

УДК 595.422:595.799:571.6

Клещ *Varroa underwoodi* — Потенциальный паразит Европейских пчел

Паразитические клещи рода *Varroa* Oudemans, 1904 относятся к семейству Varroidae отряда Mesostigmata надотряда Parasitiformes инфраотряда Gamasina. Клещи этого рода — эктопаразиты пчел рода *Apis*, представлены, как минимум, четырьмя видами (Anderson, Trueman, 2000; Rosenkranz et al., 2010):
 ◆ *V. jacobsoni* Oudemans 1904, первоначально описанный в популяции пчел *A. cerana* на острове Ява в Индонезии (Oudemans, 1904), впоследствии был обнаружен в популяции *A. nigrocincta* в других местах Индонезии (Hadisoesilo, Otis, 1998; Anderson, Trueman, 2000) и *A. mellifera* в Папуа-Новой Гвинее (Roberts et al., 2015);
 ◆ *V. destructor* Anderson and Trueman 2000, ошибочно идентифицированный как *V. jacobsoni*, сначала был описан в популяции *A. cerana* в Китае, Японии, Корее и Таиланде, впоследствии его обнаружили в популяции *A. mellifera* в Японии (Anderson, 2000; Anderson, Trueman, 2000);
 ◆ *V. rindereri* de Guzman and Delfinado-Baker 1996, впервые был описан в популяции *A. koschevnikovi* на острове Борнео в Малайзии (de Guzman, Delfinado-Baker, 1996), на других видах пчел пока не обнаружен;
 ◆ *V. underwoodi* Delfinado-Baker and Aggarwal 1987, первоначально описанный в популяции пчел *A. cerana* в Непале, впоследствии был обнаружен в популяции *A. nigrocincta* в Индонезии (Delfinado-Baker, Aggarwal, 1987; Anderson et al., 1997; Кузнецов, 2005).

Медоносная пчела *A. mellifera* во всем мире преимущественно поражается клещом *V. destructor* (Traynor et al., 2020) и реже — *V. jacobsoni* в Папуа-Новой Гвинее (Roberts et al., 2015). Описано несколько митохондриальных гаплотипов *V. destructor*, из которых только два —

K (корейский) и *J* (японский) способны размножаться и паразитировать в семьях *A. mellifera* (Anderson, 2000; Anderson, Trueman, 2000; Mucoz et al., 2008). На сегодняшний день наиболее плохо изучены два вида клещей — *V. rindereri* и *V. underwoodi* (Oudemans, 1904; Delfinado-Baker, Aggarwal, 1987; de Guzman, Delfinado-Baker, 1996; Anderson et al., 1997; Rath, 1999; Anderson, Trueman, 2000; Wang et al., 2019a).

Медоносную пчелу *A. cerana* в основном поражают клещи *V. destructor* и *V. underwoodi*, из них последний более малочисленный (Lin et al., 2021), [10, 11]. Ареал данного вида постоянно расширяется и охватывает популяции *A. cerana* в Непале (Delfinado-Baker and Aggarwal, 1987), Южной Кореи (Chantawannakul et al., 2016), [12], Индонезии (Chantawannakul et al., 2016), [5], Папуа-Новой Гвинее (Lee, 1995; Chantawannakul et al., 2016), [5], Вьетнаме, Японии (de Guzman, Rinderer, 1999; Chantawannakul et al., 2016) и Китае (de Guzman, Rinderer, 1999; Huang, 2004; Chantawannakul et al., 2016), [10]. Согласно зарубежным публикациям (Chantawannakul et al., 2016), [10], Россия еще не входит в список всемирно признанных ареалов распространения *V. underwoodi*, хотя ранее они были описаны российскими исследователями морфометрически и на основе полиморфизма гена COX1 мтДНК в природной популяции *A. cerana* в Приморском крае [3, 4, 9].

Наряду с расширением ареала *V. underwoodi* и контактом с новыми видами пчел рода *Apis* растет число его видов-хозяев: *A. cerana* в Непале (Delfinado-Baker, Aggarwal 1987), *A. nuluensis* в Малайзии (Delfinado-Baker, Aggarwal, 1987; de Guzman et al., 1996), [5],

A. nigrocincta в Индонезии (Hadisoesilo, 1997), [5], *A. mellifera* в Папуа-Новой Гвинее (Lee, 1995; de Guzman, Rinderer, 1999), [5]. Хотя доказательства размножения *V. underwoodi* были обнаружены только в семьях *A. cerana*, появляются сообщения о его обнаружении в семьях других видов пчел, что позволяет предположить о наличии повышенного потенциала к межвидовой смене хозяев. Клещ *V. underwoodi* может быть особенно опасен для семей *A. mellifera*, которых содержат рядом с *A. cerana* в большинстве азиатских стран (Zheng et al., 2011, 2018; Chantawannakul et al., 2016; Roberts et al., 2020), [10, 11].

Поскольку разные гаплотипы видов клещей *Varroa* неодинаково паразитируют на разных видах пчел рода *Apis* (Anderson, 2000; Anderson, Trueman, 2000; Mucoz et al., 2008), как например, только два гаплотипа *K* и *J* клеща *V. destructor* из шести способны паразитировать на *A. mellifera*, то существует высокая вероятность, что некоторые гаплотипы *V. underwoodi* смогут паразитировать на *A. mellifera* и затем распространиться по всему миру, как *V. destructor*. Показано, что *V. underwoodi* характеризуется высоким уровнем генетического разнообразия (Navajas et al., 2010; Roberts et al., 2015), [10], разные гаплотипы которых обладают разным потенциалом к паразитированию на разных видах пчел. Высокий уровень генетического разнообразия *V. underwoodi* дает возможность быстро сформировать и распространить его гаплотипы, способные паразитировать на *A. mellifera*. Это также подтверждается законом гомологических рядов, где способность *V. destructor* и *V. jacobsoni* к паразитированию на *A. mellifera* может также проявиться и у *V. underwoodi* [1]. Следовательно, *A. mellifera* является потенциальным хозяином для *V. underwoodi* в ходе его дальнейшей эволюции (Anderson, 2000; Anderson, Trueman, 2000; Mucoz et al., 2008), [9–11].

Переход *V. underwoodi* на нового хозяина — *A. mellifera* может сопровождаться такими негативными явлениями, как передача новых вирусов и бактерий от других видов пчел, что может спровоцировать новые болезни, привести к нарушению микробиома, снижению выживаемости и иммунитета (Sandionigi et al., 2015; Hubert et al., 2017; Raymann et al., 2017; Diaz et al., 2019; Marche et al., 2019;

Bleau et al., 2020), [6, 10, 11]. Исследование особенностей *V. underwoodi* позволит предотвратить его переход на *A. mellifera*, а также заранее разработать методы борьбы с новым паразитом (Thompson, 1994; de Guzman, Rinderer, 1999; Kolar, Lodge, 2001; Woolhouse et al., 2005). Например, одним из методов борьбы является селекция *A. mellifera* по гигиеническому поведению против *V. destructor*, которая, вероятно, будет также работать против *V. underwoodi* (Mondragyn et al., 2005; Allsopp 2006; Locke and Fries 2011; Çakmak, Fuchs, 2013; Locke, 2016; Conlon et al., 2018; McMullan, 2018; van Alphen, Fernhout 2020). В настоящей работе мы выполнили характеристику клещей *V. underwoodi* в популяции *A. c. ussuriensis* в Приморском крае России на основе анализа морфометрии и полиморфизма гена COX1 мтДНК.

Взрослых особей *V. underwoodi* отобрали летом 2004 г. из выводковых ячеек из двух семей (№ 2 и 5) *A. c. ussuriensis* на пасеке в селе Ромашка Хасанского района Приморского края (43.5N, 131.3E). Собранные образцы клеща поместили в 70%-ный этанол и хранили при -20°C .

Следует отметить, что клещ *V. underwoodi* был обнаружен исключительно в семьях *A. cerana*, зараженность семей составляла 50%. В июне уровень заражения расплода трутней достигал 2,8%, в июле — 35, в августе — 58%. Степень заражения расплода рабочих пчел составляла 1%. Способность *V. underwoodi* размножаться в семьях *A. cerana* была подтверждена тем, что 5–6 взрослых самок и 2–3 нимфы были обнаружены совместно в ячейках трутневого расплода.

Для предварительного подтверждения видовой принадлежности морфометрические характеристики и размер взрослых самок *V. underwoodi* ($n = 10$) сравнивали с ранее опубликованными данными (Delfinado-Baker, Aggarwal, 1987), [5, 7, 10, 12]. Перед оценкой морфометрии отобранные образцы клещей высушили от этанола при комнатной температуре в течение 1 мин. Известно, что размер спинного щита с боковыми щетинками используется для характеристики *V. underwoodi*. Морфометрию каждого образца измеряли с помощью цифрового микроскопа EOS Kiss X7 (Canon, Япония) с объективом MP-E 65mm f / 2.8 1-5x Macro Photo (Canon, Япония) при 150-кратном увеличении в соответствии с инструкциями производителя.

Тотальную ДНК экстрагировали из трех клещей на семью *A. s. ussuriensis* с использованием набора Qiagen DNEasy для тканей животных с помощью колонок для связывания ДНК (Qiagen, Валенсия, Калифорния). Последовательность гена COX1 мтДНК использовали для идентификации вида клещей как *V. underwoodi*, а также для определения гаплотипа мтДНК. ПЦР-амплификацию гена COX1 мтДНК *V. underwoodi* провели согласно [10] с использованием пары праймеров (COX1_821_F: 5'-GGAGTAGGTACAGTTGAACGG-3' и COX1_821_R: 5'-ACAACCCAGCAATAATAGCAA-3') с продуктом 821 п.н.

Все продукты ПЦР очищали с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit (250) (QIAGEN, Hilden, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Нуклеотидные последовательности гена COX1 мтДНК образцов *V. underwoodi* определяли путем двустороннего секвенирования продуктов ПЦР с применением метода Сэнгера (Sanger et al., 1977) с использованием пары праймеров (F-V51: 5'-GTAATTTGTATACAAAGAGGG-3' и R-V1400: 5'-CAATATCAATAGAAGAATTAGC-3') (Warrit et al., al. 2004) на капиллярном секвенаторе ABI 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, США) с помощью набора ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit в соответствии с инструкциями производителя. Нуклеотидная последовательность гена COX1 мтДНК *V. underwoodi* размером 458 п.н. была загружена в базу данных Генбанка DDBJ / GenBank под регистрационным номером LC532104.

Последовательности гена COX1 мтДНК *V. underwoodi* — MH205173 (Hangzhou, Китай), MH205174 (Jinhua, Китай), MH205175 (Nanchang, Китай), MH205176 (Jilin, Китай), MH205177 (Maoming, Китай), *V. destructor* — KJ403739, KJ507740, KJ403742, KJ403744 (Riyadh, Саудовская Аравия) и *V. jacobsoni* — MF462134 (Moresby, Папуа-Новая Гвинея), AF010479 (Canberra, Австралия) из Генбанка использовали для сравнительного анализа с *V. underwoodi* из Приморского края. Образцы клещей *V. destructor* и *V. jacobsoni* применяли для сравнительного анализа в качестве внешних групп.

Уровень генетической дивергенции и р-дистанции между видами *V. underwoodi*, *V. destructor* и *V. jacobsoni* оценивали на основе последовательностей гена COX1 мтДНК с применением метода выравнивания



Рис. 1. Дорсальная (А) и вентральная (Б) поверхность взрослой самки клеща *V. underwoodi* из Приморского края (фото Д.И. Такахаши [9])

CLUSTALW в MEGA 10.0.5 (Kumar et al., 2018). Дендрограмма филогенетических отношений методом ближайших соседей, основанная на р-дистанции последовательностей гена COX1 мтДНК была построена с 2000 бутстрэп репликациями в CLC Genomics Workbench 21 (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Канада). Статистический анализ и анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) выполняли с использованием ARLEQUIN 3.5.2 (Excoffier, Lischer, 2010), STATISTICA 8.0 (StatSoft, OK, США) и EXCEL 2010 (Microsoft, CA, США).

Таксономическую принадлежность образцов *V. underwoodi* определяли с использованием оценки морфометрии и полиморфизма гена COX1 мтДНК. Цвет эллипсоидального тела самок *V. underwoodi* был каштаново-коричневым (рис. 1). Поверхность дорсального щита слегка бороздчатая, сетчатая, с плотно прикрытыми щетинками примерно такой же длины и небольшими колючками. Щетинки на каждом боковом крае постепенно увеличивались в длине кзади, причем последние три пары снова уменьшались в размерах.

Длина тела взрослой самки *V. underwoodi* составляла $[(767,50 \pm 20,5)]$ — среднее значение \pm стандартное отклонение], ширина — $(1300,50 \pm 20,5)$ мкм ($n = 10$). Для сравнения длина и ширина тела взрослых самок *V. underwoodi* была следующей, мкм: в семьях *A. cerana* — 700–752 x 1089–1157 ($n = 15$), также в семьях этих пчел из Непала — 741–780 x 1151 – 1168 ($n=2$) (Delfinado-Baker and Aggarwal, 1987) и из Южной Кореи — 703– 784 x 1135 – 1324 ($n=2$) [12]; в семьях *A. mellifera* — 700–735 x 1090–1120 ($n = 6$); в семьях *A. cerana* из Irian Jaya — 690–730 x 1050–1130 ($n = 5$) и из Sulawesi и Java — 720–780 x 1050–1080 ($n = 2$); в семьях *A. nigrocincta* из Sulawesi – 740–760 x 1120–1220 ($n = 5$) [5]. Таким образом, исходя из соответствия текущих морфологических параметров с ранее опубликованными данными

ми по морфологии было предположено, что образцы этих клещей принадлежат к виду *V. underwoodi*.

Был проведен сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена *COX1* мтДНК *V. underwoodi*, *V. destructor* и *V. jacobsoni*. Выровненные нуклеотидные последовательности гена *COX1* мтДНК позволяют рассчитать различия нуклеотидов в соответствующих позициях разных образцов клещей (рис. 2).

Нуклеотидные последовательности гена *COX1* мтДНК образцов *V. underwoodi* LC532104 из Приморского края оказались идентичны MH205176 из Jilin (Китай) [10]. Все различия между *V. underwoodi*, *V. destructor* и *V. jacobsoni* были рассчитаны на основе полиморфизма последовательностей гена *COX1* мтДНК. В таблице представлены усредненные попарные оценки числа нуклеотидных и аминокислотных замен, *p*-дистанции и процент генетической дивергенции на основе последовательностей гена *COX1* мтДНК видов клеща рода *Varroa* из разных стран.

Последовательности гена *COX1* мтДНК *V. underwoodi*, *V. destructor* и *V. jacobsoni* различаются на статистически значимом уровне ($p \leq 0,05$). Таким образом, нуклеотидная последовательность гена *COX1* мтДНК по-

зволяет с вероятностью 95% различать виды клеща рода *Varroa*. Из трех видов наиболее близки друг к другу *V. destructor* и *V. jacobsoni* со значением генетической дивергенции 7%. Вид *V. underwoodi* равноудален от *V. destructor* и *V. jacobsoni* и отличается со значением генетической дивергенции 10%. Попарные генетические дистанции, генетическую дивергенцию, число замен нуклеотидов и аминокислот между каждым образцом *V. underwoodi* ($n = 6$), *V. destructor* ($n = 4$) и *V. jacobsoni* ($n=2$) рассчитывали на основе сравнения последовательностей гена *COX1* мтДНК (см. табл.).

Между образцами гена *COX1* мтДНК *V. underwoodi* генетическая дивергенция варьировала от 0 до 2%, *p*-дистанция — от 0,000 до 0,022, количество нуклеотидных аминокислотных замен изменялось от 0 до 10 и от 0 до 8 соответственно. Не наблюдалось генетических различий между образцами MH205176 и LC532104, а также MH205175 и MH205174. Наименьшими генетическими различия оказались между образцами MH205176, MH205175, LC532104 и MH205175; MH205176, и MH205174; LC532104 и MH205174. Наибольшие генетические различия были замечены между образцом MH205177 и остальными образ-

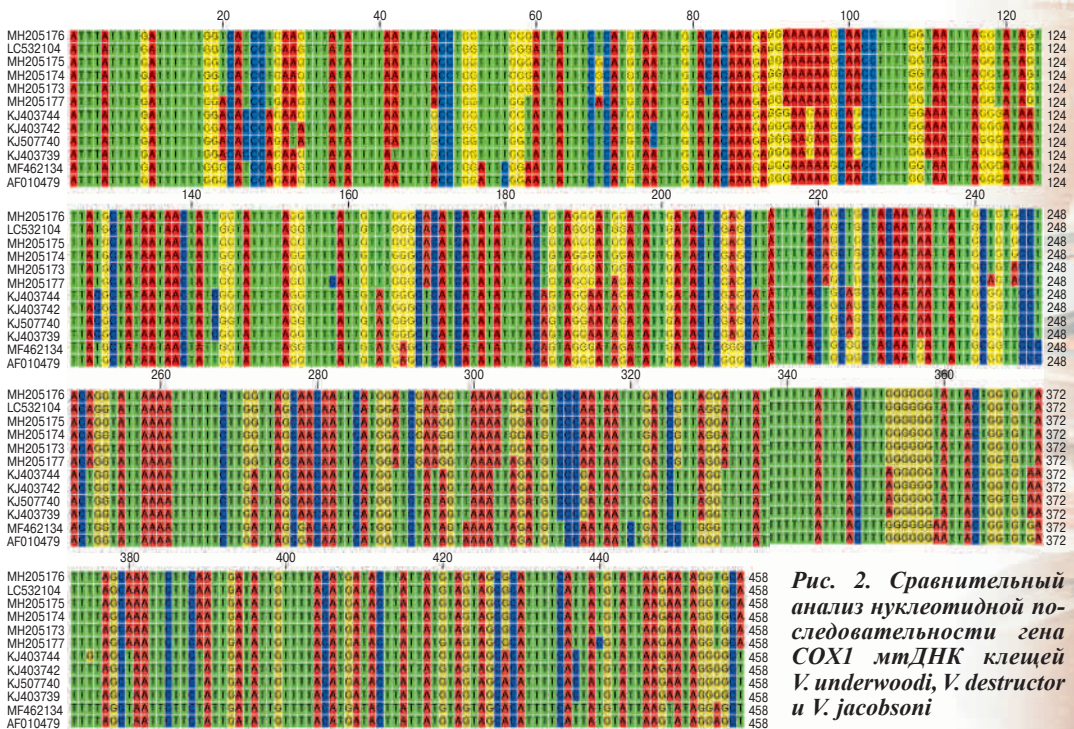


Рис. 2. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена *COX1* мтДНК клещей *V. underwoodi*, *V. destructor* и *V. jacobsoni*

Попарные различия и генетическая дивергенция между образцами *V. underwoodi*, *V. destructor* и *V. jacobsoni*, рассчитанные на основе полиморфизма последовательностей гена *COX1*

Образец, вид клеща	MH205176	LC532104	MH205175	MH205174	MH205173	MH205177	KJ403744	KJ403742	KJ507740	KJ403739	MF462134	AF010479
	Число нуклеотидных замен / Число аминокислотных замен											
MH205176, <i>V. underwoodi</i> , Jilin (Китай)		0 / 0	1 / 1	1 / 1	2 / 2	10 / 8	44 / 36	46 / 36	46 / 36	44 / 35	44 / 34	44 / 34
LC532104, <i>V. underwoodi</i> , Приморский край (Россия)	0,000 / 0		1 / 1	1 / 1	2 / 2	10 / 8	44 / 36	46 / 36	46 / 36	44 / 35	44 / 34	44 / 34
MH205175, <i>V. underwoodi</i> , Nanchang (Китай)	0,002 / 0	0,002 / 0		0 / 0	1 / 1	10 / 8	45 / 37	47 / 37	47 / 37	45 / 36	45 / 35	45 / 35
MH205174, <i>V. underwoodi</i> , Jinhua (Китай)	0,002 / 0	0,002 / 0	0,000 / 0		1 / 1	10 / 8	45 / 37	47 / 37	47 / 37	45 / 6	45 / 35	45 / 35
MH205173, <i>V. underwoodi</i> , Hangzhou (Китай)	0,004 / 0	0,004 / 0	0,002 / 0	0,002 / 0		9 / 7	45 / 37	47 / 37	47 / 37	45 / 36	45 / 35	45 / 35
MH205177, <i>V. underwoodi</i> , Maoming (Китай)	0,022 / 2	0,022 / 2	0,022 / 2	0,022 / 2	0,020 / 2		42 / 36	44 / 36	44 / 36	42 / 35	44 / 36	44 / 36
KJ403744, <i>V. destructor</i> (Саудовская Аравия)	0,096 / 10	0,096 / 10	0,098 / 10	0,098 / 10	0,098 / 10	0,092 / 9		4 / 2	4 / 2	2 / 1	32 / 27	32 / 27
KJ403742, <i>V. destructor</i> (Саудовская Аравия)	0,100 / 10	0,100 / 10	0,103 / 10	0,103 / 10	0,103 / 10	0,096 / 10	0,009 / 1		0 / 0	4 / 1	34 / 27	34 / 27
KJ507740, <i>V. destructor</i> (Саудовская Аравия)	0,100 / 10	0,100 / 10	0,103 / 10	0,103 / 10	0,103 / 10	0,096 / 10	0,009 / 1	0,000 / 0		4 / 1	34 / 27	34 / 27
KJ403739, <i>V. destructor</i> (Саудовская Аравия)	0,096 / 10	0,096 / 10	0,098 / 10	0,098 / 10	0,098 / 10	0,092 / 9	0,004 / 1	0,009 / 1	0,009 / 1		32 / 26	32 / 26
MF462134, <i>V. jacobsoni</i> (Папуа-Новая Гвинея)	0,096 / 10	0,096 / 10	0,098 / 10	0,098 / 10	0,098 / 10	0,096 / 10	0,070 / 7	0,074 / 7	0,074 / 7	0,070 / 7		0 / 0
AF010479, <i>V. jacobsoni</i> (Австралия)	0,096 / 10	0,096 / 10	0,098 / 10	0,098 / 10	0,098 / 10	0,096 / 10	0,070 / 7	0,074 / 7	0,074 / 7	0,070 / 7	0,000 / 0	

p-дистанция / генетическая дивергенция, %

цами. Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *COX1* мтДНК MH205176 и LC532104 показывает отсутствие нуклеотидных замен между ними. Эти последовательности гена *COX1* мтДНК были обозначены как гаплотип *China 1* MH205176 [9].

Между образцами *V. destructor* генетическая дивергенция варьировала от 0 до 1%, p-дистанция — от 0,000 до 0,022, количество нуклеотидных и аминокислотных замен изменялось от 0 до 4 и от 0 до 1 соответственно. Наименьшие генетические различия наблюдались между образцами KJ403744 и KJ403739. Не были обнаружены генетиче-

ские различия между образцами KJ403742 и KJ403740, а также между образцами MF462134 и AF010479.

Окончание следует

**Р.А. ИЛЬЯСОВ^{1,2,3}, Д.И. ТАКАХАШИ⁴, М.Л. ЛИ²,
М.Ю. ПРОЩАЛЫКИН⁵, А.С. ЛЕЛЕЙ⁵, Х.В. КВОН²,
В.Н. ДАНИЛЕНКО¹, А.Г. НИКОЛЕНКО³**

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва;

²Отделение наук о жизни, специализация в области биологических наук и Центр исследований насекомых-переносчиков болезней, Инчхонский национальный университет, г. Инчхон, Корея;

³Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, г. Уфа;

⁴Факультет естественных наук, Университет Киото, г. Киото, Япония;

⁵ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДО РАН, г. Владивосток