

DAS HAEMOLYMPH-PROTEIN-SPEKTRUM IMAGINALER DROHNEN  
UND GYNANDER IM VERGLEICH ZU DEN WEIBLICHEN KASTEN  
BEI APIS MELLIFICA

Hartmut Fahrenhorst, Zoologisches Institut der Universität Münster/  
Westf., Deutschland.

Die Zusammenhänge zwischen Oogenese, speziell Vitellogenese, und Veränderungen der Protein-Spektren der Haemolymphe sind bei Insekten mehrfach untersucht worden (vgl. ENGELMANN, 1970). Generell treten dotterpflichtige Fraktionen, sog. Vitellogenine (Pan et al., 1969) als  $\alpha$ -spezifische Proteine nur dann auf, wenn im Oogenese-Zyklus die Phase der Dottereinlagerung durchlaufen wird. Über die Oogenese-Phase hinausgehende, die gesamte imaginale Ontogenese berücksichtigende Untersuchungen des Haemolymphestatus fehlen noch ebenso wie geschlechtsspezifische Vergleiche. Ein besonderes entwicklungsphysiologisches Problem stellen bei sozialen Insekten außerdem kastenspezifische Haemolympf-Unterschiede dar, denen in der Insektenphysiologie bislang noch keine Beachtung geschenkt wurde.

Der Kastenpolymorphismus erreicht zwar bei Apis mellifica nicht seinen Höhepunkt, aber die Honigbiene bietet als Haustier beste Voraussetzungen für elektrophoretische Untersuchungen von Einzeltieren, die unter Normalbedingungen gehalten werden können. Außer den im Bienenvolk während der Hauptsaison vertretenen drei Kasten Königin, Arbeiterin, Drohne wurden normalerweise nicht vorkommende genotypisch abweichende Individuen untersucht: (Drescher, 1965) Gynandromorphe und diploide Drohnen, die nach den Zuchtmethoden von Woyke (1962-69), erzeugt wurden. Die Honigbiene bietet somit eine große Breite für vergleichende Untersuchungen geschlechtsbedingter, altersbedingter und genotypbedingter entwicklungsphysiologischer Kriterien des Haemolymphestatus.

Bei der elektrophoretischen Auftrennung der Haemolympfproteine auf gelatinierten Celluloseacetatstreifen (Cellogel) sind unter den angewandten Versuchsbedingungen auf den fertigen Pherogrammen neben der Startbande (= unlösliche Proteine) drei gewanderte Fraktionen (= lösliche Proteine) zu finden. Nach Engels (1971) erhalten die drei Haemolympf-Fraktionen ausgehend vom Start die fortlaufenden Bezeichnungen H1, H2 und H3. Bei H2 und H3 kann noch jeweils eine Auftrennung in zwei Unterbanden festgestellt werden. Da die Banden der Fraktion H2 häufig nicht gut separiert sind, wird nur die Bande H3 in H3a und H3b unterteilt ausgewertet. Die Bande H3b stellt das dotterpflichtige Haemolympf-Protein dar (Engels, 1972).

Königinnen

Im Haemolympf-Spektrum der Königin fällt der besonders hohe Titer der H3b-oder Dotterbande auf (vgl. Abb. 1). Er liegt außer bei frisch geschlüpften Jungköniginnen durchweg viel höher als der aller übrigen Protein-Fraktionen. Hierbei muß zwischen alters- und physiologisch-bedingt verschiedenen Haemolympf-Spektren unter-

schieden werden.

Bei unbegatteten Jungköniginnen (vgl. Tabelle), die noch nicht in Eilage sind, steigt in den ersten Tagen nach dem Schlüpfen der Dotterprotein-Titer und erreicht im Alter von 15 Tagen ein Maximum von 75%. Der erstaunlich hohe Anteil der Dotterprotein-Fraktion ist wohl darauf zurückzuführen, daß der normale Verbrauch durch Dottereinlagerung während der Oogenese noch nicht funktioniert und so ein Stau von Dottermaterial in der Haemolymph auftritt. Diese Proteine müssen im eigenen Fettkörper synthetisiert werden, da Jungköniginnen vor dem Begattungsflug nicht von den Arbeiterinnen gefüttert werden (Alber *et al.*, 1955).

Bei den eierlegenden Sommerköniginnen fällt der Anteil der Dotter-Fraktion in der Haemolymph bis auf 2/3 des maximalen Prozentsatzes (vgl. Abb. 1) ab. Dieses beruht offenbar auf dem extrem hohen Verbrauch durch die Vitellogenese. Der bei Jungköniginnen beobachtete Stau ist aufgehoben. Man kann den von nun an meßbaren Prozentsatz der Dotterproteine im Blut mit einem Flüssiggleichgewicht vergleichen: Die bei einer normalen Oogeneseaktivität und Eilagetätigkeit verbrauchten, nämlich über den Weg der Pinocytose ins wachsende Ei eingebauten Dotter-Proteine werden in gleichem Maße ersetzt, und zwar einmal durch Eigensynthese des Fettkörpers (Engels, 1972), und wahrscheinlich besonders durch Aufnahme von Dotterproteinen aus dem Futtersaft der Ammenbienen (Engels, 1971).

Bei eierlegenden Winterköniginnen ist die Legeleistung sehr gering. Der Titer der H3b-Bande liegt bei ihnen höher als bei den eierlegenden Sommerköniginnen und nähert sich dem Wert der Jungköniginnen. Bei den nicht eierlegenden Sommerköniginnen sowie den nicht eierlegenden Winterköniginnen liegen die Prozentwerte sogar in der gleichen Größenordnung wie bei den Jungköniginnen (vgl. Abb. 2.). Da auch bei ihnen keine Haemolymph-Proteine durch die Vitellogenese verbraucht werden, findet hier offenbar ebenfalls ein Stau des Dottermaterials bis zu einem Sättigungspunkt statt. Allgemein ist zu den Haemolymphspektren der Königinnen zu sagen, daß nur zu Anfang ihrer Imaginalzeit typisch altersabhängige Veränderungen im Banden-Muster zu beobachten sind. Bei älteren Königinnen ist nur eine Abhängigkeit vom physiologischen Zustand, d. h. von der Vitellogenese-Aktivität festzustellen.

#### Arbeiterinnen

Arbeiterinnen haben während ihres imaginalen Lebens im Bienenvolk eine Reihe verschiedener Aufgaben zu erfüllen. Die ausgeübte Tätigkeit ist stark vom jeweiligen Alter abhängig (Lindauer, 1952). Sie drückt sich besonders im physiologischen Zustand bestimmter Drüsen aus, vor allem der Hypopharynxdrüsen (= Futtersaftdrüsen) und Wachdrüsen (Kratky, 1931). Mit dem 4. Tag der Imaginalzeit setzt in der Regel die Ammentätigkeit ein, die bis zum 15. Tag, unter besonderen Bedingungen auch länger, andauert (Jung-Hoffmann, 1966). Halberstadt (1966, 1967, 1970) fand bei diskelektrophoretischen

Untersuchungen der Sekrete der Hypopharynxdrüse bei Ammenbienen im Alter von 5 bis 9 Tagen zwei spezielle Protein-Banden, die wahrscheinlich die Hauptkomponente des Weiselfuttersaftes darstellen.

Im Haemolymph-Spektrum von 3 - 15 Tage alten Arbeiterinnen tritt eine Proteinfraction auf, deren elektrophoretisches Verhalten mit der H3b-Fraktion von Königinnen übereinstimmt (vgl. Abb. 3). Offensichtlich handelt es sich bei dieser Bande auch um Dottermaterial. Möglicherweise geht es in den von der Hypopharynxdrüse produzierten Futtersaft ein, der von den Ammenbienen außer an die frische Brut auch an die Königin verfüttert wird. Diese Annahme ließe sich gut mit der von Engels (1971) aufgestellten Hypothese über den interindividuellen Proteinaustausch zwischen Ammenbienen und Königinnen in Einklang bringen.

Große Unterschiede im Titer der H3b-Bande treten bei Arbeiterinnen im Alter von 10 Tagen auf. Wenn man annimmt, daß ein hoher Anteil der H3b-Bande ein physiologisches Merkmal typischer Ammenbienen ist, so läßt sich aus diesem Befund folgendes schließen: Für die verschiedenen Tätigkeiten der Arbeiterinnen im Volk gibt es keine genau altersbegrenzten Zeiträume, sondern es handelt sich um fließende Übergänge. Der Zeitpunkt des Übergangs von der Ammen- zur Bautätigkeit einer einzelnen Arbeiterin scheint wesentlich vom allgemeinen Zustand des Volkes abhängig zu sein (vgl. Lindauer, 1962; Jung-Hoffmann, 1966). Einen klaren Hinweis für die Abhängigkeit gerade der Ammenfunktion von den Verhältnissen im Volk geben isoliert im Thermostaten gehaltene Arbeiterinnen. Solche gruppenweise in kleinen Käfigen gehaltene Bienen zeigen ein für sechs Tage alte Arbeiterinnen völlig abnormes Protein-Spektrum der Haemolympe. Bei ihnen tritt, obwohl sie eigentlich im besten Ammenalter sind, überhaupt keine H3b-Bande auf (vgl. Abb. 4). Dies ist wahrscheinlich auf das Fehlen sowohl von Brut als auch einer Königin zurückzuführen.

#### Drohnen

Bei Drohnen ist zwischen den haploiden Individuen, dem Normalfall der männlichen Geschlechtstiere, und diploiden Drohnen, einer genotypisch abweichenden, experimentell erzeugten Form männlicher Bienen, zu unterscheiden. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen weiblichen Morphen - Königinnen und Arbeiterinnen - tritt bei normalen Drohnen die H3b- oder Dotterbande nicht auf (vgl. Abb. 5). Dieser Befund überrascht nicht, da bei Insekten generell die Dotterproteine weibchen-spezifisch sind. Im übrigen haben speziell im Bienenvolk die Drohnen mit der Aufzucht von Brut nichts zu tun. Bei Flugdrohnen im Alter von 20-25 Tagen tritt allerdings eine Fraktion auf, die zwar nur einen kleinen Prozentsatz am Gesamtprotein der Haemolympe ausmacht, aber ein ähnliches elektrophoretisches Verhalten zeigt, wie die H3b-Bande.

Ziel der Untersuchung an den diploiden Drohnen ist es herauszufinden, ob das Auftreten der H3b- oder Dotterbande gesch-

lechtsabhängig ist, also als weibchen-spezifisches Merkmal nur bei Königinnen und Arbeiterinnen auftritt, oder abhängig von Ploidiegrad bzw. der Gendosis ist, also bei allen diploiden Individuen, den Königinnen, den Arbeiterinnen und auch den diploiden Drohnen, beobachtet werden kann. Bei der Analyse von Haemolymph-Proben der wenigen bisher erhaltenen diploiden Drohnen zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den haploiden Drohnen. Auch bei ihnen ist im Alter von 3-6 Tagen keine H3b-Bande nachzuweisen, während sie bei weiblichen Individuen gleichen Alters stets vorhanden ist, allerdings nur unter Normalbedingungen (vgl. Abb. 6). Anhand der vorliegenden Befunde lassen sich jedoch noch keine definierten Aussagen über die oben diskutierten zwei Möglichkeiten einer genetischen Kontrolle der Synthese der H3b-Proteine machen; denn die analysierten diploiden Drohnen befanden sich während ihrer Imaginalzeit nicht unter normalen physiologischen Bedingungen im Volk, sondern gekäfigt in kleinen Versuchsbienengruppen im Thermo-  
staten. Zur Klärung dieser Frage sind weitere Untersuchungen erforderlich.

#### Gynandromorphen

Auch die Gynandromorphen bieten Ansatzpunkte für die Prüfung der Frage, ob die Haemolymph-Fraktion H3b als geschlechtsspezifisches oder als gendosisabhängiges Merkmal anzusehen ist. Hierfür erscheinen besonders solche Gynander geeignet, bei denen weibliche und männliche Morphologie in der Körperlängsachse wechseln. Die untersuchten Gynander wurden innerhalb eines Volkes unter physiologischen Normalbedingungen gehalten und regelmäßig im Bereich des Brutnests beobachtet. Zum Zeitpunkt der Präparation waren sie 6 Tage alt, befanden sich, verglichen mit Sommer-  
Arbeiterinnen, also im Ammenalter.

Erstaunlicherweise ist bei allen untersuchten Gynandromorphen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte H3b-Bande nachzuweisen (vgl. Abb. 7). Daraus muß man unter Berücksichtigung der Drohnen-Befunde schließen, daß die untersuchten Individuen sämtlich weibliche Charaktere besitzen (vgl. Tabelle). Selbst bei gynandromorphen Bienen, deren äußere Morphologie fast ganz der eines Drohns entspricht, ist die Fraktion H3b vorhanden. Daraus ist abzuleiten, daß bei der Untersuchung von gynandromorphen Bienen weder die äußere Morphologie noch die Haemolymph-Spektren einen sicheren Schluß darüber erlauben, ob die Tiere überwiegend weibliche oder männliche Eigenschaften besitzen. Es müssen zusätzlich die innere Morphologie und insbesondere der Entwicklungszustand der endocrinen Organe und der Futtersaftdrüsen untersucht werden.

Nach meinen Befunden kann ausgesagt werden, daß es sich bei den Gynandern zumindest um potentielle Ammenbienen handelt. Verhaltensbeobachtungen von Sakagami & Takahashi (1956) und Jay & Jay (1966) haben ergeben, daß im Gegensatz zu reinen Drohnen von Gynandern teilweise durchaus bestimmte Arbeiten im Volk

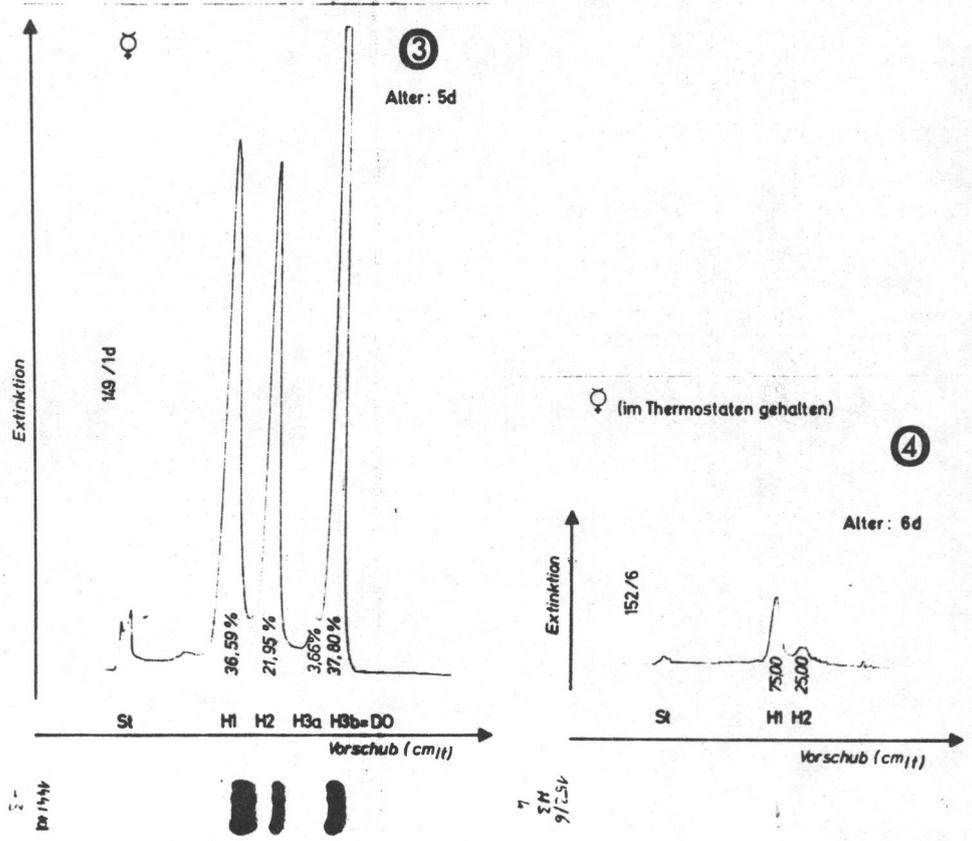
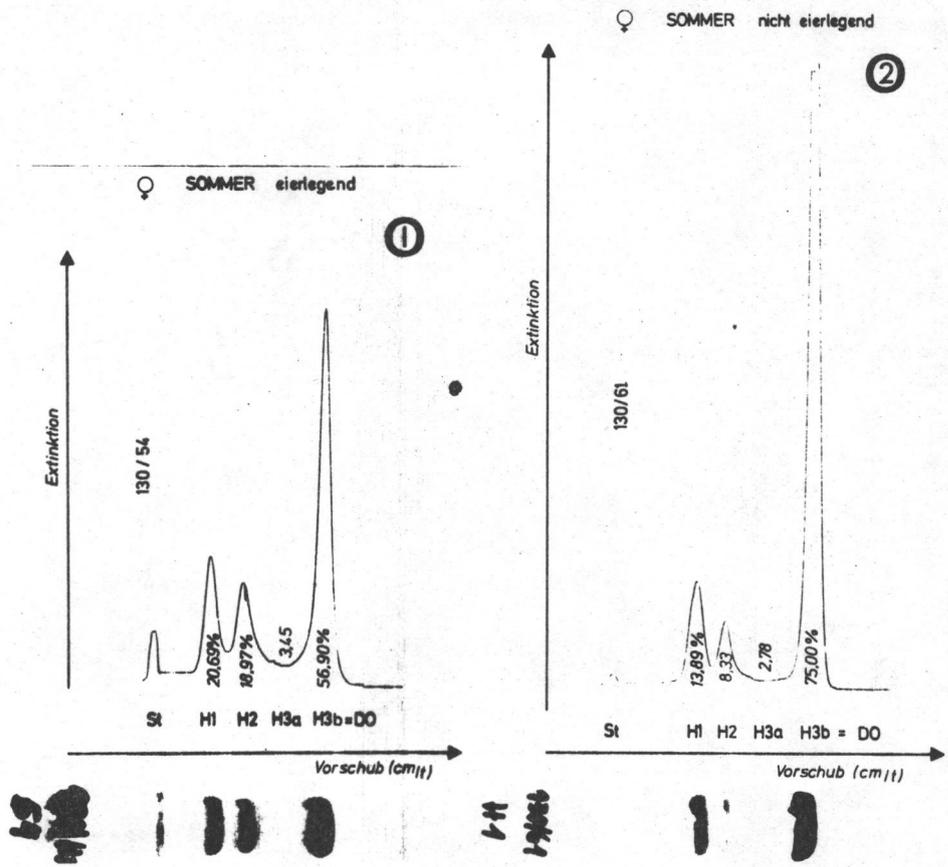
übernommen werden; so wurden z. B. Ammendienst, Baudienst, Wachdienst und auch Sammeltätigkeit registriert. Allerdings beschränken sich diese Aussagen auf Feststellungen an einer geringen Zahl von gynandromorphen Bienen.

Abschließend kann man über das Auftreten des Weibchenspezifischen Proteins in der Haemolymph bei Apis mellifica folgendes feststellen (vgl. Tabelle): Bei Königinnen ist das Weibchenspezifische Protein in jedem Alter und in allen fortpflanzungsphysiologischen Situationen vorhanden. Bei den Arbeiterinnen tritt es dagegen normalerweise nur im Ammenalter auf. Es ist also festzuhalten, daß Dotter-Proteine bei allen fortpflanzungsaktiven weiblichen Individuen des Bienenvolkes vorhanden sind. Die Gynandromorphen nehmen als weiblich-männliche Mosaiktiere eine Sonderstellung ein. Da bei ihnen die Protein-Fraktion H3b ebenfalls auftritt, sind auch sie zumindest als potentielle Ammenbienen anzusehen.

Bei haploiden Drohnen treten keine Dotter-Proteine auf. Die Frage des Vorkommens der Haemolymph-Fraktion H3b bei diploiden Drohnen muß zunächst noch ungeklärt bleiben. Daher kann auch noch keine Aussage über die genetische Basis der Synthesebedingungen dieses Proteins gemacht werden.

## Haemolymph-Protein-Spektren imaginaler Honigbienen (*Apis mellifica*)

Kasten bzw. Genotypen	Alter in d nach dem Schlupf	Anteil der Fraktionen in %			
		H1	H2	H3a	H3b
Königinnen ♀ ♀	4	12	21	1	66
Arbeiterinnen ♀ ♀	5	35	22	5	38
Gynander ♀ ♂	6	45	23	4	28
Drohnen haploid 1n ♂ ♂	5	60	33	7	0
Drohnen diploid 2n ♂ ♂	6	56	42	1	1
Arbeiterinnen (im Thermosta- ten gehalten)	6	78	22	0	0



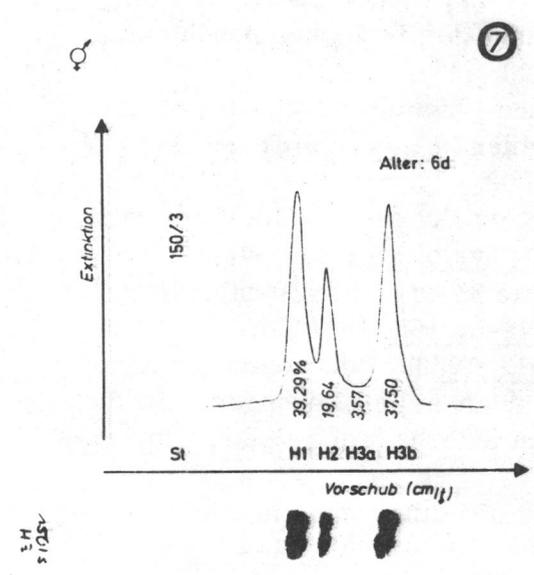
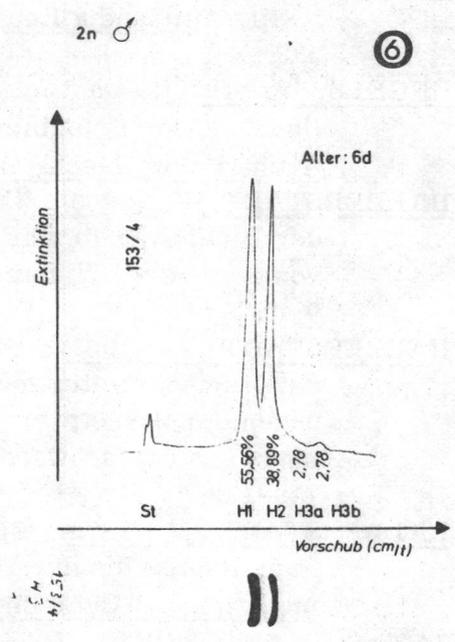
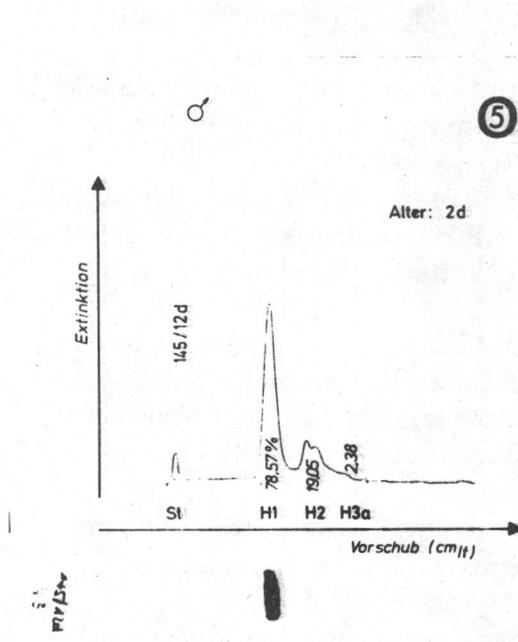


Abb. 1-7: Apis mellifica, Haemolymph-Spektren, Cello-gel-Elektropherogramme, Färbung Amidoschwarz. Jeweils unten Originale, oben Densitometer-Kurven. Verkleinert auf 2/5.

## LITERATUR

- ALBER, M. et al. (1955). Von der Paarung der Honigbiene. Z. Bienenforsch. 3: 1-28.
- DRESCHER, W. (1965). Der Einfluß von Umweltbedingungen auf die Bildung von Gynandromorphen bei der Honigbiene Apis mellifica L. Insectes Soc. 12: 201-218.
- ENGELMANN, F. (1970). The physiology of insect reproduction. Pergamon Press, Oxford.
- ENGELS, W. (1971). Herkunft der Dotter-Proteine bei Apis mellifica. XXIII. Apimondia Kongress, Moskau, Kongressberichte 439-441.
- ENGELS, W. (1972). Quantitative Untersuchungen zum Dotterprotein-Haushalt der Honigbiene (Apis mellifica). Wilhelm Roux' Arch. Enkw. Mech. Org. 171: 55-86.
- HALBERSTADT, K. (1966). Über die Proteine der Hypopharynxdrüse der Bienenarbeiterinnen. I. Elektrophoretischer Vergleich von Sommer-, Winter- und gekäfigten Bienen. Annls. Abeille 9: 153-163.
- HALBERSTADT, K. (1967). Über die Proteine der Hypopharynxdrüse der Bienenarbeiterinnen. II. Elektrophoretische Untersuchungen der Sekretproteine bei Schwarmbienen und Arbeiterinnen aus brutschwachen Völkern. Annls. Abeille 10: 119-132.
- HALBERSTADT, K. (1970). Ein Beitrag zur Ultrastruktur und zum Funktionszyklus der Pharynxdrüse der Honigbiene (Apis mellifica L.) Cytobiol. 2: 341-358.
- JAY, S.C. & JAY, D.H. (1966). A behavioural study of a gynandromorphic honeybee. Can. Ent. 98: 170-174.
- JUNG-HOFFMANN, I. (1966). Die Determination von Königin und Arbeiterin der Honigbiene (Ein Vergleich der Brutpflegemaßnahmen und der Herkunft der Futterkomponenten). Z. Bienenforsch. 8: 296-322.
- KRATKY, E. (1931). Morphologie und Physiologie der Drüsen in Kopf und Thorax der Honigbiene (Apis mellifica L.). Z. wiss. Zool. 139: 120-2000
- LINDAUER, M. (1952). Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. Z. vergl. Physiol. 34: 299-345.
- PAN, M.L. et al. (1969). Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. Science, Wash. 165: 393-394.
- SAKAGAMI, S.F. & TAKAHASHI, H. (1956). Beobachtungen über die gynandromorphen Honigbienen, mit besonderer Berücksichtigung ihrer Handlungen innerhalb des Volkes. Insectes Soc. 3: 513-529.
- WOYKE, J. (1962). The hatchability of 'lethal' eggs in two sex-allele fraternity of honeybees. J. Apicult. Res. 1: 6-13.
- WOYKE, J. (1963). Drone larvae from fertilized eggs of the honeybee. J. Apicult. Res. 2: 19-24.

- WOYKE, J. (1963). Rearing and viability of diploid drone larvae. J. Apicult. Res. 2: 77-84.
- WOYKE, J. (1965). Genetic proof of the origin of drones from fertilized eggs of ten honeybees. J. Apicult. Res. 4: 7-11.
- WOYKE, J. (1965). Study of the comparative viability of diploid and haploid larval drone honeybees. J. Apicult. Res. 4: 12-16.
- WOYKE, J. (1965). Do honeybees eat diploid drone larvae because they are in worker cells? J. Apicult. Res. 4: 65-70.
- WOYKE, J. (1969). A method of rearing diploid drones in a honeybee colony. J. Apicult. Res. 8: 65-74.
- WOYKE, J. (1969). Rearing diploid drones on royal jelly or bee milk. J. Apicult. Res. 8: 169-173.