

MEDONOSNA ČEBELA IN ČMRLJI SE OKUŽUJEJO Z ISTIMI VIRUSNIMI SEVI

Ivan TOPLAK¹, Laura ŠIMENC¹, Metka PISLAK OCEPEK¹, Danilo BEVK²

Izvleček

Upadanje števila različnih vrst oprasovalcev je lahko med drugim tudi posledica bolezni in dovzetnosti na okužbe z različnimi RNA virusi. V zadnjih letih je vse več dokazov, da bi se nekatere vrste čebeljih virusov lahko prenašale med različnimi vrstami oprasovalcev. V tej študiji smo z molekularnimi metodami izvedli genetsko tipizacijo pozitivnih vzorcev virusa akutne paralize čebel (ABPV), virusa črnih matičnikov (BQCV), virusa mešičkaste zalege (SBV) in virusa Lake Sinai, ki smo jih ugotovili pri čebelah (*Apis mellifera carnica*) in čmrljih (*Bombus lapidarius*, *B. pascuorum*, *B. terrestris*, *B. lucorum*) v Sloveniji. Posamezno vrsto čebeljega virusa smo dokazovali s specifično metodo RT-PCR. V primeru pozitivnega rezultata smo produkte RT-PCR posameznega virusa direktno sekvencirali po Sangerju. S primerjavo od 408 do 783 nukleotidov dolgih odsekov virusnih genomov smo pri čebelah in čmrljih ugotovili od 98,5 do 100 % ujemanje nukleotidnega zaporedja, kar je nedvoumen dokaz, da isti sevi čebeljih virusov okužujejo obe skupini oprasovalcev. Z izvedeno študijo v Sloveniji prvič dokazujemo, da so čebele in čmrlji okuženi z genetsko istimi sevi virusov ABPV, BQCV, SBV in virusom Lake Sinai. Vsekakor bo za uspešnejši nadzor virusnih okužb pri čebelah potrebno tovrstne študije razširiti tudi na druge vrste oprasovalcev.

Ključne besede: čebele, čmrlji, določanje nukleotidnega zaporedja, prenos, epidemiologija

HONEYBEES AND BUMBLEBEES ARE INFECTED WITH THE SAME STRAINS OF VIRUSES

Abstract

The decline of the number of different types of pollinators may be result of disease and susceptibility for infections with various RNA viruses. In recent years there has been growing evidence that certain types of honeybee viruses could be transmitted between different pollinators. In this study, sequencing of positive samples of acute bee paralysis virus (ABPV), black queen cell virus (BQCV), sacbrood bee virus (SBV) and Lake Sinai virus were carried out using molecular methods. Samples were collected and found positive in honeybees (*Apis mellifera carnica*) and bumblebees (*Bombus lapidarius*, *B. pascuorum*, *B. terrestris*, *B. lucorum*) in Slovenia. An individual type of bee virus was proven using a specific RT-PCR method. RT-PCR products of individual viruses were directly sequenced by Sanger method. By comparison 408 to 783 nucleotides of long fragments of viral genomes, we found 98,5 to 100% nucleotide identity in bees and bumblebees, which is clear evidence that the same strains of honeybee viruses are infecting both types of pollinators. This study, conducted in Slovenia, for the first time proves that bees and bumblebees are infected with genetically identical strains of ABPV, BQCV, SBV and Lake Sinai virus. For the successful control of viral infections in bees, further studies should also be extended to other types of pollinators.

Key words: bees, bumblebees, sequencing, transmission, epidemiology

¹ Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, Ljubljana, Slovenija

² Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, Slovenija



UVOD

Čebele ogrožajo različni patogeni, vključno z virusnimi okužbami (Evans in Schwarz, 2011). Pri medonosnih čebelah (*Apis mellifera*) so opisali že več kot 20 različnih vrst virusov. Najbolj proučevani so virus akutne paralize (ABPV), virus črnih matičnikov (BQCV), virus kronične paralize (CBPV), virus deformiranih kril (DWV) in virus mešičkaste zalege (SBV). Na najbolj patogenih čebeljih virusih, kot so ABPV, CBPV, DWV in SBV so v zadnjem desetletju opravili številne raziskave v zvezi z izginjanjem čebel in ugotavljanjem njihovega vpliva na zdravje čebelje družine. Rezultat povečanega zanimanja in širitev raziskav virusnih okužb čebeljih družin ter uporaba novih tehnologij, kot je naslednja generacija sekvenciranja, je odkritje nekaterih novih virusov, na primer odkritja virusa Lake Sinai v letu 2010. Za nekatere viruse še ni jasno, kakšen vpliv imajo na čebeljo družino, saj imajo virusne okužbe pri čebelah pogosto značaj kronične okužbe (Runckel in sod., 2011).

Dinamika virusnih okužb je preko leta v zdravi čebelji družini velika, najzanesljivejši pokazatelj prisotnosti virusne okužbe pa je pregled vzorcev čebel delavk (Jamnikar Ciglencečki in sod., 2014). Virusne okužbe so v prizadetih čebeljih družinah v Sloveniji pogosto ugotovljene, običajno pa ugotavljamo sočasno prisotnost večjega števila različnih virusov, število pa narašča s klinično sliko prizadete čebelje družine (Toplak in sod., 2010, Toplak in sod., 2012).

Upadanje števila različnih vrst oprasovalcev je lahko med drugim tudi posledica delovanja patogenov. Prostoživeči čmrlji (*Bombus* spp.) so poleg čebel med najpomembnejšimi vrstami oprasovalcev in so prav tako ogroženi, kot medonosne čebele in druge vrste divjih oprasovalcev (Fürst in sod., 2014). V študiji, ki so jo v Veliki Britaniji izvajali na 26 lokacijah so dokazali, da se čebelji virusi (BQCV, DWV, ABPV, slow bee paralysis virus-SBPV) pojavljajo pri čebelah in čmrljih (*Bombus* spp.), z metodo RT-PCR pa so določili različne količine virusa pri čmrljih. Ugotovili so, da je pogostost pojavljanja posameznega virusa pri čebelah dober pokazatelj prisotnosti virusov pri čmrljih (McMahon in sod., 2015).

Pri pregledu 4 vzorcev različnih vrst umrlih čmrljev smo v Sloveniji leta 2017 z metodo RT-PCR prvič dokazali prisotnost nukleinske kisline dveh čebeljih virusov (ABPV in BQCV) pri čmrljih. Pregledani 4 vzorci čmrljev so vsebovali vrste *Bombus humilis*, *Bombus pascuorum*, *Bombus hypnorum* in *Bombus lapidarius* (Grad in Toplak, 2018). V predhodnih raziskavah je bilo večkrat dokazano, da se čebelji virusi znotraj čebeljih družin prenašajo horizontalno in vertikalno, prav tako je varoja (*Varroa destructor*) med sesanjem hemolimfe zelo dobra prenašalka številnih virusov pri čebelah (Chen in sod., 2006). Prenos različ-

nih vrst patogenov med različnimi vrstami je že dolgo poznan tako pri živalih, kot pri človeku (Woolhouse in sod., 2005), zato je preučevanje teh možnosti pomembno tudi za čebele, ki se v naravi ob neposrednih ali posrednih stikih srečujejo tudi z drugimi oprasovalci. Zelo malo pa je poznanega o dovzetnosti in načinih prenosa med različnimi vrstami oprasovalcev. Dosedanje ugotovitve nakazujejo veliko kompleksnost virov okužbe in težavno interpretacijo virusnih okužb, ko govorimo o medsebojnem vplivu različnih oprasovalcev.

V izvedeni študiji smo z filogenetsko primerjavo virusnih sevov ABPV, BQCV, Lake Sinai virusa in SBV iz pozitivnih vzorcev čebel in čmrljev prvič v Sloveniji želeli ugotoviti, ali so isti sevi posamezne vrste čebeljih virusov prisotni tudi pri čmrljih.

MATERIAL IN METODE

V obdobju od 2007 do 2018 smo vzorčili čebele delavke iz šibkih ali odmrlih čebeljih družin, umrle čebele delavke ali žive čebele z znaki paralize pred panjem, odmrlo zalego in varoje iz celotnega ozemlja Slovenije. V avgustu 2017 smo na štirih različnih lokacijah (Sevno, Lukovica, Naklo, Ljubljana) na cvetočih travnikih vzorčili klinično zdrave čmrlje vrste *B. lapidarius* (BL), *B. pascuorum* (BP), *B. terrestris*/*B. lucorum* (BT) in istočasno na vsaki lokaciji 10 klinično zdravih čebel delavk. Vzorce smo do začetka preiskave zamrznili in jih hranili na < - 50 °C.

Naključno odbranim desetim čebelam iz vzorca smo dodali 5 ml medija RPMI (Gibco, Velika Britanija) in jih homogenizirali v epruveh z Ultra-Turrax DT-20 (IKA, Nemčija), ter centrifugirali 5 min pri 2500 g. Podobno smo pripravili vzorce čmrljev, s tem da smo 1 čmrlju dodali 3 ml medija RPMI in vsakega čmrlja testirali individualno. Celokupno RNA smo izolirali iz suspenzije posameznega vzorca s kompletom QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca.

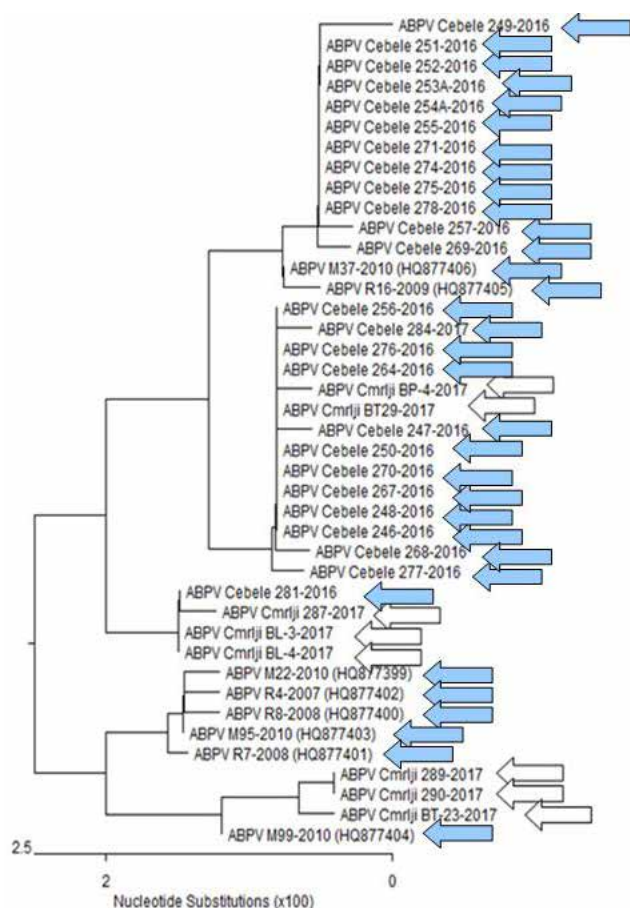
Nukleinsko kislino petih čebeljih virusov (ABPV, BQCV, CBPV, DWV in SBV) smo dokazovali z metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) po postopku, ki je bil predhodno opisan (Toplak in sod., 2012). Virus Lake Sinai smo dokazovali z metodo RT-PCR in predhodno opisanimi oligonukleotidnimi začetniki 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: za ABPV 452 nukleotidov (nt), za BQCV 770 nt, za CBPV 570 nt, za DWV 504 nt, za Lake Sinai virus 603 nt in za SBV 814.

V primeru pozitivnega rezultata smo produkte RT-PCR posameznega virusa direktno sekvencirali po Sangerju.

Izvedli smo filogenetske primerjave s programom DNA-STAR 5.05 (Lasergen, ZDA) ugotovljenih pozitivnih vzorcev štirih virusov (ABPV, BQCV, DWV in SBV) pri čebelah in čmrljih ter rezultate interpretirali na podlagi ujemanja nukleotidnega zaporedja.

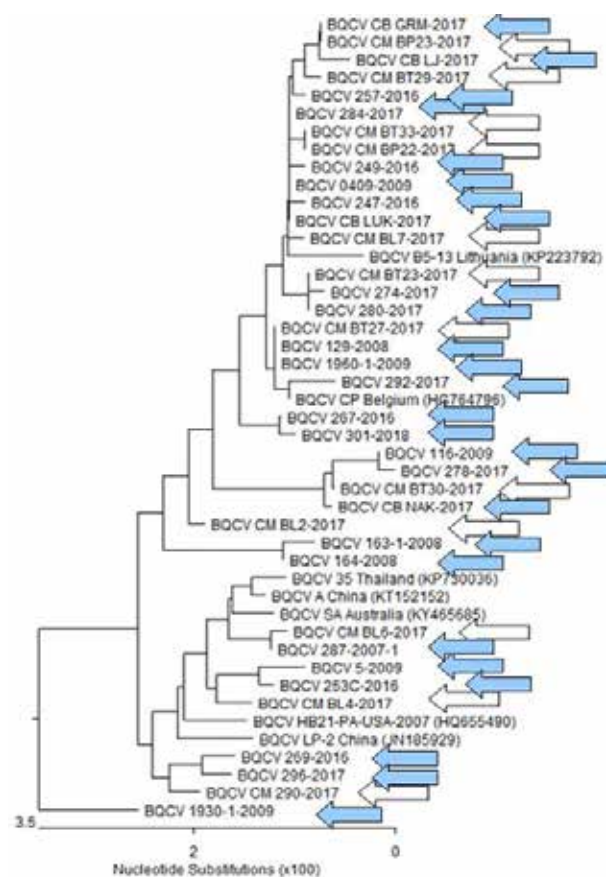
REZULTATI

V filogenetsko primerjavo virusnih sevov ABPV smo vključili 33 pozitivnih vzorcev čebel in 8 pozitivnih vzorcev čmrljev. Primerjava zaporedja 408 nukleotidov regije ORF1 virusnega genoma je pokazala, da so pri čmrljih prisotni genetsko isti sevi ABPV, z 99,3-100% identičnostjo zaporedja nukleotidov najbližjim sevom ABPV, ki smo jih ugotovili pri čebelah (Slika 1). Pri čmrljih vrste *B. lapidarius*, *B. pascuorum*, *B. terrestris/lucorum*, smo ugotovili najmanj tri različne seve ABPV, ki se med seboj na nukleotidnem nivoju razlikujejo v primerjani regiji ORF1 za največ v 3,9%.



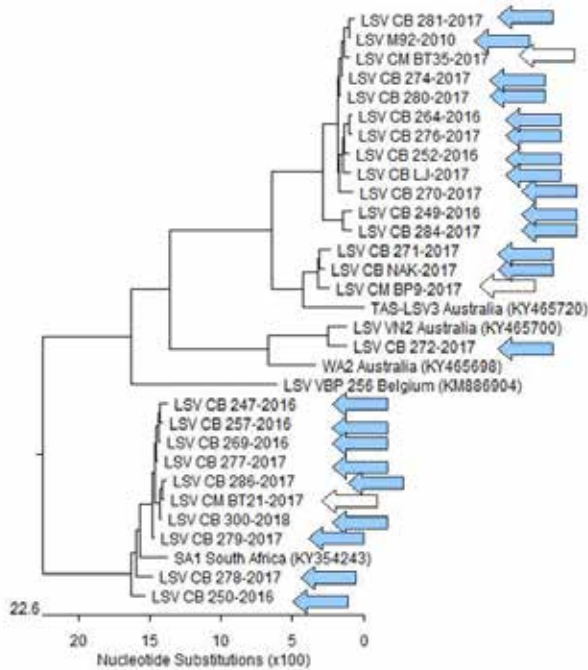
Slika 1. Filogenetska primerjava sevov ABPV ugotovljenih v pozitivnih vzorcih čebel (obarvane puščice) in čmrljev (ne obarvane puščice) v Sloveniji. Primerjava je izvedena na podlagi zaporedja 408 nukleotidov regije ORF1 virusnega genoma skupaj z genetsko najbližjimi sevi iz genske banke.

Filogenetsko primerjavo virusnih sevov BQCV smo izvedli z vključitvijo 26 pozitivnih vzorcev čebel in 12 pozitivnih vzorcev čmrljev, skupaj z genetsko najbližjimi sevi iz genske banke. Primerjava zaporedja 653 nukleotidov regije virusnega genoma, ki kodira protein kapside, je pokazala, da so pri čebelah in čmrljih prisotni genetsko isti sevi BQCV, z 98,5-100% identičnostjo zaporedja nukleotidov (Slika 2). Na istih lokacijah smo pri čmrljih ugotovili genetsko iste seve BQCV, ki so prisotni tudi pri vzorcih čebel.



Slika 2. Filogenetska primerjava sevov BQCV ugotovljenih v pozitivnih vzorcih čebel (obarvane puščice) in čmrljev (ne obarvane puščice) v Sloveniji. Primerjava je izvedena na podlagi zaporedja 653 nukleotidov regije virusnega genoma, ki kodira protein kapside, skupaj z genetsko najbližjimi sevi iz genske banke.

Primerjava 557 nukleotidov dolgih odsekov regije genoma, ki kodira gen za polimerazo RNA virusa Lake Sinai, je pri vključenih 23 pozitivnih vzorcih čebel in 3 pozitivnih vzorcih čmrljev pokazala 98,7-99,6% identičnost zaporedja nukleotidov med genetsko najbolj sorodnimi pozitivnimi vzorci virusa Lake Sinai čebel in čmrljev (Slika 3). Pri čebelah in čmrljih smo ugotovili seve iz dveh genetsko različnih skupin virusov Lake Sinai (poimenovani LSV2 in LSV3), ki se med seboj razlikujejo največ v 24,6%.

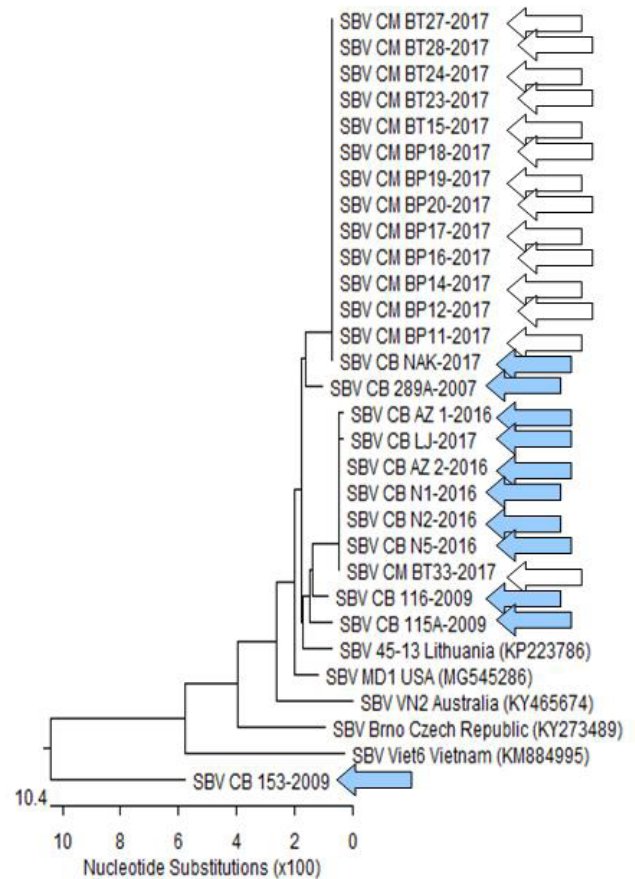


Slika 3. Filogenetska primerjava sevov virusa Lake Sinai ugotovljenih v pozitivnih vzorcih čebel (obarvane puščice) in čmrljev (ne obarvane puščice) v Sloveniji. Primerjava je izvedena na podlagi zaporedja 557 nukleotidov regije virusnega genoma, ki kodira polimerazo RNA, skupaj z genetsko najbližjimi sevi iz genske banke.

V filogenetski primerjavi SBV smo primerjali 783 nukleotidov dolgo zaporedje 11 pozitivnih vzorcev čebel in 14 pozitivnih vzorcev čmrljev. Primerjava regije virusnega genoma, ki kodira poliprotein je pokazala 100% identičnost zaporedja nukleotidov med pozitivnimi vzorci SBV čebel in čmrljev (Slika 4). V vzorcih čebel in čmrljev, ki so bili vzorčeni na isti lokaciji (Naklo in Ljubljana) smo ugotovili 100% identičnost nukleotidnega zaporedja, kar je dokaz, da je pri čebelah in čmrljih bil v času vzorčenja prisoten isti sev SBV.

RAZPRAVA

Večina prenosov čebeljih virusov poteka znotraj čebelje družine in med čebeljimi družinami horizontalno (preko neposrednih ali posrednih stikov med pašnimi čebelami), manj pogost pa je vertikalni način, ko je vir okužbe matica (Chen in sod., 2006). Čebele bi se lahko z novim virusom okužile ob stiku z okuženo čebelo, na kontaminiranih cvetovih, z okuženo varojo, od čmrljev ali ostalih vrst divjih čebel (McMahon in sod., 2015). V predhodno izvedeni študiji smo v istih čebeljih družinah ugotovili, da so z virusi ABPV, BQCV, CBPV in DWV najpogosteje okužene pašne čebele, v nekoliko nižjem odstotku hišne



Slika 4. Filogenetska primerjava sevov SBV ugotovljenih v pozitivnih vzorcih čebel (obarvane puščice) in čmrljev (ne obarvane puščice) v Sloveniji. Primerjava je izvedena na podlagi zaporedja 783 nukleotidov regije virusnega genoma, ki kodira poliprotein, skupaj z genetsko najbližjimi sevi iz genske banke.

čebele, najmanjši odstotek pa smo ugotavljali pri zalegi (Jamnikar Ciglenečki in sod., 2014). To potrjuje, da so za prenos virusov najverjetneje v večini primerov odgovorne pašne čebele in zato obstaja velika verjetnost prenosa čebeljih virusov na paši.

Iz rezultatov izvedene študije v Sloveniji prvič ugotavljamo, da se tako pri čebelah, kot pri čmrljih pojavljajo genetsko isti sevi ABPV, BQCV, SBV in Lake Sinai virusa. Pri čmrljih smo pogosto ugotovili genetsko različne seve iste vrste virusa in v večini primerov smo te genetske različice našli tudi pri čebelah, ki smo jih že v prejšnjih letih ugotovili v Sloveniji ali istočasno vzorčili. Najverjetneje se čebele in čmrlji medsebojno okužujejo na kontaminiranih cvetovih ali ob neposrednih stikih. Iz študije pa ne moremo zaključiti, kako poteka okužba, ali s čebel na čmrlje, ali obratno, najbolj verjetno pa je, da okužbe potekajo v obe smeri.

V izvedeno študijo smo zajeli genetsko tipizirane pozitiv-

ne vzorce čebel (ABPV, BQCV, SBV), ki smo jih vzorčili med leti 2007 in 2018 iz prizadetih čebeljih družin, zdrave čmrle pa smo vzorčili na štirih lokacijah na travnikih v letu 2017. Iz študije tudi lahko zaključimo, da se patogeni sevi čebeljih virusov pojavljajo tudi pri čmrljih, ne vemo pa, ali pri čmrljih povzročijo klinično sliko, kot jo opisujejo pri čebelah. Virusov CBPV in DWV v pregledanih vzorcih čmrljev še nismo ugotovili, kar je lahko posledica načina vzorčenja, saj smo vzorčili in pregledali le čmrle brez kliničnih znakov bolezni. Za CBPV in DWV je značilno, da lahko v obolelih čebeljih družinah povzročata hujšo prizadetost posameznih ali večjega števila čebel (deformirana krila in paraliza), ki bi se lahko pojavlja tudi pri klinično prizadetih čmrljih, teh pa nismo vključili v to raziskavo. Vzorčenje tako prizadetih čmrljev bi bilo namreč zelo zahtevno, saj prostoživeče vrste čmrljev odmrejo v naravi (Grad in Toplak, 2018). Klinično prizadete čmrle bi bilo morda mogoče ob daljšem in natančnem opazovanju zdravja čmrle družine vzorčiti v lastnem čmrljaku.

S filogenetsko analizo nukleotidnih zaporedij kratkih od-

sekov virusnega genoma smo nedvoumno dokazali genetsko identične seve ABPV, BQCV, SBV in Lake Sinai virusa pri čmrljih in čebelah. To nam odpira nov pogled na vlogo virusov v patologiji oprasovalcev in njihovi sposobnosti preživetja. Iste virusne seve smo ugotovili pri različnih vrstah čmrljev, čeprav zaradi majhnega števila pregledanih in primerjanih pozitivnih vzorcev virusov ne moremo sklepati, da so vse vrste čmrljev enako dovzetne za okužbe s posameznim čebeljim virusom.

Naša filogenetska študija daje veliko natančnejši vpogled v razširjenost čebeljih virusov pri čmrljih in natančno dokazuje prenos med vrstami, kakor so to izvedli v predhodni študiji pri čmrljih v Veliki Britaniji, kjer so štiri vrste virusov le dokazovali (McMahon in sod., 2015).

Vsekakor bi bilo za uspešnejši nadzor virusnih okužb pri čebelah potrebno tovrstne študije razširiti tudi na druge vrste oprasovalcev. Na ta način bomo dobili popolnejšo sliko o dejanski razširjenosti in ogroženosti različnih vrst oprasovalcev zaradi čebeljih virusov.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se Alenki Jurič, mag. Miri Jenko Rogelj, Suzani Skerbiš, mag. Vidi Lešnik, mag. Ivo Planincu, Martini Škof, Mateji Ratiznojnik in Aniti Vraničar Novak za pomoč pri zbiranju in posredovanju vzorcev prizadetih čebel. Prav tako gre iskrena zahvala prof. dr. Janezu Gradu, ki je prinesel 4 vzorce odmrlih čmrljev, zbranih iz njegovega čmrljaka, da smo jih lahko uporabili v tej raziskavi. Dr. Danijeli Rihtarič, Poloni Žagar in Nataliji

Novak se zahvaljujemo za pomoč pri dokazovanju virusov z metodo RT-PCR. Opravljene raziskave so financirane iz sredstev Programske skupine P4-0092 in projekta CRP V4-1622 (Pomen divjih oprasovalcev pri oprasovanju kmetijskih rastlin in trajnostno upravljanje v kmetijstvu za zagotovitev zanesljivega oprasovanja), ki ju financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz državnega proračuna.



LITERATURA

- Chen Y, Evans JD, Feldlaufer MF. Horizontal and vertical transmission of viruses in honey bee *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* 2006; 92: 152-159.
- Evans JD, Schwarz RS. Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in Microbiol* 2011; 19: 614-620.
- 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.
- Grad J, Toplak I. Žuželke, muha *Hermetia illucens* in virusi kot možni škodljivci čmrljem. *Acta Entom Slov* 2018; 26: 29-40.
- Jamnikar Ciglencečki U, Pislak Ocepek M, Jenčič V, Toplak I. Seasonal variations of four honey bee viruses in pupae, hive and forager bees of Carniolan gray bee (*Apis mellifera carnica*). *Slov Vet Res* 2014; 51: 131-40.
- McMahon DP, Furst MA, Caspar J, Theodorou P, Brown MJ, Paxton RJ. A sting in the split: widespread cross-infection of multiple RNA viruses across wild and managed bees. *J Anim Eco* 2015; 84, 615-624.
- 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 and Crithidia. *PLoS ONE* 2011; 6, e20656.
- Toplak I, Zabavnik Piano J, Pislak Ocepek M. Ugotavljanje prisotnosti petih čebeljih virusov v vzorcih obolelih čebeljih družin v letu 2010. Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Nacionalni veterinarski inštitut, končno poročilo 2010; 1-48.
- Toplak I, Rihtarič D, Jamnikar Ciglencečki 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.
- Woolhouse MEJ, Haydon DT, Anita R. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trend in Ecology and Evolution* 2005; 20: 238-244.