



32. Untersuchungen zur Immunabwehr von *Apis mellifera* gegen Bakterien und Pilze

J Griesch, L Podsiadlowski

► To cite this version:

J Griesch, L Podsiadlowski. 32. Untersuchungen zur Immunabwehr von *Apis mellifera* gegen Bakterien und Pilze. *Apidologie*, 1996, 27 (4), pp.298-300. hal-00891362

HAL Id: hal-00891362

<https://hal.science/hal-00891362>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

32. Untersuchungen zur Immunabwehr von *Apis mellifera* gegen Bakterien und Pilze. J Griesch, L Podsiadlowski (FU Berlin, Institut für Zoologie, Königin-Luise-Str 1-3, D-14195 Berlin, Deutschland)

Zur Induzierung einer Immunantwort wurden den Larven von Drohnen und Arbeiterinnen von *Apis mellifera* pro Tier 10 µl Zymosan-Lösung injiziert. Zymosan ist ein Extrakt aus Hefe-Zellen, lösliche Komponenten sind vorwiegend β -1,3-Glucane, häufige Bestandteile von Pilzzellwänden. Kontrolltieren wurde in denselben Mengen Grace's Insect Medium injiziert. Nach 24 Stunden wurde den Larven Hämolymphe entnommen. Die Hämolymphezellen wurden abzentrifugiert und die zellfreie Hämolymphe auf antibakterielle und antifungale Aktivität untersucht.

1. Antibakterielle Wirkung ließ sich auf Agarplatten mit lebenden *Escherichia coli*-Kolonien nachweisen. Das Wachstum der Bakterien wurde unter Zugabe von zellfreier Hämolymphe der Versuchstiere stark gehemmt (Eichung mit dem Antibiotikum Gentamycin, die Ergebnisse für Versuchstiere entsprechen 19,2 µg/ml; sd = 2,4; n = 8; sowie für Kontrolltiere 9,4 µg/ml; sd = 1,7; n = 8; unbehandelte Tiere zeigten keine meßbaren Hemmhöfe). Ein auffallender Unterschied zeigte sich zwischen Drohnen- und Arbeiterinnenlarven. Während bei ersteren die starke Hemmung des *E coli*-Wachstums nur bei den immunisierten Versuchstieren auftrat, zeigte bei den Arbeiterinnen-Larven auch die Hämolymphe der Kontrolltiere (14,2 µg/ml; sd = 2,6; n = 8), sowie völlig unbehandelter Tiere (13,9 µg/ml; sd = 1,9; n = 8) eine starke antibakterielle Aktivität (immunisierte Tiere: 12,4 µg/ml; sd = 2,2; n = 8).

2. Weitere Tests wurden auf Agarplatten mit getrockneten *Micrococcus lutei* durchgeführt. Dieser Test weist spezifisch nur das antimikrobielle Protein Lysozym nach, zeigte aber bei den untersuchten Larven

keine positiven Ergebnisse. Lysozym spielt also bei Bienenlarven höchstens eine untergeordnete Rolle in der Abwehr gegen Mikroorganismen.

3. Ein Test auf antifungale Aktivität wurde mit Suspensionen lebender Hefezellen auf Mikrotiterplatten durchgeführt. Das Hefewachstum wurde photometrisch über die optische Dichte der Suspension bestimmt. Für die Hämolymphe der Drohnen-Larven, die vorher mit Zymosan behandelt wurden, zeigte sich ein geringfügig gehemmtes Wachstum (85% der Zellzahlen gegenüber den Kontrollversuchen; n = 10). Insgesamt wurde das Hefewachstum jedoch durch Hämolymphezugabe eher stimuliert (150% gegenüber Hefen ohne Hämolymphezugabe; n = 10).

Humoral defence in *Apis mellifera* against bacteria and fungi

Larvae of *Apis mellifera* drones and workers were injected with 10 µL of a zymosan solution, in order to induce an immune response. Zymosan is an extract from yeast cells, the major soluble components are β -1,3-glucans, which are common in fungal cell walls. As a control, other larvae were injected with 10 µL of Grace's Insect medium. Twenty-four hours later haemolymph was extracted from the larvae. Upon separation of its cellular components, the negative effect of the cell-free haemolymph on bacteria and fungi was determined through three different assays.

1. The inhibition zone assay with living *Escherichia coli* colonies on agar plates showed that the immunized haemolymph from both drone and worker larvae possessed strong antibacterial activity. The assay was standardized with the antibiotic Gentamycin. The results for immunized haemolymph for drone larvae correspond to 19.2 µg/mL Gentamycin (sd = 2.4, n = 8), compared to 9.4 µg/mL (sd = 1.7, n = 8)

for larvae treated with Grace's Insect Medium. Haemolymph from unimmunized worker larvae showed comparable antibacterial effects with the immunized haemolymph from worker larvae (untreated: 13.9 $\mu\text{g/mL}$, $\text{sd} = 1.9$; $n = 8$; medium: 14.2 $\mu\text{g/mL}$, $\text{sd} = 2.6$; $n = 8$; immunized: 12.4 $\mu\text{g/mL}$, $\text{sd} = 2.2$; $n = 8$). The haemolymph from untreated drone larvae showed no measurable inhibition of *E. coli*, thus showing a clear difference between drones and workers.

2. In literature the so-called nephelometric test with dried *Micrococcus luteus* cells on agar plates is used only for detection of lysozyme, which is a wide-spread antibacterial protein. The results from this assay showed negative results, suggesting that lysozyme may play only a subordinate role in the humoral defence of honeybee larvae.

3. An assay for antifungal activity was carried out using living yeast cells in microtiter plates. Yeast growth was measured photometrically by the increase in optical density. Haemolymph from immunized drone larvae had little inhibitory effect on yeast growth (85% of total cell number, compared to haemolymph from larvae which were treated only with medium, $n = 10$). However, in other experiments yeast growth was stimulated by the addition of insect haemolymph (150% of total cell numbers, compared to yeast without haemolymph; $n = 10$).

Étude de la résistance immunitaire d'*Apis mellifera* aux bactéries et aux champignons

Des injections de 10 μL d'une solution de zymosan ont été injectées à des larves de mâles et d'ouvrières d'*Apis mellifera* dans le but de provoquer chez elles une réponse immunitaire. Le zymosan est un extrait de cellules de levure dont les principaux composants solubles sont des β -1,3-glucanes, constituants courants des parois cellulaires

des champignons. Les animaux témoins ont reçu la même quantité de milieu pour culture de cellules d'insectes de Grace. Après 24 heures, de l'hémolymph a été prélevée des larves. Les cellules hémo-lymphatiques ont été éliminées par centrifugation et une recherche de l'activité antibactérienne et antifongique a été effectuée sur l'hémolymph séparée de ses cellules.

i) Un effet antibactérien a été mis en évidence sur des plaques de gélose contenant des colonies vivantes d'*Escherichia coli*. La croissance des bactéries a été fortement inhibée par l'addition de l'hémolymph privée de ses cellules (calibrage avec un antibiotique, la gentamycine, résultats chez les animaux testés correspondant à 19,2 $\mu\text{g/mL}$, écart type de 2,4, $n = 8$ et chez les témoins à 9,4 $\mu\text{g/mL}$, écart type de 1,7, $n = 8$, les animaux non traités n'ont présenté aucune plage d'inhibition décelable). Une différence marquée a été observée entre les mâles et les larves ouvrières. Tandis que chez les premiers la forte inhibition de la croissance d'*E. coli* n'est apparue que chez les animaux testés immunisés, chez les larves ouvrières l'hémolymph des témoins (14,2 $\mu\text{g/mL}$, écart type de 2,6, $n = 8$) ainsi que des animaux n'ayant reçu aucun traitement (13,9 $\mu\text{g/mL}$, écart type de 1,9, $n = 8$) a présenté une forte activité antibactérienne (animaux immunisés : 12,4 $\mu\text{g/mL}$, écart type de 2,2, $n = 8$).

ii) D'autres tests ont été effectués sur des plaques de géloseensemencées de cellules de *Micrococcus lutei* desséchées. Ce test ne cible de manière spécifique que la lysozyme, une protéine antibactérienne, mais n'a cependant pas donné de résultats positifs chez les larves étudiées. La lysozyme joue donc chez les larves d'abeille tout au plus un rôle mineur dans la défense contre les microorganismes.

iii) Un test de l'activité antifongique a été effectué avec des suspensions de cellules de levure vivante étalées sur des plaques de microtitration. La croissance de la levure a

été déterminée par voie photométrique par mesure de la densité optique de la suspension. Le test de l'hémolymphe des larves de mâles traitées au préalable au zymosan n'a révélé qu'une faible inhibition de la croissance (85 % de cellules par rapport aux témoins, $n = 10$). Dans l'ensemble, la croissance de la levure a cependant été plutôt stimulée par l'apport d'hémolymphe (150 % par rapport aux levures non additionnées d'hémolymphe, $n = 10$).

33. Einfluß der Paarungshäufigkeit der Bienenkönigin auf Leistungsmerkmale des Bienenvolkes. P Neumann, RFA Moritz (FR 1-1, Institut für Biologie, FB 7, TU Berlin, Franklinstr. 28/29, 10587 Berlin, Deutschland)

Verschiedene Theorien postulieren einen Einfluß der Paarungshäufigkeit der Königin auf Leistungsmerkmale des Volkes. Zwei Theorien wurden getestet: 1. reduzierte Anfälligkeit für Parasiten und 2. erhöhte Produktivität durch genetisch determinierte Arbeitsteilung.

Im Juni 1995 wurden Arbeiterinnen gesammelt, aus denen individuell DNA extrahiert wurde. Der Polyandriegrad jeder Königin wurde mit DNA-Mikrosatelliten-Variabilität bestimmt (Loci A76 und A107; $N = 840$ Arbeiterinnen; 28 weiselrichtige Völker). Die Anzahl der effektiven Männchen (n_e) ergab sich über die durchschnittliche intrakoloniale Verwandtschaft R ($n_e = 2/(4R-1)$). Die Anzahl der *Varroamilben* (Parasiten-Theorie) wurde am Saisonende ermittelt. Der Honigertrag (Koloniefitness-Theorie) wurde über Wiegen der Honigwaben vor und nach dem Schleudern und Abschätzen des Wintervorrats bestimmt. Um Linieneffekte zu eliminieren, wurde für alle Völker eine Differenz der Meßwerte zum jeweiligen Familienmittel berechnet.

Die durchschnittliche Anzahl von effektiven Männchen (n_e) betrug $17 \pm 7,63$. Es

ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl an *Varroamilben* und n_e . Für den Honigertrag wurde eine signifikante Korrelation gefunden ($p < 0.05$). Kovarianzanalysen zeigten einen Anteil von 10% der Gesamtvarianz, der auf Polyandrieeffekte zurückzuführen ist.

Wir fanden keinen Hinweis für die Hypothese einer erhöhten Resistenz gegen Parasiten. Unsere Ergebnisse unterstützen das Konzept einer erhöhten Produktivität des Volkes durch hohe genetische Variabilität. Die aktuellen Mechanismen können zum derzeitigen Stand der Untersuchungen nicht geklärt werden.

Comparing performance data of honeybee colonies with mating frequencies of honeybee queens (*Apis mellifera*) using single locus DNA-fingerprinting

Various theories predict an effect of the mating frequency of the queen on performance data of the colony. Two theories were tested: 1) reduced susceptibility of parasites; and 2) increased productivity through genetic determined division of labour.

In June 1995, 1 600 workers were sampled from 40 colonies. DNA was extracted of individual workers and the degree of polyandry for each queen was detected using DNA microsatellite variability (loci A76 and A107; $N = 840$ worker, 28 queen-right colonies). The number of effective males (n_e) was estimated by calculating the average intracolony relationship and solving the equation, $n_e = 2/(4R - 1)$. The number of *Varroa* mites (parasite theory) was determined at the end of the season and the honey yield (colony fitness theory) was obtained by weighing frames before and after honey extraction and estimating winter storage. The difference for each colony to the mean of their own breeding line was calculated to eliminate strain effects.