

шие участки без клеток, окруженные клетками округлой формы (поражение монослоя 30–40 %), клетки монослоя (80 %) содержали в своей цитоплазме мелкую зернистость. Через 96 часов с момента заражения наблюдалось поражение монослоя не менее 80 % с большими очагами отслоения клеток. В контрольных матрасах монослоем оставался полным и ровным, без признаков клеточной дегенерации.

Полученный в результате культивирования в культуре ФЭК материал признан стерильным (отсутствие роста микроорганизмов на МПА, МПБ, МППБ, Сабуро).

Методом ПЦР проведена идентификация вируса, а также установлена положительная динамика накопления вируса в культуре ФЭК. Так, по сравнению с вирусным материалом, полученным непосредственно от пчел, в вирусном материале после культивирования в культуре фибробластов куриных эмбрионов наблюдалось увеличение концентрации вируса в 1,9 раза. Это может говорить о том, что для изоляции и культивирования вируса деформации крыла пчел может быть использована культура фибробластов из развивающихся эмбрионов кур.

Литература

1. Угрозы распространения вирусных инфекций у пчел (*Apis mellifera* L.) и роль клеща *Varroa Destructor* в развитии патологий / А. В. Спрыгин [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51, № 2. – С. 156–171.
2. Yue, C. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honey bees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*) / C. Yue, E. Genersch // Journal of General Virology. – 2005. – Vol. 86. – P. 3419–3424.
3. Nielsen, S. L. Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark / S. L. Nielsen, M. Nicolaisen, P. Kryger // Apidologie. – 2008. – Vol. 39. – P. 310–314.
4. Localization of deformed wing virus (DWV) in the brains of the honeybee, *Apis mellifera* Linnaeus / K. S. Shah [et al.] // Virology Journal. – 2009. – P. 6–182.

АСКОСФЕРОЗ ПЧЕЛ и МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ASCOSPHAERA APIS

М. И. Черник, Ю. И. Тяпша, О. В. Дубаневич, О. Л. Гуринович

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеслесского»,
г. Минск, Республика Беларусь, e-mail: chernict@mail.ru

Аннотация. В работе представлены результаты исследований по молекулярно-генетической детекции генома *Ascosphaera apis* и разработке ПЦР-диагностики аскосфероза пчел.

Ключевые слова: аскосфероз пчел, ПЦР-диагностика, геном *Ascosphaera apis*, Беларусь.

Введение. Благодаря хорошей приспособляемости к различным условиям внешней среды микроскопические грибы успешно выдерживают конкуренцию с другими микроорганизмами и часто вытесняют их в жизненной борьбе с того или иного субстрата.

Из основных микозов, патогенных для пчел, значительное распространение получил аскосфероз (перицистомикоз, перицистоз, известковый расплод, меловый расплод, сухой гнилец). АСКОСФЕРОЗ ПЧЕЛ (*Ascosphaeriosis*) – инфекционная болезнь пчелиных семей, вызываемая грибом *Ascosphaera apis*, характеризующаяся поражением трутневых, пчелиных личинок и куколок, в редких случаях поражаются маточные личинки. К заражению возбудителем *Ascosphaera apis* чувствительны яйца, личинки и куколки, однако в лабораторных условиях воспроизвести заражение яиц и куколок не удалось.

С. Ф. Спилтор в 1955 г. определил для гриба новый род – *Ascosphaera*. В настоящее время *Ascosphaera apis* относят к классу *Ascomycetes* (сумчатые), подкласс *Protoascomycetes* (голосумчатые), семейство *Ascosphaeraceae*, род *Ascosphaera*, вид *Ascosphaera apis*.

Мицелий гриба *Ascosphaera apis* септированный, многоядерный, ветвистый, достигает длины 600 мкм, толщины – 3–8 мкм. При одинаковых условиях развития размеры гиф могут варьировать. Мицелий имеет поры внутри перегородок между гифами, поэтому внутренняя протоплазма имеет

возможность перетекать из клетки в клетку. Имеются противоречивые мнения о наличии хламидоспор у гриба *Ascosphaera apis*.

Гриб раздельнополый. Мужской мицелий (антеридий) – желто-бурого цвета, тонкий, медленно растущий. Женский (оогоний) – бесцветный. Размножение происходит путем слияния ядер мужского и женского мицелиев, за которым следует процесс кариогамии, а затем многократное деление слившихся (копуляционных) ядер, в результате чего образуются многочисленные споры, склеивающиеся в шары и заключенные в шаровидную полость – цисту (циста со споровыми шарами и спорами внутри носит название «плодовое тело»).

В споровых шарах содержится по 50 % мужских и женских спор. Споры сильно преломляют свет, имеют тонкую оболочку, почти бесцветны, в массе имеют слабо-коричневый цвет.

Существует два варианта гриба – *Ascosphaera apis* var. *apis* и *Ascosphaera apis* var. *major*, которые различаются размерами споровых цист и неспособностью скрещиваться между собой. Диаметр споровых цист *Ascosphaera apis* var. *apis* – 32–99 мкм (в среднем 65,8), *Ascosphaera apis* var. *major* – 88,4–168,5 мкм (в среднем 128,4). У *Ascosphaera apis* var. *apis* споры эллипсоидные или почковидные одноклеточные с вязкой поверхностью, размер которых составляет 1,0–2,0х2,0–3,5 (в среднем 1,4х2,7) мкм, с отношением длины и ширины 1,9. *Ascosphaera apis* var. *major* имеет споры плоско-выпуклой, сублантоидной или цилиндрической формы, размером 1,0–1,5х3–4 (в среднем 1,3х3,4) мкм при соотношении длины и ширины 2,6.

Гриб растет на сусло-агаре, картофельно-глюкозном агаре, крахмально-дрожжевой среде и среде Сабуро. Оптимум роста 25–28 °С (минимум 22°, максимум 36°). Грибы растут на средах с добавлением глюкозы. Оптимальный рост *Ascosphaera apis* происходит при 10–20 % глюкозы, а *Ascosphaera major* – при 20–30 %. Также рост гриба стимулируют моносахариды (глюкоза, фруктоза, галактоза, сахароза, мальтоза, лактоза), а трегалоза рост гриба не поддерживает.

Возбудитель аскосфероза пчел характеризуется как «приспосабливающийся» патоген. Для проявления болезни необходимо действие стрессовых факторов. К ним относятся охлаждение личинок, холодная влажная погода, повышенная влажность воздуха в улье, слабая сила семей, необоснованное применение антибиотиков и органических кислот и др.

Не всегда визуально можно диагностировать данное заболевание, а по культурально-морфологическим свойствам выделяемых культур грибов не всегда удастся провести точную идентификацию выросшей культуры, при этом данный метод является длительным по времени. Поэтому для предотвращения распространения инфекции желательна ранняя диагностика. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет проводить быструю (в течение 5 часов) детекцию генома возбудителя (*Ascosphaera apis*) как в организмах, так и в объектах окружающей среды из изначально малого количества исследуемого материала, например, при пересылке маток, пакетов пчел из неблагополучных пасек, кормлении пчел пыльцой или белковой пастой, изготовленной из цветочной пыльцы, пораженной грибом *Ascosphaera apis*. ПЦР тест-систем на данный момент нет в продаже, хотя существуют публикации по диагностике данным методом. Поэтому перед нами была поставлена задача сконструировать собственную тест-систему ПЦР для диагностики аскосфероза.

Материалы и методы. Эпизоотическую ситуацию изучали визуальным методом по разработанной нами схеме обследования пчеловодческих хозяйств. Для выявления больных пчелиных семей обращали внимание на поведение пчел, состояние предульевых площадок, сотов, расплода и кормовых запасов. При исследовании предульевых площадок обнаруживали больных и мертвых пчел, трутней, выброшенных пораженных личинок. При наличии ползающих пчел исследовали у них состояние кишечника, извлекая его пинцетом. Для осмотра гемолимфы разрезали и сдавливали грудь.

При клиническом обследовании больных пчелосемей определяли степень поражения расплода с учетом погибших личинок в соторамках и выброшенных на дно улья. При слабой степени поражения обнаруживали до 10, при средней – от 11 до 100, при сильной – более 100 погибших личинок.

Отбор материала для исследования проводили согласно методическим указаниям по отбору патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования» (утверждены ГУВ МСХ и П РБ 16.01.2008, № 10-1-5/36).

Микроскопические исследования проводили согласно «Методическим рекомендациям по проведению микроскопических исследований в ветеринарных диагностических лабораториях» (утверждены ГУВ МСХ и П РБ 03.03.2008, № 10-1-5/137).

Для конструирования ПЦР тест-системы для диагностики аскосфероза пчел использовали следующее оборудование и материалы:

а) приборы и расходные материалы: ламинар, бытовой холодильник, термостат, микротермостат «BIOSAN-CH100» (Латвия), амплификатор «С 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США), центрифуги, паровые автоклавы, сухожаровые шкафы, микроцентрифуга высокоскоростная (14000 об/мин) Jouan (Франция), комплект автоматических пипеток «SOCOREX» (Швейцария) 0,1–2 мкл, 0,5–10 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 1–10 мл и наконечники к ним (с фильтрами и без фильтров), пробирки типа «эппендорф» вместимостью 0,5 и 1,5 мл, вортекс «BIOSAN» (Латвия), пробирки для ПЦР 0,2 мл для прибора «С 1000 Thermal Cycler», система для электрофореза «Consort» (Бельгия), Gel Doc XR и программа imageLab Software, BIO-RAD (США), весы RADWAG AS 220/X (Польша), система подготовки воды «Crystal B», ADRONA (Латвия), фильтрационная установка, весы аналитические, весы до 1 кг;

б) реактивы: 10x PCR буфер для Tag ДНК-полимеразы (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»), 10x TE-буфер pH 8,0 (SIGMA), маркер молекулярного веса «GeneRuler 50 bp Ladder» (Fermentas, Литва), Taq-полимераза, 5 ед./мкл (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»), раствор MgCl₂ (50 мМ), смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (10 мМ) (Fermentas, Литва), агароза (helicon, Россия).

Подбор праймеров для детекции геомы *Ascosphaera apis* осуществляли по базам данных национального центра биотехнологической информации – GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Европейского института биоинформатики – EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>) и Японского банка ДНК – DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>). Были подобраны специфичные праймеры к межгенным спейсерам *A. apis*.

Выделение ДНК проводили российским набором «АмплиПрайм РИБО-сорб», согласно инструкции по его применению.

Температуру отжига праймеров подбирали в температурном диапазоне 57, 58, 59, 60 °C, MgCl₂ в реакционной смеси использовали в концентрации 3 мМ, ДНК-полимеразу – в концентрации 2 единицы активности на 50 мкл реакционной смеси, праймеры и dNTPs в концентрации 0,3 мМ. Амплификацию проводили по следующей схеме: 1 цикл: 3 мин. – 98 °C; 40 циклов: 0,5 мин. – 98 °C; 1 мин. – 57–60 °C; 1 мин. – 72 °C; 1 цикл: 5 мин. – 72 °C.

Множественное нуклеотидное выравнивание проводили с помощью программы AlignX. Специфичность подобранных праймеров проверили программой BLAST.

Результаты исследований. Как показали результаты проведенных исследований, на пчелопасаках республики основным микозным заболеванием является аскосфероз. Сомнительные диагнозы на аспергиллез и кандидамикоз нашими лабораторными исследованиями подтверждены не были.

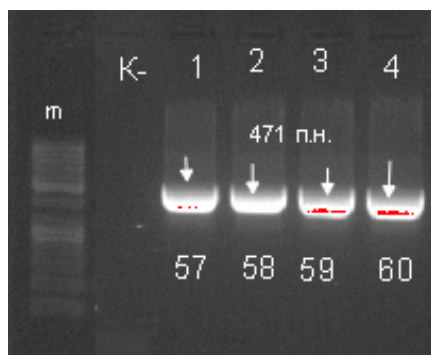
Клинические признаки заболевания зависели от формы проявления болезни. Различали скрытую, легкую и тяжелую формы течения аскосфероза.

При скрытой форме течения болезни отмечались единичные пораженные личинки, при этом клинических признаков заболевания обнаружить не удавалось.

При легкой форме поражения аскосферозом (до 10 пораженных личинок на соте) удавалось обнаружить пораженные личинки. По мере повышения температуры окружающей среды и улучшения кормовой базы летная активность пчел повышалась, что могло способствовать самовыздоровлению. Однако легкая форма проявления болезни могла перейти в тяжелую форму (до 100 пораженных личинок на соте).

В пораженных семьях пчелы не в состоянии были очистить ячейки от мумифицированных личинок, матки прекращали яйцекладку, что приводило к уменьшению количества пчел, ослаблению семьи, а также иногда к гибели семьи.

При диагностике заболевания мы учитывали эпизоотологические данные, клинические и патоморфологические изменения.



Электрофоретическая детекция продуктов амплификации проб, исследуемых тест-системой для обнаружения ДНК возбудителя *Ascosphaera apis*: 1 – проба с температурой отжига 57 °C; 2 – проба с температурой отжига 58 °C; 3 – проба с температурой отжига 59 °C; 4 – проба с температурой отжига 60 °C; K- – отрицательный контрольный образец; m – маркер

Всего доставлено в лабораторию и исследовано 100 проб патологического материала пчел, отобранных на пасеках Брестской и Минской областей.

Нами обследовано 13 пчелопасек Минской и Брестской областей. В 36,4 % подтвержден диагноз на аскосфероз по клиническим признакам заболевания, из них зарегистрированы сильная степень поражения в 16,6 %, средняя – в 50,0 %, слабая – в 33,35 % [1].

Для того, чтобы более эффективно диагностировать скрытую форму аскосфероза на пчелопасеках, а также профилактировать распространение данного заболевания при пересылке маток, пакетов пчел из неблагополучных пасек, кормлении пчел пыльцой или белковой пастой, изготовленной из цветочной пыльцы, пораженной грибом, нами разработана ПЦР тест-система для детекции генома *Ascosphaera apis*.

При поиске специфичных праймеров мы исходили из того, что ген рибосомальной РНК (рРНК) – один из наиболее консервативных (наименее вариабельных) генов. Поэтому систематическое положение организма и расхождения с близ-

кими видами могут быть определены на основании анализа сходств и различий в последовательностях рРНК.

80S рибосома эукариот состоит из большой 60S субъединицы (построенной на основе трех молекул рРНК – 5S, 5,8S и 28S) и малой 40S субъединицы (построенной на основе 18S рРНК). В ходе исследования локуса 5,8S оказалось, что межгенные спейсеры ITS1 и ITS2 более вариабельны. Анализ полиморфизма данных межгенных спейсеров позволяет изучать филогенетические отношения между близкородственными видами, а также изучать филогению между популяциями внутри вида и между отдельными индивидуумами. Поэтому мы выбрали праймеры к консервативному локусу межгенных спейсеров ITS1 – 5,8 S-ITS2, который находится между 18S и 28 S рРНК.

Подобранные праймеры, кодирующие межгенные спейсеры, фланкируют участок 1648-2118 штамма CQ867786 длиной 471 п.н.

По результатам множественного выравнивания 15 нуклеотидных последовательностей с помощью программы Align X данного участка генома *Ascosphaera apis* (изоляты U68313.1, FJ172292.2, GQ867764.1, GQ867766.1, GQ867785.1) и другие мы подтвердили общие видоспецифические участки подобранных праймеров.

Специфичность подобранных праймеров проверили программой BLAST. Установлено, что 100%-ная идентичность праймера во всех их 21 нуклеотидах соответствует только *Ascosphaera apis*.

При постановке ПЦР с пробами ДНК, выделенной из личинок пчел, пораженных грибом *Ascosphaera apis*, диагноз подтвердился. Стрелками показаны специфические фрагменты ДНК *Ascosphaera apis* на уровне 471 п.н. ПЦР тест-система работает в широких диапазонах температур 57–60 °C (рисунок).

Выводы. 1. Впервые в Республике Беларусь для диагностики возбудителя аскосфероза пчел сконструирована отечественная ПЦР тест-система.

2. Разработанная ПЦР тест-система позволяет проводить быструю (в течение 5 часов) детекцию генома возбудителя *Ascosphaera apis* как в организмах, так и в объектах окружающей среды, и может быть использована для более эффективного диагностирования скрытых форм аскосфероза на пчелопасеках, а также при пересылке маток, пакетов пчел и другой продукции пчеловодства.

3. В результате проведенных исследований установлено, что основным микозным заболеванием пчел в Республике Беларусь является аскосфероз. Выделенные штаммы возбудителя аскосфероза пчел *Ascosphaera apis* относятся к классу *Ascomycetes* (сумчатые), подклассу *Protoascomycetes* (голосумчатые), семейству *Ascosphaeraceae*, роду *Ascosphaera*, виду *Ascosphaera apis*.

4. Эпизоотическая ситуация по аскосферозу остается напряженной. Отмечается сильная степень поражения пчелосемей. Количество больных семей на отдельных пасеках достигает 30 %, что обуславливает ослабление пчелосемей, снижение способности пчел к медосбору и опылению, не позволяет эффективно использовать потенциал пчелосемей, приводит к гибели пчел и наносит существенный экономический ущерб отрасли.

Литература

1. Методические рекомендации по проведению ветеринарно-санитарных мероприятий на пчелопасеках при аскосферозе пчел. – Минск, 2012. – 24 с.
2. Черник, М. И. Изучение закономерностей проявления микозных патологий у пчел / М. И. Черник // Актуальные проблемы биотехнологии в аграрно-промышленном комплексе: материалы Междунар. науч.-практ. конф., г. Минск, 26-27 ноября 2015 г. / РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского»; под ред. П. А. Красочки. – Минск, 2015. – С. 137-144.
3. Anderson, D. L. New species and isolate of spore-cysts fungi (*Plectomycetes: Ascospaerales*) from Australia / D. L. Anderson, N. L. Gibson // Austral. Syst. Bot. – 1998. – N 11. – P. 53-72.
4. Bissett, J. *Ascospaera acerosa* sp. nov. Isolated from the alfaalfa leafcutting bee, with a key to the species of *Ascospaera* / J. Bissett, G. Duke, M. Goettel // Mycologia. – 1996. – N 88. – P. 797-803.