

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOINFORMAATIKA ÕPPETOOL

**Mesilastel noseматоosi põhjustavate mikrosporiidide *Nosema apis* ja *Nosema ceranae*
tuvastamiseks disainitud PCR praimerite liigispetsiifilisuse analüüs**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Johanna-Stina Idla

Juhendaja: bioinformaatika teadur Kairi Raime, MSc

TARTU 2021

Mesilastel nosematoosi põhjustavate mikrosporiidide *Nosema apis* ja *Nosema ceranae* tuvastamiseks disainitud PCR praimerite liigispetsiifilisuse analüüs

Mesilastes põhjustavad nosematoosi kõrgelt spetsialiseerunud parasiitsed seened - mikrosporiidid *Nosema apis* ja *N. ceranae*. Olenevalt nakkustekitajast võib haiguse kulg mööduda sümptomiteta ja päädida laiaulatusliku mesilaskoloonia surmaga. Nakkuse varases staadiumis PCR-põhise meetodiga tuvastamiseks kasutatakse liigispetsiifilisi PCR praimereid, mis on lähedaste liikide eristamisel tundlikud, täpsed, usaldusväärsed. Teaduskirjandusest leiti potentsiaalseid *N. apis*'e ja *N. ceranae* spetsiifilisi praimeripaare, mille liigispetsiifilisust kontrolliti programmiga Primer-BLAST. Liigispetsiifiliseks *N. apis*'e nakkuse tuvastamiseks *singleplex* PCR meetodil on optimaalne kasutada Mnapis-F, UnivRev ja *N. ceranae* tuvastamiseks NosCF, NosCR praimeripaari. Töö tulemust saab rakendada diagnostilise analüüsti, mille eesmärk on nosematoosnakkuse põhjustajate liigipõhine tuvastus, välja töötamiseks.

Märksõnad: liigispetsiifilised praimerid, spetsiifilisuse kontroll, *Nosema apis*, *Nosema ceranae*

CERCS: B110 Bioinformaatika, meditsiiniinformaatika, biomatemaatika, biomeetrika

Species-specificity analysis of PCR primers designed to detect nosematosis-causing microsporidia *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in bees

In bees, nosematosis is caused by highly specialized parasitic fungi - the microsporidia *Nosema apis* and *N. ceranae*. Depending on the pathogen, the disease may be asymptomatic and lead to the death of an entire bee colony. For the early detection of infection by PCR, it is necessary to use species-specific primers that are sensitive, accurate, reliable in distinguishing between closely related species. Several potential *N. apis* and *N. ceranae* specific primer pairs have been identified in the scientific literature and checked for specificity using Primer-BLAST. Primer pairs Mnapis-F and UnivRev, and NosCF and NosCR are optimal for species-specific detection of *N. apis* and *N. ceranae* infection, respectively, by *singleplex* PCR. The result of this work can be applied in the development of a diagnostic test for the species-specific identification of the pathogens responsible for nosematosis.

Keywords: species-specific primers, specificity checking, *Nosema apis*, *Nosema ceranae*

CERCS: B110 Bioinformatics, medical informatics, biomathematics, biometrics

Sisukord	
Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	5
1. Kirjanduse ülevaade	6
1.1. Mesilaste levinud seenhaigused	6
1.2. Nosematoos, <i>N. apis</i> ja <i>N. ceranae</i>	6
1.3. Nosema liikide tuvastamiseks kasutatavad meetodid	11
1.3.1. Mikroskoopia	11
1.3.2. Molekulaarsed meetodid	13
1.4. Liigispetsiifiliste PCR praimerite disain	15
1.4.1. Liigispetsiifiliste praimerite disaini üldised põhimõtted	15
1.4.2. Liigispetsiifiliste praimerite disaini etapid <i>Nosema</i> spp. tuvastamiseks	16
2. Uurimus	23
2.1. Töö eesmärgid	23
2.2. Materjal ja metoodika	23
2.3. Tulemused ja arutelu	24
2.3.1. <i>N. apis</i> 'e ja <i>N. ceranae</i> spetsiifilised PCR praimerid	24
2.3.2. <i>N. apis</i> 'e ja <i>N. ceranae</i> praimerite spetsiifilisuse kontroll ja analüüs	26
Kokkuvõte	40
Summary	41
Kasutatud kirjanduse loetelu	42
Kasutatud veebiaadressid	52
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	53

Kasutatud lühendid

BOLD	Barcode of Life Database
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ITS	sisemine transkribeeritav speisser regioon (<i>internal transcribed spacer region</i>)
LSU rRNA	suur 23S rRNA subühik (<i>large subunit rRNA</i>)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NW	Neeleman-Wunsch
PCR-RFLP	polümeraas ahelreaktsiooni restriksioonifragmendi pikkuse polümorfism (<i>polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism</i>)
qPCR	kvantitatiivne ehk reaalaaja PCR
RNAi	RNA interferents
RPB1	DNAst sõltuv RNA polümeraas II suurim subühik
rRNA	ribosoomi-RNA
SEM	skaneeriv elektronmikroskoopia
SNP	üksiknukleotiidne polümorfism (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
TEM	transmissioonelektronmikroskoopia
T_m	sulamistemperatuur (melting temperature)
VTL	Veterinaar- ja Toidulaboratoorium

Sissejuhatus

Mesilaste seas levib ebameeldiv seenhaigus noseматоos, mida tuntakse nime “vaikne tapja” all (Gajger *et al.*, 2009; Hornitzky, 2008). Nakkustekitaja *Nosema apis* põhjustab mesilastel kõhulahtisust, seejuures taru ja mee roojaga saastumist. *N. ceranae* põhjustab pika asümptomaatilise inkubatsiooniperioodijärgselt laiaulatuslikku, mesinikele tihtipeale saladuslikuks jäävat mesilaspesakonna hukku (Higes *et al.*, 2008). Eesti Veterinaar- ja Toidulaboratoorium pakub Eesti mesinikele nosematoosi tuvatamiseks analüüsimeetodit, mis põhineb *Nosema* spp. eoste arvulisel määramisel, kuid ei võimalda kahte *Nosema* liiki teineteisest eristada.

N. apis'e ja *N. ceranae* eristamine on oluline, sest nende põhjustatud haiguse kulg ja tagajärjed on erinevad. Tuvastades nosematoosnakkuse piisavalt varajases staadiumis, on võimalik sõltuvalt nakkustekitaja liigist rakendada mesilaspesakonnas õigel ajal vastavaid nakkust pärssivaid ennetus- või ravimeetodeid ning hoida nosematoosi kontrolli all mesinikele suuremat kahju põhjustamata. PCR-põhised meetodid võimaldavad suhteliselt odavalt, usaldusväärselt ja tundlikult tuvastada nakkust põhjustavate liikide DNA-d juba enne tõsisemate haigussümptomite ilustumist. PCR-põhiste meetodite üheks oluliseks komponendiks on liigispetsiifilised praimerid. Liigispetsiifiliste praimerite disainil on tarvis järgida mitmeid olulisi elemente, et tagada praimerite unikaalsus sihtmärkjärjestuse suhtes.

Uurimistöö eesmärk on leida avaldatud teaduskirjandusest *N. apis*'e ja *N. ceranae* tuvastamiseks seni disainitud PCR praimereid, kontrollida nende liigispetsiifilisust bioloogilistes andmebaasides saadaval olevate järjestuste abil ning analüüsida nende sobivust nosematoosi põhjustavate seente *N. apis* ja *N. ceranae* kiireks DNA-põhiseks tuvastamiseks. Väljavalitud *N. apis* ja *N. ceranae* spetsiifilisi PCR praimereid saaks tulevikus kasutada nosematoosnakkuse põhjustaja PCR-põhise meetodiga tuvastamiseks ka Eestis.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Mesilaste levinud seenhaigused

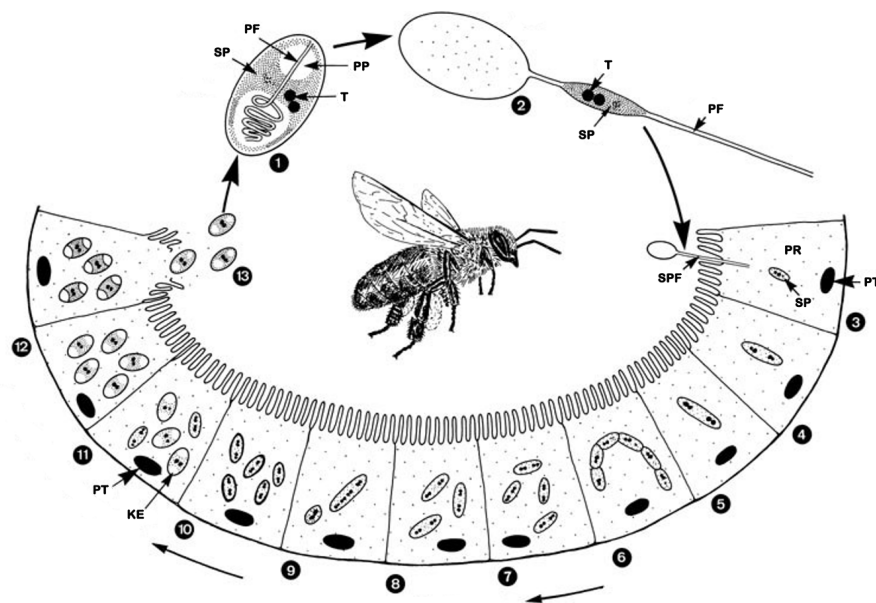
Mesilaste tervist mõjutavad tihti toitainetepuudusest tingitud stress, ravimid, parasiidid ja patogeenid (Dolezal ja Toth, 2018). Seeneriigi esindajate põhjustatud mesilashaiguste hulka kuuluvad lubihaue ja kivihaue (Jensen *et al.*, 2013), melanoos (Riis, 2014) ja noseматоos (Dolezal ja Toth, 2018). Lubihaue ehk askosferoos on mesilaste vastsete haigus, mida põhjustab parasiitseene *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) (Cornman *et al.*, 2012; Spiltoir, 1955). Kivihaue ehk aspergilloos on harva esinev ja üsna madala patogeensusega mesilaste pesakonna haigus, mida põhjustab parasiitseente perekond *Aspergillus*, eriti liik *A. flavus* (Foley *et al.*, 2014; Jensen *et al.*, 2013). Melanoosi põhjustab *Melanosella mors-apis* nimeline seeneliik, kes nakatab eelkõige mesilasema, nakatuda võivad ka töomesilased (Riis, 2014).

Nosematoos on ülemaailmselt väga levinud täiskasvanud mesilaste seenhaigus (Aufauvre *et al.* 2012; Hornitzky, 2008). Nosematoosile ainuomased sümptomid puuduvad - need sarnanevad suuresti muude haiguste kulule. Niisiis on haigust keeruline diagnoosida, kerge teiste tõbedega segamini ajada ning see jääb tihtipeale märkamata, mistõttu tuntakse seda ka kui “vaikset tapjat”. (Gajger *et al.*, 2009; Hornitzky, 2008) Nakkuse põhjustatud tagajärgi mesilaspesakonnas peetakse võrdväärseks või suuremaks kui kõikide teiste mesilashaiguste puhul (Hornitzky, 2008). Nosematoos kuulub Eestis registreerimiskohustuslike loomataudide hulka - kuigi nakkus ei mõjuta suuresti üldist kaubandust, võib nakkus avaldada väga suurt negatiivset mõju konkreetse mesilaspesakonna omanikule. Nosematoosi tuvastamisel tuleb sellest aruandluse käigus informeerida Põllumajandus- ja Toiduameti kohalikku asutust. (Abiks mesinikule..., 2016; Loomataudid..., 2021)

1.2. Nosematoos, *N. apis* ja *N. ceranae*

Nosematoositekitajad on ühed kõige laialdasemalt üle maailma levinud mesilasparasiidid (Fleites-Ayil *et al.* 2018). Mesilaste (perekond *Apis* liikides, sh *Apis mellifera*, *A. ceranae*, *A. florea*, *A. dorsata* (Chaimanee *et al.*, 2010)) seas levib seenhaigus nosematoos, mida põhjustavad kõrgelt spetsialiseerunud seeneriiki kuuluvad oportunistlikud obligatoorsed rakusisesed parasiidid, mikrosporiidid ehk pisieoselised *Nosema apis* ja *Nosema ceranae* (Asten *et al.*, 2019; Capella-Gutiérrez *et al.*, 2012; Corradi ja Keeling, 2009; Martín-Hernández *et al.*, 2011; Naudi *et al.*, 2019). Mikrosporiidid on üks takson, mille mitmekordne reklassifikatsioon ajas on olnud väga ulatuslik (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2012;

Corradi ja Keeling, 2009). Evolutsiooniline päritolu on jäänud tihtipeale ebaselgeks, sest mikrosporiidid on üldiselt väga primitiivsed, neil puuduvad eukarüootidele omased mitokondrid ja Golgi kompleks, kuid neis esineb ka väga kompleksseid struktuure (Corradi ja Keeling, 2009). Metaboolselt inaktiivsed spoorid on mikrosporiidide ainuke eluetapp, mis leiab aset peremeesrakust väljaspool (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2012; Corradi ja Keeling, 2009). Nende nakatamismehhanism töötab, kasutades peremeesraku membraani läbistamiseks polaarset filamenttorukest, surudes seejärel sporoplasma peremeesraku tsütoplasmasse (Joonis 1) (Corradi ja Keeling, 2009). Täna liigitatakse mikrosporiidid seeneriiki, kuid nende kindlas positsioonis fülogeneesipuul ei ole siiani konsensussele jõutud (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2012).



Joonis 1. Mesilastel nosematoosi põhjustava *N. apis*'e elutsüklil. T: tuum; SP: sporoplasma; PF: polaarne filamenttoruke; SPF: sisestatud polaarne filamenttoruke; PR: peremeesrakk; PT: peremeesraku tuum; KE: küps endospor; PP: polaroplast. 1) Nakkusohtlik spoor, mis sisaldab sporoplasmat (SP). 2) ja 3) Spoor sisestab polaarset filamenttorukest peremeesorganismi kesksoolde epiteelraku ning surub SP raku tsütoplasmasse. 4)-12) SP kasvab, paljuneb asekuaalsel teel, jaguneb, küpseb. 13) Küpsed ja nakkusohtlikud spoorid vabanevad peremeesrakust soolde ning nakatavad järgmisi rakke või väljutatakse organismist. Allikas: *Nosema apis*... (2008), muudetud.

Nakkust levitavad nii peremees kui ka mitteperemeesorganismid, kes elutegevuse käigus kannavad parasiite edasi, näiteks lillelt lillele, samuti enda kolooniasse (Graystock *et al.*, 2015). Lisaks on täheldatud *Nosema* spp. spooride levikut õhu kaudu (Sulborska *et al.*, 2019) ning mikrosporiidide spoore leidub palju ka pinnavees (Izquierdo *et al.*, 2011). Mõlema

nosematoosi põhjustava *Nosema* liigi (*Nosema apis* ja *Nosema ceranae*) tekitatud haigus väljendub mesilaste vähenenud aktiivsuses mee tootmisel ja korjetegevusel ning vähenenud tolmemendamise efektiivsuses (Bourgeois *et al.*, 2010). Nosematoos põhjustab nakatunud mesilastel kesksoole epiteelrakkude hävinemist, *N. ceranae* puhul nakatuvad ka muud koed, mis viib seede- ja ainevahetushäiretest tingitud toitainetevaeguse, *N. ceranae* puhul ka immuunpuudulikkuseni, ning enneaegse surmani (Dolezal ja Toth, 2018; Gajger *et al.*, 2009; Michalczyk *et al.*, 2013). Nosematoosnakkuste uurimiseks tuleb nakatunud mesilastest *Nosema* spp. spore ekstraheerida, kuid neid on tavaliselt piisavas koguses saadaval vaid parasvöötmealadel kevadel. Asjaolu, et patogeenid ei ole kultiveeritavad, teeb *Nosema* spp. nakkuse, arengu ja virulentsuse uurimise keeruliseks. (McGowan *et al.*, 2016) Liigi *Nosema apis* põhjustatud nosematoosi on kergem tuvastada - seda iseloomustab laiahaardeline mesilaste kõhulahtisus, sellest tulenev roojamine taru sissepääsu juures ning suuremahuline mesilaste suremus, ent *Nosema ceranae* nakkusele viitab peamiselt koloonia kahanemine või kidur kasv (Bourgeois *et al.*, 2010).

N. apis'e põhjustatud nosematoos on hooajaline, sest parasiitse eluviisiga mikrosporiidi areng sõltub tugevalt temperatuurist. Parim temperatuurivahemik parasiidi eoste kasvuks on 32–33 kraadi, alla ja üle selle vahemiku areng aeglustub või pidurdub. Mesilasperede nakatumine tõuseb sügisel, püsib talvel stabiilselt madalal ning nakkus saavutab haripunkti hiliskevadel. Haigete mesilaspesakondade taru sisemus on kaetud roojaga, raske nakkuse puhul on tarude põhi kaetud surnud mesilastega. (Asten *et al.*, 2019) Peamine nosematoosi infektsiooniallikas on tõenäoliselt roojaga saastunud vaha mesilaspesakonna kasvatamiseks kasutatavatel kärgedel või muudel taru sisepindadel (Bailey, 1955, viidatud Nosemosis..., 2019 kaudu). Nakatumine toimub mesilaspesakonna väljaheidetes leiduvate eoste alla neelamisel (*Nosema apis*..., 2008).

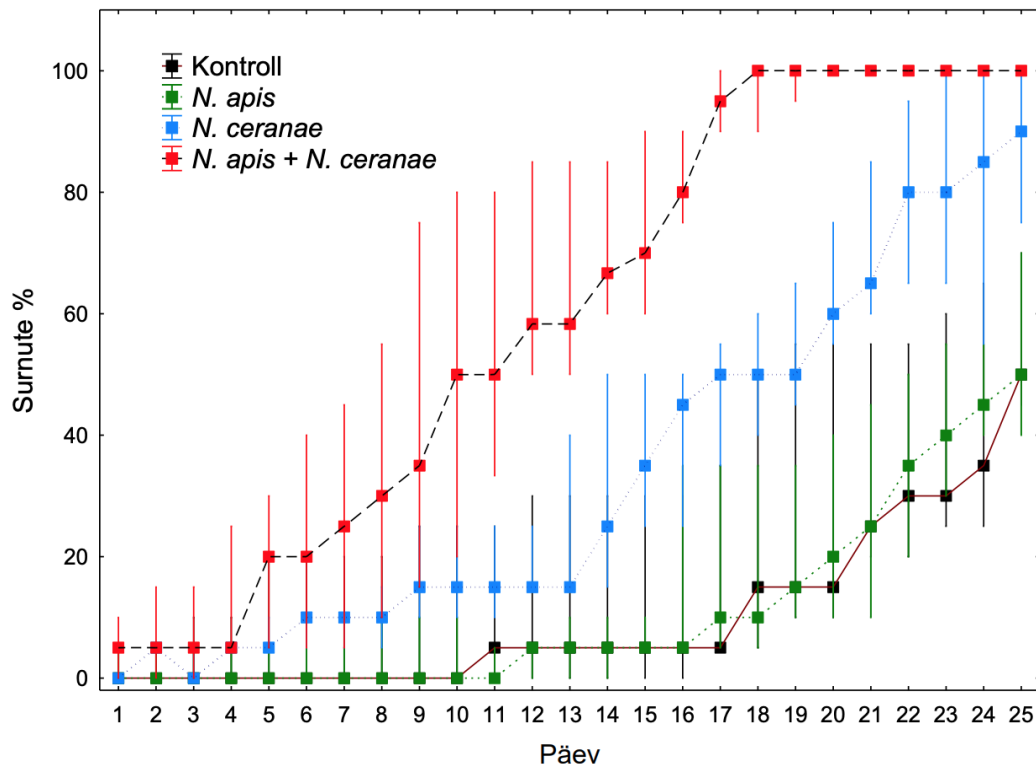
Liigi *N. ceranae* põhjustatud nosematoosi esineb sagedamini kui *N. apis*'e põhjustatud nakkust (Chen *et al.*, 2009b) ning seda esineb aastaringselt (Martín-Hernández *et al.*, 2007). *N. ceranae* puhul on 5 spoori piisav hulk nakatamaks kogu mesilaskolooniat (Sulborska *et al.*, 2019). *N. ceranae* nakkust on keerulisem tuvastada, sest selle puhul ei esine väliseid sümptomeid (Bourgeois *et al.*, 2010; Fries, 2010). Niisiis on välisel vaatlusel keeruline mesilaste vaevusi just haigustekitajaga *N. ceranae* seostada, mistõttu võib selle mikrosporiidi põhjustatud nosematoos jääda märkamata (Asten *et al.*, 2019) ja tekitada mesinikele palju probleeme (Bourgeois *et al.*, 2010). *N. ceranae* põhjustatud nosematoosi märkamata jäämise

korral püsib mesilasperes nakkuskoormus, mis pärsib pere arengut ning põhjustab isendite surma (Asten *et al.*, 2019). *N. ceranae* nakkusele on omane mesilaste kehva meesproduktioon, mesilasperede järkjärguline kahanemine ja arvukad surmad sügisel-talvel (Higes *et al.*, 2008). Pärsitud arengut ja kahanenud mesilaspere suurust püütakse kompenseerida, jätkates haudmetegevust ka hilissügisel, mil tuleks hakata valmistuma talvitumiseks. Intensiivne haudmetegevus põhjustab omakorda sööda liigset tarbimist, mis võib talvel viia kogu mesilaspere nälgimise ja hukuni. (Asten *et al.*, 2019) Pikk asümptomaatiline inkubatsiooniperiood võib olla põhjus, miks haiguse vältel selged nakkusele viitavad sümptomid enne mesilaspesakonna hukku puuduvad (Higes *et al.*, 2008).

Ühest küljest on täheldatud, et *N. ceranae*’l pole mesilase individuaalsel tasandil *N. apis*’e ees virulentsuses konkurentsieelist (Forsgren ja Fries, 2010). Teisalt on näidatud, et koloonia tasandil on *N. ceranae* virulentsem, millele viitab *N. ceranae* *N. apis*’e mesilaspopulatsioonidest välja tõrjumine ning *N. ceranae* esinemissageduse kasv, laialdasem levimus ja kõrgem mesilaste suremus võrreldes *N. apis*’ega (Chen *et al.*, 2009b; Klee *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2011; Paxton *et al.*, 2007). Samas ei pruugi *N. ceranae* esinemissageduse kasv ja laialdasem levik olla tingitud kõrgemast virulentsusest, vaid võrreldes valgusmikroskoopiaga palju spetsiifilisemate ja tundlikumate molekulaarsete tehnikate kasutuselevõtust (Matović *et al.*, 2020). Sellegipoolest on näidatud, et *N. ceranae* põhjustab mesilastel raskemini kulgevat noseματοosi kui *N. apis*. *N. ceranae* raskemalt kulgeva nakkuse põhjus võib olla mesilaste sooleepiteeli laialdasemast hävinemisest, seejuures toitainete omastamise vähesusest ja näljast tingitud energeetiline stress, mis on *N. ceranae* nakkuse puhul suurem kui *N. apis*’e nakkuse puhul. *N. ceranae* põhjustatud energeetiline stress viib immuunsüsteemi vastupanuvõime vähenemiseni ning seetõttu võrreldes *N. apis*’ega ka suurema mesilaste suremuseni. (Martín-Hernández *et al.*, 2011)

Looduslike infektsioonide seas on paralleelsed nakkused sagedased nähtused (Paxton *et al.*, 2007; Naudi *et al.*, 2019). *N. apis*’e ja *N. ceranae* seganakkust esineb tihti ning on leitud, et *N. ceranae* nakkus mesilaskolooniates ei takista *N. apis*’ega nakatumist ja nakkuse püsimist ega ka vastupidi (Martín-Hernández *et al.*, 2012; Paxton *et al.*, 2007). Kumbki liik ei välista teineteist mesilase individuaalsel ega ka koloonia tasandil (Forsgren ja Fries, 2010; Martín-Hernández *et al.*, 2012). On leitud, et *N. apis*’e ja *N. ceranae* puhaskultuuridega nakkuse ning mesilaste suremuse vahel statistiliselt olulist ($p \leq 0,05$) seost ei ole, kuid *N. ceranae* puhaskultuuri nakkuse puhul on mesilaste suremus võrreldes *N. apis*’e puhaskultuuri

nakkusega veidi kõrgem. Kahe liigi seganakkuse puhul tõuseb suremus märkimisväärselt (Joonis 2). Suremuse tõus *N. apis*'e ja *N. ceranae* seganakkuse puhul võib olla tingitud mõlema liigi põhjustatud energeetilise stressi tegurite kombineerumisest - tekib sünergeeruv või summeeruv efekt. (Järvis, 2019)



Joonis 2. Nosematoosi nakatunud mesilaste suremus (%) 25 päeva vältel. Joonisel on esitatud mediaanid koos protsentiilidega (25%, 75%). Kontrollgruppi kuulusid mesilased, keda toideti nakatamata, puhta söödasiirupiga. Allikas: Järve (2019).

Nosematoosi kulgu mesilasperes raskendavad sellega kaasnevad haigused, mis viivad mesilaste suurema suremuseni. Nosematoos soodustab mesilaste musta emakupu viiruse, elujõuetu haudme ning mesilaspere ootamatu suremuse sündroomi ehk kollapsi tekkimist. Lisaks esineb nosematoosiga käsikäes sagedasti ka amöbiaasi, niitviirust ning ainuüksi nosematoosiga mesilase Y-viirust. (Abiks mesinikule..., 2016; Fries *et al.*, 2013; Oherd ja Vari, 2015; Riis, 2014) Naudi *et al.* (2019) uuring näitas, et nosematoos on vastupidav haigus - 2012. aastal nakatunud mesilastest oli 5 aasta pärast haigusest vabanenud vaid 30%. *N. apis* ja *N. ceranae* põhjustatud nakkuse kulgu ja tagajärjed on erinevad, mistõttu on nosematoosi põhjustavate *N. apis*'e ja *N. ceranae* eristamine oluline (Bourgeois *et al.*, 2010; Naudi *et al.*, 2019).

Huang *et al.* (2013) tööühm toob oma uuringus välja, et ainus teadaolev ja efektiivseks peetav ravi nosematoosi vastu oli 2013. aasta seisuga antibiootikum fumagilliin, mis hoiab *Nosema apis*'e nakkust kontrolli all ning pärsib mõneti *Nosema ceranae* nakkust. See-eest soodustab see pikkade ravikuuride vaheliste perioodide tõttu *N. ceranae* hüperprolifereerumist ning on mürgine nii mesilastele, lühendades soovimatu kõrvalmõjuna nende eluiga, ning kõikidele selgroogsetele. (Burnham, 2019; Huang *et al.*, 2013) Mitmetes riikides, kaasa arvatud Euroopa Liidu liikmesriikides on fumagilliini põllumajanduslik kasutamine keelatud. Niisiis on väga suur nõudlus uue ravimeetodi vastu, mis oleks nosematoosi, eriti *N. ceranae* nakkuse ravimisel efektiivne ning ohutu nii mesilastele kui ka inimestele. (Burnham, 2019; Gajger *et al.*, 2009, Huang *et al.*, 2013) Ravi arendamisel tuleb arvestada nosematoosi nakkuse tekitajate liigiliste erinevustega. Tõenäoliselt on *N. ceranae* puhaskultuuri nakkuse ja seganakkuse korral tarvis rakendada intensiivsemat ravi, näiteks kõrgemat ravimi kontsentratsiooni ja/või pikemat ravikuuri kui *N. apis*'e puhaskultuuri nakkuse korral. Nosematoositekitaja liigiline määramine võiks saada mesinduse oluliseks osaks, et mesinikud saaksid nakkusallika kiiresti kindlaks määrata ja mesilaspesakondadele õigel ajal õiget ravi või vastavaid ennetusmeetodeid rakendada (Bourgeois *et al.*, 2010; Naudi *et al.*, 2019).

1.3. *Nosema* liikide tuvastamiseks kasutatavad meetodid

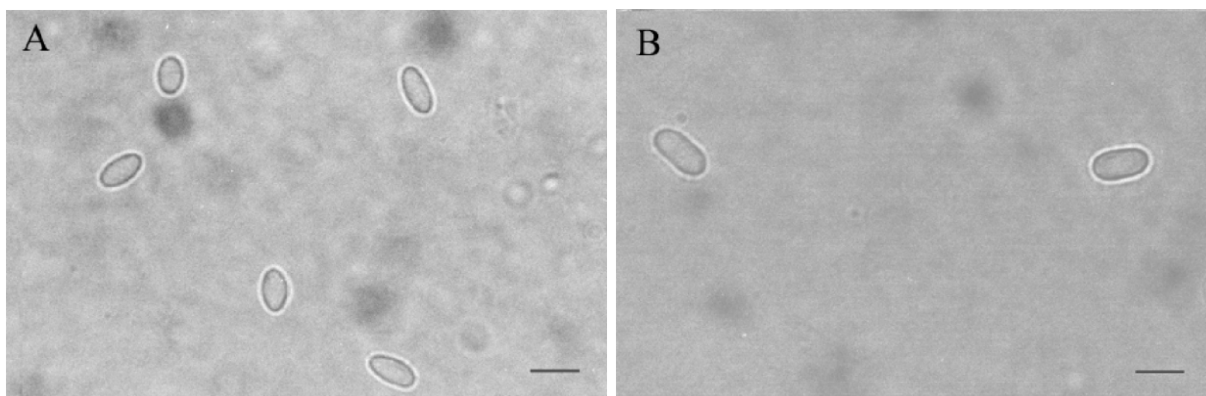
Tänapäeval kasutatakse nosematoosi tekitavate pisieoseliste parasiitide eristamiseks valgus- või elektronmikroskoobipõhist vaatlust (Fries, 2010) või mitmeid PCR-põhiseid molekulaarseid meetodeid (Chen *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2006; Klee *et al.*, 2006; Klee *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007).

1.3.1. Mikroskoopia

Traditsiooniliselt on nosematoosnakkuse tuvastamiseks kasutatud valgusmikroskoopianalüüsi, mis põhineb *Nosema* spp. eoste visuaalsel arvulisel määramisel (Hamiduzzaman *et al.*, 2010). Valgusmikroskoopia käigus määratakse proovis *Nosema* liikide eoste arv, tuginedes *N. apis*'e ja *N. ceranae* eoste erinevale suurusele (Fries *et al.* 2006). Eesti Veterinaar- ja Toidulaboratooriumi (VTL) bakterioloogia-patoloogia osakonna liige Katrin Peik täpsustas kirjavahetuses autoriga, et VTLis kasutatakse *Nosema* spp. eoste arvulist määramist - loendamine toimub Neubaueri kambris, kuid see ei võimalda liike *N. apis* ja *N. ceranae* teineteisest eristada. Elektronmikroskoopiat on kasutatud *Nosema* spp. detailse struktuuri ja arengustaadiumite kirjeldamiseks (Fries, 1989; Fries *et al.*, 1992) ning *Nosema* liikide

tuvastamiseks, eristades liike nende spooridesiseste struktuuride erineva arvu põhjal (Chen *et al.*, 2009a; Fries *et al.*, 2006).

Vastuolulistest uurimistöö tulemustest tingituna peetakse nii valgus- kui ka (transmissioon)elektronmikroskoopiat (TEM) lähedalt seotud mikrosporiidide liikide üksteisest eristamiseks ja fülogeneetiliseks määratlemiseks ebatäpseks ja ebausaldusväärseks meetodiks (Fries *et al.*, 2006). Kuigi *N. ceranae* spoorid on pea alati *N. apis*'e spooridest väiksemad (Joonis 3), on valgusmikroskoopanalüüsimeetodil neid keeruline, eriti segainfektsiooni puhul teineteisest morfoloogiliselt eristada ja kvantifitseerida (Chen *et al.*, 2009b; Fries *et al.* 2006) ning objektiivset tulemust ei ole võimalik saavutada (Ptaszyńska *et al.*, 2014). Valgusmikroskoopanalüüs ei ole laialdaselt soovitud meetod tingituna ka selle kulukusest, töömahukusest ja ajakulust (Hamiduzzaman *et al.*, 2010; Martín-Hernández *et al.*, 2007). Lisaks on meetodit rakendades tarvis pikaajalist kogemust, et tuvastada nakkust ka selle varajases staadiumis (Klee *et al.* 2006). TEM on sobilik vaid proovide suhteliselt väikese ala uurimiseks, kuid *N. apis*'e ja *N. ceranae* eristamisel soovitatakse kasutada skaneeriv elektronmikroskoopiat (SEM). SEMiga on võimalik väga üksikasjalikult visualiseerida mikrosporiidide morfoloogilisi ja struktuurseid detaile, mistõttu sobib see hästi nakkuse kinnitamiseks ja selle tõsiduse määramiseks. (Ptaszyńska *et al.*, 2014) Sellegipoolest on analüüsimeetodi ühtlustamiseks ja optimeerimiseks ning *Nosema* liikide üksteisest eristamise tundlikkuse, spetsiifilisuse ja usaldusväärsuse suurendamiseks tarvis kasutusele võtta PCR-meetodipõhised molekulaarsed tehnikad (Fries *et al.*, 2006; Hamiduzzaman *et al.*, 2010; Martín-Hernández *et al.*, 2007).



Joonis 3. *Nosema ceranae* (A) ja *Nosema apis*'e (B) eoseid on valgusmikroskoopanalüüsil keeruline eristada. Joone pikkus piltidel on 5 µm. Allikas: Fries *et al.* (2006).

1.3.2. Molekulaarsed meetodid

Morfoloogiliselt on *Nosema* liikidel keeruline vahet teha, mistõttu on arendatud mitmeid erinevaid molekulaargeneetilisi meetodeid *Nosema* liikide kiireks ja täpseks teineteisest eristamiseks (Chen *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2006; Klee *et al.* 2006; Klee *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007). Molekulaarsed lihtsa tööpõhimõttega ülimalt tundlikud meetodid on enamjaolt polümeraasahelreaktsiooni (PCR) põhised ning võimaldavad mesilastes *Nosema* spp. olemasolu tuvastada ka siis, kui visuaalne vaatlusel neid ei detekteeritud. PCR on kiire, odav ja sensitiivne meetod spetsiifilise geneetilise materjali amplifitseerimiseks ja on laialdaselt kasutusel erinevatel diagnostilistel testidel. PCR-põhiste testide puhul kasutatakse nosematoosnakkuse tuvastamiseks tervete mesilaste või mesilaste erinevate kudede homogenaadist saadud DNA ekstrakti. (Fries *et al.*, 2013)

Samas tuleb tundlike molekulaarsete meetodite tulemuste tõlgendamisse suhtuda ettevaatlikult. Kuigi *Nosema* spp. olemasolu proovis võib olla tuvastatud, ei pruugi vegetatiivses faasis *Nosema* liigid ning väike spooride hulk peremeesorganismile mõju avaldada. (Fries *et al.*, 2013) Fries (2010) toob oma töös välja, et *Nosema apis*'e ja *N. ceranae* infektsiooni tuvastamiseks ja diagnoosimiseks on kirjeldatud mitmeid erinevat tüüpi PCR-põhiseid meetodeid, sealhulgas polümeraasahelreaktsiooni restriksiooni fragmendi pikkuse polümorfismi (PCR-RFLP) meetodit (Klee *et al.* 2006; Klee *et al.* 2007), liigispetsiifilisi praimereid kasutavat *singleplex* PCR meetodit (Chen *et al.* 2008) ning *multiplex* PCR-i (Hamiduzzaman, 2010; Martín-Hernández *et al.*, 2007), mis võimaldab kahe või enama (Guimarães-Cestaro *et al.*, 2016) liigi DNA samaaegset amplifikatsiooni. Eristamine toimub tavaliselt, tuginedes praimeridisainiks valitud 16S rRNA regiooni amplifikatsioonile (Chen *et al.*, 2008; Fries *et al.*, 2013; Higes *et al.*, 2006; Klee *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Stevanovic *et al.*, 2011; Webster *et al.*, 2004).

PCR-RFLP meetod põhineb PCR produktide sobilike restriksiooniensüümidega lõikamisel. Kindlaid restriksiooniensüüme kasutades saadakse erinevate pikkustega polümorfseid fragmente, mida kasutatakse liikide tuvastamise markeritena (Kim *et al.*, 2017). Meetod võimaldab eristada ühenukleotiidsel polümorfismi (SNP) täpsusega erinevate liikide DNA järjestusi (Duta-Cornescu *et al.*, 2009). *N. apis*'e ja *N. ceranae* sihtmärkjärjestuste proovimaterjalist tuvastamine põhineb liikide 16S rRNA geeni konserveerunud regioonidel ning kasutatud restriksiooniensüümid on PacI, NdeI ja MspI (Klee *et al.*, 2007). PacI lõikab *N. ceranae* unikaalset saiti ning NdeI teeb seda *N. apis*'e puhul. Ensüümi MspI kasutati katse

kontrollensüümina - see lõikab kõikide uuringus kasutatud *Nosema* liikide PCR produkte ning annab märku katse õnnestumisest (Klee *et al.*, 2007). PCR-RFLP tulemusi on võimalik UV-valguses visualiseerida, kasutades agarose-geelelektroforeesil etiidiumbromiidi sisaldavat geeli, ning järjestuste kauguste põhjal nullpunktist tuvastada konkreetse organismi DNA järjestuse olemasolu analüüsitud materjalis (Stevanovic *et al.*, 2011). Stevanovic *et al.* (2011) ning Gisder ja Genersch (2013) toovad enda uuringutes välja, et kuigi PCR-RFLP on ajakulukam ja kallim kui edaspidi kirjeldatud *uniplex/singleplex* ja *multiplex* PCR, on see meetod siiani olnud *Nosema* liikide tuvastamisel ja eristamisel 100% täpne.

Singleplex PCR meetodi puhul kasutatakse proovis oleva konkreetse organismi DNA sihtmärkjärjestuse tuvastamiseks liigspetsiifilist praimeripaari. Mitme erineva organismi geneetilise materjali tuvastamiseks proovist tuleb iga organismi puhul teha individuaalne reaktsioon, kasutades erinevaid praimeripaare (Chen *et al.* 2008). Chen *et al.* (2008) tööühm on oma uurimistöös kasutanud liikide *N. apis* ja *N. ceranae* samaaegseks tuvastamiseks *singleplex* PCR meetodit, kasutades mõlema *Nosema* perekonna liigi 16S rRNA geeni konserveerunud regioonidele disainitud universaalseid perekonna-spetsiifilisi PCR praimereid. Perekonna-spetsiifilisi praimereid kasutades on võimalik tuvastada, kas konkreetses proovis on perekond *Nosema* esindajate DNA järjestusi. Kahe *Nosema* liigi proovis eristamiseks on disainitud ka liigspetsiifilised praimeripaarid (Chen *et al.* 2008). *Multiplex* PCR võimaldab ühes reaktsiooniproovis detekteerida ja amplifitseerida samaaegselt kahe või enama eri liiki organismide märklaudjärjestusi (Guimarães-Cestaro *et al.*, 2016). Võrreldes *singleplex* PCR meetodiga on *multiplex* PCR märkimisväärselt odavam ning vähem ajakulukam (Edwards ja Gibbs, 1994; Martín-Hernández *et al.*, 2007). *Multiplex* PCR meetod on odavam ja vähem ajakulukam seetõttu, et näiteks proovist spetsiifiliste *Nosema* liikide identifitseerimiseks on tarvis kasutada vaid ühte reaktsiooniseguga eppendorfi mitme samasuguse reaktsiooniseguga anuma asemel. Katse korraldamiseks kulub vähem ühekordseid anumaid, proovimaterjali ja kulukaid reagente ning katse ettevalmistamine on lihtsam ja kiirem (Edwards ja Gibbs, 1994; Guimarães-Cestaro *et al.*, 2016).

Paljud praimerid on disainitud kasutamiseks tavapärase PCR-i puhul, kuid on avaldatud ka protokolle ja praimereid qPCR-i (kvantitatiivse PCR-i) jaoks, mis võimaldavad ka *N. apis*'e ja *N. ceranae* kvantifikatsiooni. Kvantitatiivse PCR praimerite tundlikkust ja usaldusväärsust tuleb igas eraldiseisvas laboris testida (Bustin ja Huggett, 2017; Fries *et al.*, 2013). Siiani on laborites nosematoosi diagnostikaks kasutatud erinevaid praimerijärjestusi, DNA

ekstraheerimis- ning visualiseerimismeetodeid (Erler *et al.*, 2012), kuid kvantitatiivse PCR praimerite amplifikatsiooni tulemus võib varieeruda olenevalt rakendatud DNA ekstraheerimismeetodist, reaktsioonireagentidest ning ka kasutatud termotsüklerist (Bustin ja Huggett, 2017). Seda seetõttu, et protokollid on välja töötatud spetsiifiliste seisundite hindamiseks ning need ei ole kinnitatud võrreldavates oludes kasutamiseks (Erler *et al.*, 2012). Tänapäeval on diagnostiliste markerite ja nende detektsioonipiiride kohta olemas vähe usaldusväärset omavahel võrreldavat informatsiooni (Erler *et al.*, 2012) ning erinevate meetodite eri oludes kasutamine võib viia vastuoluliste tulemusteni (Fries *et al.*, 2013). Enamikes uuringutes on välja toodud kasutatud praimerite järjestused, ent mitte protokolle, mida järgides nendeni jõuti. Laboriteülese võrreldavuse saavutamiseks ja optimaalseima naseematoosi diagnostika protokolle välja töötamiseks võiks olla uuringutes üles määratud ka täpne praimeridisaini protokoll, mis võimaldaks korrata praimerite disainiprotsessi. See lubaks lihtsamini tuvastada ja hinnata, kas liigispetsiifiliste praimerite disaini ja kasutamise ebaõnnestumisel oli tegu ebakvaliteetsete praimerite või alternatiivsete katsetingimustega.

1.4. Liigispetsiifiliste PCR praimerite disain

1.4.1. Liigispetsiifiliste praimerite disaini üldised põhimõtted

Praimerid on PCR analüüsi ühed kõige olulisemad komponendid - neist sõltub meetodi tundlikkus ja spetsiifilisus (Abd-Elsalam, 2003; Bustin ja Huggett, 2017; Dieffenbach *et al.*, 1993; Ye *et al.*, 2012). Liigispetsiifiliste PCR praimerite disaini puhul on oluline jälgida, et loodud praimerid seonduksid vaid soovitud kohta ning amplifitseeriks vaid sihtmärkjärjestust. Sihtmärkjärjestus on konkreetse organismi geneetiline materjal, mida plaanitakse paljundada, mittesihhtmärkjärjestus omakorda teiste samas proovis esinevate organismide geneetiline materjal, mida amplifitseerida ei soovita. Kõige olulisemad omadused kvaliteetsetel PCR praimeritel on nende tundlikkus, mida iseloomustab sihtmärkjärjestuse tuvastamine väga madalate kontsentratsioonide juures, ning spetsiifilisus ehk ainult sihtmärkjärjestuse, seejuures mitte ühegi teise proovis sisalduva mittesihhtmärkjärjestuse ära tundmine. (Raime, 2015)

Praimerite disainiprotsess koosneb mitmest etapist. Esmalt määratletakse sihtmärk- ja mittesihhtmärkjärjestused, leitakse saadavalolevatest andmebaasidest või sekveneerides vajalike järjestuste info ning koostatakse referentsjärjestuste andmebaas (MacDonald ja Sarre, 2016). Seejärel joondatakse, võrreldakse erinevaid geenijärjestusi omavahel ning valitakse välja disainiks kasutatav genoomipiirkond (Klymus *et al.*, 2020). PCR praimerite

seondumiseks sobilikud genoomipiirkonnad on regioonid, mis on ühe taksoni, näiteks liigi raames konserveerunud, kuid varieeruvad eri taksonite vahel, et vältida mittesihhtmärkjärjestuste tuvastamist (Villard ja Malausa, 2013). Juhul, kui konkreetse organismi tuvastamiseks kasutatakse ühe liigi raames konserveerunud genoomipiirkonda, välditakse valenegatiivsete tulemusteni jõudmist, ning juhul, kui mittesihhtmärkjärjestusega organismides esineb selles regioonis piisavalt varieeruvust, välditakse valepositiivsete tulemusteni jõudmist (Wilcox *et al.*, 2013). Viimase etapina enne praimerite empiirilist, *in vitro* valideerimist on tarvis praimereid *in silico* genereerida, analüüsida, kontrollida nende sihtmärkjärjestusega spetsiifilisust ning seejärel sobilikud praimeripaarid välja valida (Derveaux *et al.*, 2010; Klymus *et al.*, 2020).

On avaldatud mitmeid PCR praimerite optimaalse disaini põhimõtteid käsitlevaid teadusartikleid (Bustin ja Huggett, 2017; Derveaux *et al.*, 2010; Klymus *et al.*, 2020). Sellegipoolest võib paljudes PCR-põhist meetodit kasutavates uuringutes leida praimeridisaini protsessis olulisi puuduseid. Tavapäraselt on protsessi kirjeldus ja kaasatud info ebapiisav andmaks hinnanguid konkreetse uuringu järelduste tõepärasusele, näiteks ei märgita üles uuringutes kasutatud praimerijärjestusi või jäetakse kõrvale info, kuidas konkreetsete järjestusteni jõuti (Bustin ja Huggett, 2017). Praimeridisainil kasutatakse erinevaid programme, näiteks Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012), PerlPrimer (Marshall, 2004), SP-designer (Villard ja Malausa, 2013), PRISE2 (Huang *et al.*, 2014), jms, millel kõikidel on oma eelised ja puudused: programmid erinevad üksteisest teoreetilise vundamendi, selektsioonikriteeriumite, arvutusliku efektiivsuse, kasutamise lihtsuse, interaktiivse disaini ning terviklikkuse poolest (Dieffenbach *et al.*, 1993; SantaLucia, 2007). Nendest erinevustest tulenevalt varieerub ka PCR praimerite disaini kvaliteet (SantaLucia, 2007). Ebatäpsest disainiprotsessist tulenevalt võivad praimerid olla ebaspetsiifilised, seonduda sihtmärkjärjestusega sarnaste mittesihhtmärkjärjestustega ning moodustada sekundaarstruktuure. Kehv praimeridisain käsikäes optimeerimata reaktsioonitingimustega vähendab meetodi täpsust, viies valenegatiivsete või -positiivsete tulemusteni. (Bustin ja Huggett, 2017)

1.4.2. Liigispetsiifiliste praimerite disaini etapid *Nosema* spp. tuvastamiseks

Esimene etapp liigispetsiifiliste praimerite disainil on sobiva sihtmärk- ja mittesihhtmärkjärjestuste määratlemine ning nende järjestustest referentsandmebaasi kokkupanek (Klymus *et al.*, 2020). Laialdast informatsiooni erinevate järjestuste kohta leiab

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (NCBI Resource Coordinators, 2018), RefSeq (O’Leary *et al.*, 2016), GenBank (Clark *et al.*, 2016), Ensembl (Howe *et al.*, 2021), jt andmebaasidest. Klymus *et al.* (2020) toovad variantidena välja ka BOLD (Barcode of Life Database) (Ratnasingham ja Hebert, 2007), EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory-The European Bioinformatics Institute) (Madeira *et al.*, 2019) ning DDBJ (DNA Data Bank of Japan) (Fukuda *et al.*, 2021) andmebaasid. Avalikes andmebaasides ei pruugi kõiki vajalikke järjestusi täismahus olemas olla, mistõttu on vahel tarvis enne praimerite disaini sihtmärk- või mittesihhtmärkjärjestusi juurde sekveneerida. (MacDonald ja Sarre, 2016) Referentsjärjestuste andmebaas, mis minimeerib järjestuste väärtuvastamise riskid, peaks sisaldama mitme sama liigi indiviidi sihtmärkjärjestusi ning kõiki sihtmärkjärjestusega sarnaseid mittesihhtmärkjärjestusi (MacDonald ja Sarre, 2016), mida võib proovimaterjalist, noseматоosi tuvastamisel näiteks peremeesorganismi kudetest või roojast tuvastada (Erler *et al.*, 2012).

Liigispetsiifiliste praimerite disaini järgmine etapp on kõikide referentsandmebaasi kogutud järjestuste joondus ja võrdlus praimeridisainiks kõige sobilikuma genoomiregiooni leidmiseks (Klymus *et al.*, 2020; MacDonald ja Sarre, 2016). Referentsjärjestuste joondamise ja võrdlusega on võimalik kontrollida, kas praimerid disainiks valitud sihtmärkjärjestuse mõni regioon tagab piisava eraldusvõime ning piirab tuvastamist soovitud taksoni, näiteks liigi raames. Juhul, kui valitud sihtmärkjärjestuses esineb konserveerunud, identseid alasid, mis varieeruvad mittesihhtmärkjärjestustes piisaval määral tagamaks ebaefektiivne praimerite seondumine, on valitud sihtmärkjärjestus sobilik praimerite disainiks. (MacDonald ja Sarre, 2016) Andmebaasist leitud järjestuste samaaegseks joondamiseks ning sihtmärk- ja mittesihhtmärkregioonide tuvastamiseks on tarvis kasutada mitme järjestuse joondust. Selleks on loodud mitmeid sama funktsiooni, kuid erinevate omadustega programme, sealhulgas ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), T-coffee (Notredame *et al.*, 2000), MUSCLE (Edgar, 2004), Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) jms. ClustalW on mitme järjestuse joonduseks kõige enam kasutatud programm, T-coffee on selle kiirem ja täpsem edasiarendus ning MUSCLE lubab lisaks kiirusele ja täpsusele joondada mitusada järjestust korraga. Programmid töötavad kõige paremini valkude puhul ning annavad infot kõige konserveerunumate ja vähem konserveerunumate regioonide kohta. (Claverie ja Notredame, 2007)

Järgnevalt on tarvis valida kandidaat-genoomiregioonidest välja kõige sobivam regioon

liikide tuvastamiseks ja eristamiseks, disainiks kasutatav genoomipiirkond (Klymus *et al.*, 2020). Tavaliselt on organismis mitme koopiana esinevad mitokondriaalsed geenid *Nosema* liikide puhul selleks sobilik valik, sest tagavad hea eraldusvõime ning võivad olla keskkonnaproovides vähem lagunenud kui tuumageenid (Pompanon *et al.* 2012). Kõikide elusorganismide 16S rRNA geenid sisaldavad kõrgelt konserveerunud regioone (Chaimanee *et al.*, 2011), mistõttu on paljudes varasemates uuringutes *N. ceranae* ja *N. apis*'e liigiti tuvastamiseks kasutatud mitokondriaalse 16S rRNA geeni järjestusandmeid (Chen *et al.*, 2008; Fries *et al.*, 2013; Higes *et al.*, 2006; Klee *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Stevanovic *et al.* 2011; Webster *et al.*, 2004), kuid Gisder ja Genersch (2013) ning Sagastume *et al.* (2011) tööd viitavad, et sellele tuginevad analüüsid ei pruugi olla usaldusväärsed. Sagastume *et al.* (2011) tuvastasid *N. cerane* 16S rRNA geenis väga suure varieeruvuse - Euroopa ja Kesk-Aasia populatsioonidest leiti 79 erinevat haplotüüpi.

Gisder ja Genersch (2013) pakuvad välja alternatiivse sobiliku genoomipiirkonna *Nosema apis*'e ja *N. ceranae* liigispetsiifiliseks tuvastamiseks - RPB1 (DNAs tõltuva RNA polümeraas II suurima subühiku) geeni kodeeriva järjestuse. Oluline valku kodeeriv geen on konserveerunud, varieerub liigisiselt vähe ning selle kasutamine tagab, et liikidevahelist rekombinatsiooni ei toimu või toimub vähemal määral. Seda seetõttu, et vastasel juhul põhjustaksid muutused järjestuses sellelt kodeeritava valgu funktsiooni häirumist. (Claverie ja Notredame, 2007; Gisder ja Genersch, 2013; Ku *et al.*, 2007) Gisder ja Genersch (2013) demonstreerisid oma uuringus, et varasemalt 102 valgusmikroskoopia abil tuvastatud *Nosema* spp. positiivsest proovist ei suuda vastupidiselt RPB1 geenijärjestusele disainitud praimeritele korrektselt eristada *N. apis*'e ja *N. ceranae* puhas- ja seganakkuseid Martín-Hernández *et al.* (2007) ja Chen *et al.* (2008) 16S rRNA regioonile disainitud praimerid (Tabel 1). Martín-Hernández *et al.* (2007) disainitud praimer 218MITOC madalat *N. ceranae* liigispetsiifilisust kinnitas ka Erler *et al.* (2012) uuring. Praimerite madala spetsiifilisuse põhjus võib olla liigisisene varieeruvus või mikrosporiididele omane mitme mittehomoloogilise koopiaga 16S rRNA geenidevaheline rekombinatsioon (Sagastume *et al.*, 2011; Gisder ja Genersch, 2013). PCR-RFLP meetodi kasutamise korrektne tulemus viitab sellele, et kasutatud restriksiooniensüümide lõikamissaite ei ole rekombinatsioon veel mõjutanud (Gisder ja Genersch, 2013). RPB1 geenijärjestuse töökindlus, usaldusväärsus ja spetsiifilisus on kontrollitud ning selle kasutamine *Nosema* spp. liigispetsiifiliste praimerite disainiks eeldatavasti *single*- ja *multiplex* meetodil sobilikum kui 16S rRNA geeni järjestusandmete kasutamine (Gisder ja Genersch, 2013; Ku *et al.*, 2007).

Tabel 1. Nelja erinevate tingimustega meetodi tulemused 102 *Nosema* spp. positiivse proovi tuvastamisel. Allikas: Gisder ja Genersch (2013).

	RPB1 (Duplex-PCR)	16S rRNA (PCR-RFLP)	16S rRNA (Duplex-PCR)	16S rRNA (PCR)
	Gisder ja Genersch (2013)	Klee <i>et al.</i> (2007)	Martín-Hernández <i>et al.</i> (2007)	Chen <i>et al.</i> (2008)
<i>N. apis</i>	39	39	23	3
<i>N. ceranae</i>	50	50	47	76
<i>N. apis</i> 'e + <i>N. ceranae</i> seganakkus	13	13	32	12
Kokku	102	102	102	91

Pärast sobiliku genoomipiirkonna valikut, enne praimerite disaini, soovivad Andreson *et al.* (2006a) sihtmärkjärjestuse maskeerida. Maskeerimine on disainitavates praimerites soovimatute, mittespetsiifiliste järjestustega seondumise vältimiseks kõige lihtsam ja efektiivsem viis (Andreson *et al.*, 2006a) ning võib kaasa aidata PCR-i edukusele (Andreson *et al.*, 2006b). Järjestuse maskeerimise käigus asendatakse järjestuse madala keerukusega regioonid muu sümboliga, näiteks tähisega “X”, “N” või väikse tähega, mis võimaldavad järjestuses maskeerida korduseid ja SNPe (Andreson *et al.*, 2006a). Järjestuse madala keerukusega alad, näiteks kordused nukleotiidses järjestuses “ATATATATA”, tekivad organismides sageli ja sõltumatult (Frith, 2011). Seetõttu esineb nendes regioonides järjestuste vahel väga suur sarnasus, kuhu soovitakse praimerite seondumist vältida (Derveaux *et al.*, 2010). Sihtmärkjärjestuse maskeerimiseks soovivad Andreson *et al.* (2006a) kasutada korduste ja SNPide maskeerimist ühendavat programmi SNPmasker (<https://bioinfo.ut.ee/snpmasker/>). PCR praimerite disainiks ebasobivate kordusjärjestuste maskeerimiseks on Kõressaar *et al.* (2018) töögrupp avaldanud ka programmi Primer3_masker, mis on hõlpsaks kasutuseks Primer3 programmi integreeritud. Programmid on see-eest sobilikud vaid piiratud arvu organismide genoomijärjestuse maskeerimiseks, mistõttu tuleb *Nosema* spp. puhul kasutada täna mõnda muud programmi.

Liigispetsiifiliste praimerite disaini järgmise etapi, praimerite *in silico* genereerimise, analüüsi ning unikaalsuse kontrolli (Klymus *et al.*, 2020; Derveaux *et al.*, 2010) eesmärk on luua spetsiifilised praimerid, mis oleks tuvastatava liigi siseselt kõrgelt konserveerunud, 3'-otsast unikaalsed ja sisaldaks piisaval hulgal mittesihtmärkjärjestustega mittepaarduvaid aluspaare (Wilcox *et al.*, 2013). See on oluline etapp, sest madala spetsiifilisusega ja/või vähetundlike

praimerite kasutamisel amplifitseeritakse mittesihthääljärjestusi, mis pädib valepositiivse tulemusega, või amplifikatsiooni ei toimu, mis tipneb valenegatiivse tulemusega (Andreson *et al.* 2008; MacDonald ja Sarre, 2016). Kvaliteetset PCR analüüsi iseloomustab pea sajaprotsendiline efektiivsus, kõrge tundlikkus ning robustsus ehk omadus, et meetod töötab usaldusväärselt ka kergete protokollist kõrvalekallete puhul (Bustin ja Huggett, 2017). PCR praimerite kvaliteeti mõjutavad mitmed kriteeriumid, mida on võimalik *in silico* testida: praimerite pikkus, G ja C nukleotiidide sisaldus, eeldatav sulamis- ja seondumistemperatuur, sekundaarstruktuurid, unikaalsus uuritava DNA raames ning SNPde olemasolu praimeris seondumiskohas (Abd-Elsalam, 2003). Üldiselt määravad praimerite spetsiifilisuse praimerite pikkus ning nende seondumistemperatuur (Dieffenbach *et al.*, 1993). Iga lisanduva nukleotiidi kohta muutub praimer 4 korda spetsiifilisemaks (Dieffenbach *et al.*, 1993) ning mida pikem ja seega stabiilsemalt järjestusega seonduv on praimer, seda efektiivsemalt toimub praimeris elongatsioon (Zhao ja Guan, 2010). Kvaliteetseid primereid iseloomustavad tunnused on, et need ei moodusta sekundaarseid struktuure, näiteks juuksenõelstruktuure ega dimeere, neil on sarnane sulamistemperatuur (T_m) ja G-C nukleotiidide sisaldus (Abd-Elsalam, 2003; Bustin ja Huggett, 2017; Ye *et al.*, 2012).

Aluspaaride mittepaardumised praimeris 3'-otsas mõjutavad amplifikatsiooni kõige rohkem (Wilcox *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2012), muude regioonide ja 5'-otsa mittepaardumistel on praimeris spetsiifilisusele väga väike mõju (Wilcox *et al.*, 2013). Sellegipoolest on praimeris täies ulatuses komplementaarsus liigispetsiifilisuse tagamiseks väga oluline (Stadhouders *et al.*, 2010), sest sihtmärkjärjestuse amplifikatsioon polümerisatsioonietapil toimub vähem efektiivselt ka siis, kui praimeris ja järjestuse vahel esineb mõni mittepaardumine (Wilcox *et al.*, 2013). Polümeraas ei saa paardumata nukleotiididega seonduda, millest tuleneb elongatsiooni blokeerumine või häirumine (Daher *et al.*, 2015). Lefever *et al.* (2013) töögrupp toob oma uuringus välja, et ≥ 4 mittepaarduva nukleotiidi esinemine ühes praimeris või ühes praimeris 3 ja teises praimeris vähemalt 2 mittepaarduva nukleotiidi esinemine blokeerib reaktsiooni täielikult ning spetsiifiliste praimerite *in silico* disainil tuleks jälgida, et praimeripaari puhul ei esineks enam kui 3 mittepaarduvat nukleotiidi, et vältida amplifikatsiooni blokeerumist. Amplifikatsiooni ei toimu ka siis, kui praimeris 3'-otsas esineb kuni 2. positsioonini aluspaaridevahelist mittepaardumist (Wilcox *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2012) ning 3.-6. positsioonis olevate aluspaaride mittepaardumise korral toimub amplifikatsioon minimaalsel määral (Álvarez-Fernández, 2013 viidatud Daher *et al.*, 2015 kaudu; Stadhouders

et al., 2010; Wu *et al.*, 2009). Samas on ka täheldatud, et ühel 3'-otsa mittepaardumisel pole piisavat mõju, et amplifikatsiooni takistada (Lefever *et al.*, 2019; Ye *et al.*, 2012). Mittepaardumiste amplifikatsioonitõenäosuses on silmatud hierarhiat - kõige tõenäolisemalt toimub amplifikatsioon, kui mittepaardumine toimub puriin-pürimidiin (A-C, C-A, G-T, T-G) vahel, järgneb pürimidiin-pürimidiin (T-T, C-T, T-C) ning kõige vähem tõenäolisemalt moodustub PCR produkt puriin-pürimidiin (A-A, A-G, G-A, G-G) või C-C nukleotiidide mittepaardumiste korral (Stadhouders *et al.*, 2010). Lefever *et al.* (2013) töögrupp sedastab, et kaugemal kui 3'-otsa 5. positsioonis asuvate aluspaaride mittepaardumine avaldab amplifikatsioonile mõõdukat mõju, kuid ei takista amplifikatsiooni.

Praimerite *in silico* disainiks kasutatakse laialdaselt programmi Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>), mis genereerib (maskeeritud) järjestusele tuginedes kõige sobilikumad praimerid. Programm kalkuleerib termodünaamika mudelitele toetudes praimerite sulamis- (T_m) ja seondumistemperatuurid ning ennustab ja väldib praimerite kalduvust moodustada sekundaarstruktuure. (Koressaar ja Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012) Andreson *et al.* (2006b) töögrupp juhib tähelepanu sellele, et programm Primer3 loob ette antud järjestusele tuginedes kõrgkvaliteetsed praimerid, kuid mõned praimeripaarid võivad sellegipoolest moodustada mitu PCR produkti. *In silico* disainile järgnevalt tuleks kontrollida praimerite unikaalsust - see võimaldab ennustada ja välja filtreerida praimerid, mis näiteks *multiplex* PCR puhul võivad omavahel seonduda või annavad genoomis mitu erinevat produkti (Andreson *et al.*, 2006b). Potentsiaalsete amplifikatsiooni sihtmärkide tuvastamiseks peavad Bustin ja Huggett (2017) asjakohaseks kasutada praimerite unikaalsuse hindamiseks NCBI Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) programmi, mis võimaldab teha nii olemasolevate praimerite spetsiifilisuse kontrolli kui ka sihtmärkjärjestusspetsiifiliste praimerite disaini (Ye *et al.*, 2012).

Primer-BLAST ühendab endas Primer3 funktsiooni, et disainida PCR praimerid, ning BLAST lokaalse joondamise (Altschul *et al.*, 1997) ja Needleman-Wunsch (NW) globaalse joondamise (Needleman ja Wunsch, 1970) algoritmid, et kontrollida praimerite spetsiifilisust (Ye *et al.*, 2012). Primer-BLAST kasutab identsete regioonide tuvastamiseks vaikeväärtusena sõnapikkust 7. See tähendab, et juhul, kui 18 nukleotiidi pikkusel praimeril on konkreetse järjestusega võrreldes 6. ja 12. positsioonil mittepaarduv nukleotiid, on pikima identse regiooni pikkus 6 nukleotiidi ja esineb vaid 2 mittepaardumist, kuid BLAST algoritm sarnasust ei tuvasta. (Kalendar *et al.*, 2017) Niisiis ei saa vaid BLASTil põhinevaid

programme kasutades informatsiooni kogu praimeril ulatuses praimer-järjestus paardumiste kohta ning mõni rohkemate mittepaardumistega, kuid potentsiaalselt amplifitseeritav sihtmärkjärjestus võib jääda märkamata. Probleemi lahendab mooduli teine etapp - NW globaalse joondamise algoritm. Primerite spetsiifilisuse tagamiseks peab praimer sihtmärkjärjestusega kogupikkuses seondunud olema, seega NW algoritm joondab praimer-järjestus paarduvad regioonid kogu praimeril ulatuses. Nii on võimalik potentsiaalselt amplifitseeritavate järjestuste vasteid saada ka sisestatud hulk praimer-järjestus vaheliste mittepaardumiste puhul. Primer-BLAST eelis teiste programmide ees on, et see lubab täpsustada mittepaardumiste arvu, mis praimeril peab mittesihtmärkjärjestusega ja nende 3'-otsaga olema. (Ye *et al.*, 2012)

Primer-BLAST annab Primer3 programmiga integreeritusest tulenevalt praimeritele tulemustes ka iseendaga komplementaarsuse ja iseenda 3'-otsaga komplementaarsuse skoorid. Skoorid iseloomustavad praimerite kalduvust moodustada praimeridimeere. “*Self complementarity*” ehk iseendaga komplementaarsus kirjeldab praimeril kalduvust seonduda iseenda või paarilisega. Skoor kujuneb vastavalt järgnevale lokaalse joonduse süsteemile: +1 punkt paardunud nukleotiidide, -1 mittepaardunud nukleotiidide, -2 punkti lünga eest. Skoor on 0, kui praimerite vahel ei esine märkimisväärset joondust. “*Self 3' complementarity*” skoor iseloomustab omakorda praimeril iseenda või paarilise 3'-otsaga hübridiseerumise tõenäosust. Skoori arvutamisel kasutatakse globaalset joondamist ning skoor on samuti 0, kui praimerijärjestuste vahel ei esine tähelepanuväärset joondust. (Untergasser *et al.*, 2012)

In silico praimerite disainile järgneb alati kandidaatprimerite eksperimentaalne kontroll (Derveaux *et al.*, 2010). Bustin ja Huggett (2017) rõhutavad, et põrumiskindlate praimeripaaride disaini on *in silico* võimatu teha. Primerid on tarvis empiiriliselt analüüsida, et määrata konkreetse organismi tuvastamise tarbeks disainitud liigspetsiifiliste praimerite tundlikkus ja efektiivsus. Primerite detektsioonipiir sõltub suuresti PCR protokollist, mida järgitakse, ning samuti võib amplifikatsiooni edukus sõltuvalt proovis sisalduva DNA kvaliteedist varieeruda. (Derveaux *et al.*, 2010; MacDonald ja Sarre, 2016) Alati ei ole selge, miks mõni praimerikombinatsioon töötab hästi või halvasti, mistõttu on tarvis iga primeridisaini tulemus eksperimentaalselt läbi proovida ning selle toimivus kinnitada (Bustin ja Huggett, 2017; Derveaux *et al.*, 2010).

2. Uurimus

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärk on leida sobivad liigispetsiifilised PCR praimerid noseematoosi põhjustavate mikrosporiidide *N. apis* ja *N. ceranae* tuvastamiseks. Küsimus, millele vastust otsitakse on: “Kas varasemalt avaldatud praimeripaarid *N. apis*’e ja *N. ceranae* eristamiseks on tõepoolest liigispetsiifilised?”. Eesmärgi saavutamiseks:

1. Leitakse teaduskirjandusest seni disainitud *N. apis*’e ja *N. ceranae* praimerijärjestusi;
2. Kontrollitakse nende liigispetsiifilisust, kasutades täna genoomiandmebaasides kättesaadavaid nukleiinhappejärjestusi;
3. Analüüsitakse olemasolevate praimerite eeliseid ja puuduseid mikrosporiidide *N. apis* ja *N. ceranae* tuvastamiseks/eristamiseks.

2.2. Materjal ja meetodika

Käesolevas töös töötati läbi *Nosema* liikide PCR-põhise tuvastamise teemal seni ilmunud teaduskirjandust, et leida siiani disainitud *N. apis*’e ja *N. ceranae* spetsiifiliste praimeripaaride järjestusi. Leitud *N. apis*’e ja *N. ceranae* tuvastamiseks disainitud praimerite liigispetsiifilisuse kontrollimiseks kasutati NCBI veebipõhist programmi Primer-BLAST, mis on ligipääsetav aadressil <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Otsinguks rakendati Primer-BLAST programmi, sest see hõlmab lisaks BLAST lokaalse joonduse algoritmile (Altschul *et al.*, 1997) ka globaalset NW algoritmi (Needleman ja Wunsch, 1970). Teaduskirjandusest leitud praimeripaaridele rakendati enamjaolt Primer-BLAST programmi määratud vaikeväärtuseid ning väärtused, mida muudeti, on kuvatud järgneval joonisel (Joonis 4).

Andmebaasi “*nr*” soovitatakse kasutada organismide puhul, mida muudes andmebaasides ei leidu, või järjestuste puhul, mida ei ole RefSeq andmebaasides (Ye *et al.*, 2012). Parameetri “*Database*” väärtuseks valiti “*nr*”, et tuvastada praimeripaariga komplementaarsete järjestustega organisme, kelle kogu genoom ei ole veel sekveneeritud, näiteks *N. apis*. Sel viisil on andmebaasist võimalik leida paardumisi mistahes olemasolevate nukleotiidsete järjestustega. “*Organism*” parameeter jäeti tühjaks, et laiendada otsingut praimeritega kõikvõimalike komplementaarsete järjestuste leidmiseks. Praimerite spetsiifilisus ja PCR-i edukus sõltub eelkõige praimer 3’-otsa paardumisest sihtmärkjärjestusega ja mittepaardumisest mittesihtmärkjärjestusega. On täheldatud, et ainult ühe praimer 4 või ühe praimer 3 ja teise puhul vähemalt 2 praimer-järjestus mittepaardumine

inhibeerib amplifikatsiooni ja blokeerib selle pea täielikult (Lefever *et al.*, 2013). Kontrollimaks praimerite võimalikku ebaspetsiifilisust, laiendati spetsiifilisuse parameetreid järgnevate väärtusteni: ühel praimeril peab esinema mittesihthääljärjestusega vähemalt 2 mittepaardumist, sealhulgas vähemalt 1 mittepaardumine 3'-otsa viimaste nukleotiidide vahel. Vastavad parameetrid annavad laia ülevaate praimerite võimalikest seondumiskohtadest. Amplikoni maksimaalse lubatud suuruse jaoks kasutati otsingul väärtust 1000, sest liigspetsiifiliste praimerite efektiivsus on kõrgem, kui sünteesitavad PCR produktid on lühemad (Ye *et al.*, 2012).

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Specificity check

☒ Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode

Automatic

Database

nr

Exclusion

☐ Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) ☐ Exclude uncultured/environmental sample sequences

Organism

Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type. Add organism

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency

Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 1 mismatches within the last 1 bps at the 3' end. Ignore targets that have 9 or more mismatches to the primer.

Max target amplicon size

1000

Allow splice variants

☐ Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

Get Primers ☐ Show results in a new window ☒ Use new graphic view

Joonis 4. *Nosema* liigspetsiifiliste praimerite kontrolliks valitud parameetrid. Vaikeväärtustest erinevad parameetrid on joonisel näidatud kollase kastiga ümbritsetult. Allikas: NCBI Primer-BLAST.

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. *N. apis*'e ja *N. ceranae* spetsiifilised PCR praimerid

Teaduskirjandusest leiti 11 artiklit, milles oli kirjeldatud 18 *Nosema* spp. tuvastamiseks disainitud praimeripaari (Tabel 2). *N. apis*'e liigspetsiifiliseks tuvastamiseks leiti 7 praimeripaari ja *N. ceranae* liigspetsiifiliseks tuvastamiseks 6 praimeripaari, kokku 13 eeldatavalt liigspetsiifilist praimeripaari. Ülejäänud praimeripaarid olid *Nosema* spp. spetsiifilised, s.t olid mõeldud lisaks *N. apis*'e ja *N. ceranae* tuvastamiseks ka vaid kimalasi (*Bombus* spp.) nakatava *Nosema bombi* (Klee *et al.*, 2006; Klee *et al.*, 2007) detekteerimiseks. Praimerite spetsiifilisuse kontrolli rakendati vaid praimeripaaridele, mis olid disainitud eesmärgipäraselt liigspetsiifiliseks. Analüüsi kaasatud *Nosema apis*'e praimeripaarid olid NosA, 321APIS, *N. apis*, NaFor ja UnivRev, NosaRNAPol, Mnapis-F ja Muniv-R ning NosAF/AR. *Nosema ceranae* spetsiifilised praimeripaarid, mida analüüsiti, olid 218MITOC,

N. ceranae, NcFor ja UnivRev, NoscRNAPol, Mnceranae-F ja Muniv-R ning NosCF/CR.

Tabel 2. *Nosema* spp., *N. ceranae* ja *N. apis*’e spetsiifilised PCR praimerid. ITS: sisemine transkribeeritav speisser region. LSU rRNA: suur 23S rRNA subühik. Helehall taust: praimerid ei läbinud Gisder ja Genersch (2013) töös praimerite spetsiifilisuse kontrolli. Tumehall taust: praimerid ei läbinud Gisder ja Genersch (2013) ega Erler *et al.* (2012) töös praimerite spetsiifilisuse kontrolli. Roheline taust: Erler *et al.* (2012) töös soovitatavad praimerid *N. apis*’e ja *N. ceranae* spetsiifiliseks tuvastamiseks.

Nimi	Allikas		Praimeri järjestus (5'-3')	Lookus	Sihtmärkliik	Produkti pikkus
NosA	Webster <i>et al.</i> (2004)	F R	CCGACGATGTGATATGAGATG CACTATTATCATCTCTCAGATCATA	16S rRNA	<i>N. apis</i>	209
ITS	Klee <i>et al.</i> (2006)	F R	GATATAAGTCGTAACATGGTTGCT CATCGTTATGGTATCTATTGAIC	ITS region	<i>N. apis</i> , <i>N. ceranae</i> jm	120, 120
NOS	Higes <i>et al.</i> (2006)	F R	TGCCGACGATGTGATATGAG CACAGCATCCATTGAAAACG	16S rRNA	<i>N. apis</i> , <i>N. ceranae</i> jm	240, 252
SSU-res	Klee <i>et al.</i> (2007)	F R	GCCTGACGTAGACGCTATTCT GTATTACCGCGGCTGCTGG	16S rRNA	<i>N. apis</i> , <i>N. ceranae</i> jm	402, 402
218MITOC	Martín-Hernández <i>et al.</i> (2007)	F R	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTA CCCGTCATTCTCAACAAAAACCG	16S rRNA	<i>N. ceranae</i>	218-219
321APIS		F R	GGGGGCGATGCTTTGACGTACTATGTA GGGGGGCGTTTAAATGTGAACAACATG	16S rRNA	<i>N. apis</i>	321
<i>Nosema</i>	Chen <i>et al.</i> (2008)	F R	GGCAGTTATGGGAAGTAACA GGTCGTACATTCTCTCT	16S rRNA	<i>N. apis</i> , <i>N. ceranae</i> jm	208, 212
<i>N. ceranae</i>		F R	CGGATAAAAGAGTCCGTTACC TGAGCAGGGTTCTAGGGAT		<i>N. ceranae</i>	250
<i>N. apis</i>		F R	CCATTGCCGATAAGAGAGT CACGCATTGCTGCATCATTGAC		<i>N. apis</i>	401
NcFor	Forsgren ja Fries (2010)	F	TATTGTAGAGAGGTGGGAGATT	LSU rRNA	<i>N. ceranae</i>	316
NaFor		F	CTAGTATATTGAATATGTTTCAATGG		<i>N. apis</i>	278
UnivRev		R	GTCGCTATGATCGCTTGCC		<i>N. apis</i> , <i>N. ceranae</i>	278, 316
Nos-16S-fw/rv	Stevanovic <i>et al.</i> (2011)	F R	CGTAGACGCTATCCCTAAGATT CTCCCACTATACAGTACACCTCATA	16S rRNA	<i>N. apis</i> , <i>N. ceranae</i> jm	488, 488
NoscRNAPol	Gisder ja Genersch (2013)	F R	TGGGTTCCCTAAACCTGGTGGTTT TCACATGACCTGGTGCTCTTCT	RPB1	<i>N. ceranae</i>	662
NosaRNAPol		F R	AGCAAGAGACGTTTCTGGTACCTCA CCTTCACGACCACCATGGCA		<i>N. apis</i>	297
Mnceranae-F	Fries <i>et al.</i> (2013)	F	CGTTAAAGTGTAGATAAGATGTT	16S rRNA	<i>N. ceranae</i>	143
Mnapis-F		F	GCAATGCTTTTGACGTACTATG		<i>N. apis</i>	224
Muniv-R		R	GACTTAGTAGCCGCTCTCTC		<i>N. apis</i> , <i>N. ceranae</i>	224, 143
NosCF/CR	Sulborska <i>et al.</i> (2019)	F R	ACGTAATACGATCAGATGGTCAGC CTCGAACGAAATGTCCTATCA	RPB1 ja 16S rRNA	<i>N. ceranae</i>	168
NosAF/AR		F R	CATGTCCTTTGACGTACTATGTA CTAGCTGATAGGTCTCACTCT		<i>N. apis</i>	132

2.3.2. *N. apis*'e ja *N. ceranae* praimerite spetsiifilisuse kontroll ja analüüs

Veebiprogrammi Primer-BLAST kasutamisel saadi kõikidele praimeripaaridele nende omaduste ning liigispetsiifilisuse kontrolli tulemused. Tulemused on välja toodud praimerite liigispetsiifilisuse analüüsi lõpus, leheküljel 36 Tabelis 3. Primer-BLAST väljastab tulemusena ennustuse praimeripaari tõenäoliste seondumiste kohta erinevatel järjestustel, mis võivad anda lubatud pikkusega PCR produkti. Liigispetsiifilisuse analüüsi tulemus oli "jah", kui Primer-BLAST leidis konkreetse praimeripaari puhul potentsiaalselt PCR produkti andvad seondumised ainult valitud sihtmärkjärjestustel. Liigispetsiifilisuse analüüsi tulemus oli "ei", kui Primer-BLAST tuvastas praimeripaari ebaspetsiifilised seondumiskohad mittesihhtmärkjärjestustel, mis võivad luua programmis lubatud suurusega PCR produkti. Hinnang *N. apis*'e või *N. ceranae* tuvastamise sobivuseks oli "jah", kui praimeripaar oli liigispetsiifiline või moodustas kõikide Primer-BLAST tulemuste mittesihhtmärkjärjestusega seondudes kokku enam kui 3 mittepaardumist ning "ei" kõikidel muudel juhtudel.

Webster *et al.* (2004) töörühma disainitud praimeripaar NosA, mis peaks seonduma vaid *N. apis*'e järjestusega, seondub täispikkuses ka *N. ceranae*, sh praimerite mitmete 3'-otsa mittepaardumistega ka *N. neumannii* mittesihhtmärkjärjestustega - praimeripaar ei ole *N. apis*'e liigispetsiifiline (Joonis 5). Arvestades, et päri- ja vastassuunalise praimeri maksimaalne iseendaga seondumise ja iseenda 3'-otsaga seondumise skoor on kõrged, eriti vastassuunalise praimeri puhul, võib praimerite tõenäoline omavaheliste dimeeride moodustamine 3'-otstes pärssida ka PCRi efektiivsust ja praimerite tundlikkust.

>[MH350400.1](#) Nosema ceranae clone 5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 208
Forward primer 1 CCGACGATGTGATATGAGATG 21
Template       282 ..... 302

Reverse primer 1 CACTATTATCATCCTCAGATCATA 24
Template       489 ..... 466
```

>[MF882996.1](#) Nosema neumannii isolate Moses_132_Kasese small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 209
Forward primer 1 CCGACGATGTGATATGAGATG 21
Template       645 .....G.. 665

Reverse primer 1 CACTATTATCATCCTCAGATCATA 24
Template       853 .....A..AGA. 830
```

Joonis 5. NosA seondub *N. ceranae* ning praimerite 3'-otsa mittepaardumistega *N. neumannii* mittesihhtmärkjärjestustega, (5'-3'). Punktidena on tähistatud järjestuse praimeriga komplementaarsed ning tähtedena mittekomplementaarsed nukleotiidid. Allikas: NCBI Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012).

Kuigi Erler *et al.* (2012) soovitasid enda uuringus läbi viidud kontrollkatsetele tuginedes kasutada usaldusväärseks *N. apis*'e tuvastamiseks ja *N. ceranae*'st eristamiseks Webster *et al.* (2004) disainitud praimeripaari NosA, siis täna see soovitus enam ei päde. *N. ceranae* järjestuse täispikkuses komplementaarsus nii pärisuunalise kui ka vastassuunalise praimeriga annab PCR produkti ka mittesihtmärkjärjestusega. Praimeridisainiks valitud 16S rRNA eeldatavalt vaid *N. apis*'es konserveerunud regiooni 100% komplementaarsus *N. ceranae* järjestusega vihjab, et praimeridisainiks ei valitud välja vaid ühe liigi piires konserveerunud regiooni, või kinnitab Sagastume *et al.* (2011) ning Gisder ja Genersch (2013) leidu *N. apis*'e ja *N. ceranae* liikidevahelisest 16S rRNA rekombinatsioonist.

Martín-Hernández *et al.* (2007) tööühm disainis *N. ceranae*'le praimeripaari 218MITOC ning *N. apis*'ele praimeripaari 321APIS. Primer-BLAST programmi tulemus näitab, et 218MITOC puhul ei ole tegemist liigispetsiifilise praimeripaariga, sest on disainitud seonduma regiooni, mis on konserveerunud ka teises organismides, näiteks mikrosporiidsetes *Vairimorpha* liikides (Joonis 6). Kuigi amplifikatsiooni efektiivsus on 5'-otsa mittepaardumise korral pärsitud, siis enam kui 3 nukleotiidi vähemalt ühe praimeri koguulatuses mittepaardumise korral või kuni 3'-otsa 2. nukleotiidi mittepaardumise puhul amplifikatsiooni ei toimu ning 3.-6. nukleotiidi mittepaardumisel toimub minimaalselt. *Vairimorpha* spp., samuti ka paari *N. ceranae* klooni, näiteks NCS6 ja NCS51 järjestuse puhul esineb vähemalt ühes praimeris 5 mittepaarduvat nukleotiidi, mistõttu on järjestuste amplifikatsioon väga vähetõenäoline. Juhul, kui praimeripaar ei seonu kõikide sihtmärkliigi tüvede varieeruvate järjestustega ja neid ei amplifitseeri, võib praimerite noseматоosi diagnostikas kasutamine viia valenegatiivse tulemuseni.

>[LC510190.1](#) Nosema ceranae gene for SSU rRNA, partial sequence, clone: NCS6 >[LC510235.1](#) Nosema ceranae gene for SSU rRNA, partial sequence, clone: NCS51

product length = 219		product length = 220	
Forward primer 1 CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA 28		Forward primer 1 CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA 28	
Template 624 T.C..... 651		Template 621 T.C.....G...ATA.T. 648	
Reverse primer 1 CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG 26		Reverse primer 1 CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG 26	
Template 842 TATTA..... 817		Template 840 TATTA..... 815	

>[MW600361.1](#) Nosema ceranae isolate M16 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence >[MN608539.1](#) Vairimorpha sp. clone B5-2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 219		product length = 218	
Forward primer 1 CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA 28		Forward primer 1 CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA 28	
Template 2 29		Template 644 T.C..... 671	
Reverse primer 1 CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG 26		Reverse primer 1 CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG 26	
Template 220 195		Template 861 TATTA..... 836	

Joonis 6. 218MITOC amplifitseerib lisaks *N. ceranae*'le ka *Vairimorpha* liikide järjestusi, (5'-3'). Punktidena on tähistatud järjestuse praimeriga komplementaarsed ning tähtedena mittekomplementaarsed nukleotiidid. Allikas: NCBI Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012).

Lisaks ebaspetsiifilisusele on 218MITOC praimeripaari pärisuunalise praimeriseendaga komplementaarsuse skoor üsna kõrge, mistõttu on tõenäoline, et see moodustab enda või paarilisega dimeere. Praimeripaar on mõnede järjestuste puhul 3'-otsast järjestusspetsiifiline, kuid selles regioonis iseenda või paarilisega hübridiseerumisskoor on mõlemal praimeril suur. Kõrgeid komplementaarsusskoore tasub võimalikult kõrge PCRi efektiivsuse tagamiseks vältida, sest mida väiksem on skooride summa, seda vähem tõenäolisem on, et praimerid üksteisega hübridiseeruvad. Mõnede *N. ceranae* järjestuste puhul esineb primeritel järjestusega enam kui kolme nukleotiidi mittepaardumist, sealhulgas 3'-otsas, mis on tõenäoliselt põhjus, miks Martín-Hernández *et al.* (2007) disainitud praimeripaar 218MITOC Gisder ja Genersch (2013) ning Erler *et al.* (2012) kontrolluuringutes põrus. Lähtuvalt praimerite ebaspetsiifilisest paardumisest *N. ceranae* eri järjestustega on praimeridisainiks valitud 16S rRNA regioon, mis ei ole piisavalt kõrgelt konserveerunud, et tagada *N. ceranae* liigisisene tuvastusvõime. Liigi järjestuse varieeruvus praimeridisainiks valitud regioonis annab kinnitust ka Sagastume *et al.* (2011) ning Gisder ja Genersch (2013) viidatud *N. apis*'e ja *N. ceranae* liikidevahelisele 16S rRNA rekombinatsioonile.

Primer-BLAST programmi tulemus praimeripaarile 321APIS näitab, et tegemist on praimeripaariga, mis seondub spetsiifiliselt *N. apis*'e järjestustega. Pärisuunalise praimeriseendaga komplementaarsus kui ka 3'-otsa komplementaarsusskoor kõrge, kuid vastassuunalise praimeriseendaga komplementaarsuse väärtus veel kõrgem. On väga suur tõenäosus, et PCRi käigus praimerid ei amplifitseeri sihtmärkjärjestust, vaid moodustavad üksteisega dimeere. See vähendab märgatavalt PCRi efektiivsust ning võib põhjustada kvalitatiivse meetodi ebaõnnestumise. Eriti oluline on selliste praimerite disaini vältida qPCRi puhul, mis jätkaks proovis leiduvad sihtmärkjärjestused amplifitseerimata ning annaks kvantitatiivselt vale tulemuse. Kuigi PCR efektiivsus praimeripaari 321APIS kasutamisel osutus Erler *et al.* (2012) uuringus madalamaks kui praimeripaari NosA kasutusel, on see liigispetsiifilisuse tagamisel parem valik.

Chen *et al.* (2008) töörühm disainis unikaalselt *N. apis*'e ja *N. ceranae*'ga seonduvad praimeripaarid. Primer-BLAST programmi tulemuste põhjal on *N. apis*'e praimeripaar liigispetsiifiline ning ei esine ühtegi praimer-sihtmärkjärjestus mittepaardumist (Joonis 7). Vastassuunalisel praimeril on kõrge kalduvus nii iseenda kui ka väga kõrge iseenda 3'-otsaga komplementaarsusele, seega praimeridimeeride vältimisel on 321APIS konkreetsest praimeripaarist edukam. Primer-BLAST programmi tulemuste põhjal on *N. ceranae*

praimeripaar liigispetsiifiline, vaid ühel järjestusel neljast ehk 25% esineb üks mittepaardumine 3'-otsa 6. nukleotiidi juures. PCR reaktsioon toimub sellise järjestuse amplifikatsioonil väga väikese efektiivsuse juures. *N. ceranae* praimeripaari iseendaga komplementaarsuse skoorid on keskmised/kõrged ning 3'-otsa komplementaarsus on pärisuunalise praimer puhul väga kõrge, mistõttu võib amplifikatsioonil oodata kõrvalprodukte praimer-praimer dimeeridena. Sellele vaatamata on Chen *et al.* (2008) tööühma praimeripaarid liigispetsiifilisuse tagamisel edukad.

```

Products on target templates
>U97150.1 Nosema apis small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer and large subunit ribosomal RNA gene, complete sequence

product length = 401
Forward primer 1 CCATTGCCGATAAGAGAGT 20
Template 4395 ..... 4414

Reverse primer 1 CACGCATTGCTGCATCATTGAC 22
Template 4795 ..... 4774

```

Joonis 7. *N. apis*'e praimeripaar on liigispetsiifiline ning sihtmärkjärjestusega täispikkuses komplementaarne, (5'-3'). Punktidena on tähistatud järjestuse praimeriga komplementaarsed ning tähtedena mittekomplementaarsed nukleotiidid. Allikas: NCBI Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012).

Forsgren ja Fries (2010) disainisid spetsiifiliselt *N. apis*'ega seonduma mõeldud praimer NaFor, *N. ceranae*'ga seonduva praimer NcFor ning mõlema liigi järjestustele seonduva universaalse vastassuunalise (*reverse*) praimer UnivRev. Primer-BLAST programmi tulemuste põhjal on NaFor ja UnivRev puhul tegemist praimeripaariga, millel on pärisuunalise praimer keskmisses regioonis ja sihtmärkjärjestuse vahel 1 mittepaardumine ning mis ei ole *N. apis*'e liigispetsiifiline, sest programm annab vaste ka liigiga *Arachis hypogaea* ehk maapähkliga. *A. hypogaea* järjestusel esineb mõlema praimer vahel 6-7 mittepaardumist (Joonis 8). Praimerite amplifikatsioon peatub, kui kasvõi ühes praimeris on enam kui 3 mittepaardumist, seega *A. hypogaea* amplifikatsiooni ei toimu ka siis, kui proov on maapähkli DNAGA kontamineerunud. Kuigi konkreetne praimeripaar on liigispetsiifilisuse tagamisel tugev kandidaat, on pärisuunalise praimer iseendaga komplementaarsuse skoor (8,00) ja 3'-otsaga komplementaarsuse skoor (4,00) väga kõrged, mistõttu ei ole praimeripaar PCR-il *N. apis*'e tuvastamiseks eeldatavasti kõige efektiivsem.

>[CP030989.1](#) *Arachis hypogaea* cultivar Shitouqi chromosome A07

```
product length = 279
Features flanking this product:
  7717 bp at 5' side: U-box domain-containing protein
  53734 bp at 3' side: uncharacterized protein

Forward primer 1      CTAGTATATTTGAATATTGTTTACAATGG  29
Template      13291648  A...A.....T.C.A...G.....  13291676

Forward primer 1      CTAGTATATTTGAATATTGTTTACAATGG  29
Template      13291926  A.G.AC.....T...A...G.....  13291898
```

Joonis 8. Primer-BLAST annab praimeripaari NaFor ja UnivRev puhul vastena ka *Arachis hypogaea* järjestuse, (5'-3'). Punktidena on tähistatud järjestuse praimeriga komplementaarsed ning tähtedena mittekomplementaarsed nukleotiidid. Allikas: NCBI Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012).

Praimeripaar NcFor ja UnivRev hübridiseerub Primer-BLAST tulemuse põhjal *N. ceranae* järjestustega 100% ulatuses. See-eest on praimerid komplementaarsed ka liikide *Nymphalis polychloros* ja *Nosema bombi* järjestustega - vastassuunaline praimer on järjestustega täispikkuses komplementaarne, ei paardu vaid pärisuunalise praimeriga 3'-otsa kõige otsmine nukleotiid (Joonis 9). Arvestades, et üks 3'-otsas paiknev nukleotiid ei pruugi amplifikatsiooni blokeerida ning mittepaardumiste amplifikatsioonitõenäosuses on täheldatud hierarhiat (puriin-puriin < purimidiin-purimidiin < puriin-purimidiin) (Stadhouders *et al.*, 2010), võib siiski otsmiste G-T (puriin-purimidiin) nukleotiidide mittepaardumisel esineda vähese efektiivsusega amplifikatsiooni. Juhuslike seondumiste ja amplifikatsiooniproductide moodustamise vältimiseks ei soovita autor praimeripaari NcFor ja UnivRev *N. ceranae* mesilasproovist tuvastamisel siiski kasutada.

>[XR_002966747.1](#) *Nosema ceranae* 23S ribosomal RNA (AAJ76_1700062503), rRNA >[HG992272.1](#) *Nymphalis polychloros* genome assembly, chromosome: W

```
product length = 316
Forward primer 1      TATTGTAGAGAGGTGGGAGATT  22
Template      1835      .....  1856

Reverse primer 1      GTCGCTATGATCGCTTGCC  19
Template      2150      .....  2132

product length = 313
Forward primer 1      TATTGTAGAGAGGTGGGAGATT  22
Template      3358006  .....G  3358027

Reverse primer 1      GTCGCTATGATCGCTTGCC  19
Template      3358318  .....  3358300
```

>[AY741101.1](#) *Nosema bombi* small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 313
Forward primer 1      TATTGTAGAGAGGTGGGAGATT  22
Template      3061      .....G  3082

Reverse primer 1      GTCGCTATGATCGCTTGCC  19
Template      3373      .....  3355
```

Joonis 9. Praimeripaar NcFor ja UnivRev on sihtmärkjärjestusega täispikkuses komplementaarne, kuid paardub ka *Nymphalis polychloros* ja *Nosema bombi* järjestustega, (5'-3'). Punktidena on tähistatud järjestuse praimeriga komplementaarsed ning tähtedena mittekomplementaarsed nukleotiidid. Allikas: NCBI Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012).

Gisder ja Genersch (2013) on välja töötanud praimeripaarid NosaRNAPol ja NoscRNAPol, mis amplifitseerivad RNA polümeraas II suurima subühiku (RPB1) järjestust. Primer-BLAST programmi tulemuste põhjal on NosaRNAPol praimeripaar *N. apis*'e liigispetsiifiline ning on sihtmärkjärjestusega täispikkuses komplementaarne (Joonis 10). See-eest on nii pärisuunalise kui ka vastassuunalise praimeride iseenda ja iseenda 3'-otsaga komplementaarsuse skoor kõrge ja praimerite tundlikkus võib praimeridimeeride moodustumise arvelt kahaneda (Joonis 10).

```

Products on target templates
>DQ996230.1 Nosema apis RNA polymerase II largest subunit (RPB1) gene, partial cds

product length = 297
Forward primer 1      AGCAAGAGACGTTTCTGGTACCTCA 25
Template       1854  ..... 1878

Reverse primer 1      CCTTCACGACCACCCATGGCA 21
Template       2150  ..... 2130

```

Joonis 10. NosaRNAPol on *N. apis*'e RPB1 järjestusega täispikkuses komplementaarne, (5'-3'). Punktadena on tähistatud järjestuse praimeriga komplementaarsed ning tähtedena mittekomplementaarsed nukleotiidid. Allikas: NCBI Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012).

Primer-BLAST programm annab praimeripaari NoscRNAPol puhul lisaks *N. ceranae*'le tulemusi ka *Vairimorpha necatrix* järjestustega. *V. necatrix* järjestuse ja vastassuunalise praimeride vahel esineb 5'-otsas ja praimeride keskosas kokku 4 mittepaardumist, pärisuunalisel praimeril veel 1 lisaks. Niisiis pole praimeripaar liigispetsiifiline, kuid *Lepidoptera* ehk libliklaste seltsi kuuluvaid putukaid nakatava mikrosporiidi *V. necatrix* (Down *et al.*, 2004) analüüsitavas proovis leidumine mittespetsiifilisi amplifikatsiooniprodukte ei anna, sest amplifikatsioon on välistatud enama kui 3 praimer-järjestus mittepaardumise korral. Vastassuunalise praimeride iseendaga komplementaarsuse skoor on kõrge, kuid 3'-otsaga komplementaarsus olematu, pärisuunalise praimeride puhul on skoor vastavalt kõrge või väga kõrge, mis vähendab PCRi tootlikkust. Praimeripaar NoscRNAPol sobib sellegipoolest *N. ceranae* nakkuse mesilasproovidest kinnitamiseks.

Fries *et al.* (2013) töörühm disainis *N. apis*'e järjestusele seonduva pärisuunalise praimeride Mnapis-F, *N. ceranae* järjestusele seonduva pärisuunalise praimeride Mceranae-F ja mõlema liigi järjestusega universaalselt seonduva vastassuunalise praimeride Muniv-R. Primer-BLAST programmi tulemuste põhjal on Mnapis-F ja Muniv-R praimeripaar *N. apis*'e liigispetsiifiline ning paardub sihtmärkjärjestusega täisulatuses (Joonis 11). Praimeride iseendaga seonduvuse ja iseenda 3'-otsaga seonduvuse skoor on vastavalt keskmine ja kõrge. Praimeripaar on hea liigispetsiifiline *N. apis*'e tuvastamise kandidaat.

>[KX258209.1](#) *Nosema apis* strain RGSNa01 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 224
Forward primer 1 GCATGTCCTTGACGTACTATG 21
Template       1 ..... 21

Reverse primer 1 GACTTAGTAGCCGTCTCTC 19
Template       224 ..... 206
```

Joonis 11. Praimeripaar Mnapis-F ja Muniv-R on sihtmärkjärjestusega täispikkuses komplementaarne, (5'-3'). Punktadena on tähistatud järjestuse praimeriga komplementaarsed ning tähtedena mittekomplementaarsed nukleotiidid. Allikas: NCBI Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012).

Praimeripaar Mceranae-F ja Muniv-R seondub see-eest lisaks *N. ceranae* sihtmärkjärjestusele ka *Nosema thomsoni*, *N. carpocapsae*, *N. vespula*, *N. portugal*, *N. adaliae*, *Vairimorpha lymantriae*, *Nymphalis polychloros* ja *Thelohania disparis*'e mittesihtmärkjärjestustega. Praimeripaar on *N. ceranae* ja *Vairimorpha* spp. järjestusega täisulatuses komplementaarne, muudel järjestustel ei ole pärisuunalise praimeri 3'-otsa viimane nukleotiid järjestuste nukleotiidiga komplementaarne (Joonis 12).

>[MN608538.1](#) *Vairimorpha* sp. clone B5-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 143
Forward primer 1 CGTTAAAGTGTAGATAAGATGTT 23
Template       130 ..... 152

Reverse primer 1 GACTTAGTAGCCGTCTCTC 19
Template       272 ..... 254
```

>[KC596023.1](#) *Nosema thomsoni* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence >[JX268035.1](#) *Nosema pieriae* small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 143		product length = 143
Forward primer 1 CGTTAAAGTGTAGATAAGATGTT 23		Forward primer 1 CGTTAAAGTGTAGATAAGATGTT 23
Template 120G 142		Template 85G 107
Reverse primer 1 GACTTAGTAGCCGTCTCTC 19		Reverse primer 1 GACTTAGTAGCCGTCTCTC 19
Template 262 244		Template 227 209

Joonis 12. Praimeripaar Mceranae-F ja Muniv-R seondub ka *Vairimorpha* ja *Nosema* perekonna liikide mittesihtmärkjärjestustega, (5'-3'). Punktadena on tähistatud järjestuse praimeriga komplementaarsed ning tähtedena mittekomplementaarsed nukleotiidid. Allikas: NCBI Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012).

Nosema adaliae järjestuse amplifikatsiooni võib välistada, sest pärisuunalise praimeri 3'-otsas esineb alates 2. nukleotiidist 5 mittepaardumist järjest. Muude mittesihtmärkjärjestuste puhul väga suure tõenäosusega praimer-järjestus hübridisatsiooni ei toimu, sest 3'-otsa viimaste nukleotiidide paardumine on amplifikatsiooni toimumisel ja edukusel väga oluline, kuid see ei pruugi reaktsiooni toimumist täielikult vältida. Tuleb silmas pidada, et G-T (puriin-pürimidiin) nukleotiidide mittekomplementaarse paardumise korral toimub

amplifikatsioon muudest olukordadest kõige tõenäolisemalt ning juhuslikult amplifitseeritud mittesihhtmärkjärjestuste 100% kindlusega vältimiseks ei tasu konkreetset praimeripaari mesilasproovist noseματοosnakkuse tuvastamiseks kasutada.

Sulborska *et al.* (2019) disainisid praimeripaarid NosCF/CR ja NosAF/AR. Primer-BLAST programmi tulemuste põhjal on praimeripaar NosCF/CR *N. ceranae* liigispetsiifiline ning paardub sihtmärkjärjestusega täisulatuses (Joonis 13). Vasteid tuli ka sihtmärkjärjestustega, millest ühel esineb praimeritega 3'-otsast 3. nukleotiidi mittepaardumine, kuid teistel järjestustel 3'-otsast kaugemal. Niisiis toimub sihtmärkjärjestuse amplifikatsioon vähem efektiivselt ka mittepaardumistega järjestustega seondumisel. Amplifikatsiooni efektiivsust ja seejuures praimerite tundlikkust võib vähendada ka praimerite iseendaga kõrgest komplementaarsusest tingitud dimeriseerumine. Primer-BLAST programmi tulemuste põhjal on ka praimeripaar NosAF/AR *N. apis*'e liigispetsiifiline ning paardub enamike sihtmärkjärjestusega täisulatuses. Osade sihtmärkjärjestustega esineb üksiknukleotiidseid mittepaardumisi 5'-otsas või keskmises regioonis, kuid need amplifikatsiooni toimumist suurel määral ei mõjuta. Pärisuunalise praimeri puhul on iseendaga ja iseenda 3'-otsaga komplementaarsus kõrge, vastassuunalisel veidi madalam, seega võib PCR efektiivsus praimerite spetsiifilisuse arvelt veidi kannatada. See-eest on mõlemad praimeripaarid, NosCF/CR *N. ceranae* ja NosAF/AR *N. apis*'e põhjustatud noseματοosnakkuse tuvastamisel väga head kandidaadid.

>[XM_024474576.1](#) Nosema ceranae dna-directed rna polymerase ii largest subunit (AAJ76_2100035271), partial mRNA

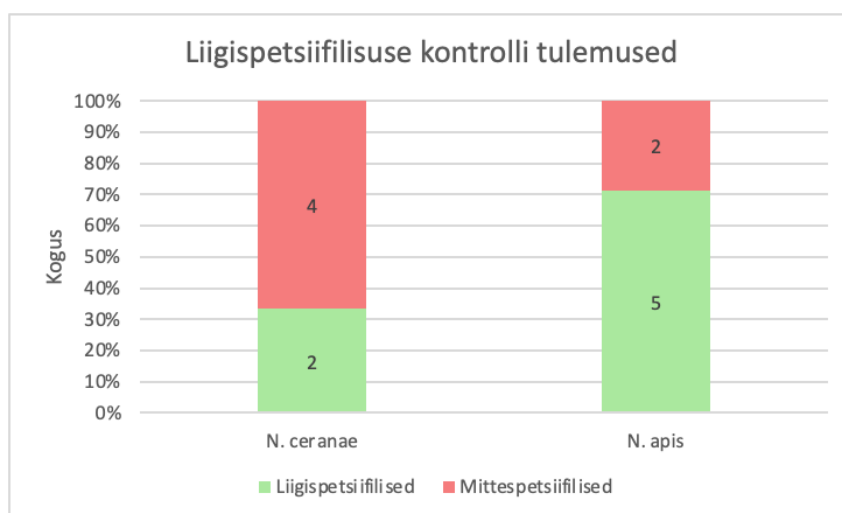
```
product length = 168
Forward primer  1      ACGTAATACGATCAGATGGTCAGC   24
Template        1124  .....              1147

Reverse primer  1      CTCGAACGAAATGTCCCATCA   21
Template        1291  .....              1271
```

Joonis 13. Praimeripaar NosCF/CR on sihtmärkjärjestusega täispikkuses komplementaarne, (5'-3'). Punktidena on tähistatud järjestuse praimeriga komplementaarsed ning tähtedena mittekomplementaarsed nukleotiidid. Allikas: NCBI Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012).

Teadustöodes kasutatavad diagnostilised protokollid ei ole rangelt reguleeritud, nagu näiteks kliinilise kasutuse korral. Seetõttu on teadustöodes avaldatud PCR protokollide puhul tarvis erinevaid faktoreid, eriti spetsiifilisust kriitiliselt enne kasutuselevõttu või järelduste tegemist hinnata. (Bustin ja Huggett, 2017) Noseματοosnakkuse põhjustaja proovist tuvastamiseks on tarvis kasutada liigispetsiifilisi primereid. Liigispetsiifilised praimerid välistavad

mittesihhtmärkjärjestuste tuvastamise keskkonnaproovist, mis võib sisaldada paljude muude elusorganismide geneetilist materjali. *N. apis*'e tuvastamiseks leiti teadusartiklitest 7 praimeripaari ja *N. ceranae* tuvastamiseks 6 praimeripaari. *Nosema apis*'e puhul olid Primer-BLAST tulemuste kohaselt tõepoolest liigispetsiifilised 5 praimeripaari ning *Nosema ceranae* puhul 2 praimeripaari. Primer-BLAST liigispetsiifilisuse kontrolli põhjal olid *Nosema apis*'e liigispetsiifilised praimeripaarid 321APIS (Martín-Hernández *et al.*, 2007), *Nosema apis* (Chen *et al.*, 2008), NosaRNAPol (Gisder ja Genersch, 2013), Mnapis-F ja Muniv-R (Fries *et al.*, 2013) ning NosAF/AR (Sulborska *et al.*, 2019). Primer-BLAST liigispetsiifilisuse kontrolli põhjal olid *Nosema ceranae* liigispetsiifilised praimeripaarid *Nosema ceranae* (Chen *et al.*, 2008) ja NosCF/CR (Sulborska *et al.*, 2019). Niisiis oli teaduskirjandusest leitud *N. apis*'e praimeritest 71,4% ning *N. ceranae* praimeritest 33,3% liigispetsiifilised (Joonis 14). Kokku leiti teadusartiklitest nosematoosnakkuse tuvastamiseks 53,8% ulatuses liigispetsiifilisi praimeripaare. See-eest leiti Primer-BLAST programmiga ka 2 praimeripaari - *N. apis*'el NaFor ja UnivRev (Forsgren ja Fries, 2010) ning *N. ceranae*'l NoscRNAPol (Gisder ja Genersch, 2013), mis ei ole liigispetsiifilised, kuid ei amplifitseeri mittesihhtmärkjärjestusi tänu praimeripaarides järjestusega 5-7 mittepaarduvale nukleotiidile. Niisiis on nimetatud praimeripaarid sellegipoolest sobilikud *N. apis*'e või *N. ceranae* liigipõhiseks tuvastamiseks.



Joonis 14. Liigispetsiifilisuse kontrolli tulemused: teaduskirjanduses on avaldatud enam *N. apis*'e kui *N. ceranae* liigispetsiifilisi praimereid. Allikas: autori andmed.

Nosema ceranae liigispetsiifiliste praimerite vähesus annab alust arvata, et *N. ceranae* puhul toimub Gisder ja Genersch (2013) ning Sagastume *et al.* (2011) tööühmade kirjeldatud 16S rRNA geenijärjestuse rekombinatsioon võrreldes *N. apis*'ega efektiivsemalt.

Praimeridisainiks on tarvis leida genoomiregioon, mis oleks liigisiselt kõrgemalt konserveerunud kui 16S rRNA geenijärjestus ning tagaks piisava liikidevahelise eristusvõime. Lisaks peaks sobiv genoomiregioon esinema organismis ühes korduses, et vältida rekombinatsiooni (Gisder ja Genersch, 2013; Sagastume *et al.*, 2011) ning välja töötatud liigispetsiifiliste praimerite sellest tulenevat ebaefektiivsust. Potentsiaalsed kandidaadid mikrosporiidides liigisiselt kõrgelt konserveerunud genoomipiirkondadeks on liigisiselt vähe ning liikidevaheliselt piisavalt varieeruvad valku kodeerivad regioonid, milles toimub rekombinatsioon minimaalsel määral (Gisder ja Genersch, 2013). Lefever *et al.* (2013) töögrupp on täheldanud, et ≥ 4 mittepaarduva nukleotiidi esinemine ühes praimeris või ühes praimeris 3 ja teises praimeris vähemalt 2 mittepaarduva nukleotiidi esinemine blokeerib reaktsiooni täielikult ning soovib spetsiifiliste praimerite *in silico* disainil amplifikatsiooni blokeerumise vältimiseks jälgida, et praimeripaari puhul ei esineks enam kui 3 mittepaarduvat nukleotiidi. Arvestades, et RPB1 geenijärjestusele disainitud praimeripaaridest $\frac{2}{3}$ puhul ei tuvastanud Primer-BLAST mitte ühtegi võimalikku ebaspetsiifilise produkti teket mittesihtmärkjärjestustelt ning $\frac{1}{3}$ praimeripaari puhul tuvastas Primer-BLAST pigem väheohtlikke võimalikke seandumisi mittesihtmärkjärjestustele, s.t praimerite ja mittesihtmärkjärjestuse vahel oli üle 3 mittepaarduva positsiooni, siis sobib RPB1 geenijärjestus *Nosema* liikide spetsiifiliste praimerite disainiks. Sellegipoolest oleks nosematoosnakkuse liikide eristamiseks sobivate praimeridisaini regioonide tuvastamiseks tarvis *Nosema* perekonna liikide genoomi edaspidi lähemalt uurida ning omavahel võrrelda. Kõrgelt konserveerunud regioonide tuvastamiseks ning nendele seonduma disainitud praimerite nosematoosnakkuse diagnostikasse rakendamiseks oleks edaspidi kindlasti tarvis sekveneerida ka *N. apis*'e täismahus genoom.

Kõik liigispetsiifilised praimerid, mille puhul Primer-BLAST produkti moodustumist mittesihtmärkliigi järjestustelt ei tuvastanud, või praimerid, mille puhul primer-BLAST tuvastas küll võimaliku ebaspetsiifilise seandumise, kuid praimer-mittesihtmärkjärjestus joonduses esineb enam kui 3 mittepaarduvat nukleotiidi, on *in silico* kontrolli põhjal usaldusväärsed diagnostilised markerid nosematoosnakkuse tuvastamisel. See-eest leitakse sobilike kandidaatide hulgast optimaalsete omadustega praimeripaarid *singleplex* PCR meetodil *N. apis*'e ja *N. ceranae* tuvastamiseks, mida edaspidistes uuringutes kasutada soovitatakse.

Tabel 3. Primeripaaride omadused. Liigispetsiifilisuse kontrolli rakendati vaid primeritele, mis olid disainitud eesmärgipäraselt liigispetsiifiliseks. Primer-BLAST programmiga leiti 2 primeripaari - *N. apis*'el NaFor ja UnivRev ning *N. ceranae*'l NoscRNAPol, mis ei ole liigispetsiifilised, kuid ei amplifitseeri mittesihthäädjärjestusi tänu primeripaarides järjestusega 5-7 mittepaarduvale nukleotiidile, seega on sobilikud liikide tuvastamiseks.

Nimi	Pikkus (nt)	Tm (°C)	GC (%)	Komplementaarsus iseendaga	3'-otsa komplementaarsus	Liigispetsiifiline?	Sobib tuvastamiseks?
NosA (Webster <i>et al.</i> , 2004)	21	56,13	47,62	6,00	4,00	EI (<i>Nosema apis</i>)	EI
	24	53,05	33,33	7,00	7,00		
218MITOC (Martín-Hernández <i>et al.</i> , 2007)	28	60,62	35,71	6,00	4,00	EI (<i>Nosema ceranae</i>)	EI
	26	63,55	46,15	4,00	2,00		
321APIS (Martín-Hernández <i>et al.</i> , 2007)	27	64,33	48,15	5,00	4,00	JAH (<i>Nosema apis</i>)	JAH
	30	65,27	43,33	8,00	1,00		
<i>Nosema apis</i> (Chen <i>et al.</i> , 2008)	20	57,08	50,00	4,00	1,00	JAH (<i>Nosema apis</i>)	JAH
	22	61,60	50,00	8,00	6,00		
<i>Nosema ceranae</i> (Chen <i>et al.</i> , 2008)	21	56,18	47,62	5,00	5,00	JAH (<i>Nosema ceranae</i>)	JAH
	19	56,95	52,63	4,00	2,00		
NaFor, NcFor ja UnivRev (Forsgren ja Fries, 2010)	29	54,13	24,14	8,00	4,00	EI (<i>Nosema apis</i>)	JAH
	22	55,42	40,91	2,00	1,00	EI (<i>Nosema ceranae</i>)	EI
	19	59,14	57,89	5,00	1,00		
NosaRNAPol (Gisder ja Genersch, 2013)	25	63,70	48,00	8,00	4,00	JAH (<i>Nosema apis</i>)	JAH
	21	64,98	61,90	6,00	3,00		
NoscRNAPol (Gisder ja Genersch, 2013)	24	64,05	50,00	6,00	6,00	EI (<i>Nosema ceranae</i>)	JAH
	23	63,50	52,17	5,00	0,00		
Mnapi-F, Mnceranae-F ja Muniv-R (Fries <i>et al.</i> , 2013)	21	54,82	42,86	4,00	3,00	JAH (<i>Nosema apis</i>)	JAH
	23	52,39	30,43	4,00	4,00	EI (<i>Nosema ceranae</i>)	EI
	19	53,87	52,63	5,00	2,00		
NosCF/CR (Sulborska <i>et al.</i> , 2019)	24	60,56	45,83	7,00	2,00	JAH (<i>Nosema ceranae</i>)	JAH
	21	58,38	47,62	4,00	1,00		
NosAF/AR (Sulborska <i>et al.</i> , 2019)	24	56,33	37,50	6,00	4,00	JAH (<i>Nosema apis</i>)	JAH
	22	57,21	45,45	5,00	2,00		

Praimerite spetsiifilisuse määravad suuresti praimerite seondumistemperatuur ja pikkus (Dieffenbach *et al.*, 1993). Kvaliteetseid primereid iseloomustab muuhulgas see, et neil on sarnane sulamistemperatuur (T_m) ja G-C nukleotiidide sisaldus (Abd-Elsalam, 2003; Bustin ja Huggett, 2017; Ye *et al.*, 2012). Teaduskirjandusest leitud *N. apis*'e ja *N. ceranae* praimerite pikkused jäävad vahemikku 19...30 nukleotiidi, keskmine pikkus on 23 nukleotiidi, mediaanväärtus on 22,5. Kõikide praimeripaaride GC% erineb vahemikus 0...33,75%, keskmiselt 11% ning mediaanväärtus on 9,77%, seega on praimerite G-C sisaldus keskmiselt sarnane. Lisaks on kõikide praimeripaaride T_m sarnane - praimeripaaris olevate praimerite T_m erineb vahemikus 0,55...5,01°C, keskmiselt 2,18°C ning mediaanväärtus on 1,48°C.

Nosema apis'e liigispetsiifiliseks tuvastamiseks disainitud praimerite seast välistatakse optimaalse praimeripaari valikul praimeripaar NaFor ja UnivRev (Forsgren ja Fries, 2010), sest vahe praimerite T_m (5,01°C) ja GC% (33,75%) väärtustes on kõige suurem. Kõikidest *N. apis*'e liigispetsiifilistest praimeritest on iseendaga komplementaarsuse skoor pärisuunalise praimeripuhul kõige väiksem (4,00) Chen *et al.* (2008) ja Fries *et al.* (2013) tööühmade disainitud praimeritel, vastassuunalise praimeripuhul on see kõige väiksem (5,00) Fries *et al.* (2013) ja Sulborska *et al.* (2019) tööühmade disainitud praimeritel. Kõikidest *N. apis*'e liigispetsiifilistest praimeritest on iseenda 3'-otsa komplementaarsuse skoor pärisuunalise praimeripuhul kõige väiksem (1,00) Chen *et al.* (2008) tööühme praimeril, vastassuunalise praimeripuhul on see kõige väiksem (1,00) Martín-Hernández *et al.* (2007) tööühmal. Arvestades Martín-Hernández *et al.* (2007), Chen *et al.* (2008) ning Gisder ja Genersch (2013) tööühmade vähemalt 1 praimerit väga kõrget tõenäosust iseendaga komplementaarsusele (väärtusega 8,00), välistati need optimaalseima praimeripaari leidmisel. Sarnast meetodit praimerite iseenda 3'-otsaga komplementaarsusskooride puhul rakendades saadakse *N. apis*'e mesilasproovidest tuvastamiseks, seejuures dimeeride moodustumise vältimiseks ja võimalikult efektiivse PCR reaktsiooni toimumiseks optimaalne praimeripaar **Mnapis-F ja Muniv-R** (Fries *et al.*, 2013), mille praimerite pikkus on 21 ja 19 nukleotiidi, T_m erineb vaid 0,95°C ning G-C nukleotiidide sisaldus 9,77% ulatuses.

Nosema ceranae tuvastamiseks optimaalse praimeripaari leidmiseks kasutatakse sarnast meetodit. Kõikidest *N. apis*'e liigispetsiifilistest praimeritest on iseendaga komplementaarsuse skoori suhe pärisuunalise-vastassuunalise praimeripuhul kõige parem Chen *et al.* (2008) tööühme disainitud praimeritel. Kõige parem pärisuunalise-vastassuunalise praimeripuhul on iseendaga 3'-otsa komplementaarsusskoori suhe Sulborska *et al.* (2019) tööühmal.

Arvestades 3'-otsa spetsiifilisuse olulisust lähedaste liikide tuvastamisel, on eriti oluline vältida 3'-otsaga dimeeride moodustumist. *N. ceranae* mesilasproovist tuvastamiseks, seejuures dimeeride moodustumise vältimiseks ja võimalikult efektiivse PCR reaktsiooni toimumiseks on optimaalne valik praimeripaar **NosCF/CR** (Sulborska *et al.*, 2019), mille praimerite pikkus on 24 ja 21 nukleotiidi, nende T_m erineb 2,18°C ning G-C nukleotiidide sisaldus 1,79% ulatuses.

Praimeripaarid Mnapis-F ja Muniv-R (Fries *et al.*, 2013), mille T_m on vastavalt 54,82°C ja 53,87°C, ning NosCF/CR (Sulborska *et al.*, 2019), mille pärisuunalise praimer T_m on 60,56°C ja vastassuunalisel 58,38°C, on kasutatavad mesilasproovist tuvastamisel vaid *singleplex* meetodil, sest praimerite sulamistemperatuurid on väga erinevad - suurim vahe on 6,69°C. Väga suur erinevus praimerite sulamistemperatuurides kahandab amplifikatsiooni efektiivsust, sest kõrgema T_m-ga praimer võib madalamatel temperatuuridel ebaspetsiifiliselt seonduda ning madalama T_m-ga praimer ei pruugi kõrgematel temperatuuridel töötada. Lähtudes sarnasest T_m-ist, võiks *multiplex* meetodil sobida Mnapis-F ja Muniv-R (Fries *et al.*, 2013) praimeripaariga käsikäes kasutamiseks praimeripaar *Nosema ceranae* (Chen *et al.*, 2008), sest praimerite suurim T_m erinevus on 3,08°C. Lisaks võiks sobida ka praimeripaaride NosCF/CR (Sulborska *et al.*, 2019) ja *Nosema apis* (Chen *et al.*, 2008) kooslus - praimeritevaheline suurim T_m erinevus on 4,52°C, mis on kõikidest teaduskirjandusest leitud praimeripaaride kombinatsioonidest vähim temperatuurierinevus. See-eest tuleb enne *multiplex* meetodi *in vivo* kasutamist kontrollida ka 4 praimerit omavahel dimeeride moodustumise tõenäosust, mida on võimalik internetis leiduvates *multiplex* PCR praimereid analüüsivates programmides hõlpsasti teha.

Primer-BLAST kontrollib, kas konkreetne praimeripaar annab spetsiifiliselt sihtmärkjärjestuselt produkti, kuid ei kontrolli kummagi praimerit spetsiifilisust individuaalselt. Praimeripaaride puhul, mille üks praimer seondub liigispetsiifiliselt vaid sihtmärkjärjestusele, kuid teine praimer üksikult mittesihhtmärkjärjestusele, Primer-BLAST ebaspetsiifilist seandumist ei tuvasta. Edaspidi võiks käesoleva uurimistöö tulemusi kontrollida ning tundlikkuse ja efektiivsuse täpsemaks analüüsiks rakendada *in vivo* katsetes, sest teatavasti ei suuda *in silico* analüüs täielikult simuleerida empiirilisi katseid (Bustin ja Huggett, 2017; Derveaux *et al.*, 2010). Töös leitud optimaalsete praimerite käsikäes kasutuseks tuleks välja töötada ka ühtne PCR protokoll, mille järgi toimida. Fries *et al.* (2013) ja Sulborska *et al.* (2019) uuringutes kasutatud tava PCR reaktsioonisegud erinesid üksteisest

nii proovi, Taq DNA polümeraasi, reaktsioonipuhvri koguse, MgCl₂, dNTP ja mõlema praimerid kontsentratsiooni, kogumahu ning termotsükleri programmi poolest. Ka Fries *et al.* (2013) mainivad protsessi lõpus, et igas laboris võib tekkida vajadus disainida uued praimerid, rakendada teistsugust protokoll või PCR tingimusi. Juhul, kui töös soovitatud praimeripaaride, *N. apis*'e puhul Mnapis-F ja Muniv-R ning *N. ceranae* puhul NosCF/CR või mõnede muude praimeripaaride samaaegsael kasutusel saavutatakse parim spetsiifilisuse ja tundlikkuse suhe, võiks kasutatud protokoll leida kasutust ka laiemalt. See lubaks maailma eri paigus viia läbi uuringuid ja saada tulemusi, mis on üksteisega võrreldavad ning edaspidiste järelduste tegemisel ühtselt rakendatavad. Nii oleks võimalik leida tugevamaid seoseid ja teha kindlamaid järeldusi mesilaspatoogenide *N. apis* ja *N. ceranae* virulentsuse, leviku efektiivsuse ja -mustrite, ravivõimaluste, patoogenide kliinilise pildi erinevuste põhjuste jms kohta.

Usaldusväärseid tulemusi iseloomustab võimalus neid identsel protsessil korrata ja kinnitada. Ebaspetsiifiliseks osutunud praimerite puhul ei ole *in silico* praimeridisaini protsessi kordamine enamjaolt võimalik, sest protsess ei ole piisavalt detailselt lahti kirjutatud. Seetõttu on soovitatav kirjeldada võimalikult detailselt ka *in silico* praimerite disaini, mille põhjal oleks võimalik hiljem analüüsida, kas ebaspetsiifilisuse põhjus oli ebakvaliteetses praimeridisainis või milleski muus. Lisaks on põhjust kahelda ebaspetsiifilisi praimereid rakendanud töögruppide tulemustes. Rakendades näiteks praimeripaari NosA (Webster *et al.*, 2004) kummagi *Nosema* liigi nakkuse kindlaks tegemiseks, on väga lihtne saada vastuolulisi tulemusi, arvestades, et NosA praimerid on täna andmebaasides saadaval olevate järjestuste põhjal täispikkuses komplementaarsed nii *N. apis*'e kui ka *N. ceranae* 16S rRNA geenijärjestusega. Praimerite ebaspetsiifilisuse põhjus võib olla uuringute hetkel andmebaasides leiduva info vähesus - näiteks Martín-Hernández *et al.* (2007) kirjeldavad praimeridisainil vaid 15 kasutatud *Nosema* perekonna liikide järjestusandmeid, sealhulgas 6 *N. apis*'e ja 4 *N. ceranae* järjestust. Käesolevas töös korraldatud praimerite liigispetsiifilisuse kontroll aitab analüüsida, kas praimerid on endiselt spetsiifilised, kasutades aastate jooksul täienenud andmebaasi.

Kokkuvõte

Nosematoosi kontrolli all hoidmiseks ja põhjalikumalt uurimiseks on oluline korrektne mikrosporiidide *Nosema apis* ja *N. ceranae* tuvastamine (Hamiduzzaman, 2010). Käesoleva töö käigus leiti liigispetsiifilisuse analüüsiks 7 *Nosema apis*'e ja 6 *Nosema ceranae* detekteerimiseks disainitud praimeripaari. Primer-BLAST liigispetsiifilisuse kontrollile tuginedes sobivad *Nosema apis*'e liigispetsiifiliseks tuvastamiseks 5 praimeripaari ning *Nosema ceranae* liigispetsiifiliseks tuvastamiseks 2 praimeripaari. Lisaks on tuvastamiseks sobilikud 2 praimeripaari, mille mittesihtmärkjärjestusega 5-7 mittepaardumistest tingituna amplifikatsiooni ei toimu. Tuginedes praimerite parameetrite optimaalsuse analüüsile, soovitatakse tavapärase *singleplex* PCR meetodi puhul nosematoosnakkuse põhjustaja kindlaks määramisel kasutada varasemalt välja töötatud praimeripaare **Mnapis-F ja Muniv-R** (Fries *et al.*, 2013) ja **NosCF/CR** (Sulborska *et al.*, 2019).

Käesoleva töö tulemust on võimalik rakendada nosematoosnakkuse põhjustajate liigipõhiseks tuvastuseks diagnostilise analüüsti arendamisel. Välja pakutud optimaalsete praimeripaaride kasutuseks tuleks luua ühtne tööprotsess (näiteks DNA ekstraheerimiseks kasutatava meetodika valik mesilase kehaosast, meeproovist vm) ja PCR protokoll, mis võimaldaks võimalikult efektiivset, tundlikku ja spetsiifilist *Nosema* liikide DNA detekteerimist. Nakkuse diagnoosimine selle varajases staadiumis võimaldaks võimalikult varakult võtta kasutusele haigust pärssivad ravimeetodid, ennetada kaasuvate haiguste teket ning rakendada tulevikus individuaalset ja efektiivset ravi vastavalt põhjustaja(te)le. Nosematoosi põhjustavate liikide tuvastamine võiks saada mesinike seas regulaarseks tavaks, et ennetada haigusest tingitud suurema kahju tekitamist nii mesilastele kui ka mesinikele endile.

Species-specificity analysis of PCR primers designed to detect nosematosis-causing microsporidia *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in bees

Johanna-Stina Idla

Summary

The microsporidia *Nosema apis* and *N. ceranae* are highly specialized parasitic fungi causing nosematosis in bees. *Nosema apis* causes diarrhoea in bees. On the other hand, *N. ceranae* infection is characterized by a long asymptomatic incubation period which often escapes the beekeepers' attention, subsequently causing extensive bee mortality. The Estonian Veterinary and Food Laboratory offers Estonian beekeepers an analysis method based on the detection and enumeration of *Nosema* sp. spores, although not allowing the two *Nosema* species to be distinguished.

The distinction between *N. apis* and *N. ceranae* is relevant because the course and consequences of nosematosis are different for bees, depending on the pathogen species. By detecting nosematosis at a sufficiently early stage, it is possible to apply appropriate prevention or treatment methods, depending on the infectious agent and prevent causing further damage to bees and beekeepers. PCR-based methods using species-specific primers which can distinguish between closely related species make it possible to detect nosematosis infection reliably and sensitively before the onset of severe symptoms.

In this bachelor thesis, 13 potentially *N. apis* and *N. ceranae* species-specific PCR primers were found from the scientific literature. The species-specificity of primers was checked using Primer-BLAST, and the optimal primers to be used in *singleplex* PCR were found for both species. As a result of this work, *in silico* analysis of the primers demonstrated that primer pairs Mnapis-F and UnivRev, and NosCF and NosCR are the optimal option for species-specific detection of *N. apis* and *N. ceranae*, respectively. Selected primer pairs can be applied in the development of a diagnostic test for species-specific identification of the two *Nosema* species responsible for nosematosis.

Kasutatud kirjanduse loetelu

- Abd-Elsalam, K. A. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *Afr J Biotechnol*, 2(5): 91–95.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17): 3389–3402.
- Andreson, R., Möls, T., Remm, M. (2008). Predicting failure rate of PCR in large genomes. *Nucleic Acids Res*, 36(11): e66. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn290>.
- Andreson, R., Puurand, T., Remm, M. (2006a). SNPmasker: automatic masking of SNPs and repeats across eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res*, 34(2): W651–W655. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl125>.
- Andreson, R., Reppo, E., Kaplinski, L., Remm, M. (2006b). GENOMEMASKER package for designing unique genomic PCR primers. *BMC bioinformatics*, 7, 172. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-172>.
- Asten, A., Ess, M., Järva, J., ... Vari, L. (2019). Nosematoos, p. 250–256. In: Tänapäeva mesindus, Print Best, Viljandi.
- Aufauvre, J., Biron, D. G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., Vigüès, B., Belzunces, L. P., Delbac, F., Blot, N. (2012). Parasite-insecticide interactions: A case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci Rep-UK*, 2: 326. <https://doi.org/10.1038/srep00326>.
- Bourgeois, A. L., Rinderer, T. E., Beaman, L. D., Danka, R. G. (2010). Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *J Invertebr Pathol*, 103(1): 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.10.009>.
- Burnham, A. J. (2019). Scientific Advances in Controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) Infections in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Frontiers in veterinary science*, 6: 79. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00079>.
- Bustin, S., Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. Biomolecular detection and quantification, 14: 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>.

- Capella-Gutiérrez, S., Marcet-Houben, M., Gabaldón, T. (2012). Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biol*, 10, 47. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-47>.
- Chaimanee, V., Chen, Y., Pettis, J. S., Cornman, R. S., Chantawannakul, P. (2011). Phylogenetic analysis of *Nosema ceranae* isolated from European and Asian honeybees in Northern Thailand. *J Invertebr Pathol*, 107(3): 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.012>.
- Chaimanee, V., Warrit, N., Chantawannakul, P. (2010). Infections of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. *J Invertebr Pathol*, 105(2): 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.06.005>.
- Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B., Pettis, J. S. (2008) *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J Invertebr Pathol*, 97(2): 186–188. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.07.010>.
- Chen, Y., Evans, J. D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A. M., Pettis, J. S. (2009b). Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *J Invertebr Pathol*, 101(3): 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.05.012>.
- Chen, Y. P., Evans, J. D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Rindal, D., Pettis, J. S. (2009a). Morphological, Molecular, and Phylogenetic Characterization of *Nosema ceranae*, a Microsporidian Parasite Isolated from the European Honey Bee, *Apis mellifera*. *J Euk Microbiol*, 56(2): 142–147. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00374.x>.
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic Acids Res*, 44(D1): D67–D72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276>.
- Claverie, J. M., Notredame, C. (2007). Becoming a Pro in Sequence Analysis, p. 197-328. In: *Bioinformatics For Dummies*, 2nd edition, Wiley Publishing, Inc., Hoboken.
- Cornman, R. S., Bennett, A. K., Murray, K. D., Evans, J. D., Elisk, C. G., Aronstein, K. (2012). Transcriptome analysis of the honey bee fungal pathogen, *Ascosphaera apis*: Implications for host pathogenesis. *BMC Genomics*, 13: 285. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-285>.
- Corradi, N., Keeling, P. J. (2009). Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biology Reviews*, 23(1–2): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.05.001>.

- Daher, R. K., Stewart, G., Boissinot, M., Boudreau, D. K., Bergeron, M. G. (2015). Influence of sequence mismatches on the specificity of recombinase polymerase amplification technology. *Mol Cell Probes*, 29(2): 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.11.005>.
- Derveaux, S., Vandesompele, J., Hellemans, J. (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, 50(4): 227–230. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.11.001>.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *Genome Res*, 3: S30–S37. <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.s30>.
- Dolezal, A. G., Toth, A. L. (2018). Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. *Curr Opin Insect Sci*, 26: 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.006>.
- Down, R. E., Bell, H. A., Kirkbride-Smith, A. E., Edwards, J. P. (2004). The pathogenicity of *Vairimorpha necatrix* (Microspora: Microsporidia) against the tomato moth, *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) and its potential use for the control of lepidopteran glasshouse pests. *Pest Manag Sci*, 60(8): 755–764. <https://doi.org/10.1002/ps.872>.
- Duta-Cornescu, G., Simon-Gruita, A., Constantin, N., Stanciu, F., Dobre, M., Banica, D., Tuduce, R., Cristea, P. D., Stoian, V. (2009). A comparative study of ARMS - PCR and RFLP - PCR as methods for rapid SNP identification. *Rom Biotech Lett*, 14(6): 4845–4850.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5, 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>.
- Edwards, M. C., Gibbs, R. A. (1994). Multiplex PCR: Advantages, Development and Applications. *Genome Res*, 3: S65–S75. <https://doi.org/10.1101/gr.3.4.s65>.
- Erler, S., Lommatzsch, S., Lattorff, H. M. G. (2012). Comparative analysis of detection limits and specificity of molecular diagnostic markers for three pathogens (Microsporidia, *Nosema* spp.) in the key pollinators *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Parasitol Res*, 110: 1403–1410. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2640-9>.
- Fleites-Ayil, F.A., Quezada-Euán, J.J.Q., Medina-Medina, L.A. (2018). Onset of Foraging and Lifespan of Africanized Honey Bees (*Apis Mellifera*) Infected with Different Levels of *Nosema Ceranae* Spores in Neotropical Mexico. *Apidologie*, 49: 781–788. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0602-2>

- Foley, K., Fazio, G., Jensen, A. B., Hughes, W. O. H. (2014). The distribution of *Aspergillus* spp. Opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. *Vet Microbiol*, 169(3–4): 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.11.029>.
- Forsgren, E., Fries, I. (2010). Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet Parasitol*, 170(3–4): 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.010>.
- Fries, I. (1989). Observations on the development and transmission of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. *J Apicult Res*, 28(2): 107–117. <https://doi.org/10.1080/00218839.1989.11100830>.
- Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol*, 103: S73–S79. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.017>.
- Fries, I., Chauzat, M. P., Chen, Y. P., ... Williams, G. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *J Apicult Res*, 52(1): 1–28. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14>.
- Fries, I., Granados, R. R., Morse, R. A. (1992). Intracellular germination of spores of *Nosema apis* Z. *Apidologie*, 23(1): 61–70. <https://doi.org/10.1051/apido:19920107>.
- Fries, I., Martín, R., Meana, A., García-Palencia, P., Higes, M. (2006). Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *J Apicult Res*, 45(4): 230–233. <https://doi.org/10.1080/00218839.2006.11101355>.
- Frith, M. C. (2011). Gentle masking of low-complexity sequences improves homology search. *PLOS ONE*, 6(12): e28819. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028819>.
- Fukuda, A., Kodama, Y., Mashima, J., Fujisawa, T., Ogasawara, O. (2021). DDBJ update: streamlining submission and access of human data. *Nucleic Acids Res*, 49(D1): D71–D75. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa982>.
- Gajger, I.T., Petrinc, Z., Pinter, L., Kozarić, Z. (2009). Experimental Treatment of *Nosema* Disease with “Nozevit” Phyto-Pharmacological Preparation. *Am Bee J*, 149(5): 485–490.
- Gisder, S., Genersch, E. (2013). Molecular differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* based on species-specific sequence differences in a protein coding gene. *J Invertebr Pathol*, 113(1): 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.01.004>.

- Graystock, P., Goulson, D., Hughes, W. O. H. (2015). Parasites in bloom: flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species. *Proc R Soc Lond [Biol]*, 282(1813): 20151371. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1371>.
- Guimarães-Cestaro, L., Serrão, J. E., Message, D., Martins, M. F., Teixeira, É. W. (2016). Simultaneous detection of *Nosema* spp., *Ascosphaera apis* and *Paenibacillus larvae* in honey bee products. *J Hymenopt Res*, 49: 43–50. <https://doi.org/10.3897/JHR.49.7061>.
- Hamiduzzaman, M. M., Guzman-Novoa, E., Goodwin, P. H. (2010). A multiplex PCR assay to diagnose and quantify *Nosema* infections in honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol*, 105(2): 151–155, <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.06.001>.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., ... Meana, A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol*, 10(10): 2659–2669. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x>.
- Higes, M., Martín, R., Meana, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol*, 92(2): 93–95. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.02.005>.
- Hornitzky, M. (2008). *Nosema apis* literature review, p. 1-9. In: *Nosema disease: Literature review and three year survey of beekeepers - Part 2*, Rural Industries Research and Development Corporation, Kingston, ACT.
- Howe, K. L., Achuthan, P., Allen, J., ... Flicek, P. (2021). Ensembl 2021. *Nucleic Acids Res*, 49(D1): D884–D891. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa942>.
- Huang, W. F., Solter, L. F., Yau, P. M., Imai, B. S. (2013). *Nosema Ceranae* Escapes Fumagillin Control in Honey Bees. *PLoS Pathog*, 9(3): e1003185. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003185>.
- Huang, Y. T., Yang, Ji., Chrobak, M., Borneman, J. (2014). PRISE2: Software for designing sequence-selective PCR primers and probes. *BMC Bioinformatics*, 15, 317. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-317>.
- Izquierdo, F., Castro Hermida, J. A., Fenoy, S., Mezo, M., González-Warleta, M., del Aguila, C. (2011). Detection of microsporidia in drinking water, wastewater and recreational rivers. *Water Res*, 45(16): 4837–4843. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.06.033>.

- Jensen, A. B., Aronstein, K., Flores, J. M., Vojvodic, S., Palacio, M. A., Spivak, M. (2013). Standard methods for fungal brood disease research. *J Apicult Res*, 52(1): 1–20. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.13>.
- Järvis, M. (2019). Pisieoseliste *Nosema apis* ja *Nosema ceranae* söötmise teel nakatamise edukus meemesilastel ja mõju isendite elueale. Bakalaureusetöö, Eesti Maaülikool.
- Kalendar, R., Khassenov, B., Ramankulov, Y., Samuilova, O., Ivanov, K. I. (2017). FastPCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics*, 109(3–4): 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.05.005>.
- Kim, Y., Choi, S. J., Choi, C. (2017). An Efficient PCR-RFLP Method for the Rapid Identification of Korean *Pyropia* Species. *Molecules*, 22(12): 2182. <https://doi.org/10.3390/molecules22122182>.
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., ... Paxton, R. J. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol*, 96(1): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.014>.
- Klee, J., Tay, W. T., Paxton, R. J. (2006). Specific and sensitive detection of *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) in bumble bees (*Bombus* spp.; Hymenoptera: Apidae) by PCR of partial rRNA gene sequences. *J Invertebr Pathol*, 91(2): 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.10.012>.
- Klymus, K. E., Ruiz Ramos, D. V., Thompson, N. L., Richter, C. A. (2020). Development and Testing of Species-specific Quantitative PCR Assays for Environmental DNA Applications. *Jove-J Vis Exp*, 165: e61825. <https://dx.doi.org/10.3791/61825>.
- Koressaar, T., Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10): 1289–1291. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm091>.
- Ku, C. T., Wang, C. Y., Tsai, Y. C., Tzeng, C. C., Wang, C. H. (2007). Phylogenetic analysis of two putative *Nosema* isolates from Cruciferous Lepidopteran pests in Taiwan. *J Invertebr Pathol*, 95(1): 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.11.008>.
- Kõressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R., Remm, M. (2018). Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*, 34(11): 1937–1938, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty036>.

- Lefever, S., Pattyn, F., Hellemans, J., Vandesompele, J. (2013). Single-Nucleotide Polymorphisms and Other Mismatches Reduce Performance of Quantitative PCR Assays. *Clin Chem*, 59(10): 1470–1480. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.203653>.
- MacDonald, A. J., Sarre, S. D. (2016). A framework for developing and validating taxon-specific primers for specimen identification from environmental DNA. *Mol Ecol Resour*, 17(4): 708–720. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12618>.
- Madeira, F., Park, Y., Lee, J., ... Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res*, 47(W1): W636–W641, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>.
- Marshall, O. J. (2004). PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*, 20(15): 2471–2472. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth254>.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., Martínez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A., Higes, M. (2012). Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*?. *Environ Microbiol*, 14(8): 2127–2138. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x>.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Barrios, L., Martínez-Salvador, A., Meana, A., Mayack, C., Higes, M. (2011). Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol Res*, 109: 605–612. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2292-9>.
- Martin-Hernandez, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M, Garrido-Bailon, E., Higes, M. (2007). Outcome of Colonization of *Apis Mellifera* by *Nosema Ceranae*. *Appl Environ Microbiol*, 73(20): 6331–6338. <https://doi.org/10.1128/AEM.00270-07>.
- Matović, K., Vidanović, D., Manić, M., Stojiljković, M., Radojičić, S., Debeljak, Z., Šekler, M., Ćirić, J. (2020). Twenty-five-year study of *Nosema* spp. in honey bees (*Apis mellifera*) in Serbia. *Saudi J Biol Sci*, 27(1): 518–523. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.11.012>.
- McGowan, J., De la Mora, A., Goodwin, P. H., Habash, M., Hamiduzzaman, M. M., Kelly, P. G., Guzman-Novoa, E. (2016). Viability and infectivity of fresh and cryopreserved *Nosema ceranae* spores. *J Microbiol Meth*, 131: 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.021>.

Michalczyk, M., Sokół, R., Szczerba-Turek, A. (2013). Phylogenetic analysis of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* small subunit 16S rRNA in honey bees (*Apis mellifera*) from north-eastern Poland. *Med weter*, 69(12): 733–735.

Naudi, S., Kullman, B., Šteiselis, J., Tummeleht, L., Jürison, M., Raimets, R., Karise, R. (2019). Pisieoselised *Nosema apis* ja *Nosema ceranae* meemesilastes - muutus ajas ning liigiline jaotus. Teaduselt mahepõllumajandusele: konverentsi toimetised, 1: 84–87.

NCBI Resource Coordinators (2018). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*, 46(D1): D8–D13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095>.

Needleman, S. B., Wunsch, C. D. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol*, 48(3): 443–453. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90057-4).

Nosema apis. (2008). *Nosema apis*, p. 2149. In: Mehlhorn, H. (ed.), Encyclopedia of Parasitology, Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-48996-2_2149.

Notredame, C., Higgins, D. G., Heringa, J. (2000). T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol*, 302(1): 205–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>.

Oherd, A., Vari, L. (2015). Varroalest – viirushaiguste ning teiste nakkuste levimisele kaasaaitaja, p. 15–17. In: Linask, K. (ed.), Varroatoosi ja kaasnevate mesilashaiguste tõrje, 4th edition, Eesti Mesinike Liit, Tallinn.

O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., ... Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res*, 44(D1): D733–D745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>.

Paxton, R. J., Klee, J., Korpela, S., Fries, I. (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*, 38: 558–565. <https://doi.org/10.1051/apido:2007037>.

Pompanon, F., Deagle, B. E., Symondson, W. O. C., Brown, D. S., Jarman, S. N., Taberlet, P. (2012). Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Mol Ecol*, 21(8): 1931–1950. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05403.x>.

- Ptaszyńska, A. A., Borsuk, G., Mułenko, W., Demetraki-Paleolog, J. (2014). Differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* spores under Scanning Electron Microscopy (SEM). *J Apicult Res*, 53(5): 537–544. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.5.02>.
- Raime, K. (2015). Taksoni-spetsiifiliste praimerite disaini meetoodika arendus ning selle rakendamine allergeensete taimeliikide tuvastamisel. Magistritöö, Tartu Ülikool.
- Ratnasingham, S., Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes*, 7: 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>.
- Riis, J. (2014). Mesilaste haigused, p. 32–37. In: Linask, K. (ed.), Mesinduse oskussõnastik, 2nd edition, Eesti Mesinike Liit, Tallinn.
- Sagastume, S., del Águila, C., Martín-Hernández, R., Higes, M., Henriques-Gil, N. (2011). Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honeybees. *Environ Microbiol*, 13(1): 84–95. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02311.x>.
- SantaLucia, J. Jr. (2007). Physical principles and visual-OMP software for optimal PCR design. *Methods Mol Biol*, 402: 3–33. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_1.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., ... Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*, 7(1): 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
- Spiltoir, C. (1955). Life Cycle of *Ascosphaera apis* (*Pericystis apis*). *Am J Bot*, 42(6): 501–508. <https://doi.org/10.2307/2438686>.
- Stadhouders, R., Pas, S. D., Anber, J., Voermans, J., Mes, T. H., Schutten, M. (2010). The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *J Mol Diagn*, 12(1): 109–117. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090035>.
- Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Genersch, E., Kovacevic, S. R., Ljubenkovic, J., Radakovic, M., Aleksic, N. (2011). Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie*, 42: 49–58. <https://doi.org/10.1051/apido/2010034>.

- Sulborska, A., Horecka, B., Cebrat, M., Kowalczyk, M., Skrzypek, T. H., Kazimierczak, W., Trytek, M., Borsuk, G. (2019). Microsporidia *Nosema* spp. – obligate bee parasites are transmitted by air. *Sci Rep-UK*, 9: 14376. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50974-8>.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22(22): 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, 40(15): e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>.
- Villard, P., Malausa, T. (2013). SP-Designer: a user-friendly program for designing species-specific primer pairs from DNA sequence alignments. *Mol Ecol Resour*, 13(4): 755–758. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12116>.
- Webster, T. C., Pomper, K. W., Hunt, G., Thacker, E. M., Jones, S. C. (2004). *Nosema apis* infection in worker and queen *Apis mellifera*. *Apidologie*, 35(1): 49–54. <https://doi.org/10.1051/apido:2003063>.
- Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Jane, S. F., Lowe, W. H., Whiteley, A. R., Schwartz, M. K. (2013). Robust Detection of Rare Species Using Environmental DNA: The Importance of Primer Specificity. *PLOS ONE*, 8(3): e59520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059520>.
- Wu, J. H., Hong, P. Y., Liu, W. T. (2009). Quantitative effects of position and type of single mismatch on single base primer extension. *J Microbiol Meth*, 77(3): 267–275. [10.1016/j.mimet.2009.03.001](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.03.001).
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.
- Zhao, G., Guan, Y. (2010). Polymerization behavior of Klenow fragment and Taq DNA polymerase in short primer extension reactions. *Acta Bioch Bioph Sin*, 42(10): 722–728. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq082>.

Kasutatud veebiaadressid

Abiks mesnikule mesilashaiguste äratundmiseks. (2016). Maaeluministeeriumi kodulehekülg. Kasutatud 14.01.2021,

<https://www.agri.ee/et/abiks-mesnikule-mesilashaiguste-aratundmiseks>.

Loomataudid. (2021). Maaeluministeeriumi kodulehekülg. Kasutatud 15.02.2021, <https://www.agri.ee/et/eesmargid-tegevused/loomade-tervis-heaolu-ja-aretus/loomatervis/loomataudid>.

Nosemosis of Honey Bees. (2019). World Organisation for Animal Health kodulehekülg. Kasutatud 15.03.2021,

https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.04_NOSEMOSIS_FIN_AL.pdf.

Veterinaar- ja Toidulaboratooriumi tasuliste teenuste hinnakiri. (2020). Kasutatud 18.01.2021, https://www.vetlab.ee/sites/default/files/Hinnakiri%2012_2020_kodulehele.pdf.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Johanna-Stina Idla,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose “**Mesilastel noseматоosi põhjustavate mikrosporiidide *Nosema apis* ja *Nosema ceranae* tuvastamiseks disainitud PCR praimerite liigispetsiifilisuse analüüs**”, mille juhendaja on 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 Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, 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.

Johanna-Stina Idla

31.05.2021