

ENZYMELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ANALYSE DER VERWANDTSCHAFTSGRADE ZWISCHEN HUMMEL- UND SCHMAROTZERHUMMELARTEN (*APIDAE, BOMBINI*)

Elsa OBRECHT und Adolf SCHOLL

Zoologisches Institut der Universität Bern (1)

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Gattungen *Bombus* und *Psithyrus* mittels Enzymelektrophorese untersucht. Im Vordergrund steht die Frage, ob sich Hinweise auf einen mono- oder polyphyletischen Ursprung der Gattung *Psithyrus* erbringen lassen. Untersucht werden neun europäische *Psithyrus*-Arten aus fünf Subgenera, sowie zwölf europäische *Bombus*-Arten aus drei Subgenera.

Das Elektrophoresemuster der zehn untersuchten Enzyme weist eine hohe Artkonstanz und Artspezifität auf. Beim zwischenartlichen Vergleich ergibt sich ein hoher Grad an Übereinstimmungen bei *Bombus*- und *Psithyrus*-Arten des gleichen Subgenus, hingegen deutliche Differenzen beim Vergleich von Arten verschiedener Subgenera.

In der Gattung *Psithyrus* nimmt *P. rupestris* nach seinem Enzymmuster eine sehr isolierte Stellung ein. Die anderen *Psithyrus*-Arten zeigen bemerkenswerte Affinitäten zueinander und zu den beiden Arten des Subgenus *Bombus*, *B. terrestris* und *B. lucorum*.

EINLEITUNG

Die Hummeln werden systematisch in zwei Gattungen eingeteilt; die Gattung *Bombus* umfasst die sozial lebenden Hummeln, die Gattung *Psithyrus* die Schmarotzer- oder Kuckuckshummeln. Die Frage nach dem Ursprung der Gattung *Psithyrus* beschäftigt die Systematiker seit langem. Unumstritten ist, dass sie aus der Gattung *Bombus* entstanden sein muss. Ob aber mehrere Entwicklungslinien zu einer polyphyletischen Gruppe geführt haben, oder ob die Gattung *Psithyrus* monophyletisch entstanden ist, ist ungeklärt. 1927 stellte RICHARDS eine Liste von 27 morphologischen Merkmalen zusammen, die allen *Psithyrus*-Arten gemein sind, bei *Bombus* aber fehlen.

(1) Sahlstrasse 8, CH-3012 Bern (Schweiz).

Acht dieser Merkmale liessen sich nicht als Anpassung an die parasitische Lebensweise erklären. Dies würde auf eine monophyletische Entwicklung hindeuten. Zu dieser Ansicht kamen auch GASCHOTT (1922) und MILLIRON (1971) durch vergleichende Untersuchungen der männlichen Genitalien.

Als Argument für eine polyphyletische Entstehung wertete RICHARDS die Tendenz einiger Hummelarten (*B. terrestris*, *B. lapidarius*), keine eigene Kolonie zu gründen, sondern in bereits bestehende Nester der gleichen oder einer nahe verwandten Art einzudringen. Dieser Parasitismus ist fakultativ und temporär. Nach RICHARDS könnte er dort stabil werden, wo sich die parasitierende Art ihrer nördlichen Verbreitungsgrenze nähert und deshalb relativ später im Frühling erscheint, als die Wirtsart, die den örtlichen Klimaverhältnissen besser angepasst ist. Die Befunde von REINIG (1935), wonach eine *Psithyrus*-Art selten die nördliche Verbreitungsgrenze ihres Wirts erreicht, scheinen RICHARDS' Ansicht zu unterstützen.

In der neueren Literatur (MILLIRON und OLIVER, 1966 und RICHARDS, 1973), wird mehrfach berichtet, dass die Hummelart *B. hyperboreus* im nördlichen Kanada ganz zur parasitischen Lebensweise übergegangen ist. Sie befällt Nester der nahe verwandten Art *B. arcticus*. YARROW (1970) vermutet, dass auch die sehr seltene alpine Art *B. inexpectatus* ein obligater Parasit in Nestern von *B. ruderarius* ist. Als weiteres Argument für den polyphyletischen Ursprung der Schmarotzerhummeln gilt die oft vertretene Ansicht (PLATH; 1922, REINIG, 1935), dass eine *Psithyrus*-Art meist an einen ganz bestimmten Wirt, oder eine nahe verwandte Gruppe von Wirtsarten angepasst ist, denen sie in der Färbung oft täuschend ähnlich sieht.

Neuerdings ist das *Psithyrus*-Problem unter Verwendung biochemischer Methoden, insbesondere der Enzymelektrophorese, wieder aufgegriffen worden. Bei dieser Methode wird die elektrophoretische Mobilität funktionsidentischer Enzyme verschiedener Tierspecies verglichen. Aus Mobilitätsdifferenzen sind Rückschlüsse auf genetische Veränderungen an den Enzymloci möglich. Die hier betrachtete genetische Variabilität unterliegt allenfalls nur einem äusserst geringen Selektionsdruck. Aus den Elektrophoresebefunden kann deshalb auf den Grad der genetischen Verwandtschaft geschlossen werden.

Untersuchungen von FINK *et al.* (1970), sowie STEPHEN und CHELDELIN (1973) an α -Glycerophosphat-Dehydrogenasen bei verschiedenen *Bombus*- und vier amerikanischen *Psithyrus*-Arten führten zu Ergebnissen, die auf einen monophyletischen Ursprung der untersuchten Schmarotzerhummelarten hinweisen (1). In der mitteleuropäi-

(1) Inzwischen sind von PEKKARINEN (1979), sowie PEKKARINEN *et al.* (1979) elektrophoretische Untersuchungen über Verwandtschaftsbeziehungen bei nordeuropäischen Hummeln und Schmarotzerhummeln durchgeführt worden, die vor allem bei den sozialen Hummeln Widersprüche zur systematischen Gliederung der Gattung ergeben haben. Gegen das methodische Vorgehen der Autoren müssen jedoch Einwände vorgebracht werden, da viele Enzyme nicht bei allen Arten untersucht worden sind. Die in paarweisem Artvergleich berechneten Koeffizienten genetischer Ähnlichkeit beziehen sich demnach vielfach auf sehr verschiedene Enzymstichproben. Es ist aber bekannt, dass der Ähnlichkeitskoeffizient entscheidend durch die Auswahl der Enzyme beeinflusst sein kann, besonders wenn nur kleine Enzymstichproben untersucht werden. Aus den Primärbefunden der Autoren ist ersichtlich, dass einzelne Enzyme bei allen Arten identische Mobilität ergeben haben, andere Enzyme dagegen weisen eine hohe interspezifische Variabilität auf. Die Koeffizienten sind deshalb nur vergleichbar, solange sie aus der gleichen Enzymstichprobe berechnet werden.

sehen Hummelfauna sind *Psithyrus*-Arten aus enzymatisch bisher nicht untersuchten Subgenera vertreten. Im vorliegenden Beitrag sollen deshalb Befunde an mitteleuropäischen *Bombus*- und *Psithyrus*-Arten dargelegt werden, die sich zudem auf eine grössere Enzymstichprobe beziehen.

MATERIAL UND METHODEN

1. Ausgangsmaterial

Die zwölf untersuchten *Bombus*-Arten aus drei Subgenera und die neun *Psithyrus*-Arten aus fünf Subgenera sind in Tabelle 1 nach Fundorten zusammengestellt. Die wichtigsten Fanggebiete waren die Umgebung von Bern, die Grosse Scheidegg bei Grindelwald (Berner Oberland), die Lötschberg-Südrampe (Wallis) und die Umgebung des Hochmoores bei Le Cachot (Neuenburger Jura). Die Artbestimmung erfolgte vorwiegend nach den Schlüsseln von SCHMIEDEKNECHT (1930), KRÜGER (in SCHMIEDEKNECHT, 1930) und FREY-GESSNER (1899-1907). Die Nomenklatur folgt LØKEN (1975) und RICHARDS (1968) für *Bombus* und REINIG (1935) für *Psithyrus*. Die Hummeln wurden mit Honigwasser gefüttert und bis zur biochemischen Untersuchung im Kühlschrank bei ca 7 °C gehalten. Ausländisches Material wurde in flüssigem Stickstoff transportiert und im Tiefkühlschrank bei -30 °C gelagert. Kontrollversuche hatten ergeben, dass das Einfrieren keinen Einfluss auf die Mobilität der untersuchten Enzyme hat, jedoch wurde bei einzelnen Enzymen (EST, HK-1, ACON) eine Abnahme der Aktivität festgestellt.

2. Elektrophorese

Die elektrophoretischen Untersuchungen wurden unter Verwendung von Standardmethoden durchgeführt, die an anderer Stelle (SCHOLL *et al.*, 1978) ausführlich beschrieben worden sind. Ausgangsmaterial für die elektrophoretischen Untersuchungen bildeten Homogenate von Geweben einzelner Tiere. Es wurden einerseits Flügelmuskulatur und ferner die Weichteile des Abdomens jeweils in zehnfachem Volumen Tris-Puffer (0,1 M, pH 8,0) homogenisiert. Aus den Homogenaten wurden durch Zentrifugation partikelfreie Überstandsfraktionen gewonnen. Für die Elektrophorese der Enzyme wurden in der Regel die Abdomenextrakte verwendet, die Enzyme HK-3 und GPT jedoch liessen sich nur in Extrakten der Flügelmuskulatur einwandfrei darstellen.

Die untersuchten Enzyme und die verwendeten Abkürzungen werden nachfolgend genannt. Hinter den Enzymen wird in Klammern jeweils das zur Auftrennung verwendete Puffersystem angeführt (TC = Tris-Citrat-Puffer, TBE = Tris-Borat-EDTA-Puffer, beide Puffersysteme sind bei SCHOLL *et al.*, 1978 beschrieben). Die spezifischen Färbemedien für die Darstellung der Enzyme werden nur erwähnt, sofern sie an früherer Stelle (SCHOLL *et al.*, 1978) nicht beschrieben worden sind, oder von den dort publizierten Methoden abweichen.

Arginin Phosphokinase, APK (TC-Puffer, die zur Enzymdarstellung notwendigen Reagentien wurden in ein Agargel eingegossen, welches über das Trenngel geschichtet wurde. Herstellung : 400 mg Reinagar und 240 mg L-Arginin-monohydrochlorid wurden in 40 ml H₂O gelöst und zum Sieden erhitzt. Nach Erkalten des Agars auf 50-45 °C wurden beigegeben : 10 mg Phosphoenolpyruvat, 40 mg ATP, 20 mg NADH₂, 10 I.U. Pyruvat-Kinase und 25 I.U. Laktat-Dehydrogenase, gelöst in 5 ml Glycinpuffer, 1,52 M Glycin, 42 mM MgCl₂ · 6 H₂O, pH mit 5 n NaOH auf 9,0 eingestellt. Die Zonen mit APK-Aktivität wurden unter einer UV-Lampe, 350 nm, ausgewertet.) — β -Hydroxy-Butyrat Dehydrogenase, BDH (TC-Puffer, Enzymdarstellung nach McKECHNIE, EHRlich und WHITE, 1975). — Hexokinase, HK (TC-Puffer, Enzymdarstellung nach BREWER, 1970. Modifikation : die zur Enzymdarstellung notwendigen Reagentien wurden in ein Agargel eingegossen). — Phosphoglucose Isomerase, PGI (TBE-Puffer). — Phospho-Glucomutase, PGM (TC-Puffer). — Aconitase, ACON (TC-Puffer, Enzymdarstellung nach HARRIS und HOPKINSON, 1976). — Isocitrat Dehydrogenase, IDH (TC-Puffer, Enzymdarstellung nach SCHOLL *et al.*, 1978, jedoch wurden die zur Enzymdarstellung notwendigen Reagentien in ein Agargel eingegossen, die

TAB. 1. — Zusammenstellung der untersuchten *Bombus*- und *Psithyrus*-Arten nach Fundorten.
 TABL. 1. — Classification of the *Bombus* and *Psithyrus* species studied according to their sampling place.

	Küttelkoten bei Solothurn	Umgebung von Bern	Gr. Scheidegg b. Grindelwald	Lötschberg- Südrampe (Wallis)	Le Cachot (Neuenburger Jura)	Schweiz	Nord- deutschland	Irland	Pyrenäen	♀	♂	total
<i>Bombus</i>												
Subg. <i>Bombus</i>												
<i>terrestris</i>	38	32	1	1	1	4	1	3	3	19	48	79
<i>lucorum</i>	3	52	5			4	4	4	4	15	44	69
Subg. <i>Pyrobombus</i>												
<i>hypnorum</i>	1	17	1							3	10	19
<i>pratensis</i>	8	20	8	1	1	3	3	1	1	20	17	44
<i>jonellus</i>			9							1	5	9
<i>pyrenaeus</i>			11							3	3	11
<i>lapponicus</i>			6							1	4	6
Subg. <i>Thoracobombus</i>												
<i>pascuorum</i>	8	27	4	8	5	9	2	4	4	21	27	59
<i>humilis</i>	9	1				1	1	2	2	8	9	21
<i>veteranus</i>	6			5			2			1	3	7
<i>sylvanum</i>				1	4					7	3	10
<i>rudeticus</i>										11	3	14
<i>Psithyrus</i>												
Subg. <i>Psithyrus</i>												
<i>rupestris</i>				1		1				2		2
Subg. <i>Fernaldaepsithyrus</i>												
<i>meridionalis</i>			2							2		2
<i>sylvestris</i>		38	5		1	1	1	1	1	17	30	47
<i>flavidus</i>			8							3	5	8
<i>norvegicus</i>		8				1				6	5	9
Subg. <i>Asithonipsithyrus</i>												
<i>vestalis</i>				1						1		1
<i>bohemicus</i>		8						1	1	5	4	9
Subg. <i>Metapsithyrus</i>												
<i>campestris</i>		10						1	1	5	6	11
Subg. <i>Allopsithyrus</i>												
<i>barbutellus</i>		5	2	2	2	1	1	1	1	8	5	13

NADP-Konzentration wurde um 50 % erhöht). — Glutamat-Pyruvat-Transaminase, GPT (TC-Puffer, Enzymdarstellung nach HARRIS und HOPKINSON, 1976. Modifikation : die NADH_2 -Konzentration wurde verfünffacht, die LDH-Konzentration verdoppelt). — Esterasen, EST (TC-Puffer, Enzymdarstellung nach SHAW und PRASAD, 1969).

3. Auswertung der Primärbefunde

Der Grad der zwischenartlichen Übereinstimmungen der Elektrophoresemuster der Enzyme wurde quantifiziert, indem in paarweisem Artvergleich der Anteil elektrophoretisch identischer Enzyme berechnet wurde. Dieser Koeffizient diente als Matrix für die Konstruktion eines Dendrogramms durch Clusteranalyse (siehe FERGUSON, 1979).

ERGEBNISSE

Die elektrophoretische Analyse von Enzymen erwies sich bei den Hummeln als unerwartet schwierig. Trotz der Verwendung verschiedenster Puffersysteme bei der Auftrennung und zahlreicher Modifikationen von Standard-Färbemedien bei der Enzymdarstellung liessen sich viele Enzyme nicht bei allen untersuchten Arten klar auftrennen und darstellen. Es kann deshalb nur eine kleine Enzymstichprobe ausgewertet werden. Diese methodischen Schwierigkeiten haben sich offensichtlich auch bei andern Autoren (PEKKARINEN, 1979, PEKKARINEN *et al.*, 1979) ergeben.

APK, BDH, PGI, PGM, ACON und GPT wurden jeweils als eine Enzymbande aufgelöst, welche bei Individuen der gleichen Art Mobilitätsidentität ergeben hat mit Ausnahme von sehr seltenen Polymorphismen. Diese traten auf bei der PGI von *B. pratorum*, bei der PGM von *P. sylvestris* und *B. lucorum* sowie bei der ACON von *P. sylvestris* und *B. pascuorum*. Während bei den meisten Arten jeweils nur ein Tier mit aberrantem Enzymphänotyp festgestellt wurde, war der Polymorphismus der PGM von *B. lucorum* häufiger, es traten je drei Tiere aus schweizerischen und norddeutschen Populationen sowie ein Tier aus den Pyrenäen mit aberrantem Enzymphänotyp auf. Im interspezifischen Vergleich hat sich bei APK und BDH bei allen untersuchten Arten die gleiche Mobilität ergeben, bei PGI, PGM, ACON und GPT wurden dagegen mehrere Elektrophoresevarianten (Elektromorphen) festgestellt.

Die Hexokinase-Zymogramme zeigten in mehreren Zonen des anodischen Teiles des Gels Enzymaktivität. Bei allen Arten trat eine Enzymbande mit hoher anodischer Mobilität (HK-1) sowie eine Enzymbande in der Nähe der Auftragsstelle (HK-3) auf, welche scharf begrenzt waren. Es war ferner im mittleren Teil des Gels ein diffuser Farbniederschlag festzustellen, diese Enzymzone konnte nicht ausgewertet werden, weil sie nie klar begrenzt auftrat. Wir vermuten, dass es sich bei HK-1 und HK-3 um zwei genetisch unabhängige Isoenzyme handelt, denn die beiden Enzyme variierten in ihrer Mobilität bei den untersuchten Arten unabhängig voneinander.

IDH- und EST-Zymogramme ergaben stets eine Schar von Enzymbanden, welche in anodischer Richtung in ihrer Aktivität abnahmen. Bei Individuen der gleichen Art

hatten alle Banden stets gleiche Mobilität, mit Ausnahme von seltenen Polymorphismen bei EST. Dort wurden einzelne Tiere der Arten *P. flavidus*, *B. terrestris*, *B. lucorum*, *B. hypnorum* und *B. pratorum* mit aberrantem Enzymphänotyp beobachtet. Beide Enzyme haben beim Vergleich der Arten häufig Mobilitätsdifferenzen erkennen lassen, besonders EST ist interspezifisch sehr variabel, denn nur die drei *Psithyrus*-Arten *P. meridionalis*, *P. sylvestris* und *P. flavidus* unterschieden sich nicht. Vermutlich werden die IDH- und EST-Enzymbanden jeweils nur von einem Enzymlocus determiniert, denn im Gegensatz zu den Hexokinase-Isoenzymen verhielten sich die IDH- und EST-Isoenzyme nicht unabhängig voneinander. Wenn sich im interspezifischen Vergleich Differenzen ergaben, so war jeweils die gesamte Bandenschar parallel verschoben.

Um das Elektrophoresemuster der untersuchten Enzyme bei den untersuchten Hummel- und Schmarotzerhummel-Arten vergleichen zu können, haben wir in Abbildung 1 die gefundenen Elektromorphen der Enzyme in Form von Symbolen dargestellt. Die Wahl der Symbole erfolgte nach dem Gesichtspunkt, dass sich die gefundenen Übereinstimmungen innerhalb der Subgenera deutlich hervorheben. Alle Arten, welche sich in der Mobilität eines Enzyms als identisch erwiesen haben, tragen bei diesem Enzym das gleiche Symbol. Wo ein Symbol fehlt, kennzeichnet dies, dass die betreffende Elektrophoresevariante des Enzyms nur bei dieser Art aufgetreten ist. Bei *P. vestalis* konnten APK, BDH und HK-3 nicht untersucht werden, diese drei Enzyme sind deshalb in Abbildung 1 durch einen Strich bei *P. vestalis* gekennzeichnet.

Bei der Betrachtung der Abb. 1 fällt auf, dass ein bestimmtes Enzymmuster nie bei zwei Arten gefunden wird. Das Enzymmuster könnte zu einer biochemischen Art diagnose herangezogen werden. Zur Artspezifität des Musters trägt vor allem das Enzym EST bei, welches sich nur bei drei Arten als mobilitätsidentisch erwies. Die Enzyme APK und BDH haben demgegenüber bei allen Arten Mobilitätsidentität ergeben. Der Grad der Übereinstimmungen des Enzymmusters ist bei den untersuchten Arten sehr verschieden. Es sollen zunächst die sozialen Hummeln besprochen werden. Arten des gleichen Subgenus haben meist ein sehr ähnliches Enzymmuster, sie erweisen sich bei vielen Enzymen als mobilitätsidentisch. Arten verschiedener Subgenera unterscheiden sich dagegen stark, Übereinstimmungen treten selten auf. *B. lapponicus* zeigt mit den übrigen Arten des Subgenus *Pyrobombus* geringere Übereinstimmungen als diese unter sich. Arten der beiden Subgenera der Sektion *Anodontobombus*, Subgenus *Bombus* und Subgenus *Pyrobombus*, zeigen keine grössere Ähnlichkeit zueinander als zu Arten des Subgenus *Thoracombus* aus der Sektion *Odontobombus*.

Auch bei den Schmarotzerhummeln lässt sich bei den vier Arten des Subgenus *Fernaldaepsithyrus* sowie bei den beiden Arten des Subgenus *Ashthonipsithyrus* jeweils ein sehr ähnliches Enzymmuster erkennen. Zwischen den beiden Subgenera sowie auch beim Vergleich mit den anderen *Psithyrus*-Arten ergeben sich grössere Unterschiede. Im Elektrophoresemuster der Enzyme zeigen *P. campestris* (Subg. *Metapsithyrus*) und *P. barbutellus* (Subg. *Allopsithyrus*) höhere Affinitäten zueinander als zu Arten anderer

Subgenus und Art	Enzyme									
	APK	BDH	HK-1	PGI	HK-3	PGM	ACON	GPT	IDH	EST
<u>Psithyrus</u>										
rupestris	○	○			□				○	
<u>Fernaldaepsithyrus</u>										
meridionalis	○	○	○	○	○	○	○		○	○
sylvestris	○	○	○	○	○	○	○	⊙	○	○
flavidus	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
norvegicus	○	○	○	○			○	○	○	
<u>Ashthonipsithyrus</u>										
vestalis	-	-	○	○	-	□	□	□	○	
bohemicus	○	○	○	○	□	□	□	□	○	
<u>Metapsithyrus</u>										
campestris	○	○	○	○	⊙		⊙	○	○	
<u>Allopsithyrus</u>										
barbutellus	○	○	○	○	⊙	□	⊙	○	■	
<u>Bombus</u>										
terrestris	○	○	○	○	⊙	○		⊙	⊙	
lucorum	○	○	⊙	○	⊙	○	■	⊙	⊙	
<u>Pyrobombus</u>										
hypnorum	○	○	⊙	⊙		■	⊙		⊙	
pratorum	○	○	⊙	⊙		⊙	⊙	⊙		
jonellus	○	○	⊙	⊙		⊙	⊙	⊙	■	
pyrenaicus	○	○		⊙		⊙	⊙		○	
lapponicus	○	○		⊙				⊙		
<u>Thoracobombus</u>										
pascuorum	○	○	○	■		■	■	■	■	
humilis	○	○	⊙		■	■	■		■	
veteranus	○	○	○	■	■	■	■	■	⊙	
sylvarum	○	○	○	■	■	■	■	■	⊙	
ruderarius	○	○	○	■	■	■	■	■	■	

ABB. 1. — Elektrophoresemuster der Enzyme.

Bei jedem Enzym sind die mobilitätsidentischen Arten durch das gleiche Symbol gekennzeichnet. Ohne Symbol: nur bei einer Art gefundene Elektromorphen.

FIG. 1. — Electrophoretic patterns of enzymes.

In each column the enzymes which have identical electrophoretic mobility have been marked with the same symbols. Species-specific electromorphs carry no symbol. A dash denotes that this enzyme could not be studied (*P. vestalis*).

Psithyrus-Subgenera. *P. rupestris* nimmt unter den hier betrachteten Schmarotzerhummeln nach seinem Enzymmuster eine sehr isolierte Stellung ein. Bei sieben der zehn untersuchten Enzyme lassen sich Übereinstimmungen zwischen Schmarotzerhummeln und sozialen Hummeln des Subgenus *Bombus* feststellen. Mit Hummelarten der Subgenera *Pyrobombus* und *Thoracobombus* zeigen Schmarotzerhummeln dagegen nur bei höchstens drei bzw. vier Enzymen elektrophoretische Übereinstimmungen.

In Abb. 2 sind die Beziehungen, welche sich aufgrund der Elektrophoresebefunde zwischen den untersuchten Hummelarten ergeben haben, in Form eines Dendrogrammes dargestellt (1). Das Dendrogramm lässt erkennen, dass die Gattung *Psithyrus* mit Ausnahme von *P. rupestris* im Enzymmuster der untersuchten Arten eine grössere Geschlossenheit aufweist, als das Hummel-Subgenus *Pyrobombus*, in welchem *B. lapponicus* eine ähnlich isolierte Stellung einnimmt wie *P. rupestris* in der Gattung *Psithyrus*. Es ist weiterhin zu erkennen, dass *P. rupestris* in seinem Enzymmuster geringere Affinitäten zu den anderen Arten der Gattung *Psithyrus* aufweist, als diese zu den beiden Arten des Hummel-Subgenus *Bombus*, *B. terrestris* und *B. lucorum*.

DISKUSSION

Aus Abb. 1 ist ersichtlich, dass sich die heute geltende Einteilung der Gattungen *Bombus* und *Psithyrus* in Subgenera anhand des Grades der Ähnlichkeit der Enzymmuster weitgehend nachvollziehen lässt. Die Arten der Gattung *Psithyrus* weisen mit Ausnahme von *P. rupestris* ein sehr homogenes Enzymmuster auf. Die isolierte Stellung von *P. rupestris* in der Gattung wird unterstrichen, wenn die Enzyme differenziert betrachtet werden. Die geringen Affinitäten des Enzymmusters von *P. rupestris* mit dem der anderen *Psithyrus*-Arten beruhen fast ausschliesslich auf drei Enzymen, APK, BDH und IDH. Es fällt nun aber auf, dass APK und BDH keinen differentialdiagnostischen Wert besitzen, denn diese beiden Enzyme haben bei allen *Psithyrus*- und *Bombus*-Arten (und auch bei weiteren untersuchten Hummelarten, welche hier nicht behandelt worden sind, weil die betrachtete Enzymstichprobe bisher nur unvollständig untersucht werden konnte) die gleiche Mobilität.

Aus dem Dendrogramm (Abb. 2) ist zu erkennen, dass die elektrophoretisch nachweisbaren Affinitäten zwischen *P. rupestris* und den anderen *Psithyrus*-Arten nicht

(1) In diesem Dendrogramm ist *P. vestalis* in Klammern gesetzt, weil bei ihm nicht alle zehn Enzyme untersucht werden konnten. Wir haben bei der Erstellung des Dendrogramms die Annahme gemacht, *P. vestalis* sei bei den drei nicht untersuchten Enzymen mit *P. bohemicus* identisch. Für APK und BDH trifft dies mit hoher Wahrscheinlichkeit zu, denn diese beiden Enzyme sind bei allen anderen Hummelarten mobilitätsidentisch, für HK-3 dagegen ist die getroffene Annahme weniger wahrscheinlich. Falls diese Annahmen jedoch nicht zuträfen, so würde dies im Dendrogramm die Stellung von *P. vestalis* zu *P. bohemicus* verändern, indem die Dichotomie tiefer anzusetzen wäre, hingegen würde die Stellung des Subgenus *Ashthonipsithyrus* zu den anderen *Psithyrus*-Subgenera nur unwesentlich verändert.

grösser sind, als die Affinitäten, die sich zwischen den Schmarotzerhummeln und sozialen Hummeln feststellen lassen. Es ergeben sich somit aus der Enzymanalyse doch Hinweise, dass *P. rupestris* auf eine Entwicklungslinie zurückgeführt werden könnte, die unabhängig von der anderen *Psithyrus*-Arten entstand.

Es erscheint weiterhin bemerkenswert, dass sich im Enzymmuster der *Psithyrus*-Arten ein hoher Grad an Übereinstimmungen mit den beiden Arten des Subgenus

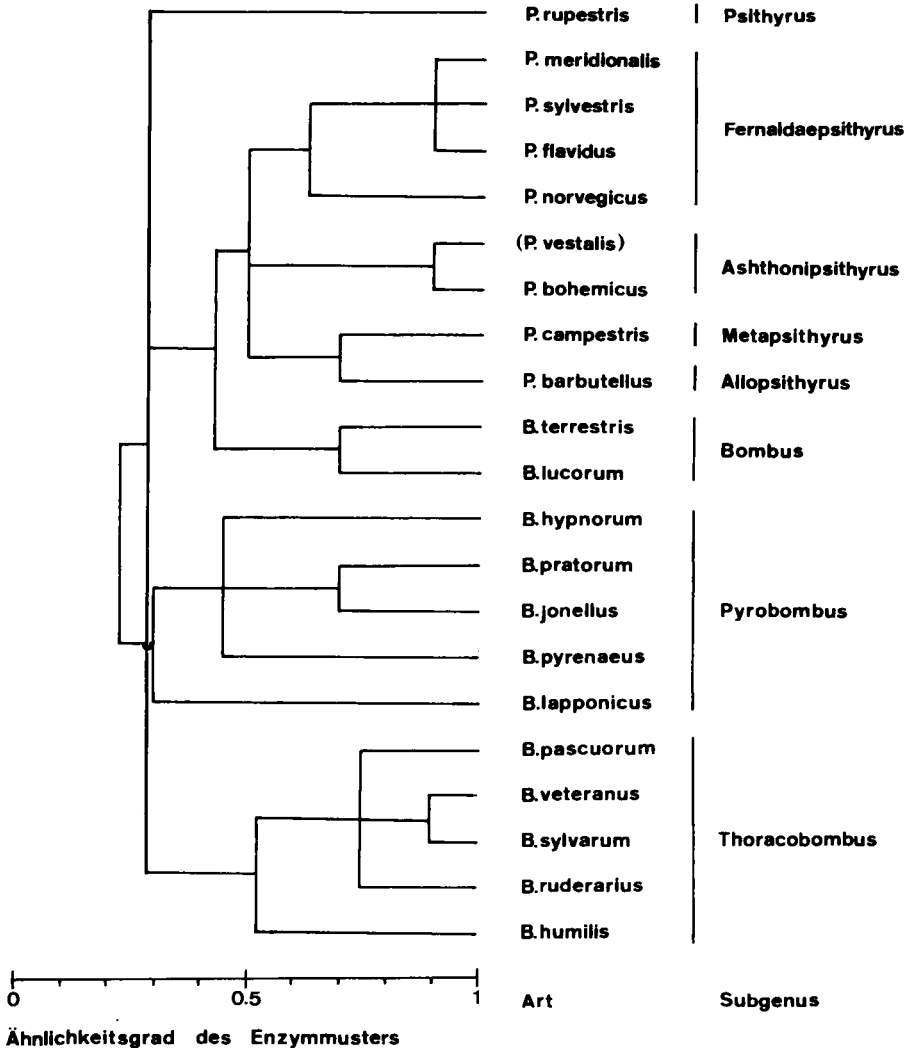


FIG. 2. — Dendrogram.

Grouping of species according to cluster analysis based on the degree of similarity of electrophoretic patterns.

ABB. 2. — Dendrogramm.

Gruppierung der Arten durch Clusteranalyse, basierend auf dem Ähnlichkeitsgrad der Elektrophoresemuster.

Bombus, *B. terrestris* und *B. lucorum* nachweisen lässt. In Anbetracht der kleinen Stichprobe von Enzymen, unter welchen, wie bereits diskutiert, APK und BDH hier keine differentialdiagnostische Bedeutung haben, kann dies nicht unbedingt als ein Hinweis auf nähere verwandtschaftliche Affinitäten der Gattung *Psithyrus* zum Subgenus *Bombus* gewertet werden. Es erscheint uns jedoch bemerkenswert, dass MILLIRON (1971) die Gattung *Psithyrus* als monophyletische Gruppe in die Nähe des Subgenus *Bombus* stellt.

Die bisher durchgeführten enzymelektrophoretischen Untersuchungen bieten demzufolge gewisse Anhaltspunkte für die Lösbarkeit des *Psithyrus*-Problems. Die eingangs gestellte Frage nach dem Ursprung der Schmarotzerhummeln kann anhand der dargestellten Ergebnisse jedoch nicht beantwortet werden. Hierzu wäre eine wesentliche Erweiterung der Enzymstichprobe erforderlich.

DANK

Die Untersuchungen wurden vom Schweizerischen Nationalfonds (Gesuch Nr. 3.640.80) finanziell unterstützt.

Eingegangen im April 1981

Reçu pour publication en avril 1981

RÉSUMÉ

ÉTUDE DU DEGRÉ DE PARENTÉ ENTRE BOURDONS ET PSITHYRES (*APIDAE*, *BOMBINI*) PAR ANALYSE DES ENZYMES PAR ÉLECTROPHORÈSE

On a récemment à nouveau débattu des relations de parenté entre les genres *Bombus* et *Psithyrus*, principalement en ce qui concerne l'origine mono- ou polyphylétique du genre *Psithyrus*. Nous présentons dans ce travail des données qui résultent de l'étude des enzymes par électrophorèse sur des bourdons et des psithyres d'Europe centrale.

Douze espèces de *Bombus* représentant les trois sous-genres *Bombus*, *Pyrobombus* et *Thoracobombus*, ainsi que neuf espèces de *Psithyrus* issues des cinq sous-genres *Psithyrus*, *Fernaldaepsithyrus*, *Ashthonipsithyrus*, *Metapsithyrus* et *Allopsithyrus* ont servi de matériel d'étude. Ces insectes provenaient des environs de Berne, des Alpes et du Jura suisses et, pour comparaison, du nord de l'Allemagne et des Pyrénées françaises.

A partir des insectes on a préparé des homogénats de tissus qui ont été analysés en électrophorèse selon les méthodes standard décrites par SCHOLL *et al.* (1978). Parmi les dix enzymes étudiés, on en a séparé six, l'arginine phosphokinase, la β -hydroxy-butyrat déhydrogenase, la phosphoglucose isomérase, la phospho-glucomutase, l'aconitase et la glutamate-pyruvate-transaminase, pour lesquels la bande enzymatique avait la même mobilité chez les individus d'une espèce. La phosphoglucose isomérase et l'aconitase ont montré un polymorphisme sporadique. Chez la phospho-glucomutase de *Bombus lucorum* le polymorphisme est plus fréquent. Chez l'héxokinase on rencontre deux zones de bandes enzymatiques qui varient chez les espèces étudiées indépendamment l'une de l'autre et qu'il faut interpréter comme deux isoenzymes génétiquement indépendants. Chez l'isocitrate déhydrogenase et l'estérase il existe aussi un groupe de bandes, qui sont constamment déplacées toutes ensemble chez les différentes espèces et qui ont donc été vrai-

semblablement déterminées par un seul locus d'enzyme. Quelques-unes des espèces étudiées montrent pour l'estérase un polymorphisme sporadique. Les dix enzymes étudiés montrent un comportement différent selon les espèces. L'arginine phosphokinase et la β -hydroxy-butyrat déshydrogenase présentent la même mobilité chez toutes les espèces étudiées. Chez les autres enzymes, il existe plusieurs électromorphes. Pour l'estérase on a établi une mobilité identique chez seulement trois espèces de psithyres : *P. meridionalis*, *P. sylvestris* et *P. flavidus*.

L'électrophoréogramme (fig. 1) présente une constante et une spécificité propres à l'espèce. Dans les comparaisons interspécifiques les espèces de *Bombus* et de *Psithyrus* du même sous-genre montrent généralement un schéma enzymatique semblable tandis que, lorsqu'on compare des espèces de sous-genres différents, on peut mettre en évidence des différences plus marquées.

A l'intérieur du genre *Psithyrus*, *P. rupestris* occupe une position très isolée, tandis que les huit autres espèces de *Psithyrus* étudiées présentent un schéma enzymatique très homogène qui, chez sept des dix enzymes étudiés, concorde avec celui des deux espèces *Bombus terrestris* et *B. lucorum* du sous-genre *Bombus*.

Un dendrogramme établi par l'analyse factorielle représente les relations, décelables par électrophorèse, entre les espèces de bourdons et de psithyres étudiées. Les résultats prouvent que l'on pourrait chercher à rattacher *Psithyrus* aux bourdons sociaux proches du sous-genre *Bombus*. *Psithyrus rupestris* pourrait alors se rapporter à une lignée évolutive indépendante des autres espèces de *Psithyrus*.

SUMMARY

ENZYME ELECTROPHORETIC INVESTIGATIONS ON PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS BETWEEN SOCIAL AND PARASITIC BUMBLEBEE SPECIES (*APIDAE*, *BOMBINI*)

Phylogenetic relationships of the genera *Bombus* and *Psithyrus* were studied using enzyme electrophoretic techniques. The main point of interest was, whether this approach would yield information on the question of the monophyletic or polyphyletic evolutionary origin of the genus *Psithyrus*. Nine European *Psithyrus* species representing five subgenera and twelve European *Bombus* species representing three subgenera were studied. The electrophoretic pattern of the ten studied enzymes proved to be highly species-constant and species-specific. The interspecific comparison showed a high degree of similarity between *Bombus* and *Psithyrus* species of the same subgenus, whereas species of different subgenera were clearly distinct. According to its enzyme pattern *P. rupestris* was found to occupy a very isolated position in the genus *Psithyrus*. The remaining *Psithyrus* species showed remarkable affinities among each other and to the two species *B. terrestris* and *B. lucorum* of the subgenus *Bombus*.

LITERATUR

- BREWER G. I., 1970. — *An introduction to isozyme techniques*. Academic Press, New York. 186 p.
- FERGUSON A., 1980. — *Biochemical systematics and evolution*. Blackie, Glasgow/London. 194 p.
- FINK S. C., CARLSON C. W., GURUSIDDAIAH S., BROSEMER R. W., 1970. — Glycerol-3-phosphate dehydrogenase in social bees. *J. Biol. Chem.* 245 (24), 6525-6532.
- FREY-GESSNER E., 1899-1907. — *Fauna Insectorum Helvetiae, Hymenoptera, Apidae*. Bd 1, 18-77. Hans Kőrber, Bern.
- GASCHOTT O., 1922. — Zur Phylogenie von *Psithyrus*. *Zool. Anz.* 54, 225-231.
- HARRIS H., HOPKINSON D. A., 1976. — *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- LØKEN A., 1975. — Studies on Scandinavian bumblebees (*Hymenoptera, Apidae*). *Norsk ent. Tidsskr.* 20, 1-218.

- MCKECHNIE S. W., EHRLICH P. R., WHITE R. R., 1975. — Population genetics of *Euphydryas* butterflies, I. Genetic variation and the neutrality hypothesis. *Genetics* 81, 571-594.
- MILLIRON H. E., 1971. — A monograph of the Western Hemisphere bumblebees (*Hymenoptera* : *Apidae*, *Bombinae*). I. The genera *Bombus* and *Megabombus* subgenus *Bombias*. *Mem. ent. Soc. Can.* 82, 1-80.
- MILLIRON H. E., OLIVER D. R., 1966. — Bumblebees from Northern Ellesmere Island, with observations on usurpation by *Megabombus hyperboreus* (Schönh.) (*Hymenoptera*, *Apidae*). *Can. Ent.* 98, 207-213.
- PEKKARINEN A., 1979. — Morphometric, colour and enzyme variation in bumblebees (*Hymenoptera*, *Apidae*, *Bombus*) in Fennoscandia and Denmark. *Acta Zool. Fennica* 158, 1-60.
- PEKKARINEN A., VARVIO-AHO S. L., PAMILO P., 1979. — Evolutionary relationships in northern European *Bombus* and *Psithyrus* species (*Hymenoptera*, *Apidae*) studied on the basis of allozymes. *Ann. ent. Fenn.* 45 (3 a), 77-80.
- PLATH O. E., 1922. — Notes on *Psithyrus* with records of two new American hosts. *Biol. Bull. Woods Hole* 43, 23-44.
- REINIG W. F., 1935. — On the variation of *Bombus lapidarius* L. and its cuckoo *Psithyrus rupestris* Fabr. with notes on mimetic similarity. *J. Genet.* 30, 321-356.
- RICHARDS K. W., 1973. — Biology of *Bombus polaris* Curtis and *Bombus hyperboreus* Schönherr at Lake Hazen, Northwest Territories (*Hymenoptera* : *Bombini*). *Quaestiones ent.* 9, 115-157).
- RICHARDS O. W., 1927. — The specific characters of the British humblebees (*Hymenoptera*). *Trans. R. ent. Soc. Lond.* 75, 233-268.
- RICHARDS O. W., 1968. — The subgeneric division of the genus *Bombus* Latreille (*Hymenoptera*, *Apidae*). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Ent.)* 22, 211-276.
- SCHMIEDEKNECHT O., 1930. — *Die Hymenopteren Nord- und Mitteleuropas*, 845-874. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- SCHOLL A., CORZILLIUS B., VILLWOCK W., 1978. — Beitrag zur Verwandtschaftsanalyse altweltlicher Zahnkarpfen der Tribus *Aphaniini* (*Pisces*, *Cyprinodontidae*) mit Hilfe elektrophoretischer Untersuchungsmethoden. *Z. zool. Syst. Evolut.-forsch.* 16, 116-132.
- SHAW C. R., PRASAD R., 1969. — Starch gel electrophoresis of enzymes — a compilation of recipes. *Biochem. Genet.* 4, 297-320.
- STEPHEN W. P., CHELDELIN I. H., 1973. — Phenetic groupings in bees of the tribe *Bombini* based on the enzyme α -glycerophosphate dehydrogenase. *Biochem. Syst.* 1, 69-76.
- YARROW I. H. H., 1970. — Is *Bombus inexpectatus* (Tkalčú) a workerless obligate parasite? (*Hym.*, *Apidae*). *Insectes soc.* 17 (2), 95-112.