

Primer hallazgo del Virus de la Parálisis Aguda Israelí (IAPV) en *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae)

SUSEVICH, María L.^{1,2}, REYNALDI, Francisco J.^{1,2*},
MARTI, Gerardo A.^{2,3} & ECHEVERRÍA, María G.^{1,2}

¹ Laboratorio de Virología (LAVIR), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina. * E-mail: freynaldi@yahoo.com

² CONICET (CCT La Plata). La Plata, Argentina.

³ Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) (CCT La Plata CONICET-UNLP). Boulevard 120 e/ Av. 60 y calle 64 (1900) La Plata, Argentina.

Received 03 - X - 2018 | Accepted 31 - XII - 2018 | Published 28 - III - 2019

<https://doi.org/10.25085/rsea.780104>

First IAPV finding in *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae)

ABSTRACT. In the La Plata Horticultural Belt (CHP, in Spanish), bee viruses were searched for the first time in green bug *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). The presence of the Israeli acute paralysis virus (IAPV) was detected using PCR technique. These results would allow to infer that knowledge of viral infections in insects could be of great importance since they could act as viral reservoirs, resulting in the spilling of pathogens to honey bees and other pollinators. This study made it possible to detect IAPV for the first time in *N. viridula*. Future studies are needed to understand the ecology of these viruses in arthropod communities of CHP and to determine the role that green bugs play as possible reservoirs of these viruses in the environment.

KEYWORDS. Bees. Green bug. La Plata Horticultural Belt. Pathogenic viruses of bees.

RESUMEN. Se llevó a cabo un relevamiento de virus patógenos de abejas en ejemplares de chinche verde *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) en el Cinturón Hortícola Platense (CHP). Se detectó la presencia del Virus israelí de la parálisis aguda (IAPV) mediante técnicas moleculares. Estos resultados permitirían inferir que las infecciones virales en los insectos son de gran importancia ya que podrían actuar como reservorios virales, información que podría ser útil para conocer la dinámica del virus en la naturaleza. Este trabajo detecta por primera vez la presencia de IAPV en *N. viridula*. Serán necesarios estudios adicionales para entender la ecología de estos virus en las comunidades de artrópodos del CHP y determinar el rol que cumplen las chinches como posibles reservorios de estos virus en el ambiente.

PALABRAS CLAVE. Abejas. Chinche verde. Cinturón Hortícola Platense. Virus patógenos de abejas.

En la región del Cinturón Hortícola Platense (CHP), que comprende parte los partidos de Berazategui, Magdalena y La Plata (Provincia de Buenos Aires, Argentina), se halla presente la chinche verde *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae), capaz de causar daño en cultivos regionales (La Porta & de Crozuel, 1984). Particularmente, en un trabajo de 1989 realizado en Sudáfrica, los autores comprobaron que esta

especie causaba daño por alimentación directa sobre la pasionaria (*Passiflora edulis* Sims), además de actuar como vector de dos virus que infectan a su fruto, el maracuyá (Williamson & von Wechmar, 1992).

En el CHP convive además la abeja melífera (*Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)), afectada por varios organismos tales como la bacteria *Paenibacillus larvae* (Alippi et al., 2004), el ácaro *Varroa destructor* (Dolezal

et al., 2016; Beyer et al., 2018; Lin et al., 2018), el hongo *Nosema* spp. (Plischuk et al., 2008; Botías et al., 2013) y los virus de las familias Dicistroviridae e Iflaviridae (De Miranda et al., 2013). A *Nosema ceranae* y algunos virus se los ha vinculado recientemente a la desaparición de las colonias de abejas (o síndrome de despoblamiento de colmenas), que se ha detectado en América así como en países de la Unión Europea y de Asia (Higes et al., 2009; Antúnez et al., 2017; Meana et al., 2017). Este síndrome se caracteriza porque las colonias pierden de manera repentina sus abejas, dejando en los mejores casos a la reina y a un pequeño grupo de obreras. Además las abejas desaparecen sin dejar rastro dado que apenas se encuentran individuos muertos dentro o cerca de la colmena (Bromenshenk et al., 2010; Martín-Hernández et al., 2018). En relación a los patógenos virales, a la fecha se han identificado en abejas al menos 24 virus diferentes (Remnant et al., 2017) y en general tienen distribución mundial. Entre ellos, el virus de la parálisis aguda israelí (IAPV) (Valles et al., 2017) se encuentra estrechamente relacionado con el virus de la abeja de Cachemira (KBV) y el virus de la parálisis aguda de las abejas (ABPV) (Meeus et al., 2014) ya que pertenecen al mismo género (Dicistroviridae, Aparavirus) pero genéticamente diferentes entre ellos (Maori et al., 2007). Las abejas infectadas con IAPV presentan alas temblorosas, parálisis y finalmente mueren fuera de la colmena. Algunos reportes han correlacionado fuertemente este virus con el síndrome de despoblamiento de colmenas (CCD en inglés) encontrándose en un apiario colonias donde IAPV era el patógeno dominante y se replicaba activamente en éstas (Cox-Foster et al., 2007). Curiosamente, un aumento de las copias genómicas de IAPV en dos colonias coincidió con su posterior colapso. Esto indicaría que una vez adquirida e inducida a la replicación, IAPV actúa como un factor infeccioso que afecta la salud de las colonias y puede determinar su mortalidad. En Argentina, el virus de la parálisis crónica de las abejas (CBPV), el virus Sacbrood (SBV) y ABPV han sido detectados (Reynaldi et al., 2010) y podrían ser los causantes probables de las pérdidas de colonias de abejas (McMenamin & Genersch, 2015). De esta manera las enfermedades virales de las abejas estarían relacionadas con el CCD, y por ese motivo son importantes desde el punto de vista económico en la apicultura. En este sentido, estudiar los patógenos de las abejas en insectos que comparten su mismo nicho ecológico resulta de interés, ya que muchos de ellos podrían actuar como posibles reservorios virales.

El objetivo del presente trabajo fue investigar la presencia de virus patógenos de abejas en chinches verdes.

Se utilizaron 60 individuos de *N. viridula* obtenidos de colectas realizadas entre marzo de 2016 y marzo de 2017, cada 15 días. Todas las muestras se tomaron de invernáculos tanto a cielo abierto como cerrados. La totalidad de los insectos fueron colectados de *Lactuca*

sativa L. (lechuga), *Solanum melongena* L. (berenjena), *Solanum lycopersicum* L. (tomate) y *Capsicum annum* L. (pimiento). Los insectos fueron colectados individualmente en recipientes plásticos y transportados al laboratorio. Los individuos colectados no presentaron signos visibles de infección y luego de 48 hs en el laboratorio fueron congelados a -20 °C para su posterior análisis.

Las chinches se agruparon en cuatro grupos de 15 individuos adultos cada uno y se trituraron en un mortero con 2 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de la homogenización, las muestras se purificaron y clarificaron de acuerdo al protocolo descrito por Susevich et al. (2017) y luego fueron corridas en geles de poliacrilamida para evaluar la presencia de proteínas de peso específico. De acuerdo a estos resultados, las muestras que mostraron las bandas esperadas para la familia Dicistroviridae fueron seleccionadas para realizar su posterior extracción de ARN. Éste se extrajo agregando 500 µl de reactivo Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) a 500 µl del material purificado. La mezcla se extrajo con 220 µl de cloroformo, se agitó fuertemente y luego de una centrifugación a 12.000 x g durante 10 min, el ARN contenido en la solución acuosa se precipitó mediante la adición de un volumen igual de isopropanol. El ARN precipitado se recogió por centrifugación a 12.000 x g durante 10 min, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió el *pellet* en 20 µl de agua libre de RNasa.

Se utilizaron 5 µl del ARN total para la síntesis de ADN complementario (ADNc). La reacción se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Sguazza et al. (2013) utilizando una PCR múltiple (mPCR) como metodología de *screening* en un volumen final de 25 µl. Esta PCR múltiple amplifica 6 virus: SBV y virus de las alas deformadas -DWV- (Iflaviridae), virus de las celdas reales negras -BQCV-, ABPV e IAPV (Dicistroviridae) y CBPV (sin clasificar). Como control positivo se utilizó una muestra previamente aislada y caracterizada en el Laboratorio de Virología como IAPV. La presencia de IAPV se confirmó luego del *screening* utilizando los cebadores específicos propuestos por Reynaldi et al. (2011) para una PCR simple, que amplifican 185 pb. Luego de la amplificación las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2,5% durante 40 minutos a 100 V que fue inmediatamente teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz UV.

De los cuatro grupos de muestras analizados, tres fueron positivos a IAPV, tanto en la PCR múltiple como en la PCR específica, en la cual se evidenciaron amplicones de 185 pb específicos de acuerdo a Reynaldi et al. (2011) (Fig. 1).

El virus IAPV se describió por primera vez en Israel y se asoció con la mortalidad de las abejas (Maori et al., 2007). Sin embargo Reynaldi et al. (2011) estudiaron la frecuencia de IAPV en abejas melíferas argentinas, hallando un 41% de prevalencia sin presentar mortalidad en las colmenas estudiadas. También el

IAPV se ha reportado en España (Garrido-Bailón et al., 2010) y en Francia (Blanchard et al., 2008) sin definir el papel patogénico de este virus en las colonias de abejas melíferas.

Por otro lado, Reynaldi et al. (2013) reportaron el primer informe de infección de *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) con virus de abejas melíferas y postularon reforzar los estudios de las infecciones virales en abejorros y de su epidemiología ya que el posible rol de los primeros como reservorios daría lugar a la propagación de patógenos hacia las abejas melíferas y otros polinizadores nativos. Estos autores concuerdan con Levitt et al., (2013), quienes postulan que los virus no son específicos de la comunidad de polinizadores, y que otras especies de artrópodos tendrían el potencial de participar en la transmisión de virosis en poblaciones de polinizadores.

Este trabajo permitió detectar por primera vez IAPV en *N. viridula* y sugiere que incluso insectos filogenéticamente distantes de *A. mellifera* (como *N. viridula*) podrían actuar como reservorios virales, resultando en la dispersión de patógenos hacia las abejas melíferas y resto de los polinizadores, como propusieron Reynaldi et al. (2013) para los abejorros. Serían necesarios estudios a mayor escala para comprender la dinámica de estos virus en las comunidades de artrópodos del CHP y determinar el rol que cumplen sus integrantes como posibles agentes foréticos o transportadores, reservorios o huéspedes.

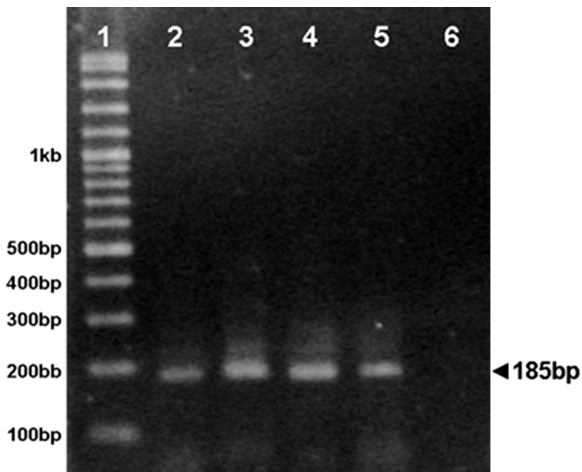


Fig. 1: Amplificación específica de IAPV de tres muestras positivas a virus utilizando PCR múltiple (mPCR). Calle 1: Marcador de pares de bases –pb- (Fermentas); Calle 2: control positivo para IAPV; Calles 3, 4 y 5: Amplificación positiva para IAPV; Calle 6: control negativo (mezcla de PCR sin molde).

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Alippi, A.M., Reynaldi, F.J., López, A.C., De Giusti, M.R., & Aguilar, O.M. (2004) Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the causal agent of American Foulbrood of honeybees in Argentina. *Journal of Apicultural Research*, **43**, 135-143.
- Antúnez, K., Invernizzi, C., Mendoza, Y., vanEngelsdorp, D., & Zunino, P. (2017). Honeybee colony losses in Uruguay during 2013-2014. *Apidologie*, **48**, 364-370.
- Beyer, M., Junk, J., Eickermann, M., Clermont, A., Kraus, F., Georges, C., Reichart, A., & Hoffmann, L. (2018) Winter honey bee colony losses, *Varroa destructor* control strategies, and the role of weather conditions: Results from a survey among beekeepers. *Research in Veterinary Science*, **118**, 52-60.
- Blanchard, P., Schurr, F., Celle, O., Cougoule, N., Drajnudel, P., Thiéry, R., Faucon, J.P., & Ribière, M. (2008) First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, **99**, 348-350.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., & Higes, M. (2013) *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research*, **44**, 25.
- Bromenshenk, J.J., Henderson, C.B., Wick, Ch.H., Stanford, M.F., Zulich, A.W., Jabbour, R.E., Deshpande, S.V., McCubbin, P.E., Seccomb, R.A., et al. (2010) Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS ONE*, **5**(10), e13181.
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., et al. (2007) A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, **318**, 283-287.
- De Miranda, J.R., Bailey, L., Ball, B.V., Blanchard, P., Budge, G. E., Chejanovsky, N., Chen, Y.P., Gauthier, L., Genersch, E., et al. (2013) Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, **52**, 1-56.
- Dolezal, A.G., Carrillo-Tripp, J., Miller, W.A., Bonning, B.C., & Toth, A.L. (2016) Intensively Cultivated Landscape and *Varroa* Mite Infestation Are Associated with Reduced Honey Bee Nutritional State. *PLoS One*, **11**(4), e0153531.
- Garrido-Bailón, E., Martín-Hernández, R., Bernal, J., Bernal, J.L., Martínez-Salvador, A., Barrios, L., Meana, A., & Higes, M. (2010) The detection of Israeli Acute Paralysis virus (IAPV), fipronil and imidacloprid in professional apiaries are not related with massive honey bee colony loss in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **8**, 658-661.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido Bailón, E., González-Porto, A.V., García-Palencia, P., Meana, A., del Nozal, M.J., Mayo, R., & Bernal, J.L. (2009) Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports*, **1**, 110-113.
- La Porta, C.N., & de Crozuel, I.S. (1984) Estudios básicos para el control biológico de *Nezara viridula* (L., 1758) (Hemiptera, Pentatomidae) en la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, **43**, 119-143.
- Levitt, A.L., Singh, R., Cox-Foster, D.L., Rajotte, E., Hoover, K., Ostiguy, N., & Holmes, E.C. (2013). Cross-species transmission of honey bee viruses in associated arthropods. *Virus Research*, **176**, 232-240.

- Lin, Z., Qin, Y., Page, P., Wang, S., Li, L., Wen, Z., Hu, F., Neumann, P., Zheng, H., & Dietemann, V. (2018) Reproduction of parasitic mites *Varroa destructor* in original and new honeybee hosts. *Ecology and Evolution*, **8**(4), 2135-2145.
- Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., Tanne, E., & Sela, I. (2007) Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra-and inter-species recombination. *Journal of General Virology*, **88**, 3428-2438.
- Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., García-Palencia, P., Meana, A., Pinto, M.A., et al. (2018) *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environmental Microbiology*, **20**, 1302-1329.
- McMenamin, A.J., & Genersch, E. (2015) Honey bee colony losses and associated viruses. *Current Opinion in Insect Science*, **8**, 121-129.
- Meana, A., Llorens-Picher, M., Euba, A., Bernal, J.L., Bernal, J., García-Chao, M., Dagnac, T., Castro-Hermida, J.A., González-Porto, A.V., et al. (2017) Risk factors associated with honey bee colony loss in apiaries in Galicia, NW Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **15**(1), e0501.
- Meeus, I., de Miranda, J.R., de Graaf, D.C., Wäckers, F., & Smagghe, G. (2014) Effect of oral infection with Kashmir bee virus and Israeli acute paralysis virus on bumblebee (*Bombus terrestris*) reproductive success. *Journal of Invertebrate Pathology*, **121**, 64-69.
- Plischuk, S., Martín-Hernández, R., Lange, C.E., & Higes, M. (2008) Detección de *Nosema ceranae* (Microsporidia) en *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) de la región pampeana. En: *Libro de Resúmenes del VIIº Congreso Argentino de Entomología, 2008*, Huerta Grande, Córdoba. pp. 154.
- Remnant, E.J., Shi, M., Buchmann, G., Blacquière, T., Holmes, E.C., Beekman, M., & Ashe, A. (2017) A diverse range of novel RNA viruses in geographically distinct honey bee populations. *Journal of Virology*, **91**(16), e00158-17.
- Reynaldi, F.J., Sguazza, G.H., Pecoraro, M.R., Tizzano, M.A., & Galosi, C.M. (2010) First report of viral infections that affect Argentine honeybees. *Environmental Microbiology Reports*, **2**, 749-751.
- Reynaldi, F.J., Sguazza, G.H., Tizzano, M.A., Fuentealba, N., Galosi, C.M., & Pecoraro, M.R. (2011) First report of Israeli acute paralysis virus in asymptomatic hives of Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, **43**(2), 84-86.
- Reynaldi, F.J., Sguazza, G.H., Albicoro, F.J., Pecoraro, M.R., & Galosi, C.M. (2013) First molecular detection of coinfection of honey bee viruses in asymptomatic *Bombus atratus* in South America. *Brazilian Journal of Biology*, **73**(4), 797-800.
- Sguazza, G.H., Reynaldi, F.J., Galosi, C.M., & Pecoraro, M.R. (2013) Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods*, **194**, 102-106.
- Susevich, M.L., Metz, G.E., Marti, G.A., & Echeverría, M.G. (2017) Dicistroviridae: A new viral purification technique. *Revista Argentina de Microbiología*, **49**(4), 311-314.
- Valles, S.M., Chen, Y., Firth, A.E., Guérin, D.M., Hashimoto, Y., Herrero, S., de Miranda, J.R., Ryabov, E., & Ictv Report Consortium (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: Dicistroviridae. *Journal of General Virology*, **98**(3), 355-356.
- Williamson, C., & von Wechmar, M.B. (1992) Two novel viruses associated with severe disease symptoms of the green stinkbug *Nezara viridula*. *Journal of General Virology*, **73**(9), 2467-2471.