

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt
Akademii Rolniczej w Lublinie
ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin
e-mail: marek.chmielewski@ar.lublin.pl

MARIA TERESA ZOŃ, KRZYSZTOF BUCZEK,
MAREK CHMIELEWSKI

Ocena parametrów odporności humoralnej różnych linii *Apis mellifera mellifera* L.

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

Streszczenie. Pszczoła miodna jest ciągle narażona na atak różnych saprofitycznych i patogennych drobnoustrojów, pasożytniczych pierwotniaków i wyżej uorganizowanych pasożytów oraz pasożytujących roztoczy. W odpowiedzi na zakażenie i zranienie w jamie ciała pszczoły zostają uruchomione różnorodne procesy w celu zniszczenia czynnika, który się do niej przedostał. Po przełamaniu zewnętrznych barier ochronnych inicjuje on odpowiedź immunologiczną. Odpowiedź humoralna obejmuje syntezę i uwalnianie do hemolimfy licznych białek o działaniu przeciwbakteryjnym, wśród nich lizozymu i apidycyn o działaniu na bakterie Gram-dodatnie lub Gram-ujemne. Gwałtowny wzrost poziomu apidycyn stwierdzono u 4 linii pszczół. Jednakże był on statystycznie istotnie wyższy u pszczół robotnic linii augustowskiej i Asta. Także aktywność bakteriologiczna typu lizozymu była wyższa w hemolimfie tych dwóch linii pszczół w porównaniu z pszczołami linii północnej i norweskiej.

Słowa kluczowe: pszczoła miodna, odporność, lizozym, apidycyny

WSTĘP

Humoralne odczyny obronne pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.) są związane z obecnością w hemolimfie polipeptydów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, głównie przeciwbakteryjnym. Różnią się one czasem pojawienia oraz mechanizmem działania. Aktywność bakteriologiczna typu lizozymu występuje zarówno w hemolimfie pszczoły niepodbudzonej immunologicznie, jak również u pszczół zakażonych. W hemo-

limfie owada niezakażonego nasilenie aktywności bakteriologicznej lizozymu jest niskie. Natomiast silnie wzrasta w następstwie zakażenia [Gliński i Jarosz 1995a, Gliński i Kostro 2001].

Zakażenie indukuje pojawienie się w hemolimfie polipeptydów odpornościowych (immune proteins) typu apidycyn, abycyny i hymenoptecyny. Pojawiają się one po kilku, kilkunastu godz. po zakażeniu, osiągając maksymalny poziom po 24–48 godz., a następnie ich aktywność zanika po około 96 godz. [Casteels i in. 1989, 1990, Boman 1998].

Spośród czynników humoralnych odporności przeciwzakażnej określenie aktywności bakteriologicznej typu lizozymu oraz poziomu apidycyn znalazło zastosowanie w ocenie nasilenia odporności przeciwzakażnej pszczoł i trzmieli [Gliński i Jarosz 1995a].

Celem niniejszych badań było określenie stanu odporności przeciwzakażnej linii pszczoł hodowanych na określonym terenie i objętych krajowymi programami hodowlanymi ochrony zasobów genetycznych lub krajowym programem doskonalenia genetycznego. Uzyskane wyniki można wykorzystać przy wyborze linii pszczoł do hodowli.

MATERIAŁ I METODY

Pszczoły

Charakter i nasilenie odporności oceniono i porównano u 4 linii pszczoły miodnej na podstawie odpowiedzi humoralnej pszczoł robotnic w okresie letnim. W każdym przypadku badano pszczoły pochodzące z 10 rodzin w 3 okresach badawczych w odstępach 2-tygodniowych (14–15 maja, 1–2 czerwca, 14–15 czerwca).

Badania przeprowadzono z 3 liniami pszczoł *Apis mellifera mellifera* L. objętymi krajowymi programami hodowlanymi ochrony zasobów genetycznych: augustowska, północna, Asta, oraz z linią norweską, dla której realizowany jest krajowy program doskonalenia genetycznego.

Indukcja odporności

Odporność nabytą indukowano żywymi komórkami *E. coli* D31 z 18 godz. hodowli bulionowej. Komórki bakteryjne po zawieszeniu w płynie fizjologicznym wprowadzano mikrostrzykawką 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 μ l płynu dla *Lepidoptera*. Owady nieimmunizowane oraz owady po immunizacji były utrzymywane w identycznych warunkach.

Aktywność bakteriologiczna typu lizozymu

Aktywność bakteriologiczną typu lizozymu oznaczono dla każdej linii pszczoł niepoddanych indukcji (zakażeniu) oraz zakażonych *Escherichia coli* D31 po 24 godz. aklimatyzacji (czas 0). Poziom aktywności bakteriologicznej lizozymu w hemolimfie pszczoł robotnic oznaczono metodą basenikowo-dyfuzyjną wg Mohruga i Messnera [1968]. Szalka Petriego do ilościowego oznaczania aktywności lizozymu zawierała 10 ml 0,066 M buforu Sorensena, 100 mg agarozы (Sigma) i liofilizat komórek *Micrococcus luteus* (Sigma) w ilości 0,75 mg/ml jako substrat działania lizozymu. W celu zahamowania wzrostu bakterii pochodzących z otoczenia, do podłoża dodano 30 μ g oksytetracykli-

ny/ml. W podłożu agarowym wycinano baseniki o średnicy 2,7 mm, które wypełniano hemolimfą w ilości 5,0 μ l. Strefy bakteriolizy oceniano po 24 godz. inkubacji w 28°C.

Stężenie lizozymu w badanej hemolimfie obliczono z krzywej kalibracyjnej: $y = \exp(a + bx)$, sporządzonej dla następujących stężeń lizozymu białka jaja kurzego (EWL): 125,0, 62,5, 31,25, 15,625, 7,81, 3,9, 1,95, 0,98, 0,49 μ g/ml i wyrażono w μ g/ml hemolimfy w przeliczeniu na aktywność lizozymu białka jaja kurzego (EWL; EC.3.2.1.17). Na osi odciętych odkładano logarytm stężenia lizozymu standardowego, a na osi rzędnych średnicę w mm strefy bakteriolizy. Dla każdej serii oznaczeń aktywności lizozymu sporządzono krzywą kalibracyjną ze świeżo przygotowanych rozcieńczeń lizozymu białka jaja kurzego (EWL). W wynikach podano średnie z odchyleniami standardowymi z wykonanych oznaczeń.

Aktywność apidycyn

Aktywność bakteriobójczą hemolimfy pszczół robotnic uwarunkowaną obecnością apidycyn oceniono metodą basenikowo-dyfuzyjną w warstwie agaru odżywczego wobec *Escherichia coli* D31, jako drobnoustroju indykatorowego opornego na streptomycynę [Jarosz 1994]. Hodowlę *E. coli* D31 w bulionie odżywczym z fazy wzrostu logarytmicznego zawieszono w agarze w ilości $3 \cdot 10^5$ komórek bakteryjnych na 10 ml podłoża. W celu zahamowania wzrostu obecnej mikroflory, do podłoża dodano 100 μ g/ml siarczanu streptomycyny. Przygotowane w ten sposób podłoże w ilości 8 ml wylewano do szalek Petriego o średnicy 10 cm. Po zastygnięciu agar wycinano baseniki o średnicy 3 mm, które następnie wypełniano badaną hemolimfą w ilości 5 μ l i inkubowano w 28°C przez 24 godz. Stężenie apidycyn w hemolimfie wyrażono w stosunku do syntetycznej cekropiny A *Hyalophora cekropia* z wykreślonej krzywej kalibracyjnej dla stężeń: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,78 μ g/ml, podając na osi x stężenie cekropiny, zaś na osi y wielkość strefy zahamowania wzrostu drobnoustroju indykatorowego wyrażonej w mm [Gliński i Jarosz, 1992]. Wyniki poddano analizie statystycznej testem χ^2 przy $p \leq 0,05$ oraz programem Statistica.

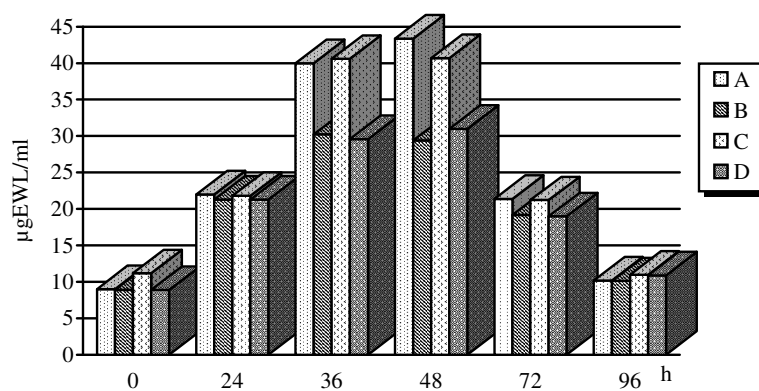
WYNIKI

Natywny (czas 0) poziom aktywności lizozymu w hemolimfie linii augustowskiej, północnej, Asta i norweskiej wahał się w granicach $8,9 \pm 0,1$ μ g EWL/ml (B i D) do $11,2 \pm 0,3$ μ g EWL/ml (C). Wartości aktywności lizozymu dla poszczególnych linii w czasie 0 nie różniły się istotnie statystycznie (rys. 1).

Immunizacja jamy ciała pszczół robotnic zainicjowała hipersyntezę lizozymu. Wystąpił statystycznie istotny ($p \leq 0,05$) wzrost aktywności lizozymu w okresie 24–72 godz. w porównaniu z okresem 0 oraz 96 godz. dla każdej linii pszczół.

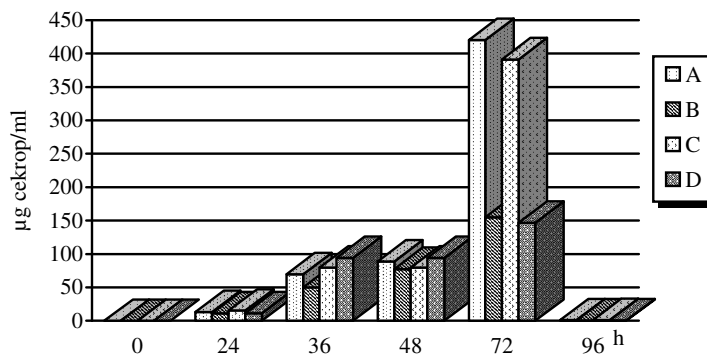
Aktywność lizozymu hemolimfy osiągała wartość maksymalną $43,4 \pm 0,2$ μ g EWL/ml w 48 godz. po immunizacji dla linii augustowskiej, $40,7 \pm 0,2$ μ g EWL/ml dla okresu 48 godz. dla linii Asta, $30,2 \pm 0,3$ μ g EWL/ml dla okresu 36 godz. dla linii północnej i $31,0 \pm 0,2$ μ g EWL/ml dla okresu 48 godz. dla linii norweskiej.

Wartości aktywności lizozymu dla okresu 36 i 48 godz. dla linii augustowskiej (A) różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) od analogicznych okresów dla linii północnej (B) i norweskiej (D). Nie różnią się natomiast od wartości uzyskanych dla linii Asta (C) dla tych samych okresów badania.



Rys. 1. Aktywność bakteriolityczna typu lizozymu hemolimfy pszczół robotnic nieimmunizowanych (czas 0) oraz immunizowanych do jamy ciała żywymi komórkami *E. coli* D31 (czas 24–96 godz.); linia augustowska (A), północna (B), Asta (C), norweska (D)

Fig. 1. Bacteriolytic activity of haemolymph lysozyme ($\mu\text{g EWL/ml}$) in non-immunized (0) and immunized worker bees with a suspension of live cells *E. coli* D31 (24–96 h); augustowska (A), northern (B), Asta (C), and norwegian (D) lineages



Rys. 2. Poziom apidacyń w hemolimfie pszczół nieimmunizowanych (czas 0) i immunizowanych (czas 24–96 godz.) linii augustowskiej (A), północnej (B), Asta (C) i norweskiej (D)

Fig. 1. Level of apidaecins ($\mu\text{g cekropin A Hyalophora cekropia/ml}$) in non-immunized (0) and immunized worker bees with a suspension of live cells *E. coli* D31 (24–96 h), augustowska (A), northern (B), Asta (C), and norwegian (D) lineages

Wartości dla okresu 36 i 48 godz. dla linii Asta (C) różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) od wartości dla tych samych okresów badania dla linii północnej (B) i norweskiej (D) – rys. 1.

W hemolimfie pszczoł natywnych (czas 0 godz.) wszystkich czterech linii nie stwierdzono aktywności apidycyn. Zakażenie jamy ciała żywymi komórkami *E. coli* D31 zainicjowało syntezę apidycyn. Maksymalne miana pojawiły się w 72 godz. badania i wynosiły odpowiednio u pszczoł linii augustowskiej $420,1 \pm 1,4$, północnej $155,2 \pm 3,2$, Asta $391,1 \pm 2,2$ i norweskiej $147,0 \pm 4,4$ μg cekropiny A *Hyalophora cekropia* ml. Natomiast w 96 godz. poziom apidycyn w hemolimfie był bardzo niski i wahał się od $0,9 \pm 0,1$ (linia B) do $1,3 \pm 0,1$ (linia C).

W przypadku wszystkich czterech badanych linii pszczoł występowały różnice istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$) pomiędzy poziomem apidycyn w okresie 24–72 godz. i okresem 96 godz. (rys. 2).

Poziom apidycyn dla pszczoł robotnic z linii augustowskiej ($420,1 \pm 1,4$) i linii Asta ($391,1 \pm 2,2$) dla 72 godz. nie różniły się statystycznie istotnie. Był on natomiast istotnie wyższy ($p \leq 0,05$) w porównaniu z wartościami stwierdzonymi w analogicznym okresie dla linii północnej ($155,2 \pm 3,2$) i norweskiej ($147,0 \pm 4,4$) – rys. 2.

W poszczególnych liniach pszczoł dla okresu 36–73 godz. był istotnie wyższy w porównaniu z okresem 24 godz.

Statystycznie wyższy poziom ($p \leq 0,05$) apidycyn występował także pomiędzy okresem 48 godz. ($77,8 \pm 1,4$ oraz $94,2 \pm 2,3$), a okresem 24 i 36 i 96 godz. dla linii północnej (B) oraz dla linii norweskiej (D) – rys. 2.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W kraju dużo uwagi poświęca się doskonaleniu pszczoł i ich przystosowaniu do różnych warunków zimowania oraz do lepszego wykorzystania warunków klimatyczno-rozwojowych do wiosennego rozwoju rodziny. Działania hodowlane szły w kierunku uzyskania pszczoł zdolnych do utrzymania dobrej kondycji w zmieniającym się środowisku. I tak np. w tym celu dwie linie augustowską i kaminoską zachowano w pierwotnej formie w rejonach naturalnego ich występowania, zaś linię północną i Asta udoskonalono, zachowując najcenniejsze cechy pszczoł rodzimych.

Zastosowanie w badaniach własnych dwóch modeli eksperymentalnych – jednego o niepobudzonym układzie odpornościowym (pszczoły natywne) oraz drugiego o układzie odpornościowym pobudzonym zakażeniem jamy ciała robotnic przez żywe komórki *Escherichia coli* D31 umożliwiło ocenę nasilenia i porównanie odpowiedzi humoralnej wrodzonej i nabytej pszczoł w stanie zdrowia i w infekcji [Boman i Hultmark 1987, Gliński i Jarosz, 1990a, Gliński i Jarosz 1995, Dustman 1999].

Polipeptydy i białka odpornościowe pszczołowatych, które są warunkiem istnienia humoralnej naturalnej (lizozym) i nabytej (apidycyny) odporności cechują się różnorodnością. Jednakże efekt ich działania jest w zasadzie dwupłaszczyznowy [Casteels-Josson i in. 1993]. Obejmuje zahamowanie wzrostu, względnie działanie bójcze na bakterie. Aktywacja immunologiczna, której następstwem jest hipersynteza lizozymu oraz synteza *de novo* apidycyn, abycyny i hymenoptecyny u pszczoły miodnej obejmuje współdziałanie hemocytów z komórkami produkującymi polipeptydy i białka odpornościowe, głów-

nie z komórkami ciała tłuszczowego, oraz regulację tych mechanizmów na poziomie komórkowym przy użyciu białek szlaków sygnałowych, jakimi są hemokiny, oraz na poziomie molekularnym – na etapie transkrypcji [Casteels i in. 1993, Gliński i Jarosz 2001]. Hemokiny, będące odpowiednikami cytokin kręgowców, biorą udział w większości procesów biologicznych w organizmie owadów.

Badane parametry odporności humoralnej u pszczoł natywnych wszystkich czterech linii nie różniły się istotnie. Zakażenie jamy ciała pszczoł robotnic przez bakterie indukuje, oprócz hipersyntezy lizozymu, syntezę apidycyn z następowym ich uwalnianiem do hemolimfy owada. W komórkach ciała tłuszczowego pojawia się immune RNA [Gliński i Jarosz 1992].

W badaniach wyraźne różnice dotyczyły aktywności bakteriologicznej lizozymu u robotnic o pobudzonym układzie immunologicznym, o czym świadczy zarówno statystycznie istotny ($p \leq 0,05$) wzrost aktywności bakteriologicznej typu lizozymu, jak i poziomu apidycyn w hemolimfie robotnic z linii augustowskiej i Asta .

Z badań własnych wynika, że w charakterystyce linii pszczoły środkowoeuropejskiej powinna być uwzględniona ocena stanu odporności przeciwzakaźnej jamy ciała, która jest jednym z fragmentów odporności przeciwzakaźnej. Ta ocena powinna uwzględnić, oprócz wartości indeksu fagocytarnego i liczby Wrighta, aktywność bakteriologiczną hemolimfy typu lizozymu oraz poziom apidycyn.

WNIOSKI

1. Aktywność bakteriologiczna hemolimfy typu lizozymu natywnych pszczoł robotnic linii augustowskiej, północnej, Asta i norweskiej, rasy środkowoeuropejskiej nie różni się w sposób istotny.

2. Pobudzone immunologicznie pszczoły robotnice linii augustowskiej i Asta cechuje wyższa aktywność bakteriologiczna hemolimfy typu lizozymu i wyższy poziom apidycyn aniżeli pszczoł robotnic linii północnej i norweskiej.

PIŚMIENNICTWO

- Boman H.G. 1998. Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review. *Scand. J. Immunol.* 48, 15.
- Boman H.G., Hultmark D. 1987. Cell-free immunity in insects. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 103.
- Casteels P. R., Ampe C., Jacob F., Vaeck M., Tempst P. 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* 8, 2387.
- Casteels P.R., Ampe C., Riviere L., Van Damme J., Elicone C., Fleming M., Jacobs F., Tempst P. 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.* 187, 381.
- Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Tempst P. 1993. Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, and antibacterial peptide that is infection inducible in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Biol. Chem.* 268, 7044.
- Casteels-Josson K., Capaci T., Casteels P., Tempst P. 1993. Apidaecin, multipeptide precursor structure: a putative mechanism for amplification of the insect antibacterial response. *EMBO J.* 12, 1569.

- Dustmann J. H. 1999. Natural defense mechanisms of a honey bee colony against diseases and parasites. *Amer. Bee J.* 133, 431.
- Gliński Z., Jarosz J. 1990. Biochemiczne podstawy odporności humoralnej owadów. *Postępy Mikrobiol.*, 29, 59.
- 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., Jarosz J. 2001. Infection and immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apiacta* 36, 12.
- Gliński Z., Kostro K. 2001. Key stones in insect immunity. *Cent. Eur. J. Immunol.*, 26, 43.
- Jarosz J. 1994. Modulation of cell-free immune responses in insects. *Cytobios* 79, 169.
- Mohrig W., Messner B. 1968. Immunreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrmechanismus der Insekten. *Biol. Zentralbl.*, 87, 439.

Summary. The honey bee during its life is subject to a nearly continual challenge by different saprophytic and pathogenic microorganisms, protozoan and metazoan parasites and parasitic mites. In response to infection and injury a variety of immune processes have evolved to suppress invaders that have succeeded in reaching the haemocoel. When the outer protective barriers are broken the invader encounters the internal immune responses active in the coelomic cavity of the bee. Cell-free immune responses involve synthesis and release of several antibacterial immune proteins, among them lysozyme and apidaecins capable of killing Gram-negative or Gram-positive bacteria. A sharp increase of the levels of apidaecin occurred in the four lineages of the bees. However, a statistically significantly higher level of apidaecins was noted in the augustowska and Asta worker bees. Also, the antibacterial level of haemolymph lysozyme was significantly higher in these two lineages of bees after infection in comparison to northern and norwegian worker bees.

Key words: hone bee, immunity, lysozyme, apidaecins