

## AZ ALH, HR78 ÉS ND GÉNEK EXPRESSZIÓJÁNAK VÁLTOZÁSA ATKAFERTŐZÖTTség (VARROA DESTRUCTOR OUD.) HATÁSÁRA MÉZELŐ MÉHben (APIS MELLIFERA L.)

ZAKAR ERIKA – OLÁH JÁNOS – JÁVOR ANDRÁS – KUSZA SZILVIA

### ÖSSZEFOGLALÁS

A *Varroa atka* (*Varroa destructor* Oud.) – továbbiakban atka – megfelelő kezelés hiányában a mézelő méhcsaládok pusztulását okozza világszerte. A vizsgálat alapjául szolgáló méhmintákat here és dolgozó fiasításból vették. Az 5–5 atkás és 5–5 atka mentes bábót a kikelés előtti még pigmentálatlan „kék szem” stádiumban gyűjtötték. Kvantitatív real-time PCR módszerrel három (Hr78, Alh, nem meghatározott-ND), már korábban a méhatka fertőzöttséggel összefüggésbe hozott gén mRNS szintjét határozták meg az atkás és nem atkás herékben illetve dolgozóknál. Eredményeik alapján különbség figyelhető meg az atkás és atkamentes dolgozók és herék között mindhárom vizsgált gén esetében. A vizsgált gének magasabb expressziót mutatnak a fertőzött dolgozóknál és a fertőzéstől mentes here mintákban. Megállapították, hogy mind az atkás, mind az atkamentes dolgozó és here bábokban legerősebben a Hr78 gén fejeződik ki, míg leggyengébben az Alh ( $Alh < ND < Hr78$ ). Amikor összehasonlították az atkával fertőzött dolgozó mintákat a szintén fertőzött here mintákkal, azt tapasztalták, hogy a Hr78 gén elsősorban a fertőzött dolgozóknál kódolja az antitestek képződését, valamint hat a higiéniás viselkedésre. Ezzel szemben az Alh gén főként a fertőzött herékben szabályozza a fertőzésre adott immunválaszt. Célkitűzésük annak vizsgálata volt, hogy változik a kiválasztott három gén expressziója házi méhben (*Apis mellifera* L.) nagy ázsiai méhatka (*Varroa destructor* Oud.) fertőzést követően.

### SUMMARY

Zakar, E. – Oláh, J. – Javor, A. – Kusza, SZ.: THE CHANGE OF EXPRESSION OF THE ALH, HR78 AND ND GENES IN MITE (*Varroa destructor* Oud.) INFECTED HONEY BEES (*Apis mellifera* L.)

The parasitic mite without adequate treatment is causing the death of honeybee colonies worldwide. Bee samples derived from drone and worker brood cells formed the basis of this examination, where as a first step capped brood cells were opened and 5–5 samples of parasitised and non-parasitised pupae were collected at the blue-eye stage. By applying the Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) method, mRNS levels of three genes (Hr78, Alh, non-determined-ND) were estimated in *Varroa*-infected and non-infected drones and workers that were previously connected with mite parasitism. Results clearly demonstrated differences in the expression of both genes between infected and non-infected drone and worker samples. Besides, the examined genes were reflecting higher level of expression in infected workers and non-infected drone samples. In addition, results showed that Hr78 gene was expressing at the highest level in both *Varroa*-parasitised and non-parasitised worker and drone pupae whereas Alh was expressing less ( $Alh < ND < Hr78$ ). Samples of parasitic mite infected honey bee workers were compared to drones and it was found that, Hr78 gene triggered antibody formation primarily and affected the hygienic behavior in infected workers. Alh gene regulated immun-response to parasitism mainly in infected drones. The Krh housekeeping gene was utilised to normalise Ct values. The aim of the present study was to follow through the gene expression variation of the above three genes in honey bees (*Apis mellifera* L.) as a response to *Varroa destructor* infection.

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Bailey és Ball (1991) szerint a Varroa atka, vagy nagy ázsiai méhatka, a mézelő méh ektoparazitája. Azért tekintjük az egyik legveszélyesebb élősködőnek, mert a méh lárvájának, bábjának és kifejlett alakjának hemolimfájával táplálkozik. Erőteljes fertőzöttség esetén a méh nem tud teljes egészében kifejlődni, deformált szárny, lábak és potroh jellemzi. Ezek az egyedek életképtelenek. Az atka többnyire nemcsak azzal károsít a családokban, hogy a gazdaszervezet hemolimpháját fogyasztja, hanem gyakran vírusvektorként is szolgál. Evans és Aronstein (2006) szerint méhállományokban a deformáló szárny-vírus (DWF) okozza a legnagyobb gazdasági károkat a méhállományokban. Forgách és mtsai (2008) RT-PCR módszerrel hat méhpatogén vírus előfordulását vizsgálták. Kifejlett méhmin-tákkal és Varroa destructor atkákkal végzett eredményeiket összehasonlították francia és osztrák eredményekkel. Kimutatták a mézelő méhvírusok földrajzi eltéréseit Magyarország és a korábbi Európai Unió tagállamok között. Bailey és Ball (1991) szerint az atka jelenléte megfelelő kezelés hiányában a mézelő méhcsaládok pusztulását jelentheti. Az utóbbi időben sok atkaölő vegyszer (akaricid) került forgalomba és számos védekezési módszer látott napvilágot, de csupán az élősködő atkák számát sikerült csökkenteni, végleges megoldást egyik sem jelentett. A megporzást végző rovarok fogatkozása közvetlenül érzékelhető gazdasági következménnyel jár, így mindenképpen fontos az atka parazitáltsággal kapcsolatos kérdések megválaszolása.

Fisk és Thummel (1998) szerint az atka életciklusa szinkronban van a méhekével, kizárólag fedett here és dolgozó fiasításon fejlődik. A paraziták és patogének hatására a társas rovarok kifejlesztették mind az egyedi, mind pedig a csoportos védekező stratégiájukat. A tisztántartás, a fészek higiéniája és más viselkedésformák egyaránt jellemzőek a társas rovarokra, hogy csökkentsék a baktériumok, gombák és parazita atkák kártételét. Jacob és mtsai (1991) szerint erre klasszikus példa, amikor a dolgozók megtalálják és eltávolítják a fertőzött lárvákat az egészséges fiasítás közül. Morse (1997) az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) és a maláriaszúnyog (*Anopheles gambiae*) génkészletét a mézelő méhekével hasonlította össze. A méhek a rovarok immunitásért felelős génjeinek csupán 1/3-val rendelkeznek. A domesztikáció következtében csökkent a méheknek paraziták elleni védekezőképessége.

Navajas és mtsai (2008) vizsgálták az atka fertőzöttség genetikai hátterét. Különbségeket találtak a populációk atka érzékenysége tekintetében. Eredményeik szerint az atka parazitáltság megváltoztatja a gének kifejeződését, kapcsolatban van az embrionális fejlődéssel, a sejtek anyagcseréjével és az immunitással. Különösen az atka-toleráns méhek mutatnak jelentős különbséget a génexpresszió során. A fertőzöttség iránti érzékenységekben két paramétert ismertek meg. Különbség van a szaglás folyamatában, ami talán összefügg a fiasítás szaporodásával és a higiénikus viselkedéssel. Ez utóbbi nagy valószínűséggel maga után vonja az atka toleranciát. A tanulmányban a Krh, Hr78, Alh, baz és egy nem meghatározott (ND) gént vizsgáltak.

Perrin és Dura (2004) szerint a Hr78 gén expressziója a lárvák nyálmirigyében történik, és az antitestek képződését szabályozza, valamint a higiénikus viselkedésre hat, így közvetett hatása van az atka parazitizmusra. Emellett a lárvális fej-

lődésben és ezen belül is a lárvák ecdyson-regulációjában játszik kulcsszerepet. *Rothenbuhler*-nek (1964) sikerült meghatározni az Alhambra lókus genetikai szerkezetét ecetmuslicában. Az Alhambra (Alh) gén létfontosságú az immunrendszer működésében. *Spivak* (2001) szerint az ecetmuslicában található Kr (Krüppel) gén az embrionális fejlődés korai szakaszában, a blasztoderma stádiumban expresszálódik, amely az önálló kortikális sejtek kialakulásának időszaka. *Wang és Cai* (2006) szerint a bazooka (baz) gén számos funkciója ismert. Protein kódolás mellett molekuláris feladata a proteinkináz C megkötése. Az anatómiai fejlődést és a sejtosztódás folyamatát is meghatározza. Az idegrendszer-, a plazmamembrán-, és az anatómiai struktúra kialakulásában, valamint az embrionális fejlődésben is fontos szerepe van.

*Yang és Cox-Foster* (2005) szerint a qRT-PCR módszer kifejlesztése biztosítja, hogy pontosan mérhető a parazitáit egyed-, és a parazita génjeinek átírása, hogy ezáltal felmérhessük a környezeti és genetikai komponensek hatását a mézelő méh immunitására. A fent említett módszer széles körben alkalmazható a gerinctelen patológiában.

Jelen tanulmány célja, hogy vizsgáljuk a házi méhben (*Apis mellifera* L.) három gén expressziós mintázatának változását a nagy ázsiai méhatkával (*Varroa destructor* Oud.) történő fertőzést követően.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálatainkat a DE-MTK Állatgenetikai Laboratórium Laboratóriumban végeztük. A mintákat egy családból, here és dolgozó fiasításból vettük 2009 nyarán. Az 5–5 atkás és 5–5 atkamentes bábót a kikelés előtti, még pigmentálatlan, „kék szem” stádiumban gyűjtöttük egy krajnai méhet (*Apis mellifera carnica*) tartó méhészetből. Az 5–5 5 atkás dolgozó és 5 atkás here, valamint 5 atkamentes dolgozó és 5 atkamentes herefiasítást jelent.

A krajnai méh egyedülként tenyészthető Magyarországon. Fertőzött mintának tekintettük azt a bábót, melyen legalább egy atkát találtunk. A mintavétel után a bábok folyékony nitrogénbe kerültek (–196 °C) a laboratóriumba szállításig, majd felhasználásig –80 °C-on tároltuk azokat.

A teljes RNS izolálása során a kit-ben található útmutatást követtük. Az RNS izoláláshoz szükséges vegyszerek: kit (Quiagen, USA) és RNáz mentes desztillált víz. A mintakoncentrációt Nano Drop spektrofotométerrel mértük.

A polimeráz láncreakciót megelőzi egy reverz transzkripció lépés, melynek terméke a cDNS. A cDNS szolgál a polimeráz láncreakció (PCR) templátjául. A PCR reakciót ABI 7300 típusú gépen végeztük. A polimeráz láncreakció célja a qRT-PCR módszer során alkalmazott primerek (*Navajas és mtsai* 2008) megfelelő amplifikálódásának ellenőrzése (1. táblázat). Elektroforézis során az amplifikált termék ellenőrzését 2%-os ethidium bromidot tartalmazó agaróz gélen végeztük.

1. táblázat

A házi méh qRT-PCR analízise során alkalmazott primerek jellemzői

| Gén neve(1) | Forward primer szekvencia (5'-3') | Reverse primer szekvencia (5'-3') | Amplifikált termék hossza (bp)(2) | Feltapadási hőmérséklet (°C)(3) |
|-------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Krh I       | ACTCATCAGTTGTTGGTT<br>CTCCTC      | TCGTTTGGCTCTTCAGTC<br>TTGTG       | 118                               | 60                              |
| ND[(1)]     | TCACACCGATATTCTCAT<br>CAAAGG      | CTTGTCATTCTTGTTCTCC<br>GATTG      | 112                               | 60                              |
| Hr78        | TGACGAAGTTTAGTTGCT<br>GCTATG      | TGTTGTTCCCTATGATCTC<br>TGTCC      | 107                               | 60                              |
| Alh         | ACTTGTGGTAATGCTGG<br>CTGAC        | AACGAACGAAGGAAAGGAA<br>TAACG      | 129                               | 60                              |
| baz         | ACCAGGAACAAGCGAG<br>TCAGAA        | ACCAGGAACAAGCGAGTCA<br>GAAG       | 112                               | 60                              |

[ND=non determine(1)]

Table 1: Primers applied in qRT-PCR analysis of honey bees genes(1); length of the amplified product(2); adhesion temperature(3)

Abszolút kvantifikáció során történt a vizsgálatunkhoz legalkalmasabb primer és minta koncentráció meghatározása. Az adatokat az SDS 2.1. szoftver segítségével értékeltük. A relatív kvantifikáció során a következő módszert alkalmaztuk:

Adataink normalizálása referencia génnel:

$$\Delta Ct = Ct_{GOI} - Ct_{Gref}$$

ahol:  $Ct$  az a ciklus szám ahol a felszaporított mennyiségű templát eléri a fix küszöbértéket,

$Ct_{GOI}$  az általunk vizsgált gén  $Ct$  értéke,

$Ct_{Gref}$  a referenciaként használt gén  $Ct$  értéke.

A normalizált adatokat a kalibrátor segítségével hasonlítottuk össze (ez a mi esetünkben lehet a gén vagy minta):

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{GOI} - Ct_{Gref})_{kondíció} - (Ct_{GOI} - Ct_{Gref})_{kalibrátor}$$

A relatív kvantifikáció során használt képlet:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ volt.}$$

## EREDMÉNYEK

Az összes vizsgált atkás és nem atkás dolgozó mintát hasonlítottuk össze a Hr78 génre vonatkozóan (1. ábra). A kalibrátor gén az ND volt. A Hr78 gén nagyobb mértékben fejeződött ki az atkás egyedekben, mint az atkától mentesekben. Jól látható, hogy a termelődött mRNS szintben jelentős különbség mutatkozik a fertőzött és nem fertőzött egyedek között.

1. ábra: Minden vizsgált atkás és nem atkás dolgozó báb összehasonlítása a Hr78 génről termelődött mRNS szint alapján



Figure 1: Comparison of all examined infected and non-infected worker pupae based on the mRNS level triggered by the Hr78 gene  
infected(1); non-infected(2); total worker samples(3)

Az összehasonlítást elvégeztük az Alh gén esetében is (2. ábra). A kalibrátorként alkalmazott ND gént alapul véve az atkás és nem atkás dolgozó mintákra egyaránt jellemző az Alh gén alacsonyabb expressziós szintje. Emellett a nem atkás dolgozó fiasításból vett mintáknál az atkához képest kisebb mértékű expressziós szint jellemző. Az Alh gén esetében a fertőzött és nem fertőzött egyedek összességének génexpressziójában bekövetkezett különbségek a 2. ábrán láthatók.

Az összes atkával fertőzött és nem fertőzött here minta összehasonlítását követően megállapítható, hogy az ND génhez viszonyítva a Hr78 gén expressziója magasabb szintű. A Hr78 gén kifejeződése az összes atkás egyedben alacsonyabb, mint az összes atkamentesben. Ezzel szemben az Alh gén expressziója alacsonyabb szintet mutat, mint az ND géné. Az Alh gén kifejeződésében is tapasztalható különbség az összes atkával fertőzött és nem fertőzött egyed esetében. A Hr78 gén expresszióját vizsgálva jelentős különbség mutatkozik a fertőzött és nem fertőzött egyedek összességénél, míg ez a különbség az Alh génnél kevésbé jelentős (3. ábra)

Eredményeink alapján megállapítható, hogy mind az atkás és nem atkás dolgozó és here bábokban legerősebben a Hr78 gén fejeződik ki, míg leggyengébben az Alh (Alh<ND<Hr78). Miután rendelkezésünkre álltak a korábban ismertett adatok az atkával fertőzött és nem fertőzött dolgozó és herefiasításokból,

2. ábra: Az összes vizsgált atkás és nem atkás dolgozó báb összehasonlítása az Alh génre vonatkozóan

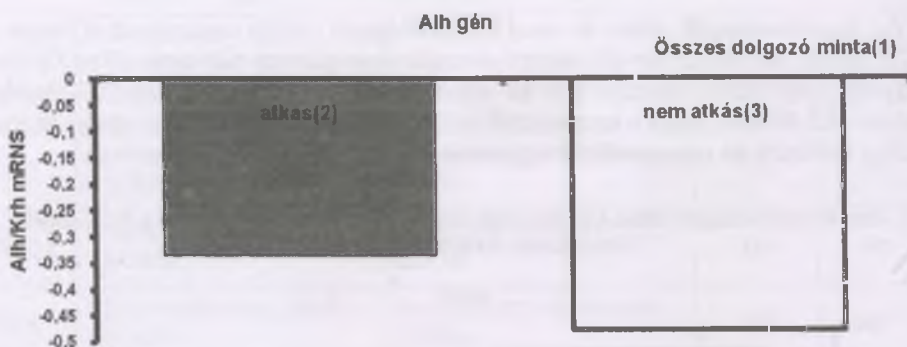


Figure 2: Comparison of all examined infected and non-infected worker pupae for the Alh gene total worker samples(1); infected(2); non-infected(3)

3. ábra: Minden vizsgált atkás és nem atkás here báb összehasonlítása a Hr78 és az Alh génre vonatkozóan

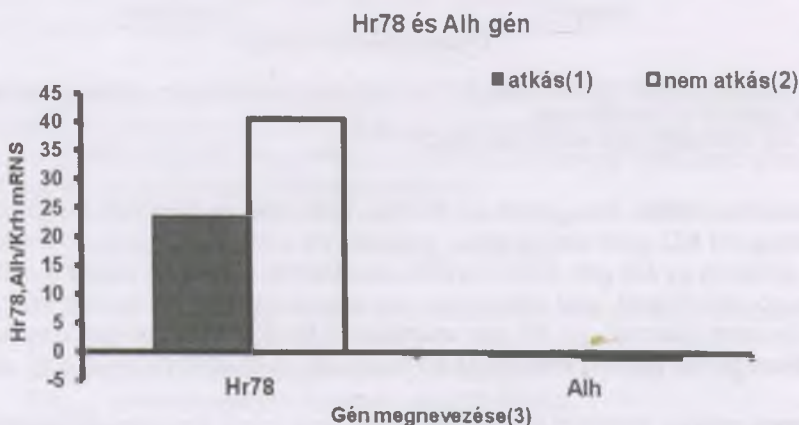


Figure 3: Comparison of all examined infected and non-infected drone pupae for the Hr78 and Alh genes infected(1); non-infected(2); genes(3)

elvégeztük ezek összehasonlítását. A Hr78 gén kifejeződésének összehasonlításakor azt tapasztaltuk, hogy az ND génhez viszonyítva az atkával fertőzött herékben magasabb volt az expressziós szint, mint a fertőzött dolgozóknál vagy a nem fertőzött herékben és dolgozóknál. A Hr78 génről termelődött mRNS mennyisége az atkával fertőzött dolgozóknál nagyobb volt, mint a fertőzött herékben (4. ábra).

Ha ugyanezt az összehasonlítást elvégezzük az Alh gén esetében is, azt tapasztaljuk, hogy az atkával fertőzött herékben a vizsgált gén expressziója kiemel-

4. ábra: Az összes atkával fertőzött és nem fertőzött dolgozó és here minta összehasonlítása a Hr78 génre vonatkozóan



Figure 4: Comparison of all infected and non-infected worker and drone samples for the Hr78 gene infected workers(1); infected drones(2); non-infected workers(3); non-infected drones(4); all tested samples(5)

kedően magas értéket mutat. Ezzel szemben az atkával fertőzött dolgozókban és a nem fertőzött dolgozókban és herékben a Hr78 génről kevesebb mRNS termelődött. Az Alh génről termelődött mRNS szintje az atkával fertőzött herékben nagyobb volt, mint a fertőzött dolgozókban (5. ábra).

5. ábra: Az összes atkával fertőzött és nem fertőzött dolgozó és here minta összehasonlítása az Alh génre vonatkozóan



Figure 5: Comparison of all infected and non-infected worker and drone samples for the Alh gene infected workers(1); infected drones(2); non-infected workers(3); non-infected drones(4); all tested samples(5)

## KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálatainkban az adott génről termelődött mRNS szintjét minden esetben a non determined (ND) génhez viszonyítottuk. Elvégeztük az összes vizsgált atkás és atkamentes dolgozó minta összehasonlítását. A Hr78 gén expressziója nagyobb mértékű volt, mint az ND géné. A Hr78 gén nagyobb mértékben fejeződött ki az atkás mintákban, mint az atkamentesekben. Ez azzal magyarázható, hogy a parazitáltság hatására a higiénikus viselkedés növekvő szintet mutatott, ezt pedig a Hr78 gén szabályozza (Perrin és Dura, 2004). Különbséget tapasztaltunk az atkás dolgozó méhmintákban a Hr78 génről termelődött mRNS szintjében, ez az eredmény hatékonyan alkalmazható lesz rezisztens és toleráns méhcsaládok létrehozásában.

Az Alh gén expressziója alacsonyabb szintet mutat az ND gén kifejeződéséhez képest. Az Alh génről termelődött mRNS szintje szintén magasabb az atkával fertőzött dolgozóknál, mint az atkamentes mintákban. Ez azért következhetett be, mert az Alh génben található leucin tartomány létfontosságú az immunrendszer működésében (Rothenbuhler, 1964). Az Alh gén jelenléte szintén alapul szolgálhat a méhállományok szelekciójában.

Egy megfigyelés alapján fogalmazódott meg az a célunk, hogy a dolgozóknál és a herékben külön-külön vizsgáljuk a gének kifejeződését. Calderone (2005) szerint az atkák előnyben részesítik a herefiasításokat. A here méhminták esetében az ND génhez viszonyítva a Hr78 génről termelődött mRNS szintje magasabb, míg az Alh génről termelődött mRNS szintje alacsonyabb szintet mutat. A here méhminták vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a Hr78 és Alh gén expressziós szintje a nem fertőzött egyedekben a magasabb. A fertőzéstől mentes egyedekben azért volt alacsonyabb a génkifejeződés mértéke, mert ezen gének csak részben vesznek részt a higiénikus viselkedésben és a parazitáltságra adott immunválasz létrejöttében.

Általánosságban elmondható, hogy különbség figyelhető meg az atkás és atkamentes dolgozók, valamint a herék között mindkét vizsgált gén esetében. Emellett a megfigyelt gének magasabb expressziót mutatnak a fertőzött dolgozóknál és a fertőzéstől mentes here méhmintákban.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy mind az atkás és atkamentes dolgozó és here bábokban legerősebben a Hr78 gén fejeződik ki, míg leggyengébben az Alh ( $Alh < ND < Hr78$ ).

Ezek után összehasonlítottunk az atkával fertőzött dolgozókat a szintén parazitált here méhmintákkal. Azt tapasztaltuk, hogy a Hr78 génről termelődött mRNS mennyisége az atkával fertőzött dolgozóknál nagyobb volt, mint a fertőzött herékben. Ebből arra következtethetünk, hogy a Hr78 gén elsősorban a fertőzött dolgozóknál kódolhatja a higiénikus viselkedést. Ezzel szemben az Alh génről termelődött mRNS szintje az atkával fertőzött herékben nagyobb volt, mint a fertőzött dolgozóknál. Ezek alapján az Alh gén főként a fertőzött herékben szabályozza a parazitáltságra adott immunválaszt. Eredményeink hatékonyan alkalmazhatók lesznek rezisztens és toleráns méhcsaládok létrehozásában.

## IRODALOM

- Bailey, L. – Ball, B. (1991): Honey bee pathology, 2nd ed, Academic Press, London, England, 191–212.
- Calderone, N.W. (2005): Evaluation of drone brood removal for the management of *Varroa destructor* (Acari: Varroidea) in colonies of the goney bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) in the North-easter USA. J. Econ. Entomol. 98: 645–650.
- Evans, J.D. – Aronstein, K.A. (2006): Immune pathways and defence mechanism in honey bees *Apis mellifera*. Insect Mol. Bioi., 15. 5. 645–656.
- Forgách, P. – Bakonyi, T. – Tapasztai, Zs. – Nowony, N. – Rusvai, M. (2008): Prevalence of pathogenic bee viruses in Hungarian apiaries: Situation before joining the European Union. J. Invertebrate Pathol., 98. 235–238.
- Fisk, G.J. – Thummel, C.S. (1998): The DHR78 nuclear receptor is required for ecdysteroid signaling during the onset of *Drosophila* metamorphosis. Cell, 93.4. 543–555.
- Jacob, Y. – Sather, S. – Martin, J.R. – Ollo, R. (1991): Analysis of Krüppel control elements reveals that localized expression results from the interaction of multiple subelements. Proc Natl Acad Sci. USA, 88.13. 5912–6.
- Morse, R.A. (1997): Honey Bee Pests Predators and Diseases. Cornell University Press (Comstock Publishing).
- Navajas, M. – Migeon, A. – Alaux, C. – Martin-Magniette, M.L. – Robinson, G.E. – Evans, J.D. – Cros-Arteli, S. – Crauser, D. – Conte, L.Y. (2008): Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. BMC Genomics, 9. 301.
- Perrin, L. – Dura, J.M. (2004): Molecular genetics of the *Alhambra* (*Drosophila* AF10) complex locus of *Drosophila*. Mol. Gen. Genomics, 272. 156–161.
- Rothenbuhler, W. (1964): Resistance to American foulbrood in honey bees: I. Differential survival of larvae of different genetic lines. Am. Zool., 4. 111–123.
- Spivak, M. (2001): Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. Apidologie, 32. 555–565.
- Wang, H. – Cai, Y. (2006): *Drosophila* homologs of mammalian TNF/TNFR-related molecules regulate segregation of Miranda/Prospero in neuroblasts. EMBO J., 25. 5783–5793.
- Yang, X. – Cox-Foster, D.L. (2005): Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102. 7470–7475.

Érkezett: 2010. 06.13.

Szerzők címe: Debreceni Egyetem, Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma,  
 Diószegi Sámuel Agrárinovációs Intézet  
 University of Debrecen,  
 Centre of Agricultural and Applied Economic Sciences  
 Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management  
 Institute of Samuel Dioszegi Agricultural innovation  
 H-4032 Debrecen, Böszörményi út 138.  
 kusza@agr.unideb.hu