

Identyfikacja szczepów otorbielaka pszczelego przy użyciu rybosomalnego DNA^{*)}

PAWEŁ CHORBIŃSKI

Katedra Epizootologii i Administracji Weterynaryjnej z Kliniką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR,
Pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Chorbiński P.

Identification of *Ascosphaera apis* strains using ribosomal DNA sequences

Summary

Ascosphaera apis is a heterothallic fungus that belongs to the genus *Ascosphaera*. This genus consists of over 21 species of *Ascosphaera* that have appeared in solitary bees and social bees. *Ascosphaera apis* is the most common fungus in honeybees (*Apis mellifera* L.), *A. major*, *A. atra* or *A. Duiformis* are rare.

The aim of the study was to perform the amplification of ITS1-5.8S-ITS2 region of ribosomal DNA from 29 strains of *Ascosphaera apis* by PCR and sequences of obtained products. Twelve of the tested stains were 100% identical to GeneBank accession numbers (GI/3513430, GB/U68313,1, AAU68313) that attested the appurtenance to the *Ascosphaera apis* species and have a very stable ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA. Using the PCR technique for amplification of the 5.8S rDNA region makes it possible to determine the membership of the strains in particular *Ascosphaera* genus and *A. apis* species. Other species of fungus may be involved in the chalkbrood infections of the honey bee colonies, in spite of the *A. apis*.

Keywords: *Ascosphaera apis*, PCR, rDNA sequences

Otorbielak pszczeli (*Ascosphaera apis*) jest heterotalicznym grzybem wywołującym groźną chorobę czerwiu pszczelego w rodzinach pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.). Grzyb ten należy do rodzaju *Ascosphaera* (rodzina *Ascosphaeraceae*, klasa *Ascomycetes*), który obejmuje obecnie ponad 21 gatunków występujących u pszczół samotnych oraz pszczół społecznych. U pszczoły miodnej spotyka się przede wszystkim *Ascosphaera apis*, rzadziej *A. major*, *A. atra* czy *A. duoformis* (1).

W przebiegu zakażenia grzybicą otorbielakową (*ascosphaeriosis apium*) obserwowana jest duża zmienność w obrazie klinicznym, wynikająca z sezonowości rozwoju rodziny pszczelej i jej uwarunkowań genetycznych, ilości gromadzonego pokarmu i wychowywanego czerwia oraz patogenności drobnoustroju. Straty w pasiekach powodowane przez grzybicę otorbielakową związane są ze spadkiem liczebności i produktywności rodzin pszczelich.

Identyfikacja gatunków grzybów będących przyczyną zachorowań pszczół opiera się przede wszystkim na określaniu ich cech morfologicznych i hodowlanych. Większość tych oznaczeń polega na określaniu wielkości owocników (*asomata*), zawierających kuliste worki zarodnikonośne, wypełnione zarodnikami

(*ascospores*). Zarodniki posiadają charakterystyczny kształt, a stały stosunek długości do szerokości wynosi dla *Ascosphaera apis* 1,9. Laboratoryjna identyfikacja grzyba *Ascosphaera apis* nie następuje pod warunkiem uzyskania na podłożu wzrostu szczepów wytwarzających owocniki (2), jednak izolacja czystych kultur jest bardzo pracochłonna i trudna z powodu częstych mieszanych zakażeń innymi grzybami lub występowania szczepów nie wytwarzających owocników (5, 9). Potwierdzają to badania własne, w czasie których izolowano z zamarych na grzybicę otorbielakową larw pszczelich liczne gatunki kropidlaków (*Aspergillus spp.*), *Penicillium spp.* oraz *Mucor racemosus* i *Alternaria alternata* (3).

Celem podjętych badań było wykonanie amplifikacji regionu ITS1-5.8S-ITS2 rybosomalnego DNA szczepów *Ascosphaera apis* przy użyciu technik PCR oraz porównawcza analiza filogenetyczna izolatów.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 29 szczepów *Ascosphaera apis* będących izolatami terenowymi grzybicy otorbielakowej pszczoły pochodzących z krajowych pasiek (tab. 1.) Pozyskane szczepy namnażano przez posiew rozdrobionych zmumifikowanych larw pszczelich wg metodyki opisanej przez Glińskiego i wsp. (6). Po uzyskaniu wzrostu i izolowaniu kultur grzybowych, badane szczepy identyfikowano, posługując się ogólnie przyjętymi metodami ma-

^{*)} Praca wykonana w ramach projektu badawczego finansowanego przez KBN nr 5 PO6K 027 19.

Tab. 1. Pochodzenie szczepów *Ascosphaera apis* izolowanych od pszczół

L.p.	Numer szczepu	Miejsce pochodzenia
1.	A3	Puławy
2.	A10	Duszniki Zdrój
3.	A16	Żerniki Wrocławskie
4.	A25	Sandomierz
5.	A26	Magnice
6.	A32	Wrocław
7.	A33	Brzeg Dolny
8.	A35	Kąty Wrocławskie
9.	A37	Trzebnica
10.	A38	Wysoka
11.	A40	Czastary
12.	A44	Wrocław
13.	A45	Częstochowa
14.	A46	Bolków
15.	A48	Magnice
16.	A49	Wrocław
17.	A50	Magnice
18.	A58	Bronowice
19.	A62	Brodnica
20.	A64	Szramowo
21.	A66	Kuligi
22.	A69	Wrocław
23.	A70	Magnice
24.	A71	Oława
25.	A72	Kobierzyce
26.	A76	Wrocław
27.	A77	Wrocławek
28.	A90	Puławy Górne
29.	A94	Leśnica

zbierno do nowych próbek i dodawano tę samą objętość mieszaniny fenol : chloroform : alkohol izoamyłowy (25 : 24 : 1, pH 8,0), mieszano i wirowano przy 13 000 × g przez 10 min. Ponownie zbierano fazę wodną, dodawano tę samą objętość mieszaniny chloroform : alkohol izoamyłowy (24 : 1), mieszano i wirowano jak wyżej. Czynność tę powtarzano dwukrotnie. Następnie do fazy wodnej dodawano 1ml izopropanolu, dokładnie mieszano i inkubowano w łaźni wodnej o temp. 70°C przez 1 godz. Po inkubacji próbę wirowano przy 13 000 × g przez 30 min. w celu wytrącenia DNA. Supernatant usuwano, a osadzoną na dnie peletkę DNA przemywano 70% etanolem. Czynność tę wykonywano dwukrotnie. Następnie osad suszono w temperaturze pokojowej, po czym zawieszano DNA w 0,05 ml redestylowanej wody i zamrażano w -20°C do dalszych badań.

Amplifikację rDNA wykonywano w oparciu o sekwencje starterów kodujących region 5,8S rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) opisanych przez Curran i wsp. (4): starter górny

kro- i mikroskopowymi. Do dalszych badań przeznaczano jedynie szczepy wytwarzające zarodniki (askospory), które w czasie hodowli nie wykazywały cech pleomorfizmu. Materiał badawczy stanowiły 8-dniowe hodowle szczepów *Ascosphaera apis* namnażanych w temp. 25°C na podłożu Sabourauda (SDA-YE) (BioMerieux, Francja) z dodatkiem 0,2% wyciągu drożdżowego i 0,1% chloramfenikolu. Z każdej hodowli pobierano od 2 do 3 fragmentów mycelium (tj. około 10-50 mg).

Izolację całkowitego komórkowego DNA prowadzono zgodnie z procedurą CTAB (8, 9). Pobraną grzybnię zamrażano w ciekłym azocie, a następnie rozdrabniano i zalewano buforem CTAB (100 mM Tris HCl, 20 mM NaEDTA, 1,4 M NaCl, 2% bromek cetyltrimetyloamoni, 0,2% beta-merkaptoetanolu) z dodatkiem 0,1 mg proteiny K do objętości 0,5 ml. Jednorodną mieszaninę umieszczano w łaźni wodnej o temperaturze 65°C przez 1 godz., a następnie wirowano przy 13 000 × g przez 10 min. Fazę wodną

(TW81) o sekwencji GTT TCC GTA GGT GAC CTG C oraz starter dolny (AB28) ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT. Wielkość powielanego ampikonu wynosiła 520 par zasad (p.z.). Reakcję amplifikacji prowadzono w probówkach typu Eppendorf o pojemności 0,1 ml. Mieszanina reakcyjna składała się z około 25 ng wyekstrahowanego DNA; po 10 pM każdego ze starterów; 10 × buforu dla stabilnej polimerazy DNA; po 2 mM każdego z trójfosforanów – dNTP (z dATP, dCTP, dGTP i dTTP). Zawartość próbek uzupełniano wodą do całkowitej objętości 10 µl. Reakcję PCR prowadzono w aparacie Mastercycler Gradient (Eppendorf, Niemcy) w następujących warunkach temperaturowych: denaturacja wstępna w temp. 94°C przez 2 min., po czym dodawano 2 jednostki polimerazy Taq (5 U/µl) (EURx, Polska), a następnie wykonywano właściwą amplifikację: denaturacja – 94°C 20", hybrydizacja – 54°C 20", elongacja – 72°C 1'). Amplifikację powtarzano w 35 cyklach zakończonych 1 minutową elongacją w temp. 72°C. Po zakończeniu reakcji PCR nakładano 1/5 objętości mieszaniny reakcyjnej na 1% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny o stężeniu 1 µg/ml. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 105 V w buforze 1 × TAE (40 mM Tris acetate 2 mM EDTA). Wyniki obserwowano w transluminatorze o długości fali 300 nm. Wynik dodatni oznaczał obecność prążka DNA o spodziewanej wielkości w stosunku do wzorca mas.

Otrzymane produkty poddano następnie sekwencjonowaniu przy użyciu ABIPrism™BigDye™ Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer, USA) zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Analizę sekwencji wykonano w ABI377 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer, USA) w Laboratorium Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB, PAN w Warszawie.

Wyniki i omówienie

W wyniku przeprowadzonego sekwencjonowania uzyskano sekwencję: 7-527 nt z sekwencji No AAU68313:

GTC TGT GCG GCT AGG TGC CCC TAA ACA
AGG CCC TGC CGC GAC TCC CAC CCT TGT
CTA CCT TAC CTG TTG CTT CGG CGG GCC TGC
GGG TTC TCG CGA GCC TGC TGC CGG AGG
GGT TAG TTC CCC CCT GGC TAG CGT CCG
CCG AAG ATA AAC GAA CTC CAG TCG AAG
ATT GAA GTC TGA AGA AAA TTG ATA AAT
AAA TCA AAA CTT TCA ACA ACG GAT CTC
TTG GGT TCC GAC ATC GAT GAA GGA ACG
CAG CGA AAT GCG ATA AGT AAT GTG AAT
TGC AGA ATT CCG TGA ATC ATC GAA TCT TTG
AAC GCA CAT TGC GCC CTC TGG TAT TCC GGG
GGG CAT GCC TGT CCG AGC GTC ATT GC AAC
CC TCA AGC ACG GCT TGT GTG TTG GGC GAT
CGT CCC GTC TTA GGA GGG ACG CGC CCG
AAA GGC AGT GAC GGC GTC GTG TTC CGG
TGC CCG AGC GTA TGG GGC TTT GTC TTT CGC
TCT AGT GGC CTG GCC GAC TGT CCG GTC
TAA CCA TCA TTT ACT TCT AG

Spośród badanych próbek izolaty (n = 12) o numerach A3, A10, A32, A38, A46, A50, A58, A69, A70,

A71, A90 i A94 wykazywały 100% identyczność z numerami akcesyjnymi GI/3513430, GB/U68313,1, AAU68313 banku genów (Gene Bank), co potwierdza ich przynależność od gatunku *Ascospaera apis*.

Próbki (n = 6) o numerach A03, A50, A58, A70, A90, A94 wykazywały zmienność w obrębie sekwencji 5'-TGC CTG TCC GAG CGT C/TA TTG CAA CCC TCA A-3'. Zmienność ta ma zwykle charakter równocności C i T, nieznacznej przewagi C lub T, bądź T/c (zwykle T, ale C też daje sygnał). Opisane zmiany świadczą o dużej stabilności nukleotydów sekwencjonowanego regionu i małej zmienności regionu 5,8S rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) szczepów *Ascospaera apis*.

Analiza pozostałych próbek (n = 17) wykazała silne zanieczyszczenia mykologiczne materiału badanego, pomimo starannego przygotowania hodowli i oceny czystości mikologicznej. W badaniach stwierdzono obecność *Penicillium commune* (izolat wb 15 i wb 43), *Penicillium chrysogenum* i *Penicillium spp.* w próbach A37, A48, A49, A62, A64, A72 i A77. Próby o numerach A26, A40, A44 i A16 wykazały 100% zgodność z obecnością *Penicillium commune* (izolat wb 19 i wb 55), *Penicillium crustorum* i *Penicillium italicum*. Z kolei próby A33, A35, A45 i A46 były zgodne z *Chaetomium spp.*, *Aspergillus nidulans* (izolat wb 2) i *Alternaria spp.*

Wymagania hodowli *in vitro* dla wzrostu *Ascospaera apis* uniemożliwiają wykorzystanie dodatków substancji hamujących wzrost innych gatunków grzybów, np. aktydionu. Uzyskanie więc czystych hodowli grzybów wymaga żmudnego, często wielokrotnego przesiewu fragmentów kolonii, a następnie precyzyjnej oceny makro- i mikroskopowej szczepów. Można także podczas izolacji spotkać się ze zjawiskiem równoczesnego wzrostu mieszanej grzybni *Ascospaera apis*, *Mucor racemosus*, *Penicillium cyclopium*. Pomimo wielokrotnych pasażów materiału pobieranego przy użyciu lupy binokularnej często niemożliwe jest ostatecznie uzyskanie czystych kultur *A. apis*. Towarzyszące grzyby wytwarzają strzępki łudząco podobne do grzybiczy otorbielakowej, stąd też w obrazie mikroskopowym hodowla taka uwidacznia się jako jednogatunkowa.

W rutynowej diagnostyce grzybiczy otorbielakowej uzyskanie obfitego wzrostu i pojawienie się w centrum kolonii owocników wystarcza do postawienia rozpoznania. Do badań przy użyciu techniki PCR wymagana jest szczególna czystość mikologiczna, którą trudno uzyskać bez specjalistycznego wyposażenia laboratorium.

Uzyskane wyniki wskazują, że w rozwoju grzybiczy otorbielakowej może brać udział kilka czynników zakaźnych. Potwierdzałoby to sugestie Glińskiego i Chmielewskiego (5) o złożonej etiologii tej choroby, co z kolei rzutuje na przebieg kliniczny choroby w rodzinach pszczelich.

Wnioski

1. Otorbielak pszczeli (*Ascospaera apis*) wykazuje stabilność w sekwencji nukleotydów regionu 5,8S rDNA (ITS1-5.8S-ITS2).

2. Użycie techniki PCR do amplifikacji regionu 5,8S rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) pozwala na potwierdzenie przynależności gatunkowej szczepów do rodzaju *Ascospaera* i gatunku *Ascospaera apis*.

3. W rozwoju grzybiczy otorbielakowej rodzin pszczelich oprócz *Ascospaera apis* mogą brać udział inne gatunki grzybów.

Piśmiennictwo

1. Anderson D. L., Gibbs A. J., Gibson N. L.: Identification and phylogeny of spore cysts fungi (*Ascospaera* spp.) using ribosomal DNA sequence. Mycol. Res. 1998, 102, 541-547.
2. Anderson D. L., Gibson N. L.: New species and isolates of spore cysts fungi (Plectomycetes: Ascosphaerales) from Australia. Austral. Syst. Bot. 1998, 11, 53-72.
3. Chorbiński P., Tomaszewska B.: Grzyby i grzybice występujące u pszczół. Mat. XV Nauk. Konf. Pszczel.; Warroza pszczół i gospodarka pasieczna. Olsztyn 1999, s. 8.
4. Curran J., Driver F., Ballard J. W. O., Milner R. J.: Phylogeny of Metarhizium: analysis of ribosomal DNA sequence data. Mycol. Res. 1994, 98, 547-552.
5. Gliński Z., Chmielewski M.: Imidazole derivatives in control of the honey bee brood mycoses. Pszczel. Zesz. Nauk. 1996, 40, 165-173.
6. Gliński Z., Wolski T., Chmielewski M.: Badania „in vitro” nad aktywnością przeciwgrzybiczą wyciągów arcydzięgla lekarskiego (*Archangelica officinalis* Hoffm.) w stosunku do *Ascospaera apis*. Medycyna Wet. 1988, 44, 552-556.
7. Grube M., Depriest P. T., Gargas A., Hafellner J.: DNA isolation from lichen ascomata. Mycol. Res. 1995, 99, 1321-1324.
8. Henrion B., Chevalier G., Marti F.: Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. Mycol. Res. 1994, 98, 37-43.
9. Koenig J. P., Boush G. M., Erickson E. H.: Effects of more introduction and ratio of adult bees to brood on chalkbrood in honeybee colonies. J. Apic. Res. 1987, 26, 191-195.

Adres autora: dr wet. Paweł Chorbiński, Pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

YERUHAM I., ELAD D., AVIDAR Y., GRINDBERG K., TIOMKIN D., MONBAZ A.: Botulizm typu B w stadzie bydła mlecznego: aspekty kliniczne i epidemiologiczne. (Outbreak of botulism type B in a dairy cattle herd: clinical and epidemiological aspects). Vet. Rec. 153, 270-272, 2003 (9)

Kiszka zanieczyszczona ziemią zawierająca endospory *Clostridium botulinum* typ B stanowi dobre podłoże do produkcji toksyny przez ten zarazek. Zarazek rozmnaża się w pH 4,5 lub powyżej (optymalne pH 7,0) przy dużej wilgotności. Zatrucie jadem kiełbasianym typu B wystąpiło w stadzie krów mlecznych rasy holsztyńskiej liczącym 246 krów i buhaja, po skarmieniu kieszonki z kukurydzy. Corocznie zwierzęta szczepiono przeciwko *C. botulinum* typ C, C2 i D. Pierwsze zachorowania wystąpiły po 4 dniach karmienia kieszonką wśród objawów porażenia opuszkowego, utraty łaknienia, osowienia, ślinotoku, regurgitacji i biegunki prowadzącej do odwodnienia organizmu. Nowe zachorowania wystąpiły po 8 dniach. Ogółem zachorowało 60 (33,5%) krów, przy czym u 43 (71,7) wystąpiła ostra lub chroniczna postać choroby, u 17 (28,3%) postać subkliniczna. Padły 34 krowy i 1 buhaj. Leczenie przy użyciu borogłukonianu wapnia, płynów wieloelektrolitowych i witaminy B, dało efekty u 24 krów. Z kieszonki wyizolowano toksynogenny szczep *C. botulinum* typ B.