

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt  
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie  
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin  
e-mail: krzysztof.buczek@up.lublin.pl

KRZYSZTOF BUCZEK, MARIA TERESA ZOŃ

### **Ocena parametrów odporności komórkowej różnych linii pszczoly miodnej (*Apis mellifera* L.)**

---

Evaluation of haemocytic immune parameters of different lineages  
of the honey bee (*Apis mellifera* L.)

**Streszczenie.** Zbadano parametry odporności hemocytarnej czterech różnych linii pszczoly miodnej (*Apis mellifera* L.): augustowskiej (MA), północnej (PN) Asta i norweskiej (NRQ). Linie MA, PN i Asta są objęte krajowymi programami hodowlanymi ochrony zasobów genetycznych pszczół, a dla linii norweskiej (NRQ) jest realizowany program doskonalenia genetycznego pszczół. Oceniono następujące parametry odpowiedzi immunologicznej: indeks fagocyтары oraz liczbę hemocytów aktywnych w fagocytozie (liczba Wrighta). Badane parametry dla niepobudzonych immunologicznie pszczół robotnic z czterech linii nie różniły się w sposób istotny. Natomiast immunologiczna odpowiedź hemocyтары była po indukcji istotnie silniejsza u pszczół linii augustowskiej i Asta w porównaniu z linią północną i norweską. Wartość indeksu fagocyтары i liczby Wrighta różniła się istotnie.

**Słowa kluczowe:** pszczoła miodna, odporność, indeks fagocyтары, liczba Wrighta

#### WSTĘP

W jamie ciała (hemocel) owada są uruchamiane i realizowane odczyny immunologiczne wrodzone i indukowane, nabyte. Rozpoznanie mikroorganizmów po wnikięciu do jamy ciała owada jako obce (*non-self*) uruchamia całą kaskadę mechanizmów obronnych związanych z hemocytami (odporność komórkowa) oraz z humoralną, wrodzoną i nabytą odpornością przeciwbakteryjną hemolimfy [Royet 2004]. Komórkowe i humoralne mechanizmy odporności jamy ciała współdziałają ze sobą ściśle w hamowaniu zakażenia jamy ciała przez drobnoustroje. Efektem tych odczynów jest likwidacja zakażenia, dzięki czemu jest możliwe przeżycie i rozwój owada w środowisku obfitującym w mikroorganizmy i pasożyty [Gliński i Buczek 2003].

Zakażenie w jamie ciała likwiduje fagocytoza, otoczkowanie (inkapsulacja) i nodulacja. Odczyny obronne komórkowe i humoralne są skuteczne w zwalczaniu zakażeń wywołanych przez drobnoustroje saprofityczne, mało skuteczne w zwalczaniu zakażenia jamy ciała wywołanego przez entomopatogenne bakterie i wirusy [Lackie 1988, Gliński i Jarosz 1995].

Odpowiedź hemocytna, która wraz z lizozymem stanowi drugą linię obrony przeciwzakaźnej, pojawia się szybko – po kilkukilkudziesięciu minutach [Dustmann 1999]. Charakterystycznym zjawiskiem w komórkowych odczynach obronnych jest hemocytopenia, która polega na szybkim zmniejszeniu ilości plazmatocytów w hemolimfie oraz na spadku ogólnej liczby hemocytów krwi owada [Geng i Dunn 1989]. Fagocytoza jest cechą charakterystyczną wyspecjalizowanych typów komórek krwi i niektórych typów komórek osiadłych. U pszczoły funkcję fagocytów pełnią głównie granulocyty ziarniste (GR) i plazmatocyty (PL) [Gliński i Jarosz 1992].

Dotychczas wykazano, że efektywność fagocytozy zależy od wieku owada, stadium rozwojowego i zjadliwości zarazka [Xeros 1964, Salt 1970, Ratner i Vinson 1985]. Szczepy bakterii bardziej zjadliwych są fagocytowane w mniejszych ilościach niż szczepy słabo zjadliwe lub bakterie saprofityczne, formy szorstkie bakterii (R) są łatwiej fagocytowane i niszczone w fagocycie niżeli formy gładkie (S). Kompleks LPS bakterii Gram-ujemnych, zwłaszcza komponenta cukrowa, utrudnia lub wręcz uniemożliwia fagocytozę.

Efekty fagocytozy należy rozpatrywać w dwóch aspektach: usuwania substancji obcej z hemolimfy oraz hamowania lub likwidacji zakażenia. Ten pierwszy aspekt ma znaczenie w trakcie przepoczwarczenia lub podczas usuwania zmienionych lub uszkodzonych tkanek owada, np. w trakcie reperacji ran, usuwania tkanek uszkodzonych przez toksyny i wirusy. Drugi aspekt dotyczy zasadniczo obrony owada przed zakażeniem przez oczyszczanie hemolimfy z drobnoustrojów.

Nie zawsze sfagocytowane drobnoustroje są zabijane w fagolizosomie. Same mogą niszczyć fagocyty dzięki wytwarzanym zewnątrzkomórkowym proteazom. Po uwolnieniu ze zniszczonego fagocytu, mogą nawet rozmnażać się w hemolimfie, powodując śmierć owada. Niekiedy fagocyty roznoszą zakażenie w organizmie owada. To zjawisko obserwuje się w przypadku infekcji niektórymi riktesjami i wirusami, które nie są niszczone w fagolizosomie i mogą się nawet rozmnażać w fagocytach.

Fagocytozę u pszczoły, tak jak i u innych owadów, wspomagają otoczkowanie oraz humoralne odczyny obronne związane ze wzrostem aktywności bakteriologicznej i bakteriobójczej hemolimfy.

## MATERIAŁ I METODY

### **Pszczoły**

Pszczoły pochodziły z rodzin o wyrównanej sile, wolnych od warrozy, zgnilca amerykańskiego i zgnilca europejskiego. Wykorzystano następujące linie pszczół: augustowska (MA), północna (PN) i Asta, objęte krajowymi programami hodowlanymi ochrony zasobów genetycznych, oraz linia norweska (NQR), dla której realizowany jest krajowy program doskonalenia genetycznego.

Po indukcji bakteryjnej wykonanej po 24 godz. aklimatyzacji (czas 0) i w czasie 24, 48, 72 i 96 godz. po indukcji oznaczono wartość indeksu fagocytarnego, wielkość liczby Wrighta. Hemolimfę pobierano z zatoki grzbietowej do probówek Eppendorfa na łaźni lodowej. Zastosowanie łaźni lodowej zapobiegało melanizacji hemolimfy. Wyniki poddano analizie statystycznej (test  $\chi^2$  przy  $p \leq 0,05$  oraz program Statistica).

#### **Indukcja odpowiedzi immunologicznej**

Odporność nabytą indukowano żywymi komórkami D31 z 18-godz. hodowli bulionowej. Komórki bakteryjne po zawieszeniu w płynie fizjologicznym wprowadzano mikrozrykawką Hamiltona do jamy ciała przez błonę pomiędzy 3. i 4. segmentem odwłoka robotnicy w ilości  $15 \cdot 10^3$  komórek *E. coli* D31 w objętości 2  $\mu$ l płynu dla *Lepidoptera*. Owady nieimmunizowane oraz owady po immunizacji były utrzymywane w identycznych warunkach.

#### **Indeks fagocytarny**

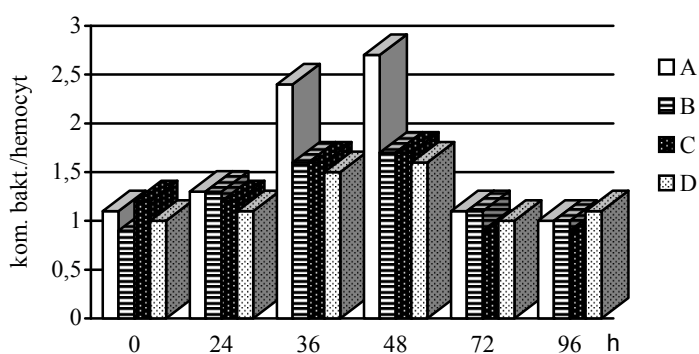
Hemolimfę pobraną w ilości 10  $\mu$ l z zatoki grzbietowej do silikonowanych probówek po 24 godz. aklimatyzacji lub po 24, 36, 48, 72 i 96 godz. po indukcji bakteryjnej mieszano z taką samą ilością 18-godzinnej zawiesiny hodowli bulionowej *E. coli* D31 (pH 7,2, inkubacja 32°C). Tak otrzymaną mieszaninę inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej, delikatnie wstrząsając co 10 min. Z każdej próbki wykonano na odtłuszczonych szkiełkach pięć rozmazów krwi. Po wysuszeniu rozmazu na powietrzu preparat utrwalono w 96% metanolu przez 5 min i barwiono odczynnikiem Mansona przez 1 min. Po spłukaniu preparatu wodą destylowaną i wysuszeniu, oglądano go pod immersją w mikroskopie świetlnym o powiększeniu 1250 razy. W preparatach z rozmazu hemolimfy liczono komórki bakteryjne pochłonięte przez 50 fagocytów. Z tych danych obliczono średnią liczbę bakterii sfagocytowanych przez jeden hemocyt robotnicy pszczoły miodnej. W wynikach podano wartości średnie i odchylenia standardowe dla danej linii pszczół i dla okresu badania.

#### **Liczba Wrighta**

Procent hemocytów biorących udział w fagocytozie obliczono wykorzystując preparaty użyte do określenia wartości indeksu fagocytarnego. W tym celu oglądano 100 hemocytów w preparatach pod mikroskopem świetlnym przy powiększeniu 1200 razy. W wynikach podano wartości średnie [Wiesner i in. 1998].

### **WYNIKI**

Średnie wartości indeksu fagocytarnego u pszczół robotnic z czterech linii pszczół w czasie 0, tj. u pszczół niezakażonych do jamy ciała żywymi komórkami *Escherichia coli* D31, wahały się w granicach od  $0,9 \pm 0,1$  do  $1,1 \pm 0,2$  komórek bakteryjnych/hemocyt. W tym okresie różnice w wartości indeksu fagocytarnego pomiędzy badanymi liniami nie różniły się statystycznie istotnie (rys. 1).



Rys. 1. Wartość indeksu fagocytarnego (komórki bakteryjne/hemocyt;  $x \pm SD$ ) u pszczół robotnic *Apis mellifera* L. linii augustowskiej (A), północnej (B), Asta (C) i norweskiej (D); pszczoły nieimmunizowane (czas 0), pszczoły immunizowane (czas 24–96 godz.)

Fig. 1. The value of phagocytic index (bacteria cells/haemocytes;  $x \pm SD$ ) in the worker honey bees *Apis mellifera* L. Augustowska lineage (A), northern (B), Asta (C) and Norewegian (D); non-immunised bees (time 0 h), immunized bees (time 24–96 h)

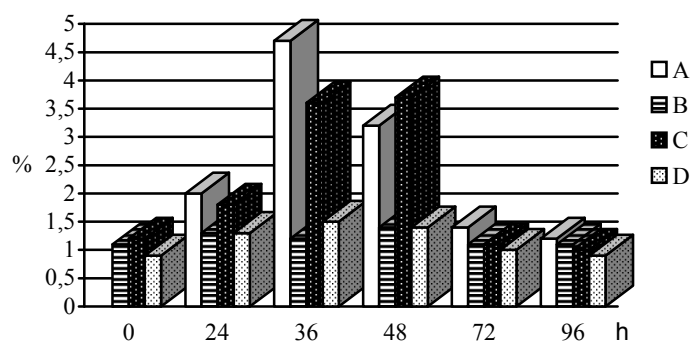
W następstwie zakażenia zwiększał się indeks fagocytarny u pszczół robotnic wszystkich 4 badanych linii. Statystycznie istotny wzrost ( $p \leq 0,05$ ) wystąpił u pszczół linii augustowskiej (A) w 24, 36 i 48 godz. po zakażeniu w odniesieniu do czasu 0 (przed zakażeniem) oraz w odniesieniu do 72 i 96 godz. po zakażeniu. Maksymalny wzrost wartości indeksu fagocytarnego w tej grupie wystąpił w 48 godz. po zakażeniu i wyniósł  $2,7 \pm 0,2$  komórki bakteryjne/hemocyt (rys. 1).

Natomiast u pszczół z trzech pozostałych linii: północna, Asta i norweska (B, C i D) statystycznie istotny wzrost wartości indeksu fagocytarnego stwierdzono w 36 i 48 godz. po zakażeniu w porównaniu z pozostałymi okresami badania w danej grupie. Maksymalne wartości indeksu fagocytarnego stwierdzono w linii B w 36 i 48 godz. po zakażeniu ( $1,7 \pm 0,2$  i  $1,7 \pm 0,1$ ), w linii C w 48 godz. ( $1,7 \pm 0,2$ ), a w linii D w 48 godz. ( $1,6 \pm 0,2$ ).

Statystycznie istotne różnice ( $p \leq 0,05$ ) wystąpiły w wartościach indeksu fagocytarnego pomiędzy pszczołami linii augustowskiej (A) i pozostałymi trzema liniami badanymi pszczoł (B, C i D). Dotyczyły okresu 24–48 godz. Wtedy wartość indeksu fagocytarnego dla linii augustowskiej (A) była najwyższa.

Wartość liczby Wrighta u nieimmunizowanych pszczół wszystkich linii nie różniła się statystycznie istotnie (rys. 2). Wahała się od  $0,9 \pm 0,2\%$  u pszczół robotnic linii norweskiej (D) do  $1,2 \pm 0,1\%$  u pszczół linii Asta (C).

Zakażenie (immunizacja do jamy ciała żywych komórek (*Escherichia coli* D31) spowodowało istotnie statystyczny wzrost ( $p \leq 0,05$ ) wartości liczby Wrighta u pszczół linii augustowskiej (A) w okresie 24–48 godz. w odniesieniu do pozostałych okresów badań w tej linii. Maksymalną wartość liczby Wrighta, wynoszącą  $4,7 \pm 0,1\%$ , stwierdzono dla okresu 36 godz.



Rys. 2. Wartość liczby Wrighta (%  $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) u pszczoł robotnic czterech linii pszczoły miodnej: augustowska (A), północna (B), Asta (C), norweska (D); pszczoły nieimmunizowane (czas 0), pszczoły immunizowane (czas 24–96 godz.)

Fig. 2. Value of the Wright's number (%  $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) in four lineages of the honey bee Augustowska lineage (A), northern (B), Asta (C) and Norwegian (D); non-immunised bees (time 0 h), immunized bees (time 24–96 h)

Również w przypadku linii Asta (C) statystycznie istotny wzrost wartości liczby Wrighta wykazano w okresie 36 i 48 godz. w odniesieniu do pozostałych okresów badania w tej linii. Wartość maksymalną ( $3,7 \pm 0,1$ ) stwierdzono dla 48 godz. okresu badania (rys. 2).

Wartości liczby Wrighta dla linii północnej (B) i norweskiej (D) nie różniły się istotnie pomiędzy sobą dla wszystkich okresów badań. Dla linii północnej wahały się one od  $1,1 \pm 0,1\%$  (czas 0, 96 godz.) do  $1,4 \pm 0,1\%$  (czas 48 godz.), a dla linii norweskiej od  $0,9 \pm 0,2\%$  (czas 0 i 96 godz.) do  $1,5 \pm 0,2\%$  (czas 36 godz.).

Różnice statystycznie istotne występowały pomiędzy wartościami dla okresu 24–48 godz. dla linii A oraz pomiędzy wartościami dla okresu 36 i 48 godz. dla linii C i wartościami dla wszystkich okresów linii północnej (B) i norweskiej (D) oraz dla okresów 0, 24, 72 i 96 godz. dla linii pszczoł linii Asta (C).

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badane parametry odporności komórkowej u pszczoł natywnych wszystkich czterech linii nie różniły się istotnie. Dotyczy to zarówno wartości indeksu fagocytarnego, jak i liczby Wrighta. Można by przyjąć, że brak różnic w tych parametrach wskazuje na bardzo podobne, jeżeli nie na identyczne nasilenie komórkowej odporności przeciwzakaznej pszczoł niepobudzonych immunologicznie.

Odpowiedź immunologiczna jest efektem głównie aktywacji plazmatocytów (PL) i granulocytów (GR) do komórkowych odczynów obronnych oraz pobudzenia ciała tłuszczowego (*fat body*) i hemocytów do produkcji i uwalniania lizozymu do hemolimfy oraz ciała tłuszczowego do produkcji i uwalniania apidycyn [Ottaviani i Franceschi

1998, Bulet i Stöcklin 2005, Ottaviani 2005]. Odczyny komórkowe zaczynają działać natychmiast po rozpoznaniu patogenu jako „obcego” dla organizmu owada, zaś ich skuteczność jest duża [Boman i Hyltmark 1987]. Następstwem zakażenia jest więc zwiększenie aktywności immunocytów, czego skutkiem jest wzrost indeksu fagocytarnego i liczby Wrighta przez uruchomienie kaskady przenoszenia sygnałów Toll i Imd [Aronstein i Salvidar 2005].

Zmiany w parametrach charakteryzujących odporność komórkową pomiędzy badanymi liniami mogą też być następstwem wrodzonych różnic w aktywności układu oksydazy polifenolowej. Układ oksydazy polifenolowej jest zaangażowany w rozpoznawaniu immunologicznym, ułatwia fagocytozę, uczestniczy w melanizacji guzków i otoczek oraz w inkapsulacji melanotycznej [Gliński i Jarosz 1995a].

Jedną z przyczyn obserwowanych różnic w wartości indeksu fagocytarnego może być działanie opsonizujące lizozymu, którego synteza wyraźnie wzrosła w dwóch liniach pszczół (linia augustowska i Asta) w porównaniu z pozostałymi dwoma liniami [Zoń i in. 2007]. Uczestniczy on u owadów w fagocytozie immunologicznej.

Zakażenie jamy ciała przez bakterie, oprócz hipersyntezy lizozymu, indukuje syntezę apidycyn z następowym ich uwalnianiem do hemolimfy owada. W komórkach ciała tłuszczowego pojawia się immune RNA [Gliński i Jarosz 1992].

Większe wartości indeksu fagocytarnego, liczby Wrighta, aktywności lizozymu i apidycyn mają istotne znaczenie w odporności przeciwzakaźnej pszczoły w chorobach bakteryjnych, grzybicach i inwazjach pierwotniaków, a także w likwidacji wtórnych zakażeń bakteryjnych spotykanych w inwazjach wywołanych przez krwiopijne roztocza [Gliński i Kostro 2001, 2004].

#### WNIOSKI

1. Parametry odporności hemocytarnej reprezentowane przez wartość indeksu fagocytarnego i liczbę Wrighta pszczół robotnic linii augustowskiej, północnej, Asta i norweskiej rasy środkowoeuropejskiej, niepobudzonych immunologicznie nie różnią się w sposób istotny.

2. Pobudzone immunologicznie pszczoły robotnice linii augustowskiej i Asta cechuje wyższe nasilenie odpowiedzi hemocytarnej w porównaniu z pobudzonymi immunologicznie pszczołami robotnicami linii północnej i norweskiej. Świadczy o tym zwiększona wartość indeksu fagocytarnego i liczby Wrighta.

#### PIŚMIENNICTWO

- Aronstein K., Saldivar E. 2005. Characterization of a honey bee Toll related receptor gene Am18w and its potential involvement in antimicrobial immune defense. *Apidologie* 36, 3.
- Boman H. G., Hultmark D. 1987. Cell-free immunity in insects. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 103.
- Bulet P., Stöcklin R. 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein and Peptides Letters* 11, 3.
- Dustmann J. H. 1999. Natural defense mechanisms of a honey bee colony against diseases and parasites. *Amer. Bee J.* 133, 431.

- Geng C., Dunn P. E. 1989. Plasmatocyte depletion in larvae of *Manduca sexta* following injection of bacteria. *Dev. Comp. Immun.*, 13, 17.
- Gliński Z., Buczek K. 2003. Response of the *Apoidea* to fungal infections. *Apiacta* 38, 183.
- Gliński Z., Jarosz J. 1992. *Zarys immunologii owadów*. Wyd. AR Lublin.
- Gliński Z., Jarosz J. 1995. Cellular and humoral defences in honey bees. *Bee World* 76, 195.
- Gliński Z., Jarosz J. 1995a. *Immunobiologia pszczoły miodnej*. Wyd. AR, Lublin.
- Gliński Z., Kostro K. 2001. Key stones in insect immunity. *Cent. Eur. J. Immunol.*, 26, 43.
- Gliński Z., Kostro K. (red.) 2004. *Immunobiologia*. PWRiL, Warszawa.
- Lackie A. M. 1988. Immune mechanisms in insects. *Parasitologie Today* 4, 98.
- Ottaviani E. 2005. Insect immunorecognition. *Invertebr. Survival J.*, 2, 142.
- Ottaviani E., Franceschi A. 1998. New theory of the common evolutionary origin of natural immunity, inflammation and stress responses: the invertebrate phagocytic immunocytes as an eye-witness. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 5, 291.
- Ratner S., Vinson S. B. 1985. Phagocytosis and encapsulation: Cellular immune responses in arthropods. *Am. Zool.*, 23, 198.
- Royet J. 2004. Infectious non-self recognition in invertebrates: lessons from *Drosophila* and other insect models. *Molec. Immunol.*, 41, 1063.
- Salt G. 1970. The cellular defence reactions of insects. *Exper. Biol.* 16, Cambridge Univ. Press 118.
- Wiesner A., Dunphy G. B., Marmaras V. J., Morishima I., Sugumaran M., Yamakawa M. (eds.) 1998. *Techniques in Insect Immunology*. SOS Publications, Fair Haven.
- Xeros N. 1964. Phagocytosis of virus in *Tipula plaidis* Meigen. *J. Insect Pathol.*, 6, 225.
- Zoń M.T., Buczek K., Chmielewski M. 2007. Ocena parametrów odporności humoralnej różnych linii *Apis mellifera* L. *Ann. UMCS, sec. DD*, 62 (1), 43.

**Summary.** Haemocytic immune parameters of four different lineages of the honey bee (*Apis mellifera* L.): augustowska (MA), northern (PN), Asta and Norwegian (NRQ) were examined. The lines MA, PN and Asta were under the state control of the bee genome protection while for NRQ was realized a programme of genetic improving. The following haemocytic immune responses were evaluated: phagocytic index and the number of haemocytes active in phagocytosis (Wright's number). The examined parameters for the four lines of non-induced bees did not differ significantly. However, the haemocytic immune response was significantly stronger in immunologically induced worker bees of augustowska and Asta lines in comparison to the worker bees of northern and Norwegian lines. The values of phagocytic index and Wright's number differed significantly.

**Key words:** honey bee, immunity, phagocytic index, Wright's number