

Univerza v Ljubljani  
*Veterinarska* fakulteta



Laura Šimenc

**UGOTAVLJANJE TER DOLOČANJE VIRUSOV V  
NARAVNO OKUŽENIH ČEBELJIH DRUŽINAH  
(*Apis mellifera carnica*) IN RAZVOJ OKUŽBE V  
INOKULIRANI ČEBELJI ZALEGI**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2022

Univerza v Ljubljani  
*Veterinarska* fakulteta



UDK: 595.799:578.76:578.23:577.21:575.22(043.3)

Laura Šimenc, dr. vet. med.

**UGOTAVLJANJE TER DOLOČANJE VIRUSOV V  
NARAVNO OKUŽENIH ČEBELJIH DRUŽINAH  
(*Apis mellifera carnica*) IN RAZVOJ OKUŽBE V  
INOKULIRANI ČEBELJI ZALEGI**

Doktorska disertacija

**DETERMINATION AND IDENTIFICATION OF VIRUSES  
IN NATURALLY INFECTED HONEYBEE COLONIES  
(*Apis mellifera carnica*) AND DEVELOPMENT OF THE  
INFECTION AFTER HONEYBEE BROOD VIRUS  
INOCULATION**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2022

Laura Šimenc

Ugotavljanje ter določanje virusov v naravno okuženih čebeljih družinah (*Apis mellifera carnica*) ter razvoj okužbe v inokulirani čebelji zalegi

Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo ter na Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Mentor: izr. prof. dr. Ivan Toplak

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

prof. dr. Vlasta Jenčič

izr. prof. dr. Urška Jamnikar Ciglencečki

prof. dr. Aleš Gregorc

Izjava o delu: Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

## IZVLEČEK

Ključne besede: molekularna biologija; virusne bolezni – diagnostika – genetika; čebele – virologija; genotipizacija; sekvenciranje celotnega genoma – metode; verižna reakcija s polimerazo; *in vitro* tehnike

Key words: molecular biology; virus diseases – diagnosis – genetics; bees – virology; genotyping; whole genome sequencing – methods; polymerase chain reaction; *in vitro* techniques

V raziskavi smo ugotavljali in določali viruse v naravno okuženih čebeljih družinah (*Apis mellifera carnica*) in preučevali razvoj virusne okužbe v inokulirani čebelji zalegi. Razvili in uporabili smo nove začetne oligonukleotide, sonde TaqMan in standarda za kvantitativno metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo v realnem času (RT-qPCR) za določitev in kvantifikacijo virusa Lake Sinai linije 3 (LSV3) in virusa mešičkaste zalege (SBV). Z metodo RT-qPCR smo pregledali 89 vzorcev klinično obolelih čebeljih družin, vzorčenih med aprilom 2016 in septembrom 2020, in 108 vzorcev klinično zdravih čebeljih družin, vzorčenih med oktobrom 2018 in oktobrom 2019, in ugotavljali, ali so prisotni čebelji virusi: virus akutne paralize čebel (ABPV), virus črnih matičnikov (BQCV), virus kronične paralize čebel (CBPV), virus deformiranih kril (DWV), LSV3 in SBV. Prisotnost ABPV smo ugotovili v 29,63 % klinično zdravih in 79,78 % klinično obolelih čebeljih družin, BQCV v 98,15 % klinično zdravih in 96,63 % klinično obolelih čebeljih družin. Prisotnosti CBPV nismo ugotovili v nobenem vzorcu klinično zdravih čebeljih družin, v klinično obolelih čebeljih družinah pa v 19,10 %. DWV smo ugotovili v 39,81 % zdravih in 69,66 % obolelih čebeljih družin, LSV3 pa v 67,59 % klinično zdravih in 48,31 % klinično obolelih čebeljih družin. Prisotnost SBV smo ugotovili v 35,19 % klinično zdravih in 22,47 % obolelih čebeljih družin. Statistično značilno višje število kopij smo ugotovili pri klinično obolelih čebeljih družinah, okuženih z ABPV, CBPV, DWV in SBV ( $p < 0,0001$ ), medtem ko pri BQCV ( $p = 0,6597$ ) in LSV3 ( $p = 0,0062$ ) statistično značilnih razlik med zdravimi in obolelimi čebeljimi družinami nismo ugotovili. Iz devetih vzorcev klinično obolelih in desetih vzorcev klinično zdravih čebeljih družin, v katerih smo z določanjem nukleotidnega zaporedja po Sangerju predhodno ugotovili različne linije čebeljih virusov, smo z metodo sekvenciranja naslednje generacije (NGS) določili 22 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov čebeljih virusov, in sicer ABPV

(n = 4), BQCV (n = 3), CBPV (n = 2), DWV (n = 5), LSV (n = 4), SBV (n = 1), Apis Rhabdovirus-1 ali ARV-1 (n = 1), Bee Macula-like virus ali BeeMLV (n = 1), Hubei partiti-like virus 34 ali HPLV34 (n = 1). Nukleotidna zaporedja genomov ABPV, BQCV, DWV in SBV so prva nukleotidna zaporedja celotnih genomov teh vrst virusov, identificiranih v Sloveniji. Nukleotidna zaporedja genomov ARV-1, BeeMLV in HPLV34 smo na območju Slovenije ugotovili prvič, zato odkritje predstavlja pomemben doprinos k ugotovljeni genetski raznovrstnosti čebeljih virusov pri nas in po svetu. Z namenom raziskovanja pomnoževanja čebeljih virusov in razvoja virusnih okužb pri ličinkah smo uporabili *in vitro* metodo gojenja čebeljih ličink. V razvojni fazi čebelje ličinke, od prvega do petega dneva starosti, smo z inokulacijo terenskih sevov LSV3 in SBV (*per os*) preučevali pomnoževanje virusov in umiranje ličink. Pomnoževanja LSV3 in SBV v ličinkah nismo ugotovili, prav tako nismo ugotovili značilnih razlik v umiranju ličink glede na različne odmerke virusa. Uvedene metode imajo velik potencial za nadaljnje študije virusnih, bakterijskih in drugih okužb pri čebelah.

## ABSTRACT

In this study honeybee viruses in naturally infected honeybee colonies (*Apis mellifera carnica*) were determined and identified. Furthermore, the development of the viral infection after honeybee brood virus inoculation was studied. Two new sets of primers, TaqMan probes and standards for quantitative method of real-time reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-qPCR) for detection and quantification of Lake Sinai virus lineage 3 (LSV3) and sacbrood bee virus (SBV) were developed and implemented. 89 samples of clinically affected honeybees sampled from April 2016 to September 2020 and 108 samples of clinically healthy honeybee colonies sampled over one year period from October 2018 to October 2019, were examined with RT-qPCR methods, for presence of six honeybee viruses: acute bee paralysis virus (ABPV), black queen cell virus (BQCV), chronic bee paralysis virus (CBPV), deformed wing virus (DWV), LSV3 and SBV. ABPV was detected in 29,63 % of clinically healthy and 79,78 % of clinically affected honeybee colonies, BQCV was detected in 98,15 % of clinically healthy and 96,63 % of clinically affected honeybee colonies. CBPV was not detected in any sample of clinically healthy but was detected in 19,10 % of clinically affected honeybee samples. DWV was detected in 39,81 % of healthy and 69,66 % of affected honeybee colonies, LSV3 was detected in 67,59 % of healthy and 48,31 % of affected honeybee colonies. SBV was detected in 35,19 % of healthy and in 22,47 % of affected honeybee colonies. There were statistically significantly higher viral copy numbers detected in clinically affected honeybee colonies infected with ABPV, CBPV, DWV in SBV ( $p < 0,0001$ ), but with BQCV ( $p = 0,6597$ ) and LSV3 ( $p = 0,0062$ ) there were no statistically significant differences detected in viral copy numbers between healthy and affected honeybee colonies. From nine samples of clinically affected and ten samples of healthy honeybee colonies in which different strains of honeybee viruses were detected by Sanger sequencing, 22 nucleotide sequences of complete genomes of honeybee viruses were determined with next generation sequencing (NGS) method (ABPV  $n = 4$ , BQCV  $n = 3$ , CBPV  $n = 2$ , DWV  $n = 5$ , LSV  $n = 3$ , SBV  $n = 1$ , Apis Rhabdovirus-1 (ARV-1)  $n = 1$ , Bee Macula-like virus (BeeMLV)  $n = 1$ , Hubei partiti-like virus 34 (HPLV34)  $n = 1$ ). Nucleotide sequences of complete genomes of ABPV, BQCV, DWV and SBV are first nucleotide sequences of complete genomes of this viral species determined in Slovenia. ARV-1, BeeMLV and HPLV34 were detected in Slovenia for the first time and they represent important contribution to genetic diversity of honeybee viruses identified in Slovenia and over

the world. With the goal to research the replication of honeybee viruses and development of viral infections, we implemented the method of *in vitro* rearing of honeybee larvae. In the developing phase of honeybee larva from day one to day five, with inoculation of field strains of LSV3 and SBV *per os*, viral replication and dying of larvae were studied. The replication of LSV3 and SBV in the larvae was not determined and significant differences in dying of larvae depending on different viral doses were not detected. The implemented methods have great potential for further studies of viral, bacterial and other infections on the developing stages of honeybees.

## KAZALO VSEBINE

<b>IZVLEČEK</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b> .....	<b>9</b>
<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>14</b>
<b>KAZALO TABEL</b> .....	<b>21</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>23</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>25</b>
<b>2 PREGLED LITERATURE</b> .....	<b>29</b>
2.1 MEDONOSNA ČEBELA.....	29
2.2 KRANJSKA ČEBELA ( <i>Apis mellifera carnica</i> ).....	29
2.3 ČEBELJA DRUŽINA .....	30
2.3.1 Pomen matice .....	30
2.3.2 Čebele delavke .....	31
2.3.3 Troti.....	31
2.4 RAZVOJ ČEBELJE DRUŽINE .....	31
2.5 DELO ČEBELARJA .....	32
2.6 ČEBELARSTVO V SLOVENIJI .....	33
2.7 BOLEZNI ČEBELJE DRUŽINE .....	33
2.7.1 Čebelji virusi .....	34
2.7.1.1 Virus akutne paralize čebel.....	35
2.7.1.2 Virus črnih matičnikov .....	36
2.7.1.3 Virus kronične paralize čebel .....	37
2.7.1.4 Virus deformiranih kril.....	39
2.7.1.5 Virus Lake Sinai .....	40
2.7.1.6 Virus mešičkaste zalege.....	41
2.7.1.7 Apis rhabdovirus-1 .....	42
2.7.1.8 Bee Macula-like virus.....	43
2.7.1.9 Hubei partiti-like virus .....	43
2.8 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA VIRUSNIH OKUŽB Z MOLEKULARNIMI METODAMI .....	44



2.8.1	Metoda RT-PCR v diagnostiki čebeljih virusov.....	44
2.8.2	Sekvenciranje po Sangerju .....	45
2.8.3	Metoda RT-PCR v realnem času .....	46
2.8.4	Kvantitativna metoda RT-PCR v realnem času.....	46
2.8.5	Sekvenciranje naslednje generacije .....	47
2.8.5.1	Priprava knjižnic NGS .....	47
2.8.5.2	Tehnologija Illumina.....	48
2.8.5.3	Obdelava podatkov NGS.....	48
2.8.5.4	NGS pri preučevanju čebeljih virusov .....	49
2.9	POSKUSI NA ČEBELAH V <i>IN VITRO</i> POGOJIH .....	49
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>51</b>
3.1	KVANTIFIKACIJA ČEBELJIH VIRUSOV Z METODO RT-qPCR .....	51
3.1.1	Vzorčenje čebel .....	51
3.1.2	Priprava vzorcev .....	53
3.1.3	Izolacija nukleinskih kislin.....	54
3.1.4	Protokol kvantifikacije ABPV, BQCV, CBPV in DWV z metodo RT-qPCR .....	54
3.1.5	Načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov, sond TaqMan in standardov metode RT-qPCR za LSV3 in SBV.....	54
3.1.6	Optimizacija kvantifikacije s standardom za SBV in LSV3 .....	55
3.1.7	Izračun števila virusnih kopij na čebelo .....	55
3.1.8	Določitev meje zaznavanja (LOD) in meje kvantifikacije (LOQ) za metodo RT-qPCR pri šestih čebeljih virusih .....	55
3.1.9	Preverjanje specifičnosti metode RT-qPCR za SBV in LSV3 .....	56
3.1.10	Preverjanje učinkovitosti metode RT-qPCR za šest čebeljih virusov .....	56
3.1.11	Kvantitativna metoda RT-qPCR.....	58
3.1.12	Statistična analiza kvantifikacije čebeljih virusov z metodo RT-qPCR.....	58
3.2	DOLOČANJE NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ CELOTNIH GENOMOV ČEBELJIH VIRUSOV Z METODO NGS .....	59
3.2.1	Izbor vzorcev za NGS.....	59
3.2.2	Priprava vzorcev .....	59

3.2.3	Določanje nukleotidnih zaporedij v vzorcih z NGS s tehnologijo Illumina .....	60
3.2.4	Bioinformacijska obdelava podatkov NGS.....	60
3.2.5	Nadzor kakovosti odčitkov .....	60
3.2.6	Sestavljanje odčitkov v soseske .....	60
3.2.7	Sestavljanje nukleotidnih zaporedij genomov čebeljih virusov .....	60
3.2.8	Preverjanje sestavljanja nukleotidnih zaporedij genomov virusov in anotacije genomov.....	62
3.2.9	Poravnave nukleotidnih zaporedij genomov virusov in analiza raznolikosti.....	63
3.2.10	Filogenetske analize .....	63
3.3	POSKUSI NA ČEBELJIH LIČINKAH V <i>IN VITRO</i> POGOJIH.....	64
3.3.1	Izbor ličink .....	64
3.3.2	Zasnova poskusa .....	66
3.3.3	Priprava hrane za ličinke .....	68
3.3.4	Priprava virusnih inokulumov .....	68
3.3.4.1	Priprava inokuluma LSV3 .....	68
3.3.4.2	Priprava inokuluma SBV .....	68
3.3.5	Določanje prisotnosti in količine virusa v vzorčenih ličinkah z metodo RT-qPCR.....	69
3.3.6	Statistična obdelava podatkov poskusa na ličinkah .....	70
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>71</b>
4.1	KVANTIFIKACIJA ČEBELJIH VIRUSOV Z METODO RT-qPCR.....	71
4.1.1	LOD in LOQ metode RT-qPCR za LSV3 in SBV .....	71
4.1.2	Statistični parametri metode RT-qPCR za ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 in SBV .....	71
4.1.3	Primerjava števila kopij virusov pri klinično zdravih in obolelih čebeljih družinah.....	74
4.1.4	Odstotek pozitivnih vzorcev pri klinično zdravih in klinično obolelih čebeljih družinah .....	74
4.1.5	Ugotovljeno število kopij virusa pri klinično zdravih in klinično obolelih čebeljih družinah .....	75

4.2	DOLOČANJE NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ CELOTNIH GENOMOV ČEBELJIH VIRUSOV Z METODO NGS .....	79
4.2.1	Nukleotidna zaporedja celotnih genomov ABPV .....	80
4.2.2	Nukleotidna zaporedja celotnih genomov BQCV .....	85
4.2.3	Nukleotidna zaporedja celotnih genomov CBPV.....	89
4.2.4	Nukleotidna zaporedja celotnih genomov DWV.....	93
4.2.5	Nukleotidna zaporedja celotnih genomov LSV.....	98
4.2.6	Nukleotidno zaporedje celotnega genoma SBV.....	101
4.2.7	Nukleotidno zaporedje celotnega genoma ARV-1 .....	104
4.2.8	Nukleotidno zaporedje celotnega genoma BeeMLV.....	105
4.2.9	Nukleotidno zaporedje celotnega genoma HPLV34 .....	106
4.3	POSKUSI NA ČEBELJIH LIČINKAH V <i>IN VITRO</i> POGOJIH .....	106
4.3.1	Poskus s čebeljimi ličinkami, inokuliranimi z LSV3 v <i>in vitro</i> pogojih....	107
4.3.1.1	Umiranje ličink pri poskusu okužbe ličink z inokulumom LSV3 .....	107
4.3.1.2	Kontrolna skupina .....	108
4.3.1.3	Skupina ličink, ki je prejela nizek odmerek inokuluma LSV3 .	108
4.3.1.4	Skupina ličink, ki je prejela srednji odmerek inokuluma LSV3 .....	109
4.3.1.5	Skupina ličink, ki je prejela visok odmerek inokuluma LSV3 .	110
4.3.2	Poskus s čebeljimi ličinkami, inokuliranimi s SBV v <i>in vitro</i> pogojih .....	111
4.3.2.1	Umiranje ličink pri poskusu okuževanja ličink z inokulumom SBV .....	112
4.3.2.2	Kontrolna skupina .....	112
4.3.2.3	Skupina ličink, ki je prejela nizek odmerek inokuluma SBV ...	113
4.3.2.4	Skupina ličink, ki je prejela srednji odmerek inokuluma SBV .	114
4.3.2.4	Skupina ličink, ki je prejela visok odmerek inokuluma SBV ...	115
5	<b>RAZPRAVA .....</b>	<b>117</b>
5.1	PRIMERJAVA ŠTEVILA KOPIJ VIRUSA PRI ZDRAVIH IN OBOLELIH ČEBELJIH DRUŽINAH.....	117
5.2	NUKLEOTIDNA ZAPOREDJA CELOTNIH GENOMOV ČEBELJIH VIRUSOV .....	120

5.3	POSKUSI NA ČEBELJIH LIČINKAH .....	125
<b>6</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>130</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>132</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>134</b>
<b>9</b>	<b>ZAHVALE .....</b>	<b>136</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>138</b>
<b>11</b>	<b>PRILOGE.....</b>	<b>153</b>

**KAZALO SLIK**

Slika 1:	Zgradba celotnih genomov virusov ABPV in BQCV ter DWV in SBV .....	35
Figure 1:	Structure of complete genomes of ABPV and BQCV and DWV and SBV .....	35
Slika 2:	Matičnik z ličinko matice, ki je postala črna zaradi okužbe z BQCV .....	37
Figure 2:	Queen cell with queen bee larva which turned black due to the infection with BQCV.....	37
Slika 3:	Zgradba genoma CBPV, ki je sestavljen iz dveh fragmentov RNA1 in RNA2 ....	38
Figure 3:	Genome structure of CBPV consisting of two fragments RNA1 and RNA2 .....	38
Slika 4:	CBPV pod elektronskim mikroskopom .....	39
Figure 4:	CBPV through electronic microscope.....	39
Slika 5:	Deformirana krila čebele delavke, okužene z DWV.....	40
Figure 5:	Honeybee with wing deformities caused by infection with DWV. ....	40
Slika 6:	Zgradba genoma LSV, ki ima štiri odprte bralne okvirje, pri katerih se regije ORF1, ORF2 in ORF3 prekrivajo, ORF2 zapisuje RdRp, ORF3 pa kapsidni protein. ....	41
Figure 6:	Genome structure of LSV consisting of four ORF regions of which ORF1, ORF2 and ORF3 are overlapping. ORF2 encodes RdRp and ORF3 encodes capsid protein. ....	41
Slika 7:	Mrtva ličinka, okužena s SBV, ki se je spremenila v mešiček. ....	42
Figure 7:	Dead bee larva infected with SBV with liquid between the body and unshed skin in the shape of the sac.....	42
Slika 8:	Čebelnjak na lokaciji 3, iz katerega smo vzorčili zdrave čebelje družine. ....	52
Figure 8:	Apiary in location 3 from which we sampled healthy honeybee colonies.....	52
Slika 9:	Lokacije vzorčenja zdravih in obolelih čebeljih družin. ....	53
Figure 9:	Sampling locations of healthy and affected honeybee colonies. ....	53
Slika 10:	Obdelava podatkov, pridobljenih pri določanju nukleotidnega zaporedja celotnih genomov s tehnologijo Illumina, od pridobljenih odčitkov do rekonstrukcije celotnih genomov. ....	64
Figure 10:	Workflow of data analysis of complete genomes after Illumina sequencing from raw reads to reconstruction of whole genomes. ....	64
Slika 11:	Izbor vzorcev čebeljih ličink, starih od 24 do 48 ur, iz satja v juliju 2021 .....	65

Figure 11: Sample collection of 24 to 48 hours old honeybee larvae from the comb in July 2021.....	65
Slika 12: Čebelje ličinke, gojene v 96-jamičnih mikroploščah, stare tri dni. ....	66
Figure 12: Honeybee larvae reared in 96-well microplates, three days old.....	66
Slika 13: Grafični prikaz eksperimenta s čebeljimi ličinkami v <i>in vitro</i> pogojih. Na vsaki mikrotitrski plošči je 48 ličink.....	67
Figure 13: Graphical presentation of experiment with <i>in vitro</i> rearing of honeybee larvae. There are 48 larvae in each microplate.....	67
Slika 14: Standardna premica petih zaporednih desetkratnih razredčitev standarda LSV3.....	72
Figure 14: Standard line of five consecutive 10-fold dilutions of LSV3 standard. ....	72
Slika 15: Standardna premica petih zaporednih desetkratnih razredčitev standarda SBV. ....	72
Figure 15: Standard line of five consecutive 10-fold dilutions of SBV standard. ....	72
Slika 16: Odstotek pozitivnih vzorcev in povprečno število kopij virusov v log <sub>10</sub> /čebelo za ABPV (A, B), BQCV (C, D) in CBPV (E, F).....	77
Figure 16: Percentage of positive samples and average viral copy number in log <sub>10</sub> /bee for ABPV, (A, B), BQCV (C, D) and CBPV (E, F). ....	77
Slika 17: Odstotek pozitivnih vzorcev in povprečno število kopij virusov v log <sub>10</sub> /čebelo za DWV (A, B), LSV3 (C, D) in SBV (E, F).....	78
Figure 17: Percentage of positive samples and average viral copy number in log <sub>10</sub> /bee for DWV, (A, B), LSV3 (C, D) and SBV (E, F).....	78
Slika 18: Filogenetska primerjava 19 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov ABPV. Zaporedja ABPV, določena v tej raziskavi, so označena s pikami in krepko pisavo.....	82
Figure 18: Phylogenetic comparison of 19 nucleotide sequences of complete genomes of ABPV. Sequences of ABPV determined in this study are marked with dots and bold text. ....	82
Slika 19: Filogenetska primerjava 45 nukleotidnih zaporedij ABPV, določenih pri čebelah in čmrljih v Sloveniji, in sicer v regiji ORF1, ki zapisuje replikazo, v dolžini 408 nt. Nukleotidna zaporedja ABPV, določena v tej raziskavi, so označena s trikotniki in krepko pisavo .....	83

Figure 19: Phylogenetic comparison of 45 nucleotide sequences of ABPV determined in honeybees and bumblebees in Slovenia in ORF1 region, 408 nt long, which encodes replicase. ABPV sequences determined in this study are marked with triangles and bold text. ....	83
Slika 20: Filogenetske primerjave 21 nukleotidnih zaporedij (357 nt) ABPV, določenih pri čebelah v Sloveniji, v regiji ORF2, ki zapisuje kapsidni protein. Nukleotidna zaporedja ABPV, določena v tej raziskavi, so označena s trikotniki in krepko pisavo.. ....	84
Figure 20: Phylogenetic comparison of 21 nucleotide sequences (357 nt) of ABPV from honeybee samples determined in Slovenia in ORF2 region, which encodes capsid protein. Nucleotide sequences of ABPV determined in this study are marked with triangles and bold text. ....	84
Slika 21: Filogenetska primerjava 38 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov BQCV. Nukleotidna zaporedja BQCV, določena v tej raziskavi, so označena s pikami in krepko pisavo. ....	87
Figure 21: Phylogenetic comparison of 38 nucleotide sequences of complete genomes of BQCV. Strains of BQCV determined in this study are marked with dots and bold text. ....	87
Slika 22: Filogenetska primerjava 48 nukleotidnih zaporedij (653 nt) BQCV, določenih pri čebelah in čmrljih v Sloveniji, v regiji ORF2, ki zapisuje kapsidni protein. Zaporedja BQCV, določena v tej raziskavi, so označena s trikotniki in krepko pisavo. ....	88
Figure 22: Phylogenetic comparison of 48 nucleotide sequences (653 nt) of BQCV from honeybee samples determined in Slovenia in ORF2 region, which encodes capsid protein. BQCV sequences determined in this study are marked with triangles and bold text. ....	88
Slika 23: Filogenetska primerjava 33 nukleotidnih zaporedij RNA1 celotnih genomov CBPV.. ....	91
Figure 23: Phylogenetic comparison of 33 nucleotide sequences RNA1 of complete genomes of CBPV. ....	91
Slika 24: Filogenetska primerjava 33 nukleotidnih zaporedij RNA2 celotnih genomov CBPV. ....	92

Figure 24: Phylogenetic comparison of 33 nucleotide sequences RNA2 of complete genomes of CBPV. ....	92
Slika 25: Filogenetska primerjava 38 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov DWV. Nukleotidna zaporedja celotnih genomov, določena v tej raziskavi, so označena s pikami in krepko pisavo. ....	95
Figure 25: Phylogenetic comparison of 38 nucleotide sequences of complete genomes of DWV. Nucleotide sequences of complete genomes of DWV determined in this study are marked with dots and bold text. ....	95
Slika 26: Filogenetska primerjava 55 nukleotidnih zaporedij (573 nt) DWV (v regiji ORF, ki zapisuje helikazo), določenih pri čebelah v Sloveniji. Zaporedja DWV, določena v tej raziskavi, so označena s trikotniki in krepko pisavo. ....	96
Figure 26: Phylogenetic comparison of 55 nucleotide sequences (573 nt) of DWV (in ORF region which encodes helicase) from honeybee samples determined in Slovenia. DWV sequences determined in this study are marked with triangles and bold text. ....	96
Slika 27: Filogenetska primerjava 66 nukleotidnih zaporedij (471 nt) DWV (v regiji ORF, ki zapisuje protein L), določenih pri čebelah v Sloveniji. Zaporedja DWV, določena v tej raziskavi, so označena s trikotniki in krepko pisavo. ....	97
Figure 27: Phylogenetic comparison of 66 nucleotide sequences (471 nt) of DWV (in ORF region, which encodes L protein) from honeybee samples determined in Slovenia. DWV sequences determined in this study are marked with triangles and bold text. ....	97
Slika 28: Filogenetska primerjava 30 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov LSV. ....	99
Figure 28: Phylogenetic comparison of 30 nucleotide sequences of complete genomes of LSV. ....	99
Slika 29: Filogenetska primerjava 30 nukleotidnih zaporedij (557 nt) LSV (v regiji ORF2, ki zapisuje RdRp), določenih pri čebelah in čmrljih v Sloveniji. Zaporedja LSV, določena v tej raziskavi, so označena s trikotniki in krepko pisavo. ....	100
Figure 29: Phylogenetic comparison of 30 nucleotide sequences (557 nt) of LSV (in ORF2 region, which encodes RdRp) from honeybee and bumblebee samples	



	determined in Slovenia. LSV sequences determined in this study are marked with triangles and bold text. ....	100
Slika 30:	Filogenetska primerjava 56 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov SBV. ....	102
Figure 30:	Phylogenetic comparison of 56 nucleotide sequences of complete genomes of SBV. ....	102
Slika 31:	Filogenetska primerjava 26 nukleotidnih zaporedij (783 nt) SBV (v regiji ORF, ki zapisuje poliprotein), določenih pri čebelah in čmrljih v Sloveniji. Zaporedje SBV, določeno v tej raziskavi, je označeno s trikotnikom in krepko pisavo. ....	103
Figure 31:	Phylogenetic comparison of 26 nucleotide sequences (783 nt) of SBV (in ORF region, which encodes polyprotein) from honeybee and bumblebee samples determined in Slovenia. SBV sequence determined in this study is marked with triangle and bold text. ....	103
Slika 32:	Filogenetska primerjava 29 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov ARV-1. .	104
Figure 32:	Phylogenetic comparison of 29 nucleotide sequences of complete genomes of ARV-1. ....	104
Slika 33:	Filogenetska primerjava 6 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov BeeMLV. Nukleotidno zaporedje celotnega genoma, določenega v tej raziskavi, je označeno s piko in krepko pisavo. ....	105
Figure 33:	Phylogenetic comparison of 6 nucleotide sequences of complete genomes of BeeMLV. Nucleotide sequence of complete genome determined in this study is marked with dot and bold text. ....	105
Slika 34:	Število kopij LSV3 v log <sub>10</sub> kopij na ličinko pri mrtvih in živih ličinkah in število umrlih ličink na posamezen dan vzorčenja pri kontrolni skupini ličink, pri poskusu z LSV3. ....	108
Figure 34:	Copy number of LSV3 in log <sub>10</sub> copies/ larva in dead and alive larvae and number of dead larvae on every day of sampling in the control group in LSV3 experiment. ....	108
Slika 35:	Število kopij LSV3 v log <sub>10</sub> kopij na ličinko pri mrtvih in živih ličinkah in število umrlih ličink na posamezen dan vzorčenja pri skupini ličink, ki smo ji v hrano dodali nizek odmerek inokuluma LSV3. ....	109

- Figure 35: Copy number of LSV3 in log<sub>10</sub> copies/ larva in dead and alive larvae and number of dead larvae on every day of sampling in the group of larvae to which we applied low dose of LSV3 inoculum into their food..... 109
- Slika 36: Število kopij LSV3 v log<sub>10</sub> kopij na ličinko pri mrtvih in živih ličinkah in število umrlih ličink na posamezen dan vzorčenja pri skupini ličink, ki smo ji v hrano dodali srednji odmerek inokuluma LSV3..... 110
- Figure 36: Copy number of LSV3 in log<sub>10</sub> copies/ larva in dead and alive larvae and number of dead larvae on every day of sampling in the group of larvae to which we applied medium dose of LSV3 inoculum into their food..... 110
- Slika 37: Število kopij LSV3 v log<sub>10</sub> kopij na ličinko pri mrtvih in živih ličinkah in število umrlih ličink na posamezen dan vzorčenja pri skupini ličink, ki smo ji v hrano dodali visok odmerek inokuluma LSV3..... 111
- Figure 37: Copy number of LSV3 in log<sub>10</sub> copies/ larva in dead and alive larvae and number of dead larvae on every day of sampling in the group of larvae to which we applied high dose of LSV3 inoculum into their food..... 111
- Slika 38: Število kopij SBV v log<sub>10</sub> kopij na ličinko pri mrtvih in živih ličinkah in število umrlih ličink na posamezen dan vzorčenja pri kontrolni skupini ličink, pri poskusu z inokulumom SBV..... 113
- Figure 38: Copy number of SBV in log<sub>10</sub> copies/ larva in dead and alive larvae and number of dead larvae on every day of sampling in the control group in experiment with SBV inoculum. .... 113
- Slika 39: Število kopij SBV v log<sub>10</sub> kopij na ličinko pri mrtvih in živih ličinkah in število umrlih ličink na posamezen dan vzorčenja pri skupini ličink, ki smo ji v hrano dodali nizek odmerek inokuluma SBV..... 114
- Figure 39: Copy number of SBV in log<sub>10</sub> copies/ larva in dead and alive larvae and number of dead larvae on every day of sampling in the group of larvae to which we applied low dose of SBV inoculum into their food..... 114
- Slika 40: Število kopij SBV v log<sub>10</sub> kopij na ličinko pri mrtvih in živih ličinkah in število umrlih ličink na posamezen dan vzorčenja pri skupini ličink, ki smo ji v hrano dodali srednji odmerek inokuluma SBV. .... 115

- Figure 40: Copy number of SBV in log<sub>10</sub> copies/ larva in dead and alive larvae and number of dead larvae on every day of sampling in the group of larvae to which we applied medium dose of SBV inoculum into their food. .... 115
- Slika 41: Število kopij SBV v log<sub>10</sub> kopij na ličinko pri mrtvih in živih ličinkah in število umrlih ličink na vsak dan vzorčenja pri skupini ličink, ki smo ji v hrano dodali visok odmerek inokuluma SBV. .... 116
- Figure 41: Copy number of SBV in log<sub>10</sub> copies/ larva in dead and alive larvae and number of dead larvae on every day of sampling in the group of larvae to which we applied high dose of SBV inoculum into their food. .... 116

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Znanstvena klasifikacija kranjske čebele. ....	29
Table 1: Scientific classification of the Carniolan honeybee. ....	29
Tabela 2: Zaporedja oligonukleotidnih začetnikov in sond, uporabljenih pri metodi RT-qPCR. ....	57
Table 2: Nucleotide sequences of primers and probes used in RT-qPCR method. ....	57
Tabela 3: Zgradba standardov, uporabljenih pri metodi RT-qPCR. ....	57
Table 3: Structure of standards, used in RT-qPCR method. ....	57
Tabela 4: Izbor pozitivnih vzorcev za NGS na podlagi vrednosti Ct pri ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 in SBV ter dobljenega zaporedja sekvenciranja po Sangerju. ....	61
Table 4: Selection of positive samples for NGS according to Ct values of ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV and nucleotide sequences determined by Sanger sequencing method. ....	61
Tabela 5: Podatki o inokulumu LSV3 in SBV, ugotovljeni v dveh poskusih. ....	69
Table 5: Inoculum data of LSV3 and SBV from two experiments. ....	69
Tabela 6: Statistični parametri o uporabljeni metodi RT-qPCR za kvantifikacijo virusov ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 in SBV z uporabo serije desetkratnih zaporednih razreditev standarda in po treh ločenih ponovitvah. ....	73
Table 6: Statistical parameters for adequacy of RT-qPCR method for quantification of ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV obtained from 10-fold dilutions of the standard and three separate repetitions. ....	73
Tabela 7: Odstotek pozitivnih vzorcev čebeljih družin s prisotnostjo ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 in SBV, določenih z metodo RT-qPCR, glede na vsako lokacijo vzorčenja zdravih čebeljih družin posebej in skupaj. ....	75
Table 7: Percentage of positive samples of honeybee colonies for ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV tested by RT-qPCR method for each of the sampling locations of healthy honeybee colonies individually and together. ....	75
Tabela 8: Odstotek pozitivnih vzorcev čebeljih družin s prisotnostjo ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 in SBV, določenih z metodo RT-qPCR pri klinično zdravih in obolelih čebeljih družinah. ....	75

---

Table 8: Percentage of positive samples of honeybee colonies for ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV tested by RT-qPCR method in healthy and affected honeybee colonies. ....	75
Tabela 9: Število kopij LSV3 v kontrolnih ličinkah, odvzetih na dan presajanja ličink iz satja, na začetku poskusa z inokulumom LSV3.....	107
Table 9: Copy number of LSV3 in control larvae sampled on the day of larvae grafting on the beginning of experiment and repetition of experiment of inoculation with LSV3.....	107
Tabela 10: Število kopij SBV v kontrolnih ličinkah, odvzetih na dan presajanja ličink iz satja, na začetku poskusa z inokulumom SBV. ....	112
Table 10: Copy number of SBV in control larvae sampled on the day of larvae grafting in the beginning of experiment with SBV inoculum. ....	112

## SEZNAM OKRAJŠAV

ABPV	virus akutne paralize čebel (angl. <i>acute bee paralysis virus</i> )
ARV-1	Apis rhabdovirus 1
AmFv	Filamentozni virus čebel (angl. <i>Apis mellifera filamentous virus</i> )
BeeMLV	Bee Macula-like virus
BQCV	virus črnih matičnikov (angl. <i>black queen cell virus</i> )
CBPV	virus kronične paralize čebel (angl. <i>chronic bee paralysis virus</i> )
CBPSV	satelitski virusi kronične paralize čebel (angl. <i>chronic bee paralysis satellite viruses</i> )
Ct	točka, v kateri signal fluorescence poročevalske molekule bistveno naraste in prečka linijo fluorescenčnega praga (angl. <i>threshold cycle</i> )
ddNTP	dideoksinukleotidi
DWV	virus deformiranih kril (angl. <i>deformed wing virus</i> )
EURL	referenčni laboratorij Evropske unije
+G	angl. <i>gamma distributed</i>
GenBank	genska banka
GTR	angl. <i>general time reversible</i>
HKY	Hasegawa-Kishono-Yano
HPLV34	Hubei partiti-like virus 34
+I	angl. <i>evolutionarily invariable</i>
IAPV	izraelski virus akutne paralize (angl. <i>Israeli acute paralysis virus</i> )
kb	kilobaza
KBV	kašmirski virus čebel (angl. <i>Kashmir bee virus</i> )
LOD	meja zaznavanja (angl. <i>limit of detection</i> )
LSV	virus Lake Sinai
LOQ	meja kvantifikacije (angl. <i>limit of quantification</i> )
ONT	angl. <i>Oxford Nanaopore technology</i>
ORF	odprt bralni okvir (angl. <i>open reading frame</i> )
RdRp	od RNA odvisna polimeraza RNA
RT-PCR	reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo

---

RT-qPCR	kvantitativna metoda reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo v realnem času
SMRT	angl. <i>single molecule real-time sequencing</i>
T92	Tamura 3-parameter
TN93	Tamura-Nei
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	metoda naslednje generacije sekvenciranja (angl. <i>next generation sequencing</i> )
nt	nukleotid
NVI	Nacionalni veterinarski inštitut
SBPV	virus počasne paralize čebel (angl. <i>slow bee paralysis virus</i> )
SBV	virus mešičkaste zalege (angl. <i>sacbrood bee virus</i> )
ssRNA	enovijačna pozitivno polarna molekula RNA (angl. <i>single strand RNA</i> )
UVHVVR	Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin
VDV-1	virus varoje destruktor 1 (angl. <i>varroa destructor virus 1</i> )
VF UL	Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

## 1 UVOD

Čebele spadajo med najpomembnejše opraševalce rastlin in proizvajajo čebelje pridelke, ki jih človek uporablja za prehrano in lajšanje zdravstvenih težav. Virusne okužbe čebel se pogosto omenja v povezavi z obolevanjem, prezgodnjim umiranjem in propadom čebeljih družin. Nekateri čebelji virusi povzročajo klinično sliko obolenja čebel s paralizo, deformiranimi krili, skrajšano življenjsko dobo ali odmrtnje celotne čebelje družine. Drugi čebelji virusi povzročajo klinično nezaznavne do blage oblike okužbe, pri nekaterih virusih pa njihova patogeneza še ni dovolj raziskana. Virusne okužbe čebeljih družin najpogosteje ugotavljamo pri pašnih čebelah, klinični znaki pa so pogosto povezani s povečanim številom varoj (Ball, 1985). V svetu je bilo odkritih več kot 30 različnih vrst čebeljih virusov, v Sloveniji smo dokazali prisotnost osmih različnih čebeljih virusov. V čebeljih družinah smo dokazali virus akutne paralize čebel (angl. *acute bee paralysis virus* – ABPV), virus črnih matičnikov (angl. *black queen cell virus* – BQCV), virus kronične paralize čebel (angl. *chronic bee paralysis virus* – CBPV), virus deformiranih kril (angl. *deformed wing virus* – DWV), virus Lake Sinai (angl. *Lake Sinai virus* – LSV), virus mešičkaste zalege (angl. *sacbrood bee virus* – SBV) in kašmirski virus čebel (angl. *Kashmir bee virus* – KBV) (Cizelj in Gregorič, 2004; Toplak in sod., 2012; Jamnikar Ciglencečki, 2013; Toplak in sod., 2016a; Jamnikar Ciglencečki in sod., 2018).

Metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) v realnem času so razvili za določanje (Blanchard in sod., 2007) in kvantifikacijo čebeljih virusov (Benjeddou in sod. 2001; Balkonyi in sod., 2002; Chantawannakul in sod., 2006; Blanchard in sod., 2007; Blanchard in sod., 2012; Jamnikar Ciglencečki in sod., 2012; Blanchard in sod., 2013; Schurr in sod., 2019). Kvantitativna metoda RT-PCR v realnem času (RT-qPCR) je nadgradnja metode reverzne transkripcije in polimerazne verižne reakcije (RT-PCR) (de Miranda in sod., 2013), ki omogoča hitrejšo, bolj specifično in bolj občutljivo diagnostiko čebeljih virusov. Z metodo RT-qPCR lahko relativno ali absolutno določimo število kopij posamezne vrste čebeljega virusa v vzorcih. V evropskem referenčnem laboratoriju za čebelje bolezni (ANSES, Francija) so razvili in preverili protokole ter napisali priporočila za kvantifikacijo čebeljih virusov (ABPV, BQCV, CBPV, SBV in DWV – genotip A in B) (NF U47-600-2, 2015; Schurr in sod., 2017; Schurr in sod., 2019). Oceno zanesljivosti in specifičnosti metode RT-qPCR za virus CBPV so izvedli v okviru medlaboratorijske primerjave na podlagi rezultatov 21 laboratorijev, od tega je bilo 16



evropskih referenčnih laboratorijev za čebelje bolezni (Schurr in sod., 2017). EURL organizira vsakoletno medlaboratorijsko primerjavo metode RT-qPCR za določanje in kvantifikacijo čebeljih virusov ABPV, BQCV, CBPV, DWV in SBV v nacionalnih referenčnih laboratorijih za čebelje bolezni (Schurr in sod., 2019).

Metoda sekvenciranja naslednje generacije (NGS) se uporablja za odkrivanje novih virusov, bakterij, določanje nukleotidnih zaporedij celotnih genomov ter na vseh drugih področjih genetike. Priprava vzorcev navadno zahteva mehansko (filtracija, ultracentrifugiranje) ali encimsko (nukleaze) predobdelavo, s čimer lahko povečamo zastopanost virusnega genetskega materiala v primerjavi z ostalimi odčitki (Galbraith in sod., 2018). Metagenomski pristop omogoča vpogled v genetski material celotne mikrobne raznolikosti (mikrobiote), ki se nahaja v vzorcu, brez predhodnega poznavanja vrste mikroorganizmov. Pri metagenomskem pristopu največkrat naključno določamo nukleotidna zaporedja celokupne nukleinske kisline (angl. *random shotgun metagenomic sequencing*) (Oulas in sod., 2015). Z NGS so v zadnjem desetletju določili prisotnost številnih čebeljih virusov in opisali nove viruse, kot so LSV, Aphid Lethal Paralysis virus in Big Sioux River virus (Runckel in sod., 2011). NGS so v preteklosti uspešno uporabili tudi v Sloveniji, ko so iz vzorca propadle čebelje družine določili nukleotidno zaporedje prvega celotnega genoma CBPV (Jamnikar Ciglencečki in sod., 2017). Iz istega vzorca so določili tudi nukleotidno zaporedje prvega celotnega genoma LSV3 (Šimenc in sod., 2020).

Eksperimentalne okužbe omogočajo študije patogeneze posameznega patogena oziroma več patogenov skupaj, imunološke študije, raziskovanje učinkov in stranskih učinkov zdravil ter mnoge druge raziskave, so pa zahtevne za izvedbo, zato je celo v novejši literaturi o tem le malo objav. Začetnik eksperimentalnih poskusov na čebelah v *in vitro* pogojih je bil Britanec Bailey, ki je že leta 1963 raziskoval patogenezo čebeljih virusov ABPV in CBPV pri odraslih čebelah (Bailey in sod., 1963). V *in vitro* pogojih lahko odrasle čebele ali njihove razvojne stopnje gojimo, dodajamo različne patogene in hkrati sledimo porabi hrane, vedenju, razvoju in preživetju. Pri večini eksperimentalnih poskusov so uporabili odrasle čebele delavke, ker jih je lažje gojiti (Toplak in sod., 2013; Dolezal in sod., 2016; Tehel in sod., 2022), nekatere eksperimentalne poskuse pa so izvedli na čebeljih ličinkah (Aupinel in sod., 2005) ali čebeljih bubah (Hou in sod., 2014).

## Zasnova raziskave

Naša raziskava je potekala v treh sklopih:

1. Kvantifikacija čebeljih virusov z metodo RT-qPCR v vzorcih klinično zdravih in klinično obolelih čebeljih družin za dokaz šestih čebeljih virusov, in sicer ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 in SBV.
2. Določanje nukleotidnih zaporedij celotnih genomov čebeljih virusov iz pozitivnih vzorcev z metodo NGS.
3. Eksperimenti na čebeljih ličinkah, gojenih v *in vitro* pogojih, z inokulacijo LSV3 in SBV *per os*.

V prvem sklopu raziskave smo s kvantitativno metodo RT-qPCR testirali vzorce obolelih čebeljih družin, s sumom na virusno okužbo, ter vzorce čebeljih družin brez kliničnih znakov. Določali smo prisotnost šestih čebeljih virusov in natančno število kopij virusov v posameznem vzorcu. Metodo RT-qPCR za dokaz prisotnosti ABPV, BQCV, CBPV in DWV smo povzeli po objavljenem protokolu evropskega referenčnega laboratorija za čebelje bolezni (ANSES, Francija). Uporaba metode RT-qPCR za LSV3 in SBV še ni bila razvita do te mere, da bi jo lahko v naši raziskavi uporabili za kvantifikacijo, zato smo sami razvili in uvedli začetne oligonukleotide, sodni TaqMan in standarda za kvantitativno metodo tudi za ta dva čebelja virusa. Izvedli smo statistične primerjave rezultatov, da bi ugotovili morebitne značilne razlike med številom kopij posameznih virusov, ugotovljenih pri klinično zdravih in klinično obolelih čebeljih družinah.

Pri drugem sklopu smo z metodo NGS iz nekaterih pozitivnih vzorcev, v katerih smo ugotovili enega ali več čebeljih virusov, ki so bili predhodno testirani z metodo RT-qPCR, določili nukleotidna zaporedja celotnih genomov različnih čebeljih virusov ter tudi določili nove vrste virusov, ki jih do sedaj pri čebeljih družinah v Sloveniji še niso določili. Nato smo izvedli filogenetske primerjave ugotovljenih nukleotidnih zaporedij celotnih genomov z zaporedji genomov iz genske banke (GenBank) ter primerjave krajših odsekov genomov, ki so jih predhodno določili v Sloveniji in po svetu, za prikaz njihove sorodnosti. V predhodnih molekularno-epidemioloških študijah so odkrili številne genetske linije ABPV, BQCV, DWV, LSV in SBV v Sloveniji (Jamnikar Ciglencečki in sod., 2013; Jamnikar Ciglencečki in sod., 2018; Šimenc in sod., 2020; Toplak in sod., 2020), zato določitev novih nukleotidnih zaporedij

celotnih genomov čebeljih virusov v Sloveniji predstavlja nove izvirne znanstvene podatke o linijah, ki so prisotne v Sloveniji.

V tretjem sklopu raziskave smo izvedli poskuse na čebeljih ličinkah v *in vitro* pogojih z inokulacijo virusnih inokulumov LSV3 in SBV *per os*. Izbira teh dveh virusov za eksperimentalno okužbo je temeljila na domnevi, da je SBV močno patogen za čebelje ličinke, LSV3 pa pogosto prisoten, vendar slabo raziskan čebelji virus. Čebelje ličinke so morda primeren model za spremljanje okužbe s posameznimi čebeljimi virusi in študije patogeneze, saj so ličinke od vseh razvojnih stopenj čebel najmanj okužene z virusi ali pa so za virusne okužbe manj dovzetne. Zaradi tega so morda manj primeren model za proučevanje virusnih okužb (Aupinel in sod., 2005; Gregorc in sod., 2012; Jamnikar Ciglencečki, 2013; Jamnikar Ciglencečki in sod., 2014). Pri ličinkah smo v razvojni stopnji od ličinke do bube spremljali umiranje ličink ter dnevno vzorčili ličinke, ki smo jih v nadaljevanju testirali s kvantitativno metodo RT-qPCR, s katero smo spremljali potek okužbe in pomnoževanje virusov.

V doktorski disertaciji smo postavili naslednje hipoteze:

- 1) Število kopij posameznega virusa (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV in SBV) je višje pri čebeljih družinah s klinično sliko kot pri čebeljih družinah brez klinične slike.
- 2) Pri čebeljih družinah bomo z metodo NGS prvič ugotovili prisotnost nekaterih virusov v Sloveniji.
- 3) Z metodo NGS bomo določili nukleotidna zaporedja celotnih genomov nekaterih čebeljih virusov.
- 4) Pomnoževanje SBV po inokulaciji zalege je odvisno od števila kopij virusa v inokulumu.
- 5) Pomnoževanje LSV po inokulaciji zalege ni odvisno od števila kopij virusa v inokulumu.

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 MEDONOSNA ČEBELA

Medonosna čebela je edina žuželka, ki je človek ni udomačil, a z njo sobiva v harmoniji, kjer imata tako človek kot čebela drug od drugega medsebojne koristi. Medonosno čebelo (*Apis mellifera*) je leta 1758 prvi poimenoval švedski znanstvenik, botanik in taksonom Carl Linne.

**Tabela 1: Znanstvena klasifikacija kranjske čebele.**

Table 1: Scientific classification of the Carniolan honeybee.

Deblo:	členonožci ( <i>Arthropoda</i> )
Razred:	žuželke ( <i>Insecta</i> )
Red:	kožokrilci ( <i>Hymenoptera</i> )
Podred:	čebelam podobni kožokrilci ( <i>Apocrita</i> )
Naddružina:	čebele ( <i>Apoidea</i> )
Družina:	prave čebele ( <i>Apidae</i> )
Poddružina:	čebele medarice, sršeni ( <i>Apinae</i> )
Rod:	čebele ( <i>Apis</i> )
Vrsta:	medonosna čebela ( <i>Apis mellifera</i> )
Podvrsta:	kranjska čebela ( <i>Apis mellifera carnica</i> )

### 2.2 KRANJSKA ČEBELA (*Apis mellifera carnica*)

Kranjska čebela ali *Apis mellifera carnica* je slovenska avtohtona rasa čebele, ki so jo prvič opisali konec 19. stoletja in izvira iz območja takratne dežele Kranjske (Pollmann, 1879). Danes je razširjena v državah srednje Evrope in umetno naseljena v druge države po svetu. V Sloveniji ima status zaščitene podvrste, zato vnos drugih podvrst v državo ni dovoljen (Resolucija o zaščiti kranjske čebele, 2014). Za italijansko čebelo je druga najbolj razširjena podvrsta čebel v svetu. Zaradi svojih pozitivnih lastnosti ter umirjenega značaja je izjemno priljubljena med čebelarji, ne samo v Sloveniji, ampak tudi v tujini (Tomašec, 1949; Sulimanović in Jenčič, 1996). Ima vitko telo in temno rjave zadkove obročke, na katerih so sive dlačice. Za čebelarstvo so ugodne njene lastnosti: miren značaj, majhna poraba zimske hrane, hiter spomladanski razvoj, usmerjenost k izkoriščanju paše v gozdu, dobra orientacija in da v panju ni nagnjena k

pretirani propolizaciji, njena neugodna lastnost pa je nagnjenost k rojenju (Sulimanović in Jenčič, 1996; Gregorc, 2002).

## 2.3 ČEBELJA DRUŽINA

Čebela kot posameznica ni sposobna preživeti, zato živi v socialni skupnosti oziroma družini, v kateri vsaka žuželka predstavlja del celote. Čebelja družina je skupnost ene matice, do 60.000 čebel delavk, ki se jim v določenih obdobjih leta pridruži še nekaj sto trotov, ter nepokrite in pokrite zalege. Čebele so genetsko prilagojene na delitev dela in se hitro prilagajajo vplivom okolja. Med seboj se sporazumevajo s feromoni, zvočnimi in vizualnimi dražljaji. S tako imenovanim pašnim plesom, z gibanjem po krožnici, vrtenjem zadka in tresenjem kril, pa sporočajo lokacijo izvora paše (Gregorc, 2002). Za razvoj in preživetje čebelje družine čebele potrebujejo okoli 70 kilogramov medu in od 20 do 30 kilogramov cvetnega prahu na leto. Za preživetje v neugodnih razmerah leta z nizkimi temperaturami, slabim vremenom in pomanjkanjem paše si čebele ustvarijo zalogo medu in cvetnega prahu, zato so zanimive za človeka.

### 2.3.1 Pomen matice

Matica je mati vseh čebel in edina prava samica v čebelji družini. Je dvakrat večja kot čebele delavke. Njeno telo meri do 30 mm, neoplojena je težka 220 mg, oplojena pa 320 mg. V trebušni votlini matice se nahajata dva izredno razvita jajčnika. Matica se razvije iz oplojenega jajčeca, enako kot čebele delavke, a s to razliko, da je njena celica v satju matičnik, ki ga čebele delavke zgradijo, da bi vzgojile novo matico, njena prehrana pa je v fazi ličinke sestavljena izključno iz matičnega mlečka. Spolno dozori po petih do desetih dneh od poleganja, nato izleti na svatbeni ples, kjer jo oplodijo troti. Matica izleti večkrat, dokler ni zadosti oplojena, nato pa panja praviloma ne zapušča več. Matica lahko zaleže do 2000 jajčec v 24 urah, v eni sezoni pa zaleže do 200.000 jajčec. Iz oplojenih jajčec se razvijejo čebele delavke ali nova matica, iz neoplojenih pa troti. Ena čebelja družina ima le po eno matico, ki živi do pet let, vendar pri intenzivnem čebelarjenju matico čebelarji zamenjajo po dveh letih (Sulimanović in Jenčič, 1996).

### 2.3.2 Čebele delavke

V čebelji družini je daleč največ čebel delavk, saj jih je v eni družini lahko do 70.000. Čebele delavke izvajajo večino aktivnosti znotraj in zunaj panja. Velike so od 13 do 15 mm ter težke približno 100 mg. To so spolno nerazvite samice, ki se enako kot matica razvijejo iz oplojenih jajčec, vendar je njihova hrana v obdobju ličinke tri dni sestavljena iz matičnega mlečka, naslednje tri dni pa iz mešanice medicīne, peloda in vode. Čebele delavke v poletnem obdobju živijo približno pet tednov, v zimskem pa več mesecev, zato jih delimo na poletne in zimske čebele delavke. Prvih 21 dni življenja čebele delavke večino časa preživijo v panju, kjer grejejo zalego, čistijo celice, hranijo zalego, negujejo in hranijo matico, gradijo satje in stražijo panj. Po desetih dneh življenja pričnejo z orientacijskimi poleti, po 21 dneh pa postanejo pašne čebele z nalogo prinašanja medicīne, cvetnega prahu in vode v panj.

### 2.3.3 Troti

Troti so samci v čebelji družini, ki se razvijejo iz neoplojenih jajčec, ki jih matica zaleže v večje celice, tako imenovane celice trotovske zalege. Čebelja družina jih začne vzrejati pozno spomladi in na vrhuncu pašne sezone je lahko v eni družini do 1000 trotov. Troti so veliki do 17 mm in težki okoli 200 mg, z debelejšim telesom, okroglo glavo in dobro razvitimi krili in očmi. So brez žela in imajo zelo kratek rilček. Spolno dozori po desetih dneh in živijo približno 60 dni. V panju ne opravljajo nobene posebne naloge, edina njihova naloga je, da oplodijo matico. Po parjenju umrejo ali pa jih čebele delavke ob koncu aktivne pašne sezone izženejo iz panja. Troti so pomembni tudi za selekcijo čebel, saj prenašajo svoje dedne lastnosti na matico, na delavke v prvi generaciji potomstva in na trote v drugi generaciji (Tomašec, 1949; Gregorc, 2002).

## 2.4 RAZVOJ ČEBELJE DRUŽINE

Razvoj čebelje družine se začne pri čebelji matici, ki zalega po vrsti v vsako celico, v obliki krožnice, od sredine sata proti robu, zato je pravilno zaležena površina sata strnjena in enake starosti. Iz jajčeca se po treh dneh razvije ličinka, ki jo delavke zalijejo z matičnim mlečkom. Prve tri dni se vse ličinke prehranjujejo z matičnim mlečkom, nato pa se začnejo ličinke čebel delavk in trotov hraniti z mešanico medicīne, peloda in vode, ličinke matic pa se do prehoda v

fazo bube prehranjujejo le z matičnim mlečkom. Celotno obdobje hranjenja ličink traja pri matici pet, pri delavki šest in pri trotu sedem dni. Ko ličinke prenehajo jesti, se iztrebijo in se uleknejo vzdolž satne celice. Sledi doba bube ali nimfe, ko čebele delavke pokrijejo celico s pokrovom iz voska, čeprav v zadnjem času opažajo vedno več bub v celicah brez pokrova. Ličinke v tej fazi razvoja popolnoma obmirujejo in se preobrazijo v odrasle čebele, pri delavki faza bube traja 12 dni, pri trotu 13 do 14 in pri matici 8 do 9 dni, tako da celoten razvoj pri čebeli delavki poteka 21 dni, pri trotu 24 in pri matici 16 dni. V tem času se čebela popolnoma razvije, potemni in se na koncu razvoja pregrize skozi pokrovček na plan, medtem ko troti in matice pokrovček izžagajo v enem kosu (Sulimanović in Jenčič, 1996; Gregorc, 2002).

## 2.5 DELO ČEBELARJA

Čebelarstvo je v Sloveniji tradicionalna kmetijska dejavnost, katere cilj je pridobivanje čebeljih pridelkov, kot so med, matični mleček, cvetni prah in propolis. Vendar pa pobiranje čebeljih produktov obsega le manjši del čebelarških opravil. Čebelar mora svoje čebelje družine redno pregledovati, čistiti čebelnjake, dohranjevati čebele in zatirati njihove škodljivce. Čebelarska opravila so točno določena po posameznih mesecih in so v skladu z razvojem čebelje družine preko leta. Delo čebelarja zahteva veliko časa, znanja in čuta za čebele. Redni natančni pregledi čebeljih družin so pomembni za zgodnje odkrivanje bolezni čebel, kot so varoza in huda gniloba čebelje zalege. Delo čebelarjev je zelo odgovorno, saj je lahko prav ravnanje čebelarjev vzrok za prenose bolezni, predvsem hude gnilobe čebelje zalege ter virusnih okužb med posameznimi panji istega čebelnjaka in med čebelnjaki istega čebelarja, in sicer preko kontaminirane čebelarske opreme. Prenos bolezni se lahko zgodi tudi med čebelnjaki različnih čebelarjev, s prodajo okuženih matic ali čebeljih družin. Da bi čebelje bolezni hitro odkrili, preprečevali njihovo širjenje ter zagotovili pravočasno zdravljenje čebel, imamo v Sloveniji organizirano veterinarsko službo Nacionalnega veterinarskega inštituta (NVI) VF UL, ki skrbi za zdravstveno varstvo čebel v Sloveniji. Med nalogami veterinarjev, specializiranih za zdravstveno varstvo čebel, je najpomembnejše zatiranje varoze in hude gnilobe, ki je predpisano s Programom ukrepov na področju čebelarstva v RS.

## 2.6 ČEBELARSTVO V SLOVENIJI

V Sloveniji ima čebelarstvo zelo dolgo tradicijo, saj je prvi razcvet doživelo že v 18. stoletju, ko ga je na Kranjskem razvijal Peter Pavel Glavar, na Dunaju pa je slovenske čebelarske izkušnje v svet prenašal Anton Janša. Listina ljubljanskega mestnega arhiva potrjuje, da so v letih 1753 in 1754 na cesarski tehtnici v Ljubljani pretehtali 593.975 funtov medu (332,6 tone). V 19. stoletju pa se je razvila tudi trgovina s čebelami. Emil Ravenegg oziroma baron Rotschütz je okoli leta 1870 izvozil več kot 17.000 rojev čebel na leto. Mihael Ambrožič iz Mojstrane pa je pred prvo svetovno vojno izvozil prek 70.000 rojev in neznano število matic (Rihar, 1956). Leta 1939 je imela na takratnem področju Dravske banovine vsaka tretja kmetija čebele. Poleg tega pa čebelnjak s poslikavami panjskih končnic, ki jih drugi narodi ne poznajo, predstavlja neprecenljivo arhitekturno in kulturno dediščino. Po podatkih centralnega registra čebelnjakov je bilo oktobra 2020 v Sloveniji 11.293 čebelarjev, ki so imeli 213.581 čebeljih družin. V letu 2020 je imel vsak čebelar v povprečju 17,48 čebelje družine. Prevladujoči način čebelarjenja uporablja Alberti-Žnideršičeve panje ali AŽ-panje, kjer je naseljenih kar 90 % čebeljih družin. Po podatkih Statističnega urada je bilo v Sloveniji leta 2020 pridelanih 1293 ton medu, od tega 34 ton ekološkega medu.

## 2.7 BOLEZNI ČEBELJE DRUŽINE

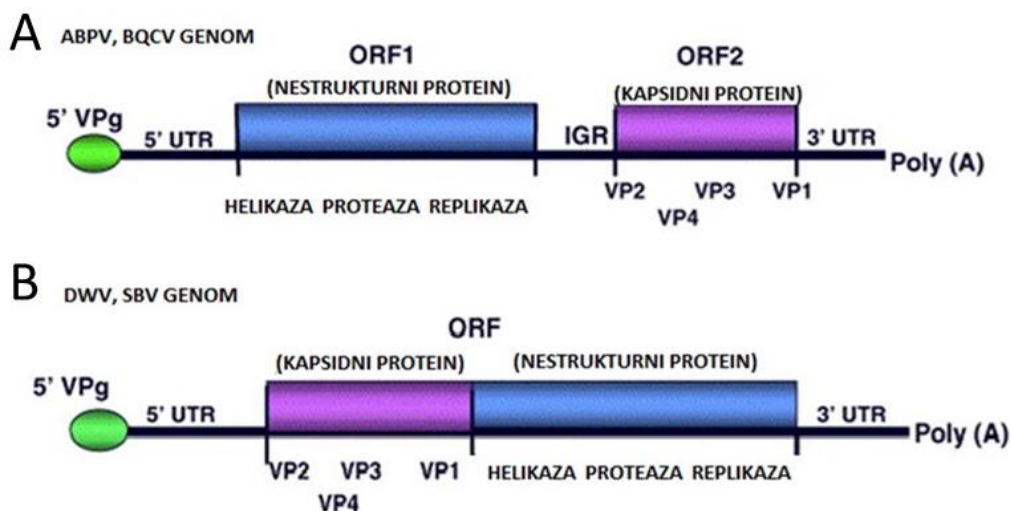
Medonosne čebele imajo obrambne mehanizme, ki jim do določene mere omogočajo zaščito pred čebeljimi boleznimi. V prvi vrsti je to anatomska in fiziološka zaščita s hitinom, dlavicami, peritrofno membrano, hemociti, interferoni in encimi, k zaščiti pa prispevajo tudi vedenjski vzorci čebel, kot so čiščenje, propoliziranje in umiranje zunaj panja. Veliko vlogo pri zaščiti čebel pa imajo tudi matični mleček, propolis, pelod in med. Bolezni čebel se prenašajo s srečevanjem čebel na istih cvetovih, ropom čebel, prenosom med različnimi starostnimi kategorijami čebel, s prenosi preko kontaminirane čebelarske opreme in prodajo okuženih čebeljih družin, le redke bolezni pa se prenašajo z matice na zalego. Bolezni čebel, ki niso kužne narave, so prehlajena zalega, pregreta zalega, majska bolezen, bolezen gozdne paše in druge nekužne bolezni. Kužne bolezni pa povzročajo zajedavci (varoja – *Varroa destructor*, nosema – *Nosema apis*, *Nosema ceranae*), bakterije (*Paenibacillus larvae* – huda gniloba čebelje zalege, *Melissococcus plutonius* – pohlevna gniloba čebelje zalege), glive in virusi. Na zdravje



čebelje družine vplivajo tudi drugi čebelji škodljivci, kot so glodavci, ptice, netopirji in sršeni ter dejavniki okolja, kot so to onesnaženost zraka, pesticidi in kemikalije.

### 2.7.1 Čebelji virusi

Večina čebeljih virusov, razen filamentoznega virusa čebel (angl. *Apis mellifera filamentous virus* – AmFV), ki je edini velik čebelji virus DNA, je zgrajenih v obliki malih izometričnih virusnih delcev v velikosti okoli 30 nm, ki vsebujejo le eno pozitivno polarno molekulo RNA, ki služi kot mRNA pri sintezi proteinov (Bailey in Ball, 1991). Pred nedavnim odkrit Apis Rhabdovirus pa ima molekulo RNA, ki je negativno polarna (Walker in sod., 2015). Američan White je prvi opisal čebelje viruse kot povzročitelje čebeljih bolezni. Odkril je filtrabilne delce pri vzorcu obolele zalege, pri kateri je šlo za okužbo s SBV (White, 1913). Britanec Bailey pa je v drugi polovici 20. stoletja prvi bolj natančno raziskal in opisal čebelje viruse, prvi je izvajal različne poskuse na čebelah in njihovih ličinkah. V zadnjem desetletju se je predvsem znanje o genetski raznolikosti čebeljih virusov zelo povečalo, kar so omogočile nove molekularne metode ugotavljanja nukleotidnih zaporedij delov ali celotnih virusnih genomov. Do leta 2022 je bilo opisanih nekaj več kot 30 vrst različnih čebeljih virusov. Med najbolj poznane spadajo ABPV, BQCV, CBPV, DWV in SBV. Na sliki 1 je prikazana zgradba genomov ABPV, BQCV, DWV in SBV, ki vsebujejo strukturne kapsidne proteine (VP1, VP2, VP3, VP4) in nestrukturne proteine (helikazo, proteazo in replikazo). Genoma ABPV in BQCV vsebujeta dva odprta bralna okvirja (angl. *open reading frame* – ORF), in sicer ORF1 in ORF2, ki po prevajanju tvorita dva ločena poliproteina (strukturni in nestrukturni poliprotein), ki ju kasneje proteaze razcepijo na posamične proteine. Genoma DWV in SBV pa vsebujeta po en ORF, zato po prevajanju nastane enoten poliprotein, ki ga kasneje proteaze razcepijo na strukturne in nestrukturne proteine (Chen in sod., 2006).



Slika 1: Zgradba celotnih genomov virusov ABPV in BQCV ter DWV in SBV (Chen in sod., 2006).

Figure 1: Structure of complete genomes of ABPV and BQCV and DWV and SBV (Chen et al., 2006).

### 2.7.1.1 Virus akutne paralize čebel

ABPV je eden izmed najpogosteje proučevanih in pomembnih virusov čebelje družine. Spada v družino *Dicistroviridae* in rod *Aparavirus*, kamor uvrščamo tudi kašmirski virus čebel (angl. *Kashmir bee virus* – KBV) in izraelski virus akutne paralize čebel (angl. *Israeli acute paralysis virus* – IAPV) (Valles in sod., 2017). ABPV je majhen ikozaedrični ribovirus brez ovojnice in vsebuje eno pozitivno polarno molekulo RNA. Nukleotidno zaporedje celotnega genoma ABPV sestavlja približno 9500 nukleotidov (nt) in vsebuje dva odprta bralna okvirja (ORF1 in ORF2), ki pri prevajanju tvorita dva ločena poliproteina (nestrukturni poliprotein in strukturni poliprotein), ki ju kasneje proteaze razcepijo na posamične proteine (slika 1).

Okužbo z ABPV so opisovali kot manj pomembno subklinično okužbo čebel, pogosto prisotno pri čebeljih družinah, vendar je predvsem v povezavi s hudimi infestacijami z varojo pridobila na svoji pomembnosti (Ball in sod., 1988; Békési in sod., 1999). Pri direktnem injiciranju samo 100 kopij virusa v hemolimfo čebel se pojavijo hudi znaki okužbe, ki lahko povzročijo paralizo okuženih čebel, smrt v nekaj dneh in posledično propad čebeljih družin (Bailey in sod., 1963). Virus se akumulira v čebelji glavi, možganih in hipofaringealnih žlezah, infektivni odmerek ABPV za čebele delavke so našli tudi v pelodu, ki so ga nabrale okužene čebele (Bailey, 1976).

V Sloveniji so naredili raziskavo, pri kateri so med leti 2007 in 2010 odvzeli vzorce iz 248 čebeljih družin, iz 134 čebelnjakov v petih različnih geografskih območjih Slovenije. Ugotovili so prisotnost ABPV v 42,3 % čebeljih družin in določili krajša nukleotidna zaporedja ABPV v regijah ORF1 in ORF2. S primerjavo 54 nukleotidnih zaporedij ABPV v regiji ORF2 in 29 zaporedij v regiji ORF1 so dokazali dve različni skupini ABPV: SLO1 (od 98,6 do 100-odstotno identični v regiji ORF2 in od 98,5 do 100-odstotno identični v regiji ORF1) in SLO2 (od 99,4 do 100-odstotno identični v regiji ORF2 in od 99,8 do 100-odstotno v regiji ORF1). Pri tem je bila skupina SLO2 povezana s hujšimi kliničnimi znaki, obe skupini pa sta bili naključno porazdeljeni po območju Slovenije (Jamnikar Ciglencečki in sod., 2013). V drugi raziskavi, ki so jo izvedli v Sloveniji med leti 2017 in 2018, so ABPV ugotovili pri 8,8 % vzorcev divjih čmrljev in 62,5 % vzorcev čebel (Toplak in sod., 2020). Izvedli so filogenetske primerjave nukleotidnih zaporedij v regiji ORF1, ki kažejo na 99,3 do 100-odstotno genetsko identičnost sevov ABPV, ugotovljenih pri čmrljih s sevi, opisanimi pri čebelah na podlagi nukleotidnih zaporedij (Toplak in sod., 2020). Na Hrvaškem so v letu 2018 ugotovili ABPV pri 3,7 % divjih čmrljev (Tlak Gajger in sod., 2021).

### 2.7.1.2 Virus črnih matičnikov

BQCV je eden izmed najpogosteje ugotovljenih virusov v čebeljih družinah. Je majhen virus iz družine *Dicistroviridae* in rodu *Triatovirus* z nukleotidnim zaporedjem genoma v velikosti približno 8500 nt, ki ima podobno razporeditev genov kot genom ABPV (Valles in sod., 2017) (slika 1). Okužba s tem virusom je v večini primerov subklinična in je pogosto ugotovljena pri čebelah delavkah in zalegi. Ob hkratni prisotnosti črevesnega parazita mikrosporidija (*Nosema apis* ali *Nosema ceranae*) se virus močno namnoži in skrajša življenje čebel v večji meri, kot se to zgodi pri sami okužbi z nosemo (Ball in Bailey, 1999). Okužba z BQCV posebej prizadene ličinke matic, ki v matičnikih odmrejo in postanejo črne, po čemer je virus dobil ime (Bailey in Woods, 1977) (slika 2). BQCV so ugotovili tudi pri čmrljih in divjih čebelah (McMahon in sod., 2015; Radzevičiūtė in sod., 2017; Singh in sod., 2010) ter dokazali aktivno okužbo pri vsaj eni vrsti čmrlja in več vrstah čebel samotark (Peng in sod., 2011; Radzevičiūtė in sod., 2017).

V študiji pojavnosti virusov v obolelih čebeljih družinah v Sloveniji med leti 2007 in 2009 so ugotovili prisotnost BQCV v 83,3 % vzorcev čebel (Toplak in sod., 2012). Med letoma 2017

in 2018 so BQCV ugotovili pri 100 % zdravih čebel, vzorčenih na travnikih, in 58,1 % divjih čmrljev. V tej raziskavi so potrdili tudi od 98,5 do 100-odstotno identičnost sevov BQCV med čmrlji in čebelami v Sloveniji, v regiji ORF2, ki zapisuje kapsidni protein (Toplak in sod., 2020). Na Hrvaškem so BQCV ugotovili kar pri 88,89 % divjih čmrljev (Tlak Gajger in sod., 2021).

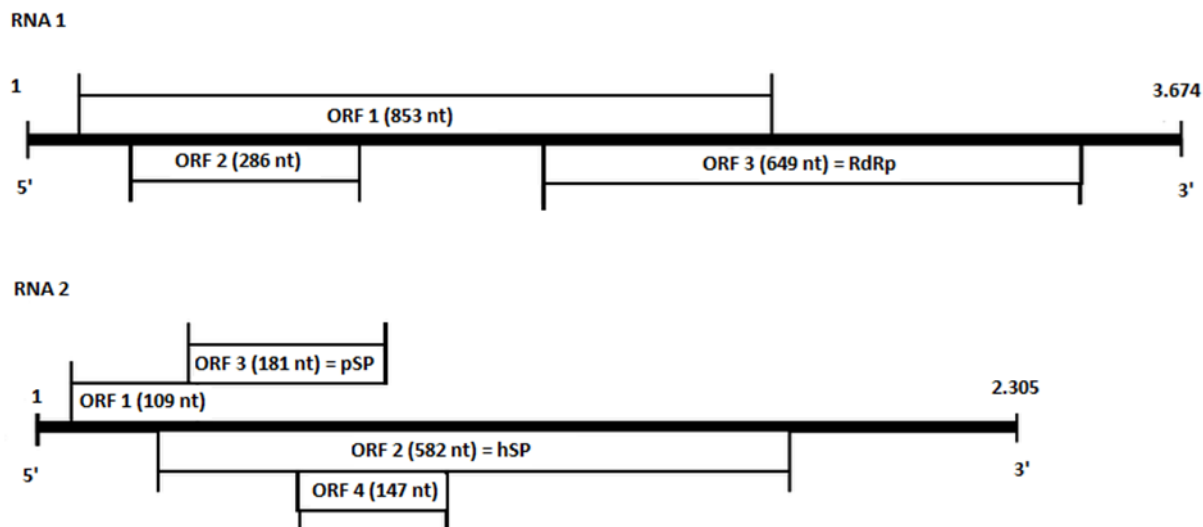


**Slika 2:** Matičnik z ličinko matice, ki je postala črna zaradi okužbe z BQCV (BeAware, 2022).

Figure 2: Queen cell with queen bee larva which turned black due to the infection with BQCV (BeAware, 2022).

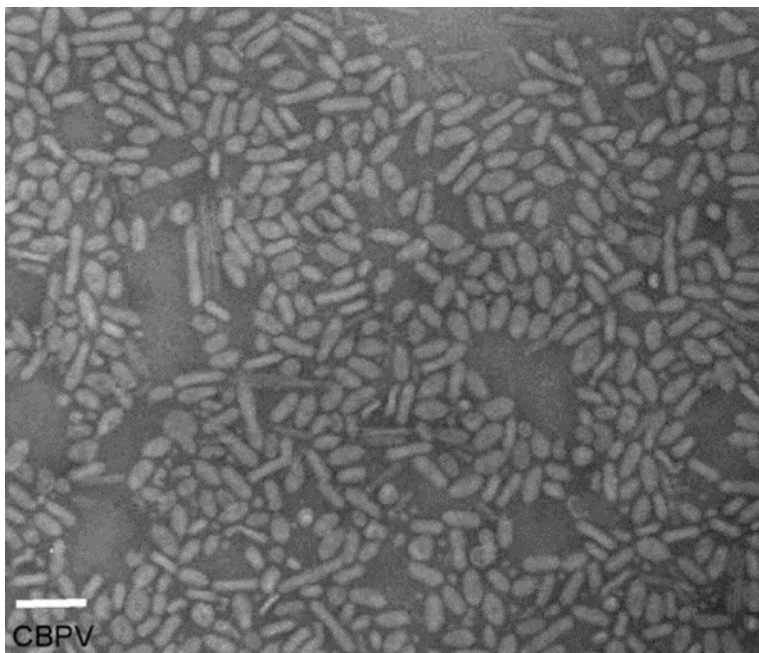
### 2.7.1.3 Virus kronične paralize čebel

Okužbe s CBPV se pri čebeljih družinah pojavljajo sporadično in povzročajo hude paralize ter izgube čebeljih družin. Zaradi posebne zgradbe genoma virusa ta virus še ni klasificiran v nobeno družino ali rod. Glede na zgradbo zelo ohranjene regije genoma, ki zapisuje od RNA odvisno polimerazo RNA (RdRp), pa kaže podobnosti z družinama *Nodaviridae* in *Tombusviridae* (Olivier in sod., 2008). Genom virusa CBPV je bil sprva opisan kot segmentiran genom, sestavljen iz petih enovijačnih fragmentov RNA, dveh daljših RNA1 in RNA2, dolgih 4200 in 2800 nt, ter treh krajših RNA fragmentov, dolgih 1100 nt (slika 3). V nadaljnjih raziskavah so ugotovili, da so ti krajši fragmenti RNA satelitski virusi (angl. *chronic bee paralysis satellite viruses* – CBPSV). Ti satelitski virusi so bili najprej najdeni pri insektih in njihovo pomnoževanje poteka le ob prisotnosti CBPV.



**Slika 3: Zgradba genoma CBPV, ki je sestavljen iz dveh fragmentov RNA1 in RNA2 (Chevin in sod., 2015).**  
Figure 3: Genome structure of CBPV consisting of two fragments RNA1 and RNA2 (Chevin et al., 2015).

Izbruhi CBPV se najpogosteje pojavljajo v spomladanskih in poletnih mesecih, virus pa povezujejo tudi z izgubami čebel preko zime (Antúnez in sod., 2005). Klinična slika bolezni je izrazita pri čebelah delavkah in se pojavlja v dveh oblikah. Prva, akutna oblika, se kaže v trepetanju kril in telesa, paralizi, nezmožnosti letenja in plazenju čebel pred panjem, z rahlo razširjenimi dislociranimi krili in napihnjenim abdomnom. Druga, kronična oblika, se kaže z melanizacijo kutikule (potemnele čebele), izgubo dlačic, kar okuženim čebelam daje videz manjših, črnih, svetlečih čebel, pri tem čebele ne morejo več leteti in umrejo v nekaj dneh (Ball in Bailey, 1999). V isti čebelji družini se lahko pojavita obe obliki hkrati, znaki pa so podobni kot pri zastrupitvi (Schurr in sod., 2017). Eksperimentalna okužba zimskih čebel delavk s CBPV in *Nosema ceranae* je potrdila pomnoževanje virusa in povečano smrtnost pri okuženih čebelah, patogenost virusa pa se poveča v kombinaciji z nosemo (Jamnikar Ciglencečki, 2013; Toplak in sod., 2013). V letu 2010 so iz vzorca propadle čebelje družine določili prvo nukleotidno zaporedje celotnega genoma CBPV v Sloveniji, in sicer M92/2010 (KY937971 in KY937972) (Jamnikar Ciglencečki in sod., 2017). To je tudi prvo nukleotidno zaporedje celotnega genoma kateregakoli čebeljega virusa, določenega v Sloveniji.



**Slika 4: CBPV pod elektronskim mikroskopom** (Ball in Bailey, 1999).

Figure 4: CBPV through electronic microscope (Ball and Bailey, 1999).

#### **2.7.1.4 Virus deformiranih kril**

DWV je pogosto ugotovljen pri čebeljih družinah. Je majhen virus ssRNA iz družine *Iflaviridae*, iz rodu *Iflavirus*, kamor spadata tudi SBV in virus počasne paralize čebel (angl. *slow bee paralysis virus* – SBPV) (Valles in sod., 2017). Genom DWV je dolg 10.100 nt, vsebuje en ORF, ki se prepiše v enoten poliprotein, iz katerega nastanejo strukturni in nestrukturni proteini (slika 1). Okužba z DWV je močno povezana z infestacijo čebeljih družin z varojo, čeprav se izgube odraslih čebel, matic, zalege in celotnih čebeljih družin lahko pojavijo tudi v odsotnosti varoje. Okužba čebel z DWV je lahko subklinična, lahko pa povzroči deformacije kril v fazah razvoja čebel in skrajšuje njihovo življenjsko dobo (de Miranda in sod., 2010; Benaets in sod., 2017). Določili so več genotipov DWV, ki so jih razdelili na DWV-A, DWV-B in DWV-C (Ongus in sod., 2004; Valles in sod., 2017).

Prisotnost DWV so potrdili tudi pri čmrljih (*Bombus terrestris*, *Bombus pascuorum*), pri katerih so opazili podobne znake deformiranih kril kot pri čebelah (Genersch in sod., 2006; Toplak in sod., 2020; Tlak Gajger in sod., 2021). V Sloveniji so pri čebeljih družinah in v varojah med leti 2007 in 2014 določili 61 zaporedij DWV s 471 nukleotidi v regiji ORF, ki zapisujejo protein L, in 50 zaporedij DWV s 573 nukleotidi, ki zapisujejo helikazo. Filogenetske analize teh

sekvenc so pokazale veliko genetsko podobnost, in sicer od 92,8 do 100-odstotno podobnost v regiji, ki zapisuje protein L, in od 95,3 do 100-odstotno v regiji helikaze med sevi DWV, ugotovljenimi pri čebelah in pri varoji, kar potrjuje pomembno vlogo varoje pri prenosu DWV (Jamnikar Ciglencečki in sod., 2018).

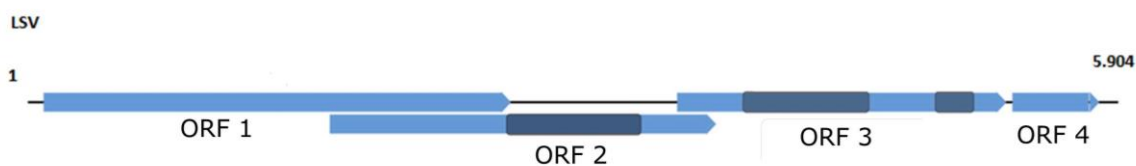


**Slika 5: Deformirana krila čebele delavke, okužene z DWV (Prime Bees, 2018).**

Figure 5: Honeybee with wing deformities caused by infection with DWV (Prime Bees, 2018).

#### **2.7.1.5 Virus Lake Sinai**

LSV je bil prvič ugotovljen in opisan pri opazovanju čebel in proučevanju čebeljih virusov v Združenih državah Amerike med letoma 2008 in 2009 (Daughenbaugh in sod., 2015). LSV še ni uvrščen v nobeno družino oziroma rod, njegov genom pa je sestavljen iz približno 5900 nt in vsebuje štiri prekrivajoče se regije ORF (slika 6).



**Slika 6: Zgradba genoma LSV, ki ima štiri odprte bralne okvirje, pri katerih se regije ORF1, ORF2 in ORF3 prekrivajo, ORF2 zapisuje RdRp, ORF3 pa kapsidni protein.**

Figure 6: Genome structure of LSV consisting of four ORF regions of which ORF1, ORF2 and ORF3 are overlapping. ORF2 encodes RdRp and ORF3 encodes capsid protein.

Patogenost LSV še ni dobro raziskana, vendar so okužbe z LSV lahko povezane z izgubami čebeljih družin. Čebele so pogosto nosilke velikega števila kopij virusa LSV, vendar niso še nobenih očitnih kliničnih znakov povezali z okužbo (Bigot in sod., 2017; Cornman in sod., 2019; Traynor in sod., 2016). V Sloveniji so LSV ugotovili z metodo RT-PCR pri 75,92 % pregledanih vzorcev čebeljih družin in pri 17,07 % vzorcev čmrljev. Ugotovili so tri različne genetske linije tega virusa: LSV1, LSV2 in LSV3, od katerih je LSV3 v Sloveniji najpogosteje ugotovljena linija (57,69 %). Iz vzorca propadle čebelje družine iz leta 2010 (M92/2010) so določili nukleotidno zaporedje celotnega genoma LSV3, ki je dostopen v genski banki (MG918125), kar dokazuje, da je LSV3 krožil v čebelji populaciji že leta 2010 (Šimenc in sod., 2020). Ugotovili so veliko genetsko raznolikost LSV (od 74,51 % do 99,82 %), ki kroži po Sloveniji. Pri čebelah in čmrljih so v Sloveniji ugotovili skoraj enaka nukleotidna zaporedja LSV, ki imajo od 98,20 do 99,64-odstotno identičnost zaporedja nukleotidov v regiji ORF2, ki zapisuje RdRp (Toplak in sod., 2020). V genski banki NCBI je bilo do leta 2022 shranjenih več kot 90 zaporedij celotnih genomov virusa LSV, ki se delijo na osem različnih genetskih linij (Šimenc in sod., 2020).

### 2.7.1.6 Virus mešičkaste zalege

Bolezen, ki jo povzroča SBV, je prva čebelja bolezen, ki so jo pripisali virusnemu povzročitelju (White, 1913). Virus spada v družino *Iflaviridae* in rod *Iflavirus*. Ima genom v velikosti približno 8800 nt, z enim ORF, ki kodira enoten poliprotein (slika 1). SBV povzroča značilno klinično sliko pri okužbi čebeljih ličink, saj se te po okužbi ne zabubijo, začne se nabirati tekočina med telesom in kutikulo, ličinke se spremenijo v mešiček, ki se po njihovi smrti posuši v lusko (Bailey in sod., 1969). Najbolj občutljive za okužbo so dva dni stare čebelje ličinke, ki



se z virusom okužijo preko kontaminirane hrane (Hitchcock, 1966). Starejše kot so čebele, manj patogen je zanje virus, vendar pa se virus množi tudi v odraslih čebelah. Pri čebelah delavkah, razen krajše življenjske dobe, okužba ne povzroča kliničnih znakov (Bailey, 1969). Virus se množi predvsem v predelu glave čebele in se akumulira v hipofaringealnih žlezah (Bailey, 1969; Mussen in Furgala, 1977). Čebele delavke prenesejo SBV na ličinke, ko jih hranijo z matičnim mlečkom, ki ga izločajo iz teh žlez (Bailey, 1969). Odmrle ličinke vsebujejo velike količine virusa (do  $10^{12}$  kopij na ličinko), vendar v panju najdemo le posamezne odmrle ličinke, ker jih čebele zaradi močnega čistilnega nagona hitro odstranijo. Virus se prenaša od čebele do čebele z vsemi čebeljimi pridelki, predvsem s pelodom, matičnim mlečkom in medom. Širjenje virusa se lahko omeji tudi s spremembo obnašanja čebel v okuženi družini, ki prenehajo jesti in hraniti ličinke. SBV prenaša tudi varoja. S filogenetsko primerjavo 25 nukleotidnih zaporedij SBV v regiji, ki zapisuje poliprotein, so potrdili 100-odstotno identičnost zaporedij nukleotidov SBV pri čebelah in čmrljih v Sloveniji (Toplak in sod. 2020).



**Slika 7: Mrtva ličinka, okužena s SBV, ki se je spremenila v mešiček** (Mendelu Faculty of Agrisciences, 2022).

Figure 7: Dead bee larva infected with SBV in the shape of the sac (Mendelu Faculty of Agrisciences, 2022).

#### **2.7.1.7 Apis rhabdovirus-1**

ARV-1 je, za razliko od prej opisanih čebeljih virusov, virus z negativno polarno molekulo RNA in ovojnico, ki je značilna za rhabdoviruse, v dolžini od 100 do 430 nm, s premerom od 10 do 45 nm. Pri čebelah, čmrljih in varoji na področju Evrope, Afrike, Azije in Avstralije sta bili opisani dve različici tega virusa, in sicer ARV-1 in ARV-2, iz družine *Rhabdoviridae* in

rodu *Mononegavirales* (Remnant in sod., 2017). Celotni genom ARV-1 meri približno 15.000 nt in zapisuje pet ORF, ki se med seboj ne prekrivajo in ki zapisujejo pet strukturnih proteinov: RdRp (L), fosforiliran fosfoprotein (P), nukleoprotein (N), protein matriksa (M) in glikoprotein ovojnice (G) (Walker in sod., 2015). Raziskovalci so ugotovili, da se ARV-1 aktivno razmnožuje tako v čebelah kot tudi v varojah, našli pa so ga tudi v divjih čmrljih. Ugotovili so, da se pojavlja v 20 % čebeljih družin, do sedaj okužb še niso povezali s kliničnimi znaki pri čebeljih družinah (Levin in sod., 2017).

#### **2.7.1.8 Bee Macula-like virus**

BeeMLV so prvič opisali kot nov virus, najden pri čebelah in varojah, ki je genetsko soroden družini *Tymoviridae*, kamor spadajo predvsem rastlinski virusi. Genom virusa je velik 6500 nt in ima poliadeniliran konec ter prekrivajoče regije ORF, ki zapisujejo kapsidni protein, protein P15 in hipotetični poliprotein. Virus so ugotovili v francoskih čebeljakih, v Skandinaviji pa ga ni bilo. Virus se množi tako v čebelah kot tudi v varojah, ki so domnevni gostitelj in vektor virusa, patogeneza tega virusa pa še ni razjasnjena (de Miranda in sod., 2015). V genski banki NCBI je bilo do leta 2022 objavljenih pet nukleotidnih zaporedij celotnih genomov BeeMLV, ugotovljenih pri čebeljih družinah v Franciji, na Kitajskem in ZDA ter pri varoji na Kitajskem, ni pa še nobenega podatka o prisotnosti tega virusa v Sloveniji.

#### **2.7.1.9 Hubei partiti-like virus 34**

Je majhen pozitivno polarni enovijačni virus RNA, ki so ga prvič opisali pri zemeljskem polžu iz kitajske province Hubei in je še neklasificiran virus družine *Riboviridae*. Genom virusa obsega približno 1500 nt, opisan pa je le en ORF, ki vključuje zapis za RdRp. Do leta 2022 so v gensko banko NCBI shranili le dve nukleotidni zaporedji celotnih genomov tega virusa. Prvega, WHWN68514 (KX884207), so določili pri zemeljskem polžu na Kitajskem, drugega, HPLV/V1/2018/ITA (MT747982), pa pri azijskem sršenu (*Vespa velutina*) v Italiji.

## 2.8 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA VIRUSNIH OKUŽB Z MOLEKULARNIMI METODAMI

Zaradi nespecifičnih kliničnih znakov je določeno virusno okužbo čebeljih družin zelo težko ugotoviti le na podlagi odstopanj od zdrave čebelje družine, zato čebelarji pogosto ne zaznajo virusne okužbe (Tentcheva in sod., 2004; Chen in sod., 2004; Berenyi in sod., 2006). Do leta 1995 so za ugotavljanje prisotnosti virusov v čebeljih družinah uporabljali serološke metode, kot je Ouchterjev test gelske difuzije, test ELISA in test indirektna imunofluorescence – test IF (Allen in sod., 1986; Allen in Ball, 1995). Pri teh metodah je zaradi nizke občutljivosti in specifičnosti pogosto prihajalo do napačne interpretacije rezultatov. Po letu 2000 so se začele intenzivno razvijati številne molekularne metode, ki so v novejših raziskavah postale vodilne (Grabenstiner in sod., 2001; Benjeddou in sod., 2001; Bakonyi in sod., 2002; Ribière in sod., 2002; Cizelj in Gregorčič, 2004; Topley in sod., 2005; Yue in Genersch, 2005; Antunez in sod., 2006; Berenyi in sod., 2006; Blanchard in sod., 2007; Forgách in sod., 2008; Haddad in sod., 2008; Weinstein Teixeira in sod., 2008; Gisder in sod., 2009; Martin in sod., 2010; Toplak in sod., 2012). Dokazi različnih čebeljih virusov v preiskovanih vzorcih temeljijo na visoko občutljivih in specifičnih metodah RT-PCR in RT-PCR v realnem času (Chantawannakul in sod., 2006; Jamnikar Ciglencečki in Toplak, 2012; Šimenc in sod., 2021). Posamezne čebelje viruse filogenetsko primerjajo na podlagi rezultatov Sangerjevega sekvenciranja, nukleotidna zaporedja njihovih celotnih genomov pa določajo z metodo NGS (Palacios in sod., 2008; Olivier in sod., 2008; Choe in sod., 2012; Jamnikar Ciglencečki in Toplak, 2013; Šimenc in sod., 2020; Toplak in sod. 2020; Tlak Gajger in sod., 2021).

### 2.8.1 Metoda RT-PCR v diagnostiki čebeljih virusov

Revolucija v razvoju molekularnih metod na področju molekularne biologije se je začela leta 1983, ko je Kary Mullis odkril metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) in zanj leta 1993 prejel Nobelovo nagrado za kemijo (Mullis, 1990). S pomočjo PCR lahko pomnožimo določene odseke DNA od nekaj začetnih kopij, do več milijonov kopij v nekaj urah, s čimer dobimo zadostno količino genetskega materiala za nadaljnjo analizo, na primer za Sangerjevo sekvenciranje (Linz in sod., 1990). Dokazovanje virusnega genoma z metodo PCR temelji na pomnoževanju specifičnega odseka virusnega genoma, kar omogoča pravilna izbira dveh kratkih odsekov nukleinske kisline (t. i. začetnih oligonukleotidov), komplementarnih na

začetku in koncu odseka, ki ga želimo pomnožiti (Eles in sod., 1992). Metoda je sestavljena iz ponavljajočih se ciklov, v katerih prihaja do sinteze novih molekul DNA. Vsak cikel je sestavljen iz denaturacije dvojne vijačnice DNA, vezave začetnih oligonukleotidov in sinteze komplementarne verige DNA, kar poteka v termopomnoževalniku, v katerem izbiramo temperature ter trajanje in število ciklov. Pri dokazovanju virusov RNA pa moramo pred izvajanjem metode PCR še prepisati virusno molekulo RNA v komplementarno molekulo DNA z reverzno transkripcijo (RT). Produkate reakcije PCR po končanem pomnoževanju analiziramo z elektroforezo na agaroznem gelu.

Ena prvih aplikacij metode za dokaz virusnega povzročitelja bolezni, ki je temeljila na metodi RT-PCR, je bila uporaba za dokazovanje KBV (Stoltz in sod., 1995). Od takrat naprej je potekal hiter razvoj in v novejšem obdobju vsa diagnostika čebeljih virusov temelji na molekularnih metodah. V letu 2010 so v virološkem laboratoriju Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani uporabili metodo RT-PCR za dokaz petih čebeljih virusov (ABPV, BQCV, CBPV, DWV in SBV). V letu 2010 so v sklopu programa Nacionalnega veterinarskega inštituta (NVI) pregledali 117 vzorcev čebel iz 91 obolelih čebeljih družin z različnih področij Slovenije. Ugotavljali so prisotnost nukleinskih kislin petih čebeljih virusov, in sicer z metodo RT-PCR (Toplak in sod., 2010). Leta 2015 pa so v dogovoru z Upravo za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR) v okviru odredbe pregledali 197 vzorcev čebel mrtvic, varoj in vzorcev odmrle čebelje zalege in z metodo RT-PCR iskali prisotnost petih čebeljih virusov (Toplak in sod., 2016a). Obe raziskavi sta podali osnovne podatke o razširjenosti čebeljih virusov pri kranjski čebeli v Sloveniji.

### **2.8.2 Sekvenciranje po Sangerju**

S sekvenciranjem po Sangerju določimo zaporedje nukleotidov v preiskovanem produktu DNA, ki ga predhodno pomnožimo v termopomnoževalniku, in sicer s tehniko dodajanja kemijsko modificiranih fluorescenčno označenih nukleotidov. Po končani sekvenčni reakciji mešanico različno dolgih fragmentov ločimo s kapilarno elektroforezo. Po obdelavi podatkov dobimo natančno zaporedje nukleotidov zelenega fragmenta DNA. To metodo je leta 1977 razvil angleški biokemik Friederik Sanger, za kar je prejel tudi Nobelovo nagrado za kemijo (Sanger in sod., 1977). Metoda je 40 let ostala vodilna metoda določanja nukleotidnih zaporedij,

v novejšem času pa jo postopoma nadomeščajo metode sekvenciranja naslednje generacije (Toplak, 2004).

### **2.8.3 Metoda RT-PCR v realnem času**

Metoda RT-PCR v realnem času je nadgradnja metode RT-PCR, kjer lahko spremljamo pomnoževanje produktov že med samo reakcijo, saj so produkti označeni s fluorescenčnimi barvili, pri katerih izmerjena fluorescenca eksponentno narašča sorazmerno z nastajanjem produktov (Kubista in sod., 2006). Ta metoda je bolj specifična in občutljiva kot konvencionalna metoda RT-PCR, omogoča pa tudi analizo večjega števila vzorcev ter zmanjša možnost kontaminacije zaradi zaprtega sistema, brez zaključnega prikazovanja produktov na gelu.

### **2.8.4 Kvantitativna metoda RT-PCR v realnem času**

Pri metodi RT-qPCR lahko natančno določimo število kopij virusa v preiskovanem vzorcu. To nam omogoča uporaba desetkratne razredčitve standarda z znanim številom kopij želenega odseka DNA, ki ga poleg vzorcev dodamo v vsako izvedbo reakcije RT-PCR v realnem času. Interpretacijo rezultatov prikažemo z logaritmom 10 ( $\log_{10}$ ) števila kopij na čebelo oziroma vzorec. Pri ugotavljanju virusnih bolezni ni pomembno le dokazovanje nukleinskih kislin virusa, ampak tudi ugotavljanje količine virusa v čebeli. V prvih objavljenih študijah virusnih okužb pri čebelah so z metodo RT-PCR ugotavljali predvsem prevalenco posameznih virusov (Tentcheva in sod., 2004; Jamnikar Ciglencečki in sod., 2014) ali relativno kvantifikacijo s kemijo Sybr Green (Desai in sod., 2015; Molineri in sod., 2017). Metoda TaqMan, absolutna kvantifikacija čebeljih virusov, je dvignila diagnostiko čebeljih virusnih bolezni na višji nivo in postaja vsesplošno uporabna pri diagnostiki in raziskovanju. Zanesljivost, natančnost in primerljivost na novo uvedene metode so prvič preverili z medlaboratorijsko kontrolo v EURL za čebelje bolezni (ANSES, EURL), ki je vključevala 16 različnih nacionalnih referenčnih laboratorijev za čebelje bolezni, in sicer za kvantifikacijo CBPV (Schurr in sod., 2017). Leta 2019 je EURL postavil tudi prve smernice za kvantifikacijo čebeljih virusov (ABPV, BQCV, CBPV, DWV in SBV), za katere so načrtovane letne medlaboratorijske kontrole in mednarodna sodelovanja (Schurr in sod., 2019).

## 2.8.5 Sekvenciranje naslednje generacije

Sekvenciranje naslednje generacije (angl. *next-generation sequencing* – NGS) oziroma sekvenciranje visokih zmogljivosti je tehnologija določanja nukleotidnega zaporedja (sekvenciranja) velikega števila zaporedij DNA. Je hitro razvijajoča se tehnologija, ki jo delimo na dve glavni skupini, to sta sekvenciranje druge in tretje generacije. Sekvenciranje druge generacije je določanje nukleotidnega zaporedja kratkih, namnoženih fragmentov DNA. Sekvenciranje tretje generacije pa je določanje nukleotidnega zaporedja posameznih daljših fragmentov DNA, na primer s tehnologijo MinION (Oxford Nanopore Technologies, Velika Britanija).

Vzporedno sekvenciranje kratkih (100–150 bp) klonalno namnoženih fragmentov DNA (sekvenciranje druge generacije) je najbolj uporabljena in razširjena različica metode, za katero je na voljo več različnih tehnologij, kot sta Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, ZDA) in Illumina (ZDA), vodilna tehnologija na trgu (Levy and Myers, 2016). Tehnologija temelji na določanju zaporedja DNA s polimerazo DNA, zato je tehnologija označena kot sekvenciranje s sintezo (Besser in sod., 2018). Za sekvenciranje je na voljo več platform, ki so prilagojene različnim potrebam uporabnikov, sekvenatorji pa omogočajo hkratno sekvenciranje več milijonov fragmentov DNA.

Najnovejše tehnologije določanja nukleotidnih zaporedij pa temeljijo na sekvenciranju dolgih fragmentov DNA (t. i. sekvenciranje tretje generacije), brez predhodnega klonalnega pomnoževanja in brez fragmentacije. Vodilni tehnologiji sekvenciranja tretje generacije sta Oxford Nanopore Technology (ONT, Združeno kraljestvo) in SMRT (angl. *single molecule real-time sequencing*, Pacific Biosciences, ZDA) (Eid in sod., 2009). Pri obeh tehnologijah dolžina odčitkov presega 50 kb.

### 2.8.5.1 Priprava knjižnic NGS

Knjižnice so zbir kratkih, klonalno namnoženih fragmentov DNA, ki imajo na vsakem koncu DNA vezan oligonukleotid z znanim zaporedjem – adapter. Na adapterja se veže matrična DNA, na katero so vezani komplementarni oligonukleotidi, na matrično DNA pa se veže DNA-polimeraza. Še en oligonukleotid z znanim zaporedjem, ki ga imenujemo črna koda DNA

(angl. *barcode*), je ponavadi priključen adapterjem in specifično označuje vsak vzorec ter omogoča hkratno sekvenciranje več vzorcev (angl. *multiplexing*). Priprava knjižnic se začne z mehansko (ultrasonifikacija) ali encimsko (tagmentacija s kompleksom Transposome pri tehnologiji Illumina) fragmentacijo DNA. Po mehanski fragmentaciji in pred vezavo adapterjev je potrebno encimsko popravilo koncev DNA, ki zapolni vrzeli. Po vezavi adapterjev in črtnih kod pa poteka izbor fragmentov določene dolžine (angl. *size selection*) ter njihova pomnožitev z metodo PCR.

### 2.8.5.2 Tehnologija Illumina

Tehnologija Illumina (Illumina/Solexa, ZDA) je vodilna tehnologija sekvenciranja kratkih fragmentov DNA (75–300 bp). Temelji na klonalnem pomnoževanju fragmentov DNA s premostitvenim PCR (angl. *bridge PCR*) na površini pretočne celice (angl. *flow cell*). Pri tem nastanejo gruče klonov, ki jih sekvenciramo po vrsti, nukleotid za nukleotidom. V vsakem ciklu sekvenciranja se k matrični DNA dodajo štirje fluorescenčno označeni dideoksinukleotidi (angl. *dideoxynucleotide*, ddNTP), ki imajo dodano kemično skupino, ki je reverzibilni terminator sinteze in preprečuje vgradnjo naslednjega komplementarnega ddNTP. Laser nato odčita identiteto vgrajenega nukleotida, čemur sledi spiranje tistih ddNTP, ki se niso vgradili, odstranitev reverzibilnega terminatorja in dodajanje novih ddNTP za začetek novega cikla (Bentley in sod., 2008). Pri tehnologiji Illumina je poleg sekvenciranja fragmentov z enega konca (angl. *single-read sequencing*) omogočeno tudi sekvenciranje z obeh koncev (angl. *paired-end sequencing*), ki izboljša obdelavo podatkov, ter ugotavljanje strukturnih sprememb in variacij v genomu (ugotavljanje insercij, delecij in inverzij), ponavljajočih se elementov in fuzij genov (Ambardar in sod., 2016).

### 2.8.5.3 Obdelava podatkov NGS

Obdelava podatkov v obliki nukleotidnih zaporedji DNA, pridobljenih z NGS, je sestavni del metode NGS. Obdelavo izvajamo s specializiranimi bioinformacijskimi programi (Carrico in sod., 2018). Podatke najprej obdelamo z odprtokodnim operacijskim sistemom Linux, nato odstranimo odčitke (angl. *reads*) slabe kakovosti in ostanke adapterjev. Kvalitetne odčitke nato sestavimo v soseske in preverimo njihovo kakovost. Na koncu zaporedja nukleotidov odčitkov primerjamo z zaporedji v podatkovni zbirki genske banke NCBI.

#### 2.8.5.4 NGS pri preučevanju čebeljih virusov

Metode NGS omogočajo nov metagenomski pristop pri raziskavah mikrobiote in posledično tudi virusnih združb v posameznem vzorcu (Palacios in sod., 2008; Runckel in sod., 2011). Uporaba NGS je zadnji dve desetletji močno v porastu in že predstavlja enega od temeljev moderne molekularne biologije. V mnogih študijah, v katerih so uporabili to tehnologijo, so odkrili in opisali nove patogene, vključno s čebeljimi virusi, kot so LSV, Aphid Lethal Paralysis virus in Big Sioux River virus (Runckel in sod., 2011; Granberg in sod., 2013; Daughenbaugh in sod., 2015; Levin in sod., 2017; Remnant in sod., 2017; McMenemy in Flenniken, 2018). Tudi v Sloveniji so z NGS že določili nukleotidni zaporedji dveh celotnih genomov čebeljih virusov, in sicer CBPV in LSV, ki sta bila izolirana iz vzorca propadle čebelje družine iz leta 2010 (Jamnikar Ciglencečki in sod., 2017; Šimenc in sod., 2020), in še številne druge patogene. Poleg čebeljih virusov so na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo že določili nukleotidna zaporedja celotnih genomov nekaterih povzročiteljev virusnih bolezni: virusa prašičje epidemične diareje (Toplak in sod., 2016b), virusa bovine virusne diareje (Toplak in sod., 2016c), virusa vozličastega dermatitisa (Toplak in sod., 2017) in virusa picobirna (Kuhar in sod., 2017) ter bakterijskih genomov, kot je na primer *Paenibacillus larvae* (Papić in sod., 2021).

### 2.9 POSKUSI NA ČEBELAH V *IN VITRO* POGOJIH

Začetnik *in vitro* eksperimentalnih poskusov na čebelah je bil Britanec Bailey, ki je že leta 1963 raziskoval patogenezo čebeljih virusov (Bailey in sod., 1963). Eksperimenti so izredno zahtevni, saj morajo biti skrbno načrtovani in nadzorovani. Čebelam in njihovim razvojnim stopnjam moramo v poskusu zagotoviti pogoje, podobne naravnim, da so rezultati poskusa verodostojni in uporabni za raziskave v čebelarstvu. Z eksperimenti so proučevali patogeneze čebeljih virusov. Za veliko virusov patogeneza še ni pojasnjena, saj na pojav bolezni pogosto vpliva več različnih dejavnikov in ne le en sam čebelji virus. V *in vitro* pogojih lahko odrasle čebele ali njihove razvojne stopnje gojimo, dodajamo patogene in hkrati sledimo porabi hrane, vedenju, razvoju bolezni in preživetju. Pri večini eksperimentalnih poskusov so uporabili odrasle čebele delavke, ker jih je lažje gojiti (Toplak in sod., 2013; Dolezal in sod., 2016), nekatere poskuse pa so izvedli na čebeljih ličinkah in bubah (Hou in sod., 2014; Aupinel in sod., 2015). Pri eksperimentalnih okužbah zimskih čebel delavk, ki so jih izvedli v 13 skupinah,



ki so jih okuževali z različnimi kombinacijami CBPV in *Nosema ceranae*, so ugotovili, da sočasna peroralna okužba s CBPV in nosemo povzroči najvišjo smrtnost čebel (Toplak in sod., 2013). Pri eksperimentalnih okužbah čebeljih bub z virusom izraelske akutne paralize (IAPV) so ugotovili močno kužnost virusa, aktivno razmnoževanje virusa v čebeljih bubah in povečano smrtnost (Hou in sod., 2014).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 KVANTIFIKACIJA ČEBELJIH VIRUSOV Z METODO RT-qPCR

##### 3.1.1 Vzorčenje čebel

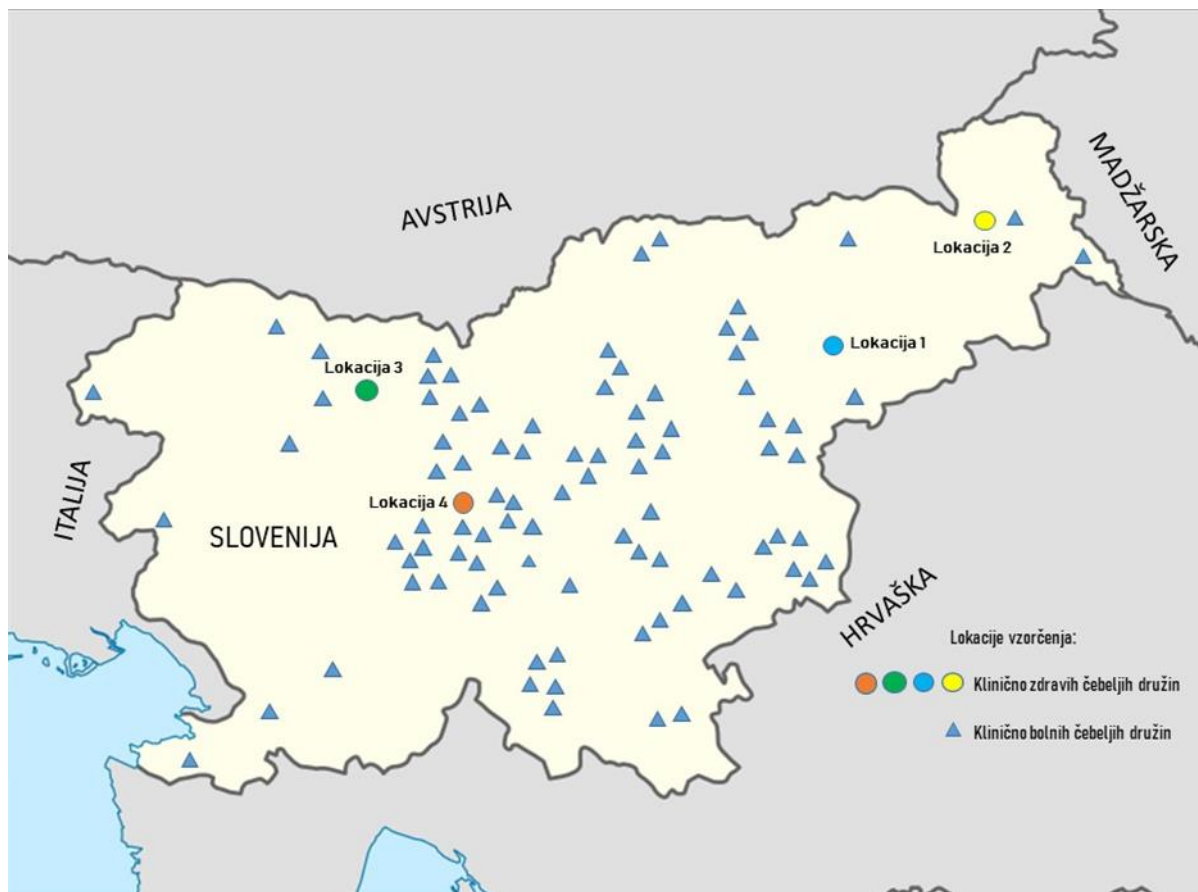
Odvzeli smo 108 vzorcev klinično zdravih čebeljih družin, ki smo jih vsak mesec vzorčili na štirih različnih lokacijah po Sloveniji (v podravski, pomurski, gorenjski in osrednjeslovenski regiji), iz štirih različnih čebelnjakov, v obdobju med oktobrom 2018 in oktobrom 2019. Čebelnjak v podravski regiji (lokacija 1) je del večjega intenzivnega čebelarstva z več kot 20 čebelnjaki in 2000 čebeljimi družinami. Izbrani čebelnjak stoji na obrobju gozda in vsebuje okoli 100 čebeljih družin. Čebelnjak v pomurski regiji (lokacija 2) je ljubiteljski čebelnjak, sestavljen iz sedmih samostojnih panjev, postavljen na travnik, vendar je dobro oskrbovan in pod stalnim veterinarskim nadzorom. Čebelnjak na Gorenjskem (lokacija 3) je postavljen na samem, na obrobju gozda. V njem je okoli 50 čebeljih družin, namenjenih ekstenzivnemu čebelarstvu (slika 8). Čebelnjak v osrednjeslovenski regiji (lokacija 4) je šolski čebelnjak Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, ki je namenjen izobraževalnemu procesu in raziskavam, ima okoli 20 čebeljih družin in stoji v urbanem okolju.

Vsak mesec smo vzorce odvzeli v treh različnih čebeljih družinah istega čebelnjaka. V posamezni čebelji družini smo vzorčili po 10 živih čebel delavk. Vzorce smo do nadaljnje obdelave shranili na manj kot  $-60$  °C. Te čebelje družine so predstavljale zdravo populacijo čebel, po oceni veterinarjev specialistov za čebelje bolezni, ki so spremljali stopnjo infestacije z varojo, prisotnost noseme, prisotnost hude in pohlevne gnilobe čebelje zalege in klinične znake, povezane z virusnimi okužbami čebel. Iz klinično obolelih čebeljih družin iz celotnega območja Slovenije smo med aprilom 2016 in decembrom 2020 odvzeli 89 vzorcev (slika 9). Veterinarji, specialisti za čebelje bolezni, so odvzeli 10 čebel delavk iz iste čebelje družine, pri kateri so postavili sum na virusno obolenje. Vzorce so poslali v virološki laboratorij na preiskavo. Sum na virusno obolenje so postavili na podlagi zaznane klinične slike, kot so umrle čebele pred in v panju, nezmožnost letenja čebel, tresavica, potemnelost čebel, deformacije na krilih, ličinke v obliki mešička, potemnelost matice, slabotnost čebel (priloga 1).



**Slika 8: Čebelnjak na lokaciji 3, iz katerega smo vzorčili zdrave čebelje družine.**

Figure 8: Apiary in location 3 from which we sampled healthy honeybee colonies.



**Slika 9: Lokacije vzorčenja zdravih in obolelih čebeljih družin. Lokacije vzorčenja klinično zdravih čebeljih družin so označene s krogi različnih barv, lokacije klinično obolelih pa z modrimi trikotniki.**

Figure 9: Sampling locations of healthy and affected honeybee colonies. Sampling locations of clinically healthy honeybees are presented with dots in different colours and sampling locations of clinically affected honeybees are presented with blue triangles.

### 3.1.2 Priprava vzorcev

Desetim čebelam iz posameznega vzorca smo dodali 5 ml medija RPMI-1640 (Gibco, Združeno kraljestvo), jih 10 minut pustili na sobni temperaturi in homogenizirali v epruvetah Ultra-Turrax DT-20 (IKA, Nemčija) ter 15 minut centrifugirali pri 2500 g. Odvzeli smo 2 ml supernatanta za nadaljnjo obdelavo.

### 3.1.3 Izolacija nukleinskih kislin

Celokupno RNA smo po navodilih proizvajalca izolirali iz 140  $\mu$ l supernatanta s kompletom QIAamp viral RNA Mini Kit (Qiagen, Nemčija) in pridobili 60  $\mu$ l RNA, ki je bila raztopljena v elucijskem pufu.

### 3.1.4 Protokol kvantifikacije ABPV, BQCV, CBPV in DWV z metodo RT-qPCR

Štiri protokole za metodo RT-qPCR (pri ABPV, BQCV, CBPV, DVW), z uporabo plazmidov kot standardov za kvantifikacijo, smo povzeli po protokolih evropskega referenčnega laboratorija za čebelje bolezni ANSES iz Francije (ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.3900 in 1300). Začetni oligonukleotidi in sonde, ki smo jih uporabili, so prikazani v tabeli 2. Standarde za kvantifikacijo, ki so jih izdelali s sintetičnimi klonalno pomnoženimi plazmidi za ABPV, BQCV, CBPV in DWV, pa smo prav tako prejeli iz evropskega referenčnega laboratorija za čebelje bolezni, in sicer v koncentraciji 9 log<sub>10</sub> kopij na 5  $\mu$ l, iz katerih smo pripravili desetkratne razredčitve, ki so vsebovale od 10<sup>-2</sup> do 10<sup>-6</sup> kopij standarda za posamezni virus.

### 3.1.5 Načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov, sond TaqMan in standardov metode RT-qPCR za LSV3 in SBV

Za dokazovanje in kvantifikacijo LSV3 in SBV smo uvedli metodo RT-qPCR za kvantifikacijo s sondo TaqMan. Začetne oligonukleotide, sonde TaqMan in standarde za kvantifikacijo smo konstruirali s pomočjo nukleotidnih zaporedij iz Slovenije in tujine, pridobljenih iz genske banke NCBI, ter nukleotidnih zaporedij LSV3 (26 sekvenc: MH350870-MH350894, MG918125) in SBV (25 sekvenc: MH900054-MH900078) iz Slovenije, in sicer s programom Geneious Prime (Biomatters Ltd., Nova Zelandija). Standard za RT-qPCR za dokaz LSV3 smo dizajnirali na podlagi nukleotidnega zaporedja genoma LSV3 (KY465717), v delu genoma med 2021 in 2265, z dolžino 244 nt. Standard za RT-qPCR za dokaz SBV smo dizajnirali na podlagi nukleotidnega zaporedja genoma SBV (MG545287), v delu genoma med 5030 in 5368, z dolžino 338 nt (tabela 3). Pri LSV smo zaradi ugotovljene velike genetske raznolikosti dizajnirali oligonukleotidne začetnike, sonde in standarde za tri genetske linije LSV: LSV1, LSV2 in LSV3. Ko smo ugotovili, da je LSV3 v Sloveniji najpogostejša genetska linija, smo pri testiranjih uporabili le metodo za dokaz LSV3. Oligonukleotidne začetnike in sonde smo

izdelali v najbolj ohranjeni regiji genoma, pri LSV3 je to regija ORF2, ki zapisuje od RNA odvisno polimerazo RNA (RdRp), pri SBV pa je to del regije ORF, ki zapisuje kapsidni protein (tabeli 2 in 3). Naročilo izdelave začetnih oligonukleotidov, sond in standardov kvantifikacije za metodi RT-qPCR za LSV3 in SBV smo poslali v podjetje Sigma-Aldrich (Nemčija).

### **3.1.6 Optimizacija kvantifikacije s standardom za SBV in LSV3**

Iz podjetja Sigma-Aldrich smo prejeli dve raztopini klonalno namnoženih plazmidov z nukleotidnim zaporedjem standardov za SBV in LSV3, s točno določeno koncentracijo in znanim številom kopij standarda. Iz znanega števila kopij v standardu smo za vsako uporabo metode RT-qPCR, s petimi zaporednimi desetkratnimi razredčitvami standarda (od  $10^{-2}$  do  $10^{-6}$ ), določili natančno število kopij virusa v 5  $\mu$ l preiskovanega vzorca RNA, s standardne krivulje vsake reakcije, in sicer s programom MxPro-Mx3005P v4.10 (Stratagene, Združene države Amerike).

### **3.1.7 Izračun števila virusnih kopij na čebelo**

Rezultate virusnih kopij na čebelo smo preračunali s pomočjo logaritma z osnovo 10, in sicer na način, da smo rezultatu  $\log_{10}$  števila kopij na 5  $\mu$ l RNA prišteli faktor 1,93, ki upošteva vse razredčitve, od priprave vzorca do izvedbe RT-qPCR.

Število virusnih kopij na čebelo je enako številu kopij na 5  $\mu$ l RNA  $\times 0,5 \times 14,29 \times 12$ . Rezultat je 85,74. Faktor za preračunavanje oziroma  $\log_{10}(85,74)$  je 1,93.

Faktor 0,5 smo uporabili, ker smo 10 čebel homogenizirali v 5 ml RPMI. Faktor 14,29 smo uporabili, ker smo za izolacijo RNA uporabili 140  $\mu$ l od 2 ml supernatanta. Faktor 12 smo uporabili, ker smo od 60  $\mu$ l eluirane raztopine RNA uporabili 5  $\mu$ l RNA za reakcijo RT-qPCR.

### **3.1.8 Določitev meje zaznavanja (LOD) in meje kvantifikacije (LOQ) za metodo RT-qPCR pri šestih čebeljih virusih**

Mejo zaznavanja (angl. *limit of detection* – LOD) smo določili kot zadnjo razredčitev standarda, v katerem smo plazmidno DNA še določili v vseh ponovitvah reakcije RT-qPCR ( $n = 8$ ) (Schurr

in sod., 2019). Mejo kvantifikacije (angl. *limit of quantification* – LOQ) in natančnost metod pa smo ocenili za vsako serijo razredčitev standardov in vsako količino virusa v vzorcu posebej, glede na teoretične vrednosti. Pri tem smo upoštevali parametre standardnega odklona, ponovljivosti in zanesljivosti (Feinberg, 2007). LOQ smo določili kot najvišjo razredčitev standarda, kjer količino plazmida še lahko določimo s sprejemljivo natančnostjo (NF U47-600, ANFOR, 2015). Najvišja je zanesljivost v območju med  $2 \log_{10}$  in  $10 \log_{10}$  virusnih kopij na čebelo (Schurr in sod., 2017; Schurr in sod., 2019).

### **3.1.9 Preverjanje specifičnosti metode RT-qPCR za SBV in LSV3**

Specifičnost kvantitativne metode RT-qPCR za SBV smo preverili na 74 vzorcih, za LSV3 pa na 62 vzorcih čebel in čmrljev iz Slovenije in Hrvaške, pri katerih smo predhodno določili prisotnost SBV in LSV z metodo RT-PCR. Nukleotidna zaporedja krajših odsekov RNA smo potrdili s sekvenciranjem po Sangerju (Toplak, 2004; Toplak in sod., 2020; Šimenc in sod., 2021).

### **3.1.10 Preverjanje učinkovitosti metode RT-qPCR za šest čebeljih virusov**

Parametre učinkovitosti, naklon, presečišče in  $R^2$  za šest aplikacij metode RT-qPCR smo določili s tremi ponovitvami vsake aplikacije, z uporabo petih zaporednih desetkratnih razredčitev standardov, iz katerih smo izračunali povprečne vrednosti in standardne odmike teh parametrov.

**Tabela 2: Zaporedja oligonukleotidnih začetnikov in sond, uporabljenih pri metodi RT-qPCR.**

Table 2: Nucleotide sequences of primers and probes used in RT-qPCR method.

Virus	Pozitivno usmerjen oligonukleotidni začenik (5' – 3')	Negativno usmerjen oligonukleotidni začenik (5' – 3')	Sonda (5' – 3')	Referenca	Koncentracija oligonukleotidnega začetnika	Koncentracija sonde
ABPV	CATATTGGCGAGCCACTATG	CTACCAGGTTCAAAGAAAATTTC	ATAGTTAAAACAGCTTTTCACACTGG	(Jamnikar Ciglencečki in Toplak, 2012)	800 nM	100 nM
BQCV	GGTGCGGGAGATGATATATGGA	GCCGTCTGAGATGCATGAATAC	TTTCCATCTTTATCGGTACGCCGCC	(Chantawannakul in sod., 2006)	320 nM	200 nM
CBPV	CGCAAGTACGCCTTGATAAAGAAC	ACTACTAGAAACTCGTCGCTTCG	TCAAGAACGAGACCACCGCCAAGTTC	(Blanchard in sod., 2012)	320 nM	200 nM
DVW	GCGGCTAAGATTGTAAATGTC	GTGACTAGCATAACCATGATTA	CCTTGACCAGTAGACAGCATC	(Schurr in sod., 2019)	350 nM	100 nM
LSV3	GTACCTACACTCTTCCATGCAC	CCAGCTAAGGAGGCGTAAC	TCACCCACATCATTGAGCCAGGT	(Šimenc in sod., 2021)	200 nM	100 nM
SBV	AGCCAGTGATAGATGCTC	AAATACTCCCGCCAAATCAC	TGGCTCATCTGGGATCACAATTTCC	(Šimenc in sod., 2021)	200 nM	50 nM

**Tabela 3: Zgradba standardov, uporabljenih pri metodi RT-qPCR.**

Table 3: Structure of standards, used in RT-qPCR method.

Ime plazmida	Plazmidni vektor	Nukleotidna pozicija kloniranega vektorja	Dolžina zaporedja	Virus in dostopna številka virusnega genoma v genski banki	Začetna oligonukleotida	Referenca
pB2	pCR II Topo (Invitrogen)	8115 do 8512	397	ABPV (AF126050)	ABPV1/ABPV2	(Bakonyi in sod., 2002)
pNC1-4	pGEM-T Easy (Promega)	7850 do 8550	700	BQCV (AF183905)	BQCV1/BQCV2	(Benjeddou in sod., 2001)
pAb2	pGEM-T Easy (Promega)	2260 do 3059	799	CBPV (EU122229)	R3-RC/CBPV3	(Blanchard in sod., 2007)
pC1	pCR II Topo (Invitrogen)	4240 do 4659	419	DWV (AY292384)	DWV3/DWV4	(Blanchard in sod., 2007)
LSV3	LSV3-SI (Sigma-Aldrich)	2021 do 2265	244	LSV3 (KY465717)	LSV3-417/LSV3-536	(Šimenc in sod., 2021)
SBV	SBV-SI (Sigma-Aldrich)	5030 do 5368	338	SBV (MG545287)	SBV-117/SBV-221	(Šimenc in sod., 2021)



### 3.1.11 Kvantitativna metoda RT-qPCR

Reverzno transkripcijo smo izvedli skupaj z reakcijo PCR, s pomočjo kompleta QuantiNova Pathogen+IC Kit (Qiagen, Nemčija). Mešanico RT-qPCR je sestavljalo: 5 µl mešanice QuantiNova Master Mix; 2 µl desetkratne Internal Control (IC) Probe Assay; 1 µl interne kontrole (IC) v razmerju 1 : 100; 4,5 µl deionizirane vode; 1 µl pozitivno usmerjenega začetnega oligonukleotida (200 nM); 1 µl negativno usmerjenega začetnega oligonukleotida (200 nM); 0,5 µl sonde (100 nM) in 5 µl izolirane RNA, tako da je bil končni volumen reakcijske mešanice 20 µl. Reakcijo RT-qPCR smo izvedli na aparaturi Mx3005P (Stratagene, ZDA), s temperaturnim protokolom: 20 minut pri 50 °C, 2 minuti pri 95 °C, sledilo je 45 ciklov po 15 sekund pri 95 °C, 30 sekund pri 60 °C in 30 sekund pri 60 °C. V vsako izvedbo reakcije smo vključili pozitivno kontrolo, pripravljeno iz suspenzije čebel, predhodno pozitivnih na enega od šestih čebeljih virusov (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 in SBV), z vrednostjo Ct okoli 25. Pozitivno kontrolo smo razdelili na 50 alikvotov po 160 µl, enako tudi negativno kontrolo, pripravljeno iz 50 alikvotov po 160 µl medija RPMI-1640 (Gibco, Združeno kraljestvo). Pri vsaki izvedbi smo uporabili en alikvot negativne in en alikvot pozitivne kontrole. V vsako izvedbo RT-qPCR pa smo vključili tudi pet desetkratnih razredčitev standarda znane koncentracije za določitev naklona premice za kvantifikacijo.

### 3.1.12 Statistična analiza kvantifikacije čebeljih virusov z metodo RT-qPCR

Podatke smo zbrali in uredili s programom Microsoft Excel 365 (Microsoft, ZDA). Odstotek pozitivnih vzorcev in virusno obremenitev za ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 in SBV smo izračunali za vzorce zdravih in vzorce obolelih čebeljih družin. Pri analizi virusne obremenitve čebel smo izračunali povprečno vrednost iz vzorcev pozitivnih čebeljih družin. Vse vzorce, ki so imeli vrednosti pod mejo detekcije, smo obravnavali kot negativne in jim za virusno obremenitev pripisali vrednost 0. Pri vzorcih, ki so imeli vrednost virusne obremenitve nad mejo detekcije in pod mejo kvantifikacije, pa smo pripisali polovico vrednosti meje kvantifikacije. Za izračun osnovnih opisnih statistik, statistične teste in grafe smo uporabili program R, verzijo 4.1.2 (EEA, 2020). Pri vseh statističnih testih je bila za statistično značilnost uporabljena meja p za vrednosti, nižje od 0,05, vrednosti med 0,05 in 0,1 pa smo interpretirali kot mejno statistično značilne. Za testiranje hipotez smo uporabili neparametrične teste, saj podatki niso zadostili predpostavkam za uporabo parametričnih testov; podatki niso bili

normalno razporejeni in/ali variance med skupinami niso bile enake. Povezave med razširjenostjo ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 in SBV v zdravih in obolelih čebeljih družinah smo ugotavljali s Fisherjevim eksaktnim testom (Lovric, 2011). Razliko v virusni obremenitvi pozitivnih vzorcev med zdravimi in obolelimi čebeljimi družinami smo testirali z Wilcoxonovim testom vsote rangov (Haynes in sod., 2013).

## **3.2 DOLOČANJE NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ CELOTNIH GENOMOV ČEBELJIH VIRUSOV Z METODO NGS**

### **3.2.1 Izbor vzorcev za NGS**

Vzorci za NGS smo odvzeli v letih 2018 in 2019 iz devetih klinično obolelih in desetih zdravih čebeljih družin, pri katerih smo z metodo RT-qPCR ugotovili prisotnost enega ali več čebeljih virusov. Za določanje nukleotidnega zaporedja celotnih genomov čebeljih virusov z metodo NGS smo odbrali tiste vzorce, pri katerih so bile vrednosti Ct pod 20. Vzorce z nižjimi vrednostmi Ct smo odbrali zato, da bi določili več nukleotidnih zaporedij celotnih genomov čebeljih virusov, zaradi boljše uspešnosti sekvenciranja in večje pokritosti genomov. Pred izvedbo metode NGS smo izbrane pozitivne vzorce pomnožili z metodo PCR za določanje ABPV, BQCV, CBPV, DWV, SBV in LSV3 (Toplak in sod., 2020; Šimenc in sod., 2020), jih sekvencirali po Sangerju, in tako dobili vpogled v genetsko prisotnost sevov v vzorcih, jih primerjali s sevi iz genske banke NCBI in na podlagi tega izbrali čim bolj reprezentativne vzorce (tabela 4).

### **3.2.2 Priprava vzorcev**

Celokupne nukleinske kisline izbranih vzorcev smo po navodilih proizvajalca izolirali s kompletom MagMax Core in aparaturo King Fisher (Thermo Fisher Scientific, ZDA), in sicer iz 200 µl suspenzije vzorca. Pri tem postopku smo pridobili 80 µl raztopljene RNA v elucijskem pufri. Koncentracijo izolirane nukleinske kisline smo izmerili s fluorometrom Qubit™ 3.0 (Thermo Fisher Scientific, ZDA).

### 3.2.3 Določanje nukleotidnih zaporedij v vzorcih z NGS s tehnologijo Illumina

Pripravo knjižnic in sekvenciranje s tehnologijo Illumina so izvedli v komercialnem centru Novagene (Nizozemska). Sekvenciranje knjižnic z obeh koncev ( $2 \times 150$  bp) so izvedli po sistemu NovaSeq 6000 (Illumina, ZDA), iz poslanih izoliranih RNA iz naših vzorcev.

### 3.2.4 Bioinformacijska obdelava podatkov NGS

Obdelavo podatkov z odprtokodnimi, samostojnimi bioinformacijskimi programi (SPAdes, Diamond), ki temeljijo na operacijskem sistemu Linux, smo izvedli na strežniku PowerEdge R730 Server (Dell), ki se nahaja na Veterinarski fakulteti.

### 3.2.5 Nadzor kakovosti odčitkov

Odčitke (angl. *reads*) smo analizirali v formatu FASTQ. Z orodjem Cutadapt v1.18 (Martin, 2011) smo odstranili odčitke slabe kakovosti (vrednost  $Q < 20$ ) in ostanke adapterjev. Vrednost  $Q$  (tudi vrednost Phred) meri verjetnost napake za napačno odčitano nukleotid v odčitku; vrednost  $Q = 20$  ustreza 1 % verjetnosti za napako. Odčitki slabe kakovosti in ostanke adapterjev lahko motijo nadaljnjo bioinformacijsko obdelavo podatkov, npr. sestavljanje odčitkov (angl. *genome assembly*) v soseske (angl. *contigs*). Za nadzor kakovosti odčitkov, ki smo jih dobili z orodjem Cutadapt (angl. *trimmed reads*), smo uporabili orodje FastQC v0.11.8.

### 3.2.6 Sestavljanje odčitkov v soseske

Odčitke, ki smo jih pridobili z orodjem Cutadapt v1.18, smo sestavili v soseske z orodjem SPAdes v3.13.0 (Bankevich in sod., 2012) in z uporabo parametra *meta* (Nurk in sod., 2017).

### 3.2.7 Sestavljanje nukleotidnih zaporedij genomov čebeljih virusov

S programom Diamond (Buchfink in sod., 2021) smo sestavljene soseske primerjali z zaporedji v podatkovni zbirki genske banke NCBI. Rezultate smo nato analizirali s programom MEGAN v6.17.0 (Huson in sod., 2007), s katerim smo soseske vizualizirali in jih taksonomsko uvrstili. Soseske, ki smo jih uvrstili v posamezno taksonomsko skupino, smo v formatu FASTA ter s

programom Geneious Prime v2019.2.3 (Biomatters, Nova Zelandija) rekonstruirali v virusne genome. Za sestavljanje nukleotidnih zaporedij genomov čebeljih virusov smo uporabili metodo prileganja odčitkov na referenčni genom s privzetimi parametri za posamezno vrsto virusa, in sicer z orodjem Geneious Read Mapper 6.0.3 (Biomatters, Nova Zelandija). Pri tem smo uporabili referenčne genome virusov iz genske banke NCBI.

**Tabela 4: Izbor pozitivnih vzorcev za NGS na podlagi vrednosti Ct pri ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 in SBV ter dobljenega zaporedja sekvenciranja po Sangerju.**

Table 4: Selection of positive samples for NGS according to Ct values of ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV and nucleotide sequences determined by Sanger sequencing method.

Št.	Virus	Oznaka vzorca	Zdravstveni status čebel	Dobljena vrednost Ct	Dolžina zaporedja (nt)	% identičnosti z najbližjim nt zaporedjem iz genske banke	Koncentracija RNA (ng/μl)
1	ABPV	324/2016	obolele	10,94	433	MG737448 98 %	507
2	ABPV	366/2020	obolele	14,05	452	AF486072 98 %	16,4
3	ABPV	386/2020	obolele	4,34	434	AF486072 99 %	17,3
4	BQCV	LS90/2019	zdrave	10,95	692	MH899977 100 %	572
5	BQCV	336/2016	obolele	8,66	679	MN565034 99 %	210
6	BQCV	377/2020	obolele	14,19	690	MH899979 99 %	408
7	CBPV	376/2020	obolele	13,07	509	FJ345313 99 %	18,4
8	CBPV	380/2020	obolele	8,66	543	FJ345313 99 %	240
9	DWV	LS13/2018	zdrave	10,82	478	JF346624 97 %	414
10	DWV	LS26/2019	zdrave	8,5	431	KT004425 98 %	521
11	DWV	341/2019	obolele	9,78	479	JF346624 98 %	614

Št.	Virus	Oznaka vzorca	Zdravstveni status čebel	Dobljena vrednost Ct	Dolžina zaporedja (nt)	% identičnosti z najbližjim nt zaporedjem iz genske banke	Koncentracija RNA (ng/μl)
12	LSV3	LS02/2018	zdrave	15,29	482	KY465171 98 %	591
13	LSV3	LS20/2019	zdrave	13,58	578	KY465171 98 %	513
14	LSV3	LS48/2019	zdrave	12,94	504	MG918123 98 %	283
15	LSV3	LS74/2019	zdrave	13,48	578	KY465717 98 %	68,0
16	LSV3	LS81/219	zdrave	13,73	576	MG918123 98 %	240
17	LSV3	LS84/2019	zdrave	14,54	533	MG918125 98 %	484
18	LSV3	inok. LSV LS21/2019	zdrave	10,18	520	MG918123 98 %	336
19	SBV3	inok. PB 2019	obolele	12,64	719	MG545286 98 %	322

### 3.2.8 Preverjanje sestavljanja nukleotidnih zaporedij genomov virusov in anotacije genomov

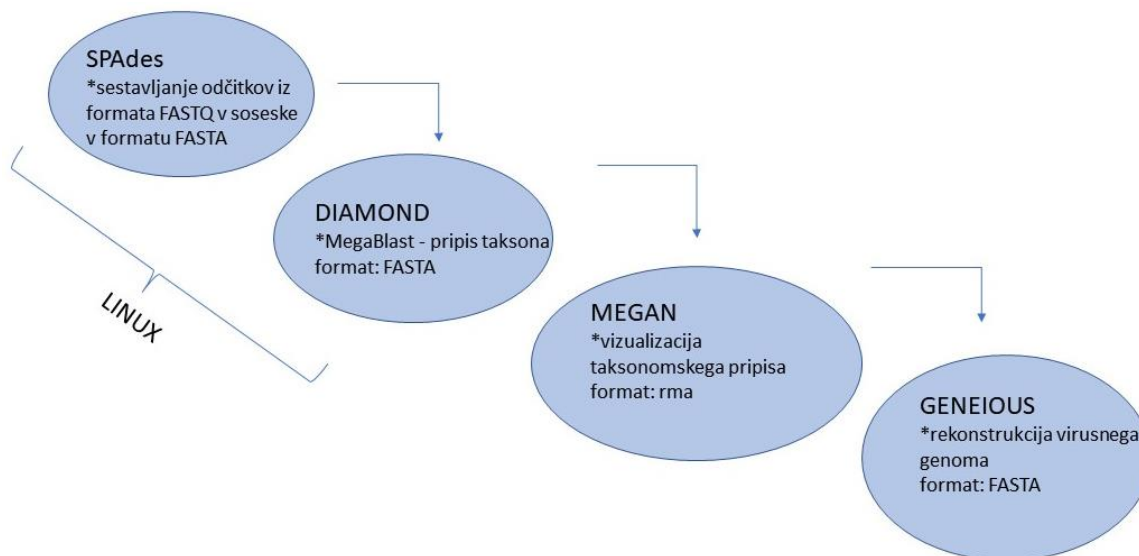
Pravilnost sestavljenih nukleotidnih zaporedij smo preverili tako, da smo na sestavljena zaporedja genomov poravnali odčitke, pri čemer so morala biti pokrita vsa mesta posameznega genoma. Na podlagi teh poravnjav smo določili tudi povprečno pokritost posameznega zaporedja. Nato smo v posameznem sestavljenem genomu določili zaporedje genov (anotacija). Zaporedja genov smo določili s prenosom anotacij. Najprej smo s programsko opremo Geneious Prime v2019.2.3 (Biomatters, Nova Zelandija) določili odprte bralne okvire, nato smo zaporedja sestavljenih genomov s programom MAFFT v.7.450 (Katoh in sod., 2002) poravnali z zaporedji genomov, dostopnih v podatkovni zbirki genske banke NCBI, jih primerjali med seboj in prenesli ustrezne anotacije, ki so imele več kot 45-odstotno podobnost. Tako sestavljene in anotirane genome smo predložili podatkovni zbirki genske banke NCBI, kjer so objavljeni in dostopni pod številkami (angl. *accession numbers*), ki jih v tej raziskavi navajamo v oklepaju za imenom virusnega seva, kot na primer ABPV 366/2020 (ON453877).

### 3.2.9 Poravnave nukleotidnih zaporedij genomov virusov in analiza raznolikosti

Za analizo raznolikosti nukleotidnih zaporedij celotnih genomov smo nukleotidna zaporedja sestavljenih genomov in genomov, pridobljenih iz podatkovne zbirke genske banke NCBI, poravnali s programom MAFFT v.7.450 (Kato in sod., 2002) s programsko opremo Geneious Prime v2019.2.3 (Biomatters, Nova Zelandija) ter porezali konce, da so bila vsa poravnana nukleotidna zaporedja genomov enako dolga. Na podlagi poravnave smo določili odstotek identičnosti med posameznimi genomi in genomi, pridobljenimi iz genske banke NCBI.

### 3.2.10 Filogenetske analize

Za filogenetske analize smo izbrali nukleotidna zaporedja celotnih genomov slovenskih čebeljih virusov in nukleotidna zaporedja celotnih genomov tujih čebeljih virusov, dostopnih v genski banki NCBI. Najprej smo nukleotidna zaporedja vseh virusnih genomov, ki smo jih uporabili za filogenetske primerjave, izvozili, jih združili z orodjem MAFFT v.7.450 (Kato in sod., 2002) in izvedli poravnave nukleotidnih zaporedij s programsko opremo Geneious Prime v2019.2.3 (Biomatters, Nova Zelandija). Nato smo s programom MEGA7 v.7.0.25 z metodo največjega verjetja (angl. *maximum likelihood*), po najboljšem ugotovljenem modelu, izdelali filogenetske primerjave. Z metodo samovzorčenja (angl. *bootstrapping*) s 1000 ponovitvami smo ocenili zanesljivost filogenetskih dreves. Na razvejitevah so navedene statistične podpore posameznih cepitev, ki so višje od 700. Nukleotidna zaporedja smo na filogenetskih drevesih označili z dostopnimi številkami genske banke, organizmom, pri katerem je bil ta virus določen, državo izvora, letnico in ponekod smo dodali genotip oziroma genetsko linijo, če so bili te podatki znani.



**Slika 10: Obdelava podatkov, pridobljenih pri določanju nukleotidnega zaporedja celotnih genomov s tehnologijo Illumina, od pridobljenih odčitkov do rekonstrukcije celotnih genomov.**

Figure 10: Workflow of data analysis to determinate nucleotide sequences of complete genomes after Illumina sequencing from raw reads to reconstruction of the genomes.

### 3.3 POSKUSI NA ČEBELJIH LIČINKAH V *IN VITRO* POGOJIH

#### 3.3.1 Izbor ličink

Izbrali smo dve čebelji družini za odvzem ličink, eno iz čebelnjaka Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani na Gerbičevi ulici 60, drugo pa iz čebelnjaka na obrobju gozda na Gorenjskem. V teh čebeljih družinah smo pri čebelah in ličinkah z metodo RT-qPCR testirali prisotnost šestih čebeljih virusov, kot je opisano v poglavju 3.1.4.

V odbranih čebeljih družinah pri odraslih čebelah in ličinkah nismo ugotovili prisotnosti ABPV, CBPV, DWV, SBV in LSV3, v obeh družinah pa smo ugotovili prisotnost BQCV. Vrednost Ct za BQCV je v čebelnjaku v Ljubljani znašala 15,76 pri čebelah in 25,97 pri ličinkah. V čebelnjaku na Gorenjskem pa je vrednost Ct za BQCV znašala 24,51 pri čebelah in 25,70 pri ličinkah. Čebelje družine smo testirali en teden pred začetkom presajanja ličink.

Prvi poskus smo izvedli v juniju 2020 (ličinke iz čebelnjaka v Ljubljani; poskus z inokulumom LSV3), drugi poskus pa v juliju 2021 (ličinke iz čebelnjaka na Gorenjskem; poskus z inokulumom SBV). Ličinke za gojenje v *in vitro* pogojih smo odvzeli iz zaleženega satovja



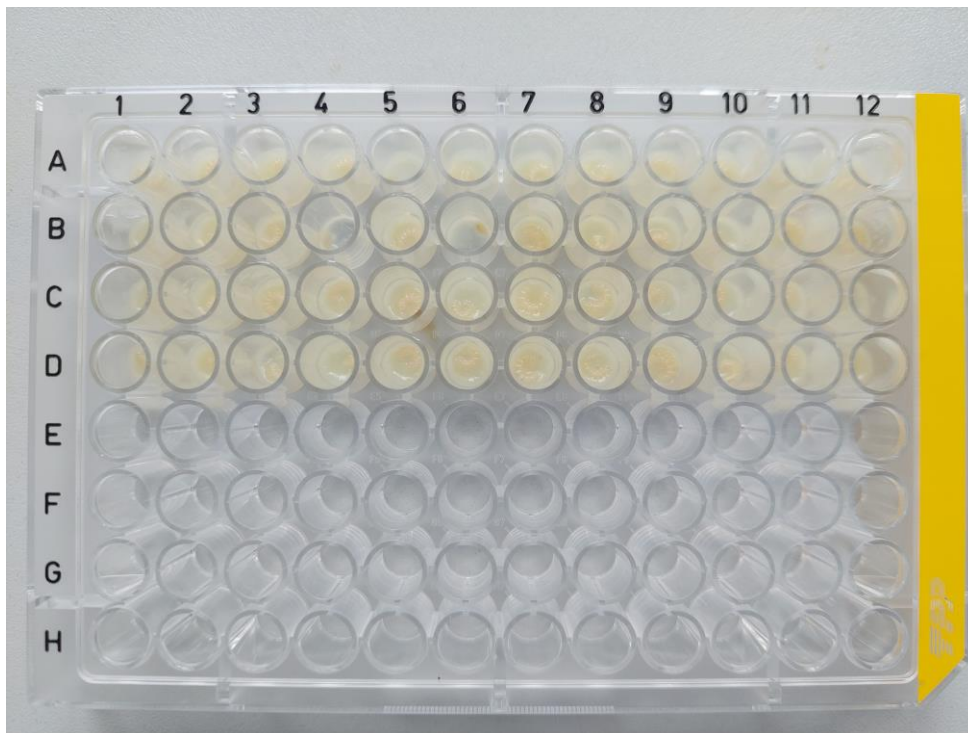
izbranega panja in od 24 do 48 ur stare ličinke v mikrobiološki komori prenesli na mikroplošče za tkivne kulture s 96 jamicami (TPP, Švica), in sicer s sterilnim priborom za presajanje ličink. V jamice smo predhodno s pipeto odmerili 20  $\mu$ l pripravljene hrane za ličinke, ogrete na temperaturo inkubatorja (34,5 °C).



**Slika 11: Izbor vzorcev čebeljih ličink, starih od 24 do 48 ur, iz satja v juliju 2021**

Figure 11: Sample collection of 24 to 48 hours old honeybee larvae from the comb in July 2021.



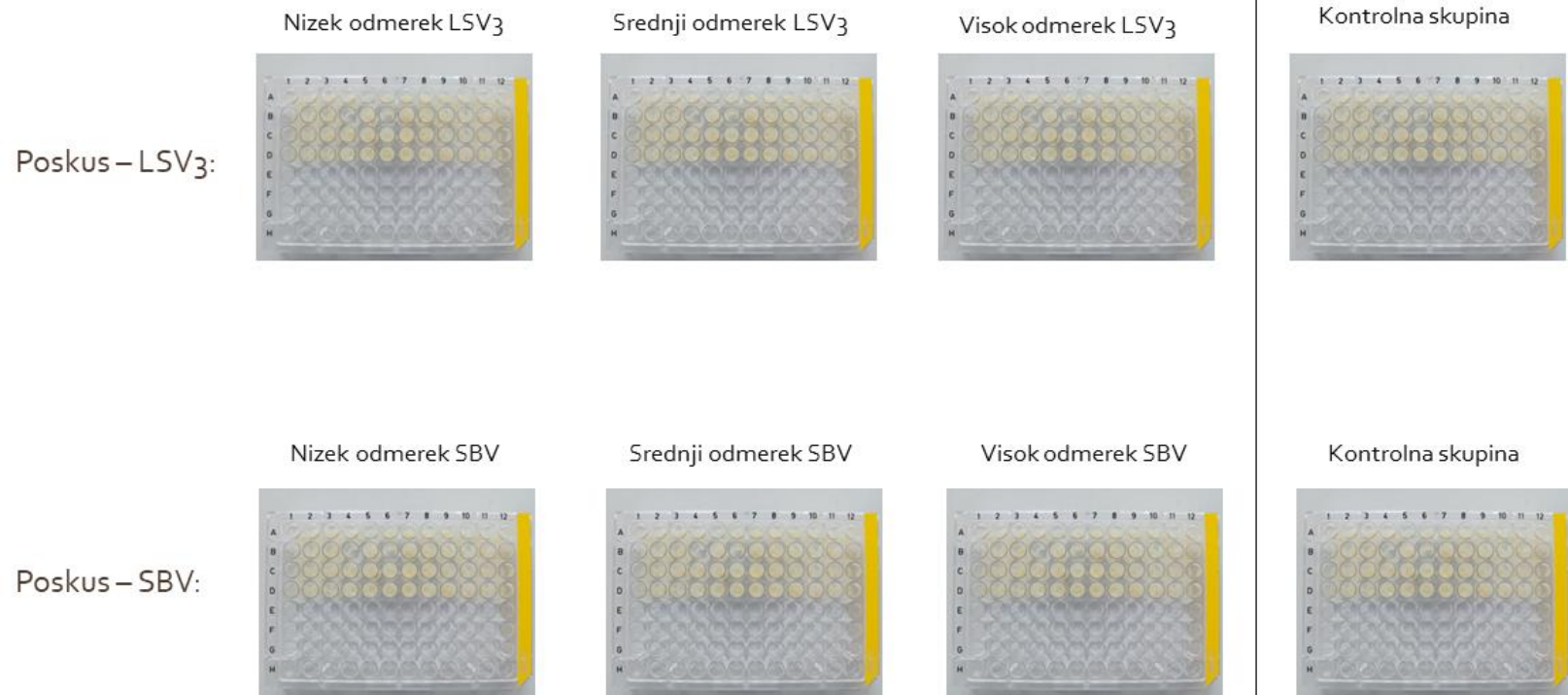


Slika 12: Čebelje ličinke, gojene v 96-jamičnih mikroploščah, stare tri dni.

Figure 12: Honeybee larvae reared in 96-well microplates, three days old.

### 3.3.2 Zasnova poskusa

Izvedli smo dva poskusa, enega z inokulumom LSV3, drugega pa z inokulumom SBV. Za vsak poskus smo uporabili štiri mikrotitrne ploščice (kontrolna skupina, nizek odmerek, srednji odmerek, visok odmerek inokuluma) za tkivne kulture s 96 jamicami (TPP, Švica). Na vsako ploščo smo iz satja presadili 48 ličink, ki smo jih nato pet dni gojili v inkubatorju (Kambič, Slovenija) pri pogojih 34,5 °C in 96 % relativne vlage. Vsak dan smo s posamezne ploščice odvzeli vse mrtve in tri žive ličinke. Vitalnost ličink smo ocenili glede na prožnost kutikule, napetost ličink, barvo in premikanje oz. gibanje glavice ličinke. Zadnji, peti dan vzorčenja, smo odvzeli vse ličinke. Na prvi ploščici smo gojili kontrolno skupino ličink, ki smo jo hranili le s hrano brez dodatka virusnega inokuluma, na drugi ploščici smo gojili ličinke, ki smo jim prvi dan k hrani dodali še 2 µl nizkega odmerka virusnega inokuluma, na tretji plošči smo ličinkam dodali srednji odmerek inokuluma in na četrti ploščici smo ličinkam dodali visok odmerek inokuluma (tabela 5). Prvi dan smo ličinke hranili z 10 µl hrane, drugi dan z 20 µl, tretji dan s 30 µl, četrti dan s 40 µl in peti dan s 50 µl vnaprej pripravljene hrane (Aupinel in sod., 2005; Gregorc in sod., 2012) (slika 13).



**Slika 13: Grafični prikaz eksperimenta s čebeljimi ličinkami v *in vitro* pogojih. Na vsaki mikrotitrski plošči je 48 ličink.**

Figure 13: Graphical presentation of experiment with *in vitro* rearing of honeybee larvae. There are 48 larvae in each microplate.

### 3.3.3 Priprava hrane za ličinke

V laboratoriju smo pripravili hrano za ličinke. Raztopino hrane za ličinke smo sestavili iz 12 % D-glukoze, 12 % D-fruktoze, 2 % kvasnega ekstrakta (Sigma-Aldrich, Nemčija) v deionizirani vodi. Raztopino smo filtrirali skozi membranski filter v velikosti 0,22  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Nemčija) ter homogenizirali z matičnim mlečkom v razmerju 50 % matičnega mlečka in 50 % raztopine. Matični mleček smo pred uporabo z metodo RT-qPCR testirali na prisotnost šestih čebeljih virusov. Pripravljeno hrano za ličinke smo razdelili na odmerke po 5 ml ter do uporabe zamrznili na manj kot  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V 48 jamic sterilne mikrotitrne plošče za tkivne kulture smo s pipeto odmerili 20  $\mu\text{l}$  hrane za ličinke, ki smo jo predhodno odtalili ter v inkubatorju segreli na  $34,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Hrano za ličinke smo hranili v hladilniku na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  do največ 3 dni.

### 3.3.4 Priprava virusnih inokulumov

#### 3.3.4.1 Priprava inokuluma LSV3

Za eksperimentalni poskus z inokulumom LSV3 smo uporabili pozitiven vzorec LSV3 (LS21/2019), v katerem smo z metodo RT-qPCR ugotovili  $2,25 \times 10^9$  kopij LSV3 (Ct je 10,18). Vzorec čebel delavk smo odvzeli iz zdrave čebelje družine, v kateri z metodo RT-qPCR nismo ugotovili prisotnosti ABPV, BQCV, CBPV, DWV ali SBV. Iz suspenzije vzorca smo z redčenjem v tekočini RPMI-1640 (Gibco, Združeno kraljestvo) pripravili nizek, srednji in visok odmerek inokuluma LSV3 (tabela 5), ki smo ga filtrirali skozi membranski filter velikosti 0,22  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Nemčija), razdelili na odmerke po 1 ml in do uporabe shranili na manj kot  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.3.4.2 Priprava inokuluma SBV

Za eksperimentalni poskus z inokulumom SBV smo uporabili pozitiven vzorec SBV (PB/2019), v katerem smo z metodo RT-qPCR ugotovili  $1,29 \times 10^8$  kopij SBV na 5  $\mu\text{l}$  RNA (Ct je 12,20). Pozitiven vzorec SBV (PB/2019) smo odvzeli v čebelnjaku, kjer so veterinarji specialisti postavili sum na SBV. Iz satja smo odvzeli eno odmrlo ličinko, pri kateri je glede na klinične znake obstajal sum na okužbo s SBV (mešiček, napolnjen s tekočino). V vzorcu z metodo RT-qPCR nismo ugotovili prisotnosti nukleinskih kislin ABPV, BQCV, CBPV, DWV

ali LSV3. Isti vzorec smo preiskali tudi z metodo NGS. Iz tega vzorca smo z redčenjem v RPMI-1640 (Gibco, Združeno kraljestvo) pripravili nizek, srednji in visok odmerek inokuluma SBV (tabela 4), ki smo ga filtrirali skozi membranski filter velikosti 0,22 µm (Sartorius, Nemčija) in razdelili na odmerke po 1 ml ter do uporabe shranili na manj kot –60 °C.

**Tabela 5: Podatki o inokulumu LSV3 in SBV, ugotovljeni v dveh poskusih.**

Table 5: Inoculum data of LSV3 and SBV from two experiments.

			<b>Količina virusa v vzorcu</b>	<b>Nizek odmerek</b>	<b>Srednji odmerek</b>	<b>Visok odmerek</b>
<b>Ime vzorca</b>	<b>Pridobljen iz</b>	(št. kopij/5µl RNA)	(št. kopij/5µl RNA)	(št. kopij/5µl RNA)	(št. kopij/5µl RNA)	(št. kopij/5µl RNA)
<b>LSV3</b>	LSV3	10 zdravih	2,25 x 10 <sup>9</sup>	327	4,48 x 10 <sup>4</sup>	17,68 x 10 <sup>6</sup>
<b>INOKULUM</b>	LS21/2019	čebel delavk				
<b>SBV</b>	SBV	odmrla	1,29 x 10 <sup>8</sup>	60	3,55 x 10 <sup>4</sup>	6,53 x 10 <sup>6</sup>
<b>INOKULUM</b>	PB/2019	ličinka, sumljiva na SBV				

### 3.3.5 Določanje prisotnosti in količine virusa v vzorčenih ličinkah z metodo RT-qPCR

Posamezno odvzeto ličinko smo homogenizirali v 1 ml RPMI-1640 (Gibco, Združeno kraljestvo) s pomočjo homogenizacijskih epruvt in s kroglicami MagNA Lyser Green Beads (Roche, Nemčija). Izolacijo celokupne nukleinske kisline smo po navodilih proizvajalca izvedli s kompletom MagMax Core in aparaturo King Fisher Flex (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Nato smo določili prisotnost SBV oziroma LSV3 v posameznem vzorcu ter z metodo RT-qPCR določili število kopij virusa v 5 µl RNA. Število kopij na posamezno ličinko smo izračunali tako, da smo število kopij v 5 µl RNA pomnožili s faktorjem 80. Faktor 80 smo uporabili zato, ker smo za izolacijo RNA uporabili 200 µl od 1 ml suspenzije ličinke in 5 µl od 80 µl eluirane RNA (faktor 16) za metodo RT-qPCR. Izvedli smo primerjave rezultatov ugotovljenega števila kopij na posamezno ličinko in podatke statistično ovrednotili za nizek, srednji in visok odmerek.

### 3.3.6 Statistična obdelava podatkov poskusa na ličinkah

Pri posameznem eksperimentu s čebeljimi ličinkami so podani podatki virusne obremenitve na posamezno ličinko. Razlike med virusno obremenitvijo ličink pri vsaki od štirih skupin ličink smo pri poskusu s SBV in LSV3 vsak dan meritve testirali z neparametričnim Kruskal-Wallisovim testom vsote rangov (Kruskal in Wallis, 1952). Razlike med virusno obremenitvijo pri živih in mrtvih ličinkah na posamezen dan smo ločeno za vsako od štirih skupin testirali z Wilcoxonovim testom vsote rangov (Haynes in sod., 2013).

## **4 REZULTATI**

### **4.1 KVANTIFIKACIJA ČEBELJIH VIRUSOV Z METODO RT-qPCR**

#### **4.1.1 LOD in LOQ metode RT-qPCR za LSV3 in SBV**

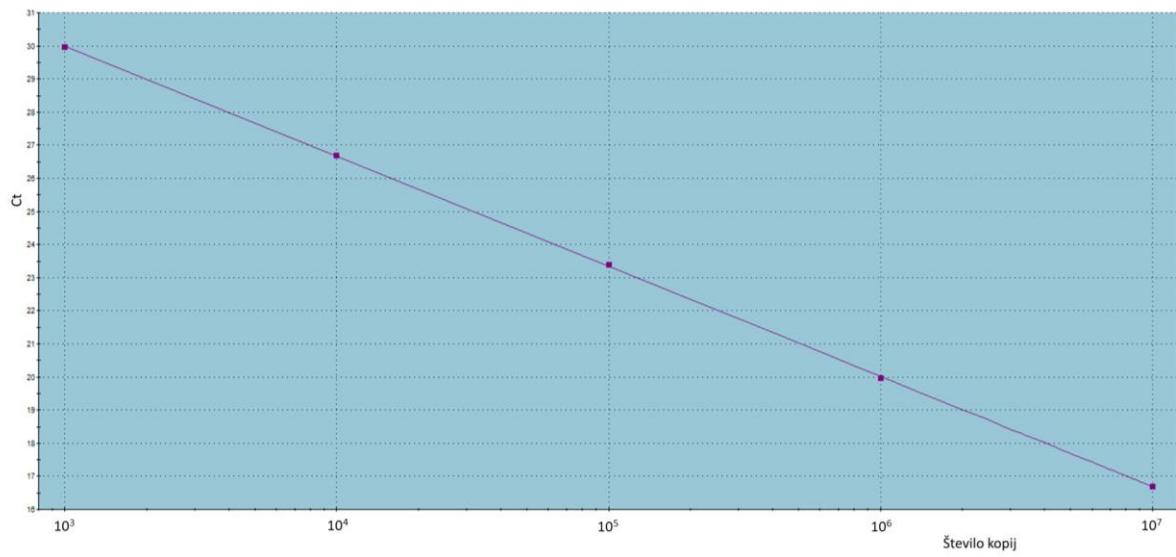
Pri uporabi metode RT-qPCR za LSV3 in SBV smo LOD ocenili na 10 kopij na 5  $\mu$ l RNA oziroma 100 kopij na čebelo, kar je primerljivo z oceno vrednosti LOD za uporabo metode pri ABPV, BQCV, CBPV in DWV (Schurr in sod., 2017; Schurr in sod., 2019).

LOQ za uporabo metode RT-qPCR za LSV3 in SBV smo ocenili na 100 virusnih kopij na 5  $\mu$ l RNA in 1000 virusnih kopij na čebelo, kar je primerljivo z uporabo metode RT-qPCR za kvantifikacijo ABPV, BQCV, CBPV in DWV v EURL.

#### **4.1.2 Statistični parametri metode RT-qPCR za ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 in SBV**

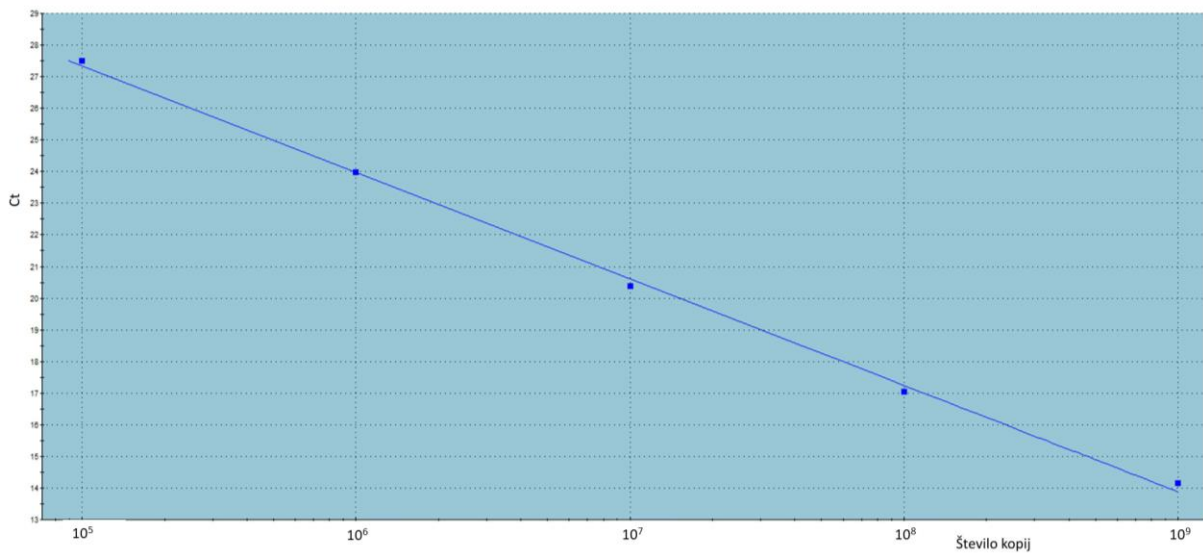
Učinkovitost metode RT-qPCR za ABPV znaša  $105,9 \pm 6,9$ ; učinkovitost metode za BQCV znaša  $107,6 \pm 8,4$ ; učinkovitost metode za CBPV znaša  $94,9 \pm 4,6$ ; učinkovitost metode za DWV znaša  $108,9 \pm 9,37$ ; učinkovitost metode za LSV3 znaša  $93,8 \pm 3,9$ ; učinkovitost metode za SBV znaša  $94,7 \pm 7,8$  (tabela 6).

Pri pomnoževanju petih zaporednih desetkratnih razredčitev standardov za LSV3 in SBV smo dobili pričakovane sigmoidne krivulje z enakomernim razmikom med desetkratnimi razredčitvami. Iz krivulj smo izrisali premico za kvantifikacijo vzorcev (slika 14, slika 15).



Slika 14: Standardna premica petih zaporednih desetkratnih razredčitev standarda LSV3.

Figure 14: Standard line of five consecutive 10-fold dilutions of LSV3 standard.



Slika 15: Standardna premica petih zaporednih desetkratnih razredčitev standarda SBV.

Figure 15: Standard line of five consecutive 10-fold dilutions of SBV standard.

**Tabela 6: Statistični parametri o uporabljeni metodi RT-qPCR za kvantifikacijo virusov ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 in SBV z uporabo serije desetkratnih zaporednih razredčitev standarda in po treh ločenih ponovitvah.**

Table 6: Statistical parameters for adequacy of RT-qPCR method for quantification of ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV obtained from 10-fold dilutions of the standard and three separate repetitions.

<b>ABPV</b>	<b>Ponovitev 1</b>	<b>Ponovitev 2</b>	<b>Ponovitev 3</b>	<b>Povprečje</b>	<b>Standardni odklon</b>
Presečišče	43,96	48,47	45,35	45,93	± 2,54
Naklon	-3,084	-3,345	-3,150	-3,193	± 0,152
Učinkovitost	111,0	99,0	107,7	105,9	± 6,9
R <sup>2</sup>	0,995	0,978	0,982		

<b>BQCV</b>	<b>Ponovitev 1</b>	<b>Ponovitev 2</b>	<b>Ponovitev 3</b>	<b>Povprečje</b>	<b>Standardni odklon</b>
Presečišče	42,77	41,80	41,77	42,11	± 0,66
Naklon	-3,362	-3,102	-3,036	-3,167	± 0,195
Učinkovitost	99,2	110,1	113,5	107,6	± 8,4
R <sup>2</sup>	0,993	0,994	1,000		

<b>CBPV</b>	<b>Ponovitev 1</b>	<b>Ponovitev 2</b>	<b>Ponovitev 3</b>	<b>Povprečje</b>	<b>Standardni odklon</b>
Presečišče	48,35	48,04	46,05	47,48	± 1,43
Naklon	-3,579	-3,432	-3,358	-3,456	± 0,123
Učinkovitost	90,3	95,9	98,5	94,9	± 4,6
R <sup>2</sup>	0,995	0,996	1,000		

<b>DWV</b>	<b>Ponovitev 1</b>	<b>Ponovitev 2</b>	<b>Ponovitev 3</b>	<b>Povprečje</b>	<b>Standardni odklon</b>
Presečišče	42,74	42,65	40,38	41,92	± 1,54
Naklon	-3,334	-3,059	-3,011	-3,135	± 0,199
Učinkovitost	99,5	112,3	114,8	108,9	± 9,37
R <sup>2</sup>	0,981	0,998	0,997		

<b>LSV 3</b>	<b>Ponovitev 1</b>	<b>Ponovitev 2</b>	<b>Ponovitev 3</b>	<b>Povprečje</b>	<b>Standardni odklon</b>
Presečišče	42,52	41,04	39,58	41,05	± 1,47
Naklon	-3,395	-3,607	-3,460	-3,487	± 0,120
Učinkovitost	97,0	89,9	94,5	93,8	± 3,9
R <sup>2</sup>	0,997	0,998	0,995		

<b>SBV</b>	<b>Ponovitev 1</b>	<b>Ponovitev 2</b>	<b>Ponovitev 3</b>	<b>Povprečje</b>	<b>Standardni odklon</b>
Presečišče	41,08	40,29	37,68	39,68	± 2,00
Naklon	-3,616	-3,517	-3,264	-3,466	± 0,202
Učinkovitost	89,0	92,5	102,5	94,7	± 7,8
R <sup>2</sup>	0,997	0,999	1,000		



#### **4.1.3 Primerjava števila kopij virusov pri klinično zdravih in obolelih čebeljih družinah**

V 108 vzorcih zdravih čebeljih družin in 89 vzorcih klinično obolelih čebeljih družin smo s kvantitativno metodo RT-qPCR in s sondo TaqMan uspešno določili prisotnost in število kopij ABPV, BQCV, CBPV, DWV in LSV3.

#### **4.1.4 Odstotek pozitivnih vzorcev pri klinično zdravih in klinično obolelih čebeljih družinah**

Odstotek vzorcev, pozitivnih na ABPV, je pri klinično zdravih čebeljih družinah znašal 29,63 %, pri klinično obolelih pa 79,78 %. BQCV smo ugotovili v 98,15 % vzorcev klinično zdravih čebeljih družin in v 96,63 % vzorcev klinično obolelih. CBPV nismo ugotovili v nobenem vzorcu klinično zdravih čebeljih družin in pri 19,10 % vzorcev klinično obolelih čebeljih družin. DWV smo ugotovili pri 39,81 % zdravih in 69,66 % obolelih čebeljih družin. Z LSV3 je bilo okuženih 67,59 % klinično zdravih in 48,31 % klinično obolelih čebeljih družin. Prisotnost nukleinskih kislin SBV smo ugotovili v 35,19 % vzorcev klinično zdravih in 22,47 % obolelih čebeljih družin.

Statistično značilno višji odstotek pozitivnih vzorcev pri klinično obolelih čebeljih družinah v primerjavi z zdravimi smo ugotovili pri ABPV, CBPV in DWV ( $p < 0,05$ ). Pri BQCV statistično značilnih razlik nismo ugotovili ( $p \geq 0,1$ ). Pri LSV3 in SBV pa smo ugotovili statistično značilno več pozitivnih vzorcev pri klinično zdravih čebeljih družinah ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 7: Odstotek pozitivnih vzorcev čebeljih družin s prisotnostjo ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 in SBV, določenih z metodo RT-qPCR, glede na vsako lokacijo vzorčenja zdravih čebeljih družin posebej in skupaj.**

Table 7: Percentage of positive samples of honeybee colonies for ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV tested by RT-qPCR method for each of the sampling locations of healthy honeybee colonies individually and together.

<b>Lokacija in</b>						
<b>število vzorcev (N)</b>	<b>ABPV (%)</b>	<b>BQCV (%)</b>	<b>CBPV (%)</b>	<b>DWV (%)</b>	<b>LSV3 (%)</b>	<b>SBV (%)</b>
<b>Lokacija 1 – zdrave</b>						
<b>N = 27</b>	3,70	96,30	0,00	55,56	74,07	3,70
<b>Lokacija 2 – zdrave</b>						
<b>N = 21</b>	9,52	100	0,00	4,76	71,43	38,10
<b>Lokacija 3 – zdrave</b>						
<b>N = 30</b>	30,00	100	0,00	20,00	46,67	30,00
<b>Lokacija 4 – zdrave</b>						
<b>N = 30</b>	66,67	96,67	0,00	70,00	80,00	66,67
<b>Skupaj – zdrave</b>						
<b>N = 108</b>	29,63	98,15	0,00	39,81	67,59	35,19

**Tabela 8: Odstotek pozitivnih vzorcev čebeljih družin s prisotnostjo ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 in SBV, določenih z metodo RT-qPCR pri klinično zdravih in obolelih čebeljih družinah.**

Table 8: Percentage of positive samples of honeybee colonies for ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV tested by RT-qPCR method in healthy and affected honeybee colonies.

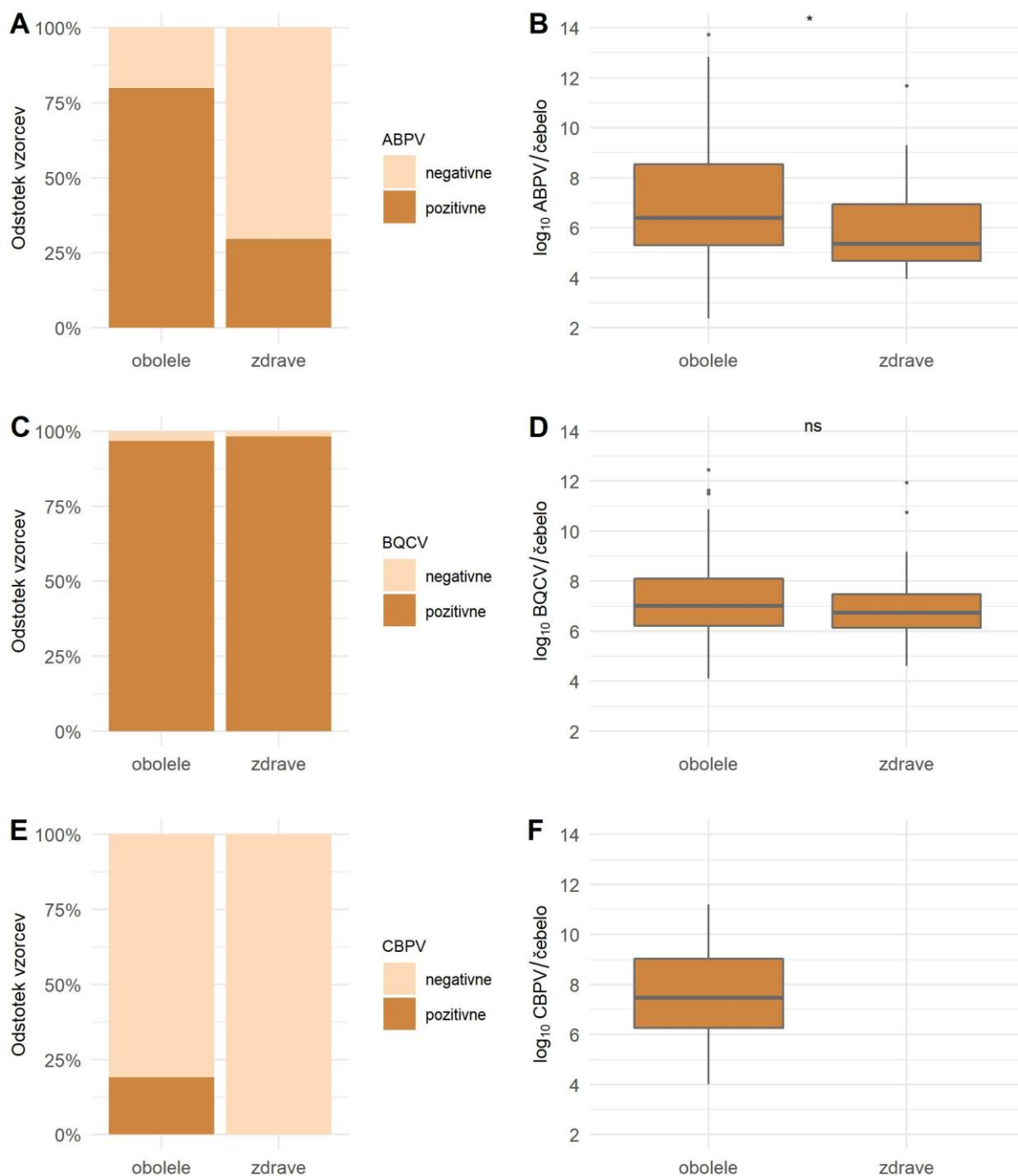
<b>Število vzorcev (N)</b>	<b>ABPV (%)</b>	<b>BQCV (%)</b>	<b>CBPV (%)</b>	<b>DWV (%)</b>	<b>LSV3 (%)</b>	<b>SBV (%)</b>
<b>Skupaj – zdrave</b>						
<b>N = 108</b>	29,63	98,15	0,00	39,81	67,59	35,19
<b>Skupaj – obolele</b>						
<b>N = 89</b>	79,78	96,63	19,10	69,66	48,31	22,47

#### **4.1.5 Ugotovljeno število kopij virusa pri klinično zdravih in klinično obolelih čebeljih družinah**

Povprečno število kopij ABPV v vzorcih zdravih čebeljih družin je znašalo  $5,98 \pm 1,79 \log_{10}$  kopij na čebelo, pri klinično obolelih čebeljih družinah pa  $7,21 \pm 2,74 \log_{10}$  kopij na čebelo. Pri BQCV je število kopij v vzorcih zdravih čebeljih družin znašalo  $6,88 \pm 1,09 \log_{10}$  kopij na čebelo, pri klinično obolelih pa  $7,33 \pm 1,74 \log_{10}$  kopij na čebelo. Pri CBPV je povprečno število kopij v vzorcih klinično obolelih čebeljih družin znašalo  $8,01 \pm 2,56 \log_{10}$  kopij na čebelo, pri

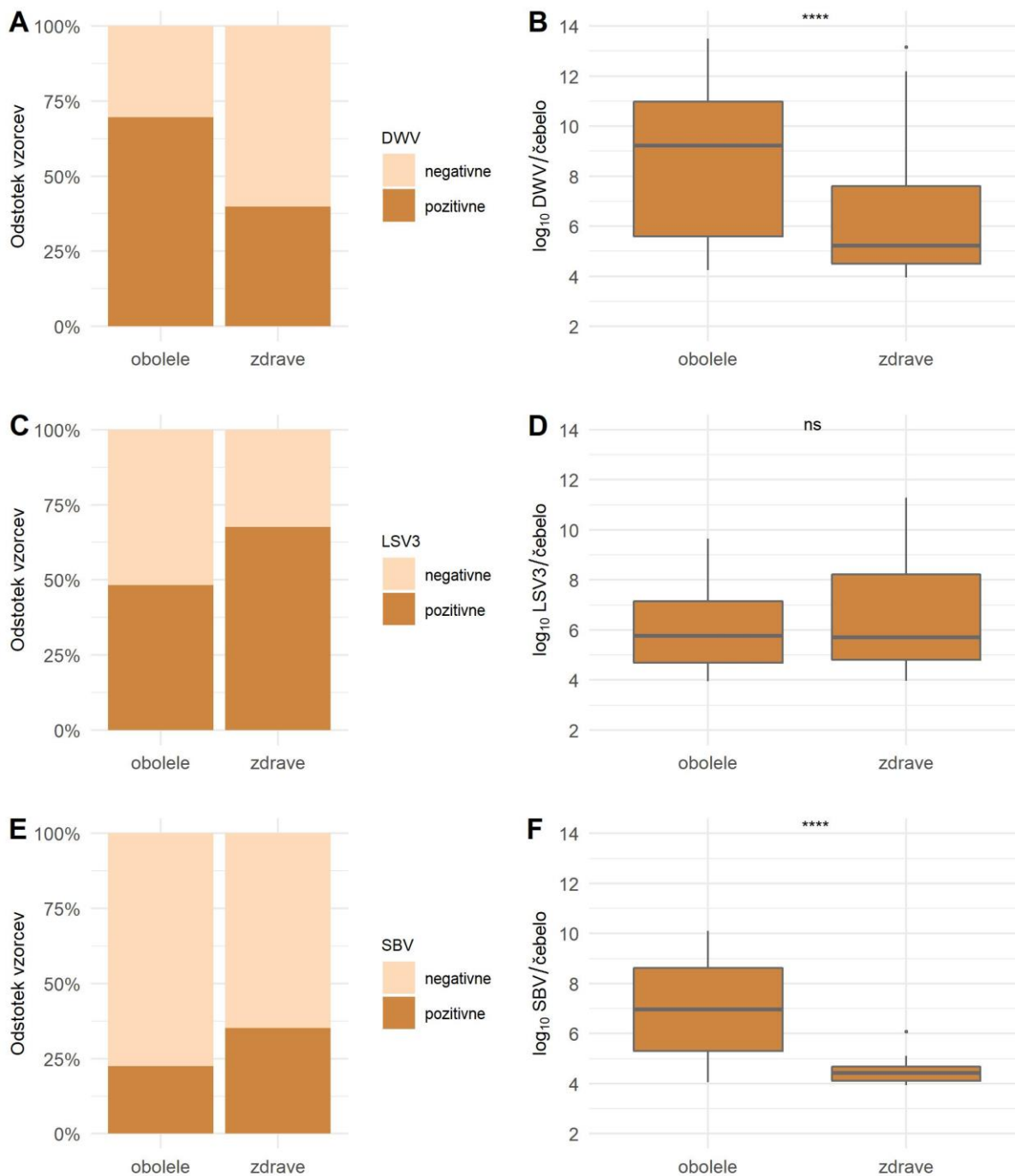
klinično zdravih pa CBPV nismo dokazali v nobenem od preiskovanih vzorcev. Povprečno število kopij pri DWV je  $6,37 \pm 2,55 \log_{10}$  kopij na čebelo pri klinično zdravih čebeljih družinah in  $8,69 \pm 2,90 \log_{10}$  kopij na čebelo v vzorcih klinično obolelih čebeljih družin. Pri LSV3 je bilo povprečno število kopij pri zdravih čebeljih družinah  $6,44 \pm 2,07 \log_{10}$  kopij na čebelo, pri klinično obolelih pa  $6,03 \pm 1,59 \log_{10}$  kopij na čebelo in pri virusu SBV je bilo povprečno število kopij pri zdravih čebeljih družinah  $4,45 \pm 0,42 \log_{10}$  kopij na čebelo, pri klinično bolnih pa  $6,92 \pm 2,00 \log_{10}$  kopij na čebelo.

Statistično značilno višje število kopij smo ugotovili pri klinično obolelih čebeljih družinah pri virusih ABPV, CBPV, DWV in SBV ( $p < 0,0001$ ), medtem ko pri BQCV ( $p = 0,6597$ ) in LSV3 ( $p = 0,0062$ ) statistično značilnih razlik v številu kopij med zdravimi in obolelimi čebeljimi družinami nismo ugotovili (sliki 16 in 17).



**Slika 16: Odstotek pozitivnih vzorcev in povprečno število kopij virusov v  $\log_{10}$ /čebelo za ABPV (A, B), BQCV (C, D) in CBPV (E, F).**

Figure 16: Percentage of positive samples and average viral copy number in  $\log_{10}$ /bee for ABPV, (A, B), BQCV (C, D) and CBPV (E, F).



**Slika 17: Odstotek pozitivnih vzorcev in povprečno število kopij virusov v  $\log_{10}$ /čebelo za DWV (A, B), LSV3 (C, D) in SBV (E, F).**

Figure 17: Percentage of positive samples and average viral copy number in  $\log_{10}$ /bee for DWV, (A, B), LSV3 (C, D) and SBV (E, F).

## 4.2 DOLOČANJE NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ CELOTNIH GENOMOV ČEBELJIH VIRUSOV Z METODO NGS

Z metodo NGS smo iz desetih vzorcev klinično zdravih in devetih vzorcev klinično obolelih čebeljih družin določili skupno 22 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov čebeljih virusov, ki jih uvrščamo med devet različnih vrst virusov. Določili smo štiri nukleotidna zaporedja celotnih genomov ABPV, tri zaporedja BQCV, dve zaporedji CBPV, pet za DWV, štiri za LSV in po eno nukleotidno zaporedje celotnih genomov SBV, ARV-1, BeeMLV in HPLV34. Pri metagenomski analizi dobljenih odčitkov izbranih vzorcev smo ugotovili tudi dele genomov drugih čebeljih virusov. Prvič je bil ugotovljen AmFv, prav tako smo ugotovili številne rastlinske viruse.

Iz štirih vzorcev klinično obolelih čebel smo v posameznem vzorcu določili nukleotidna zaporedja celotnih genomov več različnih virusov:

- Iz vzorca klinično obolele čebelje družine 341/2019, pri kateri so opazili veliko odmrlih čebel pred panjem, smo določili nukleotidna zaporedja celotnih genomov: CBPV RNA1 341/2019 (ON648751) in RNA2 341/2019 (ON648752), DWV 341-1/2019 (ON648741), DWV 341-2/2019 (ON648742) in ARV-1 341/2019 (ON620344).
- Iz vzorca klinično obolele čebelje družine 377/2020, pri kateri so opazili plazeče in potemnele čebele, smo določili nukleotidna zaporedja celotnih genomov: ABPV 377/2020 (ON648739), BQCV 377/2020 (ON648737) in HPLV34 377/2020 (ON648754).
- Iz vzorca klinično obolele čebelje družine 376/2020, pri kateri so opazili črne čebele, smo določili nukleotidna zaporedja celotnih genomov: ABPV 376/2020 (ON648748), CBPV RNA1 376/2020 (ON648749) in RNA2 376/2020 (ON648750).
- Iz vzorca klinično obolele čebelje družine 336/2019, pri kateri so opazili umiranje večine čebel, smo določili nukleotidna zaporedja celotnih genomov: BQCV 336/2019 (ON648735) in DWV 336/2019 (ON648740).

#### 4.2.1 Nukleotidna zaporedja celotnih genomov ABPV

Določili smo nukleotidna zaporedja štirih celotnih genomov ABPV, in sicer z imeni in dostopnimi številkami iz genske banke NCBI:

1. ABPV 366/2020 (ON453877),
2. ABPV 376/2020 (ON648748),
3. ABPV 377/2020 (ON648739),
4. ABPV 386/2020 (ON648738).

Primerjava nukleotidnih zaporedij štirih celotnih genomov ABPV, določenih v tej raziskavi, je pokazala od 98,34 do 99,85-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja. Zaporedji ABPV 366/2020 (ON453877) in ABPV 377/2020 (ON648739) sta si med seboj identični v 99,31 %. Zaporedji ABPV 376/2020 (ON648748) in ABPV 386/2020 (ON648738) pa sta si med seboj v 99,85 % identični.

Nukleotidno zaporedje celotnega genoma ABPV 366/2020 (ON453877) smo določili iz vzorca klinično obolele čebelje družine, pri kateri so opazili povečano število mrtvih čebel pred vhomom v panj, ki so bile vzorčene 4. junija 2020. Dolžina nukleotidnega zaporedja celotnega genoma je 9457 nt, povprečna pokritost genoma pa je 4907. Nukleotidno zaporedje tega genoma ABPV je najbližje sevu ABPV12C (OL803814) iz Češke iz leta 2018, s katerim imata 98,29-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja.

Nukleotidno zaporedje celotnega genoma ABPV 376/2020 (ON648748) smo določili iz vzorca klinično obolele čebelje družine, pri kateri so opazili potemnele čebele, vzorčene 17. junija 2020. Dolžina nukleotidnega zaporedja celotnega genoma je 9452 nt, povprečna pokritost genoma pa 1787. Nukleotidno zaporedje tega genoma je najbližje zaporedju ABPV12C (OL803814) iz Češke, s katerim imata 97,69-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja.

Nukleotidno zaporedje celotnega genoma ABPV 377/2020 (ON648739) smo določili iz vzorca klinično obolele čebelje družine, pri kateri so opazili več plazečih se potemnelih čebel, vzorčenih 1. julija 2020. Dolžina nukleotidnega zaporedja celotnega genoma je 9424 nt, povprečna pokritost genoma pa je 365. Nukleotidno zaporedje tega genoma je najbližje

zaporedju ABPV12C (OL803814) iz Češke iz leta 2018, s katerim imata 98,10-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja.

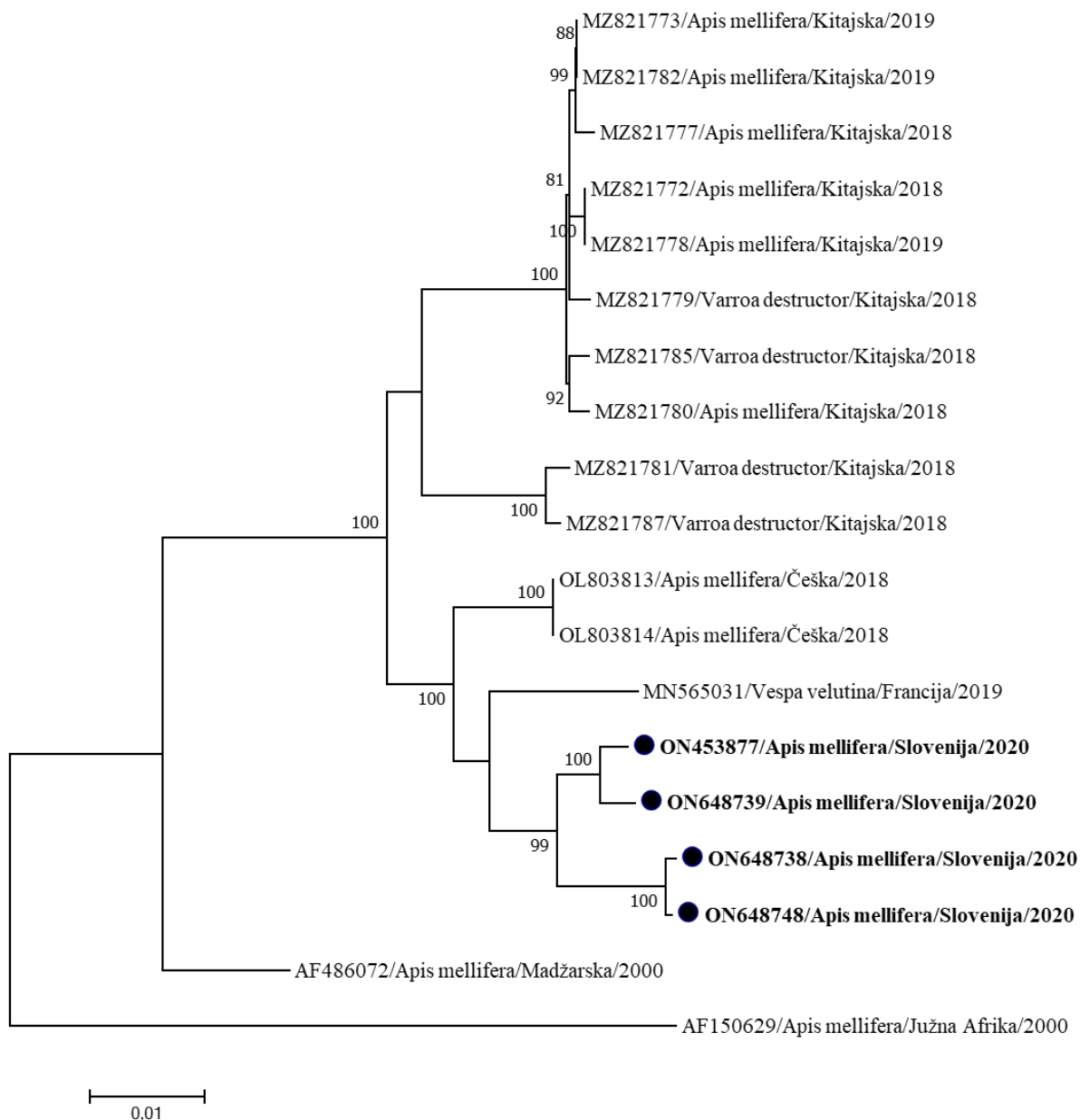
Nukleotidno zaporedje celotnega genoma ABPV 386/2020 (ON648738) smo določili iz vzorca klinično obolele čebelje družine, pri kateri so opazili zmanjševanje števila čebel, vzorčenih 17. julija 2020. Dolžina celotnega genoma je 9440 nt, povprečna pokritost genoma pa je 57466. Nukleotidno zaporedje tega genoma je najbližje sevu ABPV12C (OL803814) iz Češke, s katerim imata 97,65-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja.

Filogenetska primerjava štirih nukleotidnih zaporedij celotnih genomov ABPV, določenih v tej raziskavi, s 15 nukleotidnimi zaporedji celotnih genomov ABPV iz tujine, ki smo jih pridobili iz podatkovne baze genske banke NCBI (skupaj 19), je pokazala, da so nukleotidna zaporedja genomov iz te raziskave najbolj podobna nukleotidnim zaporedjem genomov iz Češke – ABPV12A (OL803813) in ABPV12C (OL803814) ter iz Francije – ABPV/144I (MN565031) (od 97,53 do 98,29-odstotno) (slika 18).

Izvedli smo filogenetske primerjave krajših odsekov (408 nukleotidov) nukleotidnih zaporedij v regiji ORF1, ki zapisuje helikazni protein. 41 zaporedij ABPV, ki so jih določili v predhodnih raziskavah v Sloveniji, smo primerjali s štirimi zaporedji ABPV, ki smo jih pridobili iz celotnih genomov, določenih v tej raziskavi. Ugotovili smo 100-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja ABPV 386/2020 (ON648738) z zaporedjem ABPV 281/2017 (MH900044), ki je bil prej ugotovljen pri čebeli, in z zaporedjema *Bombus*-BL3/2017 (MH900049) in *Bombus*-BL4/2017 (MH90050), ki so ju prej ugotovili pri čmrljih v Sloveniji (slika 19). Nukleotidna zaporedja ABPV 366/2020 (ON453877), ABPV 376/2020 (ON648748) in ABPV 377/2020 (ON648739), določena v tej raziskavi, pa se v regiji ORF1 razlikujejo od prej poznanih slovenskih nukleotidnih zaporedij, in sicer v 96,32 do 99,76 % (slika 19).

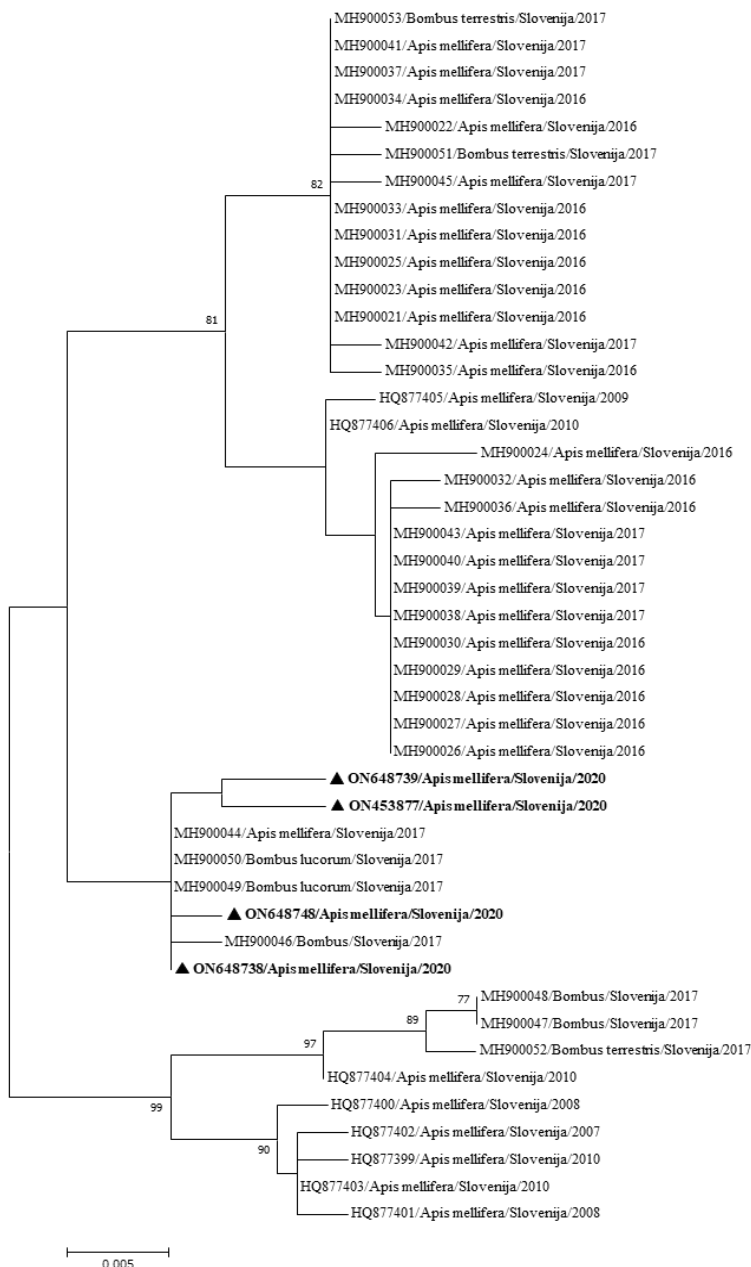
Filogenetske primerjave 17 krajših odsekov nukleotidnih zaporedij (357 nukleotidov) ABPV (v regiji ORF2, ki zapisuje kapsidni protein), določenih v predhodnih raziskavah v Sloveniji, s štirimi nukleotidnimi zaporedji ABPV, določenimi iz celotnih genomov v tej raziskavi, so pokazale, da so zaporedja ABPV iz te raziskave v regiji ORF2 med seboj 100-odstotno identična in se od 91,88 do 98,32-odstotno razlikujejo od predhodno določenih slovenskih sevov na podlagi nukleotidnih zaporedij (slika 20).





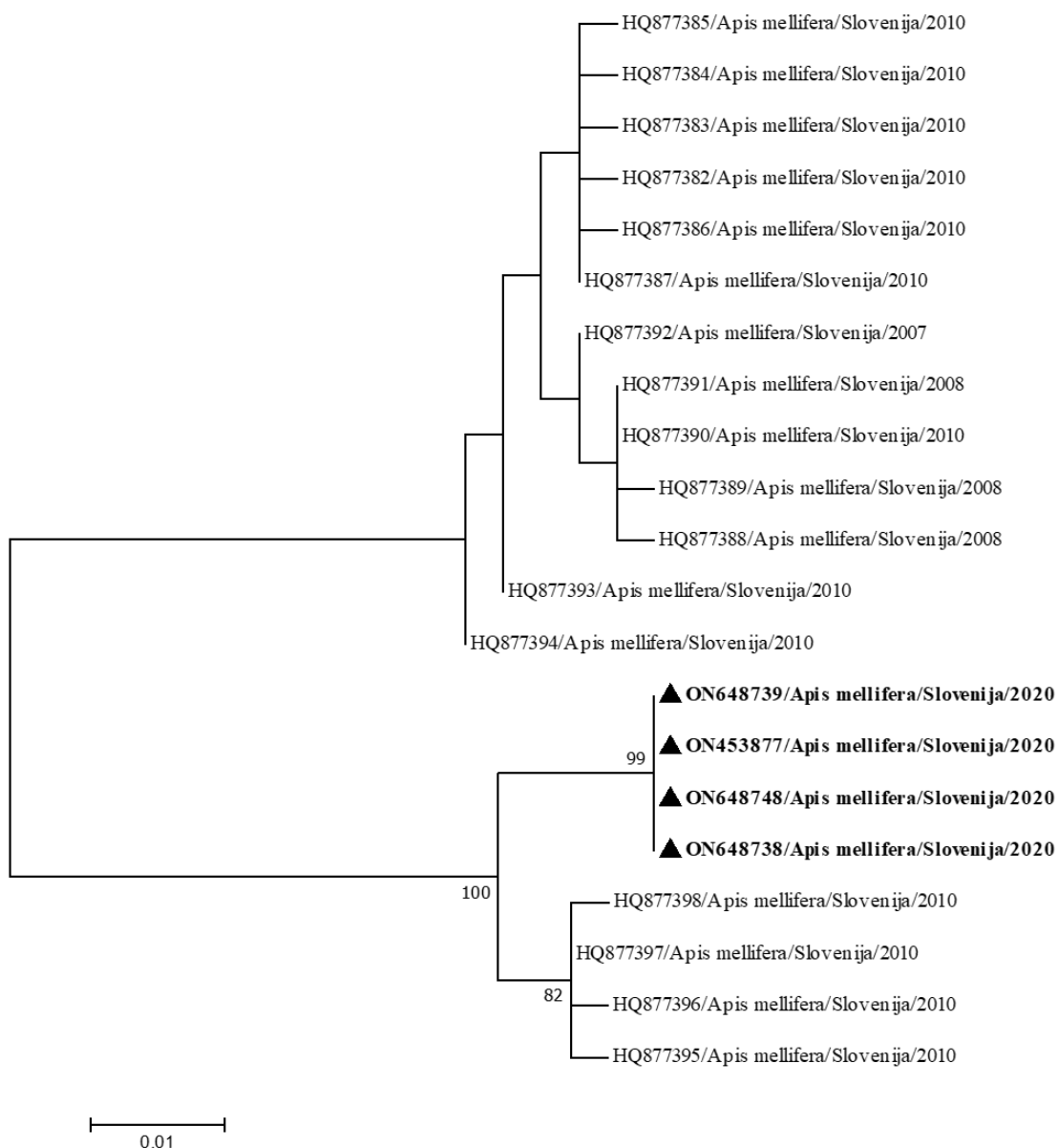
**Slika 18: Filogenetska primerjava 19 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov ABPV. Zaporedja ABPV, določena v tej raziskavi, so označena s pikami in krepko pisavo. Filogenetsko drevo smo izdelali z metodo največjega verjetja po modelu TN93+G, z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Dolžina vej odraža število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto.**

Figure 18: Phylogenetic comparison of 19 nucleotide sequences of complete genomes of ABPV. Sequences of ABPV determined in this study are marked with dots and bold text. Maximum likelihood tree was computed based on TN93+G model with bootstrap support of 1000 repetitions. Branch lengths are measured in the number of substitutions per site.



**Slika 19: Filogenetska primerjava 45 nukleotidnih zaporedij ABPV, določenih pri čebelah in čmrljih v Sloveniji, in sicer v regiji ORF1, ki zapisuje replikazo, v dolžini 408 nt. Nukleotidna zaporedja ABPV, določena v tej raziskavi, so označena s trikotniki in krepko pisavo. Filogenetsko drevo smo izdelali po metodi največjega verjetja po modelu TN93+G z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Dolžina vej odraža število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto.**

Figure 19: Phylogenetic comparison of 45 nucleotide sequences of ABPV determined in honeybees and bumblebees in Slovenia in ORF1 region, 408 nt long, which encodes replicase. ABPV sequences determined in this study are marked with triangles and bold text. Maximum likelihood tree was computed based on TN93+G model with bootstrap support of 1000 repetitions. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site.



**Slika 20: Filogenetske primerjave 21 nukleotidnih zaporedij (357 nt) ABPV, določenih pri čebelah v Sloveniji, v regiji ORF2, ki zapisuje kapsidni protein. Nukleotidna zaporedja ABPV, določena v tej raziskavi, so označena s trikotniki in krepko pisavo. Filogenetsko drevo smo izdelali po metodi največjega verjetja po modelu T92, z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Dolžina vej odraža število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto.**

Figure 20: Phylogenetic comparison of 21 nucleotide sequences (357 nt) of ABPV from honeybee samples determined in Slovenia in ORF2 region, which encodes capsid protein. Nucleotide sequences of ABPV determined in this study are marked with triangles and bold text. Maximum likelihood tree was computed based on T92 model with bootstrap support of 1000 repetitions. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site.

#### 4.2.2 Nukleotidna zaporedja celotnih genomov BQCV

Določili smo nukleotidna zaporedja prvim trem celotnim genomom BQCV v Sloveniji:

1. BQCV 336/2019 (ON648735),
2. BQCV LS90/2019 (ON648736),
3. BQCV 377/2020 (ON648737).

Primerjava nukleotidnih zaporedij treh slovenskih genomov BQCV je pokazala od 94,28 do 97,24-odstotno identičnost nukleotidnih zaporedij.

Nukleotidno zaporedje celotnega genoma BQCV 336/2019 (ON648735) smo določili iz vzorca obolele čebelje družine, pri katerih so opazili odmiranje čebel, vzorčenih 14. februarja 2019. Dolžina nukleotidnega zaporedja celotnega genoma meri 8450 nt, povprečna pokritost genoma je 4676. Nukleotidno zaporedje tega genoma je najbolj podobno celotnemu genomu BQCV4B (OL803818) iz Češke iz leta 2018, s katerim imata 96,84-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja.

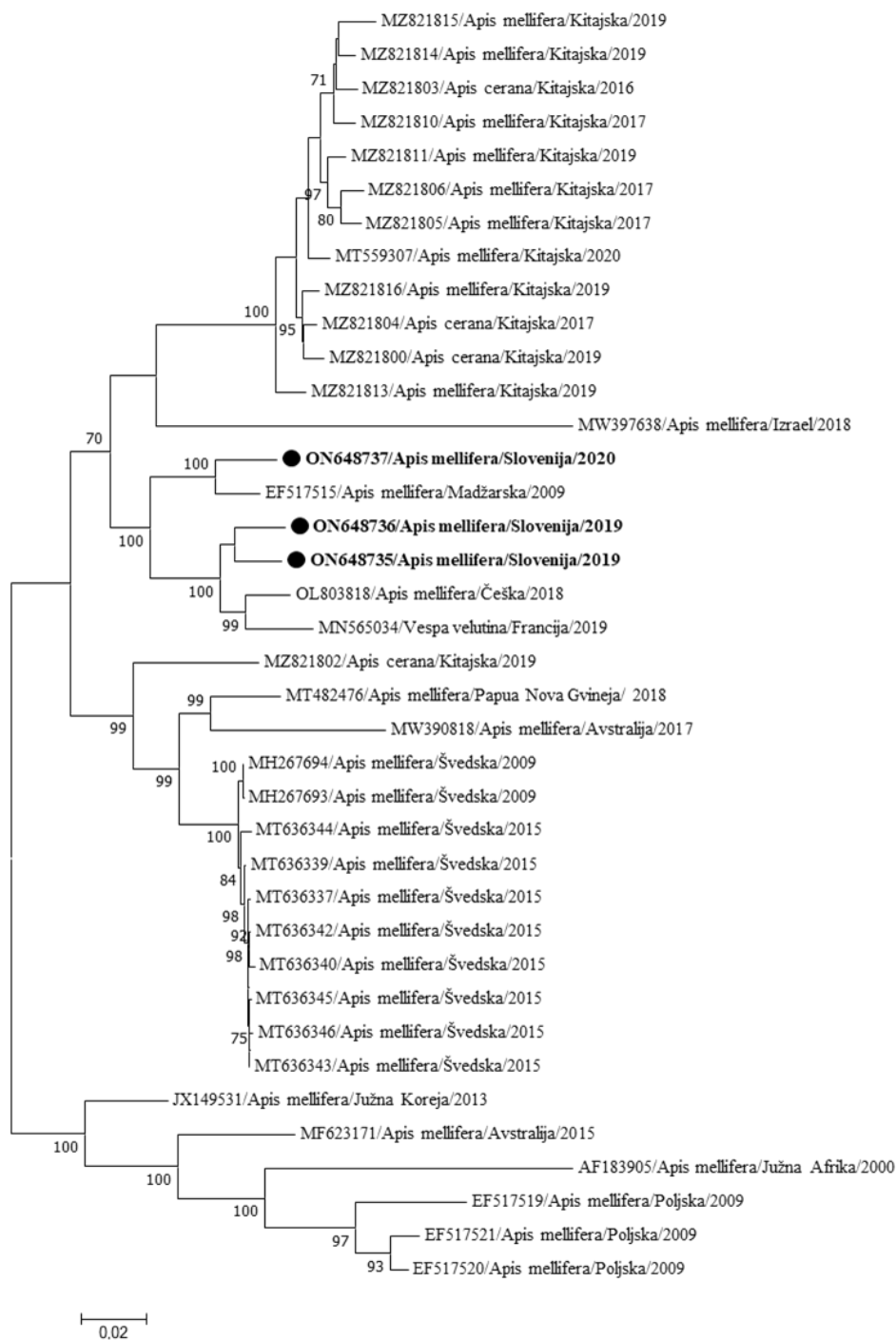
Nukleotidno zaporedje celotnega genoma BQCV LS90/2019 (ON648736) smo določili iz vzorca klinično zdrave čebelje družine, vzorčene 8. avgusta 2019. Dolžina celotnega genoma je 8450 nt, povprečna pokritost genoma je 30. Nukleotidno zaporedje tega genoma je najbolj podobno genomu BQCV4B (OL803818) iz Češke iz leta 2018, s katerim imata 96,54-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja.

Nukleotidno zaporedje celotnega genoma BQCV 377/2020 (ON648737) smo določili iz vzorca zdrave čebelje družine, vzorčene 1. julija 2020. Dolžina celotnega genoma meri 8451 nt, povprečna pokritost genoma je 35. Nukleotidno zaporedje tega genoma je najbolj podobno genomu HUNGARY-10 (EF517515) iz Madžarske iz leta 2009, s katerim imata 97,01-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja.

Filogenetska primerjava 35 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov BQCV iz genske banke NCBI in treh nukleotidnih zaporedij genomov BQCV, določenih v tej raziskavi (skupaj 38), je pokazala, da so nukleotidna zaporedja genomov BQCV, določenih v tej raziskavi, najbolj podobna nukleotidnim zaporedjem genomov HUNGARY-10 (EF517515) iz Madžarske,

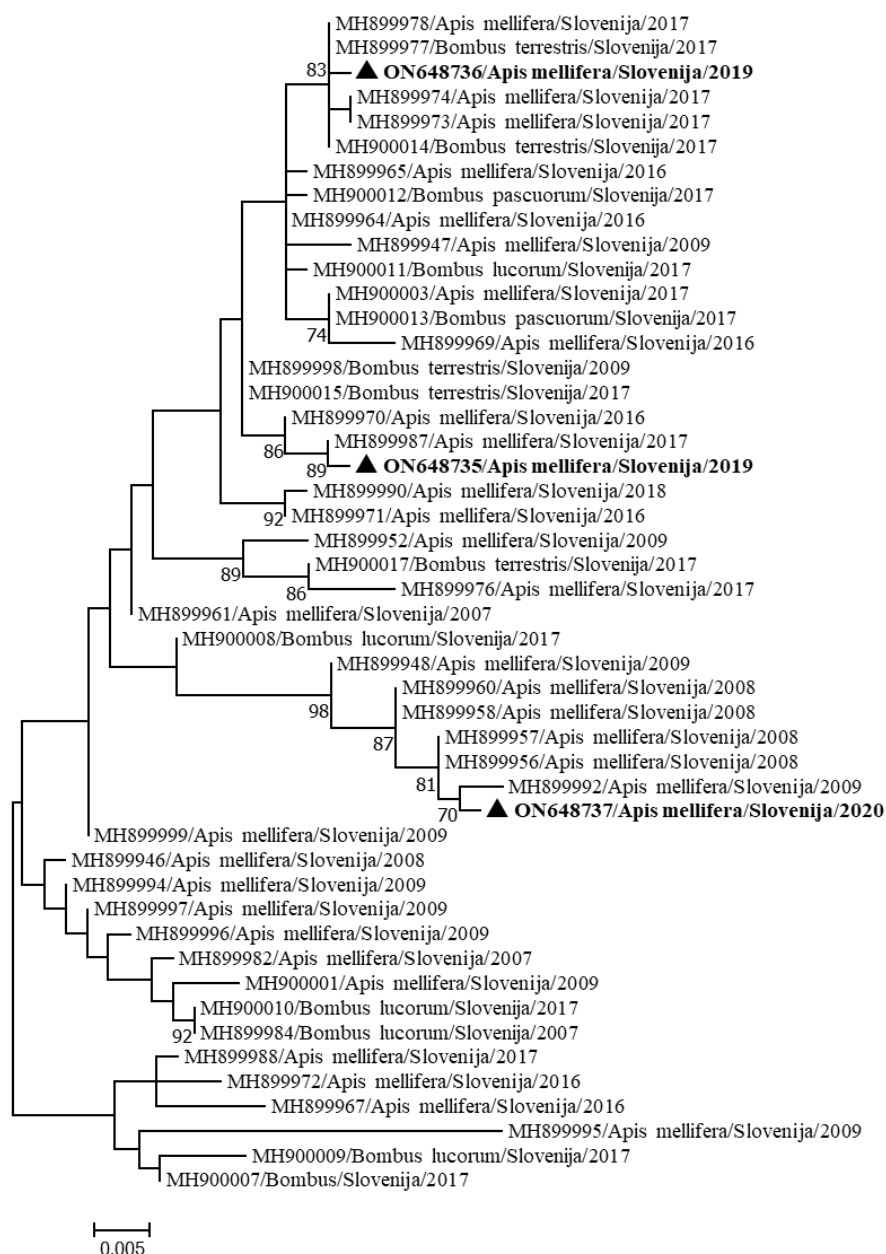
BQCV 144I (MN565034) iz Francije in BQCV4B (OL803818) iz Češke (od 93,53 do 97,01-odstotno) (slika 21).

Izvedli smo filogenetske primerjave krajših odsekov nukleotidnih zaporedij (653 nt) BQCV v regiji ORF2, ki zapisuje kapsidni protein. Primerjali smo tri zaporedja BQCV, določena v tej raziskavi, s 45 zaporedji, določenimi pri čebelah in čmrljih v Sloveniji v predhodnih raziskavah. Ugotovili smo od 95,87 do 99,85-odstotno identičnost sevov BQCV določenih v tej raziskavi z ostalimi slovenskimi sevi na podlagi nukleotidnih zaporedij (slika 22).



**Slika 21: Filogenetska primerjava 38 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov BQCV. Nukleotidna zaporedja BQCV, določena v tej raziskavi, so označena s pikami in krepko pisavo. Filogenetsko drevo smo izdelali z metodo največjega verjetja po modelu GTR+G+I, z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Dolžina vej odraža število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto.**

Figure 21: Phylogenetic comparison of 38 nucleotide sequences of complete genomes of BQCV. Strains of BQCV determined in this study are marked with dots and bold text. Maximum likelihood tree was computed based on GTR+G+I model with bootstrap support of 1000 repetitions. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site.



**Slika 22: Filogenetska primerjava 48 nukleotidnih zaporedij (653 nt) BQCV, določenih pri čebelah in čmrljih v Sloveniji, v regiji ORF2, ki zapisuje kapsidni protein. Zaporedja BQCV, določena v tej raziskavi, so označena s trikotniki in krepko pisavo. Filogenetsko drevo smo izdelali po metodi največjega verjetja po modelu T92+G+I, z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Dolžina vej odraža število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto.**

Figure 22: Phylogenetic comparison of 48 nucleotide sequences (653 nt) of BQCV from honeybee samples determined in Slovenia in ORF2 region, which encodes capsid protein. BQCV sequences determined in this study are marked with triangles and bold text. Maximum likelihood tree was computed based on T92+G+I model with bootstrap support of 1000 repetitions. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site.

### 4.2.3 Nukleotidna zaporedja celotnih genomov CBPV

Določili smo dve nukleotidni zaporedji celotnih genomov CBPV, sestavljenih iz fragmentov RNA1 in RNA2, iz vzorcev klinično obolelih čebeljih družin:

1. CBPV RNA1 341/2019 (ON648751), CBPV RNA2 341/2019 (ON648752),
2. CBPV RNA1 376/2020 (ON648749), CBPV RNA2 376/2020 (ON648750).

Nukleotidni zaporedji fragmentov RNA1 iz CBPV RNA1 341/2019 (ON648751) in CBPV RNA1 376/2020 (ON648749), ki smo ju določili v tej raziskavi, sta si med seboj 97,84-odstotno identični. Nukleotidni zaporedji fragmentov RNA2 iz CBPV RNA2 341/2019 (ON648752) in CBPV RNA2 376/2020 (ON648750), ki smo ju določili v tej raziskavi, pa imata 98,81-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja.

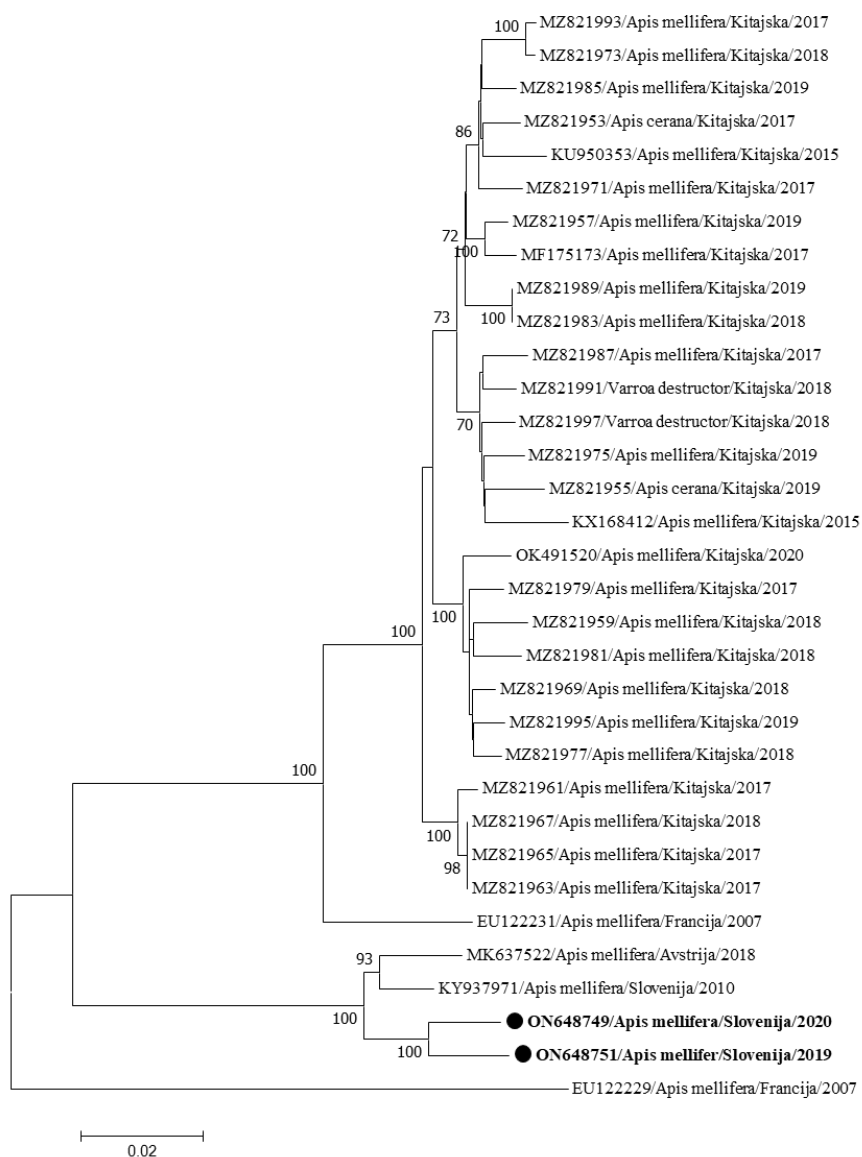
Nukleotidno zaporedje CBPV RNA1 341/2019 smo pridobili iz vzorca klinično obolele čebelje družine, pri kateri so opazili večje število mrtvih čebel pred panjem, in sicer 7. decembra 2019. Celotni fragment RNA1 obsega 3617 nt, s povprečno pokritostjo genoma 8964. Primerjava zaporedij seva CBPV RNA1 341/2019 (ON648751) z najbližjim sevom M92/2010 (KY937971) iz genske banke NCBI je pokazala 97,18-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja. Nukleotidno zaporedje genoma CBPV RNA2 341/2019 iz istega vzorca je dolgo 2272 nt, s povprečno pokritostjo genoma 23573. Primerjava zaporedij seva CBPV RNA2 341/2019 (ON648752) z najbližjim sevom M92/2010 (KY937972) iz genske banke NCBI je pokazala 98,50-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja.

Nukleotidno zaporedje genoma CBPV RNA1 376/2020 smo pridobili iz vzorca klinično obolele čebelje družine, vzorčene 18. junija 2020, pri kateri so opazili odrasle čebele črne barve. Celotni fragment RNA1 obsega 3645 nt, s povprečno pokritostjo genoma 37553. Primerjava zaporedij seva CBPV RNA1 376/2020 (ON648749) z najbližjim sevom M92/2010 (KY937971) iz genske banke NCBI je pokazala 97,25-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja. Nukleotidno zaporedje genoma CBPV RNA2 376/2020 iz istega vzorca je dolgo 2272 nt, s povprečno pokritostjo genoma 8131. Primerjava zaporedij seva CBPV RNA2 376/2020 (ON648750) z najbližjim sevom M92/2010 (KY937972) iz genske banke NCBI je pokazala 98,68-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja.



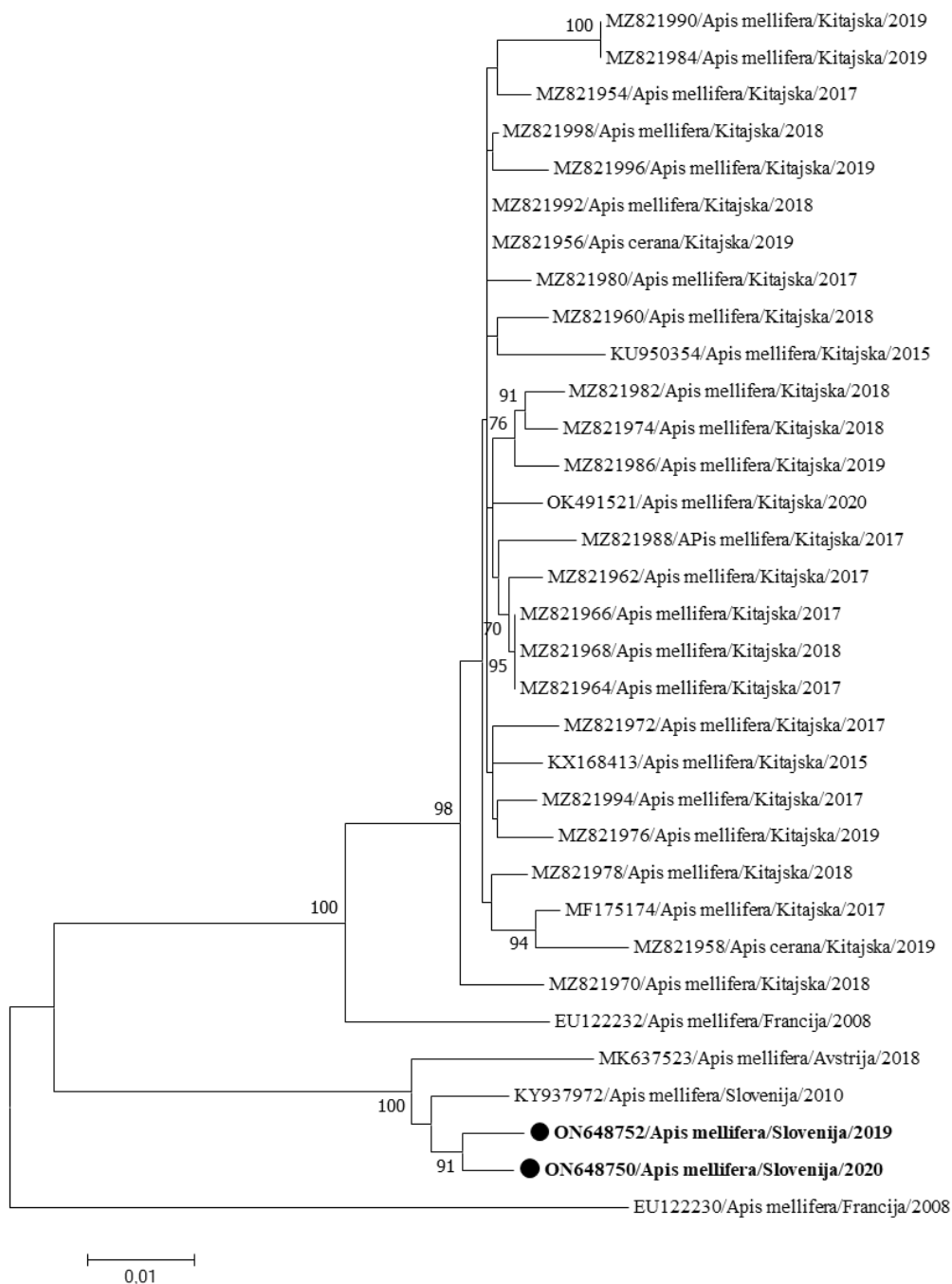
Filogenetska primerjava 31 nukleotidnih zaporedij fragmenta RNA1 celotnih genomov CBPV iz genske banke NCBI in dveh nukleotidnih zaporedij CBPV RNA1 341/2019 (ON648751) in CBPV RNA1 376/2020 (ON648749), ki smo ju določili v tej raziskavi (skupaj 33), je pokazala, da so sevi CBPV, določeni v tej raziskavi, najbolj podobni sevom AUT-17 (MK637522) iz Avstrije in M92/2010 (KY937971) iz Slovenije na podlagi nukleotidnega zaporedja (od 96,82 do 97,25-odstotno) (slika 23).

Filogenetska primerjava 31 nukleotidnih zaporedij fragmenta RNA2 celotnih genomov CBPV iz genske banke NCBI z dvema fragmentoma RNA2, ki smo ju določili v tej raziskavi (skupaj 33), je pokazala, da so zaporedja CBPV, določena v tej raziskavi, tudi v nukleotidnem zaporedju fragmenta RNA2 najbolj podobna sevom AUT-17 (MK637523) iz Avstrije in M92/2010 (KY937972) iz Slovenije (od 97,36 do 98,68-odstotno) (slika 24).



**Slika 23: Filogenetska primerjava 33 nukleotidnih zaporedij RNA1 celotnih genomov CBPV. Nukleotidna zaporedja celotnih genomov CBPV, določena v tej raziskavi, so označena s pikami in krepko pisavo. Filogenetsko drevo smo izdelali po metodi največjega verjetja po modelu T93+G+I z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Dolžina vej odraža število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto.**

Figure 23: Phylogenetic comparison of 33 nucleotide sequences RNA1 of complete genomes of CBPV. Nucleotide sequences of complete genomes of CBPV determined in this study are marked with dots and bold text. Maximum likelihood tree was computed based on T93+G+I model with bootstrap support of 1000 repetitions. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site.



**Slika 24: Filogenetska primerjava 33 nukleotidnih zaporedij RNA2 celotnih genomov CBPV. Nukleotidna zaporedja celotnih genomov CBPV, določena v tej raziskavi, so označena s pikami in krepko pisavo. Filogenetsko drevo smo izdelali po metodi največjega verjetja po modelu GTR+G+I, z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Dolžina vej odraža število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto.**  
 Figure 24: Phylogenetic comparison of 33 nucleotide sequences RNA2 of complete genomes of CBPV. Nucleotide sequences of complete genomes of CBPV determined in this study are marked with dots and bold text. Maximum likelihood tree was computed based on GTR+G+I model with bootstrap support of 1000 repetitions. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site.

#### 4.2.4 Nukleotidna zaporedja celotnih genomov DWV

Določili smo pet nukleotidnih zaporedij celotnih genomov DWV, ki so prva nukleotidna zaporedja celotnih genomov DWV, določena v Sloveniji:

1. DWV 336/2019 (ON648740),
2. DWV 341-1/2019 (ON648741),
3. DWV 341-2/2019 (ON648742),
4. DWV LS13/2018 (ON648743),
5. DWV LS26/2018 (ON648744).

V vzorcih klinično zdravih čebeljih družin smo ugotovili genotip DWV-A (DWV LS13/2018, DWV LS26/2018), pri klinično obolelih pa genotipa DWV-A (DWV 341-2/2019) in DWV-B (DWV 336/2019, DWV 341-1/2019). Dve različni nukleotidni zaporedji genomov DWV smo določili iz istega vzorca klinično obolele čebelje družine, pri kateri so opazili večje število odmrlih čebel pred panjem. Vzorec smo odvzeli 7. decembra 2019. To sta bili nukleotidni zaporedji DWV 341-1/2019 in DWV 341-2/2019. Nukleotidno zaporedje genoma DWV 341-1/2019 lahko uvrstimo h genotipu DWV-B, nukleotidno zaporedje genoma DWV 341-2/2019 pa h genotipu DWV-A.

Nukleotidna zaporedja pri genotipih DWV-A in DWV-B, ki smo jih določili v tej raziskavi, so si med seboj podobna v 84,54 do 85,48 %.

Nukleotidno zaporedje genoma DWV 341-1/2019 (ON648741) obsega 10126 nt, s povprečno pokritostjo genoma 31035, in ima 99,48-odstotno identičnost zaporedja z nukleotidnim zaporedjem genoma DWV/144I (MN565037) iz Francije.

Nukleotidno zaporedje genoma DWV 341-2/2019 (ON648742) obsega 10145 nt, s povprečno pokritostjo 5006, in ima 97,87-odstotno identičnost z nukleotidnim zaporedjem genoma PA (AY292384) iz Italije.

Nukleotidno zaporedje genoma DWV 336/2019 (ON648740) smo določili iz vzorca klinično obolele čebelje družine, ki je bila vzorčena 14. februarja 2019, pri kateri so ugotovili umiranje večine čebel v panju. Zaporedje je dolgo 10127 nt in povprečna pokritost je 3342. Nukleotidno

zaporedje tega genoma je najbolj podobno nukleotidnemu zaporedju celotnega genoma DWV/144I (MN565037) iz Francije (99,26-odstotna identičnost nukleotidnega zaporedja).

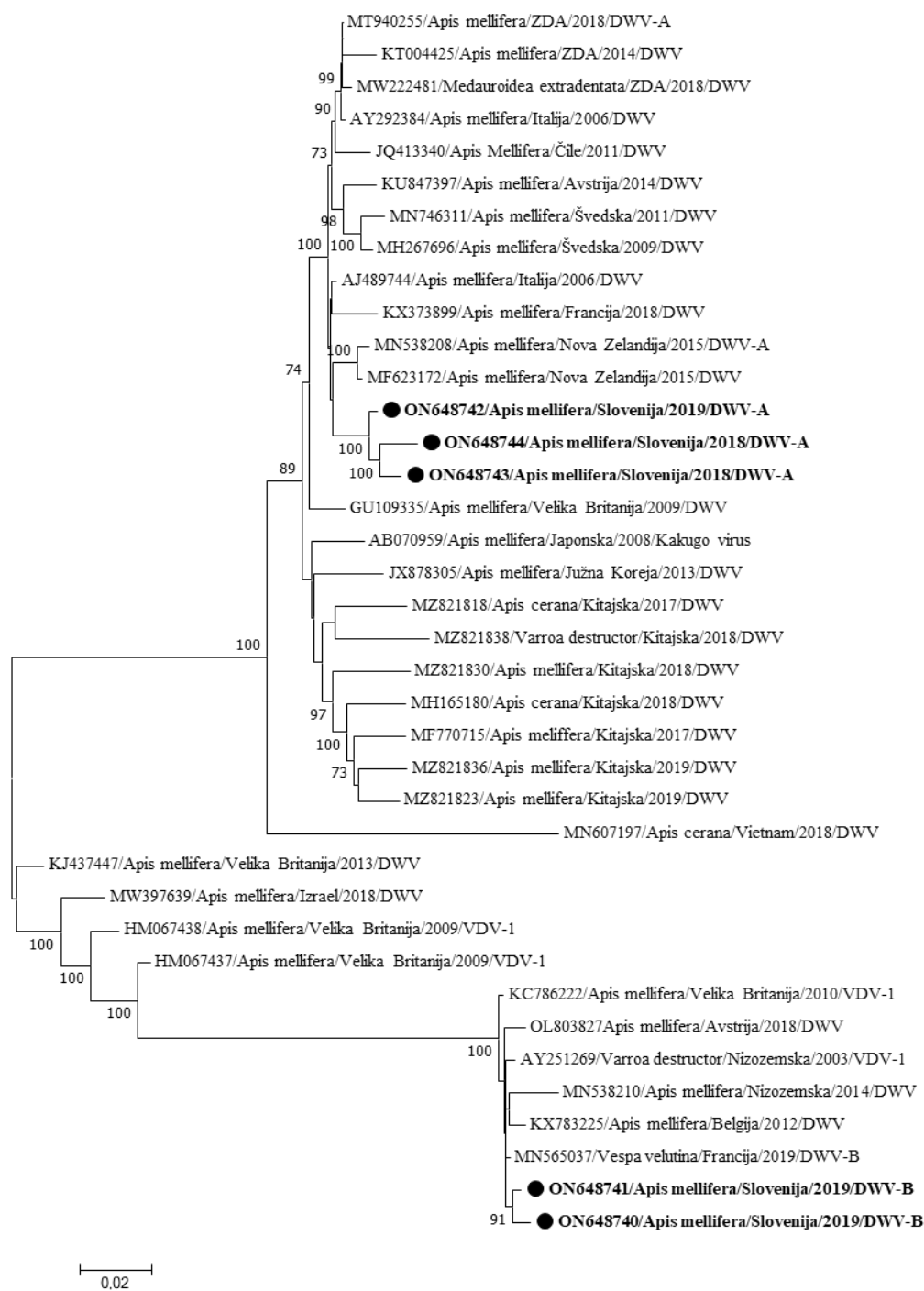
Nukleotidno zaporedje genoma DWV LS13/2018 (ON648743) smo pridobili iz vzorca klinično zdrave čebelje družine, odvzetega 15. novembra 2018. Nukleotidno zaporedje tega genoma obsega 9647 nt, s povprečno pokritostjo 7267, in ima 97,55-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja z genoma PA (AY292384) iz Italije.

Nukleotidno zaporedje genoma DWV LS26/2018 (ON648744) smo določili iz vzorca klinično zdrave čebelje družine, vzorčene 11. decembra 2018. Nukleotidno zaporedje genoma meri 9962 nt, s povprečno pokritostjo 1575. Nukleotidno zaporedje tega genoma ima 97,26-odstotno identičnost z genomom PA (AY292384) iz Italije.

Nukleotidna zaporedja treh genomov DWV, ki smo jih določili v tej raziskavi, ki jih lahko uvrstimo v genotip DWV-A (DWV 341-2/2019, DWV LS13/2018, DWV LS26/2018), so si med seboj od 98,37 do 98,89-odstotno identična. Dve nukleotidni zaporedji celotnih genomov, določenih v tej raziskavi, ki ju lahko uvrstimo v genotip DWV-B (DWV 336/2019, DWV 341-1/2019), pa imata 99,30-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja.

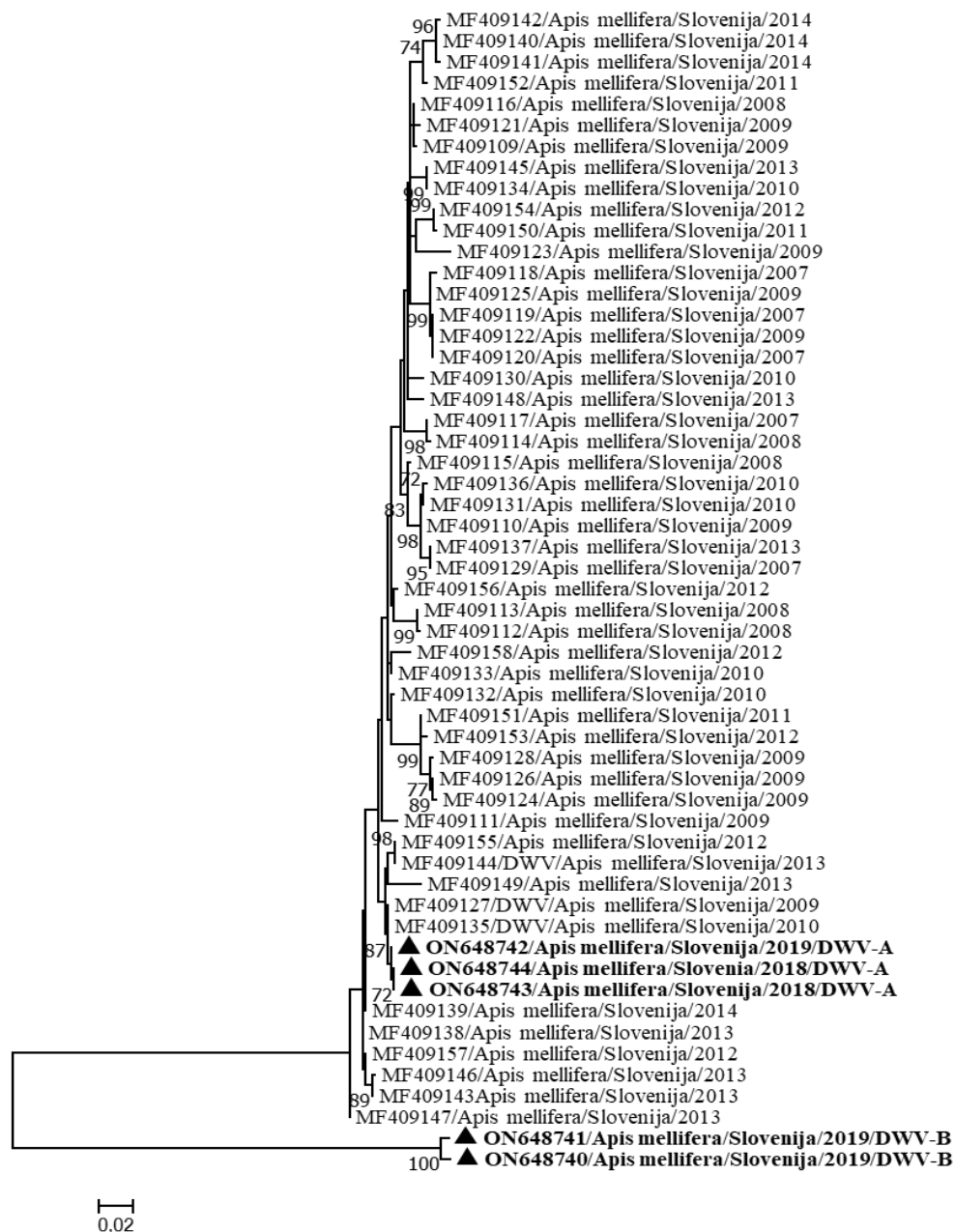
Filogenetska primerjava 33 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov DWV iz genske banke NCBI in petih nukleotidnih zaporedij celotnih genomov, določenih v tej raziskavi (skupaj 38), je pokazala delitev nukleotidnih zaporedij, določenih v tej raziskavi, v dva genotipa, in sicer genotip DWV-A in DWV-B (slika 25). Primerjava 50 krajših odsekov zaporedij DWV v regiji ORF, ki zapisuje helikazo (573 nt), ki so bili določeni v Sloveniji v predhodnih raziskavah s petimi zaporedji, določenimi iz celotnih genomov v tej raziskavi, je pokazala od 76,79 do 99,83-odstotno identičnost nukleotidnih zaporedij (slika 26). Primerjava 61 krajših odsekov zaporedij DWV predhodno določenih v Sloveniji v regiji ORF, ki zapisuje protein L (471 nt) s petimi zaporedji določenimi iz celotnih genomov v tej raziskavi, je pokazala od 72,82 do 99,58-odstotno identičnost nukleotidnih zaporedij (slika 27).

Nukleotidni zaporedji genomov DWV LS13/2018 (ON648743) in DWV LS26/2018 (ON648744) določenih v tej raziskavi, sta si tako v regiji helikaze kot tudi v regiji proteina L, 100-odstotno identični.



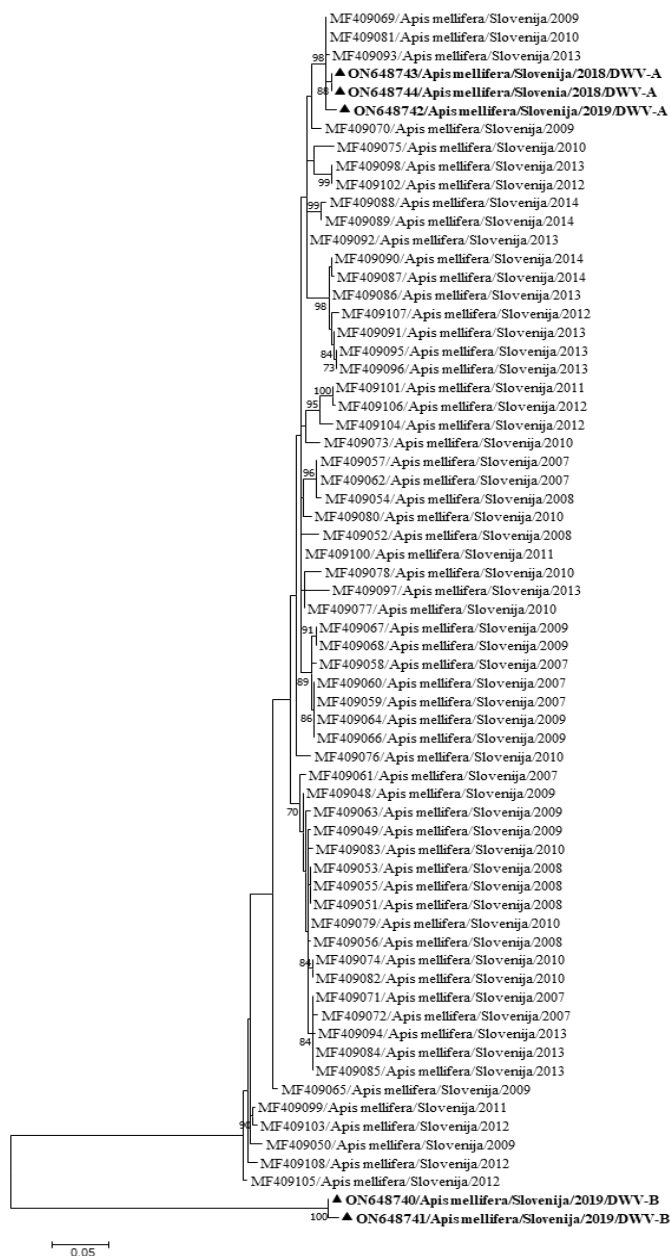
**Slika 25: Filogenetska primerjava 38 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov DWV. Nukleotidna zaporedja celotnih genomov, določena v tej raziskavi, so označena s pikami in krepko pisavo. Filogenetsko drevo smo izdelali po metodi največjega verjetja po modelu GTR+G+I, z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Dolžina vej odraža število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto.**

Figure 25: Phylogenetic comparison of 38 nucleotide sequences of complete genomes of DWV. Nucleotide sequences of complete genomes of DWV determined in this study are marked with dots and bold text. Maximum likelihood tree was computed based on GTR+G+I model with bootstrap support of 1000 repetitions. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site.



Slika 26: Filogenetska primerjava 55 nukleotidnih zaporedij (573 nt) DWV (v regiji ORF, ki zapisuje helikazo), določenih pri čebelah v Sloveniji. Zaporedja DWV, določena v tej raziskavi, so označena s trikotniki in krepko pisavo. Filogenetsko drevo smo izdelali po metodi največjega verjetja po modelu TN93+I, z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Dolžina vej odraža število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto.

Figure 26: Phylogenetic comparison of 55 nucleotide sequences (573 nt) of DWV (in ORF region which encodes helicase) from honeybee samples determined in Slovenia. DWV sequences determined in this study are marked with triangles and bold text. Maximum likelihood tree was computed based on TN93+I model with bootstrap support of 1000 repetitions. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site.



**Slika 27: Filogenetska primerjava 66 nukleotidnih zaporedij (471 nt) DWV (v regiji ORF, ki zapisuje protein L), določenih pri čebelah v Sloveniji. Zaporedja DWV, določena v tej raziskavi, so označena s trikotniki in krepko pisavo. Filogenetsko drevo smo izdelali po metodi največjega verjetja po modelu T92+I, z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Dolžina vej odraža število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto.**

Figure 27: Phylogenetic comparison of 66 nucleotide sequences (471 nt) of DWV (in ORF region, which encodes L protein) from honeybee samples determined in Slovenia. DWV sequences determined in this study are marked with triangles and bold text. Maximum likelihood tree was computed based on T92+I model with bootstrap support of 1000 repetitions. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site.



#### 4.2.5 Nukleotidna zaporedja celotnih genomov LSV

Določili smo nukleotidna zaporedja štirih celotnih genomov LSV:

1. LSV LS21/2018 (ON648753),
2. LSV LS48/2019 (ON648745),
3. LSV LS74/2019 (ON648746),
4. LSV LS81/2019 (ON648747).

Ta nukleotidna zaporedja genomov LSV imajo od 76,41 do 93,58-odstotno identičnost. Vse vzorce, iz katerih smo pridobili nukleotidna zaporedja celotnih genomov LSV, smo odvzeli iz klinično zdravih čebeljih družin. Tri nukleotidna zaporedja genomov, in sicer LSV LS48/2019, LSV LS74/2019 in LSV LS81/2019, lahko uvrstimo k LSV3, nukleotidno zaporedje gena LSV LS21/2018 pa k LSV4.

Nukleotidno zaporedje gena LSV LS21/2018 (ON648753) smo določili iz vzorca klinično zdrave čebelje družine, ki smo ga odvzeli 16. novembra 2018. Nukleotidno zaporedje gena obsega 5973 nt, s povprečno pokritostjo 3375, in ima 88,53-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja z zaporedjem gena LSV\_No15\_AM-HUN-2017-3-1 (MZ821861) s Kitajske.

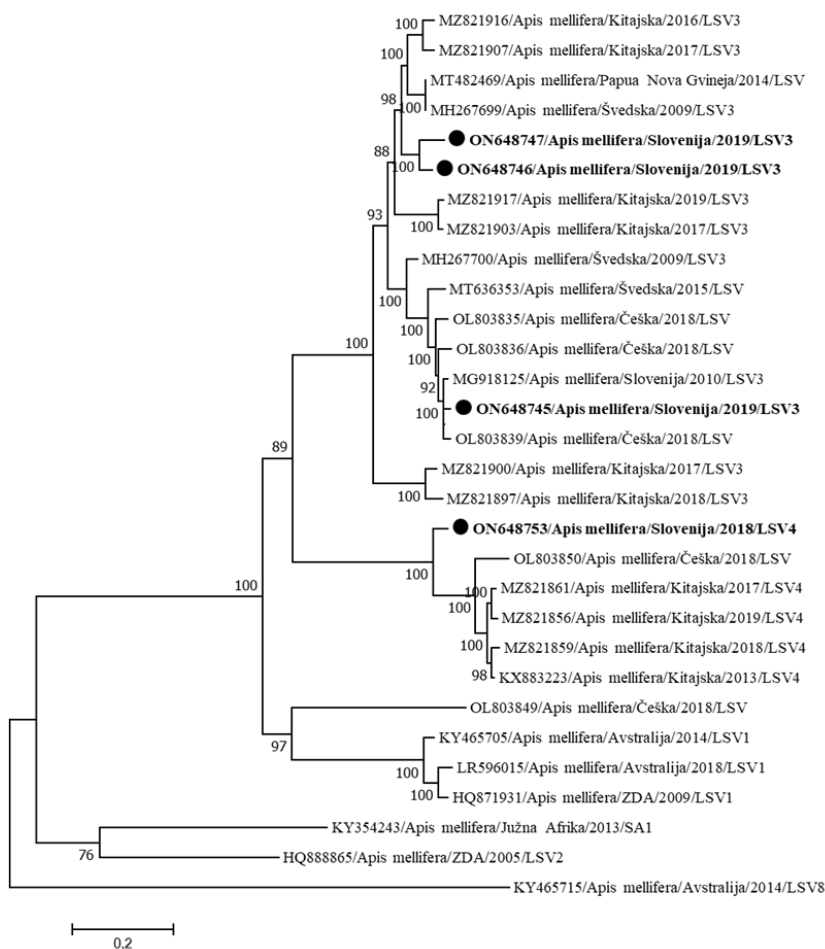
Nukleotidno zaporedje gena LSV LS48/2019 (ON648745) smo določili iz vzorca klinično zdrave čebelje družine, ki smo ga odvzeli 28. februarja 2019. Nukleotidno zaporedje gena obsega 5967 nt, s povprečno pokritostjo 15452, in ima 97,37-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja z zaporedjem gena M92/2010 (MG918125) iz leta 2010 iz Slovenije.

Nukleotidno zaporedje gena LSV LS74/2019 (ON648746) smo določili iz vzorca klinično zdrave čebelje družine, ki smo jo vzorčili 16. maja 2019. Nukleotidno zaporedje gena obsega 5997 nt, s povprečno pokritostjo 407, in ima 94,66-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja z zaporedjem gena NT-LSV3 (KY4655717) iz Avstralije.

Nukleotidno zaporedje gena LSV LS81/2019 (ON648747) smo določili iz vzorca klinično zdrave čebelje družine, ki smo ga odvzeli 31. maja 2019. Nukleotidno zaporedje gena obsega

6025 nt, s povprečno pokritostjo 594, in ima 90,76-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja z zaporedjem genoma NT-LSV3 (KY4655717) iz Avstralije.

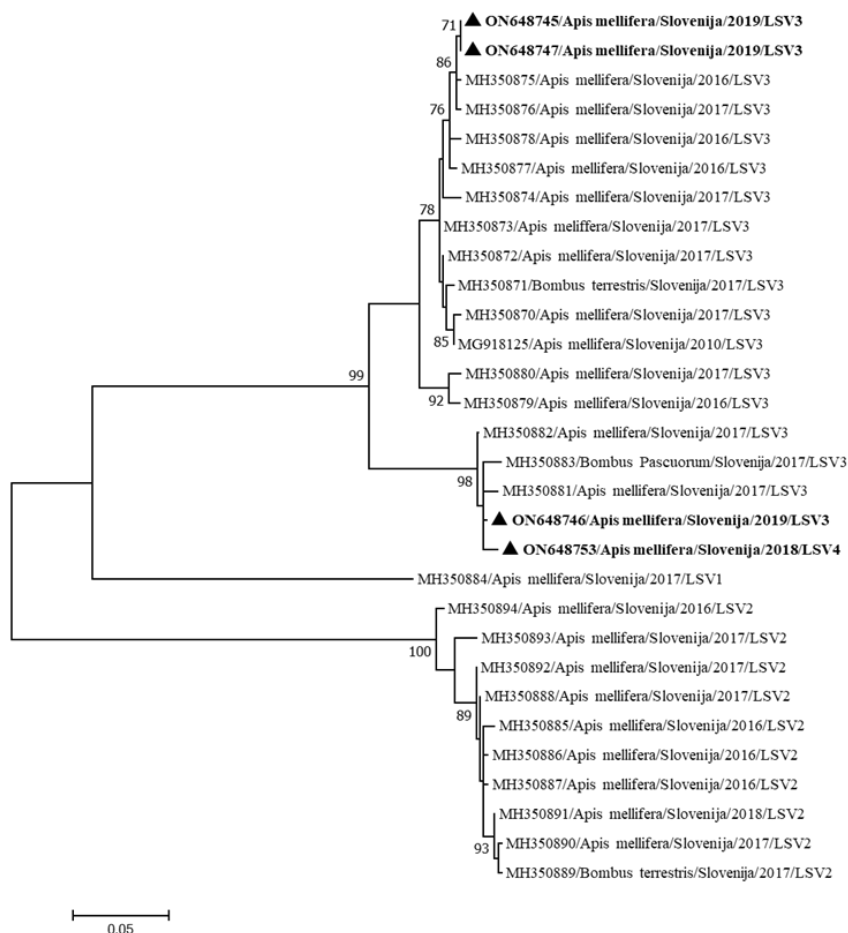
Filogenetska primerjava 26 nukleotidnih zaporedij genomov LSV iz genske banke NCBI in štirih nukleotidnih zaporedij genomov, določenih v tej raziskavi (skupaj 30), je pokazala delitev sevov na podlagi nukleotidnih zaporedij v več genetskih linijah. Sevi, določeni v tej raziskavi, spadajo med LSV3 in LSV4 (slika 28).



**Slika 28: Filogenetska primerjava 30 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov LSV. Nukleotidna zaporedja celotnih genomov, določena v tej raziskavi, so označena s pikami in krepko pisavo. Filogenetsko drevo smo izdelali po metodi največjega verjetja po modelu GTR+G+I, z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Dolžina vej odraža število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto.**

Figure 28: Phylogenetic comparison of 30 nucleotide sequences of complete genomes of LSV. Nucleotide sequences of complete genomes determined in this study are marked with dots and bold text. Maximum likelihood tree was computed based on GTR+G+I model with bootstrap support of 1000 repetitions. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site.

Primerjava 26 nukleotidnih zaporedij dolžine 557 nt (iz regije ORF2, ki zapisuje RdRp), ki so bila določena pri čebelah in čmrljih v Sloveniji v predhodnih študijah, s štirimi nukleotidnimi zaporedji, določenimi iz celotnih genomov v tej študiji, smo ugotovili od 75,22 do 99,64-odstotno identičnost nukleotidnih zaporedij sevov določenih v tej raziskavi z ostalimi slovenskimi sevi LSV (slika 29).



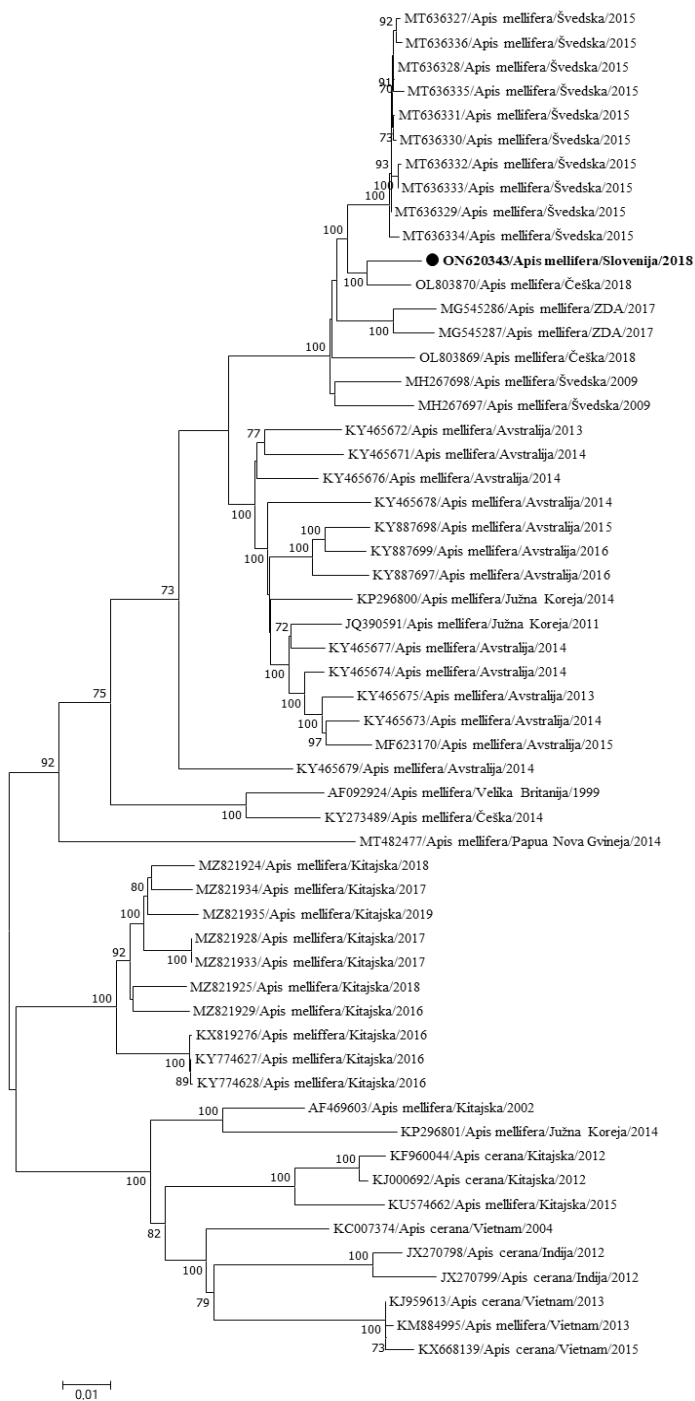
**Slika 29:** Filogenetska primerjava 30 nukleotidnih zaporedij (557 nt) LSV (v regiji ORF2, ki zapisuje RdRp), določenih pri čebelah in čmrljih v Sloveniji. Zaporedja LSV, določena v tej raziskavi, so označena s trikotniki in krepko pisavo. Filogenetsko drevo smo izdelali po metodi največjega verjetja po modelu K2+G+I, z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Dolžina vej odraža število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto.

Figure 29: Phylogenetic comparison of 30 nucleotide sequences (557 nt) of LSV (in ORF2 region, which encodes RdRp) from honeybee and bumblebee samples determined in Slovenia. LSV sequences determined in this study are marked with triangles and bold text. Maximum likelihood tree was computed based on K2+G+I model with bootstrap support of 1000 repetitions. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site.

#### **4.2.6 Nukleotidno zaporedje celotnega genoma SBV**

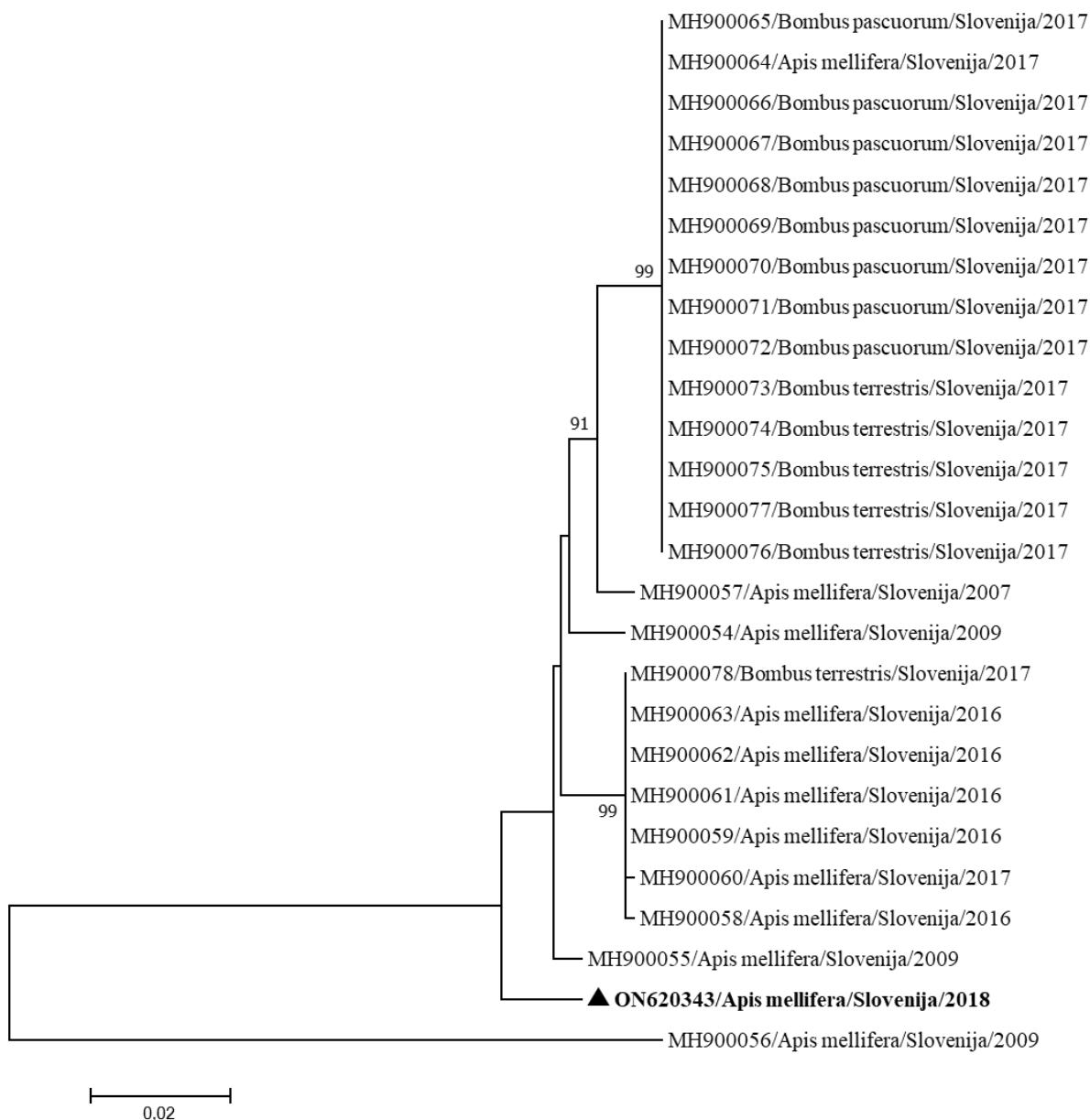
Nukleotidno zaporedje prvega celotnega genoma SBV – LS20/2018 (ON620343), določenega v Sloveniji, smo pridobili iz vzorca klinično zdrave čebelje družine, ki smo ga odvzeli 16. novembra 2018. Nukleotidno zaporedje genoma obsega 8787 nt, s povprečno pokritostjo 30. Z nukleotidnim zaporedjem genoma SBV9C (OL803870) iz leta 2018 iz Češke ima 98,01-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja.

Filogenetska primerjava 55 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov SBV iz genske banke NCBI z nukleotidnim zaporedjem genoma SBV, določenim v tej raziskavi (skupaj 56), prikazuje delitev nukleotidnih zaporedij SBV v različne linije (slika 30). Primerjava 25 krajših nukleotidnih zaporedij SBV dolžine 783 nt (iz regije ORF, ki zapisuje poliprotein), ki so bila določena pri čebelah in čmrljih v Sloveniji v predhodnih raziskavah, z zaporedjem, pridobljenim iz celotnega genoma SBV, določenega v tej raziskavi, kaže od 87,36 do 97,83-odstotno identičnost zaporedja SBV – LS20/2018 (ON620343) z ostalimi slovenskimi sevi SBV (slika 31).



**Slika 30: Filogenetska primerjava 56 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov SBV. Nukleotidno zaporedje celotnega genoma, določenega v tej raziskavi, je označeno s piko in krepko pisavo. Filogenetsko drevo smo izdelali po metodi največjega verjetja po modelu GTR+G+I, z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Dolžina vej odraža število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto.**

Figure 30: Phylogenetic comparison of 56 nucleotide sequences of complete genomes of SBV. Nucleotide sequence of complete genome determined in this study is marked with dot and bold text. Maximum likelihood tree was computed based on GTR+G+I model with bootstrap support of 1000 repetitions. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site.

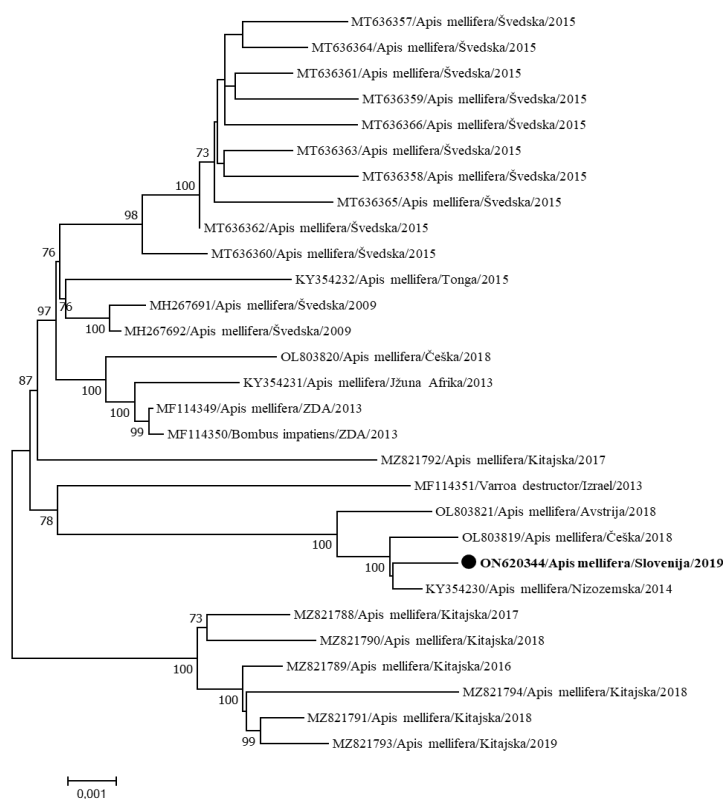


**Slika 31: Filogenetska primerjava 26 nukleotidnih zaporedij (783 nt) SBV (v regiji ORF, ki zapisuje poliprotein), določenih pri čebelah in čmrljih v Sloveniji. Zaporedje SBV, določeno v tej raziskavi, je označeno s trikotnikom in krepko pisavo. Filogenetsko drevo smo izdelali po metodi največjega verjetja po modelu Tamura 3-parameter, z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Dolžina vej odraža število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto.**

Figure 31: Phylogenetic comparison of 26 nucleotide sequences (783 nt) of SBV (in ORF region, which encodes polypeptide) from honeybee and bumblebee samples determined in Slovenia. SBV sequence determined in this study is marked with triangle and bold text. Maximum likelihood tree was computed based on Tamura 3-parameter model with bootstrap support of 1000 repetitions. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site.

#### 4.2.7 Nukleotidno zaporedje celotnega genoma ARV-1

Prvo nukleotidno zaporedje celotnega genoma ARV-1 341/2019 (ON620344) v Sloveniji smo ugotovili iz vzorca klinično obolele čebelje družine, pri kateri so opazili večje število mrtvih čebel pred panjem. Vzorec so odvzeli 17. decembra 2019. Nukleotidno zaporedje genoma obsega 14585 nt, s povprečno pokritostjo 93, in ima 99,78-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja z zaporedjem genoma AWD-1442 (KY354230) iz Nizozemske. Filogenetska primerjava 28 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov ARV-1 iz genske banke NCBI in zaporedja celotnega genoma ARV-1, določenega v tej študiji, kaže delitev nukleotidnih zaporedij celotnih genomov v več različnih linij (slika 32).



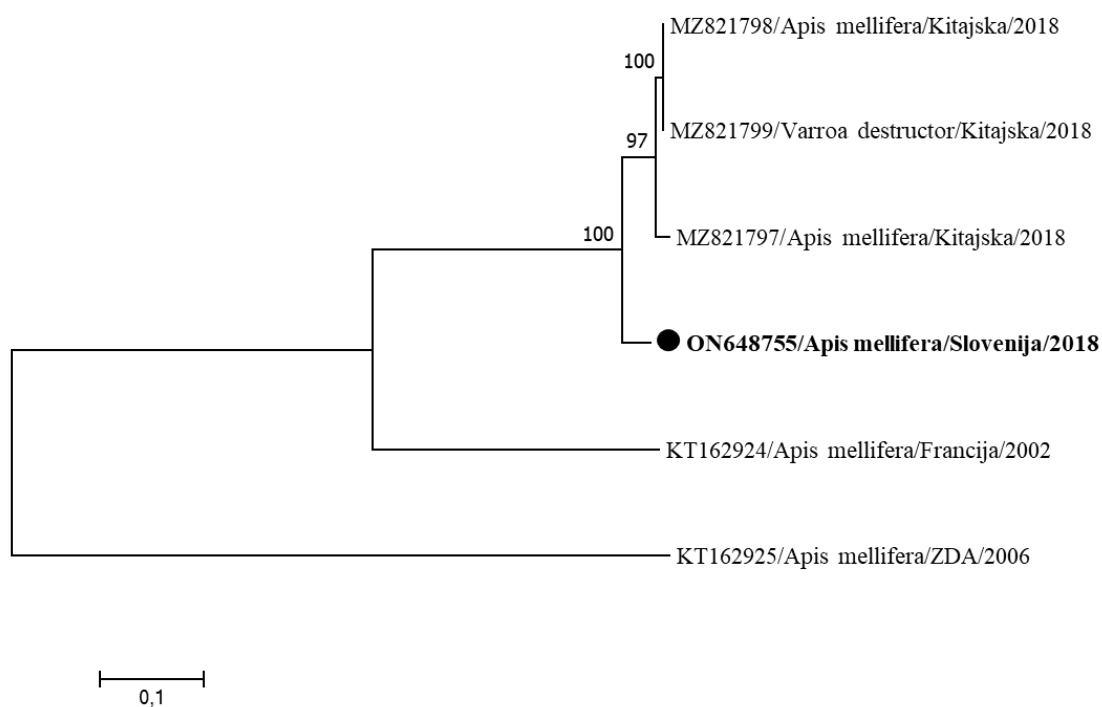
**Slika 32: Filogenetska primerjava 29 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov ARV-1. Nukleotidno zaporedje celotnega genoma, določenega v tej raziskavi, je označeno s piko in krepko pisavo. Filogenetsko drevo smo izdelali po metodi največjega verjetja po modelu TN93+G, z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Dolžina vej odraža število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto.**

Figure 32: Phylogenetic comparison of 29 nucleotide sequences of complete genomes of ARV-1. Nucleotide sequence of complete genome determined in this study is marked with dot and bold text. Maximum likelihood tree was computed based on TN93+G model with bootstrap support of 1000 repetitions. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site.

#### 4.2.8 Nukleotidno zaporedje celotnega genoma BeeMLV

Prvo nukleotidno zaporedje celotnega genoma BeeMLV v Sloveniji, LS13/2019 (ON648755), smo določili iz vzorca klinično zdrave čebelje družine, ki smo jo vzorčili 15. novembra 2018. Nukleotidno zaporedje genoma obsega 6411 nt, s povprečno pokritostjo 67, in ima 93,63-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja z zaporedjem genoma BMLV\_No3\_Mi020-JL2018-10 (MZ821799) s Kitajske.

Filogenetska primerjava petih nukleotidnih zaporedij celotnih genomov BeeMLV iz genske banke NCBI in zaporedja genoma, določenega v tej raziskavi, je pokazala, da se nukleotidno zaporedje genoma, določenega v tej raziskavi, od 64,68 do 93,63-odstotno razlikuje od ostalih genomov iz genske banke (slika 33).



**Slika 33: Filogenetska primerjava 6 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov BeeMLV. Nukleotidno zaporedje celotnega genoma, določenega v tej raziskavi, je označeno s piko in krepko pisavo. Filogenetsko drevo smo izdelali po metodi največjega verjetja po modelu HKY+G, z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Dolžina vej odraža število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto.**

Figure 33: Phylogenetic comparison of 6 nucleotide sequences of complete genomes of BeeMLV. Nucleotide sequence of complete genome determined in this study is marked with dot and bold text. Maximum likelihood tree was computed based on HKY+G model with bootstrap support of 1000 repetitions. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site.



#### 4.2.9 Nukleotidno zaporedje celotnega genoma HPLV34

Prvo nukleotidno zaporedje celotnega genoma HPLV 377/2020 (ON648754) smo določili v vzorcu klinično obolele čebelje družine, pri kateri so pred panjem opazili večje število potemnelih in plazečih se čebel. Vzorec so pridobili 1. julija 2020. Nukleotidno zaporedje genoma obsega 1460 nt, s povprečno pokritostjo 6055. Izkazuje 99,18-odstotno identičnost nukleotidov z zaporedjem genoma WHWN68514 (KX884207), ki so ga določili pri zemeljskem polžu s Kitajske. V genski banki NCBI sta dostopni le dve drugi zaporedji celotnih genomov tega virusa. Drugo zaporedje je zaporedje genoma HPLV/V1/2018/ITA (MT747982), ki so ga ugotovili v azijskem sršenu (*Vespa velutina*) v Italiji in ki ima 98,98-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja z zaporedjem genoma, ki smo ga določili v tej raziskavi.

### 4.3 POSKUSI NA ČEBELJIH LIČINKAH V *IN VITRO* POGOJIH

Pred začetkom poskusov z inokulacijo virusov smo izvedli tri ponovitve poskusnega gojenja ličink brez inokulacije virusa, saj je postopek gojenja ličink zapleten, predvsem ker so ličinke postavljene v umetno okolje in pri sebi nimajo čebel »dojilj«, ki bi neprestano skrbele zanje, jih hranile večkrat dnevno in takoj odstranile odmrle ličinke. Pri poskusu z gojenjem čebeljih ličink v *in vitro* pogojih smo ugotovili, da je preživetje čebeljih ličink najboljše, če jih iz satja na mikroplošče presadimo, ko so stare od 24 do 48 ur. Ugotovili smo tudi, da moramo tik pred izvedbo poskusa preveriti, ali so pri ličinkah prisotni čebelji virusi, saj se razmere v panju lahko hitro spreminjajo in se lahko ličinke v kratkem času okužijo z določenim virusom ali se virus v njih namnoži do visokih koncentracij.

Z ličinkami je treba rokovati zelo previdno, saj so izredno občutljive. Več kot enkrat dnevno je bilo treba preveriti, če so pojedle hrano, in jo po potrebi dodati. Paziti smo morali, da ličinke nismo utopili v hrani in ji zamašili dihalnih por, zato smo hrano dodajali poleg ličinke, v bližino glave. Ugotovili smo, da mrtve ali bolne ličinke postanejo mehke in zdrizaste, izgubijo čvrsto obliko ličinke, potemniijo, lahko postanejo popolnoma črne, se ne premikajo, ne rastejo in ne pojedjo vse dnevne količine hrane. Žive in zdrave ličinke so čvrste konsistence, tipične segmentirane oblike in svetleče rumenkaste barve. V prvih dneh gojenja se ličinke gibljejo le malo, vendar pod mikroskopom jasno opazimo dihalne gibe. Četrty in peti dan gojenja lahko

opazimo premikanje glavice in krčenje telesa ob dotiku. Poleg tega pojedjo vso dnevno količino hrane ter vidno rastejo iz dneva v dan.

#### 4.3.1 Poskus s čebeljimi ličinkami, inokuliranimi z LSV3 v *in vitro* pogojih

Pri poskusu z inokulumom LSV3 smo prvi poskus izvedli z ličinkami iz čebelnjaka v Ljubljani, pri katerih nismo zaznali naravne okužbe z LSV3. Pri ličinkah iz čebelnjaka na Gorenjskem pa smo pri ponovitvi poskusa z inokulumom LSV3 zaznali prisotnost naravne okužbe s LSV3, in sicer na dan presajanja ličink ( $3,76 \times 10^3$  kopij na ličinko oz.  $3,58 \log_{10}$ ), čeprav teden dni prej pri ličinkah in čebelah iz iste čebelje družine nismo zaznali LSV3. V nadaljevanju predstavimo rezultate poskusa z okuževanjem ličink (iz čebelnjaka v Ljubljani) z inokulumom LSV3.

**Tabela 9: Število kopij LSV3 v kontrolnih ličinkah, odvzetih na dan presajanja ličink iz satja, na začetku poskusa z inokulumom LSV3.**

Table 9: Copy number of LSV3 in control larvae sampled on the day of larvae grafting in the beginning of experiment with LSV3 inoculum.

Poskus z inokulumom LSV3	Število kopij LSV3/ ličinko
Kontrolna ličinka 1 (1 ličinka)	0
Kontrolna ličinka 2 (1 ličinka + 10 µl hrane)	0
Kontrolna ličinka 3 (1 ličinka + 10 µl hrane + 2µl nizkega odmerka inokuluma)	$6,65 \times 10^4$ ( $3,82 \log_{10}$ )
Kontrolna ličinka 4 (1 ličinka + 10µl hrane + 2µl srednjega odmerka inokuluma)	$5,95 \times 10^5$ ( $5,77 \log_{10}$ )
Kontrolna ličinka 5 (1 ličinka + 10µl hrane + 2µl visokega odmerka inokuluma)	$3,00 \times 10^6$ ( $6,48 \log_{10}$ )

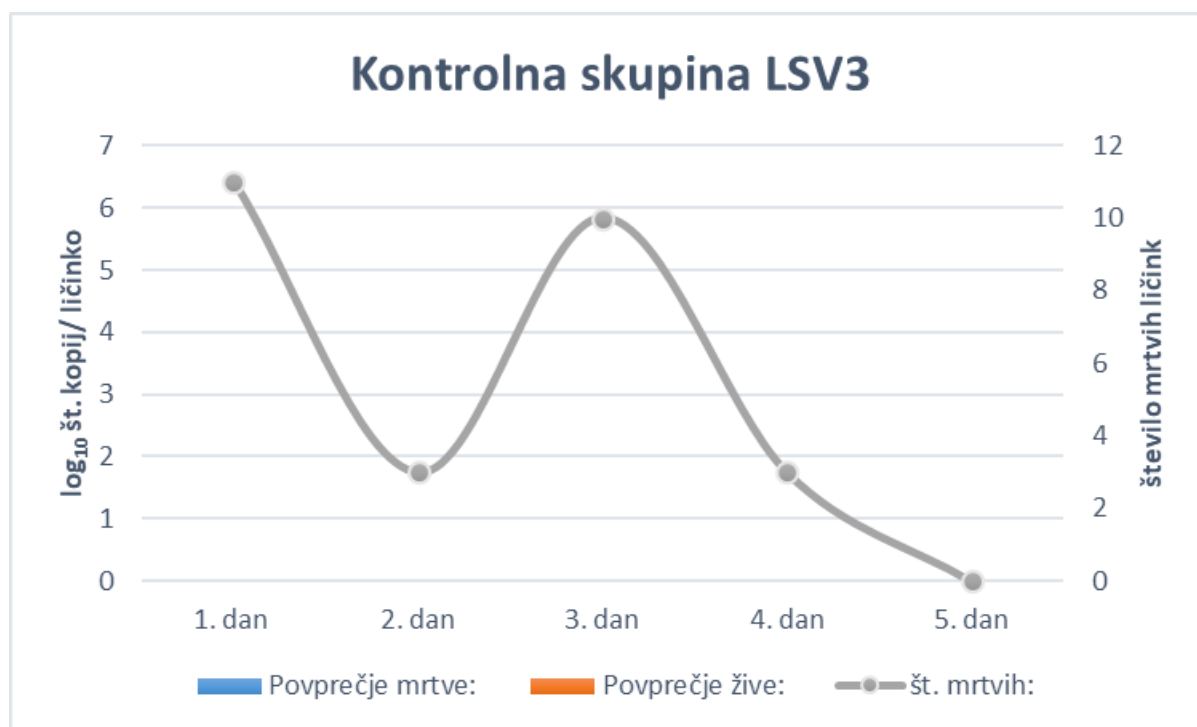
##### 4.3.1.1 Umiranje ličink pri poskusu okužbe ličink z inokulumom LSV3

Pri poskusu okužbe ličink z inokulumom LSV3 je v petih dneh pri vseh skupinah umrlo 87 od 192 ličink (45,31 %). Največ ličink je umrlo pri kontrolni skupini, in sicer 27, kar odstopa od pričakovanja. V skupini ličink, ki smo ji v hrano dodali nizek odmerek inokuluma LSV3, je skupaj umrlo 19 ličink. V skupini ličink, ki smo ji v hrano dodali srednji odmerek inokuluma, je umrlo 20 ličink. V skupini, ki smo ji dodali v hrano visok odmerek inokuluma, je v petih dnevih poskusa umrlo 21 ličink. Največ ličink je v povprečju pri vseh skupinah umrlo prvi dan

poskusa (povprečno 7,25) in tretji dan poskusa (povprečno 8,25), najmanj pa peti dan poskusa, ko ni umrla nobena ličinka.

#### 4.3.1.2 Kontrolna skupina

Pri poskusu z inokulumom LSV3 v kontrolni skupini ličink nismo pri nobeni ličinki z metodo RT-qPCR ugotovili prisotnosti LSV3. Največ ličink (11) je pri kontrolni skupini umrlo prvi dan poskusa (slika 34). Poskus je trajal pet dni.



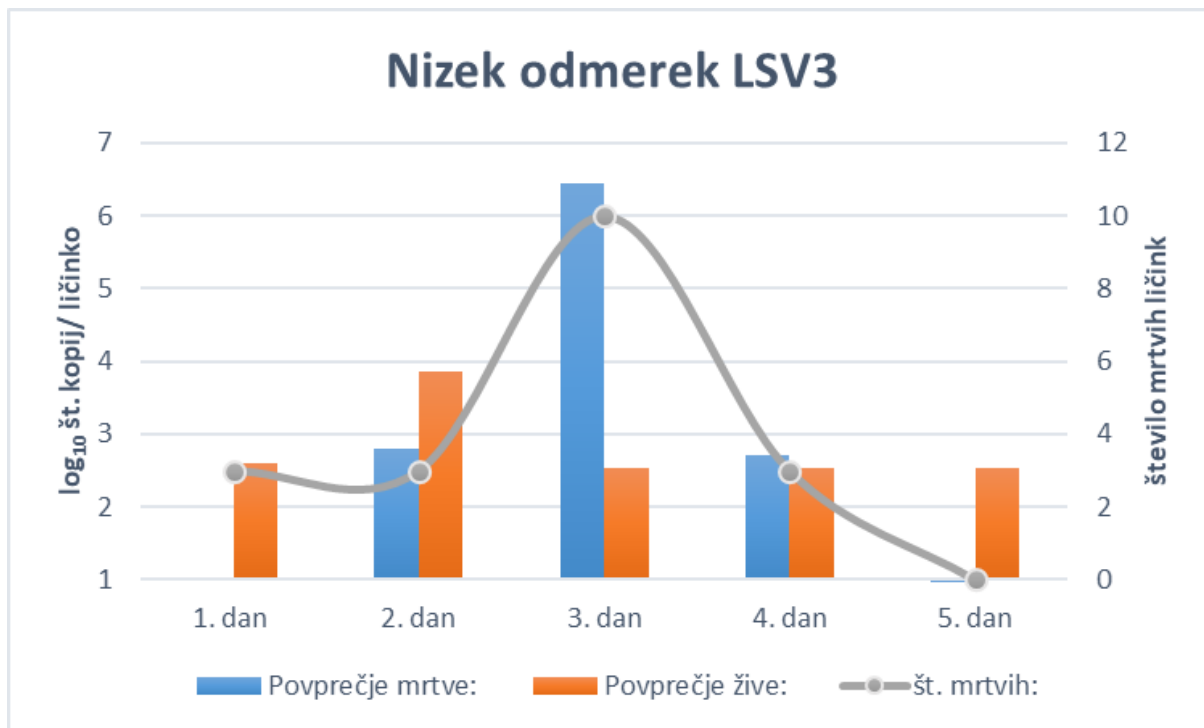
**Slika 34: Število kopij LSV3 v  $\log_{10}$  kopij na ličinko pri mrtvih in živih ličinkah in število umrlih ličink na posamezen dan vzorčenja pri kontrolni skupini ličink, pri poskusu z LSV3.**

Figure 34: Copy number of LSV3 in  $\log_{10}$  copies/ larva in dead and alive larvae and number of dead larvae on every day of sampling in the control group in LSV3 experiment.

#### 4.3.1.3 Skupina ličink, ki je prejela nizek odmerek inokuluma LSV3

Pri skupini ličink, ki je prejela nizek odmerek inokuluma LSV3, je bilo največ virusnih kopij (povprečno 6,45  $\log_{10}$  kopij na ličinko) ugotovljenih pri mrtvih ličinkah na tretji dan poskusa. Število kopij LSV3 se je gibalo pri mrtvih ličinkah od najmanj 1,04 (prvi dan) do največ 6,45  $\log_{10}$  kopij na ličinko (tretji dan poskusa). Največ ličink je umrlo tretji dan poskusa (10). Število

kopij LSV3 pri živih ličinkah pa se je gibalo od najmanj 2,53 (peti dan poskusa) do največ 3,87 log<sub>10</sub> kopij na ličinko, in sicer drugi dan poskusa (slika 35). Poskus je trajal pet dni.

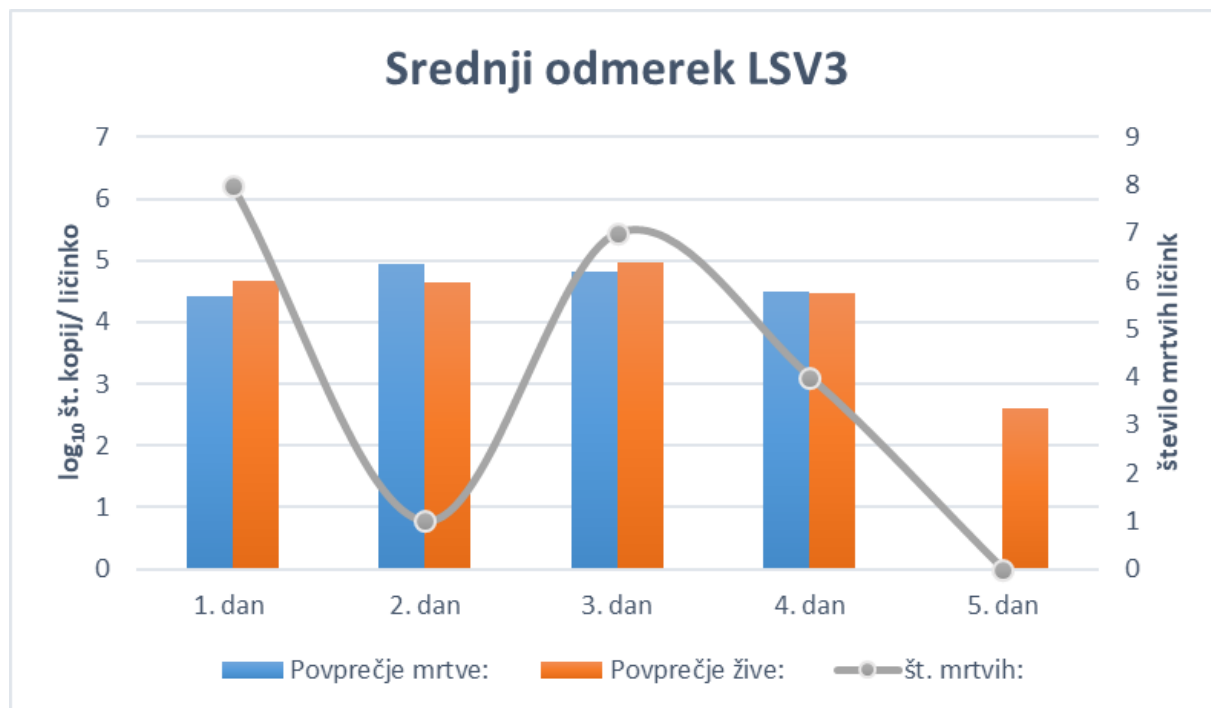


**Slika 35: Število kopij LSV3 v log<sub>10</sub> kopij na ličinko pri mrtvih in živih ličinkah in število umrlih ličink na posamezen dan vzorčenja pri skupini ličink, ki smo ji v hrano dodali nizek odmerek inokuluma LSV3.**

Figure 35: Copy number of LSV3 in log<sub>10</sub> copies/ larva in dead and alive larvae and number of dead larvae on every day of sampling in the group of larvae to which we applied low dose of LSV3 inoculum into their food.

#### 4.3.1.4 Skupina ličink, ki je prejela srednji odmerek inokuluma LSV3

Pri skupini ličink, ki je prejela srednji odmerek inokuluma LSV3, je bilo največ virusnih kopij (povprečno 4,96 log<sub>10</sub> kopij na ličinko) ugotovljenih v živih ličinkah na tretji dan poskusa. Število kopij LSV3 se je gibalo pri mrtvih ličinkah od najmanj 4,42 (prvi dan) do največ 4,95 log<sub>10</sub> kopij na ličinko (drugi dan poskusa). Največ ličink je umrlo prvi dan poskusa (8). Število kopij LSV3 pri živih ličinkah pa se je gibalo od najmanj 2,61 (peti dan poskusa) do največ 4,96 log<sub>10</sub> kopij na ličinko, in sicer tretji dan poskusa (slika 36). Poskus je trajal pet dni.

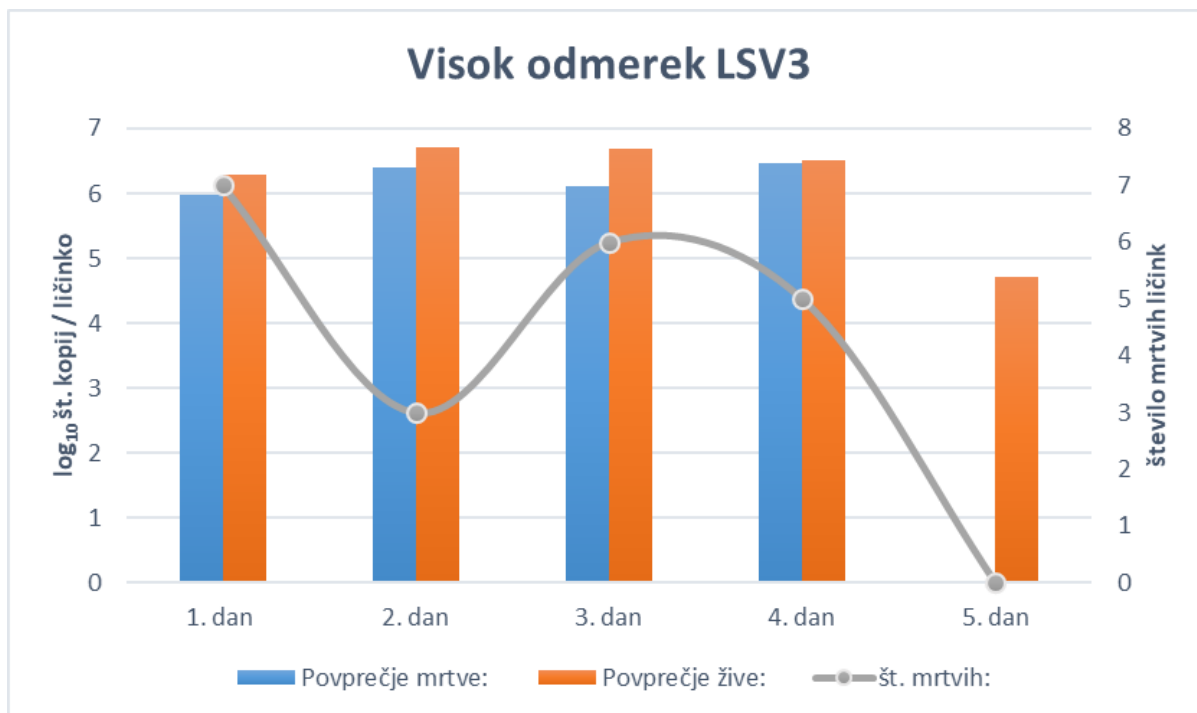


Slika 36: Število kopij LSV3 v log<sub>10</sub> kopij na ličinko pri mrtvih in živih ličinkah in število umrlih ličink na posamezen dan vzorčenja pri skupini ličink, ki smo ji v hrano dodali srednji odmerek inokuluma LSV3.

Figure 36: Copy number of LSV3 in log<sub>10</sub> copies/ larva in dead and alive larvae and number of dead larvae on every day of sampling in the group of larvae to which we applied medium dose of LSV3 inoculum into their food.

#### 4.3.1.5 Skupina ličink, ki je prejela visok odmerek inokuluma LSV3

Pri skupini ličink, ki je prejela visok odmerek inokuluma LSV3, je bilo največ virusnih kopij (povprečno 6,70 log<sub>10</sub> kopij na ličinko) ugotovljenih v živih ličinkah na drugi dan poskusa. Število kopij LSV3 se je gibalo pri mrtvih ličinkah od najmanj 5,98 (prvi dan) do največ 6,47 log<sub>10</sub> kopij na ličinko (četrti dan poskusa). Največ ličink je umrlo prvi dan poskusa (7). Število kopij LSV3 pri živih ličinkah pa se je gibalo od najmanj 4,71 (peti dan poskusa) do največ 6,70 log<sub>10</sub> kopij na ličinko, in sicer drugi dan poskusa (slika 37). Poskus je trajal pet dni.



Slika 37: Število kopij LSV3 v log<sub>10</sub> kopij na ličinko pri mrtvih in živih ličinkah in število umrlih ličink na posamezen dan vzorčenja pri skupini ličink, ki smo ji v hrano dodali visok odmerek inokuluma LSV3.

Figure 37: Copy number of LSV3 in log<sub>10</sub> copies/ larva in dead and alive larvae and number of dead larvae on every day of sampling in the group of larvae to which we applied high dose of LSV3 inoculum into their food.

#### 4.3.2 Poskus s čebeljimi ličinkami, inokuliranimi s SBV v *in vitro* pogojih

Ugotovili smo, da so ličinke pri poskusu s SBV pri kontrolni skupini že naravno okužene s SBV ( $3,48 \times 10^4$  kopij na ličinko oz.  $4,54 \log_{10}$ ), čeprav teden dni pred tem pri ličinkah in čebelah iz tega panja nismo ugotovili prisotnosti nukleinskih kislin SBV. Odločili smo se, da zaradi hitrih sprememb glede prisotnosti virusov v čebelnjaku na Veterinarski fakulteti v Ljubljani zamenjamo čebelnjak za izbor ličink. Za ponovitev poskusov smo v letu 2021 izbrali ličinke iz čebelnjaka na Gorenjskem, ki je postavljen na obrobje gozda, kjer smo predvidevali večjo stabilnost glede prisotnosti čebeljih virusov. Pri ličinkah iz tega čebelnjaka nismo ugotovili naravne okuženosti s SBV. V nadaljevanju so predstavljeni rezultati poskusa z ličinkami iz čebelnjaka na Gorenjskem.

**Tabela 10: Število kopij SBV v kontrolnih ličinkah, odvzetih na dan presajanja ličink iz satja, na začetku poskusa z inokulumom SBV.**

Table 10: Copy number of SBV in control larvae sampled on the day of larvae grafting in the beginning of experiment with SBV inoculum.

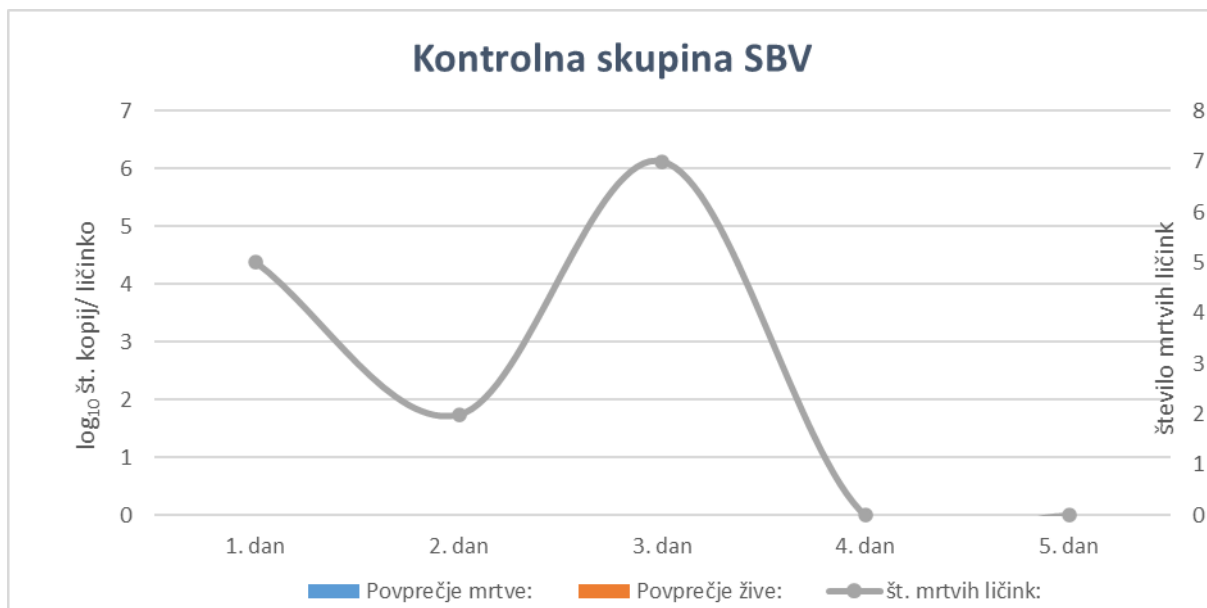
Poskus z inokulumom SBV	Število kopij SBV/ ličinko
Kontrolna ličinka 1 (1 ličinka)	0
Kontrolna ličinka 2 (1 ličinka + 10 µl hrane)	0
Kontrolna ličinka 3 (1 ličinka + 10 µl hrane + 2µl nizkega odmerka inokuluma)	5,42 (2,73 log <sub>10</sub> )
Kontrolna ličinka 4 (1 ličinka + 10µl hrane + 2µl srednjega odmerka inokuluma)	1,41 x 10 <sup>5</sup> (5,15 log <sub>10</sub> )
Kontrolna ličinka 5 (1 ličinka + 10µl hrane + 2µl visokega odmerka inokuluma)	1,08 x 10 <sup>8</sup> (8,03 log <sub>10</sub> )

#### 4.3.2.1 Umiranje ličink pri poskusu okuževanja ličink z inokulumom SBV

Umiranje ličink v petih dneh izvajanja poskusa z inokulumom SBV je bilo višje od pričakovanega, saj je umrlo skupaj 64 od 192 ličink, kar znaša 33,33 %. V kontrolni skupini ličink je v petih dnevih poskusa skupaj umrlo 14 ličink. Pri skupini ličink, ki smo jim v hrano dodali nizek odmerek inokuluma, je umrlo 15 ličink. Pri skupini ličink, ki smo jim dodali srednji odmerek inokuluma, jih je umrlo 16. Pri skupini ličink, ki smo jim dodali visok odmerek inokuluma, pa je umrlo 19 ličink. Največ ličink je v povprečju pri vseh skupinah umrlo prvi dan poskusa (in sicer 4,75) in tretji dan poskusa, ko je umrlo v povprečju 5,75 ličinke. Najmanj ličink je umrlo peti dan poskusa, ko ni umrla nobena ličinka.

#### 4.3.2.2 Kontrolna skupina

Pri poskusu z inokulumom SBV v kontrolni skupini ličink pri nobeni ličinki z metodo RT-qPCR nismo ugotovili prisotnosti SBV. Največ ličink (7) je pri kontrolni skupini umrlo na tretji dan poskusa (slika 38). Poskus je trajal pet dni.



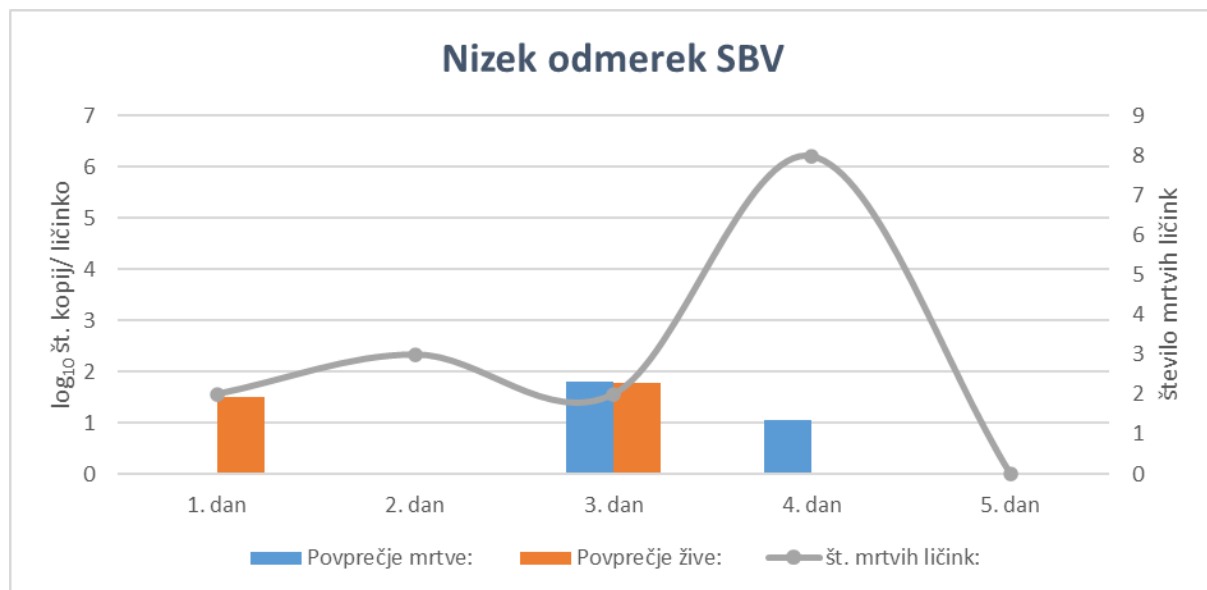
**Slika 38: Število kopij SBV v log<sub>10</sub> kopij na ličinko pri mrtvih in živih ličinkah in število umrlih ličink na posamezen dan vzorčenja pri kontrolni skupini ličink, pri poskusu z inokulumom SBV.**

Figure 38: Copy number of SBV in log<sub>10</sub> copies/ larva in dead and alive larvae and number of dead larvae on every day of sampling in the control group in experiment with SBV inoculum.

#### 4.3.2.3 Skupina ličink, ki je prejela nizek odmerek inokuluma SBV

Pri skupini ličink, ki smo ji v hrano dodali nizek odmerek inokuluma SBV, smo prvi dan ugotovili povprečno 1,51 log<sub>10</sub> kopij na ličinko pri živih ličinkah, Tretji dan vzorčenja smo ugotovili povprečno 1,81 log<sub>10</sub> kopij na ličinko pri mrtvih in 1,77 log<sub>10</sub> kopij na ličinko pri živih ličinkah. Vse ostale ličinke so bile pri testiranju na prisotnost SBV negativne. Največ ličink je umrlo četrty dan vzorčenja, in sicer 8 (slika 39). Poskus je trajal pet dni.



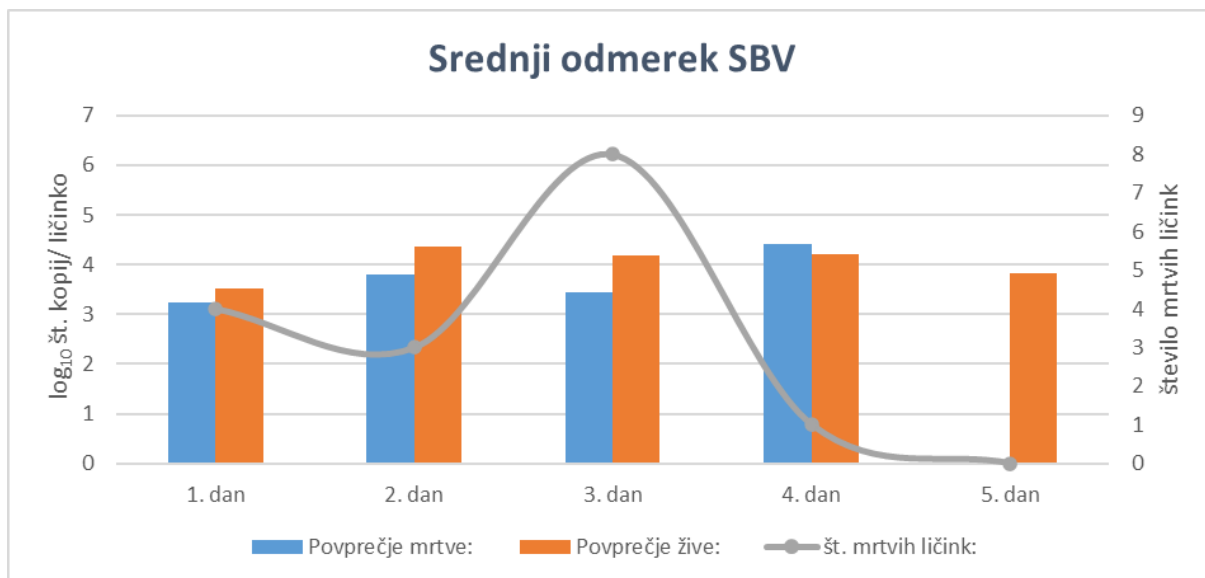


**Slika 39: Število kopij SBV v log<sub>10</sub> kopij na ličinko pri mrtvih in živih ličinkah in število umrlih ličink na posamezen dan vzorčenja pri skupini ličink, ki smo ji v hrano dodali nizek odmerek inokuluma SBV.**

Figure 39: Copy number of SBV in log<sub>10</sub> copies/ larva in dead and alive larvae and number of dead larvae on every day of sampling in the group of larvae to which we applied low dose of SBV inoculum into their food.

#### 4.3.2.4 Skupina ličink, ki je prejela srednji odmerek inokuluma SBV

Pri poskusu okužbe ličink s SBV pri skupini, okuženi s srednjim odmerkom inokuluma SBV, je bilo povprečno število kopij virusa najvišje četrty dan poskusa, in sicer pri mrtvih ličinkah (4,41 log<sub>10</sub> kopij na ličinko). Število kopij SBV se je pri mrtvih ličinkah gibalo od najmanj 3,24 (prvi dan) do največ 4,41 log<sub>10</sub> kopij na ličinko na četrty dan poskusa, peti dan poskusa pa ni umrla nobena ličinka. Največ ličink je umrlo tretji dan poskusa (8). Število kopij SBV pri živih ličinkah pa se je gibalo od najmanj 3,52 na prvi dan poskusa do največ 4,36 log<sub>10</sub> kopij na ličinko na drugi dan poskusa (slika 40). Poskus je trajal pet dni.

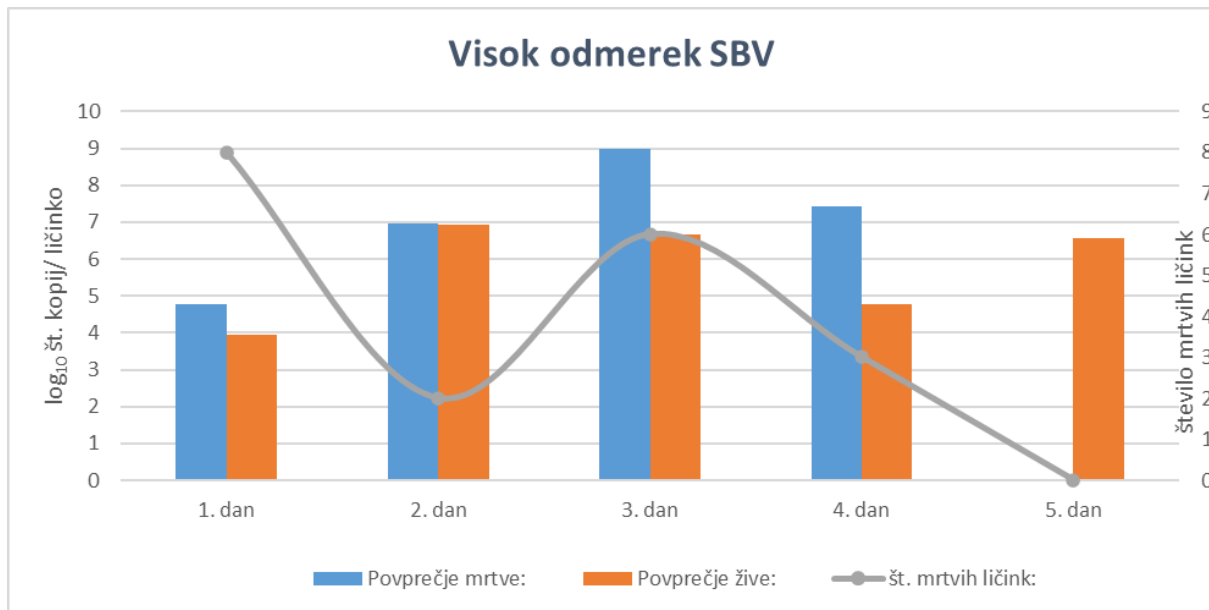


**Slika 40:** Število kopij SBV v log<sub>10</sub> kopij na ličinko pri mrtvih in živih ličinkah in število umrlih ličink na posamezen dan vzorčenja pri skupini ličink, ki smo ji v hrano dodali srednji odmerek inokuluma SBV.

Figure 40: Copy number of SBV in log<sub>10</sub> copies/ larva in dead and alive larvae and number of dead larvae on every day of sampling in the group of larvae to which we applied medium dose of SBV inoculum into their food.

#### 4.3.2.4 Skupina ličink, ki je prejela visok odmerek inokuluma SBV

Pri skupini ličink, okuženih z visokim odmerkom inokuluma SBV, je bilo najvišje povprečno število kopij SBV na tretji dan poskusa, in sicer pri mrtvih ličinkah (9,00 log<sub>10</sub> kopij na ličinko). Število kopij SBV se je pri mrtvih ličinkah gibalo od najmanj 4,76 na prvi dan do največ 9,00 log<sub>10</sub> kopij na ličinko na tretji dan poskusa. Število kopij SBV pri živih ličinkah pa se je gibalo od najmanj 3,96 (prvi dan vzorčenja) do največ 6,93 log<sub>10</sub> kopij na ličinko (drugi dan vzorčenja). Največ ličink je umrlo prvi dan vzorčenja, in sicer 8 (slika 41). Poskus je trajal pet dni.



**Slika 41: Število kopij SBV v log<sub>10</sub> kopij na ličinko pri mrtvih in živih ličinkah in število umrlih ličink na vsak dan vzorčenja pri skupini ličink, ki smo ji v hrano dodali visok odmerek inokuluma SBV.**

Figure 41: Copy number of SBV in log<sub>10</sub> copies/ larva in dead and alive larvae and number of dead larvae on every day of sampling in the group of larvae to which we applied high dose of SBV inoculum into their food.

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 PRIMERJAVA ŠTEVILA KOPIJ VIRUSA PRI ZDRAVIH IN OBOLELIH ČEBELJIH DRUŽINAH

V okviru izvedene raziskave smo razvili začetne oligonukleotide, uporabili smo sonde TaqMan in standarda za dokazovanje in kvantifikacijo SBV in LSV3 z metodo RT-qPCR, ki omogoča zanesljivo določitev števila kopij posameznega virusa v čebeli, v območju od  $10^2$  do  $10^{12}$  virusnih kopij. Ti različici metod dosegata podobno občutljivost in specifičnost kot prej razvite in opisane različice za kvantifikacijo ABPV, BQCV, CBPV in DWV, ki smo jih povzeli po evropskem referenčnem laboratoriju za čebelje bolezni ANSES iz Francije (Jamnikar Ciglencečki in Toplak, 2012; ANFOR, 2015; Schurr in sod., 2017; Schurr in sod., 2019). Ker so si genetske linije LSV med seboj genetsko zelo različne, tudi v najbolj ohranjeni regiji genoma, ORF2, ki zapisuje RdRp (od 74,51 do 99,46-odstotna identičnost slovenskih zaporedij LSV v regiji RdRp), to vpliva na občutljivost metode RT-qPCR. V Sloveniji so pred to raziskavo določili tri različne genetske linije LSV (LSV1, LSV2, LSV3) (Šimenc in sod., 2020), v tej raziskavi pa smo ugotovili tudi eno zaporedje, ki pripada genetski liniji LSV4. Zaradi velike genetske raznolikosti linij LSV nismo uspeli razviti enotnega protokola za metodo RT-qPCR, kjer bi dokazovali različne linije LSV z eno metodo, zato smo se odločili za razvoj metode RT-qPCR s sondo TaqMan, in sicer za specifični dokaz linije LSV3, ki je v Sloveniji pogosto prisotna (Šimenc in sod., 2020). RT-qPCR za dokaz SBV smo razvili z namenom izboljšanja obstoječih metod, ki temeljijo na kemiji SYBR Green, ki omogoča le nespecifično detekcijo produktov PCR, oz. na uporabi sonde MGB, s katero nismo uspeli pridobiti tako zanesljivih rezultatov kot s sondo TaqMan (Desai in sod., 2015; Molineri in sod., 2017; Schurr in sod., 2019). Metodo za kvantifikacijo šestih čebeljih virusov (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 in SBV) smo testirali na 197 vzorcih klinično zdravih in obolelih čebeljih družin. To metodo lahko v našem laboratoriju v prihodnje uporabimo za rutinsko diagnostiko čebeljih virusov pri klinično obolelih čebeljih družinah, čebelji zalegi, maticah, varojah in panjskem odpadku, kjer lahko glede na količino in vrsto virusa diagnosticiramo povzročitelja bolezni. To metodo lahko uporabimo na zdravih čebeljih družinah, čmrljih in drugih žuželkah (npr. metuljih) ali celo na cvetovih rastlin, s čimer smo povečali nabor diagnostičnih metod za preiskovanje terenskih vzorcev.

Čeprav smo 108 vzorcev klinično zdravih čebel odvzeli iz štirih različnih čebelnjakov v obdobju enega leta, smo ugotovili veliko različnost v odstotku ugotovljenih pozitivnih vzorcev za posamezni virus. Prav tako smo v obdobju enega leta vzorčili 89 obolelih čebeljih družin, tudi v obdobju izven glavne čebelarske sezone (jesen, zima). Tak način vzorčenja ni bil idealen, kot smo naknadno ugotovili. Idealno vzorčenje bi dosegli, če bi v 89 različnih čebelnjakih vzorčili še zdrave čebelje družine, seveda pa v tem primeru v to vzorčenje ne bi smeli vključiti istih čebelnjakov kot pri obolelih čebeljih družinah. Primerjava prisotnosti čebeljih virusov in virusne obremenitve pri zdravih in obolelih čebeljih družinah pa nam ponuja vpogled v prisotnost različnih čebeljih virusov po čebelnjakih, glede na njihovo klinično sliko, o čemer po svetu še ni bilo izvedenih veliko raziskav.

V francoski študiji iz leta 2019 so predlagali tudi prve mejne vrednosti za število kopij virusa, ki povzroči klinične znake pri čebelah (Schurr in sod., 2019). S primerjavo deleža pozitivnih vzorcev in virusne obremenitve (število kopij virusa na čebelo) pri klinično zdravih in obolelih čebeljih družinah smo pri klinično obolelih čebeljih družinah ugotovili statistično značilno višje vrednosti pri ABPV, CBPV, DWV in SBV, kar je pričakovano, saj imajo vsi štirje čebelji virusi poznano patogenost. Za ABPV so v francoski študiji postavili mejo na  $5 \log_{10}$  števila kopij na čebelo, kar se ujema z rezultati naše raziskave, saj je imela večina klinično obolelih čebeljih družin število kopij nad to postavljeno mejo, večina klinično zdravih čebeljih družin pa pod  $5 \log_{10}$ .

Pri BQCV smo v naši študiji ugotovili podobno povprečno vrednost števila virusnih kopij na čebelo, tako pri klinično zdravih čebelah ( $6,88 \pm 1,09 \log_{10}$ ) kot tudi pri klinično obolelih čebelah ( $7,33 \pm 1,74 \log_{10}$ ). V francoski študiji so predlagali referenčno mejo pri  $8 \log_{10}$  kopij na čebelo (Schurr in sod., 2019). Glede na to, da so okužbe z BQCV v Sloveniji zelo razširjene in je to virus, ki ne povzroča kliničnih znakov pri čebelah delavkah, smo ga v naši študiji pričakovano ugotovili v 98.15 % klinično zdravih čebeljih družin in v 96.63 % klinično obolelih čebeljih družin, ugotovljene povprečne vrednosti števila kopij pa so bile pod postavljeno referenčno vrednost, ne glede na klinično sliko.

Število kopij CBPV, ki povzroči klinično sliko obolenja, je postavljeno na  $6 \log_{10}$  kopij na čebelo (Schurr in sod., 2017). V naši študiji smo ugotovili povprečno  $8 \log_{10}$  kopij na čebelo v vzorcih čebeljih družin s kliničnimi znaki. Prisotnost nukleinskih kislin CBPV smo ugotovili v

19,10 % klinično obolelih čebeljih družin, kar je popolnoma primerljivo s predhodno izvedenimi študijami v Sloveniji, ko so s klasično metodo PCR med leti 2007 in 2010 CBPV ugotovili v 16 % (Jamnikar Ciglencečki, 2013), leta 2010 v 15,30 % (Toplak in sod., 2010) leta 2015 pa v 12,69 % (Toplak in sod., 2016a) klinično obolelih čebeljih družin. Pričakovano pa prisotnosti tega virusa nismo dokazali v nobenem od 108 vzorcev klinično zdravih čebeljih družin, kar potrjuje rezultate predhodne raziskave (Jamnikar Ciglencečki, 2013), saj je virus zelo patogen in se po okužbi hitro množi in pogosto povzroči hudo klinično sliko z umiranjem čebeljih družin. CBPV je lahko v manjšem odstotku ugotovljen tudi pri klinično zdravih čebelah in celo pri maticah (Jamnikar Ciglencečki, 2013).

Pri DWV je predlagana meja klinično zaznavne okužbe  $6 \log_{10}$  kopij na čebelo, kar smo delno potrdili z rezultati naše študije, saj smo pri zdravih čebeljih družinah dobili povprečno vrednost  $6.37 \log_{10}$  kopij na čebelo in  $8.69 \log_{10}$  kopij na čebelo pri klinično obolelih čebeljih družinah.

Podobno vrednost povprečnega števila kopij LSV3 smo ugotovili tako pri klinično zdravih ( $6,44 \pm 2,07 \log_{10}$  kopij na čebelo) kot tudi pri klinično obolelih čebeljih družinah ( $6,03 \pm 1,59 \log_{10}$  kopij na čebelo), kar se ujema s predhodnimi ugotovitvami, da okužba z LSV ne povzroča znakov obolenja. LSV3 smo ugotovili pri 67.59 % klinično zdravih in 48.31 % klinično obolelih čebeljih družin, kar potrjuje veliko razširjenost tega čebeljega virusa (Traynor in sod., 2016; Bigot in sod., 2017; Cornman in sod., 2019; Šimenc in sod., 2020). Izvedena študija, ki opisuje virusno breme LSV3 v klinično zdravih in obolelih čebeljih družinah v nekem obdobju je tudi prva tovrstna študija v svetu (Šimenc in sod., 2021).

Predlagana meja klinično zaznavne okužbe pri SBV je  $9 \log_{10}$  kopij na čebelo, kar je višje, kot smo ugotovili v naši študiji, kjer smo dobili  $6,92 \pm 2,00 \log_{10}$  kopij na čebelo pri obolelih čebeljih družinah. Vendar so v francoski študiji postavili referenčno mejo glede na rezultate vzorcev okuženih ličink, ki lahko vsebujejo velike količine virusnih kopij ( $10^{13}$ ) (Schurr in sod., 2019). V naši študiji smo proučevali čebele delavke, pri katerih virus ne povzroča klinične slike in so v tem primeru le prenašalke določenega virusnega bremena, potem ko so očistile celice z odmrlo okuženo ličinko ali pa so asimptomatske prenašalke SBV. Tako je lahko pregled čebel delavk z metodo RT-qPCR za SBV dobra napovedna vrednost okužbe v čebelji družini. Dokazana prisotnost virusa pri 35,19 % vzorcev zdravih čebeljih družin je celo višja kot v vzorcih klinično obolelih čebeljih družin (22,47 %), vendar nam nižja virusna obremenitev pri

zdravih čebelah delavkah ( $4,45 \pm 0,42 \log_{10}$ ) kaže, da te samo prenašajo SBV, kar bi lahko bilo povezano z dogajanjem v čebelji družini pri okužbi zalege s SBV, vendar tega v tej študiji nismo natančneje preučevali.

Glede prisotnosti in virusne obremenitve posameznega virusa na čebeljo družino lahko postavimo meje za pojav klinične slike, vendar smo v tej raziskavi določali le prisotnost in virusno obremenitev izbranih šestih čebeljih virusov, in s tem nismo dobili vpogleda v prisotnost ostalih čebeljih virusov niti nismo proučevali sinergističnega delovanja virusov med seboj oziroma delovanja virusov skupaj z drugimi patogeni. Tu lahko iščemo problematiko pri skrbi za zdravje in dobro počutje čebeljih družin, kjer moramo pridobiti celoten vpogled in povezavo med klinično sliko, odpornostjo čebel ter prisotnostjo različnih patogenov, katerih vpliv se med seboj sešteva.

## 5.2 NUKLEOTIDNA ZAPOREDJA CELOTNIH GENOMOV ČEBELJIH VIRUSOV

V opravljeni raziskavi smo določili 22 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov čebeljih virusov, ki jih lahko uvrstimo med devet različnih vrst čebeljih virusov. Devet nukleotidnih zaporedij celotnih genomov virusov smo določili iz vzorcev obolelih čebeljih družin, saj smo pri njih ugotovili višje koncentracije določenega virusa, določili pa smo tudi deset nukleotidnih zaporedij celotnih genomov iz vzorcev klinično zdravih čebeljih družin. Iz vzorcev klinično zdravih čebeljih družin smo določili nukleotidna zaporedja celotnih genomov BQCV LS90/2019, DWV LS13/2018, DWV LS26/2018, LSV LS21/2018, LSV LS48/2019, LSV LS74/2019, LSV LS81/2019, SBV LS20/2018 in BeeMLV LS13/2019. Pri metagenomski analizi dobljenih odčitkov izbranih vzorcev smo ugotovili tudi dele genomov drugih čebeljih virusov. Prvič je bil na primer ugotovljen AmFv, ki je edini do sedaj znani virus DNA med čebeljimi virusi, z dolgim linearnim genomom. Prav tako smo ugotovili številne rastlinske viruse.

V Sloveniji so pred to študijo določili nukleotidni zaporedji celotnih genomov le čebeljima virusoma CBPV M92/2010 (KY937971, KY937972) (Jamnikar Ciglencečki in sod., 2017) in LSV M92/2010 (MG918125) (Šimenc in sod., 2020). V tej študiji smo določili 22 novih nukleotidnih zaporedij celotnih genomov in s tem zelo povečali število čebeljih virusov s poznanimi nukleotidnimi zaporedji celotnih genomov v Sloveniji.

Čeprav je ABPV eden od najbolj poznanih in proučevanih čebeljih virusov, pa nukleotidnega zaporedja celotnega genoma tega virusa v Sloveniji do te študije še niso določili. V raziskavi smo določili štiri nova nukleotidna zaporedja celotnih genomov ABPV iz vzorcev obolelih čebeljih družin. Glede na filogenetske analize so nukleotidna zaporedja celotnih genomov ABPV iz te študije najbolj sorodna nukleotidnim zaporedjem genomov ABPV12A (OL803813) in ABPV12C (OL803814) iz Češke ter ABPV/144I (MN565031) iz Francije, kar je pričakovano. Zelo verjetno bodo v prihodnje ugotovili podobne seve še v drugih evropskih državah. Pri primerjavi nukleotidnih zaporedij genomov ABPV v regiji ORF1, ki zapisuje kapsidni protein, in regiji ORF2, ki zapisuje RdRp, z zaporedji ABPV, ki so bila prej ugotovljena pri čebelah in čmrljih v Sloveniji, smo ugotovili, da so nukleotidna zaporedja, določena v tej raziskavi, v regiji ORF1 najbolj sorodna z zaporedji, določenimi pri čebelah in čmrljih v Sloveniji v letu 2017 (Toplak in sod., 2020). V regiji ORF2 pa so zaporedja ABPV, določena v tej raziskavi, med seboj 100-odstotno identična in se od predhodno določenih sevov v Sloveniji razlikujejo od 91,88 do 98,32-odstotno (Jamnikar Ciglencečki, 2013; Jamnikar Ciglencečki in Toplak, 2013; Toplak in sod., 2020).

Določili smo tri nukleotidna zaporedja celotnim genomom BQCV, ki so med seboj od 94,28 do 97,24-odstotno identična. Pred izvedbo te študije še ni bilo določeno nukleotidno zaporedje celotnega genoma BQCV, ki bi izhajal iz vzorca čebelje družine iz Slovenije. Nukleotidni zaporedji genomov BQCV 336/2020 (ON648735) in BQCV 377/2020 (ON648737) smo določili iz vzorcev čebeljih družin s kliničnimi znaki, zaporedje genoma BQCV LS90/2019 (ON648736) pa iz vzorca zdrave čebelje družine. Nukleotidna zaporedja genomov, določena v tej raziskavi, so najbolj sorodna zaporedjem genomov iz Češke, Madžarske in Francije, kar je pričakovano, glede na geografsko bližino in zgodovinsko povezanost s temi evropskimi državami.

Nukleotidni zaporedji celotnih genomov CBPV, določeni v tej študiji, imata 97,18-odstotno (RNA1 341/2019) in 97,25-odstotno (RNA1 376/2019) identičnost zaporedja nukleotidov s fragmentom RNA1 genoma CBPV M92/2010 (KY937971) ter od 98,50 do 98,68-odstotno identičnost zaporedja nukleotidov s fragmentom RNA2 CBPV M92/2010 (KY93792) iz Slovenije iz leta 2010 (Jamnikar Ciglencečki, 2017). Najbolj podobno nukleotidno zaporedje genoma iz tujine (od 96,82 do 96,88 % v RNA1; od 97,36 do 97,54 % v RNA2) pa je nukleotidno zaporedje genoma CBPV AUT-17 (MK637522, MK637523) iz Avstrije iz leta



2018, kar je pričakovano, saj je verjetno posledica lokalnega širjenja seva CBPV čez mejo med državama. V sestavi organizacije genoma CBPV nismo ugotovili večjih razlik v primerjavi z ostalimi genomi iz genske banke NCBI na podlagi nukleotidnih zaporedij, razen točkastih mutacij, ki so naključno razporejene. Ugotavljamo, da je nukleotidno zaporedje genoma CBPV zelo stabilno zaradi ugotovljene majhne genetske heterogenosti in visoke patogenosti virusa zelo stabilen, kot so ugotavljali tudi v predhodnih študijah (Budge in sod., 2020; Schurr in sod., 2017).

V študiji smo določili pet nukleotidnih zaporedij celotnih genomov DWV, od tega dve pripadata genotipu B – DWV 341-1/2019 (ON648741) in DWV 336/2019 (ON648740), trije pa genotipu A – DWV 341-2/2019 (ON648742), DWV LS13/2018 (ON648743) in DWV LS26/2018 (ON648744). To so prva nukleotidna zaporedja celotnih genomov DWV, določena v Sloveniji. Zanimivo je, da smo dva različna genotipa, DWV A in B, pridobili iz vzorca iste čebelje družine, in sicer DWV 341-2/2019 (ON648742) pri DWV-A in DWV 341-1/2019 (ON648741) pri DWV-B. Ta ugotovitev prikazuje prednost metode NGS v primerjavi s Sangerjevim sekvenciranjem, saj v primerih mešane okužbe (nejasno mešano zaporedje dveh sevov) zaporedja takšnega vzorca običajno ne določamo. Nukleotidna zaporedja genomov DWV smo določili tako iz vzorcev obolelih čebel kot tudi iz vzorcev zdravih čebeljih družin, kar je pričakovano, saj DWV lahko ugotovimo tudi pri čebelah delavkah brez kliničnih znakov. Do te študije v Sloveniji še niso določili nobenega nukleotidnega zaporedja celotnega genoma DWV. Nukleotidna zaporedja genomov genotipa DWV-A, določena v tej raziskavi, so genetsko najbolj sorodna nukleotidnemu zaporedju genoma PA (AY292384) iz Italije (od 97,26 do 97,87 %), zaporedja genomov genotipa DWV-B pa so genetsko najbolj sorodna zaporedju genoma DWV/144I (MN565037) iz Francije (od 99,26 do 99,48 %). Nukleotidna zaporedja celotnih genomov DWV, določena v tej študiji, so med seboj od 84,15 do 99,30-odstotno identična, kar je veliko, vendar pričakovano, saj pripadajo dvema različnima genotipoma. Primerjava nukleotidnih zaporedij v regiji ORF, ki zapisuje helikazo (573 nt) in protein L (471 nt), ki so jih določili pri čebelah in čmrljih v Sloveniji v predhodnih raziskavah (Toplak in sod., 2020), z istimi odseki nukleotidnih zaporedij, določenih iz celotnih genomov v tej študiji, je pokazala od 76,79 do 99,83-odstotno identičnost zaporedij iz te raziskave z ostalimi slovenskimi sevi v predelu helikaze ter od 72,82 do 99,58-odstotno identičnost v predelu proteina L. To je veliko večja raznolikost, kot smo jo ugotovili v raziskavi iz leta 2018

(Jamnikar Ciglencečki in sod., 2019), ko je bila ugotovljena nukleotidna identičnost v regiji proteina L od 92,40 do 100-odstotna, v regiji helikaze pa od 95,00 do 100-odstotna.

Primerjava nukleotidnih zaporedij LSV, ki smo jih določili v tej študiji, z ostalimi zaporedji LSV, ki so jih določili v Sloveniji v predhodnih raziskavah, dokazuje veliko genetsko raznolikost slovenskih sevov LSV na podlagi nukleotidnega zaporedja, saj smo ugotovili od 75,22 do 99,64-odstotno identičnost zaporedja nukleotidov v regiji ORF2, ki zapisuje RdRp. Vsa nukleotidna zaporedja celotnih genomov LSV smo ugotovili iz vzorcev zdravih čebeljih družin. Prvo nukleotidno zaporedje celotnega genoma LSV M92/2010 (MG918125) v Sloveniji pa so določili iz vzorca propadle čebelje družine, sočasno okužene s CBPV M92/2010 (KY93791, KY93792) (Šimenc in sod., 2020). V tem primeru je prisotnost LSV v vzorcu klinično obolele čebelje družine prej posledica velike razširjenosti tega virusa v populaciji, kot tudi sočasne okužbe z več kot enim virusom, kar smo ugotavljali že v raziskavi iz leta 2012 (Toplak in sod., 2012). Nukleotidno zaporedje genoma LS48/2019 (ON648753), določeno v tej študiji, je najbolj sorodno (97,37 %) zaporedju genoma M92/2010 (MG918125), ki je bil že prej določen v Sloveniji. Nukleotidni zaporedji celotnih genomov LS74/2019 (ON648746) in LS81/2019 (648747) pa sta najbolj sorodni (94,66 % in 90,76 %) nukleotidnemu zaporedju genoma NT-LSV3 (KY4565717) iz Avstralije. Nukleotidno zaporedje genoma LS21/2018 (ON648753) smo uvrstili v linijo LSV4, kamor spadajo tudi nukleotidna zaporedja genomov iz Češke in Kitajske. To je prva ugotovitev LSV4 v Sloveniji, kar povečuje raznolikost prej ugotovljenih linij LSV1, LSV2 in LSV3 v Sloveniji (Šimenc in sod., 2020). Primerjava krajših zaporedij LSV v regiji ORF2, ki zapisuje RdRp (557 nt) s predhodno določenimi LSV pri čebelah in čmrljih v Sloveniji je pokazala od 75,22 do 99,64-odstotno identičnost zaporedij in veliko genetsko heterogenost sevov LSV v Sloveniji na podlagi nukleotidnih zaporedij. Izvedena študija prikazuje, da smo LSV3 ugotovili pri 67,59 % zdravih in 48,31 % obolelih čebeljih družin.

Iz vzorca zdrave čebelje družine smo določili nukleotidno zaporedje prvemu celotnemu genomu SBV v Sloveniji, in sicer SBV LS20/2018 (ON620343), ki je genetsko najbolj soroden nukleotidnemu zaporedju genoma SBV9C (OL803870) iz Češke, z 98,01-odstotno identičnostjo zaporedja nukleotidov. Primerjava odseka genoma SBV, v regiji ORF, ki zapisuje poliprotein (783 nt), je pokazala od 87,36 do 97,83-odstotno identičnost nukleotidnega

zaporedja s 25 vzorci, ki so jih v Sloveniji določili v predhodnih raziskavah (Toplak in sod., 2020).

Z metodo NGS smo določili tudi nukleotidna zaporedja genomov virusov, ki jih do sedaj v Sloveniji še nismo ugotovili. Ugotovljeni ARV-1, BeeMLV in HPLV34 so prvi ugotovljeni virusi te vrste v vzorcih čebeljih družin v Sloveniji. ARV-1 je virus RNA, ki se zelo razlikuje od ostalih čebeljih virusov, saj je njegov genom negativno polaren, medtem ko ima večina ostalih čebeljih virusov pozitivno polarne genome. ARV-1 se razmnožuje tako v čebelah kot tudi v varojah, našli pa so ga tudi v čmrljih. ARV-1 so ugotovili v 20 % čebeljih družin, ni pa še znano, ali povzroča klinične znake pri čebeljih družinah (Levin in sod., 2017). Prav gotovo bi bilo treba tudi temu virusu v prihodnje posvetiti nekaj pozornosti, da bi ugotovili, kakšna je razširjenost ARV-1 po Sloveniji, ali je prisotnih več sevov tega virusa in če so povezani s kakšno klinično sliko obolenja pri čebelah.

BeeMLV je od vseh ugotovljenih virusov v tej študiji med najmanj poznanimi virusi, saj je bilo do leta 2022 v genski banki NCBI opisanih le pet nukleotidnih zaporedij celotnih genomov BeeMLV, od tega so štiri ugotovili pri čebelah in enega pri varoji. Virus se lahko množi tako v čebelah kot tudi v varojah, ki so domnevno virusni gostitelj in vektor, patogeneza virusa pa še ni dobro proučena (de Miranda in sod., 2015). Nukleotidna zaporedja celotnih genomov BeeMLV so zelo raznolika, saj imajo med seboj od 64,89 do 99,35-odstotno identičnost zaporedja nukleotidov. Z določitvijo prvega slovenskega nukleotidnega zaporedja celotnega genoma BeeMLV LS13/2019 (ON648755), ki ima 93,63-odstotno identičnost zaporedja z najbližjim sevom BMLV\_No3\_Mi020-JL2018-10 (MZ821799) s Kitajske, smo prvi dokazali prisotnost virusa BeeMLV v Sloveniji.

Nukleotidnega zaporedja genoma HPLV34 do sedaj še niso ugotovili v vzorcu čebelje družine, naša študija pa je pokazala, da je ta virus prisoten tudi pri čebelah. Iz same pokritosti genoma, ki je znašala 6055, lahko sklepamo na veliko število kopij virusne RNA v vzorcu. Ni pa jasno, ali so bile čebele z njim okužene ali so bile le kontaminirane po površini. Prvič so HPLV34 določili pri zemeljskem polžu iz kitajske province Hubei, po kateri je virus tudi poimenovan, in sicer WHWN68514 (KX884207) (Shi in sod., 2016). Določili pa so ga tudi pri azijskem sršenu v Italiji, in sicer pod oznako HPLV/V1/2018/ITA (MT747982) (Marzoli in sod., 2021). To sta tudi edini dostopni nukleotidni zaporedji celotnih genomov HPLV34 v genski banki

NCBI, poleg zaporedja genoma, določenega v tej raziskavi – HPLV34 377/2020 (ON648754). O tem virusu je znanega še zelo malo, zato je o njem treba narediti še mnogo nadaljnjih raziskav.

### 5.3 POSKUSI NA ČEBELJIH LIČINKAH

Z izvedenimi poskusi na čebeljih ličinkah v *in vitro* pogojih smo v laboratoriju na Veterinarski fakulteti UL prvič uporabili sistem gojenja virusov na ličinkah v inkubatorju. Pri tem smo se soočali s številnimi izzivi, kako čim boljše prenesti pogoje iz narave (panja) v umetno nadzorovano okolje (inkubator, brez prisotnosti čebel delavk). Prva težava se je pokazala pri tem, kako najti ličinke, ki so predhodno čim manj okužene z virusi. Čeprav so ličinke del čebelje družine, ki so poleg matice z virusi najmanj okužena kategorija, je težko najti družine, pri katerih je prisotnih malo čebeljih virusov, verjetno zaradi hitrega prenosa virusov znotraj čebelje družine in med čebelami iz različnih čebelnjakov, ki izletavajo in se srečujejo v obdobju pašne sezone. Pri pripravi poskusa so nam pomagale prejšnje raziskave, ki so pokazale, da so čebele najmanj okužene z virusi na začetku pašne sezone (Jamnikar Ciglencečki 2013; Jamnikar Ciglencečki in sod., 2014). Pred začetkom poskusa smo testirali ličinke in čebele iz panjev, ki bi jih v nadaljevanju uporabili za izbor ličink za poskuse, na prisotnost šestih čebeljih virusov z metodo RT-qPCR. Na podlagi teh rezultatov smo izbrali panj, v katerem pri čebelah in ličinkah nismo ugotovili nobenega od šestih testiranih virusov oziroma smo ugotovili le nizko število kopij BQCV. Kot smo ugotovili pri prvi izvedbi poskusa s SBV, se je v obdobju med prvim testiranjem čebel in presajanjem ličink, ki je trajalo le sedem dni, SBV tako namnožil, da smo pri kontrolni skupini ugotovili  $34,76 \times 10^3$  kopij na ličinko ( $4,54 \log_{10}$ ). Pri ponovitvi poskusa z inokulumom LSV3 smo pri kontrolni skupini ugotovili  $3,76 \times 10^3$  kopij na ličinko ( $3,58 \log_{10}$ ), čeprav tako v ličinkah kot v čebelah pri predhodnem pregledu istega panja nismo ugotovili prisotnosti čebeljih virusov. Za prvo izvedbo poskusa smo uporabili ličinke iz čebelnjaka Veterinarske fakultete v Ljubljani, za ponovitev poskusa pa smo ličinke odvzeli v čebelnjaku na območju Gorenjske, ki se nahaja na lokaciji na obrobju gozda. Na podobno težavo smo naleteli tudi pri hrani za ličinke, saj je bila komercialna mešanica matičnega mlečka okužena z visokimi odmerki šestih čebeljih virusov, zato smo v nadaljevanju za pripravo hrane za ličinke uporabili matični mleček, pridobljen iz čebelnjaka, ki ni bil kontaminiran z nobenim od šestih čebeljih virusov.

Drugo težavo smo opazili pri delu z ličinkami, ko smo iz panja presadili premlade ličinke, stare manj kot 24 ur, in se je s tem stopnja njihovega preživetja precej zmanjšala. Zato smo pri nadaljevanju poskusov uporabili ličinke v starosti približno 48 ur. Čebele delavke v panju stalno skrbijo za ličinke, jih hranijo in odstranjujejo odmrle ličinke, kar ni popolnoma primerljivo s pogoji, ki jih lahko vzpostavimo v inkubatorju. Ličinke smo hranili in pregledovali le enkrat dnevno, bolj optimalno za ličinke pa bi bilo hranjenje večkrat dnevno. Poseben izziv je predstavljalo vsakodnevno določanje, če so ličinke še žive ali mrtve, vendar smo to težavo dokaj enostavno rešili s pregledom ličink pod mikroskopom, kjer se dobro opazi premikanje ličink med njihovim dihanjem, premikanje glavice in telesa.

Po izvedbi poskusa smo se soočili z dejstvom, da se tako LSV3 kot tudi SBV v ličinkah nista množila, kot smo pričakovali. Prvi mogoč razlog je neuspešna okužba ličink, saj se ličinke z dodanimi odmerki inokulumov morda sploh niso okužile ali pa se je virus v ličinkah slabo množil. Pri poskusu s SBV pri skupini ličink, ki smo ji dodali srednji odmerek inokuluma, smo pri mrtvih ličinkah ugotovili porast v številu kopij SBV, in sicer od 3,24 na prvi dan do 4,41  $\log_{10}$  kopij na ličinko na četrti dan poskusa. Povečanje števila kopij virusa smo opazili tudi v skupini ličink, ki smo ji dodali visok odmerek SBV, ko se je število kopij SBV pri mrtvih ličinkah gibalo od 4,76 (prvi dan) do 9,00  $\log_{10}$  kopij na ličinko na tretji dan poskusa. Podobno povečanje števila kopij virusa smo opazili tudi pri živih ličinkah, ki smo jim dodali srednji in visoki odmerek SBV, vendar v manjši meri kot pri mrtvih ličinkah. Iz tega lahko sklepamo, da je povečano virusno breme SBV povzročilo pospešeno umiranje ličink. Pri poskusu z LSV3 smo porast števila kopij virusa opazili pri mrtvih ličinkah, ki smo jim dodali nizek odmerek LSV3, in sicer se je število povečalo z 1,04 (prvi dan) na 6,45  $\log_{10}$  kopij na ličinko (tretji dan poskusa). Podobno smo opazili pri mrtvih ličinkah, ki smo jim dodali visok odmerek LSV3, kjer je število kopij virusa naraslo s 5,98 (prvi dan) na 6,47  $\log_{10}$  kopij na ličinko (četrti dan poskusa).

Razlog za slabše razmnoževanje virusov v ličinkah lahko iščemo v genetski odpornosti ličink na uporabljene seve SBV ali LSV3. Po podatkih iz literature so za okužbo s SBV *per os* najbolj občutljive ličinke v starosti 48 ur (Hitchcock, 1966), zato bi se ličinke v tej raziskavi morale uspešno okužiti. Vendar je lahko množitev virusa odvisna od virusnega seva SBV. Nimamo podatkov o tem, ali se ugotovljen sev SBV množi hitreje ali počasneje in če sploh povzroči klinično sliko obolenja pri ličinkah ali ne.

Mogoče je, da smo uporabili prenizko koncentracijo virusa v inokulumu, saj so opisani odmerki za pojav kliničnih znakov v čebelah višji, in sicer  $9 \log_{10}$  (Schurr in sod., 2019), mi pa smo uporabili najvišji odmerek inokuluma v vrednosti  $8,03 \log_{10}$  kopij za SBV in  $6,48 \log_{10}$  kopij za LSV3, saj smo pričakovali, da se bosta virusa hitro namnožila do visokih koncentracij, ki naj bi povzročile klinične znake, kar pa se potem ni zgodilo. Inokulum smo ličinkam aplicirali le prvi dan hranjenja, vse ličinke pa tudi niso pojedle vse hrane, kar je lahko dejanski odmerek, namenjen ličinki, še dodatno zmanjšalo, in to bi lahko vplivalo na naše rezultate.

Z izvedenimi poskusi z virusnima sevoma LSV3 in SBV na čebeljih ličinkah v *in vitro* pogojih v času trajanja poskusa (5 dni) nismo ugotovili statistično značilnih razlik v naraščanju števila kopij virusa, ne pri virusu SBV kot tudi ne pri virusu LSV3. Ne glede na nizki, srednji ali visoki odmerek inokuliranega virusa. Prav tako nismo ugotovili statistično značilnih razlik med številom kopij virusa, ugotovljenega pri mrtvih ali živih ličinkah, zato ne moremo zaključiti, da se je uporabljeni sev virusa v ličinkah razmnoževal niti da je za ličinke patogen.

Opazili smo, da je bilo več mrtvih ličink v prvih dneh poskusa, na zadnji, peti dan poskusa, pa je bilo ugotovljenih najmanj mrtvih ličink, kar lahko razložimo s tem, da so ličinke prve dni bolj občutljive in da na preživetje deluje tudi rokovanje z njimi, kot je na primer presajanje ličink, kasneje pa z njimi fizično nismo več rokovali, razen da smo jih vsakodnevno hranili. Pri poskusu z inokulumom SBV je v kontrolni skupini umrlo 14 ličink, v skupini ličink, okuženih z nizkim odmerkom, je umrlo 15 ličink, v skupini s srednjim odmerkom 16 in v skupini z visokim odmerkom 19 ličink. Takšni rezultati so glede na virusni inokulum pričakovani, saj se je s povečevanjem odmerka virusa tudi umiranje ličink povečalo, vendar razlike v številu mrtvih ličink niso značilne, zato iz tega ne moremo sklepati o patogenosti virusnega seva SBV. Pri poskusu z LSV3 je največ ličink umrlo v kontrolni skupini, in sicer 27, kar zelo odstopa in težko najdemo razlog za to. Možna je kontaminacija ličink s kakšnim drugim patogenom ali da so bile predolgo časa izpostavljene neprimernim pogojem, na primer da so bile med hranjenjem predolgo časa zunaj inkubatorja. V skupini ličink, okuženi z nizkim odmerkom LSV3, je umrlo 19 ličink, v skupini s srednjim odmerkom 20 ličink in v skupini z visokim odmerkom 21 ličink. Iz teh rezultatov pa še ne moremo dokazati patogenosti virusa za ličinke. Za to bodo potrebne še nadaljnje raziskave, vključno z optimizacijo postopka gojenja ličink.

Pri eksperimentalni okužbi čebeljih bub v *in vitro* pogojih leta 2014 v Izraelu so s sevom IAPV, ki je močno kužen in patogen, intraabdominalno okuževali belooke bube z injiciranjem z iglo med tretjim in četrtem integumentom abdomna, in sicer z 2  $\mu$ l inokuluma, pripravljenega iz kolonije močno okuženih čebel, s titri virusa od  $10^{10}$  do  $10^{12}$  virusnih kopij na 1  $\mu$ g RNA (Hou in sod., 2016). Pomnoževanje virusa so nato preverili z določanjem pozitivno polarne RNA v razmerju z negativno polarno virusno RNA in ugotovili značilno stokratno povečanje števila kopij virusa v čebeljih bubah. V primerjavi z našim poskusom lahko ugotovimo, da so v Izraelu uporabili intraabdominalno aplikacijo bolj infektivnega virusa in v višjih dozah, kar močno poveča uspešnost okužbe čebel.

Pri eksperimentu v *in vitro* pogojih, ki so ga izvedli v Nemčiji leta 2022, kjer so želeli preučiti prenos DWV med čebelami in čmrlji, so z DWV okužili odrasle čebele in čmrlje, in sicer z odmerkom v višini  $10^7$  kopij virusa, tudi v tem primeru so virus vbrizgali intraabdominalno in pri tem ugotovili uspešno okužbo s pomnoževanjem virusa do  $10^{13}$  virusnih kopij na čebelo oziroma čmrlja. Prav tako so ugotovili prenos virusa z okuženih čebel na druge čebele ter čmrlje preko hrane. Ugotovili so tudi, da ni prenosa virusa v obratni smeri, torej z okuženih čmrljev na čmrlje in čebele (Tehel in sod., 2022). Če primerjamo ta poskus z našimi poskusi, so tudi oni uporabili intraabdominalno aplikacijo virusa, ki močno poveča uspešnost okužbe, s tem da so uporabili podobno količino virusnega inokuluma, kot smo ga uporabili v našem poskusu. Pri tem je treba poudariti, da so v nemški raziskavi uporabili drugo vrsto virusa (DWV) ter odrasle čebele in čmrlje. Prav gotovo je v prihodnje treba razmisliti o uporabi injiciranja virusa, vendar pa so pri tem tehnične omejitve s samo izvedbo in občutljivostjo ličink na takšen poseg. Vprašanje je, ali je to pri 24 do 48 ur starih ličinkah sploh izvedljivo. Mogoče je tudi, da se SBV in LSV3 začeta razmnoževati šele po petih dneh starosti ličink, ko pridejo v fazo zabubljanja, in bi poskus morali podaljšati. Poskus je v našem primeru potekal le pet dni, saj smo želeli proučevati čebelje ličinke le v razvojni stopnji ličink in ne preko celotnega obdobja razvoja čebel.

Pri poskusu sočasne okužbe odraslih zimskih čebel s CBPV in *Nosema ceranae*, ki so ga izvedli leta 2013 v Sloveniji (Toplak in sod., 2013), kjer so čebele okužili *per os* in *per cutum*, so ugotovili tisočkratno povečanje števila virusnih kopij pri mrtvih čebelah v primerjavi z živimi, največjo smrtnost pa so ugotovili pri skupini čebel, okuženih le s CBPV, in to peroralno. Pri

tem eksperimentu so uporabili terenski sev CBPV, ki je eden izmed najbolj patogenih čebeljih virusov, in drugo kategorijo čebel, za katero je dokazano, da je na ta virus zelo občutljiva.

V literaturi še nismo zasledili nobenega eksperimenta z okužbo čebeljih ličink z virusoma LSV3 in SBV, ki smo ju uporabili v naši študiji. Po začetnih težavah, ko smo ugotovili kontaminacijo kontrolne skupine, smo zamenjali ličinke in izbrali drug čebeljak. S tem bi lahko potrdili morebitno genetsko odpornost čebel na te virusne seve, kar bi lahko vplivalo na neuspešno okužbo, vendar tega ne moremo ne potrditi ne izključiti. Poskus bi lahko izvedli tudi z zamenjavo virusnega inokuluma, vendar nam to zaradi omejenega časa in večkratnih ponovitev poskusa časovno ni uspelo, bomo pa vse ugotovitve in izkušnje iz te študije vključili v načrtovanje prihodnjih raziskav. Prav tako bi bilo smiselno uporabiti višji odmerek inokuluma, da bi s tem povečali možnost uspešne okužbe.

Uvedbo gojenja čebeljih ličink v *in vitro* pogojih in gojenje čebeljih ličink do izleganja odraslih čebel lahko v prihodnje uporabimo za eksperimente z različnimi čebeljimi virusi, bakterijami (npr. *Paenibacillus larvae*), paraziti, insekticidi in drugimi kontaminanti iz okolja. Izzivi gojenja čebeljih ličink v *in vitro* pogojih so v tem, kako odbrati ličinke, kako izboljšati preživetje ličink in kako ter v kakšnih količinah aplicirati patogene in hrano.



## 6 SKLEPI

V okviru doktorske disertacije smo ugotavljali ter določali viruse v naravno okuženih čebeljih družinah in preučevali razvoj okužbe v inokulirani čebelji zalegi. Raziskavo smo razdelili na tri sklope in v njih potrdili ali ovrgli pet zastavljenih hipotez.

*Hipoteza 1: Število kopij posameznega virusa (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV in SBV) je višje pri čebeljih družinah s klinično sliko kot pri čebeljih družinah brez klinične slike.*

- Hipotezo smo potrdili za ABPV, CBPV, DWV in SBV, saj smo pri teh virusih dokazali statistično značilno višje število kopij virusa pri klinično obolelih čebeljih družinah kot pri zdravih čebeljih družinah.
- Hipotezo smo ovrgli za BQCV in LSV, saj nismo ugotovili statistično značilnih razlik v številu kopij med obolelimi in zdravimi čebeljimi družinami.

*Hipoteza 2: Pri čebeljih družinah bomo z metodo NGS prvič ugotovili prisotnost nekaterih virusov v Sloveniji.*

- V Sloveniji smo z metodo NGS prvič ugotovili viruse ARV-1, BeeMLV in HPLV34 pri čebelah in tako potrdili hipotezo.

*Hipoteza 3: Z metodo NGS bomo določili nukleotidna zaporedja celotnih genomov nekaterih čebeljih virusov.*

- Z metodo NGS smo določili nukleotidna zaporedja 22 celotnim genomom virusov, ki jih uvrščamo med devet različnih vrst virusov, določenih v vzorcih zdravih in obolelih čebeljih družin v Sloveniji, s čimer smo hipotezo potrdili.

*Hipoteza 4: Pomnoževanje SBV po inokulaciji zalege je odvisno od števila kopij virusa v inokulumu.*

- Hipoteze nismo ne potrdili, ne ovrgli, saj nismo mogli zanesljivo potrditi pomnoževanja SBV, ker ni bilo statistično značilnih razlik v količini virusa, ne glede na različne odmerke virusnega inokuluma v petih dnevih poskusa.

*Hipoteza 5: Pomnoževanje LSV po inokulaciji zalege ni odvisno od števila kopij virusa v inokulumu.*

- Hipoteze nismo ne potrdili, ne ovrgli, saj nismo mogli zanesljivo potrditi pomnoževanja LSV, ker ni bilo statistično značilnih razlik v količini virusa, ne glede na različne odmerke virusnega inokuluma v petih dnevih poskusa.

## 7 POVZETEK

V izvedeni raziskavi smo se osredotočili na ugotavljanje in določanje virusov v naravno okuženih čebeljih družinah (*Apis mellifera carnica*) ter na razvoj okužbe v inokulirani čebelji zalegi.

Razvili smo začetne oligonukleotide, sonde TaqMan in standarda za dokazovanje in kvantifikacijo LSV3 in SBV z metodo RT-qPCR. Metodo RT-qPCR za kvantifikacijo ABPV, BQCV, CBPV in DWV smo povzeli po protokolu EURL in jo v virološkem laboratoriju VF UL prvič uporabili za preiskave teh čebeljih virusov.

Ugotovili smo statistično značilno višje število kopij ABPV, CBPV, DWV in SBV v vzorcih klinično obolelih čebeljih družin v primerjavi z vzorci klinično zdravih čebeljih družin. Nismo pa ugotovili statistično značilnih razlik med obolelimi in zdravimi čebeljimi družinami v številu virusnih kopij pri BQCV in LSV3.

Določili in opisali smo 22 nukleotidnih zaporedij celotnih genomov virusov iz devetih vzorcev obolelih in desetih vzorcev zdravih čebeljih družin, odvzetih iz območja celotne Slovenije, ki pripadajo devetim različnim vrstam čebeljih virusov (ABPV: n = 4, BQCV: n = 3, CBPV: n = 2, DWV: n = 5, LSV: n = 4, SBV: n = 1, ARV-1: n = 1, BeeMLV: n = 1, HPLV34: n = 1).

V Sloveniji smo prvič določili nukleotidna zaporedja celotnih genomov ABPV, BQCV, DWV in SBV in prvič ugotovili ARV-1, BeeMLV in HPLV-34 pri čebelah.

Ugotovili smo nukleotidna zaporedja genomov DWV (DWV 341-2/2020) in DWV (DWV 341-1/2020) v istem vzorcu klinično obolele čebelje družine, ki sta si med seboj 84,15-odstotno identična in ju lahko uvrstimo v genotipa A in B.

V Sloveniji smo prvič ugotovili LSV linije 4 in mu določili nukleotidno zaporedje celotnega genoma. Določili smo nukleotidno zaporedje celotnega genoma ARV-1, ki je prvi ugotovljeni virus te vrste pri čebeljih družinah v Sloveniji. Določili smo nukleotidno zaporedje celotnega genoma BeeMLV, ki je eno od petih zaporedij genomov te vrste virusa v genski banki NCBI,

nukleotidno zaporedje genoma HPLV34 pa je prvo nukleotidno zaporedje celotnega genoma tega virusa, določenega v vzorcu čebelje družine, na svetu.

Pri poskusu s čebeljimi ličinkami v *in vitro* pogojih pri dveh eksperimentalnih okužbah ličink z virusnima inokulumoma LSV3 in SBV nismo ugotovili statistično značilno višjega števila kopij virusa v mrtvih ličinkah v primerjavi z živimi. Količina virusa se v obdobju petih dni trajanja poskusa ni statistično značilno povečevala pri nobeni skupini ličink, ki smo ji dodali nizek, srednji ali visok odmerek inokuluma LSV3 ali SBV.

## 8 SUMMARY

The research focused on determination and identification of viruses in naturally infected honeybee colonies (*Apis mellifera carnica*) and development of the infection in inoculated honeybee brood.

Two new sets of primers, TaqMan probes and standards for detection and quantification of LSV3 and SBV for RT-qPCR method were developed and implemented. RT-qPCR method for quantification of ABPV, BQCV, CBPV and DWV, from EURL protocols, were used in our laboratory for the first time, for investigation of honeybee viruses.

Statistically, significantly higher viral copy number was determined in clinically affected honeybee colonies in comparison to healthy honeybee colonies for ABPV, CBPV, DWV and SBV. There were no statistically significant differences detected in viral copy number of BQCV and LSV3 between healthy and affected honeybee colonies.

22 sequences of complete genomes of nine different viral species were determined and described from nine samples of affected and ten samples of healthy honeybee colonies collected over whole Slovenian territory (ABPV n=4, BQCV n=3, CBPV n=2, DWV n=5, LSV3 n=4, SBV n=1, ARV-1 n=1, BeeMLV n=1, HPLV34 n=1).

First genome sequences of ABPV, BQCV, DWV and SBV in Slovenia were determined and described and ARV-1, BeeMLV and HPLV34 were detected for the first time in honeybee samples in Slovenia.

DWV (DWV 341-2/2020) and DWV (DWV 341-1/2020) genome sequences were discovered in the same sample of diseased honeybee colony with 84,15 % nucleotide identity between each other which can be classified as genotype A and B.

LSV lineage 4 was detected in Slovenia for the first time and its genome sequence determined. The complete genome sequence of ARV-1 was detected, which is the first genome sequence of this viral species detected in honeybee samples in Slovenia. BeeMLV genome sequence was determined which is one of five genome sequences of this viral species in the NCBI GenBank

and HPLV34 genome sequence is the first genome sequence of this species detected in honeybee samples worldwide.

In the experiment of *in vitro* rearing of honeybee larvae, no statistically significant differences were confirmed in number of viral copies between live and dead honeybees in experiment with inoculation of LSV3 and SBV. The viral load did not statistically significantly multiply over five days of the experiment in the groups of larvae infected with low, medium and high dose of inoculum LSV3 and SBV.

## 9 ZAHVALE

Najlepše bi se zahvalila svojemu mentorju, izr. prof. dr. Ivanu Toplaku, ki me je prvič spoznal z laboratorijem, name prenesel vse svoje znanje in izkušnje in mi stal ob strani v vseh trenutkih, lepih in težkih. Pomagal mi je postaviti doktorat in se ob tem ukvarjal z mojo funkcionalno nepismenostjo. Ne morem se mu dovolj oddolžiti za ves trud in potrpljenje v času petih let, ko ni nikoli obupal nad menoj.

Lepo se zahvaljujem tudi spoštovani predsednici komisije, prof. dr. Vlasti Jenčič, za pomoč pri poskusih z ličinkami in njeno dobro voljo in energijo, ki jo je delila, kadarkoli sem se oglasila na njihovem inštitutu, ter za pregled in oceno doktorske naloge.

Lepo se zahvaljujem članici komisije, izr. prof. dr. Urški Jamnikar Ciglencečki, za velik prispevek k izboljšanju moje doktorske naloge in za njene konstruktivne kritike, ki so nalogo dvignile na višji nivo. Zahvaljujem se ji tudi za pregled in oceno doktorske naloge.

Zahvalila bi se članu komisije, prof. dr. Alešu Gregorcu, za vso pomoč pri vzorčenju zdravih čebeljih družin ter pri poskusu s čebeljimi ličinkami, saj je bil vedno pripravljen na pomoč in si je vedno vzel čas za moje delo, predvsem v njegovem čebelnjaku, za kar je žrtvoval veliko svojih čebel. Lepo se mu zahvaljujem tudi za vso strokovno pomoč ter za pregled in oceno doktorske naloge.

Lepo bi se zahvalila dr. Danijeli Černe, in sicer za vso njeno pomoč ter njene izkušnje pri delu v laboratoriju in za pomoč pri strokovnem znanju z vseh področij veterinarske virologije.

Zahvalila bi se tudi dr. Urški Kuhar, in sicer za njeno pomoč pri uvajanju v metodo NGS in strokovno podporo pri obdelavi podatkov. Bila je zelo prizanesljiva vodja laboratorija, ko sem imela veliko dela s svojih doktoratom.

Zahvalila bi se Nataliji Novak in Poloni Žagar za veliko pomoč pri delu v laboratoriju, za vzpodbudo in da sem se lahko v vsakem trenutku obrnila nanju.

Zahvaljujem se dr. Luciji Žvokelj za pomoč pri delu v čebelnjaku, da si je vedno vzela čas in da mi je pripravila satje za presajanje čebeljih ličink. Zahvaljujem se Robertu Pislak-Baliju in Mateji Ratiznojnik za pomoč in sodelovanje in njun čas pri vzorčenju zdravih čebeljih družin ter za njune čebele.

Najlepša hvala dr. Bojanu Papiću in dr. Tanji Knific za vso njuno strokovno pomoč pri obdelavi rezultatov doktorske naloge ter vso njuno vzpodbudo.

Hvala vsem sodelavcem iz Enote za virologijo Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo, hvala za pomoč in nasvete, še posebej prof. dr. Petru Hostniku, ki mi je nesebično stal ob strani in skrbel za pomirjanje odnosov v naši enoti.

Najlepša hvala knjižničarkama Veterinarske fakultete, Stanislavi Ujc in Slavici Sekulič, za pomoč in pregled doktorske naloge.

Najlepša hvala lektoricama Tjaši Mislej in Renati Bok Zelenjak za slovensko in angleško lektoriranje in pomoč.

Iz srca se zahvaljujem svoji družini, ki ni obupala nad mano takrat, ko sem sama obupala nad sabo, brez vas bi mi težko uspelo.



## 10 LITERATURA

Allen MF, Ball BV, White RF, Antoniw JF. The detection of acute bee paralysis virus in *Varroa jacobsoni* by the use of a simple indirect ELISA. *J Apicult Res* 1986; 25(2): 100–5. doi: 10.1080/00218839.1986.11100700

Allen MF, Ball BV. Characterisation and serological relationship of strains of Kashmir bee virus. *Ann Appl Biol* 1995; 126(3): 471–84. doi: 10.1111/j.1744-7348.1995.tb05382.x

Ambardar S, Gupta R, Trakroo D, Lal R, Vakhlu J. High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry. *Indian J Microbiol* 2016; 56(4): 394–404. doi: 10.1007/s12088-016-0606-4

ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.1300 – Verzija 02. Standard operating procedure: detection and quantification of the chronic bee paralysis virus (CBPV) by real-time RT-PCR. Sophia Antipolis Cedex: ANSES Sophia Antipolis Laboratory, 2018: 16 str.

ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.3900 – Verzija 03. Standard operating procedure: detection and quantification of the Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), Black Queen Cell Virus (BQCV), Deformed Wing Virus (DWV-A & DWV-B), and Sacbrood Virus (SBV) by real-time RT-PCR. Sophia Antipolis Cedex: ANSES Sophia Antipolis Laboratory, 2019: 18 str.

Antúnez K, D'Alessandro B, Corbella E, Zunino P. Detection of chronic bee paralysis virus and acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *J Invertebr Pathol* 2005; 90(1): 69–72. doi: 10.1016/j.jip.2005.07.001

Antunez K, D'Alessandro B, Corbella E, Ramallo G, Zunino P. Honey-bee viruses in Uruguay. *J Invertebr Pathol* 2006; 93(1): 67–70. doi: 10.1016/j.jip.2006.05.009

Aupinel P, Fortini D, Dufour H et al. Improvement of artificial feeding in standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bull Insectology* 2005; 58 (2):107–11.

Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* 1963; 21(3): 390–95. doi: 10.1016/0042-6822(63)90200-9

Bailey L. Viruses attacking the honey bee. *Adv Virus Res* 1967; 20: 271–304. doi: 10.1016/S0065-3527(08)60507-2

Bailey L. The multiplication and spread of sacbrood virus of bees. *Ann Appl Biol* 1969; 63(3): 483–91. doi: 10.1111/j.1744-7348.1969.tb02844.x

Bailey L, Woods RD. Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses. *J Gen Virol* 1977; 37(1): 175–82. doi: 10.1099/0022-1317-37-1-175

Bailey L, Ball BV. Honey bee pathology. 2nd ed. Cambridge: Academic Press, 1991: 10–34.

Ball BV. Acute paralysis virus isolates from honeybee colonies infested with *Varroa jacobsoni*. *J Apicult Res* 1985; 24(2): 115–19. doi: 10.1080/00218839.1985.11100658

Ball BV, Allen MF. The prevalence of pathogens in the honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Ann Appl Biol* 1988; 113(2): 237–44. doi: 10.1111/j.1744-7348.1988.tb03300.x

Ball BV, Bailey L. Honey bee viruses In: Granoff A Webster RG, eds. *Encyclopedia of virology*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1999: 743–9.

Bakonyi T, Farkas R, Szendroi A, Dobos-Kovács M, Rusvai M. Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. *Apidologie* 2002; 33(1): 63–74. doi: 10.1051/apido:2001004

Bankevich A, Nurk S, Antipov D et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012; 19(5): 455–77. doi: 10.1089/cmb.2012.0021

BeAware. Black queen cell virus [online]. Australian Government, Department of Agriculture, Fisheries and Forestry: Canberra, 2022. <https://beeaware.org.au/archive-pest/black-queen-cell-virus/#ad-image-0> (16. 6. 2022)

Békési L, Ball BV, Dobos-Kovács M, Bakonyi T, Rusvai M. Occurrence of acute paralysis virus of the honeybee (*Apis mellifera*) in a Hungarian apiary infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Acta Vet Hung* 1999; 47(3): 319–24. doi: 10.1556/AVet.47.1999.3.5

Benaets K, Van Geystelen A, Cardoen D et al. Covert deformed wing virus infections have long-term deleterious effects on honeybee foraging and survival. *Proc Biol Sci* 2017; 284(1848): e20162149 (8 str.) doi: 10.1098/rspb.2016.2149

Benjeddou M, Leat N, Allsopp M, Davison S. Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67 (5): 2384–7. doi: 10.1128/AEM.67.5.2384-2387.2001

Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 2008; 456(7218): 53–9. doi: 10.1038/nature07517

Berenyi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Köglberger H, Nowotny N. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72: 2414–20. doi: 10.1128/AEM.72.4.2414-2420.2006

Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24(4): 335–41. doi: 10.1016/j.cmi.2017.10.013

Bigot D, Dalmon A, Roy B et al. The discovery of Halictivirus resolves the Sinaivirus phylogeny. *J Gen Virol*. 2017; 98(11): 2864–75. doi: 10.1099/jgv.0.000957

Blanchard P, Ribière M, Celle O et al. Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. *J Virol Methods* 2007; 141(1): 7–13. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.11.021

Blanchard P, Guillot S, Antúnez K et al. Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan(®) assay for quantitation of *Sacbrood virus* (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies. *J Virol Methods* 2003; 197(1): 7–13. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.09.012

Blanchard P, Regnault R, Schurr F, Dubois E, Ribière M. Intra-laboratory validation of Chronic bee paralysis virus quantitation using an accredited standardised real-time quantitative RT-PCR method. *J Virol Methods* 2012; 180(1/2): 26–31. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.12.005

Buchfink B, Reuter K, Drost HG. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nat Methods* 2021; 18: 366–8. doi: 10.1038/s41592-021-01101-x

Budge GE, Simcock NK, Holder PJ et al. Chronic bee paralysis as a serious emerging threat to honey bees. *Nat Commun* 2020; 11: e2164 (9 str.) doi: 10.1038/s41467-020-159190

Carrico JA, Rossi M, Moran-Gilad J, Van Domselaar G, Ramirez M. A primer on microbial bioinformatics for nonbioinformaticians. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24(4): 342–9. doi: 10.1016/j.cmi.2017.12.015

Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, Brown M. A scientific note on the detection of honey-bee viruses using real-time PCR (TaqMan) in *Varroa* mites collected from a Thai honey-bee (*Apis mellifera*) apiary. *J Invertebr Pathol* 2006; 91(1): 69–73. doi: 10.1016/j.jip.2005.11.001

Chen YP, Zhao Y, Hammond J, Hsu HT, Evans JD, Feldlaufer MF. Multiple virus infections in honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *J Invertebr Pathol* 2004; 87(2/3): 84–93. doi: 10.1016/j.jip.2004.07.005

Chevin A, Coutard B, Blanchard P, Dabert-Gay AS, Ribière-Chabert M, Richard T. Characterisation of structural proteins from Chronic bee paralysis virus (CBPV) using mass spectrometry. *Viruses* 2015; 7(6): 3329–44. doi: 10.3390/v7062774

Choe SE, Nguyen TT, Hyun BH et al. Genetic and phylogenetic analysis of South Korean sacbrood virus isolates from infected honey bees (*Apis cerana*). *Vet Microbiol* 2012; 157(1/2): 32–40. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.12.007

Cizelj I, Gregorič N. Dokazovanje virusnih infekcij pri odmrlih čebeljih družinah *Apis mellifera carnica*. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2004.

Cornman RS. Relative abundance and molecular evolution of *Lake sinai virus* (Sinaivirus) clades. *Peer J* 2019; 7: e6305 (13str.) doi: 10.7717/peerj.6305

Daughenbaugh KF, Martin M, Brutsche ML et al. Honey bee infecting *Lake Sinai viruses*. *Viruses* 2015; 7(6): 3285–309. doi: 10.3390/v7062772

de Miranda JR, Genersch E. Deformed wing virus. *J Invertebr Pathol* 2010; 103 (suppl. 1): 48–61. doi: 10.1016/j.jip.2009.06.012

de Miranda JR, Bailey L, Ball BV et al. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *J Apis Res* 2013; 52(4): 1–57. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.22

de Miranda JR, Cornman RS, Evans JD et al. Genome characterization, prevalence and distribution of a macula-like virus from *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Viruses* 2015; 7(7): 3586–602. doi: 10.3390/v7072789

Desai SD, Kumar S, Currie R. Occurrence, detection, and quantification of economically important viruses in healthy and unhealthy honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) colonies in Canada. *Can Entomol* 2015; 148(1): 22–35. doi: 10.4039/tce.2015.23

Dolezal GA, Hendrix SD, Scavo DA et al. Honey bee viruses in wild bees: Viral prevalence, loads and experimental inoculation. PLoS ONE 2016; 11(11): e0166190 (16 str.)  
doi: 10.1371/journal.pone.0166190

EEA. R Core Team (2020) [online]. Copenhagen: Agency of the European Union, 2020.  
<http://www.r-project.org/index.html> (13. 3. 2020)

Eeles RA, Warren W, Stamps A. The PCR revolution. Eur J Cancer 1992; 28(1): 289–93.  
doi: 10.1016/0959-8049(92)90436-6

Eid J, Fehr A, Gray J et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. Science 2009; 323(5910): 133–8. doi: 10.1126/science.1162986

Feinberg, M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. J Chromatogr A 2007; 1158(1/2): 174–83. doi: 10.1016/j.chroma.2007.02.021

Forgách P, Bakonyi T, Tapaszti Z, Nowotny N, Rusvai M. Prevalence of pathogenic bee viruses in Hungarian apiaries: Situation before joining the European Union J Invertebr Pathol 2008; 98(2): 235–8. doi: 10.1016/j.jip.2007.11.002

Galbraith DA, Fuller ZL, Ray AM et al. Investigating the viral ecology of global bee communities with high-throughput metagenomics. Sci Rep 2018; 11: 8(1): e8879 (11 str.)  
doi: 10.1038/s41598-018-27164-z

Genersch E, Yue C, Fries I, de Miranda JR. Detection of deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. J Invertebr Pathol 2006; 91(1): 61–3. doi: 10.1016/j.jip.2005.10.002

Gisder S, Aumeir P, Genersch E. Deformed wing virus (DWV): viral load and replication in mites (*Varroa destructor*). J Gen Virol 2009; 90(2): 463–7. doi: 10.1099/vir.0.005579-0

Granberg F, Vicente-Rubiano M, Rubio-Guerri C et al. Metagenomic detection of viral pathogens in Spanish honeybees: co-infection by aphid lethal paralysis, Israel acute paralysis and *Lake Sinai viruses*. PLoS One 2013; 8(2): e57459 (8 str.) doi: 10.1371/journal.pone.0057459

Grabenstiner E, Ritter W, Carter MJ et al. Sacbrood virus of the honey-bee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8(1): 93–104. doi: 10.1128/CDLI.8.1.93-104.2001

Gregorc A. Medonosna čebela in osnove čebelarjenja. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2002.

Gregorc A, Evans JD, Scharf M, Ellis JD. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). J Insect Physiol 2012; 58(8): e1042-9. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.03.015

Haddad NJ, Brake M, Migdadi H, de Miranda JR. First detection of honey bee viruses in Jordan by RT-PCR. Jordan J Agric Sci 2008; 4(3): 242–6.

Haynes W. Wilcoxon Rank Sum Test. In: Dubitzky W, Wolkenhauer O, Cho K, Yokota H, eds. Encyclopedia of systems biology. Springer; 2013: 10 str.

Hou C, Rivkin H, Slabezki Y, Chejanovsky N. Dynamics of the presence of israeli acute paralysis virus in honey bee colonies with colony collapse disorder. Viruses 2014; 5: 6(5): 2012–27. doi: 10.3390/v6052012

Huson DH, Auch AF, Qi J, Schuster SC. MEGAN analysis of metagenomic data. Genome Res 2007; 17(3): 377–86. doi: 10.1101/gr.5969107

Jamnikar Ciglencečki U, Toplak I. Development of a real-time RT-PCR assay with TaqMan probe for specific detection of acute bee paralysis virus. J Virol Methods 2012; 184(1/2): 63–8. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.05.010

Jamnikar Ciglencečki U. Preučevanje virusnih okužb pri kranjski čebeli (*Apis mellifera carnica*). Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2013. Doktorska disertacija.

Jamnikar Ciglencečki U, Toplak I. Genetic diversity of acute bee paralysis virus in Slovenian honeybee samples. *Acta Vet Hung* 2013; 61(2): 244–56. doi: 10.1556/AVet.2013.005

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(3): 131–40.

Jamnikar Ciglencečki U, Toplak I, Kuhar U. Complete genome of chronic bee paralysis virus strain SLO/M92/2010, detected from *Apis mellifera carnica*. *Genome Announc* 2017; 5(26): e00602-17 (2 str.) doi: 10.1128/genomeA.00602-17

Jamnikar Ciglencečki U, Pislak Ocepek M, Toplak I. Genetic diversity of deformed wing virus from *Apis mellifera carnica* (*Hymenoptera: Apidae*) and Varroa Mite (*Mesostigmata: Varroidae*). *J Econ Entomol* 2019; 112(1): 11–9. doi: 10.1093/jee/toy312

Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(14): 3059–66. doi: 10.1093/nar/gkf436

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006; 27(2/3): 95–125. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007

Kuhar U, Vengušt G, Jamnikar Ciglencečki U. Complete genome sequence of roe deer picobirnavirus strain PBV/roe\_deer/SLO/D38-14/2014. *Genome Announc* 2017; 5(50): e01329-17 (2 str.) doi: 10.1128/genomeA.01329-17

Kruskal WH, Wallis A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc* 1952; 47 (260): 583–621. doi: 10.1080/01621459.1952.10483441



Levin S, Galbraith D, Sela N, Erez T, Grozinger CM, Chejanovsky N. Presence of *Apis rhabdovirus-1* in populations of pollinators and their parasites from two continents. *Front Microbiol* 2017; 12(8): e2482 (11 str.) doi: 10.3389/fmicb.2017.02482

Levy SE, Myers RM. Advancements in next-generation sequencing. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2016; 17: 95–115. doi: 10.1146/annurev-genom-083115-022413

Linz U, Delling U, Rübsamen-Waigmann H. Systematic studies on parameters influencing the performance of the polymerase chain reaction. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28(1): 5–13.

Lovric M, ed. *International encyclopaedia of statistical science*. Berlin: Springer, 2011.

Martin M. Cutadapt removes adapter sequence from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J* 2011; 17(1): 10–12. doi: 10.14806/ej.17.1.200

Martin SJ, Ball BV, Carreck NL. Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWV) in untreated or acaricide-treated *Varroa destructor* infested honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J Apicult Res* 2010; 49(1): 72–9. doi: 10.3896/IBRA.1.49.1.10

Marzoli F, Forzan M, Bortolotti L et al. Next generation sequencing study on RNA viruses of *Vespa velutina* and *Apis mellifera* sharing the same foraging area. *Transbound Emerg Dis* 2021; 68(4): 2261–73. doi: 10.1111/tbed.13878

McMahon DP, Fürst MA, Caspar J, Theodorou P, Brown MJF, Paxton RJ. A sting in the spit: widespread cross-infection of multiple RNA viruses across wild and managed bees. *J Anim Ecol* 2015; 84(3): 615–24. doi: 10.1111/1365-2656.12345

McMenamin AJ, Flenniken ML. Recently identified bee viruses and their impact on bee pollinators. *Curr Opin Insect Sci* 2018; 26: 120–9. doi: 10.1016/j.cois.2018.02.009

Mendelu Faculty of Agrisciences. Diseases and pests of bees [online]. Brno, Faculty of Agrisciences, 2022.

[http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/print.php?page=6498&typ=html](http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=6498&typ=html) (2.11.2022)

Molineri AI, Pacini A, Giacobino A et al. Prevalence of honey bee (*Apis mellifera*) viruses in temperate and subtropical regions from Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2017; 49(2): 166–73. doi: 10.1016/j.ram.2016.12.004

Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 1990; 262(4): 56–61, 64–5. doi: 10.1038/scientificamerican0490-56

Mussen EC, Furgala B. Replication of sacbrood virus in larval and adult honeybees, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* 1977; 30(1): 20–34.

NF U47-600-2. Animal health analysis methods – PCR – Part 2: Requirements and recommendations for the development and the validation of veterinary PCR. Saint-Denis: AFNOR, 2015: 51 str.

Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. MetaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res* 2017; 27(5): 824–34. doi: 10.1101/gr.213959.116

Olivier V, Blanchard P, Chaouch S et al. Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus Res* 2008; 132(1/2): 59–68. doi: 10.1016/j.virusres.2007.10.014

Ongus JR, Peters D, Bonmatin JM, Bengsch E, Vlak JM, van Oers MM. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *J Gen Virol* 2004; 85(12): 3747–55. doi: 10.1099/vir.0.80470-0

Oulas A, Pavloudi C, Polymenakou P et al. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinform Biol Insights* 2015; 9: 75–88. doi: 10.4137/BBI.S12462

Palacios G, Hui J, Quan PL et al. Genetic analysis of Israel acute paralysis virus: distinct clusters are circulating in the United States. *J Virol* 2008; 82(13): 6209–17. doi: 10.1128/JVI.00251-0

Papić B, Golob M, Zdovc I, Avberšek J, Pislak Očepek M, Kušar D. Using whole-genome sequencing to assess the diversity of *Paenibacillus larvae* within an outbreak and a beekeeping operation. *Microb Genom* 2021; 7(12): e000709 (8 str.) doi: 10.1099/mgen.0.000709

Peng W, Li J, Boncristiani H, Strange JP, Hamilton M, Chen Y. Host range expansion of honey bee Black Queen Cell Virus in the bumble bee, *Bombus huntii*. *Apidologie* 2011; 42: 650–8. doi: 10.1007/s13592-011-0061-5

Pollmann A. Werth der verschiedenen Bienenracen und deren Varietäten, bestimmt durch Urtheile namhafter Bienenzüchter. 2. Verm. Aufl. Leipzig; Voigt, 1889.

Pravilnik o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje in preprečevanje varoze čebel. *Ur List RS*, št. 21/20. 2020; 30(10): 1035–6 (13.3.2020)

Prime Bees. Deformed wing virus [online]. College Station: Prime Bees °Aggieland Honey, 2018. <https://primebees.com/2018/05/01/deformed-wing-virus/> (16 .6. 2022)

Radzevičiūtė R, Theodorou P, Husemann M et al. Replication of honey bee-associated RNA viruses across multiple bee species in apple orchards of Georgia, Germany and Kyrgyzstan. *J Invertebr Pathol* 2017; 146: 14–23. doi: 10.1016/j.jip.2017.04.002

Remnant EJ, Shi M, Buchmann G et al. A diverse range of novel RNA viruses in geographically distinct honey bee populations. *J Virol* 2017; 91(16): e00158-17 (19 str.) doi: 10.1128/JVI.00158-17

Resolucija o zaščiti kranjske čebele (ReZKČ). *Ur List RS* 2014; 24(18): 2041-7 (14.3.2014)

Ribière M, Triboulot C, Mathieu L, Aurières C, Faucon JP, Pèpin M. Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* 2002; 33(3): 339–51. doi: 10.1051/apido:2002020

Rihar J. Praktično čebelarjenje. Ljubljana: Kmečka knjiga, 1956. 308 str.

Runckel C, Flenniken ML, Engel JC et al. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. PLoS ONE 2011; 6(6): e20656 (18 str.) doi: 10.1371/journal.pone.0020656

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Nati Acad Sci USA 1977; 74(12): 5463–7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463

Shi M, Lin XD, Tian JH et al. Redefining the invertebrate RNA virosphere. Nature 2016; 540(7634): 539–43. doi: 10.1038/nature20167

Singh R, Levitt AL, Rajotte EG et al. RNA viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-apis hymenopteran species. PLoS ONE 2010; 5(12): e14357 (16 str.) doi: 10.1371/journal.pone.0014357

Sulimanović Đ, Jenčič V. Čebelja družina in njene bolezni. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1966.

Schurr F, Cougoule N, Rivière MP et al. Trueness and precision of the real-time RT-PCR method for quantifying the chronic bee paralysis virus genome in bee homogenates evaluated by a comparative inter-laboratory study. J Virol Methods 2017; 248: 217–25. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.07.013

Schurr F, Tison A, Militano L et al. Validation of quantitative real-time RT-PCR assays for the detection of six honeybee viruses. J Virol Methods 2019; 270: 70–78. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.04.020

Stoltz D, Shen XR, Boggis C, Sisson G. Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. J Apicult Res 1995; 34: 153–60. doi: 10.1080/00218839.1995.11100900

Šimenc L, Kuhar U, Jamnikar Ciglencečki U, Toplak I. First complete genome of lake sinai virus lineage 3 and genetic diversity of *Lake sinai virus* strains from honey bees and bumblebees. J Econ Entomol 2020; 113(3): 1055–61. doi: 10.1093/jee/toaa049

Šimenc L, Knific T, Toplak I. The comparison of honeybee viral loads for six honeybee viruses (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV) in healthy and clinically affected honeybees with TaqMan quantitative real-time RT-PCR assays. *Viruses* 2021; 13(7): e1340 (17 str.) doi: 10.3390/v13071340

Tehel A, Streicher T, Tragust S, Paxton RJ. Experimental cross species transmission of a major viral pathogen in bees is predominantly from honeybees to bumblebees. *Proc Biol Sci* 2022; 289(1969): e20212255 (9 str.) doi: 10.1098/rspb.2021.2255

Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N et al. Prevalence and seasonal variations of six honeybee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(12): 7185–91. doi: 10.1128/AEM.70.12.7185-7191.2004

Tlak Gajger I, Šimenc L, Toplak I. The first detection and genetic characterization of four different honeybee viruses in wild bumblebees from Croatia. *Pathogens* 2021; 10(7): e808 (11 str.) doi: 10.3390/pathogens10070808

Tomašec I. *Biologija pčela*. Zagreb: Nakladni zavod Hrvatske, 1949.

Toplak I. *Molekularna epidemiologija bovine virusne diareje (BVD) v slovenskih plemenskih rejah govedi*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2004. Doktorska disertacija.

Toplak I, Zabavnik Piano J, Pislak M. *Ugotavljanje prisotnosti petih čebeljih virusov v vzorcih obolelih čebeljih družin v letu 2010*. Ljubljana: Nacionalni veterinarski institut, Veterinarska fakulteta, 2010.

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(2): 89–96.

Toplak I, Jamnikar Ciglencečki U, Aronstein K, Gregorc A. Chronic bee paralysis virus and *Nosema ceranae* experimental co-infection of winter honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Viruses* 2013; 5(9): 2282–97. doi: 10.3390/v5092282

Toplak I, Rihtarič D, Pislak M et al. Ugotavljanje petih virusov v odmrlih čebeljih družinah v letu 2015 v Sloveniji. *Slo Vet Res* 2016a; 53(suppl. 17): 263–6.

Toplak I, Ipavec M, Kuhar U et al. Complete genome sequence of the *Porcine epidemic diarrhea virus* strain SLO/JH-11/2015. *Genome Announc* 2016b; 4(2): e01725-15 (2 str.) doi: 10.1128/genomeA.01725-15

Toplak I, Kuhar U, Kušar D, Papić B, Koren S, Toplak N. Complete genome sequence of a *Bovine viral diarrhea virus subgenotype 1e* strain, SLO/2407/2006, isolated in Slovenia. *Genome Announc* 2016c; 4(6): e01310-16. doi: 10.1128/genomeA.01310-16.

Toplak I, Petrović T, Vidanović D et al. Complete genome sequence of *Lumpy skin disease virus* isolate SERBIA/Bujanovac/2016, detected during an outbreak in the Balkan area. *Genome Announc* 2017; 5(35): e00882-17 (2 str.) doi: 10.1128/genomeA.00882-17

Toplak I, Šimenc L, Pislak Očepek M, Bevk D. Determination of genetically identical strains of four honeybee viruses in bumblebee positive samples. *Viruses* 2020; 12(11): e1310 (16 str.) doi: 10.3390/v12111310

Topley E, Davison S, Leat N, Benjeddou M. Detection of three honey-bee viruses simultaneously by a single multiplex reverse transcriptase PCR. *Afr J Biotechnol* 2005; 4 (7): 763–7.

Traynor KS, Rennich K, Forsgren E et al. Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. *Apidologie* 2016; 47: 325–47. doi: 10.1007/s13592-016-0431-0

Valles SM, Chen Y, Firth AE, Guérin DMA et al. ICTV virus taxonomy profile: *Dicistroviridae*, *J Gen Virol* 2017; 98: 355–6. doi: 10.1099/jgv.0.000756

Walker PJ, Firth C, Widen SG et al. Evolution of genome size and complexity in the rhabdoviridae. PLOS Pathog 2015; 11(2): e1004664 (25 str.)  
doi: 10.1371/journal.ppat.1004664

Weinstein Teixeira E, Chen Y, Message D, Pettis J, Evans JD. Virus infections in Brazilian honey bees. J Invertebr Pathol 2008; 99(1): 117–9. doi: 10.1016/j.jip.2008.03.014

White G F. Sacbrood, a disease of bees. Washington: US Department of agriculture, Bureau of entomology, 1913.

Yue C, Genersch E. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honey-bees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). J Gen Virol 2005; 86(12): 3419–24. doi: 10.1099/vir.0.81401-0

## 11 PRILOGE

### Priloga 1: Vzorci klinično obolelih čebeljih družin s krajem vzorčenja in opisom klinične slike.

Attachment 1: Samples of clinically affected honeybee colonies with sampling location and description of clinical signs.

Številka vzorca:	Kraj vzorčenja:	Vrsta vzorca:	Klinična slika:
1	Dolnja Lokoš	čebele mrtvice	Čebele nimajo zadosti zalege za ta čas.
2	Gaberje pri Dobovi	čebele mrtvice	V zadnjih treh dneh je bilo opaženo večje število mrtvic na podnicah.
3	Škofja Loka	čebele iz panja 14	Znaki obolele čebelje družine s spremenjeno čebeljo zalego.
4	Zagorje ob Savi	čebele mrtvice	Od 23 čebeljih družin je 18 čebeljih družin prizadetih z varojo.
5	Podčetrtek	čebele mrtvice	Čebele mrtvice iz 24 prizadetih čebeljih družin, pobrane izpred panjev, varoja prisotna.
6	Slovenske Konjice	čebele mrtvice	Mrtvice in žive čebele, odvzete iz 23 čebeljih družin, pred panji in čebelnjakom, varoja prisotna.
7	Medvode	čebele iz panja 1N	Propadlo je 13 čebeljih družin od 18, varoja prisotna.
8	Zagorje ob Savi	čebele mrtvice	15 prizadetih čebeljih družin, varoja prisotna.
9	Novo mesto	čebele mrtvice	Propadla čebelja družina.
10	Tržišče	čebele mrtvice	Odvzeto od 20 prizadetih čebeljih družin.
11	Lom pod Storžičem	žive čebele iz panjev 1–40	Od 40 čebeljih družin jih je propadlo 8.
12	Čadovlje, Trzič	čebele mrtvice iz panja št. SR	Po zatiranju varoje je propadlo vseh 14 čebeljih družin.
13	Dolenja vas, Selca	čebele mrtvice iz panja št. 2C	Ena čebelja družina od 12, čebele imajo zakrnela krila.
14	Braslovče	čebele mrtvice in žive čebele z naletne deske	Od 39 je propadlo 16 čebeljih družin v zadnjih 14 dneh.
15	Valburga, Medvode	čebele mrtvice iz panja propadle družine št. 24	Odmiranje čebeljih družin v oktobru in novembru.



Številka vzorca:	Kraj vzorčenja:	Vrsta vzorca:	Klinična slika:
16	Valburga, Medvode	žive čebele iz panjev št. 1, 2, 3, DB	Odmiranje čebeljih družin v oktobru in novembru.
17	Podljubelj, Tržič	čebele mrtvice iz panja št. 4	Od 11 čebeljih družin jih je do konca oktobra 2016 propadlo 9.
18	Podljubelj, Tržič	žive čebele iz panja št. 6	Od 11 čebeljih družin jih je do konca oktobra 2016 propadlo 9.
19	Dobrina, Loka pri Žusmu	čebele mrtvice	Čebelje družine so zelo oslabele.
20	Breg, Žirovnica	čebele iz panja št. 44	30 čebeljih družin od 49 je propadlo v začetku novembra.
21	Prekštan, Gornji Grad	čebele mrtvice	Odmrlo 9 do 14 čebeljih družin, varoja prisotna.
22	Večje brdo, Dobrje pri Planini	čebele mrtvice	Odmrlo 20 čebeljih družin, varoja prisotna.
23	Cundrovec, Brežice	čebele mrtvice	Odmrla čebelja družina, imela je veliko hrane.
24	Podšentjur, Litija	čebele mrtvice	Čebelarju je propadlo 500 čebeljih družin.
25	Žvabovo, Šentjernej	čebele mrtvice	Propadlo 5 čebeljih družin, opažene čebele s poškodovanimi krili.
26	Podkraj, Hrastnik	čebele mrtvice	3 odmrle čebelje družine od 11, prisotna varoja.
27	Šmartno v Tuhinju	čebele mrtvice	Čebele iz panja št. 11 in 12 so odmrle na satju in na podnici.
28	Cerklje	čebele mrtvice	Povečano število mrtvic.
29	Cerklje	čebele mrtvice	Povečano število mrtvic.
30	Radeče	čebele mrtvice	Čebelja družina je propadla v januarju ali februarju.
31	Vojnik	čebele mrtvice	Odmrlo 15 čebeljih družin.
32	Kojsko	čebele mrtvice	Odmrlo 26 čebeljih družin, v panjih je ostalo malo čebel.
33	Podčetrtek	čebele mrtvice	Odmrlo 10 čebeljih družin.
34	Stranska vas, Dobrova	čebele mrtvice	V zadnjem tednu opaža vsak dan čebelice, ki se nekoordinirano gibljejo pred panji (ima 52 panjev).
35	Zagorje	čebele mrtvice	Čebele pobrane pred panjem št. 3 in 6, sum varoje, čebele temne barve, brez dlačic, sum zastrupitve.

Številka vzorca:	Kraj vzorčenja:	Vrsta vzorca:	Klinična slika:
36	Vrhnika	čebele mrtvice	Povečano odmiranje čebel po zatiranju varoje.
37	Loče	mrtvice in zalega	Čebele odmirajo v zadnjih dneh (30 čebeljih družin), klinično opažena poškodovana krila in prisotnost varoje.
38	Senovo	čebele mrtvice	Veliko število mrtvih čebel na bradah panjev.
39	Reštanj	čebele mrtvice	Veliko število mrtvih čebel na bradah panjev, tudi brez kril.
40	Velike Lašče	čebele mrtvice	Vzorci, odvzeti iz 2 čebeljih družin, napadene z varojo.
41	Velike Lašče	čebele mrtvice	Vzorci odvzeti od 2 čebeljih družin, napadene z varojo.
42	Ig	čebele mrtvice	Skupni vzorec iz 12 čebeljih družin, mrtvice pred panjem.
43	Logatec	čebele mrtvice	18 čebeljih družin, skupni vzorec KRAS.
44	Logatec	čebele mrtvice	18 čebeljih družin, skupni vzorec ZAPLANA.
45	Krško	čebele mrtvice	Vzorec je bil odvzet iz 6 čebeljih družin, prisotnih veliko mrtvic.
46	Mirna Peč	čebele mrtvice	Vzorec odvzet iz 2 odmrlih čebeljih družin.
47	Zagorje ob Savi	čebele mrtvice	Mrtvice iz 3 čebeljih družin, zdravljene z amitrazom.
48	Vajdova ulica	čebele mrtvice	Mrtvice iz 1 propadle čebelje družine.
49	Vuzenica	čebele mrtvice	Mrtvice iz 6 propadlih čebeljih družin, naluknjana zalega.
50	Vuzenica	čebele mrtvice	Mrtvice iz 6 propadlih čebeljih družin.
51	Videm	čebele mrtvice	Na podnicah ogromno odmrlih čebel.
52	Škofljica	čebele mrtvice	Propadla ena čebelja družina.
53	Grosuplje	čebele mrtvice	Propadla ena čebelja družina.
54	Velenje	čebele mrtvice	Odmrla ena čebelja družina.
55	Hotanje, Ponikva	čebele mrtvice	Odmrle 3 čebelje družine preko zime.
56	Šmartno pri Litiji	čebele mrtvice	Klinično vidni znaki varoze, deformirana krila, zaostale čebele.
57	Šentrupert	čebele mrtvice	4 odmrla čebelje družine, v jeseni 2018 zelo napadene z varojami.
58	Laško	čebele mrtvice	4 odmrla čebelje družine, čebele mrtvice pred panji.
59	Šoštanj	čebele mrtvice	12 čebeljih družin, mrtvice pred panji.

Številka vzorca:	Kraj vzorčenja:	Vrsta vzorca:	Klinična slika:
60	Šmartno v Rožni dolini	čebele mrtvice	Čebele iz odmrle čebelje družine.
61	Murska Sobota	mrtvice	Čebele iz odmrle čebelje družine.
62	Tomišelj, Ig	mrtvice	Čebele iz odmrle čebelje družine.
63	Stahovica	mrtvice	Čebele iz odmrle čebelje družine.
64	Radovljica	mrtvice	Povečano število varoj, čebele propadle.
65	Strunjan, Piran	mrtvice	Izropanih (izginulih) 32 čebeljih družin.
66	Predjamska	mrtvice	Propadlo 10 čebeljih družin, sum bolezni.
67	Črnuče	mrtvice	Čebele so apatične, omotične, na bradi so čebele črne, brez dlačic.
68	Zg. Jakobski Dol, Pesnica	mrtvice	Čebelja družina peša že dva meseca, čebele odmirajo pred panjem.
69	Mengeš	mrtvice	Povečano število mrtvic pred žrelom, panjske čebele 1–4.
70	Mengeš	mrtvice	Povečano število mrtvic pred žrelom, pašne čebele 1–34.
71	Hrpelje, Kozina	mrtvice	Na satju in pred panjem so opazne črne čebele in čebele z živčnimi motnjami.
72	Jesenice	mrtvice	Čebele zapuščajo panje, ne morejo vzleteti, se plazijo po tleh pred čebelnjakom, se tresejo in preko noči umirajo zunaj.
73	Kočevje	mrtvice	Povečano odmiranje čebel pred čebelnjakom, mrtvice pred čebelnjakom imajo poškodovana krila.
74	Kočevje	mrtvice	Povečano odmiranje čebel pred čebelnjakom, mrtvice pred čebelnjakom imajo poškodovana krila, panj 51, poškodovane čebele.
75	Kočevje	mrtvice	Povečano odmiranje čebel pred čebelnjakom, mrtvice pred čebelnjakom imajo poškodovana krila.
76	Kočevje	pašne čebele na žrelih, odmrle	Povečano odmiranje čebel pred čebelnjakom, mrtvice pred čebelnjakom imajo poškodovana krila.
77	Kočevje	pašne čebele na žrelih	Povečano odmiranje čebel pred čebelnjakom, mrtvice pred čebelnjakom imajo poškodovana krila.

Številka vzorca:	Kraj vzorčenja:	Vrsta vzorca:	Klinična slika:
78	Zreče	čebele mrtvice	Čebele odvzete pred panji, iz 13 čebeljih družin.
79	Žalec	čebele mrtvice	Odrasle črne čebele.
80	Semič	čebele mrtvice	Pred panji je opaziti črnikaste čebele, ki lezejo.
81	Polzela	čebele mrtvice	Pred panjem pobrane čebele, sum zastrupitve.
82	Logatec	čebele mrtvice	Odvzeti vzorci pri spremenjenih črnih čebelah, sum kronične paralize, panj številka 3.
83	Logatec	čebele mrtvice	Odvzeti vzorci pri spremenjenih črnih čebelah, sum kronične paralize, panj številka 7.
84	Logatec	čebele mrtvice	Odvzeti vzorci pri spremenjenih črnih čebelah, sum kronične paralize, panj številka 8.
85	Pod gradom	čebele mrtvice	Odmrle čebelje družine, čebele izginjajo.
86	Tržišče	čebele mrtvice	Odmrle čebele na bradi, čebele so na hrbtu in se vrtijo.
87	Čezsoča, Bovec	čebele mrtvice	Večje število odmrlih čebel, do 5000 umrlih čebel.
88	Zreče	čebele mrtvice	Čebele so izginile, deformirane čebele.
89	Zreče	zalega	Čebele so izginile, čebelar je našel tudi deformirane čebele.