

**Генетическая динамика популяций и иммунитет**

УДК 638.12:575.174:[636.093+578.2

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ (*Apis mellifera* L.) И РАСПРОСТРАНЕНИЕ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ ПЧЕЛ НА ФОНЕ ЭПИЗООТИИ КЛЕЩА *Varroa destructor* НА ТЕРРИТОРИИ УДМУРТИИ\***А.Е. КАЛАШНИКОВ<sup>1</sup>, И.В. МАСЛЕННИКОВ<sup>2</sup>, Л.М. КОЛБИНА<sup>2</sup>, И.Г. УДИНА<sup>1</sup>

Пчелы среднерусской породы *Apis mellifera mellifera* L. зимостойки, устойчивы к ряду заболеваний, способны эффективно использовать короткий медосбор. Интрогрессия южных пород влияет на хозяйственные качества местных северных пород, отрицательно отражается на их приспособленности к природным условиям, а также снижает иммунитет, в результате чего повышается восприимчивость пчел к заражению эктопаразитами и распространяются различные заболевания, в том числе вирусные. Заражение пчел клещом *Varroa destructor* предрасполагает к инфицированию вирусами. Представлены данные о дифференциации популяций пчел среднерусской породы на территории Удмуртии, полученные на основании изучения морфометрических показателей (кубитальный индекс крыла — КИ) и оценки варибельности межгенного локуса COI-COII мтДНК с использованием ПЦР. На основании анализа мтДНК степень гибридизации пчел по материнской линии в удмуртских выборках 1UD\_S и 5UD\_S составляла соответственно 15,38 и 60,00 %. Выборки 2UD\_S-4UD\_S отвечали стандарту среднерусской породы. Для всех изученных выборок (1UD\_S-5UD\_S) была получена средняя оценка КИ > 0,55, что подтверждает высокую вероятность их принадлежности к среднерусской породе. Однако по данным анализа варибельности длины межгенного локуса COI-COII гибридизацию с южными породами не наблюдали только для выборок 2UD\_S-4UD\_S, тогда как у 1UD\_S и 5UD\_S ее отмечали, что свидетельствует о большей надежности молекулярных методов при оценке степени гибридизации в выборках пчел. Интересно, что в одном образце выборки 2UD\_S была выявлена гетероплазмия PQ/p3×Q. У пчел в зоне их поражения клещом *V. destructor* обнаружили вирус деформации крыла (DWV) (23,3 % семей), вирусы хронического паралича (ABPV) и мешотчатого расплода (SBV) (13,3 %) с помощью ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией).

**Ключевые слова:** медоносная пчела, *Apis mellifera* L., митохондриальная ДНК, кубитальный индекс, вирус деформации крыла, вирус мешотчатого расплода, вирус хронического паралича, варроатоз, *Varroa destructor*.

**Keywords:** honey bee, *Apis mellifera* L., mitochondrial DNA, cubital index, deformed wing virus, sacbrood virus, chronic paralysis virus, varroatoz, *Varroa destructor*.

Темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* L. и относящиеся к ней пчелы среднерусской породы широко распространены на территории России (1), в том числе в Удмуртии (2) и Башкортостане (3). Эти пчелы зимостойки, устойчивы к ряду заболеваний, способны эффективно использовать короткий медосбор. Их хоботок короткий (6,0-6,4 мм), они имеют темную окраску, характерную светлую «сухую» печатку меда, но агрессивны и склонны к повышенному роению. Значение кубитального индекса (КИ) стандарта породы находится в пределах 0,60-0,65 (4).

Под воздействием антропогенного фактора в России, как и в Западной Европе, Северной Америке, произошла гибридизация *A. m. mellifera* с подвидами медоносной пчелы, распространенными в более южных широтах. Интрогрессия южных пород влияет на хозяйственные качества местных северных пород, отрицательно отражается на их приспособленности

\* Работа выполнена в рамках субсидии для юридических лиц на поддержку научных исследований в рамках реализации мероприятий 1.1-1.5 Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (соглашение № 8088 от 23 июля 2012 года между Министерством образования и науки Российской Федерации и Российской академией наук и Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институтом общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской Академии наук). Работа также поддержана грантом Всемирного фонда защиты пчел (World Save Bee Fund e.V.) «Мониторинг эпидемиологической ситуации и оценка причин коллапса пчелиных семей в Удмуртской Республике» (соглашение о поддержке научных и научно-практических проектов № 01-ЦФ/Г).

к природным условиям, а также снижает иммунитет, в результате чего повышается восприимчивость пчел к заражению эктопаразитами и распространяются различные заболевания, в том числе вирусные (5).

Заражение пчел клещом *Varroa destructor* предрасполагает к инфицированию пчел вирусами (5-7). Клещ служит резервуаром для вирусов пчел, поэтому инвазия клеща ослабляет их иммунитет и способствует распространению вирусной инфекции (8). Из изученных РНК-содержащих вирусов медоносной пчелы шесть вызывают тяжелые последствия при инфицировании вплоть до гибели пчелиных семей, среди них вирус деформации крыла (DWV) (5), острого (ABPV) и хронического паралича (CBPV), а также кашмирский вирус (KBV), вирус мешотчатого расплода (SBV) и вирус черных маточников (BQCV) (6).

Нашей целью было изучение дифференциации популяций пчел на территории Удмуртии при помощи морфометрического метода (определения кубитального индекса) (КИ) и анализа вариабельности межгенного локуса COI-COII митохондриального генома (мтДНК), а также выявление распространения у пчел РНК-содержащих вирусов.

*Методика.* В работе использовали медоносных пчел с территории Удмуртии, собранных на пасеках в 2011-2012 годах. Для исследования кубитального индекса и анализа мтДНК отбирали особей в следующих районах: д. Красный Яр (1UD\_S) ( $n = 11$ ), д. Б. Уча (2UD\_S) ( $n = 24$ ), д. Моторки (3UD\_S) ( $n = 23$ ), г. Ижевск, 9-й км (4UD\_S) ( $n = 8$ ) и Воткинский район (5UD\_S) ( $n = 7$ ). Образцы для изучения РНК-содержащих вирусов пчел отбирали из 30 семей на пасеке, расположенной на 9-м км Якшур-Бодьинского тракта ( $n = 90$ ) (в исследовании объединяли материал от трех пчел из каждой семьи в пул образца), и затем анализировали при помощи ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Изучение морфометрических признаков пчел (КИ) выполняли согласно рекомендациям (4). Для этого крылья пчел фотографировали, фотографии обрабатывали в программе Corel X13. Значение КИ указывали в долях от единицы.

ДНК из грудного отдела пчел выделяли при помощи набора «Diatom DNA prep 400» («Изоген», Россия), ПЦР мтДНК проводили с применением набора «ScreenMix» («Евроген», Россия). Для выделения РНК использовали набор «Trizol» («Изоген», Россия).

Наличие РНК-вирусной инфекции выявляли методом ОТ-ПЦР с помощью набора «GenPack RT-PCR Core», а затем ставили ПЦР с набором «ScreenMix» («Изоген», Россия). В реакции ПЦР мтДНК использовали праймеры согласно описанию (1-3), в ОТ-ПЦР — праймеры, представленные ранее (6, 8). Тип породы (северный или южный) определяли при помощи ПЦР-анализа длины межгенного локуса COI-COII мтДНК пчел (1-3).

Математическую и статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Microsoft Excel.

*Результаты.* Среднее значение КИ для популяции вычисляется как усредненная величина. КИ может быть указанием на гибридизацию пород при формировании изученной популяции или на соответствие рассматриваемой популяции (выборки) породному стандарту по морфометрическим показателям в целом.

По результатам исследований было установлено, что средние значения КИ пчел из удмуртских популяций 1UD\_S-5UD\_S несколько меньше, чем для стандарта породы (различия составили от 7 до 17 %). Показатели рассчитывали на основании данных, представленных в таблице, по

отклонению от среднего стандарта КИ для породы (в пределах ошибки метода 9,8 %). Таким образом, для популяций пчел 1UD\_S-5UD\_S получили среднюю оценку КИ > 0,55, что свидетельствует о высокой вероятности их принадлежности к среднерусской породе.

При помощи ПЦР проанализировали вариабельность межгенного локуса COI-COII мтДНК в изученных выборках пчел (см. табл.). Эта область мтДНК содержит элемент Р длиной 54 п.н., затем вариабельное число элементов Q, которыми различаются пчелы южных и северных популяций. Изученный участок митохондриального генома расположен между 3'-областью гена COI и 5'-областью гена COII с общей длиной 50 п.н. Известно, что в изученном участке мтДНК у пчел южных пород содержится один элемент Q (длина 196 п.н.), а у пчел северных популяций — два элемента Q и более.

**Морфометрические показатели и частота митотипов в изученных популяциях пчел *Apis mellifera mellifera* L. на территории Удмуртии (2011-2012 годы)**

Выборка	n	КИ	Доверительный интервал (P = 0,05)	Cv	КИ		Вариант митотипа по мтДНК			Степень метизации, %
					min	max	PQ (350 п.н.)	PQQ (546 п.н.)	546/796PQQ/P3×Q	
1UD_S	11	0,499	±0,037	0,125	0,409	0,600	0,1538	0,8462		15,38
2UD_S	24	0,557	±0,040	0,178	0,318	0,750		0,9600	0,0400	0
3UD_S	23	0,557	±0,030	0,132	0,429	0,722		1,0000		0
4UD_S	8	0,550	±0,034	0,089	0,500	0,632		1,0000		0
5UD_S	7	0,537	±0,053	0,134	0,450	0,625	0,6000	0,4000		60,00

Примечание. КИ — кубитальный индекс. Пропуски означают отсутствие соответствующего варианта митотипа.

На основании анализа мтДНК выявлена гибридизация пчел по материнской линии в выборках 1UD\_S и 5UD\_S, которая составила соответственно 15,38 и 60,00 %. Выборки 2UD\_S-4UD\_S отвечали стандарту среднерусской породы, так как в них не были обнаружены короткие варианты изученного фрагмента (350 п.н.), которые характерны для южных пород. Таким образом, в отличие от морфометрического анализа, на основании которого все пять изученных популяций с высокой вероятностью могли быть отнесены к среднерусской породе, при оценке вариабельности длины межгенного локуса COI-COII гибридизация с южными породами была подтверждена для выборок 1UD\_S и 5UD\_S, и только в образцах 2UD\_S-4UD\_S она отсутствовала. В одном образце выборки 2UD\_S была выявлена гетероплазмия PQ/p3×Q.

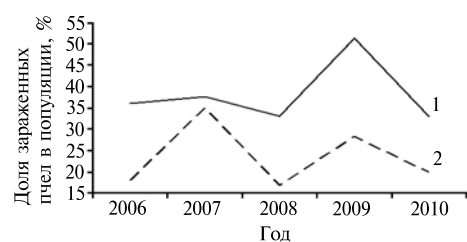
Для пчел из урбанизированных районов Республики Башкортостан ранее также наблюдали снижение среднего значения КИ на 5,25 % и присутствие митотипа PQ, характерного для южных пород. В некоторых популяциях пчел степень гибридизации с южными породами (в том числе с карпатской) достигала 50 %. В районах Удмуртии с низкой плотностью населения, из которых взяты наши выборки 2UD\_S и 3UD\_S, как и для лесных районов Башкортостана (бурзятинская популяция, заповедник Шулган-Таш), отмечена крайне низкая степень гибридизации среднерусской пчелы с южными породами (не более 0,01, частота митотипа PQQ не менее 0,99) (3).

Происходящая в настоящее время гибридизация разных пород пчел обусловлена человеческим фактором, так как пчеловоды зачастую предпочитают разводить более миролюбивую карпатскую пчелу, не принимая в расчет факт преимущественного распространения среднерусской породы в своем регионе.

Полученные данные об одновременном инфицировании семей пчел несколькими РНК-вирусами предполагают вероятную роль этих инфекций в синдроме их массовой гибели — коллапсе пчелиной семьи (6, 7). К важ-

ным причинам гибели пчелиных семей относится также заболевание варроатозом. Это тяжело протекающая, не поддающаяся до сих пор полному излечению паразитарная болезнь пчелиных семей с одновременным поражением рабочих пчел, трутней, маток и расплода (8, 9). Возбудитель — клещ *Varroa destructor*, источник заражения — инфицированные клещом пчелиные семьи. Клещ распространяется блуждающими пчелами, пчелами-воровками, трутнями, с роями, при кочевках пасек, купле и продаже пчел и маток и др. Основное место сосредоточения клеща в активный период — печатный расплод и пчелы внутри улья. Трутневой расплод поражается в 7-15 раз сильнее, чем расплод рабочих пчел.

Данные о распространении варроатоза в Удмуртии представлены на рисунке. На пасеках, где выполнялся отбор образцов для исследования на наличие вирусной инфекции, была установлена высокая степень инвазии клеща *Varroa destructor* (более 40 % при допустимой норме 2 %). В лесу на этой пасеке за зимовку погибли две пчелиные семьи.



Динамика наиболее распространенных болезней пчел в Удмуртии: 1 — варроатоз, 2 — нозематоз (по данным ГУ ветеринарии Удмуртской Республики).

В России известны случаи вирусных заболеваний пчел, например поражение вирусом деформации крыла (5) и другими вирусами (6). По нашим данным, вирус деформации крыла (DWV) распространен наиболее широко (7 семей, или 23,3 %). Он чаще всего встречается в семьях пчел, пораженных *V. destructor* (3, 4). Вирусы хронического паралича (ABPV) и мешотчатого расплода (SBV) мы отмечали в 4 семьях (13,3 %). Не менее двух

вирусов одновременно обнаружили в 4 случаях (13,3 %), не менее трех — в одном (3 %). Наблюдали одновременную инфекцию вирусами DWV и SBV, а также DWV и ABPV. При этом необходимо отметить, что вирус мешотчатого расплода наиболее эффективно детектируется именно при ОТ-ПЦР (метод рассматривается как альтернатива обнаружению вируса при диагностике только по клиническим проявлениям заболевания). В работах О. Vegepü с соавт. (8) и J.R. Miranda с соавт. (9) выявлены инфекции одновременно вирусами DWV и SBV, а также DWV и ABPV. Отмечены и другие смешанные вирусные инфекции. Можно предположить, что при смешанных вирусных инфекциях их летальность для пчелиных семей повышается (9).

Итак, нами проведен анализ породной принадлежности пчел на территории Удмуртии одновременно по кубитальному индексу и по вариативности межгенного локуса COI-COII мтДНК. Выявлены популяции, которые представляют среднерусскую породу пчел. Продемонстрировано, что оценка кубитального индекса КИ и анализ мтДНК дополняют друг друга, однако молекулярный метод дает более надежные результаты. У пчел на территории Удмуртии обнаружены РНК-содержащие вирусы, заражение которыми может приводить к летальному исходу. В некоторых выборках наблюдали комбинированную вирусную инфекцию, при которой риск гибели пчелиной семьи возрастает.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кривцов Н.И., Горячева И.И., Удина И.Г., Бородачев А.В., Монахова М.А. Идентификация пород и популяций медоносной пчелы с использованием ме-

- тода ПЦР. Сельскохозяйственная биология, 2010, 6: 26-29.
2. Непейвода С.Н., Колбина Л.М., Воробьева С.Л., Санникова Н.В., Масленников И.В., Ильясов Р.А., Николенко А.Г. Анализ дифференциации популяции *Apis mellifera* в Удмуртии. Пчеловодство, 2011, 10: 12-13.
  3. Николенко Ю.М., Беньковская Г.В., Поскряков А.В., Николенко А.Г., Вахитов В.А. Использование метода ПЦР для контроля чистопородности пчелосемей *Apis mellifera mellifera* L. в условиях Южного Урала. Генетика, 1998, 34(11): 1574-1577.
  4. Бородачев А.В., Бурмистров А.Н., Касьянов А.И., Кривцова Л.С., Кривцов Н.И., Лебедев В.И., Мартынов А.Г., Соловьева Л.Ф., Харитонов Н.Н. Методы проведения научно-исследовательских работ в пчеловодстве. Рыбное, 2002.
  5. Удина И.Г., Кунижева С.С., Гришечкин А.Е., Калашников А.Е., Учаева В.С., Кривцов Н.И., Злобин В.И. Обнаружение вируса деформации крыла у медоносной пчелы *Apis mellifera* L. на пасеках в Московской области методом ОТ-ПЦР. Вопросы вирусологии, 2010, 5: 37-40.
  6. Калашников А.Е., Удина И.Г. Распространение РНК-содержащих вирусов у медоносной пчелы *Apis mellifera* L. на территории России. Farm animals, 2012, 1: 72-76.
  7. Колбина Л.М., Санникова Н.А., Воробьева С.Л., Непейвода С.Н., Паньков Е.В., Масленников И.В., Калашников А.Е., Удина И.Г. О вирусной инфекции пчел в Республике Удмуртия. Пчеловодство, 2012, 8: 35.
  8. Berenyi O., Vakonyi N., Derakhshifar I., Koglbberger H., Nowotny N. Occurrence of six honey bee viruses in diseased Austrian apiaries. Appl. Environ. Microbiol., 2006, 72(4): 2414-2420.
  9. Miranda J.R., Cordoni G., Budge G. The acute bee paralysis virus—Kashmir bee virus—Israeli acute paralysis virus complex. J. Invertebr. Pathol., 2010, 103(1): 30-47.

<sup>1</sup>ФГБУН Институт общей генетики

им. Н.И. Вавилова РАН,

119991 г. Москва, ул. Губкина, 3,

e-mail: aekalashnikov@vigg.ru, irina\_udina@mail.ru;

<sup>2</sup>ГНУ Удмуртский НИИ сельского хозяйства

Россельхозакадемии,

427007 Удмуртская Республика, Завьяловский р-н,

пос. Первомайский, ул. Ленина, 1,

e-mail: lidakolbina@yandex.ru

Поступила в редакцию

15 ноября 2012 года

## GENETIC DIFFERENTIATION OF POPULATIONS OF HONEY BEE (*Apis mellifera* L.) AND DISTRIBUTION OF RNA-CONTAINING VIRUSES AT THE BACKGROUND OF EPIZOOTIA OF *Varroa destructor* ON THE TERRITORY OF UDMURTIA

A.E. Kalashnikov<sup>1</sup>, I.V. Maslennikov<sup>2</sup>, L.M. Kolbina<sup>2</sup>, I.G. Udina<sup>1</sup>

### Summary

Bees *Apis mellifera mellifera* L. of the Middle Russian breed are resistant to cold winter and a number of diseases, and can effectively use short summer for nectar collection. Introgression of southern bees affects the trait of local northern breeds and changes negatively their adaptation to environment, decreases the immunity and, as a result, increases their susceptibility to ectoparasites and viruses. Mite infestation with *Varroa destructor* predisposes the honey bees to viral infection. Assessment of the purity degree of breed affiliation to Middle Russian breed or to dark forest honey bee *Apis m. mellifera* L. of Udmurt populations of honey bee was fulfilled by the analysis of cubital index (detected by wing parameters) and the study of variation of the intergenic locus COI-COII of mtDNA by PCR. By mtDNA variation, the hybridization in 1UD\_S and 5UD\_S specimen makes 15.38 и 60.00 %, respectively, and 2UD\_S-4UD\_S specimen met the standards of the Middle Russian breed. In 1UD\_S-5UD\_S, an average cubital index was more than 0.55, so the honey bees can be referred to Middle Russian breed with high probability. Nevertheless, with regard to variability of the intergenic locus COI-COII of mtDNA, the hybridization with southern bees occurred in 2UD\_S-4UD\_S specimen, but not in 1UD\_S and 5UD\_S. In 2UD\_S a heteroplasmy PQ/p3×Q was found. The presence of RNA viruses was detected by RT-PCR in bees under mite infestation with *V. destructor*. DWV, ABPV and SBV were found in 23.3 %, 13.3 % and 13.3 % of bee colonies, respectively. A combination of two or more types of viruses was identified in 13.3 % of bee colonies, and at least three types were detected in 3.0 %. A simultaneous infection was observed for DWV and SBV, and for DWV и ABPV.