

Кафедра информационной биологии ФЕН НГУ

РАСПРОСТРАНЕНИЕ И РАЗНООБРАЗИЕ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ МИКРОСПОРИДИЙ У ПЧЕЛ (РОД *APIS*) И ШМЕЛЕЙ (РОД *BOMBUS*) НА ТЕРРИТОРИИ ИНДИИ

Работу выполнила: Трапезникова М.С., гр. 12412

Научный руководитель: к.б.н. Конопацкая И.Д.

Лаборатория молекулярно-генетических систем, ИЦиГ СО РАН

Разнообразие микроспоридий у медоносных пчёл и шмелей

Микроспоридии - облигатные внутриклеточные спорообразующие паразитические организмы, которые относятся к Царству Грибы.

Распространение паразитических микроспоридий в популяциях медоносных пчёл и шмелей является одной из причин снижения численности данных опылителей.



Nosema apis

Nosema ceranae



Nosema bombi Новые варианты *N. bombi*

Цели и задачи исследования

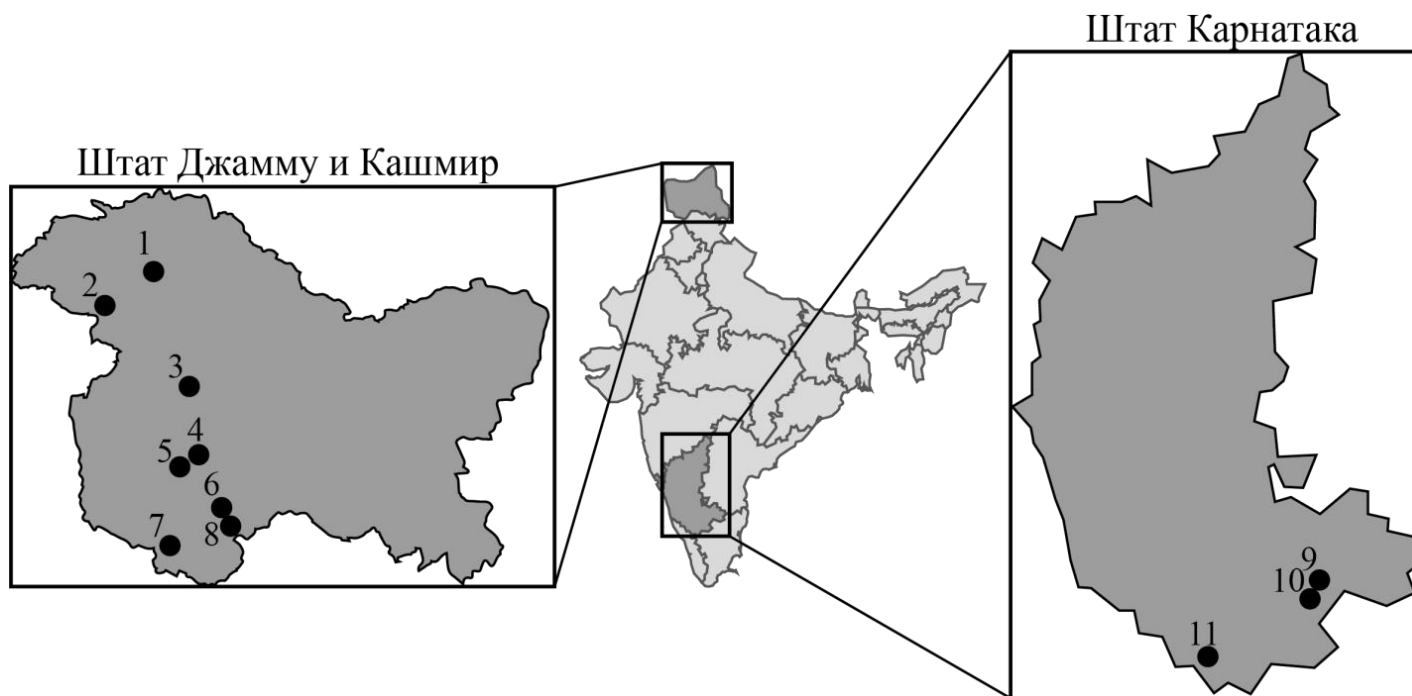
Целью исследования является изучение распространения и разнообразия микроспоридий в природных популяциях медоносных пчёл и шмелей на территории Индии.

Задачи исследования:

- 1) Биоинформатический поиск и анализ последовательностей кластера генов рибосомной РНК микроспоридий, паразитирующих на насекомых отряда Hymenoptera и класса Insecta, представленных в генетических базах данных.
- 2) Установление нуклеотидных последовательностей кластера генов рибосомной РНК паразитических микроспоридий, выявленных в образцах медоносных пчёл и шмелей с территории Индии.
- 3) Сравнительный и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей кластера генов рибосомной РНК, выявленных в данной работе, и представленных в генетических базах данных.

Объекты исследования

Объектами исследования являются паразиты медоносных пчёл и шмелей: микроспоридии рода *Nosema* (Microsporidia: *Nosematidae*).



Образцы медоносных пчёл и шмелей были предоставлены проф. М. Войцеховским (Ягеллонский университет, г. Краков, Польша).

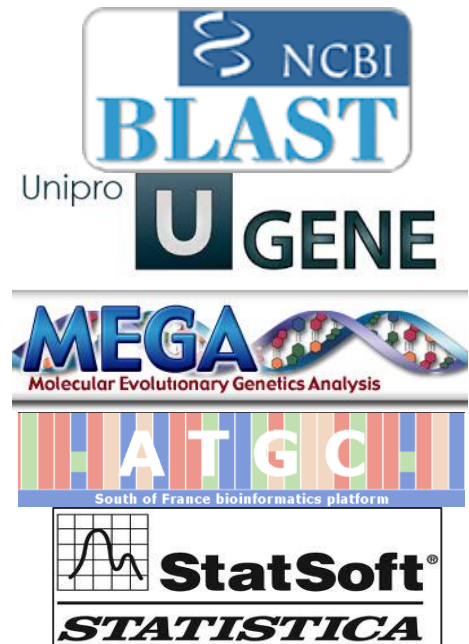
Методы и подходы, используемые в исследовании

Биоинформатические подходы:

- логический поиск по базе данных GenBank;
- поиск по гомологии с помощью программы BLAST;
- сравнительный анализ;
- филогенетический анализ.

Экспериментальные подходы:

- выделение тотальной ДНК;
- ПЦР амплификация;
- электрофорез в агарозном геле;
- секвенирование ДНК методом Сэнгера
(анализ реакций секвенирования – ЦКП «Геномика»).



Кластер генов рибосомной РНК микроспоридий

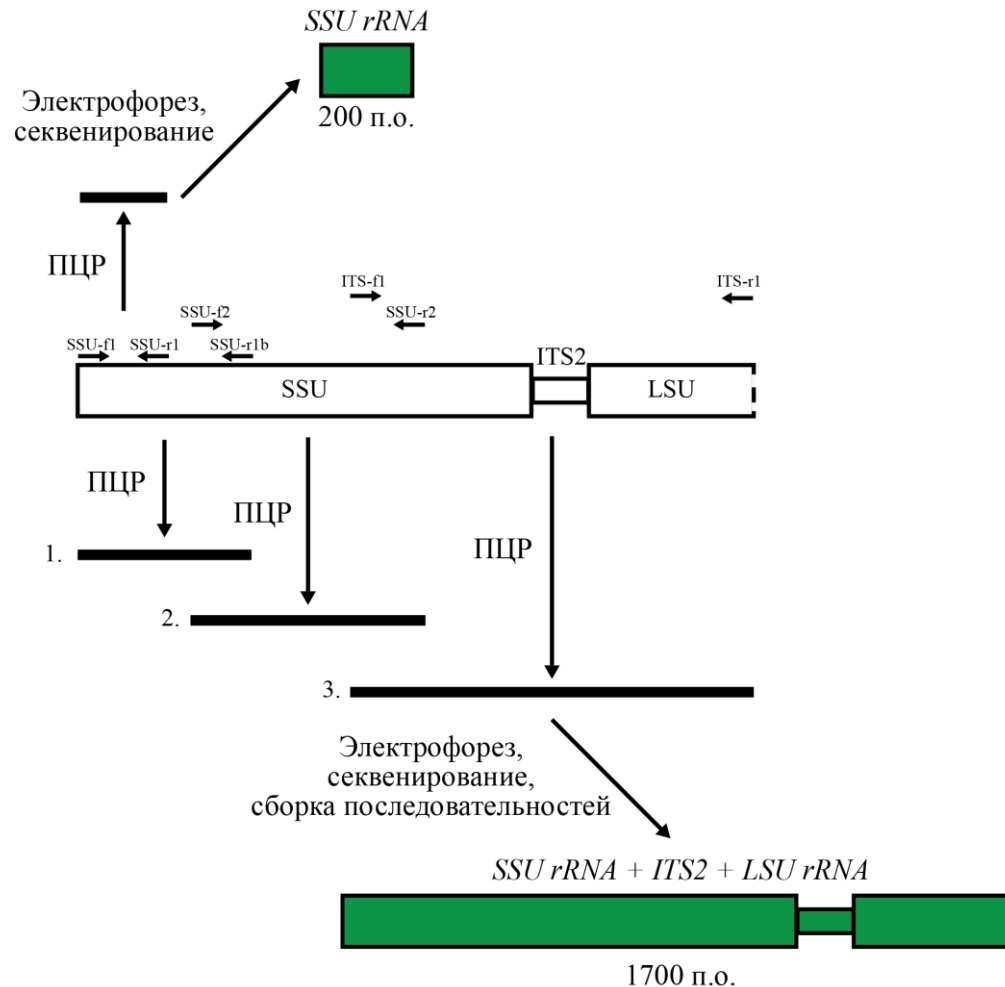
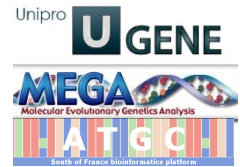
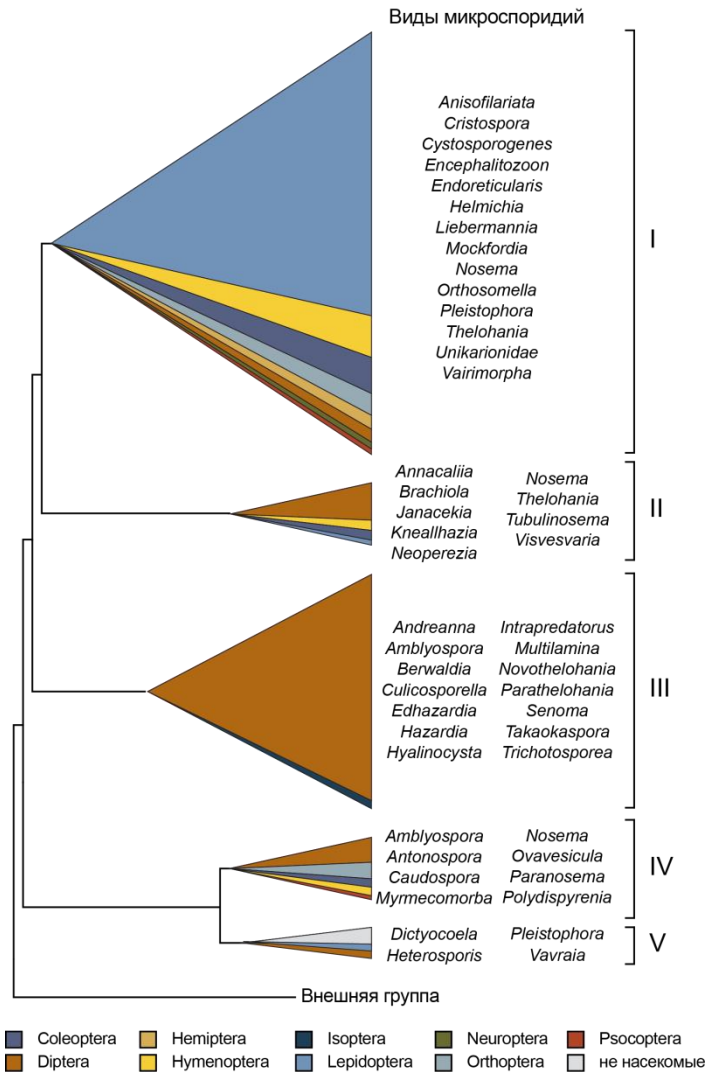


Схема этапов установления нуклеотидных последовательностей фрагментов кластера генов рибосомных РНК микроспоридий

Результаты: Разнообразие микроспоридий, паразитирующих на насекомых отряда Hymenoptera и класса Insecta



- Микроспоридии, выявленные у представителей отряда Hymenoptera, относятся к 5 родам (*Myrmecomorba*, *Thelohania*, *Nosema*, *Kneallhazia*, *Antonospora*) и двум классам Terresporidia и Aquasporidia.
- Разнообразие микроспоридий медоносных пчёл рода *Apis* и шмелей *Bombus* ограничено родом *Nosema*.

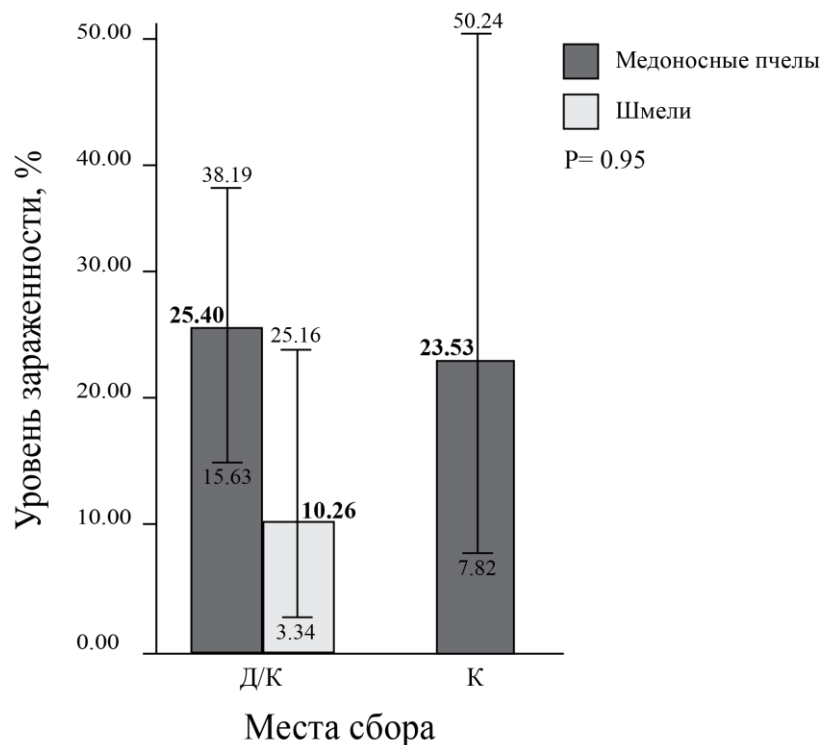
Филогенетическое древо, реконструированное на основе последовательностей гена *SSU rRNA* микроспоридий, паразитирующих на насекомых отряда Hymenoptera и класса Insecta, представленных в базе данных GenBank.

Результаты: Присутствие микроспоридий в образцах медоносных пчёл и шмелей с территории Индии

Место сбора	Общее кол-во образцов	Количество образцов, заражённых микроспоридиями
Медоносные пчелы рода <i>Apis</i>		
Штат Джамму и Кашмир	63	16
Штат Карнатака	17	4
Шмели рода <i>Bombus</i>		
Штат Джамму и Кашмир	39	4

Результаты ПЦР амплификации тотальной ДНК медоносных пчёл и шмелей с праймерами специфичными к *SSU rRNA Nosema spp.*

Результаты: Уровень зараженности медоносных пчёл и шмелей микроспоридиями *Nosema* spp.

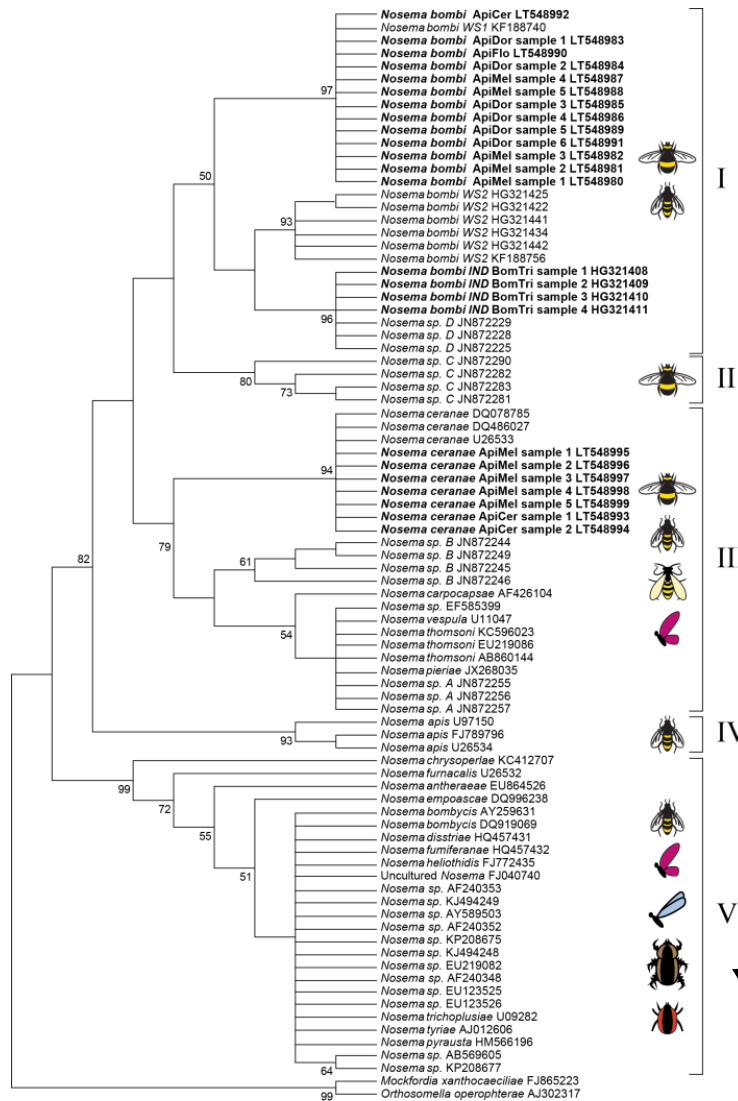


Д/К- штат Джамму и Кашмир, К- штат Карнатака

- Уровень зараженности в природной популяции медоносных пчёл в штате Джамму и Кашмир составил 25.40%, а в штате Карнатака – 23.53%.
- На территории штата Джамму и Кашмир микроспоридиями было заражено 10.26% проанализированных образцов шмелей.

Уровень зараженности природных популяций медоносных пчел и шмелей микроспоридиями *Nosema* spp. с указанием доверительных интервалов, полученных с помощью метода Клоппера-Пирсона (Clopper, Pearson 1934).

Результаты: Разнообразие микроспоридий в популяциях медоносных пчел и шмелей на территории Индии

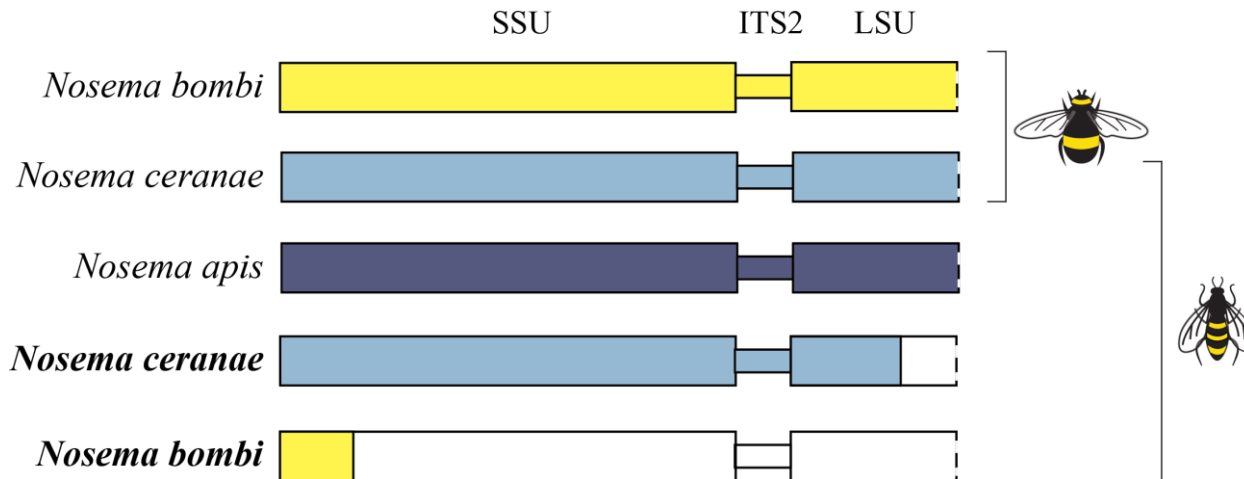


- В проанализированных образцах медоносных пчёл присутствуют микроспоридии двух видов *Nosema ceranae* и *Nosema bombi*.
- *Nosema bombi* у пчёл выявлена впервые.
- В проанализированных образцах шмелей представлен единственный вид микроспоридий - *N. bombi*.

Рисунок. Филогенетическое древо, реконструированное на основе последовательностей генов рибосомной РНК малой субъединицы рибосом микроспоридий, поражающих насекомых, методом максимального правдоподобия (ML) в программе PhyML v.3.0. Для оценки достоверности был использован бутстреп-тест (100 репликаций). Жирным шрифтом выделены последовательности микроспоридий, полученные в настоящей работе.

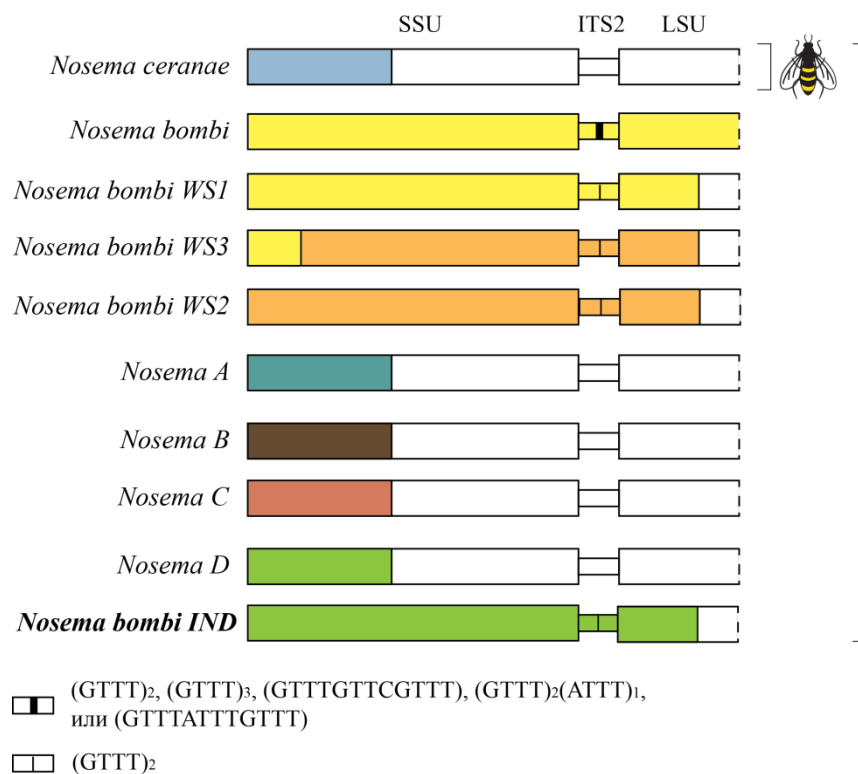
Результаты: Генетические варианты микроспоридий в популяциях медоносных пчёл на территории Индии

- Для образцов медоносных пчёл, зараженных микроспоридием *N. bombi*, не удалось установить последовательности *SSU rRNA*, *ITS2* и *LSU rRNA*.
- Сравнительный анализ последовательностей *SSU rRNA*, *ITS2* и *LSU rRNA* *N. ceranae* из образцов медоносных пчёл показал отсутствие генетической варибельности данного паразита.



Генетические варианты кластера генов рибосомной РНК микроспоридий, выявленных у медоносных пчёл рода *Apis*. Последовательности, выявленные в рамках настоящей работы, выделены жирным шрифтом.

Результаты: Генетические варианты микроспоридий в популяциях шмелей на территории Индии



Сравнительный анализ показал, что в проанализированных образцах шмелей представлен единственный генетический вариант микроспоридии *Nosema D*.

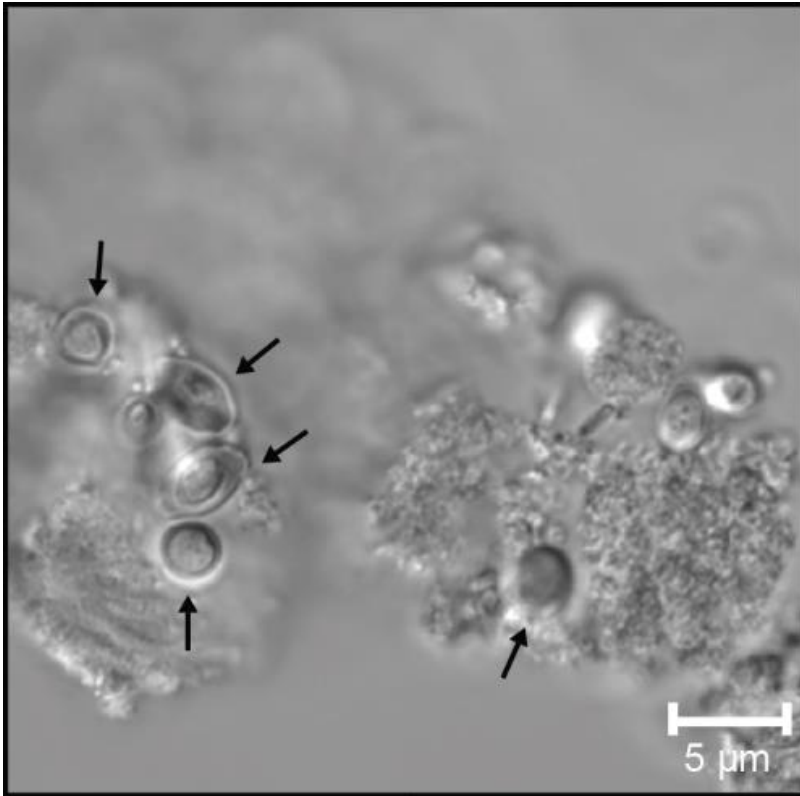
Генетические варианты кластера генов рибосомной РНК, микроспоридий выявленных у шмелей рода *Bombus*. Последовательности, выявленные в рамках настоящей работы, выделены жирным шрифтом.

Выводы

1. В результате биоинформатического анализа последовательностей кластера генов рибосомной РНК микроспоридий, представленных в базе данных GenBank, было показано, что на насекомых отряда Hymenoptera паразитируют микроспоридии пяти родов (*Antonospora*, *Kneallhazia*, *Myrmecomorba*, *Nosema* и *Thelohania*) из двух классов Terresporidia и Aquasporidia. Разнообразие микроспоридий, поражающих медоносных пчёл рода *Apis* и шмелей *Bombus*, ограничено родом *Nosema*.
2. Микроспоридии вида *N. bombi*, исходно описанные исключительно для шмелей рода *Bombus*, были впервые выявлены в природных популяциях медоносных пчёл видов *A. cerana*, *A. dorsata*, *A. florea* и *A. mellifera*.
3. В природных популяциях медоносных пчёл рода *Apis* на территории штата Джамму и Кашмир выявлены генетические варианты микроспоридий *N. bombi* WS1 и *N. ceranae*, а на территории штата Карнатака обнаружен только вариант *N. bombi* WS1.
4. Генетический вариант микроспоридий *N. bombi* - *Nosema D*, ранее описанный для шмелей на территории Китая, выявлен в природных популяциях шмелей на территории штата Джамму и Кашмир (Индия).

Спасибо за внимание!

Структура спор микроспоридий



Nosema bombi
(отдел Microsporidia)



Строение споры