

PRVI DOKAZ PRISOTNOSTI VIRUSA LAKE SINAI PRI ČEBELAH IN ČMRLJIH V SLOVENIJI

Laura ŠIMENC¹, Urška KUCHAR, Urška JAMNIKAR CIGLENEČKI, Ivan TOPLAK

Izvleček

O prisotnosti virusa Lake Sinai (LSV) v Sloveniji do te študije nismo imeli nobenih podatkov. Ta virus smo prvič ugotovili v arhivskem vzorcu čebelje družine iz leta 2010 v katerem smo s tehnologijo NGS določali genom virusa kronične paralize čebel (CBPV). Da bi ugotovili razširjenost LSV v Sloveniji, smo od oktobra 2016 do januarja 2018 zbrali 56 vzorcev čebel iz klinično prizadetih čebeljih družin in 41 vzorcev klinično zdravih čmrljev iz petih različnih lokacij po Sloveniji ter jih s specifično metodo RT-PCR pregledali na prisotnost LSV. S tehnologijo Ion Torrent NGS smo določili celotni genom virusa Lake Sinai iz vzorca umrlih čebel s paralizo. Zaporedje celotnega genoma virusa LSV iz vzorca M92/2010 obsega 5.926 nukleotidov in je prvo zaporedje celotnega genoma genetske linije LSV 3 v genski banki. Temu genomu je najbolj podoben genom LSV iz Avstralije iz leta 2014 (KY465717), oba genoma se ujemata v 86 %. Med leti 2016 in 2018 smo ta virus dokazali v 75,92 % pregledanih vzorcev čebel in v 17,07 % pregledanih čmrljev. S filogenetsko analizo 557 nukleotidov dolge regije genoma, ki kodira polimerazo RNA smo primerjali 22 pozitivnih vzorcev čebel in 3 pozitivnih vzorcev čmrljev ter dokazali 3 različne genetske linije LSV. Ugotovili smo tudi, da so virusni sevi, ki smo jih ugotovili pri čmrljih, identični sevom pri čebelah.

Ključne besede: čebele, čmrlji, virus Lake Sinai, celotni genom, sekvenciranje naslednje generacije

FIRST DETECTION OF LAKE SINAI VIRUS IN HONEYBEES AND BUMBLEBEES IN SLOVENIA

Abstract

No data regarding Lake Sinai bee virus (LSV) infections was available for our country until this study. The first positive sample of LSV in Slovenia (M92/2010) was discovered from an archive honeybee sample collected in 2010 in which we were discovering a genome of chronic bee paralysis virus (CBPV) with next generation sequencing technology. To reveal LSV occurrence in Slovenia we collected 56 honeybee samples with clinical signs of disease and 41 samples of healthy bumblebees from five different locations throughout Slovenia. Samples were tested with a specific RT-PCR method for the detection of LSV RNA. The complete genome sequence of the LSV M92/2010 strain consists of 5.926 nucleotides and is the first determined complete genome sequence of LSV3 lineage, with 86% nucleotide identity to the most closely related strain NT-LSV3 from Australia (KY465717). Between the years 2016 and 2018 we proved LSV in 75,92 % of honeybee samples and in 17,07 % of bumblebee samples. With phylogenetic analysis of 557 nucleotides long genome region for RNA depended RNA polymerase of 22 LSV positive honeybee samples and 3 positive bumblebee samples we discovered 3 different lineages of LSV in Slovenia. We also proved that circulating strains of LSV in honeybees and bumblebees are identical.

Key words: honeybees, bumblebees, Lake Sinai virus, genome, next generation sequencing

¹ Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, Ljubljana, Slovenija; laura.simenc@vf.uni-lj.si

UVOD

LSV so prvič opisali leta 2008 pri čebelah blizu jezera Sinai v Združenih državah Amerike. Njegovo prisotnost so ugotovili z metodo sekvenciranja naslednje generacije (NGS, angl. Next Generation Sequencing). Raziskovalci so kasneje odkrili več genetskih linij tega virusa tako v ZDA, kot tudi v Španiji, Belgiji in Turčiji, pri različnih vrstah čebel in čmrljev (Runckel in sod., 2011).

LSV je čebelji virus, o katerem še ni dosti znanega. Genom virusa predstavlja enovijačna pozitivno polarna molekula RNA. Poznanih je že skupno 33 celotnih genomov tega virusa, prav tako pa tudi nekaj odsekov genoma tega virusa (vir: GenBank, 1.9.2018)

Različni sevi LSV so genetsko zelo raznoliki in so razdeljeni na več genetskih linij, od LSV1 do LSV8, nekateri sevi LSV pa ostajajo še ne klasificirani (Daughenbaugh in sod., 2015). Glede prenosa, delovanja ter patogenosti tega virusa je še zelo malo znanega. Na podlagi dosedanjih ugotovitev se predvideva, da je virus nizko patogen, saj okužba pri čebelah poteka prikrito. Ni pa natančneje bilo proučeno, kakšne so posledice mešanih okužb z drugimi čebeljimi virusi in kako te kombinacije virusov vplivajo na čebele in čebelje družine. Prav tako ni še dosti znanega o prenosu virusa LSV med čebelami in čmrlji ter drugimi opraševalci (Fürst in sod., 2014).

Ker LSV v Sloveniji še nismo ugotavljali, smo se odločili, da v tej študiji specifično metodo RT-PCR pregledamo manjše število vzorcev čebel in čmrljev. Pozitivnim vzorcem čebel in čmrljev smo določili nukleotidno zaporedje v zelo ohranjenem delu virusnega genoma in jih primerjali z ostalimi sevi iz genske banke.

MATERIALI IN METODE

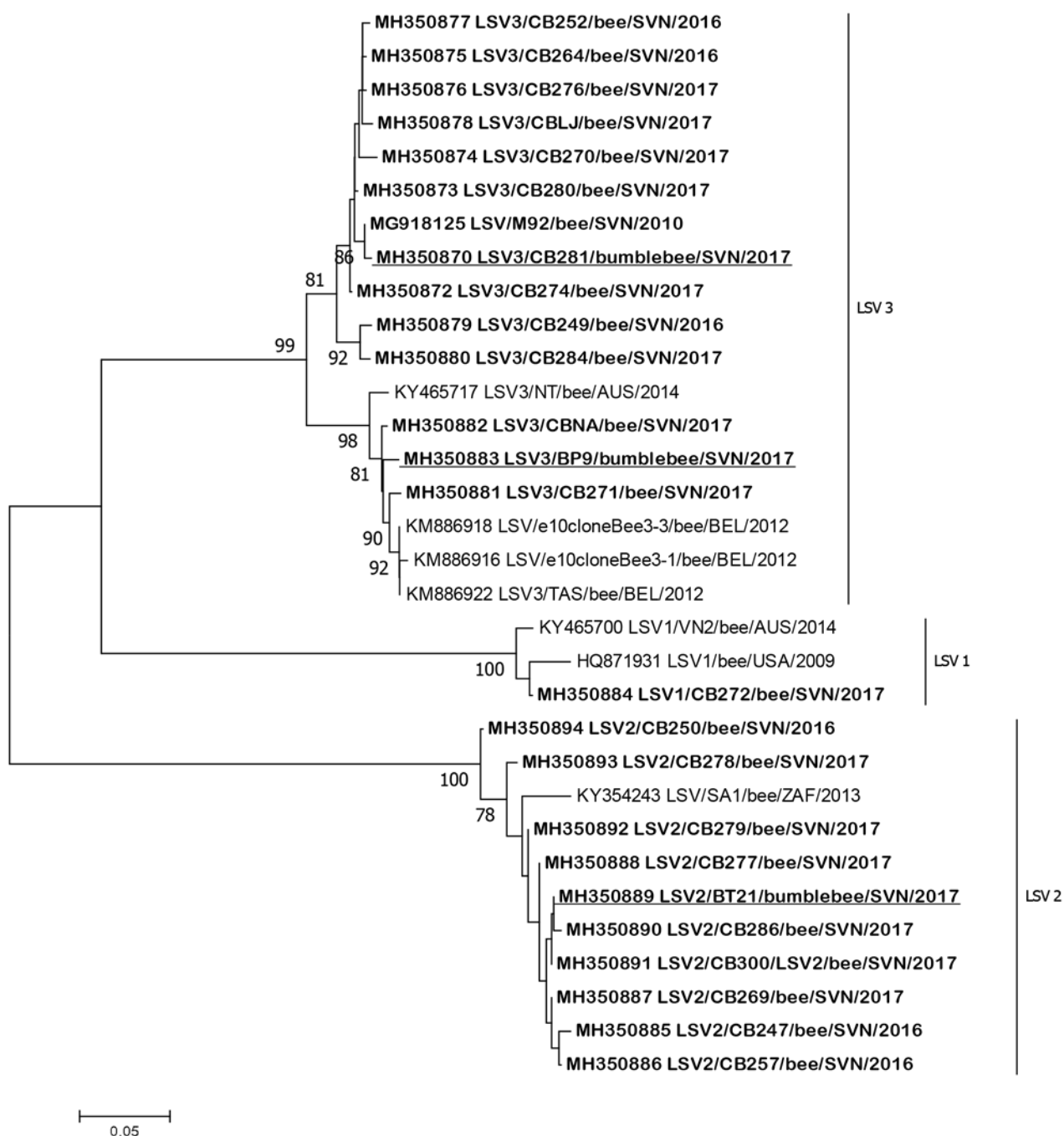
Od oktobra 2016 do januarja 2018 smo zbrali 56 vzorcev čebel iz klinično prizadetih čebeljih družin poslianih na preiskavo na 5 čebeljih virusov iz 32 različnih lokacij in 41 vzorcev klinično zdravih čmrljev iz 5 različnih lokacij po Sloveniji ter jih s specifično metodo RT-PCR pregledali na prisotnost LSV. Vzorce smo do začetka preiskave zamrzili na -50°C . 10 čebelam iz posameznega vzorca smo dodali 5 ml medija RPMI (Gibco, Velika Britanija) in jih homogenizirali v epruvetah z Ultra-Turrax DT-20 (IKA, Nemčija), ter centrifugirali 15 min pri 2500 g. Podobno smo pripravili vzorce čmrljev, le da smo 1 čmrlju dodali 3 ml medija RPMI in vsakega čmrlja testirali posebej. Celokupno RNA smo izolirali iz suspenzije posame-

znega vzorca s kompletom QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Nukleinsko kislino LSV smo dokazovali z metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) po postopku, ki je bil predhodno opisan (Toplak in sod., 2012). Uporabili smo predhodno opisane oligonukleotidne začetnike za RdRp regijo virusnega genoma: LSV1765-F in LSV2368-R (Ravoet in sod., 2015). Rezultate smo ovrednotili na podlagi velikosti produktov RT-PCR v agaroznem gelu kot pozitivne v primeru pričakovane velikosti produkta, 603 nukleotide za LSV. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 5 združenih močno pozitivnih vzorcev čebel, kot negativno kontrolo pa RPMI. V primeru pozitivnega rezultata smo produkte RT-PCR posameznega virusa direktno sekvencirali po Sangerju. Za sekvenciranje celotnega genoma LSV M92/2010 smo uporabili metodo next generation sequencing (NGS), ki je bila predhodno opisana (Jamnikar-Ciglencečki in sod., 2017). Urejena nukleotidna zaporedja slovenskih sevov LSV in sevov, pridobljenih iz genske banke, smo analizirali s programi iz programskega paketa MEGA, verzija 7 (Kumar et al., 2016). Nukleotidna zaporedja smo poravnali s programom ClustalW (Thompson in sod., 1994). Za posamezne pare nukleotidnih zaporedij smo s programom MEGA na podlagi modela p-distance izračunali matriko genetskih razdalj (angl. pairwise distances). Filogenetska drevesa smo poiskali z uporabo metode povezovanja s sosedom (angl. Neighbor-Joining, NJ) (Saitou in Nei, 1987). Za iskanje dreves s prej omenjenima metodama smo uporabili evolucijski model Kimura 2. Z metodo samovzorčenja (angl. bootstrapping) s 1000 ponovitvami smo ocenili zanesljivost filogenetskih dreves.

REZULTATI Z RAZPRAVO

Prvi pozitivni rezultat LSV v Sloveniji smo dobili v arhivskem vzorcu čebel iz leta 2010 z metodo NGS. Zaporedje celotnega genoma LSV iz vzorca M92/2010 obsega 5.926 nukleotidov in je prvo zaporedje celotnega genoma genetske linije LSV 3 v genski banki. Temu genomu je najbolj podoben genom LSV iz Avstralije iz leta 2014 iz genske banke (KY465717), oba genoma sta si identična v 86 % (vir: GenBank).

Z metodo RT-PCR smo ugotovili prisotnost nukleinske kisline virusa LSV v 41 (75,92 %) od 56 pregledanih vzorcev čebel. Prisotnost LSV smo z metodo RT-PCR dokazali tudi v 7 (17,07 %) od 41 pregledanih čmrljev. Podobno raziskavo so naredili tudi v Belgiji, kjer so ugotovili prisotnost LSV pri 21,1 % čmrljev (Parmentier in sod. 2016). S filogenetsko analizo 22 pozitivnih vzorcev čebel in 3



Slika 1: Filogenetska primerjava 557 nukleotidov dolgih zaporedij regije, ki kodira polimerazo RNA. V to primerjavo je vključenih 21 naših vzorcev čebel in 3 vzorci čmrljev sekvenciranih po Sangerju, celotni genom arhivskega vzorca iz leta 2010 (M92-2010) in najbližje sorodni vzorci LSV iz tujine (Belgije, Avstralije, Združenih držav Amerik in Južne Afrike).

vzorci čmrljev smo ugotovili, da lahko naše seve LSV uvrstimo v tri različne genetske linije: LSV1, LSV2 in LSV3. S filogenetsko primerjavo smo ugotovili veliko genetsko raznolikost sevov LSV v Sloveniji. V zelo ohranjenem delu virusnega genoma, ki kodira RNA polimerazo imajo med seboj od 76,4 do 99,6 % identičnost nukleotidnega zaporedja. Primerjava s sevi iz genske banke je pokazala, da so naš sevi genetsko najbolj identični virusnim sevom iz Belgije (98,9 %), Avstralije (97,8 %), Združenih držav

Amerike (97,6 %) in Južne Afrike (96,9 %). Ugotavljamo tudi, da so virusni sevi pri čmrljih genetsko identični sevom pri čebelah, 98,7-99,6 % (Slika 1), kar je primerljivo z raziskavami v tujini, kjer so našli tako pri čebelah kot pri divjih čebelah in čmrljih identične seve LSV (Parmentier in sod. 2016).

Ugotavljamo, da so sevi LSV tudi v Sloveniji genetsko zelo raznoliki, podobno kot so to odkrivali v tujini, saj smo na majhnem področju, kot je Slovenija odkrili naj-

manj 3 različne genetske linije LSV (Daughenbaugh KF, 2015). Zanimivo in na nek način tudi razumljivo je, da si čebele in čmrlji delijo enake virusne seve, saj se med seboj srečujejo na istih cvetlicah na paši.

Iz izvedene študije ne moremo sklepati, ali LSV povzroča kakšno klinično sliko pri čebelah ali čmrljih, vendar je splošno znano, da čebelji virusi, ki imajo veliko število

genetskih različic niso visoko patogeni. Za LSV še ni znano, ali povzroča kakršne patološke spremembe oziroma povzroča izgube v populaciji čebel in čmrljev. Vprašanje pa je ali ta virus ima kakšen vpliv pri oslabljenih čebeljih družinah, pri močnih okužbah z varojo ali pri mešanih okužbah z večjim številom virusov.

ZAKLJUČEK

Prvič smo dokazali prisotnost LSV pri čebelah in čmrljih v Sloveniji. Dokaz LSV v arhivskem vzorcu potrjuje, da je bil virus prisoten pri nas že leta 2010. Prvi smo določili celoten genom LSV3 in ga poslali v gensko banko. Med leti 2016 in 2018 smo ta virus dokazali v visokem odstotku pregledanih vzorcev čebel (75,92 %) in v manjšem odstot-

ku pregledanih čmrljev (17,07 %). S filogenetsko primerjavo delov genoma LSV smo ugotovili, da so pri čebelah in pri čmrljih prisotni isti sevi LSV, ki jih lahko uvrstimo v 3 različne genetske linije LSV1, LSV2 in LSV3, kar govori o veliki genetski raznolikosti sevov LSV po Sloveniji.

ZAHVALA

Zahvalili bi se veterinarjem, ki so pomagali z zbiranjem vzorcev prizadetih čebel Alenki Jurič, mag. Miri Jenko Rogelj, Suzani Skerbiš, mag. Vidi Lešnik, mag. Ivu Planincu, Martini Škof, Mateji Ratiznojnik in Aniti Vraničar Novak. Zahvala gre tudi Danilu Bevku, ki je vzorčil zdrave čmrlje, da smo lahko ugotovili dragoceno primerjavo med

prenosom virusov med tima dvema vrstama pomembnih opraševalcev rastlin. Zahvalili pa se bi tudi Dr. Danijeli Rihtarič, Poloni Žagar in Nataliji Novak, ki so pomagale pri laboratorijskih preiskavah dokazovanja čebeljih virusov. Opravljene raziskave so financirane iz sredstev Programske skupine P4-0092.

LITERATURA

- Daughenbaugh KF, Martin M, Brutscher LM, Cavigli I, Garcia E, Lavin M, Flenniken ML. Honey Bee Infecting Lake Sinai Viruses. *Viruses* 2015, 7, 3285-3309.
- Fürst MA, McMahon DP, Osborne JL, Paxton RJ, Brown MJF. Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature* 2014; 506: 364-366.
- Jamnikar-Ciglencčki U, Toplak I, Kuhar U. Complete genome of chronic bee paralysis virus strain SLO/M92/2010, detected from *Apis mellifera carnica*. *Genome Announcements* 2017; 5: e00602-17.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33, 1870-1874.
- Parmentier L, Smagghe G, De Graaf DC, Meeus I. Varroa destructor Macula-like virus, Lake Sinai virus and other new RNA viruses in wild bumblebee hosts (*Bombus pascuorum*, *Bombus lapidaries* and *Bombus pratorum*). *Journal of Invertebrate Pathology* 2016; 134 6-11.
- Ravoet J, De Smet L, Wenseleers T, De Graaf DC. Genome sequence of Lake Sinai Virus found in honey bees and Orf1/RdRP-based polymorphism in a single host. *Virus Res* 2015; 201: 67-72.
- Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Gannem D, Andino R, DeRisi JL. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema, Crithidia. *PLoS ONE* 2011,6, e20656.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 406-5.
- Toplak I, Rihtarič D, Jamnikar Ciglencčki U, Hostnik P, Jenčič V, Barlič-Maganja D. Detection of six honeybee viruses in clinically affected colonies of Carniolan gray bee (*Apis mellifera carnica*). *Slov Vet Res* 2012; 49: 83-91.