *Thelohania* sp. за их октоспоровую форму. Впоследствии оказалось, что эта микроспоридия принадлежит другому роду – *Vairimorpha*, так как выяснили, что у них есть несколько спорогоний в жизненном цикле (Sokolova & Entzeroth, 1995). В пробе 1967 г. не удалось обнаружить споры при светомикроскопическом исследовании, но молекулярный анализ показал присутствие энтомопатогена. В филогенетическом дереве этот изолят занял своё место среди представителей р. *Vairimorpha*. Этот изолят достаточно сильно отдалён от типового вида *Vairimorpha necatrix* (Y00266) – сходство 94,7%, а генетически ближе всего к *V. (Nosema) sp.* из *Apis cerana* (LC510169) – сходство последовательностей составляет 98.51%, при этом хозяин этого изолята относится к другому семейству – Apidae (Таблица 2, Приложение 1 (Таблица 1.2. и 1.4.)). Среди чешуекрылых наибольшее сходство (98.4%)

отмечено для изолята *V. (Nosema) thomsoni*, выделенного из *Choristoneura conflictana* EU219086 из сем. Tortricidae (Kyei-Poku et al., 2008; Takashima et al., 2021; Vossbrinck et al., 1987).

Microsporidium sp. ex *Agrotis segetum* Uzbekistan 1967

Эта микроспоридия была обнаружена также в озимой совке *A. segetum*, но в другой стране – Узбекистан, 1967 год. Эти споры напоминают по форме и размерам ($2,73 \times 1,79$ мкм (N=20), овальная форма) споры из р. *Endoreticulatus*, но молекулярно-филогенетический анализ показал, что они, вместе с *Microsporidium* sp. (KY615713) из *Eilema complanum* с высокой поддержкой (100%) образуют кладу (Kireeva et al., 2021; Pilarska et al., 2017).

Endoreticulatus sp. ex *Agrotis exclamationis* Russia 1968

Микроспоридии из восклицательной совки также важны для развития биологических методов борьбы с этим подгрызающим вредителем сельскохозяйственных культур. В гусеницах были обнаружены споры из р. *Endoreticulatus*. Средний размер и форма спор были типичные для данного рода – $3,05 \times 1,58$ мкм (N=20) (Приложение 5, Рисунок 5.1.). Последовательности, полученные для этих изолятов, показали высокое генетическое сходство (99.75%) с последовательностями изолята из *Spodoptera litura* из Японии (LC422301) (Imura et al., 2019). Кроме изучаемого нами изолята из *A. exclamationis*, в GenBank обнаружена очень близкая последовательность (U10342 – сходство составляет 99.6%) из этого же хозяина – *E. (Pleistophora) sp.* (Tsai et al., 2003). Сходство же с типовым видом также достаточно велико – около 99,2% (Таблица 3, Приложение 1 (Таблица 1.2. и 1.5.)) (Baker et al., 1995).

Таблица 3. Сходство последовательностей мсрРНК типового видом рода *Endoreticulatus* – *Endoreticulatus schubergi* и изолятов, проанализированных в данном исследовании.

№	Название проб	Сходство последовательностей, в %		
		1	2	3
1	<i>Endoreticulatus schubergi</i> L39109	=	–	–
2	<i>Endoreticulatus</i> sp. ex <i>Helicoverpa armigera</i> South-Western Russia 1966	99,5	=	–
3	<i>Endoreticulatus</i> sp. ex <i>Agrotis exclamationis</i> Russia 1968	99,2	99,7	=

Endoreticulatus sp. ex *Helicoverpa armigera* South-Western Russia 1966

Изолят из хлопковой совки *H. armigera*, найденной в Ставрополе 1966 году, первоначально идентифицировали как относящийся к р. *Nosema*. Но молекулярно-генетический анализ показал, что эта микроспоридия принадлежит к другому роду – *Endoreticulatus*. Полученная последовательность достаточно близка к последовательности типового вида (L39109) – 99,5%, но ближайшим родственником этого изолята выступает *E. (Pleistophora)* sp. из *Spodoptera litura* из Японии (99.9%) (Таблица 3, Приложение 1 (Таблица 1.2. и 1.5.)) (Hidetoshi & Timothy, 1995; Imura et al., 2019).

По результатам проведенных исследований получены 9 сиквентов мсрРНК микроспоридий, которые в большинстве своём представляют собой новые изоляты. В основном они принадлежат к трём родам: *Nosema*, *Vairimorpha* и *Endoreticulatus*. Большинство этих патогенов было описано ранее в литературе, но молекулярные данные позволили более детально уточнить положение, а также выявить новых хозяев для этих видов.

3.1.2. Филогенетическая реконструкция микроспоридий, выделенных из представителей сборной группы дендрофаги.

Новые сборы гусениц-дендрофагов проводили коллеги в 2017 году в Новосибирской области. В этот год наблюдали массовую вспышку численности боярышницы в Новосибирской области и Республике Алтай (Рисунок 4).

При ревизии коллекции ВИЗР были отобраны 21 пробы, из которых только в 14 были обнаружены микроспоридии при микрокопировании полученных мазков. Для молекулярно-генетических исследований из всех проб была экстрагирована геномная ДНК, но только 11 изолятов были пригодны для последующих манипуляций. Среди хозяев в основном выступал непарный шелкопряд (*Erebidae: Lymantria*), но были представители и из других семейств – *Erebidae*, *Thaumetopoeidae* и *Lasiocampidae* (Рисунок 4).

На основе доступных последовательностей мсрРНК микроспоридий из GenBank и полученных нами последовательностей была построена филогенетическая реконструкция для микроспоридий, выделенных из представителей листогрызущих дендрофагов. Все последовательности, используемые в данной работе, более подробно описаны в Приложении 2 (Таблица 2.1.). Основные результаты, полученные светомикроскопическими и молекулярными методами, отражены в Приложении 2 (Таблица 2.2.). Также в Приложении 2 в Таблицах 2.3.-2.4. представлены дополнительные сведения о сходстве и

генетическом расстоянии между всеми проанализированными последовательностями мсрРНК. Светомикроскопические изображения спор микроспоридий из коллекции ВИЗР и новых сборов насекомых за 2017-2021 годы представлены в Приложении 5 (Рисунок 5.1.).

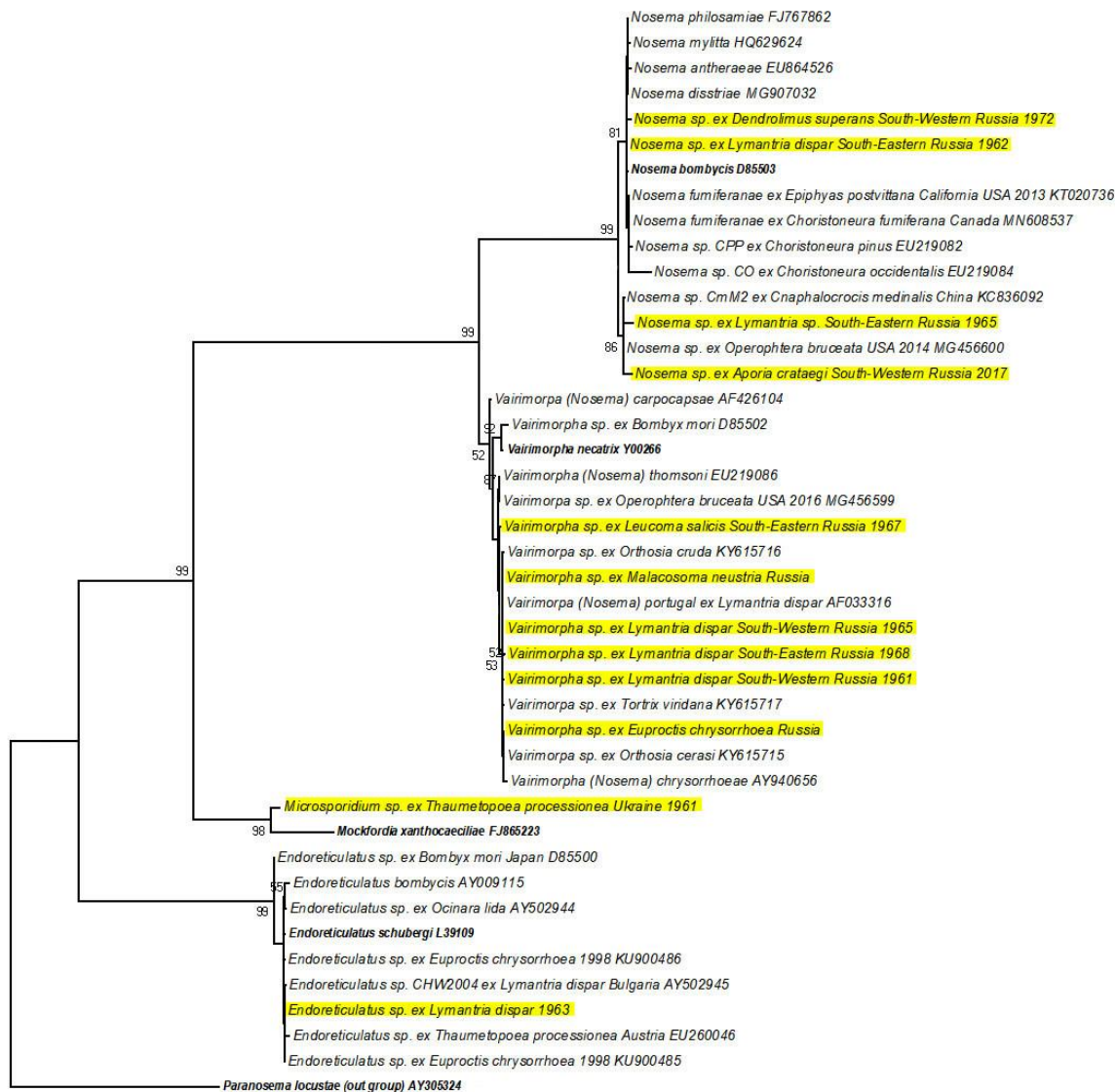


Рисунок 4 Филогенетическая реконструкция на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена мсрРНК микроспоридий, выделенных из представителей листогрызущих дендрофагов.

Филограмма построена методом максимального подобия в приложении MEGA7 с использованием модели Tamura-Nei. Числовые индикаторы на развилках указывают бутстрэп-поддержку ветвей.

Полужирным шрифтом выделены типовые виды для каждого рода микроспоридий. **Желтым фоном** отмечены изоляты, последовательности которых получены в настоящей работе.

Endoreticulatus sp. ex *Lymantria dispar* 1963

Endoreticulatus schubergi - одна из самых известных микроспоридий из р. *Endoreticulatus* (*Pleistophora*), типовой вид данного рода, впервые выделенный из златогузки *Euproctis chrysorrhoea* и непарного шелкопряда (Weiser, 1962). Схожих микроспоридий выделяли из разных семейств чешуекрылых – Noctuidae, Pieridae, Erebidae, при этом их морфология совпадала, но инфекционные свойства отличались. Каждый из изолятов был способен инфицировать определённый круг хозяев. Например, *E. schubergi aporiae* заражал трёх представителей из р. *Pieris* и златогузку, но не был патогенным для непарного шелкопряда. Предполагается, что именно златогузка была исходным хозяином для *E. schubergi*, так как все описанные изоляты могут инфицировать её личинок (Исси, 1971, 2002). В коллекции ВИЗР сохранился один образец *E. schubergi* из непарного шелкопряда, подходящий для молекулярно-генетических исследований. Полученная последовательность продемонстрировала высокое сходство (99,6%) с последовательностью типового вида *E. schubergi* (GenBank L39109). Наибольшее сходство (99.9%) обнаружили с последовательностью изолята *Endoreticulatus* sp. LC422301, выделенного из *Spodoptera litura* (Imura et al., 2019). При сравнении нуклеотидных последовательностей с другими изолятами микроспоридий из рода *Endoreticulatus*, выделенных из представителей семейств чешуекрылых насекомых, можно обнаружить то, что все изоляты почти идентичны между собой (от 99,4% до 100%). При этом они были обнаружены в разных насекомых-хозяевах, а также в разных регионах. Эти данные, вероятно, свидетельствуют о том, что *Endoreticulatus schubergi* широко распространён, а также имеет широкий круг хозяев. (Таблица 4, Приложение 2 (Таблица 2.2.) (Baker et al., 1995; Pilarska et al., 2015; Tsai et al., 2003; Wang et al., 2005). Единственный изолят, который более существенно отличается от всех, выделен из походного шелкопряда *Thaumetopoea processionea* в Австрии. На первый взгляд, инфекционные свойства достаточно схожи у этих микроспоридий, но изолят из походного шелкопряда по сравнению с непарным шелкопрядом оказался более высоковирулентным: обычно он вызывал гибель личинок, но иногда появлялись и способные откладывать яйца взрослые особи с тканями, полностью заполненными спорами (Hoch et al., 2008, 2009).

Таблица 4. Сходство последовательностей мсрРНК типового вида рода *Endoreticulatus* – *Endoreticulatus schubergi*, других изолятов, последовательности которых доступны в GenBank, и изолятом, последовательность которого получена в данном исследовании (**выделен полужирным шрифтом**).

№	Название проб	Сходство последовательностей, в %								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	<i>Endoreticulatus schubergi</i> L39109	=	–	–	–	–	–	–	–	–
2	<i>Endoreticulatus</i> sp. ex <i>Euproctis chrysorrhoea</i> 1998 KU900485	99,5	=	–	–	–	–	–	–	–
3	<i>Endoreticulatus</i> sp. ex <i>Lymantria dispar</i> 1963	99,5	100	=	–	–	–	–	–	–
4	<i>Endoreticulatus</i> sp. ex <i>Bombyx mori</i> Japan D85500	99,5	99,7	99,7	=	–	–	–	–	–
5	<i>Endoreticulatus</i> sp. ex <i>Ocinara lida</i> AY502944	99,3	99,4	99,4	99,4	=	–	–	–	–
6	<i>Endoreticulatus</i> sp. ex <i>Euproctis chrysorrhoea</i> 1998 KU900486	99,5	99,8	99,8	99,7	99,4	=	–	–	–
7	<i>Endoreticulatus</i> sp. CHW2004 ex <i>Lymantria</i> <i>dispar</i> Bulgaria AY502945	99,4	99,8	99,8	99,5	99,3	99,7	=	–	–
8	<i>Endoreticulatus bombycis</i> AY009115	99,4	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,4	=	–
9	<i>Endoreticulatus</i> sp. ex <i>Thaumetopoea processionea</i> Austria EU260046	98,5	98,9	98,9	98,6	98,3	98,7	98,7	98,5	=

Nosema sp. ex *Lymantria dispar* South-Eastern Russia 1962

Гусеницы непарного шелкопряда были собраны в Самарской области 1962 году. В этот период произошла массовая вспышка численности *L. dispar*, но на следующий год популяция резко сократилась. Оказалось, что большая часть гусениц была поражена микроспоридиями, особенно сильно были инфицированы слюнные железы. Средний размер спор примерно 4,14×2,35 мкм (N=15, спор сохранилось малое количество), их форма грушевидная. На филогенетическом дереве этот изолят расположен ближе всего к типовому виду рода *Nosema* (GenBank D85503) (Hatakeyama et al., 1997), имея сходство последовательности 99.8% (Таблица 5, Приложение 2 (Таблица 2.2. и 2.3.)).

Таблица 5. Сходство последовательностей мсрПНК типового вида рода *Nosema* – *N. bombycis* и изолятов, проанализированных в данном исследовании.

№	Название проб	Сходство последовательностей, в %				
		1	2	3	4	5
1	<i>Nosema bombycis</i> D85503	=	–	–	–	–
2	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Lymantria dispar</i> South-Eastern Russia 1962	99,8	=	–	–	–
3	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Dendrolimus superans</i> South-Western Russia 1972	99,5	99,3	=	–	–
4	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Lymantria</i> sp. South-Eastern Russia 1965	97,5	97,3	97	=	–
5	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Aporia crataegi</i> South-Western Russia 2017	97,2	97	96,7	99,3	=

Nosema sp. ex *Lymantria* sp. South-Eastern Russia 1965

В отличие от других проб, именно этот образец хранился не в дистиллированной воде, а в виде заспиртованных гусениц из р. *Lymantria* (вероятно, что это непарный шелкопряд). При микрокопировании гусениц *L. dispar* из Свердловска (1965 год) не было обнаружено спор микроспоридий, при этом оказалось, что ДНК энтомопатогена сохранилась. Этот изолят на 99,9% схож с *Nosema (Vairimorpha) austropotamobii* (GenBank MF344634) (Pretto et al., 2018). Сходство с типовым видом р. *Nosema* составляет 97,5% (D85503) (Hatakeyama et al., 1997) (Таблица 5, Приложение 2 (Таблица 2.2. и 2.3.)).

Nosema sp. ex *Dendrolimus superans* South-Western Russia 1972

В сборах вредителя хвойных пород - сибирского шелкопряда из Свердловска (1972 год) были обнаружены микроспоридии. Спор в пробе было достаточно мало, примерный размер – 4,53×2,8 мкм (N=10). Первоначально эту пробу определили как *Nosema* sp., что подтвердилось при молекулярно-генетическим исследованием. Ближайшим родственником этого изолята оказалась *N. bombycis* (GenBank MZ314703) (Franzen & Müller, 1999) из тутового шелкопряда - сходство мсрПНК составило 99,7%, сходство с другим изолятом *N. bombycis* составило 99,3% (D85503) (Hatakeyama et al., 1997) (Таблица 5, Приложение 2 (Таблица 2.2. и 2.3.)).

Nosema sp. ex *Aporia crataegi* South-Western Russia 2017

В 2017 году Новосибирской области в гусеницах боярышницы были обнаружены споры, причем только часть насекомых (около 30%) была инфицирована. Эти

микроспоридии были идентичны изоляту *Nosema* sp. из *Snaphalocrocis medinalis*, GenBank KC836092 и для данного энтомопатогена известна высокая инфекционность в отношении тутового шелкопряда (Huang et al., 2013). Сходство же с типовым видом рода *Nosema* составляет 97,2% (D85503) (Hatakeyama et al., 1997) (Таблица 5, Приложение 2 (Таблица 2.2. и 2.3.)).

Vairimorpha sp. ex *Leucoma salicis* South-Eastern Russia 1967

Ещё одна проба была собрана в Новосибирской области в 1967 году из ивовой волнянки, гусеницы которой наносят вред ивам и тополям. Средний размер спор составляет 4,79×2,86 мкм (N=20), а их форма в основном овальная, реже встречается и грушевидная. Этот изолят совпадает на 99.6% с другими, доступными в GenBank изолятами – *Nosema thomsoni* из *Choristoneura conflictana* (GenBank EU219086) и *Microsporidia* sp. из *Operophtera bruceata* (GenBank MG456589) из Северной Америке, при этом схожесть последовательности с типовым видом рода *Nosema* составляет 96,2% (GenBank D85503) (Таблица 6, Приложение 2 (Таблица 2.2. и 2.4.)) (Donahue et al., 2019; Kyei-Poku et al., 2008; Vossbrinck et al., 1987).

Таблица 6. Сходство последовательностей мсрПНК типового вида рода *Vairimorpha* – *Vairimorpha necatrix* и изолятов, проанализированных в данном исследовании.

№	Название проб	Сходство последовательностей, в %						
		1	2	3	4	5	6	7
1	<i>Vairimorpha necatrix</i> Y00266	=	–	–	–	–	–	–
2	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Leucoma salicis</i> South-Eastern Russia 1967	96,2	=	–	–	–	–	–
3	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Malacosoma neustria</i> Russia	96,1	98,9	=	–	–	–	–
4	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Lymantria dispar</i> Russia 1965	95,9	98,8	99,8	=	–	–	–
5	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Lymantria dispar</i> South-Western Russia 1961	95,9	98,8	99,8	99,7	=	–	–
6	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Euproctis chryorrhoea</i> Russia	95,9	98,8	99,8	99,7	99,7	=	–
7	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Lymantria dispar</i> Russia	95,8	98,7	99,7	99,8	99,6	99,6	=

Vairimorpha sp. ex *Lymantria dispar* Russia 1965; *Vairimorpha* sp. ex *Lymantria dispar* South-Western Russia 1961; *Vairimorpha* sp. ex *Lymantria dispar* Russia

Изоляты *Vairimorpha* sp. были выделены из трех образцов непарного шелкопряда *L. dispar*. Микроспоридии были обнаружены в слюнных железах, жировом теле и даже в яйцах насекомых. Из всех образцов была экстрагирована геномная ДНК, и полученные последовательности показали полное соответствие гомологичному участку *Vairimorpha lymantriae* (GenBank AF141129) (Vavra et al., 2006), на основании чего можно предположить, что они представляют собой географические изоляты данного вида. Сходство с типовым видом рода *Vairimorpha* – *V. necatrix* (GenBank Y00266) (Maddox et al., 1999) составило 96% (Таблица 6, Приложение 2 (Таблица 2.2. и 2.4.)).

Vairimorpha sp. ex *Malacosoma neustria* Russia

Из кольчатого непарного шелкопряда был выделен изолят, последовательность мсрПНК, которого имела 100%-ную идентичность с последовательностями *Vairimorpha lymantriae* (GenBank AF033315) (Maddox et al., 1999) и секвенированными образцами из коллекции ВИЗР (три изолята *Vairimorpha* sp. ex *L. dispar*, см. выше). В этой пробе не удалось идентифицировать споры с помощью световой микроскопии (Таблица 6, Приложение 2 (Таблица 2.2. и 2.4.)).

Vairimorpha sp. ex *Euproctis chrysorrhoea* Russia

Чаще всего в златогузке находили споры, принадлежащие к роду *Endoreticulatus* (*Plistophora*), которые описывали как *E. schubergi* (Baker et al., 1995). Но в данном сборе были обнаружены микроспоридии, споры которых имели достаточно крупный размер (4,89×2,19 мкм) и овальную форму. Молекулярный анализ показал, что исследуемый изолят принадлежит к р. *Vairimorpha* и на 99,9% близок к *V. lymantriae* (GenBank AF033315). Сходство с типовым видом рода – *V. necatrix* (GenBank Y00266) составляет 96,2% (Таблица 6, Приложение 2 (Таблица 2.2. и 2.4.)) (Maddox et al., 1999; Vossbrinck et al., 1987). Вероятно, как и микроспоридии, выделенные из непарного и кольчатого шелкопрядов, этот энтомопатоген также представляет собой географического изолята *V. lymantriae*, так как оба вида гусениц способны существовать в одних и тех же местообитаниях.

Microsporidium sp. ex *Thaumetopoea processionea* Ukraine 1961

Из дубового походного шелкопряда, собранного в Закарпатье (Украина) в 1961 году, были выделены споры, которые имели овальную форму и размер около 3,37×2,08 мкм (N=20). Полученная для этого изолята последовательность мсрПНК на 88.96% схожа с последовательностью *Mockfordia xanthocaeciliae* из *Xanthocaecilius sommermanae* (GenBank FJ865223). На филогенетическом дереве этот изолят находится вне клады, соответствующей семейству Nosematidae (Kireeva et al., 2021; Sokolova et al., 2010).

В целом, в ходе нашей работы получено 12 последовательностей микроспоридий, выделенных из представителей дендрофагов. Подавляющее большинство из них принадлежит к родам *Nosema*, *Vairimorpha* и *Endoreticulatus*. Был обнаружен изолят, который не относится к семейству Nosematidae и формирует на дереве высоко поддержанную кладу с *Mockfordia xanthocaeciliae*, при этом последовательности этих микроспоридий сходны лишь на 89%, что даёт возможность предположить, что *Microsporidium* sp. ex *Thaumetopoea processionea* может относиться к потенциально новому роду микроспоридий.

3.1.3. Молекулярно-филогенетический анализ микроспоридий, выделенных из представителей сем. Pieridae

Наибольшее количество гусениц из этого семейства было собрано в 2019-2021 годы в Новгородской и Ленинградской областях, а также в Китае (сбор гусениц производил Токарев Ю.С.). За весь период работы было проанализировано более 50 гусениц капустной и репной белянки, причём в большинстве из них были найдены споры. Кроме того, сборы проводили и в Новосибирской области, в частности, там были собраны гусеницы боярышницы в 2017 году (гусениц собирал Токарев Ю.С.) (см раздел 3.1.2.).

Было проанализировано 22 пробы из коллекции ВИЗР, но только в 7 были обнаружены споры микроспоридий с помощью световой микроскопии. Генетически все паразиты принадлежали к двум родам – *Vairimorpha* и *Nosema* (Рисунок 5). Более подробные данные о размере, форме спор, а также о сходстве полученных последовательностей с типовыми видами представлены в Приложении 3 (Таблица 3.2.). Также в Приложении 3 в Таблицах 2.3.-2.4. представлены сведения о сходстве и генетических расстояниях всех проанализированных последовательностях, которые не вошли в данный раздел. Светомикроскопические изображения спор микроспоридий из

коллекции ВИЗР и новых сборов насекомых за 2017-2021 годы представлены в Приложении 5 (Рисунок 5.1).

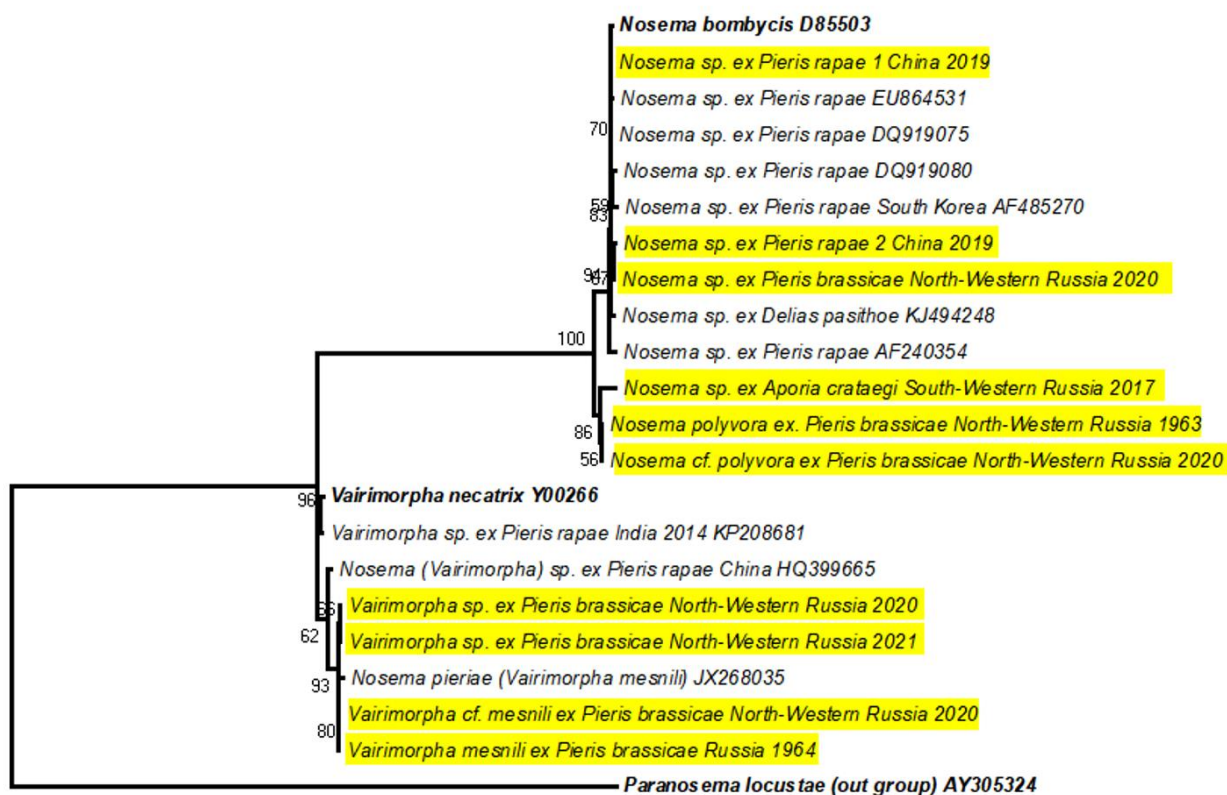


Рисунок 5. Филогенетическая реконструкция на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена мсрРНК микроспоридий, выделенных из представителей сем. Pieridae

Филограмма построена методом максимального подобия в приложении MEGA7 с использованием модели Tamura-Nei. Числовые индикаторы на развилках указывают бутстрэп-поддержку ветвей.

Полужирным шрифтом выделены типовые виды для каждого рода микроспоридий. **Желтым фоном** отмечены изоляты, последовательности которых получены в настоящей работе.

Nosema cf. polyvora ex *Pieris brassicae* North-Western Russia 2020; *Nosema polyvora* ex *Pieris brassicae* North-Western Russia 1963

Nosema polyvora из капустной белянки – одна из наиболее значимых микроспоридий для регуляции численности *Pieris brassicae*. Она характеризуется цилиндрической формой

спор. Активное изучение этой микроспоридии началось в 50-х годах в России. Она вызывает массовую гибель капустной белянки в природных условиях, а также в опытах даже при низкой дозировке спор. Кроме того, данный изолят также находили в наездниках *Cotesia glomerata*, паразитирующих на гусеницах капустной и репной белянок, а также в боярышнице (Issi & Maslennikova, 1966). Но в 70-х годах ряд учёных высказали предположение, что *N. polyvora* – это синоним *V. mesnili* (Sprague, 1977). После этого в литературе не встречается упоминаний об этой микроспоридии. В 2020 году на территории Ленинградской и Новгородской областей были вновь обнаружены эти энтомопатогены. Сходство последовательности обнаруженного изолята с типовым видом рода *Nosema* (GenBank D85503) составило 97,7% (Таблица 7, Приложение 3, 5 (Таблица 3.2 и 3.3., Рисунок 5.1.)), а сходство с *Vairimorpha austropotamobii* (GenBank MF344634) из *Austropotamobius pallipes complex* (Pretto et al., 2018) составило 100%. Однако морфологически изолированная нами *Nosema* cf. *polyvora* и *V. austropotamobii* сильно отличаются. Мы провели сравнительный анализ современного и архивных изолятов. В коллекции ВИЗР было обнаружено несколько хорошо сохранившихся образцов, подходящих для морфологических и молекулярно-генетических исследований. Оказалось, что современные и архивные изоляты абсолютно идентичны по секвенированному фрагменту мсрРНК, а также по форме и размерам спор.

Таблица 7. Сходство последовательностей мсрРНК типового видом рода *Nosema* -*N. bombycis* и изолятов, проанализированных в данном исследовании.

№	Название проб	Сходство последовательностей, в %						
		1	2	3	4	5	6	7
1	<i>Nosema bombycis</i> D85503	=	–	–	–	–	–	–
2	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Pieris rapae</i> 1 China 2019	100	=	–	–	–	–	–
3	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 2020	99,8	99,8	=	–	–	–	–
4	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Pieris rapae</i> 2 China 2019	99,6	99,6	99,8	=	–	–	–
5	<i>Nosema</i> cf. <i>polyvora</i> ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 2020	97,7	97,7	97,5	97,3	=	–	–
6	<i>Nosema polyvora</i> ex. <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 1963	97,7	97,7	97,5	97,3	100	=	–
7	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Aporia crataegi</i> South-Western Russia 2017	97,3	97,3	97,2	97,0	99,3	99,3	=

Nosema sp. ex *Pieris brassicae* North-Western Russia 2020

Кроме *N. polyvora* в 2020 году в сборах *P. brassicae* был обнаружен другой изолят данного рода в Ленинградской области. Морфологически эта микроспоридия ничем не отличалась от *V. mesnili* (форма спор и их размер совпали при сравнении образцов из коллекции ВИЗР и из новых сборов насекомых за 2020-2021 годы), но генетически оказалось, что этот изолят принадлежит к другому роду – *Nosema*, в частности он на 100% идентичен с *Nosema* sp. из карадрины *Spodoptera exigua* (GenBank KT336240) (Hatakeyama et al., 1997; Xing et al., 2019). Можно предположить, что эта микроспоридия перешла на капустную белянку от карадрины (*Spodoptera exigua*), так как в месте сбора прорастали вместе капуста, свёкла, арахис и редис – культуры, на которых питаются гусеницы карадрины. С типовым видом данного рода сходство было также достаточно высоким – 99,8% (GenBank D85503) (Таблица 7, Приложение 3 (Таблица 3.2 и 3.3.)).

Nosema sp. ex *Pieris rapae* 1 China 2019; *Nosema* sp. ex *Pieris rapae* 2 China 2019

Сборы гусениц и куколок репной белянки проводили в России и в Китае (Гуанчжоу) (в последнем случае сбор производил в 2019 г. Токарев Ю. С.). Из двух мест были собраны 6 куколок и 5 гусениц репной белянки. В одной из гусениц было найдено огромное количество спор – около 220 млн. Оказалось, что эта микроспоридия принадлежит к р. *Nosema*, а ближайшим родственником по мсрПНК (сходство 99,9%) является типовой вид *N. bombycis* (GenBank D85503) (Hatakeyama et al., 1997) (Таблица 7, Приложение 3 (Таблица 3.2 и 3.3.)). Во всех остальных гусеницах энтомопатогенов не обнаружили. При микроскопировании в куколках репной белянки не наблюдали никаких спор микроспоридий, при этом с помощью молекулярного анализа в одном из образцов детектировали инфекцию. Наиболее высокое сходство (99,9%) последовательность этого изолята имела с последовательностью *N. fumiferanae* (GenBank KT020736) (Hopper et al., 2016), выделенной из коричневой яблонной моли, а сходство с типовым видом р. *Nosema* было около 99,6% (GenBank D85503) (Hatakeyama et al., 1997) (Таблица 7, Приложение 3, 5 (Таблица 3.2 и 3.3., Рисунок 5.1.)).

Vairimorpha cf. *mesnili* ex *Pieris brassicae* North-Western Russia 2020; *Vairimorpha mesnili* ex *Pieris brassicae* Russia 1964; *Vairimorpha* sp. ex *Pieris brassicae* North-Western Russia 2021; *Vairimorpha* sp. ex *Pieris brassicae* North-Western Russia 2020

Одной из самых известных микроспоридий, выделенных из насекомых, является *Vairimorpha (Nosema) mesnili*, которую находят в капустной, репной и горчичной белянках, а также в их паразитоиде *Cotesia glomerata* (Larsson, 1979). Она характеризуется наличием двух спорогоний, что характерно для р. *Vairimorpha*. Развивается этот энтомопатоген во всех тканях (Исси, 2002). Из коллекции ВИЗР было проанализировано несколько проб с данной микроспоридией и только одна из них оказалась пригодна для молекулярно-генетических исследований. Этот изолят был собран в 1964 году и показал сходство (99,9%) с *Nosema pieriae (V. mesnili)* (GenBank JX268035) (Yaman et al., 2014;). Кроме архивного образца, эта микроспоридия также была обнаружена в новых сборах. В 2020 году на территории Ленинградской области были обнаружены 4 гусеницы, которые были поражены спорами этого энтомопатогена, причём генетически микроспоридии были практически идентичны между собой (сходство от 99,3% до 99,8%) и изолятом из GenBank *Nosema pieriae (V. mesnili)* JX268035 (Yaman et al., 2014). А в 2021 году на том же месте были найдены 5 гусениц, пораженные микроспоридиями. В трех гусеницах были обнаружены октоспоры – продукты второй спорогонии, которая характерна для данного энтомопатогена, но наблюдается довольно редко. Генетический анализ показал сходство на 99.35% этого энтомопатогена с изолятом из GenBank JX268035 (Таблица 8) (Yaman et al., 2014). Вероятно, все эти образцы представляют собой географические изоляты *Vairimorpha mesnili*.

Таблица 8. Сходство последовательностей мсрПНК типового вида рода *Vairimorpha* – *Vairimorpha necatrix*, (*Nosema pieriae (Vairimorpha mesnili)* из *Pieris brassicae* (выделен полужирным шрифтом)) и изолятов, проанализированных в данном исследовании.

№	Название проб	Сходство последовательностей, в %					
		1	2	3	4	5	6
1	<i>Vairimorpha necatrix</i> Y00266	=	–	–	–	–	–
2	<i>Vairimorpha</i> cf. <i>mesnili</i> ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 2020	96,6	=	–	–	–	–
3	<i>Vairimorpha mesnili</i> ex <i>Pieris brassicae</i> Russia 1964	96,6	100	=	–	–	–
4	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 2021	96,4	99,4	99,4	=	–	–
5	<i>Nosema pieriae (Vairimorpha mesnili)</i> JX268035	96,4	99,8	99,8	99,3	=	–
6	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 2020	96,4	99,4	99,4	100	99,3	=

Среди представителей сем. Pieridae встречается ряд вредителей сельскохозяйственных культур и плодовых деревьев. К ним относятся капустная и репная белянки, а также боярышница. Изучением их патогенов занимаются довольно длительное время во всем мире. Кроме того, гусеницы репной белянки представляют собой наиболее удобную модель для изучения паразито-хозяйных отношений с паразитоидом *Cotesia glomerata*, так как бабочки этого вида хорошо размножаются в лабораторных условиях (Tanada, 1955). Несмотря на то, что многие представители из сем. Pieridae являются основными вредителями капусты, а также плодовых деревьев (например, яблони), на данный момент в GenBank представлено небольшое количество последовательностей мсрРНК микроспоридий из этих чешуекрылых (Приложение 3 (Таблица 3.1.)). В результате нашей работы обнаружено 10 изолятов микроспоридий, заражающих представителей семейства Pieridae. Они принадлежат к двум родам – *Nosema* и *Vairimorpha*. Кроме того, нами было четко показано, что *Nosema polyvora* и *Vairimorpha mesnili* – это два разных вида микроспоридий (а не один, как считалось ранее - Sprague, 1977), поражающие капустную белянку, которые иногда могут вызывать у хозяина смешанные инфекции. И в ходе настоящей работы, эти изоляты впервые заняли своё место на филогенетическом древе микроспоридий, поражающих сем. Pieridae.

Таким образом, всего было получено 26 последовательностей микроспоридий из представителей двух семейств чешуекрылых насекомых Pieridae, Noctuidae и сборной группы дендрофагов из коллекции ВИЗР, которые хранились на протяжении 60 лет и при этом оказались пригодными для молекулярно-генетических исследований. Кроме изучения микроспоридий из коллекции, были проведены новые сборы в разных регионах России, а также в Китае и было выделено 7 новых изолятов, часть которых использована для изучения инфекционных свойств микроспоридий.

3.2. Изучение инфекционных свойств микроспоридий р. *Nosema*

Было проведено 37 опытов по искусственному скормливанию спор разных близкородственных микроспоридий гусеницам из разных семейств чешуекрылых насекомых.

На основе полученных результатов и литературных данных были составлены таблицы по интенсивности заражения, локализации паразита в хозяине и влиянию микроспоридий на организм. Показано, что, в основном, органами-мишенями становятся слюнные железы и кишечник. Также часто споры обнаруживали в мальпигиевых сосудах и жировом теле. Среди наиболее заметных признаков микроспоридиоза можно выделить

задержку развития насекомых и неравномерный рост в группе. Кроме того, паразиты вызывали 100% летальный исход при неправильно подобранной дозировке или неправильном выборе гусениц по возрасту. К редким признакам протекающей болезни можно отнести диарею, каннибализм и появление неправильно сформированных куколок. Более подробная информация представлена в Приложении 4, 5 (Таблица 4.1.-4.4., Рисунок 5.2.).

3.2.1. Инфекционные свойства *Nosema bombycis*

Наиболее интересные и полные данные представлены в таблице по *Nosema bombycis*, так как изучением этой микроспоридии в мире занимались длительное время (Приложение 4 (Таблица 4.1.)) (Han & Weiss, 2017; Kashkarova & Khakhanov, 1980; Labert, 1856-1857; Pei et al., 2021; Weiser, 1973).

Гусеницы второго возраста стеблевого мотылька оказались восприимчивы к *N. bombycis* в двух дозировках (0.1 и 1 млн спор на гусеницу). Смертность в контроле была 20% (N=45), в то время как в варианте заражения с дозировкой 1 млн – около 32% (N=43), а при 0,1 млн – смертность была соизмерима с контролем (Рисунок 6, 7). При сокращении численности насекомых не всегда удавалось найти трупы, что можно объяснить как каннибализмом, так и поеданием насекомыми трупов гусениц. В контрольных и в опытных вариантах заражения другими микроспоридиями такого не наблюдалось. Стоит отметить, что пики по скорости окукливания совпадали у всех трёх вариантов. Все гусеницы и куколки были инфицированы энтомопатогеном, причём средняя продуктивность спор (количество спор на насекомое) составила 18 млн на особь (Приложение 4 (Таблица 4.1.)). Кроме того, куколки стеблевого мотылька способны выживать при хранении в холодильнике при +4°C на протяжении 5 месяцев, что обеспечивает лучшее хранение спор для дальнейших исследований.

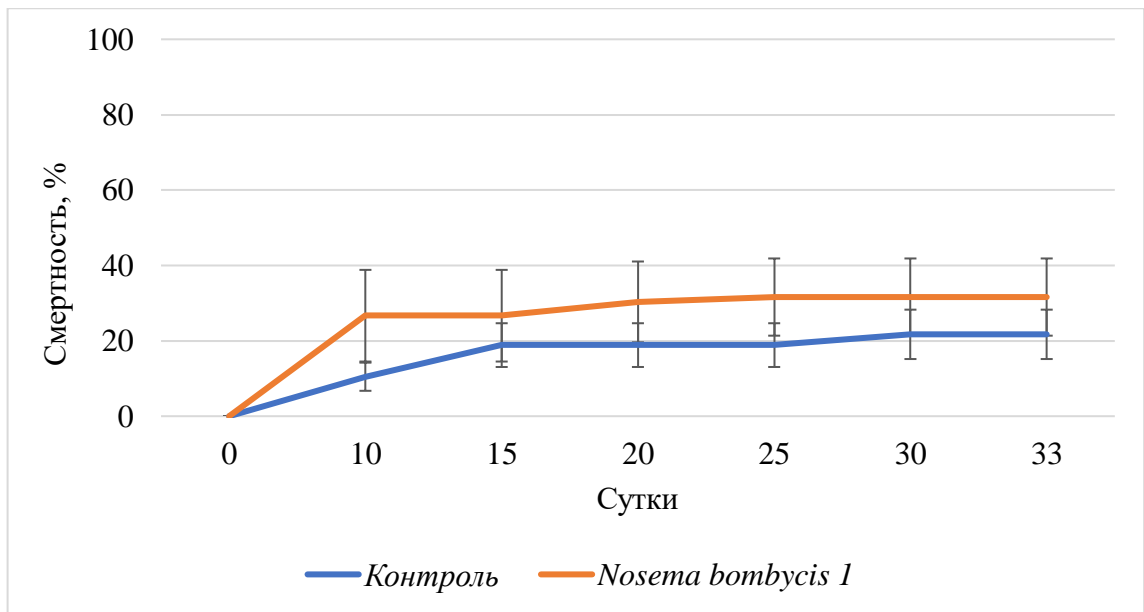


Рисунок 6. Динамика смертности при заражении гусениц второго возраста *Ostrinia scapulalis* спорами *Nosema bombycis* в дозировке 1 млн спор/гусеницу

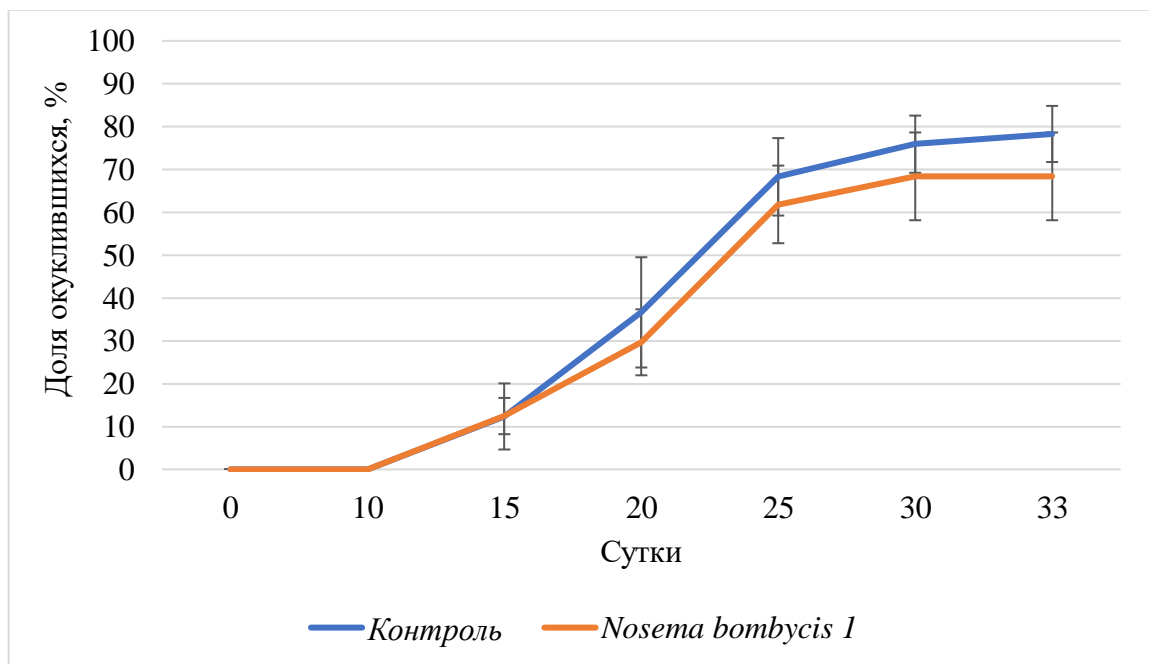


Рисунок 7. Динамика скорости окукливания при заражении гусениц второго возраста *Ostrinia scapulalis* спорами *Nosema bombycis* в дозировке 1 млн спор/гусеницу

Наиболее патогенными оказалась *N. bombycis* для крапивницы. При заражении гусениц второго возраста разными дозами (1, 0,1 и 0,01 млн) наблюдали 100% летальный исход (Рисунок 8). Оказалось, чем меньше изначальная доза, тем дольше срок отмирания подопытных насекомых. Кроме того, была попытка инфицировать гусениц третьего возраста в дозировке 1 млн спор на гусеницу, в этом случае появилась одна куколка

зараженная *N. bombycis*, насекомое окуклилось с отставанием в три дня по сравнению с контролем. Нам не удалось поставить повторности в этом варианте опыта, но полученные данные можно оценить с точки зрения качественного экспериментального теста на оценку восприимчивости крапивницы. Следовательно, для дальнейшей работы необходимо заражать спорами *N. bombycis* личинок третьего возраста с дозировкой 0,1 и 0,01 для обеспечения появления куколок и последующего хранения спор в них. Среднее количество микроспоридий на гусеницу 70 млн (трупы гусениц от третьего возраста и старше). (Приложение 4 (Таблица 4.1.)).

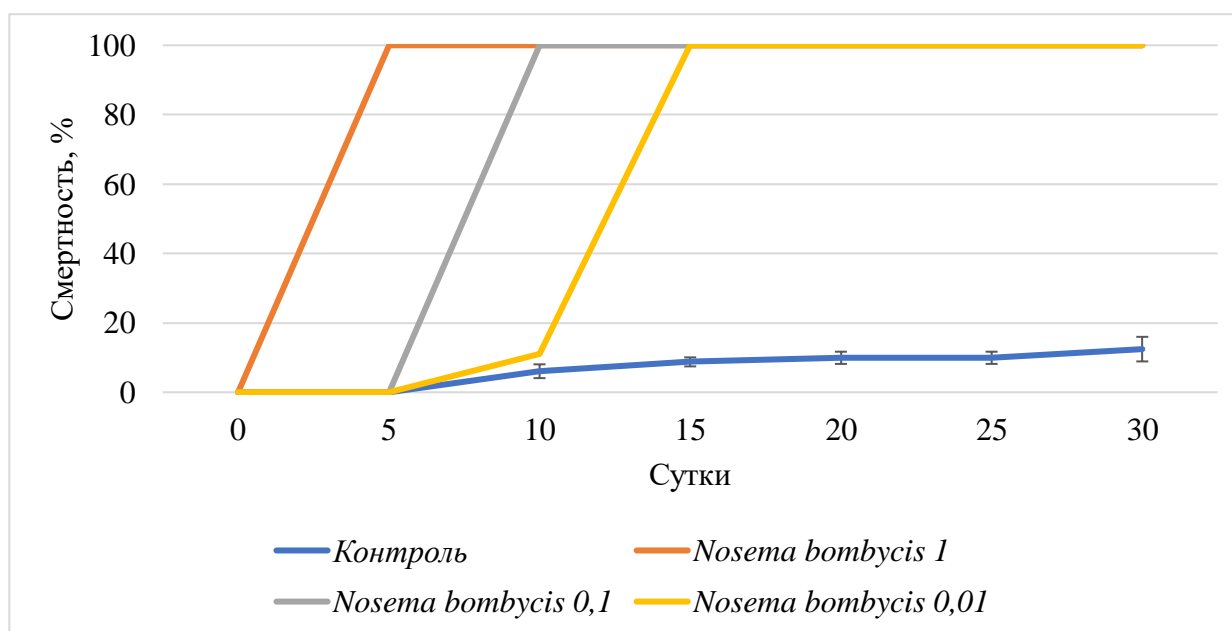


Рисунок 8. Динамика смертности при заражении гусениц второго возраста *Aglais urticae* спорами *Nosema bombycis* в дозировке 1, 0,1 и 0,01 млн спор/гусеницу

Капустная белянка оказалась восприимчива к *N. bombycis*, что соответствует литературным данным (Kashkarova & Khakhanov, 1980). В отличие от других опытов наблюдалась высокая смертность гусениц третьего – четвёртого возрастов по сравнению с контролем при дозировке 1 млн спор на личинку второго возраста (по 30 особей на вариант) (Рисунок 9). В связи с тем, что в опыте не появилось ни одной куколки, была предпринята попытка изменить возраст заражаемых личинок на третий и снизить дозировку до 0,1 и 0,01 млн спор на особь соответственно. За счёт этого удалось получить куколки в среднем в 20% случаев. Также стоит отметить, что снижение дозировки до минимальной из вышеперечисленных сместило смертность гусениц младших возрастов в сторону старших (четвёртый-пятый). Среднее количество спор на гусеницу – 90 млн. (определено при проверке трупов личинок от третьего возраста и куколок) (Приложение 4 (Таблица 4.1.)).

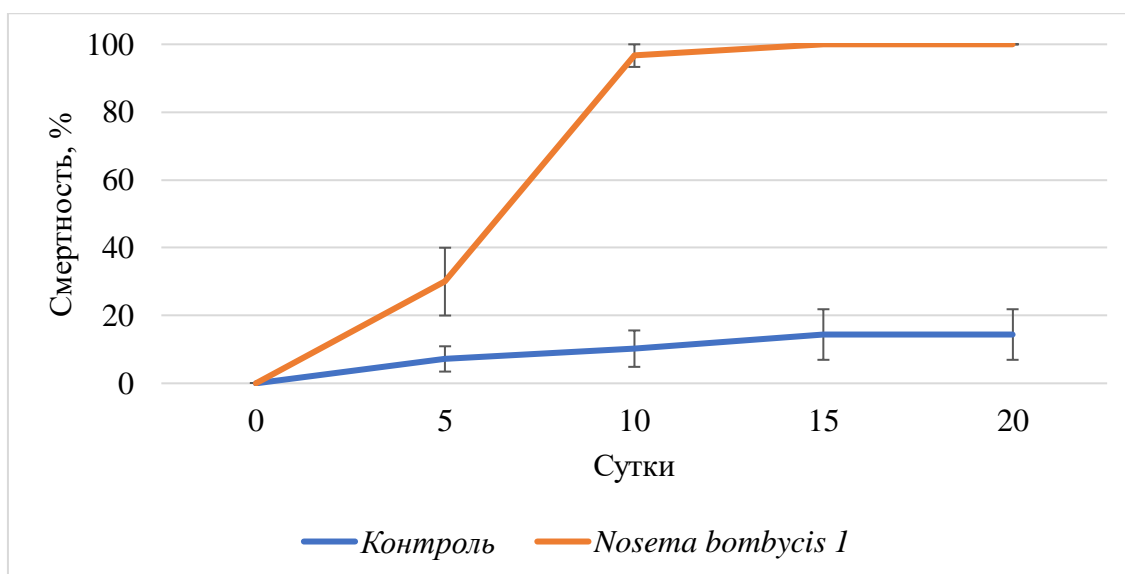


Рисунок 9. Динамика смертности при заражении гусениц второго возраста *Pieris brassicae* спорами *Nosema bombycis* в дозировке 1 млн спор/гусеницу

Был поставлен только 1 пилотный опыт на личинках брюквенницы *Pieris napi* второго возраста с двумя дозировками (1 и 0,1 млн на гусеницу). В связи с тем, что эта бабочка относится к р. *Pieris*, как капустница и репница, было выдвинуто предположение, что эти гусеницы окажутся также высоко восприимчивы к данному энтомопатогену, поэтому были использованы разные дозировки спор. На протяжении всего опыта наблюдали высокую смертность гусениц начиная с первых дней, в частности в варианте с 1 млн спор смертность составляла 80% на 10-е сутки (в то время как, в другом варианте с меньшим количеством спор – 0,1 млн – 40%). В итоге эти гусеницы оказались полностью заселены огромным количеством спор микроспоридий (Приложение 5 (Рисунок 5.2.)). Среди последних гусениц, оставшихся в живых на 10-15 сутки, было замечено, что у них нарушился водный баланс и гусеницы потемнели (были салатого цвета, а стали тёмно-зеленого). Кроме того, личинки не росли (оставались LIV возраста), полностью переставали питаться и двигаться (но реагировали на прикосновение – съёживались) (Приложение 4 (Таблица 4.1.)). Таким образом, необходимо поставить ряд дополнительных опытов с другим возрастом или другими дозировками спор, чтобы более детально изучить паразито-хозяйинные взаимоотношения в этой системе.

Наименьшее количество опытов было поставлено с капустной и яблонной молью. Их гусеницы разительно отличаются от других – они очень мелкие, поэтому изначально была сделана попытка заразить насекомых в дозировке 0,5 млн спор на личинку. Яблонная моль оказалась хорошо восприимчива к этой дозе и в 30% случаев появлялись куколки с

тем же количеством спор, что и было скормлено (0,5 млн). На первый взгляд, может показаться, что это те же споры, что были даны личинкам. Но при микрокопировании тканей гусениц были обнаружены пораженные участки кишечника, трахей, жирового тела. Кроме того, в некоторых особях наблюдали не зрелые споры, а пролиферативные стадии (меронты). Также стоит отметить, что две личинки из выборки жили на 10 дней дольше, чем окуклившийся контроль. Они не питались, но реагировали на прикосновение. Для капустной моли было отмечено, что дозировка 0,5 млн – достаточна, чтобы вызвать 100% летальный исход, а её снижение до 0,01 млн позволила получить жизнеспособные куколки с энтомопатогеном (Приложение 4 (Таблица 4.1.)).

Одним из невосприимчивых к данной микроспоридии видов оказался табачный бражник. Были поставлены 2 повторности по 10 гусениц с личинками второго возраста табачного бражника. Эти варианты развивались в соответствии с контролем.

Таким образом, *Nosema bombycis* имеет очень широкий круг хозяев, причём стоит отметить, что многие из них - представители разных семейств чешуекрылых насекомых (Приложение 4 (Таблица 4.1.)). Полученные результаты совпадают с литературными данными, согласно которым эта микроспоридия имеет широкий круг хозяев, который включает такие семейства как Crambidae, Nymphalidae, Pieridae, Erebidae, Plutellidae, Yponomeutidae, Noctuidae и Bombycoidea. У большинства насекомых этот энтомопатоген вызывает до 100% гибели личинок младших возрастов. Кроме того, описаны случаи выхода уродливых бабочек и до 95% инфицированного потомства от зараженных особей (Chisa et al., 1992; M. Han & Watanabe, 1988; Kashkarova и Khakhanov, 1980; Kudo & Decoursey, 1940; Pei et al., 2021; Zhang et al., 1995).

3.2.2. Инфекционные свойства *Nosema pyrausta*

В нашей лаборатории уже на протяжении длительного периода ведётся работа по изучению микроспоридии *Nosema pyrausta* и её влиянию на кукурузного мотылька и его ближайших родственников. Кроме того, исследуется влияние и на его паразитоидов (Sajar & Lewis, 1988) в полевых и лабораторных опытах. Известно, что энтомопатоген способен поражать других чешуекрылых (Kononchuk et al., 2021; Malysh et al., 2021; Tokarev et al., 2018).

В данном исследовании были поставлены опыты с большинством из перечисленных видов. Восприимчивым хозяином оказалась только крапивница, которая ранее не была изучена на восприимчивость к данному энтомопатогену (Приложение 4 (Таблица 4.2.)).

Для крапивницы также наблюдали задержку развития по сравнению с контролем. Было поставлено несколько опытов с гусеницами второго возраста, 1 млн спор на особь (30 личинок). При инфицировании в дозе 1 млн спор наблюдали высокую смертность личинок старших возрастов (Рисунок 10, 11). Кишечник, жировое тело и слюнные железы были полностью заселены энтомопатогеном (Приложение 5 (Рисунок 5.2.)). У части гусениц наблюдали существенную задержку развития, в результате чего одновременно наблюдали гусениц третьего и пятого возрастов в варианте с *Nosema pyrausta*. При снижении дозировки спор энтомопатогена в 10 раз существенной разницы с контролем не наблюдалось. Куколки крапивницы достаточно крупные и содержали в среднем 289 млн спор на особь, что делает их весьма перспективными для наработки *N. pyrausta* в лабораторных условиях (Приложение 4 (Таблица 4.2.)).

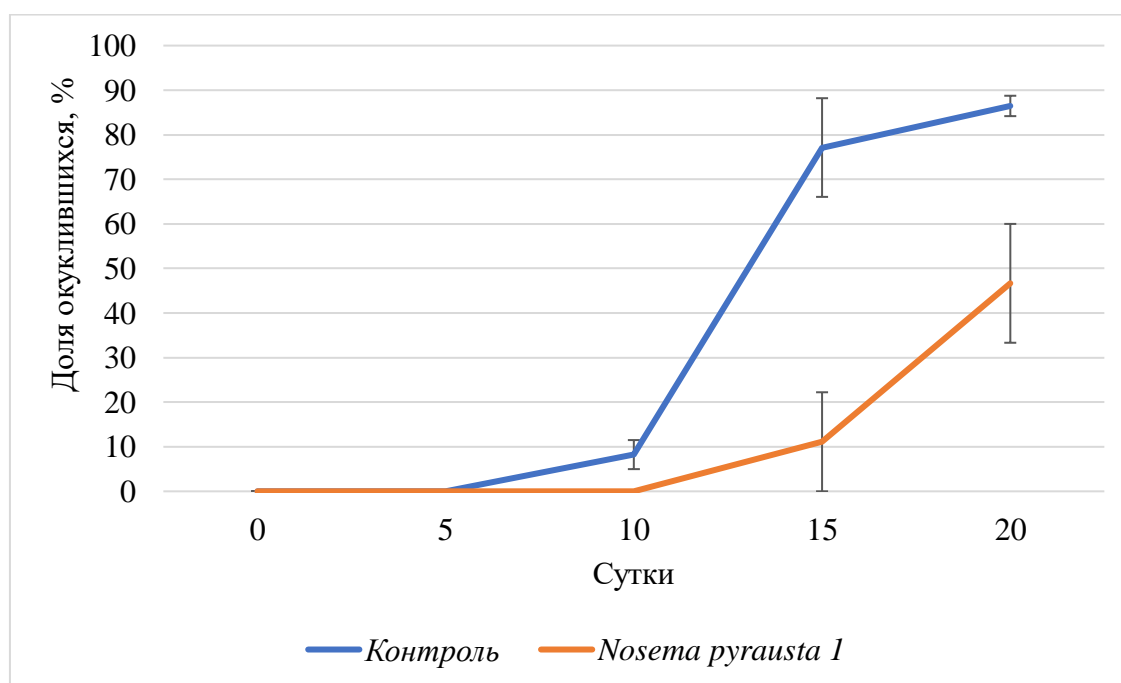


Рисунок 10 Динамика скорости окукливания при заражении гусениц второго возраста *Aglais urticae* спорами *Nosema pyrausta* в дозировке 1 млн спор/гусеницу

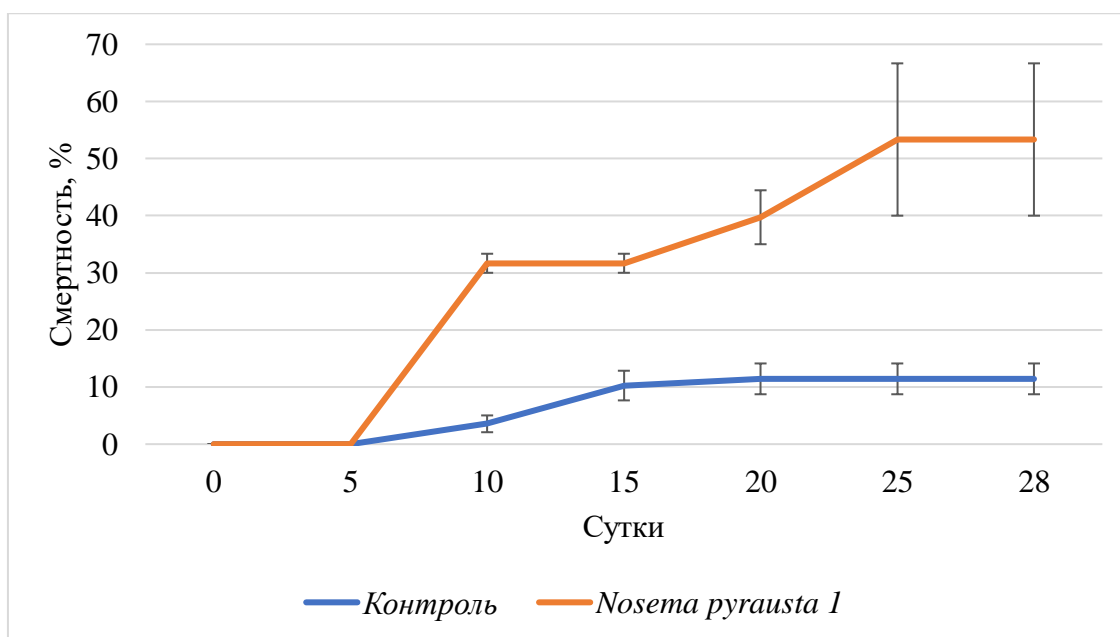


Рисунок 1 Динамика смертности при заражении гусениц второго возраста *Aglais urticae* спорами *Nosema pyrausta* в дозировке 1 млн спор/гусеницу

Остальные виды оказались не восприимчивы к *Nosema pyrausta*. С ними было поставлено ряд опытов по искусственному заражению спорами (примерно по 20 особей на вариант), но не было существенной разницы с контролем, все органы и ткани были свободными от спор.

Таким образом, среди хозяев *Nosema pyrausta* выступают только виды близкородственные к кукурузному мотыльку, а также крапивница из р. *Aglais*, и, весьма вероятно, что её ближайшие родственники будут также восприимчивы к данному энтомопатогену (Приложение 4 (Таблица 4.2.)).

3.2.3. Инфекционные свойства *Nosema tyriae*

Микроспоридия *Nosema tyriae* является наименее изученной из четырёх выбранных изолятов в данной работе. Существует только 1 исследование по данному энтомопатогену, который выделен из крестовниковой медведицы *Tyria jacobaeae* (Erebidae) (Canning et al., 1999). Генетически эта микроспоридия близка к *Nosema bombycis*, что даёт возможность предположить схожесть их инфекционных свойств.

Почти со всеми видами чешуекрылых насекомых были поставлены опыты по искусственному скармливанию спор *N. tyriae*. Среди новых восприимчивых хозяев можно выделить: стеблевого мотылька, капустную и брюквенную белянок, капустную моль и американскую белую бабочку (Приложение 4 (Таблица 4.3.)).

Со стеблевым мотыльком были поставлены опыты в нескольких повторностях по искусственному скармливанию спор *N. tyriae* в дозировке 1 млн на гусеницу второго возраста. Микроспоридия не оказывала влияния на стеблевого мотылька; смертность и скорость окукливания были примерно на одинаковом уровне с контролем (Рисунок 12). Продукция спор достигала 11,5 млн спор на насекомое. Из-за низкой патогенности для стеблевого мотылька, достаточно высокой продуктивности спор и долгого периода хранения куколок при +4 °С эту модель паразито-хозяйинных отношений можно считать успешной для наработки и дальнейшего хранения спор микроспоридий (Приложение 4 (Таблица 4.3.)).

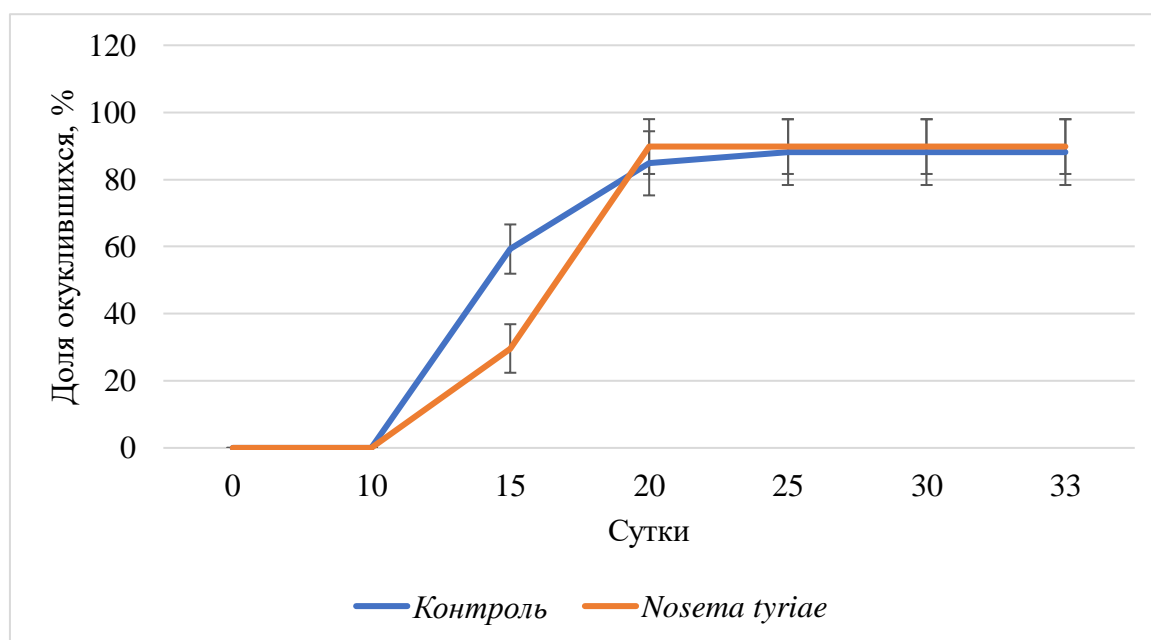


Рисунок 12 Динамика скорости окукливания при заражении гусениц второго возраста *Ostrinia scapulalis* спорами *Nosema tyriae* в дозировке 1 млн спор/гус

Продукция спор *Nosema tyriae* в американской белой бабочке была одной из самых маленьких, как и экстенсивность заражения. Было поставлено несколько повторностей с гусеницами второго возраста в дозировке 1 млн спор на особь (в сумме в контроле 45 гусениц и 26 в варианте). Микроспоридия вызывала достаточно высокую смертность личинок, но инфицированных тканей не было обнаружено (хотя после завершения опыта в гомогенатах из насекомых были обнаружены одиночные споры) (Рисунок 13). *N. tyriae* вызывала уродства у инфицированных куколок в 20% случаев, что является вероятностным событием ($p < 0.05$) по критерию хи-квадрата Пирсона. Продукция спор была очень низкая – около 1,5 млн на особь (Приложение 4, 5 (Таблица 4.3., Рисунок 5.2.)).

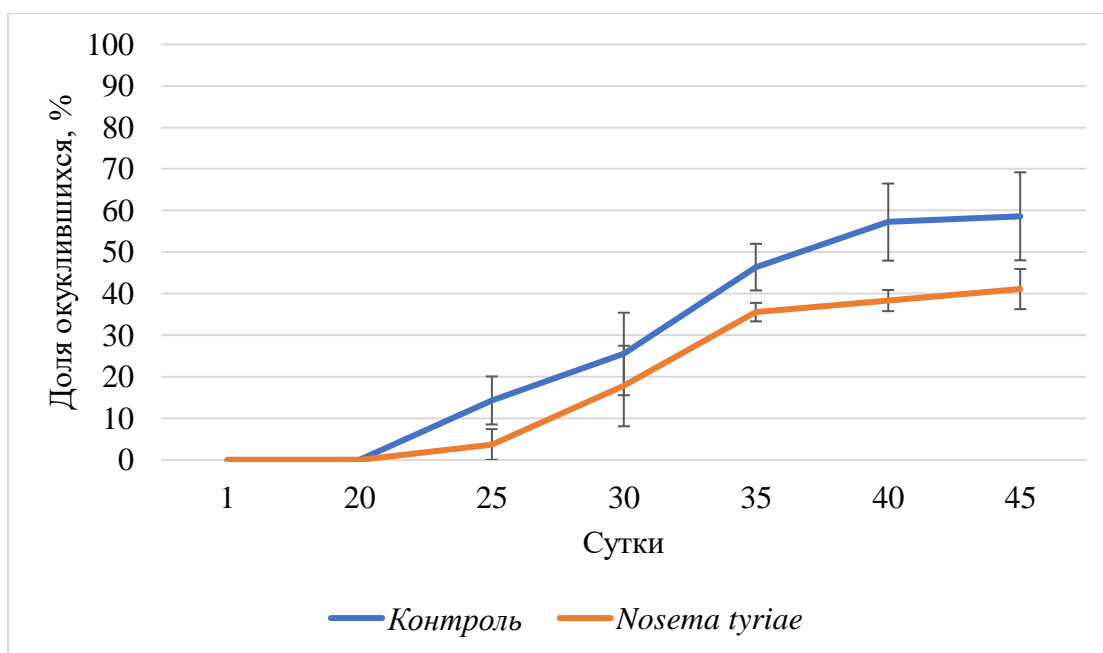


Рисунок 13. Динамика скорости окукливания при заражении гусениц второго возраста *Huphantria cunea* спорами *Nosema tyriae* в дозировке 1 млн спор/гусеницу

Капустная белянка оказалась восприимчивым хозяином для *Nosema tyriae*. После скармливание гусеницам второго возраста 1 млн спор, личинки умирали в 90% случаев на 15-е сутки (Рисунок 14) (всего в сумме 39 гусениц в вариантах). При этом продукция спор была достаточно высокой – в среднем 119 млн на особь. Также была предпринята попытка инфицировать личинок более старшего возраста (по 10 особей третьего возраста в варианте), используя более низкую дозу (число спор на особь было уменьшено в 10 раз). Подопытные насекомые погибли на 15 сутки, как и в варианте с 1 млн спор (Рисунок 15). Кроме того, было отмечено, что гусеницы за несколько дней до гибели переставали питаться, выглядели обезвоженными и уменьшались в размерах, их кишечник, слюнные железы и мальпигиевые сосуды были полностью заполнены спорами микроспоридий (Приложение 4, 5 (Таблица 4.3., Рисунок 5.2.)).

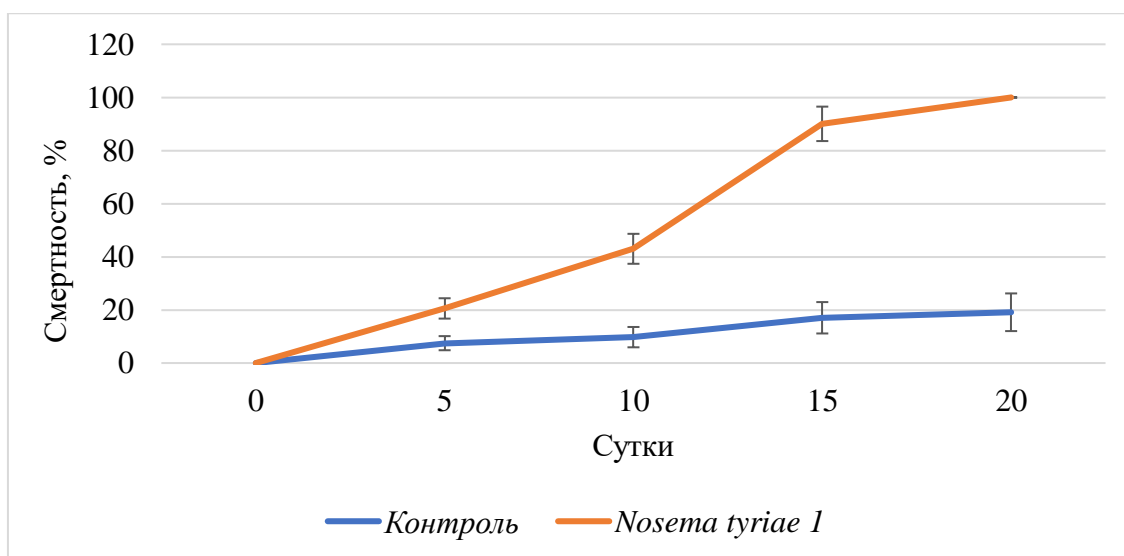


Рисунок 14 Динамика смертности при заражении гусениц второго возраста *Pieris brassicae* спорами *Nosema tyriae* в дозировке 1 млн спор/гусеницу

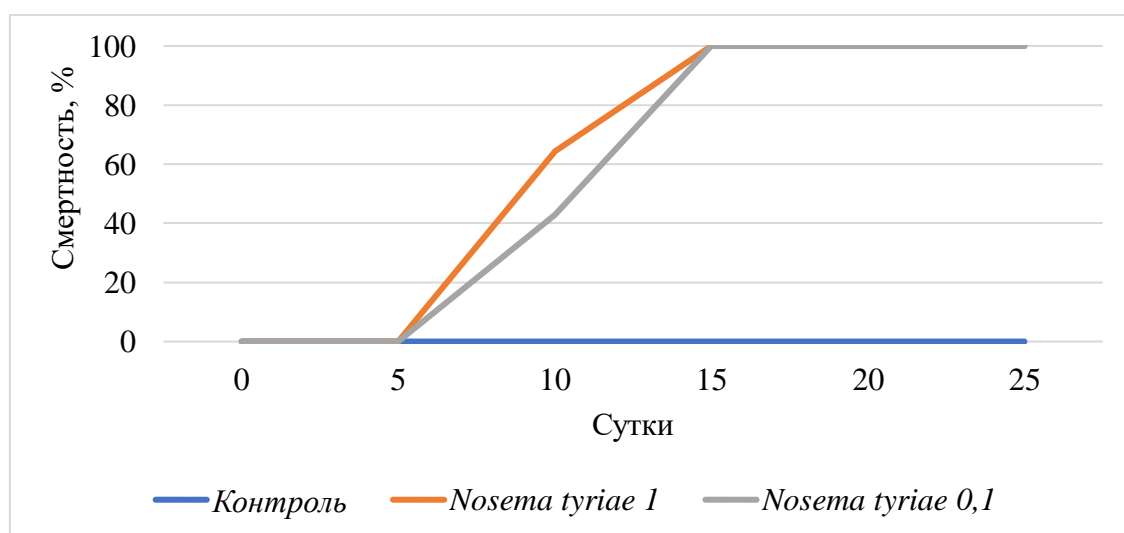


Рисунок 15 Динамика смертности при заражении гусениц третьего возраста *Pieris brassicae* спорами *Nosema tyriae* в дозировке 1 и 0,1 млн спор/гусеницу

На брюквеннице и капустной моли были поставлены пилотные опыты по искусственному заражению. Как и капустная белянка, гусеницы *Pieris napi* второго возраста были поражены спорами *Nosema tyriae* при дозировке 1 млн спор на личинку. 100% летательный исход наблюдали на 10-е сутки на четвёртом возрасте, в то время как контроль начинал примерно в это время окукливаться. Гусеницы выглядели схожим образом с вариантом заражения *N. bombycis* (см. выше) – они мало двигались, ничем не питались последние дни, а также кишечник был заполнен спорами. Кроме того, они смогли полинять только до четвёртого возраста, в то время как контроль уже окукливался (Наблюдалась

задержка развития). Среди поражённых тканей можно выделить слюнные железы и мальпигиевы сосуды, в которых находилось огромное количество спор (Приложение 5 (Рисунок 5.2.)). В среднем, с одной особи было получено 18 млн спор. Капустная моль оказалась тоже подвержена данной микроспоридии при скармливании гусеницам второго возраста в дозе 0,5 млн спор на особь. Споры были обнаружены в слюнных железах, жировом теле и кишечнике хозяина. По сравнению с контролем наблюдали небольшая задержка развития, но смертности от микроспориоза не было (Приложение 4 (Таблица 4.3.)).

Среди невосприимчивых видов стоит отметить *Aglais urticae*, *Manduca sexta*, *Yponomeuta evonymella* и *Yponomeuta malinella*. Микроспоридия *N. tyriae* очень похожа по инфекционным свойствам на *N. bombycis*, кроме того, генетически они являются близкородственными (Canning et al., 1999). Но если сравнивать патогенность, то оказывается, что для каких-то видов она является менее вирулентной, чем *N. bombycis*, (например, для стеблевого мотылька). Для других (например, для капустной белянки и брюквенницы) она выступает в качестве высокопатогенного паразита. А для третьих (например, для крапивницы) – оказывается полностью не патогенной. Так как споры *N. bombycis* и *N. tyriae* внешне существенно не отличаются друг от друга, как и генетически по локусу мсрРНК (900 п.н.), представленным в GenBank, то данные по инфекционным свойствам можно использовать для уточнения вида (Приложение 4 (Таблица 4.3.)).

Таким образом, на примере *N. tyriae* были выявлены все возможные вариации воздействия микроспоридии на хозяина (от слабой до высокой патогенности и смертности). По литературным данным, эта микроспоридия способна инфицировать и тутового шелкопряда *Bombyx mori* (Bombycidae), но существенного вреда этот патоген не причиняет (Canning et al., 1999). Кроме того, несмотря на всю схожесть данного изолята с *N. bombycis*, они обладают разными инфекционными свойствами, что можно использовать как диагностический признак при определении вида.

3.2.4. Инфекционные свойства *Nosema polyvora*

Этой микроспоридией занимались достаточно длительное время в 60-80-х годах прошлого века (Исси, 1964), но после её длительное время не наблюдали в популяциях капустной и репной белянок и только недавно - в 2020 году - мы смогли обнаружить этого энтомопатогена в сборах насекомых из Невеля (Псковская область), Колпино (Санкт-Петербург) и пос. Тайцы (Ленинградская область). В связи с тем, что *N. polyvora* была получена сравнительно недавно, с ней было поставлено наименьшее число опытов.

Nosema polyvora в дозе 1 млн на гусеницу второго возраста не оказывала пагубного влияния на развитие и скорость окукливания стеблевого мотылька (n=22) (Рисунок 16). Кроме того, экстенсивность заражения была низкой – на уровне 30%. При скармливании спор в дозе 0,1 млн спор на гусеницу второго возраста (n=24) количество инфицированных личинок снизилось до 10%. Продукция спор была очень низкой, по сравнению с другими вариантами ранее описанных микроспоридий. Несмотря на это данная модель интересна с точки зрения изучения влияния паразита на резистентную модель хозяина. Средняя продукция спор была на уровне 2,7 млн на куколку (N=8, среди всех проанализированных вариантов) (Приложение 4 (Таблица 4.4.)).

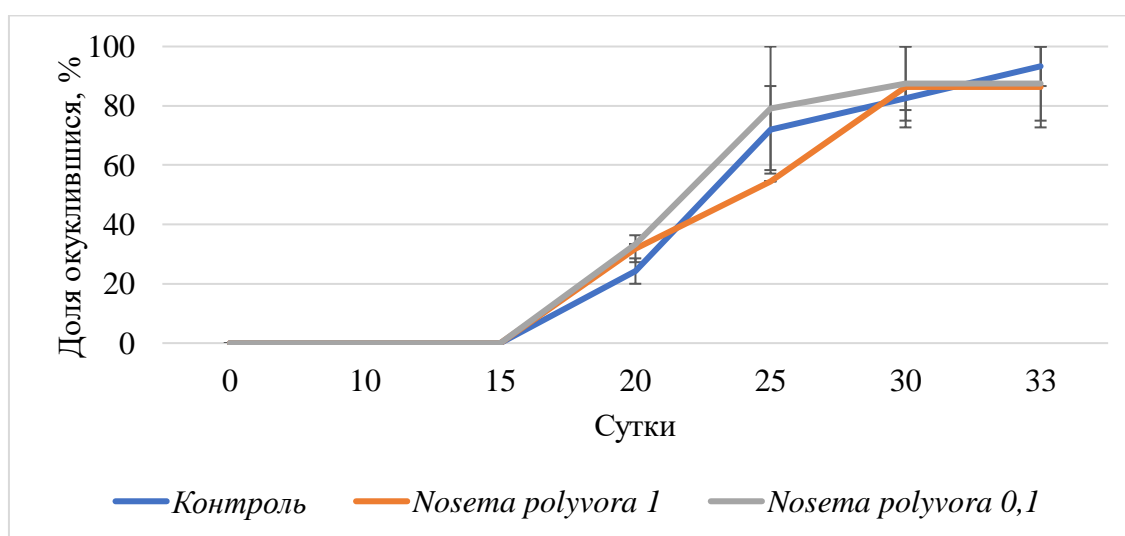


Рисунок 16. Динамика скорости окукливания при заражении гусениц второго возраста *Ostrinia scapularis* спорами *Nosema polyvora* в дозировке 1 и 0,1 млн спор/гусеницу

Капустная белянка, напротив, оказалась сильно восприимчивым хозяином. На основе изученной литературы были поставлены опыты с разным количеством спор на гусеницу второго возраста – 1 млн (N=10), 0,1 (N=20) и 0,01(N=20) (Issi & Maslennikova, 1966). Но во всех опытах наблюдали смертность в 100% случаев, где среднее летальное время LT₅₀ составляло 8-10 дней. В трупах гусениц все ткани были заселены спорами, особенно в кишечнике, где кроме энтомопатогенов ничего не было. Кроме того, слюнные железы также были переполнены микроспоридиями. Также стоит отметить задержку развития личинок в опыте по сравнению с контролем. Часть гусениц оставалась третьего-четвёртого возраста на десятые сутки, в то время как контроль в этот период был пятого и готовился к окукливанию (Рисунок 17). Кроме того, была попытка инфицировать более старшую группу личинок третьего возраста микроспоридиями в дозе 0,01и 0,001 спор на особь (по 10 гусениц на вариант). При более высокой дозе наблюдали 100% летальный

исход, а при низкой – появилась одна куколка. Стоит отметить, что смертность младших возрастов в этом варианте опыта была меньше, но возросла смертность гусениц перед окукливанием (Рисунок 18). Продуктивность спор во всех вариантах была высокой – в среднем 89 млн на особь у трупов третьего возраста и старше (Приложение 4 (Таблица 4.4.)).

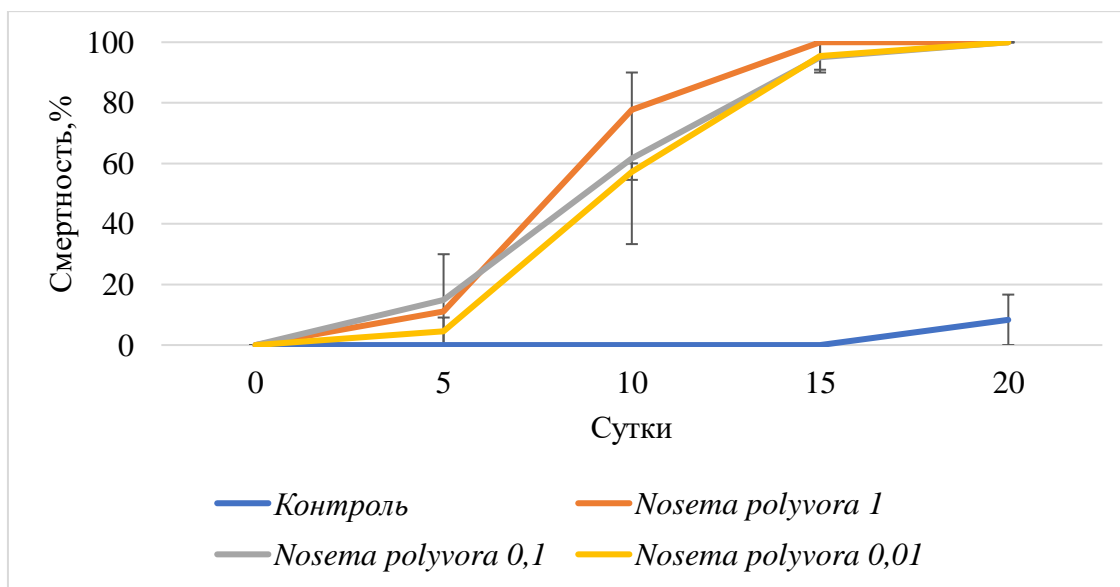


Рисунок 17. Динамика смертности при заражении гусениц второго возраста *Pieris brassicae* спорами *Nosema polyvora* в дозировке 1, 0,1 и 0,01 млн спор/гусениц

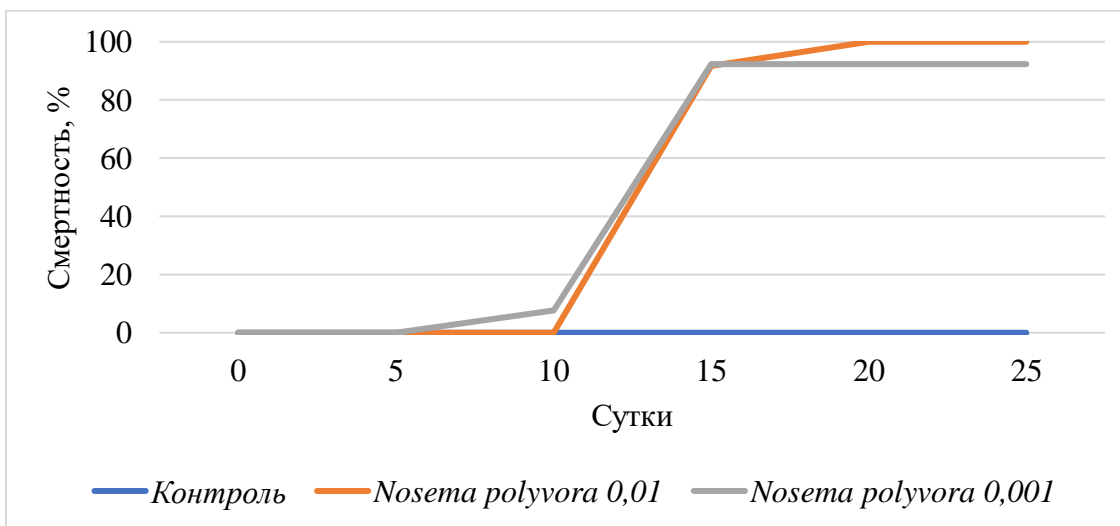


Рисунок 18. Динамика смертности при заражении гусениц третьего возраста *Pieris brassicae* спорами *Nosema polyvora* в дозировке 0,01 и 0,001 млн спор/гусеницу

Кроме капустной белянки – одного из основных вредителей капусты, микроспоридия *N. polyvora* инфицирует и капустную моль. Были поставлены пилотные опыты с гусеницами второго возраста и дозировкой спор 0,5 млн на особь (n=10). Не было

обнаружено никого воздействия энтомопатогена на личинок, при этом слюнные железы, жировое тело и кишечник были полностью заселены микроспоридиями (Приложение 5 (Рисунок 5.2.)). Интенсивность заражения при этом была низкой, что можно связать с размерами гусениц (длина составляла около 1 см). Таким образом, несмотря на то, что продуктивность энтомопатогена оказалась низкой, возможно, именно этот хозяин играет важную роль в распространении *N. polyvora* в природных условиях (Приложение 4 (Таблица 4.4.)).

Среди поставленных опытов только один вид оказался невосприимчивым к *N. polyvora* – *Manduca sexta* (n=20). К сожалению, не удалось в полной мере поставить все опыты с этой микроспоридией на выбранных представителях чешуекрылых насекомых, так как она была получена только в августе 2020 года.

Инфекционные свойства у *Nosema polyvora* интересны, так как ряд насекомых, обитающих на капусте, заражались данным энтомопатогеном. Среди протестированных видов, а также опираясь на литературные данные (Issi & Maslennikova, 1966) можно выделить капустную и репную белянок, капустную моль. Интересно, что на основе данных, полученных в результате генотипирования проб из коллекции ВИЗР, было выявлено, что капустная совка также может быть подвержена данному энтомопатогену (см. раздел 3.1.1.). Вероятно, эта паразитарная система с участием всех шести видов фитофагов, а также их энтомофагов и гиперпаразитоидов (Issi & Maslennikova, 1966; Larsson, 1979) сложнее, чем предполагалось ранее, и их эволюция протекала совместно. Кроме того, *N. polyvora* способна инфицировать стеблевого мотылька, но вирулентность при этом низкая. Такую систему интересно использовать в качестве резистентной модели для изучения передачи микроспоридий потомству и энтомофагам.

Таким образом, на основе полученных данных были составлены таблицы по способности тех или иных микроспоридий инфицировать хозяина (Приложение 4). Причем часть информации была взята из литературных данных для обобщения всех имеющихся данных на начало 2022 года (Canning et al., 1999; Grushevaya et al., 2020, 2021; M. S. Han & Watanabe, 1988; Issi & Maslennikova, 1966; Kashkarova & Khakhanov, 1980; Kononchuk et al., 2021; Kudo & Decoursey, 1940; Malysh et al., 2021; Pei et al., 2021; Tokarev, Grizanov, et al., 2018; Weiser, 1973). Было поставлено более 37 разнообразных опытов по изучению инфекционных свойств четырёх близкородственных микроспоридий при развитии в представителях из 7 семейств. Для отдельных видов микроспоридии оказались высокопатогенными, а другие насекомые оказались невосприимчивыми к энтомопатогенам.

Наиболее полные результаты представлены для микроспоридии *N. bombycis*, так как ее изучением занимались длительное время во всем мире (Vavra & Lukes, 2013). Кроме того, именно она имеет наиболее широкий круг хозяев, заражая хотя бы одного представителя из большинства семейств чешуекрылых, представленных в Таблице 9. Среди опытов, поставленных в ходе работы, были протестированы разные дозировки спор, поэтому наблюдалось большое число разнообразных реакций у гусениц – от потери веса и задержки развития до 100% летального исхода.

Таблица 9. Общая таблица восприимчивости чешуекрылых хозяев к микроспоридиям, изучаемых в работе

Сем-во	Название организма/ микроспоридии	<i>Nosema bombycis</i>	<i>Nosema pyrausta</i>	<i>Nosema tyriae</i>	<i>Nosema polyvora</i>
<i>Crambidae</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i>	+	+	Н/Д	Н/Д
	<i>Loxostege sticticalis</i>	+	+	Н/Д	Н/Д
	<i>Ostrinia scapularis</i>	+	+	+	+
<i>Nymphalidae</i>	<i>Aglais urticae</i>	+	+	-	Н/Д
<i>Pieridae</i>	<i>Pieris brassicae</i>	+	-	+	+
	<i>Pieris rapae</i>	+	-	Н/Д	+
	<i>Pieris napi</i>	+	Н/Д	+	+
<i>Erebidae</i>	<i>Hyphantria cunea</i>	+	-	+	-
	<i>Lymantria dispar</i>	-	+	Н/Д	Н/Д
<i>Bombycidae</i>	<i>Bombyx mori</i>	+	Н/Д	+	-
<i>Pyralidae</i>	<i>Galleria mellonella</i>	-*	+	Н/Д	Н/Д
<i>Plutellidae</i>	<i>Plutella xylostella</i>	+	-	+	+
<i>Sphingidae</i>	<i>Manduca sexta</i>	-	-	-	-
<i>Yponomeutidae</i>	<i>Yponomeuta evonymella</i>	Н/Д	-	-	Н/Д
	<i>Yponomeuta malinella</i>	+	-	-	Н/Д

«+» восприимчивые виды, «-» невосприимчивые виды, «*» – другой способ инфицирования через инъекцию спор в жировое тело гусеницы.

Зеленым отмечены данные из литературы;

Красным отмечены результаты проведенной работы.

У *Nosema pyrausta* менее широкий круг хозяев, причем по результатам нашего исследования было обнаружено, что три вида из сем. Pieridae и один вид из сем. Plutellidae, которые обитают на капусте, оказались не восприимчивы к данному энтомопатогену. Кроме того, эта микроспоридия оказалась непатогенной для целого ряда других насекомых-хозяев. Единственный новый вид, подтвержденный данной микроспоридии – *Aglais urticae*, обитающий на крапиве.

Среди всех микроспоридий *N. tyriae* выделяется тем, что в литературе описан только один случай естественного заражения гусениц крестовниковой медведицы этой микроспоридией и один опыт экспериментального заражения тутового шелкопряда (Canning et al., 1999). Наши данные демонстрируют то, что для этого энтомопатогена характерен достаточно широкий круг хозяев, причем инфекционные свойства схожи с *N. bombycis*, но число восприимчивых видов насекомых среди протестированных меньше (Рисунок 19).

Наименьшее число опытов было поставлено с *N. polyvora* в связи с тем, что споры были обнаружены сравнительно недавно. Большинство работ было посвящено сем. Pieridae, из которых эта микроспоридия была выделена (Issi & Maslennikova, 1966). Наши данные по инфекционности спор на примере капустной белянки полностью совпали с литературными (Исси, 1964). Среди новых выявленных хозяев стоит отметить капустную моль, которая выживала при дозировке спор 0,5 млн на гусеницу, в отличие от капустной белянки, для которой доза выше и ниже этой не подошла (100% летальный исход). Кроме того, в слабой степени оказался восприимчив и стеблевой мотылек, которого можно использовать как резистентную модель хозяина.

Среди интересных фактов можно отметить то, что виды из одного семейства могут быть как восприимчивы к одному и тому же энтомопатогену, так и реагировать по-разному (Рисунок 19). Так, гусеницы из двух разных родов *Ostrinia* и *Loxostege* семейства Crambidae оказались восприимчивы к *N. pyrausta* и *N. bombycis* (Grushevaya et al., 2021; Malysh et al., 2021). Другая картина наблюдалась в семействе Erebidae. Американская белая бабочка *Huphantria cunea*, судя по литературным данным, восприимчива к *N. bombycis*, а непарный шелкопряд *Lymantria dispar*, наоборот, не инфицируется данным энтомопатогеном (Kashkarova & Khakhanov, 1980). То же самое характерно и для другого патогена – *N. pyrausta* (Kononchuk et al., 2021). Таким образом, невозможно предсказать, будет ли восприимчиво целое семейство насекомых к данной микроспоридии, но, вероятно, для рода такой прогноз сделать можно. Так, например, все энтомопатогены проявляют одинаковые инфекционные свойства в отношении трёх видов из р. *Pieris*. Такие же данные, но менее

масштабные, были получены для сем. Crambidae – р. *Ostrinia* и сем. Yponomeutidae – р. *Yponomeuta*.

Единственный вид насекомого, для которого не удалось обнаружить новых энтомопатогенов, среди четырёх полученных изолятов – табачный бражник. Все виды не оказали пагубного влияния на это насекомое. Разницы с контролем не наблюдалось ни в одном из опытов.

Таким образом, на основе полученных и литературных данных удалось обобщить и систематизировать информацию об энтомопатогенах чешуекрылых и их паразито-хозяйственных отношениях. Некоторые из них имеют узкий круг хозяев (*N. pyrausta*), а другие – широкий (*N. bombycis*), несмотря на генетическую близость этих видов.

3.3. Изучение взаимоотношения микроспоридий чешуекрылых с энтомофагами

Изучение влияния микроспоридий на *Cotesia (Apanteles) glomerata* ведется на протяжении длительного времени во всём мире. В основном изучали взаимоотношения *Vairimorpha (Nosema) mesnili* на репной или капустной белянках, реже на боярышнице (Sokolova & Entzeroth, 1995; Yaman et al., 2014; Исси и Онацкий, 1982). Но также были работы по изучению другой микроспоридии – *N. polyvora*, которая характеризуется высокой патогенностью по отношению к *Pieris brassicae* (Issi & Maslennikova, 1966; Исси, 1963; Исси, 1964).

Эти данные были получены для типичных энтомопатогенов, обнаруженных у насекомых из сем. Pieridae. При этом, как было выяснено ранее, для капустной белянки выявлены две нетипичные микроспоридии, которые поражают гусениц – *Nosema bombycis* (Kashkarova & Khakhanov, 1980) и *N. tyriae* (настоящая работа). Среди проделанных опытов наиболее успешным оказалось инфицирование гусениц третьего возраста в дозировке 0,1 млн спор на особь *N. bombycis*.

Шесть коконов *C. glomerata* были получены из свободной от микроспоридий гусеницы *P. rapae*, которую собрали на территории капустного поля ВИЗР. Спаривание вылетевшего имаго происходило на протяжении трёх дней с момента выхода и при дополнительном питании 5% сахарным сиропом (Larsson, 1979). После к ним на одни сутки были посажены 11 гусениц второго возраста, полученные из собранных в природе яиц. Гусениц позднее, после линьки на третий возраст, инфицировали *N. bombycis*. Все 6 имаго наездника были проверены на наличие энтомопатогенов, но все они оказались здоровыми. Среди показателей отслеживали: количество дней до выхода апантелеса; продукцию спор *N. bombycis*; количество трупов личинок/живых ос и количество прожитых ими дней.

Исходя из полученных данных, было выявлено, что чем больше времени прошло с момента скармливания *N. bombycis* гусеницам капустной белянки, тем большее количество энтомопатогена было обнаружено в пробе (Таблица 10). Но несмотря на микроспоридиоз, число личинок наездника в контрольном и инфицированном вариантах были примерно на одинаковом уровне. Кроме того, по внешнему виду личинки паразитических ос и их сформированные коконы не отличались среди вариантов (Рисунок 19). Единственное существенное отличие наблюдалось в количестве коконов наездника. В варианте с патогеном их было меньше, так как большинство личинок погибло (Таблица 10). Вероятно, это связано с поражением шёлкоотделительных желёз, что препятствует формированию здоровой куколки. Доля личинок апантелеса, которые смогли сформировать полноценный кокон, в контроле составила 41%, а в варианте с использованием зараженных микроспоридией гусениц это значение не превышало 16%. Разница между этими значениями была существенной на уровне значимости $p < 0.01$ (Хи-квадрат Пирсона).

Таблица 10. Заражение апантелеса микроспоридиями *Nosema bombycis* при развитии личинок паразитоида в гусеницах капустной белянки, зараженных этой микроспоридий

№	Кол-во дней до выхода апантелеса	Продуктивность <i>N. bombycis</i> в гусенице	Кол-во трупов личинок	Кол-во живых ос	Кол-во прожитых дней
1 К	13	отр	2	28	7
2 К	13	отр	6	5	7
3 К	13	отр	3	30	7
4 К	14	отр	4	20	Н/Д
5 К	14	отр	4	20	Н/Д
4 <i>N. bomb</i>	13	26×10^6	8	7	7
5 <i>N. bomb</i>	14	45×10^6	3	31	7
6 <i>N. bomb</i>	14	44×10^6	10	2	5
7 <i>N. bomb</i>	15	80×10^6	4	2	2
8 <i>N. bomb</i>	13	30×10^6	15	11	5
9 <i>N. bomb</i>	14	54×10^6	8	17	8

К – Контроль

N. bomb – вариант с микроспоридией *Nosema bombycis*

Н/Д – нет данных

Похожую картину наблюдали при развитии апантелеса в гусеницах белянки, зараженной другой типичной микроспоридией – *Nosema polyvora*. Из слабо- и средне

инфицированных гусениц появлялось сопоставимое с контролем количество личинок энтомофага. При слабом инфицировании капустной белянки часть паразитоидов могли быть свободными от микроспоридий, а основные показатели развития были идентичны по сравнению с контролем. Из гусениц со средним уровнем инфицирования наблюдался выход в основном инфицированных энтомофагов. Часть из них не смогла окуклиться, при высоком уровне инфекции гусениц личинки паразитоида не были способны развиваться, как и их хозяин (Issi & Maslennikova, 1966; Исси, 1963).

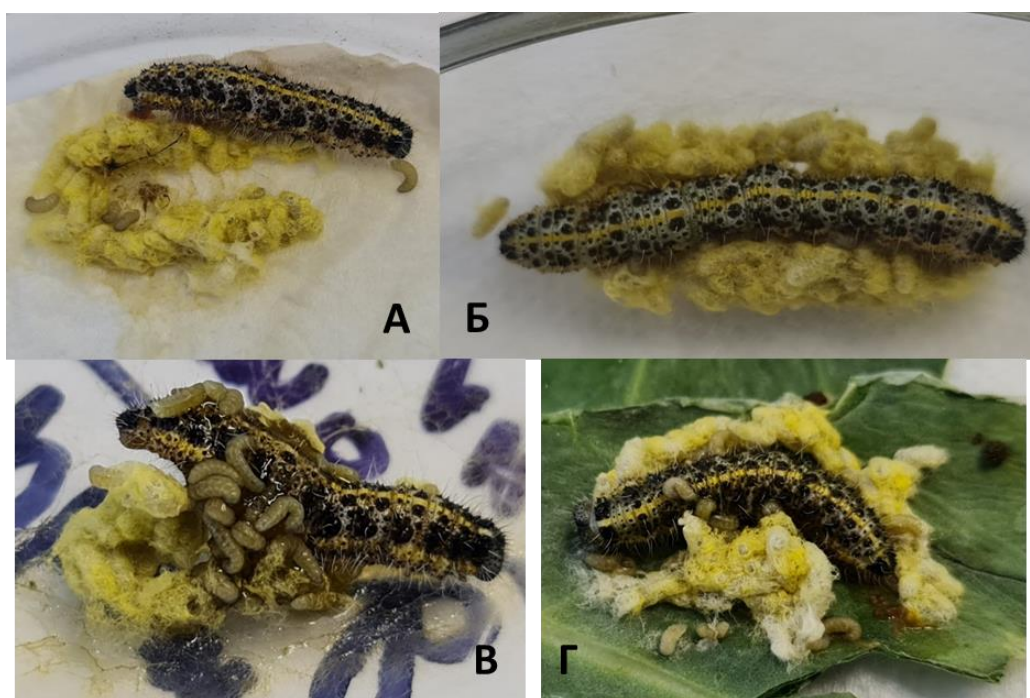


Рисунок 19. Вышедшие личинки наездника *Cotesia glomerata* из экспериментально заражённых микроспоридией *Nosema bombycis* гусениц капустной белянки,

А и Б – контроль; В и Г – *N. bombycis*

Микрокопирование имаго апантелесов показало, что большинство тканей поражено микроспоридиями *Nosema bombycis* – мальпигиевы сосуды, жировая ткань, околоплодные ткани (яичники и их придатки) и даже яйца паразитоида (Рисунок 20). Наши наблюдения подтверждают литературные данные, полученные на примере другой паразитарной системы с участием *N. polyvora* (Issi & Maslennikova, 1966; Исси, 1963; Исси, 1964).

При сравнении полученных результатов при инфицировании *N. polyvora* и *N. bombycis* можно выделить следующие закономерности:

- по сравнению с контролем паразитоиды выходят из гусениц примерно в одинаковое время;

- кладки между больными и инфицированными паразитоидами не отличаются по внешнему виду или по количеству коконов в них;
- количество трупов личинок больше в инфицированном варианте;
- микроспоридии не влияют на жизнеспособность ос в лабораторных условиях;
- среди пораженных тканей выделяют мальпигиевы сосуды, жировое тело, околоплодные ткани (яичники и их придатки), яйца паразитоида.

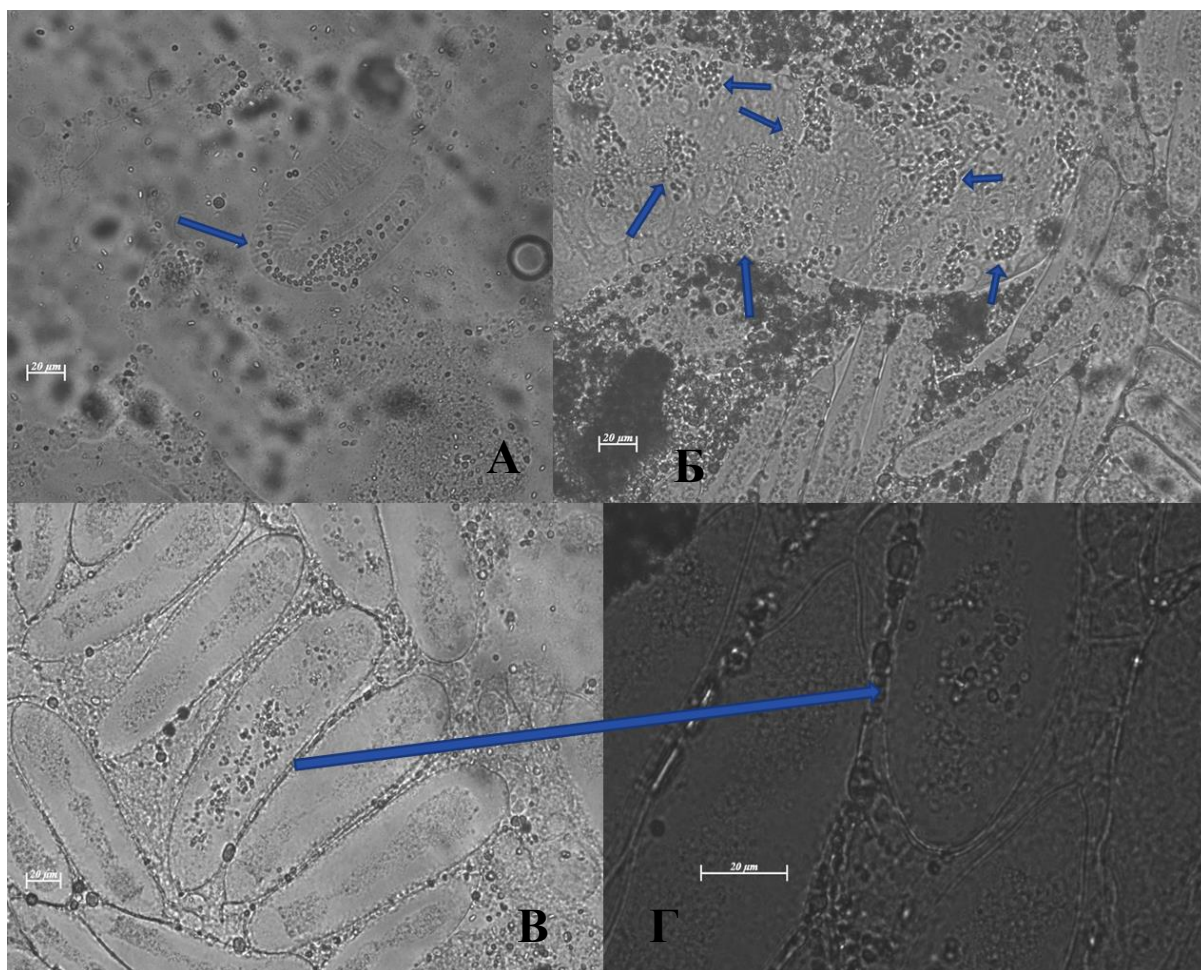


Рисунок 20. Световая микроскопия *Nosema bombycis* из *Cotesia (Apanteles) glomerata*, А – инфицированная трахея паразитоида; Б – инфицированные околоплодные ткани; В и Г – инфицированные яйца наездника.

Cotesia glomerata играет важную роль в распространении микроспоридий в популяции капустной, репной белянок и боярышницы. Были поставлены опыты по переносу инфекции от больных насекомых здоровым, в которых было показано заражение 100% особей путём передачи через инфицированный яйцеклад. Кроме того, заражённые апантелесы, вышедшие из гусеницы с *N. polyvora* или *Vairimorpha mesnili*, способны передавать патогена не только посредством инокуляции, но и с инфицированными яйцами.

Вероятно, они не развиваются в хозяине, но выступают в качестве «инфекционных пакетов» со спорами (Issi & Maslennikova, 1966; Larsson, 1979; Sokolova & Entzeroth, 1995; Исси, 1963; Исси и Онацкий, 1982). В данной работе был продемонстрирован схожий сценарий по развитию спор в паразитоиде. *N. bombycis* выступает в качестве нетипичной микроспоридии для данной паразитарной системы. Все наездники были поражены этим патогеном. В основном уровень инфекции был одинаков среди всех протестированных образцов. Кроме того, при сравнении данных из литературы и результатов данной работы было выявлено, что в случае *N. bombycis* заражённость наблюдается практически в 100% случаев, что отличается от данных, полученных для *N. polyvora* (Issi & Maslennikova, 1966). Вероятно, это отличие может объясняться долгой эволюцией данной паразитарной системы и необходимости наличия здоровых особей для поддержания популяции. *N. bombycis* – новый энтомопатоген для данной системы, и еще не выработаны механизмы борьбы с ним как в гусенице, так и в личинке паразитоида.

Таким образом, при развитии потомства апантелеса в гусеницах инфицированных неспецифической микроспоридией происходит его заражение. Микроспоридии *N. bombycis* поражает ткани паразитоида, что снижает его выживаемость. Кроме того, микроспоридии были обнаружены в репродуктивной системе паразитоида, включая яйца. Вероятно, самки апантелеса могут передавать *N. bombycis* также, как и две другие типичные микроспоридии, характерные для капустной белянки – *N. polyvora* и *Vairimorpha mesnili*. Заражают наездники гусениц через инфицированный яйцеклад, а также при откладке яиц со спорами (Issi & Maslennikova, 1966; Larsson, 1979). Следовательно, апантелес имеет большое практическое значение с точки зрения распространения разных микроспоридий в популяции капустной, репной белянок, а также боярышницы, что важно для совершенствования подходов к борьбе с вредными чешуекрылыми насекомыми.

Заключение

В ходе ревизии коллекции ВИЗР было проанализировано 64 образца микроспоридий, собранных в середине прошлого века. Большинство из них ранее были описаны только с точки зрения их морфологического строения и инфекционных свойств (Issi & Tkach, 1971; Issi & Maslennikova, 1966; Larsson, 1979; Sokolova & Entzeroth, 1995). В ходе исследования, описанного в данной работе, удалось выделить ДНК и амплифицировать ген мсрРНК из 40% проб, представленных в коллекции. В результате было получено 26 последовательностей мсрРНК микроспоридий. Их анализ впервые позволил установить филогенетическое положение целого ряда изолятов микроспоридий из коллекции ВИЗР. В основном были обнаружены представители родов, которые чаще всего встречаются у чешуекрылых насекомых, таких как *Nosema*, *Vairimorpha* и *Endoreticulatus*. Но была обнаружена и уникальная последовательность, которая только на 88.96% схожа с *Mockfordia xanthocaeciliae* из *Xanthocaecilius sommermanae* (GenBank FJ865223) (Kireeva et al., 2021; Sokolova et al., 2010).

Исследование новых изолятов микроспоридий, собранных в 2017-2021 гг., позволило получить 7 последовательностей, которые принадлежат к двум родам – *Nosema* и *Vairimorpha*.

С некоторыми изолятами (*Nosema polyvora* и *Nosema* sp. ex *Helicoverpa zea* South-Western Russia 2019 (данные по инфекционным свойствам последнего изолята представлены в недавно опубликованной статье - Kononchuk et al., 2022) были поставлены опыты по искусственному скормливанню спор различным представителям чешуекрылых насекомых, изучаемых в данной работе.

В современных сборах 2020-2021 гг. удалось найти насекомых, пораженных микроспоридиями, идентичных изолятам из коллекции ВИЗР, собранной в середине прошлого века. Энтомопатогены схожи по строению (форма и размер спор), генотипу (по секвенированному фрагменту гена мсрРНК) и по инфекционным свойствам (выделены из тех же хозяев). В частности, были обнаружены споры *N. polyvora*, которые не встречались в сборах капустной белянки с 1975 года. Помимо этой микроспоридии, был найден изолят, принадлежащий к роду *Vairimorpha* – *V. mesnili*. Первоначально эти два изолята описывались как два разных вида, но в виду своеобразного жизненного цикла *Vairimorpha mesnili* (с образованием октоспор) было выдвинуто предположение, что *Nosema polyvora* – это часть сложного цикла *V. mesnili* (Sprague, 1977). В дальнейшем находили только споры характерные для *V. mesnili* (Yaman et al., 2014). И только сравнительно недавно, нами были

обнаружены оба изолята, и при помощи молекулярной диагностики было показано, что это два разных вида, которые заняли место в разных кладах на филогенетическом дереве.

В ходе проведенных нами сборов насекомых, был найден новый хозяин для *N. polyvora*. В частности, в пробе *Nosema* sp. ex *Mamestra brassicae* 1962, были обнаружены споры, напоминающие по форме и размерам энтомопатоген, выделенный из капустной белянки. После экстракции ДНК была получена нуклеотидная последовательность данного образца. При сравнении с *N. polyvora* из проб, выделенных из коллекции и из новых сборов, оказалось, что они идентичны по данному локусу на 100%. Раньше предполагали, что *N. polyvora* достаточно узкоспецифичная микроспоридия и воздействует только на представителей семейства Pieridae (Issi & Maslennikova, 1966), но на основе последних данных, включая поставленные опыты, можно предположить, что эта паразитарная система сложнее, чем считалось ранее. В ней задействовано по крайней мере 6 представителей из отряда Lepidoptera (*Mamestra brassicae*, *Pieris rapae*, *Pieris brassicae*, *Pieris napi*, *Aporia crataegi*, *Plutella xylostella*), как минимум один представитель из отряда Braconidae (*Cotesia glomerata*) и его гиперпаразитоиды из отряда Ichneumonidae (*Gelis agilis* и *Lysibia nana*) (Issi & Maslennikova, 1966; Junnikkala, 1985; Yoshinori, 1955). Вероятно, это ещё не полный список хозяев, так как паразитоидов намного больше среди всех шести видов, кроме того, на капусте могут обитать и другие вредители (другие гусеницы чешуекрылых, клопы, жуки, тля и т.д.).

Из новых сборов был отобран изолят *N. polyvora*, с которым было поставлено несколько биотестов. Для этой микроспоридии был известен небольшой круг хозяев, включающий представителей из р. *Pieris* и р. *Aporia* – капустная (были поставлены опыты на этом объекте), репная, брюквенная и горчичная белянки, а также боярышница (Issi & Maslennikova, 1966). Среди новых обнаруженных хозяев можно отметить капустную моль. При этом на данный момент не было сообщений о нахождении спор *N. polyvora* в этих гусеницах и бабочках в природе. Также стоит отметить стеблевого мотылька, но в качестве резистентной модели хозяина.

Nosema pyrausta представляет собой удобный объект, который успешно культивируется в лабораторных условиях в стеблевом и кукурузных мотыльках в течение года. Это даёт возможность не потерять инфекционные свойства микроспоридии, а также ставить опыты круглогодично с разными насекомыми. Однако этот паразит оказался более узкоспецифичным – он инфицирует в высокой степени четыре вида травяных огневок и крапивницу, тогда как остальные насекомые, которые чувствительны к данному патогену в меньшей степени (пчелиная огневка, непарный шелкопряд) могут рассматриваться как

резистентные модели (Grushevaya et al., 2020, 2021; Kononchuk et al., 2021; Malysh et al., 2021; Tokarev et al., 2018).

Отдельное внимание стоит уделить *N. tyriae*, описанной ранее только в одной статье (Canning et al., 1999). В ходе данной работы удалось выявить способность данного вида заражать многих хозяев, таких как стеблевой мотылёк, капустница, брюквенница и капустная моль. Данный энтомопатоген был высоковирулентным для отдельных видов (например, для капустной и брюквенной белянки), но для остальных насекомых он не оказывал сильного патологического воздействия с высоким летальным исходом. Это свойство данного энтомопатогена интересно с точки зрения изучения передачи инфекции и ее влияния на следующее поколение насекомых, а также с точки зрения перспектив его использования для борьбы с вредными чешуекрылыми.

Наибольшее количество данных было найдено и получено для микроспоридии *Nosema bombycis*, которая имеет широкий круг хозяев. Среди ранее изученных восприимчивых насекомых можно выделить представителей сем. Noctuidae и Pieridae, которые после инфицирования не могли иметь здоровое потомство (Kashkarova & Khakhanov, 1980; Pei et al., 2021). Среди обнаруженных нами хозяев можно выделить стеблевого мотылька, крапивницу, капустную и яблонную молей. Сейчас вновь поднимаются вопросы о возможности использования *N. bombycis* в качестве агента для борьбы с вредными чешуекрылыми, в частности против *Spodoptera litura* и *Helicoverpa armigera* (Imura et al., 2019). Данные, полученные в ходе этой работы, позволили углубить и дополнить уже имеющиеся сведения об этом энтомопатогене, а также расширить представления о потенциальном круге его хозяев.

Микроспоридии оказывают сильное влияние на организм хозяина: возможны проявления каннибализма среди гусениц, нарушение водного баланса, изменения цвета личинок, снижение активности в целом и т.д. (Andreadis, 2007; Issi & Maslennikova, 1966; Vavra & Lukes, 2013; Исси, 1963). Почти все признаки заболевания были обнаружены в данных опытах. Кроме того, микроспоридиоз вызывает высокую смертность гусениц младших или старших возрастов (*Nosema bombycis* и крапивница/капустница) (Kashkarova & Khakhanov, 1980), или происходит искусственная пролонгация жизни насекомого, необходимая для созревания наибольшего количества спор (*N. bombycis* и яблонная моль). Эти паразиты являются для личинок сильнейшим фактором стресса, из-за которого они впоследствии не могут сформировать полноценную куколку (*N. tyriae* и американская белая бабочка). Изучение таких эффектов, вызываемых микроспоридиями, важно для понимания возможности использования этих энтомопатогенов не только в лабораторных условиях, но и во внешней среде против вредных насекомых.

Нетипичная микроспоридия способна инфицировать паразитоида в хозяине наравне с типичной. Так, *N. bombycis* способна заражать капустную белянку и паразитоида *Cotesia glomerata* в ней. Похожая ситуация отмечена и в двух других хорошо изученных природных паразитарных системах с участием *N. polyvora* и *Vairimorpha mesnili* (Issi & Maslennikova, 1966; Larsson, 1979; Исси и Онацкий, 1982). Причём, как и ранее было отмечено, выход апантелеса происходил примерно в одно и то же время с контролем, количество личинок паразитоида также совпадало с незаражённым вариантом. Однако, в соответствии как с литературными, так и с нашими данными, отличалось количество личинок, которые не смогли сплести кокон в инфицированных вариантах (доля личинок апантелеса, которые смогли сформировать полноценный кокон, в контроле составила 41%, а в варианте с *N. bombycis* – 16%) (Issi & Maslennikova, 1966; Larsson, 1979). Вылет имаго и количество прожитых дней совпадало с контролем. Микроспоридий можно было найти в 100% случаев во всех насекомых в околоплодных тканях, трахеях и даже в яйцах паразитоида, что говорит о возможности передачи нетипичной микроспоридии посредством введения инфицированных яиц. Кроме того, есть вероятность надрыва тканей около яиц и передачи микроспоридий вместе с яйцом через инфицированный яйцеклад. Эти наблюдения важны для совершенствования подходов к борьбе с вредными чешуекрылыми насекомыми.

Выводы

1 Среди основных представителей микроспоридий, инфицирующих чешуекрылых насекомых, можно выделить 3 рода – *Nosema*, *Vairimorpha* и *Endoreticulatus*, которые встречаются повсеместно, включая наши сборы. Более редко встречаются представители, которые принадлежат к родам *Vavraia*, *Trachipleistophora*, *Cystosporogenes*, *Orthosomella*. Одиночный изолят показал родство с микроспоридией рода *Mockfordia* из сеноедов.

2 Светомикроскопический и молекулярно-генетический анализы позволили подтвердить, что *V. (Nosema) mesnili* и *N. polyvora* представляют собой отдельные виды микроспоридий. Для *N. polyvora* впервые показана способность заражать стеблевого мотылька *Ostrinia scapularis* и капустную моль *Plutella xylostella*.

3 Микроспоридия *N. tyriae* вирулентна для ряда насекомых – капустной и брюквенной белянок (Pieridae), стеблевого мотылька (Crambidae), капустной моли (Plutellidae) и американской белой бабочки (Erebidae).

4 Микроспоридия *N. pyrausta* среди четырёх изученных видов рода *Nosema* имела самый узкий круг хозяев. В качестве нового восприимчивого хозяина можно выделить только крапивницу (Nymphalidae).

5 Наибольшее количество восприимчивых видов чешуекрылых хозяев обнаружено для *N. bombycis*, включая стеблевого мотылька (Crambidae), крапивницу (Nymphalidae), капустную моль (Plutellidae), брюквенницу (Pieridae) и яблонную моль (Yponomeutidae).

6 Для размножения микроспоридий в лабораторных условиях оптимальные дозировки составляют для *N. tyriae* и *N. polyvora* 1 млн спор на гусеницу стеблевого мотылька второго возраста для получения 5-11 млн спор на куколку; для *N. pyrausta* – 1 млн спор на гусеницу крапивницы второго возраста для получения около 290 млн спор на куколку; *N. bombycis* – 0,1 млн на гусеницу капустной белянки третьего возраста для получения около 90 млн спор на особь.

7 Микроспоридия *N. bombycis* способна поражать не только неспецифичных чешуекрылых хозяев, таких как капустная белянка, но и паразитирующего в её гусеницах наездника *Cotesia (Apanteles) glomerata* (Hymenoptera: Braconidae), снижая его выживаемость и инфицируя репродуктивную систему.

Благодарности

Выражаю свою благодарность за помощь в написании выпускной квалификационной работы руководителю Насоновой Елене Станиславовне (к. б. н., старший научный сотрудник, СПбГУ).

Особую благодарность выражаю своему научному руководителю Токареву Юрию Сергеевичу (профессор РАН, д.б.н., заместитель директора по научной работе ВИЗР) и Малыш Юлии Михайловне (к. б. н., старший научный сотрудник) за их профессиональные советы и поддержку на протяжении всего моего обучения.

Также я очень благодарна моим коллегам (ВИЗР): Исси Ирме Викторовне, Игнатъевой Анастасии Николаевне, Малыш Светлане Михайловне, Уткузовой Алсу Мансуровне, Володарцевой Юлии Викторовне, Конончук Анастасии Геннадьевне, Грушевой Инне Валентиновне за сотрудничество и поддержку.

Данная работа поддержана грантом РФФИ №20-66-46009 (рук. Токарев Ю. С.).

Список литературы

- Andreadis, T. G. (2007). Microsporidian parasites of mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* Vol. 23, Issue 2 SUPPL., pp. 3–29. [https://doi.org/10.2987/8756-971x\(2007\)23\[3:mpom\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2987/8756-971x(2007)23[3:mpom]2.0.co;2)
- Arneodo, J. D., & Sciocco-Cap, A. (2018). Biological and molecular features of *Nosema rachiplusiae* sp. n., a microsporidium isolated from the neotropical moth *Rachiplusia nu* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae). *Parasitology Research*, 117(5), 1325–1331. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5820-z>
- Bacela-Spychalska, K., Wroblewski, P., Mamos, T., Grabowski, M., Rigaud, T., Wattier, R., Rewicz, T., Konopacka, A., & Ovcharenko, M. (2018). Europe-wide reassessment of Dictyocoela (Microsporidia) infecting native and invasive amphipods (Crustacea): *Molecular versus ultrastructural traits*. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26879-3>
- Baker, M. D., Vossbrinck, C. R., Didier, E. S., Maddox, J. V., & Shaddock, J. A. (1995). Small subunit ribosomal DNA phylogeny of various Microsporidia with emphasis on AIDS related forms. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 42(5), 564–570. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1995.tb05906.x>
- Bass, D., Czech, L., Williams, B. A. P., Berney, C., Dunthorn, M., Mahé, F., Torruella, G., Stentiford, G. D., & Williams, T. A. (2018). Clarifying the relationships between Microsporidia and Cryptomycota. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 65(6), 773–782. <https://doi.org/10.1111/jeu.12519>
- Canning, E. U., Curry, A., Cheney, S. A., Lafranchi-Tristem, N. J., Ebert, D., Rifardt, D., Killick-Kendrick, M., & Killick-Kendrick, R. (2001). *Flabelliforma montana* (Phylum Microsporidia) from *Phlebotomus ariasi* (Diptera, Psychodidae): ultrastructural observations and phylogenetic relationships. *Europ. J. Protistol*, 37, 207–221. <http://www.urbanfischer.de/journals/ejp>
- Canning, E. U., Curry, A., Cheney, S. A., Lafranchi-Tristem, N. J., Kawakami, Y., Hatakeyama, Y., Iwano, H., & Ishihara, R. (1999). *Nosema tyriae* n.sp. and *Nosema* sp., microsporidian parasites of cinnabar moth *Tyria jacobaeae*. <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4861>
- Chemurot, M., de Smet, L., Brunain, M., de Rycke, R., & de Graaf, D. C. (2017). *Nosema neumanni* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. *European Journal of Protistology*, 61, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2017.07.002>
- Chen, D., Shen, Z., Zhu, F., Guan, R., Hou, J., Zhang, J., Xu, X., Tang, X., & Xu, L. (2012). Phylogenetic characterization of a microsporidium (*Nosema* sp. MPr) isolated from the *Pieris rapae*. *Parasitology Research*, 111(1), 263–269. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2829-6>
- Cheney, S. A., Lafranchi-Tristem, N. J., & Canning, E. U. (2000). Phylogenetic relationships of *Pleistophora*-like Microsporidia based on small subunit ribosomal DNA sequences and implications for the source of *Trachipleistophora hominis* infections. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(3), 280–287. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00048.x>
- Chisa, Y., Masako, F., & Takeshi, K. (1992). Isolation and characterization of *Nosema bombycis* (Microsporida: Nosematidae) from larvae of beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 36(2), 127–134. <https://doi.org/10.1303/jjaez.36.127>
- Choi, J.Y., Kim, J. G., Choi, Y.C., Kim, W., Je, Y. C., & Kim, K. (2002). *Nosema* sp. isolated from cabbage white butterfly (*Pieris rapae*) collected in Korea. *Journal of Microbiology*, 40(3), 199–204.

- Colmenero, A. I., Barría, C., Feist, S. W., & Tuset, V. M. (2015). Observations on the occurrence of *Spraguea lophii* in *Mediterranean lophiids*. *Parasitology Research*, 114(5), 1977–1983. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4354-x>
- Cormier, A., Wattier, R., Giraud, I., Teixeira, M., Grandjean, F., Rigaud, T., & Cordaux, R. (2021). Draft genome sequences of *Thelohania contejeani* and *Cucumispora dikerogammari*, pathogenic Microsporidia of *Freshwater crustaceans*. *Microbiology Resource Announcements*, 10(2). <https://doi.org/10.1128/MRA.01346-20>
- Corradi, N., Pombert, J.-F., Farinelli, L., Didier, E. S., & Keeling, P. J. (2010). The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nature Communications*, 1(1), 77. <https://doi.org/10.1038/ncomms1082>
- Corradi, N., & Selman, M. (2013). Latest progress in microsporidian genome research. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60(3), 309–312. <https://doi.org/10.1111/jeu.12030>
- da Silva, A. J., Schwartz, D. A., Visvesvara, G. S., de Moura, H., Slemenda, S. B., & Pieniazek, N. J. (1996). Sensitive PCR diagnosis of Infections by *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) using primers based on the region coding for small-subunit rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(4), 986–987. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.4.986-987.1996>
- Delbac, F., Peuvél, I., Metenier, G., Peyretailade, E., & Vivares, C. P. (2001). Microsporidian invasion apparatus: identification of a novel polar tube protein and evidence for clustering of *ptp1* and *ptp2* genes in three *Encephalitozoon* species. *Infection and Immunity*, 69(2), 1016–1024. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.1016-1024.2001>
- Dellibovi-Ragheb, T. A., Gisselberg, J. E., & Prigge, S. T. (2013). Parasites FeS Up: iron-sulfur cluster biogenesis in Eukaryotic pathogens. *PLoS Pathogens*, 9(4), e1003227. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003227>
- Desjardins, C. A., Sanscrainte, N. D., Goldberg, J. M., Heiman, D., Young, S., Zeng, Q., Madhani, H. D., Becnel, J. J., & Cuomo, C. A. (2015). Contrasting host–pathogen interactions and genome evolution in two generalist and specialist microsporidian pathogens of mosquitoes. *Nature Communications*, 6(1), 7121. <https://doi.org/10.1038/ncomms8121>
- Dissanaike, A. S. (1958). Experimental infection of tapeworms and oribatid mites with *Nosema helminthorum*. *Experimental Parasitology*, 7(3), 306–318. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(58\)90027-4](https://doi.org/10.1016/0014-4894(58)90027-4)
- Doliwa, A., Dunthorn, M., Rassoshanska, E., Mahé, F., Bass, D., & Duarte Ritter, C. (2021). Identifying potential hosts of short-branch Microsporidia. *Microbial Ecology*, 82(2), 549–553. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01657-9>
- Donahue, K. L., Broadley, H. J., Elkinton, J. S., Burand, J. P., Huang, W., & Andersen, J. C. (2019). Using the SSU, ITS, and Ribosomal DNA Operon Arrangement to Characterize Two Microsporidia Infecting Bruce Spanworm, *Operophtera bruceata* (Lepidoptera: Geometridae). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(3), 424–434. <https://doi.org/10.1111/jeu.12685>
- Dong, S., Shen, Z., Xu, L., & Zhu, F. (2010). Sequence and phylogenetic analysis of SSU rRNA gene of five microsporidia. *Current Microbiology*, 60(1), 30–37. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9495-7>
- Dunn, A., Terry, R., & Smith, J. (2001). Transovarial transmission in the microsporidia. *Advances in Parasitology* Volume 48 (pp. 57–100). [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(01\)48005-5](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(01)48005-5)
- Fokin, S. I. (2012). Frequency and biodiversity of symbionts in representatives of the main classes of Ciliophora. *European Journal of Protistology*, 48(2), 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2011.12.001>
- Franzen, C. (2004). Microsporidia: how can they invade other cells? *Trends in Parasitology*, 20(6), 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.04.009>
- Franzen, C. (2008). Microsporidia: a review of 150 years of research. *The Open Parasitology Journal*, 2(1), 1-34. <https://doi.org/10.2174/1874421400802010001>

- Franzen, C., & Müller, A. (1999). Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of Microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2), 243–285. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.2.243>
- Frixione, E., Ruiz, L., Santillán, M., de Vargas, L. V., Tejero, J. M., & Undeen, A. H. (1992). Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 22(1), 38–50. <https://doi.org/10.1002/cm.970220105>
- Frolov, A. N., Berim, M. N., & Grushevaya, I. V. (2019). Rearing of trilobed male uncus *Ostrinia* species in laboratory for experimental purposes. *Plant Protection News*, 3(101), 58–62. [https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-3\(101\)-58-62](https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-3(101)-58-62)
- Frolova, E. V., Paskerova, G. G., Smirnov, A. V., & Nassonova, E. S. (2021). Molecular phylogeny and new light microscopic data of *Metchnikovella spiralis* (Microsporidia: Metchnikovellidae), a hyperparasite of eugregarine *Polyrhabdina* sp. From the polychaete *Pygospio elegans*. *Parasitology*, 148(7), 779–786. <https://doi.org/10.1017/S0031182021000603>
- Gaugler, R. R., & Brooks, W. M. (1975). Sublethal effects of infection by *Nosema heliothidis* in the corn earworm, *Heliothis zea*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 26(1), 57–63. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(75\)90169-X](https://doi.org/10.1016/0022-2011(75)90169-X)
- Goblirsch, M. (2018). *Nosema ceranae* disease of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 49(1), 131–150. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0535-1>
- Goertz, D., & Hoch, G. (2008). Horizontal transmission pathways of terrestrial microsporidia: A quantitative comparison of three pathogens infecting different organs in *Lymantria dispar* L. (Lep.: *Lymantriidae*) larvae. *Biological Control*, 44(2), 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.014>
- Grushevaya, I., Ignatieva, A., & Tokarev, Y. (2020). Susceptibility of three species of the genus *Ostrinia* (Lepidoptera: Crambidae) to *Nosema pyrausta* (Microsporidia: Nosematida). *BIO Web of Conferences*, 21, 00040. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202100040>
- Grushevaya, I. V., Ignatieva, A. N., Malysh, S. M., Senderskiy, I. V., Zubarev, I. V., & Kononchuk, A. G. (2018). Spore dimorphism in *Nosema pyrausta* (Microsporidia, nosematidae): From morphological evidence to molecular genetic verification. *Acta Protozoologica*, 57(1), 49–52. <https://doi.org/10.4467/16890027AP.18.004.8398>
- Grushevaya, I. V., Senderskiy, I. V., Zubarev, I. V., & Tokarev, Y. S. (2021). Transovarial transmission of *Nosema pyrausta* in three generations of *Ostrinia nubilalis* in laboratory tests. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 169(11), 1057–1060. <https://doi.org/10.1111/eea.13100>
- Haine, E. R., Brondani, E., Hume, K. D., Perrot-Minnot, M. J., Gaillard, M., & Rigaud, T. (2004). Coexistence of three microsporidia parasites in populations of the freshwater amphipod *Gammarus roeseli*: Evidence for vertical transmission and positive effect on reproduction. *International Journal for Parasitology*, 34(10), 1137–1146. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.006>
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucl Acids Symp*, 41, 95–98. <https://doi.org/10.7717/peerj.12097/supp-2>
- Han, B., & Weiss, L. M. (2017). Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *Microbiology Spectrum*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0018-2016>
- Han, M. S., & Watanabe, H. (1988). Transovarial transmission of two Microsporidia in the silkworm, *Bombyx mori*, and disease occurrence in the progeny population. *Journal of invertebrate pathology*, 51(1), 41–45. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(88\)90086-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(88)90086-9)
- Hatakeyama, Y., Kawakami, Y., Iwano, H., Inoue, T., & Ishihara, R. (1997). Analyses and taxonomic inferences of small subunit ribosomal RNA sequences of five microsporidia pathogenic to the silkworm *Bombyx mori*. *The Journal of Sericultural Science of Japan*, 66(4), 242–252.

- Heinz, E., Williams, T. A., Nakjang, S., Noël, C. J., Swan, D. C., Goldberg, A. v., Harris, S. R., Weinmaier, T., Markert, S., Becher, D., Bernhardt, J., Dagan, T., Hacker, C., Lucocq, J. M., Schweder, T., Rattei, T., Hall, N., Hirt, R. P., & Embley, T. M. (2012). The Genome of the obligate intracellular parasite *Trachipleistophora hominis*: new insights into microsporidian genome dynamics and reductive evolution. *PLoS Pathogens*, 8(10), e1002979. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002979>
- Henry, J.E. (1981) Natural and applied control of insects by protozoa. *Annual Review of Entomology*, 26, pp 49-73. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.26.010181.000405>
- Hidetoshi, I., & Timothy, J. K. (1995). Identification and isolation of dimorphic spores from *Nosema furnacalis* (Microspora Nosematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 65(3), 230–236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jipa.1995.1035>
- Higes, M., Martín-Hernández, R., García-Palencia, P., Marín, P., & Meana, A. (2009). Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*, 1(6), 495–498. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00052.x>
- Hoch, G., Pilarska, D. K., & Dobart, N. (2009). Effect of midgut infection with the microsporidium *Endoreticulatus schubergi* on carbohydrate and lipid levels in *Lymantria dispar* larvae. *Journal of Pest Science*, 82(4), 351–356. <https://doi.org/10.1007/s10340-009-0260-2>
- Hoch, G., Verucchi, S., & Schopf, A. (2008). Microsporidian pathogens of the oak processionary moth, *Thaumetopoea processionea* (L.) (Lepidoptera, *Thaumetopoidae*), in eastern Austria's oak forests. *Mitteilungen Der Deutschen Gesellschaft Für Angewandte Entomologie*, 16, 225–228.
- Hopper, J. V., Huang, W. F., Solter, L. F., & Mills, N. J. (2016). Pathogenicity, morphology, and characterization of a *Nosema fumiferanae* isolate (Microsporidia: Nosematidae) from the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae) in California. *Journal of Invertebrate Pathology*, 134, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.01.001>
- Huang, X. H., Qi, G. J., Tang, Q. K., Pan, Z. X., Zhu, F. R., Liu, Y. S., Yu, X. Z., Luo, M. L., Jiang, M. G., Shi, M. N., Tang L., & Yu C. J. (2013). Biological characters and molecular phylogenetic analysis of a microsporidium strain isolated from *Cnaphalocrocis medinalis*. *Science of Sericulture*, 39(3), 543–550.
- Husain Khan, H., Kumar, A., Naz, H., & Hadi Husain Khan, C. (2017). Evaluation of chemical and biological insecticides for the management of cabbage butterfly, *Pieris brassicae* (Linn.) (Lepidoptera: Pieridae)-A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6).
- Hylis, M., Pilarska, D. K., Oborník, M., Vavra, J., Solter, L. F., Weiser, J., Linde, A., & McManus, M. L. (2006). *Nosema chrysoorrhoeae* n. sp. (Microsporidia), isolated from browntail moth (*Euproctis chrysoorrhoea* L.) (Lepidoptera, *Lymantriidae*) in Bulgaria: Characterization and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology*, 91(2), 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.11.006>
- Imura, Y., Hatakeyama, Y., Takahashi, M., Ohbayashi, T., Mizobe, S., & Iwano, H. (2019). A novel approach using microsporidia to estimate the flight route of the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Entomology and Zoology*, 54(2), 185–192. <https://doi.org/10.1007/s13355-019-00611-7>
- Imura, Y., Nakamura, H., Nozawa, M., & Hatakeyama, Y. (2020). Latest status of silkworm-associated microsporidians via pebrine inspection revealed by phylogenetic analyses. *Journal of Insect Biotechnology and Sericulture*, 89(3), 3063–3071. https://doi.org/10.11416/jibs.89.3_063
- Issi, I. V., & Tkach, M. T. (1971). Epizootic disease of microsporidiosis in the population of *Hydraecia micacea* esp. (Noctuidae). *International Congress of Entomology*, 2, 73–74.
- Issi, I. V. (2020). Development of microsporidiology in Russia. *Plant Protection News*, 103(3), 161–176. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-3-4972>

- Issi, I. V., & Maslennikova, V. A. (1966). The role of the parasite *Apanteles glomeratus* L. (Hymenoptera, Braconidae) in transmission of *Nosema polyvora* Blunk (Protozoa, Microsporidia). *Entomology*.
- Junnikkala, E. (1985). Testis development in *Pieris brassicae* parasitized by *Apanteles glomeratus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 37(3), 283–288. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1985.tb03486.x>
- Karpov, S. A., Mamkaeva, M. A., Aleoshin, V. V., Nassonova, E., Lilje, O., & Gleason, F. H. (2014). Morphology, phylogeny, and ecology of the aphelids (Aphelidea, Opisthokonta) and proposal for the new superphylum Opisthosporidia. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00112>
- Kashkarova, L., & Khakhanov, A. (1980). Range of the hosts of the causative agent of pebrine (*Nosema bombycis*) in the mulberry silkworm. *Parazitologiya*, 14(2), 164–167.
- 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(6862), 450–453. <https://doi.org/10.1038/35106579>
- Kazuhiro, I., Yuuka, C., Chisa, Y.-A., Shoji, H., & Susumu, S. (2004). Analyses of the ribosomal DNA region in *Nosema bombycis* NIS 001. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51(6), 598–604. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00592.x>
- Keeling, P. J., & Slamovits, C. H. (2004). Simplicity and complexity of Microsporidian Genomes. *Eukaryotic Cell*, 3(6), 1363–1369. <https://doi.org/10.1128/EC.3.6.1363-1369.2004>
- Kent, M. L., Shaw, R. W., & Sanders, J. L. (2014). Microsporidia in Fish. Chapter 20. <https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch20>
- Kent, M. L., & Speare, D. J. (2005). Review of the sequential development of *Loma salmonae* (Microsporidia) based on experimental infections of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Chinook salmon (*O. tshawytscha*). *Folia Parasitologica*, 52, 63–68. <https://doi.org/10.14411/fp.2005.009>
- Kermani, N., Abu Hassan, Z. A., Suhaimi, A., Abuzid, I., Ismail, N. F., Attia, M., & Abd Ghani, I. (2014). Parasitism performance and fitness of *Cotesia vestalis* (Hymenoptera: Braconidae) infected with *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae): Implications in integrated pest management strategy. *PLoS one*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100671>
- Kireeva, D. S., Ignatieva, A. N., & Issi, I. V. (2021). Genetic diversity of microsporidia from lepidopteran insects in Russia and neighboring countries. 2021 *International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control & 53rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology*, 118–118.
- Kleespies, R. G., Vossbrinck, C. R., Lange, M., & Jehle, J. A. (2003). Morphological and molecular investigations of a microsporidium infecting the European grape vine moth, *Lobesia botrana* Den. et Schiff., and its taxonomic determination as *Cystosporogenes legeri* nov. comb. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83(3), 240–248. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(03\)00104-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00104-6)
- Kononchuk, A. G., Martemyanov, V. V., Ignatieva, A. N., Belousova, I. A., Inoue, M. N., & Tokarev, Y. S. (2021). Susceptibility of the gypsy moth *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Erebidae) to *Nosema pyrausta* (Microsporidia: Nosematidae). *Insects*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/insects12050447>
- Kononchuk, A. K., Malysh, S. M., Rumiantseva, A. C., Kireeva, D. S., Gerus, A. V., & Zhuravlyov, V. S. (2022). Molecular detection of endosymbionts in local populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in European part of Russia. *Plant protection news*, 105(1), 50–61. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2022-105-1-15260>
- Kudo, R. R., & Decoursey, J. D. (1940). Experimental Infection of *Hyphantria cunea* with *Nosema bombycis*. In Source: *The Journal of Parasitology* (Vol. 26, Issue 2).

<http://www.jstor.org>URL:<http://www.jstor.org/stable/3272378>Accessed:31-01-201615:49UTC

- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kyei-Poku, G., Gauthier, D., & van Frankenhuyzen, K. (2008). Molecular data and phylogeny of *Nosema* infecting lepidopteran forest defoliators in the genera *Choristoneura* and *Malacosoma*. *Journal of eukaryotic microbiology*, 55(1), 51–58. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2007.00302.x>
- Lebert. (1856-1857) Ueber die gegenwärtig herrschende Krankheit des Insekts der Seide. pp. 16-74.
- Laigo, F. M., & Paschke, J. D. (1966). A microsporidian, *Thelohania* sp., in *Pieris rapae*. *J Invertebr Pathology*, 8(2), 269–270. [https://doi.org/doi:10.1016/0022-2011\(66\)90146-7](https://doi.org/doi:10.1016/0022-2011(66)90146-7).
- Lange, C. E., & Azzaro, F. G. (2008). New case of long-term persistence of *Paranosema locustae* (Microsporidia) in melanopline grasshoppers (Orthoptera: Acrididae: *Melanoplinae*) of Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(3), 357–359. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.09.002>
- Larsson, J. I. R. (1989). The light and electron microscopic cytology of *Bacillidium filiferum* sp. nov. (Microspora, bacillidiidae). *Archiv Für Protistenkunde*, 137(4), 345–355. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(89\)80017-X](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(89)80017-X)
- Larsson, R. (1979). Transmission of *Nosema mesnili* (Paillot) (Microsporida, Nosematidae), a microsporidian parasite of *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera, Pieridae) and its parasite *Apanteles glomeratus* L. (Hymenoptera, Braconidae). *Zoologischer Anzeiger*, 203(3/4), 151-157.
- LeBrun, E. G., Jones, M., Plowes, R. M., & Gilbert, L. E. (2022). Pathogen-mediated natural and manipulated population collapse in an invasive social insect. *Proceedings of the national academy of sciences*, 119(14). <https://doi.org/10.1073/pnas.2114558119>
- Lom, J., & Dyková, I. (2005). Microsporidian xenomas in fish seen in wider perspective. *Folia Parasitologica*, 52, 69–81. <https://doi.org/10.14411/fp.2005.010>
- Ma, L., Tu, Z., Xue, Y., & Wang, J. (2008). Cloning and phylogenetic analysis of small subunit ribosomal RNA core sequence of *Vairimorpha ceraces* (Microspora: Burenellidae) from the insect of Lepidoptera, Cerace Stipatana (Walker). *Acta microbiologica sinica*, 48(11), 1439–1444.
- Maddox, J. V., Baker, M. D., Jeffords, M. R., Kuras, M., Linde, A., Solter, L. F., Mcmanus, M. L., Vá, J., & Vossbrinck, C. R. (1999). *Nosema portugal*, N. sp., Isolated from Gypsy Moths (*Lymantria dispar* L.) collected in Portugal. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73(1), 1–14. <https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4817>
- Malone, L. A., & Wigley, P. J. (1981). The morphology and development of *Nosema carpocapsae*, a Microsporidian Pathogen of the Codling Moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) in New Zealand. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38, 315–329. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90097-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90097-5)
- Malysh, J. M., Chertkova, E. A., & Tokarev, Y. S. (2021). The microsporidium *Nosema pyrausta* as a potent microbial control agent of the beet webworm *Loxostege sticticalis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186, 107675. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107675>
- Malysh, J. M., Malysh, S. M., Kireeva, D. S., Kononchuk, A. G., & Demenkova, M. A. (2020). Detection of *Wolbachia* in larvae of *Loxostege sticticalis* (Pyraloidea: Crambidae) in European and Asian parts of Russia. *Plant Protection News*, 103(1), 49–52. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-1-49-52>
- Nath, S. B. (2015). Molecular characterization and phylogenetic relationships of 7 microsporidian isolates from different Lepidopteran pests cross infecting silkworm, *Bombyx mori*, based on Intergenic spacer sequence analysis. *Journal of entomology and zoology studies*, 3(2), 324-330. <https://doi.org/10.4172/2168-9849.1000133>

- Park, E., & Poulin, R. (2021). Revisiting the phylogeny of microsporidia. *International journal for parasitology*, 51(10), 855–864. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.02.005>
- Pei, B., Wang, C., Yu, B., Xia, D., Li, T., & Zhou, Z. (2021). The first report on the transovarial transmission of microsporidian *Nosema bombycis* in Lepidopteran crop pests *Spodoptera litura* and *Helicoverpa armigera*. *Microorganisms*, 9(7), 1442. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071442>
- Pieniasek, N. J., da Silva, A. J., Slemenda, S. B., Visvesvara, G. S., Kurti, T. J., & Yasunaga, C. (1996). *Nosema trichoplusiae* is a synonym of *Nosema bombycis* based on the sequence of the small subunit ribosomal RNA coding region. *Journal of invertebrate pathology*, 67(3), 316–317. <https://doi.org/10.1006/jipa.1996.0049>
- Pilarska, D., Radek, R., Huang, W.F., Takov, D., Linde, A., & Solter, L. (2015). Review of the genus *Endoreticulatus* (Microsporidia, Encephalitozoonidae) with description of a new species isolated from the grasshopper *Poecilimon thoracicus* (Orthoptera: Tettigoniidae) and transfer of *Microsporidium itiiti* Malone to the genus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 124, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.09.007>
- Pilarska, D., Takov, D., Hylis, M., Radek, R., Fiala, I., Solter, L., & Linde, A. (2017). Natural occurrence of microsporidia infecting Lepidoptera in Bulgaria. *Acta Parasitologica*, 62(4), 858–869. <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0104>
- Pleshinger, J., & Weidner, E. (1985). The microsporidian spore invasion tube. IV. Discharge activation begins with pH-triggered Ca²⁺ influx. *The Journal of Cell Biology*, 100(6), 1834–1838. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.6.1834>
- Pretto, T., Montesi, F., Ghia, D., Berton, V., Abbadi, M., Gastaldelli, M., Manfrin, A., & Fea, G. (2018). Ultrastructural and molecular characterization of *Vairimorpha austropotamobii* sp. nov. (Microsporidia: Burenellidae) and *Thelohania contejeani* (Microsporidia: Thelohaniidae), two parasites of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes complex* (Decapoda: Astacidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 151, 59–75. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.11.002>
- Remadevi, O. K., Sasidharan, T. O., Bhattacharya, J., Vossbrinck, C. R., & Dharma Rajan, P. (2010). Some pathological effects and transmission potential of a microsporidian isolate (*Nosema* sp.) from the teak defoliator *Hyblaea puera* (Lepidoptera: Hyblaeidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 30(3), 138–144. <https://doi.org/10.1017/S1742758410000214>
- Renuka, G., & Shamitha, G. (2013). Pathogenic effects of the microsporidian *Nosema* sp., on larval and post-cocoon parameters in tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury. *International Journal of Industrial Entomology*, 26(1), 1–12. <https://doi.org/10.7852/ijie.2013.26.1.001>
- Ronny Larsson, J. I., & Koie, M. (2006). The ultrastructure and reproduction of *Amphiamblyscapitellides* (Microspora, Metchnikovellidae), a parasite of the gregarine *Ancora sagittata* (Apicomplexa, Lecudinidae), with redescription of the species and comments on the taxonomy. *European Journal of Protistology*, 42(4), 233–248. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2006.07.001>
- Ryan, J. A., & Kohler, S. L. (2010). Virulence is context-dependent in a vertically transmitted aquatic host-microparasite system. *International Journal for Parasitology*, 40(14), 1665–1673. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.07.004>
- Sajap, A. S., & Lewis, L. C. (1988). Effects of the Microsporidium *Nosema pyrausta* (Microsporida: Nosematidae) on the Egg Parasitoid, *Trichogramma nubilale* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of invertebrate pathology* 52(2), 294-300. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2011\(88\)90138-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2011(88)90138-3)
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

- Saxena, K. N. & Schoonhoven, L. M. (1982). Induction of orientational and feeding preferences in *Manduca sexta* larvae for different food sources. *Entomologia experimentalis et applicata*, 32(2), 173-180. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1982.tb03199.x>
- Schuld, M., Madel, G., & Schmuck, R. (1999). Impact of *Vairimorpha* sp. (Microsporidia: Burnellidae) on *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera, Trichogrammatidae), a hymenopteran parasitoid of the cabbage moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera, Yponomeutidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 74(2), 120–126. <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4865>
- Siegel, J. P., Lacey, L. A., & Vossbrinck, C. R. (2001). Impact of a North American isolate of the microsporidium *Nosema carpocapsae* on a laboratory population of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(4), 244–250. <https://doi.org/10.1006/jipa.2001.5071>
- Siegel, J. P., Maddox, J. V., & Ruesink, W. G. (1988). Seasonal progress of *Nosema pyrausta* in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52(1), 130–136. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(88\)90111-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(88)90111-5)
- Slamovits, C. H., Fast, N. M., Law, J. S., & Keeling, P. J. (2004). Genome compaction and stability in microsporidian intracellular parasites. *Current Biology*, 14(10), 891–896. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.04.041>
- Sokolova, J., & Entzeroth, R. (1995). Morphological and immunological studies on Microsporidia: antigenic properties of *Nosema mesnili* spores. *Archiv für protistenkunde*, 145(1–2), 100–104. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(11\)80303-9](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(11)80303-9)
- Sokolova, Y. Y., Issi, I. V., & Voronin, V. N. (2018). Annotated list of species of the Microsporidia described in the Former Soviet Union and Russia in 20th century (1967-2000). *Protistology* Vol. 12, Issue 1, pp. 12–37. <https://doi.org/10.21685/1680-0826-2018-12-1-2>
- Sokolova, Y. Y., Sokolov, I. M., & Carlton, C. E. (2010). New microsporidia parasitizing bark lice (Insecta: Psocoptera). *Journal of Invertebrate Pathology*, 104(3), 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.03.008>
- Solter, L. F., & Maddox, J. V. (1998). Timing of an early sporulation sequence of Microsporidia in the genus *Vairimorpha* (Microsporidia: Burnellidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 72(3), 323–329. <https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4815>
- Solter, L. F., Maddox, J. v., & McManus, M. L. (1997). Host Specificity of Microsporidia (Protista: Microspora) from European populations of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) to indigenous North American Lepidoptera. *Journal of invertebrate pathology*, 69(2), 135–150. <https://doi.org/10.1006/jipa.1996.4650>
- Solter, L. F., Pilarska, D. K., McManus, M. L., Zubrik, M., Patocka, J., Huang, W. F., & Novotny, J. (2010). Host specificity of microsporidia pathogenic to the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.): Field studies in Slovakia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.04.009>
- Sprague V. Classification and Phylogeny of the Microsporidia. *Comparative Pathobiology*, pp 1–30. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4205-2_1
- Steinhaus, E. A., & Hughes, K. M. (1949). Two Newly Described Species of Microsporidia from the Potato Tuberworm, *Gnorimoschema operculella* (Zeller) (Lepidoptera, Gelechiidae). *The Journal of Parasitology*, 35(1), 67. <https://doi.org/10.2307/3273388>
- Stentiford, G. D., Bass, D., & Williams, B. A. P. (2019). Ultimate opportunists—the emergent enterocytozoon group microsporidia. *PLoS Pathogens*, 15(5), e1007668. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007668>
- Szumowski, S. C., & Troemel, E. R. (2015). Microsporidia-host interactions. *In Current Opinion in Microbiology* Vol. 26, pp. 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.03.006>
- Takashima, S., Ohari, Y., & Itagaki, T. (2021). Prevalence of *Nosema* species infections in *Apis cerana japonica* and *Apis mellifera* honeybees in the Tohoku region of Japan. *Parasitology International*, 83, 102361. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102361>

- Thomarat, F., Vivares, C. P., & Gouy, M. (2004). Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of Microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes. *Journal of Molecular Evolution*, 59(6), 780–791. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-2673-0>
- Timofeev, S. A. (2015). Current Concepts of Human Microsporidiosis. *Annals of the Russian academy of medical sciences*, 70(2), 257–263. <https://doi.org/10.15690/vramn.v70i2.1321>
- Timofeev, S., Tokarev, Y., & Dolgikh, V. (2020). Energy metabolism and its evolution in Microsporidia and allied taxa. *Parasitology research* Vol. 119(5), 1433–1441. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06657-9>
- Toguebaye, B. S., Marchand, B., & Bouix, G. (1988). Microsporidia of the Chrysomelidae. *Biology of Chrysomelidae*, pp. 399–416. https://doi.org/10.1007/978-94-009-3105-3_23
- Toguebaye, B. S., Quilichini, Y., Diagne, P. M., & Marchand, B. (2014). Ultrastructure and development of *Nosema podocotyloidis* n. sp. (Microsporidia), a hyperparasite of *Podocotyloides magnatestis* (Trematoda), a parasite of *Parapristipoma octolineatum* (Teleostei). *Parasite*, 21, 44. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014044>
- Tokarev, Y. S., Grizanova, E. V., Ignatieva, A. N., & Dubovskiy, I. M. (2018). Greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) as a resistant model host for *Nosema pyrausta* (Microsporidia: Nosematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 157, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.07.002>
- Tokarev, Y. S., Huang, W. F., Solter, L. F., Malyshev, J. M., Becnel, J. J., & Vossbrinck, C. R. (2020). A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. *Journal of Invertebrate Pathology*, 169. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107279>
- Tokarev, Y. S., Zinatullina, Z. Y., Ignatieva, A. N., Zhigileva, O. N., Malyshev, J. M., & Sokolova, Y. Y. (2018). Detection of two Microsporidia pathogens of the European honey bee *Apis Mellifera* (Insecta: Apidae) in Western Siberia. *Acta Parasitologica*, 63(4), 728–732. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0086>
- Tosun, O. (2020). A new isolate of *Nosema fumiferanae* (Microsporidia: Nosematidae) from the date moth *Apomyelois* (Ectomyelois) *ceratoniae*, Zeller, 1839 (Lepidoptera: Pyralidae). *Parasitology*, 147(13), 1461–1468. <https://doi.org/10.1017/S0031182020001481>
- Tsai, S. J., Lo, C. F., Soichi, Y., & Wang, C. H. (2003). The characterization of microsporidian isolates (Nosematidae: *Nosema*) from five important lepidopteran pests in Taiwan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83(1), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(03\)00035-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00035-1)
- Tsai, S.J., Huang, W.F., & Wang, C.H. (2005). Complete sequence and gene organization of the *Nosema spodopterae* rRNA gene. *The journal of eukaryotic microbiology*, 52(1), 52–54. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.3291rr.x>
- van Frankenhuyzen, K., Ebling, P., McCron, B., Ladd, T., Gauthier, D., & Vossbrinck, C. (2004). Occurrence of *Cystosporogenes* sp. (Protozoa, Microsporidia) in a multi-species insect production facility and its elimination from a colony of the eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of invertebrate pathology*, 87(1), 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.06.001>
- Vavra, J., Hylis, M., Obornik, M., & Vossbrinck, C. R. (2005). Microsporidia in aquatic microcrustacea: the copepod microsporidium *Marssoniella elegans* Lemmermann, 1900 revisited. *Folia parasitologica*, 52, 163–172. <https://doi.org/10.14411/fp.2005.021>
- Vavra, J., Hylis, M., Vossbrinck, C. R., Pilarska, D. K., Linde, A., Weiser, J., McManus, M. L., Hoch, G., & Solter, L. F. (2006). *Vairimorpha disparis* n. comb. (Microsporidia: Burenellidae): A redescription and taxonomic revision of *Thelohania disparis* Timofejeva 1956, a microsporidian parasite of the gypsy moth *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae). *Journal of eukaryotic microbiology*, 53(4), 292–304. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00108.x>

- Vavra, J., & Lukes, J. (2013). Microsporidia and ‘The Art of Living Together.’ *Advances in Parasitology*, Vol. 82, pp. 253–319. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407706-5.00004-6>
- Vavra, J., & Ronny Larsson, J. I. (2014). Structure of the Microsporidia. *The Microsporidia and Microsporidiosis* (pp. 7–84). <https://doi.org/10.1128/9781555818227.ch2>
- Vossbrinck, C. R., Becnel, J. J., & Weiss, L. M. (2014). Phylogeny of the Microsporidia Chapter 6. <https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch6>
- Vossbrinck, C. R., & Debrunner-Vossbrinck, B. A. (2005). Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia parasitologica*, 52(1–2), 131–142. <https://doi.org/10.14411/fp.2005.017>
- Vossbrinck, C. R., Maddox, J. V., Friedman, S., Debrunner-Vossbrinck, B. A., & Woese, C. R. (1987). Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient Eukaryotes. *Nature*, 326(6111), 411–414. <https://doi.org/10.1038/326411a0>
- Wang, C.Y., Solter, L. F., Tsui, W.H., & Wang, C.H. (2005). An *Endoreticulatus* species from *Ocinara lida* (Lepidoptera: Bombycidae) in Taiwan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89(2), 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.03.002>
- Wang, J.Y., Huang, K.W., Mao, X., Zhao, Y., & Lu, C. (2001). Small subunit ribosomal RNA genes of Microsporidia. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 33(2), 229–232.
- Weidner Earl, & Halonen Sandra K. (1993). Microsporidian spore envelope keratins phosphorylate and disassemble during spore activation. *Journal of eukaryotic microbiology*, 40(6), 783–788. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1993.tb04474.x>
- Weiss, J. (1973) Transmission of microsporidia via infection. *International colloquium on insect pathology and microbial control*.
- Weiser, J. (1962). Die Mikrosporidien als Parasiten der Insekten. *Anzeiger Für Schadlingskunde*, 35(4), 60–61. <https://doi.org/10.1007/BF01882462>
- Weiss, L. M., & Vossbrinck, C. R. (1999). Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the Microsporidia. *The Microsporidia and Microsporidiosis* (pp. 129–171). <https://doi.org/10.1128/9781555818227.ch4>
- Williams, B. A. P., Hamilton, K. M., Jones, M. D., & Bass, D. (2018). Group-specific environmental sequencing reveals high levels of ecological heterogeneity across the microsporidian radiation. *Environmental microbiology reports*, 10(3), 328–336. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12642>
- Xing, D., Li, Q., Zhang, J., Xiao, Y., Chen, W., & Yang, Q. (2019). Phylogenetic analysis of the complete rRNA gene sequence of *Nosema* sp. SE isolated from the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Journal of parasitology*, 105(6), 878. <https://doi.org/10.1645/18-142>
- Xing, D. X., Wu, F. Q., Luo, G. Q., & Liao, S. T. (2011). Biological characters and molecular phylogenesis of a microsporidium isolated from *Delias pasithoe* (Lepidoptera: Pieridae). *Sci. sericult*, 37(6), 1014–1018.
- Yaman, M., Bekircan, Ç., Radek, R., & Linde, A. (2014). *Nosema pieriae* sp. n. (Microsporida, Nosematidae): A new microsporidian pathogen of the cabbage butterfly *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae). *Acta protozoologica*, 53(2), 223–232. <https://doi.org/10.4467/16890027AP.14.019.1600>
- Yazar, S., Koru, O., Hamamci, B., Cetinkaya, U., Karaman, U., & Kuk, S. (2013). Mikrosporidialar ve Mikrosporidiosis. *In Turkish Society for Parasitology*, 37(2), 123–134). <https://doi.org/10.5152/tpd.2013.28>
- Yoshinori T. (1955). Field observations on a microsporidian parasite of *Pieris rapae* (L.) and *Apanteles glomeratus*. 15(3), 609–617.
- Zhang, L., Du, Y., & Wang, Y. (1995). A new species of *Endoreticulatus* (Protozoa, Microspore) from the larva of silkworm, *Bombyx mori*. L. *Journal of southwest agricultural university*, 17(4), 363–367.
- Zhao, W., Yu, S., Yang, Z., Zhang, Y., Zhang, L., Wang, R., Zhang, W., Yang, F., & Liu, A. (2016). Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) isolated from various

- birds in China. *Infection, Genetics and Evolution*, 40, 151–154. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.037>
- Zhu, F., Shen, Z., Xu, X., Tao, H., Dong, S., Tang, X., & Xu, L. (2010). Phylogenetic Analysis of complete rRNA gene sequence of *Nosema philosamiae* isolated from the Lepidopteran *Philosamia cynthia ricini*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57(3), 294–296. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2010.00475.x>
- Глулов, В. В. (2001). Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты.
- Исси И. В., и Масленникова В. А. (1966). Роль наездника *Apanteles glomeratus* L. (Hymenoptera, Braconidae) в трансмиссии микроспоридии *Nosema polyvora* Blunck (Protozoa, Microsporidia). *Энтомологическое обозрение*, 45(3), 494–498.
- Исси, И. В. (1963). Протозооноз капустной белянки в Ленинградской области и его значение для прогноза. Труды ВИЗР.
- Исси, И. В. (1971). О полиморфизме вида *Pleistophora schubergi* Zwolfer, 1927 и возможном пути видообразования у микроспоридий. *Паразитология*, 5(4), 297–301.
- Исси, И. В. (1986). Микроспоридии как тип паразитических простейших. *Протозоология* (Vol. 10, pp. 6–136).
- Исси, И. В. (2002). Паразитарные системы микроспоридий: описание и вопросы терминологии. *Паразитология*, 36(6), 478–492.
- Исси, И. В., и Онацкий, Н. М. (1982). Смертность гусениц *Pieris brassicae* от смешанной инфекции микроспоридии *Nosema mesnili* (Paillot) и *Bacillus thuringiensis* из galleriae. Бюллетень Всесоюзного НИИ Защиты Растений, 3–9.
- Исси И.В. (1964). Микроспоридиоз капустной белянки и других насекомых и его биологическое значение.
- Ефименко, Т. М., Соколова, Ю. Я., Исси, И. В. (1990). О передаче микроспоридии *Vairimorpha antheraeae* половым путем у совок (Noctuidae). *Паразитология*, 24(1), 63-70.
- Токарев, Ю. С., Малыш, Ю. М., Дубинина, Е. В., Алексеев, А. Н., Фролов, А. Н., и Исси, И. В. (2007). Значение микроспоридий в борьбе с вредными членистоногими. *Защита и карантин растений*, 15–17.

Приложение

Приложение 1.

Таблица 1.1. Виды и изоляты микроспоридий, использованные в филогенетическом анализе, их хозяева, номера нуклеотидных последовательностей мсрРНК в GenBank.

Номер в GenBank	Название микроспоридии	Хозяин	Примечание
KY615713	<i>Microsporidium</i> sp.	<i>Eilema complanum</i>	(Pilarska et al., 2017)
MH118301	<i>Microsporidia</i> sp. YuT-2019a	<i>Agrotis segetum</i>	Не опубликовано
D85503	<i>Nosema bombycis</i>	<i>Bombyx mori</i>	(Hatakeyama et al., 1997)
KY126433	<i>Nosema rachiplusiae</i>	<i>Rachiplusia nu</i>	(Arneodo & Sciocco-Cap, 2018)
LC422302	<i>Nosema</i> sp.	<i>Spodoptera litura</i>	(Imura et al., 2019)
AB569605	<i>Nosema</i> sp.	<i>Spodoptera litura</i>	(Imura et al., 2019)
MG907030	<i>Nosema</i> sp.	<i>Spodoptera</i> sp.	(Tokarev et al., 2020)
MG907033	<i>Nosema</i> sp.	<i>Striacosta albicosta</i>	(Tokarev et al., 2020)
AY747307	<i>Nosema spodopterae</i>	<i>Spodoptera litura</i>	(Tsai et al., 2005)
U09282	<i>Nosema trichoplusiae</i>	<i>Spodoptera exigua</i>	(Pieniazek et al., 1996)
Y00266	<i>Vairimorpha necatrix</i>	<i>Mythimna unipuncta</i>	(Vossbrinck et al., 1987)
LC422313	<i>Vairimorpha</i> sp.	<i>Spodoptera litura</i>	(Imura et al., 2019)
KY615716	<i>Vairimorpha</i> sp.	<i>Orthosia cruda</i>	(Pilarska et al., 2017)
KY615715	<i>Vairimorpha</i> sp.	<i>Orthosia cerasi</i>	(Pilarska et al., 2017)
L39109	<i>Endoreticulatus schubergi</i>	<i>Lymantria dispar</i>	(Baker et al., 1995)
LC422301	<i>Endoreticulatus</i> sp.	<i>Spodoptera litura</i>	(Imura et al., 2019)
LC422312	<i>Endoreticulatus</i> sp.	<i>Spodoptera litura</i>	(Imura et al., 2019)
U10342	<i>Endoreticulatus</i> sp.	<i>Agrotis exclamationis</i>	(Silva et al., 1996)
AJ002605	<i>Trachipleistophora hominis</i>	<i>Homo sapiens</i>	(Cheney et al., 2000)
LC422327	<i>Trachipleistophora</i> sp.	<i>Spodoptera litura</i>	(Imura et al., 2019a)
XR552272	<i>Vavraia culicis</i>	<i>Aedes albopictus</i>	(Desjardins et al., 2015)
LC422328	<i>Vavraia</i> sp.	<i>Spodoptera litura</i>	(Imura et al., 2019)
LC422331	<i>Vavraia</i> sp.	<i>Spodoptera litura</i>	(Imura et al., 2019)
GU299512	<i>Orthosomella</i> sp. KMI-3	<i>Conistra vaccinii</i>	(Solter et al., 2010)
AJ302316	<i>Orthosomella operophterae</i>	<i>Operophtera brumata</i>	(Canning et al., 2001)

*Полужирным шрифтом выделены типовые виды родов микроспоридий.

Таблица 1.2. Обобщение морфометрических и генетических данных для представителей семейства Noctuidae, анализируемых в данной работе

Название микроспоридий	Размер спор, мкм	Форма спор	Типовой вид	Сходство с типовым видом, в %	Наиболее схожий изолят	Основной хозяин	Сходств, в %	Инфекционные свойства		Примечание
								Не заражает	Инфицирует	
<i>Nosema hydraeciae</i> ex <i>Hydraecia micacea</i> North-Western Russia 1967	4,19×2,05	Овальные	<i>Nosema bombycis</i> D85503	99,6	<i>Nosema bombycis</i> AB125664	<i>Bombyx mori</i>	99.9	<i>Mamestra brassicae</i> , <i>Agrotis segetum</i>	–	(Issi & Tkatch, 1971; Kazuhiro et al., 2004)
<i>Nosema</i> sp. ex <i>Heliothis</i> sp. Russia	4,53×1,89	Овальные	<i>Nosema bombycis</i> D85503	99,75	<i>Nosema rachiplusi</i> ae KY126433	<i>Rachiplusia nu</i>	99.9	–	–	(Arneodo & Sciocco–Cap, 2018)
<i>Nosema</i> sp. ex <i>Helicoverpa zea</i> South-Western Russia 2019	3,94×2,38	Грушевидные	<i>Nosema bombycis</i> D85503	100	<i>Nosema bombycis</i> D85503	<i>Bombyx mori</i>	100	–	<i>Ostrinia nubilalis</i> , <i>Loxostege sticticalis</i>	(Hatakeyama et al., 1997; Kononchuk et al., 2022)
<i>Nosema</i> sp. ex <i>Mamestra brassicae</i> 1962	5,45×2,6	Вытянутая овальная форма	<i>Nosema bombycis</i> D85503	97,65	<i>Vairimorpha austropotamobii</i> MF344634	<i>Austropotamobius pallipes</i> complex	100	<i>Bombyx mori</i> , <i>Manduca sexta</i> , <i>Hyphantria cunea</i>	<i>Pieris brassicae</i> , <i>Pieris rapae</i> , <i>Pieris napi</i> , <i>Plutella xylostella</i> , <i>Ostrinia scapularis</i>	(Pretto et al., 2018)
					<i>Nosema polyvora</i>	<i>Pieris brassicae</i>	100			

<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Mamestra brassicae</i> North-Western Russia 1967	4,2× 2,05	Овальные, переходящие в грушевидную форму	<i>Vairimorpha necatrix</i> Y00266	95,2	<i>Vairimorpha vespula</i> U11047	<i>Vespula germanica</i>	99,9	–	–	(Baker et al., 1995)
<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Agrotis segetum</i> Russia	–	–	<i>Vairimorpha necatrix</i> Y00266	94,9	<i>Nosema</i> sp. LC510169	<i>Apis cerana</i>	99,9	–	–	(Takashima et al., 2021)
<i>Microsporidium</i> sp. ex <i>Agrotis segetum</i> Uzbekistan 1967	2,73× 1,79	Овальная	<i>Microsporidium</i> sp. KY615713	100	<i>Microsporidium</i> sp. KY615713	<i>Eilema complanatum</i>	100	–	–	(Pilarska et al., 2017)
<i>Endoreticulatus</i> sp. ex <i>Agrotis exclamationis</i> Russia 1968	3,05× 1,58	Овальная	<i>Endoreticulatus schubergi</i> L39109	99,4	<i>Pleistophora</i> sp. OSL–2014–2 LC422301	<i>Spodoptera litura</i>	99,8	–	–	(Imura et al., 2019)
<i>Endoreticulatus</i> sp. ex <i>Helicoverpa armigera</i> South-Western Russia 1966	3,8× 1,74	Овальная	<i>Endoreticulatus schubergi</i> L39109	99,5	<i>Pleistophora</i> sp. OSL–2012–7 LC052199	<i>Spodoptera litura</i>	99,9	–	–	(Imura et al., 2019)

Таблица 1.3. Сходство последовательностей мсрРНК типового вида рода *Nosema* – *N. bombycis* с последовательностями, доступными в GenBank и полученными в данном исследовании.

№	Название пробы	Сходство последовательностей, % (верхние правые ячейки) и генетическое расстояние (нижние левые ячейки)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	<i>Nosema bombycis</i> D85503	ID	100	99,8	99,7	99,8	99,7	99,7	99,4	99,4	99,3	99	97,4
2	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Spodoptera litura</i> Ogasawara Japan LC422302	0	ID	99,8	99,7	99,8	99,7	99,7	99,4	99,4	99,3	99	97,4
3	<i>Nosema rachiplusiae</i> ex <i>Rachiplusia nu</i> Argentina KY126433	0,0014	0,0014	ID	99,5	99,7	99,5	99,5	99,5	99,3	99,1	98,8	97,3
4	<i>Nosema hydraeciae</i> ex <i>Hydraecia micacea</i> North-Western Russia 1967	0,0014	0,0014	0,0028	ID	99,8	99,7	99,7	99,4	99,4	99,3	98,8	97,2
5	<i>Nosema trichoplusiae</i> ex <i>Spodoptera exigua</i> U09282	0	0	0,0014	0,0014	ID	99,8	99,8	99,5	99,5	99,4	99	97,3
6	<i>Nosema spodopterae</i> ex <i>Spodoptera litura</i> AY747307	0	0	0,0014	0,0014	0	ID	100	99,7	99,4	99,4	98,8	97,3
7	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Helicoverpa zea</i> South-Western Russia 2019	0	0	0,0014	0,0014	0	0	ID	99,7	99,4	99,4	98,8	97,3
8	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Heliothis</i> sp. Russia	0,0028	0,0028	0,0014	0,0042	0,0028	0,0028	0,0028	ID	99,1	99,1	98,6	97
9	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Spodoptera litura</i> Vietnam AB569605	0,0042	0,0042	0,0056	0,0056	0,0042	0,0042	0,0042	0,007	ID	99	98,6	97,2
10	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Striacosta albicosta</i> Nebraska USA 1974 MG907033	0,0014	0,0014	0,0028	0,0028	0,0014	0	0	0,0028	0,0056	ID	99	97,2
11	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Spodoptera</i> sp. Yugoslavia 1985 MG907030	0,0056	0,0056	0,007	0,0084	0,007	0,007	0,007	0,0098	0,0112	0,0084	ID	96,9
12	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Mamestra brassicae</i> 1962 Russia	0,0228	0,0228	0,0242	0,0242	0,0228	0,0213	0,0213	0,0242	0,0242	0,0199	0,0242	ID

Таблица 1.4. Сходство последовательностей мсрРНК типового вида рода *Vairimorpha* – *Vairimorpha necatrix* с последовательностями, доступными в GenBank и полученными в данном исследовании.

№	Название пробы	Сходство последовательностей, % (верхние правые ячейки) и генетическое расстояние (нижние левые ячейки)					
		1	2	3	4	5	6
1	<i>Vairimorpha necatrix</i> Y00266	ID	99	95	95,1	94,9	94,7
2	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Spodoptera litura</i> Ogasawara Japan LC422313	0,0063	ID	95,4	95,6	95,4	95,2
3	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Orthosia cruda</i> KY615716	0,0443	0,0441	ID	99,5	99,7	97,1
4	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Mamestra brassicae</i> North-Western Russia 1967	0,0429	0,0414	0,005	ID	99,5	97,2
5	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Orthosia cerasi</i> KY615715	0,0456	0,0441	0,0025	0,005	ID	97,1
6	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Agrotis segetum</i> Russia	0,047	0,0455	0,0294	0,0281	0,0294	ID

Таблица 1.5. Сходство последовательностей мсрРНК типового вида рода *Endoreticulatus* – *Endoreticulatus schubergi* с последовательностями, доступными в GenBank и полученными в данном исследовании.

№	Название пробы	Сходство последовательностей, % (верхние правые ячейки) и генетическое расстояние (нижние левые ячейки)					
		1	2	3	4	5	6
1	<i>Endoreticulatus schubergi</i> L39109	ID	99,6	99,5	99,5	99,5	99,2
2	<i>Endoreticulatus</i> sp. ex <i>Spodoptera litura</i> Ogasawara Japan LC422301	0,0025	ID	99,8	99,7	99,6	99,6
3	<i>Endoreticulatus</i> sp. ex <i>Helicoverpa armigera</i> South-Western Russia 1966	0,0037	0,0012	ID	99,6	99,5	99,7
4	<i>Endoreticulatus</i> sp. ex <i>Spodoptera litura</i> Ogasawara Japan LC422312	0,0037	0,0025	0,0037	ID	99,3	99,3
5	<i>Endoreticulatus</i> sp. <i>Agrotis exclamationis</i> U10342	0,0037	0,0037	0,005	0,0062	ID	99,5
6	<i>Endoreticulatus</i> sp. ex <i>Agrotis exclamationis</i> Russia 1968	0,0062	0,0037	0,0025	0,0062	0,005	ID

Приложение 2.

Таблица 2.1. Виды и изоляты микроспоридий, использованные в филогенетическом анализе, их хозяева, номера доступа нуклеотидной последовательности мсрРНК в GenBank.

Номер в GenBank	Название микроспоридии	Хозяин	Отряд	Семейство	Род	Примечание
FJ865223	<i>Mockfordia xanthocaeciliae</i>	<i>Xanthocaecilius sommermanae</i>	Psocodea	Caeciliusidae	<i>Xanthocaecilius</i>	(Sokolova et al., 2010)
EU219082	<i>Nosema sp. CPP</i>	<i>Choristoneura pinus</i>	Lepidoptera	Tortricidae	<i>Choristoneura</i>	(Kyei-Poku et al., 2008)
MN608537	<i>Nosema fumiferanae</i>	<i>Choristoneura fumiferana</i>	Lepidoptera	Tortricidae	<i>Choristoneura</i>	(Hopper et al., 2016)
KC836092	<i>Nosema sp. CmM2</i>	<i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	Lepidoptera	Crambidae	<i>Cnaphalocrocis</i>	(Huang et al., 2013)
KT020736	<i>Nosema fumiferanae</i>	<i>Epiphyas postvittana</i>	Lepidoptera	Tortricidae	<i>Epiphyas</i>	(Tosun, 2020)
D85503	<i>Nosema bombycis</i>	<i>Bombyx mori</i>	Lepidoptera	Bombycidae	<i>Bombyx</i>	(Hatakeyama et al., 1997)
HQ629624	<i>Nosema mylitta</i>	<i>Antheraea mylitta</i>	Lepidoptera	Saturniidae	<i>Antheraea</i>	Unpublished
EU864526	<i>Nosema antheraeae</i>	<i>Antheraea pernyi</i>	Lepidoptera	Saturniidae	<i>Antheraea</i>	Unpublished
FJ767862	<i>Nosema philosamia</i>	<i>Samia cynthia</i>	Lepidoptera	Saturniidae	<i>Samia</i>	(Zhu et al., 2010)
MG456600	<i>Nosema sp.</i>	<i>Operophtera bruceata</i>	Lepidoptera	Geometridae	<i>Operophtera</i>	(Donahue et al., 2019)
MG907032	<i>Nosema disstriae</i>	<i>Malacosoma disstria</i>	Lepidoptera	Lasiocampidae	<i>Malacosoma</i>	(Tokarev et al., 2020)
EU219084	<i>Nosema sp. CO</i>	<i>Choristoneura occidentalis</i>	Lepidoptera	Tortricidae	<i>Choristoneura</i>	(Kyei-Poku et al., 2008)
GQ244502	<i>Nosema sp.</i>	<i>Hyblaea pueria</i>	Lepidoptera	Hyblaeidae	<i>Hyblaea</i>	(Remadevi et al., 2010)
AF426104	<i>Vairimorpha (Nosema) carpocapsae</i>	<i>Cydia pomonella</i>	Lepidoptera	Tortricidae	<i>Cydia</i>	(Siegel et al., 2001)
Y00266	<i>Vairimorpha necatrix</i>	<i>Mythimna unipuncta</i>	Lepidoptera	Noctuidae	<i>Mythimna</i>	(Vossbrinck et al., 1987)
D85502	<i>Vairimorpha sp.</i>	<i>Bombyx mori</i>	Lepidoptera	Bombycidae	<i>Bombyx</i>	(Hatakeyama et al., 1997)

AY940656	<i>Vairimorpha (Nosema) chrysorrhoeae</i>	<i>Euproctis chrysorrhoea</i>	Lepidoptera	Erebidae	<i>Euproctis</i>	(Hyliš et al., 2006)
KY615717	<i>Vairimorpha</i> sp.	<i>Tortrix viridana</i>	Lepidoptera	Tortricidae	<i>Tortrix</i>	(Pilarska et al., 2017)
KY615716	<i>Vairimorpha</i> sp.	<i>Orthosia cruda</i>	Lepidoptera	Noctuidae	<i>Orthosia</i>	(Pilarska et al., 2017)
KY615715	<i>Vairimorpha</i> sp.	<i>Orthosia cerasi</i>	Lepidoptera	Noctuidae	<i>Orthosia</i>	(Pilarska et al., 2017)
AF033316	<i>Vairimorpha (Nosema) portugal</i>	<i>Lymantria dispar</i>	Lepidoptera	Erebidae	<i>Lymantria</i>	(Maddox et al., 1999)
MG456599	<i>Vairimorpha</i> sp.	<i>Operophtera bruceata</i>	Lepidoptera	Geometridae	<i>Operophtera</i>	(Donahue et al., 2019)
EU219086	<i>Vairimorpha (Nosema) thomsoni</i>	<i>Choristoneura conflictana</i>	Lepidoptera	Tortricidae	<i>Choristoneura</i>	(Kyei-Poku et al., 2008)
AF033315	<i>Vairimorpha lymantriae</i>	<i>Lymantria dispar</i>	Lepidoptera	Erebidae	<i>Lymantria</i>	(Maddox et al., 1999)
DQ272237	<i>Vairimorpha (Thelohania) disparis</i>	<i>Lymantria dispar</i>	Lepidoptera	Erebidae	<i>Lymantria</i>	(Vavra et al., 2006)
EU267796	<i>Vairimorpha ceraces</i>	<i>Cerace stipatana</i>	Lepidoptera	Tortricidae	<i>Cerace</i>	(Ma et al., 2008)
D85500	<i>Endoreticulatus</i> sp.	<i>Bombyx mori</i>	Lepidoptera	Bombycidae	<i>Bombyx</i>	(Hatakeyama et al., 1997)
AY009115	<i>Endoreticulatus bombycis</i>	<i>Bombyx mori</i>	Lepidoptera	Bombycidae	<i>Bombyx</i>	(Zhang et al., 1995)
EU260046	<i>Endoreticulatus</i> sp.	<i>Thaumetopoea processionea</i>	Lepidoptera	Notodontidae	<i>Thaumetopoea</i>	(Hoch et al., 2008)
AY502944	<i>Endoreticulatus</i> sp.	<i>Ocinara lida</i>	Lepidoptera	Bombycidae	<i>Ernolatia</i>	(Wang et al., 2005)
KU900486	<i>Endoreticulatus</i> sp.	<i>Euproctis chrysorrhoea</i>	Lepidoptera	Erebidae	<i>Euproctis</i>	(Pilarska et al., 2015)
KU900485	<i>Endoreticulatus</i> sp.	<i>Euproctis chrysorrhoea</i>	Lepidoptera	Erebidae	<i>Euproctis</i>	(Pilarska et al., 2015)
L39109	<i>Endoreticulatus schubergi</i>	<i>Lymantria dispar</i>	Lepidoptera	Erebidae	<i>Lymantria</i>	(Baker et al., 1995)
AY502945	<i>Endoreticulatus</i> sp. <i>CHW2004</i>	<i>Lymantria dispar</i>	Lepidoptera	Erebidae	<i>Lymantria</i>	(Wang et al., 2005)
AY233131	<i>Cystosporogenes legeri</i>	<i>Lobesia botrana</i>	Lepidoptera	Tortricidae	<i>Lobesia</i>	(Kleespies et al., 2003)
AJ302320	<i>Cystosporogenes operophterae</i>	<i>Operophtera brumata</i>	Lepidoptera	Geometridae	<i>Operophtera</i>	(Canning et al., 2001)

AY566237	<i>Cystosporogenes</i> sp.	<i>Choristoneura fumiferana</i>	Lepidoptera	Tortricidae	<i>Choristoneura</i>	(van Frankenhuyzen et al., 2004)
LC467332	<i>Cystosporogenes</i> sp.	<i>Bombyx mori</i>	Lepidoptera	Bombycidae	<i>Bombyx</i>	(Imura et al., 2020)
LC467308	<i>Cystosporogenes</i> sp.	<i>Bombyx mori</i>	Lepidoptera	Bombycidae	<i>Bombyx</i>	(Imura et al., 2020)
GU299511	<i>Cystosporogenes</i> sp.	<i>Operophtera brumata</i>	Lepidoptera	Geometridae	<i>Operophtera</i>	(Solter et al., 2010)
AJ302317	<i>Orthosomella operophterae</i>	<i>Operophtera brumata</i>	Lepidoptera	Geometridae	<i>Operophtera</i>	(Canning et al., 2001)
GU299512	<i>Orthosomella</i> sp. KMI-3	<i>Conistra vaccinii</i>	Lepidoptera	Noctuidae	<i>Conistra</i>	(Solter et al., 2010)
AJ302316	<i>Orthosomella operophterae</i>	<i>Operophtera brumata</i>	Lepidoptera	Geometridae	<i>Operophtera</i>	(Canning et al., 2001)

*Полужирным шрифтом выделены типовые виды родов микроспоридий.

Таблица 2.2. Обобщение морфометрических и генетических данных для представителей сборной группы листогрызущих дендрофаги

Название микроспоридии по филогенетическому дереву	Размер спор, мкм	Форма спор	Типовой вид	Сходство с типовым видом, в %	Наиболее схожий изолят	Основной хозяин	Сходство, в %	Примечание
<i>Nosema</i> sp. ex <i>Lymantria dispar</i> South-Eastern Russia 1962	4,14×2,35	Грушевидная	<i>Nosema bombycis</i> D85503	99,6	<i>Nosema bombycis</i> D85503	<i>Bombyx mori</i>	99,6	(Hatakeyama et al., 1997)
<i>Nosema</i> sp. ex <i>Dendrolimus superans</i> South-Western Russia 1972	4,53×2,8	Грушевидная	<i>Nosema bombycis</i> D85503	99,6	<i>Nosema bombycis</i> MZ314703	<i>Bombyx mori</i>	99,7	(Franzen & Müller, 1999)
<i>Nosema</i> sp. ex <i>Lymantria</i> sp. South-Eastern Russia 1965	–	–	<i>Nosema bombycis</i> D85503	99,6	<i>Vairimorpha austropotamobii</i> MF344634	<i>Austropotamobius pallipes complex</i>	99,9	(Pretto et al., 2018)
<i>Nosema</i> sp. ex <i>Aporia crataegi</i> South-Western Russia 2017	–	–	<i>Nosema bombycis</i> D85503	97,7	<i>Nosema</i> sp. CmM2 KC836092	<i>Bombyx mori</i>	100	(Huang et al., 2013)
<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Leucoma salicis</i> South-Eastern Russia 1967	4,79×2,86	Овальные, переходящие в грушевидную форму	<i>Vairimorpha necatrix</i> Y00266	96,5	<i>Nosema thomsoni</i> EU219086	<i>Choristoneura conflictana</i>	99,6	(Kyei-Poku et al., 2008)
<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Malacosoma neustria</i> Russia	–	–	<i>Vairimorpha necatrix</i> Y00266	95,3	<i>Vairimorpha lymantriae</i> AF033315	<i>Lymantria dispar</i>	100	(Maddox et al., 1999)
<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Lymantria dispar</i> Russia 1965	3,74×2,16	Овальная	<i>Vairimorpha necatrix</i> Y00266	96	<i>Vairimorpha lymantriae</i> AF033315	<i>Lymantria dispar</i>	99,9	(Maddox et al., 1999)
<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Lymantria dispar</i> South-Western Russia 1961	5,18×2,3	Овальная	<i>Vairimorpha necatrix</i> Y00266	96	<i>Vairimorpha lymantriae</i> AF033315	<i>Lymantria dispar</i>	99,9	(Maddox et al., 1999)

<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Euproctis chrysorrhoea</i> Russia	4,89× 2,19	Овальная	<i>Vairimorpha</i> <i>necatrix</i> Y00266	95	<i>Microsporidium</i> sp. KY615715	<i>Orthosia cerasi</i>	99,9	(Pilarska et al., 2017)
<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Lymantria dispar</i> Russia	4,74× 2,39	Овальная	<i>Vairimorpha</i> <i>necatrix</i> Y00266	95,1	<i>Vairimorpha</i> <i>lymantriae</i> AF033315	<i>Lymantria dispar</i>	99,8	(Maddox et al., 1999)
<i>Microsporidium</i> sp. ex <i>Thaumetopoea</i> <i>processionea</i> Ukraine 1961	3,37× 2,08	Овальная	<i>Mockfordia</i> <i>xanthocaeciliae</i> FJ865223	89	<i>Mockfordia</i> <i>xanthocaeciliae</i> FJ865223	<i>Xanthocaecilius</i> <i>sommermanae</i>	89	(Sokolova et al., 2010)
<i>Endoreticulatus</i> sp. ex <i>Lymantria dispar</i> 1963	2,5× 1,43	Овальная	<i>Endoreticulatus</i> <i>schubergi</i> L39109	99,6	<i>Pleistophora</i> sp. OSL-2014-2 LC422301	<i>Spodoptera litura</i>	99,9	(Imura et al., 2019)

Таблица 2.3. Сходство последовательностей мсрРНК типового вида рода *Nosema* – *N. Bombycis* с последовательностями, доступными в GenBank и полученными в данном исследовании.

№	Название пробы	Сходство последовательностей, % (верхние правые ячейки) и генетическое расстояние (нижние левые ячейки)															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	<i>Nosema bombycis</i> D85503	ID	100	99,8	99,6	99,8	99,6	99,5	99,5	99,8	99,5	99,5	99,1	97,3	97,3	97,2	97,3
2	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Hyblaea puer</i> a India GQ244502	0	ID	99,8	99,6	99,8	99,6	99,5	99,5	99,8	99,5	99,5	99,1	97,3	97,3	97,2	97,3
3	<i>Nosema philosamiae</i> FJ767862	0,00 16	0,00 16	ID	99,8	99,6	99,8	99,6	99,6	100	99,6	99,3	99,3	97,2	97	97	97,2
4	<i>Nosema</i> sp. CO ex <i>Choristoneura occidentalis</i> EU219084	0,00 16	0,00 16	0	ID	99,5	100	99,8	99,8	99,8	99,5	99,1	99,1	97	97	96,9	97
5	<i>Nosema Vairimorpha ceraces</i> EU267796	0,00 16	0,00 16	0,00 33	0,00 33	ID	99,5	99,3	99,3	99,6	99,3	99	97,2	97,2	97	97,2	
6	<i>Nosema fumiferanae</i> ex <i>Epiphyas postvittana</i> California USA 2013 KT020736	0,00 16	0,00 16	0	0	0,00 33	ID	99,8	99,8	99,8	99,5	99,1	99,1	97	97	96,9	97
7	<i>Nosema fumiferanae</i> ex <i>Choristoneura fumiferana</i> Canada MN608537	0,00 33	0,00 33	0,00 16	0,00 16	0,00 49	0,00 16	ID	99,6	99,6	99,3	99	99	96,9	96,9	96,7	96,9
8	<i>Nosema</i> sp. CPP ex <i>Choristoneura pinus</i> EU219082	0,00 16	0,00 16	0	0	0,00 33	0	0,00 16	ID	99,6	99,3	99	99	96,9	96,9	96,7	96,9
9	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Lymantria dispar</i> South-Eastern Russia 1962	0,00 16	0,00 16	0	0	0,00 33	0	0,00 16	0	ID	99,6	99,3	99,3	97,2	97,2	97	97,2
10	<i>Nosema mylitta</i> HQ629624	0,00 49	0,00 49	0,00 33	0,00 33	0,00 66	0,00 33	0,00 49	0,00 33	0,00 33	ID	99	99	96,9	96,9	96,7	96,9
11	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Dendrolimus superans</i> South-Western Russia 1972	0,00 49	0,00 49	0,00 66	0,00 66	0,00 66	0,00 66	0,00 82	0,00 66	0,00 66	0,00 99	ID	98,6	96,9	96,9	96,7	96,9
12	<i>Nosema antheraeae</i> EU864526	0,00 82	0,00 82	0,00 65	0,00 66	0,00 98	0,00 66	0,00 82	0,00 66	0,00 65	0,00 98	0,0 132	ID	96,5	96,5	96,4	96,5
13	<i>Nosema</i> sp. CmM2 ex <i>Cnaphalocrocis medinalis</i> China KC836092	0,02 51	0,02 51	0,02 68	0,02 68	0,02 68	0,02 68	0,02 85	0,02 68	0,02 68	0,03 02	0,0 303	0,03 36	ID	99,3	99,8	100
14	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Lymantria</i> sp. South-Eastern Russia 1965	0,02 34	0,02 34	0,02 5	0,02 51	0,02 51	0,02 51	0,02 68	0,02 51	0,02 5	0,02 84	0,0 286	0,03 19	0,00 49	ID	99,1	99,3
15	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Operophtera bruceata</i> USA 2014 MG456600	0,02 51	0,02 51	0,02 68	0,02 68	0,02 68	0,02 68	0,02 85	0,02 69	0,02 68	0,03 02	0,0 303	0,03 36	0	0,0 049	ID	99,8
16	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Aporia crataegi</i> South-Western Russia 2017	0,02 51	0,02 51	0,02 68	0,02 68	0,02 68	0,02 68	0,02 85	0,02 68	0,02 68	0,03 02	0,0 303	0,03 36	0	0,0 049	0	ID

Таблица 2.4. Сходство последовательностей мсрПНК типового вида рода *Vairimorpha* – *Vairimorpha necatrix* с последовательностями, доступными в GenBank и полученными в данном исследовании.

№	Название пробы	Сходство последовательностей, % (верхние правые ячейки) и генетическое расстояние (нижние левые ячейки)																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	<i>Vairimorpha necatrix</i> Y00266	ID	96,6	96,1	96,1	99,1	95,3	95,3	95,1	95,3	95,3	95,3	95,5	95,1	95,1	95,1	95,1	95
2	<i>Vairimorpha (Nosema) carpocapsae</i> AF426104	0,031 8	ID	98,9	98,9	96,1	98,2	98,2	98,1	98,2	98,2	98,2	98,3	98,1	98,1	98,1	98,1	97, 9
3	<i>Vairimorpha (Nosema) thomsoni</i> EU219086	0,037 6	0,010 8	ID	100	95,5	98,9	98,9	98,7	98,9	98,9	98,9	99,1	98,7	98,7	98,7	98,7	98, 6
4	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Operophtera bruceata</i> USA 2016 MG456599	0,037 6	0,010 8	0	ID	95,5	98,9	98,9	98,7	98,9	98,9	98,9	99,1	98,7	98,7	98,7	98,7	98, 6
5	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Bombyx mori</i> D85502	0,006 7	0,036 1	0,041 9	0,041 9	ID	94,7	94,7	94,6	94,7	94,7	94,7	95	94,6	94,6	94,6	94,6	94, 5
6	<i>Vairimorpha (Thelohania) disparis</i> DQ272237	0,044 8	0,016 3	0,009 5	0,009 5	0,049 2	ID	99,8	99,7	99,8	99,8	99,8	98,9	99,7	99,7	99,7	99,7	99, 5
7	<i>Vairimorpha lymantriae</i> AF033315	0,046 2	0,017 7	0,010 8	0,010 8	0,050 6	0	ID	99,8	100	100	100	98,9	99,8	99,8	99,8	99,8	99, 7
8	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Tortrix viridana</i> KY615717	0,047 7	0,019 1	0,012 2	0,012 2	0,052 1	0,001 3	0,001 3	ID	99,8	99,8	99,8	98,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99, 5
9	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Orthosia cruda</i> KY615716	0,046 2	0,017 7	0,010 8	0,010 8	0,050 6	0	0	0,001 3	ID	100	100	98,9	99,8	99,8	99,8	99,8	99, 7
10	<i>Vairimorpha (Nosema) portugal</i> ex <i>Lymantria dispar</i> AF033316	0,046 2	0,017 7	0,010 8	0,010 8	0,050 6	0	0	0,001 3	0	ID	100	98,9	99,8	99,8	99,8	99,8	99, 7
11	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Malacosoma neustria</i> Russia	0,046 2	0,017 7	0,010 8	0,010 8	0,050 6	0	0	0,001 3	0	0	ID	98,9	99,8	99,8	99,8	99,8	99, 7
12	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Leucoma salicis</i> South-Eastern Russia 1967	0,040 6	0,013 6	0,005 4	0,005 4	0,044 9	0,006 8	0,008 1	0,009 5	0,008 1	0,008 1	0,008 1	ID	98,7	98,7	98,7	98,7	98, 6
13	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Lymantria dispar</i> South-Western Russia 1961	0,046 3	0,017 7	0,010 8	0,010 8	0,050 7	0	0	0,001 3	0	0	0	0,008 1	ID	99,7	99,7	99,7	99, 5
14	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Lymantria dispar</i> Russia 1965	0,047 6	0,019 1	0,012 2	0,012 2	0,052	0,001 3	0,001 3	0,002 7	0,001 3	0,001 3	0,001 3	0,009 5	0,001 3	ID	99,7	99,7	99, 8
15	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Orthosia cerasi</i> KY615715	0,047 6	0,019 1	0,012 2	0,012 2	0,052	0,001 3	0,001 3	0,002 7	0,001 3	0,001 3	0,001 3	0,009 5	0,001 3	0,002 7	ID	100	99, 5
16	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Euproctis chrysorrhoea</i> Russia	0,047 6	0,019 1	0,012 2	0,012 2	0,052	0,001 3	0,001 3	0,002 7	0,001 3	0,001 3	0,001 3	0,009 5	0,001 3	0,002 7	0	ID	99, 5
17	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Lymantria dispar</i> Russia	0,049 1	0,020 5	0,013 6	0,013 6	0,053 5	0,002 7	0,002 7	0,004	0,002 7	0,002 7	0,002 7	0,010 8	0,002 7	0,001 3	0,00 4	0,00 4	ID

Приложение 3.

Таблица 3.1. Виды и изоляты микроспоридий, использованные в филогенетическом анализе, их хозяева, номера доступа нуклеотидных последовательностей мсрРНК в GenBank.

Номер в GenBank	Название микроспоридии	Хозяин	Примечание
D85503	<i>Nosema bombycis</i>	<i>Bombyx mori</i>	(Hatakeyama et al., 1997)
HQ399665	<i>Nosema (Vairimorpha) sp.</i>	<i>Pieris rapae</i>	(Chen et al., 2012)
AF240354	<i>Nosema sp.</i>	<i>Pieris rapae</i>	(Wang et al., 2001)
EU864531	<i>Nosema sp.</i>	<i>Pieris rapae</i>	(Dong et al., 2010)
DQ919080	<i>Nosema sp.</i>	<i>Pieris rapae</i>	Unpublished
AF485270	<i>Nosema sp.</i>	<i>Pieris rapae</i>	(Choi et al., 2002)
KJ494248	<i>Nosema sp.</i>	<i>Delias pasithoe</i>	(Xing et al., 2011)
DQ919075	<i>Nosema sp.</i>	<i>Pieris rapae</i>	Unpublished
Y00266	<i>Vairimorpha necatrix</i>	<i>Mythimna unipuncta</i>	(Vossbrinck et al., 1987)
JX268035	<i>Nosema pieriae</i> (<i>Vairimorpha mesnili</i>)	<i>Pieris brassicae</i>	(Yaman et al., 2014)
KP208681	<i>Vairimorpha sp.</i>	<i>Pieris rapae</i>	(Nath, 2015)

*Полужирным шрифтом выделены типовые виды родов микроспоридий.

Таблица 3.2. Обобщение морфометрических и генетических данных для представителей семейства Pieridae

Название микроспоридии по филогенетическому дереву	Размер спор, мкм	Форма спор	Типовой вид	Сходство с типовым видом, в %	Наиболее схожий изолят	Основной хозяин	Сходство с наиболее схожим видом, в %	Инфекционные свойства		Примечание
								Не заражает	Инфицирует	
<i>Nosema</i> sp. ex <i>Pieris rapae</i> 1 China 2019	3,87×2,07	Овальные, переходящие в грушевидную форму	<i>Nosema bombycis</i> D85503	99.9	<i>Nosema bombycis</i> MT510133	<i>Bombyx mori</i>	100	–	–	(Huang et al., 2013)
<i>Nosema</i> sp. ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 2020	4,19×2,64	Грушевидная	<i>Nosema bombycis</i> D85503	99.9	<i>Nosema rachiplusiae</i> KY126433	<i>Rachiplusia nu</i>	100	–	–	(Arneodo & Sciocco-Cap, 2018)
<i>Nosema</i> sp. ex <i>Pieris rapae</i> 2 China 2019	–	–	<i>Nosema bombycis</i> D85503	99.75	<i>Nosema fumiferanae</i> KT020736	<i>Epiphyas postvittana</i>	99.9	–	–	(Hopper et al., 2016)
<i>Nosema</i> cf. <i>polyvora</i> ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 2020	5,34×2,18	Вытянутая овальная форма	<i>Nosema bombycis</i> D85503	97,65	<i>Vairimorpha austropotamobii</i> MF344634	<i>Austropotamobius pallipes</i> complex	100	<i>Bombyx mori</i> , <i>Manduca sexta</i> , <i>Hyphantria cunea</i>	<i>Pieris brassicae</i> , <i>Pieris rapae</i> , <i>Pieris napi</i> , <i>Plutella xylostella</i> , <i>Ostrinia scapularis</i>	(Pretto et al., 2018)
<i>Nosema polyvora</i> ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 1963	5×2,24	Вытянутая овальная форма	<i>Nosema bombycis</i> D85503	97,65	<i>Vairimorpha austropotamobii</i> MF344634	<i>Austropotamobius pallipes</i> complex	100			
<i>Nosema</i> sp. ex <i>Aporia crataegi</i> South-Western Russia 2017	–	–	<i>Nosema bombycis</i> D85503	97.7	<i>Nosema</i> sp. CmM2 KC836092	<i>Bombyx mori</i>	100	–	–	(Huang et al., 2013)
<i>Vairimorpha</i> cf. <i>mesnili</i> ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 2020	4,31×2,58	Грушевидная	<i>Vairimorpha necatrix</i> Y00266	95.8	<i>Microsporidia</i> sp. MG456593	<i>Operophtera bruceata</i>	99.8	–	–	(Yaman et al., 2014)

<i>Vairimorpha mesnili</i> ex <i>Pieris brassicae</i> Russia 1964	4,37× 2,69	Грушевид ная	<i>Vairimorp ha necatrix</i> Y00266	96.3	<i>Nosema pieriae</i> JX268035	<i>Pieris brassicae</i>	99.9			(Yaman et al., 2014)
<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 2021	4,17× 2,8	Грушевид ная	<i>Vairimorp ha necatrix</i> Y00266	95.9	<i>Nosema</i> sp. LC510179	<i>Apis cerana</i>	100	–	–	(Takashima et al., 2021)
<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 2020	4,27× 2,72	Грушевид ная	<i>Vairimorp ha necatrix</i> Y00266	95.65	<i>Nosema</i> sp. LC510179	<i>Apis cerana</i>	100	–	–	(Takashima et al., 2021)

Таблица 3.3. Сходство последовательностей мсрПНК типового вида рода *Nosema* – *Nosema bombycis* с последовательностями, доступными в GenBank и полученными в данном исследовании.

№	Название пробы	Сходство последовательностей, % (верхние правые ячейки) и генетическое расстояние (нижние левые ячейки)													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	<i>Nosema bombycis</i> D85503	ID	100	100	99,8	99,8	99,8	99,6	99,5	99,1	99,5	97,5	97,5	97,2	81,8
2	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Pieris rapae</i> DQ919075	0	ID	100	99,8	99,8	99,8	99,6	99,5	99,1	99,5	97,5	97,5	97,2	81,8
3	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Pieris rapae</i> 1 China 2019	0	0	ID	99,8	99,8	99,8	99,6	99,5	99,1	99,5	97,5	97,5	97,2	81,8
4	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Pieris rapae</i> EU864531	0,00 16	0,00 16	0,00 16	ID	99,6	99,6	99,5	99,3	99	99,3	97,3	97,3	97	81,8
5	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 2020	0,00 16	0,00 16	0,00 16	0,00 33	ID	99,6	99,8	99,3	99	99,3	97,3	97,3	97	81,8
6	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Pieris rapae</i> DQ919080	0,00 16	0,00 16	0,00 16	0,00 33	0,00 33	ID	99,5	99,6	99	99,3	97,3	97,3	97	81,8
7	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Pieris rapae</i> 2 China 2019	0,00 16	0,00 16	0,00 16	0,00 33	0	0,00 33	ID	99,1	98,8	99,1	97,2	97,2	96,9	81,6
8	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Pieris rapae</i> South Korea AF485270	0,00 49	0,00 49	0,00 49	0,00 65	0,00 65	0,00 33	0,00 65	ID	98,7	99	97	97	96,7	81,8
9	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Pieris rapae</i> AF240354	0,00 65	0,00 65	0,00 65	0,00 82	0,00 82	0,00 82	0,00 82	0,01 15	ID	99	97,4	97,4	97	82
10	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Delias pasithoe</i> KJ494248	0,00 49	0,00 49	0,00 49	0,00 65	0,00 65	0,00 65	0,00 66	0,00 99	0,00 82	ID	97,3	97,3	97	81,6
11	<i>Nosema</i> cf. <i>polyvora</i> ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 2020	0,02 33	0,02 33	0,02 33	0,02 5	0,02 5	0,02 5	0,02 5	0,02 84	0,02 33	0,02 5	ID	100	99,3	82,1
12	<i>Nosema polyvora</i> ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 1963	0,02 33	0,02 33	0,02 33	0,02 5	0,02 5	0,02 5	0,02 5	0,02 84	0,02 33	0,02 5	0	ID	99,3	82,1
13	<i>Nosema</i> sp. ex <i>Aporia crataegi</i> South-Western Russia 2017	0,02 67	0,02 67	0,02 67	0,02 84	0,02 84	0,02 84	0,02 84	0,03 19	0,02 67	0,02 84	0,00 66	0,00 66	ID	82,4
14	<i>Nosema (Vairimorpha)</i> sp. ex <i>Pieris rapae</i> China HQ399665	0,20 3	0,20 3	0,20 3	0,20 3	0,20 3	0,20 3	0,20 33	0,20 32	0,19 82	0,20 5	0,19 63	0,19 63	0,19 19	ID

Таблица 3.4. Сходство последовательностей мсрРНК типового вида рода *Vairimorpha* – *Vairimorpha necatrix* с последовательностями, доступными в GenBank и полученными в данном исследовании.

№	Название пробы	Сходство последовательностей, % (верхние правые ячейки) и генетическое расстояние (нижние левые ячейки)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1	<i>Vairimorpha necatrix</i> Y00266	ID	99,4	97,7	96,6	96,6	96,4	96,4	96,4
2	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Pieris rapae</i> India 2014 KP208681	0,0027	ID	97,4	96,3	96,3	96,2	96,2	96,2
3	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Pieris rapae</i> China HQ399665	0,0207	0,0207	ID	98,6	98,6	98,5	98,5	98,5
4	<i>Vairimorpha</i> cf. <i>mesnili</i> ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 2020	0,0321	0,0321	0,0137	ID	100	99,4	99,4	99,8
5	<i>Vairimorpha mesnili</i> ex <i>Pieris brassicae</i> Russia 1964	0,0321	0,0321	0,0137	0	ID	99,4	99,4	99,8
6	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 2020	0,0322	0,0322	0,0137	0,0041	0,0041	ID	100	99,3
7	<i>Vairimorpha</i> sp. ex <i>Pieris brassicae</i> North-Western Russia 2021	0,0322	0,0322	0,0137	0,0041	0,0041	0	ID	99,3
8	<i>Nosema pieriae</i> (<i>Vairimorpha mesnili</i>) JX268035	0,0336	0,0336	0,0151	0,0014	0,0014	0,0055	0,0055	ID

Приложение 4.

Таблица 4.1. Влияние микроспоридии *Nosema bombycis* на организм хозяина

Вид хозяина	Локализация в хозяине	Среднее кол-во микроспоридий в хозяине	Максимальное кол-во микроспоридий в хозяине	Влияние микроспоридии на хозяина	Примечание
Данные, полученные в ходе исследования					
<i>Ostrinia scapularis</i>	Жировое тело, кишечник, слюнные железы	$18,9 \times 10^6$	$30,2 \times 10^6$	Смертность гусениц младших возрастов, каннибализм; задержка развития	–
<i>Aglais urticae</i>	Слюнные железы, средний отдел кишечника	$51,8 \times 10^6$	113×10^6	Высокая смертность гусениц младших возрастов до 100%; задержка развития	–
<i>Pieris brassicae</i>	Жировое тело, кишечник, слюнные железы, мальпигиевые сосуды	$89,1 \times 10^6$	297×10^6	Высокая смертность гусениц третьего-четвёртого возрастов до 100%; задержка развития	–
		–	–	Зараженность до 100%; вышедшие бабочки до 45% имели различные уродства	(Kashkarova & Khakhanov, 1980)
<i>Pieris napi</i>	Жировое тело, кишечник, слюнные железы, мальпигиевые сосуды	$93,8 \times 10^6$	220×10^6	Высокая смертность гусениц перед окукливанием до 100%	–
<i>Plutella xylostella</i>	Жировое тело, кишечник, слюнные железы	$33,4 \times 10^4$	$42,3 \times 10^4$	Смертность гусениц младших возрастов	–
<i>Hyponomeuta malinella</i>	Слюнные железы	25×10^4	40×10^4	Недостаточно данных	–
Данные, полученные из литературы					
<i>Ostrinia nubilalis</i>	–	–	–	До 100% зараженность особей, высокая гибель на личиночной стадии	(Kononchuk et al., 2022)
<i>Pieris rapae</i>	–	–	–	До 30% смертность гусениц; зараженность до 100%; вышедшие бабочки до 40% имели различные уродства	(Kashkarova & Khakhanov, 1980)

<i>Agrotis segetum</i>	–	–	–	Зараженность до 100; вышедшие бабочки до 40% имели различные уродства; зараженность потомства до 80%	(Kashkarova & Khakhanov, 1980)
<i>Helicoverpa armigera</i>	Кишечник, жировое тело, мальпигиевые сосуды	–	–	Зараженность до 100; зараженность потомства до 70%	(Kashkarova & Khakhanov, 1980; Pei et al., 2021)
<i>Spodoptera exigua</i>	Кишечник, жировое тело, мальпигиевые сосуды	«Мертвые личинки содержали большое количество спор микроспоридий»		До 30% смертность гусениц; зараженность до 100; зараженность потомства до 95%	(Chisa et al., 1992; Kashkarova & Khakhanov, 1980; Pei et al., 2021)
<i>Phytometra gumma</i>	Кишечник, жировое тело, мальпигиевые сосуды	–	–	До 50% смертность гусениц; зараженность до 100; зараженность потомства до 85%	(Kashkarova & Khakhanov, 1980)
<i>Hyphantria cunea</i>	Ткани кишечника, шелковичные железы, жировых телах и эпителиальных клетках шелковых желез, мальпигиевые сосуды, трахеях	–	–	Сильно зараженные личинки проявляют симптомы, характерные для болезни пембрина (потеря аппетита, не способность построить кокон)	(Kudo & Decoursey, 1940)
<i>Bombyx mori</i>	Ткани кишечника, шелковичные железы, жировых телах и эпителиальных клетках шелковых желез, мальпигиевые сосуды	–	–	Трансовариальная передача потомству до 100%, потеря аппетита, не способность построить кокон; высокая смертность на личиночной стадии	(Han & Watanabe, 1988)

Таблица 4.2. Влияние микроспоридии *Nosema pyrausta* на организм хозяина

Вид хозяина	Локализация в хозяине	Среднее кол-во микроспоридий в хозяине	Максимально е кол-во микроспоридий в хозяине	Влияние микроспоридии на хозяина	Примечание
Данные, полученные в ходе исследования					
<i>Aglais urticae</i>	Слюнные железы, средний отдел кишечника, жировое тело, мальпигиевые сосуды	289×10 ⁶	625×10 ⁶	Отставание в развитии по сравнению с контролем	–
Данные, полученные из литературы					
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Жировое тело, слюнные железы	36,2×10 ⁶	123×10 ⁶	Смертность на личиночной стадии; задержка развития; Трансовариальная передача потомству; негативное влияние на взрослых особей (снижение плодовитости и лётной активности)	(Grushevaya et al., 2021)
<i>Ostrinia scapularis</i>	Жировое тело, слюнные железы	–	–	Трансовариальная передача потомству	(Grushevaya et al., 2020)
<i>Ostrinia furnacalis</i>	Жировое тело, слюнные железы	–	–	Трансовариальная передача потомству	(Grushevaya et al., 2020)
<i>Galleria mellonella</i>	–	Слабое заражение		При обычном скормливание спор заражение не происходит, при добавлении к спорам ФТМ 1% и/или <i>Bacillus thuringiensis</i> инфицированы оказываются до 29% особей	(Tokarev, Grizanov, et al., 2018)
<i>Lymantria dispar</i>	Слюнные железы, жировая ткань предкуколок и куколок	–	–	Не оказывает пагубного влияния на выживаемость насекомых; резистентная модель хозяина	(Kononchuk et al., 2021)
<i>Loxostege sticticalis</i>	Слюнные железы, жировая ткань, мальпигиевые сосуды	–	–	Высокая смертность личинок младших возрастов; Трансовариальная передача потомству	(Malysh et al., 2021a)

Таблица 4.3. Влияние микроспоридии *Nosema tyriae* на организм хозяина

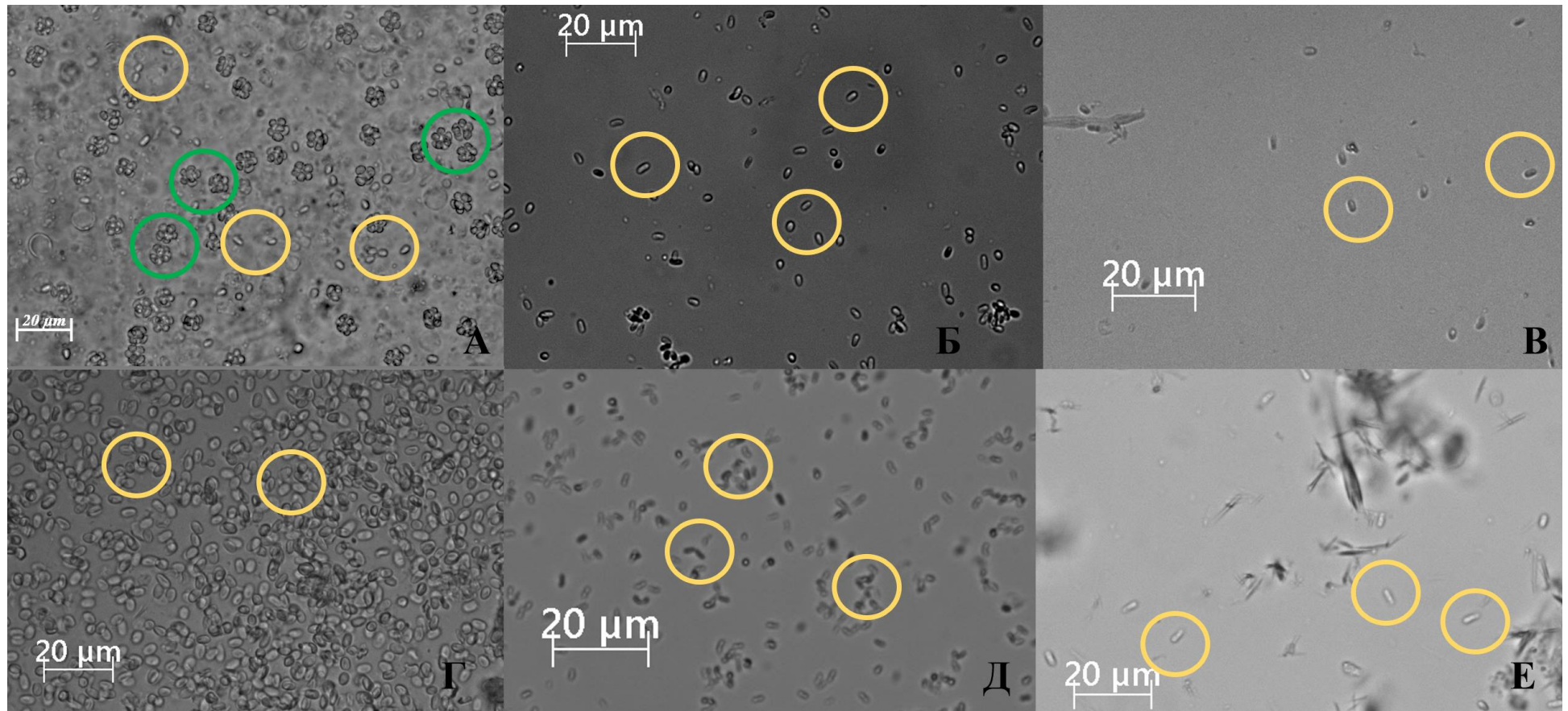
Вид хозяина	Локализация в хозяине	Среднее кол-во микроспоридий в хозяине	Максимальное кол-во микроспоридий в хозяине	Влияние микроспоридии на хозяина	Примечание
Данные, полученные в ходе исследования					
<i>Ostrinia scapularis</i>	Жировое тело, кишечник, слюнные железы	$11,5 \times 10^6$	$21,6 \times 10^6$	Разницы с контролем не наблюдалось	–
<i>Huphantria cunea</i>	Нет данных	$1,5 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	Появление несформированных куколок; смертность на личиночной стадии	–
<i>Pieris brassicae</i>	Слюнные железы, жировое тело, кишечник, мальпигиевые сосуды	119×10^6	410×10^6	Высокая смертность гусениц перед окукливанием до 100%	–
<i>Pieris napi</i>	Жировое тело, кишечник, слюнные железы, мальпигиевые сосуды	18×10^6	27×10^6	Высокая смертность гусениц младших возрастов до 100%	–
<i>Plutella xylostella</i>	Кишечник, слюнные железы	27×10^4	41×10^4	Смертность гусениц младших возрастов	–
Данные, полученные из литературы					
<i>Tyria jacobaeae</i>	Стенка кишечника, шелковые железы, жировое тело	–	–	Низкая патогенность;	(Canning et al., 1999)
<i>Bombyx mori</i>	–	–	–	Низкая патогенность; выживаемость до имаго	(Canning et al., 1999)

Таблица 4.4. Влияние микроспоридии *Nosema polyvora* на организм хозяина

Вид хозяина	Локализация в хозяине	Среднее кол-во микроспоридий в хозяине	Максимальное кол-во микроспоридий в хозяине	Влияние микроспоридии на хозяина	Примечание
Данные, полученные в ходе исследования					
<i>Ostrinia scapularis</i>	Нет данных	5×10^5	$7,5 \times 10^5$	Разницы с контролем не наблюдалось	–
<i>Pieris brassicae</i>	Слюнные железы, жировое тело, кишечник, мальпигиевые сосуды	89×10^6	456×10^6	Высокая смертность гусениц перед окукливанием до 100%; неравномерный рост гусениц	–
	Гонады, эпителий трахеи	–	–	Диарея; изменение водного баланса; появление коричневой полосы вдоль кишечника; кишечник полностью распадается; деформация крыльев	(Исси, 1964)
<i>Plutella xylostella</i>	Кишечник, слюнные железы, жировое тело	31×10^4	39×10^4	Разницы с контролем не наблюдалось	–
Данные, полученные из литературы					
<i>Pieris rapae</i>	Слюнные железы, жировое тело, кишечник, мальпигиевые сосуды	–	–	–	(Исси, 1964)
<i>Pieris napi</i>	Слюнные железы, жировое тело, кишечник, мальпигиевые сосуды	–	–	–	(Исси, 1964)
<i>Leptidea sinapis</i>	Слюнные железы, жировое тело, кишечник, мальпигиевые сосуды	–	–	–	(Исси, 1964)
<i>Aporia crataegi</i>	Слюнные железы	–	–	Не оказывает пагубного влияния на выживаемость насекомых; резистентная модель хозяина	(Исси, 1964)

Приложение 5.

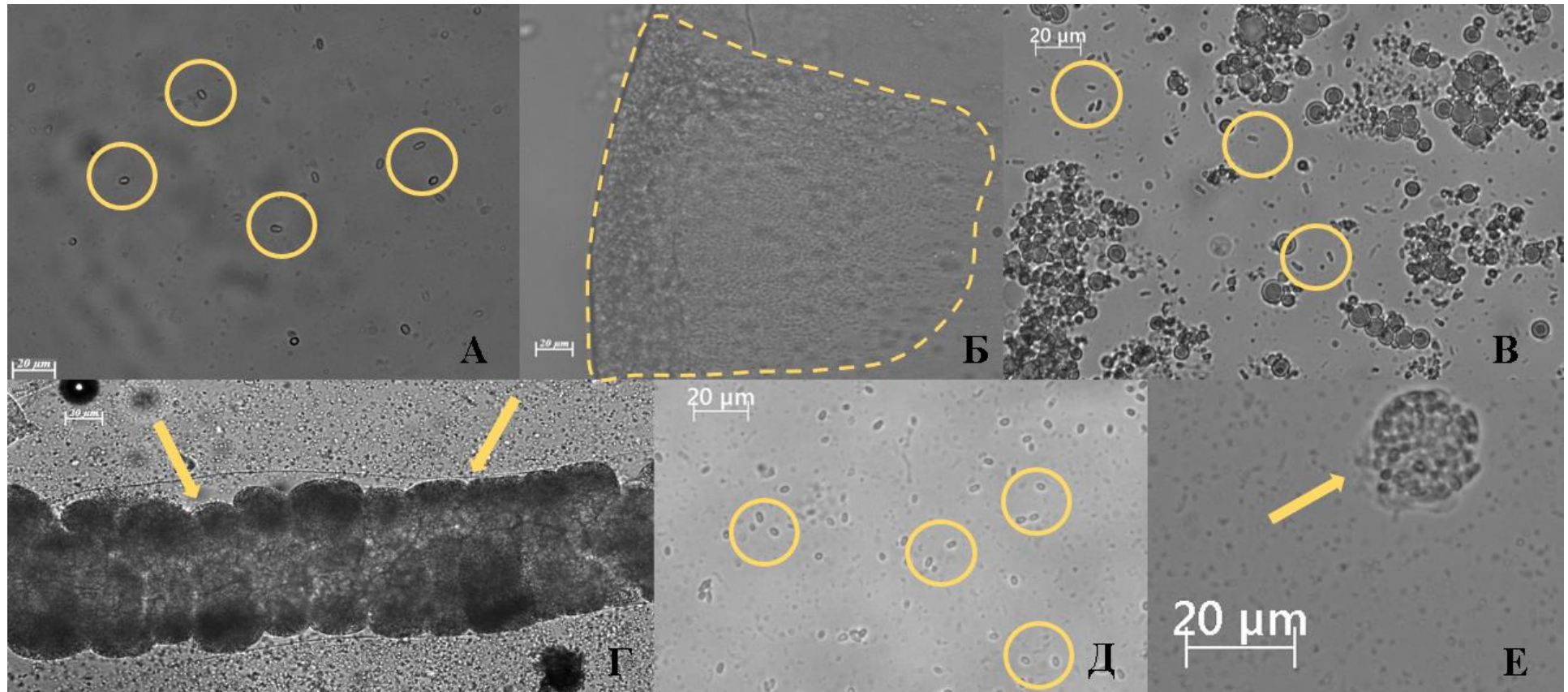
Рисунок 5.1. Световая микроскопия спор микроспоридий из коллекции ВИЗР и новых сборов насекомых за 2017-2021 годы.



A – *Vairimorpha* sp. ex *Pieris brassicae* North-Western Russia 2021,
желтый круг – одиночные споры; зелёный круг – октоспоры;
Б – *Nosema* sp. ex *Pieris rapae* 1 China 2019;
В – *Microsporidium* sp. ex *Thaumetopoea processionea* Ukraine 1961;

Г – *Vairimorpha* sp. ex *Leucoma salicis* South-Eastern Russia 1967;
Д – *Endoreticulatus* sp. ex *Agrotis exclamationis* Russia 1968;
Е – *Nosema polyvora* ex. *Pieris brassicae* North-Western Russia 1963.

Рисунок 5.2. Световая микроскопия спор микроспоридий, выделенных из экспериментально инфицированных гусениц.



А – *Nosema tyriae*, выделенная из *Pieris brassicae* (содержимое слюнных желёз гусеницы);

Б – *Nosema pyrausta*, выделенная из *Aglais urticae* (участок ткани слюнных желёз, поражённый микроспоридиями);

В – *Nosema polyvora*, выделенная из *Plutella xylostella* (жировое тело);

Г – *Nosema bombycis*, выделенная из *Pieris napi* (слюнные железы, полностью заселённые микроспоридиями);

Д – *Nosema tyriae*, выделенная из *Pieris napi* (содержимое слюнных желёз гусеницы);

Е – *Nosema tyriae*, выделенная из *Hyphantria cunea* (одиночная инфицированная клетка микроспоридиями).