

**ИССЛЕДОВАНИЕ РЯДА ШТАММОВ *ASCOSPHERA APIS* (ASCOMYCOTINA),  
ИЗОЛИРОВАННЫХ В СЕМЬЯХ *APIS MELLIFERA*, ОБИТАЮЩИХ В ЮГО-ВОСТОЧНОЙ  
ПРОВИНЦИИ БУЭНОС-АЙРЕС, АРГЕНТИНА**

Н.И. ПЕНЬЯ, С. РУФФИНЕНГО, Г. КЛЕМЕНТЕ, А. ЭСКАНДЕ, Аргентина

### Введение

Аскофероз или известковый расплод является одной из основных санитарных проблем пчеловодных исследований во всем мире. Данное инвазивное микотическое заболевание поражает личинки насекомых *Apoidea*, вызывая их гибель и мумифицирование. В случае *Apis mellifera* установлено, что основным агентом болезни является *Ascospheera apis* Olive & Spiltoir и *A. major*.

В первой фазе личинки приобретают ватный аспект. Затем они высыхают и мумифицируются. Мумия будет белого цвета если мицелий имеет лишь один пол (+ или -) и черного цвета если мицелий представляет грибковые нити двух полов. После копуляции последние производят аскоцисты, придающие этот черный цвет.

В Южной Америке болезнь обнаружена в Аргентине, Чили, Уругвае и Венесуэле. В 80-е годы в Аргентине эту болезнь считали второстепенной и спорадической. В начале 90-х годов произошло эпидемиологическое изменение, причем в 1995 году аскофероз достиг высокие уровни инфицирования в большинстве аргентинских провинций с развитым пчеловодством (ДЕЛЬ ОЙО, 1995).

Первая работа об аскоферозе опубликована в Аргентине РОССИ и КАРРАНЦА (1980). Ими установлено наличие болезни в ряде пасек юго-восточной провинции Буэнос-Айрес в конце 1978 года. Авторами установлено, что грибок *A. apis* вызывает эту болезнь, однако ими не проведены морфометрические анализы или скрещивание со штаммами с известной таксономической позицией. Первое characterization грибка *A. apis* на основе морфологического и морфометрического исследования, а также его скрещивания со штаммами с известной таксономической позицией осуществлено РУФФИНЕНГО с сотр. (2000). С этой целью ими использованы штаммы, полученные от белых мумий, взятых из больных ульев восточной зоны провинции Буэнос-Айрес.

Данная работа задалась целью: 1) характеризовать штаммы *Ascospheera* sp. из ульев *A. mellifera* с пасек юго-востока провинции Буэнос-Айрес в зависимости от морфологии, морфометрии и совместимости их скрещивания со штаммами с известной таксономической позицией и 2) определить межспецифичную вариабельность штаммов и двух ориентировочных штаммов.

### Материал и методика

Были взяты черные мумии *A. mellifera* из больных ульев с пасек юго-востока провинции Буэнос-Айрес (Аргентина), а именно дистриктов Балкарсе, Мирамар и Мехонге (таблица I). Мумии содержали в чашках Петри и омораживали до момента их использования.

Таблица I

**Зоны происхождения, число мумий и дата их взятия**

Зона происхождения	Число черных мумий	Дата взятия проб
Балкарсе	16	март 99 г.
Мирамар	27	февраль 99 г.
Мехонге	14	апрель 99 г.

Для изолирования совместимых таллов черные мумии каждой зоны происхождения дезинфицировали погружением в гипохлорит натрия 2% в течение 1 мин и затем обработали стерильным физиологическим раствором по технике, описанной Биссе (1988). Штаммы получены инокулируя агар МУ2 (РУФФИНЕНГО с сотр., 2000) с остатками, полученными после соскребывания мумий. Культуры инокулированы при 30 °С в течение 48 часов в условиях темноты и анаэробноза и при 30 °С (в темноте и анаэробнозе) в следующие 15 дней. Из развитых колоний были взяты части совместимых таллов, которые осеменены отдельно. Культуты каждого талла очищены, причем были культивированы грибковые нити. Совместимость штаммов определена их сопоставлением в кратных культурах (рис. 1 А).

Споровые и неспоровые штаммы сохранены при 30 °С. Неспоровые культуры были пересажены через каждые 10 или 15 дней во избежание их старения.

Все штаммы морфологически и морфометрически сравнены с двумя показательными штаммами: *A. apis* номер 1187 (Национальная лаборатория в Рисе, Департамент сельскохо-

зайственных исследований, Дания) и *A. apis* номер 11479 (Департамент микробиологии, Национальный институт гигиенических наук, Токио, Япония).

Морфометрический анализ включил измерение диаметра аскоцистов, спороцистов и аскоспор и длины аскоспор точностью до 1 мкм. Часть культуры с аскоцистами из каждой чашки была погружена в воду и наблюдалась при 100х. Для анализа спороцистов и аскоспор диких штаммов использовали желатин-глицерин (САСС, 1964) при x1000. Число измерений каждой пробы, по указаниям СКУ (1988) и КАРРЕРА с сотр. (1989) составили от 80 до 100 для аскоцистов и спороцистов и 200 для аскоспор.

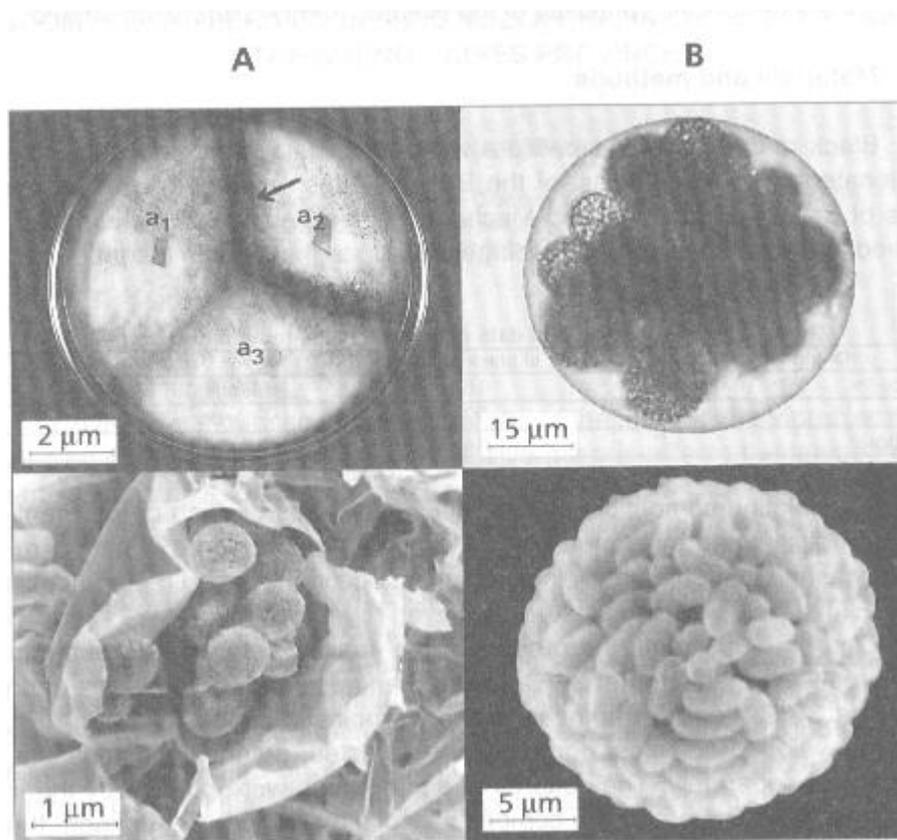


Рис. 1 – *Ascosphaera apis*

А – Кратные культуры для получения репродуктивных сексуальных структур ( $a_1$ ,  $a_2$  и  $a_3$ ); штаммы происходят из Мирамара. Стрелка указывает зону темного цвета аскоцистов. В: Целые аскоцисты со спороцистами. С: Спороцисты внутри одного аскоциста. D: Спороцисты

Штаммы были подвергнуты тестам совместимости скрещиванием в двойных культурах штаммов *A. apis* 1187 и *A. apis* 11479. К анализам морфологии штаммов добавлены данные, полученные при применении электронной микроскопии (М.Е.В. Joel JSM-35 CF с 10 kW, Токио, Япония).

Были получены средние и пределы вариации данных. Подсчитаны средние и вариабельность показательных и новополученных штаммов. Были определены пределы гомогенности вариантностей (F) и средних между двумя категориями штаммов и между ними и новополученными штаммами. Во всех случаях учитывали уровень вероятности ошибки в 5%.

## Результаты

Неспоровые культуры, полученные из верхушек грибковых нитей производили белые, пышные, компактные колонии с диаметром от 5 до 7 см спустя 7 дней. Были получены пять штаммов от зоны Балкарсе, четыре от Мирамара и шесть от Мехонге.

Культуры, полученные из соскребаемых черных мумий имели серо-черный цвет. Они представляли центрифугальный рост и радиальные секторы. Их микроскопический анализ показал присутствие сферических аскоцистов серо-коричневого цвета с вариабельной величиной и просвечивающей стенкой, позволяющей наблюдать за спороцистами внутри (рис. 1 В). Отрыв аскоцистов освободил более или менее сферические спороцисты слабо желтого цвета с высокой вариабельностью размеров (рис. 1 С и D). Аскоспоры, в свою очередь, имели эллипсоидальную форму и стеклянные гладкие стенки.

Измерения структур репродукции новополученных и показательных штаммов представлены в таблице II, а полученные величины параметров сравнены с литературными (таблица III). Как показательные, так и новополученные штаммы представляли ряд значений, превышающих значения, указанные для *A. apis*. 0,5% аскоцистов показательных штаммов были на 2% выше 120 мкм (самое высокое значение, указанное литературой по специальности). Наиболее высокие отклонения по сравнению с литературными данными отмечены для спороцистов. В случае показательных штаммов 1,5% измерений были на 14% меньше 6 мкм, а 4% превышали на 10% 20 мкм. У новополученных штаммов 1,5% были на 15% выше 20 мкм. Что касается длины аскоспор 2,5% измерений показательных штаммов и 1% новополученных превышали на 3% максимальный размер (3,9 мкм) отмеченный в литературе для *A. apis*.

Средняя показателя гибкости новополученных штаммов варьировала от 1,96 до 2,01, составляя 2,06 и 2,08 для штамма 1187 и, соответственно, для штамма 11479 (таблица II).

В случае двойственных культур между новополученными и показательными штаммами *A. apis* 1187 и 11479 установлена сексуальная совместимость, выявляемая образованием характерной лентой аскоцистов темного цвета. Данная лента появилась в результате спаривания грибковой нитью разного пола (+ и -) от 5-ого до 7-ого дня после пересадки.

Таблица II

**Морфометрические характеристики штаммов из юго-восточных зон провинции Буэнос-Айрес и показательных штаммов**

Штамм	Аскоцисты		Спороцисты		Аскоспоры (длина)		Аскоспоры (диаметр)		Показатель гибкости <sup>*</sup>
	Пределы	средние	Пределы	средние	Пределы	средние	Пределы	средние	
<i>A. apis</i> 1187	32-123	69,54	6-22	13,62	2,2-4	2,97	1,2-2	1,45	2,06
<i>A. apis</i> 11479	32-112	67,80	6-22	12,97	2,5-4	3,05	1,2-1,8	1,48	2,08
Balcarce	32-101	69,51	9-21	14,04	2,5-4	3,05	1,2-2	1,55	1,97
Miramar	32-107	70,20	9-23	13,92	2,5-4	3,21	1,2-2	1,63	1,98
Mechongué	32-107	68,69	9-23	14,35	2,3-4	3,07	1,2-2	1,58	1,96

\*Значения для аскоцистов и спороцистов являются средней 80 или 100 измерений; значения аскоспор являются средней 200 измерений. Значения выражены в мкм.

\*\*Отношение между длиной и диаметром аскоспор

Таблица III

**Сравнение размеров структур репродукции полученных нами штаммов *A. apis* с данными, приведенными в литературе по специальности. Значения приведены в мкм**

Штамм	Аскоцисты	Спороцисты	Аскоспоры (длина)	Аскоспоры (диаметр)	Показатель гибкости <sup>*</sup>
<i>Значения, представленные в литературе и значения, полученные нами</i>					
В литературе	32 <sup>a</sup> -120 <sup>b-c</sup>	7 <sup>b-d</sup> -20 <sup>d</sup>	2 <sup>b</sup> -3,9 <sup>d</sup>	1 <sup>b</sup> -2 <sup>b</sup>	1,7 <sup>e</sup> -2,2 <sup>f</sup>
Штаммы <i>A. apis</i> 1187 и 11479	32-123	6-22	2,2-4	1,2-2	2,06-2,08
Полученные нами значения	32-107	8-23	2,3-4	1,2-2	1,96-2,01
<i>Значения, не включающиеся в категорию значений литературы по специальности для <i>A. apis</i>. Они выражены в процентах наиболее низких и наиболее высоких значений</i>					
Штаммы <i>A. apis</i> 1187 и 11479	0-2	14-10	0-3	0	0
Штаммы, изолированные нами	0	0-15	0-3	0	0

\*Отношение между длиной и диаметром аскоспор: <sup>a</sup>Spiltoir & Olive (1955); <sup>b</sup>Skou (1972); <sup>c</sup>Maurizio (1935); <sup>d</sup>Bissett (1988);

<sup>e</sup>Spiltoir (1955); <sup>f</sup>Stephen u comp.

Результаты сравнения средних, полученных тестом t представлены в таблице IV.

Таблица IV

**Уровень вероятности погрешности<sup>1</sup>, полученный тестами t для сравнения средних. Значения величины аскоцистов и спороцистов являются средней от 80 до 100 измерений; значения аскоспор являются средней 200 измерений**

Штамм	Аскоцисты (диаметр)		Спороцисты (диаметр)		Аскоспоры (длина)		Аскоспоры (диаметр)		Гибкость <sup>2</sup>	
	1187	11479	1187	11479	1187	11479	1187	11479	1187	11479
11479	0,54	-	0,19	-	0,01	-	0,12	-	0,38	-
Balcarce	0,99	0,51	0,34	0,014	0,014	0,93	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Mechongué	0,73	0,75	0,12	0,003	0,0008	0,31	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Miramar	0,78	0,36	0,50	0,03	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,002	0,0001

<sup>1</sup>Вероятности менее 0,05 показывают достоверные различия между штаммами 1187 и 11479 или между новополученными и показательными штаммами

<sup>2</sup>Отношение между длиной и диаметром аскоспор

## Дискусии

Морфология споровых и неспоровых штаммов, происхождением из юго-восточной зоны провинции Буэнос-Айрес оказалась подобной морфологии штаммов 1187 и 11479, а также указанной SPILTOIR и OLIVE (1955), SKOU (1972), BISSETT (1988), ALONSO и сотр. (1989), ALONSO (1991) и ALONSO и сотр. (1993) для *A. apis*.

Морфометрия (средние и пределы вариабельности) (таблицы II и III) совпала с описанной MAURIZIO (1935), SPILTOIR (1955), SPILTOIR и OLIVE (1955), SKOU (1972), STEPHEN (1981) и BISSETT (1988) для *A. apis*. Небольшой процент наших штаммов (от 1% до 1,5%) представил для диаметра спорцистов и длины аскоспор значения, не совпадающие с значениями, приведенными литературой по специальности для *A. apis*. Для двух показательных штаммов 0,5 и 4% измерений мынашли значения, не совпадающие с значениями *A. apis*. Что касается диаметра и показателя гибкости аскоспор, соответствие было общим между показательными, новополученными штаммами и данными литературы (таблица III). Средние значения гибкости (1,96-2,01) соответствуют данным, полученным SPILTOIR (1955), SKOU (1972), STEPHEN (1981) и ANDERSON и сотр. (1988) для *A. apis*. Сравнение морфометрии посредством тестами *t* показало достоверные различия между новополученными и показательными штаммами и даже между показательными штаммами (таблица IV). Диаметр полученных нами спорцистов были разными, чем диаметр штамма 11479. Длина аскоспор полученных нами штаммов и штамма 11479 была разной, чем длина штамма 1187. Кроме того, штамм Мирамар имел разные значения, чем штамм 11479. Диаметр и показатель гибкости аскоспор всех полученных нами штаммов имели другие значения чем показательные штаммы. Данные результаты указывают на наличие важной морфометрической вариабельности в рамках вида, соответствующие данным SKOU (1972), SKOU (1988), ALONSO и сотр. (1973) и ANDERSON и сотр. (1998) для штаммов *A. apis* с различным происхождением.

Самый категоричный тест для характеризования вида оказался тот о совместимости при креживании с показательными штаммами 1187 и 11479. Данный тест был фундаментальным из-за морфометрических вариаций, обнаруженных между полученными нами и показательными штаммами и данными литературы по специальности. Лента темноцветных аскоцистов в контактной зоне колоний подсказывает, что они межфертильны и, следовательно, принадлежат одному и тому же виду.

## Выражение благодарности

Авторы благодарят доктора Х.М. Алонсо для высылания двух показательных штаммов; доктора Х.М. Флорес для консультаций в связи с техникой анаэробноза; господина М.О. Герпе для оказанной технической помощи; FONCYT, UNMdP и INTA за финансовую поддержку при проведении данной работы.

## ЛИТЕРАТУРА

- Alonso J.M., La ascosporesis en *Apis mellifera* en España. Caracterización etiológica de brotes de la enfermedad en once Comunidades Autónomas. Tesis Doctoral. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Extremadura, 1991, 42 pp.
- Alonso J.M., J.M. Hermoso de Mendoza Salcedo, A. Cardenal Galván, J. Rey Pérez, J.M. Antón Belvís, G. Naranjo Cerrillo, M. Hermoso de Mendoza Salcedo, La ascosporesis de la abeja melífera (*Apis mellifera* L.) en la provincia de Cáceres. Estudio morfológico de *Ascospaera* sp. *Acta Veterinaria*, 3 (1989): 57-60
- Alonso J.M., F. Puerta Puerta, J. Hermoso de Mendoza Salcedo, J. Rey Pérez, M.C. Gil Anaya, M. Hermoso de Mendoza Salcedo, La ascosporesis de la abeja melífera en España. Estudio micológico de 47 brotes de la enfermedad. *Revista Iberoamericana de Micología*, 10 (1993): 39-46
- Anderson D.L., A.J. Gibbs, N.L. Gibson, Identification and phylogeny of spore-cyst fungi (*Ascospaera* spp.) using ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, 102 (1998), 5: 541-547
- Bissett J., Contribution towards a monograph of the genus *Ascospaera*. *Canadian Journal of Botany* 66 (1988): 2541-2560
- Carrera P., A. Sommaruga, G. Vailati, G. Scari, Ascosporesis: determinazione microscopica della specie fungica responsabile della malattia nel nord Italia. *Apicoltura Moderna*, 80 (1989): 155-162
- Del Hoyo M., Informe técnico del primer taller sobre sanidad apícola. PROAPI, Hilario Ascasubi, 1995, 85 pp.
- Maurizio A., Beiträge zur Kenntnis der Pilzflora im Bienenstock. I. Die *Pericystis*infektion der Bienenlarven. *Berichte Schweiz. Botanischer Gesellschaft*, 44 (1935): 133-156
- Rossi C.O., M.R. Carranza, Momificación de larvas de abeja (*Apis mellifera* L.) provocada por *Ascospaera apis*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 56 (1980), 1-2: 11-15
- Ruffinengo S., N.I. Peña, G. Clemente, M.A. Palacio, A. Escande, Suitability of culture media for the production of ascospores and maintenance of *Ascospaera apis*. *Journal of Apicultural Research*, 1999
- Sass J., Botanical Microtechnique. Ed. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 1964
- Skou J.P., *Ascospaerales*. *Friesia*, 10 (1972), 1: 1-24
- Skou J.P., Japanese species of *Ascospaera*. *Mycotaxon*, 31 (1988): 173-190
- Spiltoir C.F., Life cycle of *Ascospaera apis* (*Pericystis apis*). *American Journal of Botany*, 42 (1955): 501-508
- Spiltoir C.F., L.S. Olive, A reclassification of the genus *Pericystis* Betts. *Mycologia*, 47 (1955): 238-244
- Stephen W.P., J.D. Vandenberg, B.L. Fichter, Etiology and epizootiology of chalkbrood in the leafcutting bee, *Megachile rotundata* (Fabricius), with notes on *Ascospaera species*. Station Bulletin 653. Agric. Exp. Station, Oregon State University. Corvallis, 1981, 10 pp.