

# Odpowiedź pszczoły miodnej na infekcję powodowaną przez *Paenibacillus larvae*

KRZYSZTOF BUCZEK

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP,  
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Buczek K.

## Response of the honey bee to *Paenibacillus larvae*

Summary

The paper characterizes and discusses the immune response mechanisms of the honey bee, mainly bee larvae, to infection caused by *Paenibacillus larvae*, the absolute pathogen of honey bee larvae. A statistically significant increase in abaecin was found in the youngest larvae during 24 h after infection that is during the germination of *P. larvae* endospores and the penetration of vegetative cells into the gut epithelium. Moreover, *P. larvae* stimulate the production of defensin – an immune protein of bee larvae. The comparative analysis of social insects and solitary model insects *Drosophila melanogaster* and the mosquito *Anopheles gambiae* revealed a significant differentiation in the number of genes and their products that play a significant role in insects' protection against microorganisms. The comparison of the number of genes responsible for three stages of immune defense: recognition of foreignness, information transfer and effector activity showed 71 genes in the honey bee, but 209 and 196 genes in the *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*, respectively. These tremendous differences in the number of immune genes between the discussed representatives of insects could be explained by the development of behavioral protective mechanisms in the honey bee, and probably also by the limited number of honey bee pathogens.

**Keywords:** *Paenibacillus larvae*, protective response of the honey bee larvae, behavioral immunity

Ekonomiczne znaczenie pszczoły miodnej, jedyne go spośród owadów społecznych z rodzaju *Apis* „udomowionego” przez człowieka przedstawiciela stawonogów, zaowocowało nie tylko poznaniem fizjologii rodziny pszczelej i doбором najbardziej wydajnych pod względem produkcyjnym gatunków, ras, odmian, lecz także badaniem zagrożeń ze strony patogenów łatwo penetrujących pasieki, stwarzające sztuczne warunki dla życia tych owadów. Pojedyncze osobniki i całe rodziny pszczół stanowią doskonały cel dla wirusów, bakterii, grzybów, pierwotniaków, roztoczy. Zarazki te znajdują wyśmienite warunki rozwoju w zmasowanych skupiskach dorosłych owadów i ich form rozwojowych (16, 18, 19).

Do zarazków wywierających istotny wpływ na gospodarkę pasieczną należy *Paenibacillus larvae*, patogen bezwzględnie chorobotwórczy dla najmłodszych larw. Bakteria ta, tworząca endospory bardzo odporne na czynniki środowiska, występuje dość powszechnie w pasiekach i należy do patogenów najgroźniejszych dla życia rodziny pszczelej. Charakterystykę fenotypową i zróżnicowanie genotypu *P. larvae* przedstawiono w odrębnym opracowaniu (3).

W warunkach naturalnych pszczoły jako owady społeczne wypracowały mechanizmy i zachowania zdolne do zniszczenia lub zahamowania destrukcyjnej działal-

ności „znanego” patogena. Człowiek, ingerując w życie tego owada w celu uzyskania największych korzyści, obok zamierzonych efektów wzrostu produkcji, przyczynił się jednocześnie do transmisji „nowych” patogenów. Kontakt z patogenem nieznanym rodzinie pszczelej, nieprzystosowanej pierwotnie do jego zwalczania często przybiera w pasiekach rozmiary katastrofalne. Można to obserwować w przypadku *Varroa destructor* – roztocza przeniesionego do gatunku *Apis mellifera*, a także rozprzestrzenienia zakażeń powodowanych przez bezwzględnego patogena *P. larvae*.

W naturalnych warunkach, w ewolucyjnym procesie rozwoju pszczoły wypracowały skuteczne mechanizmy obrony behawioralnej. Jednym z nich, niewątpliwie najbardziej skutecznym, jest niszczenie i usuwanie z rodziny zakażonych, chorych, niezdolnych do życia oraz obumarłych osobników. Wykorzystane są bakteriobójcze właściwości pokarmu i antagonistycznej flory obecnej w pokarmie, odporny na proces rozkładu i o własnościach mikrobobójczych materiał używany do budowy gniazda oraz ciągła dbałość o higienę. Ten typ odporności behawioralnej rodziny, powstały w ewolucyjnym rozwoju gatunku, podlega także zmianom przystosowawczym, rozwijanym w celu minimalizacji strat w przypadku zagrożenia ze strony patogena (8, 18, 20).

Niezależnie od zachowań rodziny jako jednego złożonego organizmu o wypracowanych systemach obrony zbiorowej, poszczególny osobnik dysponuje indywidualnymi mechanizmami odporności wrodzonej. Jest ona związana i warunkowana budową anatomiczną, sekrecją substancji działających przeciw drobnoustrojom. Jak wynika z wielu badań, pszczoły, a także inne owady, wypracowały również mechanizmy odporności nabytej jako indywidualnej obrony przed wnikającym do organizmu obcym tworem (non-self) – zarazkiem (13, 15, 21, 25).

W odniesieniu do gatunku *Apis* badania dotyczące odporności nabytej, indukowanej przez patogeny, nabierają coraz większej roli. Poznanie poziomu ekspresji odpowiedzi immunologicznej ma znaczenie nie tylko poznawcze, ale również praktyczne dla ukierunkowanej pracy selekcyjnej, zmierzającej do uzyskania linii pszczół odpornych na czynniki infekcyjne. W przedsięwzięciu tym bardzo pomocny okazuje się ilościowy test reakcji łańcuchowej polimerazy – PCR, wykorzystany do oceny odporności owada poprzez określenie zmian ilościowych w produkcji transkryptów – peptydów i białek hamujących rozwój oraz powodujących niszczenie patogena. W procesie tym następuje także identyfikacja nowych genów i ich produktów związanych z kontrolą procesu chorobowego oraz rozwojem reakcji obronnej. Nie bez znaczenia jest także możliwość szybkiego rozpoznania czynnika infekcyjnego (11, 12).

W doświadczeniach modelowych dotyczących występowania u owadów odporności nabytej wykazano, że w wyniku stymulacji bakterią *E. coli* organizm pszczoły produkuje peptydy o działaniu przeciwbakteryjnym. Ich budowa określona na podstawie sekwencji aminokwasów odpowiada peptydom rozpoznanym także u muszki owocowej – *Drosophila melanogaster* i u innych owadów, co może wskazywać na uniwersalność produkowanych substancji obronnych w stosunku do naturalnych patogenów. Peptydy te w badaniach *in vitro* wykazują aktywność mikrobobójczą w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych niekiedy i grzybów (5-7).

Doświadczenia z użyciem *P. larvae* i czerwiu pszczoły zakażanego drogą naturalną (*per os*) wykonane przez Evansa (12), pozwoliły na bezpośrednie poznanie odpowiedzi immunologicznej larwy na infekcję powodowaną tym zarazkiem. W doświadczeniu założono oznaczenie poziomu transkrypcji czterech składników peptydów – abycyny (abaecin) i defenzyny (defensin) oraz białka receptora peptydoglikanu (peptidoglycan receptor protein PGRP-LD) i *masquerade* rozpoznanych po raz pierwszy u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) (10, 12, 24).

Badania wykazały istotny wzrost poziomu abycyny u najmłodszych larw w czasie 24 godz. po zakażeniu, to jest w okresie kiełkowania w jelicie endospor i wnikania zarazka do komórek nabłonka jelita. Poziom abycyny nie ulegał zmianom w przypadku zakażeń larw starszych, co zdaje się wskazywać, że najistotniejszą rolę odgrywa oddziaływanie patogena na komórkę, a jest ono coraz bardziej redukowane wraz z wiekiem larwy.

Wykazano jednocześnie duże różnice w produkcji tego peptydu u larw kontrolnych, wskazuje to na zróżnicowanie alleli wśród członków kolonii, co można wiązać z ge-

nomem matki i zapłodnieniem przez wielu trutni w okresie godowym. Ma to znaczenie w zróżnicowanej wrażliwości czerwiu na infekcje *P. larvae* wynikające ze zróżnicowanej zdolności generowania bakteriobójczych peptydów. Podobnie wykazano stymulujący efekt patogenu na produkcję defenzyny drugiego peptydu o działaniu przeciwbakteryjnym. Badania te potwierdzają, że największa produkcja peptydu następuje w okresie największej wrażliwości larw na zakażenie. Nie stwierdzono jednak indukcji białka receptorowego PGRP-LD, konstytucyjnego białka drozofili oraz białka *masquerade*, co może wskazywać u pszczoły na utratę genów produkujących te białka lub wybór innej drogi odpowiedzi immunologicznej (12, 17, 22).

Oceniając wrażliwość linii genetycznych pszczoły w stosunku do infekcji wywołanych przez *P. larvae*, przeanalizowano możliwość wystąpienia wielu mechanizmów obronnych, związanych głównie z odpornością behawioralną dojrzałego owada (20). W odniesieniu do mechanizmów odporności osobniczej badania homogenizatów z larw wykazały, że już w organizmie dwudniowej larwy, a więc w okresie największej wrażliwości na zakażenie, znajdują się substancje hamujące *in vitro* wzrost patogenu. Na maksymalnym poziomie substancje te utrzymują się do czwartego dnia, a u sześciodniowych zasklepionych larw brak jest praktycznie efektu hamującego. Wskazuje to, że już w najwcześniejszym okresie rozwoju larwa (niezależnie od inhibitorów znajdujących się w pokarmie) dysponuje własnym, często skutecznym mechanizmem obrony humoralnej (23).

Podobne badania wykazały, że komórki jelita środkowego dojrzałego owada produkują substancje hamujące bardzo aktywnie *in vitro* wzrost oraz sporulację zarazka. Substancje te (lub substancja) niewrażliwe na temperaturę nie są indukowane w wyniku zakażenia *P. larvae*, gdyż występują w jelicie pszczół nie mających kontaktu z tym patogenem i są obecne nawet u pszczół głodzonych. Ich struktura chemiczna nie została jednak dotychczas określona (9).

Niezależnie od substancji o własnościach bakteriobójczych, produkowanych przez komórki przewodu pokarmowego o działaniu miejscowym, w ekstraktach z głowy i tułowia dorosłych owadów oraz w pokarmie produkowanym dla larw matek (royal jelly), metodą analizy w żelu poliakrylamidowym, zidentyfikowano substancje hamujące wzrost *P. larvae*, a także innych Gram-dodatnich laseczek. Badania wykazały, że są to dwa peptydy z których ten o większej masie cząsteczkowej zidentyfikowany jako rojalizyna (royalisin) wykazuje silne właściwości hamujące wzrost bakterii Gram-dodatnich. Peptyd o mniejszej masie cząsteczkowej, o słabszych właściwościach przeciwbakteryjnych był dotychczas nieidentyfikowany. Badania rojalizyny *in vitro* wykazały, że peptyd ten w ciągu 5 minut niszczy całkowicie wegetatywną postać *P. larvae*, co w warunkach *in vivo* w stosunku do tego patogena i innych Gram-dodatnich bakterii może przebiegać natychmiastowo. Oceniając aktywność substancji zawartych w pokarmie dla matek oraz w pokarmie dla pokolenia robotnic, w stosunku do *P. larvae* wykazano, że jest ona silniej wyrażona w pokarmie dla czerwiu matki, nie zidentyfikowano wprawdzie substancji

czynnej, ale, jak sugerują autorzy, jest to także bakterio-bójcza rojalizyna. Wykryto, że ilość produkowanych peptydów antybakteryjnych wydaje się wynikać ze zróżnicowania genetycznego pszczół, a także okazała się ona zawsze wyższa w rodzinach zakażonych *P. larvae* (1, 4, 9, 14, 25).

Rojalizyna, antybakteryjny peptyd należący do grupy defenzyn, podobnie jak inne peptydy o właściwościach antybiotycznych produkowane przez dobrze rozwinięty układ obronny pszczoły, apidycyny (apideacins), abyccyny (abaecin), hymenoptaecin występujące w hemolimfie, wykazują różną aktywność w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Jednak poza peptydami zawartymi w pokarmie produkowanym dla matek, w którym zidentyfikowano peptyd rojalizynę i określono jej działanie na *P. larvae*, poznanie aktywności innych polipeptydów odpornościowych w stosunku do tego patogena wymaga dalszych badań (1, 2, 4).

Identyfikacja genów proteazy serynowej i ich homologów w organizmie pszczoły, kodujących, między innymi, białka wydzielnicze pozwoliła na określenie, że w wyniku stymulacji larwy przez *P. larvae*, w 48 godzin po zakażeniu następuje istotny wzrost poziomu transkryptu SP41 i SP6 oraz spadek SP1, SP3, SP19 i serpiny-5. Zakażenie larw *E. coli* lub iniekcja płynu fizjologicznego nie powodowała widocznej reakcji ze strony larwy. Wynik ten jest o tyle interesujący, że wskazuje kierunek do badań roli tych białek w rozwoju embrionalnym larwy i odpowiedzi immunologicznej *Apis mellifera* (26).

Analiza porównawcza mechanizmów obronnych *Apis mellifera* jako przedstawiciela owadów społecznych oraz modelowych owadów żyjących samodzielnie – muszki owocowej *Drosophila melanogaster* i komara *Anopheles gambiae* – wykazały istotne różnicowane w ilości genów i produktów odgrywających znaczącą rolę w obronie organizmu. W zestawieniu ilościowym liczba genów odpowiedzialnych za wszystkie 3 etapy procesu obronnego rozpoznania, przekazania informacji i działania efektorowego u *Apis mellifera* wynosi 71, podczas gdy u *Anopheles gambiae* i *Drosophila melanogaster*, odpowiednio, 209 i 196 genów, kodujących odpowiednie substraty. Odnosząc swoje spostrzeżenia do *Apis mellifera*, tak olbrzymi stan różnicowania w liczbie genów odpornościowych autorzy usiłują tłumaczyć rozwojem behawioralnych mechanizmów obrony u tego gatunku, a także, jak się wydaje, ograniczoną liczbą patogenów. Potwierdzenie tych przypuszczeń mogą przynieść badania innych grup owadów społecznych, jak: osy, mrówki i termity żyjących w naturalnych środowiskach (13).

Prowadzone w ostatnim dziesięcioleciu badania mechanizmów obronnych stawonogów żyjących zarówno samotnie, jak i w zorganizowanych rodzinach przynoszą nowe dane dotyczące ich funkcji na poziomie reakcji molekularnych. Poznanie genomu poprzez określenie sekwencji DNA owadów coraz bardziej przybliża zrozumienie istoty reakcji oraz drogi ewolucyjnej przebytej przez poszczególne gatunki. W odniesieniu do rodzaju *Apis* badania te mają nie tylko znaczenie poznawcze, ale także mogą być wykorzystane do pracy selekcyjnej zmierzającej do uzyskania odmian pszczół najbardziej korzystnych z punktu widzenia gospodarczego.

## Piśmiennictwo

1. *Bachanová K., Klaudiny J., Kopernický J., Šimůth J.*: Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae* larvae through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie* 2002, 33, 259-269.
2. *Biliková K., Gusui W., Šimůth J.*: Isolation of a peptide fraction honeybee royal jelly as potential antifoulbrood factor. *Apidologie* 2001, 32, 275-283.
3. *Buczek K.*: Charakterystyka biochemiczna, patogenność i genotypowanie *Paenibacillus larvae*, patogen pszczoły miodnej *Apis mellifera*. *Medycyna Wet.* (w druku).
4. *Bulet P., Hetru C., Dimarcq J. L., Hoffman D.*: Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* 1999, 23, 256-259.
5. *Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P.*: Apidaecins antibacterial peptides from honeybees. *EMBO Eur. Mol. Biol. Org. J.* 1989, 8, 2387-2392.
6. *Casteels P., Tempst P.*: Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, 199, 330-345.
7. *Casteels-Josson K., Zhang W., Capaci T., Casteels P., Tempst P.*: Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-transcriptional conversion of the precursor structures. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 28569-28575.
8. *Christe P., Oppliger A., Bancała F., Castella G., Chapuisat M.*: Evidence for collective medication in ants. *Ecol. Lett.* 2003, 6, 19-22.
9. *Crailsheim K., Reissberger-Gallé U.*: Honeybee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie* 2001, 32, 91-103.
10. *De Gregorio E., Spellman P. T., Robin G. M., Lemaitre B.*: Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by Rusing oligonucleotide microarrays. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2001, 28, 12590-12595.
11. *Evans J. D.*: Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *J. Invertebr. Pathol.* 2006, 93, 135-139.
12. *Evans J. D.*: Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 2004, 85, 105-111.
13. *Evans J. D., Aronstein K., Chen V. P., Hetru C., Limier J., Jiang H., Kanost M., Thompson G. J., Zou Z., Hultmark D.*: Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biol.* 2006, 15, 645-656.
14. *Hornitzky M. A. Z.*: The pathogenicity of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores and vegetative cells to honey bee (*Apis mellifera*) colonies and their susceptibility to royal jelly. *J. Apic. Res.* 1998, 37, 268-271.
15. *Lowenberger C. A., Kamal S., Chile J., Paskewitz S., Bulet P., Hoffmann J. A., Christensen B. P.*: Mosquito-Plasmodium interactions in response to immune activation of the vector. *Exp. Parasitol.* 1999, 91, 59-69.
16. *Morse R. A., Flottum K.*: Honey Bee Pest, Predators, and Diseases. Root A. I., Medina, Ohio 1997, 718.
17. *Palmer K. A., Oldroyd B. P.*: Evidence for intra-colonial genetic variance in resistance to American foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*): further support for parasite/pathogen hypothesis for the evolution of polyandry. *Naturwissenschaften* 2003, 90, 265-268.
18. *Schmid-Hempel P.*: Parasites in Social Insects. Princeton University Press, Princeton NJ 1998.
19. *Shimanuki H.*: Bacteria, [w:] Morse R. A., Flottum K.: Honey Bee Pests Predators, and Diseases. Root A. I. Medina, Ohio 1997, 33-54.
20. *Spivak M., Gilliam M.*: Hygienic behaviour of honeybees and its application for control of brood diseases and varroa. Part I. Hygienic behaviour and resistance to American foulbrood. *Bee World* 1998, 79, 124-134.
21. *Spivak M., Reuter G. S.*: Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* 2001, 32, 555-565.
22. *Tarpy D. R.*: Genetic diversity within honey bee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2003, 270, 99-103.
23. *Wedemig M., Riessberger-Galley U., Crailsheim K.*: A substance in honey bee larvae inhibits the growth of *Paenibacillus larvae* larvae. *Apidologie* 2003, 34, 43-51.
24. *Werner T., Liu G., Kang D., Ekengren S., Steiner H., Hultmark D.*: A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000, 97, 13772-13777.
25. *Yatsunami K., Echigo T.*: Antibacterial action of royal jelly. *Bull. Fac. Agric. Tamagawa Univ.* 1985, 25, 13-22.
26. *Zou Z., Lopez D. L., Kanost R., Evans J. D., Jiang H.*: Comparative analysis of serine protease-related genes in embryonic development and innate immunity. *Insect Molecular Biol.* 2006, 15, 603-614.

Adres autora: dr Krzysztof Buczek, ul. Romanowskiego 1, 20-707 Lublin; e-mail: krzysztof.buczek@up.lublin.pl