



Сравнительный анализ распространения и генетического разнообразия основных паразитов в природных популяциях шмелей в южных районах Сибири и в Северной Индии

Лаборатория молекулярно-генетических систем

Соискатель: В. Ю. Вавилова

Научный руководитель: к.б.н., А. Г. Блинов

Новосибирск, 2018

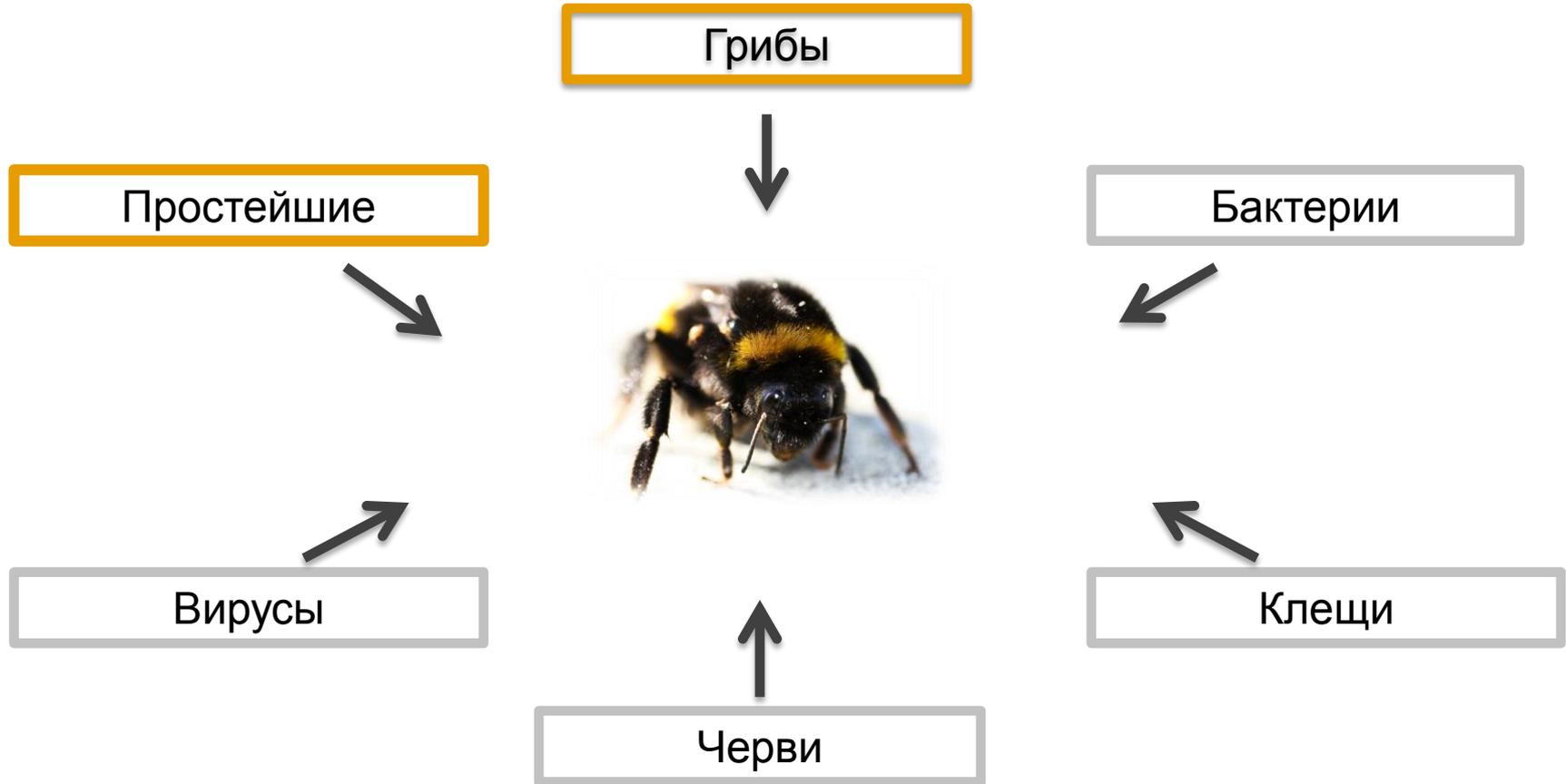
Шмели – одни из основных опылителей диких растений и сельскохозяйственных культур



Особи *Bombus terrestris*, опыляющие липу (слева) и тепличные томаты (справа).

В среднем, численность шмелей за последние десятилетия снизилась на **85%** по всему миру

Факторы снижения численности шмелей



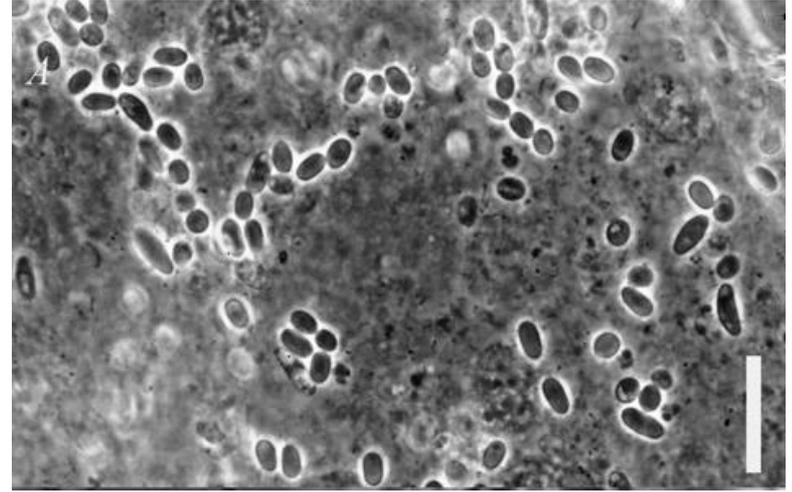
Микроспоридии шмелей рода *Bombus*



Nosema bombi

Nosema ceranae

Nosema
A, B, C, D



Изображения *Nosema bombi*, полученные с помощью фазовой контрастной микроскопии. Масштабная линейка = 10µm.

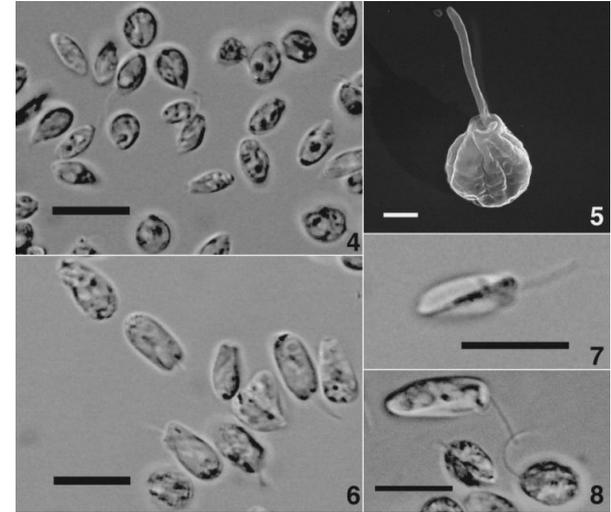
Трипаносоматиды шмелей рода *Bombus*



Crithidia bombi

Crithidia mexicana

Crithidia expoeiki

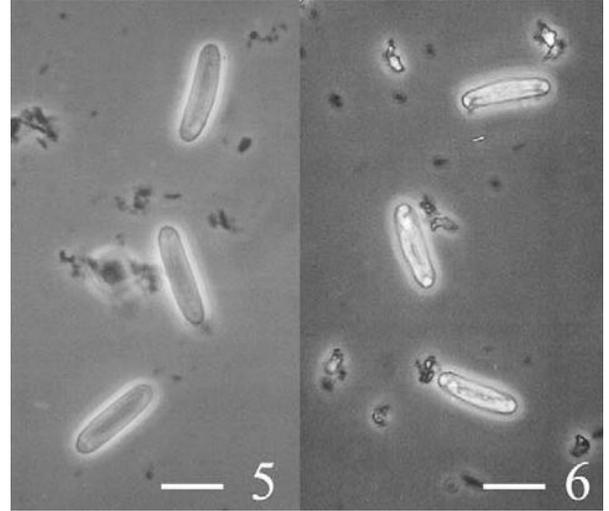


Изображения *Crithidia* spp., полученные с помощью интерференционной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии:
4-5. *Crithidia bombi*; 6-8. *Crithidia expoeiki*.
Масштабная линейка = 10µm.

Неогрегарины шмелей рода *Bombus*

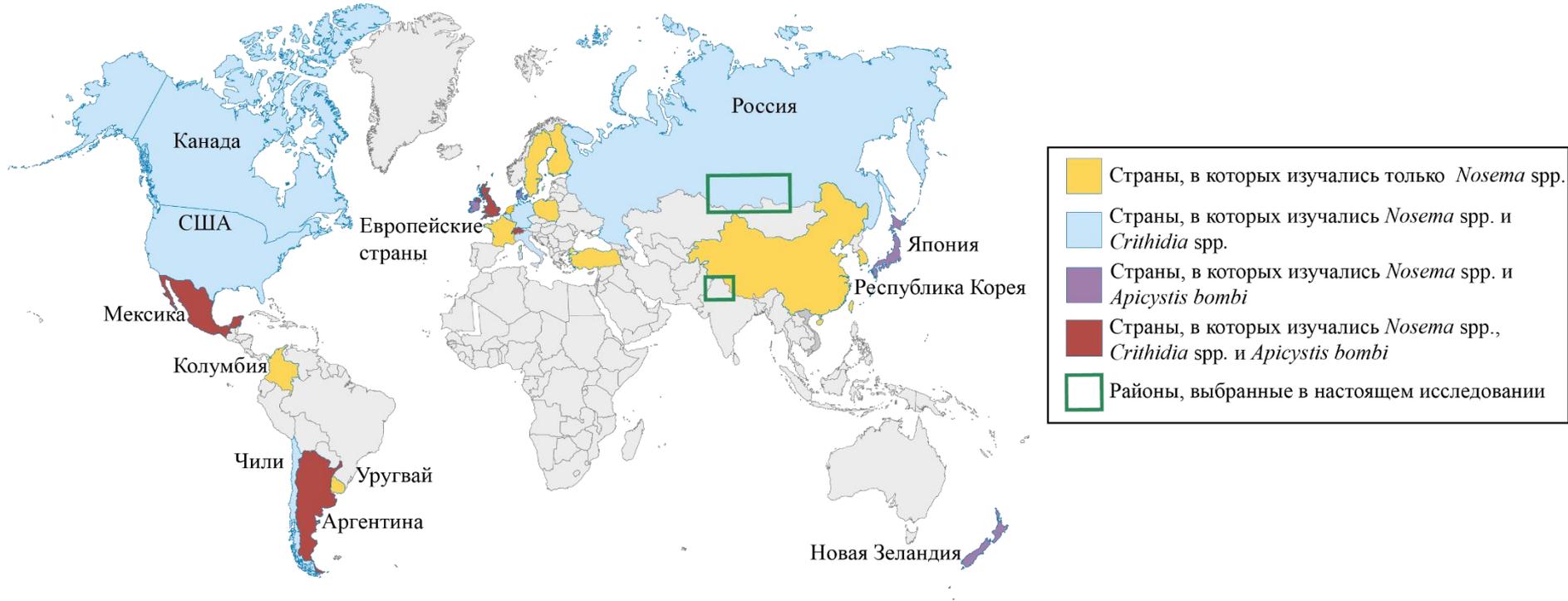


Apicystis bombi



Изображения *Apicystis bombi*, полученные с помощью интерференционной микроскопии. Масштабная линейка = 10μm.

География изучения паразитических организмов в популяциях шмелей



Цели работы:

- Изучение уровня зараженности природных популяций шмелей микроспоридией *Nosema bombi*, трипаносоматидами *Crithidia* spp. и неогрегариной *Apicystis bombi*.
- Выявление генетического разнообразия данных паразитических организмов в природных азиатских популяциях шмелей (на примере Сибири и Индии).

Задачи работы:

- Установление присутствия заражения *Nosema bombi*, *Crithidia* spp. и *Apicystis bombi* с помощью ПЦР амплификации ядерных генов данных паразитов.
- Установление нуклеотидных последовательностей, полученных ПЦР продуктов.
- Сравнительный и филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей генов *Nosema bombi*, *Crithidia* spp. и *Apicystis bombi*.

Положения, выносимые на защиту:

1. В природных популяциях шмелей в южных районах Сибири распространены четыре варианта последовательностей микроспоридии *N. bombi*, два вида трипаносоматид (*C. bombi* и *C. exроеki*) и два варианта неогрегаринов (*A. bombi* и *Mattesia* sp.).
2. В Северной Индии в природных популяциях шмелей встречается генетический вариант микроспоридии *N. bombi* IND и два вида трипаносоматид (*C. bombi* и *C. exроеki*).
3. Виды шмелей характеризуются различной степенью восприимчивости к заражению микроспоридиями, трипаносоматидами и неогрегариновыми.

Этапы исследования

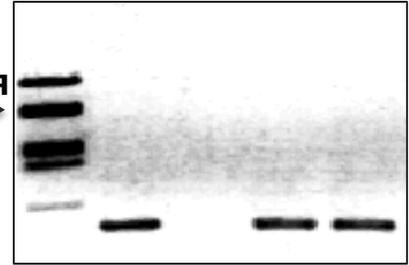
1. Сбор материала



2. Выделение ДНК



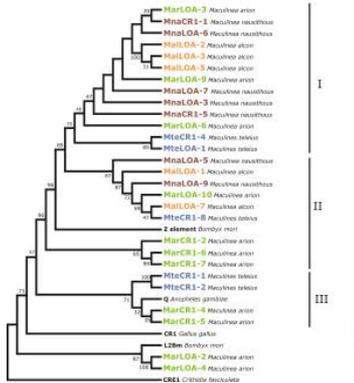
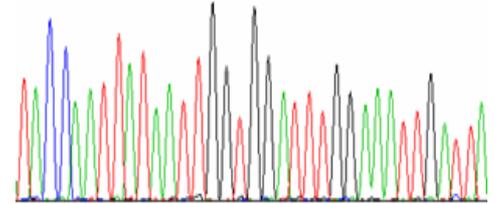
3. ПЦР амплификация



4. Секвенирование

T A C C A A T T A T A A T T G G T G G A T T T G G A A A T T G A T T A

5. Анализ нуклеотидных последовательностей



Места сбора биологического материала



1- село Степногутово; 2- Белово и Гурьевск; 3- поселок Загадное; 4- поселок Усть-Кабырзы; 5- Горно-Алтайск; 6- поселок Листвянка; 7- село Косая Степь; 8- Гульмарг и Шринагар.

Сбор шмелей на территории Сибири проводился совместно с сотрудниками Кемеровского государственного университета во главе с **проф. Н. И. Еремеевой**. Образцы индийских шмелей были предоставлены **проф. М. Войцеховским** (Ягеллонский университет, Краков, Польша).

Наиболее распространённые на территории южных районов Сибири виды рода *Bombus*



B. lucorum Linnaeus, 1761
373 образца



B. pascuorum Scopoli, 1763
114 образцов



B. veteranus Fabricius, 1793
152 образца



B. cullumanus Kirby, 1802
39 образцов



B. schrencki Morawitz, 1881
50 образцов

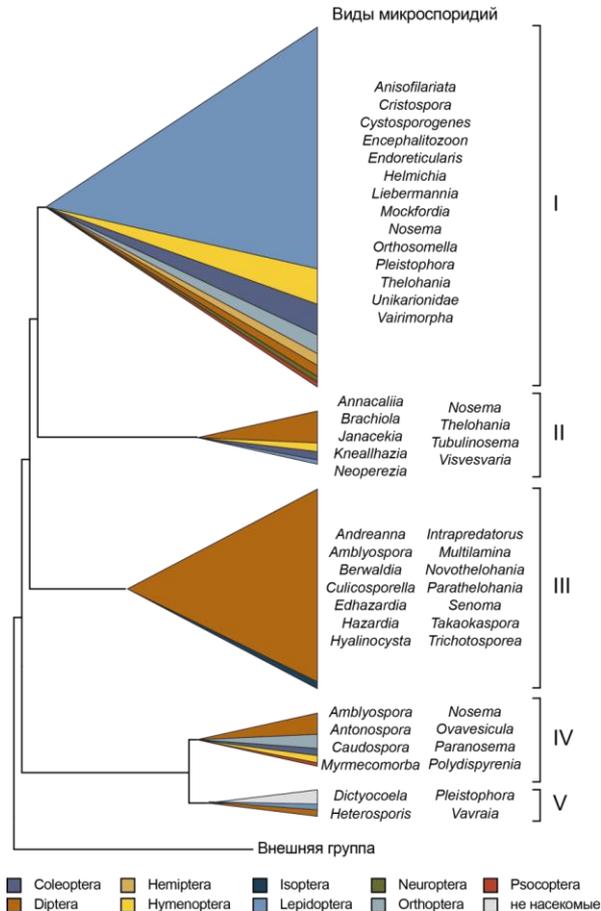


B. sichelii Radoszkowski, 1860
72 образца



B. sporadicus Nylander, 1848
72 образца

Разнообразие микроспоридий, паразитирующих на представителях класса Insecta

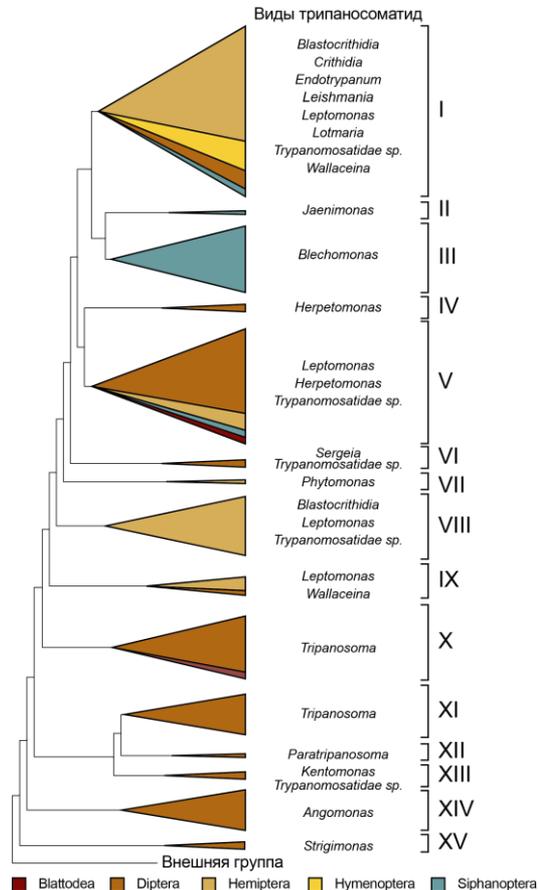


- Микроспоридии, выявленные у представителей отряда Hymenoptera, относятся к **5** родам (*Myrmecomorba*, *Thelohania*, *Nosema*, *Kneallhazia*, *Antonospora*).

- Разнообразие микроспоридий шмелей рода *Bombus* ограничено родом *Nosema*.

Филогенетическое древо, построенное на основе нуклеотидных последовательностей кластера рибосомных генов, представителей Microsporida, встречающихся у различных насекомых. Древо построено методом максимального правдоподобия в программе PhyML v.3.0. В качестве внешней группы была использована последовательность гена SSU rRNA из генома микроспоридии *Hamiltosporidium tvaerminnensis*, паразитирующей на *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera).

Разнообразие трипаносоматид, паразитирующих на представителях класса Insecta



- Трипаносоматиды, выявленные у представителей отряда Hymenoptera, относятся к 2 родам (*Crithidia* и *Lotmaria*).

- Разнообразие трипаносоматид шмелей рода *Bombus* ограничено родом *Crithidia*.

Филогенетическое древо, построенное на основе нуклеотидных последовательностей кластера рибосомных генов, представителей Trypanosomatidae, встречающихся у различных насекомых. Древо построено методом максимального правдоподобия в программе PhyML v.3.0. В качестве внешней группы были использованы последовательности гена 18S рРНК нескольких видов рода *Ichthyobodo* (Kinetoplastida: Ichthyobodonidae), паразитирующих на представителях семейств Pleuronectidae и Salmonidae.

Разнообразие неогрегариин, паразитирующих на представителях класса Insecta

- В базе данных GenBank представлено **26** последовательностей неогрегариин, которые паразитируют на насекомых.
- Неогрегарины, выявленные у представителей отряда Hymenoptera, относятся к **2** родам (*Apicystis* и *Mattesia*).
- Разнообразие неогрегариин шмелей рода *Bombus* ограничено видом *Apicystis bombi*.

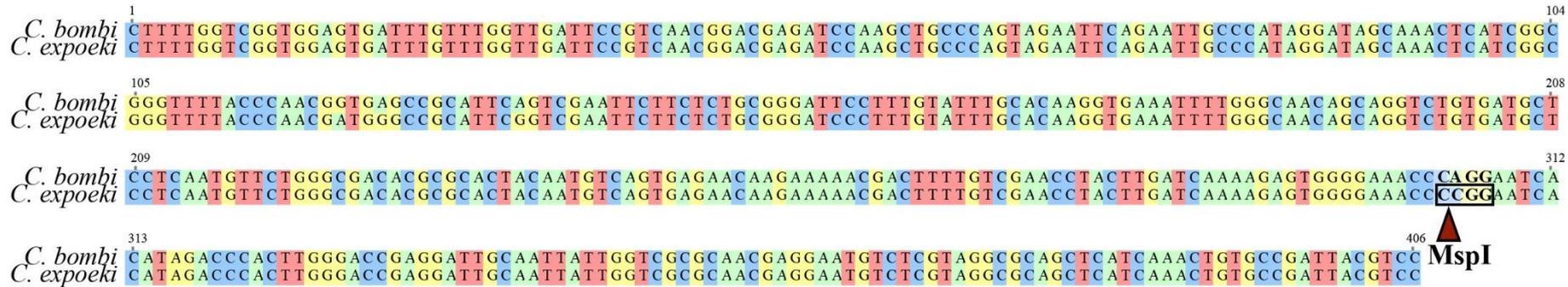
ПЦР амплификация последовательностей ядерных генов микроспоридий, трипаносоматид и неогрегарин

Было проанализировано **1076** образцов из **23** различных видов шмелей:

1. присутствие *Nosema bombi* было установлено для **80** образцов из **9** видов шмелей;
2. присутствие *Crithidia* spp. было установлено для **208** образцов из **15** видов шмелей;
3. присутствие *Apicystis bombi* было установлено для **31** образца из **7** видов шмелей.

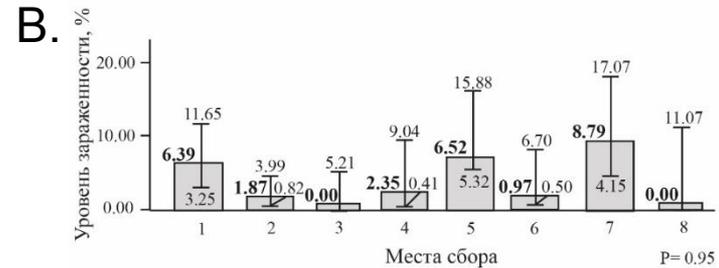
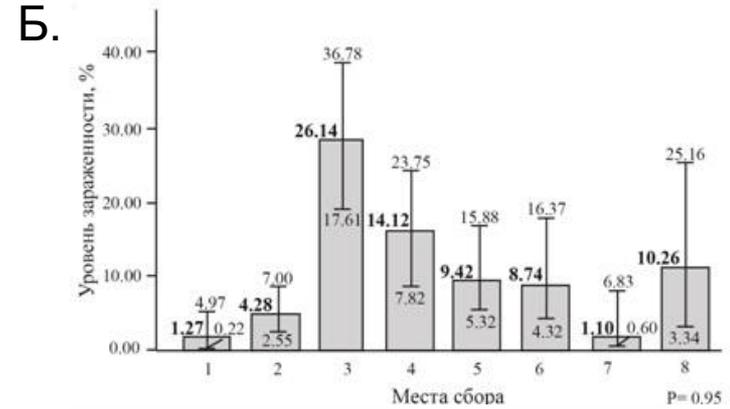
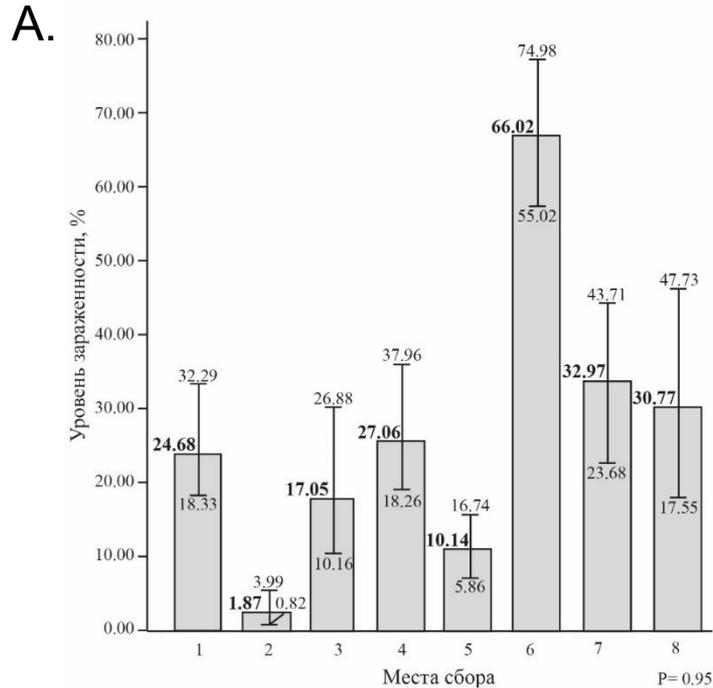
Для каждого полученного фрагмента ДНК была установлена нуклеотидная последовательность.

Рестрикционный анализ последовательностей гена 18S рРНК трипаносоматид рода *Crithidia*



Выравнивание последовательностей гена 18S рРНК *C. bombi* и *C. expoeki*. В рамку выделен фрагмент выравнивания, в котором расположен сайт рестрикции **Msp I** у трипаносоматиды *C. expoeki*.

Уровни зараженности шмелей микроспоридиями, трипаносоматидами и неогрегаринами



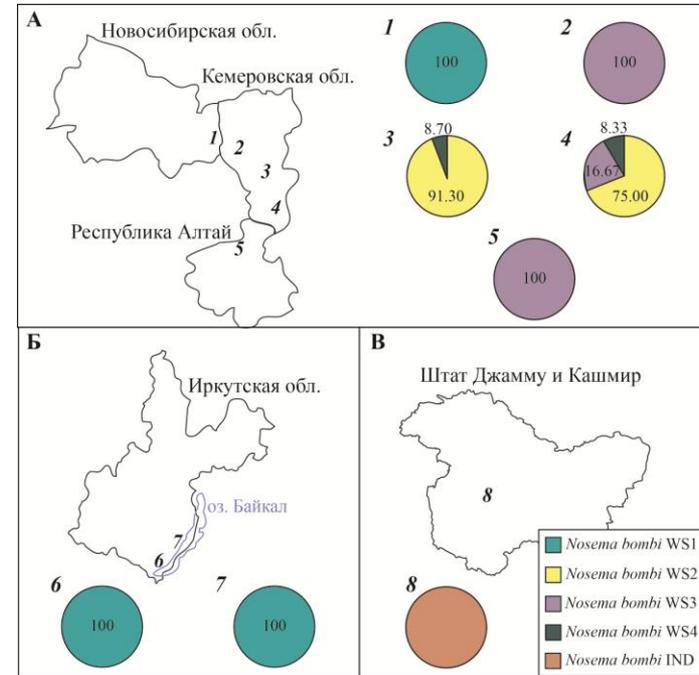
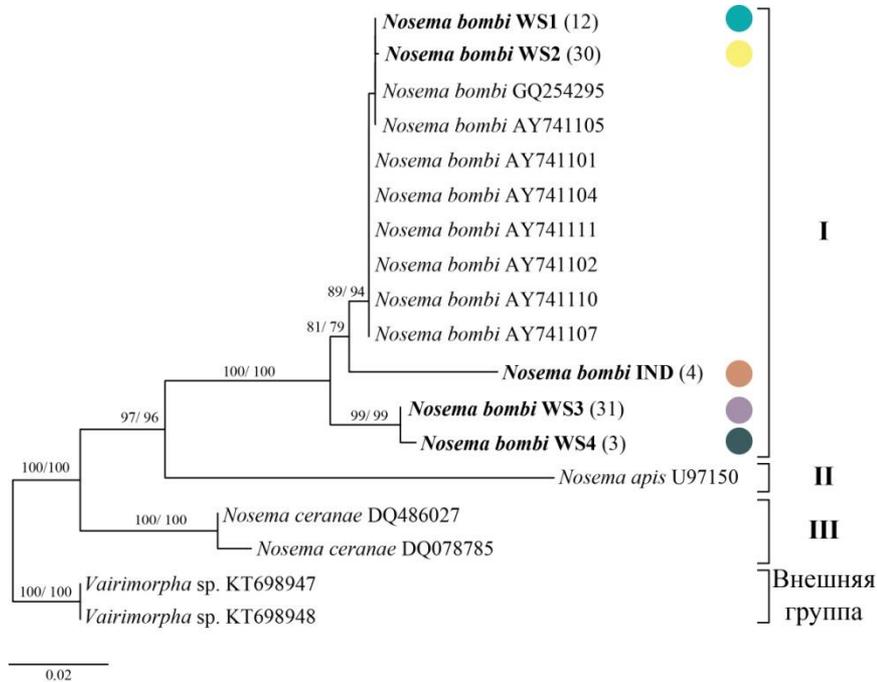
Общий уровень зараженности природных популяций шмелей трипаносоматидами (А), микроспоридиями (Б) неогрегаридами (В) с указанием доверительных интервалов, полученных с помощью метода Клоппера-Пирсона (Clopper et al., 1934).

Обозначение мест сбора: 1- село Степногутово; 2- Белово и Гурьевск; 3- поселок Загадное; 4- поселок Усть-Кабырзы; 5- Горно-Алтайск; 6- поселок Листвянка; 7- село Косая Степь; 8- Гульмарг и Шринагар.

Виды шмелей- кандидатов для промышленного разведения в качестве опылителей тепличных растений

- Среди 152 проанализированных образцов *B. veteranus* не было найдено ни одного зараженного микроспоридиями. Лишь 6 особей *B. veteranus* были поражены трипаносоматидами и неогрегаринами.
- Виды *B. cullumanus*, *B. schrencki* и *B. sichelii* были слабо подвержены заражению всеми тремя паразитическими организмами.

Микроспоридии *Nosema bombi* их географическое распределение в популяциях шмелей



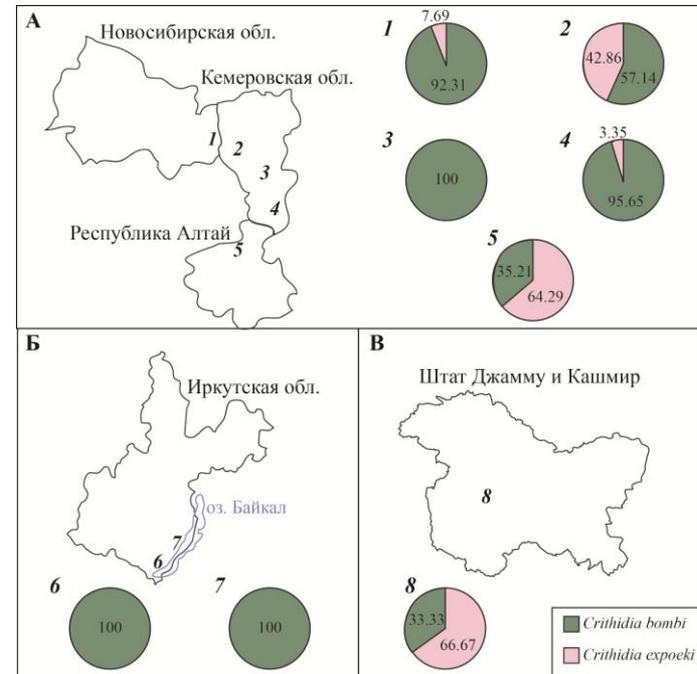
Филогенетическое древо, реконструированное на основе последовательностей кластера генов рРНК микроспоридий рода *Nosema*, поражающих насекомых, методом максимального правдоподобия (ML) в программе IQ-tree. Для оценки достоверности был использован сверхбыстрый бутстреп тест (ultrafast bootstrap, UfBoot).

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-Кабырзы; 5- Горно-Алтайск; 6- поселок Листвянка; 7- село Косая Степь; 8- Гульмарг и Шринагар.

Трипаносоматиды рода *Crithidia* и их географическое распределение в популяциях шмелей

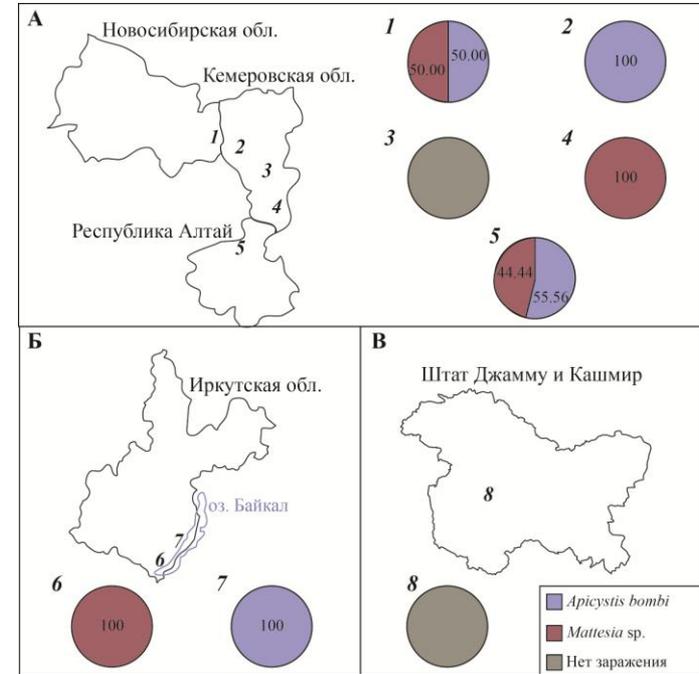
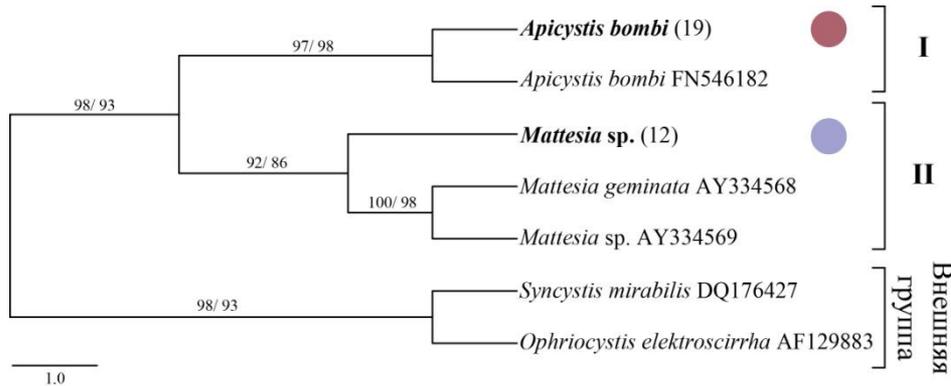
• В исследованных природных популяциях шмелей было описано заражение двумя видами трипаносоматид: *C. bombi* и *C. exproeki*.

• Не было обнаружено внутривидового генетического разнообразия у данных видов паразитов.



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

Неогрегарины и их географическое распределение в популяциях шмелей



Филогенетическое древо, реконструированное на основе последовательностей генов 18S рРНК неогрегаринов, поражающих насекомых, методом максимального правдоподобия (ML) в программе IQ-tree. Для оценки достоверности был использован сверхбыстрый бутстреп тест (ultrafast bootstrap, UfBoot).

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

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. exroeki*. Вид *C. bombi* наиболее распространен на территории Сибири, а вид *C. exroeki* - на территории штата Джамму и Кашмир (Северная Индия).

Выводы

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. и *A. bombi*, поэтому могут являться кандидатами для промышленного разведения в качестве опылителей в теплицах.

Специальность 03.02.07 (генетика)

Сведения о сдаче кандидатских экзаменов:

1. Иностранный язык – отлично
2. Философия – отлично
3. Специальность – отлично

Статьи в рецензируемых журналах:

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. - Vol. 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.

Работа была представлена на конференциях:

1. **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.
2. **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»: Тезисы докладов. С. 329.
3. **Vavilova V.**, Konopatskaia I., Ereemeeva 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.

Ответы на замечания к диссертационной работе, поступившие от официального оппонента д.б.н., профессора В.В. Глупова:

1. Раздел литературного обзора, в котором рассмотрены внутриклеточные паразиты типа Микроспоридии, составлен исключительно на основе зарубежных исследований. Автору следовало бы рассмотреть работы И.В. Исси, в том числе для описания механизма экстружии спор, являющегося отличительной чертой этих паразитов.

Я согласна с замечанием В.В. Глупова о том, что нужно было рассмотреть работы И.В. Исси в своей работе. Данные зарубежных исследований, представленные в диссертационной работе, согласуются с данными, полученными И.В. Иссе и коллегами.

2. На рисунке 7, объединяющем географическое распространение микроспоридий, трипаносоматид и неогрегарин показано, что на территории России в популяциях шмелей встречаются лишь трипаносомиды *Crithidia bombi*, тогда как имеются данные об обнаружении на этой территории микроспоридии *Nosema bombi* у шмелей (Емарова Е.Е., 2004; Szentgyörgyi et al., 2011).

Статья Szentgyörgyi et al., 2011 была рассмотрена в главе «Результаты и обсуждение», но не в главе «Обзор литературы». К сожалению, при написании своей работы я не ознакомилась с диссертационной работой Е.Е. Емаровой.

Ответы на замечания к диссертационной работе, поступившие от официального оппонента д.б.н., профессора В.В. Глупова:

3. Отсутствует заключительная часть в обзоре литературы, которая могла бы показать, почему возникает необходимость в исследованиях, которые автор описывает в главе 3 «Результаты и обсуждение».

В главе «Обзор литературы» действительно отсутствует обобщающая часть, эта информация была представлена в настоящей работе в главе «Введение».

4. Автор обнаружила, что среди шмелей, наиболее распространенных в южных районах Сибири, четыре вида слабо заражены микроспоридиями, трипаносоматидами и неогрегаринами. С чем может быть связана низкая восприимчивость этих видов шмелей к паразитам?

В настоящий момент этот вопрос активно изучается. Предполагается, что различная степень восприимчивости шмелей к заражению патогенами может быть связана с особенностями строения и функционирования колоний у различных видов (Li et al., 2008).

Ответы на замечания к диссертационной работе, поступившие от официального оппонента д.б.н., профессора В.В. Глупова:

5. Рисунок 33. Какими факторами можно объяснить наибольший уровень зараженности шмелей трипаносоматидами *Crithidia* spp., собранными в п. Листвянка?

На наш взгляд, этот факт обусловлен видовым составом шмелей, которые вошли в собранную коллекцию, а также тем, что сбор материала в районе поселка Листвянка проводился в августе. Согласно литературным данным, количество случаев заражения шмелей критидиями увеличивается к концу летнего периода (Goulson et al., 2012). Обсуждение этого вопроса было проведено на странице 79 диссертационной работы.

Ответы на замечания к диссертационной работе, поступившие от официального оппонента д.б.н., Д.Ю. Щербакова:

1. При описании результатов поиска нуклеотидных последовательностей, маркирующих различные группы паразитов, следует приводить сводные таблицы, в которых должны быть указаны номера доступа для всех последовательностей, использованных затем для описания таксономического разнообразия, а также ссылки на авторов. ... Учитывая путаницу в таксономии всех групп паразитов, исследованных В.Ю. Вавиловой, считаю, что приводить такие таблицы в основном тексте необходимо.

Я согласна с замечанием о том, что нужно было привести ссылки на авторов статей, которыми были аннотированы использованные в работе последовательности. Данные о видах паразитических организмов с указанием номеров последовательностей в базе данных GenBank сгруппированы в таблицах приложений 2, 5. Поскольку эти таблицы представлены на 20 страницах, они были вынесены в приложения, чтобы не перегружать основной текст диссертационной работы.

Ответы на замечания к диссертационной работе, поступившие от официального оппонента д.б.н., Д.Ю. Щербакова:

2. В работе не приводятся данные о соотношении генетического полиморфизма шмелей и паразитирующих на них организмов. Использование популяционных характеристик шмелей существенно дополнило бы общую картину.

Исследователя проводилось изучение взаимосвязи между генетическим полиморфизмом шмелей и паразитирующих на них организмах. Было показано, что частота заражений трипаносоматидами шмелей вида *Bomus terrestris* была ниже в колониях этих насекомых с высоким генетическим разнообразием (Liersch and Schmid-Hempel, 1998). Однако, изучение генетического полиморфизма шмелей не входило в цели настоящей работы.

Ответы на замечания к диссертационной работе, поступившие от ведущей организации ФГБУН ИХБФМ СО РАН:

1. Обзор литературы не сопровождается заключением, в котором автор объяснил бы как согласуются литературные данные с постановкой цели и задач данной работы.

Заключение было представлено в настоящей работе в главе «Введение».

2. Ни в материалах и методах, ни в результатах не приведены размеры ПЦР фрагментов, которые секвенировались и анализировались соискателем.

Данные о размерах всех полученных нуклеотидных последовательностей представлены в тексте диссертационной работы на страницах 60, 78, 84 и 91; в автореферате на страницах 5, 8-9 и 11.

3. В описании использованных материалов отсутствуют данные о времени сбора образцов, что не позволяет провести адекватное сравнение данных.

Информация о времени сбора (месяц, год), количестве собранных образцов и видах шмелей представлена в диссертационной работе в таблице 4 (глава «Материалы и методы», стр. 47).

Ответы на замечания к диссертационной работе, поступившие от ведущей организации ФГБУН ИХБФМ СО РАН:

4. Остается открытым вопрос, депонировал ли автор полученные им нуклеотидные последовательности в базе данных GenBank.

Нуклеотидные последовательности, полученные в настоящей работе, размещены в базе данных GenBank под номерами HG321391-HG321458, KF188740–KF188771, KX151681-KX151692, KY126615-KY126664. Ссылки на номера этих последовательностей не представлены в данной работе, но приведены в статьях, опубликованных по теме диссертации.

5. Соискатель не пояснила, какие преимущества дало использование различных пакетов ПО, в то время как использованное ей ПО MEGA позволяло бы осуществить все расчеты, выравнивания и построения.

Проведение расчетов, выравниваний и построений филогенетических деревьев в других программах было обусловлено удобством их использования.

Ответы на замечания к автореферату диссертационной работы, поступившие от к.б.н, доцента кафедры зоологии беспозвоночных ТГУ, Н.В. Островерховой:

1. Автором указывается, что микроспоридии «согласно современной классификации являются облигатными внутриклеточными грибковыми паразитами» (см. стр. 1 автореферата). Однако отечественные микроспоридиологи рассматривают микроспоридии как отдельную самостоятельную группу простейших, родственную грибам (Токарев 2015, Токарев и др., 2015, Токарев, Исси, 2018 и др.).

Действительно, в настоящий момент исследователи не пришли к единому мнению о таксономическом статусе Микроспоридий. При описании таксономического статуса этой группы мы основывались на данные сайта NCBI Taxonomy и несколько исследований. В статье В. Han and L. M. Weiss, 2017 были суммированы данные, основанные не только на филогентическом анализе, но и сравнении структуры и функционировании спор микроспоридий.

2. Существуют ли ассоциации между различными генетическими вариантами микроспоридий, видами шмелей и, возможно, географическим распространением хозяина на изученных территориях.

В настоящей работе не удалось выявить таких взаимосвязей.