

FILOGENETSKA ANALIZA SEVOV VIRUSA DEFORMIRANIH KRIL UGOTOVLJENIH PRI ČEBELAH IN VAROJAH V SLOVENIJI

Urška JAMNIKAR CIGLENEČKI¹, Ivan TOPLAK²

Izvleček

Virus deformiranih kril (DWV) je eden izmed najpogosteje ugotovljenih virusov v čebeljih družinah, njegovo prisotnost pa so dokazali tudi pri varojah. Prenaša se lahko neposredno preko hrane, iztrebkov, zraka in pri prašenju med matico in trotom. Posredno se prenaša preko varoj, ki kot vektorji s sesanjem hemolimfe pri okuženih čebelah uspešno prenašajo virus na neokužene čebele. DWV pri čebelah povzroča klinične znake obolenja, čebele imajo deformirana krila in povečan zadek, lahko pa povzroči tudi paralizo in skrajšano življenjsko dobo delavk in trotov. Od leta 2007 do 2013 smo 47 DWV pozitivnim vzorcem čebeljih družin in 13 DWV pozitivnim vzorcem varoj z metodo RT-PCR pomnožili RNA na dveh odsekih virusnega genoma, na genu za L protein in genu za helikazo. Na genu za L protein smo pomnožili 504 nt dolg odsek, na genu za helikazo pa je bil odsek na genomu dolg 716 nt. V Sloveniji so prisotni genetsko zelo heterogeni virusi DWV, ki so posledica kroženja več različnih sevov DWV, ki se prenašajo znotraj panjev istega čebelnjaka in med različnimi čebelnjaki. Filogenetske analize na obeh odsekih virusnega genoma so pokazale, da se tako pri varojah kot pri čebelah hkrati pojavljajo genetsko enaki sevi, kar dokazuje, da je varoja pomembna za prenos virusa DWV med čebeljimi družinami. Pri primerjalni analizi odseka gena za helikazo se je le en virusni sev, ki smo ga ugotovili pri varoji močno razlikoval od ostalih DWV sevov ugotovljenih pri čebelah in varojah v Sloveniji in je bil genetsko zelo podoben sevu virusa varoje destructor (VDV). Iz tega sklepamo, da v tem primeru najverjetneje ne gre za virus DWV, temveč za ugotovitev virusa VDV.

Ključne besede: virus deformiranih kril, varoa destructor virus, filogenetske analize, kranjska čebela, varoja

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF DEFORMED WING VIRUS IN SLOVENIAN HONEYBEES AND VARROA MITES

Abstract

Deformed wing virus (DWV) is one of the most wide-spread viruses infecting the honeybee and is also detected in varroa. The route of infection is directly through contaminated food, faeces and air or indirectly through the varroa mite, which acts as a vector. 47 positive DWV samples of bee colonies and 13 positive DWV samples of varroa mites were obtained between 2007 and 2013 during a survey throughout Slovenia. DWV RNA was amplified by RT-PCR method in two segments of the viral genome - in the gene for L protein (504 nt) and the gene for helicase (716 nt). The survey revealed the presence of genetically very heterogeneous DWV in Slovenia, as a result of the circulation of multiple strains of DWV, which are transmitted within the same hive or between the apiaries. Phylogenetic analysis of both segments of the viral genome have shown that DWV in varroa and bees are genetically very similar. This confirms the fact that varroa is important for the transmission of the virus between colonies. Interestingly, the comparative analysis of the helicase segment revealed that one viral strain from varroa (SLO 197-varoja) is significantly different from other DWV strains found in bees and varroa in Slovenia and is genetically very similar to the varroa destructor virus (VDV).

Key words: Deformed Wing Virus, Varoa Destructor Virus, Phylogenetic analysis, Honeybee, Varroa

¹ Asist-razisk. dr., Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani, Gerbičeva 60, Ljubljana

² Izr. prof. dr., Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani, Gerbičeva 60, Ljubljana

UVOD

Do danes je bilo pri čebelah ugotovljenih 24 različnih virusov. Eden izmed najpogosteje ugotovljenih virusov v čebeljih družinah je virus deformiranih kril (DWV). DWV spada med RNA viruse in je uvrščen v rod Iflavirus, v družino Iflaviridae. Njegovo prisotnost povezujejo z invadiranostjo čebelje družine z varojo (Ball, 1983). DWV je pogosto ugotovljen čebelji virus tako v Evropi, kot tudi drugod po svetu (Tentcheva in sod., 2004; Chen in sod., 2005a; Teixeira in sod., 2008; Baker in Schroeder, 2008; Nielsen in sod., 2008; Sanpa in Chantawannakul, 2009; Reynaldi in sod., 2010). Virus pri čebelah povzroča klinične znake obolenja, čebele imajo deformirana krila in povečan zadek, lahko pa povzroči tudi paralizo in skrajšano življenjsko dobo delavk in trotov (Ball, 1993; Kovac in Crailsheim, 1988).

Okužba se po navadi izrazi šele pozno poleti, ko se populacija varoj poveča in skupaj z DWV povzroči zmanjšanje števila zdravih, mladih čebel. Na ta način se zmanjša populacija zimskih čebel, kar lahko povzroči propad družine že pozimi ali zgodaj spomladi (Martin, 2001). Zaradi visoke stopnje organizacije dela v čebelji družini in socialnih stikov med čebelami ter velike gostote čebel v panju lahko okužena čebelja družina predstavlja veliko nevarnost za širjenje virusov. Zato je zelo pomemben del preučevanja dinamike okužb in širjenja okužb s čebeljimi virusi poznavanje načinov prenosov virusov. Virusi se med posameznimi čebelami in med čebeljimi družinami prenašajo na dva načina, horizontalno in vertikalno. Pri horizontalnem načinu prenosa virusov poznamo dve vrsti prenosa: neposredni in posredni. Pri neposrednem načinu se virusi prenašajo preko hrane, iztrebkov, zraka in pri prašenju med matico in trotom. Pri posrednem načinu prenosa pa se virusi prenašajo preko vektorja (varoje) (Chen in sod., 2006).

Varoje kot vektor pri prenosu virusov s sesanjem hemolimfe pri okuženih čebelah uspešno prenašajo virus na neokužene čebele. Prisotnost DWV so dokazali tako pri čebelah kakor tudi pri varojah (Bowen-Walker in sod., 1999; Nordström, 2003). Nekateri raziskovalci trdijo, da varoja s sesanjem hemolimfe sproži razmnoževanje DWV, ki je že prisoten v čebeli (Ball, 1983; Bailey in Ball, 1991), medtem ko drugi trdijo, da se DWV pomnožuje v varoji (Bowen-Walker in sod., 1999). Kot dokaz za to navajajo prisotnost negativno polarne RNA virusa, ki so jo z molekularnimi metodami dokazali pri varojah (Ongus in sod., 2004; You in Genersch, 2005). Kljub temu, da je varoja potrjen prenašalec in aktivator virusnih okužb, pa mehanizem prenosa še ni popolnoma pojasnjen.

MATERIAL IN METODE

V letih od 2007 do 2013 smo odbrali 47 DWV pozitivnih vzorcev čebeljih družin in 13 DWV pozitivnih vzorcev varoj. Pozitivne vzorce smo odbrali s celotnega področja Slovenije, odvzeli pa so jih specialisti za zdravstveno varstvo čebel iz Nacionalnega veterinarskega inštituta Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Vzorce smo obdelali in jim izolirali nukleinsko kislino. Za celokupno izolacijo RNA smo uporabili komplet kemikalij QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Nemčija) in postopek izvedli po navodilih proizvajalca. Pozitivnim vzorcem DWV smo z metodo RT-PCR pomnožili RNA na dveh odsekih virusnega genoma (na genu za L protein in genu za helikazo) z dvema različnima paroma začetnih oligonukleotidov. Za pomnoževanje na genu za L protein smo uporabili začetne oligonukleotide DWV-F/DWV-R (Cizej in Gregorčič, 2004), na genu za helikazo pa DWV-S/DWV-A (spremenjeno od Chen in sod., 2005b). Metodo RT-PCR smo izvedli s kompletom kemikalij One-Step RT-PCR kit (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Na genu za L protein smo pomnožili 504 nt dolg odsek, na genu za helikazo pa 716 nt.

Pozitivnim specifičnim produktom smo določili nukleotidno zaporedje v obe smeri tako na genu za L protein (424 bp), kot tudi na genu za helikazo (574 bp) in v obeh regijah tudi naredili primerjalne analize s programom MEGA 6.06 (Tamura in sod., 2013). Na podlagi evlucijskega modela Kimura-2 (Kimura, 1980) smo iz njih določili genetske razlike in z metodo povezovanja sosedov (angl. Neighbor-Joining) izdelali filogenetska drevesa (Saitou in Nei, 1987). Zanesljivost filogenetskih dreves smo ocenili z metodo samovzorčenja.

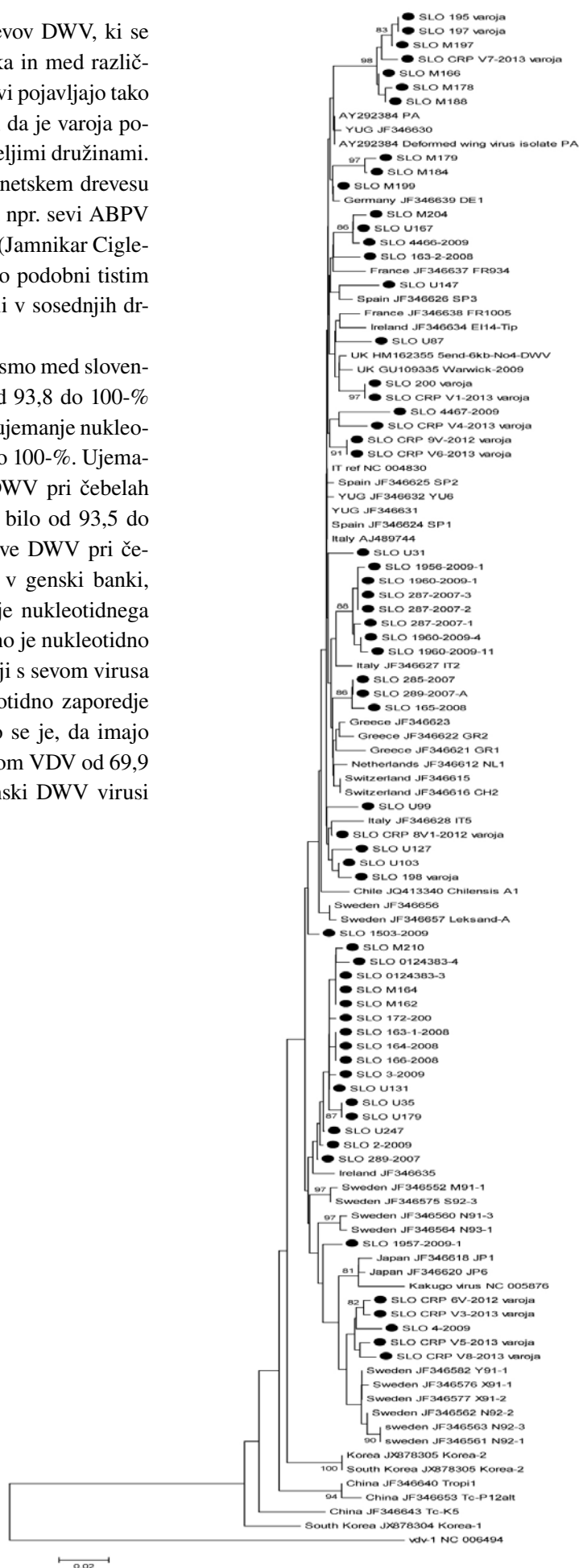
REZULTATI Z RAZPRAVO

V naši raziskavi smo naredili filogenetsko analizo pozitivnih vzorcev virusov DWV iz Slovenije na podlagi nukleotidnih zaporedij, ki smo jih določili v dveh odsekih virusnega genoma DWV, pri čebelah in pri varojah. Na genu za L protein smo naredili analize 47 slovenskih DWV virusov pri čebelah in 14 slovenskih DWV virusov pri varojah, ter jih primerjali z 46 objavljenimi zaporedji DWV iz genske banke in VDV virusom (varoa destructor virus) (Slika 1). Na genu za helikazo pa smo z 18 DWV zaporedji iz genske banke in virusom VDV iz genske banke primerjali 37 slovenskih DWV virusov pri čebelah in 13 slovenskih DWV virusov pri varojah (Slika 2). Na obeh filogenetskih drevesih je mogoče opaziti, da so virusni sevi DWV iz Slovenije, tako pri čebelah, kakor tudi pri varojah, razporejeni po celotnem drevesu. To pomeni, da so v Sloveniji prisotni genetsko zelo heterogeni virusi DWV,

ki so posledica kroženja več različnih sevov DWV, ki se prenašajo znotraj panjev istega čebelnjaka in med različnimi čebeljnaki. Hkrati se genetsko isti sevi pojavljajo tako pri varojah kot pri čebelah, kar dokazuje, da je varoja pomembna za prenos virusa DWV med čebeljimi družinami. Virusni sevi DWV iz Slovenije na filogenetskem drevesu ne tvorijo svoje filogenetske skupine, kot npr. sevi ABPV (virus akutne paralize čebel) iz Slovenije (Jamnikar Ciglenečki in Toplak, 2013) in so nekateri zelo podobni tistim DWV virusnim sevom, ki so jih ugotovili v sosednjih državah.

Pri primerjavi odsekov gena za L-protein smo med slovenskimi sevi DWV pri čebelah ugotovili od 93,8 do 100-% ujemanje nukleotidov, medtem ko je bilo ujemanje nukleotidov DWV virusov pri varojah od 91,7 do 100-%. Ujemanje nukleotidov med slovenskimi sevi DWV pri čebelah in slovenskimi sevi DWV pri varojah je bilo od 93,5 do 99,7-%. Ko smo primerjali slovenske seve DWV pri čebelah z ostalimi DWV sevi pri čebelah v genski banki, smo ugotovili od 92 do 99,7-% ujemanje nukleotidnega zaporedja. Ker nas je zanimalo tudi kakšno je nukleotidno ujemanje slovenskih DWV sevov pri varoji s sevom virusa VDV v genski banki smo tudi to nukleotidno zaporedje vključili v filogenetske analize. Izkazalo se je, da imajo slovenski DWV virusi pri varojah z virusom VDV od 69,9 do 72,3-% nukleotidno ujemanje, slovenski DWV virusi pri čebelah pa od 68,7 do 71,9-%.

Slika 1: Filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij sevov DWV v regiji gena za L protein z metodo povezovanja sosedov (NJ) po modelu Kimura-2. Na razvejitvah so navedene statistične podpore posameznih cepitev pri 1000 samovzorčenjih, ki so višje od 800.



Slika 2: Filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij sevov DWV v regiji gena za helikazo z metodo povezovanja sosedov (NJ) po modelu Kimura-2. Na razvejitvah so navedene statistične podpore posameznih cepitev pri 1000 samovzorčenjih, ki so višje od 800.



Pri primerjalni analizi odsekov gena za helikazo smo ugotovili, da so tudi tukaj slovenski sevi DWV tako pri čebelah, kot tudi pri varojah razporejeni po celotnem filogenetskem drevesu. Kljub temu lahko pri primerjavi s filogenetskim drevesom gena za L protein opazimo večjo genetsko raznolikost, saj je DWV virusni sev SLO 197-varoja, ki smo ga ugotovili pri varoji najbolj podoben virusnemu sevu vdV-1, ki je objavljen v genski banki. Med njima smo ugotovili 99,8-% ujemanje nukleotidnega zaporedja, kar kaže na to, da pri pozitivnem vzorcu SLO 197-varoja ne gre za ugotovitev virusa DWV, temveč smo v tem primeru pri varoji prvič v Sloveniji dokazali prisotnost virusa VDV (Slika 2). Zato smo nadaljevanje primerjalne analize virusnih sevov DWV pri čebelah in varojah v Sloveniji izvedli

brez upoštevanja seva SLO 197-varoja.

Med slovenskimi sevi DWV smo pri čebelah ugotovili od 96,9 do 100-% ujemanje nukleotidov, medtem ko je bilo ujemanje nukleotidov DWV virusov pri varojah od 97,5 do 100-%. Med slovenskimi DWV sevi pri čebelah in slovenskimi DWV sevi pri varojah je bilo ugotovljeno od 96,9 do 100-% nukleotidno ujemanje. Ujemanje med slovenskimi DWV sevi pri čebelah in DWV sevi iz genske banke je bilo od 95,2 do 100-%, med slovenskimi DWV sevi pri varoji in sevom virusa VDV pa od 77 do 77,8-%.

Pri primerjavi virusov DWV ugotovljenih pri varojah smo ugotovili, da so le-ti v obeh regijah virusnega genoma podobni tistim pri čebelah, kar potrjuje, da DWV prehaja iz čebel na varoje in obratno.

ZAKLJUČKI

Pri genetski primerjavi nukleotidnih zaporedij virusov DWV ugotovljenih pri varojah smo ugotovili, da so le-ti v regiji gena za helikazo in gena za L protein podobni tistim pri čebelah, kar potrjuje, da isti sevi DWV prehajajo iz čebel na varoje in obratno. Pri primerjalni analizi odseka gena za helikazo se je le en virusni sev, ki smo ga ugotovili pri varoji močno razlikoval od ostalih DWV sevov ugotovljenih pri čebelah in varojah v Sloveniji in je bil genetsko zelo podoben virusnemu sevu VDV. Iz tega sklepamo, da v tem primeru najverjetneje ne gre za virus DWV, temveč za ugotovitev virusa VDV. Izvedena raziskava je prva filogenetska študija sevov DWV, ki smo jo izvedli v Sloveniji.

vljenih pri čebelah in varojah v Sloveniji in je bil genetsko zelo podoben virusnemu sevu VDV. Iz tega sklepamo, da v tem primeru najverjetneje ne gre za virus DWV, temveč za ugotovitev virusa VDV. Izvedena raziskava je prva filogenetska študija sevov DWV, ki smo jo izvedli v Sloveniji.

LITERATURA

- Baker, A., Schroeder, D. 2008. Occurrence and genetic analysis of picorna-like viruses infecting worker bees of *Apis mellifera* L. populations in Devon South West England. *J. Invertebr. Pathol.* 98: 239–242.
- Bailey, L., Ball, B. V. 1991. Honeybee pathology. Harcourt Brace Jovanovich, Sidcup, United Kingdom.
- Ball, B. V. 1983. The association of *Varroa jacobsoni* with virus diseases of honey bees. Meeting of the EC Experts' Group, Wageningen, V: Wageningen: 21–23.
- Ball, B. V. 1993. The damaging effects of *Varroa jacobsoni*. V: Matheson, A. (ur.). Living with Varroa. International Bee Research Association, Cardiff: 9–16.
- Bowen-Walker, P. L., Martin, S. J., Gunn, A. 1999. The transmission of deformed wing virus between non-eybees (*Apis mellifera* L.) by ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* oud. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 101–106.
- Chen, Y., Pettis, J. S., Feldlaufer, M. F. 2005a. Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. *J. Invertebr. Pathol.* 90: 118–121.
- Chen, Y. P., Higgins, J. A., Feldlaufer, M. F. 2005b. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 436–441.
- Chen Y., Evans J., Feldlaufer M. 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee *Apis mellifera*. *J. Invert. Pathol.* 92: 152–159.
- Cizelj, I., Gregorčič, N. 2004. Dokazovanje virusnih

- infekcij pri odmrlih čebeljih družinah *Apis mellifera carnica*. Veterinarska fakulteta. 1–76.
- Jamnikar Ciglencečki, U., Toplak, I. 2013. Genetic diversity of acute bee paralysis virus in Slovenian honeybee samples. *Acta Vet. Hung.* 61: 244–256.
 - Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111–120.
 - Kovac, H., Crailsheim, K. 1988. Average lifespan of *Apis mellifera carnica* Pollm. infested by *varroa jacobsoni* Oud. in relation to season and extent of infestation. *J. Apicult. Res.* 27: 230–238.
 - Martin, S. J. 2001. The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *J. Appl. Ecol.* 38: 1082–1093.
 - Nielsen, S. K., Nicolaisen, M., Kryger, P. 2008. Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apidologie* 39: 310–314.
 - Nordström, S. 2003. Distribution of deformed wing virus within honey bees (*Apis mellifera*) brood cells infested with the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Exp. Appl. Acarol.* 29: 293–302.
 - Ongus, J. R., Peters, D., Bonmatin, J. M., Bengsch, E., Vlak, J. M., van Oers M. M. 2004. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus *Iflavirus* replicating in the mite *Varroa destructor*. *J. Gen. Virol.* 85: 3747–3755.
 - Reynaldi, F. J., Sguazza, G. H., Pecoraro, M. R., Tizzano, M. A., Galosi, C. M. 2010. First report of viral infections that affect argentine honeybees. *Environ. Microbiol. Reports.* 6: 749–751.
 - Sanpa, S., Chantawannakul, P. 2009. Survey of six bee viruses using RT-PCR in Northern Thailand. *J. Invertebr. Pathol.* 100: 116–119.
 - Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.
 - Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.
 - Tentcheva, D., Gauthier, L., Jouve, S., Canabady-Rochelle, L., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E., Ball, B. V., Bergoin, M. 2004. Polymerase chain reaction detection of deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie* 35: 431–439.
 - Teixeira, E. W., Chen, Y., Message, D., Pettis, J., Evans, J. D. 2008. Virus infection in Brazilian honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 99: 117–119.
 - Yue, C., Genersch, E. 2005. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honey-bees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* 86: 3419–3424.