

Проблемы диагностики микроспоридий – паразитов медоносных пчёл Игнатьева А. Н.¹, Токарев Ю. С.²

¹Игнатьева Анастасия Николаевна / Ignateva Anastasiya Nikolaevna – младший научный сотрудник;

²Токарев Юрий Сергеевич / Tokarev Yuriy Sergeevich – доктор биологических наук, старший научный сотрудник,
лаборатория микробиологической защиты растений,

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, г. Санкт-Петербург, Пушкин

Аннотация: описано современное состояние исследований в области диагностики микроспоридий, паразитирующих у медоносных пчёл. Обобщена информация по распространённости этих паразитов на территории России.

Abstract: modern state of research of microsporidia infecting honey bees is described. The information concerning prevalence of these parasites in Russia is summarized.

Ключевые слова: микроспоридии, нозематоз, диагностика, ПЦР.

Keywords: microsporidia, nosemosis, diagnostics, PCR.

Микроспоридии – облигатные внутриклеточные паразиты животных, наиболее широко распространённые в членистоногих и, в частности, в насекомых. Многие их виды высоковирулентны и оказывают существенное влияние на динамику численности своих насекомых-хозяев [1]. В условиях производственной или лабораторной культуры заражённость насекомых микроспоридиями может значительно возрасти по сравнению с природными популяциями и вызывать опустошительные эпизоотии [2]. Пчеловодческие хозяйства всего мира страдают от заражения пчёл двумя видами микроспоридий – *Nosema apis* Zander 1909 и *Nosema ceranae* Fries et al. 1996. Паразиты значительно различаются по эколого-биологическим характеристикам, и экспансия второго из них в популяциях насекомых-хозяев, где уже присутствует первый, может сопровождаться непредсказуемыми последствиями [3]. Данная ситуация представляет собой не только модель динамичной паразитарной системы в начале своего развития, важную для изучения фундаментальных вопросов паразитологии, но и возможную угрозу для пчеловодства всего мира и России в частности.

На протяжении почти 80 лет с момента первоописания *N. Apis* этот паразит считался единственным возбудителем нозематоза как европейской *A. mellifera*, так и азиатской медоносной пчелы, *Apis cerana*. Однако после описания нового паразита, *N. ceranae* из *A. ceranae*, в мировой литературе появились свидетельства того, что европейская медоносная пчела также подвержена заражению этим паразитом. В частности, в 10 из 11 образцов европейской медоносной пчелы с пасек Испании 2005 г. обнаружено заражение именно *N. ceranae* [4]. Ретроспективный анализ современных и архивных образцов позволил предположить, что переход *N. ceranae* на *A. mellifera* произошёл в течение последних 10-20 лет. В настоящее время в ряде регионов продолжается экспансия этого паразита в популяциях европейской пчелы [5], [6], [7]. Эксперименты по перекрестному заражению показали, что оба вида пчёл восприимчивы к заражению обоими паразитами, но *N. ceranae* в *A. mellifera* развивается лучше, чем *N. apis* в *A. ceranae* [8], [9].

Данные, полученные как для североамериканского континента [10], так и для Европы [11], [12], указывают на то, что доля инфекций *N. ceranae* проявляет тенденцию к доминированию в регионах с более тёплым климатом, в то время как *N. apis* проявляет обратную склонность к большей встречаемости в условиях холодного климата. Исследования на организменном уровне показали, что скорость развития *N. ceranae* выше, чем *N. apis* в более широком диапазоне температур, хотя остаётся неясным, как эта особенность может влиять на преобладание первого паразита над вторым в условиях тёплого климата. С другой стороны, показано, что жизнеспособность спор *N. ceranae* резко снижается при кратковременном хранении в замороженном виде, чего не происходит в случае с *N. apis*. Такая неприспособленность первого паразита к замораживанию вполне может иметь эпизоотологическое значение, снижая его выживаемость, в частности, при хранении воска, который часто случит источником заражения пчёл нозематозом [13]. В регионах с умеренным климатом типичная динамика заражённости пчёл *N. apis* включает низкий уровень заражённости на протяжении лета, небольшой пик осенью, постепенное повышение заражённости зимой и большая вспышка весной [14]. В одном исследовании в тропических условиях, где у пчёл отсутствует зимовка, и они активны весь год, сезонных флуктуаций заражённости *N. apis* не выявлено [15]. Однако в Испании наблюдалась чёткая сезонная динамика заражённости пчёл микроспоридиями (предположительно *N. apis*) до 2003 г., с колебаниями от 0 до 25 % в течение года и до 75 % весной. С 2003 по 2005 гг. наблюдалось постепенное нарастание степени поражения пчёл нозематозом, и с 2005 г. наблюдается заражённость пчёл микроспоридиями, в более чем 60 % случаев представленных *N. ceranae* на уровне, близком к 100 %. Колонизация пчелиных семей этим паразитом сопровождается значительным усилением гибели пчёл [11]. Таким образом, не исключено, что в

настоящее время происходит вытеснение одного паразита (*N. apis*) другим (*N. ceranae*), новым для данного вида пчёл. Исходя из того, что первичным хозяином *N. ceranae* является *A. cerana*, переход к паразитизму в новом хозяине может сопровождаться значительным сдвигом в балансе паразито-хозяинных отношений, не отрегулированных естественным отбором, результатом чего может стать значительное усиление вирулентности паразита и даже полная гибель популяций хозяина [3]. С другой стороны, в более северных странах преобладания *N. ceranae* не наблюдается, несмотря на достаточно долгую (свыше 15 лет) историю сосуществования этих паразитов в европейской медоносной пчеле [7], [16]. Возможно, именно климатические условия определяют столь значительные различия в характере развития нозематоза, вызванного *N. ceranae*, в разных странах [13].

Микроспоридии *N. apis* и *N. ceranae* обладают высоким уровнем дивергенции в консервативной области гена рРНК, что позволяет легко дифференцировать эти два вида по коротким сиквенсам [17], [10], RFLP-профилям [5], а также с помощью ПЦР с видоспецифичными праймерами [11]. Таким образом, существует достаточное количество доступных методических подходов для идентификации этих паразитов. В то же время, внутривидовое разнообразие паразитов остаётся недостаточно полно охарактеризовано как с точки зрения репрезентативности географических изолятов, так и в отношении полноты изученности генетических маркеров [13]. К настоящему времени заражённость пчелиных семей двумя видами микроспоридий проанализирована на всех континентах, где развито пчеловодство (т. е. за исключением Антарктиды), и везде зарегистрировано заражение европейской медоносной пчелы микроспоридией *N. ceranae* [5]. При этом Россия до начала наших работ оставалась белым пятном в данной области исследований, хотя её территория представляет значительную часть Евразийского континента, и пчеловодство здесь в достаточной степени развито, составляя определённый сектор сельского хозяйства. Понимание современного состояния проблемы нозематоза пчёл на территории России – важный элемент в анализе функционирования паразитарных систем с участием микроспоридий и их хозяев – перепончатокрылых насекомых-опылителей в мировом масштабе.

Нами впервые предпринято исследование российских популяций медоносной пчелы *A. mellifera* на заражённость микроспоридиями с применением высокотехнологичных методов молекулярно-генетического анализа с целью видовой идентификации паразитов [17], [18]. Принадлежность выявленных микроспоридий к *N. apis* и *N. ceranae* установлена методами секвенирования фрагмента гена рРНК, мультиплексного ПЦР с видоспецифическими праймерами [11] и морфометрического анализа, используемого в качестве экспресс-метода при работе с большими наборами образцов (не всегда пригодных для генотипирования). Показано присутствие микроспоридий во всех обследованных регионах и преобладание *N. ceranae* над *N. apis* по частоте встречаемости в южных широтах [19]. Генотипирование образцов по локусам межгенных спейсеров рРНК ITS и IGS показало высокое разнообразие внутривидовых молекулярных гаплотипов, по своему уровню соответствующее разнообразию паразитов в глобальном масштабе при отсутствии связи между распределением указанных гаплотипов и географическим происхождением заражённых пчёл. Секвенирование участков генов, кодирующих РНК-полимеразу RPB1, метионин-аминопептидазу N-MetAP, белок теплового шока HSP70, митохондриальную глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу mitG3PDH, а также ряд гипотетических белков, позволило получить набор молекулярных гаплотипов для микроспоридий из различных регионов Европейской и Азиатской частей России. Некоторые из указанных локусов оказались достаточно информативными для выявления внутривидовых форм паразитов обоих видов и будут использованы в дальнейшей работе для широкомасштабного исследования популяционной структуры возбудителей нозематозов медоносных пчёл на территории России.

Исследование поддержано РФФИ (№№ 13-04-00693-а и 14-04-31783-мол_а), а также Советом по грантам Президента РФ (№ МД-4284.2015.4).

Литература

1. *Иссу И. В.* Микроспоридии как тип паразитических простейших. В кн.: Микроспоридии. Сер. «Протозоология», 10, Ленинград: Наука, 1986. С. 6–135.
2. *Wittner M.* Historic perspectives on the Microsporidia: expanding horizons. The Microsporidia and Microsporidiosis. ASM Press, Washington, D.C., 1999. P. 1–6.
1. *Deredec A., Courchamp F.* Extinction thresholds in host–parasite dynamics // Ann. Zool. Fennici. 2003. V. 40. P. 115–130.
2. *Higes M., Martín R., Meana A.* Nosema ceranae, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe // J. Invertebr. Pathol. 2006. V. 92. P. 81–83.
3. *Klee J., Besana A., Genersch E., Gisder S., Nanetti A., Tam D. Q., Chinh T. X., Puerta F., Kryger P., Message D., Hatjina F., Korpela S., Fries I., Paxton R.* Widespread dispersal of the microsporidium Nosema

- ceranae, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera* // J. Invertebr. Pathol. 2007. V. 96. P. 1–10.
3. Paxton R. J., Klee J., Korpela S., Fries I. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis* // Apidologie. 2007. V. 38. P. 558–565.
 4. Chen Y., Evans J. D., Smith I. B., Pettis J. S. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidean infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States // J. Invertebr. Pathol. 2008. V. 97. P. 186–188.
 5. Fries I., Feng F. Crossinfectivity of *Nosema apis* in *Apis mellifera* and *Apis Cerana* // Proceedings of the Apimondia 34th International Apicultural Congress. Bucharest, Romania, 1995. P. 151–155.
 6. Fries I. Protozoa // Honey Bee Pests, Predators and Diseases, third ed. A. I. Root Company, Medina, Ohio, USA, 1997. P. 59–76.
 7. Williams G. R., Sampson M. A., Shutler D., Rogers R. E. L. Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? // J. Invertebr. Pathol. 2008. V. 99. P. 342–344.
 8. Martín-Hernández R., Meana A., Prieto L., Martínez Salvador A., Garrido-Bailon E., Higes M. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae* // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 6331–6338.
 9. Fries I., Forsgren E. Undersökning av spridningen av *Nosema ceranae* i Sverige // Investigation of the distribution of *Nosema ceranae* in Sweden Bitidningen 107, januari/februari. 2008. P. 26–27 (in Swedish).
 10. Fries I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*) // J. Invertebr. Pathol. 2010. V. 103. P. S73–S79.
 11. Bailey L. The epidemiology and control of *Nosema* disease of the honey-bee // Ann. Appl. Biol. 1955. V. 43. P. 379–389.
 12. Fries I., Raina S. American foulbrood (*Paenibacillus larvae larvae*) and African honey bees (*Apis mellifera scutellata*) // J. Econ. Entomol. 2003. V. 96. P. 1641–1646.
 13. Siede R., Berg S., Meixner M. Effects of symptomless infections with *Nosema* sp. on honey bee colonies // OIE-Symposium Diagnosis and Control of Bee Diseases, August 26–28, 2008. Freiburg, Germany.
 14. Токарев Ю. С., Игнатъева А. Н., Зинатуллина З. Я. Молекулярная диагностика нозематоза // Пчеловодство. 2010. № 5. С. 18–19.
 15. Зинатуллина З. Я., Игнатъева А. Н., Жигилева О. Н., Токарев Ю. С. «Азиатский» нозематоз в России. Пчеловодство. 2011. № 10. С. 24–26.
 16. Игнатъева А. Н., Зинатуллина З. Я., Токарев Ю. С. Распространение возбудителей нозематоза медоносной пчелы в Европейской части России // Мат. междунар. мол. конф. «Инфекционная патология членистоногих» (Санкт-Петербург, Пушкин, 25-29 марта 2012 г.). 2012. С. 24–27.