

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

на правах рукописи

БАВИЛОВА ВАЛЕРИЯ ЮРЬЕВНА

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕНИЯ И  
ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ОСНОВНЫХ ПАРАЗИТОВ В  
ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ШМЕЛЕЙ В ЮЖНЫХ РАЙОНАХ  
СИБИРИ И В СЕВЕРНОЙ ИНДИИ**

03.02.07 – Генетика

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,

Блинов Александр Геннадьевич

Новосибирск 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ.....	2
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
Актуальность исследования.....	7
Научная новизна работы.....	9
Теоретическая и практическая значимость исследования.....	10
Положения, выносимые на защиту.....	10
Вклад автора.....	10
Апробация работы.....	10
Публикации по теме диссертации.....	11
Структура и объем работы.....	12
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
Шмели рода <i>Bombus</i> – значимые опылители растений.....	13
Паразитические организмы, поражающие шмелей.....	17
Внутриклеточные паразиты типа <i>Microsporidia</i> .....	18
Общая характеристика типа <i>Microsporidia</i> .....	18
Структура спор представителей типа <i>Microsporidia</i> .....	20
Жизненный цикл микроспоридий.....	22
Особенности генома микроспоридий.....	25
Микроспоридии в популяциях шмелей.....	27
Простейшие паразиты отряда <i>Trypanosomatida</i> .....	31
Общая характеристика отряда <i>Trypanosomatida</i> .....	31
Структурная организация трипаносоматид.....	34
Жизненные циклы <i>Trypanosomatida</i> .....	36
Трипаносоматиды в популяциях шмелей.....	39
Простейшие паразиты отряда <i>Neogregarinorida</i> .....	40
Общая характеристика отряда <i>Neogregarinorida</i> .....	40

Жизненные циклы представителей Neogregarinorida .....	43
Неогрегарины в популяциях шмелей .....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	47
Сбор материала.....	47
Выделение тотальной ДНК .....	48
Полимеразная цепная реакция (ПЦР) .....	48
Рестрикционный анализ фрагментов ДНК .....	48
Разделение фрагментов ДНК в агарозном геле .....	49
Определение нуклеотидных последовательностей .....	49
Поиск последовательностей в генетической базе данных GenBank.....	50
Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей .....	50
Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей.....	51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	52
Характеристика природного материала.....	52
Разнообразие микроспоридий, поражающих насекомых отряда Hymenoptera и класса Insecta .....	54
Уровень зараженности природных популяций шмелей микроспоридиями рода <i>Nosema</i> .....	60
Общий уровень зараженности природных популяций шмелей микроспоридиями рода <i>Nosema</i> .....	60
Уровни зараженности наиболее распространенных видов шмелей микроспоридиями <i>Nosema</i> .....	65
Генетическое разнообразие микроспоридий в природных популяциях шмелей ..	67
Распространение генетических вариантов микроспоридий <i>Nosema bombi</i> в природных популяциях шмелей .....	70
Разнообразие трипаносоматид, поражающих насекомых отряда Hymenoptera и класса Insecta .....	72
Уровень зараженности природных популяций шмелей трипаносоматидами рода <i>Crithidia</i> .....	78
Общий уровень зараженности природных популяций шмелей трипаносоматидами рода <i>Crithidia</i> .....	78

Уровни зараженности наиболее распространенных видов шмелей трипаносоматидами рода <i>Crithidia</i> .....	80
Генетическое разнообразие трипаносоматид в природных популяциях шмелей .	82
Сравнительный анализ последовательностей гена 18S рРНК трипаносоматид рода <i>Crithidia</i> .....	82
Рестрикционный анализ последовательностей гена 18S рРНК трипаносоматид рода <i>Crithidia</i> .....	83
Сравнительный и филогенетический анализ последовательностей гена <i>gGAPDH</i> трипаносоматид рода <i>Crithidia</i> .....	84
Распространение трипаносоматид рода <i>Crithidia</i> в природных популяциях шмелей.....	85
Разнообразие неогрегаринов, поражающих насекомых отряда Hymenoptera и класса Insecta .....	87
Уровень зараженности природных популяций шмелей неогрегаринов рода <i>Apicystis</i> .....	91
Общий уровень зараженности природных популяций шмелей неогрегаринов рода <i>Apicystis</i> .....	91
Уровни зараженности наиболее распространенных видов шмелей неогрегаринов рода <i>Apicystis</i> .....	92
Генетическое разнообразие неогрегаринов в природных популяциях шмелей .....	94
Распространение неогрегаринов родов <i>Apicystis</i> и <i>Mattesia</i> в природных популяциях шмелей.....	96
Суммарный уровень зараженности природных популяций шмелей микроспоридиями, трипаносоматидами и неогрегаринов .....	98
Шмели-кандидаты для промышленного разведения в качестве опылителей тепличных растений.....	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	101
ВЫВОДЫ .....	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	105
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	116
Приложение 1 .....	116

Приложение 2 .....	117
Приложение 3 .....	129
Приложение 4 .....	130
Приложение 5 .....	132
Приложение 6 .....	140

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

bp — base pairs — п.о. — пара оснований;

DNA — deoxyribonucleic acid — ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота;

ITS — internal transcribed spacer — внутренний транскрибируемый участок, разделяющий гены двух рибосомных РНК;

LSU rRNA — large subunit ribosomal RNA — рибосомная РНК большой субъединицы;

ML — Maximum Likelihood — метод максимального правдоподобия;

NJ — Neighbor Joining — метод соединения ближайших соседей;

RNA — ribonucleic acid — РНК — рибонуклеиновая кислота;

SSU rRNA — small subunit ribosomal RNA — рибосомная РНК малой субъединицы;

е.а. — единица активности;

об/мин — оборотов в минуту;

ПЦР — полимеразная цепная реакция.

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

Шмели (род *Bombus*) являются одними из основных опылителей как диких растений, так и сельскохозяйственных культур, поскольку данные насекомые хорошо приспосабливаются к различным климатическим условиям и хорошо размножаются в искусственных условиях (Winter et al., 2006). В настоящее время широко распространено коммерческое разведение шмелей (Ercan et al., 2003; Velthuis et al., 2006). Около миллиона колоний, в первую очередь *Bombus terrestris* и *Bombus impatiens*, ежегодно выращиваются и распространяются по всему миру (Winter et al., 2006).

В последние годы наблюдается резкое снижение численности шмелей, которое связано с негативным влиянием на них различных паразитических организмов (Meeus et al., 2011). Существенный вклад в снижение численности шмелей вносит распространение паразитических микроспоридий рода *Nosema*, трипаносоматид рода *Crithidia*, а также неогрегариин рода *Apicystis*. Критидии и неогрегарины являются простейшими паразитическими организмами, в то время как микроспоридии, согласно современной классификации, являются облигатными внутриклеточными грибковыми паразитами (Горбунов, 1996; Lipa et al., 1996; Han et al., 2017).

Микроспоридии, поражающие шмелей, впервые были описаны в 1914 году Х. Б. Фантхамом и Э. Портер (Fantham et al., 1914). До недавнего времени считалось, что *Nosema bombi* является единственным видом микроспоридий, поражающим шмелей (Klee et al., 2006). В последнее время проводятся активные исследования генетического разнообразия микроспоридий, которые встречаются в различных природных популяциях шмелей. В одном из таких исследований, проведенном В. Т. Таем и соавторами, были описаны 13 генетических вариантов последовательностей кластера рибосомных генов *N. bombi* у шмелей, собранных на территории европейских стран (Tay et al., 2005). В работе 2012 года Дж. Ли с соавторами были выявлены несколько вариантов *Nosema* у шмелей из Китая, которые потенциально могут быть новыми видами (Li et al., 2012). Заражение

шмелей микроспоридией *Nosema ceranae*, которая является характерным паразитом медоносных пчел, также зафиксировано в последние годы (Plischuk et al., 2009a; Li et al., 2012).

Впервые простейшие трипаносоматиды были обнаружены у шмелей П. С. Горбуновым в 1987 году (Горбунов, 1987). Основываясь на морфологии, данный паразит был назван *Crithidia bombi*. Аналогично *N. bombi*, *C. bombi* долгое время считался единственным видом трипаносоматид, поражающим шмелей. В 2010 году был описан новый вид трипаносоматид, поражающих шмелей на территории Швейцарии, *Crithidia expoeki* (Schmid-Hempel et al., 2010), а в 2016 году был описан еще один вид, *Crithidia mexicana*, встречающийся в природных популяциях шмелей на территории Мексики (Gallot-Lavallée et al., 2016).

*Apicystis bombi* был впервые описан Х. Дж. Лю, Р. П. Макфарлейн и Д. Х. Пенгелли в 1974 году как *Mattesia bombi* (Neogregarinida: Ophrocystidae), у маток различных видов шмелей (Liu et al., 1974). В 1996 году Дж. Липа и О. Тридзиани показали, что данный организм относится не к роду *Mattesia*, а к роду *Apicystis*, и паразитирует не только на шмелях, но и на медоносных пчелах (Lipa et al., 1996). В настоящий момент *Apicystis bombi* является единственным видом неогрегаринов, встречающимся в популяциях шмелей, однако, анализ нуклеотидных последовательностей ITS района рибосомной РНК данного паразита у образцов шмелей, собранных на разных континентах, показал внутривидовую генетическую вариабельность (Maharramov et al., 2013).

К настоящему моменту генетическое разнообразие и распространение паразитических микроспоридий, трипаносоматид и неогрегаринов в природных популяциях шмелей изучено недостаточно. Таким образом, возникает необходимость комплексного изучения природных популяций шмелей на ранее не исследованных территориях с целью установления уровня зараженности данных популяций паразитическими микроорганизмами и поиска новых видов.

Цели работы:

1. Изучение уровня зараженности природных популяций шмелей микроспоридией *Nosema bombi*, трипаносоматидами *Crithidia* spp. и неогрегариной *Apicystis bombi*.
2. Выявление генетического разнообразия данных паразитических организмов в природных азиатских популяциях шмелей (на примере Сибири и Индии).

Задачи работы:

1. Установление присутствия заражения *Nosema bombi*, *Crithidia* spp. и *Apicystis bombi* с помощью ПЦР амплификации ядерных генов данных паразитов.
2. Установление нуклеотидных последовательностей, полученных ПЦР продуктов.
3. Сравнительный и филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей генов *Nosema bombi*, *Crithidia* spp. и *Apicystis bombi*.

### Научная новизна работы

В данной работе впервые было проведено исследование распространения и генетического разнообразия микроспоридий, трипаносоматид и неогрегаринов, поражающих природные популяции шмелей на территории южных районов Сибири и Северной Индии. Было установлено, что в южных районах Сибири распространены четыре генетических варианта микроспоридий *N. bombi* (WS1-WS4), три из которых описаны впервые. В Северной Индии был описан один генетический вариант *N. bombi* IND. Было выявлено, что природные популяции шмелей подвержены заражению двумя видами трипаносоматид, *C. bombi* и *C. exroeki*. Вид *C. bombi* наиболее распространен в южных районах Сибири, а вид *C. exroeki* - в Северной Индии. Два варианта последовательностей неогрегаринов распространены в исследованных популяциях шмелей, собранных в южных районах Сибири. Первый вариант соответствует виду *Apicystis bombi*, а второй - описан впервые. Новый вариант может иметь статус отдельного вида внутри рода *Mattesia*. На территории Северной Индии случаи заражения шмелей неогрегаринами не были установлены.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

1. В результате проведенного поиска в базе данных GenBank и последующего филогенетического анализа было установлено, какие виды микроспоридий, трипаносоматид и неогрегарин паразитируют на представителях класса Insecta.
2. Полученная информация о микроспоридиях, трипаносоматидах и неогрегаринах в исследованных природных популяциях шмелей вносит новые данные о географическом распространении данных паразитических организмов.
3. Среди наиболее распространенных в южных районах Сибири видов шмелей выявлены 4 вида, которые слабо заражены микроспоридиями, трипаносоматидами и неогрегаринами, и могут рассматриваться в качестве кандидатов для коммерческого разведения.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Шмели видов *Bombus lucorum* и *B. sporadicus* обладают высокой степенью восприимчивости к заражению микроспоридиями, трипаносоматидами и неогрегаринами, тогда как виды *B. cullumanus*, *B. schrencki*, *B. sichelii* и *B. veteranus* – низкой.
2. Зараженность шмелей неогрегаринами вида *Mattesia* sp. описана впервые и характерна для природных популяций южной Сибири.

### **Вклад автора**

Основные результаты исследования получены автором самостоятельно. Сбор и видовое определение шмелей проводился совместно с сотрудниками Кемеровского государственного университета во главе с д.б.н., проф. Н. И. Еремеевой. Образцы шмелей, собранные в штате Джамму и Кашмир, были предоставлены проф. М. Войцеховским из Ягеллонского университета в Кракове.

### **Апробация работы**

Основные результаты, полученные в рамках настоящей работы, были представлены на 51-й международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс" (Новосибирск, 2013 г.); десятой

международной конференции «Биоинформатика регуляции и структуры генома\системная биология» (Новосибирск, 2016 г.); международной конференции "Беляевские чтения" (Новосибирск, 2017 г.).

### Публикации по теме диссертации

По материалам настоящей работы были опубликованы следующие статьи в рецензируемых журналах:

1. **Vavilova V.**, Sormacheva I., Woyciechowski M., Eremeeva N., Fet V., Strachecka A., Bayborodin S. I., Blinov A. Distribution and diversity of *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) in the natural populations of bumblebees (*Bombus* spp.) from West Siberia // Parasitology Research.- 2015.- V. 114.- P. 3373-3383.
2. **Vavilova V.Y.**, Konopatskaia I., Luzyanin S.L., Woyciechowski M., Blinov A.G. Parasites of the genus *Nosema*, *Crithidia* and *Lotmaria* in the honeybee and bumblebee populations: a case study in India// Vavilov Journal of Genetics and Breeding.- 2017.- V. 21(8).- P. 943-951.

Работа была представлена на конференциях:

1. **Вавилова В. Ю.** Сравнительный анализ уровня зараженности шмелей в природных популяциях некоторых районов Западной Сибири и Индии // Материалы 51-й международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс", 12–18 апреля 2013 г: Биология. Тезисы докладов. С. 219.
2. **Vavilova V.**, Konopatskaia I., Woyciechowski M., Luzianin S., Blinov A. Parasites of the genera *Nosema*, *Apicystis*, *Crithidia* and *Lotmaria* in the natural honeybee and bumblebee populations: a case study in India // Десятая международная конференция «Биоинформатика регуляции и структуры генома\системная биология», 29 августа–2 сентября 2016 г., Новосибирск, Россия: Тезисы докладов. С. 329.
3. **Vavilova V.**, Konopatskaia I., Eremeeva N., Blinov A. Parasites of *Nosema*, *Crithidia* and *Apicystis* genera in the natural Siberian bumblebee populations // Беляевские чтения: Международная конференция, посвященная 100-летию

со дня рождения академика АН СССР Д. К. Беляева, 7–10 августа 2017 г., Новосибирск, Россия: Тезисы докладов. С. 125.

### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, выводов и списка литературы (136 наименований). Работа изложена на 140 страницах, содержит 33 рисунка, 6 таблиц и 6 приложений.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### Шмели рода *Bombus* – значимые опылители растений

Шмели рода *Bombus* (Hymenoptera: Apidae) являются общественными насекомыми с полным циклом превращения. Данные насекомые входят в монотипную трибу *Bombini*, которая, наряду с медоносными пчелами (*Apini*), безжальными пчелами (*Meliponini*) и орхидными пчелами (*Euglossini*), составляет подсемейство *Apinae* (Michener, 2000). С помощью филогенетического анализа было установлено, что ближайшими родственниками шмелей являются безжальные пчелы.

В настоящий момент описано около 250 видов шмелей, которые составляют единственный род *Bombus* (Latreille, 1802). Исторически, основываясь на морфологических данных, данный род был разбит исследователями на 38 подродов, однако, с появлением современных молекулярно-биологических методов, систематика данных насекомых была пересмотрена (Cameron et al., 2007). В настоящий момент описывается 15 подродов, которые представлены на рисунке 1 (Williams et al., 2008b).

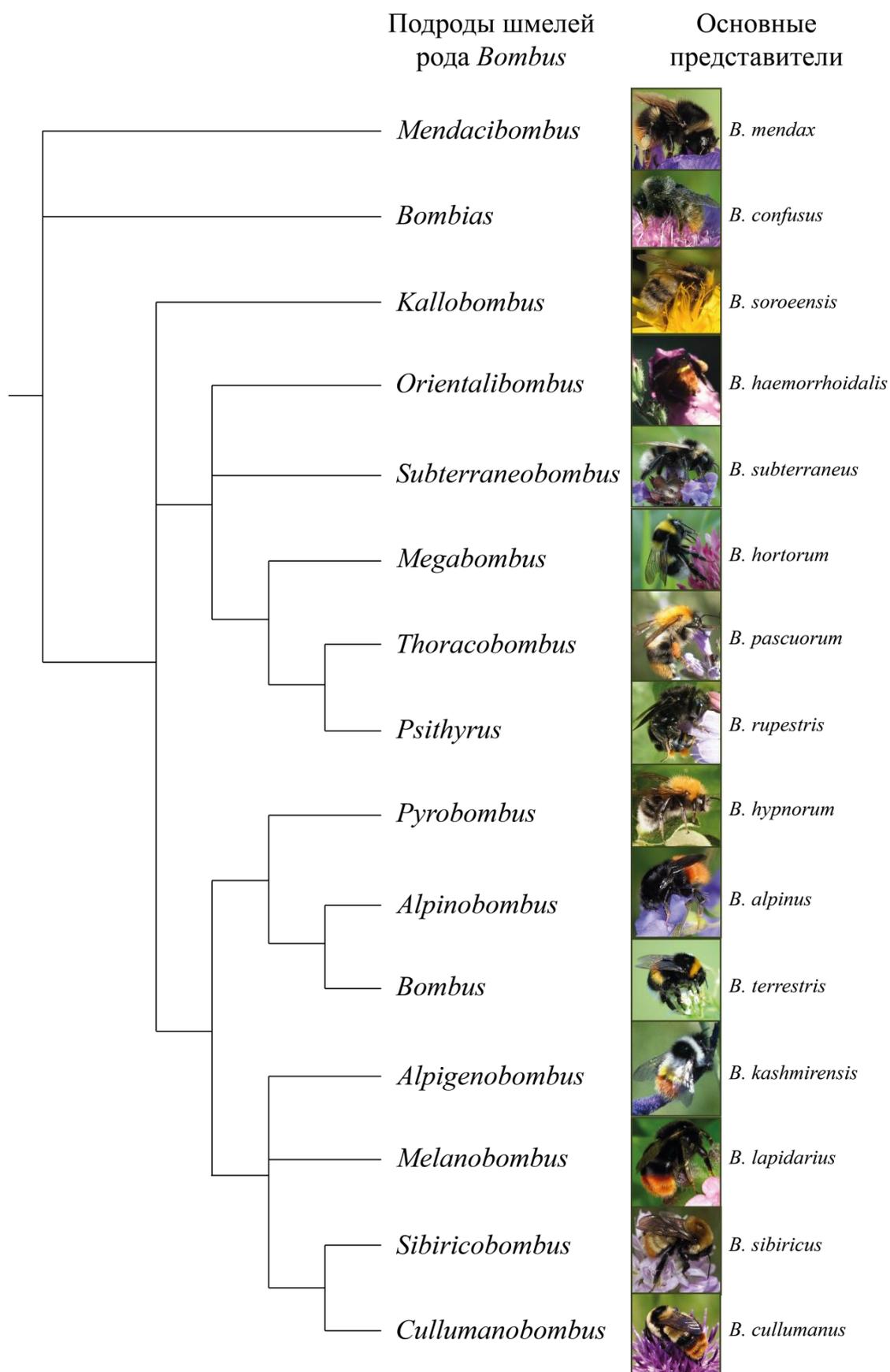
Шмели рода *Bombus* широко распространены по всему миру. Большинство видов обитают в умеренных и арктической климатических зонах, а также в высокогорьях. В Австралию, Южную Африку и Новую Зеландию шмели были завезены человеком для опыления культурных растений. В палеарктической зоне, к которой относятся выбранные в настоящем исследовании южные районы Сибири и Северная Индия, обитает около 120 видов шмелей.

На территории штата Джамму и Кашмир распространены 27 видов шмелей, которые относятся к 10 под родам. Наиболее широко представлены под роды *Melanobombus* (7 видов), *Psithyrus* (5 видов) и *Pyrobombus* (4 вида). В под родах *Bombus*, *Mendacibombus*, *Subterraneanobombus* и *Sibiricobombus* присутствует по два вида шмелей. Каждый из под родов *Alpigenobombus*, *Megabombus* и *Orientalibombus* представлен лишь одним видом (Saini et al., 2012).

На территории Западной Сибири распространены более 40 видов шмелей (Бывальцев, 2008; Бывальцев, 2009; Лузянин, 2009; Крайнов et al., 2014). Наиболее

богато представлены подроды *Bombus* и *Thoracobombus* (11 видов). Семь видов шмелей, встречающихся на данной территории, относятся к подроду *Psithyrus*, а шесть – к подроду *Pyrobombus*. Подроды *Alpigenobombus* и *Megabombus* представлены четырьмя видами шмелей, подрод *Subterraneobombus* - тремя видами, а *Cullumanobombus*, *Laesobombus* и *Melanobombus* - двумя. Для остальных подродов (*Bombias*, *Kallobombus*, и *Rhodobombus*) зарегистрировано по одному виду (Крайнов et al., 2014).

Исследования фауны шмелей на территории Восточной Сибири проводились в Красноярском крае, Республиках Бурятия, Тыва, Хакасия и Якутия, а также в Читинской области, где было выявлено более 40 видов шмелей (Прощалькин et al., 2009; Курianskaya et al., 2014; Бывальцев et al., 2015; Бывальцев et al., 2016; Драган et al., 2017). Однако в литературе отсутствуют данные по видовому разнообразию шмелей на территории Иркутской области.



**Рисунок 1.** Подроды шмелей рода *Bombus* и их основные представители (Williams et al., 2008b).

Шмели играют ключевую роль в природных и сельскохозяйственных экосистемах, обеспечивая важную функцию опыления диких растений и сельскохозяйственных культур (Goulson, 2010). Шмелей разводят в коммерческих целях для опыления тепличных культур, таких как томаты, дыни, красный перец и другие (Velthuis et al., 2006; Winter et al., 2006). Шмели обладают рядом особенностей, благодаря которым обеспечивается высокая эффективность опыления:

- Наличие густых волосков на теле насекомого позволяет эффективно переносить пыльцу с цветка на цветок;
- способность поддерживать высокую температуры тела, в результате быстрого и частого сокращения грудных мышц. Благодаря этому признаку шмели могут продолжать опыление при температуре ниже 10 °С;
- способность работать при низкой интенсивности света;
- возможность опыления при небольшом дожде (Winter et al., 2006).

Ежегодно, в коммерческих целях выращивается около миллиона колоний шмелей. Статистические расчеты показали, что более 400 тысяч гектар тепличных томатов в 2004 году было опылено именно коммерческими колониями шмелей (Winter et al., 2006). Большое количество дикорастущих растений опыляются преимущественно или исключительно шмелями, а иногда конкретными видами шмелей.

Накапливается все больше данных о том, что в последние десятилетия происходит резкое снижение численности популяций шмелей по всему миру (Williams, 1982; Sárospataki et al., 2005; Fitzpatrick et al., 2007; Kosior et al., 2007; Xie et al., 2008; Martins et al., 2010; Cameron et al., 2011). Уменьшение количества шмелей может пагубно отразиться как на диких растениях, так и на сельскохозяйственных культурах. Одной из основных причин снижения численности шмелей является негативное влияние на данных опылителей различных паразитических организмов (Meeus et al., 2011).

### Паразитические организмы, поражающие шмелей

В популяциях шмелей рода *Bombus* распространены различные патогены и паразиты, такие как вирусы, бактерии, грибы, простейшие, паразитические клещи и насекомые. Перечень основных паразитических организмов представлен в таблице 1.

**Таблица 1.** Паразиты и патогены, выявленные в популяциях шмелей (Schmid-Nempel, 2001; Chen et al., 2007; Evans et al., 2011).

Группа паразитов	Вид/название паразита
Вирусы	Acute Bee Paralysis virus, Entomopox virus
Бактерии	<i>Spiroplasma</i> , <i>Aerobacter cloaca</i>
Грибы	<i>Acrostalagmus</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Candida</i> , <i>Hirsutella</i> , <i>Metarhizium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Nosema bombi</i> , <i>Nosema ceranae</i>
Простейшие	<i>Apicystis bombi</i> , <i>Crithidia bombi</i>
Животные (нематоды)	<i>Neogregarina sp.</i> , <i>Sphaerularia bombi</i>
Животные (паразиты из отряда Нymenoptera)	<i>Syntretus splendidus</i> , <i>Melittobia acaosta</i> , <i>M. chalybii</i> , <i>Monodontomerus montivagus</i> , <i>Pediobius williamsoni</i>
Животные (паразиты из отряда Diptera)	<i>Apocephalus borealis</i> ; <i>Boettcharia litorosa</i> ; <i>Helicobia morionella</i> ; <i>Brachioma devia</i> , <i>B. sarcophagina</i> , <i>B. setosa</i> ; <i>Conops algerus</i> , <i>C. argentifacies</i> , <i>C. elegans</i> , <i>C. flavipes</i> , <i>C. quadrifasciatus</i> , <i>C. vesicularis</i> ; <i>Melaloncha sp.</i> ; <i>Physocephala brugessi</i> , <i>P. dimidiatipennis</i> , <i>P. dorsalis</i> , <i>P. nigra</i> , <i>P. obscura</i> , <i>P. rufipes</i> , <i>P. sagittaria</i> , <i>P. tibialis</i> , <i>P. vittata</i> ; <i>Senotainia tricuspis</i> ; <i>Sicus ferrugineus</i> ; <i>Zodion sp.</i>

**Таблица 1 (продолжение).** Паразиты и патогены, выявленные в популяциях шмелей (Schmid-Hempel, 2001; Chen et al., 2007; Evans et al., 2011).

Группа паразитов	Вид/название паразита
Животные (паразиты из отряда Lepidoptera)	<i>Ephestia kühniella</i>
Животные (паразиты подкласса Acari)	<i>Locustacarus buchneri</i> , <i>Tyrophagus putrescentiae</i> , <i>Hypoaspis marginopilosa</i> , <i>H. hyatti</i> , <i>H. bombicolens</i> , <i>Parasitellus fucorum</i> , <i>P. ignotus</i> , <i>P. crinitus</i> и др.

В настоящее время особый интерес исследователей привлекают микроспоридии рода *Nosema*, а также простейшие трипаносоматиды рода *Crithidia* и неогрегарины рода *Apicystis*. Массовое и резкое снижение численности в популяциях шмелей связывают с распространением микроспоридий, трипаносоматид и неогрегаринов в популяциях данных опылителей. У паразитических организмов, описанных выше, в последние годы активно выявляются новые генетические варианты и новые виды способные заражать колонии опылителей, преодолевая видовые барьеры. Однако, разнообразие данных паразитов и их вклад в снижение численности опылителей по всему миру изучены недостаточно.

### **Внутриклеточные паразиты типа *Microsporidia***

#### ***Общая характеристика типа *Microsporidia****

Микроспоридии – особая группа облигатных внутриклеточных паразитических организмов, поражающих различных хозяев от насекомых до млекопитающих, в том числе человека. Представители данной группы относятся к эукариотам и содержат ядро, окруженное оболочкой. В ходе эволюционного развития они претерпели значительные изменения, направленные на адаптацию к паразитизму. По сравнению с другими эукариотами микроспоридии характеризуются значительным упрощением структурно-функциональной

организации на различных уровнях от морфологии и ультраструктуры до особенностей биохимии, обмена веществ, и генома.

Впервые микроспоридии были описаны К. В. фон Негели в 1857 году, когда инфекция, названная “pepper disease”, угрожала шелковой промышленности Европы (Sridhar et al., 2015). Паразит, поражающий тутового шелкопряда *Bombyx mori*, был назван *Nosema bombycis* и отнесён к грибам шизомицетам (Keeling et al., 2002). В 1882 году Ж. Бальбиани выделил представителей рода *Nosema* в новую группу Microsporidia, данное название группы используется и в настоящее время (Keeling et al., 2002). Исследования взаимоотношений между микроспоридиями и другими эукариотическими организмами продолжаются в настоящее время. Развитие экспериментальных и биоинформатических методов анализа позволило подтвердить, что микроспоридии относятся к царству Грибы (Xiang et al., 2014).

На данный момент в группу Microsporidia входят паразитические организмы из 1300 видов и более 160 родов (Corradi et al., 2009). Общепризнанной классификации внутри данной группы на настоящий момент нет. Исследователи Ч. Р. Воссбринк и Б. А. Дебрюннер-Воссбринк предложили классифицировать микроспоридий в зависимости от среды обитания организмов-хозяев и выделили три класса: Aquasporidia, Marinosporidia и Terresporidia (Vossbrinck et al., 2005). Однако, в данной классификации остаются несоответствия и спорные моменты относительно позиций отдельных видов, родов и более высоких классификационных единиц микроспоридий.

Большинство микроспоридий поражают позвоночных и беспозвоночных животных, однако были выявлены представители данной группы, поражающие некоторые виды простейших, таких как инфузории и грегарины (Vivier, 1975). Поскольку грегарины и некоторые инфузории являются паразитами животных, предполагается, что микроспоридии ранее заражали животных-хозяев грегаринов и инфузорию, а затем начали паразитировать на своих конкурентах. Микроспоридии наиболее значительно представлены у членистоногих и рыб. Так, один из видов микроспоридий, *Nosema ceranae*, поражающий медоносных пчёл, оказывает отрицательное влияние на организм хозяина и вносит вклад в снижение

численности данных опылителей на территории большинства стран мира (Higes et al., 2008).

### ***Структура спор представителей типа Microsporidia***

Представители типа Microsporidia выживают вне клеток организмов-хозяев в форме спор, устойчивых к внешней среде (Vavra et al., 1999). Размер спор варьирует от 1 мкм до 40 мкм. Споры могут быть сферической, яйцевидной, палочковидной формы или иметь форму полумесяца; яйцевидная форма является наиболее распространенной. Спора представляет собой высокоорганизованную клетку, защищенную мембраной и плотной двойной стенкой (рисунок 2).



**Рисунок 2.** Структура споры микроспоридий (Keeling et al., 2002).

Внешняя стенка (экзоспора) состоит из плотного гранулированно-волокнутого белкового матрикса и имеет равномерную толщину по всей поверхности споры (Vinckier et al., 1993; Bigliardi et al., 1996; Vavra et al., 1999). Внутренняя стенка (эндоспора) образована альфа-хитином и белками, и имеет одинаковую толщину по всей поверхности за исключением вершины споры, где эндоспора значительно утончается (Vavra et al., 1999). Под оболочками расположена цитоплазма споры (спороплазма), являющаяся инфекционным материалом микроспоридий.

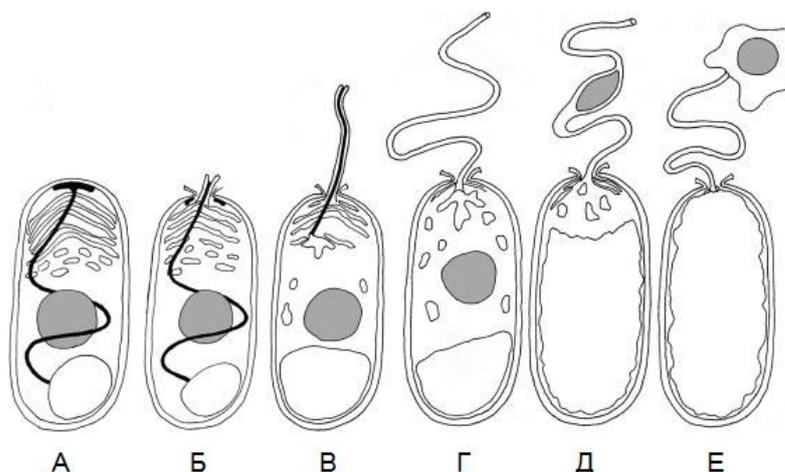
Спороплазма содержит одно или два ядра (диплокарион), цитоплазму, богатую рибосомами, и структурами, участвующими в инфицировании клетки-хозяина. Существуют три основных структуры, связанных с данным процессом: поларопласт, полярная нить или полярная трубка, и постериорная вакуоль. Поларопласт представляет собой крупную структуру, образованную мембранами, передняя часть поларопласта (ламеллярный поларопласт) - высокоорганизованная мембранная структура, задняя часть (везикулярный поларопласт) содержит мембранные компоненты, расположенные более рыхло. Наибольшую роль в процессе инфицирования играет полярная нить, состоящая из мембран и гликопротеинов, и варьирует в диаметре от 0,1 до 0,2 мкм и по длине от 50 до 500 мкм (Keohane et al., 1998; Vavra et al., 1999). Полярная нить прикреплена к вершине споры с помощью структуры, напоминающей по форме зонтик и называемой закрепляющим диском. Полярная нить доходит до задней части споры и заканчивается на задней вакуоли. По-видимому, существует некая физическая связь между окончанием полярной нити и вакуолью, но её природа (контакт или вхождение нити в вакуоль) неизвестна, так как точка контакта никогда не наблюдалась (Lom et al., 1963; Weidner, 1972; Vinckier et al., 1993; Keohane et al., 1998; Vavra et al., 1999). Полярная нить прямая примерно от одной трети до половины длины споры, а остальная часть спирально закручена. Примечательно, что такие признаки, как число витков, их расположение друг относительно друга и угол наклона консервативны и могут служить для определения конкретного вида микроспоридий (Sprague et al., 1992; Vavra et al., 1999). В отличие от других эукариотических клеток, споры микроспоридий не содержат центриолей, митохондрий, микротрубочек и пероксисом, имеют специфический аппарат Гольджи и рибосомные РНК, близкие по характеристикам к прокариотическим (Curgy et al., 1981; Vavra et al., 1999; Weiss, 2001; Keeling et al., 2002; Beznoussenko et al., 2007).

### *Жизненный цикл микроспоридий*

В жизненном цикле микроспоридий выделяют три основные фазы: инфекционная фаза (I), пролиферативная фаза (II) и фаза образования спор (фаза спорогония или фаза споруляции - III) (Weiss, 2001).

#### *Инфекционная фаза*

Процесс заражения клетки хозяина начинается с прорастания споры - выталкивания полярной нити через верхнюю часть споры (рисунок 3).



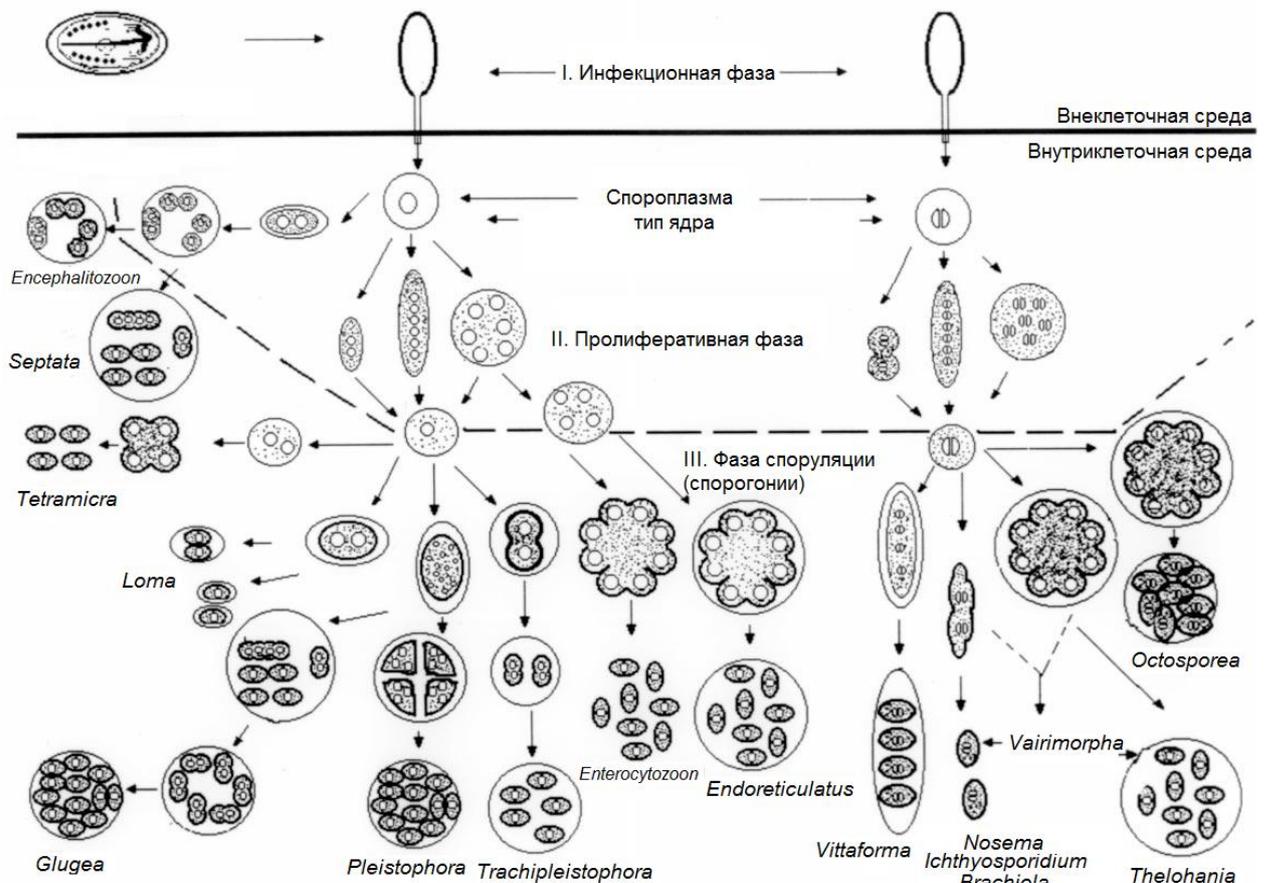
**Рисунок 3.** Стадии прорастания спор микроспоридий. А – спора устойчивая к внешней среде. Б – поларопласт и постериорная вакуоль увеличиваются, происходит разрыв закрепляющего диска и выброс полярной нити. В – полярная нить выворачивается изнутри наружу. Г, Д – спороплазма выталкивается через поляную нить и оказывается во внешней среде, окруженная новой мембраной (Е) (Keeling et al., 2002).

Запускать данный процесс может один из экологических триггеров, которые варьируют в зависимости от вида микроспоридий и изучены слабо (Undeen et al., 1990; Keohane et al., 1998). Признаками подготовки к прорастанию споры является набухание поларопласта, задней вакуоли и споры в целом. Набухание приводит к увеличению осмотического давления внутри споры, разрыву мембраны спороплазмы и закрепляющего диска и выбросу полярной нити, сопровождающемуся выворачиванием полярной нити наизнанку. Выброшенная полярная нить прокалывает мембрану клетки-мишени, а осмотическое давление

внутри споры выталкивает спороплазму через полярную нить в цитоплазму клетки-хозяина (Keeling et al., 2002).

### *Пролиферативная фаза и фаза формирования спор*

После проникновения инфекционного материала микроспоридии в клетку хозяина начинается процесс роста и размножения паразита, который значительно варьирует в зависимости от вида микроспоридий, типа ядра и среды обитания (рисунок 4).



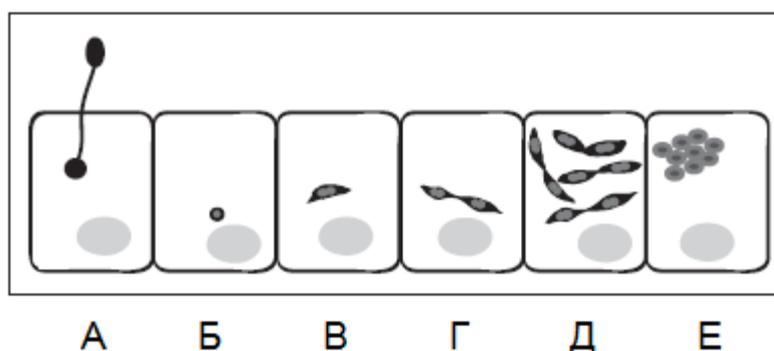
**Рисунок 4.** Жизненный цикл микроспоридий. Сплошной чёрной линией обозначена мембрана клетки-хозяина, отделяющая цитоплазму от межклеточного пространства (Weiss, 2001).

Стадия микроспоридий, проникшая в клетку хозяина, была названа меронт (от англ. meront). Меронт может существовать внутри хозяйской клетки в свободном виде или внутри фагоцитарной (паразитофорной) вакуоли, как в случае многих других внутриклеточных паразитов (Larsson et al., 1996). Во время

пролиферативной фазы паразит активно взаимодействует с клеткой-хозяином. В некоторых случаях клетка реорганизуется под влиянием паразита таким образом, что он оказывается окруженным эндоплазматическим ретикуломом и митохондриями и активно использует их для собственного деления (Vavra et al., 1999). Также микроспоридии могут физически взаимодействовать с ядром клетки хозяина через образование пор в ядре или даже путем полного проникновения инфекционного материала в ядро (Keeling et al., 2002). Клетки-хозяева могут также преобразовываться по форме и размеру, зачастую увеличиваясь, и их деятельность полностью подчиняется размножению микроспоридий.

Фаза формирования спор также как и пролиферативная фаза может протекать непосредственно в цитоплазме или вокруг преспор (спороблатов) может образовываться спорофорная везикула. Во время данной фазы может происходить несколько дополнительных делений и формируется экструзионный аппарат микроспоридий (поларопласт, полярная нить и постериорная вакуоль). По мере того как завершается образование данного аппарата и споробласт становится зрелым, клетки уменьшаются в размерах и развивается эндоспора (Keeling et al., 2002). После завершения зрелые споры высвобождаются и могут инфицировать как того же хозяина, так и новый организм (Solter et al., 1998).

Согласно последним исследованиям, в случае микроспоридий рода *Nosema* фазы II и III проходят следующим образом: после попадания паразита в клетку из спороплазмы образуется меронт веретенной формы, который делится и формирует пару веретенных меронтов (рисунок 5).

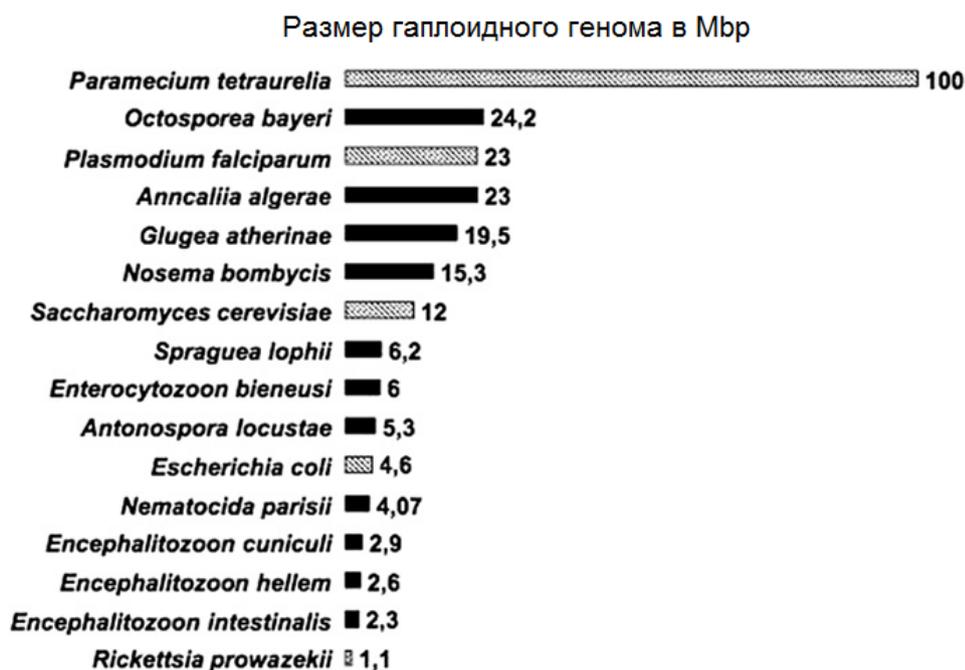


**Рисунок 5.** Схематичное представление жизненного цикла микроспоридий вида *N. ceranae*. А - полярная нить спор прокалывает мембрану клетки-мишени и впрыскивает спороплазму внутрь. Спороплазма сферической формы (Б) преобразуется в веретеновидный меронт (В), который делится и дает начало паре меронтов (Г). Парные меронты продолжают делиться (Д), затем разделяются и преобразуются в споронты круглой или овальной формы (Е) (Gisder et al., 2011).

Парные меронты продолжают делиться, используя системы клетки-хозяина, пока последняя не наполняется значительной массой меронтов. Начало фазы споронии характеризуется появлением споронтов (от англ. sporonts) и поздних споробластов круглой или овальной формы, окруженных плотной плазматической мембраной и поларопластами. Затем споробласты развиваются в споры круглой или овальной формы, устойчивые к внешней среде (Fries et al., 1992; DeGraaf et al., 1994; Gisder et al., 2011).

### ***Особенности генома микроспоридий***

Микроспоридии - уникальные эукариотические организмы, которые обладают рядом особенностей, отличающих их от других эукариот и являющихся свидетельствами длительного приспособления к облигатному паразитизму. Геномы представителей данной группы компактные и характеризуются небольшими размерами. Согласно базе данных NCBI Genome в настоящее время секвенированы 26 геномов микроспоридий, размеры данных геномов варьируют в пределах от 2.2 Мbp до 51.4 Мbp (рисунок 6).



**Рисунок 6.** Сравнение размеров геномов микроспоридий и других паразитических и свободноживущих организмов. Геномы микроспоридий представлены черными прямоугольниками, геномы бактерий и одноклеточных эукариот штрихованными прямоугольниками (Peuretaillade et al., 2011).

Микроспоридии рода *Encephalitozoon* имеют самый маленький геном среди эукариот, размер которого меньше размера генома кишечной палочки *Escherichia coli* (Vivares et al., 1996; Peuretaillade et al., 2011). Уменьшение размеров геномов микроспоридий связано с уменьшением количества генов и изменением структурной организации геномов. Количество генов в геномах микроспоридий варьирует от 1833 до 3804, что меньше, чем у дрожжей (Peuretaillade et al., 2011). Причиной уменьшения количества генов является приспособление к существованию внутри клеток-хозяев. Так, микроспоридии утратили гены различных метаболических путей, консервативных среди эукариот (метаболизма углерода, жирных кислот, аминокислот, синтеза нуклеотидов, и т.д.). Основная масса генов в геноме микроспоридий является белок-кодирующими генами, связанными с базовыми функциями (транскрипция, трансляция, репликация) и специфическими процессами взаимодействия между хозяином и паразитом (процесс заражения, клеточный цикл, и др.) (Peuretaillade et al., 2011). Однако, к

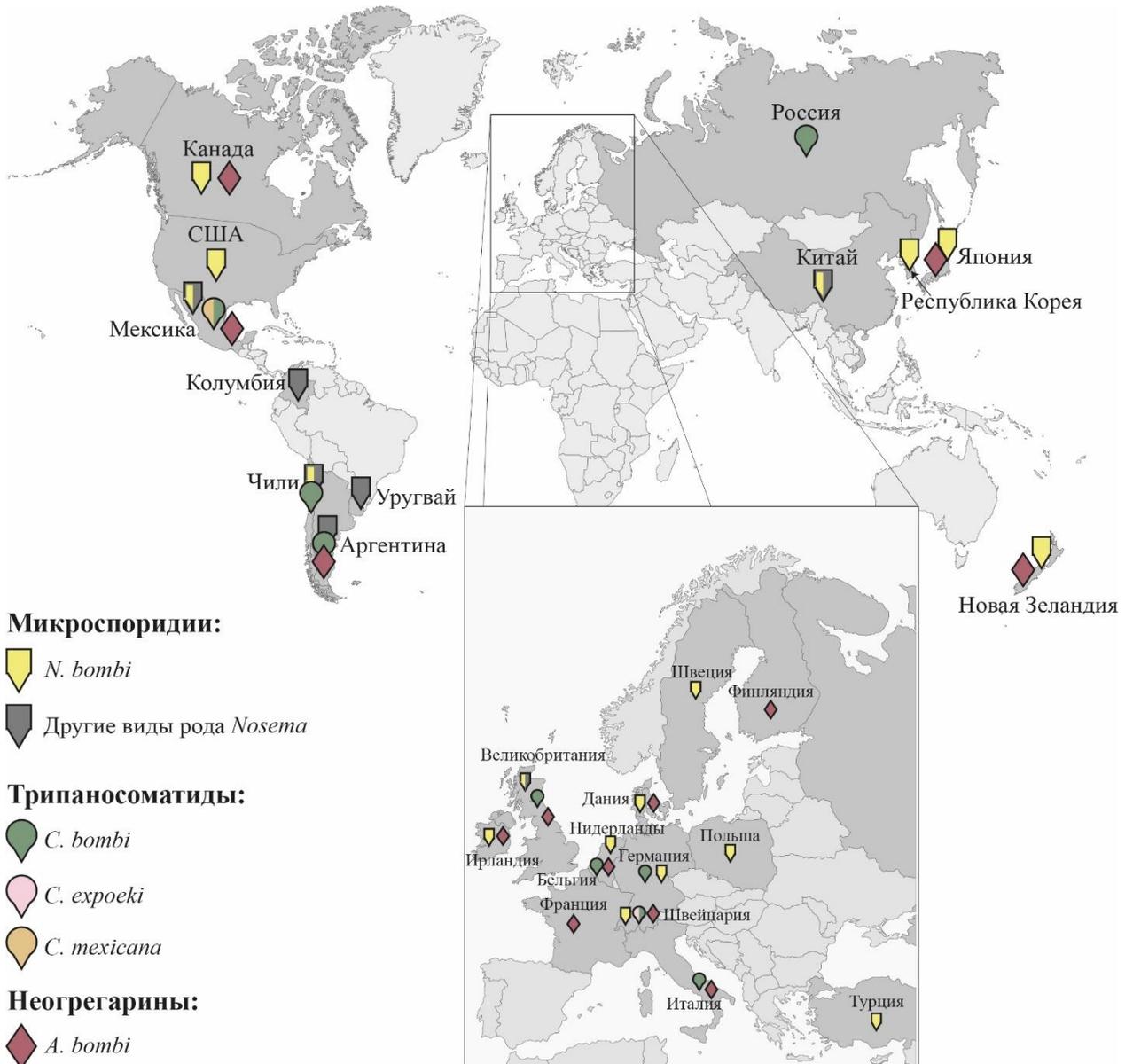
настоящему моменту геномы микроспоридий изучены не полностью, активно проводятся работы по аннотированию секвенированных геномов.

Геномы различных представителей группы Microsporidia варьируют по параметру компактность. Так, плотность генов варьирует от 0.23 до 0.87 генов на тысячу п.о. Компактность геномов *Encephalitozoon cuniculi* и *Encephalitozoon intestinalis* связана с уменьшением количества и длины интронов, уменьшением длины межгенных спейсеров, а также длины генов, кодирующих белки, консервативные среди эукариот (Lee et al., 2010). Так, сравнение протеомов *Saccharomyces cerevisiae* и *E. cuniculi* показало, что более 85% белков *E. cuniculi* короче, чем ортологи дрожжей, среднее уменьшение длины составляет 14.6% (Katinka et al., 2001; Garbarino et al., 2002). Однако некоторые виды микроспоридий характеризуются геномами большего размера, со сравнительно длинными генами, спейсерами и наличием повторенных последовательностей, в том числе мобильных генетических элементов (Gill et al., 2008; Williams et al., 2008a; Cornman et al., 2009; Corradi et al., 2009).

### ***Микроспоридии в популяциях шмелей***

#### *Разнообразие и распространение паразитических микроспоридий, поражающих шмелей*

Для представителей рода *Vombis* также в течение длительного времени был описан единственный вид микроспоридий, *N. bombi*, распространенный в Европейских странах, странах Северной Америки, а также Новой Зеландии (Brown, 2017). Для *N. bombi* характерна высокая внутривидовая вариабельность. Первые исследования вариабельности начались с анализа ITS района и позволили выявить семь длинных и шесть коротких вариантов, различающихся по количеству повторов мотива (ГТТТ) (Tay et al., 2005; O'Mahony et al., 2007; Cordes et al., 2012). Данные варианты были выявлены на территории США и некоторых стран Европы, были распределены равномерно по популяциям и не имели специфичности к определенному виду шмелей (Tay et al., 2005; Sokolova et al., 2010).



**Рисунок 7.** Географическое распространение различных видов микроспоридий, трипаносоматид и неогрегаринов в популяциях шмелей.

При исследовании шмелей на территориях Китая, Уругвая и Мексики были выявлены микроспоридии вида *N. ceranae*, ранее выявленного исключительно в популяциях медоносных пчёл (рисунок 7) (Li et al., 2012; Arbulo et al., 2015; Gallot-Lavallée et al., 2016). Кроме того, на территории Мексики было обнаружено небольшое количество образцов шмелей, пораженных видами *N. thomsoni*, *N. carpocapsae* и *N. apis* (рисунок 7) (Gallot-Lavallée et al., 2016).

### *Способы распространения микроспоридий в колониях имелей*

Успешное распространение микроспоридий в популяциях организмов-хозяев является критическим условием для выживания паразитов и оказывает влияние на эволюцию взаимоотношений между паразитом и хозяином. Представители группы *Microsporidia* имеют различные жизненные циклы, включающие в себя вертикальный или горизонтальный пути передачи паразита (Dunn et al., 2001).

#### *Горизонтальный способ распространения*

Горизонтальная передача микроспоридий может происходить между организмами, как из одного поколения, так и из разных поколений, а также между различными видами организмов-хозяев. В случае горизонтального способа паразиты могут передаваться между хозяевами оральным или половым путём. Споры, как правило, попадают в организм хозяина и инфицируют эпителиальные клетки кишки, откуда могут распространяться на другие органы и ткани. Горизонтальный путь передачи является наиболее распространённым у микроспоридий (Bigliardi et al., 2002).

#### *Вертикальный способ распространения*

Вертикальная передача микроспоридий происходит в ряду поколений от родителей к потомкам внутри одной линии организмов-хозяев. Многие микроспоридии передаются вертикальным способом только на определённой стадии их жизненного цикла. В случае паразитирования на беспозвоночных животных единственным вертикальным вариантом распространения микроспоридий является трансвариальный. Вертикальная передача микроспоридий осуществляется в основном по материнской линии (через цитоплазму яйцеклетки). Мужские гаметы чрезвычайно малы и редко вносят значительный вклад в цитоплазму оплодотворённой яйцеклетки, следовательно, передача паразита по отцовской линии – очень редкое явление. Наследование только по одной родительской линии особым образом воздействует на взаимоотношения в системе «паразит-хозяин» и приводит к необычным последствиям: микроспоридии способны вызывать гибель самцов и феминизировать популяцию организмов-хозяев.

Способ передачи микроспоридий значительно влияет на вирулентность паразитов по отношению к организму-хозяину. Горизонтальная передача паразита происходит тем эффективнее, чем больше в жизненном цикле паразита стадий, на которых может произойти заражение. Для многих микроспоридий горизонтальная передача означает смерть хозяина. Эффективность вертикальной передачи паразита напрямую зависит от выживания и эффективности размножения хозяина, поэтому в данном случае отбор должен благоприятствовать снижению вирулентности паразитов (Kellen et al., 1965; Smith et al., 1991; Hurst et al., 1994; Ebert et al., 1996; Dunn et al., 2001). Вертикальная передача паразита осуществляется в основном по одной родительской линии, и в этих случаях имеет место отбор на низкую вирулентность для самок в популяциях хозяев. Инфекция не передаётся вертикально по мужской линии, следовательно, паразиты у хозяина-самца не подвергаются данному селективному давлению. Микроспоридии используют две различные стратегии влияния на популяцию хозяев с целью увеличения эффективности распространения: 1) паразиты могут приводить к гибели самцов, что позволяет освободить споры для горизонтальной передачи; 2) паразиты способны феминизировать самцов, то есть преобразовывать самцов в функциональных, полноценных самок, которые осуществляют вертикальную передачу паразитов (Kellen et al., 1965; Dunn et al., 1995; Vandi et al., 2001).

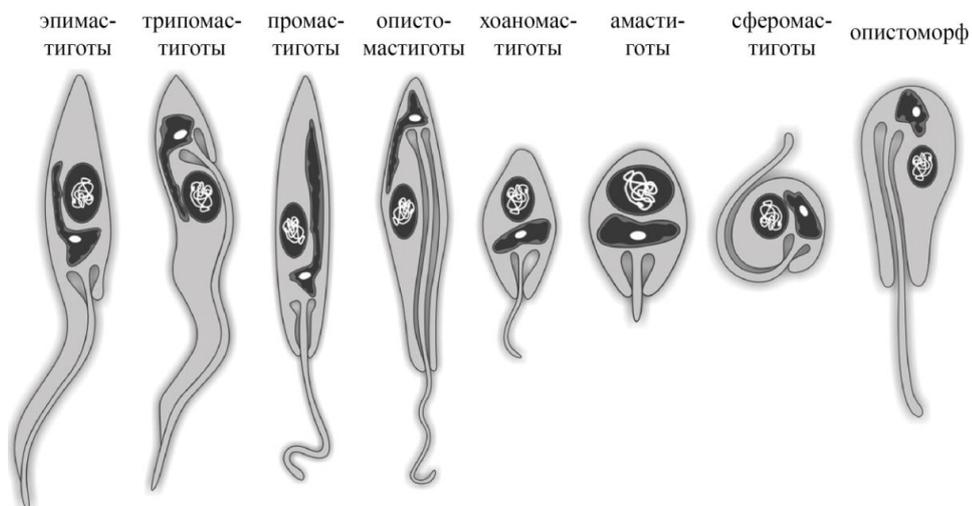
Для микроспоридий, использующих как вертикальный, так и горизонтальный способ передачи, отбор будет действовать по-разному в зависимости от выбранного на каждом конкретном этапе жизненного цикла способа передачи. Отбор будет способствовать высокой репродукции паразита и высокой вирулентности во время горизонтальной передачи. И в противоположность этому, во время вертикальной передачи отбор будет отдавать предпочтение низкой нагрузке на организм-хозяина и снижению вирулентности (Dunn et al., 2001). *N. bombi* распространяется в популяциях опылителей-хозяев как горизонтальным, так и вертикальным путем.

## Простейшие паразиты отряда Trypanosomatida

### Общая характеристика отряда Trypanosomatida

Представители отряда Trypanosomatida (Euglenozoa: Kinetoplastida) являются одножгутиковыми простейшими паразитическими организмами с гомоксенными или гетероксенными жизненными циклами (D'Avila-Levy et al., 2015). Гетероксенными паразитами являются те, чей жизненный цикл разделен между двумя хозяевами, а жизненный цикл гомоксенных паразитов протекает в организме единственного хозяина. В отряде Trypanosomatida выделяют единственное семейство Trypanosomatidae. Отличительной особенностью организмов данного семейства и класса Kinetoplastida в целом является наличие особого типа ДНК в митохондриях – кДНК (кинетопластной ДНК) (Рупперт et al., 2008).

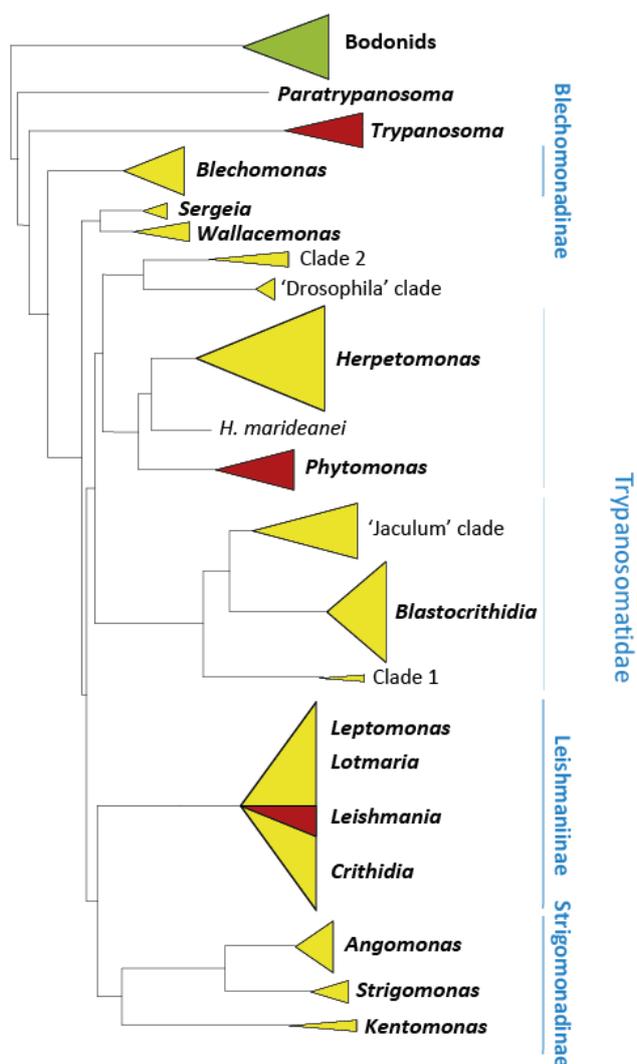
К настоящему моменту в семействе Trypanosomatidae описано более 350 видов, которые разделены на 10 родов. Последний подробный каталог трипаносоматид был опубликован в 1990 году (Подлипаев, 1990). В каталоге С. А. Подлипаева классификация трипаносоматид в основном базируется на морфологии и особенностях жизненных циклов данных организмов (D'Avila-Levy et al., 2015). Основные морфологические формы трипаносоматид представлены на рисунке 8. Особенностью данной классификации является существенная вариабельность в объеме различных родов (около 600 видов рода *Trypanosoma* и лишь два вида рода *Endotrypanum*) (Подлипаев et al., 2000).



**Рисунок 8.** Схематичное изображение основных морфологических форм трипаносоматид (D'Avila-Levy et al., 2015).

Благодаря развитию молекулярно-биологических методов, в последние десятилетия происходит интеграция морфологических признаков и молекулярных данных (Подлипаев et al., 2000; D'ávila-Levy et al., 2015). Основными маркерными последовательностями для установления филогенетических взаимоотношений служат гены 18S рРНК (18S субъединица рибосомной рибонуклеиновой кислоты), гликосомальной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*gGAPDH* - glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), сплайсируемого лидера (*SL* - spliced leader), а также некоторые другие (Фролов et al., 2015; D'ávila-Levy et al., 2015; Votýpka et al., 2015). На основе полученных молекулярных данных предпринимаются попытки пересмотра таксономии как внутри семейства Trypanosomatidae, так и его положения в типе Euglenozoa (Lukeš et al., 2014; Votýpka et al., 2015).

В 2015 году Я. Вотипка с соавторами предложили новую систему классификации семейства Trypanosomatidae, которая основана на сочетании традиционной классификации и филогенетических построениях (Votýpka et al., 2015). Согласно данной классификации семейство Trypanosomatidae содержит три подсемейства, которые соответствуют основным кластерам на филогенетическом древе (рисунок 9).



**Рисунок 9.** Филогенетическое древо, демонстрирующее эволюционные взаимоотношения трипаносоматид, построенное на основе нуклеотидных последовательностей малой субъединицы рибосомной РНК. Желтым и красным цветами обозначены гомоксенные и диксенные трипаносоматиды. Зеленым цветом выделены представители рода *Bodo* (Kinetoplastida: Bodonidae), которые были использованы в качестве внешней группы (Votýpka et al., 2015).

Подсемейство Leishmaniinae объединяет в себе один гетероксенный род *Leishmania* и три гомоксенных рода: *Crithidia*, *Leptomonas* и *Lotmaria*. Подсемейство Strigomonadinae содержит три гомоксенных рода: *Angomonas*, *Kentomonas* и *Strigomonas*. Последнее подсемейство, Blechomonadinae, включает в себя гомоксенный род *Blechomonas*. Несколько других кластеров на филогенетическом древе представлены отдельными родами, однако, поскольку данные таксоны также формируют крупные кластеры, авторами статьи вносится предположение о повышении их таксономического статуса. К данным кластерам

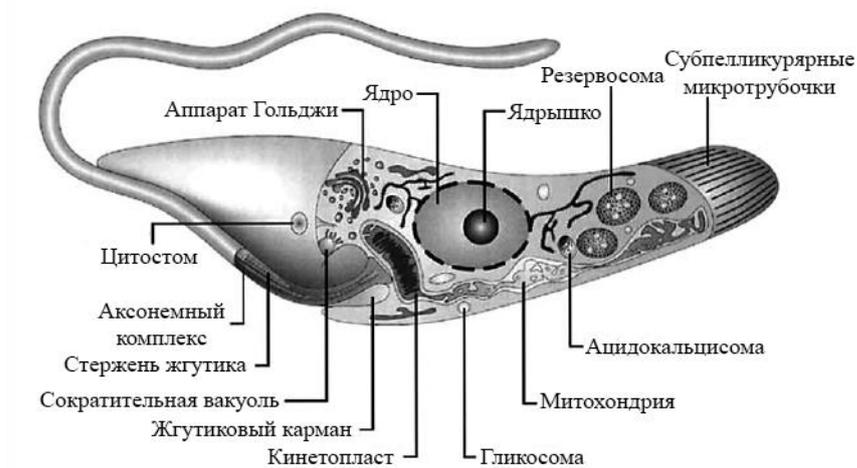
относятся гетероксенные роды *Trypanosoma* и *Phytomonas*, а также гомоксенные роды *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Sergeia*, *Paratrypanosoma* и *Wallacemonas*. Для остальных кластеров (1, 2, *Drosophila*, *Jaculum*) на филогенетическом древе в настоящий момент нельзя установить таксономическое положение, поскольку они требуют дополнительного морфологического определения (Votýpka et al., 2015). Однако, следует отметить, что предложенная система классификации Trypanosomatidae не до конца соответствует классификации данного отряда, представленной в настоящий момент в базе данных GenBank.

Представители семейства Trypanosomatidae широко распространены среди насекомых и оказывают на них негативное воздействие. Было установлено, что у медоносных пчел и шмелей, пораженных трипаносоматидами рода *Crithidia*, наблюдается увеличение уровня смертности особей во время зимовки, а также снижение продолжительности жизни.

### ***Структурная организация трипаносоматид***

Структурная организация одноклеточных протист семейства Trypanosomatidae в целом схожа с организацией клеток других эукариот. Однако, как и многие паразитические организмы, они имеют тенденцию ко вторичному упрощению или утрате некоторых органелл. В ходе эволюции, данным семейством были полностью утрачены пластиды.

Размеры клеток у различных видов трипаносоматид варьируют от 4 до 100 мкм (Wheeler et al., 2013). Строение клеток данной группы описано на примере модельного организма, *T. cruzi*, представленного на рисунке 10. Отряд Trypanosomatida характеризуется наличием нескольких органелл, которые описаны только для данной группы паразитов (Lopes et al., 2010). Основные органеллы клетки трипаносоматид и их функции представлены в таблице 2.



**Рисунок 10.** Основные структуры и органеллы эпимастиготной формы *T. cruzi* (Lopes et al., 2010).

**Таблица 2.** Основные органеллы трипаносоматид, их размеры и функции (Souza de, 2008; Lopes et al., 2010).

Органелла	Размер (мкм)	Функции
Аппарат Гольджи	Вариабельный	Выведение веществ из клетки
Ацидокальцисома	0.2	Регуляция кальциевого обмена и поддержание pH клетки
Гликосома*	0.2-0.3	Участие в биохимическом пути разложения глюкозы до пирувата
Жгутик	Вариабельный	Перемещение паразита (волнообразные движения)
Кинетопласт	~1.0	Выработка энергии для движения жгутика
Митохондрия	Вариабельный	Выработка энергии путем окислительного фосфорилирования, синтез ключевых метаболитов
Резервосома*	0.5	Хранение жиров и белков
Сократительная вакуоль	Вариабельный	Осморегуляция
Ядро	2.5	Хранение, передача и реализация наследственной информации

\* Органеллы, встречающиеся только у представителей отряда Trypanosomatida

### *Жизненные циклы Trypanosomatida*

Как было отмечено ранее, все представители отряда Trypanosomatida являются облигатными паразитами с гомоксенным или гетероксенным типом жизненного цикла (D'ávila-Levy et al., 2015). Установлено, что трипаносоматиды с гомоксенным жизненным циклом играют важную роль в эволюционной истории всего семейства, поскольку гетероксенные роды *Phytomonas* и *Leishmania* произошли от гомоксенных предков.

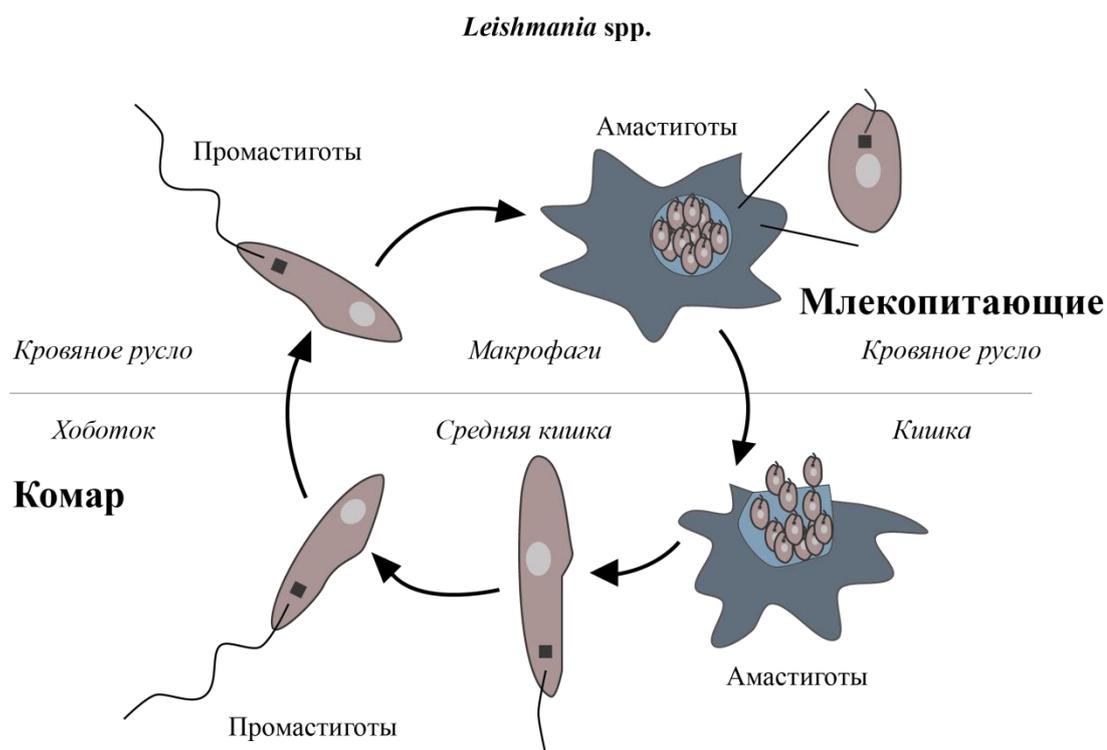
Гетероксенные виды трипаносоматид для завершения своего жизненного цикла нуждаются в двух хозяевах: беспозвоночном и позвоночном/растении. Отряд Trypanosomatida включает в себя три рода (*Leishmania*, *Trypanosoma* и *Phytomonas*) представители которых являются гетероксенными организмами.

Представители рода *Phytomonas* в настоящий момент обнаружены на территории Южной Америки, в нескольких европейских странах (Испания и Франция), в Азии и Северо-Западной Африке (Lopes et al., 2010; Jaskowska et al., 2015). Они способны поражать семена, плоды, цветы, а также флоэму и другие ткани растений (Lopes et al., 2010). Заражение насекомых происходит в результате того, что они питаются соками пораженных фитомоносами растений. У насекомых *Phytomonas* spp. в первую очередь обнаруживают в кишечном тракте, в дальнейшем паразиты перемещаются в слюнные железы, после этого вновь попадая в растения (Lopes et al., 2010).

Достаточно хорошо изучены жизненные циклы представителей нескольких видов рода *Trypanosoma* (*T. brucei* и *T. cruzi*) и рода *Leishmania* (*L. major*, *L. mexicana*, *L. donovani*, *L. tropica* и др.), поскольку данные паразиты вызывают серьезные заболевания человека. Эти паразитические организмы передаются от человека или других млекопитающих насекомым. В каждом хозяине они проходят последовательные изменения морфологии. Данные изменения могут касаться размера и формы клеток, размера митохондрий, а также могут быть связаны с появлением или исчезновением жгутика и изменением положения органелл.

Жизненный цикл гетероксенных трипаносоматид будет описан на примере одной из наиболее изученных групп - *Leishmania* spp. Данные паразитические организмы широко распространены на территории Евразии, Африки, а также Северной и Южной Америки и вызывают кожные и висцеральные поражения у

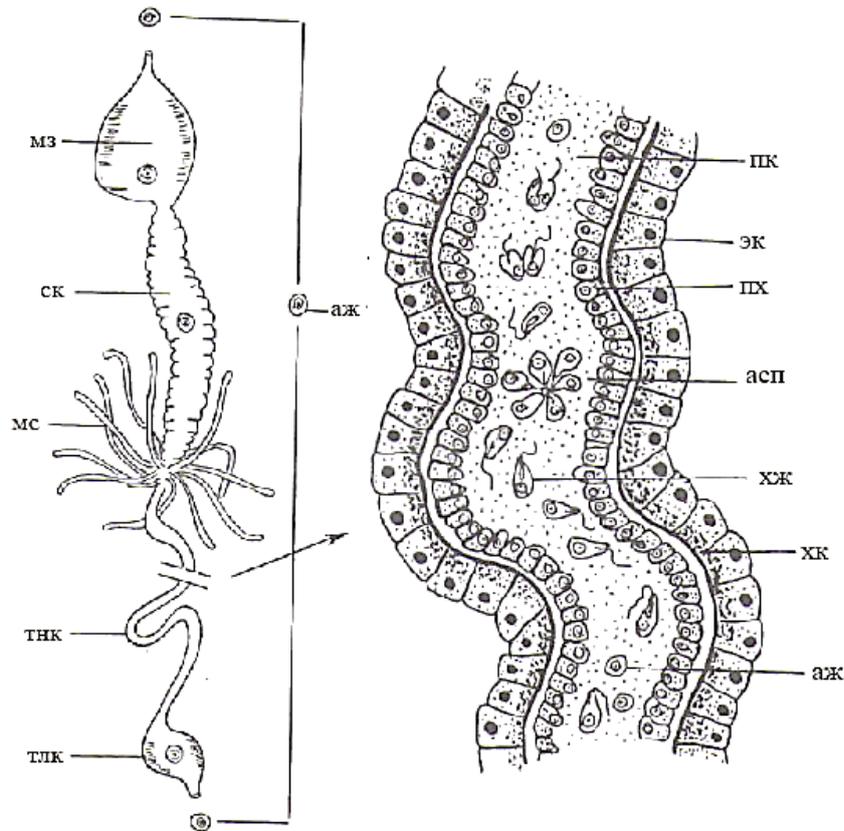
млекопитающих и рептилий. Переносчиками лейшманий (вторым хозяином) являются комары. Жизненный цикл данных организмов представлен на рисунке 11.



**Рисунок 11.** Жизненный цикл *Leishmania* spp. (Duque et al., 2013).

В результате питания комаров кровью, зараженной амастиготными формами (неподвижные, с коротким жгутиком) простейших рода *Leishmania*, происходит инфицирование насекомого-хозяина. В пищеварительном канале зараженной особи происходит развитие промастигот (подвижные формы с длинным жгутиком) с последующим их размножением. Во время кормления путем регургитации промастиготные формы попадают из кишечника насекомого в кровь млекопитающего. В организме данного хозяина инфицированные формы попадают в макрофаги, где вновь происходит их размножение. В макрофагах млекопитающего-хозяина лейшмании приобретают амастиготную форму.

Многие беспозвоночные животные являются хозяевами не только для гетероксенных трипаносоматид, но также поражаются гомоксенными видами. Жизненный цикл гомоксенных паразитов отряда Trypanosomatida будет описан на примере паразита шмелей *Crithidia bombi* Gorbunov, 1987. Схема развития различных форм *C. bombi* в кишечном тракте шмелей представлена на рисунке 12.



Буквенные обозначения: аж- амастиготная форма жгутиконосца; асп- ассоциат свободных промастигот; мз- медовый зобик; мс- мальпигиевы сосуды; ПК- просвет кишки; ПХ- прикрепленные хоаномастиготы; ск- средняя кишка; тлк- толстая кишка; тнк- тонкая кишка; хж- хоаностиготный жгутиконосец; хк- хитиновая кутикула; эк- эпителий кишечника.

**Рисунок 12.** Жизненный цикл *Crithidia bombi* (Горбунов, 1996).

Через сутки после заражения шмеля в просвете медового зобика и средней кишки появляются амастиготные (цистоподобные) паразиты. В это же время в тонком отделе кишечника наблюдаются подвижные промастиготы, которые начинают активно делиться. Деление паразита начинается с удвоения кинетопласта и жгутикового аппарата, затем происходит деление ядра. Через трое суток критидии встречаются только в тонком отделе задней кишки, помимо подвижных форм появляются особи, прикрепленные к стенкам кишечника с помощью жгутика. Еще через несколько суток просвет тонкого отдела задней кишки полностью заполняется паразитами. В толстом отделе задней кишки появляются амастиготные формы, образованные рядом последовательных делений промастигот. Амастиготы *C. bombi* вместе с экскрементами попадают в подстилку, медовый горшочек или другие материалы гнезда шмелей, а также распространяются фуражирующими особями на опыляемые растения (Горбунов, 1996).

### *Трипаносоматиды в популяциях шмелей*

#### *Разнообразие и распространение паразитических трипаносоматид, поражающих шмелей*

Впервые трипаносоматиды у шмелей были обнаружены Дж. Скоу и соавторами в 1963 году (Горбунов, 1987). Однако описание морфологии и жизненного цикла у данных паразитических организмов было проведено П. С. Горбуновым лишь в 1987 году при изучении зараженных шмелей *V. pascuorum*, собранных на территории России, а также Дж. Липа и О. Триджиани в 1988 году у шмелей вида *V. terrestris*, собранных на территории Италии (Горбунов, 1987; Lira et al., 1988) (рисунок 7). Основываясь на морфологических признаках, данная трипаносоматида была отнесена к роду *Crithidia* и получила видовое название *Crithidia bombi*. В настоящий момент установлено, что данный паразитический организм поражает большое количество видов шмелей (Schmid-Hempel, 2001; Meeus et al., 2010a; Cordes et al., 2012; Erler et al., 2012; Gallot-Lavallée et al., 2016). Морфология и жизненный цикл *C. bombi* хорошо изучены, что позволяет использовать его в качестве модельного для изучения взаимоотношений типа «паразит - хозяин» (Schmid-Hempel, 2001; Yourth et al., 2006; Yourth et al., 2008; Erler et al., 2012).

Заражение образцов шмелей критидиями может определяться как с помощью микроскопии, так и с помощью молекулярно-биологических методов (Schmid-Hempel et al., 2010). Согласно базе данных GenBank, в большинстве случаев для *C. bombi* описываются гены рибосомной РНК (18S, 5.8S) и внутренний транскрибируемый участок – ITS1. Однако, в базе данных также содержится информация о генах цитохрома b (*Cytb*) и *gGAPDH*, а также о микросателлитных локусах данного паразита.

Детальный анализ генотипов критидий у шмелей проводится с помощью микросателлитных маркеров, которые были разработаны П. Шмид-Хемпел и К. Рибер Фанк в 2004 году (Schmid-Hempel et al., 2004). Данной группой исследователей было установлено, что *C. bombi* является диплоидным организмом (Schmid-Hempel et al., 2004). Дальнейшие исследования показали наличие различных генотипов *C. bombi* в популяциях опылителей (Schmid-Hempel et al.,

2004; Salathe et al., 2011; Schmid-Hempel et al., 2011; Erler et al., 2012; Popp et al., 2012; Schmid-Hempel et al., 2014). Более того, было установлено, что внутри колонии особи шмелей могут быть поражены более чем одним штаммом описываемого паразита (Schmid-Hempel et al., 2004). Экспериментальным путем было установлено, что при множественном заражении происходит обмен генетическим материалом между штаммами *C. bombi* (Schmid-Hempel et al., 2011). В настоящий момент существуют убедительные данные о том, что у данного паразитического организма присутствует как бесполое, так и половое размножение (Salathe et al., 2011; Erler et al., 2012).

В последние годы было описано несколько новых видов трипаносоматид у шмелей, собранных на территории Швейцарии и Мексики, которые получили названия *C. expoeki* Schmid-Hempel & Tognazzo, 2010 и *C. mexicana* (рисунок 7) (Schmid-Hempel et al., 2010; Gallot-Lavallée et al., 2016). Нуклеотидные последовательности генов *gGAPDH* и *Cyt b* *C. expoeki* и *C. mexicana* значительно отличались от аналогичных последовательностей для *C. bombi*, что позволило выделить их в самостоятельные виды.

#### *Способы распространения трипаносоматид в популяциях шмелей*

Аналогично микроспоридиям, трипаносоматиды могут распространяться в популяциях шмелей как вертикальным (от самки-основательницы потомству), так и горизонтальным (передача между особями из одного поколения) путями. Однако, в отличие от микроспоридий, для трипаносоматид вертикальный способ передачи является преобладающим (Erler et al., 2012).

### **Простейшие паразиты отряда Neogregarinorida**

#### ***Общая характеристика отряда Neogregarinorida***

Представители отряда Neogregarinorida (Apicomplexa: Gregarinasina) паразитируют на беспозвоночных животных, преимущественно, на членистоногих. В отличие от представителей других отрядов Gregarinasina, характерной чертой неогрегаринов является то, что у данных организмов произошла редукция одной из жизненных форм – трофозоитов (Rueckert et al., 2010). Паразитические

неогрегарины являются внутриклеточными паразитами, которые могут поражать кишечник, жировое тело, лимфу, гиподерму и мальпигиевы сосуды хозяина (Desportes et al., 2013).

В 1900 году Л. Леже предложил деление всех грегариин на эу- и шизогрегариин. Лишь в 1953 году П. Грассом было проведено деление последней группы на Archigregarinorida и Neogregarinorida (Weiser, 1955). Следует отметить, что впервые неогрегарины вида *Ophryocystis buetschlii* были описаны А. Шнайдером в 1883-1884 годах в мальпигиевых сосудах жуков. Однако, у исследователя возникли сомнения в отношении таксономического положения обнаруженных паразитических организмов, в результате чего они были ошибочно отнесены к другому отряду. В работах Л. Леже в 1900 году было проведено описание паразитов у мокрецов, которые получили название *Schizocystis gregarinoides*. Благодаря схожести морфологических форм видов *S. gregarinoide* и *O. buetschlii*, исследователь показал, что ранее описанный А. Шнайдером вид также следует относить к неогрегариинам.

Отряд Neogregarinorida включает в себя небольшое количество родов и видов. Все известные виды неогрегариин, их жизненные циклы и таксономия были описаны в 19 – 20 веках с помощью микроскопии. Согласно литературным данным и базе данных GenBank Taxonomy было установлено, что отряд Neogregarinorida включает в себя 6 семейств (Desportes et al., 2013). Каждое семейство включает в себя от одного до шести родов, представители которых паразитируют на различных насекомых (таблица 3). Некоторые представители семейства Lipotrophidae встречаются у клещей (класс Arachnida) и двупароногих многоножек (класс Diplopoda) (Desportes et al., 2013).

**Таблица 3.** Семейства, роды отряда Neogregarinorida с указанием отряда хозяина (Desportes et al., 2013).

Отряд	Семейство	Род	Отряд насекомого-хозяина
Neogregarinorida	Caulleryellidae	<i>Caulleryella</i>	Diptera
		<i>Tipulocystis</i>	
Neogregarinorida	Gigaductidae	<i>Gigaductus</i>	Coleoptera
	Lipotrophidae	<i>Coelogregarina</i>	Lepidoptera, Siphonaptera
		<i>Farinocystis</i>	Coleoptera
		<i>Lipocystis</i>	Mecoptera
		<i>Lipotropha</i>	Diptera
		<i>Mattesia</i>	Coleoptera, Hymenoptera, Diptera
		<i>Menzbieria</i>	Coleoptera, Lepidoptera
	Ophryocystidae	<i>Apicystis</i>	Hymenoptera
		<i>Ophryocystis</i>	Coleoptera, Lepidoptera
	Syncystidae	<i>Syncystis</i>	Hemiptera, Odonata
	Schizocystidae	<i>Lymphotropha</i>	Coleoptera
		<i>Machadoella</i>	Hemiptera
		<i>Schizocystis</i>	Diptera

В отличие от микроспоридий и трипаносоматид, для которых в настоящий момент ведутся активные исследования, основанные на современных молекулярно-биологических методах, информация о генах неогрегаринов практически отсутствует. Гены рибосомной РНК установлены для нескольких представителей родов *Apicystis*, *Mattesia*, *Ophryocystis* и *Syncystis* и представлены в базе данных GenBank.

Неогрегарины поражают широкий спектр насекомых, однако, наиболее распространены среди представителей отрядов Coleoptera, Diptera, Hymenoptera и Lepidoptera. В большинстве случаев внимание исследователей привлекают неогрегарины, поражающие насекомых, которые играют важную роль в жизнедеятельности человека. Доглоносоики рода *Euscepes* являются широко распространенными вредителями сладкого картофеля. Насекомые-вредители,

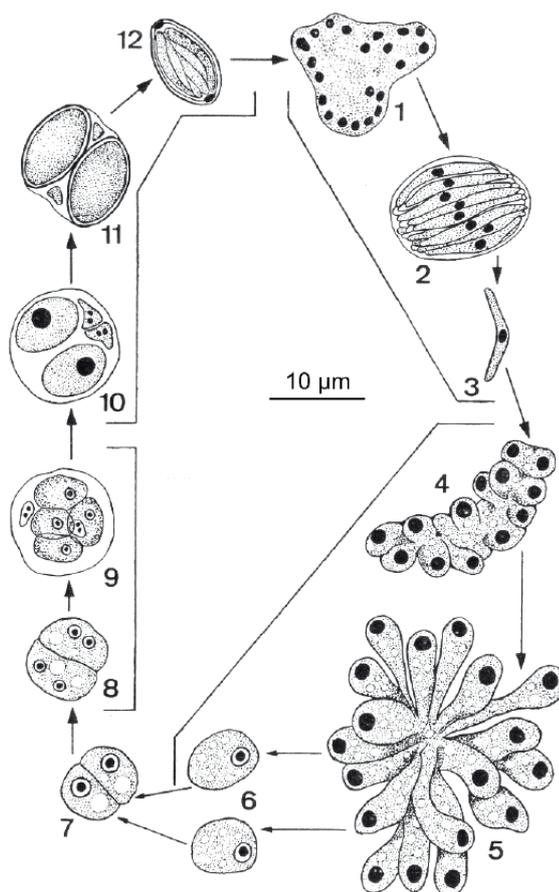
которые инфицированы неогрегаринами *Farinocystis* sp., характеризуются низкой плодовитостью и уменьшенной продолжительностью жизни. Распространенный паразит медоносных пчел и шмелей, *Apicystis bombi*, вызывает серьезные физиологические и поведенческие эффекты у своих хозяев, такие как разрушение жировой ткани, снижение способности к созданию колонии, а также повышение смертности рабочих особей. Однако, не для всех организмов, которые подвержены заражению неогрегаринами, известны негативные эффекты.

### ***Жизненные циклы представителей Neogregarinorida***

Общей чертой жизненных циклов всех представителей отряда *Neogregarinorida* является наличие бесполого размножения путем шизогонии. Данный тип размножения у неогрегаринов является вторичным приобретением. Выделяются два вида шизогоний, которые могут быть представлены в жизненных циклах неогрегаринов: микро- и макроядерные (Desportes et al., 2013).

В своем жизненном цикле неогрегарины проходят три обязательные стадии: бесполое размножение (шизогония), половой процесс (гаметогония) и размножение путем деления в ооцисте (спорогония).

Все представители отряда *Neogregarinorida* имеют схожие жизненные циклы, отличающиеся только количеством поколений мерозоитов (жизненная форма, образованная в результате шизогонии). Так, представители родов *Lymphotropha* и *Lipotropha* характеризуются наличием лишь одного поколения мерозоитов. Жизненный цикл неогрегаринов будет описан на примере *Mattesia oryzaephili* – паразита некоторых насекомых отряда *Coleoptera*, который характеризуется наличием микроядерной и макроядерной шизогоний в жизненном цикле (рисунок 14).



**Рисунок 14.** Жизненный цикл неогрегарины *Mattesia oryzaephili*, паразитирующей на представителях отряда Coleoptera. **1-3:** бесполое размножение (микроядерная шизогония); **3:** мерозоит первого поколения; **4-6:** второе бесполое размножение (макроядерная шизогония); **6:** мерозоит второго поколения; **7:** объединение двух мерозоитов; **8-9:** гаметогенез; **9:** гаметоцит с четырьмя гаметами; **10-12:** спорогония; **10:** формирование двух споробластов; **11:** зрелый гаметоцит с двумя спороцистами; **12:** спора (ооцист), содержащая восемь спорозоитов (Desportes et al., 2013).

### *Шизогония*

В результате заглатывания, споры неогрегариин (ооцисты) попадают в кишечник хозяина. Вышедшие из ооцист спорозоиты мигрируют в жировое тело насекомого, где начинают свой активный рост путем микроядерной шизогонии. В результате данного этапа образуется около 60 мерозоитов первого поколения, которые характеризуются наличием мелких ядер. Образовавшиеся мерозоиты вновь начинают деление путем шизогонии. Второй этап шизогонии называется макроядерной или шизогонией второго поколения. Данный тип бесполого размножения приводит к образованию 20 мерозоитов с более крупными ядрами.

### *Гаметогония*

Происходит попарная ассоциация мерозоитов друг с другом. В результате мейотического деления образуется гаметоциста, содержащая 4 гаметы. Каждая две гаметы сливаются, образуя зиготу.

### *Спорогония*

В дальнейшем зигота покрывается плотной оболочкой, образуя спору или ооцисту. Каждая ооциста претерпевает процесс спорогонии, в результате чего в ней образуются спорозоиты. Ооцисты, как правило, содержат восемь спорозоитов. В дальнейшем, ооцисты с экскрементами хозяина выходят наружу (Desportes et al., 2013).

## ***Неогрегарины в популяциях шмелей***

### *Разнообразие и распространение паразитических неогрегарин, поражающих шмелей*

Неогрегарины у шмелей были впервые обнаружены Х. Дж. Лю, Р. П. Макфарлейн и Д. Х. Пенгелли в 1974 году, получив видовое название *Mattesia bombi* (Liu et al., 1974). Однако, в 1996 году Дж. Липа и О. Триджиани показали, что данные паразитические организмы относятся не к роду *Mattesia*, а к роду *Apicystis* (Lipa et al., 1996). К данному заключению исследователи пришли в результате рассмотрения жизненного цикла и морфологических форм паразита: вид неогрегарин, обнаруженный у шмелей, имел ооцисты удлинённой формы, содержащие по четыре спорозоида, в то время как ооцисты всех представителей рода *Mattesia* имели веретеновидную форму и содержали по восемь спорозоитов. Было также установлено, что *A. bombi* поражает не только шмелей, но и медоносных пчел (Lipa et al., 1996).

В 2010 году И. Мееус с соавторами опубликовали первую работу, в которой предлагалось проводить поиск зараженных *A. bombi* образцов шмелей с помощью молекулярно-биологических методов (ПЦР амплификация) (Meeus et al., 2010b). В качестве маркерной последовательности был предложен фрагмент гена, кодирующего 18S рибосомную РНК. За прошедшее время, с помощью данной методики был проведен скрининг популяций шмелей и медоносных пчел с

территорий некоторых странах Европы и Южной Америки на предмет присутствия *A. bombi* (рисунок 7) (Plischuk et al., 2009b; Maharramov et al., 2013; Gamboa et al., 2015; Plischuk et al., 2017). Дж. Махаррамов с соавторами в 2013 году предложили использовать для полимеразной цепной реакции новые специфические праймеры, которые позволяют амплифицировать фрагмент, включающий в себя ITS-районы кластера генов рибосомной РНК *A. bombi* (Maharramov et al., 2013). В работе данных авторов были описаны несколько специфичных гаплотипов *A. bombi*, встречающихся в популяциях шмелей из Аргентины, Европы и Мексики, а также один "универсальный" гаплотип, который встречался во всех изученных популяциях (Maharramov et al., 2013).

В настоящее время присутствие *A. bombi* зарегистрировано у большого количества видов рода *Bombus* (коммерческие и природные популяции). Известно, что в результате инфекции *A. bombi* происходит разрушение жирового тела шмелей, а также присутствие данных паразитов коррелирует с высокой смертностью зараженных самок-основательниц в весенний период, что приводит к снижению в количестве созданных колоний и повышению смертности рабочих особей.

#### *Способы распространения неогрегаринов в популяциях шмелей*

Алиментарный механизм передачи неогрегаринов *A. bombi* в популяциях шмелей является основным способом распространения этих паразитов (Graystock et al., 2013; Graystock et al., 2015). Вертикальный путь распространения *A. bombi* предполагался ранее, однако не был подтвержден (Lira et al., 1996).

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Сбор материала

Образцы шмелей рода *Bombus* собирались в восьми точках на территории южных районов Сибири (Республика Алтай, Иркутская, Кемеровская и Новосибирская области) и в Северной Индии (штат Джамму и Кашмир). Информация о местах и датах сбора, а также о количестве собранных образцов представлена в таблице 4.

**Таблица 4.** Информация о биологическом материале, использованном в настоящей работе.

Место сбора шмелей	Дата сбора (месяц, год)	Количество видов шмелей	Количество собранных образцов
Горно-Алтайск (Республика Алтай)	Июль, 2007	10	138
Поселок Листвянка (Иркутская область)	Август, 2015	8	103
Село Косая Степь (Иркутская область)	Август, 2015	7	91
Белово и Гурьевск (Кемеровская область)	Август, 2007	12	374
Поселок Усть-Кабырза, Горная Шория (Кемеровская область)	Май, 2007	7	85
Поселок Загадное, Кузнецкий Алатау (Кемеровская область)	Июнь, 2008	6	88
Село Степногутово, озеро Танай (Новосибирская область)	Июль, 2015	13	158
Гульмарг и Шринагар (штат Джамму и Кашмир)	Май, 2007	5	39

Сбор шмелей в южных районах Сибири проводился совместно с сотрудниками Кемеровского государственного университета во главе с д.б.н, проф.

Н. И. Еремеевой. Образцы шмелей из Индии были предоставлены проф. М. Войцеховским (Ягеллонский университет, Краков, Польша).

Все пойманные шмели были определены до уровня видов. Экземпляры шмелей были зафиксированы в этиловом спирте.

### **Выделение тотальной ДНК**

Тотальная ДНК была выделена из мягких тканей брюшка взрослого насекомого (интестины) с помощью набора реактивов DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) (Qiagen, 2006), согласно протоколу фирмы-производителя.

### **Полимеразная цепная реакция (ПЦР)**

Перечень праймеров, использованных для ПЦР амплификации различных фрагментов ДНК микроспоридий рода *Nosema*, трипаносоматид рода *Crithidia* и неогрегарин рода *Apicystis* представлены в таблице приложения 1. Реакции проводили в объеме 20 мкл в амплификаторе PC-Personal-Cycler (Biometra). Каждая реакция содержала: 0.1 нг ДНК, 200 мкМ каждого из трифосфатов (dNTP), 20 мкМ каждого праймера, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 10 мМ Трис-HCl (pH 9.0, 25°C), 1% Тритон X-100 и 2.5 е.а. Taq ДНК-полимеразы. Программа ПЦР амплификации включала в себя предварительную денатурацию (2 мин. при 94°C) с последующими 30 циклами со следующим температурным профилем: 30 сек. при 94°C, 30-60 сек. при 52-60°C, 1 мин. при 72°C.

### **Рестрикционный анализ фрагментов ДНК**

Рестрикционный анализ фрагментов ДНК был выполнен с использованием эндонуклеазы MspI (сайт узнавания: C<sup>^</sup>CGG) (СибЭнзим) с использованием буфера В (10 мМ Tris-HCl (pH 7.6 при 25°C), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT), рекомендованного производителем. Гидролиз проводили при 37°C в течение 3 часов в 40 мкл реакционной смеси, в которую добавляли 6 мкг ДНК и 3 мкл рестриктазы MspI.

### **Разделение фрагментов ДНК в агарозном геле**

Для электрофоретического разделения фрагментов ДНК использовали 1.2% агарозный гель, приготовленный на буфере TAE (40 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 20 мМ NaAc, 1 мМ ЭДТА и 0.01 мкг/мл бромистый этидий). Образцы, содержащие 0,3-0,5 мкг ДНК, наносили с добавлением 1/10 объема буфера, содержащего 50% глицерина, 0,3% бромфенолового синего и 0,3% ксиленцианола. Электрофорез проводили в течение 0,5-2 часов при напряженности электрического поля 3-7 В/см. Визуализацию фрагментов ДНК осуществляли в ультрафиолетовом свете (254 нм).

Для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля использовали набор реактивов QIAquick Gel Extraction Kit, согласно инструкции производителя (Quiagen, 2008).

### **Определение нуклеотидных последовательностей**

Определение нуклеотидной последовательности проводили при помощи автоматического секвенирования. Включение метки проводилось при помощи реакции Сэнгера с использованием реагента BigDye Terminator Ready Reaction Mix v. 3.0 (Applied Biosystems). Реакция проводилась в объеме 10 мкл. Реакционная смесь содержала 50-100 нг ДНК-матрицы, 3,2 мкМ праймера, 4 мкл Terminator Ready Reaction Mix.

Реакцию проводили в следующем температурном режиме: предварительная денатурация (94°C, 3 мин.) и 20 циклов, включающих денатурацию (96°C, 10 сек.), отжиг (50°C, 5 сек.), элонгацию (60°C, 4 мин.).

Продукт реакции осаждали при помощи изопропанола. К 10 мкл реакционной смеси добавляли 30 мкл воды и 60 мкл 100% изопропанола и тщательно перемешивали. Оставляли при комнатной температуре на 30 мин., после чего центрифугировали 10 мин. при 12000 об./мин. Супернатант отбирали и добавляли 100 мкл 70% этилового спирта, снова центрифугировали 5 мин. Удаляли супернатант и сушили осадок при комнатной температуре. Определение

нуклеотидной последовательности проводилось в центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН.

### **Поиск последовательностей в генетической базе данных GenBank**

Для поиска последовательностей генов, кодирующих рибосомную РНК, из геномов микроспоридий, трипаносоматид и неогрегаринов, поражающих представителей отряда Hymenoptera и класса Insecta, использовалась база данных GenBank (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Логический поиск последовательностей микроспоридий в базе данных GenBank проводился по следующим запросам: «microsporidia AND SSU», «microsporidia AND LSU», «microsporidia AND ITS», «microsporidia AND rRNA», «microsporidia AND ribosomal RNA». Для логического поиска последовательностей трипаносоматид в базе данных GenBank проводились запросы: «trichomonadidae AND 18S», «trichomonadidae AND 28S», «trichomonadidae AND ITS», «trichomonadidae AND rRNA», «trichomonadidae AND ribosomal RNA». Для аналогичного поиска в базе данных представителей неогрегаринов вводились запросы «neogregarinorida AND 18S», «neogregarinorida AND 28S», «neogregarinorida AND ITS», «neogregarinorida AND rRNA», «neogregarinorida AND ribosomal RNA».

Для поиска последовательностей микроспоридий, трипаносоматид и неогрегаринов, гомологичных выявленным, применялась программа BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) (Altschul et al., 1990). Полученные последовательности были использованы для последующего сравнительного и филогенетического анализов.

### **Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей**

Выравнивания нуклеотидных последовательностей кластера генов рибосомной РНК были построены с использованием программы ClustalW v. 2.0. Для выравнивания использовались следующие параметры: штраф за открытие разрыва 30, штраф за продолжение разрыва 0.8, весовая матрица IUB. Улучшение

выравниваний проводилось с помощью алгоритма MUSCLE доступного в пакете программ UniPRO UGENE v. 1.12.3 (Okonechnikov et al., 2012).

### **Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей**

Построение филогенетических деревьев проводили на основе множественных выравниваний последовательностей кластера генов рибосомной РНК и гена *gGAPDH*. Для построения филогенетических деревьев были использованы метод соединения ближайших соседей (NJ – Neighbor Joining) и метод максимального правдоподобия (ML - Maximum Likelihood). NJ филогенетические деревья были построены при помощи программы MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016); ML филогенетические деревья были построены при помощи программы IQ-tree (Trifinopoulos et al., 2016). Программа SMS была использована для выбора наиболее подходящей модели нуклеотидных замен (Lefort et al., 2017). Для оценки достоверности топологии NJ филогенетических деревьев использовался бутстреп-тест (1000 репликаций), а для ML филогенетических деревьев - сверхбыстрый бутстреп тест.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

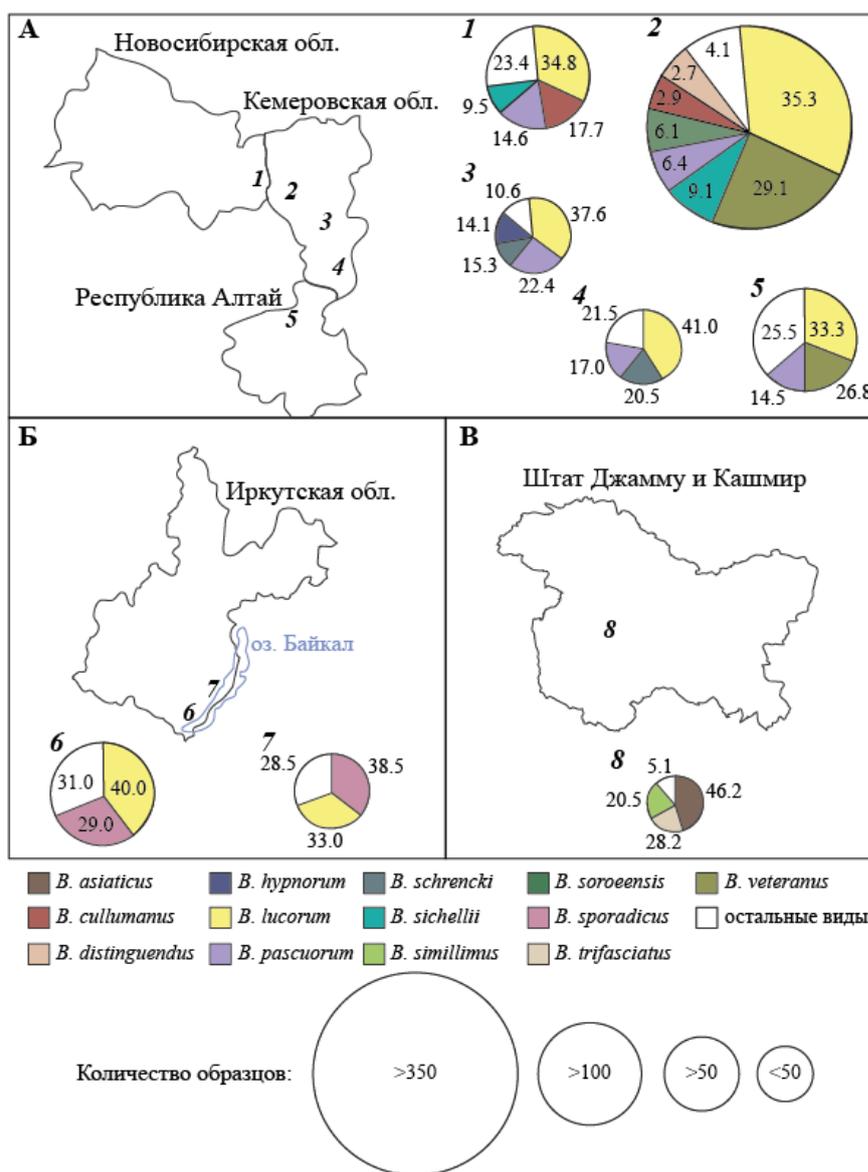
### Характеристика природного материала

Для анализа было использовано 1037 образцов шмелей, собранных на территории южных районов Сибири, и 39 образцов шмелей, собранных на территории Северной Индии. На территории южных районов Сибири были обнаружены представители 19 видов шмелей рода *Bombus*, а на территории Северной Индии – 5 видов (таблица 4). Только один вид, *B. lucorum*, был представлен во всех исследуемых природных популяциях. Всего было исследовано 23 вида шмелей, относящихся к 10 под родам.

На территории южных районов Сибири под роды *Bombus* и *Thoracobombus* были представлены 5 видами, а *Megabombus* - 3 видами. У остальных шести под родов (*Bombias*, *Kallobombus*, *Melanobombus*, *Psithyrus*, *Pyrobombus* и *Subterraneobombus*) было зарегистрировано по одному виду. На территории Северной Индии под род *Melanobombus* был представлен двумя видами, а под роды *Bombus*, *Megabombus* и *Sibiricobombus* одним видом каждый.

В каждой из проанализированных точек сбора на территории Сибири было обнаружено от 6 до 13 видов шмелей. В Северной Индии вблизи городов Гульмарг и Шринагар было выявлено 5 видов шмелей (таблица 4).

На рисунке 15 указаны виды шмелей, которые наиболее широко представлены в выборках для каждой точки сбора. На диаграммах показаны виды, представленные в выборке более чем десятью образцами.



**Рисунок 15.** Места сбора и диаграммы распределения наиболее широко представленных в выборке шмелей рода *Bombus* для каждой исследуемой природной популяции. Обозначение мест сбора: 1- село Степногутово; 2- Белово и Гурьевск; 3- поселок Загадное; 4- поселок Усть-Кабырзы; 5- Горно-Алтайск; 6- поселок Листвянка; 7- село Косая Степь; 8- Гульмарг и Шринагар.

Вид *B. lucorum* являлся наиболее распространенным на территории Западной Сибири (собрано 373 образца) (рисунок 15А). Вид *B. pascuorum* был зарегистрирован и широко распространен во всех точках сбора на территории Западной Сибири. Всего было собрано 114 образцов данного вида. Вид *B. veteranus* был также широко представлен в двух точках на территории Западной Сибири (районы Белово и Гурьевска и Горно-Алтайска). 152 образца вида *B. veteranus* было

собрано для исследования. Количество особей видов *B. cullumanus*, *B. schrencki* и *B. sichelii* в полученной коллекции варьировало от 39 до 59. Для каждого из оставшихся 11 видов шмелей, распространенных на территории Западной Сибири, было собрано меньше 30 образцов (рисунок 15А). Полученные данные согласуются с исследованиями фауны шмелей, которые были проведены ранее на территории Западной Сибири. Однако, особи видов *B. maculidorsis*, *B. muscorum*, *B. subterraneus* и *B. terrestris*, которые, согласно литературным данным, часто встречаются в Западной Сибири, не были представлены в собранной коллекции (Бывальцев, 2008; Бывальцев, 2009).

На территории Восточной Сибири (Иркутская область) наряду с *B. lucorum* был также широко представлен вид *B. sporadicus* (рисунок 15Б). Остальные виды (*B. consobrinus*, *B. hypnorum*, *B. pascuorum*, *B. patagiatus*, *B. schrencki* и *B. sichelii*) были представлены 6-13 образцами каждый.

В коллекции шмелей, собранных на территории Северной Индии, были широко представлены виды *B. asiaticus* (46.2%), *B. trifasciatus* (28.2%) и *B. simmilimus* (20.5%), а *B. lucorum* и *B. rufofasciatus* представлены одним образцом каждый (рисунок 15В). Собранные виды шмелей являются наиболее распространенными на территории штата Джамму и Кашмир (Saini et al., 2012). Однако эти виды не полностью отображают разнообразие шмелей, обитающих на территории Северной Индии (Saini et al., 2012).

Таким образом, в анализируемом биологическом материале виды *B. cullumanus*, *B. lucorum*, *B. pascuorum*, *B. schrencki*, *B. sichelii*, *B. sporadicus* и *B. veteranus* представлены наибольшим количеством образцов.

### **Разнообразие микроспоридий, поражающих насекомых отряда Hymenoptera и класса Insecta**

Для выявления паразитических микроспоридий, заражающих насекомых класса Insecta и в первую очередь отряда Hymenoptera, была проанализирована база данных GenBank. Для анализа были выбраны гены, кодирующие рибосомную РНК малой субъединицы (small subunit ribosomal RNA - SSU rRNA), поскольку данные

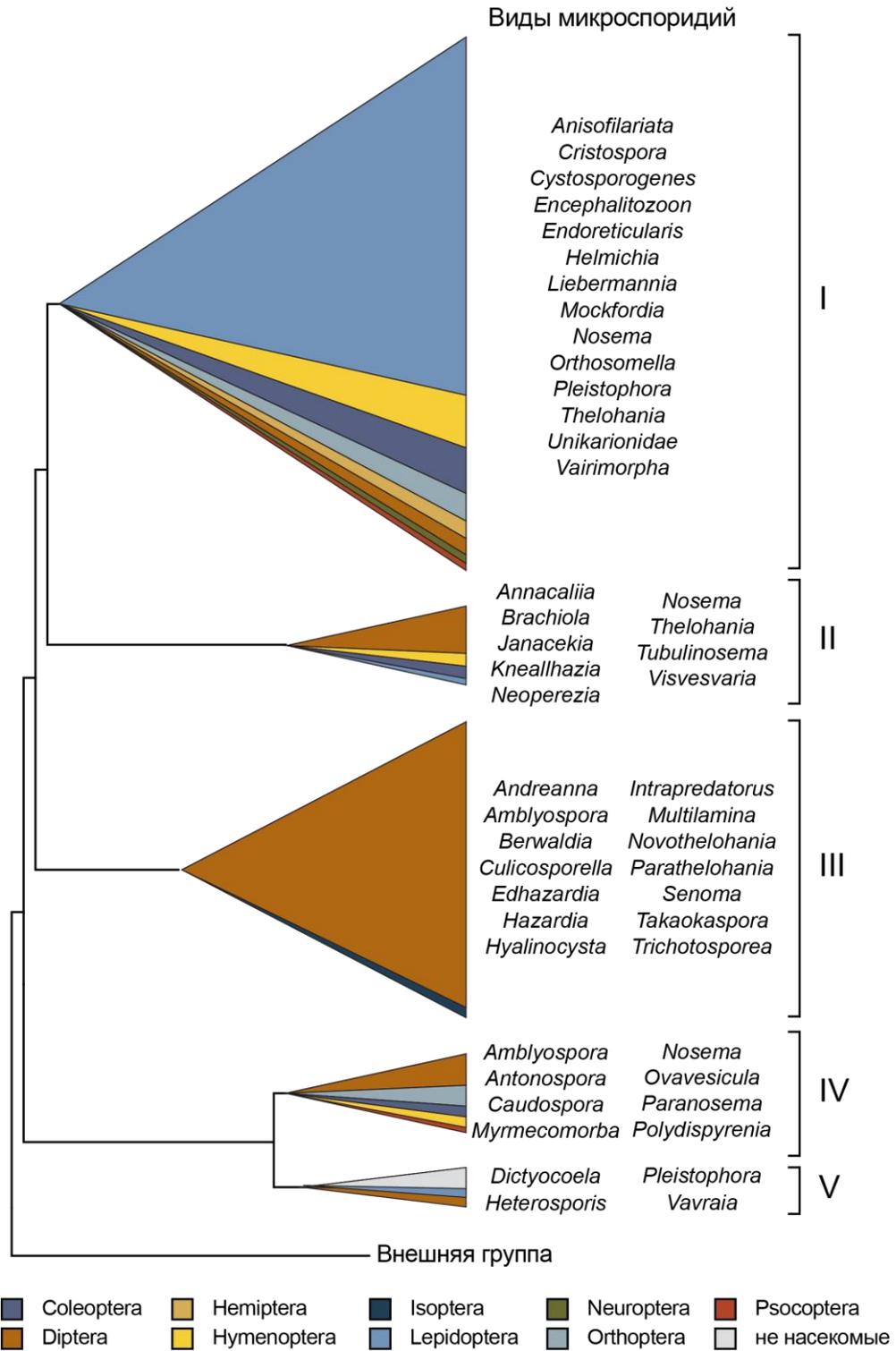
последовательности активно используются для построения филогении микроспоридий и наиболее широко представлены в базе данных GenBank.

В результате логического поиска в базе данных была найдена 4091 последовательность гена SSU rRNA микроспоридий. Их анализ позволил выявить 240 последовательностей микроспоридий, поражающих насекомых из 9 отрядов: Diptera, Isoptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Neuroptera, Hemiptera, Orthoptera, Psocoptera. Достаточно представительной оказалась выборка последовательностей только для трех отрядов насекомых: Diptera, Lepidoptera и Hymenoptera. Для отрядов Isoptera, Coleoptera, Neuroptera, Hemiptera, Orthoptera и Psocoptera микроспоридии были изучены на ограниченном количестве видов. Информация о микроспоридиях из других отрядов насекомых в базе данных отсутствует.

С использованием 240 последовательностей генов SSU rRNA в программах ClustalW и UniPRO UGENE v.1.12.3 было построено множественное выравнивание. Детальный анализ позволил отобрать последовательности, длина которых составляет не менее 1000 п.о., и удалить из исследования идентичные последовательности.

Для дальнейшего филогенетического анализа были использованы 194 последовательности микроспоридий, поражающих насекомых, из которых 14 последовательностей были описаны для микроспоридий, паразитирующих на представителях отряда Hymenoptera (перечень последовательностей приведен в приложении 2).

Филогенетическое древо было реконструировано на основе последовательностей генов SSU rRNA методом объединения ближайших соседей (NJ) в программе MEGA 7.0 (рисунок 16). Для оценки достоверности был использован бутстреп-тест (1000 репликаций). В качестве внешней группы была использована последовательность гена SSU rRNA из генома микроспоридии *Hamiltosporidium tvaerminnensis*, паразитирующей на *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera). Детальное филогенетическое древо представлено в приложении 3.



**Рисунок 16.** Схематичное филогенетическое древо, реконструированное на основе последовательностей генов рибосомной РНК малой субъединицы рибосом микроспоридий, поражающих насекомых, методом объединения ближайших соседей (NJ) в программе MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Для каждого отряда хозяев используется определенный цвет, размер треугольников соответствует количеству последовательностей.

На филогенетическом древе все последовательности образуют пять кластеров. В самый крупный **кластер I** входят последовательности 14 видов микроспоридий, паразитирующих на представителях 8 отрядов насекомых: Diptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Neuroptera, Hemiptera, Orthoptera, Psocoptera. Среди видов кластера I есть представители классов Terresporidia и Aquasporidia. При этом виды, принадлежащие к разным классам, не группируются внутри кластера согласно их принадлежности к одному или другому классу.

Внутри кластера выделяются три основные группы видов, которые образуют отдельные ветви с коэффициентом поддержки 96% и выше. В первую группу входят представители семейств Nosematidae, Burenellidae, которые фактически представлены двумя родами – *Nosema* и *Vairimorpha*. Внутри этой группы присутствуют две ветви, первую из которых образуют исключительно представители рода *Nosema*, а вторую образуют представители обоих родов. Микроспоридии родов *Nosema* и *Vairimorpha* распространены только в трех отрядах насекомых: Lepidoptera, Coleoptera и Hymenoptera. Исключение составляет *Nosema empoascae*, которая была обнаружена в одном из видов отряда Hemiptera.

Вторая группа кластера I образована представителями *Encephalitozoon sp.* (семейство Unikaryonidae) и *Mockfordia xanthocaeciliae*. Принадлежность последнего к известным семействам микроспоридий не установлена. Микроспоридий *M. xanthocaeciliae* поражает представителей отряда Psocoptera, а *Encephalitozoon sp.* выявлен в отряде Orthoptera. Отряды Orthoptera и Psocoptera эволюционно далеки от 4-х отрядов насекомых, микроспоридии которых образуют первую ветвь кластера I. Поэтому, было бы вполне резонно предположить, что обе ветви принадлежат одному семейству микроспоридий, поскольку в 1-й ветви расположены микроспоридии из насекомых с полным циклом превращения, а во 2-й – с неполным. Однако, один из двух видов микроспоридий 2-й ветви (*Mockfordia xanthocaeciliae*) описан как представитель класса Aquasporidia, в то время как все остальные виды микроспоридий, расположенные в двух первых ветвях, принадлежат классу Terresporidia (Vossbrinck et al., 2005).

Последняя группа кластера I более разнообразна по видовому составу насекомых хозяев и содержит несколько основных ветвей. Самая многочисленная из них сформирована микроспоридиями родов *Endoreticulatus*, *Crispospora* и

*Cystosporogenes*, паразитирующих на представителях отрядов Diptera, Lepidoptera, Coleoptera и Orthoptera. Вторая ветвь содержит последовательности микроспоридий *Orthosomella*, *Unikaryonidae* и *Liebermannia*, обнаруженных в отрядах Lepidoptera, Coleoptera и Orthoptera. Причем последние два рода, согласно существующей классификации, относятся к двум разным классам микроспоридий (Vossbrinck et al., 2005). Следует отметить также, что все виды микроспоридий, расположенные в данной ветви, относятся к классу Terresporidia. Последние два вида, расположенные в третьей группе, *Anisofilariata chironomi* и *Helmichia lacustris*, поражают насекомых отряда Diptera. Данные виды, как и все микроспоридии обнаруженные у двукрылых, относятся к классу Aquasporidia.

Все виды микроспоридий, образовавшие **кластер II**, относятся к классу Aquasporidia. Подавляющее большинство видов кластера II принадлежит семейству Tubulinosematidae. Микроспоридии этого семейства описаны для трех отрядов насекомых: Diptera, Hymenoptera и Coleoptera. Еще три вида кластера II описаны как представители семейства Tuzetiidae и рода *Neoperezia* класса Aquasporidia и образуют отдельную ветвь в кластере, сестринскую по отношению к ветви семейства Tubulinosematidae. Микроспоридии семейства Tuzetiidae и рода *Neoperezia* в настоящее время обнаружены только у видов отряда Diptera.

**Кластер III** содержит микроспоридии, паразитирующие на представителях отряда Diptera, за исключением одной последовательности вида *Multilamina teevani*, обнаруженного у хозяев из отряда Isoptera. Данный кластер состоит из двух групп, из которых первая является немногочисленной и образована последовательностями SSU rRNA двух видов: *Hyalinocysta chapmani* и *Culicosporella lunata*. Согласно современной классификации данные виды относятся к разным семействам и подотрядам микроспоридий.

Вторая группа объединяет виды, относящиеся к 14 родам микроспоридий. Основная масса последовательностей относится к роду *Amblyospora*, хорошо изученному для кровососущих насекомых отряда Diptera. Два вида микроспоридий рода *Trichotosporea* по своим последовательностям SSU rRNA идентичны микроспоридиям, принадлежащим роду *Amblyospora*. Более того, и те, и другие были выделены из различных видов хозяев, принадлежащих одному и тому же роду – *Ochlerotatus*. Еще два вида микроспоридий, *Intrapredatorus barri* и

*Edhazardia aedis*, также располагаются внутри филогенетической ветви, которую образуют виды рода *Amblyospora*. По всей видимости, данное разногласие связано с несовершенством таксономической системы микроспоридий. Основываясь на результатах проведенного филогенетического анализа, можно сделать предположение о том, что три вышеупомянутых вида (*Trichotosporea pygopellita*, *Intrapredatorus barri* и *Edhazardia aedis*) должны быть отнесены к роду *Amblyospora*. Кроме представителей рода *Amblyospora*, в первую группу кластера III входят еще шесть родов микроспоридий, три из которых (*Andreanna*, *Novothelohania* и *Parathelohania*) относятся к семейству Amblyosporidae, как и виды рода *Amblyospora*. Два других рода, *Hazardia* и *Hyalinocysta* относятся к семействам Gurleyidae и Thelohaniidae, соответственно. И последний вид, *Senoma globulifera*, не был причислен ни к одному из известных семейств микроспоридий.

**Кластер IV** содержит в своем составе микроспоридии, обнаруженные в отрядах Diptera, Orthoptera, Psocoptera, Hymenoptera и Coleoptera. Принципиальным расхождением полученных филогенетических результатов и существующей классификации микроспоридий является тот факт, что часть видов (род *Antonospora*) относится к классу Aquasporidia, в то время как другая часть видов (рода *Paranosema* и *Nosema*) являются представителями класса Terresporidia. Еще один микроспоридий, *Ovavesicula popilliae*, обнаруженный в одном из видов отряда Coleoptera, образует отдельную ветвь, родственную видам рода *Antonospora*, что согласуется с ранее полученными данными (Vossbrinck et al., 2007).

**Кластер V** самый немногочисленный и включает в себя два вида микроспоридий рода *Vavraia* класса Marinosporidia, описанных для насекомых, *Aedes albopictus* и *Wiseana sp*, представляющих отряды Diptera и Lepidoptera, соответственно.

Таким образом, за небольшим исключением, первый кластер образован представителями Terresporidia, а кластеры II, III и IV образованы представителями класса Aquasporidia. Самый немногочисленный кластер V относится к Marinosporidia.

Микроспоридии, выявленные у представителей отряда Hymenoptera, относятся к 5 родам (*Myrmecomorba*, *Thelohania*, *Nosema*, *Kneallhazia*, *Antonospora*) и двум классам Terresporidia и Aquasporidia. В соответствии с данными,

представленными в GenBank на представителях шмелей рода *Bombus* паразитируют микроспоридии одного рода, *Nosema*. Этот род на филогенетическом древе вошел в состав кластера I. Таким образом, в дальнейшем исследовании поиск зараженных микроспоридиями образцов шмелей проводился внутри рода *Nosema*.

### **Уровень зараженности природных популяций шмелей микроспоридиями рода *Nosema***

#### ***Общий уровень зараженности природных популяций шмелей микроспоридиями рода *Nosema****

Для исследования уровня зараженности природных популяций шмелей паразитическими микроспоридиями рода *Nosema* был проведен анализ шмелей в южных районах Сибири и в Северной Индии (таблица 4, рисунок 15). Выделение тотальной ДНК проводили из мягких тканей брюшка взрослого насекомого (интестина), являющихся основной зоной поражения микроспоридиями. Всего было получено 1076 образцов тотальной ДНК из 23 видов шмелей (таблица 5).

Присутствие заражения устанавливали с помощью ПЦР амплификации индивидуальной тотальной ДНК шмелей с праймерами, специфичными к гену малой субъединицы рибосомной РНК *N. bombi*. Положительным результатом считалось наличие ПЦР фрагмента размером 200 п.н., который определялся в результате электрофореза в агарозном геле. Положительные результаты ПЦР амплификации были получены для 80-ти образцов ДНК (таблица 5). Впоследствии для каждого из 80-ти полученных фрагментов ДНК были установлены нуклеотидные последовательности.



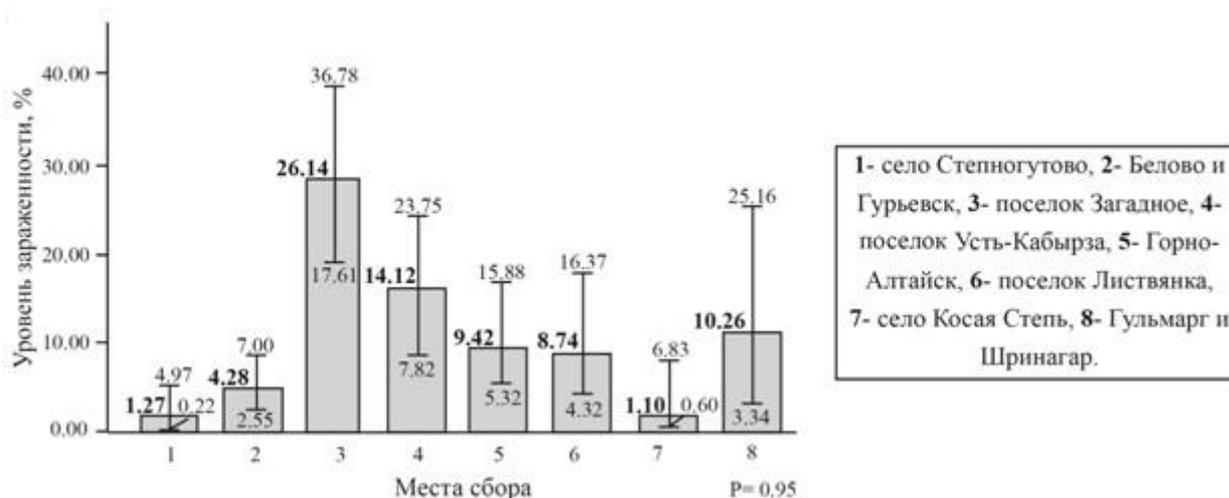
**Таблица 5 (продолжение).** Список исследованных видов шмелей, места их сборов и результаты ПЦР амплификации суммарной ДНК с праймерами, специфичными к генам, кодирующим рибосомную РНК *Nosema bombi* (N), *Crithidia* spp. (C) и *Apicystis bombi* (A).

Вид	Места сбора, количество проанализированных образцов, количество зараженных образцов																															
	Село Степногутово				Белово и Гурьевск				Поселок Загадное				Поселок Усть-Кабырза				Горно-Алтайск				Поселок Листвянка				Село Косая Степь				Гульмарг и Шринагар			
	∑	N	C	A	∑	N	C	A	∑	N	C	A	∑	N	C	A	∑	N	C	A	∑	N	C	A	∑	N	C	A	∑	N	C	A
<i>B. lucorum</i> Linnaeus, 1761	55	0	20	3	132	13	4	0	36	19	12	0	32	8	9	0	46	10	9	1	41	0	20	1	30	1	6	6	1	0	0	0
<i>B. pascuorum</i> Scopoli, 1763	23	0	10	2	24	0	0	0	15	0	0	0	19	0	0	2	20	0	4	2	5	0	0	0	8	0	1	0	0	-	-	-
<i>B. patagiatus</i> Nylander, 1848	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	6	0	6	0	0	-	-	-	0	-	-	-
<i>B. rufofasciatus</i> Smith, 1852	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	1	0	0	0
<i>B. rupestris</i> Fabricius, 1793	1	0	0	0	16	3	0	0	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-
<i>B. schrencki</i> Morawitz, 1881	3	0	0	0	0	-	-	-	18	0	1	0	13	0	6	0	3	0	0	0	5	1	3	0	8	0	0	1	0	-	-	-
<i>B. semenoviellus</i> Skorikov, 1910	4	0	0	0	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-
<i>B. sichelii</i> Radoszkowski, 1860	15	0	1	0	34	0	1	1	0	-	-	-	2	1	0	0	8	0	0	2	6	0	2	0	7	0	0	1	0	-	-	-

**Таблица 5 (продолжение).** Список исследованных видов шмелей, места их сборов и результаты ПЦР амплификации суммарной ДНК с праймерами, специфичными к генам, кодирующим рибосомную РНК *Nosema bombi* (N), *Crithidia* spp. (C) и *Apicystis bombi* (A).

Вид	Места сбора, количество проанализированных образцов, количество зараженных образцов																																			
	Село Степногутово				Белово и Гурьевск				Поселок Загадное				Поселок Усть-Кабырза				Горно-Алтайск				Поселок Листвянка				Село Косая Степь				Гульмарг и Шринагар							
	∑	N	C	A	∑	N	C	A	∑	N	C	A	∑	N	C	A	∑	N	C	A	∑	N	C	A	∑	N	C	A	∑	N	C	A				
<i>B. simillimus</i> Smith, 1852	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	8	0	2	0
<i>B. soroensis</i> Fabricius, 1777	7	0	0	1	23	0	0	0	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-
<i>B. sporadicus</i> Nylander, 1848	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	5	3	1	0	2	0	1	0	30	6	30	0	35	0	20	0	0	-	-	-	0	-	-	-
<i>B. tichenkoi</i> Skorikov, 1923	0	-	-	-	0	-	-	-	8	0	0	0	2	0	0	0	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-
<i>B. trifasciatus</i> Smith, 1852	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	11	4	2	0
<i>B. veteranus</i> Fabricius, 1793	6	0	1	0	109	0	2	0	0	-	-	-	0	-	-	-	37	0	0	3	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-
<b>Общее количество образцов</b>	<b>158</b>	<b>2</b>	<b>39</b>	<b>10</b>	<b>374</b>	<b>16</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>88</b>	<b>23</b>	<b>15</b>	<b>0</b>	<b>85</b>	<b>12</b>	<b>23</b>	<b>2</b>	<b>138</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>103</b>	<b>9</b>	<b>68</b>	<b>1</b>	<b>91</b>	<b>1</b>	<b>30</b>	<b>8</b>	<b>39</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>0</b>				

Уровни зараженности шмелей микроспоридиями для каждой точки сбора были определены как отношение зараженных шмелей к общему количеству проанализированных шмелей. Видовой состав шмелей в популяциях на данном этапе исследования не учитывался. С помощью программы STATISTICA были определены границы доверительных интервалов для уровней зараженности методом Клоппера-Пирсона (Clopper et al., 1934). Полученные результаты представлены на рисунке 17.



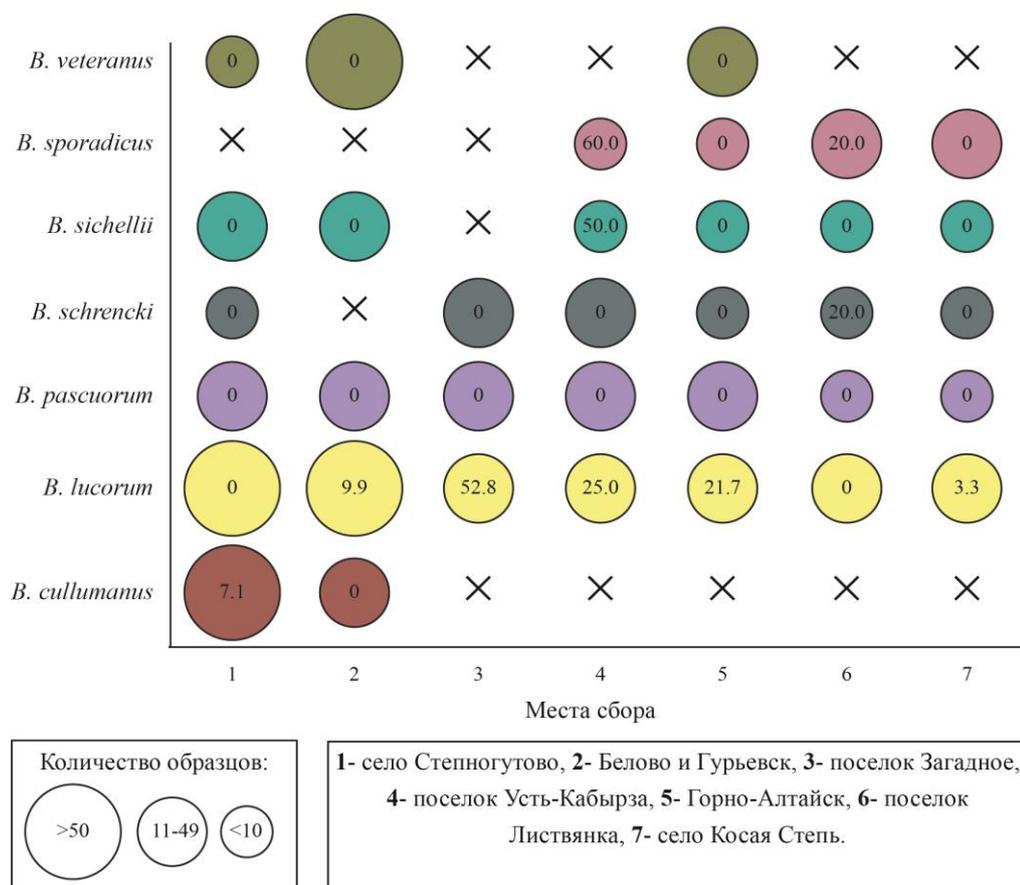
**Рисунок 17.** Общий уровень зараженности природных популяций шмелей микроспоридиями *N. bombi* с указанием доверительных интервалов, полученных с помощью метода Клоппера-Пирсона (Clopper et al., 1934).

В популяциях шмелей на территории Кузнецкого Алатау уровень зараженности микроспоридией *N. bombi* составил 26.1%. В районах сел Степногутово (Новосибирская область) и Косая Степь (Иркутская область) 1.3% и 1.1% шмелей, соответственно, были поражены данными паразитическими организмами. В остальных точках сбора уровни зараженности опылителей микроспоридией *N. bombi* варьировали от 4.3% до 14.1% (рисунок 17).

Таким образом, общий уровень зараженности популяций шмелей значительно варьирует в разных точках сбора. Это может быть связано с тем, что разные виды шмелей имеют разный уровень зараженности микроспоридиями.

**Уровни зараженности наиболее распространенных видов шмелей  
микроспоридиями *Nosema***

Уровни зараженности шмелей вида *V. lucorum* паразитическими организмами *N. bombi* в разных точках сбора варьировали от 0% до 52.8% (рисунок 18). Самый высокий уровень зараженности *V. lucorum* микроспоридиями был установлен вблизи поселка Загадное, а в Белово и Гурьевке, поселке Усть-Кабырза и Горно-Алтайске *N. bombi* была обнаружена в 9.9-25.0% всех проанализированных шмелей этого вида (рисунок 18). Среди всех образцов *V. lucorum*, собранных на территории Иркутской области, лишь один образец был заражен *N. bombi* (таблица 5). В районе села Степногутово и поселка Листвянка среди 96 образцов *V. lucorum* не было обнаружено ни одного зараженного микроспоридиями (таблица 5). *V. lucorum* является одним из наиболее распространенных видов шмелей, для которого частое поражение микроспоридиями было установлено ранее (Shykoff et al., 1991; Jilian et al., 2005; Korner et al., 2005; Klee et al., 2006; Larsson, 2007).



**Рисунок 18.** Уровни зараженности наиболее распространенных видов шмелей микроспоридиями рода *Nosema* на территории южных районов Сибири. Цветовые обозначения видов шмелей соответствуют представленным на рисунке 15. Символом «X» обозначены точки сбора, в которых данный вид шмелей не был собран в коллекцию.

Вид *B. sporadicus* был широко представлен в выборках шмелей, собранных в Иркутской области. В поселке Листвянка 20.0% шмелей вида *B. sporadicus* оказались подвержены заражению микроспоридиями, в то время как в районе села Косая Степь образцы этого вида шмелей не были поражены ими (рисунок 18). Зараженные микроспоридиями образцы *B. sporadicus* были обнаружены в районе поселка Усть-Кабырза (3 зараженных из 5 проанализированных образцов). Информация о зараженности вида *B. sporadicus* микроспоридиями отсутствует в литературных источниках.

Среди 28 образцов вида *B. cullumanus*, собранных на территории Новосибирской области, 2 образца оказались поражены микроспоридиями (уровень зараженности составил 7.1%). Было проанализировано 50 и 72 образца видов

*B. schrencki* и *B. sichelii*, соответственно, среди которых лишь по одному образцу из каждого вида был инфицирован микроспоридией *N. bombi* (рисунок 18). Среди вышеперечисленных видов лишь образцы *B. sichelii* ранее были изучены в качестве хозяев для *N. bombi*, особи этого вида были сильно подвержены заражению микроспоридиями (Korner et al., 2005).

Ни одного зараженного микроспоридиями образца среди двух видов шмелей (*B. pascuorum* и *B. veteranus*) не было обнаружено. Однако, заражение микроспоридиями особей вида *B. pascuorum* было ранее подтверждено с помощью молекулярно-биологических и микроскопических методов анализа в нескольких исследованиях (Fantham et al., 1914; Shykoff et al., 1991; Larsson, 2007; Cordes et al., 2012; Goulson et al., 2012). В литературе отсутствуют данные о том, подвержен ли вид *B. veteranus* заражению *N. bombi*.

Таким образом, мы можем сделать вывод о том, что разные виды шмелей имеют разный уровень зараженности микроспоридией *N. bombi*, вплоть до полного отсутствия зараженных особей, как в случае *B. pascuorum* и *B. veteranus*. Частое заражение микроспоридиями было установлено среди образцов видов *B. lucorum* и *B. sporadicus*. Различная степень восприимчивости шмелей к заражению микроспоридиями была описана ранее (Li et al., 2008; Otti et al., 2008; Steen Van der, 2008).

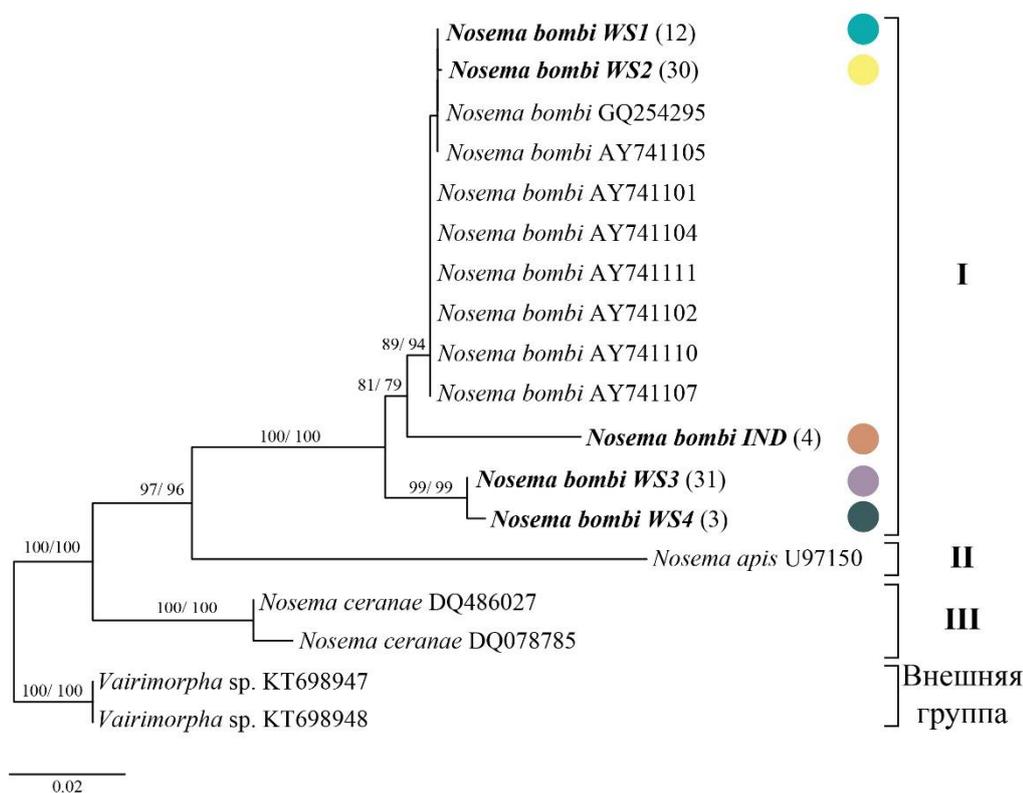
### **Генетическое разнообразие микроспоридий в природных популяциях шмелей**

Для анализа генетического разнообразия микроспоридий *N. bombi* в природных популяциях шмелей из южных районов Сибири и Северной Индии была проведена ПЦР амплификация тотальной ДНК зараженных образцов с парами праймеров, специфичными к фрагменту кластера генов рибосомной РНК (SSU rRNA, ITS2 и LSU rRNA). Используемые пары праймеров позволяют амплифицировать фрагменты с перекрытием, таким образом, в программе UniPRO UGENE v.1.12.3 для каждого зараженного образца были собраны последовательности SSU rRNA +ITS2+ LSU rRNA. Длина полученного фрагмента SSU rRNA +ITS2+ LSU rRNA составила 1700 п.о. Выбор данного фрагмента связан

с тем, что новые генетические варианты *N. bombi* были выявлены именно при анализе данных последовательностей (Tay et al., 2005).

Был проведен сравнительный анализ последовательностей кластера генов рРНК *N. bombi*, которые были установлены экспериментальным путем и представлены в базе данных GenBank. В результате данного анализа было установлено, что в природных популяциях шмелей из южных районов Сибири представлены четыре группы последовательностей *N. bombi*. Три из четырех групп последовательностей, полученных в настоящей работе, отличаются от последовательностей из базы данных. Последовательности кластера генов рРНК микроспоридий *N. bombi* у шмелей из Северной Индии были идентичны и образовывали отдельную группу.

Для проведения филогенетического анализа была использована 91 последовательность SSU rRNA +ITS2+ LSU rRNA представителей рода *Nosema*, паразитирующих на медоносных пчелах и шмелях. Филогенетическое древо было реконструировано на основе последовательностей кластера рибосомных генов методом максимального правдоподобия (ML) в программе IQ-tree (рисунок 19). Для оценки достоверности был использован сверхбыстрый бутстреп тест (ultrafast bootstrap, UfBoot). В качестве внешней группы были использованы последовательности SSU rRNA +ITS2+ LSU rRNA микроспоридий *Vairimorpha* sp., паразитирующих на полихетах вида *Manayunkia speciosa*.



**Рисунок 19.** Филогенетическое древо, реконструированное на основе последовательностей кластера генов рНК микроспоридий рода *Nosema*, поражающих насекомых, методом максимального правдоподобия (ML) в программе IQ-tree (Trifinopoulos et al., 2016). Для оценки достоверности был использован сверхбыстрый бутстреп тест (ultrafast bootstrap, UfBoot). Жирным шрифтом выделены последовательности микроспоридий, полученные в настоящей работе. В скобках указано количество нуклеотидных последовательностей, относящихся к одному генетическому варианту и использованных для построения филогенетического древа. Цветовые обозначения генетических вариантов *N. bombi* соответствуют представленным на рисунке 20.

На филогенетическом древе присутствует 3 кластера. **Кластер I** содержит три отдельные ветви. В состав первой ветви были включены последовательности SSU rRNA +ITS2+ LSU rRNA микроспоридий *N. bombi*, которые были описаны ранее в популяциях шмелей, распространенных на территории США и Европейских стран (Tay et al., 2005; Sokolova et al., 2010). В данную ветвь также вошли последовательности кластера генов рНК двух вариантов микроспоридий, которые были описаны в настоящей работе в природных популяциях шмелей

южных районов Сибири. Полученные последовательности генетического варианта *N. bombi* WS2 были идентичны последовательности *N. bombi* (GQ254295), которая была описана ранее у зараженных образцов шмелей, собранных на территории США (Sokolova et al., 2010). Последовательность кластера рибосомных генов следующего генетического варианта, *N. bombi* WS1, отличалась от последовательности *N. bombi* WS2 наличием вставки (TTGT) в районе ITS2. В отдельную ветвь в кластере I была выделена последовательность SSU rRNA +ITS2+ LSU rRNA *N. bombi* (*N. bombi* IND), обнаруженная в зараженных образцах шмелей Северной Индии. В состав третьей ветви вошли последовательности микроспоридий (*N. bombi* WS3 и *N. bombi* WS4), описанные в настоящей работе у зараженных образцов шмелей, собранных на территории Западной Сибири. Попарные расстояния между последовательностями SSU rRNA +ITS2+ LSU rRNA генетических вариантов *N. bombi*, распространенных в южных районах Сибири и в Северной Индии, варьировали 0.002 до 0.037 (метод p-distance).

Всего было получено 12 последовательностей генетического варианта *N. bombi* WS1, 30 последовательностей - *N. bombi* WS2, 31 последовательность - *N. bombi* WS3, 3 - *N. bombi* WS4 и 4 последовательности *N. bombi* IND.

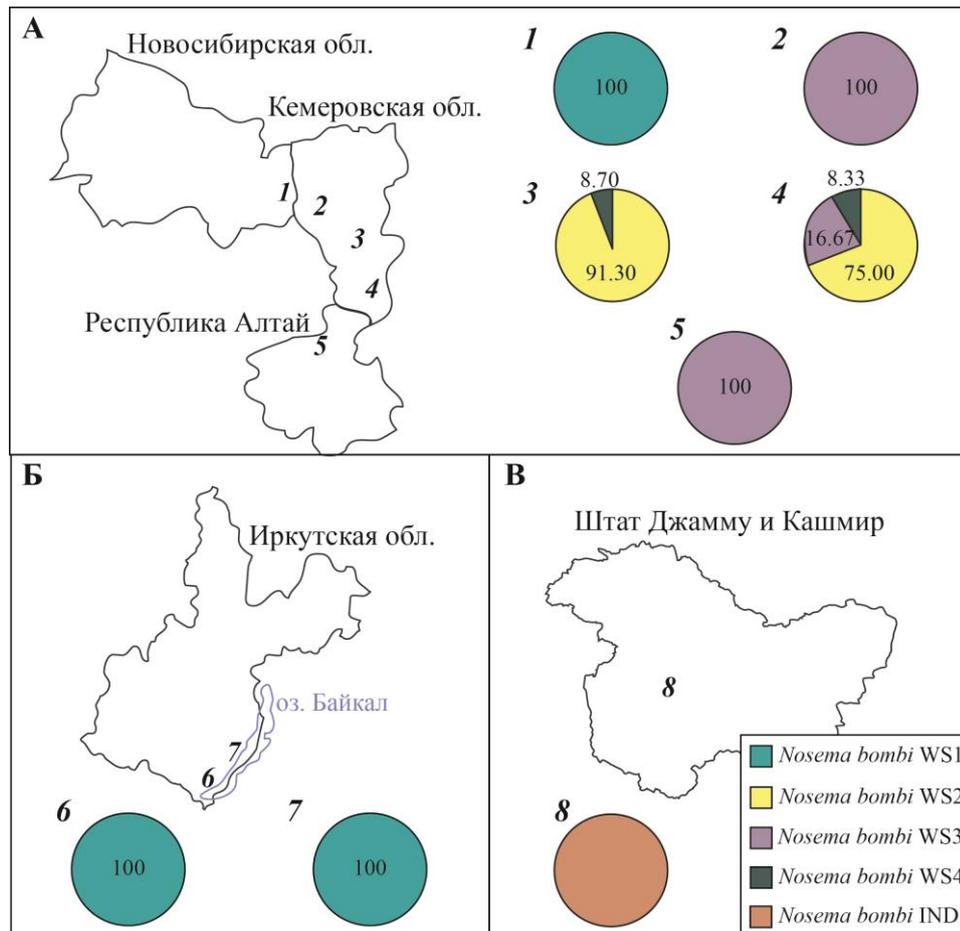
**Кластеры II и III** сформированы последовательностями SSU rRNA +ITS2+ LSU rRNA двух видов рода *Nosema*, которые являются паразитами медоносных пчел.

Таким образом, на территории южных районов Сибири и в Северной Индии природные популяции шмелей подвержены заражению 5-ю различными генетическими вариантами микроспоридий (WS1-WS4, IND), относящихся к виду *N. bombi*.

### **Распространение генетических вариантов микроспоридий *Nosema bombi* в природных популяциях шмелей**

На рисунке 20 представлено распределение генетических вариантов *N. bombi* в природных популяциях шмелей на территории южных районов Сибири и в Северной Индии.

В районе села Степногутово в популяциях шмелей вида *B. cullumanus* был распространен генетический вариант *N. bombi* WS1. Все зараженные микроспоридиями образцы шмелей видов *B. hortorum*, *B. lucorum* и *B. rupestris*, собранных на территории Белово и Гурьевска и Горно-Алтайска, были поражены *N. bombi* WS3. В районе поселка Загадное микроспоридии *N. bombi* были обнаружены в образцах *B. consobrinus*, *B. hypnorum* и *B. lucorum*. Среди этих особей встречались два варианта нозем (*N. bombi* WS2 и *N. bombi* WS4). В поселке Усть-Кабырза виды *B. lucorum*, *B. sichelii* и *B. sporadicus* поражены изучаемыми паразитами. Было установлено, что в этой точке сбора шмели подвержены заражению тремя различными вариантами (*N. bombi* WS2-WS4). В последних двух точках сбора вариант *N. bombi* WS2 был наиболее распространен (рисунок 20А, приложение 4).



**Рисунок 20.** Места сбора и диаграммы распределения генетических вариантов *N. bombi* в каждой исследуемой природной популяции. Обозначение мест сбора: 1- село Степногутово; 2- Белово и Гурьевск; 3- поселок Загадное; 4- поселок Усть-Кабырза; 5- Горно-Алтайск; 6- поселок Листвянка; 7- село Косая Степь; 8- Гульмарг и Шринагар.

На территории Восточной Сибири подвержены заражению микроспоридиями оказались виды *B. consobrinus*, *B. lucorum*, *B. schrencki* и *B. sporadicus* (таблица 5). Все образцы шмелей в этой области были поражены *N. bombi* WS1 (рисунок 20Б, приложение 4). В образцах шмелей вида *B. trifasciatus*, собранных в штате Джамму и Кашмир, был представлен генетический вариант *N. bombi* IND (рисунок 20В, приложение 4).

Таким образом, в 6 из 8 исследуемых точек сбора популяции шмелей подвержены заражению лишь одним генетическим вариантом *N. bombi*: в селе Степногутово, поселке Листвянка и селе Косая Степь- *N. bombi* WS1; в Белово, Гурьевске и Горно-Алтайске- *N. bombi* WS3; в Гульмарге и Шринагаре- *N. bombi* IND. Несколько генетических вариантов *N. bombi* распространены в природных популяциях шмелей в районе поселков Загадное (*N. bombi* WS2, *N. bombi* WS4) и Усть-Кабырза (*N. bombi* WS2- *N. bombi* WS4).

### **Разнообразие трипаносоматид, поражающих насекомых отряда Hymenoptera и класса Insecta**

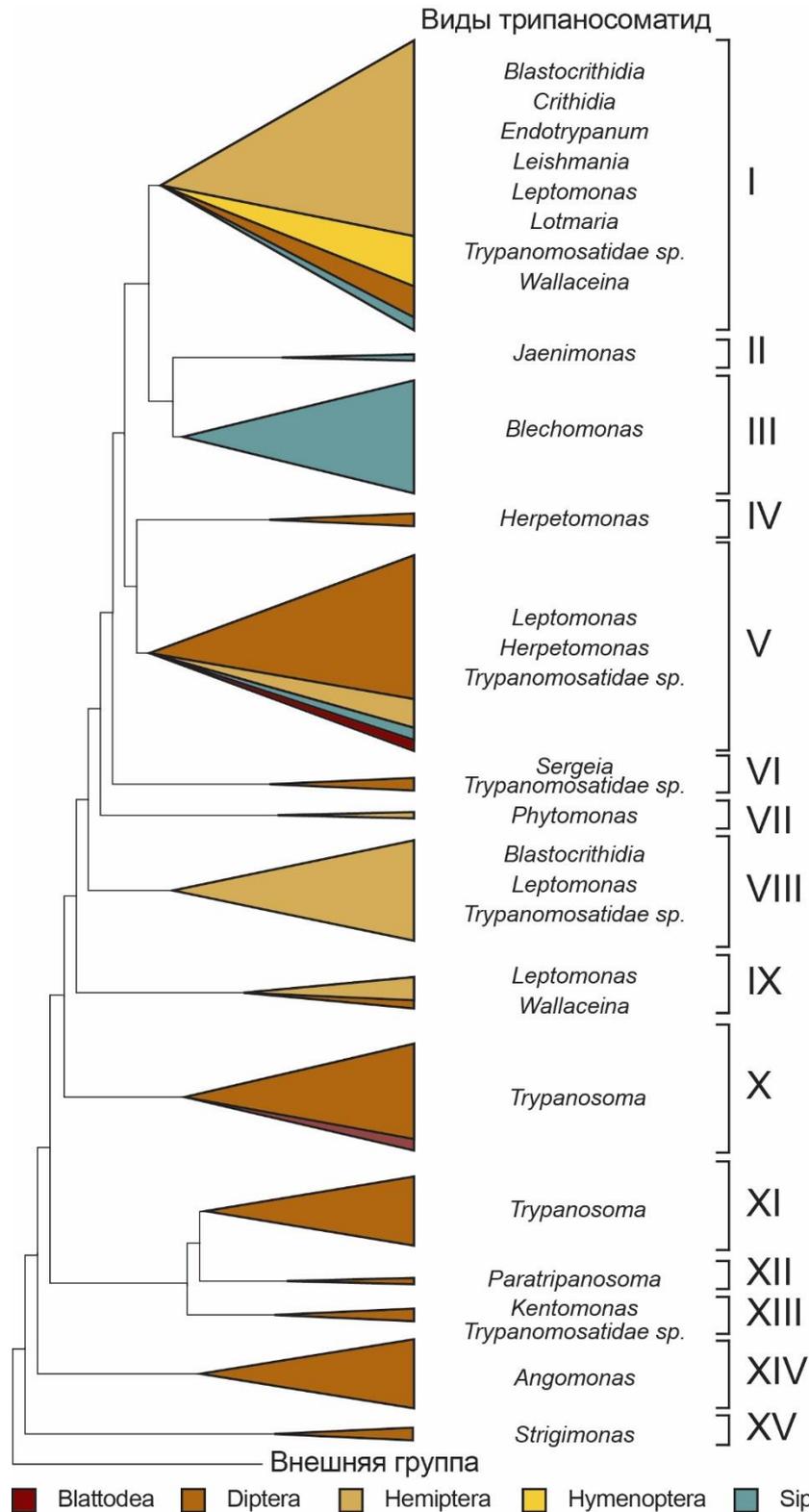
Аналогично микроспоридиям, для поиска трипаносоматид, заражающих насекомых класса Insecta и в том числе отряд Hymenoptera, была проанализирована база данных GenBank. Гены, кодирующие 18S рибосомную РНК, были выбраны для исследования, поскольку данные последовательности наиболее хорошо изучены для трипаносоматид.

В результате логического поиска в базе данных было найдено 8170 последовательностей генов 18S рРНК трипаносоматид. Анализ последовательностей позволил выявить 1213 последовательностей трипаносоматид, поражающих насекомых из 5 отрядов (Blattodea, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera и Siphonaptera). Наиболее представительной оказалась выборка последовательностей трипаносоматид, паразитирующих на насекомых из отрядов: Diptera, Hemiptera и Siphonaptera. Для отрядов Blattodea и Hymenoptera представители отряда Trypanosomatidae были изучены у небольшого количества

видов. Информация о трипаносоматидах, выявленных в других отрядах насекомых, в базе данных отсутствует.

Для филогенетического анализа были использованы 164 последовательности 18S рРНК видов отряда Trypanosomatida, поражающих насекомых, из которых 7 последовательностей относились к трипаносоматидам, поражающих представителей отряда Hymenoptera (перечень последовательностей приведен в приложении 5).

В качестве внешней группы были использованы последовательности гена 18S рРНК нескольких видов рода *Ichthyobodo* (Kinetoplastida: Ichthyobodonidae), паразитирующих на представителях семейств Pleuronectidae и Salmonidae. Детальное филогенетическое древо представлено в приложении 6.



**Рисунок 21.** Схематичное филогенетическое древо, реконструированное на основе последовательности генов 18S рибосомной РНК трипаносоматид, поражающих насекомых, методом объединения ближайших соседей (NJ) в программе MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Для каждого отряда хозяев используется определенный цвет, размер треугольников соответствует количеству последовательностей.

На филогенетическом древе все последовательности образуют пятнадцать кластеров, которые значительно варьируют по размерам (рисунок 21). **Кластер I** является наиболее крупным, в него входят последовательности из 7 родов трипаносоматид, паразитирующих на представителях 4 отрядов насекомых: Diptera, Hemiptera, Hymenoptera и Siphonaptera. Кластер разделен на две ветви (коэффициент поддержки 99%).

Первая ветвь является наиболее крупной, в ее состав вошли представители следующих видов: *Leptomonas* spp., поражающие насекомых отряда Hemiptera; *Crithidia* spp., паразитирующие на представителях отрядов Diptera, Hemiptera и Hymenoptera; *Endotripanum* spp., встречающиеся у насекомых отряда Diptera; *Wallaceina* spp., обнаруженные у клопов; *Blastocrithidia gerricola*, паразитирующий на прудовой водомерке (*Gerris lacustris*); а также несколько видов трипаносоматид с неопределенным таксономическим статусом, поражающих насекомых отряда Hemiptera.

В состав второй ветви вошли последовательности видов *C. bombi* и *Lotmaria passim*, которые паразитируют на шмелях рода *Bombus* и медоносных пчелах рода *Apis*, соответственно.

Таким образом, кластер I соответствует подсемейству Leishmaniinae, которое было описано Я. Вотипка и соавторами в 2015 году (Votýrka et al., 2015). Согласно предложенной данными исследователями классификации, подсемейство Leishmaniinae состоит из родов *Crithidia*, *Endotripanum*, *Leishmania*, *Leptomonas*, и *Lotmaria*.

В состав **кластера II** вошла лишь одна последовательность вида *Jaenimonas drosophilae*, паразитирующего на *Drosophila fallen*. Данный вид является единственным описанным в роде *Jaenimonas*.

**Кластер III** включает в себя все последовательности представителей рода *Blechromonas*, выявленные в ходе поиска по базе данных GenBank. Следует отметить, что данные паразитические организмы описаны лишь у представителей отряда Siphonaptera. Согласно Я. Вотипка и соавторам представители рода *Blechromonas* образуют отдельное подсемейство Blechomonadinae (Votýrka et al., 2015).

**Кластер IV** состоит из двух последовательностей вида *Herpetomonas mariadeanei*, описанного для *Chrysomya megacephala* и *Muscina stabulans* (отряд Diptera).

Представители рода *Herpetomonas*, паразитирующие на насекомых из отрядов Blattodea, Diptera, Hemiptera и Siphonaptera, составляют основу **кластера V**. В состав данного кластера также попали три представителя рода *Leptomonas*, два из которых поражают представителей отряда Hemiptera (*Leptomonas lactosovorans*, *Leptomonas samueli*) и один – Diptera (*Leptomonas mirabilis*). В кластер V также распространилась последовательность трипаносоматиды с неопределенным таксономическим статусом, которая была обнаружена с помощью ПЦР у мухи вида *Chrysomya putoria*, обитающей на территории острова Мадагаскар. Вероятно, «выпадающие» из общего состава кластера последовательности *Leptomonas* sp. нуждаются в пересмотре родовой принадлежности, поскольку основная масса последовательностей рода *Leptomonas* распространились в кластер I, что соответствует предложенной Я. Вотипка и соавторами систематике отряда Trypanosomatidae (Votýpka et al., 2015).

**Кластер VI** включает в себя последовательности *Sergeia podlipaevi* и *Trypanosomatidae* sp., паразитирующих на представителях отряда Diptera.

В отдельный **VII кластер** вошла последовательность паразитического гетероксенного организма вида *Phytomonas nordicus*, поражающего щитников вида *Troilus luridus*.

Трипаносоматиды, входящие в состав **кластера VIII**, паразитируют на представителях отряда Hemiptera. Большая часть образцов не имеет точной видовой и родовой принадлежности и обозначена как *Trypanosomatidae* sp. Данный кластер делится на ветви с коэффициентом поддержки 99%. В состав первой ветви наряду с *Trypanosomatidae* sp. входит последовательность *Leptomonas jaculum*. Во вторую ветвь кластера VIII попали образцы с неопределенным таксономическим статусом, а также несколько видов рода *Blastocrithidia*. Примечательно, что согласно филогенетическому анализу, который был проведен ранее для представителей отряда Trypanosomatida, кластер представителей рода *Blastocrithidia* действительно является близкородственным к кластеру,

включающему вид *L. jaculum* (Votýpka et al., 2015). Предполагается, что эта группа видов образует общее подсемейство.

В кластер IX входят пять последовательностей, относящихся к родам *Walleceina* и *Leptomonas*. Однако, несмотря на то, что оба рода являются гомоксенными, согласно современной классификации отряда Трипаносоматиды, они относятся к разным подсемействам.

Кластеры X и XI полностью состоят из последовательностей трипаносоматид, которые относятся к роду *Trypanosoma* и поражают, в основном, насекомых отряда Diptera. Лишь для одного представителя отряда Siphonaptera было установлено заражение трипаносоматидой рода *Trypanosoma* (KF054111), последовательность которой вошла в кластер X.

Кластер XII является одним из немногочисленных и состоит из одного представителя трипаносоматид, который относится к роду *Paratrypanosoma*, паразитирующему на комаре обыкновенном *Culex pipiens*.

Кластер XIII включает в себя виды *Kentomonas sorsogonicus* и *Trypanosomatidae* sp., паразитирующие на представителях отряда Diptera.

В состав кластера XIV вошли все виды рода *Angomonas* (*A. ambiguous* и *A. desouzai*), паразитирующие на широком спектре насекомых отряда Diptera, а также на насекомоядном жуке *Zelus leucogrammus*.

Кластер XV состоит из трипаносоматид рода *Strigomonas*, поражающих представителей отряда Diptera.

Таким образом, филогенетические построения в основном согласуются с таксономической системой предложенной ранее (Votýpka et al., 2015), исключение составляют трипаносоматиды родов *Angomonas*, *Kentomonas* и *Strigomonas*. Я. Вотипка и соавторами было внесено предложение об объединении родов *Angomonas*, *Kentomonas* и *Strigomonas* в общее подсемейство Strigomonadinae (Votýpka et al., 2015). В настоящем исследовании данное предположение не подтверждено.

В соответствии с полученными данными, разнообразие трипаносоматид, поражающих представителей отряда Hymenoptera, ограничено двумя родами, *Crithidia* и *Lotmaria*. На филогенетическом древе роды *Crithidia* и *Lotmaria* вошли в состав подсемейства Leishmaniinae (кластер I), что согласуется с предложенной

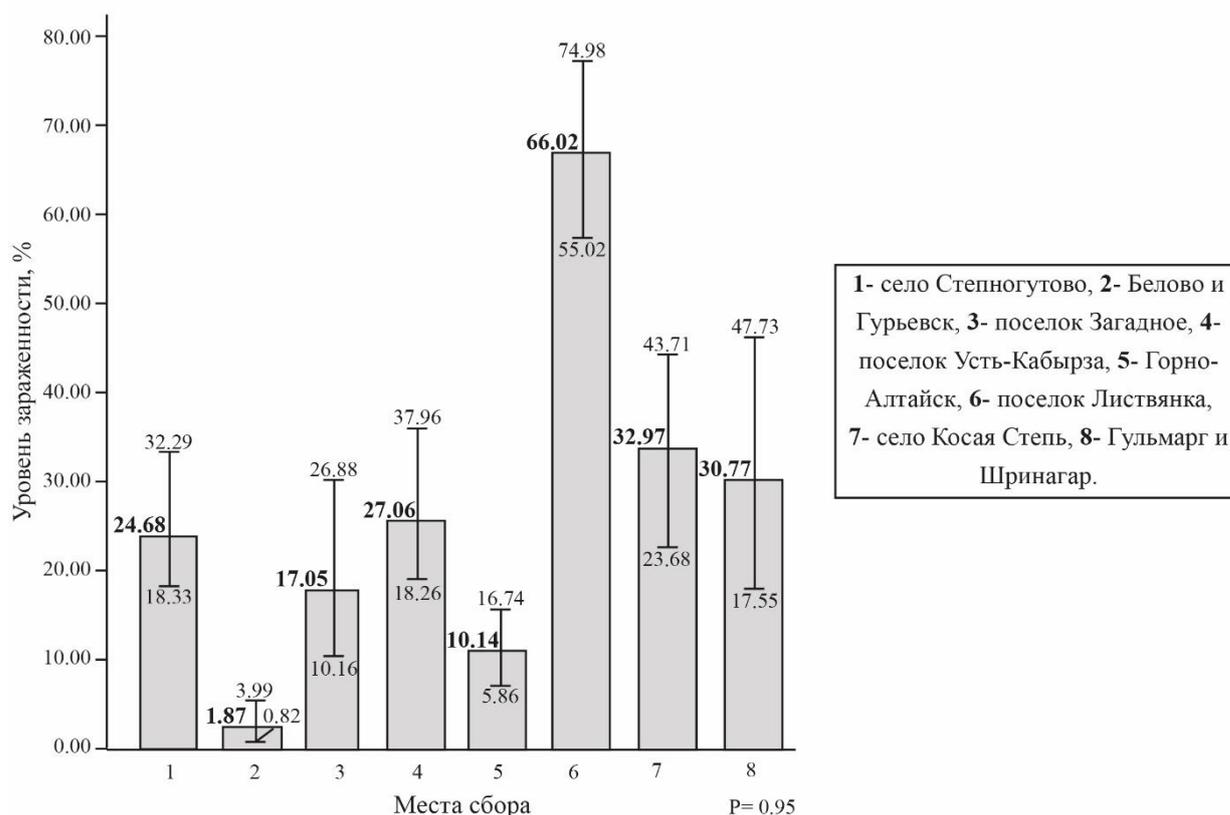
ранее классификацией семейства Trypanosomatidae (Votýpka et al., 2015). На шмелях рода *Bombus* паразитируют два вида трипаносоматид рода *Crithidia*, *C. bombi* и *C. exproeki*. Таким образом, дальнейшее исследование заражения трипаносоматидами шмелей, собранных в южных районах Сибири и в Северной Индии, было ограничено родом *Crithidia*.

### **Уровень зараженности природных популяций шмелей трипаносоматидами рода *Crithidia***

#### ***Общий уровень зараженности природных популяций шмелей трипаносоматидами рода *Crithidia****

Присутствие заражения трипаносоматидами рода *Crithidia* устанавливали с помощью ПЦР амплификации индивидуальной тотальной ДНК шмелей с праймерами, специфичными к гену 18S рРНК *Crithidia* spp. Положительным результатом считалось наличие ПЦР фрагмента размером 400 п.н., который определялся в результате электрофореза в агарозном геле. Положительные результаты ПЦР амплификации были получены для 208 из 1076 проанализированных образцов ДНК (таблица 5). Впоследствии, для каждого из 208 полученных фрагментов ДНК была установлена нуклеотидная последовательность.

Уровень зараженности шмелей трипаносоматидами *Crithidia* spp. на территории Иркутской области в районе села Листвянка составил 66.0%. Уровень зараженности шмелей паразитами данного рода в природных популяциях шмелей, собранных на территории Белово и Гурьевска (Кемеровская область), был равен 1.9%. Менее 20% исследованных в настоящей работе шмелей были поражены трипаносоматидами *Crithidia* spp. на территории Горно-Алтайска и Кузнецкого Алатау. В оставшихся природных популяциях уровни зараженности шмелей трипаносоматидами составили 24.7-33.0% (рисунок 21).

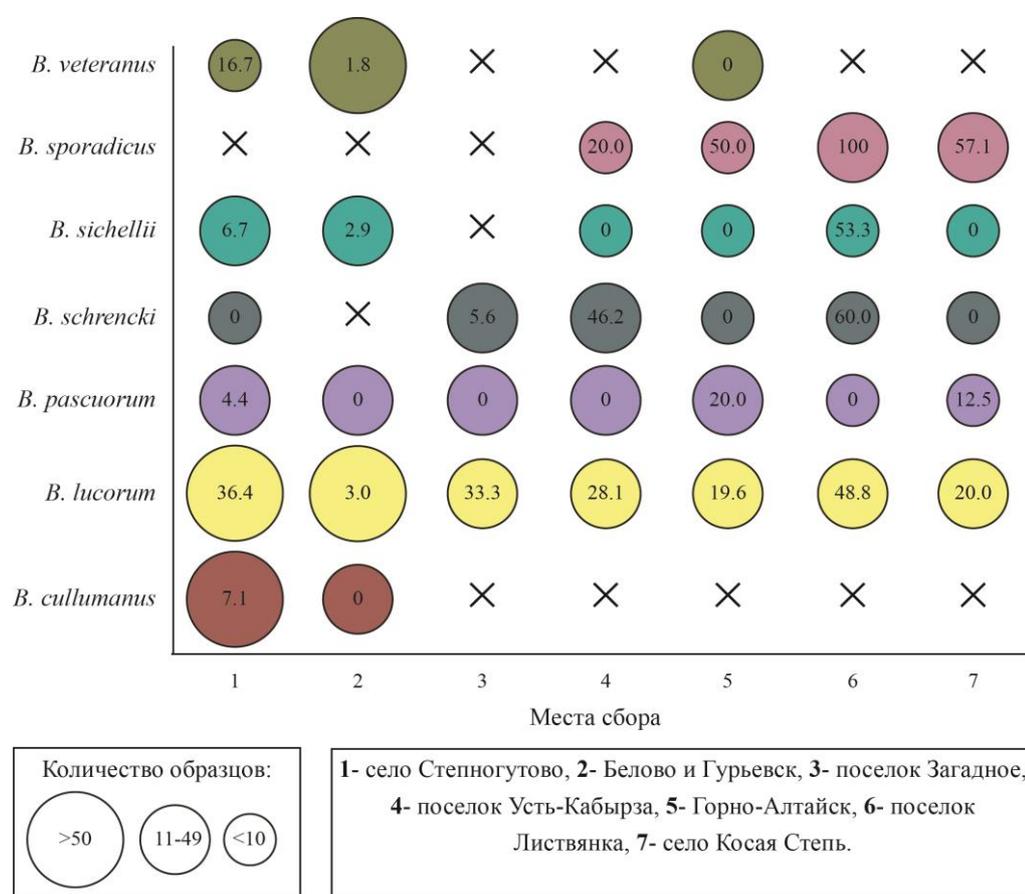


**Рисунок 21.** Общий уровень зараженности природных популяций шмелей трипаносоматидами рода *Crithidia* с указанием доверительных интервалов, полученных с помощью метода Клоппера-Пирсона (Clopper et al., 1934).

Таким образом, природные популяции шмелей на территории южных районов Сибири и северной Индии больше подвержены заражению трипаносоматидами по сравнению с микроспоридиями во всех точках сбора, за исключением районов поселка Загадное и Белово и Гурьевска. Общий уровень зараженности популяций шмелей трипаносоматидами значительно варьирует в разных точках сбора. Данные различия могут быть связаны с тем, что разные виды шмелей имеют разный уровень зараженности трипаносоматидами. Ранее была подтверждена взаимосвязь между уровнем зараженности трипаносоматидами и видом шмеля, а также показано, что количество случаев заражения шмелей критиями увеличивается к концу летнего периода (Goulson et al., 2012).

**Уровни зараженности наиболее распространенных видов шмелей  
трипаносоматидами рода *Crithidia***

Собранные образцы вида *B. sporadicus*, широко представленного в природных популяциях шмелей на территории Иркутской области, были наиболее подвержены заражению паразитическими простейшими рода *Crithidia*. В районе поселка Листвянка уровень зараженности образцов *B. sporadicus* трипаносоматидами составил 100.0%, в селе Косая Степь – 57.1%. Зараженные трипаносоматидами образцы *B. sporadicus* были также обнаружены в районе поселка Усть-Кабырза и Горно-Алтайске (рисунок 22).



**Рисунок 22.** Уровни зараженности наиболее распространенных видов шмелей трипаносоматидами рода *Crithidia* на территории южных районов Сибири. Цветовые обозначения видов шмелей соответствуют представленным на рисунке 15. Символом «X» обозначены точки сбора, в которых данный вид шмелей не был собран в коллекцию.

Уровни зараженности вида *B. lucorum* в анализируемых точках сбора варьировали от 19.6% до 48.8%, за исключением шмелей, собранных в районе

Белово и Гурьевска (Кемеровская область). В этой области заражению трипаносоматидами рода *Crithidia* были подвержены лишь 3.0% образцов *V. lucorum* (рисунок 22).

В районе села Степногутово 43.5% образцов *V. pascuorum* были поражены трипаносоматидами, в то время как в селе Косая Степь и Горно-Алтайске 12.5% и 20.0% шмелей этого вида, соответственно, были заражены *Crithidia* spp. (рисунок 22). В остальных четырех точках сбора не было найдено зараженных трипаносоматидами образцов *V. pascuorum* (таблица 5).

Ранее было установлено, что 11% особей *V. pascuorum* и 20-30% особей *V. lucorum*, собранных в природных популяциях на территории некоторых европейских стран, подвержены заражению трипаносоматидами (Shykoff et al., 1991; Korner et al., 2005). Уровни зараженности *V. pascuorum* простейшими *C. bombi* изучались также в Шотландии и составили 10-50% в зависимости от места сбора (Goulson et al., 2012).

Среди образцов *V. schrencki*, собранных в районе поселков Загадное, Усть-Кабырза и Листвянка, было обнаружено 10 зараженных трипаносоматидами особей (таблица 5, рисунок 22). В остальных точках сбора поражение трипаносоматидами образцов этого вида установлено не было. Уровень зараженности шмелей вида *V. schrencki* трипаносоматидами ранее не изучался.

Зараженные трипаносоматидами образцы вида *V. veteranus* были найдены только в популяциях шмелей, собранных вблизи села Степногутово и городов Белово и Гурьевск (общее количество зараженных образцов составило 3). Ранее поражение шмелей вида *V. veteranus* данными паразитическими организмами было установлено на территории России (Ленинградская область), однако, оценка уровня зараженности популяций данных опылителей не была проведена (Горбунов, 1987).

Вид *V. sichelii* был широко представлен в двух выборках шмелей в районе села Степногутово и городов Белово и Гурьевск. Уровни зараженности образцов *V. sichelii* трипаносоматидами *Crithidia* spp. в этих точках сбора составили 6.8% и 2.9%, соответственно (рисунок 22). Низкий уровень зараженности шмелей вида

*B. sichelii* критидиями (3%) был установлен в альпийских популяциях этих насекомых-опылителей (Korner et al., 2005).

Два зараженных трипаносоматидами образца вида *B. cullumanus* было обнаружено в Новосибирской области (уровень зараженности составил 7.1%). Исследование того, подвержены ли популяции шмелей вида *B. cullumanus* заражению трипаносоматидами рода *Crithidia*, ранее не проводилось.

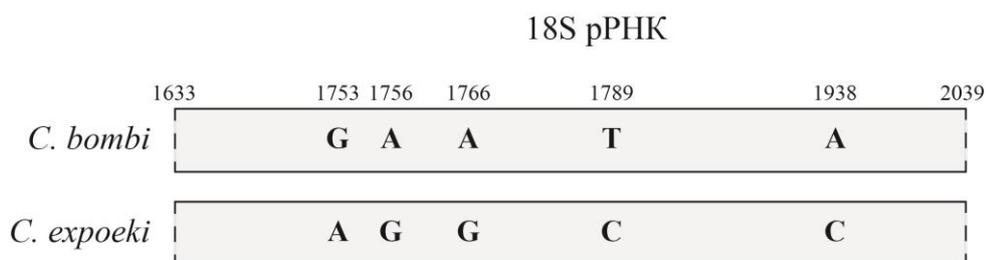
Таким образом, как и в случае микроспоридий *N. bombi*, разные виды шмелей имеют разный уровень зараженности паразитическими организмами рода *Crithidia*. Среди широко распространенных видов шмелей, собранных для исследования в южных районах Сибири, не было найдено ни одного вида, который бы не был подвержен заражению *Crithidia* spp. Частое заражение трипаносоматидами было зафиксировано для образцов видов *B. lucorum*, *B. pascuorum* и *B. sporadicus*. Количество зараженных образцов видов *B. cullumanus*, *B. schrencki*, *B. sichelii* и *B. veteranus* не превышало 10.

## **Генетическое разнообразие трипаносоматид в природных популяциях шмелей**

### ***Сравнительный анализ последовательностей гена 18S рРНК трипаносоматид рода Crithidia***

Для изучения генетического разнообразия трипаносоматид рода *Crithidia* в природных популяциях шмелей были установлены нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР амплификации с праймерами, специфичными к гену 18S рРНК *Crithidia* spp. Размер полученных последовательностей составил около 400 п. н. Для сравнительного анализа был проведен BLAST поиск по базе данных GenBank и экстрагированы гомологи из различных видов и родов трипаносоматид.

В результате сравнительного анализа было установлено, что 208 полученных последовательностей трипаносоматид были идентичны последовательностям либо *C. bombi*, либо *C. exproeki*, ранее описанным у шмелей. Полученные последовательности фрагмента гена 18S рРНК *C. bombi* и *C. exproeki* различались пятью нуклеотидами (в позициях 1753, 1756, 1766, 1789 и 1938) (рисунок 23).



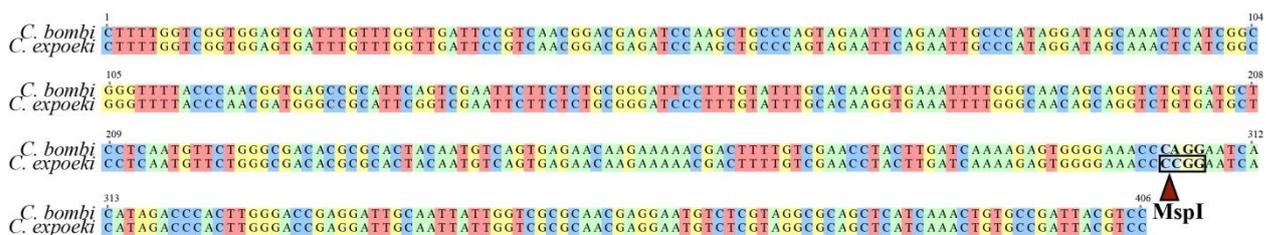
**Рисунок 23.** Схематичное изображение различий в последовательностях гена 18S рРНК *C. bombi* и *C. exroeki*. Нуклеотидные позиции указаны согласно *Crithidia fasciculata*, для которой получена полноразмерная последовательность кластера генов рРНК (Y00055).

Внутривидовой вариабельности полученных нами последовательностей *C. bombi* и *C. exroeki*, выявлено не было. Установленные последовательности были идентичны последовательностям данных видов, представленных в базе данных GenBank.

Таким образом, в проанализированных образцах шмелей южных районов Сибири и Северной Индии присутствуют трипаносоматиды двух видов *C. bombi* и *C. exroeki*.

### ***Рестрикционный анализ последовательностей гена 18S рРНК трипаносоматид рода Crithidia***

В результате сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 18S рРНК трипаносоматид, поражающих шмелей, было установлено, что последовательность *C. exroeki* в отличие от *C. bombi* содержит сайт рестрикции эндонуклеазы Msp1 (C<sup>^</sup>CGG) (рисунок 24). Обработка рестриктазой Msp1 полученных ПЦР продуктов фрагмента гена 18S рРНК трипаносоматид с последующим электрофорезом в агарозном геле позволила определить, каким видом, *C. bombi* или *C. exroeki*, были инфицированы исследуемые образцы. В случае *C. bombi* на агарозном геле наблюдалось наличие фрагмента размером около 400 п.н., а в случае *C. exroeki* – двух фрагментов размером около 300 п.н. и 100 п.н.



**Рисунок 24.** Выравнивание последовательностей гена 18S рНК *C. bombi* и *C. expoeki*. В рамку выделен фрагмент выравнивания, в котором расположен сайт рестрикции MspI у трипаносоматиды *C. expoeki*.

Таким образом, рестрикционный анализ фрагмента гена 18S рНК трипаносоматид, поражающих шмелей, является удобным методом для определения видовой принадлежности исследуемого паразита.

### ***Сравнительный и филогенетический анализ последовательностей гена gGAPDH трипаносоматид рода Crithidia***

Для детального анализа генетического разнообразия трипаносоматид рода *Crithidia* в природных популяциях шмелей была проведена ПЦР амплификация тотальной ДНК зараженных образцов с праймерами, специфичными к последовательности гена *gGAPDH*. Длина полученных фрагментов составила около 800 п. н. Выбор данного фрагмента связан с тем, что именно при анализе данных последовательностей ранее были выявлены новые генетические варианты и виды трипаносоматид (Schmid-Hempel et al., 2010; Gallot-Lavallée et al., 2016).

Для каждого из зараженных образцов была проведена ПЦР амплификация, из агарозного геля выделены фрагменты ДНК, установлена их нуклеотидная последовательность. Всего было прочитано 208 фрагментов гена *gGAPDH*. Для сравнительного анализа из базы данных GenBank были экстрагированы последовательности гомологичные *gGAPDH* с помощью программы BLAST. На основании последовательностей найденных в базе данных и полученных экспериментальным путем с помощью программ ClustalW и UniPRO UGENE v.1.12.3 были реконструированы множественные выравнивания.

Вариабельности полученных последовательностей выявлено не было, они являются идентичными последовательностям гена *gGAPDH* *C. bombi* или *C. exroeki*, представленных в базе данных GenBank.

Последовательности гена *gGAPDH* *C. bombi* и *C. exroeki* отличаются друг от друга по 35 позициям. Выравнивание последовательностей гена *gGAPDH* *C. bombi* и *C. exroeki*, выявленных в образцах шмелей, представлено на рисунке 25. Внутривидовой вариабельности последовательностей, полученных экспериментальным путем, выявлено не было.



**Рисунок 25.** Выравнивание последовательностей гена *gGAPDH* *C. bombi* и *C. exroeki*, выявленных в настоящей работе.

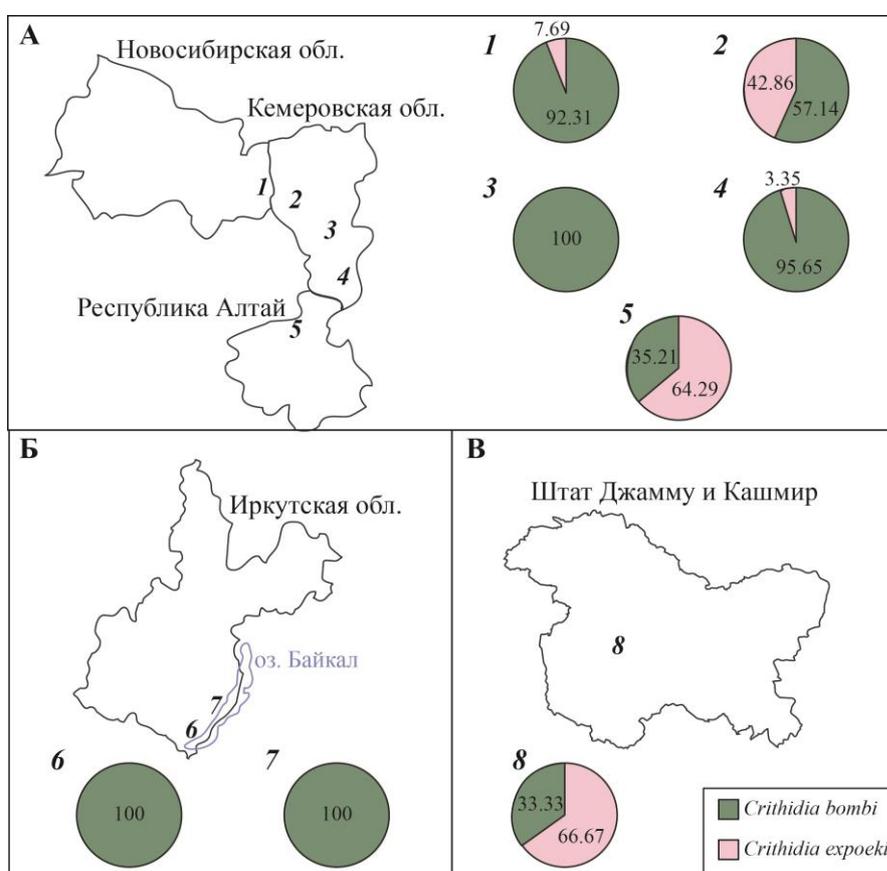
Исследуемые природные популяции шмелей, поражены двумя видами трипаносоматид, *C. bombi* и *C. exroeki*, у которых отсутствует внутривидовая вариабельность последовательностей генов 18S рРНК и *gGAPDH*.

### Распространение трипаносоматид рода *Crithidia* в природных популяциях шмелей

Распространение *C. bombi* и *C. exroeki* в природных популяциях шмелей на территории Западной Сибири представлено на рисунке 26А. Среди 99 зараженных трипаносоматидами шмелей, 15 насекомых были поражены *C. exroeki*, остальные - *C. bombi*. Девять видов шмелей (*B. distinguendus*, *B. humilis*, *B. hypnorum*, *B. lucorum*, *B. pascuorum*, *B. schrencki*, *B. sichelii*, *B. sporadicus* и *B. veteranus*) в этой

области оказались подвержены заражению трипаносоматидами (таблица 5). Образцы *V. lucorum* и *V. schrencki* были поражены как *C. bombi*, так и *C. exroeki*, в то время как остальные виды шмелей - лишь одним из этих паразитов (приложение 4).

Все зараженные трипаносоматидами образцы шмелей, собранные на территории Кузнецкого Алатау (поселок Загадное), были поражены *C. bombi*. В остальных точках сбора были обнаружены оба паразитических организма. В Горно-Алтайске, в отличие от остальных мест сбора, количество образцов, зараженных *C. exroeki*, превысило количество образцов, зараженных *C. bombi*.



**Рисунок 26.** Места сбора и диаграммы распределения видов *C. bombi* и *C. exroeki* в каждой исследуемой природной популяции. Обозначение мест сбора: 1- село Степногутово; 2- Белово и Гурьевск; 3- поселок Загадное; 4- поселок Усть-Кабырза; 5- Горно-Алтайск; 6- поселок Листвянка; 7- село Косая Степь; 8- Гульмарг и Шринагар.

В двух анализируемых точках сбора Иркутской области 98 шмелей были поражены трипаносоматидами *C. bombi*. Подвержены заражению оказались все 8

видов шмелей, собранных в поселке Листвянка и селе Косая Степь (таблица 5, приложение 4). Заражение исследуемых насекомых паразитом *C. exhoekii* в этих районах не было установлено (рисунок 26Б).

В Северной Индии среди 39 проанализированных образцов, 12 особей видов *B. asiaticus*, *B. simillimus* и *B. trifasciatus* оказались поражены трипаносоматидами рода *Crithidia*, из них 8 шмелей были заражены *C. exhoekii*, а 4- *C. bombi* (рисунок 26В). Образцы вида *B. asiaticus* были поражены и *C. bombi*, и *C. exhoekii*, а образцы *B. simillimus* и *B. trifasciatus* лишь одним из этих видов (приложение 4).

Ранее на территории нашей страны исследования трипаносоматид у шмелей проводились только в Европейской части (Ленинградская область) (Горбунов, 1987; Горбунов, 1996). В этих работах П. С. Горбунов впервые описал морфологию и жизненный цикл простейших трипаносоматид, паразитирующих на некоторых видах рода *Bombus*, и отнес их к виду *C. bombi*. Исследования трипаносоматид были проведены также и в некоторых европейских странах, однако заражение шмелей трипаносоматидами *C. exhoekii* установлено лишь в Швейцарии (Schmid-Nempel et al., 2010).

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные о трипаносоматидах рода *Crithidia*, поражающих шмелей, позволяют дополнить данные о географическом распространении этих паразитов. В природных популяциях шмелей *C. bombi* наиболее распространен на территории южных районов Сибири, а *C. exhoekii* - в Северной Индии.

### **Разнообразие неогрегаринов, поражающих насекомых отряда Hymenoptera и класса Insecta**

Аналогично предыдущим исследованиям, с помощью базы данных GenBank был проведен поиск представителей отряда Neogregarinorida, поражающих класс Insecta, в том числе насекомых отряда Hymenoptera. В результате логического поиска по запросу «Neogregarinorida» в базе данных была найдена 31 последовательность фрагментов генов 18S (SSU), 5.8S, 28S рРНК, а также ITS1 и ITS2. Дальнейший анализ показал, что в базе данных содержится 26

последовательностей неогрегариин, которые паразитируют на насекомых 3 отрядов (Hemiptera, Hymenoptera и Lepidoptera). Наиболее представленными оказались неогрегарины вида *Apicystis bombi* (22 последовательности), паразитирующие на различных видах шмелей. Большая часть последовательностей *A. bombi* состояла из фрагмента 18S рРНК + ITS1 + 5.8S рРНК + ITS2 + 28S рРНК.

В программах ClustalW и UniPRO UGENE v.1.12.3 было построено множественное выравнивание с использованием 5 последовательностей генов 18S рРНК различных неогрегариин (рисунок 27). Полная информация о видах неогрегариин, их хозяевах и использованных в построении выравнивания последовательностях представлена в таблице 6.

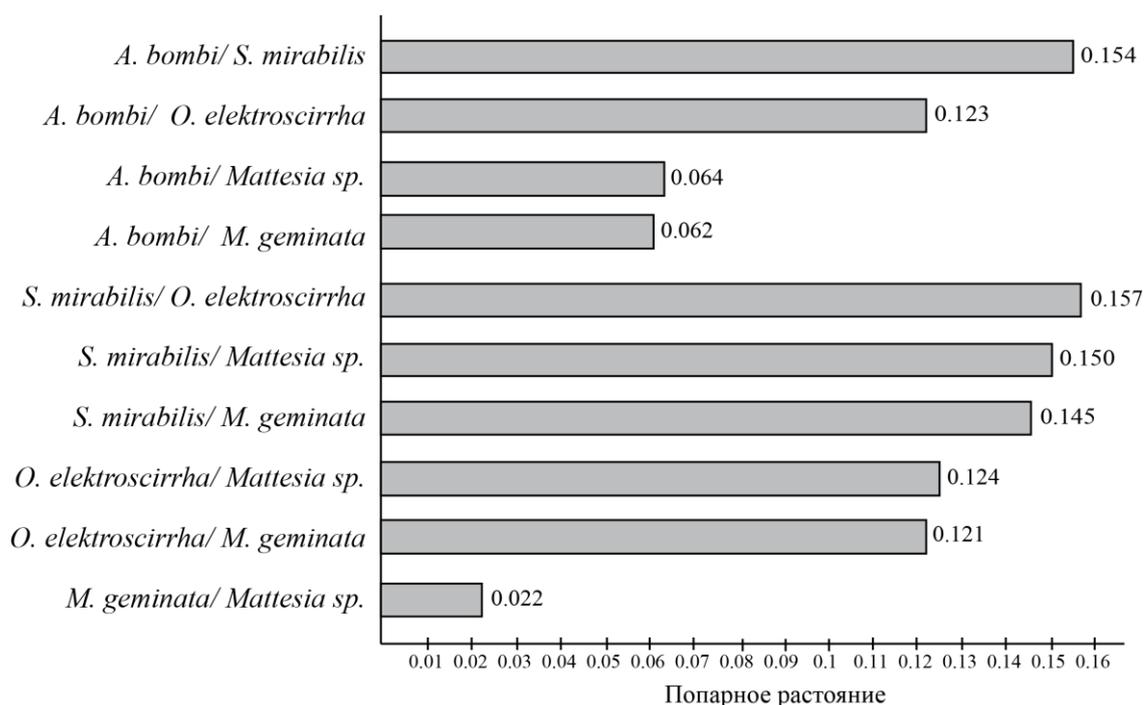
**Таблица 6.** Виды отряда Neogregarinorida, паразитирующие на насекомых класса Insecta.

Род отряда Neogregarinorida	Вид	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
<i>Apicystis</i>	<i>Apicystis bombi</i>	<i>Bombus</i> sp., Hymenoptera	FN546182
<i>Mattesia</i>	<i>Mattesia geminata</i>	<i>Solenopsis geminata</i> , Hymenoptera	AY334568
	<i>Mattesia</i> sp.	<i>Solenopsis invicta</i> , Hymenoptera	AY334569
<i>Ophriocystis</i>	<i>Ophriocystis elektroscirrha</i>	<i>Danaus plexippus</i> , Lepidoptera	AF129883
<i>Syncystis</i>	<i>Syncystis mirabilis</i>	<i>Nepa cinerea</i> , Hemiptera	DQ176427



Рисунок 27. Выравнивание последовательностей гена 18S рРНК представителей отряда Neogregarinorida.

В программе MEGA 7.0 было проведено попарное сравнение последовательностей исследуемых видов неогрегаринов методом p-distance (pairwise distance). Результаты проведенного сравнения, представленные на рисунке 28, показали, что между неогрегаринами разных родов попарное расстояние варьирует от 0.123 до 0.157. Нуклеотидные последовательности неогрегаринов родов *Ophriocystis* и *Syncystis* значительно отличаются друг от друга, а неогрегаринов родов *Apicystis* и *Mattesia* – характеризуются большим уровнем сходства. Внутри рода *Mattesia* расстояние между нуклеотидными последовательностями составило 0.022.



**Рисунок 28.** Попарные различия генов 18S рРНК неогрегаринов, установленные с помощью метода p-distance в программе MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016).

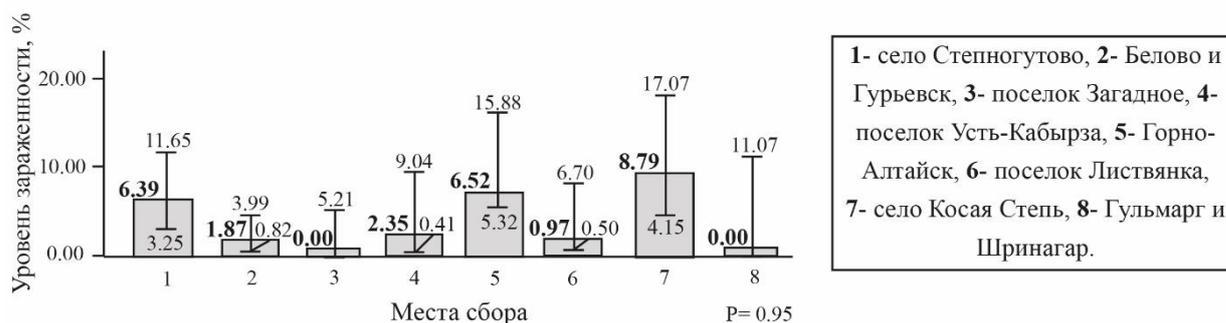
Таким образом, в настоящий момент нуклеотидные последовательности различных представителей отряда Neogregarinorida изучены слабо. Роды *Mattesia* и *Apicystis* являются наиболее близкородственными и паразитируют на представителях отряда Нуменоптера. В соответствии с результатами биоинформатического анализа разнообразие неогрегаринов, паразитирующих на шмелях, ограничено видом *A. bombi*.

## Уровень зараженности природных популяций шмелей неогрегаринами рода *Apicystis*

### *Общий уровень зараженности природных популяций шмелей неогрегаринами рода *Apicystis**

Присутствие заражения неогрегаринами рода *Apicystis* устанавливали с помощью ПЦР амплификации индивидуальной тотальной ДНК шмелей с праймерами, специфичными к гену 18S рРНК *A. bombi*. Положительным результатом считалось наличие ПЦР фрагмента размером 1000 п.н., который определялся в результате электрофореза в агарозном геле. Положительные результаты ПЦР амплификации были получены для 31 из 1076 проанализированных образцов ДНК (таблица 5). Впоследствии, для каждого из полученных фрагментов ДНК были установлены нуклеотидные последовательности.

В Иркутской области в районе села Косая Степь уровень зараженности шмелей неогрегаринами рода *Apicystis* составил 12.2%, на Алтае - 7.3%, а в Новосибирской области - 6.3%. В оставшихся четырех точках сбора на территории Сибири уровни зараженности природных популяций шмелей неогрегаринами *A. bombi* варьировали от 0.3% до 2.4%. В Северной Индии не было найдено ни одного зараженного неогрегаринами образца (рисунок 29).

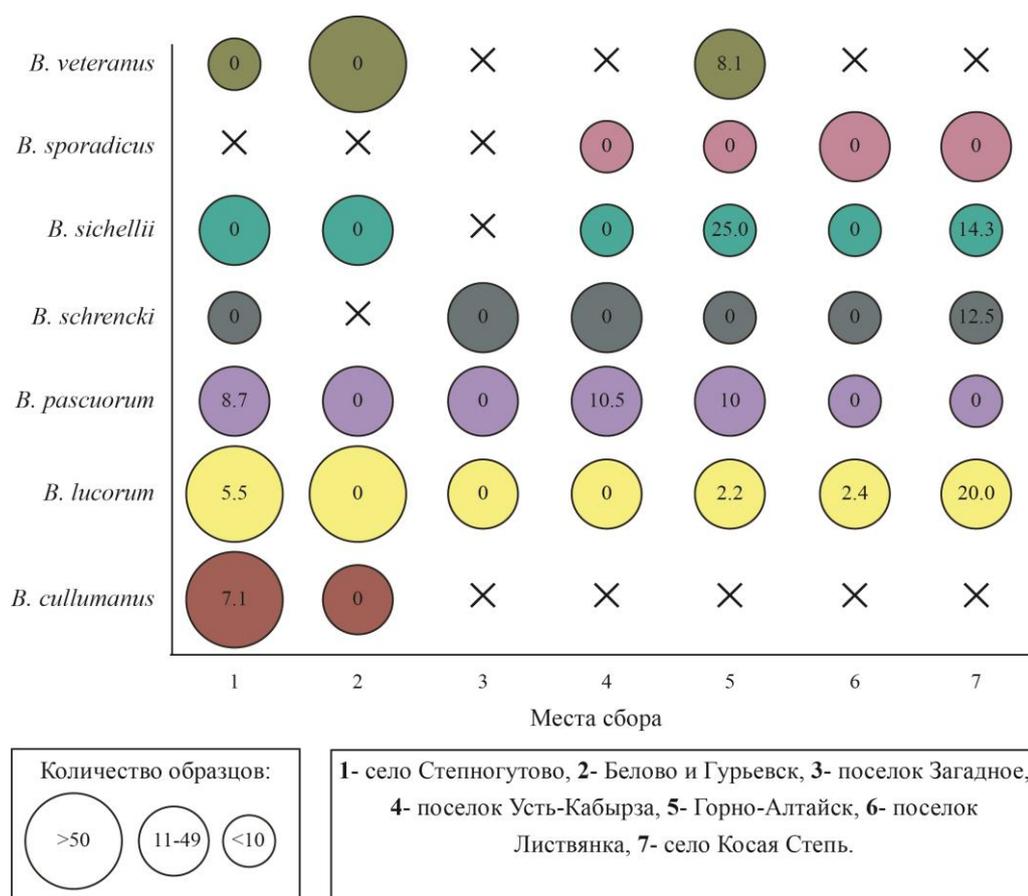


**Рисунок 27.** Общий уровень зараженности природных популяций шмелей неогрегаринами *A. bombi* с указанием доверительных интервалов, полученных с помощью метода Клоппера-Пирсона (Clopper et al., 1934).

Таким образом, природные популяции шмелей в исследованных точках сбора слабо подвержены заражению неогрегаридами. Зараженных *A. bombi* особей не найдено в районе Кузнецкого Алатау (поселок Загадное) и штате Джамму и Кашмир (Гульмарг и Шринагар).

**Уровни зараженности наиболее распространенных видов шмелей  
неогрегаридами рода *Apicystis***

Уровни зараженности шмелей вида *B. lucorum* неогрегаридами в разных точках сбора варьировали от 0.0% до 5.5%, за исключением выборки, собранной в районе села Косая Степь. В этой области 20.0% *B. lucorum* были поражены *A. bombi* (рисунок 30). Зараженные неогрегаридами образцы *B. pascuorum* были обнаружены в трех точках (село Степногутово, поселок Усть-Кабырза и Горно-Алтайск). Уровни зараженности *B. pascuorum* неогрегаридами *A. bombi* в этих местах сбора составили 8.7-10.5% (рисунок 30). Заражение вида *B. veteranus* неогрегаридами было зафиксировано лишь в районе Горно-Алтайска (уровень зараженности составил 8.1%). У видов *B. cullumanus* и *B. sichelii* было обнаружено по 2 особи, которые были инфицированы *A. bombi*. Среди всех проанализированных образцов *B. schrencki*, лишь один образец был поражен *A. bombi* (таблица 5). Образцы вида *B. sporadicus*, которые вошли в анализируемую коллекцию, не были поражены *A. bombi*.



**Рисунок 30.** Уровни зараженности (%) наиболее распространенных видов шмелей неогрегаридами рода *Apicystis* на территории южных районов Сибири. Цветовые обозначения видов шмелей соответствуют представленным на рисунке 15. Символом «X» обозначены точки сбора, в которых данный вид шмелей не был собран в коллекцию.

Ранее исследования зараженности шмелей неогрегаридами *A. bombi* проводились в некоторых европейских странах, странах Ближнего Востока и Южной Америки (Lipa et al., 1996; Cankaya et al., 2006; Meeus et al., 2010b; Plischuk et al., 2011; Goulson et al., 2012; Maharramov et al., 2013; Plischuk et al., 2017). *B. terrestris* являлся основным видом для изучения заражения данными паразитическими организмами. Заражение неогрегаридами шмелей, которые распространены в южных районах Сибири и Северной Индии, кроме вида *B. pascuorum*, ранее не изучалось. Уровни зараженности *B. pascuorum* неогрегаридами были определены в нескольких регионах Шотландии (Goulson et al., 2012).

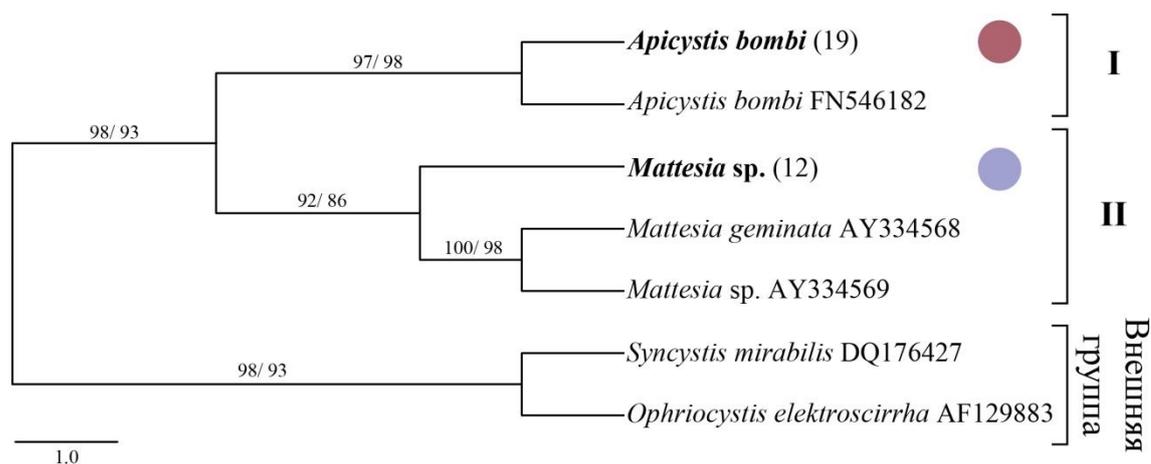
Таким образом, наиболее распространенные виды шмелей слабо подвержены заражению неогрегаридами *A. bombi*. Среди 72 проанализированных особей вида *B. sporadicus* не было найдено ни одного зараженного неогрегаридами образца.

### **Генетическое разнообразие неогрегаринов в природных популяциях шмелей**

Для изучения генетического разнообразия неогрегаринов рода *Apicystis* в природных популяциях шмелей южных районов Сибири и Северной Индии были установлены нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР амплификации с праймерами, специфичными к гену 18S рРНК неогрегаринов. Всего была получена 31 последовательность этого гена. Для сравнительного и филогенетического анализа был проведен BLAST поиск по базе данных GenBank и экстрагированы гомологи из различных видов и родов неогрегаринов.

В результате сравнительного анализа последовательностей, полученных в данном исследовании, было установлено, что они разделяются на две группы. Первая группа последовательностей идентична последовательности гена 18S рРНК *A. bombi* (FN546182), представленной в базе данных GenBank. Вторая группа последовательностей значительно отличалась от 18S рРНК *A. bombi* (значение  $p$ -distance 1.405). Последовательности второй группы были обозначены как *Mattesia* sp. Варибельности внутри описанных групп выявлено не было.

Филогенетическое древо было реконструировано на основе последовательностей генов 18S рРНК методом максимального правдоподобия (ML) в программе IQ-tree (рисунок 31). Для оценки достоверности был использован сверхбыстрый бутстреп тест (ultrafast bootstrap, UfBoot). В качестве внешней группы были использованы последовательности гена 18S рРНК неогрегаринов родов *Syncystis* и *Ophriocystis*, паразитирующих на насекомых из отрядов Hemiptera и Diptera.



**Рисунок 31.** Филогенетическое древо, реконструированное на основе последовательностей генов 18S рРНК неогрегаринов, поражающих насекомых, методом максимального правдоподобия (ML) в программе IQ-tree (Trifinopoulos et al., 2016). Для оценки достоверности был использован сверхбыстрый бутстреп тест (ultrafast bootstrap, UfBoot). Жирным шрифтом выделены последовательности неогрегаринов, полученные в настоящей работе. В скобках указано количество нуклеотидных последовательностей, относящихся к одному варианту и использованных для построения филогенетического древа. Цветовые обозначения *A. bombi* и *Mattesia sp.* соответствуют представленным на рисунке 32.

На филогенетическом древе можно выделить два кластера. В состав **кластера I** включены последовательности гена 18S рРНК вида *A. bombi*, полученные в настоящей работе, а также представленные в базе данных GenBank. **Кластер II** содержал две ветви. В состав первой ветви вошли последовательности *Mattesia sp.*, полученные в настоящей работе. В состав второй ветви вошли последовательности представителей рода *Mattesia*, паразитирующие на насекомых отряда Hymenoptera.

Таким образом, полученные в настоящей работе два варианта неогрегаринов, обнаруженных у шмелей рода *Bombus*, значительно отличаются. Первый вариант соответствует виду *A. bombi*, а второй - описан впервые. На филогенетическом древе описанный впервые вариант неогрегарины группируется в один кластер вместе с представителями рода *Mattesia* и был обозначен как *Mattesia sp.* Роды *Mattesia* и *Apicystis* считаются близкородственными, но различаются

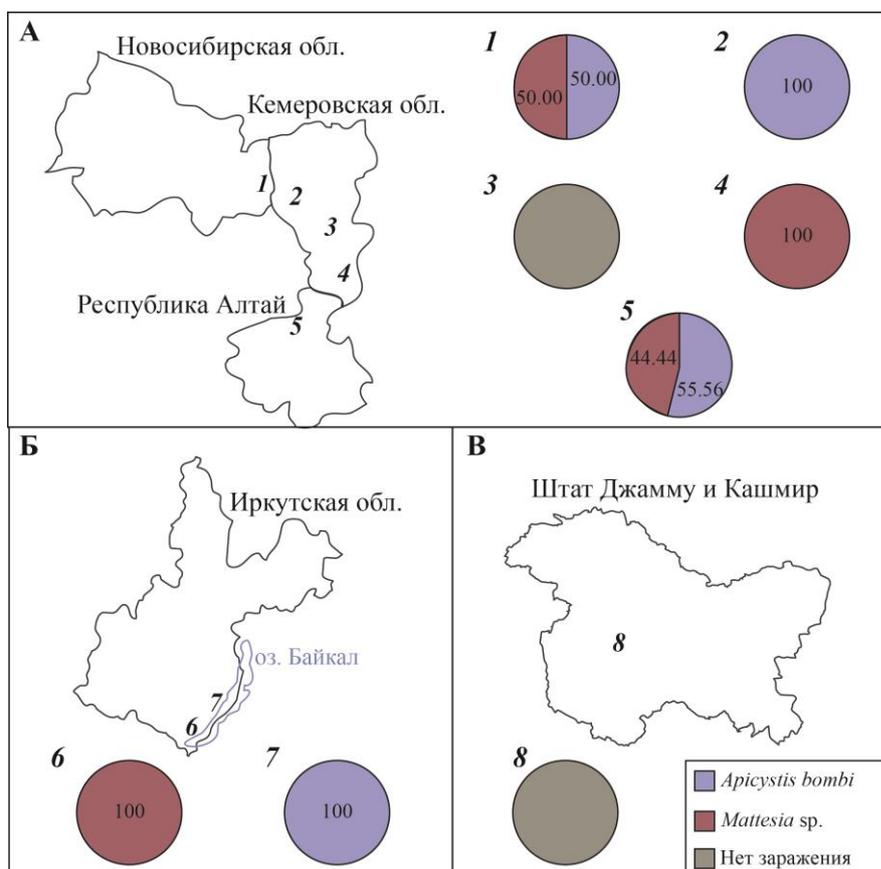
морфологически по количеству спорозоитов, содержащихся в ооцистах (Lira et al., 1996).

### **Распространение неогрегариин родов *Apicystis* и *Mattesia* в природных популяциях шмелей**

В природных популяциях шмелей Западной Сибири были распространены два варианта неогрегариин, *A. bombi* и *Mattesia* sp. (рисунок 32А). В районе села Степногутово (Новосибирская область) 5 видов шмелей (*B. cullumanus*, *B. hortorum*, *B. lucorum*, *B. pascuorum* и *B. soroeensis*) были заражены неогрегариинами (таблица 5). Среди 10 зараженных насекомых одна половина образцов была поражена *A. bombi*, а вторая – *Mattesia* sp. Случаи заражения двумя видами неогрегариин были установлены только в образцах вида *B. lucorum* (приложение 4).

В Горно-Алтайске 5 и 4 образца шмелей были заражены *A. bombi* и *Mattesia* sp., соответственно. В этой области неогрегариины были обнаружены у шмелей видов *B. hortorum*, *B. lucorum*, *B. pascuorum*, *B. sichelii* и *B. veteranus*. Образцы *B. hortorum* и *B. lucorum* были поражены *A. bombi*, в то время как образцы остальных видов шмелей - двумя паразитами (приложение 4).

В районе поселка Усть-Кабырза (Горная Шория) среди всех проанализированных образцов в 2 образцах *B. pascuorum* было установлено заражение неогрегариинами *Mattesia* sp. Лишь одна особь вида *B. sichelii* была поражена *A. bombi* на территории Белово и Гурьевска (приложение 4). Среди 88 проанализированных образцов шмелей, собранных в районе поселка Загадное в Кузнецком Алатау, не было обнаружено ни одного зараженного неогрегариинами.



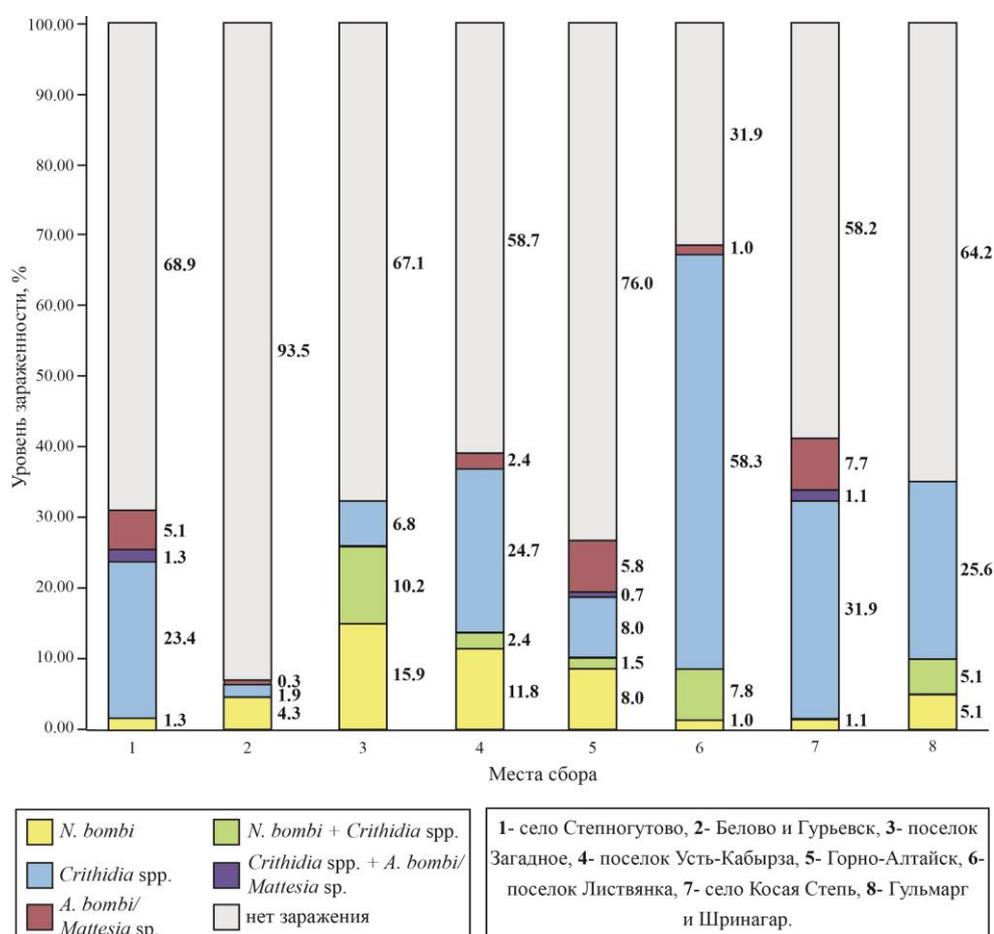
**Рисунок 32.** Места сбора и диаграммы распределения генетических вариантов *A. bombi* и *Mattesia sp.* в каждой исследуемой природной популяции. Обозначение мест сбора: 1- село Степногутово; 2- Белово и Гурьевск; 3- поселок Загадное; 4- поселок Усть-Кабырза; 5- Горно-Алтайск; 6- поселок Листвянка; 7- село Косая Степь; 8- Гульмарг и Шринагар.

В районе поселка Листвянка в одном образце вида *V. lucorum* была установлена инфекция неогрегариной *Mattesia sp.* (рисунок 32Б). 8 из 91 особей шмелей видов *V. lucorum* и *V. sichelii*, собранных вблизи села Косая Степь, были поражены *A. bombi*. В Северной Индии не было обнаружено зараженных неогрегариной шмелей (рисунок 32В).

В природных популяциях шмелей из южных районов Сибири распространены два варианта неогрегарины, *A. bombi* и *Mattesia sp.* Образцы шмелей, собранных на территории Северной Индии, не были заражены *A. bombi*.

### Суммарный уровень зараженности природных популяций шмелей микроспоридиями, трипаносоматидами и неогрегаринами

На рисунке 33 представлено процентное соотношение незараженных и зараженных микроспоридиями, трипаносоматидами и неогрегаринами шмелей в каждой точке сбора. Количество шмелей, для которых поражение данными паразитами было не установлено, варьировало от 31.9% до 76.0% во всех точках сбора, кроме городов Белово и Гурьевск. В районе Белово и Гурьевска 93.5% проанализированных образцов не были подвержены заражению изучаемыми паразитами.



**Рисунок 33.** Процентное соотношение незараженных и зараженных микроспоридиями, трипаносоматидами и неогрегаринами шмелей в каждой точки сбора.

Сбор шмелей в точке «Белово и Гурьевск» проводился вблизи металлургических заводов. Ранее было установлено, что для этих городов характерен высокий уровень загрязнения почвы тяжелыми металлами (Cd, Pb и Zn)

(Szentgyörgyi et al., 2011). Вероятно в данном случае низкий уровень зараженности шмелей исследуемыми паразитическими организмами, равный 6.5%, обусловлен высоким уровнем загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами.

Изучение уровня зараженности природных популяций шмелей микроспоридиями, трипаносоматидами и неогрегаринами было проведено ранее в Шотландии (Goulson et al., 2012). В результате исследования было установлено, что неогрегарины меньше распространены в популяциях опылителей по сравнению с двумя другими паразитическими организмами, что согласуется с данными, полученными в настоящем исследовании.

Случаи совместного заражения шмелей *N. bombi* и *Crithidia* spp., а также *Crithidia* spp. и *A. bombi* или *Mattesia* sp. были обнаружены во всех точках сбора за исключением Белово и Гурьевска (рисунок 33). Совместное заражение шмелей микроспоридиями и трипаносоматидами было установлено в 5 из 8 проанализированных точек сбора в Кемеровской и Иркутской областях, республике Алтай и штате Джамму и Кашмир. В 3 точках сбора в Новосибирской и Иркутской областях и республике Алтай были найдены особи шмелей, зараженные одновременно и трипаносоматидами, и неогрегаринами (рисунок 33).

Случаи одновременного заражения шмелей и микроспоридиями, и неогрегаринами не установлены в рамках настоящего исследования. Однако, случай коинфекции *N. bombi* и *A. bombi* был описан у образца *B. terrestris* в Аргентине (Plischuk et al., 2017).

Таким образом, вероятно существует взаимосвязь между уровнем загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами и уровнем зараженности шмелей *N. bombi*, *Crithidia* spp., *A. bombi* и *Mattesia* sp.

### **Шмели-кандидаты для промышленного разведения в качестве опылителей тепличных растений**

В настоящее время компаниями, специализирующимися на коммерческом разведении тепличных опылителей, используются 4 вида шмелей: *B. ignitus*, *B. impatiens*, *B. occidentalis* и *B. terrestris* (Velthuis et al., 2006). Среди этих видов

*B. terrestris* наиболее часто используется в качестве опылителя тепличных растений в Европе, Северной Африке и Азии, а *B. impatiens* - в Северной Америке (Winter et al., 2006). Однако, на сегодняшний день исследователями из разных стран описано большое количество случаев заражения *N. bombi*, *Crithidia* spp. и *A. bombi* шмелей *B. terrestris* и *B. impatiens* (Lipa et al., 1988; Lipa et al., 1996; Jilian et al., 2005; Korner et al., 2005; Cankaya et al., 2006; Larsson, 2007; Plischuk et al., 2009b; Sokolova et al., 2010; Plischuk et al., 2011; Cordes et al., 2012; Maharramov et al., 2013).

В данном исследовании была проведена оценка уровня зараженности наиболее распространенных в южных районах Сибири видов шмелей микроспоридиями, трипаносоматидами и неогрегаринами. Проанализированные образцы *B. veteranus* не были заражены микроспоридиями. Случаи поражения трипаносоматидами и неогрегаринами *B. veteranus* были редкими (6 зараженных образцов из 152 проанализированных). Виды *B. cullumanus*, *B. schrencki* и *B. sichelii* были слабо подвержены заражению всеми тремя паразитическими организмами (таблица 5).

Таким образом, четыре вида шмелей (*B. cullumanus*, *B. schrencki*, *B. sichelii* и *B. veteranus*), которые широко распространены в природных популяциях шмелей в южных районах Сибири, могут рассматриваться в качестве кандидатов для коммерческого разведения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря тому, что шмели легко приспосабливаются к различным климатическим условиям, они являются одними из основных опылителей диких растений и сельскохозяйственных культур (Winter et al., 2006). В последние десятилетия по всему миру наблюдается резкое снижение численности этих насекомых, которое связано с негативным влиянием на них различных паразитических организмов. Установлено, что распространение в популяциях шмелей паразитических микроспоридий рода *Nosema*, трипаносоматид рода *Crithidia*, а также неогрегариин *Apicystis bombi* вносит наибольший вклад в снижение численности данных опылителей (Meeus et al., 2011).

В настоящем исследовании был проведен поиск и анализ последовательностей, представленных в базе данных GenBank, с целью выявления микроспоридий, трипаносоматид и неогрегариин, заражающих насекомых и, в первую очередь, представителей рода *Bombus*. Было установлено, что паразитами шмелей являются микроспоридии рода *Nosema*, трипаносоматиды *C. bombi* и *C. exproeki*, а также неогрегарины *A. bombi*. В дальнейшем эти данные были использованы для молекулярно-биологических исследований, проведенных в данной работе.

На следующем этапе исследования был проведен поиск основных паразитов в образцах шмелей, собранных в 8 точках сбора в южных районах Сибири и в Северной Индии. Всего было проанализировано 1076 особей, относящихся к 23 видам шмелей.

Среди всех проанализированных образцов, 80 особей оказались поражены микроспоридиями. В результате сравнительного и филогенетического анализа было установлено, что в исследуемых популяциях шмелей распространены 5 генетических вариантов микроспоридий *N. bombi*. В данном исследовании эти генетические варианты были обозначены *N. bombi* WS1-WS4, IND. Последовательности генетического варианта *N. bombi* WS2 были идентичны последовательности *N. bombi* (GQ254295), которая была описана Ю. Соколовой и коллегами у зараженных образцов шмелей на территории США (Sokolova et al.,

2010). Остальные варианты последовательностей были описаны впервые в настоящем исследовании.

В исследуемых точках сбора 208 образцов шмелей были поражены двумя видами трипаносоматид, *C. bombi* и *C. exproeki*. Вид *C. bombi* наиболее распространен в южных районах Сибири, а вид *C. exproeki* - на территории штата Джамму и Кашмир. Ранее поражение природных популяций шмелей трипаносоматидами *C. bombi* было зафиксировано в Европе, Северной и Южной Америках, а *C. exproeki* - только в Швейцарии (Schmid-Hempel et al., 2010).

Было установлено, что среди всех проанализированных образцов шмелей 31 особь была поражена неогрегаридами. На территории Кемеровской области в районе поселка Загадное, а также в штате Джамму и Кашмир (Северная Индия) не было обнаружено ни одного насекомого, зараженного этими паразитическими организмами. В результате сравнительного и филогенетического анализов было установлено, что в природных популяциях шмелей из южных районов Сибири распространены два варианта неогрегаринов. Первый вариант соответствует виду *A. bombi*, а второй - описан впервые. Описанный впервые вариант неогрегарины был обозначен как *Mattesia* sp., поскольку он на филогенетическом древе группировался в один кластер вместе с представителями рода *Mattesia*.

Таким образом, полученные данные позволили дополнить информацию о географическом распространении микроспоридий, трипаносоматид и неогрегаринов в природных популяциях шмелей на ранее не исследованных территориях, а также сделать предположение о существовании нового вида неогрегаринов.

Виды *B. terrestris* и *B. impatiens* являются основными опылителями сельскохозяйственных культур, используемыми для коммерческого разведения (Winter et al., 2006). В настоящее время зафиксировано большое количество случаев поражения этих видов шмелей микроспоридиями *N. bombi*, трипаносоматидами *Crithidia* spp. и неогрегаридами *A. bombi* (Lipa et al., 1988; Lipa et al., 1996; Jilian et al., 2005; Korner et al., 2005; Cankaya et al., 2006; Larsson, 2007; Plischuk et al., 2009b; Sokolova et al., 2010; Plischuk et al., 2011; Cordes et al., 2012; Maharramov et al., 2013). В данном исследовании была проведена оценка уровня зараженности наиболее распространенных в южных районах Сибири видов шмелей

*N. bombi*, *Crithidia* spp. и *A. bombi*. Особи видов *B. cullumanus*, *B. schrencki*, *B. sichelii* и *B. veteranus* были слабо подвержены заражению изучаемыми паразитическими организмами. Таким образом, они могут являться кандидатами для разведения в качестве опылителей тепличных растений.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено генетическое разнообразие микроспоридий *Nosema bombi* в природных популяциях шмелей из южных районов Сибири и Северной Индии. Всего выявлено пять вариантов последовательностей *N. bombi*, один из которых был идентичен известной последовательности этого паразита на территории США. Остальные четыре варианта последовательностей были описаны впервые.
2. Природные популяции шмелей в южных районах Сибири и в Северной Индии подвержены заражению двумя видами трипаносоматид: *Crithidia bombi* и *C. exopoki*. Вид *C. bombi* наиболее распространен на территории Сибири, а вид *C. exopoki* - на территории штата Джамму и Кашмир (Северная Индия).
3. В природных популяциях шмелей из южных районов Сибири обнаружено два варианта последовательностей неогрегарин. Первый вариант соответствует виду *Apicystis bombi*, а второй - описан впервые. Этот новый вариант может иметь статус отдельного вида внутри рода *Mattesia*.
4. Виды шмелей *Bombus cullumanus*, *B. schrencki*, *B. sichelii* и *B. veteranus* слабо заражены паразитическими организмами *N. bombi*, *Crithidia* spp., *A. bombi* и *Mattesia* sp. поэтому могут являться кандидатами для промышленного разведения в качестве опылителей в теплицах.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бывальцев А.М. Фауна шмелей (Hymenoptera, Apidae, Bombini) лесостепной и степной зон Западно-Сибирской равнины // Евразийский энтомологический журнал. 2008. Т. 7. № 2. С. 141–147.
2. Бывальцев А.М. Население шмелей (Hymenoptera: Apidae, Bombini) Новосибирска и его окрестностей // Сибирский экологический журнал. 2009. Т. 16. № 3. С. 395–404.
3. Бывальцев А.М. et al. Разнообразие и обилие шмелей (Hymenoptera: Apidae, *Bombus*) в степях Хакасии // Чтения памяти А. И. Куренцова. 2015. Т. 26. С. 264–276.
4. Бывальцев А.М. et al. Фауна шмелей (Hymenoptera, Apidae: *Bombus* Latreille) Красноярского края // Чтения Памяти А.И. Куренцова. 2016. Т. 27. С. 137–154.
5. Горбунов П.С. Эндопаразитические жгутиконосцы рода *Crithidia* (Trypanosomatidae, Zoomastigophorea) из пищеварительного тракта шмелей // Зоологический журнал. 1987. Т. 66. № 12. С. 1775–1780.
6. Горбунов П.С. Особенности жизненного цикла жгутиконосца *Crithidia bombi* (Protozoa, Trypanosomatidae) // Зоологический журнал. 1996. Т. 75. № 6. С. 803–810.
7. Драган С.В., Сазанаква Е.В., Листвягова Н.А. Новые находки шмелей рода *Bombus* Latreille, 1802 (Hymenoptera: Apidae) в Хакасии (Россия) // Кавказский энтомологический бюллетень. 2017. Т. 13. № 2. С. 243–246.
8. Крайнов И.В., Кассал Б.Ю. Зоогеографическая характеристика трибы Шмели (Hymenoptera: Apidae, Bombini) на территории Западной Сибири // Омский научный вестник. 2014. Т. 1. № 128. С. 186–189.
9. Лузянин С.Л. Видовое разнообразие и экология пчёл трибы Bombini (Hymenoptera, Apidae) естественных и урбанизированных экосистем Кузнецко-Салаирской горной области. Барнаул: , 2009. 20 с.
10. Подлипаев С.А. Каталог мировой фауны простейших семейства Trypanosomatidae / под ред. М.В. Крылов. Ленинград: Труды ЗИН РАН, 1990. 177 с.
11. Подлипаев С.А., Фролов А.О. Филогения трипаносоматид: молекулярный и морфологический подходы // Паразитология. 2000. Т. 34. № 3. С. 169–182.
12. Прощалыкин М.Ю., Купянская А.Н. Пчелы семейства Apidae (Hymenoptera, Apoidea) Забайкалья // Евразийский энтомологический журнал. 2009. Т. 8. № 1. С.

59–68.

13. Рупперт Э.Э., Фокс Р.С., Барнс Р.Д. Зоология беспозвоночных. Функциональные и эволюционные аспекты. Том 1. Протисты и низшие многоклеточные. , 2008. 484 с.

14. Фролов А.О., Малышева М.Н., Ю К.А. Трансформации жизненных циклов в эволюционной истории трипаносоматид. Макротрансформации // Паразитология. 2015. № January 2015. С. 233–256.

15. Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool. // J. Mol. Biol. 1990. Т. 215. № 3. С. 403–10.

16. Arbulo N. et al. High prevalence and infection levels of *Nosema ceranae* in bumblebees *Bombus atratus* and *Bombus bellicosus* from Uruguay // J. Invertebr. Pathol. 2015. Т. 130. С. 165–168.

17. Bandi C. et al. Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism // Trends Parasitol. 2001. Т. 17. № 2. С. 88–94.

18. Beznoussenko G. V et al. Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and vesicular mechanisms of function. // J. Cell Sci. 2007. Т. 120. № March. С. 1288–1298.

19. Bigliardi E. et al. Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore. // J. Eukaryot. Microbiol. 1996. Т. 43. № 3. С. 181–6.

20. Bigliardi E., Carapelli A. Microsporidia in the springtail *Isotomurus fucicolus* (Collembola, Isotomidae) and possible pathways of parasite transmission // Ital. J. Zool. 2002. Т. 69. С. 109–113.

21. Brown M.J.F. Microsporidia : An emerging threat to bumblebees? // Trends Parasitol. 2017. С. 1–9.

22. Cameron S.A. et al. Patterns of widespread decline in North American bumble bees // Proc. Natl. Acad. Sci. 2011. Т. 108. № 2. С. 662–667.

23. Cameron S.A., Hines H.M., Williams P.H. A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*) // Biol. J. Linn. Soc. 2007. Т. 91. № 1. С. 161–188.

24. Cankaya N.E., Kaftanoglu O. An investigation of some disease and parasites of bumblebee queens (*Bombus terrestris* L.) in Turkey // Pakistan J. Biol. Sci. 2006. Т. 9. № 7. С. 1282–1286.

25. Chen Y.P., Siede R. Honey bee viruses // Adv. Virus Res. 2007. Т. 70. № 7. С. 33–

80.

26. Clopper C., Pearson E.S. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial // *Biometrika*. 1934. T. 26. № 4. C. 404–413.
27. Cordes N. et al. Interspecific geographic distribution and variation of the pathogens *Nosema bombi* and *Crithidia species* in United States bumble bee populations // *J. Invertebr. Pathol.* 2012. T. 109. № 2. C. 209–216.
28. Cornman R.S. et al. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees // *PLoS Pathog.* 2009. T. 5. № 6. C. e1000466.
29. Corradi N., Keeling P.J. Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions // *Fungal Biol. Rev.* 2009. T. 23. № 1–2. C. 1–8.
30. Cury J. et al. The mitoribosomes of a chloramphenicol-resistant cytoplasmic mutant of *Tetrahymena pyriformis* differ from those of the wild strain // 1981. C. 121–130.
31. D’avila-Levy C.M. et al. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2015. T. 110. № 8. C. 956–965.
32. DeGraaf D.C. et al. Early development of *Nosema apis* in the midgut epithelium of the honeybee // *J. Invertebr. Pathol.* 1994. T. 63. C. 74–81.
33. Desportes I., Schrevel J. *Treatise on zoology – anatomy, taxonomy, biology. The gregarines.* , 2013. 1-781 c.
34. Dunn A.M., Smith J.E. Microsporidian life cycles and diversity: The relationship between virulence and transmission // *Microbes Infect.* 2001. T. 3. № 5. C. 381–388.
35. Dunn a. M. et al. Evolutionary ecology of vertically transmitted parasites: transovarial transmission of a microsporidian sex ratio distorter in *Gammarus duebeni* // *Parasitology.* 1995. T. 111. № S1. C. S91.
36. Duque T.L.A. et al. Autophagic balance between mammals and Protozoa: a molecular, biochemical and morphological review of Apicomplexa and Trypanosomatidae infections // *Autophagy - a double-edged sword - cell survival or death?* : InTech, 2013. C. 522.
37. Ebert D., Herre E.A. The evolution of parasitic diseases // *Parasitol. Today.* 1996. T. 12. № 3. C. 96–101.
38. Ercan N., Onus A.N. The effects of bumblebees (*Bombus terrestris* L.) on fruit quality and yield of pepper (*Capsicum annuum* L.) grown in an unheated greenhouse //

Isr. J. Plant Sci. 2003. T. 51. № 4. C. 275–283.

39. Erler S. et al. Sex, horizontal transmission, and multiple hosts prevent local adaptation of *Crithidia bombi*, a parasite of bumblebees (*Bombus* spp.) // Ecol. Evol. 2012. T. 2. № 5. C. 930–940.

40. Evans J.D., Schwarz R.S. Bees brought to their knees: Microbes affecting honey bee health // Trends Microbiol. 2011. T. 19. № 12. C. 614–620.

41. Fantham H.B., Porter A. The morphology, biology and economic importance of *Nosema bombi* n.sp., parasitic in various humble bees (*Bombus* spp.) // Ann. Trop. Med. Parasitol. 1914. T. 8. C. 623–638.

42. Fitzpatrick Ú. et al. Rarity and decline in bumblebees - A test of causes and correlates in the Irish fauna // Biol. Conserv. 2007. T. 136. № 2. C. 185–194.

43. Fries I., Granados R.R., Morse R.A. Intracellular germination of spores of *Nosema apis* Z // Apidologie. 1992. T. 23. C. 61–70.

44. Gallot-Lavallée M. et al. Large scale patterns of abundance and distribution of parasites in Mexican bumblebees // J. Invertebr. Pathol. 2016. T. 133. C. 73–82.

45. Gamboa V. et al. Bee pathogens found in *Bombus atratus* from Colombia: A case study // J. Invertebr. Pathol. 2015. T. 129. C. 36–39.

46. Garbarino J.E., Gibbons I.R. Expression and genomic analysis of midasin, a novel and highly conserved AAA protein distantly related to dynein. // BMC Genomics. 2002. T. 3. C. 18.

47. Gill E.E., Becnel J.J., Fast N.M. ESTs from the microsporidian *Edhazardia aedis* // BMC Genomics. 2008. T. 9. C. 296.

48. Gisder S. et al. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia // Environ. Microbiol. 2011. T. 13. № 2. C. 404–413.

49. Goulson D. Impacts of non-native bumblebees in Western Europe and North America // Appl. Entomol. Zool. 2010. T. 45. № 1. C. 7–12.

50. Goulson D., Whitehorn P., Fowley M. Influence of urbanisation on the prevalence of protozoan parasites of bumblebees // Ecol. Entomol. 2012. T. 37. № 1. C. 83–89.

51. Graystock P. et al. The Trojan hives: Pollinator pathogens, imported and distributed in bumblebee colonies // J. Appl. Ecol. 2013. T. 50. C. 1207–1215.

52. Graystock P., Goulson D., Hughes W.O.H. Parasites in bloom: flowers aid dispersal

- and transmission of pollinator parasites within and between bee species // Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 2015. T. 282. № 1813. C. 20151371.
53. Han B., Weiss L.M. Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the Fungal Kingdom // Microbiol. Spectr. 2017. T. 5. № 2.
54. Higes M. et al. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse // Environ. Microbiol. 2008. T. 10. № 10. C. 2659–2669.
55. Hurst G.D.D. et al. The effect of infection with male-killing *Rickettsia* on the demography of female *Adalia bipunctata* L. (two spot ladybird) // Heredity (Edinb). 1994. T. 73. № 3. C. 309–316.
56. Jaskowska E. et al. Phytomonas: Trypanosomatids adapted to plant environments // PLoS Pathog. 2015. T. 11. № 1. C. 1–17.
57. Jilian L. et al. *Nosema bombi* a microsporidian pathogen of the bumble bee *bombus terrestris* (L.) // J. Apic. Sci. 2005. T. 49. № 1. C. 53–57.
58. Katinka M.D. et al. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi* // Nature. 2001. T. 414. № 6862. C. 450–453.
59. Keeling P.J., Fast N.M. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites // Annu.Rev.Microbiol. 2002. T. 56. C. 93–116.
60. Kellen W.R. et al. Host–parasite relationships of some *Thelohania* from mosquitoes (Nosematidae: Microsporidia) // J. Invertebr. Pathol. 1965. C. 161–166.
61. Keohane E.M., Weiss L.M. Characterization and function of the microsporidian polar tube: A review // Folia Parasitol. (Praha). 1998. T. 45. № 2. C. 117–127.
62. Klee J., Tay W.T., Paxton R.J. Specific and sensitive detection of *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) in bumble bees (*Bombus* spp.; Hymenoptera: Apidae) by PCR of partial rRNA gene sequences // J. Invertebr. Pathol. 2006. T. 91. № 2. C. 98–104.
63. Korner P., Schmid-Hempel P. Correlates of parasite load in bumblebees in an Alpine habitat // Entomol. Sci. 2005. T. 8. C. 151–160.
64. Kosior A. et al. The decline of the bumble bees and cuckoo bees (Hymenoptera: Apidae: Bombini) of Western and Central Europe // Oryx. 2007. T. 41. № 1. C. 79.
65. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. T. 33. № 7. C. 1870–1874.
66. Kupianskaya A.N., Proshchalykin M.Y., Lelej A.S. Contribution to the fauna of

- bumble bees (Hymenoptera, Apidae: *Bombus* Latreille, 1802) of the Republic of Tyva, Eastern Siberia // Euroasian Entomol. J. 2014. T. 13. № 3. C. 290–294.
67. Larsson J.I.R. et al. Redescription of *Pleistophora intestinalis* Chatton, 1907, a microsporidian parasite of *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*, with establishment of the new genus *Glugoides* (Microspora, Glugeidae) // Eur. J. Protistol. 1996. T. 32. № 2. C. 251–261.
68. Larsson J.I.R. Cytological variation and pathogenicity of the bumble bee parasite *Nosema bombi* (Microspora, Nosematidae) // J. Invertebr. Pathol. 2007. T. 94. № 1. C. 1–11.
69. Lee S.C. et al. Evolution of the sex-related locus and genomic features shared in microsporidia and fungi // PLoS One. 2010. T. 5. № 5.
70. Lefort V., Longueville J.-E., Gascuel O. SMS: Smart Model Selection in PhyML // Mol. Biol. Evol. 2017. T. 34. № 9. C. 2422–2424.
71. Li J. et al. Comparison of the colony development of two native bumblebee species *Bombus ignitus* and *Bombus lucorum* as candidates for commercial pollination in China // J. Apic. Res. 2008. T. 47. № 1. C. 22–26.
72. Li J. et al. Diversity of *Nosema* associated with bumblebees (*Bombus* spp.) from China // Int. J. Parasitol. 2012. T. 42. № 1. C. 49–61.
73. Lipa J.J., Triggiani O. *Crithidia bombi* sp. n. a flagellated parasite of a bumblebee *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera, Apidae) // Acta Protozool. 1988. T. 27. C. 187–190.
74. Lipa J.J., Triggiani O. *Apicystis* gen nov and *Apicystis bombi* (Liu, Macfarlane & Pengelly) comb nov (Protozoa: Neogregarinida), a cosmopolitan parasite of *Bombus* and *Apis* (Hymenoptera: Apidae) // Apidologie. 1996. T. 27. № 1. C. 29–34.
75. Liu H.J., Macfarlane R.P., Pengelly D.H. *Mattesia bombi* n. sp (Neogregarinida: Ophrocystidae), a parasite of *Bombus* (Hymenoptera: Apidae) // J. Invertebr. Pathol. 1974. T. 231. C. 225–231.
76. Lom J., Vavra J. The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores // Acta Protozool. 1963. C. 81–92.
77. Lopes A.H. et al. Trypanosomatids: odd organisms, devastating diseases // Open Parasitol. J. 2010. T. 4. № 1. C. 30–59.
78. Lukeš J. et al. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates // Mol. Biochem. Parasitol. 2014. T. 195. № 2. C. 115–122.

79. Maharramov J. et al. Genetic variability of the neogregarine *Apicystis bombi*, an etiological agent of an emergent bumblebee disease // PLoS One. 2013. T. 8. № 12. C. e81475.
80. Martins A.C., Melo G.A.R. Has the bumblebee *Bombus bellicosus* gone extinct in the northern portion of its distribution range in Brazil? // J. Insect Conserv. 2010. T. 14. № 2. C. 207–210.
81. Meeus I. et al. Multiplex PCR detection of slowly-evolving trypanosomatids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers // J. Appl. Microbiol. 2010a. T. 109. № 1. C. 107–115.
82. Meeus I. et al. Multiplex RT-PCR with broad-range primers and an exogenous internal amplification control for the detection of honeybee viruses in bumblebees // J. Invertebr. Pathol. 2010b. T. 105. № 2. C. 200–203.
83. Meeus I. et al. Effects of invasive parasites on bumble bee declines // Conserv. Biol. 2011. T. 25. № 4. C. 662–671.
84. Michener C.D. The Bees of the World. : The Johns Hopkins University Press, 2000. 953 c.
85. O'Mahony E.M., Tay W.T., Paxton R.J. Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidian *Nosema bombi* // J. Eukaryot. Microbiol. 2007. T. 54. № 1. C. 103–109.
86. Okonechnikov K. et al. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012. T. 28. № 8. C. 1166–1167.
87. Otti O., Schmid-Hempel P. A field experiment on the effect of *Nosema bombi* in colonies of the bumblebee *Bombus terrestris* // Ecol. Entomol. 2008. T. 33. № 5. C. 577–582.
88. Peyretilade E. et al. Extreme reduction and compaction of microsporidian genomes // Res. Microbiol. 2011. T. 162. № 6. C. 598–606.
89. Plischuk S. et al. South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*) // Environ. Microbiol. Rep. 2009a. T. 1. № 2. C. 131–135.
90. Plischuk S. et al. *Apicystis bombi* (Apicomplexa: Neogregarinorida) parasitizing *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Argentina // Environ. Microbiol. Rep. 2011. T. 3. № 5. C. 565–568.

91. Plischuk S. et al. Long-term prevalence of the protists *Crithidia bombi* and *Apicystis bombi* and detection of the microsporidium *Nosema bombi* in invasive bumble bees // Environ. Microbiol. Rep. 2017. T. 9. № 2. C. 169–173.
92. Plischuk S., Lange C.E. Invasive *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) parasitized by a flagellate (Euglenozoa: Kinetoplastea) and a neogregarine (Apicomplexa: Neogregarinorida) // J. Invertebr. Pathol. 2009b. T. 102. № 3. C. 263–265.
93. Popp M., Erler S., Lattorff H.M.G. Seasonal variability of prevalence and occurrence of multiple infections shape the population structure of *Crithidia bombi*, an intestinal parasite of bumblebees (*Bombus* spp.) // Microbiologyopen. 2012. T. 1. № 4. C. 362–372.
94. Qiagen. DNeasy® Blood & Tissue Handbook For purification of total DNA from animal blood animal tissue // DNeasy® Blood Tissue Handb. Purif. Total DNA from Anim. blood Anim. tissue. 2006. № July. C. 1–59.
95. Qiagen. QIAquick® Spin Handbook QIAGEN Sample and Assay Technologies // Qiagen. 2008. T. Volume 20,. № March. C. 9–10.
96. Rueckert S., Chantangsi C., Leander B.S. Molecular systematics of marine gregarines (Apicomplexa) from North-eastern Pacific polychaetes and nemerteans, with descriptions of three novel species: *Lecudina phyllochaetopteri* sp. nov., *Difficilina tubulani* sp. nov. and *Difficilina paranemertis* sp. n // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. T. 60. № 11. C. 2681–2690.
97. Saini M.S., Raina R.H., Khan Z.H. Species diversity of bumblebees (Hymenoptera: Apidae) from different mountain regions of Kashmir Himalayas // J. Sci. Res. 2012. T. 4. № 1. C. 263–272.
98. Salathe R.M., Schmid-Hempel P. The genotypic structure of a multi-host bumblebee parasite suggests a role for ecological niche overlap // PLoS One. 2011. T. 6. № 8. C. e22054.
99. Sároszpataki M., Novák J., Molnár V. Assessing the threatened status of bumble bee species (Hymenoptera: Apidae) in Hungary, Central Europe // Biodivers. Conserv. 2005. T. 14. № 10. C. 2437–2446.
100. Schmid-Hempel P. On the evolutionary ecology of host-parasite interactions: Addressing the question with regard to bumblebees and their parasites // Naturwissenschaften. 2001. T. 88. № 4. C. 147–158.

101. Schmid-Hempel P., Reber Funk C. The distribution of genotypes of the trypanosome parasite, *Crithidia bombi*, in populations of its host, *Bombus terrestris*. // *Parasitology*. 2004. T. 129. C. 147–158.
102. Schmid-Hempel R. et al. Genetic exchange and emergence of novel strains in directly transmitted trypanosomatids // *Infect. Genet. Evol.* 2011. T. 11. № 3. C. 564–571.
103. Schmid-Hempel R. et al. The invasion of southern South America by imported bumblebees and associated parasites // *J. Anim. Ecol.* 2014. T. 83. № 4. C. 823–837.
104. Schmid-Hempel R., Tognazzo M. Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees // *J. Eukaryot. Microbiol.* 2010. T. 57. № 4. C. 337–345.
105. Shykoff J.A., Schmid-Hempel P. Incidence and effects of four parasites in natural populations of bumble bees in Switzerland // *Apidologie*. 1991. T. 22. № 2. C. 117–125.
106. Smith J.E., Dunn A.M. Transovarial transmission // *Parasitol. Today*. 1991. T. 7. № 6. C. 146–148.
107. Sokolova Y.Y., Sokolov I.M., Carlton C.E. Identification of *Nosema bombi* Fantham and Porter 1914 (Microsporidia) in *Bombus impatiens* and *Bombus sandersoni* from Great Smoky Mountains National Park (USA) // *J. Invertebr. Pathol.* 2010. T. 103. C. 71–73.
108. Solter L.F., Maddox J. V. Timing of an early sporulation sequence of microsporidia in the genus *Vairimorpha* (Microsporidia: burenellidae) // *J Invertebr Pathol.* 1998. T. 72. № 3. C. 323–329.
109. Souza W. de. An introduction to the structural organization of parasitic Protozoa // *Curr. Pharm. Des.* 2008. T. 14. C. 822–838.
110. Sprague V., Becnel J.J., Hazard E.I. Taxonomy of phylum microspora. // *Crit. Rev. Microbiol.* 1992. T. 18. № 5–6. C. 285–395.
111. Sridhar U. et al. Ocular Microsporidiosis — Our Experience in a Tertiary Care Centre in North India // 2015. № August. C. 130–138.
112. Steen J.J.M. Van der. Infection and transmission of *Nosema bombi* in *Bombus terrestris* colonies and its effect on hibernation, mating and colony founding // *Apidologie*. 2008. T. 39. № 2. C. 273–282.
113. Szentgyörgyi H. et al. Bumblebees (Bombidae) along pollution gradient - heavy

- metal accumulation, species diversity, and *Nosema bombi* infection level // Polish J. Ecol. 2011. T. 59. № 3. C. 599–610.
114. Tay W.T., O'Mahony E.M., Paxton R.J. Complete rRNA gene sequences reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus* spp.) hosts and contains multiple polymorphic sites // J. Eukaryot. Microbiol. 2005. T. 52. № 6. C. 505–513.
115. Trifinopoulos J. et al. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis // Nucleic Acids Res. 2016. T. 44. C. W232–W235.
116. Undeen A.H., Epsky N.D. In vitro and in vivo germination of *Nosema locustae* (Microspora: Nosematidae) spores // J. Invertebr. Pathol. 1990. T. 56. № 3. C. 371–379.
117. Vavra J., Larsson J.I. Structure of the microsporidia // Microsporidia and Microsporidiosis. , 1999. C. 7–84.
118. Velthuis H.H.W., Doorn A. Van. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination // Apidologie. 2006. T. 37. C. 421–451.
119. Vinckier D. et al. A freeze-fracture study of microsporidia (Protozoa: Microspora) // Eur. J. Protistol. 1993. T. 29. № 4. C. 370–380.
120. Vivares C. et al. Chromosomal localization of five genes in *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia) // J. Eukaryot. Microbiol. 1996. T. 46. C. 97.
121. Vivier E. The microsporidia of the protozoa // Protistology. 1975. T. 48. C. 345–361.
122. Vossbrinck C.R., Andreadis T.G. The phylogenetic position of *Ovavesicula popilliae* (Microsporidia) and its relationship to *Antonospora* and *Paranosema* based on small subunit rDNA analysis // J. Invertebr. Pathol. 2007. T. 96. C. 270–273.
123. Vossbrinck C.R., Debrunner-Vossbrinck B.A. Molecular phylogeny of the Microsporidia: Ecological, ultrastructural and taxonomic considerations // Folia Parasitol. (Praha). 2005. T. 52. № 1–2. C. 131–142.
124. Votýpka J. et al. New approaches to systematics of Trypanosomatidae: Criteria for taxonomic (re)description // Trends Parasitol. 2015. T. 31. № 10. C. 460–469.
125. Weidner E. Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells // Zeitschrift fur Parasitenkd. 1972. T. 40. № 3. C. 227–242.
126. Weiser J. A new classification of the Schizogregarina // J. Protozool. 1955. T. 2. C.

6–12.

127. Weiss L.M. Microsporidia: Emerging pathogenic protists // *Acta Trop.* 2001. T. 78. № 2. C. 89–102.
128. Wheeler R.J., Gluenz E., Gull K. The limits on trypanosomatid morphological diversity // *PLoS One.* 2013. T. 8. № 11. C. e79581.
129. Williams B.A.P. et al. Genome sequence surveys of *Brachiola algerae* and *Edhazardia aedis* reveal microsporidia with low gene densities. // *BMC Genomics.* 2008a. T. 9. № 1. C. 200.
130. Williams P.H. The Distribution and decline of British bumble bees (*Bombus* Latr.) // *J. Apic. Res.* 1982. T. 21. № 4. C. 236–245.
131. Williams P.H. et al. A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*) // *Apidologie.* 2008b. T. 39. C. 1–29.
132. Winter K. et al. Importation of non-native bumble bees into North America: potential consequences of using *Bombus terrestris* and other non-native bumble bees for greenhouse crop pollination in Canada, Mexico, and the United States. , 2006. 1-33 c.
133. Xiang H. et al. New evidence on the relationship between Microsporidia and Fungi: a genome-wide analysis by DarkHorse software. // *Can. J. Microbiol.* 2014. T. 60. № 9. C. 557–68.
134. Xie Z., Williams P.H., Tang Y. The effect of grazing on bumblebees in the high rangelands of the eastern Tibetan Plateau of Sichuan // *J. Insect Conserv.* 2008. T. 12. № 6. C. 695–703.
135. Yourth C.P., Brown M.J.F., Schmid-Hempel P. Effects of natal and novel *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae) infections on *Bombus terrestris* hosts // *Insectes Soc.* 2008. T. 55. № 1. C. 86–90.
136. Yourth C.P., Schmid-Hempel P. Serial passage of the parasite *Crithidia bombi* within a colony of its host, *Bombus terrestris*, reduces success in unrelated hosts // *Proc. R. Soc. B-Biological Sci.* 2006. T. 273. № 1587. C. 655–659.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение 1

**Таблица.** Список праймеров, использованных в настоящем исследовании.

Название праймера	Последовательность праймера	Ген, организм	Литературный источник
SSU-f1 SSU-r1	5'- CACCAGGTTGATTCTGCCT - 3' 5'- GTTACCCGTCACCTGCCTTG - 3'	SSU rRNA, <i>N. bombi</i>	(Szentgyörgyi et al., 2011)
SSU-r1b	5'- TGTTTCGTCCAGTCAGGGTCGTCA - 3'	SSU rRNA, <i>N. bombi</i>	(Tay et al., 2005)
SSU-f2 SSU-r2	5'- CTGTATAGTTGGGAGAGAGATGAA - 3' 5'- TTAGATAGCGACGGGCGGTGTG - 3'	SSU rRNA, <i>N. bombi</i>	(Tay et al., 2005)
ITS-f1 ITS-r1	5'- TGAATGTGTCCCTGTTCTTTGTAC - 3' 5'- TAATTATAATCTCCTTGGTCCGTG - 3'	SSU rRNA, ITS2 и LSU rRNA, <i>N. bombi</i>	(Tay et al., 2005)
SEF SER	5' – CTTTTGGTCGGTGGAGTGAT – 3' 5' – GGACGTAATCGGCACAGTTT – 3'	18S rRNA, <i>Crithidia</i> spp.	(Meeus et al., 2010a)
G3 G4a	5'-TTYGCCGYATYGGYCGCATGG-3' 5'-GTTYTGCAGSGTCGCCTTGG-3'	<i>gGAPDH</i> , <i>Crithidia</i> spp.	(Schmid-Hempel et al., 2010)
ApUF2 ApBR1	5' – AGGGATATTTAAACCCATCGAA – 3' 5' – RACCACAAGAGTACGGAATGC – 3'	18S rRNA, <i>A. bombi</i>	(Meeus et al., 2010a)

## Приложение 2

**Таблица.** Виды микроспоридий, поражающих представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены микроспоридии, паразитирующие на насекомых отряда Нуменоптера.

Семейство, род микроспоридий	Вид микроспоридий	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
<i>suborder Pansporoblastina</i>			
Amblyosporidae; Amblyospora	<i>Amblyospora</i> sp.	<i>Culex salinarius</i> , Diptera	U68474
	<i>Amblyospora</i> sp.	<i>Culex nigripalpus</i> , Diptera	AY090053
	<i>Amblyospora</i> sp.	<i>Simulium</i> sp., Diptera	AJ252949
	<i>Amblyospora</i> sp.	<i>Simulium pertinax</i> , Diptera	KC855553, KC855558
	<i>Amblyospora bakcharia</i>	<i>Ochlerotatus excrucians</i> , Diptera	JF826402
	<i>Amblyospora baritia</i>	<i>Ochlerotatus cataphylla</i> , Diptera	JF826403
	<i>Amblyospora bogashovia</i>	<i>Ochlerotatus excrucians</i> , Diptera	JF826404
	<i>Amblyospora californica</i>	<i>Culex tarsalis</i> , Diptera	U68473
	<i>Amblyospora canadensis</i>	<i>Aedes canadensis</i> , Diptera	AY090056
	<i>Amblyospora connecticus</i>	<i>Aedes cantator</i> , Diptera	AF025685
	<i>Amblyospora criniferis</i>	<i>Aedes cernifera</i> , Diptera	AY090061
	<i>Amblyospora cinerei</i>	<i>Aedes cinereus</i> , Diptera	AY090057
	<i>Amblyospora chulymia</i>	<i>Ochlerotatus caspius</i> , Diptera	JF826405
	<i>Amblyospora excrucii</i>	<i>Aedes excrucians</i> , Diptera	AY090043
	<i>Amblyospora ferocious</i>	<i>Psorophora ferox</i> , Diptera	AY090062

**Таблица (продолжение).** Виды микроспоридий, поражающих представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены микроспоридии, паразитирующие на насекомых отряда Нуменоптера.

Семейство, род микроспоридий	Вид микроспоридий	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
	<i>Amblyospora flavescens</i>	<i>Ochlerotatus diantaeus</i> , Diptera	JF826406
	<i>Amblyospora hristinia</i>	<i>Ochlerotatus communis</i> , Diptera	JF826407
	<i>Amblyospora indicola</i>	<i>Culex sitiens</i> Diptera	AY090051
	<i>Amblyospora jurginia</i>	<i>Ochlerotatus excrucians</i> , Diptera	JF826408
	<i>Amblyospora kazankia</i>	<i>Ochlerotatus diantaeus</i> , Diptera	JF826409
	<i>Amblyospora khaliulini</i>	<i>Aedes communis</i> , Diptera	AY090045
	<i>Amblyospora kolarovi</i>	<i>Ochlerotatus punctor</i> , Diptera	JF826410
	<i>Amblyospora mavlukevia</i>	<i>Aedes cinereus</i> , Diptera	JF826411
	<i>Amblyospora mocrushinia</i>	<i>Aedes cinereus</i> , Diptera	JF826412
	<i>Amblyospora modestium</i>	<i>Culex modestus</i> , Diptera	JF826413
	<i>Amblyospora opacita</i>	<i>Culex territans</i> , Diptera	AY090052
	<i>Amblyospora rugosa</i>	<i>Ochlerotatus cataphylla</i> , Diptera	JF826414
	<i>Amblyospora rugosa</i>	<i>Ochlerotatus cantans</i> , Diptera	HM594265
	<i>Amblyospora salairia</i>	<i>Aedes cinereus</i> , Diptera	JF826415
	<i>Amblyospora salinaria</i>	<i>Culex salinarius</i> , Diptera	AY326270

**Таблица (продолжение).** Виды микроспоридий, поражающих представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены микроспоридии, паразитирующие на насекомых отряда Нуменоптера.

Семейство, род микроспоридий	Вид микроспоридий	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
	<i>Amblyospora severinia</i>	<i>Ochlerotatus excrucians</i> , Diptera	JF826417
	<i>Amblyospora shegaria</i>	<i>Aedes cinereus</i> , Diptera	JF826416
	<i>Amblyospora stictici</i>	<i>Aedes sticticus</i> , Diptera	AY090049
	<i>Amblyospora stimuli</i>	<i>Aedes stimulans</i> , Diptera	AF027685
	<i>Amblyospora timirasia</i>	<i>Aedes cinereus</i> , Diptera	JF826418
	<i>Amblyospora weiseri</i>	<i>Aedes cantans</i> , Diptera	AY090048
Amblyosporidae; Andreanna	<i>Andreanna caspii</i>	<i>Ochlerotatus caspius</i> , Diptera	EU664450
Amblyosporidae; Berwaldia	<i>Berwaldia schaefernai</i>	Culicidae, Diptera	AY090042
Amblyosporidae; Intrapredatorus	<i>Intrapredatorus barri</i>	<i>Culex fuscanus</i> , Diptera	AY013359
Amblyosporidae; Novothelohania	<i>Novothelohania ovalae</i>	<i>Ochlerotatus caspius</i> , Diptera	JF826419
Amblyosporidae; Parathelohania	<i>Parathelohania anophelis</i>	<i>Anopheles quadrimaculatus</i> , Diptera	AF027682
	<i>Parathelohania divulgata</i>	<i>Anopheles messeae</i> , Diptera	JF826420
	<i>Parathelohania obesa</i>	<i>Anopheles crucians</i> , Diptera	AY090065
	<i>Parathelohania tomski</i>	<i>Anopheles messeae</i> , Diptera	JF826421
Amblyosporidae; Takaokaspora	<i>Takaokaspora nipponicus</i>	<i>Ochlerotatus japonicus</i> , Diptera	KF110991

**Таблица (продолжение).** Виды микроспоридий, поражающих представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены микроспоридии, паразитирующие на насекомых отряда Нуменоптера.

Семейство, род микроспоридий	Вид микроспоридий	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
	<i>Takaokaspora nipponicus</i>	<i>Ochlerotatus hatorii</i> , Diptera	KF110990
Burenellidae; Multilamina	<i>Multilamina teevani</i>	<i>Uncitermes teevani</i> , Isoptera	KC990122
Burenellidae; Vairimorpha	<i>Vairimorpha ceraces</i>	<i>Cerace stipatana</i> , Lepidoptera	EU267796
	<i>Vairimorpha imperfecta</i>	<i>Plutella xylostella</i> , Lepidoptera	AJ131646
	<i>Vairimorpha lymantriae</i>	<i>Lymantria dispar</i> , Lepidoptera	AF033315
	<i>Vairimorpha necatrix</i>	<i>Pseudaletia unipuncta</i> , Lepidoptera	DQ996241
	<i>Vairimorpha</i> sp.	<i>Agrilus anxius</i> , Coleoptera	GQ379702, GQ337705
	<i>Vairimorpha</i> sp.	<i>Antheraea assamensis</i> , Lepidoptera	JQ083083
	<i>Vairimorpha</i> sp.	<i>Bombyx mori</i> , Lepidoptera	HQ891818
	<i>Vairimorpha</i> sp.	<i>Bombyx mori</i> , Lepidoptera	D85502
	<i>Vairimorpha</i> sp.	<i>Ocinara lida</i> , Lepidoptera	EU487251
	<i>Vairimorpha</i> sp.	<i>Pieris rapae</i> , Lepidoptera	KP208681
	<i>Vairimorpha</i> sp.	<i>Plutella xylostella</i> , Lepidoptera	AF124331
<b>Dubosqiidae; Myrmecomorba</b>	<b><i>Myrmecomorba nylanderiae</i></b>	<b><i>Nylanderia fulva</i>, Hymenoptera</b>	<b>KR704917</b>
Glugeidae; Cystosporogenes	<i>Cystosporogenes</i> sp.	<i>Agrilus anxius</i> , Coleoptera	GQ379704

**Таблица (продолжение).** Виды микроспоридий, поражающих представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены микроспоридии, паразитирующие на насекомых отряда Нуменоптера.

Семейство, род микроспоридий	Вид микроспоридий	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
	<i>Cystosporogenes</i> sp.	<i>Choristoneura fumiferana</i> , Lepidoptera	AY566237
	<i>Cystosporogenes legeri</i>	<i>Lobesia botrana</i> , Lepidoptera	AY233131
	<i>Cystosporogenes operophterae</i>	<i>Operophtera brumata</i> , Lepidoptera	AJ302320
Pleistophoridae; Ovavesicula	<i>Ovavesicula popilliae</i>	<i>Popillia japonica</i> , Coleoptera	EF564602
Pleistophoridae; Pleistophora	<i>Pleistophora</i> sp.	<i>Bombyx mori</i> , Lepidoptera	D85500
Pleistophoridae; Vavraia	<i>Vavraia culicis</i>	<i>Aedes albopictus</i> , Diptera	AJ252961
	<i>Vavraia oncoeperae</i>	<i>Wiseana</i> spp., Lepidoptera	X74112
Polydispyrenia	<i>Polydispyrenia simuli</i>	<i>Odagamia ornata</i> , Diptera	AY090069
	<i>Polydispyrenia simulii</i>	<i>Simulium</i> sp., Diptera	AJ252960
	<i>Polydispyrenia</i> sp.	<i>Simulium pertinax</i> , Diptera	KC855552
Thelohaniidae; Hyalinocysta	<i>Hyalinocysta chapmani</i>	<i>Culiseta melanura</i> , Diptera	AF483837
Thelohaniidae; Thelohania	<i>Thelohania disparis</i>	<i>Lymantria dispar</i> , Lepidoptera	DQ272237
	<b><i>Thelohania solenopsae</i></b>	<b><i>Solenopsis invicta</i>, Hymenoptera</b>	<b>AF031538</b>
Tuzetiidae; Janacekia	<i>Janacekia debaisieuxi</i>	<i>Odagamia ornate</i> , Diptera	AY090070

**Таблица (продолжение).** Виды микроспоридий, поражающих представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены микроспоридии, паразитирующие на насекомых отряда Нуменоптера.

Семейство, род микроспоридий	Вид микроспоридий	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
<i>suborder Apansporoblastina</i>			
Caudosporidae; Caudospora	<i>Caudospora simulii</i>	<i>Prosimulium mixtum</i> , Diptera	AY973624
Caudosporidae; Culicospora	<i>Culicospora magna</i>	<i>Culex restuans</i> , Diptera	AY326269
Caudosporidae; Culicosporella	<i>Culicosporella lunata</i>	<i>Culex pilosus</i> , Diptera	AF027683
Caudosporidae; Weiseria	<i>Weiseria palustris</i> ( <i>Caudospora palustris</i> )	<i>Cnephia ornithophilia</i> , Diptera	AF132544
Nosematidae; Nosema	<i>Nosema adaliae</i>	<i>Adalia bipunctata</i> , Coleoptera	KC412706
	<i>Nosema algerae</i>	<i>Anopheles stephensi</i> , Diptera	AF069063
	<i>Nosema antheraeae</i>	<i>Antheraea pernyi</i> , Lepidoptera	EU864526
	<b><i>Nosema apis</i></b>	<b><i>Apis mellifera</i>,</b> <b>Hymenoptera</b>	<b>U97150</b>
	<i>Nosema bombycis</i>	<i>Bombyx mori</i> , Lepidoptera	AY259631
	<i>Nosema bombycis</i>	<i>Pieris rapae</i> , Lepidoptera	DQ919069
	<i>Nosema carpocapsae</i>	<i>Cydia pomonella</i> , Lepidoptera	AF426104
	<b><i>Nosema ceranae</i></b>	<b><i>Apis cerana</i>,</b> <b>Hymenoptera</b>	<b>U26533</b>
	<i>Nosema chrysoperlae</i>	<i>Chrysoperla carnea</i> , Neuroptera	KC412707
	<i>Nosema disstriae</i>	<i>Malacosoma disstria</i> , Lepidoptera	HQ457431

**Таблица (продолжение).** Виды микроспоридий, поражающих представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены микроспоридии, паразитирующие на насекомых отряда Нуменоптера.

Семейство, род микроспоридий	Вид микроспоридий	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
	<i>Nosema empoascae</i>	<i>Empoasca fabae</i> , Hemiptera	DQ996238
	<i>Nosema fumiferanae</i>	<i>Choristoneura fumiferana</i> , Lepidoptera	HQ457432
	<i>Nosema furnacalis</i>	<i>Ostrinia furnacalis</i> , Lepidoptera	U26532
	<i>Nosema heliothidis</i>	<i>Helicoverpa armigera</i> , Lepidoptera	FJ772435
	<b><i>Nosema necatrix</i></b>	<b><i>Apis cerana</i>,</b> <b>Hymenoptera</b>	<b>U11051</b>
Nosematidae; Nosema	<i>Nosema oryzaephili</i>	<i>Cryptolestes ferrugineus</i> , Coleoptera	HM002483
	<i>Nosema oulemae</i>	<i>Oulema melanopus</i> , Coleoptera	U27359
	<i>Nosema pieriae</i>	<i>Pieris brassicae</i> , Lepidoptera	JX268035
	<i>Nosema plutellae</i>	<i>Plutella xylostea</i> , Lepidoptera	AY960987
	<i>Nosema portugal</i>	<i>Lymantria dispar</i> , Lepidoptera	AF033316
	<i>Nosema pyrausta</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i> , Lepidoptera	HM566196
	<i>Nosema spodopterae</i>	<i>Spodoptera litura</i> , Lepidoptera	AY747307
	<b><i>Nosema thomsoni</i></b>	<b><i>Andrena vaga</i>,</b> <b>Hymenoptera</b>	<b>AB860144</b>
	<i>Nosema thomsoni</i>	<i>Choristoneura conflictana</i> , Lepidoptera	EU219086
	<i>Nosema thomsoni</i>	<i>Harmonia axyridis</i> , Coleoptera	KC596023

**Таблица (продолжение).** Виды микроспоридий, поражающих представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены микроспоридии, паразитирующие на насекомых отряда Hymenoptera.

Семейство, род микроспоридий	Вид микроспоридий	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
	<i>Nosema tyriae</i>	<i>Tyria jacobaeae</i> , Lepidoptera	AJ012606
	<b><i>Nosema trichoplusiae</i></b>	<b><i>Apis cerana</i>,</b> <b>Hymenoptera</b>	<b>U09282</b>
	<b><i>Nosema vespula</i></b>	<b><i>Apocrita</i>, Hymenoptera</b>	<b>U11047</b>
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Antheraea assama</i> , Lepidoptera	EU123526, EU123525
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Antheraea mylitta</i> , Lepidoptera	AB009977
	<b><i>Nosema</i> sp.</b>	<b><i>Apis mellifera</i>,</b> <b>Hymenoptera</b>	<b>EF585399</b>
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Bombyx mori</i> , Lepidoptera	HQ615704, AY713311
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Calospilos suspecta</i> , Lepidoptera	AF240348
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Catopsilia pyranthe</i> , Lepidoptera	KM001605
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Cnaphalocrocis medinalis</i> , Lepidoptera	KC836091
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Choristoneura occidentalis</i> , Lepidoptera	HQ457434
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Choristoneura pinus pinus</i> , Lepidoptera	EU219082
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Delias pasithoe</i> , Lepidoptera	KJ494248
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Dendroctonus ponderosae</i> , Coleoptera	GQ337011
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Diaphania pulverulentalis</i> , Lepidoptera	KP208675

**Таблица (продолжение).** Виды микроспоридий, поражающих представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены микроспоридии, паразитирующие на насекомых отряда Нуменоптера.

Семейство, род микроспоридий	Вид микроспоридий	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Hemerophila atrilineata</i> , Lepidoptera	AF240352, JN882299
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Histia rhodope</i> , Lepidoptera	KP100640
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Hyblaea puera</i> , Lepidoptera	GQ244502
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Euploea core</i> , Lepidoptera	KP208680
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Malacosoma americanum</i> , Lepidoptera	AY589503
	<i>Nosema</i> sp. <b>MC</b>	<i>Megacopta cribraria</i> , Hemiptera	KJ494249
	<i>Nosema</i> sp.	Noctuidae, Lepidoptera	AF141130
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Papilio demoleus</i> , Lepidoptera	KP208678
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Papilio polytes</i> , Lepidoptera	KP208679
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Pieris rapae</i> , Lepidoptera	AY383655, HQ399665
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Phyllobrotica armata</i> <i>Baly</i> , Coleoptera	AF240353
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Plodia interpunctella</i> , Lepidoptera	LC033874
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Plutella xylostea</i> , Lepidoptera	AY960986
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Samia cynthia ricini</i> , Lepidoptera	FJ767862
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Spilarctia obliqua</i> , Lepidoptera	KP208677

**Таблица (продолжение).** Виды микроспоридий, поражающих представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены микроспоридии, паразитирующие на насекомых отряда Нуменоптера.

Семейство, род микроспоридий	Вид микроспоридий	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
	<i>Nosema</i> sp.	<i>Spodoptera litura</i> , Lepidoptera	AB569605
	<i>Uncultured Nosema</i>	<i>Bicyclus anynana</i> , Lepidoptera	FJ040740
	<i>Uncultured Nosema</i>	<i>Eurema blanda arsakia</i> , Lepidoptera	EU338534
	<i>Uncultured Nosema</i>	<i>Lygus lineolaris</i> , Hemiptera	JQ713130
Nosematidae; Paranosema	<i>Paranosema grylli</i>	<i>Gryllus bimaculatus</i> , Orthoptera	AY305325
	<i>Paranosema locustae</i>	<i>Gryllus bimaculatus</i> , Orthoptera	AY305324
	<i>Paranosema whitei</i>	<i>Gryllus bimaculatus</i> , Orthoptera	AY305323
Tubulinosematidae; Anncaliia	<i>Brachiola algerae</i> ( <i>Anncaliia algerae</i> )	<i>Anopheles stephensi</i> , Diptera	AY963290
	<i>Anncaliia meligethi</i>	<i>Brassicogethes aeneus</i> Coleoptera	AY894423
<b>Tubulinosematidae; Kneallhazia</b>	<b><i>Kneallhazia carolinensae</i></b>	<b><i>Solenopsis carolinensis</i>, Hymenoptera</b>	<b>GU173849</b>
Tubulinosematidae; Tubulinosema	<i>Tubulinosema acridophagus</i>	Culicidae, Diptera	AF024658
	<i>Tubulinosema hippodamiae</i>	<i>Hippodamia convergens</i> , Coleoptera	JQ082890
	<i>Tubulinosema kingi</i>	<i>Drosophila</i> sp., Diptera	DQ019419
	<i>Tubulinosema loxostegi</i>	<i>Pyrausta (Loxostege) sticticalis</i> , Lepidoptera	JQ906779
	<i>Tubulinosema ratisbonensis</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> , Diptera	AY695845
Unikaryonidae; Encephalitozoon	<i>Encephalitozoon</i> sp.	<i>Romalea microptera</i> , Orthoptera	EU502838

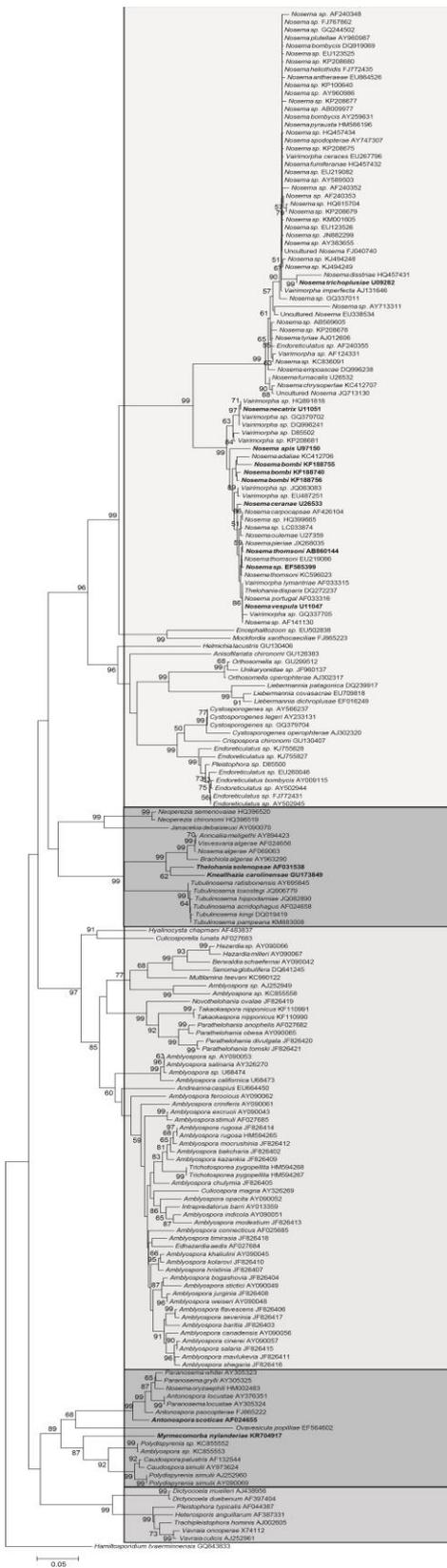
**Таблица (продолжение).** Виды микроспоридий, поражающих представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены микроспоридии, паразитирующие на насекомых отряда Hymenoptera.

Семейство, род микроспоридий	Вид микроспоридий	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
Unikaryonidae; Orthosomella	<i>Orthosomella</i> sp.	<i>Conistra vaccinii</i> , Lepidoptera	GU299512
	<i>Orthosomella operophtherae</i>	<i>Operophtera brumata</i> , Lepidoptera	AJ302317
Unikaryonidae	<i>Unikaryonidae</i> sp.	<i>Liophloeus lentus</i> , Coleoptera	JF960137
<i>suborder Microsporidia incertae sedis</i>			
Antonospora	<i>Antonospora locustae</i>  ( <i>Nosema locustae</i> )	<i>Locusta migratoria</i> , Orthoptera	AY376351
	<i>Antonospora psocopterae</i>	<i>Xanthocaecilius sommermanae</i> , Psocoptera	FJ865222
	<b><i>Antonospora scoticae</i></b>	<b><i>Andrena scotica</i>, Hymenoptera</b>	<b>AF024655</b>
Crispospora	<i>Crispospora chironomi</i>	<i>Chironomus plumosus</i> , Diptera	GU130407
Culicosporidae; Edhazardia	<i>Edhazardia aedis</i>	<i>Aedes aegypti</i> , Diptera	AF027684
Endoreticulatus	<i>Endoreticulatus bombycis</i>	<i>Bombyx mori</i> , Lepidoptera	AY009115
Endoreticulatus	<i>Endoreticulatus</i> sp.	<i>Bombyx mori</i> , Lepidoptera	AF240355
	<i>Endoreticulatus</i> sp.	<i>Lymantria dispar</i> , Lepidoptera	AY502945
	<i>Endoreticulatus</i> sp.	<i>Thaumetopoea processionea</i> , Lepidoptera	EU260046
	<i>Endoreticulatus</i> sp.	<i>Ocinara lida</i> , Lepidoptera	AY502944

**Таблица (продолжение).** Виды микроспоридий, поражающих представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены микроспоридии, паразитирующие на насекомых отряда Нуменоптера.

Семейство, род микроспоридий	Вид микроспоридий	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
	<i>Endoreticulatus</i> sp.	<i>Poecilimon thoracicus</i> , Orthoptera	KJ755827
	<i>Endoreticulatus</i> sp.	<i>Listronotus bonariensis</i> Coleoptera	KJ755828
	<i>Endoreticulatus</i> sp.	<i>Bombyx mori</i> , Lepidoptera	FJ772431
Gurleyidae; Hazardia	<i>Hazardia</i> sp.	<i>Anopheles crucians</i> , Diptera	AY090066
	<i>Hazardia milleri</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i> , Diptera	AY090067
Helmichia	<i>Helmichia lacustris</i>	<i>Chironomus plumosus</i> , Diptera	GU130406
Liebermannia	<i>Liebermannia covasacrae</i>	<i>Covasacris pallidinota</i> , Orthoptera	EU709818
	<i>Liebermannia dichroplusae</i>	<i>Dichroplus elongatus</i> , Orthoptera	EF016249
	<i>Liebermannia patagonica</i>	<i>Tristira magellanica</i> , Orthoptera	DQ239917
Mockfordia	<i>Mockfordia xanthocaeciliae</i>	<i>Xanthocaecilius sommermanae</i> , Psocoptera	FJ865223
Neoperezia	<i>Neoperezia semenovaiae</i>	<i>Chironomus plumosus</i> , Diptera	HQ396520
	<i>Neoperezia chironomi</i>	<i>Chironomus plumosus</i> , Diptera	HQ396519
Senoma	<i>Senoma globulifera</i>	<i>Anopheles messeae</i> , Diptera	DQ641245
Trichosporea	<i>Trichosporea pygopellita</i>	<i>Ochlerotatus excrucians</i> , Diptera	HM594268
	<i>Trichosporea pygopellita</i>	<i>Ochlerotatus cyprius</i> , Diptera	HM594267
Visvesvaria	<i>Visvesvaria algerae</i>	Culicidae, Diptera	AF024656

Приложение 3



**Рисунок.** Филогенетическое древо, реконструированное на основе последовательностей генов рибосомной РНК малой субъединицы рибосом микроспоридий, поражающих насекомых, методом объединения ближайших соседей (NJ) в программе MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Для оценки достоверности был использован бутстреп-тест (1000 репликаций). В качестве внешней группы была использована последовательность SSU rRNA *Hamiltosporidium tvaerminnensis* (Microsporidia: Dubosqiidae) (GQ843833), которые паразитируют на ракообразных *Daphnia magna*.

## Приложение 4

**Таблица.** Список видов шмелей, для которых было установлено заражение микроспоридиями *N. bombi*, трипаносоматидами *Crithidia* spp., неогрегаринами *A. bombi* и *Mattesia* sp.

Вид	Микроспоридии <i>N. bombi</i>					Трипаносоматиды		Неогрегарины	
	WS1	WS2	WS3	WS4	IND	<i>C. bombi</i>	<i>C. expoeki</i>	<i>A. bombi</i>	<i>Mattesia</i> sp.
<i>B. asiaticus</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>B. consobrinus</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>B. cullumanus</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>B. hortorum</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>B. humilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>B. hypnorum</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>B. lucorum</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>B. pascuorum</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>B. patagiatus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>B. rupestris</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. schrencki</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>B. sichelii</i>	-	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>B. simillimus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-

**Таблица (продолжение).** Список видов шмелей, для которых было установлено заражение микроспоридиями *N. bombi*, трипаносоматидами *Crithidia* spp., неогрегарины *A. bombi* и *Mattesia* sp.

Вид	Микроспоридии <i>N. bombi</i>					Трипаносоматиды		Неогрегарины	
	WS1	WS2	WS3	WS4	IND	<i>C. bombi</i>	<i>C. expoeki</i>	<i>A. bombi</i>	<i>Mattesia</i> sp.
<i>B. soroensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>B. sporadicus</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>B. trifasciatus</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>B. veteranus</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	+

## Приложение 5

**Таблица.** Виды отряда Trypanosomatida, поражающие представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены трипаносоматиды, паразитирующие на насекомых отряда Hymenoptera.

Род отряда Trypanosomatida	Вид	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
<i>Angomonas</i>	<i>Angomonas ambiguus</i>	<i>Chrysomya albiceps</i> , Diptera	HM593015
	<i>Angomonas ambiguus</i>	<i>Chrysomya megacephala</i> , Diptera	KC205973
	<i>Angomonas desouzai</i>	<i>Acritochaeta orientalis</i> , Diptera	KC205979
	<i>Angomonas desouzai</i>	<i>Lucilia caesar</i> , Diptera	KC205977
	<i>Angomonas desouzai</i>	<i>Lucilia cuprina</i> , Diptera	HM593014
	<i>Angomonas desouzai</i>	<i>Lucilia eximia</i> , Diptera	HM593017
	<i>Angomonas desouzai</i>	<i>Ornidia obese</i> , Diptera	HM593016, HM593012
	<i>Angomonas desouzai</i>	<i>Onesia austriaca</i> , Diptera	KC205978
	<i>Angomonas desouzai</i>	<i>Wohlfahrtia nuba</i> species group, Diptera	KC205976
	<i>Angomonas desouzai</i>	<i>Zelus leucogrammus</i> , Hemiptera	HM593011
<i>Blastocrithidia</i>	<i>Blastocrithidia gerricola</i>	<i>Gerris lacustris</i> , Hemiptera	AF153036
	<i>Blastocrithidia triatoma</i>	<i>Triatoma infestans</i> , Hemiptera	AF153037
	<i>Blastocrithidia</i> sp.	<i>Cyrtomenus bergi</i> , Hemiptera	FJ916992
<i>Blechomonas</i>	<i>Blechomonas ayalai</i>	<i>Ctenophthalmus agyrtes</i> , Siphonaptera	KF054116
	<i>Blechomonas campbelli</i>	<i>Ctenocephalides felis</i> , Siphonaptera	KF054134
	<i>Blechomonas danrayi</i>	<i>Chaetopsylla globiceps</i> , Siphonaptera	KF054137
	<i>Blechomonas englundii</i>	<i>Ceratophyllus pullatus</i> , Siphonaptera	KF054119
	<i>Blechomonas englundii</i>	<i>Ceratophyllus</i> sp., Siphonaptera	KF054120
	<i>Blechomonas englundii</i>	<i>Monopsyllus sciurorum</i> , Siphonaptera	KF054118
	<i>Blechomonas juanalfonzi</i>	<i>Ctenophthalmus</i> sp., Siphonaptera	KF054121
	<i>Blechomonas keelingi</i>	<i>Ceratophyllus</i> sp., Siphonaptera	KF054132

**Таблица (продолжение).** Виды отряда Trypanosomatida, поражающие представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены трипаносоматиды, паразитирующие на насекомых отряда Hymenoptera.

Род отряда Trypanosomatida	Вид	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
	<i>Blechomonas lauriereadi</i>	<i>Ctenocephalides canis</i> , Siphonaptera	KF054127
	<i>Blechomonas luni</i>	<i>Chaetopsylla globiceps</i> , Siphonaptera	KF054115
	<i>Blechomonas maslovi</i>	<i>Ceratophyllus pullatus</i> , Siphonaptera	KF054125
	<i>Blechomonas maslovi</i>	<i>Ceratophyllus</i> sp., Siphonaptera	KF054124
	<i>Blechomonas maslovi</i>	<i>Monopsyllus sciurorum</i> , Siphonaptera	KF054122
	<i>Blechomonas maslovi</i>	<i>Paraceras melis</i> , Siphonaptera	KF054123
	<i>Blechomonas pulexsimulantis</i>	<i>Pulex irritans</i> , Siphonaptera	KF054129
	<i>Blechomonas pulexsimulantis</i>	<i>Pulex simulans</i> , Siphonaptera	KF054128
	<i>Blechomonas wendygibsoni</i>	<i>Nycteridopsylla eusarca</i> , Siphonaptera	KF054126
	<i>Blechomonas</i> sp.	<i>Ctenophthalmus assimilis</i> , Siphonaptera	KF054117
<i>Crithidia</i>	<i>Crithidia abscondita</i>	<i>Largus</i> sp., Hemiptera	EU079126
	<i>Crithidia brachyflagelli</i>	Neotropical insects, Heteroptera, Hemiptera	JF717840
	<i>Crithidia brevicula</i>	<i>Nabis brevis</i> , Hemiptera	KJ443355, KJ443352
	<i>Crithidia bombi</i>	<b><i>Bombus pratorum</i>,</b> <b>Hymenoptera</b>	<b>KM980184</b>
	<i>Crithidia bombi</i>	<b><i>Bombus insularis</i>,</b> <b>Hymenoptera</b>	<b>KM980185</b>
	<i>Crithidia bombi</i>	<b><i>Bombus terrestris</i>,</b> <b>Hymenoptera</b>	<b>FN546181</b>
	<i>Crithidia confusa</i>	Неотропические насекомые (Heteroptera), Hemiptera	JF717837
	<i>Crithidia expoeki</i>	<b><i>Bombus flavifrons</i>,</b> <b>Hymenoptera</b>	<b>KM980187</b>
	<i>Crithidia expoeki</i>	<b><i>Bombus lucorum</i>,</b> <b>Hymenoptera</b>	<b>KM980186</b>
	<i>Crithidia insperata</i>	<i>Leptopetalops</i> sp., Heteroptera	EU079125

**Таблица (продолжение).** Виды отряда Trypanosomatida, поражающие представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены трипаносоматиды, паразитирующие на насекомых отряда Hymenoptera.

Род отряда Trypanosomatida	Вид	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
	<i><b>Crithidia mellificaе</b></i>	<i><b>Apis mellifera,</b></i> <i><b>Hymenoptera</b></i>	<b>KM980183,</b> <b>KM980182</b>
	<i>Crithidia otongatchiensis</i>	<i>Rhynocoris rapax,</i> Hemiptera	JQ658813
	<i>Crithidia otongatchiensis</i>	<i>Syrphidae</i> sp., Diptera	KC205989
	<i>Crithidia permixta</i>	триба Mirini, Heteroptera	EU079127
	<i>Crithidia pragensis</i>	<i>Cordilura albipes,</i> Diptera	KC205988
<i>Endotrypanum</i>	<i>Endotrypanum monterogeii</i>	<i>Nyssomyia trapedoi,</i> Diptera	JQ863389
	<i>Endotrypanum</i> sp.	<i>Lutzomyia gomezi,</i> Diptera	EU021238
	<i>Endotrypanum</i> sp.	<i>Psathyromyia dendrophyla,</i> Diptera	EU021240
<i>Herpetomonas</i>	<i>Herpetomonas isaaci</i>	<i>Chrysomya megacephala,</i> Diptera	KC709667
	<i>Herpetomonas isaaci</i>	<i>Chrysomya putoria,</i> Diptera	KC205992
	<i>Herpetomonas isaaci</i>	<i>Chrysomya putoria,</i> Diptera	JQ359721
	<i>Herpetomonas isaaci</i>	<i>Musca domestica,</i> Diptera	JQ359720
	<i>Herpetomonas mariadeanei</i>	<i>Chrysomya megacephala,</i> Diptera	KC205981
	<i>Herpetomonas mariadeanei</i>	<i>Muscina stabulans,</i> Diptera	JQ359714
	<i>Herpetomonas megaseliae</i>	<i>Megaselia scalaris,</i> Diptera	JQ359715
	<i>Herpetomonas modestus</i>	<i>Chrysomya megacephala,</i> Diptera	JQ359726
	<i>Herpetomonas muscarum</i>	<i>Chrysomya megacephala,</i> Diptera	KC205982
	<i>Herpetomonas muscarum</i>	<i>Musca domestica,</i> Diptera	JQ359731
	<i>Herpetomonas nabicalae</i>	<i>Chaetopsylla globiceps,</i> Siphonaptera	KF054113
	<i>Herpetomonas pessoai</i>	<i>Anthomyiidae</i> sp., Diptera	KC205984

**Таблица (продолжение).** Виды отряда Trypanosomatida, поражающие представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены трипаносоматиды, паразитирующие на насекомых отряда Hymenoptera.

Род отряда Trypanosomatida	Вид	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
	<i>Herpetomonas pessoai</i>	<i>Chrysomya putoria</i> , Diptera	JQ359718
	<i>Herpetomonas pessoai</i>	<i>Coenosia albicornis</i> , Diptera	KC205985
	<i>Herpetomonas pessoai</i>	<i>Musca domestica</i> , Diptera	JQ359717
	<i>Herpetomonas pessoai</i>	<i>Sarcophaginae</i> sp., Diptera	KC205983
	<i>Herpetomonas pessoai</i>	<i>Zelus</i> sp., Hemiptera	JQ359716
	<i>Herpetomonas puellarum</i>	<i>Chrysomya putoria</i> , Diptera	JQ359723
	<i>Herpetomonas puellarum</i>	<i>Coenosia tigrina</i> , Diptera	KC205995
	<i>Herpetomonas puellarum</i>	<i>Musca domestica</i> , Diptera	JQ359724
	<i>Herpetomonas puellarum</i>	<i>Musca</i> sp., Diptera	KC205994
	<i>Herpetomonas samuelpessoai</i>	<i>Zelus leucogrammus</i> , Hemiptera	U01016
	<i>Herpetomonas tarakana</i>	Blatta, Blattodea	KR868690
	<i>Herpetomonas</i> sp. <i>trimorpha</i>	<i>Culicoides truncorum</i> , Diptera	EU179326
	<i>Herpetomonas ztiplika</i>	<i>Culicoides cubitalis</i> , Diptera	AF416560
	<i>Herpetomonas</i> sp.	<i>Monopsyllus sciurorum</i> , Siphonaptera	KF054112
	<i>Herpetomonas</i> sp.	<i>Ornidia obese</i> , Diptera	JQ359725
<i>Jaenimonas</i>	<i>Jaenimonas drosophilae</i>	<i>Drosophila fallen</i> , Diptera	KP260534
<i>Kentomonas</i>	<i>Kentomonas sorsogonicus</i>	<i>Sarcophaga (sensu lato)</i> sp., Diptera	KM242075
<i>Leishmania</i>	<i>Leishmania tarentolae</i>	<i>Sarcophagidae</i> sp., Diptera	KC205986
<i>Leptomonas</i>	<i>Leptomonas acus</i>	subtribe Eccritotarsina, Heteroptera	DQ910923
	<i>Leptomonas barvae</i>	<i>Collaria oleosa</i> , Hemiptera	FJ968532
	<i>Leptomonas bifurcata</i>	<i>Pachypoda</i> sp., Heteroptera	DQ910925
	<i>Leptomonas jaculum</i>	<i>Nepa cinerea</i> , Hemiptera	EF184218

**Таблица (продолжение).** Виды отряда Trypanosomatida, поражающие представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены трипаносоматиды, паразитирующие на насекомых отряда Hymenoptera.

Род отряда Trypanosomatida	Вид	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
	<i>Leptomonas jaderae</i>	<i>Jadera obscura</i> , Heteroptera	EU079123
	<i>Leptomonas cf. lactosovorans</i>	<i>Pachygrontha barberi</i> , Heteroptera	EU079122
	<i>Leptomonas mirabilis</i>	<i>Cynomya cadaverina</i> , Diptera	JQ359729
	<i>Leptomonas collosoma</i>	<i>Gerris dissortis</i> , Hemiptera	JN582046
	<i>Leptomonas costaricensis</i>	<i>Ricolla simillima</i> , Heteroptera	DQ383648
	<i>Leptomonas costoris</i>	<i>Gerris comatus</i> , Hemiptera	JQ359728
	<i>Leptomonas neopamerae</i>	<i>Neopamera sp.</i> , Heteroptera	DQ910924
	<i>Leptomonas peterhoffi</i>	<i>Nabacula flavomarginata</i> , Hemiptera	AF153039
	<i>Leptomonas podlipaevi</i>	<i>Jadera obscura</i> , Hemiptera	DQ383649
	<i>Leptomonas cf. podlipaevi</i>	<i>Jadera aeola</i> , Hemiptera	EU079124
	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	<i>Dysdercus fasciatus</i> , Hemiptera	JQ658837
	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	<i>Pyrrhocoris apterus</i> , Heteroptera	JN036653
	<i>Leptomonas rigidus</i>	<i>Salda littoralis</i> , Hemiptera	JN582047
	<i>Leptomonas samueli</i>	<i>Zelus leucogrammus</i> , Hemiptera	JQ359722
	<i>Leptomonas scantii</i>	<i>Scantius (= Lodosiana) aegyptius</i> , Heteroptera	JN036654
	<i>Leptomonas seymouri</i>	<i>Dysdercus suturellus</i> , Hemiptera	KP717895
	<i>Leptomonas spiculata</i>	Neotropical insects (Heteroptera), Hemiptera	JF717838
	<i>Leptomonas tarcoles</i>	<i>Prepops sp.</i> , Heteroptera	EF546786
	<i>Leptomonas tenua</i>	<i>Monopsyllus sciurorum</i> , Siphonaptera	KF054114
	<b><i>Lotmaria passim</i></b>	<b><i>Apis mellifera</i>,</b> <b>Hymenoptera</b>	<b>KM980188</b>
<i>Paratrypanosoma</i>	<i>Paratrypanosoma confusum</i>	<i>Culex pipiens</i> , Diptera	KF963538

**Таблица (продолжение).** Виды отряда Trypanosomatida, поражающие представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены трипаносоматиды, паразитирующие на насекомых отряда Hymenoptera.

Род отряда Trypanosomatida	Вид	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
<i>Phytomonas</i>	<i>Phytomonas nordicus</i>	<i>Troilus luridus</i> , Hemiptera	KT223609
<i>Sergeia</i>	<i>Sergeia podlipaevi</i>	<i>Culicoides festivipennis</i> , Diptera	DQ394362
<i>Strigomonas</i>	<i>Strigomonas culicis</i>	<i>Aedes vexans</i> , Diptera	HM593009
	<i>Strigomonas galati</i>	<i>Lutzomyia almerioi</i> , Diptera	HM593010
<i>Trypanosoma</i>	<i>Trypanosoma avium</i>	<i>Eusimulium securiforme</i> , Diptera	AF416563
	<i>Trypanosoma congolense</i>	<i>Glossina fuscipes fuscipes</i> , Diptera	KP307025
	<i>Trypanosoma congolense</i>	<i>Glossina tabaniformis</i> , Diptera	KP307026
	<i>Trypanosoma culicavium</i>	<i>Culex molestus</i> , Diptera	HQ909084
	<i>Trypanosoma culicavium</i>	<i>Culex pipiens</i> , Diptera	HQ107970, JN006830
	<i>Trypanosoma grayi</i>	<i>Glossina morsitans morsitans</i> , Diptera	AJ005278
	<i>Trypanosoma melophagium</i>	<i>Melophagus ovinus</i> , Diptera	HQ664912
	<i>Trypanosoma simiae</i>	<i>Glossina pallidipes</i> , Diptera	AJ404608
	<i>Trypanosoma simiae</i>	<i>Glossina tabaniformis</i> , Diptera	KP307022, KP307021
	<i>Trypanosoma theileri</i>	<i>Glossina fuscipes fuscipes</i> , Diptera	KR024688
	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Culex pipiens</i> , Diptera	AF416561
	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Evandromyia infraspinosa</i> , Diptera	EU021237
	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Glossina fuscipes fuscipes</i> , Diptera	KP307018
	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Glossina pallidipes</i> , Diptera	AJ620547, AJ563915
	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Glossina tabaniformis</i> , Diptera	KP307020, KR024687, KR024685, KR024683
	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Monopsyllus sciurorum</i> , Siphonaptera	KF054111
	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Ornithomyia avicularia</i> , Diptera	AF416562

**Таблица (продолжение).** Виды отряда Trypanosomatida, поражающие представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены трипаносоматиды, паразитирующие на насекомых отряда Hymenoptera.

Род отряда Trypanosomatida	Вид	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Sciopemyia servulolimai</i> , Diptera	EU021241
	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Sciopemyia sordellii</i> , Diptera	EU021244
	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Sciopemyia sordellii</i> , Diptera	EU021243
	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Sciopemyia</i> sp., Diptera	EU021245
	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Viannamyia tuberculata</i> , Diptera	EU095838
<i>Wallaceina</i>	<i>Wallaceina brevicula</i>	<i>Nabis brevis</i> , Hemiptera	AF153045
	<i>Wallaceina collosoma</i>	<i>Gerris</i> sp., Hemiptera	AF153038
	<i>Wallaceina inconstans</i>	<i>Calocoris sexguttatus</i> , Hemiptera	AF153044
	<i>Wallaceina ravinia</i>	<i>Ravinia</i> sp., Diptera	KC205996
	<i>Wallaceina</i> sp.	<i>Salda littoralis</i> , Hemiptera	JN582045
<i>Trypanosomatidae</i> <i>sp.</i>	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	Culicidae, Diptera	AF071866
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Chrysomya putoria</i> , Diptera	KC205993
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Coranus</i> sp., Hemiptera	JQ658820
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Dieuches albostriatus</i> , Hemiptera	JQ658847
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Dieuches armatipes</i> , Hemiptera	JQ658811
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Dieuches pamela</i> , Hemiptera	GU059568
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Dysdercus fasciatus</i> , Hemiptera	JQ658812
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Ectomocoris fenestratus</i> , Hemiptera	JQ658845
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Eysarcoris guttigerus</i> , Hemiptera	GU059567
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Eysarcoris ventralis</i> , Hemiptera	JQ658839
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Gerris</i> sp., Hemiptera	GU059560
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Iphita limbata</i> , Hemiptera	JQ658851
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Lauxaniidae</i> sp., Diptera	KC206003
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Leptocorisa lepida</i> , Hemiptera	GU059563

**Таблица (продолжение).** Виды отряда Trypanosomatida, поражающие представителей класса Insecta. Жирным шрифтом выделены трипаносоматиды, паразитирующие на насекомых отряда Hymenoptera.

Род отряда Trypanosomatida	Вид	Хозяин (вид, отряд)	Номер последовательности в базе данных GenBank
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Liorhyssus hyalinus</i> , Hemiptera	JQ658823
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Melamphaus faber</i> , Hemiptera	JQ658852
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Ochrochira</i> sp., Hemiptera	GU059559
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Platymeris rhadamanthus</i> , Hemiptera	JQ658850
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Rhynocoris albopilosus</i> , Hemiptera	JQ658834
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Rhynocoris bicolor</i> , Hemiptera	JQ658827
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Sphaerocoris</i> cf. <i>testudogrisea</i> , Hemiptera	JQ658835
	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	<i>Sphedanolestes picturellus</i> , Hemiptera	JQ658822

