TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

CELVIA CC AS

Meeproovide metagenoomne analüüs mesilasperede RNA-viiruste seireks: uudse meetodi väljatöötamine

Bakalaureusetöö

12 EAP

Annaliisa Vask

Juhendaja PhD Kairi Raime

TARTU 2025

Infoleht

Meeproovide metagenoomne analüüs mesilasperede RNA-viiruste seireks: uudse meetodi väljatöötamine

Meemesilased (*Apis mellifera*) on olulised tolmeldajad, kuid nende populatsioonid on üha enam ohustatud patogeenide, nagu *Varroa destructor* ja *Nosema* spp., tõttu. Käesolevas uuringus töötati välja RNA-sekveneerimisel põhinevad meetodid mesilaste RNA-viiruste tuvastamiseks otse meest – see on mittesurev alternatiiv traditsioonilistele PCR-põhistele diagnostikameetoditele. Mesi peegeldab mesilaspere ja selle keskkonna geneetilist materjali, võimaldades tuvastada nii teadaolevaid kui ka harvaesinevaid viiruseid.

Uuring viidi läbi EIP-AGRI projekti raames ning tuvastati mitmeid mesilaste viiruseid, sealhulgas *Deformed Wing Virus*, *Chronic Bee Paralysis Virus*, *Black Queen Cell Virus* ja *Lake Sinai Virus 2*, millest osa jääb tavapärastes testides sageli märkamatuks. Väljatöötatud meetod pakub paljulubavat võimalust laiemaks, varasemaks ja mittesurevaks viirusseireks mesinduses.

Märksõnad: mee RNA, mesilaste RNA-viirused, metagenoomika, Illumina

CERCS: B110 — Bioinformaatika, meditsiiniinformaatika, biomatemaatika, biomeetrika; B230 — Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Metagenomic Analysis of Honey Samples for RNA Virus Surveillance in Honey Bee Colonies: Development of a Novel Method

Honey bees (*Apis mellifera*) are vital pollinators, but their populations are increasingly threatened by pathogens like *Varroa destructor* and *Nosema* spp. This study developed RNA sequencing-based methods to detect bee RNA viruses directly from honey. A non-invasive alternative to traditional PCR-based diagnostics. Honey reflects the genetic material of the colony and its environment, enabling the detection of both known and rare viruses.

Conducted within an EIP-AGRI project, the study identified several bee viruses, including *Deformed Wing Virus*, *Chronic Bee Paralysis Virus*, *Black Queen Cell Virus*, and *Lake Sinai Virus 2*, some of which are often missed by standard diagnostics. The method shows promise for broader, earlier, and non-destructive viral surveillance in beekeeping.

Keywords: honey RNA, bee RNA viruses, metagenomics, Illumina

CERCS: B110 — Bioinformatics, medical informatics, biomathematics, biometrics; B230 — Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

Infoleht 2
KASUTATUD LÜHENDID 5
SISSEJUHATUS 6
Töö viidi läbi Celvia CC AS ja Eesti mesinike (Muhe Mesi OÜ) vahelise EIP-AGRI töörühma koostööprojekti „Mee RNA analüüsi metoodika arendus mesilaste viiruste tuvastamiseks“ raames. Projekt on rahastatud PRIA meetmest 16.2 „Uute toodete, tavade, protsesside ja tehnoloogiate arendamise toetus”. Töö teostati asutuses Celvia CC AS.1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE 6
1.1. Mesilaste RNA-viirused: levik, mõju ja tõrje 7
1.1.1. Deformeerunud tiiva viirus A ja B (*Deformed Wing Virus A and B*) 7
1.1.2. Kroonilise paralüüsi viirus (*Chronic Bee Paralysis Virus*) 8
1.1.3. Ägeda paralüüsi viirus (*Acute Bee Paralysis Virus*) 8
1.1.4. Kotthaudme viirus (*Sacbrood Virus*) 9
1.1.5. Teised mesilaste RNA-viirused 9
1.1.6. Viiruste varajane avastamine, tõrje ning vältimine 10
1.2. Senised meetodid mesilaste RNA-viiruste tuvastamiseks Eestis ning mujal maailmas 10
1.2.1. *Real-time* RT-PCR ja *real-time* RT-qPCR kasutamine mesilaste viiruste tuvastamiseks 11
1.3. RNA eraldamine meest ja selle väljakutsed 12
1.4. RNA sekveneerimisandmete analüüs 13
1.4.1. K-meeride põhine lugemite klassifitseerimine Kraken 2 abil 13
1.4.2. Mee RNA ja DNA andmete erinevused 13
2. EKSPERIMENTAALOSA 14
2.1. Töö eesmärgid 14
2.2. Materjal ja metoodika 14
2.2.1. Proovide kogumine 14
2.2.2. RNA eraldus meeproovidest 15
2.2.3. Mee RNA raamatukogu valmistamine ja sekveneerimine 17
2.2.4. Andmete analüüs 17
2.3.Tulemused 19
2.3.1. Eralduse protokoll 19
2.3.2. Mee RNA üldine taksonoomiline koostis 20
2.3.3. Mee RNA-st tuvastatud viirused 22

2.4. Arutelu 25
KOKKUVÕTE 29
RESÜMEE / SUMMARY 31
KIRJANDUSE LOETELU 33
KASUTATUD VEEBIAADRESSID 39
LIHTLITSENTS 40

KASUTATUD LÜHENDID

ABPV: ägeda paralüüsi viirus (*Acute Bee Paralysis Virus*)

BQCV: musta emakupu viirus (*Black Queen Cell Virus)*

CBPV: kroonilise paralüüsi viirus (*Chronic Bee Paralysis Virus*)

DWV: deformeerunud tiiva viirus (*Deformed Wing Virus*)

LSV: Lake Sinai viirus (*Lake Sinai Virus*)

SBV: kotthaue (*Sacbrood Virus*)

SISSEJUHATUS

Meemesilased (*Apis mellifera*) on olulised tolmeldajad, kelle heaolu mõjutab otseselt toidutootmist ja elurikkust. Viimastel kümnenditel on mesilasperede suremus sagenenud, mida on toetanud varroalesta (*Varroa destructor*) ja *Nosema spp.* levik (Hristov et al., 2020). Täpne ja varajane viirusnakkuste tuvastamine on mesilasperede tervise säilitamise seisukohalt oluline. Traditsioonilised diagnostilised meetodid põhinevad üksikute viiruste tuvastamisel mesilastest PCR-põhiste meetodite abil, mis eeldab elusate mesilaste hukkamist ning analüüsimist.

Mesi kui proovimaterjal peegeldab hästi mesilaspere ja selle keskkonna bioloogilist koostist ning sisaldadab jälgi mesilaste, taimede, seente ja viiruste geneetilisest materjalist. Kogu proovimaterjalis sisalduva RNA analüüsimine võimaldab mesilaste RNA-viiruste, sealhulgas seni dokumenteerimata või harvaesinevate viiruste, laiemat avastamist ja seiret.

Käesoleva töö põhieesmärk oli välja töötada uudsed mee RNA sekveneerimise põhised meetodid mesilaste RNA-viiruste tuvastamiseks meest. Samuti tulemuste põhjal hinnata meetodi võimekust mee üldise RNA-profiili loomisel, uute mesilaste RNA-viiruste tuvastamisel meeproovidest ja selle edasist rakendatavust mesilaste RNA-viiruste seireks. Lisaks võrrelda mee RNA analüüsi tulemusi Eesti mesilaste alamliikide RNA-viiruste pilootuuringu käigus samadest tarudest kogutud ja analüüsitud mesilaste PCR-põhise viiruste analüüsi tulemustega.

Töö viidi läbi Celvia CC AS ja Eesti mesinike (Muhe Mesi OÜ) vahelise EIP-AGRI töörühma koostööprojekti „Mee RNA analüüsi metoodika arendus mesilaste viiruste tuvastamiseks“ raames. Projekt on rahastatud PRIA meetmest 16.2 „Uute toodete, tavade, protsesside ja tehnoloogiate arendamise toetus”. Töö teostati asutuses Celvia CC AS.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Mesi sisaldab erinevatest allikatest pärinevaid nukleiinhappeid, sealhulgas RNA-d, mis võivad pärineda mesilaste enda sekreetidest, õietolmust ja nektarist, mikroobidest ja patogeenidest ning keskkonnas leiduvatest osakestest (Bovo et al., 2018; Gismondi et al., 2017). Kuna mesi on hüperosmoosne, happeline ning ensüümiderikas keskkond, siis RNA laguneb seal suhteliselt kiirelt (Schittny et al., 2020). Seega on suur osa mees leiduvatest viirusosakestest fragmenteerunud mittetäielikud viirusosakesed, mis ei ole nakkusvõimelised. Värskest või õigesti säilitatud meest on siiski võimalik RNA, sealhulgas viirusliku RNA, jälgi leida (Gonzalez et al., 2024).

1.1. Mesilaste RNA-viirused: levik, mõju ja tõrje

Mesilaste RNA-viirused on üks olulisemaid patogeenide gruppe mesinduses. Need põhjustavad nii ägedaid kui kroonilisi infektsioone, mille mõju varieerub vastavalt mesilaste tõule, pere tugevusele, ilmastikuoludele, teiste patogeenide esinemisele ning leviku ennetuse meetoditele (Y. P. Chen & Siede, 2007). Need infektsioonid kahjustavad mesilaste tervist ning võivad viia terve mesilaspere hukkumiseni. (Šimenc et al., 2021) Enamlevinud RNA-viirused, mida ka Eestis tuvastatakse on deformeerunud tiiva viirused A ja B (DWV A ja B), kroonilise paralüüsi viirus (CBPV), ägeda paralüüsi viirus (ABPV) ja kotthauet põhjustav viirus (SBV) (*Mesilaste viirushaiguste uuringud*, 2025). Mitmete viiruste levik on otseselt seotud varroalesta (*Varroa destructor*) ja *Nosema* levikuga (Matusiewicz et al., 2016).

1.1.1. Deformeerunud tiiva viirus A ja B (*Deformed Wing Virus A and B*)

DWV on kõige levinum ja enim uuritud mesilaste RNA-viirus. See kuulub *Iflavirus* perekonda. DWV esineb enamasti kahes genotüübis: tüüp A ja B. Mõlemad genotüübid võivad mesilasperes esineda koos või eraldi. Mõlema tüübi mõju oleneb mesilaspere tervisest ning eelkõige varroalesta kui viiruse kandja esinemisest. (De Miranda & Genersch, 2010; Lanzi et al., 2006)

DWV infektsioon võib esineda asümptomaatiliselt, kuid varroalestaga koosmõjul põhjustab see sageli iseloomulikke sümptomeid, milleks on deformeerunud tiivad, kängunud keha ning lühenenud eluiga (Brettell et al., 2017; De Miranda & Genersch, 2010). Lennuvõime kaotanud

mesilaste tõttu väheneb pere töövõime. Viirus levib kõige enam varroalesta hammustuse kaudu, mis viib viiruse otse mesilase hemolümfi. See võib ka levida transovariaalselt ehk emalt järglasele ja otsese kontakti või toidu kaudu (De Miranda & Genersch, 2010).

DWV on levinud üle maailma ning sellega kaasneb tihti mesilaspere kollaps (*Colony Collapse Disorder*, CCD) (Brettell et al., 2017). DW viirust võib leida ka looduslikes tolmeldajates nagu näiteks kimalastes ning näitab ristnakatumise võimalust (Genersch et al., 2006). Levik suureneb tavaliselt hilissuvel ja sügisel varroalesta leviku suurenemisega (Brettell et al., 2017; De Miranda & Genersch, 2010; Lanzi et al., 2006).

1.1.2. Kroonilise paralüüsi viirus (*Chronic Bee Paralysis Virus*)

CBPV klassifikatsioon on teiste mesilaste RNA-viirustega võrreldes ebaselgem. CBPV kuulub viirusriiki *Riboviria*, kuid see ei ole praegu kindlasse sugukonda või perekonda paigutatud. (Dittes et al., 2020; Ribière et al., 2010)

Viirus põhjustab kaht põhilist sümptomivormi. Esimeseks on tüüp 1, mida iseloomustab paisunud kõht, värisevad tiivad ning lennuvõimetus. Lennuvõimetusega kaasneb mesilaste kogunemine taru avause ette. Teist tüüpi iseloomustab mesilaste liikumatuks muutumine, värisemine ning taru ees suremine. Sageli kaasneb ka karvade kaotus, mis muudab mesilased läikivaks ning musta värvi. (Dittes et al., 2020; Šimenc et al., 2021)

CBPV levib peamiselt otsekontakti läbi või väljaheitega saastund toidu kaudu. CBPV levik ei ole otseselt seotud varroalesta levikuga, kuid see võib areneda varroalestast tingitud stressi tagajärjel. Samuti taru liigse populatsioonitiheduse tingimustes. Viiruse puhangust tingituna väheneb pere töövõime hukkunud mesilaste tõttu märkimisväärselt. Enamasti esineb viirus kevadel ja varasuvel, kui mesilaspered on aktiivses arengufaasis ja keskkonnatingimused muutlikud. (Rowland, 2023; Sarwar, 2016)

1.1.3. Ägeda paralüüsi viirus (*Acute Bee Paralysis Virus*)

ABPV kuulub *Dicistroviridae* sugukonda *Aparavirus* perekonda. ABPV põhjustab ägeda ja tihti surmaga lõppeva infektsiooni, mis võib kulgeda asümptomaatiliselt ning mesinikule märkamatuks jääda. Uue stressori lisandumisel (nt varroalest) toimub 1-2 päeva jooksul mesilaste massiline hukkumine. Peamisteks sümptomiteks on halvatus, värisemine ja mesilaste massiline hukkumine tarus või selle ees. (De Miranda et al., 2010)

ABPV levib peamiselt varroalesta hammustuse kaudu ja ka otsekontakti või toidu kaudu. Infektsioonid esinevad kõige sagedamini sügisel, mil mesilaspered on nõrgenenud ning varroalestade arv kõrge. ABPV epideemiad võivad kiiresti hävitada terve mesilaspere, eriti juhul, kui puudub tõhus parasiiditõrje ja toetav hooldus. (Oz et al., 2025; Rodríguez-Flores et al., 2022)

1.1.4. Kotthaudme viirus (*Sacbrood Virus*)

Kotthaudme viirus kuulub *Iflavirus* perekonda ning oli esimene mesilastel diagnoositud viirus (Y. P. Chen & Siede, 2007; United States. et al., 1913). Viirus nakatab peamiselt mesilasvastseid, kuid võib esineda ka täiskasvanud mesilastes asümptomaatiliselt (Li et al., 2019; Wei et al., 2022).

SBV kõige iseloomulikumaks sümptomiks on vastse muutumine venivaks, läbipaistvaks kotitaoliseks massiks, mis hiljem kuivab koorikuks ehk “kotthaudmeks”, sellest tuleneb ka viiruse poolt põhjustatava haiguse nimi kotthaue (Wei et al., 2022). SBV infektsioon võib püsida mesilasperes aasta ringi, kuid haiguse intensiivsem levik esineb kevadel ja suvel, kui haudme areng on aktiivsem ning mesilaspered on suurema füsioloogilise koormuse all. Erinevalt DWV-st ei ole SBV levik otseselt seotud varroalestaga, kuid koosmõju teiste patogeenidega, näiteks *Nosema spp*. või viiruskoormuse üldine suurenemine, võib haiguse kulgu süvendada (Ma, 2014; Šimenc et al., 2021).

1.1.5. Teised mesilaste RNA-viirused

Musta emakupu viirus (*Black Queen Cell Virus,* BQCV) kuulub *Dicistroviridae* perekonda ning levib koos *Nosema spp.* infektsioonidega. BQCV nakatab peamiselt mesilasema vastseid, põhjustades nende tumenemist ja hukkumist, millest tuleneb ka viiruse nimetus. Täiskasvanud töömesilased võivad viirust asümptomaatiliselt edasi kanda ning nakatumine toimub läbi toidu, väljaheite ning eritiste. BQCV ei põhjusta üldiselt perede surma, kuid võib mõjutada mesilasema vahetust. (Spurny et al., 2017)

Lake Sinai viirus (LSV) on Ameerika Ühendriikides aastatel 2007–2008 avastatud viirus, mis kuulub perekonda *Sinaivirus*. Kuigi LSV täpne patogeensus pole veel täielikult selge, on uuringud näidanud, et selle esinemissagedus võib olla seotud mesilaspere üldise tervisliku seisundiga ning ulatusliku mesilasperede hukkumisega. LSV ei põhjusta alati selgelt eristatavaid sümptomeid ning võib peres esineda varjatult, kuid selle viiruse rohkus võib vähendada perede vastupanuvõimet teistele stressoritele, mõjutades kaudselt mesilaspere elujõulisust. (Daughenbaugh et al., 2015)

1.1.6. Viiruste varajane avastamine, tõrje ning vältimine

Viirusinfektsioone on võimalik enne sümptomite esinemist tuvastada molekulaarsete diagnostikameetoditega. Pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon (RT-PCR) ja selle kvantitatiivne versioon (RT-qPCR) on standardmeetodid viiruste RNA tuvastamiseks mesilastel. Need võimaldavad määrata nii viiruse olemasolu kui CT (*cycle treshold*) väärtust, mis aitab hinnata infektsiooni raskusastet. (Dittes et al., 2020; Gauthier et al., 2007)

Peale sümptomite esinemist on võimalik haigustunnuseid visuaalselt hinnata, kuid need ilmnevad alles hilises staadiumis ning paljud ei ole tihti viirusespetsiifilised (de Miranda, 2008).

Praegune viirusetõrje keskendub eelkõige leviku piiramisele ning mesilaste üldise immuunvastuse toetamisele. DWV ja ABPV puhul keskendutakse varroalesta tõrjele (Matusiewicz et al., 2016). Varroalesta levinumateks tõrjemeetoditeks on haudme eemaldamine, oblikhappe ja sipelghappe kasutamine, suhkrutolmu puistamine ning alkoholipesu (Singh et al., 2015).

Samuti on oluline *Nosema* spp. kontroll, milleks kasutatakse regulaarseid hügieenimeetmeid ja vajadusel fungitsiidseid aineid (Formato et al., 2022). Mesinduspraktikad, milleks on mesilasema regulaarne vahetamine terve noore ema vastu, haigete perede isoleerimine, tarude asetus ja ventilatsioon. Samuti mesiniku käitumine tarudega tegelemisel. Mõned tõud on osadele haigustele vastupidavamad ning ka geneetiliselt mitmekesised pered on näidanud suuremat vastupidavust. (Lannutti et al., 2022)

1.2. Senised meetodid mesilaste RNA-viiruste tuvastamiseks Eestis ning mujal maailmas

Mesilaste RNA-viiruste tuvastamine eeldab tavapäraselt proovimaterjalina elusate mesilaste või haudme kasutamist, kuna viiruslik RNA paikneb peamiselt mesilaste kudedes ja hemolümfis, kus selle kontsentratsioon on täpseks molekulaarseks analüüsiks piisavalt kõrge (Y. P. Chen & Siede, 2007). Rahvusvaheliselt on mesilaste testimine erinevate haigustekitajate, sealhulgas viiruste, bakterite ja parasiitide tuvastamiseks regulaarsem ja ulatuslikum kui Eestis (Mutinelli, 2011). Paljudes riikides, näiteks Saksamaal, Ameerika Ühendriikides ja Suurbritannias, on mesilasperede laboratoorne testimine osaks riiklikest programmidest ning see on kas täielikult või osaliselt riigi poolt toetatud (*National Honey Monitoring Scheme*, 2025; *Viruses : USDA ARS*, 2025; *WOAH and*

NRLs for Bee Diseases, 2025). Regulaarsete rutiintestide abil on võimalik haigustekitajad avastada varases staadiumis, vähendades seeläbi epideemiate ja mesilasperete suremise riski (De Miranda & Genersch, 2010). Eestis toimub testimine mesiniku enda soovil ning sõltub tema enda teadlikkusest ja rahalistest võimalustest (*Mesilaste viirushaiguste uuringud*, 2025).

Mitmetes riikides on välja töötatud ka testipaketid, mis võimaldavad korraga tuvastada mitut viirust, nagu DWV, ABPV ja CBPV. Eestis on võimalik paketina koos testida DWV, ABPV ja CBPV esinemist. (*Honey Bee Testing*, 2025; *Mesilaste viirushaiguste uuringud*, 2025)

Eestis teostatakse mesilaste RNA-viiruste testimist Riigi Laboriuuringute ja Riskihindamise Keskuses (LABRIS). Testitakse DWV A+B, CBPV, ABPV esinemist ning CBPV hinnatakse ka lisaks kvantitatiivselt. LABRIS teostab analüüse ka varroalesta ning *Nosema spp.* tuvastamiseks. Viiruste tuvastamiseks kasutatakse reaalaja RT-PCR ning reaalaja RT-qPCR. Varroalestade arvuliseks määramiseks viiakse läbi mesilaste eeltöötlus loputusmeetodil ja makroskoopiline uuring. Seejärel tüüpilise morfoloogiaga lestade loendamine. *Nosema spp*. tuvastatakse eoste arvulise määramise kaudu. (*Mesilaste viirushaiguste uuringud*, 2025)

Praegu ei pakuta Eestis analüüsi kotthaudme (*Sacbrood*) viiruse tuvastamiseks. Seda on võimalik tellida näiteks Saksamaal asuvast laborist Laboklin, kus viiruse tuvastamiseks kasutatakse PCR-põhist metoodikat. (*Sacbrood Virus*, 2025)

1.2.1. *Real-time* RT-PCR ja *real-time* RT-qPCR kasutamine mesilaste viiruste tuvastamiseks

Reaalaja pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon (*real-time* RT-PCR) on molekulaarbioloogiline meetod, millega tuvastatakse spetsiifilist viiruslikku RNA-d proovis. Meetod koosneb kahest etapist: esmalt sünteesitakse viiruslikust RNA-st pöördtranskriptaasi abil cDNA ehk komplementaarne DNA, seejärel amplifitseeritakse seda PCR-iga. Reaalaja reaktsioon tähendab, et amplifikatsiooni jälgitakse fluorestsentssignaali abil igas tsüklis, võimaldades tuvastada viiruse olemasolu ka madalates kontsentratsioonides. Seda meetodit LABRIS ägeda paralüüsi viiruse (ABPV) ja deformeerunud tiibade viiruse (DWV) esinemise kontrollimiseks. (*Mesilaste viirushaiguste uuringud*, 2025; Simeunović et al., 2014)

Reaalaja kvantitatiivne pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon (real-time RT-qPCR) on edasiarendus tavalisest RT-PCR meetodist. See võimaldab lisaks viiruse olemasolu tuvastamisele

ka selle kogust kvantitatiivselt hinnata. Fluorestsentssignaal mõõdetakse igas tsüklis ning saadud Ct (*cycle threshold*) väärtus võimaldab hinnata viiruskoormust proovis. Meetod võetakse kasutusele siis, kui soovitakse võrrelda viiruslike RNA-de hulka erinevates proovides või jälgida infektsiooni dünaamikat. Seda meetodit kasutab LABRIS kroonilise paralüüsi viiruse (CBPV) kvantitatiivseks tuvastamiseks. (*Mesilaste viirushaiguste uuringud*, 2025; Schurr et al., 2019; Šimenc et al., 2021)

1.3. RNA eraldamine meest ja selle väljakutsed

Aastatel 2020 kuni 2023 Tervisetehnoloogiate Arenduskeskuse (Celvia CC AS) ja Eesti mesinike (Muhe Mesi OÜ) koostöös viidi läbi mee DNA analüüsi projekt, mille käigus töötati muuhulgas välja innovaatilised DNA metagenoomi analüüsil põhinevad metoodikad mesilastega seotud patogeenide ja parasiitide tuvastamiseks. DNA analüüs tuvastab muuhulgas DNA-viiruseid, kuid enamik mesilasega seotud olulisi viiruseid on RNA-viirused, mida DNA-analüüsiga ei näe. Lisaks DNA-le sisaldab mesi ka erinevatest mesilase või meega kokku puutunud elusorganismidest pärinevat RNA-d. (Paluoja et al., 2024)

RNA eraldamine meest on DNA eraldamisega võrreldes tunduvalt keerulisem. RNA molekul on oma üheahelalise struktuuri tõttu tunduvalt ebastabiilsem, mis muudab selle tundlikuks nii ensümaatilise kui ka keemilise lagunemise suhtes (Schittny et al., 2020). Mesi on kõrge suhkrusisalduse, happelise pH ja ensüümirikka koostisega toiduaine, mis ei paku RNA molekulile stabiilset keskkonda. Selle tulemusel võib mees leiduv RNA juba enne laborisse jõudmist osaliselt degradeerunud olla. DNA seevastu on kaheahelaline ja keemiliselt stabiilsem ning säilib seetõttu mees paremini (Mohamadzade Namin et al., 2023).

Veel sisaldab mesi inhibiitoreid nagu fenoolühendid, pigmendid ja polüsahhariidid, mis võivad takistada edasisi reaktsioone (Ciucure & Geană, 2019). Kuigi neid ühendeid võib esineda ka DNA eraldusel, on RNA puhul nende mõju suurem. Degradatsioon või ensümaatiline saaste võib viia RNA täieliku lagunemiseni. Lisaks peab RNA eralduse ajal kasutama ka RNaaside inhibiitoreid, kuna need võivad isegi väikestes kogustes RNA täielikult hävitada. Lisaks vajab RNA oma ebastabiilsuse tõttu kiiret eraldust ning kohest säilitamist sobivates tingimustes -80˚C juures (Y. Chen et al., 2007).

1.4. RNA sekveneerimisandmete analüüs

1.4.1. K-meeride põhine lugemite klassifitseerimine Kraken 2 abil

Kraken 2 on k-meeride põhine tööriist. See loob sisendjärjestustest kindla pikkusega k-meeride nimekirja ning määrab nende abil järjestuste taksonoomilise kuuluvuse. Kraken 2 kasutab eelnevalt ehitatud ja indekseeritud andmebaasi ning on seetõttu võimeline suuri andmestikke kiiresti töötlema. Tänu sellele sobib Kraken 2 hästi esmaseks laiaulatuslikuks taksonoomiliseks analüüsiks. Madala kattuvuse või mittetäieliku andmebaasi korral võib tuvastatud taksonoomia olla ebatäpne või puudulik. Kraken 2 tüüpiliseks töövooks on järjestusfaili (FASTQ) sisestamine ja eelnevalt loodud andmebaasi abil järjestuste klassifitseerimine. (Wood et al., 2019)

Kraken 2 tulemused ehk analüüsitava proovi sekveneerimislugemite taksonoomiline koostis väljastatakse *Kraken report* faili ning tulemuste visualiseerimiseks saab kasutada programme Krona või Pavian (Breitwieser & Salzberg, 2020; Ondov et al., 2011).

1.4.2. Mee RNA ja DNA andmete erinevused

RNA on üheahealine ning viiruslik RNA on lisaks ka mutatsioonitundlik (Fitzpatrick et al., 2021).

Sellest tulenevalt võivad RNA-viiruste järjestused olla väga varieeruvad, mis teeb nende täpse joondamise referentsandmetega keeruliseks. RNA analüüs vajab cDNA sünteesi ning sageli ka ribosomaalse RNA (rRNA) eemaldamist, et suurendada sihtjärjestuste osakaal. Võrreldes DNA-viiruste või bakteritega sisaldavad RNA-viirused tihti rohkem taustamüra ehk mittespetsiifilisi või katkestatud järjestusi, mis muudab nende identifitseerimise keerulisemaks. RNA-seq andmetes võib viirusjärjestusi olla väga vähe ning neid kõiki ei ole alati võimalik tuvastada. (Shi et al., 2021)

Eeldatavasti on proovidest saadud RNA-viiruste järjestused lühikesed ning fragmenteerunud. Tulemused sisaldavad kindlasti peremeesorganismi (*Apis mellifera*) ja taimedega seotud RNA-d. Vähese viiruste järjestuste arvu ning suure fragmenteerumise puhul on keerulisem neid taustamürast eristada ning seetõttu on viiruste oodatav osakaal proovides väike.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesolev töö viidi läbi PRIA meetmetest 16.2 rahastatud projekti „Mee RNA analüüsi metoodika arendus mesilaste viiruste tuvastamiseks“ (akronüüm Mee RNA analüüs) raames. Selle eesmärk on esiteks välja töötada parimaid tulemusi andev protokoll meest RNA eraldamiseks. Teiseks eesmärgiks on välja töötada uudne RNA sekveneerimise põhine metoodika, mille abil saab meest eraldatud RNA abil tuvastada samaaegselt mitmete erinevate oluliste mesilastega seotud RNA-viiruste olemasolu. Uut metoodikat saab tulevikus rakendada kommertsiaalsete testide väljatöötamiseks, et tuvastada erinevaid maailmas levinud mesilaste RNA-viiruseid mee analüüsi abil.

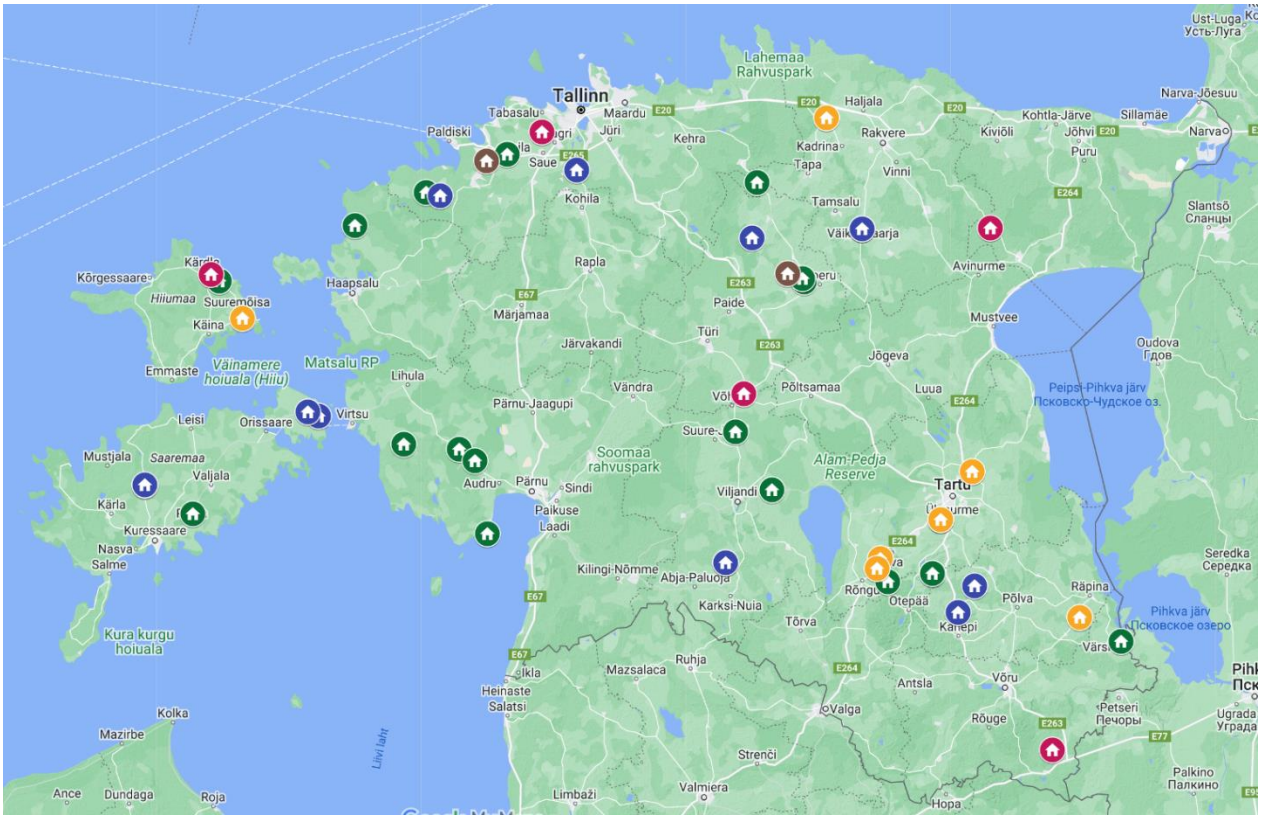
2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Proovide kogumine

Töös analüüsitud meeproovid on kogutud 2024. aasta mais ja juunis Mesinduskogu poolt tellitud Eesti mesilaste alamliikide RNA-viiruste pilootuuringu käigus.

Proovid pärinevad 46 viirusnakkusega või -kahtlusega mesilasperest üle Eesti, mis on välja toodud joonisel 1. Proovid kogusid uuringus osalevad mesinikud ise või koos usaldusmesinikuga neile saadetud juhendi järgi. Mesinikud kogusid igast uuringus osalenud mesilasperest nii vähemalt 50 grammi elusaid mesilasi kui ka vähemalt 100 grammi samast tarust pärinevat mett. Mesilasi kogudes välditi haudme ümbrust, et analüüsimiseks saada vanemaid lennumesilasi. Meeproov koguti kas tarust kärjekaapena (kärgedelt kraabitud kärjemesi) või ainult viirusnakkusega/-kahtlusega tarust vurritatud või pressitud meest. Proovide kohta täideti infoleht ning saadeti koos proovidega Celvia CC laborisse. Pilootuuringu käigus kirjeldati kogutud mesilastel viie olulisema mesilaste RNA-viiruse ning nende võimalike kandjate esinemist. Vastavalt proovimaterjali kogusele uuriti deformeerunud tiibade viiruse A+B (DWV A+B), kroonilise paralüüsi viiruse (CBPV), ägeda paralüüsi viiruse (ABPV) ja *Sacbrood* viiruse (SBV) esinemist. Lisaks teostati varroalesta (*Varroa destructor*) arvuline määramine ning *Nosema* liikide (*Nosema apis* ja *Nosema ceranae*)

tuvastus. Viiruste analüüsid mesilaste proovidel teostati LABRIS, LABOKLIN ja Eesti Maaülikooli (EMÜ) laborites.



Joonis 1. Proovide kogumiseks kasutatud tarude asukoht. Erinevad värvid tähistavad mesilaste alamliiki/rassi proovi andnud tarus (pruun - euroopa tumemesilane A. m. mellifera, punane – kraini mesilane A. m carnica, kollane – itaalia mesilane A. m. ligustica, sinine – Buckfasti mesilane, roheline – täpselt teadmata päritoluga mesilased ja hübriidid) (Raime, 2024). Allikas: Eesti mesilaste alamliikide RNA viiruste pilootuuring

2.2.2. RNA eraldus meeproovidest

Meeproovide eeltöötluseks asetati analüüsitavad proovid kuumakappi 40˚C juurde ning soojendati neid seal üleöö. Seejärel segati proovianumas olev meeproovi puhta ja autoklaavitud metall-lusikaga ühtlaseks. Uuritavat mett mõõdeti 50 ml tuubi 20-25 ml ning lisati sellele 40˚C eelsoojendatud MilliQ vett, kuni tuubi 50 ml nivooni. Mee ja vee seguga tuube raputati 40℃ juures plaat-raputis, kuni kogu mesi oli vees täielikult lahustunud. Seejärel tsentrifuugiti proove 3220×g juures 10 minutit. Tsentrifuugimise järgselt valati supernatant (vedelik) kraanikaussi.Järelejäänud sadet kasutati järgnevalt RNA eraldamiseks.

RNA eraldamiseks parima protokolli leidmiseks valiti kirjanduse põhjal esialgu välja neli erinevat reagentide komplekti ja tootja poolt kirjeldatud protokolli:

1. *Macherey-Nagel (MN) Genomic DNA Food kit*, mis sobib nii DNA kui ka RNA eraldamiseks toiduainetest. See on andnud väga häid tulemusi DNA eraldamisel meest (Paluoja et al., 2024). RNA eraldamiseks oli vaja kasutada spetsiifilist sidumispuhvrit.

2. *E.Z.N.A Plant RNA kit*, mida on kasutatud taimse RNA eraldamiseks. Tootja väited olid julgustavad, et kasutada protokolli ka teiste organismirühmade, sh toidu RNA eraldamisel.

3. *Direct-zol RNA MiniPrep kit (Zymo Research),* mille kohta on avaldatud töid, kus on protokolli edukalt kasutatud erinevate organismide (taimed, selgrootud, bakterid, viirused) miRNA eraldamiseks (Hunter & Wintermantel, 2021).

4. *MagMAX mirVana total RNA isolation kit (Termo Fisher Scientific)* on tootja poolt suunatud RNA eraldamiseks erinevatest organismidest.

Sobivaima protokolli valikul on oluline, et see oleks mugav ja kiire ka teenuslaboris ja rutiinis kasutamiseks ning annaks sekveneerimiseks piisava kvaliteediga RNA. Viimane protokoll jäi võrdlusest ja optimeerimisest välja, kuna selgus, et tootja lahendus põhines paramagnet kerade puhastusel ning töö võrreldavuse huvides seda protokolli ei kaasatud. Kolme erineva komplekti võrdlemiseks kasutati kahte erinevat meeproovi.

Protokollides tehtud muudatused olid järgmised (muus osas jälgiti tootja protokolli):

1. *MN Genomic DNA Food kit*

RNA eraldamiseks modifitseeriti protokolli ning pelletile lisati CF puhvri asemel RA1 puhvrit ja proteinaas K ensüümi. Protokolli muudatus ja optimeerimine kooskõlastati tootjaga. Enne proteinaas K ensüümi lisamist kasutati proovide mehaaniliseks homogeniseerimiseks *tissue ruptor* homogeniseerijat. Lüüsi käigus kasutati DNase ensüümi et vabaneda võimalikust DNA saastusest. RNA eraldamine viidi läbi kolonn-lahendusega.

2. *Direct-Zol RNA miniprep*

Pelletile lisati TRI reagenti, etanooli ning lahuse kanti kolonnile. Lüüsi käigus kasutati samuti ensüümi DNase, et vabaneda võimalikust DNA saastusest. RNA eraldamiseks kasutati kolonn-lahendust.

3. *EZNA Plant RNA kit*

Pelletile lisati lüüsipuhver ning eraldus tehti läbi homogeniseerimise kolonni. Lüüsi käigus kasutati samuti DNase ensüümi, et vabaneda võimalikust DNA saastusest. RNA eraldamine viidi taaskord läbi kolonn-lahendusega.

Kõik elueerimised viidi läbi 50µl RNase/DNase vaba veega.

2.2.3. Mee RNA raamatukogu valmistamine ja sekveneerimine

RNA-raamatukogu ettevalmistamiseks kasutati *NEXTFLEX® Small RNA Sequencing Kit V4* protokolli koos *No size selection* lisaprotokolliga. See sobib erinevat tüüpi proovimaterjalidest raamatukogude valmistamiseks, kasutades sisendmaterjalina minimaalselt 1 ng kogu RNA-d. Enne protokolli juurde asumist denatureeriti RNA proovid sekundaarstruktuuride lagundamiseks 80°C juures kaks minutit ning seejärel asetati proovid kaheks minutiks jääle. Protokolli käigus teostati PCR amplifikatsioon 30 tsükliga, et tagada piisav raamatukogu amplifitseerimine ka madalama sisendmaterjali korral. Pärast PCR-i valmistati raamatukogu ning puhastati saadud produkt üleliigsetest praimeritest ja ensüümijääkidest kasutades *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit*-i (Macherey-Nagel). Raamatukogu kvaliteeti ja suurusjaotust kontrolliti TapeStation High Sensitivity ScreenTape süsteemiga (Agilent) ning lahjendati kontsentratsioonini 1 nM. Sekveneerimine viidi läbi *Illumina NextSeq™ 1000* platvormil, kasutades *NEXTFLEX® Small RNA Sequencing Kit V4* protokollis soovitatud seadeid.

2.2.4. Andmete analüüs

Sekveneerimisandmete analüüsi haldati Nextflow-ga ning see viidi läbi kasutades Tartu Ülikooli kõrgjõudlusega andmetöötluse (HPC) arvutusressursse (Di Tommaso et al., 2017). Lugemite kvaliteeti hinnati tööriistaga SeqKit stats ning seejärel analüüsiti andmestikku taksonoomilise koosseisu määramiseks (Shen et al., 2024). FASTQ-failidele täiendavat eeltöötlust ei rakendanud.

Meeproovide järjestuslugemite taksonoomiliseks klassifitseerimiseks kasutati tööriista Kraken 2 koos Celvia CC poolt kohandatud referentsandmebaasiga. Referentsandmebaas on koostatud kolme andmebaasi põhjal*: NCBI nucleotide (nt) collection*, *the One Thousand Plants Project* (1KP) ja *the NCBI Sequence Read Archive* (SRA)15–17. Selle loomisel keskenduti muuhulgas liikidele, mis on seotud meega või mida on varem meeproovidest tuvastatud.

Klassifitseerimise miinimumtingimuseks on määratud vähemalt kolm tabamust (minimum hit groups) ning CT (confidence threshold) on seatud väärtusele 0,5.

Üksikute proovide visuaalseks analüüsiks kasutati Krona visualiseerimistööriista, mis pakub interaktiivset taksonoomiliste tasemete ülevaadet (Breitwieser & Salzberg, 2020). Krona graafikute loomiseks määrati minimaalsete lugemite arvuks 10, et välistada üksikute juhuslike järjestuste tekitatud müra ning keskenduda ainult usaldusväärsematele määrangutele. Üldise ülevaate saamiseks kõigist proovidest kasutati Pavian tööriista, mille abil saab võrrelda taksonoomilisi koosseise proovide lõikes ning visualiseerida suuremahulisi Kraken 2 tulemusi koondvaates (tabel ja *heatmap*) (Ondov et al., 2011). Tulemuste analüüsiks kasutati kõikides proovides klassifitseeritud lugemite koondandmeid.

2.3.Tulemused

2.3.1. Eralduse protokoll

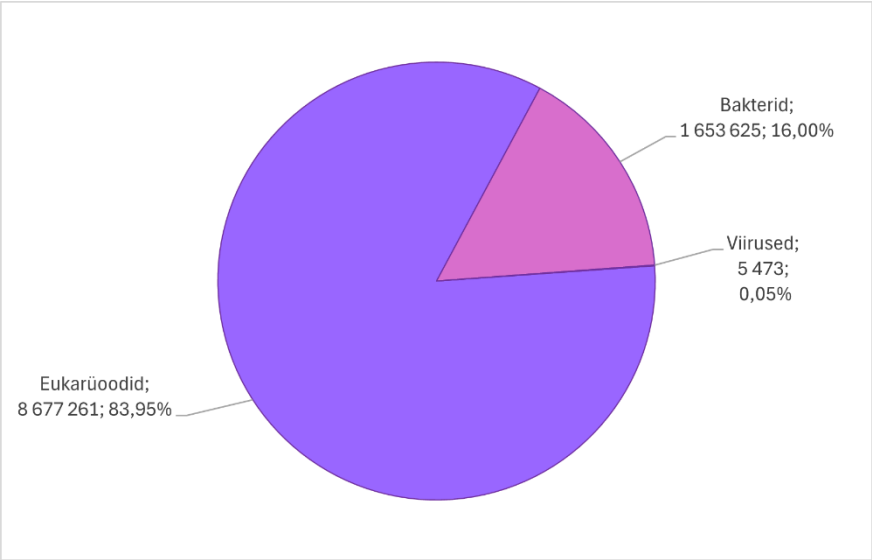
Proovidest RNA eralduseks katsetati kolme erinevat protokolli, mille eesmärk oli leida meetod, mis annaks parima RNA kontsentratsiooni ja puhtuse. Võrdluses hinnati tulemusi Nanodrop spektrofotomeetria abil, jälgides RNA kontsentratsiooni ning 260/280 ja 260/230 suhteid. Lisaks hinnati RNA kvaliteeti ScreenTape-ga. Katsetatud meetodite seas andis parima tulemuse *MN Genomic DNA Food kit*, mille tulemused on välja toodud tabelis 1. Nende proovide RNA kontsentratsioonid olid kõige kõrgemad (54 ng/µl ja 55 ng/µl), mis teiste proovidega võrreldes näitab parimat eralduse tulemust. Samuti olid nendel proovidel väga head 260/280 suhte väärtused (2,06 ja 2,07), mis näitab proovi vähest valgukontaminatsiooni. Lisaks oli ka 260/230 suhe (1,9 ja 1,89) kõrgem kui teistel proovidel, mis viitab madalamale orgaaniliste ühendite või soolade jääkide hulgale.

Tabel 1. RNA eralduseks meeproovidest kasutati kolme erinevat protokolli: *MN Genomic DNA Food kit* (proovid MN1 ja MN2), *Direct-Zol RNA miniprep* (proovid D-Z1 ja D-Z2) ja *EZNA Plant RNA kit* (proovid EZNA1 ja EZNA2). Tabelis on välja toodud eraldatud RNA kontsentratsioon ning puhtus. Tulemused mõõdeti NanoDrop spektrofotomeetriga.

	Kontsentratsioon (ng/µl)	260/280	260/230
MN1	54	2,06	1,9
MN2	55	2,07	1,89
D-Z1	3,3	1,86	1,25
D-Z2	5,7	1,43	0,91
EZNA1	10,5	1,97	1,25
EZNA2	12,2	2,05	1,52

2.3.2. Mee RNA üldine taksonoomiline koostis

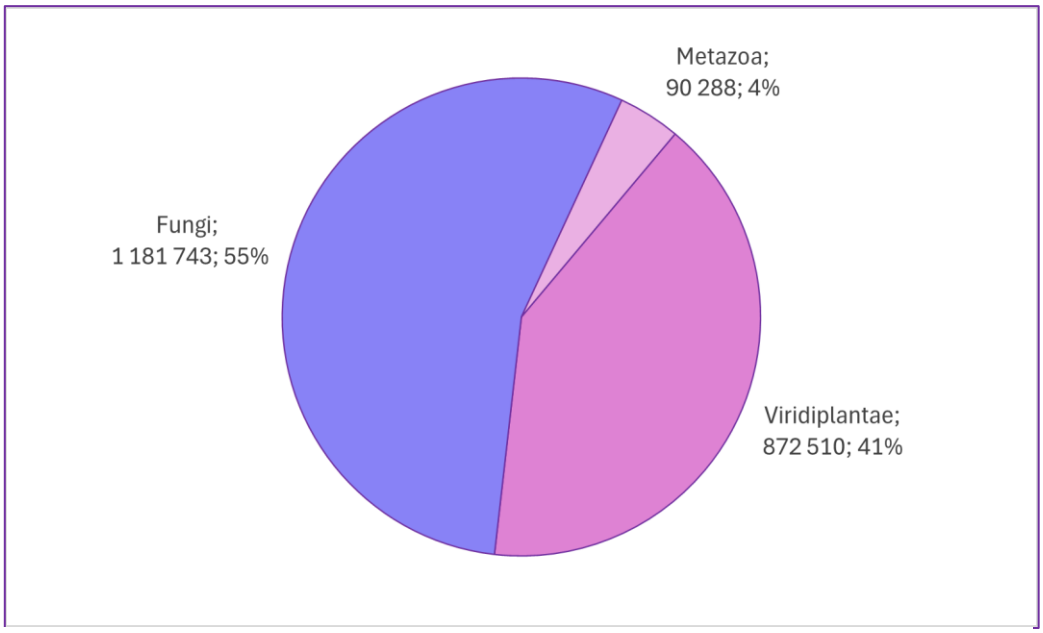
Klassifitseeritud lugemite analüüsi põhjal kuulus suurim osa lugemitest eukarüootide domeeni, moodustades 83,95% (8 677 261 lugemit) kõigist tuvastatud lugemitest. Bakterite osakaal oli 15,99% (1 653 625 lugemit) ning viirused moodustasid vaid 0,05% (5 473 lugemit). Arhede osakaal oli marginaalne ning need jäeti visuaalsetest ülevaadetest välja. (Joonis 1)



Joonis 1. Klassifitseeritud lugemite jaotus domeenide lõikes. Joonisel on kujutatud proovides tuvastatud lugemite jaotus kolme peamise domeeni vahel: eukarüoodid (sinine), bakterid (roosa) ja viirused. Arhede osakaal oli alla 0,01% ning jäeti jooniselt välja visuaalse selguse huvides.

Eukarüootsete lugemite sees domineerisid kaks peamist taksonoomilist rühma: seened (*Fungi*), mis moodustasid 55% (1 181 743 lugemit), ja rohetaimed (*Viridiplantae*), mille osakaal oli 41% (872 510 lugemit). Hulkraksed loomad (*Metazoa*) esinesid oluliselt väiksemas mahus, moodustades 4% (90 288 lugemit) (Joonis 2). Hõimkondade tasandil oli arvukaimaks rühmaks

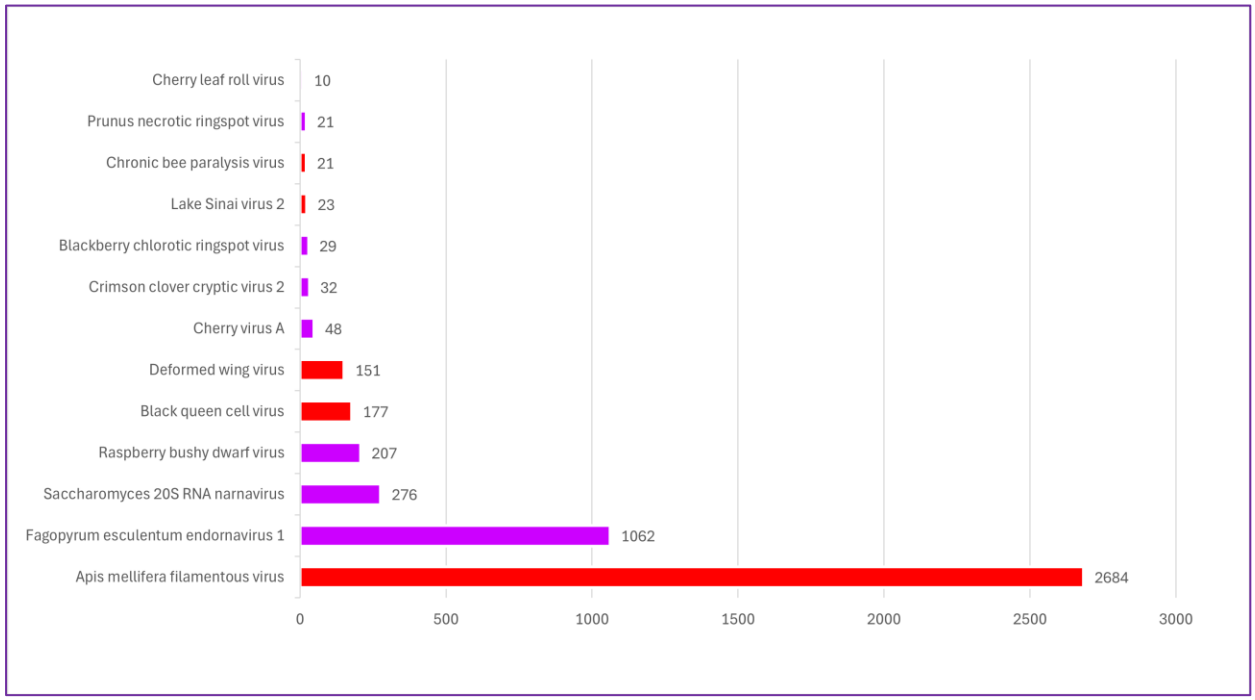
Ascomycota (1 170 087 lugemit; 56%), millele järgnes *Streptophyta* (832 881 lugemit; 40%). Ülejäänud eukarüootsed hõimkonnad moodustasid 4% (91 166 lugemit).



Joonis 2. Eukarüootsete lugemite jaotus. Eukarüootsete lugemite sees domineerivad taksonoomilised rühmad olid seened (*Fungi*, 1 181 743 lugemit, 55%, sinine), ja rohelised taimed (*Viridiplantae*, 872 510 lugemit, 41%, lilla). Hulkraksed loomad (*Metazoa*, roosa) esinesid oluliselt väiksemas mahus, moodustades 4% (90 288 lugemit).

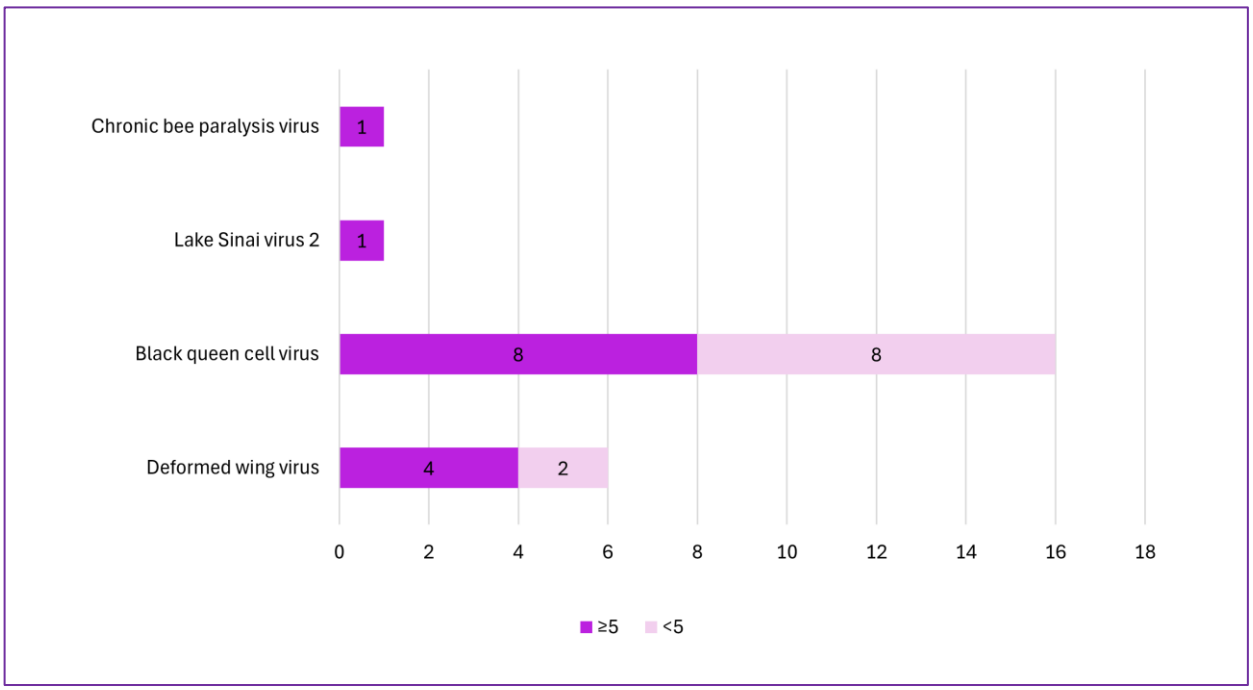
2.3.3. Mee RNA-st tuvastatud viirused

Viiruste osas tuvastati meeproovides mitmeid erinevaid taksoneid, mis on välja toodud Joonisel 3. Kõige arvukamalt esines mesilaste filamendiviirus *Apis mellifera filamentous virus* (2 684 lugemit), millele järgnesid hariliku tatra viirus *Fagopyrum esculentum endornavirus 1* (1 062 lugemit) ja *Saccharomyces 20S RNA narnavirus* (276 lugemit). Levinumate hulka kuulusid ka *Raspberry bushy dwarf virus*, ja deformeerunud tiiva viirus (*Deformed wing virus*). Viiruste üldarvu visualiseerimisel kaasati ainult need viirused, mis esinesid vähemalt ühes proovis vähemalt 10 lugemiga, et tagada lugemite usaldusväärsus ning vältida taustamüra mõju.



Joonis 3. Enimlevinud viirused kõikide analüüsitud proovide koondandmetena. Punasega on välja toodud mesilastega seotud viirused.

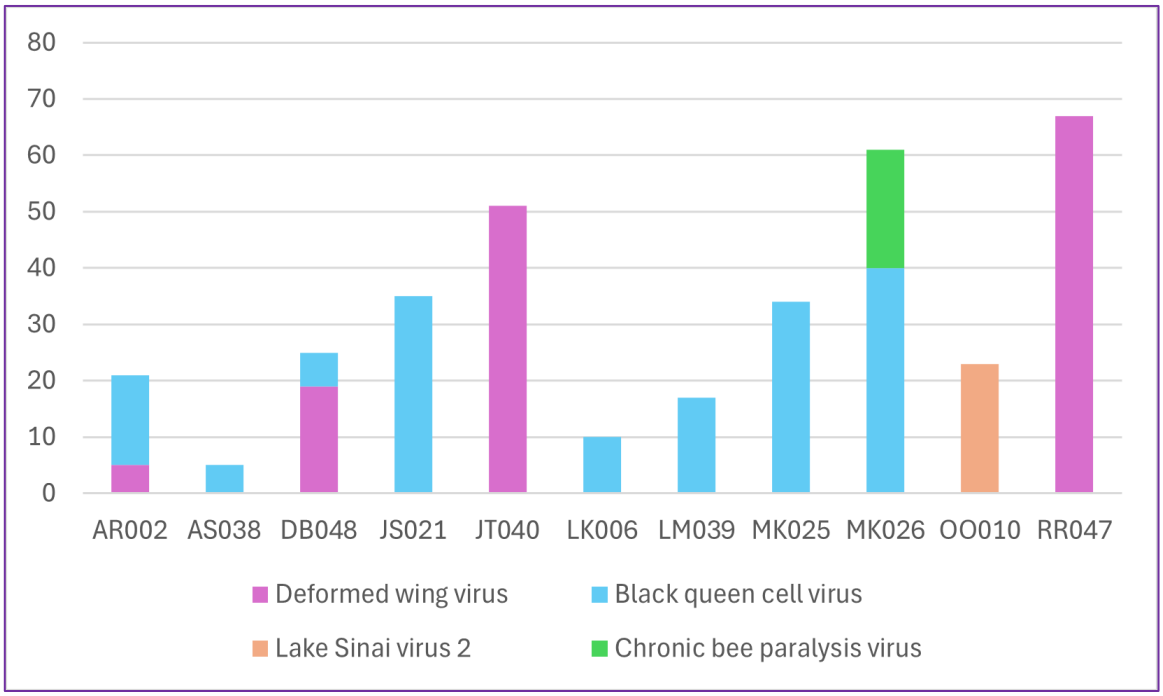
Mesilaste RNA-viirustest tuvastati musta emakupu viirus (*Black Queen Cell Virus)* kokku 16 meeproovis, sealhulgas 8 meeproovis vähemalt 5 lugemit ja 8 meeproovis alla 5 lugemi (Joonis 4). Deformeerunud tiiva viirus *(Deformed Wing Virus)* esines 6 meeproovis, neist 4 meeproovis vähemalt 5 lugemit. Deformeerunud tiiva viirus tuvastati ka nende meeproovidega samadest tarudest pärit mesilastest. Kroonilise paralüüsi viirus (*Chronic Bee Paralysis Virus*) ja Lake Sinai viirus *2* tuvastati kumbki ainult ühes proovis ning mõlemal juhul oli lugemite arv üle viie. Kroonilise paralüüsi viirus tuvastati ka selle meeprooviga samast tarust pärinevatest mesilastest ($2{,}4 \times 10^6$ genoomikoopiat mesilase kohta). Musta emakupu viirust ja Lake Sinai viirust samadest tarudest pärit mesilastes ei analüüsitud.



Joonis 4. Proovidest tuvastatud mesilaste RNA-viirused. Joonisel on välja toodud, mitmes meeproovis antud viirus esines. Tumelillaga on märgistatud proovid, milles antud viirust leidus vähemalt 5 lugemit. Heleroosaga on märgistatud proovid, milles leidus antud viirust vähem kui 5 lugemit.

Mesilaste RNA-viiruseid sisaldavate proovide visualiseerimiseks valiti meeproovid, kus konkreetse viiruse lugemite arv oli vähemalt viis. Deformeerunud tiiva viirus (*Deformed Wing* Virus) esines sagedamini meeproovides RR047 (67 lugemit) ja JT040 (51 lugemit). Musta emakupu viirus (*Black Queen Cell Virus*) oli laialt levinud, esinedes suurima lugemite arvuga meeproovides MK026 (40 lugemit) ja JS021 (35 lugemit). Lake Sinai viirus 2 tuvastati ainult meeproovis OO010 (23 lugemit) ning kroonilise paralüüsi viirus (*Chronic Bee Paralysis Virus*) meeproovis MK026 (21 lugemit).

Ühestki uuritavast meeproovist ei tuvastatud ägedat paralüüsi viirust (*Acute Bee Paralysis* Virus), mida ei tuvastatud ka meeproovidega samadest tarudest pärinevatest mesilastest.



Joonis 5. Mesilaste RNA-viiruste esinemine proovide lõikes.

Lisaks tuvastati vähese lugemite arvuga kotthaudme (*Sacbrood*) viirust (meeproovid AA016, AS038, MK026 ja RO043; kokku 6 lugemit). Samuti leiti *Varroa destructor virus 1* (meeproov JT040) ning *Varroa orthomyxovirus-1* (meeproov MK026), kuid mõlemat vaid 1 lugem, mis võib tuleneda taustamürast. Kolmest meeproovist (KU030, MK035 ja MM029) ei tuvastatud ühtegi viirust.

2.4. Arutelu

Mesilaste RNA-viirused kujutavad endast tõsist ohtu nii mesilasperede tervisele kui ka laiemalt põllumajandusele ja ökosüsteemide stabiilsusele. Mesilaste viirusnakkused laialdaselt levinud ja otseselt seotud mesilaste suremusega. Viiruste varajane tuvastamine on oluline, kuna paljud infektsioonid kulgevad asümptomaatiliselt kuni hilisesse staadiumisse, mil tõrjemeetmed on juba ebaefektiivsed. Kahjuks on olemasolevad viiruste tuvastamise meetodid sageli aeganõudvad, kallid või nõuavad elusate mesilaste proovide kogumist, mis piirab nende rakendatavust laialdasel seirel. Mee kogu RNA analüüs võiks pakkuda alternatiivset viisi mesilasperede viiruskoormuse hindamiseks.

Mee DNA ja RNA koosanalüüsil on potentsiaali muutuda väärtuslikuks diagnostikavahendiks, mis annab mesinikele infot mitte üksnes mee päritolu ja koostise, vaid ka mesilaste terviseseisundi kohta. Mee RNA analüüs võimaldaks tuvastada mee kaudu levivaid RNA-viiruseid ning kaudselt hinnata viiruste levikut, ilma mesilasi hukkamata. See avab uusi võimalusi jätkusuutlikuks ja laiaulatuslikuks haigusseireks mesinduses.

Kõige kõrgema RNA kontsentratsiooniga lõpp-produkti *MN Genomic DNA Food kit*. Kuna RNA on ebastabiilne, mõjutab inhibiitorite kogus reaktsioonis selle lõplikku kontsentratsiooni. *MN Genomic Food kit*-i kasutamisel oli lõpp-produktiks sooladest ja orgaanilistest ühenditest väga puhas RNA, mis teiste komplektide tööprotsessi käigus võis kiirendada RNA degradeerumist. Seega on *MN Genomic DNA Food kit*-i edu RNA eraldamisel ilmselt paremast puhastuse kvaliteedist tulenev.

Uuritud meeproovide RNA-s domineerisid selgelt eukarüootsed organismid (84%). Arvestades mesilaste kokkupuudet neid ümbritseva keskkonnaga, on see tulemus ootuspärane. Eukarüootide taksonoomiline jaotus näitas kaht peamist domineerivat rühma: seened (*Fungi*, 55%) ja rohelised taimed (*Viridiplantae*, 41%). Seente suur osakaal mee RNA-s võib viidata nende looduslikule esinemisele mesilaste elukeskkonnas, kuid ka võimalikule proovide saastumisele. Põhiline osa seentest kuulus kottseente hõimkonda (*Ascomycota*), mis hõlmab paljusid pärm- ja hallitusseente liike. Seetõttu võis nende osakaal kasvada ka peale proovide kogumist. Taimede, eriti *Streptophyta* esindajate, rohke esinemine proovides oli samuti ootuspärane ning mesilaste toitumiskäitumisest tulenev. Väiksemas koguses tuvastati ka hulkrakseid loomi (*Metazoa*), mille esinemine võib olla

seotud mesilaste, inimeste ning muude loomade otsese või kaudse kontaktiga uuritava taruga. Eukarüootide rohke esinemine proovides peegeldab hästi mee bioloogilist päritolu ja taru ning seda ümbritsevat keskkonda.

Analüüsitud proovides tuvastati mitmesuguseid viiruseid, mis on seotud mesilaste, taimede ning seentega. Kõige arvukamateks osutusid seitse taimi nakatavat viirust, viis mesilasi nakatavat viirust ning üks viirus, mis nakatab pärmkottseeni. Kõige levinumaks viiruseks osutus mesilaste DNA-viirus *Apis mellifera filamentous virus*, mis on kirjanduse andmetel (Paluoja et al., 2025) enimlevinud ka mee DNA-põhistes analüüsides. Teisel kohal oli hariliku tatra viirus *Fagopyrum esculentum endornavirus 1*, millele järgnes pärmkottseente viirus *Saccharomyces 20S RNA narnavirus*. Nende kahe viiruse sagedane esinemine on kooskõlas proovides domineerinud taimede ja seente suure osakaaluga, viidates nende taksonite bioloogilisele ja ökoloogilisele seotusele tuvastatud viirustega. Taimede viiruste esinemine on ilmselt seotud mesilaste taimedega kokkupuutega oma korjel.

Täiendavas analüüsis võrreldi üksikuid proove Eesti mesilaste alamliikide RNA-viiruste pilootuuringus saadud tulemustega, ning andis üksikasjalikuma ülevaate viiruste levikust ja meetodite kooskõlalisusest ning tuvastusulatusest.

Deformed wing virus tuvastati kõige rohkem proovides RR047 ja JT040, kus lugemite arv ületas 50, mis võib viidata aktiivsetele viiruskolletele. Kokku tuvastati DWV kuuest meeproovist, millest neljas oli vähemalt viis lugemit. Eelnevas mesilaste RNA-viiruste uuringus, mis keskendusid samadest tarudest pärit mesilastele, on kinnitatud DWV tegelik esinemine vastavates mesilasperedes. Tulemuste kooskõla varasema mesilastepõhise testimise ja käesoleva meeproovide analüüsi vahel viitab uuritud metoodika rakenduspotentsiaalile DWV tuvastamisel mee kaudu. See osutab meetodi sobivusele mesilaste terviseseisundi kaudseks hindamiseks ning annab alust edasiseks metoodiliseks arenduseks.

Samuti tuvastati ühest proovist (MK025) *Chronic bee paralysis virus*, mille esinemise kinnitas mesilaste RNA-viiruste uuring. Varasemas uuringus leiti viirust märkimisväärses koguses ($2{,}4 \times 10^6$ genoomikoopiat mesilase kohta), mis tõenäoliselt võimaldas viiruse tuvastamist ka käesoleva töö vähem spetsiifilise metoodika abil. See leid viitab, et kasutatud meetod omab potentsiaali ka CBPV tuvastamisel, tingimusel, et viiruskoormus on piisavalt kõrge, ning loob aluse metoodika edasiseks

täiustamiseks diagnostilisel eesmärgil. Ägedat paralüüsi viirust ei leitud ühestki tarust võetud mesilaste ega mee proovidest.

Kõige sagedamini tuvastatud viiruseks osutus *Black Queen Cell Virus* (BQCV), mis esines kokku 16 meeproovis, sealhulgas vähemalt viie lugemiga pooltes neist. Kuna BQCV esinemist varasemas uuringus ei analüüsitud, puudub otsene võrdlusvõimalus. Siiski viitab selle viiruse laialdane levik meeproovides uuritud metoodika potentsiaalile tuvastada viirusi, mis võivad jääda avastamata seniste standardsete diagnostiliste lähenemiste puhul. Seega võib meetod täita olulist lünka mesilaste viirustõve epidemioloogilises seires ja viia uute rakendusteni mesilaste haiguste jälgimises. *Lake Sinai virus* 2 (LSV) tuvastati ühes proovis (OO010) ning varasemas uuringus ka seda viirust ei testitud. Nende kahe viiruse esinemine üksnes käesoleva meetodiga rõhutab meeproovide analüüsimise väärtust viiruste laiaulatuslikul avastamisel. Eriti juhul kui laboratoorsed testid on suunatud ainult valitud patogeenidele.

Tulemused kinnitavad, et uuritud meetod võimaldab tuvastada laiemat spektrit viiruseid kui traditsioonilised laboritestid. Samas täiendavad need lähenemised üksteist, pakkudes kombineeritult täpsemat ülevaadet mesilasperede tervislikust seisundist ja viiruskoormusest.

Uuritud proovide päritolu, korjeaeg ja mesilaste vanus mängivad olulist rolli tulemuste tõlgendamisel. Kuna proovimaterjaliks oli enamasti kärjekaabe ja analüüsiti täiskasvanud lennumesilasi, peegeldavad mõlema meetodi tulemused eelkõige uuritava materjali viiruskoormust antud ajahetkel (2024. aasta mai ja juuni), mitte tingimata kogu taru viiruskoormust kogu aasta lõikes. Üldisema ülevaate saamiseks kogu taru tervislikust seisundist saaks kasutada viiruskahtlusega tarust vurritatud mett, kuid selle puhul võib kujuneda probleemiks viiruste vähene kontsentratsioon proovimaterjalis. Kuid samamoodi ei peegelda kogu taru seisundit praegused meetodid, mis analüüsivad kogu tarust 50 grammi mesilasi. Uuritava metoodika täiendamine viirusespetsiifiliste analüüsimeetoditega võimaldaks tulevikus sihipärasemalt tuvastada nii suuremat hulka erinevaid mesilaste viiruseid kui ka täpsemalt kvantifitseerida konkreetseid viiruseid.

Proovid koguti mais ja juunis, mis tähendab, et saadud tulemusi võivad mõjutada hooajalised tegurid. Mõned mesilaste viirused, nagu deformeerunud tiiva viirus ja musta emakupu viirus, on teadaolevalt sesoonsed ning nende esinemissagedus varieerub aasta lõikes. DWV levik on

tavaliselt kõrgeim hilissuvel ja varasügisel, kui *Varroa destructor* populatsioon saavutab haripunkti, nõrgestades mesilaste immuunsüsteemi ning soodustades viiruse aktiveerumist. BQCV esineb sagedamini kevadel ja varasuvel, mil mesilasperedes esineb rohkem *Nosema spp*. infektsioone ning noorte vastsete arv on suur. See selgitab ka viiruse rohket esinemist uuritavates proovides.

Tulemustes ilmnes, et paljud viirused esinesid väga väikese lugemite arvuga või üksikutes proovides. See võib olla tingitud kas madalast viiruskoormusest, valitud proovide iseloomust (täiskasvanud, mitte haigusnähte näitavad isendid), eralduse efektiivsusest, proovide kvaliteedist või ka kasutatud analüüsimeetodite tundlikkusest. Lisaks võivad mõned viirused esineda vahelduva aktiivsusega või olla proovivõtu hetkel latentse infektsiooni kujul, mida ei tuvastata RNA-põhisel lähenemisel.

Tulemuste võrdlus varasemate mesilastest saadud RNA-sekveneerimise andmetega näitab sarnasusi levinumate viiruste osas, kuid kärjekaabe kui proovimaterjal võib anda erineva viirusprofiili kui näiteks mesilaste kogu keha RNA analüüs. Seega täiendavad need kaks meetodit üksteist.

Uurimist piiravateks teguriteks olid ka metoodilised kitsaskohad: proovide kvaliteet, vähene viirusmaterjal, nukleiinhapete võimalik degradeerumine, ning üldine sõltuvus järjestamissügavusest.

Tulevasteks uurimissuundadeks võiksid olla kõrge viiruskoormusega proovide viirusspetsiifiline analüüs ja süvasekveneerimine, mis võimaldaks täpsemalt iseloomustada tuvastatud viiruseliike ja nende geneetilist varieeruvust. Samuti oleks väärtuslik võrrelda erinevates arenguetappides olevate mesilaste, vurritatud mee ning kärjekaabete viirusprofiile, et selgitada viiruste levikut mesilaspere sees ja nende potentsiaalset esinemist mees. Täiendavalt võiks uurida viiruskoormuse muutusi ajas, mis aitaks mõista viiruste dünaamikat mesilasperedes ning hinnata nende seiretööriistade sobivust pikaajalise jälgimise kontekstis.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö põhieesmärk oli projekti „Mee RNA analüüsi metoodika arendus mesilaste viiruste tuvastamiseks“ (akronüüm Mee RNA analüüs) raames välja töötada uudsed mee RNA sekveneerimise põhised meetodid. Samuti tulemuste põhjal hinnata metoodika võimekust mee üldise RNA-profiili loomisel ja uute mesilaste RNA-viiruste tuvastamisel meeproovidest ning selle edasist potentsiaali mesilaste viirusseire tööriistana kasutamisel. Töö keskendus mee kui proovimaterjali analüüsimisele, et selgitada välja, kas ja mil määral võimaldab kasutatud meetod avastada teadaolevaid ning seni dokumenteerimata viiruseid. Saadud andmeid võrreldi varasemate mesilaste Eesti mesilaste alamliikide RNA viiruste pilootuuringu tulemustega. Uut metoodikat saab tulevikus potentsiaalselt rakendada kommertsiaalsete testide väljatöötamiseks, et tuvastada erinevaid maailmas levinud mesilaste RNA-viiruseid.

Analüüsitud proovide metagenoomne ülevaade oli ootuspärane. Proovides domineerisid eukarüootsed organismid, eelkõige seened ja taimed, peegeldades mesilaste ökoloogilist konteksti ning toitumiskäitumist. Viirusanalüüs tuvastas mitmeid teadaolevaid ja ka varasemate meetoditega tuvastatud mesilaste viiruseid, sealhulgas mesilaste DNA-viiruse *Apis mellifera filamentous virus*, *Deformed wing virus* ning *Chronic bee paralysis virus*.

Oluline tulemus käesolevas töös oli *Black queen cell* viiruse (BQCV) ja *Lake Sinai 2* viiruse tuvastamine mitmes proovis. Tegemist on viirustega, mida tavapärastes laboratoorsetes mesilaste terviseanalüüsides tihti ei testita, mistõttu võib nende esinemine jääda tähelepanuta. Kasutatav meetod võimaldas viiruse olemasolu tuvastada ka ilma spetsiifilise PCR-testita, pakkudes laiapõhjalisemat ülevaadet mesilasperede viroloogilisest seisundist. Arvestades, et BQCV võib olla seotud *Nosema spp.* infektsioonide ja vastsete suremusega, on selle viiruse avastamine teaduslikult ja praktiliselt oluline. See rõhutab, kui väärtuslik on meeproovide analüüs patogeenide seireprogrammidele, eriti selliste viiruste puhul, mis võivad jääda varjule traditsiooniliste testide piirangute tõttu.

Tulemused näitavad, et kasutatud metoodika on võimeline tuvastama laiemat viirusspektrit kui tavapärased laboritestid ning omab väärtuslikku rakenduspotentsiaali mesilaste viirushaiguste

diagnostikaks. Eriti olulist rolli võiks see mängida viiruste epidemioloogilises seires, võimaldades tuvastada patogeene, mis võivad jääda märkamatuks sihtotstarbeliste testide korral.

Tulemused annavad väärtusliku lähtekoha Eesti mesilasperede viiruskoormuse hindamiseks, kuid viitavad ka vajadusele standardiseeritud proovivõtu, suuremate valimimahtude ja kombineeritud diagnostikameetodite järele.

RESÜMEE / SUMMARY

Honey bees (*Apis mellifera*) are key pollinators whose well-being directly influences food production and biodiversity. In recent decades, honey bee colony losses have become more frequent, a trend driven largely by the spread of the *Varroa destructor* mite and *Nosema* spp. infections. Accurate and early detection of viral infections is critical for maintaining colony health. Traditional diagnostic methods rely on PCR-based detection of individual viruses from live bees, requiring the sacrifice and processing of bee specimens.

Honey, as a biological matrix, provides a comprehensive reflection of the colony and its surrounding environment. It contains trace genetic material from bees, plants, fungi, and viruses. Total-RNA analysis of honey allows broader detection and surveillance of both known and undocumented or rare RNA viruses affecting bees, offering a non-invasive alternative for colony health monitoring.

The primary objective of this study was to develop novel RNA sequencing-based methods for detecting bee RNA viruses from honey samples. Additionally, the study aimed to assess the method's capacity to generate general RNA profiles of honey, detect new or previously undocumented bee RNA viruses, and evaluate its broader potential for use in viral surveillance programs. Furthermore, RNA analysis results from honey were compared with prior PCR-based virus screening data from the same colonies collected during a pilot study on RNA viruses in Estonian honey bee subspecies.

The work was conducted as part of a collaborative EIP-AGRI project titled "*Mee RNA analüüsi metoodika arendus mesilaste viiruste tuvastamiseks*", carried out in cooperation between Celvia CC AS and Estonian beekeepers (Muhe Mesi OÜ). The project was funded by the PRIA Measure 16.2 and executed at Celvia CC AS.

The metagenomic overview of the analyzed honey samples revealed a dominance of eukaryotic organisms, primarily fungi and plants, reflecting the bees' foraging behavior and ecological interactions. Viral analysis identified multiple known bee viruses, including *Apis mellifera filamentous virus*, *Deformed Wing Virus*, and *Chronic Bee Paralysis Virus*. A significant finding was

the detection of *Black Queen Cell Virus* and *Lake Sinai Virus 2* in several samples. These are viruses that are rarely included in standard bee health diagnostics and thus often go unnoticed. The applied method enabled the detection of these viruses without specific PCR tests, offering a broader insight into the virological status of colonies.

The presence of BQCV is particularly relevant due to its potential association with *Nosema spp.* infections and larval mortality, underscoring the scientific and practical value of such findings. This highlights the usefulness of honey-based pathogen surveillance, especially for detecting viruses that might be overlooked by conventional diagnostic approaches.

In conclusion, the results demonstrate that the developed methodology can detect a wider spectrum of viruses than standard laboratory tests and holds significant promise for the diagnosis and epidemiological surveillance of bee viral diseases. It offers a non-destructive, scalable, and more informative approach for assessing colony health. Combined DNA and RNA analysis from honey could provide beekeepers not only with insights into honey composition but also with valuable information about pathogen and parasite load within the colony by enabling earlier interventions and improved health monitoring strategies.

KIRJANDUSE LOETELU

Bovo, S., Ribani, A., Utzeri, V. J., Schiavo, G., Bertolini, F., & Fontanesi, L. (2018). Shotgun metagenomics of honey DNA: Evaluation of a methodological approach to describe a multi-kingdom honey bee derived environmental DNA signature. *PLOS ONE*, *13*(10), e0205575. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205575

Breitwieser, F. P., & Salzberg, S. L. (2020). Pavian: Interactive analysis of metagenomics data for microbiome studies and pathogen identification. *Bioinformatics*, *36*(4), 1303–1304. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz715

Brettell, L., Mordecai, G., Schroeder, D., Jones, I., Da Silva, J., Vicente-Rubiano, M., & Martin, S. (2017). A Comparison of Deformed Wing Virus in Deformed and Asymptomatic Honey Bees. *Insects*, *8*(1), 28. https://doi.org/10.3390/insects8010028

Chen, Y., Evans, J., Hamilton, M., & Feldlaufer, M. (2007). The influence of RNA integrity on the detection of honey bee viruses: Molecular assessment of different sample storage methods. *Journal of Apicultural Research*, *46*(2), 81–87. https://doi.org/10.1080/00218839.2007.11101372

Chen, Y. P., & Siede, R. (2007). Honey Bee Viruses. *Advances in Virus Research* (Kd 70, lk 33–80). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0065-3527(07)70002-7

Ciucure, C. T., & Geană, E. (2019). Phenolic compounds profile and biochemical properties of honeys in relationship to the honey floral sources. *Phytochemical Analysis*, *30*(4), 481–492. https://doi.org/10.1002/pca.2831

Daughenbaugh, K., Martin, M., Brutscher, L., Cavigli, I., Garcia, E., Lavin, M., & Flenniken, M. (2015). Honey Bee Infecting Lake Sinai Viruses. *Viruses*, *7*(6), 3285–3309. https://doi.org/10.3390/v7062772

de Miranda, J. R. (2008). DIAGNOSTIC TECHNIQUES FOR VIRUS DETECTION IN HONEY BEES. M. Aubert, B. Ball, I. Fries, & European Commission (Toim), *Virology and the honey bee* (lk 131–134). Publications Office.

De Miranda, J. R., Cordoni, G., & Budge, G. (2010). The Acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*, S30–S47. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.014

De Miranda, J. R., & Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*, S48–S61. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.012

Di Tommaso, P., Chatzou, M., Floden, E. W., Barja, P. P., Palumbo, E., & Notredame, C. (2017). Nextflow enables reproducible computational workflows. *Nature Biotechnology*, *35*(4), 316–319. https://doi.org/10.1038/nbt.3820

Dittes, J., Aupperle-Lellbach, H., Schäfer, M. O., Mülling, C. K. W., & Emmerich, I. U. (2020). Veterinary Diagnostic Approach of Common Virus Diseases in Adult Honeybees. *Veterinary Sciences*, *7*(4), 159. https://doi.org/10.3390/vetsci7040159

Fitzpatrick, A. H., Rupnik, A., O'Shea, H., Crispie, F., Keaveney, S., & Cotter, P. (2021). High Throughput Sequencing for the Detection and Characterization of RNA Viruses. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 621719. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.621719

Formato, G., Rivera-Gomis, J., Bubnic, J., Martín-Hernández, R., Milito, M., Croppi, S., & Higes, M. (2022). Nosemosis Prevention and Control. *Applied Sciences*, *12*(2), 783. https://doi.org/10.3390/app12020783

Hunter, W. B., Wintermantel, W. M. (2021). Optimizing Efficient RNAi-Mediated Control of Hemipteran Pests (Psyllids, Leafhoppers, Whitefly): Modified Pyrimidines in dsRNA Triggers. Plants, 10, 9. https://doi.org/10.3390/plants10091782

Gauthier, L., Tentcheva, D., Tournaire, M., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E., & Bergoin, M. (2007). Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie*, *38*(5), 426–435. https://doi.org/10.1051/apido:2007026

Genersch, E., Yue, C., Fries, I., & De Miranda, J. R. (2006). Detection of Deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (Bombus terrestris and Bombus pascuorum) with wing deformities. *Journal of Invertebrate Pathology*, *91*(1), 61–63. https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.10.002

Gismondi, A., Di Marco, G., & Canini, A. (2017). Detection of plant microRNAs in honey. *PLOS ONE*, *12*(2), e0172981. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172981

Gonzalez, F. N., Raticelli, F., Ferrufino, C., Fagúndez, G., Rodriguez, G., Miño, S., & Dus Santos, M. J. (2024). Detection and characterization of Deformed Wing Virus (DWV) in apiaries with stationary and migratory management in the province of Entre Ríos, Argentina. *Scientific Reports*, *14*(1), 16747. https://doi.org/10.1038/s41598-024-67264-7

Hristov, P., Shumkova, R., Palova, N., & Neov, B. (2020). Factors Associated with Honey Bee Colony Losses: A Mini-Review. *Veterinary Sciences*, *7*(4), 166. https://doi.org/10.3390/vetsci7040166

Lannutti, L., Gonzales, F. N., Dus Santos, M. J., Florin-Christensen, M., & Schnittger, L. (2022). Molecular Detection and Differentiation of Arthropod, Fungal, Protozoan, Bacterial and Viral Pathogens of Honeybees. *Veterinary Sciences*, *9*(5), 221. https://doi.org/10.3390/vetsci9050221

Lanzi, G., De Miranda, J. R., Boniotti, M. B., Cameron, C. E., Lavazza, A., Capucci, L., Camazine, S. M., & Rossi, C. (2006). Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Virology*, *80*(10), 4998–5009. https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.4998-5009.2006

Li, J., Wang, T., Evans, J., Rose, R., Zhao, Y., Li, Z., Li, J., Huang, S., Heerman, M., Rodríguez-García, C., Banmeke, O., Brister, J., Hatcher, E., Cao, L., Hamilton, M., & Chen, Y. (2019). The Phylogeny and Pathogenesis of Sacbrood Virus (SBV) Infection in European Honey Bees, Apis mellifera. *Viruses*, *11*(1), 61. https://doi.org/10.3390/v11010061

Ma, M. (2014). New insights of Sacbrood virus. *Virologica Sinica*, *29*(6), 410–413. https://doi.org/10.1007/s12250-014-3540-9

Matusiewicz, M., Margas, E., P. Mazurek, M., Wesołowska, L., Belter, A., & Skupińska, M. (2016). Viral infections of *Apis mellifera*: Its importance, dynamics, diagnostics and treatment opportunities. *BioTechnologia*, *97*(3), 211–225. https://doi.org/10.5114/bta.2016.62359

Mohamadzade Namin, S., Ghosh, S., & Jung, C. (2023). Honey Quality Control: Review of Methodologies for Determining Entomological Origin. *Molecules*, *28*(10), 4232. https://doi.org/10.3390/molecules28104232

Mutinelli, F. (2011). The spread of pathogens through trade in honey bees and their products (including queen bees and semen): Overview and recent developments: -EN- -FR- La dissémination d'agents pathogènes lors des échanges internationaux d'abeilles mellifères et de leurs produits (reines et semence comprises) : état de la situation et évolutions récentes -ES- Propagación de agentes patógenos por el comercio de abejas mieleras y sus derivados (abejas reinas y semen inclusive): panorámica general y evolución reciente. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, *30*(1), 257–271. https://doi.org/10.20506/rst.30.1.2033

Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*, *12*(1), 385. https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385

Oz, M. E., Avci, O., & Dogan, M. (2025). Factors influencing the prevalence of acute bee paralysis virus in Apis mellifera and insights into its phylogenetic relationships. *Virus Genes*, *61*(2), 220–229. https://doi.org/10.1007/s11262-025-02135-5

Paluoja, P., Vaher, M., Teder, H., Krjutškov, K., Salumets, A., & Raime, K. (2024). *Honey bulk DNA metagenomic analysis to identify honey biological composition and monitor honey bee pathogens*. Genomics. https://doi.org/10.1101/2024.07.31.605955

Raime, K. (2024). *Eesti mesilaste alamliikide RNA-viiruste uuring 2024* [Lõpparuanne]. Celvia CC AS.

Ribière, M., Olivier, V., & Blanchard, P. (2010). Chronic bee paralysis: A disease and a virus like no other? *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*, S120–S131. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.013

Rodríguez-Flores, M. S., Mazzei, M., Felicioli, A., Diéguez-Antón, A., & Seijo, M. C. (2022). Emerging Risk of Cross-Species Transmission of Honey Bee Viruses in the Presence of Invasive Vespid Species. *Insects*, *14*(1), 6. https://doi.org/10.3390/insects14010006

Rowland, B. W. (2023). *Modelling methods to improve our understanding of chronic bee paralysis in the European honey Bee (Apis mellifera)* [Thesis, Newcastle University]. http://theses.ncl.ac.uk/jspui/handle/10443/5876

Sarwar, M. (2016). *Prevalence of multiple viral diseases associated with honey bees colony collapse and control of disorders*.

Schittny, D., Yañez, O., & Neumann, P. (2020). Honey Bee Virus Transmission via Hive Products. *Veterinary Sciences*, *7*(3), 96. https://doi.org/10.3390/vetsci7030096

Schurr, F., Tison, A., Militano, L., Cheviron, N., Sircoulomb, F., Rivière, M.-P., Ribière-Chabert, M., Thiéry, R., & Dubois, E. (2019). Validation of quantitative real-time RT-PCR assays for the detection of six honeybee viruses. *Journal of Virological Methods*, *270*, 70–78. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.04.020

Shen, W., Sipos, B., & Zhao, L. (2024). SeqKit2: A Swiss army knife for sequence and alignment processing. *iMeta*, *3*(3), e191. https://doi.org/10.1002/imt2.191

Shi, H., Zhou, Y., Jia, E., Pan, M., Bai, Y., & Ge, Q. (2021). Bias in RNA-seq Library Preparation: Current Challenges and Solutions. *BioMed Research International*, *2021*(1), 6647597. https://doi.org/10.1155/2021/6647597

Simeunović, P., Stevanović, J., Vidanović, D., Nišavić, J., Radović, D., Stanišić, L., & Stanimirović, Z. (2014). A survey of deformed wing virus and acute bee paralysis virus in honey bee colonies from serbia using real-time RT-PCR. *Acta Veterinaria*, *64*(1), 81–92. https://doi.org/10.2478/acve-2014-0009

Singh, B., Arora, R., & Gosal, S. S. (2015). *Biological and Molecular Approaches in Pest Management*. Scientific Publishers.

Spurny, R., Přidal, A., Pálková, L., Kiem, H. K. T., De Miranda, J. R., & Plevka, P. (2017). Virion Structure of Black Queen Cell Virus, a Common Honeybee Pathogen. *Journal of Virology*, *91*(6), e02100-16. https://doi.org/10.1128/JVI.02100-16

Šimenc, L., Knific, T., & Toplak, I. (2021). 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*, *13*(7), 1340. https://doi.org/10.3390/v13071340

Wei, R., Cao, L., Feng, Y., Chen, Y., Chen, G., & Zheng, H. (2022). Sacbrood Virus: A Growing Threat to Honeybees and Wild Pollinators. *Viruses*, *14*(9), 1871. https://doi.org/10.3390/v14091871

Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, *20*(1), 257. https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Honey Bee Testing. National Agricultural Genotyping Center. https://genotypingcenter.com/tests/bees/ (vaadatud 24.05.2025)

Mesilaste viirushaiguste uuringud. (2025, aprill). LABRIS. https://labris.agri.ee/teenused/proovivotujuhendid (vaadatud 20.03.2025)

National Honey Monitoring Scheme. (2025, märts). National Honey Monitoring Scheme. https://honey-monitoring.ac.uk/ (vaadatud 24.05.2025)

Sacbrood Virus. (2025). LABOKLIN Europe. https://laboklin.com/en/products/infectious-diseases-pathogens-and-antibody-detection/viruses/sacbrood-virus/ (vaadatud 20.03.2025)

United States., United States., & White, G. F. (1913). *Sacbrood, a disease of bees /*. U.S. Dept. of Agriculture, Bureau of Entomology,. https://doi.org/10.5962/bhl.title.63367 (vaadatud 24.05.2025)

Viruses: USDA ARS. (2025). https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-barc/beltsville-agricultural-research-center/bee-research-laboratory/docs/viruses/ (vaadatud 24.05.2025)

WOAH and NRLs for Bee diseases. (2025). Friedrich-Loeffler-Institut. https://www.fli.de/en/institutes/institute-of-infectology-imed/reference-laboratories/woah-and-nrls-for-bee-diseases/ (vaadatud 24.05.2025)

LIHTLITSENTS

Mina, Annaliisa Vask,

1. annan Tartu Üikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Meeproovide metagenoomne analüüs mesilasperede RNA-viiruste seireks: uudse meetodi väljatöötamine,

mille juhendaja on PhD Kairi Raime,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Annaliisa Vask

26.05.2025