



СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ

Научная статья
УДК 638.1/574.3:57.065:577.29
DOI: 10.36508/RSATU.2024.11.32.013

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГАПЛОТИПОВ *NOSEMA APIS* В УСЛОВИЯХ ЕДИНИЧНОЙ ПАСЕКИ
РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

Николай Дмитриевич Шамаев¹ ✉, Эдуард Аркадьевич Шуралев², Малик Нилович Мукминов³

^{1,2,3} ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

² ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

¹ nikolay1157@gmail.com

² eduard.shuralev@mail.ru

³ malik-bee@mail.ru

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-26-00079, <https://rscf.ru/project/24-26-00079/>.

Аннотация.

Проблема и цель. Цель данного исследования – описать паразито-хозяйинные отношения *Apis mellifera* и *Nosema apis* на единичной пасеке Республики Татарстан и установить распределение гаплотипов паразита в сравнении с данными по Евразии с использованием полученных данных.

Методология. 50 погибших рабочих медоносных пчел *A. mellifera carnica* были собраны из одного улья на одной из пасек Лаишевского района Республики Татарстан в апреле 2023 года. Медоносных пчел промывали и измельчали для исследования под композиционным микроскопом и выделяли ДНК для проведения ПЦР-анализа. Последовательности белка РТРЗ, полученные из *A. mellifera* в различных частях мира, были найдены в международных базах данных. Сетевой анализ последовательностей аминокислот белка РТРЗ из Республики Татарстан и из баз данных оценивался с использованием с участков с высоким уровнем полиморфизма.

Результаты. В данном исследовании были охарактеризованы случаи заражения *A. mellifera* нозематозом и установлено текущее состояние распределения гаплотипов микроспоридиями *Nosema apis*. 50 исследованных медоносных пчел из Республики Татарстан были заражены *N. apis*. Аминокислотные последовательности белка РТРЗ *N. apis*, обнаруженные в разных частях Евразии, сформировали один основной гаплотип, присутствующий в Словении, Испании и Турции. РТРЗ, принадлежащий основному гаплотипу *N. apis*, был обнаружен также в Республике Татарстан, разветвленной со Словенией, Испанией и Турцией. Еще один гаплотип, обнаруженный в Республике Татарстан, был вновь полученным и отличался от основного гаплотипа на одну аминокислоту. С помощью электронных баз данных на всей территории Евразии у *N. apis* обнаружено два гаплотипа, один из которых является новым и на данный момент специфичным для исследованного улья единичной пасеки Республики Татарстан, и еще один – зарегистрированным ранее в других регионах Евразии.

Заключение. Как показано в этом исследовании, данные аминокислотной последовательности РТРЗ с пасеки Республики Татарстан и других регионов Евразии позволяют предположить, что изоляты *N. apis* от медоносных пчел имеют как общие основные, так и уникальные гаплотипы. Наличие основных евразийских гаплотипов *N. apis* на пасеке Республики Татарстан подтверждает предположение о заносе паразитов в Российскую Федерацию из стран Евразии. Настоящее исследование расширяет данные о существующих уникальных аминокислотных гаплотипах РТРЗ видов *Nosema spp.*

Ключевые слова: *Nosema apis*, *Apis mellifera carnica*, нозематоз, Республика Татарстан, РТРЗ, гаплотип

Для цитирования: Шамаев Н.Д., Шуралев Э.А., Мукминов М.Н. Распределение гаплотипов *Nosema apis* в условиях единичной пасеки Республики Татарстан // Вестник Рязанского государственного агротехнологического университета имени П.А. Костычева. 2024, Т.16, № 3. С. 92-101 <https://doi.org/10.36508/RSATU.2024.11.32.013>



Original article

DISTRIBUTION OF NOSEMA APIS HAPLOTYPES IN CONDITIONS OF A SINGLE APIARY IN THE REPUBLIC OF TATARSTAN**Nikolai D. Shamaev**¹✉, **Eduard A. Shuralev**², **Malik N. Mukminov**³^{1,2,3} Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia^{1,2,3} Kazan State Medical Academy - Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH Russia² Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia¹ nikolay1157@gmail.com² eduard.shuralev@mail.ru³ malik-bee@mail.ru

The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation No. 24-26-00079, <https://rscf.ru/project/24-26-00079/>.

Annotation.

Problem and purpose. The purpose of this study was to describe the host-parasite relationship *Apis mellifera* and *Nosema apis* and establish the distribution of parasite haplotypes in comparison with data for Eurasia, using new data obtained from a single apiary in the Republic of Tatarstan, Russia.

Methodology. 50 dead worker honey bees *A. mellifera carnica* were collected from a single hive in one of the apiaries in the Laishevsky district, Republic of Tatarstan, Russia in April 2023. Honey bees were washed and ground for examination under a composition microscope, and DNA was isolated for PCR analysis. PTP3 protein sequences obtained from *A. mellifera* in various parts of the world were found in international databases. Network analysis of amino acid sequences of the PTP3 protein from the Republic of Tatarstan and from databases was assessed using regions with a high level of polymorphism.

Results. This study characterized cases of *A. mellifera* infection with nosematosis and determined the current status of haplotype distribution of the microsporidia *Nosema apis*. 50 studied honey bees from the Republic of Tatarstan were infected with *N. apis*. Amino acid sequences of the *N. apis* PTP3 protein found in different parts of Eurasia formed one major haplotype present in Slovenia, Spain and Turkey. PTP3, belonging to the main haplotype of *N. apis*, was also found in the Republic of Tatarstan, branched with Slovenia, Spain and Turkey. Another haplotype discovered in the Republic of Tatarstan was newly obtained and differed from the main haplotype by one amino acid. Using electronic databases throughout Eurasia. Two haplotypes were discovered in *N. apis*, one of which is new and currently specific to the studied hive of a single apiary in the Republic of Tatarstan, and another one was previously registered in other regions of Eurasia.

Conclusion. As shown in this study, PTP3 amino acid sequence data from apiaries in the Republic of Tatarstan and other regions of Eurasia suggest that *N. apis* isolates from honey bees share both core and unique haplotypes. The presence of the main Eurasian haplotypes of *N. apis* in the apiary of the Republic of Tatarstan confirms the assumption of the introduction of parasites into the Russian Federation from Eurasian countries. The present study expands the knowledge of the existing unique PTP3 amino acid haplotypes of *Nosema* spp.

Key words: *Nosema apis*, *Apis mellifera carnica*, nosematosis, Republic of Tatarstan, PTP3, haplotype

For citation: Shamaev N.D., Shuralev E.A., Mukminov M.N. Distribution of *Nosema apis* haplotypes in conditions of a single apiary in the republic of Tatarstan // Herald of Ryazan State Agrotechnological University named after P.A. Kostychev. 2024, Vol.16, No. 3, P. 93-101 [https://doi.org/ 10.36508/RSATU.2024.11.32.013](https://doi.org/10.36508/RSATU.2024.11.32.013)

Введение

Пчеловодство важно для получения пчелиной пыльцы, прополиса, перги, маточного молочка, пчелиного воска и ценнейшего пищевого продукта – меда [1, 2]. Пчеловодство также важно для повышения урожайности различных сельскохозяйственных культур, развития семеноводства, поддержания флористического биоразнообразия и удовлетворения потребностей в полном опылении энтомофильных культур и получении высоких урожаев [3]. Хотя существуют и другие виды насекомых (мухи, осы, жуки и бабочки), обеспечивающие

опыление сельскохозяйственных культур, дикие и управляемые пчелы хорошо известны как эффективные опылители экономически важных мировых культур [4].

Эффективному развитию пчеловодства препятствует наличие и негативное влияние биотических и абиотических факторов, влияющих на управляемые семьи медоносных пчел, таких как патогены и события, связанные с использованием пестицидов, землепользованием и изменением климата [5]. Для целей пчеловодства необходимо содержать большое количество пчелиных семей,



однако количество управляемых семей сокращается, что связано с паразитами медоносных пчел [6].

С точки зрения мирового распространения негативное влияние паразитов медоносных пчел *Apis mellifera* связано с паразитами семейств *Nosematidae* и *Trypanosomatidae* [7]. Среди двух семейств наиболее часто встречающимися паразитами являются виды семейства *Nosematids* [6, 7]. *N. apis* и *N. ceranae*. Они считаются первоначальными паразитами европейских медоносных пчел (*A. mellifera*) и азиатских медоносных пчел (*A. ceranae*), при этом *N. ceranae* распространился далеко за пределы азиатского континента [7, 8]. Заражение видами *Nosema* spp может происходить: через пчелиную семью или мед; через совместное использование зараженных пищевых ресурсов (трофаллаксис); через бессимптомных и толерантных медоносных пчел в улье, продолжительность жизни которых поддерживает производство спор и относительно здоровый внешний вид *A. mellifera*; через торговлю медоносными пчелами и продуктами их переработки [1, 9].

Высокая заболеваемость *Nosema* spp на фоне колебаний относительной влажности и средней температуры во время зимнего периода содержания также может иметь связь со здоровьем медоносных пчел, особенно в регионах с продолжительной холодной зимой [10, 11]. Считается, что распространение спор паразита является следствием жестких манипуляций с ульями и раздавливания зараженных пчел с заражением пчелиного материала, однако их распространение также может быть следствием мировой торговли продуктами пчеловодства, либо торговли с пасеки на пасеку в разных географических регионах [1, 11].

Анализ глобально управляемых семей медоносных пчел в геоклиматических регионах с продолжительной холодной зимой показывает монотонное уменьшение количества пчелиных семей с течением времени; одним из таких регионов является Россия. Предыдущие исследования нозематоза в России позволяют предположить, что на некоторых пасеках практикуется посадка привозных пчелиных семей, пчелиных маток и роев с других пасек [12]. В другом исследовании нозематоз был зарегистрирован в семьях медоносных пчел, завезенных в северный регион Российской Федерации из зараженных семей медоносных пчел из южных регионов [13]. Основной целью данного исследования было описание паразито-хозяйинных отношений *A. mellifera* и *Nosema* apis на единичной пасеке Республики Татарстан, России и выявление распределения гаплотипов паразита в сравнении с данными по Евразии с использованием полученных данных.

Материалы и методы исследования

80 образцов медоносных пчел *A. mellifera carnica* были собраны из одного улья на одной из пасек Лаишевского района Республики Татарстан, Россия, в апреле 2023 года. Погибшие рабочие медоносные пчелы были обнаружены у входа в улей или на рамках вдали от расплодного гнезда.

Чтобы изолировать хоботок из губы, пчелу помещали под указательным пальцем. Для выпрямления хоботка потребовалось использование препаровальной иглы. С помощью пинцета выпрямленный хоботок отводили, затем поворачивали и вытягивали. С помощью пинцета переднее крыло отделяли, захватывали у основания и вытягивали. Длину крыла измеряли от верхней части переднего края основного склерита до вершины. Ширина крыла измерялась в самом широком месте, от верхнего края до низа. Соотношение длин жилок в третьей кубитальной ячейке переднего правого крыла также использовалось для расчета кубитального индекса. Для измерения длины от проксимального центрального изгиба до дистальной точки голени бедренную часть правой задней лапы удаляли с помощью препаровальной иглы. Измерения проводились с использованием программного обеспечения ScopeTek и Image J.

Перед экстракцией ДНК каждую медоносную пчелу промывали этанолом и стерильной водой, а затем измельчали в 1 мл вновь добавленной стерильной воды, как описано ранее [14]. Каплю гомогената исследовали под композиционным микроскопом («Биомед-3», Россия) с использованием фазово-контрастной световой микроскопии при 400-кратном увеличении для наблюдения за спорами. Выделение тотальной ДНК из гомогената медоносных пчел оценивали с использованием коммерческого набора EZNA Tissue DNA kit (OMEGA, США) в соответствии с инструкциями производителя. Очищенную ДНК хранили при -20°C до проведения ПЦР-анализа. ПЦР проводили, как описано ранее [15]. ПЦР-тесты проводили с использованием термоциклера Bio-Rad T100 (Bio-Rad Laboratories Ltd., Канада). ПЦР-ампликоны окрашивали бромфеноловым синим, электрофорез проводили в 1,5 % агарозном геле с бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете.

Нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов определяли в научно-исследовательской компании («Синтол», Россия) с использованием тех же реагентов для амплификации. На хроматограмме образцов наблюдались перекрывающиеся пики. Каждую аллель разделяли с помощью вектора *pT7Blue* и трансформировали в клеточную линию *E. coli* DH5 α . Трансформированные клоны *E. coli* подвергали скринингу и очистке с использованием системы очистки miniprep. Часть последовательностей гена *Ptp3* была выгружена из научной базы данных (Турция, Испания и Словения). Сеть медианного соединения наборов данных аминокислотных последовательностей белка РТР3 из Республики Татарстан и баз данных оценивалась с использованием с участков с высоким уровнем полиморфизма. Обозначения были добавлены в Microsoft PowerPoint (Microsoft Office).

Результаты исследований и их обсуждение

Сначала были получены результаты морфометрического анализа медоносных пчел с подсчетом споровой нагрузки, представленные в таблице 1.



Таблица 1 – Результаты морфометрического анализа медоносных пчел с подсчетом споровой нагрузки

Длина хоботка	Длина крыла	Ширина крыла	Кубитальный индекс	Длина от проксимального центрального изгиба до дистальной точки голени	Споровая нагрузка
6,00	9,29	3,15	48,00	2,96	150000
5,95	9,28	3,14	52,00	3,03	290000
5,82	9,27	3,15	55,00	2,98	120000
6,02	9,21	3,14	57,00	3,04	165000
6,02	9,29	3,15	56,00	3,09	208000
6,00	9,31	3,14	52,00	3,00	9000
6,13	9,27	3,15	62,00	3,05	290000
6,38	9,23	3,14	51,00	3,04	95000
6,55	9,29	3,14	50,00	3,06	118000
6,00	9,24	3,15	61,00	3,02	167000
6,00	9,26	3,14	59,00	3,01	207000
6,83	9,31	3,14	48,00	3,00	278000
6,70	9,28	3,14	53,00	2,95	28000
6,82	9,24	3,15	63,00	2,97	297000
6,00	9,25	3,14	57,00	2,96	143000
6,54	9,24	3,15	59,00	3,08	160000
6,00	9,30	3,14	49,00	3,06	99000
6,98	9,27	3,15	46,00	2,97	124000
7,03	9,25	3,14	65,00	3,10	151000
6,60	9,32	3,15	58,00	3,02	77000
7,10	9,25	3,15	50,00	3,10	67000
6,40	9,32	3,15	47,00	3,00	32000
6,22	9,28	3,14	54,00	2,94	180000
7,01	9,22	3,15	50,00	3,01	286000
7,04	9,28	3,15	58,00	2,93	229000
6,96	9,22	3,15	61,00	2,95	221000
6,56	9,18	3,14	60,00	2,94	133000
7,01	9,23	3,15	54,00	3,01	137000
6,44	9,17	3,14	64,00	2,97	25000
6,75	9,21	3,15	50,00	3,06	18000
6,46	9,33	3,14	47,00	2,94	261000
7,11	9,20	3,15	48,00	3,04	65000
6,47	9,26	3,15	51,00	3,04	259000
6,84	9,27	3,14	57,00	2,99	161000
6,73	9,19	3,15	56,00	3,05	255000
6,37	9,30	3,15	45,00	3,03	232000
7,10	9,28	3,14	64,00	3,09	134000
6,26	9,29	3,15	58,00	2,94	107000
7,20	9,29	3,14	63,00	2,98	223000
6,36	9,27	3,15	52,00	3,10	23000
6,27	9,28	3,14	49,00	3,03	198000
6,26	9,29	3,15	46,00	3,07	179000
6,37	9,16	3,15	55,00	3,05	188000
6,27	9,32	3,14	60,00	3,08	269000
6,27	9,24	3,15	54,00	3,00	85000
7,01	9,29	3,14	56,00	2,98	30000
6,28	9,27	3,14	47,00	3,09	90000
6,48	9,24	3,15	63,00	2,97	272000
6,83	9,16	3,14	55,00	3,03	47000
6,27	9,29	3,14	60,00	2,97	259000
6,44	9,23	3,15	61,00	2,93	158000



Продолжение таблицы 1

6,57	9,29	3,14	50,00	3,05	229000
6,64	9,24	3,15	49,00	3,03	136000
6,83	9,22	3,15	52,00	3,07	216000
6,44	9,30	3,14	59,00	3,07	265000
6,73	9,26	3,15	62,00	2,93	299000
6,77	9,30	3,15	53,00	2,93	51000
6,56	9,22	3,14	58,00	2,97	150000
6,74	9,23	3,15	62,00	3,05	279000
6,95	9,26	3,14	63,00	2,94	243000
6,58	9,19	3,15	46,00	3,07	270000
6,48	9,28	3,15	61,00	3,06	240000
6,58	9,26	3,15	59,00	3,01	67000
6,97	9,30	3,15	47,00	3,08	58000
6,87	9,21	3,15	55,00	2,97	120000
6,75	9,29	3,15	48,00	2,95	36000
6,67	9,23	3,15	50,00	3,06	117000
6,57	9,32	3,14	64,00	3,09	153000
6,87	9,31	3,14	63,00	3,04	41000
6,85	9,28	3,15	54,00	3,02	117000
6,85	9,19	3,15	59,00	3,05	272000
6,78	9,30	3,15	49,00	3,03	282000
6,76	9,25	3,14	52,00	3,01	34000
6,47	9,30	3,15	57,00	2,96	255000
6,35	9,30	3,14	65,00	2,93	183000
5,80	9,17	3,14	58,00	3,02	227000
5,89	9,24	3,15	55,00	3,07	66000
7,00	9,16	3,15	50,00	3,01	276000
5,88	9,29	3,14	46,00	2,92	149000
5,87	9,33	3,15	51,00	2,96	213000

Анализируя результаты морфометрического анализа медоносных пчел, построили диаграмму для выявления распределения образцов. Выявили, что преобладающими подвидами были среднерусская и серая горная кавказская пчелы. Длина хоботка варьировала от 5,80 мм до 7,20 мм. Длина крыла варьировала от 9,16 мм до 9,33 мм. Ширина крыла варьировала от 3,14 мм до 3,15 мм. Кубитальный индекс варьировал от 45 до 65 %.

Для выявления распределения подвидов пчел среди образцов была построена диаграмма (рис. 1). Самыми распространенными подвидами пчел оказались гибриды карнийской (с), среднерусской (sr) и кавказской (sgk).

Для интерпретации полученных данных были рассмотрены зависимости между полученными морфометрическими переменными. Переменным были присвоены названия: proboscis (длина хоботка), wing_le (длина крыла), wing_wid (ширина крыла), sub_ind (кубитальный индекс), tibia (длина от проксимального центрального изгиба до дистальной точки голени), sporeload (споровая нагрузка).

С использованием перечисленных переменных было решено построить корреляционную матрицу Пирсона. По результатам построения корреляционной матрицы Пирсона была выявлена слабая положительная корреляция между споровой нагрузкой и кубитальным индексом, а также

отрицательно слабая корреляция между шириной крыла и кубитальным индексом (рис. 2).

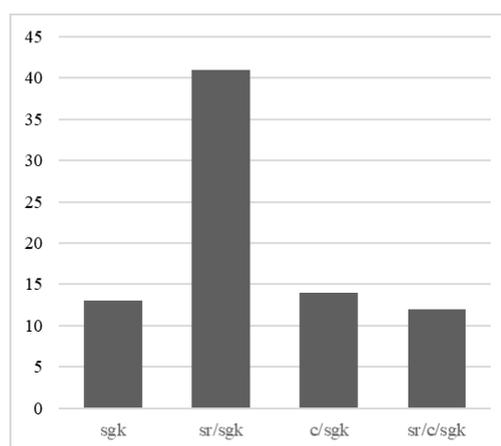


Рис. 1 – Визуализация распределения данных морфометрического анализа медоносных пчел. Подвиды: карнийской (с), среднерусский (sr) и серый горный кавказский (sgk)

Fig. 1 – Visualization of the distribution of data from morphometric analysis of honey bees. Subspecies: carnian (c), central russian (sr) and gray caucasian mountain (sgk)

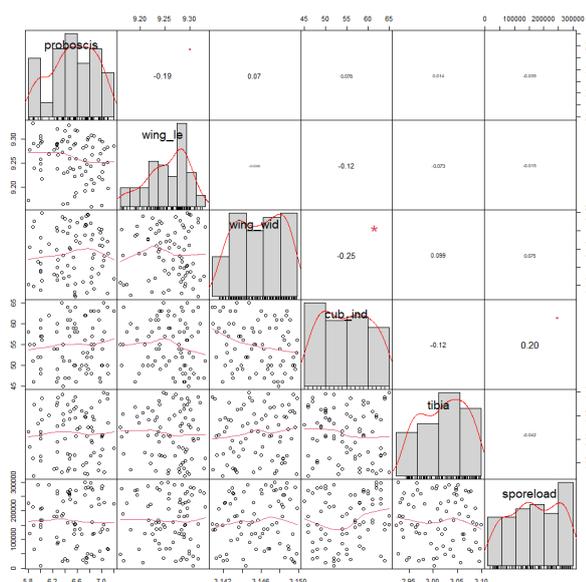


Рис. 2 – Корреляционная матрица Пирсона с использованием данных морфометрического анализа медоносных пчел
 Fig. 2 – Pearson correlation matrix using data from morphometric analysis of honey bees

Коэффициент корреляции Пирсона отражает степень линейной взаимосвязи между двумя переменными. Положительная корреляция означает, что при увеличении значений одной переменной значения другой переменной тоже увеличиваются. То есть, если коэффициент корреляции близок к +1, это указывает на сильную положительную связь между переменными. В случае отрицательной корреляции увеличение значений одной переменной сопровождается уменьшением значений другой переменной. Коэффициент корреляции, близкий к -1, говорит о сильной отрицательной связи между переменными. Если коэффициент корреляции близок к 0, то между переменными нет линейной зависимости.

В ходе работы было решено найти, какой кубитальный индекс имел связь со споровой нагрузкой. Для того чтобы определить, какая споровая нагрузка считается высокой, провели тест Колмогорова-Смирнова. Данный тест показывает порог отсечения, при какой споровой нагрузке она считается высокой. Показатели споровой нагрузки

(табл. 1) были разделены на группы (табл. 2), по которым была построена диаграмма (рис. 3), которая выявила, что достоверным порогом отсечения при показателе $p < 0,05$ является споровая нагрузка выше 150000.

Далее построили корреляционную матрицу Пирсона с использованием кубитального индекса и споровой нагрузки медоносных пчел с использованием полученных переменных. Для построения корреляционной матрицы предварительно всем значениям от 150000 и выше были присвоены значения 1, а значениям ниже 150000 были присвоены значения 0. Каждому подвиду серой горной кавказской (sgk) медоносной пчелы был присвоен номер 1. Каждому гибриду среднерусской и серой горной кавказской медоносной пчелы (sr/sgk) был присвоен номер 2. Каждому гибриду карнийской и серой горной кавказской медоносной пчелы (c/sgk) был присвоен номер 3. Каждому гибриду среднерусской, карнийской и серой горной кавказской медоносной пчелы (sr/c/sgk) был присвоен номер 4.

По результатам построения корреляционной матрицы Пирсона (рис. 4) была выявлена слабая положительная корреляция между гибридами среднерусского и серого горного кавказского подвидов медоносной пчелы, что неудивительно, потому что имеется их преобладающее количество (рис. 1). Также были выявлены отрицательные корреляции между разными подвидами, что тоже не удивительно, потому что они в одной выборке.

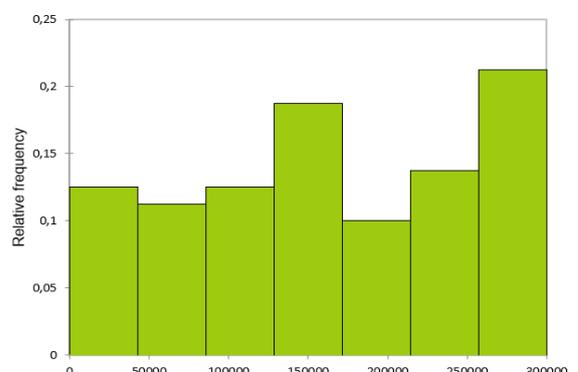


Рис. 3 – Выявление достоверного порога отсечения с использованием теста Колмогорова-Смирнова.

Fig. 3 – Identification of a reliable cutoff threshold using the Kolmogorov-Smirnov test.

Таблица 2 – Результаты разделения показателей споровой нагрузки для теста Колмогорова-Смирнова

Споровая нагрузка	Частота	Относительная частота
0-43000	10	0,125
44000-86000	9	0,113
87000-129000	10	0,125
130000-170000	15	0,188
171000-214000	8	0,100
215000-257000	11	0,138
258000-300000	17	0,213

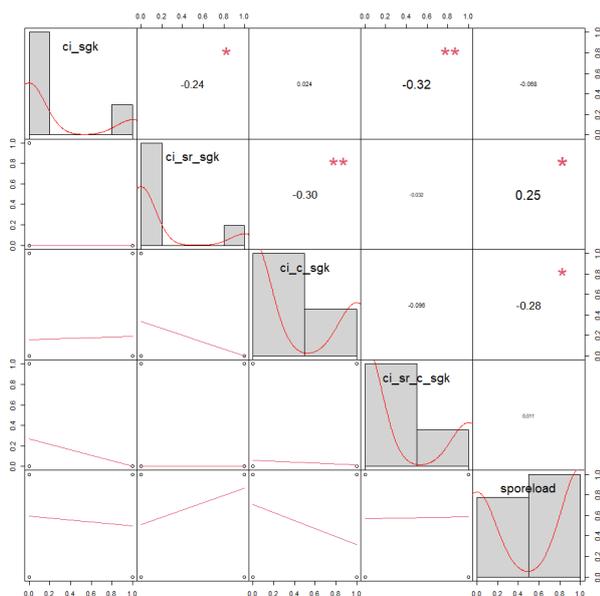


Рис. 4 – Корреляционная матрица Пирсона с использованием кубитального индекса и споровой нагрузки медоносных пчел

Fig. 4 – Pearson correlation matrix using cubital index and honeybee spore load

Таким образом, споровая нагрузка микроспоридиями рода *Nosema* среди подвидов медоносных пчел *Apis mellifera* на одной из пасек Лаишевского района Республики Татарстан предполагает наличие взаимосвязи между увеличивающейся споровой нагрузкой микроспоридий и гибридом нескольких пород медоносной пчелы.

Далее из образцов гомогенатов медоносной пчелы были выделены споры (рис. 4). Метод ПЦР позволил провести видовое определение микроспоридий *N. apis* (рис. 5). Большинство пчел с обнаруженными микроскопией спорами были ПЦР-положительными. По итогам ПЦР скрининга только 50 медоносных пчел из Республики Татар-

стан были заражены *N. apis*.

Известно, что белки РТР взаимодействуют с поверхностью клетки-хозяина. РТР3 участвует в биогенезе полярных трубок от споробласта к споре и играет роль в контроле экстррузии полярных трубок [16]. Другое исследование показало, что подавление экспрессии гена *Ptp3* позволяет держать под контролем инфекцию *N. ceranae* у медоносных пчел [17]. Таким образом, имеет смысл показать сеть гаплотипов аминокислот РТР3, чтобы увидеть функционально разные штаммы вида *Nosema spp.*, предполагая, что в Евразии существуют разные штаммы.

Аминокислотные последовательности белка РТР3 *N. apis*, обнаруженные в разных частях Евразии, сформировали один основной гаплотип, присутствующий в Словении, Испании и Турции (рис. 6). РТР3, принадлежащий основному гаплотипу *N. apis*, был обнаружен также в Республике Татарстан, разветвленной со Словенией, Испанией и Турцией. Еще один гаплотип, обнаруженный в Республике Татарстан, был вновь полученным и отличался от основного гаплотипа на одну аминокислоту.

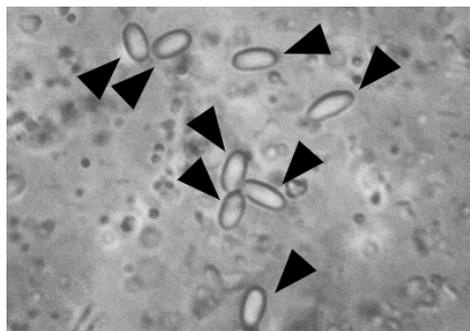


Рис. 5 – Световая микроскопия спор, схожих с *N. apis*. Черные стрелки – *N. apis*

Fig. 5 – Light microscopy of spores similar to *N. apis*. Black arrows – *N. apis*



Рис. 6 – Определение вида *N. apis* методом ПЦР. 1-11 (слева направо) – отдельные образцы *A. mellifera*. Вид *N. apis* определялся наличием полос 321 п.н.

Fig. 6 – *N. apis* species determination by PCR. 1-11 (from left to right) – individual samples of *A. mellifera*. *N. apis* species was determined by the presence of 321 bp bands

Как показано в этом исследовании, данные аминокислотной последовательности РТР3 с пасеки Республики Татарстан и других регионов Евразии позволяют предположить, что изоляты *N. apis* от медоносных пчел имеют как общие основные, так и уникальные гаплотипы. Наличие основных евразийских гаплотипов *N. apis* на пасеке Республики Татарстан подтверждает предположение о заносе паразитов в Российскую Федерацию из стран Евразии.

Настоящее исследование расширяет данные о существующих уникальных аминокислотных гаплотипах РТР3 видов *Nosema spp.* Хотя исследо-

ваний по импорту медоносных пчел в Российскую Федерацию нет, согласно данным Volza (<https://www.volza.com/>) об импорте медоносных пчел Российская Федерация импортирует медоносных пчел из европейских стран, таких как Нидерланды, Польша и Литва. Большая часть продукции медоносных пчел импортируется по всему миру из Китая, Индии, Новой Зеландии, Южной Кореи, Малайзии и Вьетнама, хотя конкретно о Российской Федерации информации нет. Несмотря на отсутствие точных данных, можно предположить, что наличие идентичных гаплотипов аминокислот белка РТР3 в Республике Татарстан, Нидер-



ландах и Южной Кореи связано с заносом вайри-морфофа в Российскую Федерацию посредством импорта медоносных пчел и/или продуктов пчеловодства. Что касается ситуации внутри страны, то есть несколько сообщений, предполагающих наличие потенциальных маршрутов распространения видов *Nosema* spp. В заповеднике на Южном Урале было обнаружено поражение пчелиных семей нозематозом, а в правительстве поступали жалобы на кочевых пчеловодов из других регионов и продажу пчел неизвестного происхождения на границе заповедника [18]. Интенсивный завоз медоносных пчел практиковался из южных регионов Российской Федерации в Сибири и Алтайском крае, а также Тюменской и Томской областях [12, 13, 18].

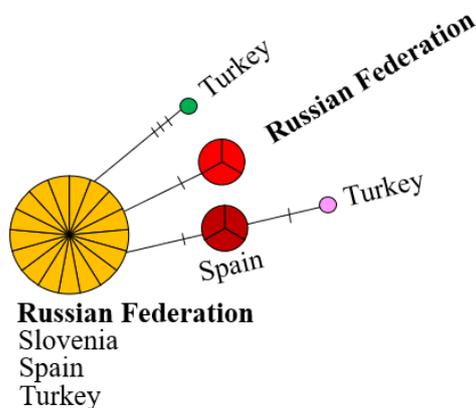


Рис. 7 – Распределение гаплотипов и сетевой анализ аминокислотных последовательностей белка *PTP3 N. apis*. Жирным шрифтом выделены гаплотипы, обнаруженные на пасеке Республики Татарстан, Россия

Fig.7 – *N. apis* *PTP3* protein amino acid haplotypes distribution and network analysis. Haplotypes found in the apiary of Republic of Tatarstan, Russia are shown in bold letters

Заключение

В данном исследовании были охарактеризованы случаи заражения *A. mellifera* нозематозом, вызванные микроспоридией *N. apis*. Споровая нагрузка микроспоридиями рода *Nosema* среди подвидов медоносных пчел *Apis mellifera* на одной из пасек Лаишевского района Республики Татарстан предполагает наличие взаимосвязи между увеличивающейся споровой нагрузкой микроспоридий и гибридом нескольких пород медоносной пчелы.

Так, корреляционная матрица Пирсона определила положительную корреляцию ($PCC = 0,25$) между гибридами среднерусского и серого горного кавказского подвида медоносной пчелы и высокой споровой нагрузкой микроспоридиями рода *Nosema*, что, согласно тесту Колмогорова-Смирнова с достоверным порогом отсечения при показателе $p < 0,05$, считается споровой нагрузке выше 150000 спор.

По итогам ПЦР скрининга 50 зараженных *N.*

apis медоносные пчелы были получены аминокислотные последовательности белка *PTP3* на одной из пасек Лаишевского района Республики Татарстан и установлено текущее состояние распределения гаплотипов микроспоридиями *Nosema apis*. с помощью электронных баз данных на всей территории Евразии. У *N. apis* обнаружено два гаплотипа, один из которых является новым и на данный момент специфичным для исследованного улья единичной пасеки Республики Татарстан, и еще один – зарегистрированным ранее в других регионах Евразии.

Список источников

1. Mutinelli, F. The spread of pathogens through trade in honey bees and their products (including queen bees and semen): overview and recent developments / F. Mutinelli // Scientific and Technical Review. – 2011. – № 30. – С. 257-271. – DOI 10.20506/rst.30.1.2033.
2. Giampieri, F. Bee products: an emblematic example of underutilized sources of bioactive compounds / F. Giampieri and [other] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2022. – DOI 10.1021/acs.jafc.1c05822.
3. Devkota, K. Beekeeping: sustainable livelihoods and agriculture production in Nepal / K. Devkota // Modern Beekeeping. – IntechOpen. – 2020. – DOI 10.5772/intechopen.90707.
4. Rader, R. Non-bee insects are important contributors to global crop pollination / R. Rader and [other] // PNAS. – 2016. – № 113. – С. 146-151. – DOI 10.1073/pnas.1517092112.
5. Insolia, L. Honey bee colony loss linked to parasites, pesticides and extreme weather across the United States / L. Insolia and [other] // Scientific Reports. – 2022. – № 12. – DOI 10.1038/s41598-022-24946-4.
6. Bartolomé, C. Longitudinal analysis on parasite diversity in honeybee colonies: new taxa, high frequency of mixed infections and seasonal patterns of variation / C. Bartolomé and [other] // Scientific Reports. – 2020. – № 10. – DOI 10.1038/s41598-020-67183-3.
7. Galajda, R. Nosema disease of European honey bees / R. Galajda and [other] // Journal of Fungus. – 2021. – DOI 10.3390/jof7090714.
8. Fries, I. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae) / I. Fries and [other] // European Journal of Protistology. – 1996. – №32. – С. 356-365. – DOI 10.1016/S0932-4739(96)80059-9.
9. Matheson, A. World bee health report / A. Matheson // Bee World. – 1993. – DOI 10.1080/0005772X.1993.11099183.
10. Gisder, S. Long-term temporal trends of *Nosema* spp. infection prevalence in Northeast Germany: continuous spread of *Nosema ceranae*, an emerging pathogen of honey bees (*Apis mellifera*), but no general replacement of *Nosema apis* / S. Gisder and [other] // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2017. – DOI 10.3389/fcimb.2017.00301.
11. Forsgren, E. Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate / E. Forsgren, I. Fries // Environmental



Microbiology Reports. – 2013. – № 5. – С. 78-82. – DOI 10.1111/j.1758-2229.2012.00386.x.

12. Зинатуллина, З.Я. «Азиатский» нозематоз в России / З.Я. Зинатуллина, А.Н. Игнатъева, О.Н. Жигилева, Ю.С. Токарев // Пчеловодство. – 2011. – № 11. – С. 24-26.

13. Островерхова, Н.В. Первый случай диагностики *Nosema ceranae* на пасеке Томской области / Н.В. Островерхова [и др.] // Пчеловодство. – 2014. – № 9. – С. 22-24.

14. Gajger, I.T. Prevalence and distribution of *Nosema ceranae* in Croatian honeybee colonies / I.T. Gajger and [other] // Veterinary medicine. – 2010. – № 55. – С. 457–462. – DOI 10.17221/2983-VETMED.

15. Maside, X. Population genetics of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*: One host (*Apis mellifera*) and two different histories / X. Maside and [other] // PLoS One. – 2015. – DOI 10.1371/journal.pone.0145609.

Вклад авторов:

Все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

References

1. Mutinelli, F. The spread of pathogens through trade in honey bees and their products (including queen bees and semen): overview and recent developments / F. Mutinelli // Scientific and Technical Review. – 2011. – № 30. – С. 257-271. – DOI 10.20506/rst.30.1.2033.

2. Giampieri, F. Bee products: an emblematic example of underutilized sources of bioactive compounds / F. Giampieri and [other] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2022. – DOI 10.1021/acs.jafc.1c05822.

3. Devkota, K. Beekeeping: sustainable livelihoods and agriculture production in Nepal / K. Devkota // Modern Beekeeping. – IntechOpen. – 2020. – DOI 10.5772/intechopen.90707.

4. Rader, R. Non-bee insects are important contributors to global crop pollination / R. Rader and [other] // PNAS. – 2016. – № 113. – С. 146-151. – DOI 10.1073/pnas.1517092112.

5. Insolia, L. Honey bee colony loss linked to parasites, pesticides and extreme weather across the United States / L. Insolia and [other] // Scientific Reports. – 2022. – № 12. – DOI 10.1038/s41598-022-24946-4.

6. Bartolomé, C. Longitudinal analysis on parasite diversity in honeybee colonies: new taxa, high frequency of mixed infections and seasonal patterns of variation / C. Bartolomé and [other] // Scientific Reports. – 2020. – № 10. – DOI 10.1038/s41598-020-67183-3.

7. Galajda, R. *Nosema* disease of European honey bees / R. Galajda and [other] // Journal of Fungus. – 2021. – DOI 10.3390/jof7090714.

8. Fries, I. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae) / I. Fries and [other] // European Journal of Protistology. – 1996. – №32. – С. 356-365. – DOI 10.1016/S0932-4739(96)80059-9.

9. Matheson, A. World bee health report / A. Matheson // Bee World. – 1993. – DOI 10.1080/0005772X.1993.11099183.

10. Gisder, S. Long-term temporal trends of *Nosema* spp. infection prevalence in Northeast Germany: continuous spread of *Nosema ceranae*, an emerging pathogen of honey bees (*Apis mellifera*), but no general replacement of *Nosema apis* / S. Gisder and [other] // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2017. – DOI 10.3389/fcimb.2017.00301.

11. Forsgren, E. Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate / E. Forsgren, I. Fries // Environmental Microbiology Reports. – 2013. – № 5. – С. 78-82. – DOI 10.1111/j.1758-2229.2012.00386.x.

12. Zinatullina, Z.YA. «Aziatskij» nozematoz v Rossii / Z.YA. Zinatullina, A.N. Ignat'eva, O.N. Zhigileva, YU.S. Tokarev // Pchelovodstvo. – 2011. – № 11. – С. 24-26.

13. Ostroverhova, N.V. Pervyj sluchaj diagnostiki *Nosema ceranae* na paseke Tomskoj oblasti / N.V. Ostroverhova [i dr.] // Pchelovodstvo. – 2014. – № 9. – С. 22-24.

14. Gajger, I.T. Prevalence and distribution of *Nosema ceranae* in Croatian honeybee colonies / I.T. Gajger and [other] // Veterinary medicine. – 2010. – № 55. – С. 457–462. – DOI 10.17221/2983-VETMED.

15. Maside, X. Population genetics of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*: One host (*Apis mellifera*) and two different histories / X. Maside and [other] // PLoS One. – 2015. – DOI 10.1371/journal.pone.0145609.

16. Peuvel, I. The microsporidian polar tube: evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi* / I. Peuvel and [other] // Molecular and biochemical parasitology. – 2002. – № 122. – С. 69-80. – DOI 10.1016/S0166-6851(02)00073-7.

17. Rodríguez-García, C. Nosemosis control in European honey bees, *Apis mellifera*, by silencing the gene encoding *Nosema ceranae* polar tube protein 3 / C. Rodríguez-García and [other] // Journal of Experimental Biology. – 2018. – № 22. – DOI 10.1242/jeb.184606.

18. Kaskinova, M. The current state of the protected *Apis mellifera mellifera* population in Russia: hybridization and nosematosis / M. Kaskinova and [other] // Animals. – 2021. – DOI 10.3390/ani11102892.

**Contribution of the authors:**

All authors have made an equivalent contribution to the preparation of the publication.

The authors declare that there is no conflict of interest.

Информация об авторах

Шамаев Николай Дмитриевич, канд. биол. наук, ст. препод., кафедра прикладной экологии Института экологии и природопользования, ФГБОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; Казанская государственная медицинская академия — филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава, России nikolay1157@gmail.com

Шуралев Эдуард Аркадьевич, канд. вет. наук, доцент, кафедра прикладной экологии Института экологии и природопользования, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; Казанская государственная медицинская академия — филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России; ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», eduard.shuralev@mail.ru

Мукминов Малик Нилович, д-р. биол. наук, профессор, кафедра прикладной экологии Института экологии и природопользования, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, malik-bee@mail.ru

Author information

Shamaev Nikolay D., Candidate of Biological Sciences, Senior Lecturer, Department of Applied Ecology, Institute of Environmental Sciences, Kazan (Volga Region) Federal University; Kazan State Medical Academy - Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH Russia, nikolay1157@gmail.com

Shuralev Eduard A., Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor, Department of Applied Ecology, Institute of Environmental Sciences, Kazan (Volga Region) Federal University; Kazan State Medical Academy - Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH Russia; Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, eduard.shuralev@mail.ru

Mukminov Malik N., Doctor of Biological Sciences, Professor, Department of Applied Ecology, Institute of Environmental Sciences, Kazan (Volga Region) Federal University; Kazan State Medical Academy - Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH Russia, malik-bee@mail.ru

Статья поступила в редакцию 15.04.2024; одобрена после рецензирования 09.08.2024; принята к публикации 20.09.2024.

The article was submitted 15.04.2024; approved after reviewing 09.08.2024; accepted for publication 20.09.2024.