

© И.В. Грушевая<sup>1</sup>, А.Н. Игнатьева<sup>1</sup>, Ю.М. Малыш<sup>1</sup>, Л.И. Трепашко<sup>2</sup>, Ю.С. Токарев<sup>1</sup>, А.Н. Фролов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин;

<sup>2</sup> Институт защиты растений, Прилуки, Беларусь

Сравнение сиквенсов гена малой субъединицы рРНК изолятов микроспоридий стеблевых мотыльков рода *Ostrinia* из России и Беларуси показало их принадлежность виду *Nosema pyrausta*. Для оценки генетического полиморфизма определены нуклеотидные последовательности молекулярных клонов межгенного спейсера рРНК (intergenic spacer, IGS) изолятов *N. pyrausta* из *Ostrinia nubilalis* и *Ostrinia scapularis* из Краснодарского края, а также *O. nubilalis* из Гомельской области Республики Беларусь. Анализ полученной и доступной в Генбанке информации показал высокий уровень дивергенции по локусу IGS как между изолятами разных видов и популяций микроспоридий, так и между молекулярными клонами в пределах индивидуальных изолятов паразитов.

✿ **Ключевые слова:** микроспоридии; молекулярные маркеры; генетический полиморфизм.

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ *NOSEMA PYRAUSTA* (MICROSPORIDIA: NOSEMATIDAE)

### ВВЕДЕНИЕ

Тип Микроспоридии — группа одноклеточных эукариот, родственных грибам (Fungi), вместе с другими облигатными внутриклеточными паразитами (Cryptomycota и Aphelidea) составляющая надтип Opisthosporida (Holomycota: Opisthokonta) [1]. Подавляющее большинство микроспоридий паразитируют в многоклеточных животных, достигая максимального разнообразия и обилия микроспоридий в членистоногих, а также в рыбах. Для целого ряда массовых видов чешуекрылых насекомых микроспоридии выступают в качестве естественных регуляторов численности, способствуя в том числе предотвращению вспышек массового размножения сельскохозяйственных вредителей [2, 3]. Считается, что микроспоридии инвазивных видов членистоногих при передаче популяциям аборигенных видов хозяев соответствующих систематических групп вызывают их угнетение, способствуя успеху видов-интродуцентов, имеющих большую устойчивость к паразитам благодаря сложившимся коэволюционным связям [4–7]. Кроме того, присутствие микроспоридий в производственных культурах насекомых может привести к значительному ухудшению состояния колоний, вплоть до их полной элиминации [2, 3, 8].

*Nosema pyrausta* (Paillot, 1927) Weiser, 1961 — микроспоридия, описанная из кукурузного мотылька *Ostrinia (Pyrausta) nubilalis* (Hübner, 1796) (Lepidoptera, Crambidae) во Франции [9]. Заражение кукурузного мотылька микроспоридиями предположительно данного вида регулярно детектировалось в Западной и Восточной Европе [10–12], а также в европейской части России [13]. Весьма существенное влияние микроспоридиоз оказывает на сезонную и многолетнюю динамику численности кукурузного мотылька в Северной Америке, куда вредитель был завезен в начале прошлого столетия [14]. В этой связи неудивительно, что наиболее интенсивно паразит изучается в США [15–18]. В то же время работы по выявлению микроспоридий в кукурузном мотыльке, обитающем в Европе, носят фрагментарный характер [10–13], что тормозит исследования в области видовой идентификации, генетического полиморфизма и разработки методов диагностики этих паразитов в природных популяциях, а также в лабораторных культурах насекомых-хозяев.

В настоящей работе проанализированы нуклеотидные последовательности двух локусов, SSU rRNA и IGS, для четырех изолятов *N. pyrausta* из двух видов стеблевых мотыльков рода *Ostrinia*, отловленных на территории России и Беларуси.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экстракции геномной ДНК использованы следующие изоляты микроспоридий (каждый — из одной зараженной гусеницы насекомого-хозяина): Nrug1 и GM173 из гусениц *O. nubilalis*, собранных в посевах кукурузы в Гулькевичском районе Краснодарского края в 2014 и 2008 гг. соответственно; Mong1 из *O. nubilalis*, собранного в Мозырском районе Гомельской области Республики Беларусь в 2015 г.; и SC104 из гусеницы *Ostrinia scapularis* (Walker, 1859) Muutura et Mongro, 1970, собранной на дикой конопле в Сла-

Поступила в редакцию 19.12.2016  
Принята к публикации 27.03.2017

ванском районе Краснодарского края в 2008 г. Геномную ДНК выделяли по стандартной методике [20]. Для амплификации фрагментов гена рибосомальной РНК, соответствующих локусам малой субъединицы рРНК (small subunit ribosomal RNA, SSU rRNA) и межгенного спейсера (intergenic spacer, IGS), использовали пары праймеров 18f::1492g [20] и HG4F::5SR [21] соответственно. ПЦР проводили в стандартных условиях с использованием Colored Taq-полимеразы (Силекс, Москва) на амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технологии, Москва). Продукты амплификации разделяли электрофоретически в 1 % агарозном геле и очищали из фрагментов геля, расплавленного в растворе 6 М йодида натрия методом сорбции на оксиде кремния [22]. Нуклеотидные последовательности очищенных ампликонов определяли методом секвенирования на генетическом анализаторе ABI Prism Genetic Analyzer 3500, напрямую или предварительно клонировали их в векторе pAL-TA. Полученные нуклеотидные последовательности редактировали вручную в приложении BioEdit [23], сравнивали с таковыми, доступными в Генбанке, с помощью встроенной утилиты BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и выравнивали в BioEdit с использованием функции Clustal W.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Амплификация локуса SSU rRNA микроспоридий с праймерами 18f::1492g была успешной для всех четы-

рех изолятов микроспоридий, использованных в настоящем исследовании. Размер продуктов амплификации локуса SSU rRNA составил порядка 1200 н. о. Результаты секвенирования показали полную идентичность последовательностей локусов у четырех изолятов. Кроме того, было продемонстрировано их стопроцентное сходство с сиквенсом, депонированным в Генбанке под номером доступа HM566196. Данный гаплотип обнаружен у изолятов микроспоридий из кукурузного мотылька, собранных нами ранее во Франции и в европейской части России.

Указанная нуклеотидная последовательность имеет три точечные мутации на 1198 н. о., то есть характеризуется дивергенцией на уровне 0,03 % по сравнению с таковыми, известными как для типового вида рода *Nosema* Nägeli, 1857 — *Nosema bombycis* Nägeli, 1857 (номер доступа AY209011), так и для *N. pyrausta*, американского происхождения (номер доступа AY958071) (табл. 1). На основании этих данных ранее нами был пересмотрен таксономический статус *N. pyrausta*, и типовой нуклеотидной последовательностью признана таковая, зарегистрированная для Франции, поскольку типовое место обитания этого паразита — Франция [9]. Обнаружение идентичных последовательностей у паразитов кукурузного мотылька в Краснодарском крае (изоляты Npyr1, GM173 и SC104), а также в Республике Беларусь (изоляция Mong1) позволяет считать данный гаплотип «фиксированным» для территории Европы и эталонным (типовым) для *N. pyrausta*.

Таблица 1

**Уровни сходства и различия микроспоридий рода *Nosema* по локусу SSU rRNA  
Levels of similarity and dissimilarity of SSU rRNA locus of microsporidia of the genus *Nosema***

Сиквенсы SSU rRNA		Сходство (снизу) и различия (сверху) сиквенсов SSU rRNA													
№	Вид микроспоридии	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
1	<i>Nosema bombycis</i> AY209011	=	0	0	0,001	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,005	0,006	0,008	0,009	
2	<i>Nosema spodopterae</i> AY747307	1,000	=	0	0,001	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,005	0,006	0,008	0,009	
3	<i>Nosema heliothidis</i> FJ772435	1,000	1,000	=	0,001	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,005	0,006	0,008	0,009	
4	<i>Nosema trichoplusiae</i> U09282	0,999	0,999	0,999	=	0,002	0,002	0,001	0,002	0,004	0,006	0,006	0,009	0,010	
5	<i>Nosema pyrausta</i> HM566196 (FR)	0,997	0,997	0,997	0,998	=	1,000	0,003	0,004	0,006	0,993	0,008	0,011	0,011	
6	<b><i>Nosema pyrausta</i> Npyr1 (RU)</b>	0,997	0,997	0,997	0,998	1,000	=	0,003	0,004	0,006	0,993	0,008	0,011	0,011	
7	<i>Nosema</i> cf <i>pyrausta</i> AY958071 (US)	0,998	0,998	0,998	0,999	0,997	0,997	=	0,003	0,005	0,006	0,007	0,010	0,011	
8	<i>Nosema tyriae</i> AJ012606	0,997	0,997	0,997	0,998	0,996	0,996	0,997	=	0,006	0,007	0,008	0,011	0,011	
9	<i>Vairimorpha imperfecta</i> AJ131645	0,997	0,997	0,997	0,996	0,994	0,994	0,995	0,994	=	0,006	0,008	0,011	0,011	
10	<i>Vairimorpha ceraces</i> EU267796	0,995	0,995	0,995	0,994	0,993	0,993	0,994	0,993	0,994	=	0,001	0,011	0,013	
11	<i>Nosema antheraeae</i> EU864526	0,994	0,994	0,994	0,994	0,992	0,992	0,993	0,992	0,992	0,990	=	0,011	0,014	
12	<i>Nosema fumiferanae</i> EU219083	0,992	0,992	0,992	0,991	0,989	0,989	0,990	0,989	0,993	0,989	0,989	=	0,016	
13	<i>Nosema</i> cf <i>bombycis</i> GX4 JF443580	0,991	0,991	0,991	0,99	0,989	0,989	0,989	0,989	0,989	0,989	0,987	0,986	0,984	=

Названия таксонов аннотированы номерами доступа в Генбанке соответствующих сиквенсов (при наличии). Для изолятов *N. pyrausta* и *Nosema* cf *pyrausta* указано географическое происхождение: Франция (FR), Россия (RU) и США (US). Полу жирным шрифтом выделен изолят, сиквенс для которого получен в настоящей работе

*N. bombycis* — опасный паразит тутового шелкопряда *Bombyx mori* (L., 1758) (Lepidoptera, Bombycidae), вызывающий заболевание, впервые исследованное Луи Пастером в 1870 г. на примере культуры насекомых, интродуцированных во Францию из Китая [2]. Эта микроспоридия имеет широкое распространение в Европе и Азии и служит объектом многочисленных исследований биологии паразита и его взаимоотношений с насекомым-хозяином, включая разработку средств диагностики и профилактики вызываемого им заболевания [21, 24, 26]. На основании представлений об узкой гостальной специфичности микроспоридий целый ряд форм, отличающихся от *N. bombycis* прежде всего видом насекомого-хозяина, описаны как самостоятельные виды. Для некоторых из них, однако, идентичность нуклеотидных последовательностей гена *SSU rRNA* (см. табл. 1), как в случае с *Nosema spodopterae* Hsu, Hsu et Yen, 1991 и *Nosema heliothidis* Lutz et Splendor, 1904, позволяет считать их изолятами *N. bombycis* из *Spodoptera litura* F., 1775 и *Heliothis zea* Boddie, 1850 (Lepidoptera: Noctuidae) соответственно, что расширяет круг хозяев для этого вида паразита [19]. В свою очередь, другие виды микроспоридий, заражающие тутового шелкопряда, могут быть ошибочно отнесены к *N. bombycis*, как, например, изолят GX4 под номером доступа в Генбанке JF443580; однако еще более высокий уровень генетической дивергенции, чем у таких видов, как *N. bombycis*, *N. pyrausta*, *Nosema antheraeae* Simchuk, Lysenko et Chetkarova, 1979 и т. п. (см. табл. 1), позволяет однозначно дифференцировать его как самостоятельный таксон ранга вида. Расхождение нуклеотидных последовательностей гена *SSU rRNA* на уровне 0,03 % известно для близкородственных, но самостоятельных видов и в других таксонах микроспоридий, например у *Glugea anomala* и *Glugea gasterostei* [27], а также у видов рода *Tubulinosema* [28–30]. В связи с этим сходство нуклеотидных последовательностей гена *SSU rRNA* на уровне 99,7 % микроспоридий *N. bombycis*, *N. pyrausta* и американского изолята *Nosema cf. pyrausta* указывает на то, что последний таксон представляет самостоятельный вид, не имеющий валидного описания.

Таким образом, можно отметить, что для такой территории, как Беларусь, освоение которой кукурузным мотыльком, как вредителем кукурузы, отмечается начиная с 2010 г. [31], ассоциированный с природной популяцией этого насекомого-хозяина вид паразита соответствует таковому, зарегистрированному в других географических зонах Европы, где очаги массового размножения вредителя существуют сотни лет. С другой стороны, интродукция кукурузного мотылька в Северную Америку сопровождалась его заражением другим видом микроспоридии. К сожалению, накопленных к настоящему времени данных недостаточно для того, чтобы строить предположения о том, является ли данный паразит аборигенным для Северной Америки, или занесен туда вместе с насекомым-хозяином из Европы.

Размер продуктов амплификации фрагмента гена рибосомальной РНК, включающего локус IGS, составил порядка 500 н. о. Непосредственное секвенирование очищенных из геля продуктов не позволило прочитать нуклеотидную последовательность из-за гетерогенности матрицы, создающей характерную картину наложения пиков. В связи с этим проведено молекулярное клонирование и для каждой пробы отсекуено от 1 до 5 клональных вариантов, содержащих локус IGS протяженностью от 243 до 274 н. о. Их сравнительный анализ показал высокий уровень полиморфизма нуклеотидных последовательностей. В частности, сходство молекулярных клонов в пределах каждого из трех изолятов Nyr1, GM173 и Mong1 колебалось в пределах 63–76, 69–77 и 65–73 % соответственно, а при сравнении их между изолятами — в диапазоне от 62 до 82 %, то есть некоторые варианты проявляли более высокий уровень сходства между изолятами из разных особей насекомого-хозяина и географических популяций, чем в пределах одного изолята (микрораспространения паразита). Аналогично единственный клон IGS, который удалось получить для изолята SC104 из другого вида насекомых-хозяев рода *Ostrinia*, проявил такой же уровень различий с этими изолятами — от 61 до 74 % (табл. 2). Сходство сиквентов IGS *N. pyrausta* с гомологичными референсными сиквенсами *N. bombycis* колеблется в тех же пределах — от 61 до 74 %, то есть данный локус нельзя считать надежным маркером межвидовой дифференциации этих близкородственных таксонов, поскольку не позволяет провести четких границ между таксонами по уровню сходства нуклеотидных последовательностей, а их вариабельность в пределах изолятов из индивидуальных особей хозяев не позволяет предложить какие-либо из последовательностей в качестве эталонных для определения вида.

Аналогичный разброс показателей сходства молекулярных клонов IGS известен для изолятов *N. bombycis* из различных областей Китая [25, 32] и других видов микроспоридий, например *Nosema ceranae* Fries et al., 1996, сравнение молекулярных клонов IGS которой проведено для изолятов из различных частей света [33]. И поскольку молекулярные клоны IGS паразита из одной особи хозяина могут различаться еще сильнее, чем между особями с разных материков, необходим поиск других молекулярных маркеров для генотипирования географических изолятов микроспоридий.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 14-04-31783 и 16-54-00144).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Таблица 2

Уровни сходства и различий молекулярных клонов IGS четырех изолятов микроспоридии *Nosema pyrausta*  
Levels of similarity and dissimilarity of molecular clones of IGS in four isolates of microsporidium *Nosema pyrausta*

IGS-клоны		Сходство (снизу) и различия (сверху) молекулярных клонов IGS												
№	Название	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	Npyr1_A1	=	0,316	0,311	0,346	0,326	0,32	0,335	0,375	0,323	0,302	0,348	0,303	0,389
2	Npyr1_A2	0,684	=	0,243	0,344	0,312	0,185	0,25	0,27	0,206	0,318	0,299	0,3	0,324
3	Npyr1_A3	0,689	0,757	=	0,369	0,283	0,283	0,346	0,34	0,304	0,32	0,311	0,283	0,314
4	Npyr1_A4	0,654	0,656	0,631	=	0,357	0,31	0,332	0,36	0,356	0,381	0,352	0,373	0,382
5	Npyr1_A5	0,674	0,688	0,717	0,643	=	0,33	0,3	0,355	0,317	0,324	0,336	0,247	0,348
6	GM173_B6	0,68	0,815	0,717	0,69	0,67	=	0,27	0,228	0,19	0,342	0,303	0,324	0,310
7	GM173_B7	0,665	0,75	0,654	0,668	0,7	0,73	=	0,308	0,227	0,343	0,281	0,288	0,297
8	GM173_B8	0,625	0,73	0,66	0,64	0,645	0,772	0,692	=	0,26	0,329	0,373	0,356	0,342
9	Mong1_C9	0,677	0,794	0,696	0,644	0,683	0,81	0,773	0,74	=	0,335	0,346	0,275	0,336
10	Mong1_G10	0,698	0,682	0,68	0,619	0,676	0,658	0,657	0,671	0,665	=	0,324	0,29	0,356
11	Mong1_C11	0,652	0,701	0,689	0,648	0,664	0,697	0,719	0,627	0,654	0,676	=	0,351	0,395
12	Mong1_C11	0,697	0,7	0,717	0,627	0,753	0,676	0,712	0,644	0,725	0,71	0,649	=	0,261
13	SC104_D13	0,611	0,676	0,686	0,618	0,652	0,690	0,703	0,658	0,664	0,644	0,605	0,739	=

Для молекулярных клонов *N. pyrausta* (№ 1–12) указаны названия изолятов и номера плазмид, одинаковыми буквами (А, В, С) отмечены клоны из одной особи насекомого-хозяина, полученные в рамках настоящей работы

## ЛИТЕРАТУРА

1. Karpov SA, Mamkaeva MA, Aleoshin VV, et al. Morphology, phylogeny, and ecology of the aphelids (Aphelidea, Opisthokonta) and proposal for the new superphylum Opisthosporidia. *Frontiers in Microbiology*. 2014;28(5):112. doi: 10.3389/fmicb.2014.00112.
2. Исси И.В. Микроспоридии как тип паразитических простейших // Микроспоридии. Серия «Протозоология». – Л.: Наука, 1986. – Т. 10. – С. 6–136. [Issi IV. Microsporidia as a phylum of parasitic protozoa. In: Microsporidia. Ser. Protozoologiya. Leningrad: Nauka; 1986;10:6-135. (In Russ.)]
3. Becnel JJ, Andreadis TG. Microsporidia in insects. ASM Press, Washington D.C.: The microsporidia and microsporidiosis; 1999. P. 447-501.
4. Rode NO, Lievens EJ, Segard A, et al. Cryptic microsporidian parasites differentially affect invasive and native *Artemia* spp. *Int J Parasitol*. 2013;43(10):795-803. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.04.009.
5. Bacela-Spychalska K, Rigaud T, Wattier RA. A co-invasive microsporidian parasite that reduces the predatory behaviour of its host *Dikerogammarus villosus* (Crustacea, Amphipoda). *Parasitology*. 2014;141(2):254-258. doi: 10.1017/S0031182013001510.
6. Gegner T, Otti O, Tragust S, Feldhaar H. Do microsporidia function as “biological weapon” for *Harmonia axyridis* under natural conditions? *Insect Sci*. 2015;22(3):353-359. doi: 10.1111/1744-7917.12224.
7. Vilcinskis A, Schmidtberg H, Estoup A, et al. Evolutionary ecology of microsporidia associated with the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Insect Sci*. 2015;22(3):313-324. doi: 10.1111/1744-7917.12159.
8. Fries I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol*. 2010;103(1): S73-S79. doi: 10.1016/j.jip.2009.06.017.
9. Paillot A. Sur deux protozoaires nouveaux parasites des chenilles de *Pyrausta nubilalis* Hubner. *CR Acad Sci Paris*. 1927;185:673-675.
10. Lipa JJ. *Thelohania ostriniae* n. sp., a new microsporidian parasite of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hnb. (Lepidoptera, Pyralidae). *Acta Protozoologica*. 1977;16(1):151-155.
11. Pezzutti R, Serini Bolchi G. *Ostrinia nubilalis* (Hb.) (Lepidoptera Pyralidae) e il suo parassita *Perezia pyraustae* Paillot (Sporozoa Microsporidia) in colture maidicole lombarde. *Bolletino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura*. 1977;14:181-188.
12. Čagán Ľ, Bokor P, Plačková A. Dissemination of the parasite *Nosema pyrausta* in populations of European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) in Slovakia, the Czech Republic and Poland. *Scientific journal for phytotechnics and zootechnics*. Nitra: Slovenska poľnohospodárska univerzita. 1998;9(3):81-85.
13. Малыш Ю.М., Токарев Ю.С., Ситникова Н.В., и др. Зараженность микроспоридиями стеблевых мотыльков рода *Ostrinia* (Lepidoptera: Crambidae) в Краснодарском крае // Паразитология. – 2011. – Т. 45. –

- Вып. 3. — С. 234–244. [Malysh YuM, Tokarev YuS, Sitnikova NV, et al. Incidence of microsporidian infection of stem borers of the genus *Ostrinia* (Lepidoptera: Crambidae) in the Krasnodar territory. *Parazitologiya*. 2011;45(3):234-244 (In Russ.)]
14. Caffrey DJ, Worthley LH. A progress report on the investigations of the European corn borer. In: USDA Agricultural Bulletin. 1927;1476:1-155.
  15. Hill RE, Gary WJ. Effects of the microsporidium, *Nosema pyrausta*, on field populations of European corn borers in Nebraska. *Environmental Entomology*. 1979;8:91-95.
  16. Siegel JP, Maddox JV, Ruesink WG. Seasonal progress of *Nosema pyrausta* in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *J Invertebr Pathol*. 1988;52(1):130-136.
  17. Lewis LC, Sumerford DV, Bing LA, Gunnarson RD. Dynamics of *Nosema pyrausta* in natural populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*: A six-year study. *Biocontrol*. 2006;51:627-642.
  18. Lewis LC, Bruck DJ, Prasifka JR, Raun ES. *Nosema pyrausta*: Its biology, history, and potential role in a landscape of transgenic insecticidal crops. *Biological Control*. 2009;48:223-231.
  19. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; 1989.
  20. Weiss LM, Vossbrinck CR. Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the Microsporidia. The Microsporidia and Microsporidiosis. Washington, ASM Press; 1999. P. 129-171.
  21. Huang WF, Tsai SJ, Lo CF, et al. The novel organization and complete sequence of the ribosomal RNA gene of *Nosema bombycis*. *Fungal Genetics and Biology*. 2004;41(5):473-481.
  22. Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 1979;76:615-619.
  23. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*. 1999;41:95-98.
  24. Liu H, Pan G, Luo B, et al. Intraspecific polymorphism of rDNA among five *Nosema bombycis* isolates from different geographic regions in China. *J Invertebr Pathol*. 2013;113(1):63-69. doi: 10.1016/j.jip.2013.01.008.
  25. Fu Z, He X, Cai S et al. Quantitative PCR for detection of *Nosema bombycis* in single silkworm eggs and newly hatched larvae. *J Microbiol Methods*. 2016;120:72-78. doi: 10.1016/j.mimet.2015.12.003.
  26. Tokarev YuS, Malysh JM, Kononchuk AG, et al. Re-definition of *Nosema pyrausta* (*Perezia pyraustae* Paillot 1927) basing upon ultrastructural and molecular phylogenetic studies. *Parasitology Research*. 2015;114(2):759-761. doi: 10.1007/s00436-014-4272-3.
  27. Tokarev Ю.С., Воронин В.Н., Сендерский И.В., Исси И.В. Микроспоридия *Glugea gasterostei* Voronin 1974 (Microsporidia: Marinosporidia) из трехглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* (Actinopterygii: Gasterosteiformes) как самостоятельный вид // *Паразитология*. — 2015. — Т. 49. — С. 81–92. [Tokarev YS, Voronin VN, Senderskiy IV, Issi IV. The microsporidium *Glugea gasterostei* Voronin 1974 (Microsporidia: Marinosporidia) from three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (Actinopterygii: Gasterosteiformes) as an independent species. *Parazitologiya*. 2015;49:81-92. (In Russ.)]
  28. Franzen C, Fischer S, Schroeder J, et al. Morphological and molecular investigations of *Tubulinosema ratisbonensis* gen. nov., sp. nov. (Microsporidia: Tubulinosematidae fam. nov.), a parasite infecting a laboratory colony of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *J Eukaryot Microbiol*. 2015;52:141-52.
  29. Bjornson S, Le J, Saito T, Wang H. Ultrastructure and molecular characterization of a microsporidium, *Tubulinosema hippodamiae*, from the convergent lady beetle, *Hippodamia convergens* Guerin-Meneville. *J Invertebr Pathol*. 2011;206:280-288.
  30. Malysh JM, Tokarev YS, Sitnikova NV, et al. *Tubulinosema loxostegi* sp. n. (Microsporidia: Tubulinosematidae) from the beet webworm *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera: Crambidae) in Western Siberia. *Acta Protozool*. 2013;52:299-308.
  31. Трешко Л.И., Надточаева С.В., Головач В.В. Опасные вредители кукурузы // *Защита и карантин растений*. — 2012. — № 9. — С. 44–49. [Trepashko LI, Nadtochaeva SV, Golovach VV. Injurious pests of maize. *Zaschita i karantin rasteniy*. 2012;(9):44-49 (In Russ.)]
  32. Ironside JE. Diversity and recombination of dispersed ribosomal DNA and protein coding genes in Microsporidia. *PLoS ONE*. 2013;8(2): e55878. doi: 10.1371/journal.pone.0055878.
  33. Sagastume S, del Aguila C, Martín-Hernández R et al. Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honeybees. *Environ Microbiol*. 2011;13(1):84-95. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02311.x.
- GENETIC POLYMORPHISM OF NATURAL ISOLATES OF NOSEMA PYRAUSTA (MICROSPORIDIA: NOSEMATIDAE)**  
I.V. Grushevaya, A.N. Ignatieva, J.M. Malysh,  
L.I. Trepashko, Y.S. Tokarev, A.N. Frolov  
For citation: *Ecological genetics*. 2017;15(1):38-43
- ✿ **SUMMARY: Background.** Microsporidia are ubiquitous parasites of animals, most abundant in arthropods and fishes. Many species of these parasites are important from standpoints of medicine, veterinary and agriculture. Microsporidium *Nosema pyrausta* is an important disease agent in corn borer populations causing adverse effect on

host fitness. Genotyping of this parasite is necessary for proper species identification and intraspecific polymorphism studies. **Materials and Methods.** Microsporidia-infected larvae of corn borers of the genus *Ostrinia* were recovered from Krasnodar Territory in Russia and Gomel Region in Belarus. Small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) was amplified and sequenced directly, while intergenic spacer (IGS) was amplified, cloned and sequenced (1-5 clones per sample) for four isolates of microsporidia. Sequences were aligned and compared using standard bioinformatics tools (Clustal W and BLAST). **Results.** SSU rRNA genotyping showed allocation of all four isolates to *N. pyrausta* with 100% identity to each other and 99.7% similarity to *Nosema bombycis*, the

type species of the genus *Nosema*. High levels of IGS sequence variation (61-74%) is observed both between isolates of different species and populations of microsporidia as well as between molecular clones within parasite isolates from individual hosts. **Conclusion.** *N. pyrausta* is widespread in corn borer populations and its genetic structure is complicated, as in other species of these parasites. Further studies of molecular markers are needed for genetic differentiation of geographic isolates of *N. pyrausta*.

✿ **KEYWORDS:** microsporidia; molecular markers; genetic polymorphism.

✿ Информация об авторах

**Инна Валентиновна Грушевая** — агроном, лаборатория сельскохозяйственной энтомологии. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений». E-mail: grushevaya\_12@mail.ru.

**Анастасия Николаевна Игнатьева** — младший научный сотрудник, лаборатория микробиологической защиты растений. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений». E-mail: edino4estvo@mail.ru.

**Юлия Михайловна Малыш** — научный сотрудник, лаборатория сельскохозяйственной энтомологии. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений». E-mail: malyshjm@mail.ru.

**Людмила Ивановна Трешко** — заведующая лабораторией, лаборатория энтомологии. РУП «Институт защиты растений». E-mail: belizr@tut.by.

**Юрий Сергеевич Токарев** — старший научный сотрудник, лаборатория микробиологической защиты растений. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений». E-mail: jumacro@yahoo.com.

**Андрей Николаевич Фролов** — заведующий лабораторией, лаборатория сельскохозяйственной энтомологии. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений». E-mail: cornborer@gmail.com.

✿ Information about the authors

**Inna V. Grushevaya** — Agronomist, Laboratory of agricultural entomology. All-Russian Scientific Research Institute of Plant Protection (VIZR), Pushkin, Saint Petersburg, Russia. E-mail: grushevaya\_12@mail.ru.

**Anastasia N. Ignatieva** — Junior Researcher. Laboratory of microbiological control. All-Russian Scientific Research Institute of Plant Protection (VIZR), Pushkin, Saint Petersburg, Russia. E-mail: edino4estvo@mail.ru.

**Julia M. Malyshev** — Researcher, Laboratory of agricultural entomology. All-Russian Scientific Research Institute of Plant Protection (VIZR), Pushkin, Saint Petersburg, Russia. E-mail: malyshjm@mail.ru.

**Lyudmila I. Trepashko** — Head, Laboratory of entomology. Institute for Plant Protection, Priluki, Republic of Belarus. E-mail: belizr@tut.by.

**Yuri S. Tokarev** — Senior researcher, Laboratory of microbiological control. All-Russian Scientific Research Institute of Plant Protection (VIZR), Pushkin, Saint Petersburg, Russia. E-mail: jumacro@yahoo.com.

**Andrei N. Frolov** — Head, Laboratory of agricultural entomology. All-Russian Scientific Research Institute of Plant Protection (VIZR), Pushkin, Saint Petersburg, Russia. E-mail: cornborer@gmail.com.