

На правах рукописи

Шевцова Анна Александровна

**Распространенность и полиморфизм геномов 7 патогенных вирусов
пчел, циркулирующих на территории Российской Федерации**

1.5.7 - Генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2023

Работа выполнена на кафедре генетики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва

Научный руководитель:

КОКАЕВА Зарема Григорьевна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры генетики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва

Официальные оппоненты:

ОСТРОВЕРХОВА Надежда Васильевна

доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры зоологии беспозвоночных Института биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства (Биологический институт) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск

БОГУСЛАВСКИЙ Дмитрий Викторович

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории нейробиологии развития Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», г. Москва

Защита состоится «___»_____20 г. в ч. на заседании диссертационного совета 24.1.088.01 (Д002.214.01) в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, ул. Губкина, 3. Телефон: +7(499)135-62-13, факс: +7(499)132-89-62, e-mail: dissovvet@vigg.ru. С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru.

Автореферат разослан «___»_____2024 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Горячева И. И.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

В последнее время по всему миру, в том числе в России, регистрируют бессимптомную массовую гибель пчелиных семей. По предварительным подсчетам, показатель смертности семей на исследуемых пасеках Российской Федерации варьирует от 28 до 100% и в среднем составляет 72%. Причиной данного явления называют заражённость пчелиных семей одним или несколькими патогенными вирусами пчёл (ПВП). В течение последних лет обнаружено более 30 различных вирусов, поражающих медоносную пчелу. Вирусные заболевания приводят к ослаблению иммунитета и в ряде случаев к гибели зараженных особей, вплоть до утраты всех семей пчел. 7 вирусов вызывают наиболее тяжелые последствия для здоровья пчел (ABPV, IAPV, KBV, BQCV, SBV, CBPV и DWV).

Роль медоносной пчелы в окружающей среде трудно переоценить. Во-первых, *Apis mellifera* является одним из главных опылителей растений, для некоторых – единственным опылителем. Для некоторых подвидов пчел отмечено ассортативное опыление только определенного вида растения. Большинство продовольственных сельскохозяйственных культур также опыляется пчелой. Во-вторых, растения, опыляемые медоносной пчелой, а также сами пчелы являются звеньями пищевых цепей многих экосистем.

Если не принять экстренных мер, то число семей в будущем может резко сократиться, что напрямую угрожает сохранности уникального генофонда медоносных пчёл и других организмов. Будет нарушен баланс внутри экосистем, что повлечёт исчезновение ценных видов растений и животных, в первую очередь сельскохозяйственных, в целом продуктивность лесных и прочих сообществ катастрофически снизится. Продовольственная безопасность России, а в связи с похожей ситуацией и в других странах – в конечном итоге всего мира, будет под угрозой. В качестве примера можно привести печальный опыт провинции Сычуань в Китае – к 2001 году в регионе вымерли почти все популяции диких пчел, и опыление растений пришлось проводить вручную. В дальнейшем о культивировании некоторых видов вообще пришлось забыть и заменить их на виды, которым не требуются пчелы-опылители – яблони, например, пришлось заменить сливами.

Осложняет сложившуюся ситуацию практически полное отсутствие среди генетических и ветеринарных лабораторий России научных групп, занимающихся выявлением и изучением распространения вирусных заболеваний медоносной пчелы на территории страны. В связи с этим полностью отсутствует информация по распространению возбудителей вирусных заболеваний пчел на территории РФ как в целом, так и по регионам.

Поэтому, в настоящее время первостепенной задачей является оценка вирусоносительства в пчелиных семьях европейской части России с использованием молекулярно-генетических маркеров, расположенных в консервативных участках вирусного генома.

Так как избавление пчелиных семей от вирусных заболеваний пока не представляется возможным, необходимо использовать подходы, позволяющие контролировать проявление заболеваний в популяциях на ранних стадиях. В России для этого используют морфометрический анализ и пассивный сбор статистики клинических проявлений заболеваний пчел без идентификации возбудителей. Поэтому не менее важной задачей в борьбе с вирусами пчёл является разработка эффективных тест-систем для определения содержания РНК-содержащих вирусов в организме медоносной пчелы *Apis mellifera*. В дальнейшем это поможет составить карту распространённости вирусов на территории России.

Цель исследования

Цель работы – оценка вирусоносительства в пчелиных семьях европейской части России и полиморфизма фрагментов геномов следующих вирусов: острого паралича (ABPV), деформации крыла (DWV), хронического паралича (CBPV), черных маточников (BQCV), мешотчатого расплода (SBV), израильского паралича (IAPV) и кашмирского (KBV).

Задачи исследования:

- 1) Выявить носительство пчёлами патогенных вирусов ABPV, BQCV, SBV, DWV, IAPV, CBPV и KBV и составить карту распространённости вирусов на европейской территории Российской Федерации.
- 2) Провести секвенирование участков гена *RdRp* вирусов ABPV, BQCV, SBV, DWV, IAPV, CBPV и KBV для сравнения с уже имеющимися в базах данных последовательностями с целью оценки его полиморфизма и выявления консервативных видоспецифичных участков.
- 3) Провести филогенетический анализ с использованием полученных в работе последовательностей вирусов пчел, а также общедоступных данных по геномам ПВП в других странах. Выявить изоляты наиболее близкие к российским, установить связь между вирусами различного географического происхождения.
- 4) Разработать тест-системы на основе методики ПЦР в реальном времени для идентификации распространенных на территории Российской Федерации патогенных вирусов пчел.

Научная новизна работы

- 1) Впервые получены данные о распространённости 7 патогенных вирусов пчел в различных регионах Российской Федерации.
- 2) Получены уникальные последовательности участков геномов патогенных вирусов пчел, циркулирующих в российских популяциях медоносной пчелы.
- 3) Проведен филогенетический анализ с использованием полученных нами последовательностей *RdRp* вирусов пчел и открытых данных секвенирования базы Genbank, оценено родство вирусов.
- 4) Разработаны и созданы эффективные наборы праймеров и зондов для проведения ПЦР в режиме реального времени с целью оценки вирусносительства на территории Российской Федерации.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Данные о распространённости патогенных вирусов на пасаеках различных регионов России могут быть использованы для ветеринарного мониторинга. На основе результатов анализа полиморфизма участков гена *RdRp* и данных филогенетического анализа, могут быть определены родственные связи между штаммами вирусов. Это дает более полное представление о характере и особенностях распространения патогенных вирусов пчел в мире, и в дальнейшем будет способствовать разработке стратегии и мер по предотвращению массового вымирания пчел. Оценка вирусносительства с помощью молекулярно-генетических методов даст возможность выявлять вирусные заболевания на пасаеках на ранних стадиях, своевременно принимать соответствующие меры, и управлять селекцией пчел, не допуская дальнейшего распространения вирусных заболеваний. Тест-системы с использованием метода ПЦР в режиме реального времени являются эффективным и быстрым методом выявления вирусносительства и могут стать перспективным методом для экспресс-диагностики вирусных заболеваний в лабораториях.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Региональная особенность распространения патогенных вирусов пчел среди популяций медоносной пчелы на территории Российской Федерации.
- 2) Полиморфизм участков гена *RdRp* изолятов вирусов пчел, выявленных на территории России, в сравнении как с другими отечественными изолятами, так и с нуклеотидными последовательностями изолятов из других стран мира.
- 3) Возможность совместной детекции исследованных видов патогенных вирусов пчел ABPV, DBV, SBV, BQCV, наиболее распространенных на территории Российской Федерации, с помощью тест-системы для ПЦР в режиме реального времени.

Личный вклад автора

Автор принимал личное участие на каждом этапе выполнения научно-квалификационной работы, которые заключались: в разработке направления исследований, методики, сборе и подготовке биологического материала, проведении молекулярно-биологических экспериментов, биоинформатическом анализе, статистической обработке и интерпретации результатов, написании статей и тезисов.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы представлены на следующих международных и российских научных конференциях: Научно-практической конференции с международным участием «Генетика - фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (Ростов-на-Дону, 2017), 18-ой Всероссийской конференции молодых учёных «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2018), «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы: IV Международная научная конференция к 55-летию основания Института генетики и цитологии НАН Беларуси» (Минск, Беларусь, 2020), «Пчеловодство и апитерапия: современное состояние и перспективы развития» (Уфа, 2022).

Публикации

По результатам исследований опубликовано 14 печатных работ: 7 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для защиты диссертаций, 2 статьи в научном сборнике, 4 - в сборниках тезисов и материалов конференций, 1 книга.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 114 страницах, содержит 3 таблицы, 34 рисунка, 31 страницу приложений. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка литературы, который включает 106 источников, из которых 90 на иностранных языках.

Финансовая поддержка работы

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-34-90165 - Аспиранты (2020-2022 гг).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы

Первый раздел диссертации посвящен рассмотрению и характеристике объекта исследования. Подробно рассмотрена морфология и геном вирусов пчел семейств Dicistroviridae и Iflavirusidae порядка Picornavirales, особенности репликации. Обобщены современные представления о различных вирусах медоносной пчелы, путях распространения вирусных заболеваний в популяциях *Apis mellifera* в различных регионах мира.

2. Материалы и методы

Образцы

В ходе исследования было проанализировано 437 пчелиных семей карпатской породы из различных регионов России: Архангельской, Белгородской, Владимирской, Вологодской, Воронежской, Московской, Пензенской, Ростовской, Рязанской, Тверской областей, Красноярского и Краснодарского края. Образцы были получены из Московской Государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К. И. Скрябина. Пчелиные семьи

транспортировали в лабораторию живыми в отдельных одноразовых пластиковых контейнерах и замораживали при температуре -30°C до востребования.

Выделение РНК

Для выделения тотальной РНК из каждой семьи отбирали 30 пчел и растирали в ступке на холоде до гомогенного состояния. От полученного гомогената отбирали 100 мг для выделения РНК. Оставшуюся массу замораживали при -70°C для возможного дальнейшего использования. Для лизиса клеток использовали реагент Extract RNA (ЗАО «Евроген», Россия). Выделение осуществляли согласно протоколу производителя. Концентрацию и чистоту выделенной РНК определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США).

Обратная транскрипция

Синтез первой цепи кДНК на РНК-матрице осуществляли с использованием обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей (MMLV-ревертаза) в составе набора MMLV RT kit (ЗАО «Евроген», Россия). Для получения кДНК в качестве праймера брали случайный декануклеотидный праймер. Реакцию обратной транскрипции проводили на приборе Bio-Rad MyCycler (США). Готовые образцы кДНК хранили при -70°C .

Дизайн высокоспецифичных праймеров

Для проведения ПЦР использовали праймеры, сконструированные в нашей лаборатории, подобранные к консервативным последовательностям гена *RdRp* вирусов.

В банке аннотированных нуклеотидных последовательностей GenBank Национального Центра Биотехнологической Информации США (GenBank NCBI USA) производили поиск нуклеотидных последовательностей искомого гена *RdRp*. Осуществляли множественное выравнивание программой ClustalW. Контрольную проверку выбранных последовательностей праймеров на специфичность отжига проводили в программе Primer BLAST, осуществляющей локальное попарное выравнивание каждого из праймеров с нуклеотидными последовательностями базы данных. Список подобранных праймеров приведен в Таблице 1.

Таблица 1. Последовательности подобранных высокоспецифичных олигонуклеотидов

Название	Последовательность, 5'→3'	Температура отжига, $^{\circ}\text{C}$	Длина продукта, п.н.
ABPV-F	TGTGATGTGGGTAGATACATT	53	300
ABPV-R	CATAATGCAAACATTCAAAGATC	55	
DWV-F	ACATTTTGAATACTATTCGAATTG	54	410
DWV-R	TAACGCTTGTTTAGCATTCCTC	52	
SBV-F	GATAGAGGCGTATACCTTATTG	54	600
SBV-R	ATGCTTTGTTCACTTGTTCCTAAAT	53	
BQCV-F	GACGAAAGGAAGCCTAAACATAA	54	420
BQCV-R	GGAAGAGACTTGCACCATTG	55	
KBV-F	GATGAACGTCGACCTATTG	53	414
KBV-R	TGTGGGTTGGCTATGAGTC	55	
IAPV-F	TATGTATGGACACAATTCTTGA	53	716
IAPV-R	GTAGTCCAGCAATGATCTC	54	
CBPV-F	AGTTGTCATGGTTAACAGGATAC	54	455
CBPV-R	TCTAATCTTAGCACGAAAGCC	54	

Проведение ПЦР

ПЦР проводили со специфичными, подобранными в нашей лаборатории праймерами. Условия проведения реакции подбирались экспериментально, реакцию проводили в амплификаторе T100 thermal cycler фирмы Bio-Rad (США). Последующую детекцию продуктов амплификации проводили с помощью гель-электрофореза в 2%-ном агарозном геле.

Подготовка образцов к секвенированию

Для сравнения изолятов вирусов разных регионов с последующим филогенетическим анализом проведено секвенирование фрагментов вирусного генома с помощью полученных праймеров. Для этого на первом этапе проведена амплификация фрагментов исследуемых вирусов с последующей детекцией продуктов в агарозном 2%-ном геле. Проводилась очистка фрагментов ДНК из геля с помощью фильтрации на колонках коммерческим набором Cleanup Standard (ЗАО «Евроген», Россия). Выделение фрагментов ДНК проводилось согласно протоколу производителя.

Выделенная и очищенная ДНК использовалась для секвенирования по Сэнгеру, которое осуществлялось в коммерческой компании ЗАО «Евроген», Россия. Обработка полученных данных выполнялась в программе Geneious, сравнение полученных последовательностей с последовательностями из базы данных проводилось с помощью Nucleotide BLAST. Филогенетические деревья строились в программе Mega 8.

3. Результаты и обсуждение

Детекция вирусов в колониях пчел

Для определения вирусносительства в пчелиных семьях анализировали электрофореграммы фрагментов кДНК вирусов. Вирусносительство подтверждалось наличием фрагмента соответствующей длины (Рисунок 1). На основе полученных данных строили карты распространности вирусов (Рисунок 2). Сводные данные по распространности в процентах приведены в Таблице 2.

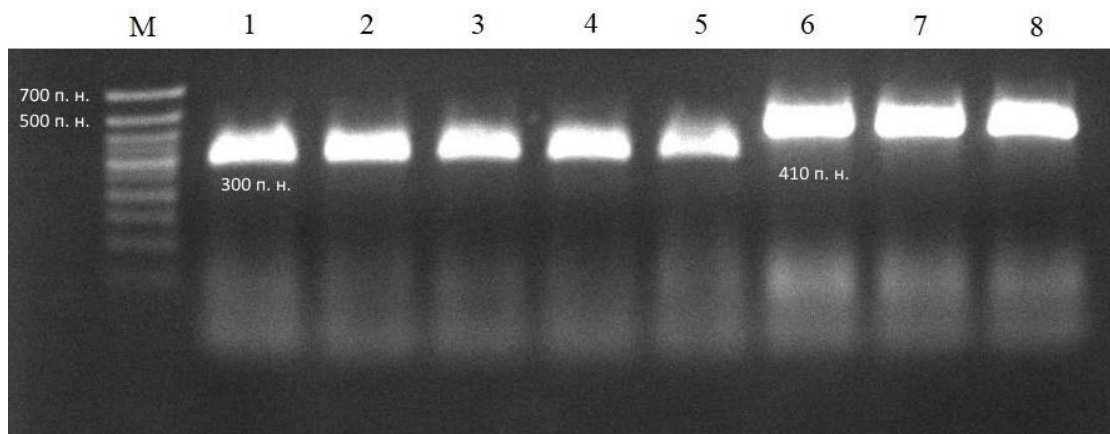


Рисунок 1. Электрофореграмма продуктов амплификации вирусов острого паралича и деформации крыла (ABPV и DWV). На рисунке представлены образцы из Рязанской области, Шацкого района. М-маркер 50 п.о., лунки 1-5 – образцы с амплифицированным фрагментом ABPV, лунки 6-8 – фрагмент DWV.

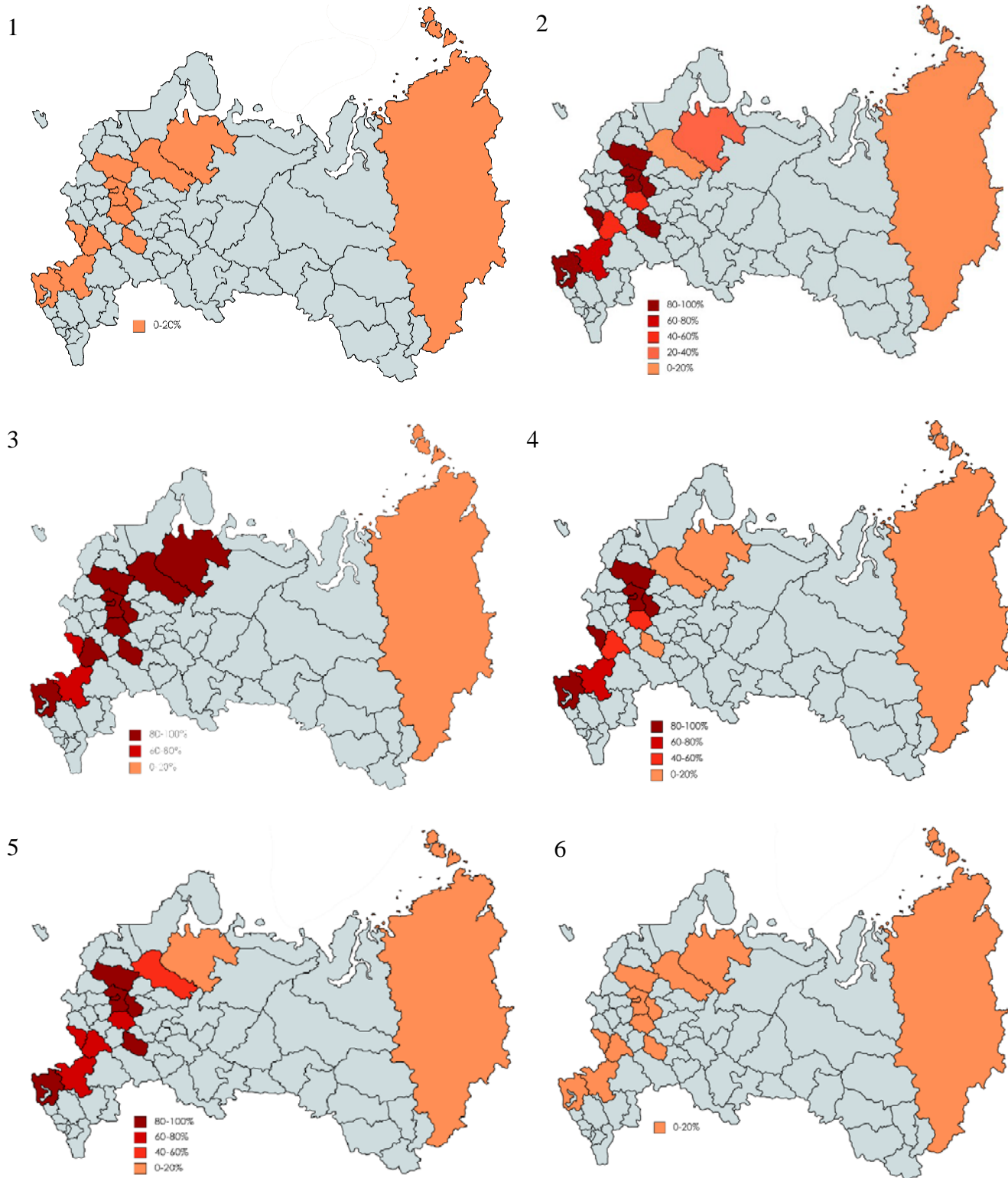


Рисунок 2. Карты распространности патогенных вирусов пчел на территории различных областей Российской Федерации. Цифрами обозначены карты для вирусов: 1 – IAPV, 2 – DWV, 3 – ABPV, 4 – BQCV, 5 – SBV, 6 – KBV.

Таблица 2. Распространение вирусов пчел в разных регионах России. Вирусоносительство указано в процентах.

Область, место	ABPV	SB V	DWV	BQCV	IAPV	KBV	CBPV
Архангельская, г. Вельск	100	31,4	17,1	28,6	0	11,4	0
Архангельская, п.о. Нагорская	100	21,9	6,3	15,6	15,6	3,1	0
Архангельская, д. Костинская	100	0	44,4	0	0	11,1	0
Белгородская, с.Ионовка	31,7	19,5	100	75,6	17,1	17,1	0
Белгородская, х.Кронштадт	100	100	100	100	7,9	7,9	0
Белгородская, кфх Биляченко	100	100	100	100	29,6	31,8	0
Владимирская	100	100	100	100	0	0	0
Вологодская	100	44,4	16,6	0	0	0	0
Воронежская, пос.Отрадное	100	51,7	6,9	10,3	17,2	0	0
Воронежская, Тепличная	100	82,8	79,3	79,3	3,5	0	0
Краснодарский край	100	100	100	100	0	7,7	0
Красноярский край	16,6	0	11,1	0	0	0	0
Московская	100	100	100	100	0	0	0
Пензенская	100	100	100	0	0	0	0
Ростовская, х. Ленина	100	40	40	20	0	0	0
Ростовская, пос.Чалтырь	62,5	81,3	81,3	75	0	0	0
Ростовская, пос.Недвичанка	64,3	83,3	85,7	71,4	0	0	0
Ростовская, Миллеровский р-он	16,7	91,7	86,1	86,1	2,8	5,6	0
Рязанская, пос.Карля	100	85	100	40	5	0	0
Рязанская, пос.Шевырляй	100	50	100	75	0	25	0
Тверская	100	100	100	100	0	0	0

Исходя из полученных данных, самым распространенным вирусом на территории России является вирус острого паралича (ABPV). Фрагмент вируса присутствует в образцах из всех регионов, в большинстве из них инфекцией поражены 100% исследуемых популяций пчел. Данные результаты соответствуют литературным данным о повсеместном распространении вируса острого паралича и о том, что в ряде случаев именно этот тип возбудителя мог являться причиной гибели всех семей пчел.

Вирус деформации крыла (DWV) является вторым по распространенности вирусом на европейской части территории РФ. В Центральном Федеральном Округе вирус встречается во всех исследованных регионах в 100% случаев. Частота встречаемости снижена в Архангельской и Ростовской областях. Возможно, это связано с лучшей выживаемостью вируса в условиях умеренного климата.

Частота встречаемости вируса мешотчатого расплода (SBV) в исследуемых регионах еще ниже, чем ABPV и DWV, а в пчелиных семьях деревни Костинская Архангельской области вирус не выявлен даже в минимальных количествах. В целом вирус чаще представлен в южных регионах России, где заражено до 100% колоний пчел, по сравнению с более северными регионами.

Вирус черных маточников (BQCV) широко распространен в областях Центрального Федерального Округа, значительно ниже частота встречаемости в Ростовской и Архангельской областях. Вирус отсутствует в образцах из Пензенской области.

Израильский вирус острого паралича (IAPV) является нетипичным для российских регионов. Самая высокая частота присутствия вируса показана для Белгородской области, но и в ней она не превышает 30% (крестьянское (фермерское) хозяйство Биляченко). В большинстве регионов вирус полностью отсутствует.

Кашмирский вирус (KBV) также слабо представлен на территории России, но оценка распространенности показала большее присутствие вируса в северных регионах и почти полное отсутствие в южных. Данный характер распределения свидетельствует о возможно лучших условиях для размножения и распространения вируса при сниженных температурах и влажности.

По данным, собранным на основе оценки вирусоносительства пчелами, можно судить о широко распространенном на территории РФ явлении коинфекции, когда семьи пчел заражены несколькими вирусами одновременно. Чаще всего коинфекция представлена сразу четырьмя вирусами – острого паралича, мешотчатого расплода, деформации крыла и вируса черных маточников. Данные результаты получены для Белгородской, Владимирской, Московской, Тверской областей и Краснодарского края. Более того, во всех этих регионах вирусными инфекциями поражены все семьи пчел. Подобное явление часто связывают со снижением иммунитета пчелы при заражении одним вирусом, что влечет за собой заражение еще одним типом. Соответственно, при диагностике вирусных заболеваний необходимо проводить тестирование по всем вирусам-возбудителям заболеваний пчел.

Анализ данных секвенирования

После получения результатов секвенирования гена *RdRp* (44 участка) данные обрабатывали в нескольких программах. В первую очередь проводили сравнение последовательностей в программе Nucleotide BLAST (NCBI), которая демонстрирует процент гомологии искомой последовательности с последовательностями, уже содержащимися в базе данных. На Рисунке 3 приведен пример такого сравнения для вируса SBV, аналогичные сравнения были проведены и для остальных вирусов. Также с помощью программы MEGA 8 были построены соответствующие филогенетические деревья, отражающие связь между типами вирусов различного географического происхождения. В качестве примера в автореферате диссертации приведено филогенетическое дерево для вируса SBV (Рисунок 4).

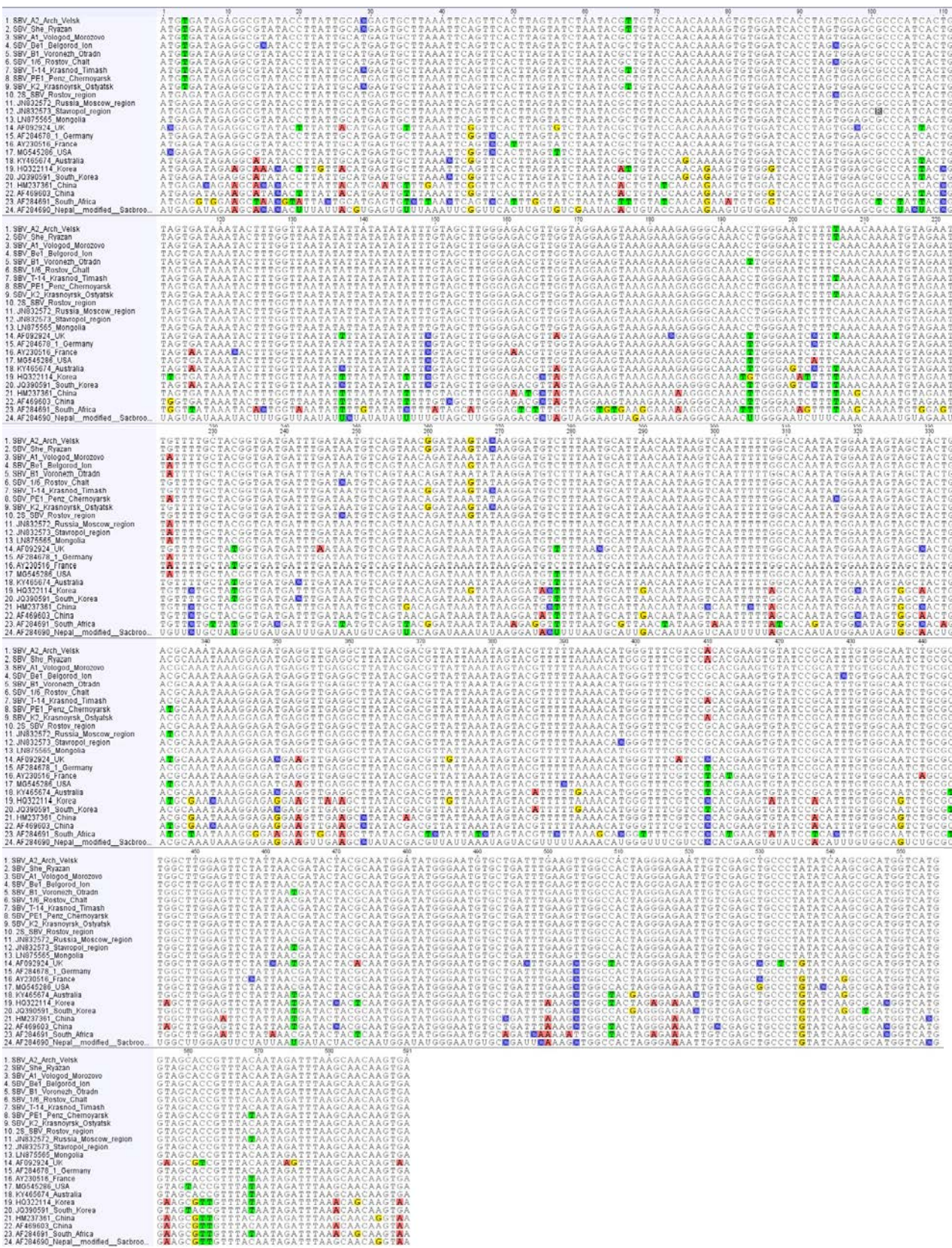


Рисунок 3. Выравнивание полученных нами последовательностей *RdRp* SBV с изолятами других стран.

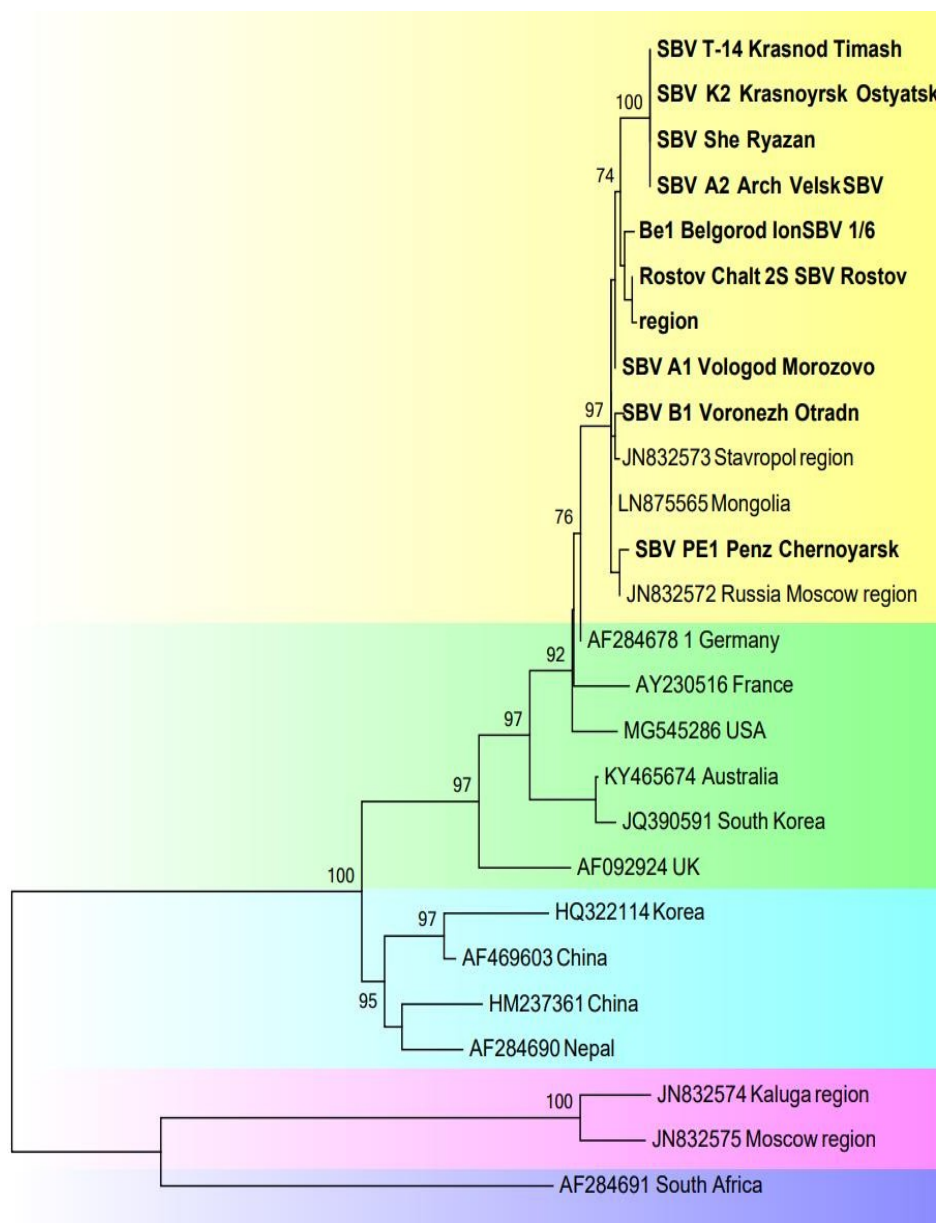


Рисунок 4. Филогенетическое дерево изолятов вируса мешотчатого расплода (SBV). Цветом выделены 4 разных генотипа: желтый и зеленый – европейская группа, голубой – азиатский, розовый – впервые выделенный в работе наших коллег генотип (Ломакина, Батуев, 2012), фиолетовый – южноафриканский. Желтым цветом обозначена клада российских изолятов в составе европейского генотипа.

Анализ сходства полученных нами последовательностей участка гена *RdRp* вирусов с последовательностями вирусов из баз данных говорит о высоком внутри- и межвидовом разнообразии вирусов в мире. Поэтому при создании тест-систем необходимо ориентироваться на ультраконсервативные участки геномов вирусов.

На основе полученных выравниваний последовательностей участка гена *RdRp* выявлены консервативные фрагменты длиной 20-35 оснований. Данные участки видоспецифичны, при межвидовом сравнении последовательности гена *RdRp* выявляется значительный полиморфизм в областях выявленных консервативных участков. Данные последовательности являются потенциальными местами посадки праймеров и зондов, входящих в состав молекулярно-генетических тест-систем для выявления вирусов ABPV, BQCV, SBV, DWV, IAPV и KBV. Номера наших последовательностей в базе GenBank представлены в таблице 3.

Таблица 3. Номера последовательностей изолятов в базе GenBank.

OL314253	2A_Belgorod Acute bee paralysis virus	ABPV
OL314254	1_Belgorod_Black queen cell virus	BQCV
OL314255	1D_Belgorod_Deformed wing virus	DWV
OL314256	1_Belgorod_Israeli acute paralysis virus	IAPV
OL314257	3_Kashmir bee virus	KBV
OL314258	2S_Sacbrood virus	SBV
PP133126	B1_Voronezh_Otradm	BQCV
PP133127	A2_Arch_Velsk	BQCV
PP133128	P2_Rostov_Nedvich	BQCV
PP133129	T_Krasnod_Timash	BQCV
PP133130	Be3/143_Belgorod_Bilyach	BQCV
PP133131	B2_Voronezh_Teplichn	BQCV
PP133132	She25_Ryazan	BQCV
PP108047	A3_Arch_Nagorsk	ABPV
PP108048	A1_Vologod_Morozovo	ABPV
PP108049	B2_Voronezh_Teplichn	ABPV
PP108050	A4_Arch_Kostinskaya	ABPV
PP108051	PE2_Penz_Chernoyarsk	ABPV
PP108052	Be3/157_Belgorod_Bilyach	ABPV
PP108053	T11_Krasnod_Timash	ABPV
PP108054	P3_Rostov_Millerovo	ABPV
PP108055	T1_Krasnod_Timash	ABPV
PP108056	She19_Ryazan_Shavyrl	ABPV
PP108057	Pe2_Penz_Chernoyarsk	ABPV
PP108058	1-7_Krasnoyarsk_Ostyatsk	ABPV
PP329843	A3_Arch_Nagorsk	DWV
PP329844	A1_Vologod_Morozovo	DWV
PP329845	B2_Voronezh_Teplichn	DWV
PP329846	A4_Arch_Kostinskaya	DWV
PP329847	PE2_Penz_Chernoyarsk	DWV
PP329848	Be3/157_Belgorod_Bilyach	DWV
PP329849	T11_Krasnod_Timash	DWV
PP329850	She_Ryazan	DWV
PP329851	B1_Voronezh_Otradm	DWV
PP329852	12_Ryazan_Karl1	DWV
PP329853	1-2_Krasnoyarsk_Ostyatsk	DWV
PP329854	P2_Rostov_Nedvich	DWV
PP329855	P3_Rostov_Millerovo	DWV
PP329856	A2_Arch_Velsk	SBV
PP329857	She17_Ryazan	SBV
PP329858	A1_Vologod_Morozovo_23	SBV
PP329859	Be1_Belgorod_Ion	SBV
PP329860	B1_Voronezh_Otradm	SBV
PP329861	1/6_Rostov_Chalt	SBV
PP329862	T-14_Krasnod_Timash	SBV
PP329863	PE1_Penz_Chernoyarsk	SBV
PP329864	K2_Krasnoyarsk_Ostyatsk	SBV
PP329865	KBV-1	KBV
PP329866	KBV-2	KBV
PP329867	KBV-3	KBV

Разработка новых высокоспецифичных ПЦР тест-систем в режиме реального времени

На основании полученных нами данных сравнения нуклеотидных последовательностей и филогенетического анализа были разработаны 2 новые высокоспецифичные ПЦР тест-системы для определения вирусов пчёл, циркулирующих на территории Российской Федерации. Данная разработка позволяет получать более быстрые и надежные результаты как для диагностических ветеринарных лабораторий, так и для ученых в научно-исследовательских институтах, куда могут обращаться пчеловоды для диагностики вирусов пчел.

Обе тест-системы предназначены для одновременной идентификации в одной пробе двух наиболее распространенных патогенных вирусов пчел в режиме реального времени:

- 1) ABPV и SBV;
- 2) DWV и BQCV.

Последовательности подобранных праймеров и зондов представлены в таблице 4.

Таблица 4. Праймеры и зонды, подобранные для тестирования в одной пробе. Синтезированы компанией «ДНК-синтез».

Вирусы	Праймеры	Зонды
ABPV	F = CCCAAGATTGGAATAAGACAGTTAGA R = GCAAACATTCAAAGATCCATCAA	P = FAM- CCCAAGGTTATTGCAGGAGAT TTCTCA-BHQ1
SBV	F = CCCAAGATTGGAATAAGACAGTTAGA R = GCAAACATTCAAAGATCCATCAA	P = VIC- CCACTAGGGAGAATTGTGCGAG CTGC-BHQ2
DWV	F = GGCGRACKTTACARACTGACYAC R = GCTRYWCGACGACCCAAAYCCT	P = VIC- CATCCAACWAGACCYGTGTTT CTRGY-BHQ2
BQCV	F = CCCAATAGTAGCAGTRTTATCWGAACT R = CTTCAAAGTCTCCWGCCACCA	P = FAM- CYACRGAYTGGGATGTRATYG CGAG-BHQ1

1. Набор BQCV(FAM) + DWV(VIC). На рисунках 5 и 6 показаны кривые накопления продукта в разных образцах при проведении ПЦР в режиме реального времени. Гибридизация специфичных проб произошла с пробами, содержащими вирусы BQCV(FAM) и DWV(VIC). Желтые кривые соответствуют каналу VIC, синие – каналу FAM.

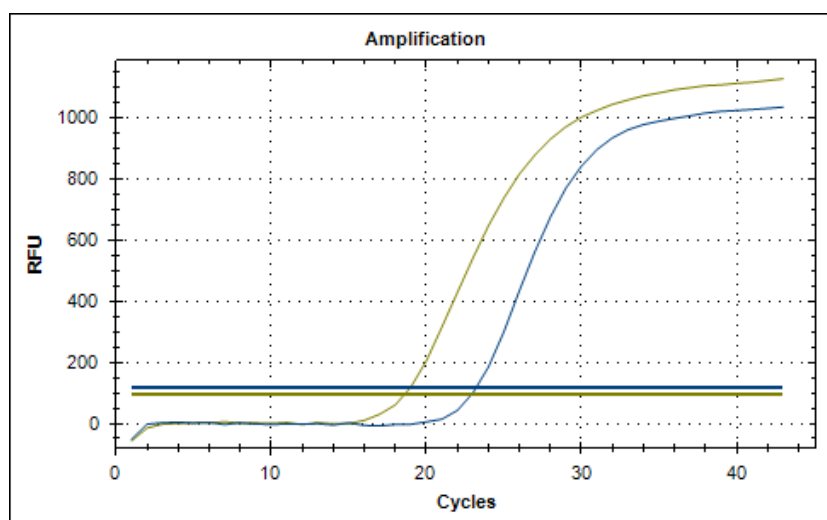


Рисунок 5. Результаты амплификации для образца А (Архангельская область). Кривые свидетельствуют о наличии фрагментов обоих вирусов.

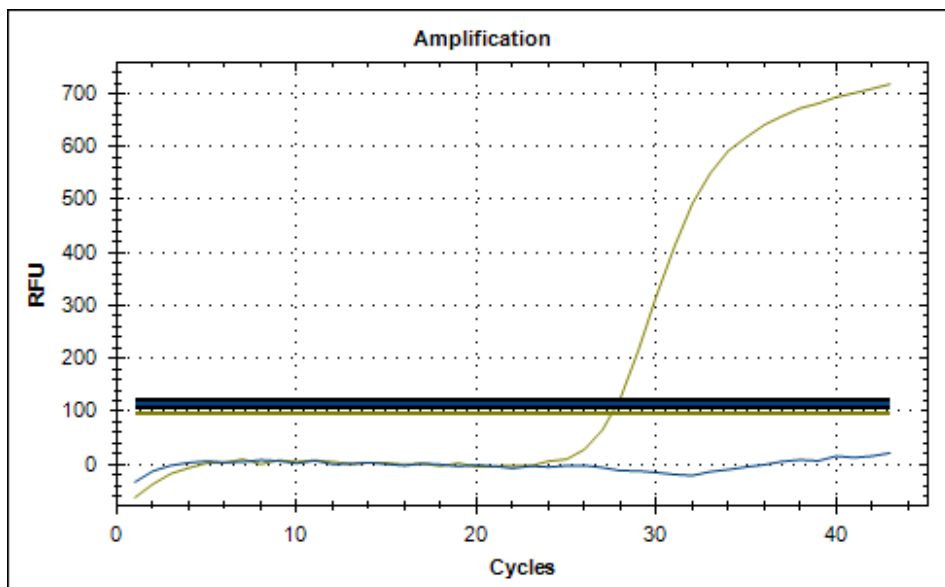


Рисунок 6. Результаты амплификации для образца В (Воронежская область). В пробе определяется только кривая канала VIC, что соответствует наличию в пробе вируса DWV и отсутствию вируса черных маточников.

2. Набор ABPV(FAM) + SBV(VIC). Результаты амплификации на тестовых образцах показаны в виде кривых накопления по каналам VIC(SBV) и FAM(ABPV) на рисунках 7 и 8.

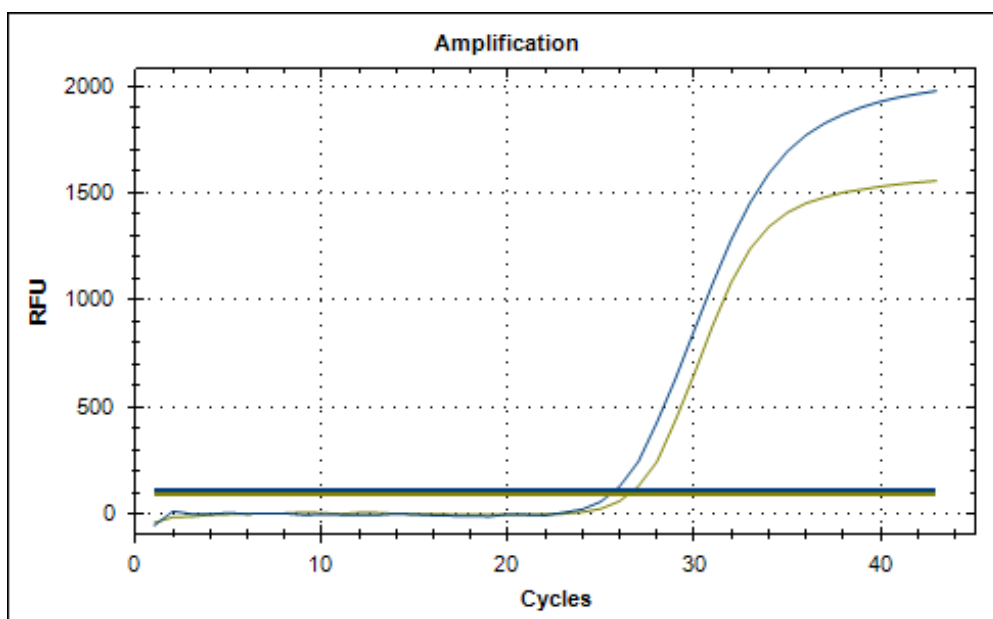


Рисунок 7. Кривые накопления продукта для образца И1 (Московская обл.). В пробе обнаружены фрагменты обоих вирусов – ABPV и SBV.

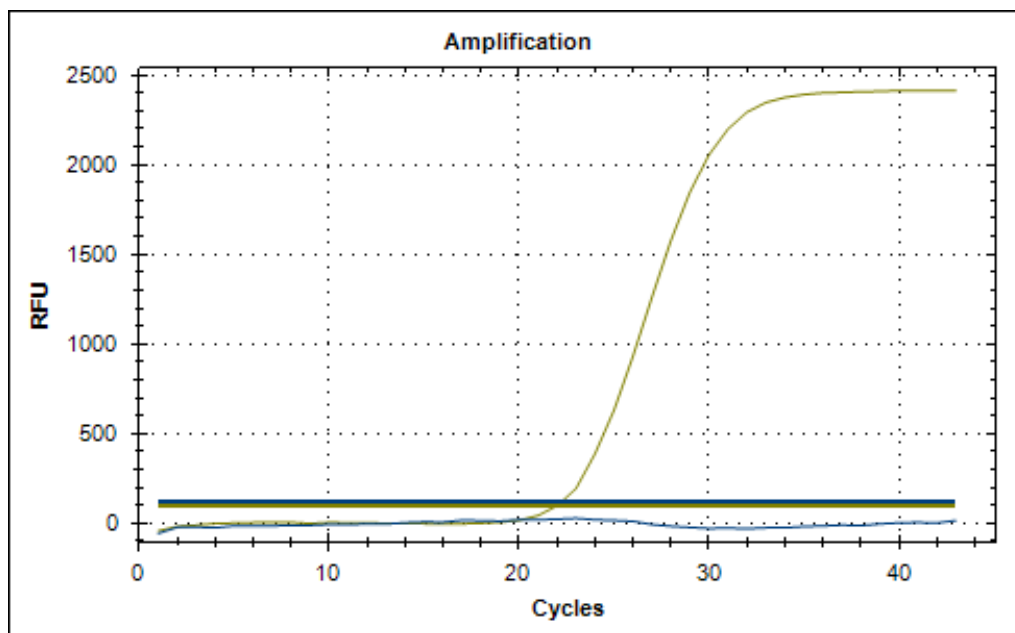


Рисунок 8. Кривая накопления для образца К2 (Красноярский край). Сигнал присутствует только по каналу VIC, соответственно, в пробе определяется лишь вирус мешотчатого расплода.

Таким образом, экспериментально показана эффективность наших тест-систем в качестве инструмента детекции четырех самых распространенных на территории Российской Федерации патогенных вирусов пчел. Разработанные нами тест-системы имеют преимущество перед существующими системами, представленными в зарубежных публикациях, так как являются высокоспецифичными и подобранными на основании нуклеотидных последовательностей вирусов, распространенных на территории именно Российской Федерации.

ВЫВОДЫ

- 1) Исследовано распространение семи патогенных вирусов пчел ABPV, BQCV, SBV, DWV, IAPV, KBV и CBPV на территории областей Европейской части Российской Федерации и в Красноярском крае. На основе этих данных составлены карты распространенности каждого из вирусов на территории Российской Федерации. Определены четыре самых распространенных вида вирусов для каждой области: ABPV, DWV, SBV, BQCV. Самым распространенным вирусом на территории всех областей установлен ABPV, частота его встречаемости Европейской части России достигала 100%. Вирус CBPV не был обнаружен в исследованных областях.
- 2) Проведено секвенирование гена *RdRp* вирусов ABPV, BQCV, SBV, DWV, IAPV и KBV. Полученные последовательности сопоставлены с существующими в базах данных последовательностями из других регионов мира. Выявлены консервативные участки последовательности гена *RdRp* вирусов ABPV, BQCV, SBV, DWV, IAPV и KBV.
- 3) Анализ полиморфизма последовательностей участка гена *RdRp* показал идентичность последовательностей вируса ABPV в российском регионе, присутствие двух типов изолятов BQCV даже в пределах одной области, наличие 2 типов изолятов DWV (тип В, рекомбинантные штаммы), отличающихся друг от друга по 57 позициям. Выявлены SNP в изолятах SBV, которые были распространены только среди российских изолятов. Изоляты IAPV и KBV показали незначительную степень полиморфизма.
- 4) Филогенетический анализ полученных последовательностей вирусов пчел показал для изолятов ABPV, SBV европейское происхождение данных вирусов и вероятное распространение из Азии для штаммов BQCV, KBV, IAPV. Для штаммов DWV из-за высоких темпов миграции между Европой и Азией установить вектор распространения затруднительно.
- 5) Разработаны тест-системы для определения пар вирусов в одной пробирке с использованием методики ПЦР в режиме реального времени.

Список публикаций по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК

1. Новые тест-системы для идентификации вирусов пчел в режиме реального времени. Шевцова А.А., Большаков В.А., Кокаева З.Г., Берёзов А.А., Королёв А.В. Пчеловодство, № 1, с. 35-37. 2024.
2. Распространенность и полиморфизм патогенных вирусов пчел в России. Шевцова А.А., Большаков В.А., Кокаева З.Г., Королёв А.В. Пчеловодство, № 9, с. 26-30. 2022.
3. Вирусная концепция гибели пчелиных семей на пасеках европейской части России. Шевцова А.А., Королёв А.В., Масленникова В.И., Кокаева З.Г., Берёзов А.Ю., Климов Е.А. Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический, издательство Изд-во Моск. ун-та (М.), том 126, № 2, с. 3-19. 2021.
4. Патогенные вирусы и клещ варроа на пасеках России. Масленникова В.И., Королёв А.В., Климов Е.А., Кокаева З.Г., Лунькова А.А. Ветеринария, зоотехния и биотехнология, издательство Общество с ограниченной ответственностью "Издательский дом "Научная библиотека" (Москва), № 9, с. 56-63. 2020.
5. Вирусная и клещевая нагрузки на пчелиные семьи в Ростовской области. Масленникова В.И., Климов Е.А., Королёв А.В., Кокаева З.Г., Шевцова А.А. Пчеловодство, № 5, с. 26-28. 2019.
6. Оценка вирусной и клещевой нагрузки на пчелиные семьи в Белгородской области при массовой гибели пчел. Масленникова В.И., Климов Е.А., Королёв А.В., Кокаева З.Г., Шевцова А.А. Ветеринария, зоотехния и биотехнология, издательство Общество с ограниченной ответственностью "Издательский дом "Научная библиотека" (Москва), № 6, с. 89-95. 2018.
7. Оценка влияния вирусной и клещевой нагрузки на гибель пчел. Масленникова В.И., Климов Е.А., Королёв А.В., Кокаева З.Г., Гареев Р.Р., Лунькова А.А. Пчеловодство, № 5, с. 28-30. 2017.

Публикации в сборниках:

1. Защитные механизмы медоносных пчел *Apis mellifera* L., способствующие снижению вирусных инфекций. Королёв А.В., Масленникова В.И., Шевцова А.А. Сборник «Пчеловодство и апитерапия: современное состояние и перспективы развития», Башкирский ГАУ Уфа, с. 84-90. 2022
2. Анализ распространённости РНК-содержащих вирусов у пчёл европейской части России методом ОТ-ПЦР. Кокаева З.Г., Лунькова А.А., Гареев Р.Р., Ярыгина Е.И., Королёв А.В., Масленникова В.И., Климов Е.А. Сборник материалов Научно-практической конференции с международным участием «Генетика - фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции», Издательство Южного федерального университета Ростов-на-Дону, с. 52-53. 2017

Тезисы докладов:

1. Распространенность и полиморфизм патогенных вирусов пчел в различных регионах Российской Федерации. Шевцова А.А., Большаков В.А., Берёзов А.Ю., Королёв А.В. Сборник V Международной научной конференции "Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы", место издания Институт генетики и цитологии НАН Беларуси Минск, тезисы, с. 176-176. 2022
2. Применение молекулярно-генетических методов для оценки распространенности патогенных вирусов медоносной пчелы на территории Российской Федерации. Шевцова А.А., Кокаева З.Г., Королёв А.В., Масленникова В.И., Климов Е.А. Сборник «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы: материалы IV Международной научной конференции к 55-летию основания Института генетики и цитологии НАН Беларуси», место издания Институт генетики и цитологии НАН Беларуси Минск, тезисы, с. 106-106. 2020
3. Разработка молекулярно-генетической тест-системы для оценки вирусносительства у пчел. Шевцова А.А., Кокаева З.Г., Королёв А.В., Масленникова В.И., Климов Е.А. Сборник

тезисов 18-ой Всероссийской конференции молодых учёных «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», место издания ФГБНУ ВНИИСБ Москва, тезисы, с. 239-239. 2018

4. Молекулярно-генетический анализ распространённости вирусов пчёл на западной территории Российской Федерации. Гареев Р.Р., Лунькова А.А., Кокаева З.Г., Ярыгина Е.И., Королев А.В., Масленникова В.И., Климов Е.А. Сборник тезисов докладов Международного симпозиума по геномике, приуроченного к году науки в Республике Беларусь, место издания Институт генетики и цитологии НАН Беларуси Минск, тезисы, с. 51-52. 2017

Книги:

1. Пчела медоносная (*Apis mellifera*) в генетическом поле. Монахова М.А., Кокшарова О.А., Кокаева З.Г., Карцев В.М., Шевцова А.А. Товарищество науч. изд. КМК (М.), ISBN 978-5-907533-14-1, 291 с. 2022