

## IMMUNOLOGISCHER VERGLEICH DER HAEMOLYMPH-PROTEINE DER 4 REZENTEN APIS-ARTEN MELLIFICA, CERANA, FLOREA UND DORSATA

Annemarie Hagmeister, Zool. Institut der Universität Münster/Westf.,  
Deutschland

### EINLEITUNG:

Aussagen über den Verwandtschaftsgrad der 4 rezenten Arten von Honigbienen der Gattung Apis sind bisher vor allem aufgrund verhaltensphysiologischer, brutbiologischer und cytologischer Vergleiche gemacht worden. Danach ist eine Einteilung der 4 Arten in zwei Gruppen möglich: Zur ersten, die mit  $2n = 16$  Chromosomen in Keimbahnzellen von ♀♀ und  $n = 8$  bei ♂♂ (Deodikar, Thakar, Shah, 1958; Deodikar und Thakar, 1966) als diploide Gruppe bezeichnet wird, gehören Apis dorsata und Apis florea. Beide Arten bauen nur eine einzige, im Freien hängende und damit dem Licht ausgesetzte Wabe. Sie tanzen nur bei direkter Sicht auf die Sonne oder blauen Himmel (Lindauer, 1956). Die zweite Gruppe, die mit einem Chromosomensatz von  $2n = 32$  bei ♀♀ und  $n = 16$  bei ♂♂ offenbar tetraploid ist (Nachtsheim, 1913; Sanderson u. Hall, 1948; Sharma et al. 1961), besteht aus Apis mellifica und Apis cerana. Beide Arten legen ein Nest aus mehreren, parallel angeordneten Waben an. Sie nisten stets in Höhlen und tanzen damit in der Regel ohne Sonnensicht. Dabei transponieren sie Sonnen- in Schwerkraftrichtung (Von Frisch, 1969), besitzen also ein kompliziertes Kommunikationsverhalten (Lindauer, 1956). Als Gradmesser für phylogenetische Beziehungen sind proteinchemische Übereinstimmungen bzw. Unterschiede besonders geeignet. Hierfür bieten sich neben bestimmten Enzymen vor allem die Serumproteine an. Eine erste vergleichende Analyse der Haemolymp- Proteine der 4 Apis-Arten führte Schabacker (1973) durch. Er fand ein bei allen prinzipiell übereinstimmendes Muster von 3 Hauptfraktionen, die bei Apis mellifica von Engels (1972) als H1, H2 und H3 beschrieben wurden. Das dotterpflichtige Material wird dabei durch die Unterbande H3b repräsentiert. Im einzelnen beschreibt Schabacker eine weitgehende Übereinstimmung der Haemolymp-Spektren von Apis cerana mit mellifica. Bei dorsata besitzt die Dotterfraktion eine hiervon stark abweichende elektrophoretische Mobilität. Die übrigen Banden weisen bei florea die grössten Unterschiede im Vergleich zu mellifica auf. Aufgrund eines bei ♂♂ von florea durchweg festgestellten hohen Titers der Fraktion H3b kommt Schabacker zu dem Schluss, dass bei dieser Art der weibliche Kastendimorphismus am wenigsten ausgeprägt ist und sie daher die stammesgeschichtlich ursprünglichste Stellung im Genus Apis einnimmt. Während elektrophoretische Eigenschaften vorwiegend auf der Ladung von Protein-molekülen beruhen, gibt ihr Antigenverhalten weitergehenden Aufschluss über strukturelle Unterschiede. Es wurden daher immunologische Vergleichsuntersuchungen zwischen den 4 Apis-Arten anhand von Haemolymp-Proben durchgeführt.

### MATERIAL UND METHODEN

Versuchstiere: Lebende Arbeiterinnen von Apis florea aus Kustan, Iran, und teilweise auch aus Ceylon. Apis dorsata aus Ceylon, Apis cerana aus Afghanistan, von Apis mellifica carnica-Hybriden.

Testseren wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit mellifica-♂♂-Total-Haemolymphe gewonnen. Das bedeutet also, dass in den vorliegenden Untersuchungen nur solche Antigene der Haemolymphe von Apis cerana, Apis dorsata und Apis florea überhaupt erfasst werden, die in ihrer immunchemischen Spezifität denen von Apis mellifica zumindest noch ähnlich sind.

Die Haemolymp-Proteine der 4 Arten wurden ausser in Immundiffusions-tests nach Ouchterlony vor allem in immunoelektrophoretischen Identitätstests nach Williams u. Wemyss verglichen.

#### Ergebnisse:

Bei der Immunelektrophorese von Apis mellifica ♂♂-Haemolymphe gegen Anti-mellifica-♂♂-Total-Haemolymp-Serum treten 3 Hauptpräzipitationsbögen auf, die den quantitativ stärksten Proteinfraktionen entsprechen. Verwendet man als Probe Ammen-Haemolymphe, so diminiert das Präzipitat der weibchen-spezifischen Dotterproteine (Bande H3b).

Das Präzipitationsmuster, das die Haemolymphe von ♂♂ von Apis cerana mit dem Anti-Apis mellifica ♂♂-Total-Haemolymp-Serum bildet, gleicht dem mit Apis mellifica-Proben fast völlig (Abb. 1). Sowohl die Anzahl der Bögen als auch die elektrophoretischen Eigenschaften der Fraktionen sind identisch. Ausserdem weisen alle in der Haemolymphe von Apis cerana vorkommenden Proteine eine weitgehende immunchemische Übereinstimmung mit den Haemolymp-Proteinen von Apis mellifica auf, denn es sind keine Spornbildungen an den Bogenenden zu beobachten. Nur die Dotterproteine scheinen bei den beiden Arten nicht mehr völlig identisch zu sein, wie es sowohl die Immunelektrophorese als auch der Ouchterlony-Test erkennen lassen (Abb. 1; 4a und b).

Die Haemolymp-Proteine von Apis dorsata weichen dagegen in stärkerer Masse von denen bei Apis mellifica vorhandenen ab (Abb. 2). Zwar treten hier in gleicher Weise wie bei Apis mellifica H1, H2 und H3b als Hauptpräzipitate auf, ihre elektrophoretischen Eigenschaften sind aber andere: während die Laufweiten der H2-Proteine beider Arten noch übereinstimmen, ist die Fraktion H1 der dorsata-Haemolymphe gegenüber der entsprechenden mellifica-Bande zur Anode hin verschoben. Die Laufweite der dorsata-Fraktion H3b ist im Vergleich mit der von mellifica kürzer. Interessanterweise gehen diese elektrophoretischen Laufweitenunterschiede einher mit einer nur noch immunologischen Teilidentität der H1- und H3b-Proteine beider Arten. In beiden Fällen wird beim Verschmelzen der entsprechenden Präzipitationslinien sowohl im Ouchterlony-Test als auch im immunoelektrophoretischen Identitätstest ein deutlicher Sporn ausgebildet (Abb. 2; 4a und b); dies belegt die nicht mehr vollständige proteinchemische Identität der artspezifischen Haemolymp-Fraktionen.

Die Haemolymp-Proteine von Apis florea weichen am stärksten von denen von Apis mellifica ab (Abb 3). Ähnlich wie die von dorsata besitzen sie eine andere elektrophoretische Mobilität. Vom

Start aus zur Anode präzipitieren die Antigene im Agarose-Gel in der Reihenfolge H2, H1 und H3b. Ausserdem ist bei der Dotter-fraktion wiederum ein besonders auffälliger proteinchemischer Unterschied im Probenmaterial beider Arten festzustellen. Wie Spornbildungen zeigen, ist auch die H1-Fraktion von florea mit der von mellifica nur teildentisch (Abb. 3; 4a und b).

#### Diskussion

Aus den immunologischen Vergleichen der Haemolymph-Proteine der 4 Apis-Arten ist also zu entnehmen, dass florea gegenüber mellifica die grössten proteinchemischen Unterschiede aufweist. Es folgen dorsata und schliesslich cerana, deren Haemolymph-Spektrum und Antigen-Eigenschaften nur geringfügig von mellifica abweichen. Die immunologischen Befunde bestätigen damit die elektrophoretischen Daten von Schabacker (1973). Auch auf der Basis noch vorhandener Identität der artspezifischen Haemolymph-Fraktionen in Bezug auf ihre Antigen-Eigenschaften bei Reaktion mit einem gegen mellifica-Proteine gerichteten Antikörper-Serum muss eine Gruppierung der Gattung in zwei Arten-Kreise vorgenommen werden: Die beiden Haus-Honigbienen mellifica und cerana einerseits, deren Haemolymph-Proteine sich immunchemisch noch fast vollkommen identisch verhalten. Meine Immuntests bestätigen damit die von vielen Autoren (vgl. Friese 1923; Ruttner und Kaissling, 1968; Morse, 1969) immer wieder betonte nahe Verwandtschaft dieser beiden Arten, von denen cerana früher gelegentlich nur als Sub-spezies indica von mellifica gesehen wurde. Phylogenetisch etwas entfernter stehen die auch unter sich stärker verschiedenen Arten dorsata und florea; da die letztere in den proteinchemischen Eigenschaften der einzelnen Haemolymph-Komponenten am stärksten von mellifica abweicht, dürfte es als sicher anzusehen sein, dass die kleinste Art florea unter rezenten Honigbienen den ursprünglichsten Status bewahrt hat. Die immunologischen Vergleiche stehen damit in voller Übereinstimmung mit der einleitend zitierten übrigen Literatur.

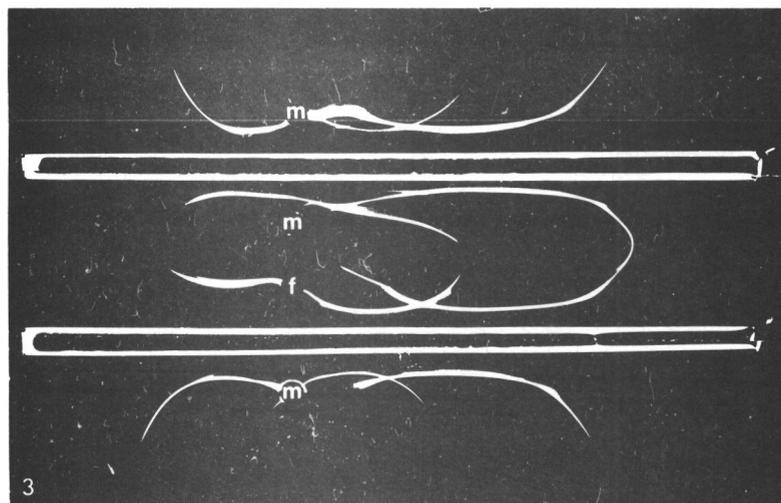
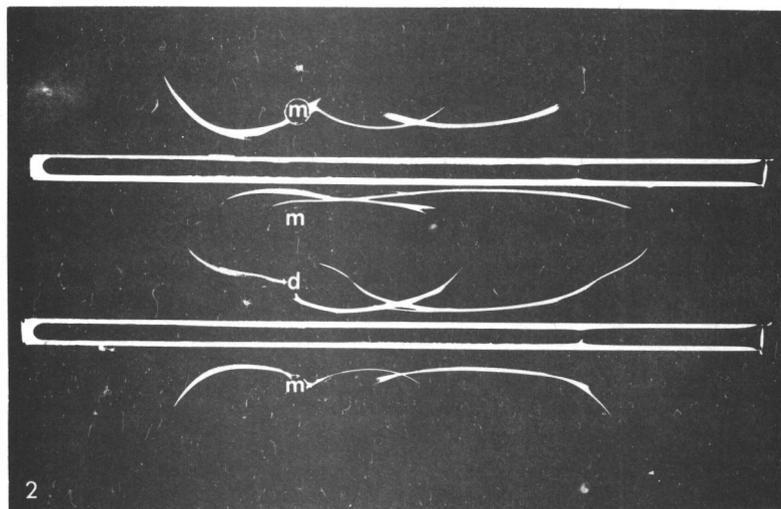
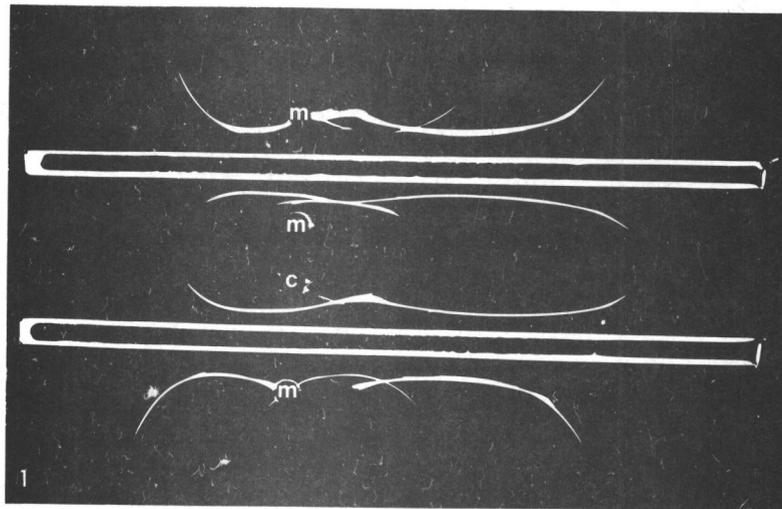


Abb. 1 - 3: Immunelektrophoretischer Vergleich der Haemolymph-Proteine von *Apis mellifica* (m) mit *cerana* (c) Abb. 1, *dorsata* (d) Abb. 2 und *florea* (f) Abb. 3.  
 Serum: Anti-*Apis mellifica* ♂-Total-Haemolymph-Serum, Trägermaterial Agarose, native Präparate, Originalgröße.

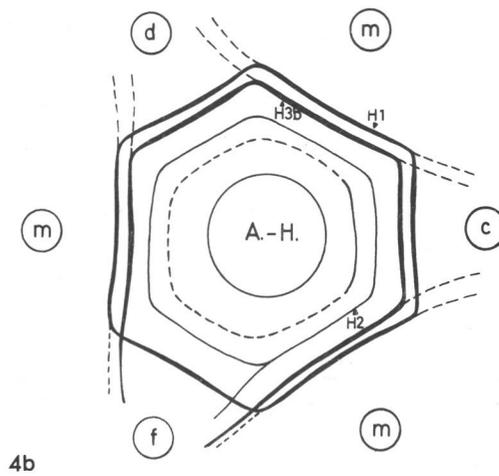
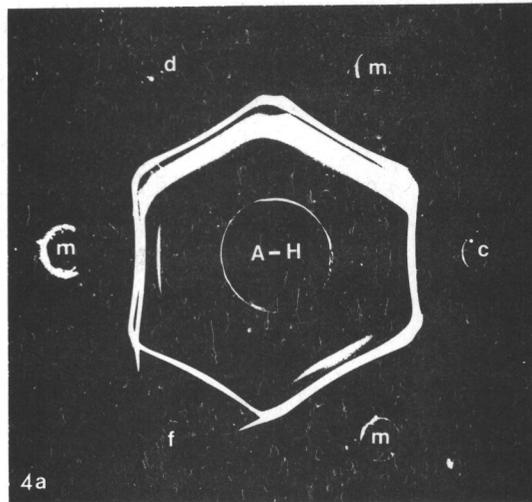


Abb. 4: Immundiffusionstest der Haemolymph-Proteine von *Apis mellifica* (m), *Apis cerana* (c), *Apis dorsata* (d) und *Apis florea* (f) gegen Anti-*Apis mellifica* -Total-Haemolymph-Serum (A.-H.).  
 a) Trägermaterial Agarose, Nativ-Präparat, 2-fachvergrössert, b) Schemazeichnung von (a).

## LITERATUR

- DEODIKAR, G.B., THAKAR, C.V., SHAH, P.N. (1958). Cyto-genetic studies in Indian honeybees. I. Somatic chromosome complement in Apis indica and its bearing on evolution and phylogeny. Proc. Indian Acad. Sci. B. XLIX, 194-207.
- DEODIKAR, G.B., THAKAR, C.V., (1966). Cyto-genetics of Indian honeybees and bearing on taxonomic and breeding problems. Ind. J. Genet. Pl. Breed 26A: 386-393.
- FRIESE, H. (1923). Die europäischen Bienen (Apidae). Das Leben und Wirken unserer Blumenwespen. De Gruyter, Berlin u. Leipzig, 456 S. R 69.
- FRISCH, K. von (1967). Tanzsprache und Orientierung der Bienen. Springer-Verlag, Berlin, 578 S.
- LINDAUER, M. (1956). Über die Verständigung bei indischen Bienen. Z. vergl. Physiol. 34: 299-345.
- MORSE, R.A. (1969). The Biology of Apis dorsata in the Philippines. Proc. VI Congr. IUSSI, Bern.
- NACHTSHEIM, H. (1913). Cytologische Studien über die Geschlechtsbestimmung der Honigbiene (Apis mellifica, L). 9, Arch. Zellforsch. 11: 170-239.
- RUTTNER, F., KAISLING, K.E. (1968). Über die interspezifische Wirkung des Sexuallockstoffes von Apis mellifica und Apis cerana. Z. vergl. Physiol. 59: 362-370.
- SANDERSON, A.R., HALL, D.W. (1948). The cytology of the honey bees Apis mellifica L. Nature, Lond. 162: 34-35.
- SCHABACKER, H. (1973). Haemolymph-Proteine und Oogenese-Aktivität der 4 rezenten Honigbienen-Arten der Gattung Apis. Staatsexamensarbeit, Münster.
- SHARMA, G.P., GUPTA, B.L., KUMBKARNI, C.G. (1961). XXVII. Cytology of Spermatogenesis in the honey-bee, Apis indica (F). Jl. R. microsc. Soc., 79: 337-351.