

Вавилова 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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2018

Работа выполнена в лаборатории молекулярно-генетических систем Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения российской академии наук», г. Новосибирск.

**Научный
руководитель:**

Блинов Александр Геннадьевич
к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических систем ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН»,
г. Новосибирск

**Официальные
оппоненты:**

Глунов Виктор Вячеславович
д.б.н., профессор, директор ФГБУН «Институт систематики и экологии животных СО РАН»,
г. Новосибирск

Щербаков Дмитрий Юрьевич
д.б.н., заведующий лабораторией геносистематики,
ФГБУН «Лимнологический институт СО РАН»,
г. Иркутск

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН), г. Новосибирск

Защита диссертации состоится «___» _____ 2018 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН» в конференц-зале Института по адресу:
пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090
тел: +7(383) 363-49-06 (1321); e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.
факс: +7(383) 333-12-78

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Шмели (род *Bombus*) являются одними из основных опылителей как диких растений, так и сельскохозяйственных культур, поскольку данные насекомые хорошо приспособляются 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 паразитическим организмом *Nosema ceranae*, который является характерным паразитом медоносных пчел, также зафиксировано в последние годы (Plischuk et al., 2009; 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 expoeiki* (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. Триджиани показали, что данный паразитический 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 неогрегариин, встречающимся в популяциях шмелей. 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 неогрегариин 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.

Целями данной работы являются изучение уровня зараженности природных популяций шмелей микроспоридией *Nosema bombi*, трипаносоматидами *Crithidia* spp. и неогрегариной *Apicystis bombi*, а также выявление генетического разнообразия данных паразитических организмов в природных азиатских популяциях шмелей (на примере Сибири и Индии).

Задачи:

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 неогрегариин, 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. exproeki*. Вид *C. bombi* наиболее распространен в южных районах Сибири, а вид *C. exproeki* - в Северной Индии. Два варианта последовательностей неогрегариин распространены в исследованных популяциях шмелей, собранных в южных районах Сибири. Первый вариант соответствует виду *A. bombi*, а второй описан впервые. Новый вариант может иметь статус отдельного вида внутри рода *Mattesia*. На территории Северной Индии случаи заражения шмелей неогрегариинами не были установлены.

Теоретическая и практическая значимость исследования. В результате проведенного анализа базы данных GenBank и последующего филогенетического анализа было установлено, какие виды микроспоридий, трипаносоматид и неогрегариин паразитируют на представителях класса Insecta. Полученная информация о микроспоридиях, трипаносоматидах и неогрегариинах в исследованных природных популяциях шмелей вносит новые данные о географическом распространении данных паразитических организмов. Среди наиболее распространенных в южных районах Сибири видов шмелей выявлены 4 вида, которые слабо подвержены заражению 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., профессором Н. И. Еремеевой. Образцы шмелей, собранные в штате Джамму и Кашмир, были предоставлены профессором М. Войцеховским из Ягеллонского университета в Кракове.

Апробация работы. Результаты данной работы были представлены на трех международных научных конференциях. По теме диссертации были опубликованы две статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 140 страницах, содержит 33 рисунка, 6 таблиц и 6 приложений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы шмелей рода *Bombus* собирали в 8 точках на территории южных районов Сибири (Республика Алтай, Иркутская, Кемеровская и Новосибирская области) и в Северной Индии (штат Джамму и Кашмир). Все пойманные шмели были определены до уровня видов. Экземпляры шмелей были зафиксированы в этиловом спирте.

Выделение тотальной ДНК было проведено из мягких тканей брюшка взрослого насекомого (интестины) с помощью набора реактивов DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) (Qiagen, 2006), согласно протоколу фирмы-производителя. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) были подобраны праймеры, специфичные к последовательностям кластера генов рибосомной РНК микроспоридий *Nosema* spp., трипаносоматид *Crithidia* spp. и неогрегарин *Apicystis bombi*, а также последовательности гена *gGAPDH* трипаносоматид *Crithidia* spp.

Для электрофоретического разделения фрагментов ДНК использовали 1.2% агарозный гель, приготовленный на буфере TAE. Для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля использовали набор реактивов QIAquick Gel Extraction Kit, согласно инструкции производителя (Quiagen, 2008).

Определение нуклеотидной последовательности проводили при помощи автоматического секвенирования. Включение метки проводилось при помощи реакции Сэнгера. Определение последовательностей проводилось в центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/sequest>).

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/).

Сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей был проведен с использованием программы ClustalW v. 2.0. Улучшение выравниваний проводилось с помощью алгоритма MUSCLE доступного в пакете программ UniPRO UGENE v. 1.12.3 (Okonechnikov et al., 2012).

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), реализованные в программах MEGA 7.0 и IQ-tree, соответственно (Kumar et al., 2016; Trifinopoulos et al., 2016). Для оценки достоверности топологии NJ филогенетических деревьев использовался бутстреп-тест (1000 репликаций), а для ML филогенетических деревьев - сверхбыстрый бутстреп тест.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разнообразие микроспоридий, трипаносоматид и неогрегаринов, поражающих насекомых отряда Hymenoptera и класса Insecta

Для выявления паразитических микроспоридий, трипаносоматид и неогрегаринов, поражающих насекомых класса Insecta и представителей отряда Hymenoptera, была проанализирована база данных GenBank. Для анализа были выбраны гены, кодирующие рибосомную РНК этих паразитов, поскольку данные последовательности активно используются для построения филогении и наиболее широко представлены в базе данных GenBank.

На первом этапе, был проведен филогенетический анализ микроспоридий, поражающих представителей класса Insecta. Для анализа были использованы 194 последовательности малой субъединицы рибосомной РНК микроспоридий. В результате анализа было установлено, что микроспоридии, выявленные у представителей отряда Hymenoptera, относятся к 5 родам (*Myrmecomorba*, *Thelohania*, *Nosema*, *Kneallhazia*, *Antonosporea*). Согласно данным, представленным в GenBank, на представителях шмелей рода *Bombus* паразитируют микроспоридии одного рода, *Nosema*.

На следующем этапе был проведен филогенетический анализ трипаносоматид, выявленных у насекомых. Для проведения филогенетического анализа были использованы 164 последовательности 18S рРНК видов трипаносоматид. 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, что согласуется с предложенной ранее классификацией семейства Trypanosomatidae (Votýpka et al., 2015). На шмелях паразитируют два вида трипаносоматид, *C. bombi* и *C. expoeki*.

В настоящий момент в базе данных содержится 26 последовательностей неогрегаринов, которые паразитируют на насекомых 3 отрядов (Hemiptera, Hymenoptera и Lepidoptera). Неогрегарины родов *Mattesia* и *Apicystis* являются

наиболее близкородственными и паразитируют на представителях отряда Hymenoptera; разнообразие неогрегаринов, паразитирующих на шмелях, ограничено видом *A. bombi*.

Таким образом, в дальнейшем исследовании поиск зараженных образцов шмелей проводился внутри родов *Nosema*, *Crithidia* и *Apicystis*.

Уровень зараженности природных популяций шмелей микроспоридиями рода *Nosema*

Для изучения уровня зараженности природных популяций шмелей микроспоридиями рода *Nosema* был проведен анализ шмелей в южных районах Сибири и в Северной Индии. Выделение тотальной ДНК было проведено из 1076 образцов, относящихся к 23 видам шмелей.

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. Впоследствии для каждого из 80-ти полученных фрагментов ДНК были установлены нуклеотидные последовательности. Уровни зараженности шмелей микроспоридиями для каждой точки сбора были определены как отношение зараженных шмелей к общему количеству проанализированных шмелей.

В популяциях шмелей на территории Кузнецкого Алатау уровень зараженности микроспоридией *N. bombi* составил 26.1%. В районах сел Степноутово (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%.

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.

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). 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 дерево было реконструировано на основе последовательностей кластера рибосомных генов методом максимального правдоподобия (ML) в программе IQ-tree (Рисунок 1). 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*.

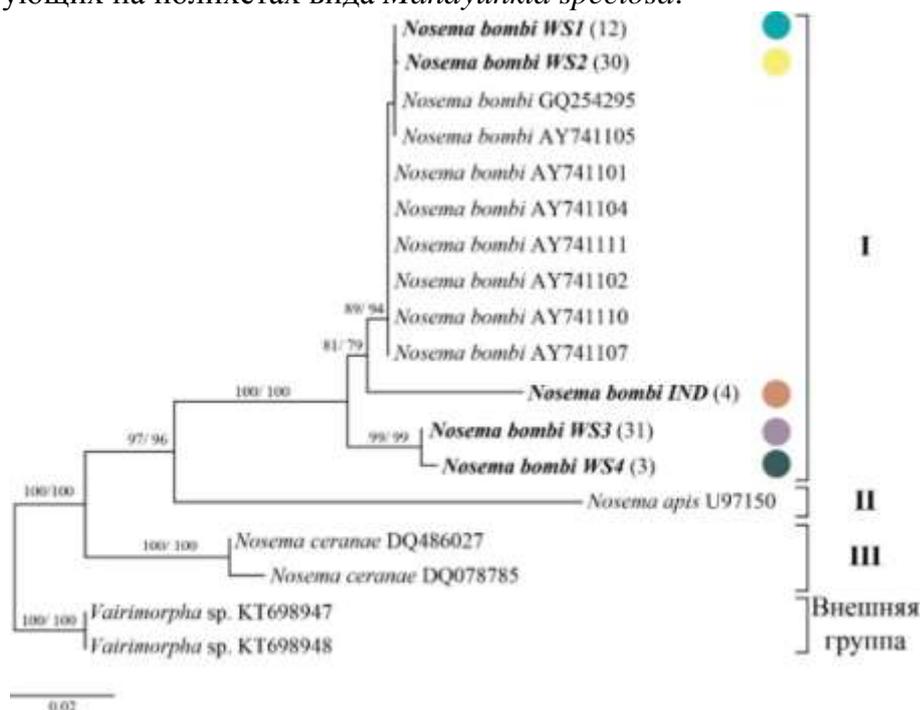


Рисунок 1. Филогенетическое дерево, реконструированное на основе последовательностей кластера генов рРНК микроспоридий рода *Nosema*, поражающих насекомых, методом ML в программе IQ-tree. Жирным шрифтом выделены последовательности микроспоридий, полученные в настоящей работе. В скобках указано количество нуклеотидных последовательностей, относящихся к одному генетическому варианту и использованных для построения филогенетического дерева.

На филогенетическом дереве 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 рРНК 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).

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 2 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 2А).

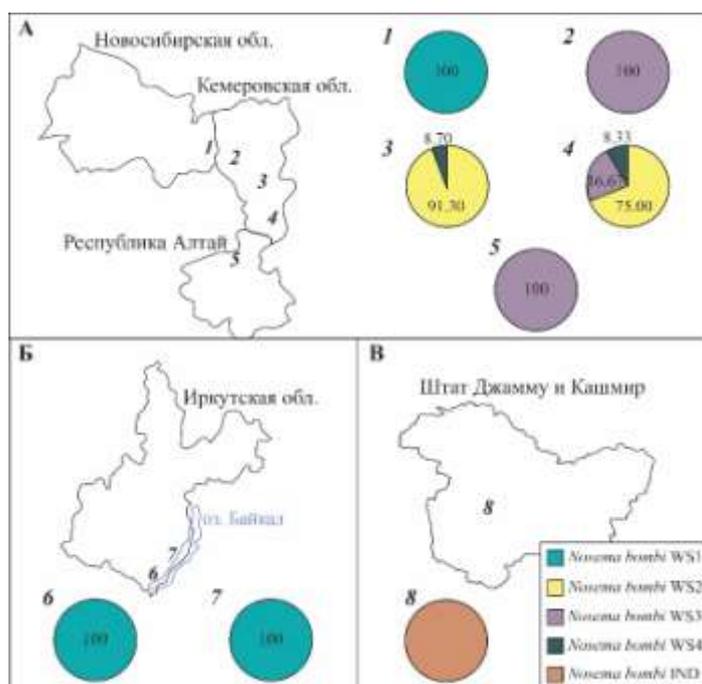


Рисунок 2. Места сбора и диаграммы распределения генетических вариантов *N. bombi* в каждой исследуемой природной популяции. Обозначение мест сбора: 1- село Степногутово; 2- Белово и Гурьевск; 3- поселок Загадное; 4- поселок Усть-Кабырза; 5- Горно-Алтайск; 6- поселок Листвянка; 7- село Косая Степь; 8-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

На территории Восточной Сибири подвержены заражению микроспоридиями оказались виды *B. consobrinus*, *B. lucorum*, *B. schrencki* и *B. sporadicus*. Все образцы шмелей в этой области были поражены *N. bombi* WS1 (рисунок 2Б). В образцах шмелей вида *B. trifasciatus*, собранных в штате Джамму и Кашмир, был представлен генетический вариант *N. bombi* IND (рисунок 2В).

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).

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. Положительные результаты ПЦР амплификации были получены для 208 из 1076 проанализированных образцов ДНК. 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%.

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 критидиями увеличивается к концу летнего периода (Goulson et al., 2012).

Генетическое разнообразие трипаносоматид в природных популяциях шмелей

Для изучения генетического разнообразия трипаносоматид рода *Crithidia* в природных популяциях шмелей были установлены нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР амплификации с праймерами, специфичными к генам 18S рРНК и *gGAPDH* *Crithidia* spp. Размер полученных последовательностей составил около 400 п. н. и 800 п. н., соответственно. 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. expoeki*, ранее описанным у шмелей. Полученные последовательности фрагмента гена 18S рРНК *C. bombi* и *C. expoeki* различались пятью нуклеотидами (в позициях 1753, 1756, 1766, 1789 и 1938). Последовательности гена *gGAPDH* этих двух видов отличались друг от друга по 35 позициям. Внутривидовой вариабельности полученных нами последовательностей *C. bombi* и *C. expoeki* выявлено не было.

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

Распространение трипаносоматид рода *Crithidia* в природных популяциях шмелей

Распространение *C. bombi* и *C. expoeki* в природных популяциях шмелей на территории Западной Сибири представлено на рисунке 3А. Среди 99 зараженных трипаносоматидами шмелей, 15 насекомых были поражены *C. expoeki*, остальные - *C. bombi*. Девять видов шмелей в этой области оказались подвержены заражению трипаносоматидами. Среди этих видов образцы *B. lucorum* и *B. schrencki* были поражены как *C. bombi*, так и *C. expoeki*, в то время как остальные виды шмелей - лишь одним из этих паразитов.

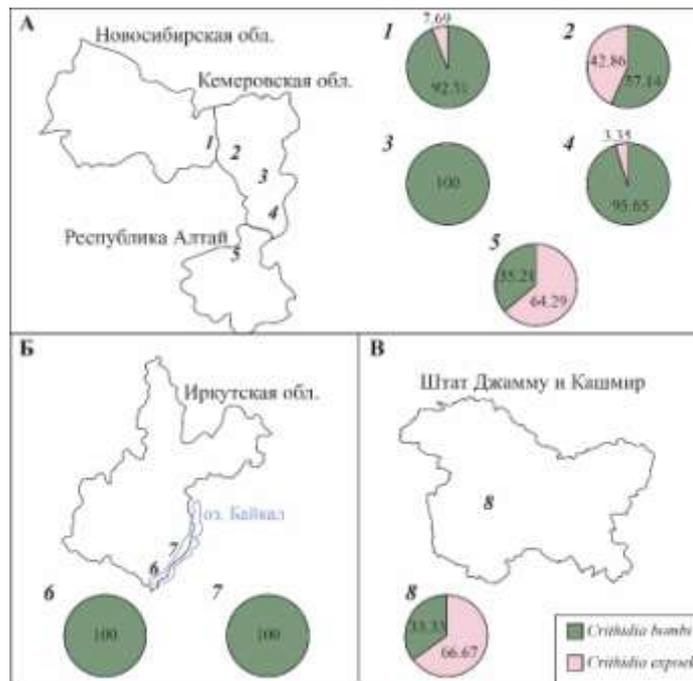


Рисунок 3. Места сбора и диаграммы распределения видов *C. bombi* и *C. expoeki* в каждой исследуемой природной популяции. Обозначение мест сбора: 1- село Степногутово; 2- Белово и Гурьевск; 3- поселок Загадное; 4- поселок Усть-Кабырза; 5- Горно-Алтайск; 6- поселок Листвянка; 7- село Косая Степь; 8-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

Все зараженные трипаносоматидами образцы шмелей, собранных 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. expoeki*, превысило количество образцов, зараженных *C. bombi*.

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. Заражение исследуемых насекомых паразитом *C. expoeki* в этих районах не было установлено (рисунок 3Б).

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. expoeki*, а 4 - *C. bombi* (рисунок 3В). Образцы вида *B. asiaticus* были поражены и *C. bombi*, и *C. expoeki*, а образцы *B. simillimus* и *B. trifasciatus* лишь одним из этих видов.

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. expoeki* установлено лишь в Швейцарии (Schmid-Hempel 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 распространена на территории южных районов Сибири, а *C. exproeki* - в Северной Индии.

Уровень зараженности природных популяций шмелей неогрегаридами рода *Apicystis*

Среди всех проанализированных образцов шмелей, 31 особь оказалась подвержена заражению неогрегаридами. Для каждого зараженного образца была установлена нуклеотидная последовательность гена 18S рРНК, размер последовательности составил около 100 п. н.

В Иркутской области в районе села Косая Степь уровень зараженности шмелей неогрегаридами 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 неогрегаридами варьировали от 0.3% до 2.4%. В Северной Индии не было найдено ни одного зараженного неогрегаридами образца.

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).

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. 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 все последовательности 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. Вариабельности внутри описанных групп выявлено не было.

Филогенетическое древо было реконструировано на основе последовательностей генов 18S рРНК методом максимального правдоподобия в программе IQ-tree (рисунок 4). 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*, паразитирующие на насекомых из отрядов Hemiptera и Diptera.

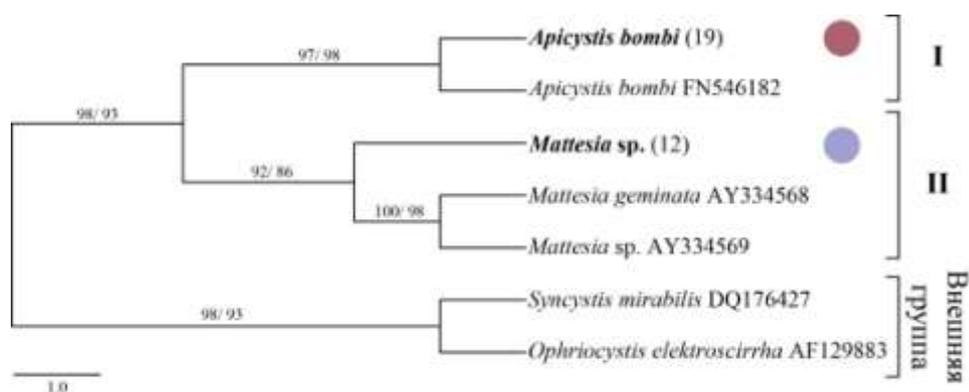


Рисунок 4. Филогенетическое древо, реконструированное на основе последовательностей генов 18S рРНК неогрегаринов, поражающих насекомых, методом ML в программе IQ-tree. Жирным шрифтом выделены последовательности неогрегаринов, полученные в настоящей работе. В скобках указано количество нуклеотидных последовательностей, относящихся к одному варианту и использованных для построения филогенетического древа.

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 GanBank. **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, обнаруженные 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 (Lipa et al., 1996).

Распространение неогрегаринов родов *Apicystis* и *Mattesia* в природных популяциях шмелей

В природных популяциях шмелей Западной Сибири были распространены два варианта неогрегаринов, *A. bombi* и *Mattesia* sp. (рисунок 5А). В районе села Степноутово (Новосибирская область) 5 видов шмелей были заражены неогрегаринами. Среди 10 зараженных насекомых одна половина была поражена *A. bombi*, а вторая – *Mattesia* sp. Случаи заражения двумя видами неогрегаринов были установлены только в образцах вида *B. lucorum*.

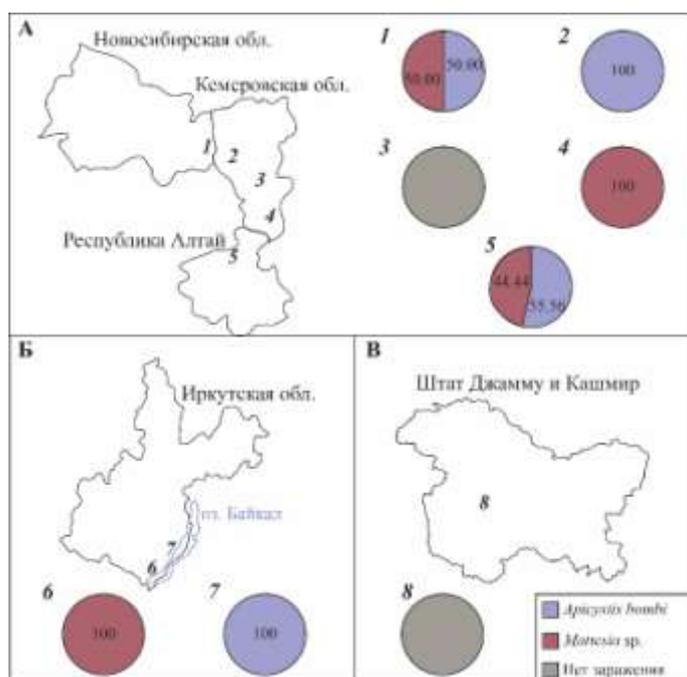


Рисунок 5. Места сбора и диаграммы распределения генетических вариантов *A. bombi* и *Mattesia* sp. в каждой исследуемой природной популяции. Обозначение мест сбора: 1- село Степногутово; 2- Белово и Гурьевск; 3- поселок Загадное; 4- поселок Усть-Кабырза; 5- Горно-Алтайск; 6- поселок Листвянка; 7- село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

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

В районе поселка Усть-Кабырза (Горная Шория) среди всех проанализированных образцов в 2 образцах *V. pascuorum* было установлено заражение неогрегариной *Mattesia* sp. Лишь одна особь вида *V. sichelii* была поражена *A. bombi* на территории Белово и Гурьевска. Среди 88 проанализированных образцов шмелей, собранных в районе поселка Загадное в Кузнецком Алатау, не было обнаружено ни одного зараженного неогрегариной (рисунок 5А).

В районе поселка Листвянка в одном образце вида *V. lucorum* была установлена инфекция неогрегариной *Mattesia* sp. (рисунок 5Б). 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 5В).

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

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* (Jilian et al., 2005; Korner et al., 2005; Cankaya et al., 2006; Larsson, 2007; Plischuk et al., 2009; 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 неогрегаридами. Проанализированные образцы *B. veteranus* не были заражены микроспоридиями. Случаи поражения трипаносоматидами и неогрегаридами *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. Таким образом, эти четыре вида шмелей 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 неогрегаринов *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 неогрегаринов, заражающих насекомых и в первую очередь представителей рода *Bombus*. Было установлено, что паразитами шмелей являются микроспоридии рода *Nosema*, трипаносоматиды *C. bombi* и *C. expeeki*, а также неогрегарины *A. bombi*. В дальнейшем этим данные были использованы для молекулярно-биологических исследований, проведенных в данной работе.

На следующем этапе исследования с помощью молекулярно-биологических методов был проведен поиск основных паразитов в образцах шмелей, собранных в 8 точках сбора на территории южных районах Сибири и 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 анализов 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 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., 2009; 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. exproeki*. Вид *C. bombi* наиболее распространен на территории Сибири, а вид *C. exproeki* - 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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.
3. **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.
4. **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.
5. **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.