

Originalartikel

Untersuchungen über Isoformen der LDH bei *Apis mellifera* L im Verlauf der Ontogenese

E Ivanova*, P Popov

Paissij Hilendarski-Universität, Lehrstuhl für allgemeine Biologie, 4000 Plovdiv, Bulgarien

Eingegangen 13 April 1996 ; angenommen 19 November 1996)

Summary — Lactate dehydrogenase expression during ontogenesis of *Apis mellifera* L. We report here results of an investigation of lactate dehydrogenase (LDH) gene expression dynamics in the ontogenesis of *Apis mellifera*. We studied 1 000 specimens from 30 colonies (inhabiting Central Sredna Gora, West Rodopen and southeastern Bulgaria) at different stages of their individual development (eggs, unsealed and sealed larvae, white-eyed and dark-eyed pupae and adult worker bees, drones and queen bees). We used vertical electrophoresis in polyacrylamide gel, according to Maurer's system I (1971). Five LDH fractions (LDH A, LDH B, LDH C, LDH D and LDH E) were found during ontogenesis of *A mellifera*. One of them (LDH E) was specific for fertile imago forms. We observed LDH D in eggs, LDH B and LDH D in unsealed larvae, LDH B and LDH C in sealed larvae and pupae, LDH A and LDH D in worker bees, LDH A, LDH D and LDH E in queen bees and LDH A, LDH B, LDH C, LDH D and LDH E in drones.

Apis mellifera / lactate dehydrogenase / isoenzymes / ontogenesis

EINLEITUNG

Bei Honigbienen waren die Dehydrogenasen Untersuchungsobjekt einer Reihe von Autoren (Cornuet, 1979; Garstide, 1980; Nunamaker und Wilson, 1982; Nunamaker et al, 1984; Sheppard und Berlocher, 1984; Shao Wen Li et al; 1985, 1988; Page und Metcalf, 1988; Del Lama et al, 1990 u a). Untersucht

wurden Malatdehydrogenasen, Alkoholdehydrogenasen, 1-Glycerophosphatdehydrogenasen, Xanthindehydrogenasen, Isozitatdehydrogenasen. Nach vielen Autoren wird das Spektrum der Lactatdehydrogenasen (LDH) bei der Mehrheit der Wirbeltiere durch fünf Isoenzyme vertreten, die aus zwei Typen von Untereinheiten bestehen: A und B (Korockin et al, 1977). Genetische Beweise

* Correspondence and reprints

Dr E Ivanova, University of Plovdiv "P Hilendarski", Dept of General Biology, Section Genetics, 24, Tzar Asen Str, 4000 Plovdiv (Bulgaria). Tel: (359) 32 238 666; 238 667; fax: (359) 32 224 147; 238 607

für die Existenz von zwei nicht allelen Genen, die die Synthese der Untereinheiten A und B kontrollieren, wurden zuerst bei Mäusen, *Peromyscus maniculatus*, erhalten (Shaw und Barto, 1963).

Die Wirbellosen, Protisten und Bakterien haben eine Vielzahl von Lactatdehydrogenasen, von denen einige spezifisch für D-Lactat, andere für L-Lactat sind. Diese LDH haben eine Molekularmasse von 70 000 bis 140 000 und zeigen die verschiedensten kinetischen Eigenschaften. Im Gegensatz zu den LDH der Wirbellosen bilden die LDH-Isoenzyme bei Wirbeltieren eine einzige homologe Familie (Markert et al, 1975). Diese Autoren vertreten die Meinung, daß die Evolutionsverbindungen der meisten LDH niederer Organismen ebenso wie ihre möglichen Verbindungen mit den LDH der Wirbeltiere bisher nicht bekannt sind, eine natürliche Homologie jedoch wenig wahrscheinlich ist.

Über das Gensystem der Lactatdehydrogenasen bei Bienen gibt es bisher wenig Untersuchungen. Molodjuk et al (1980) untersuchten die LDH-Isoenzyme bei Drohnen und analysierten Proben aus der Skelettmuskulatur, den Mucusdrüsen und Vesiculae seminales. Sie stellten fünf Fraktionen mit LDH-Aktivität in der Skelettmuskulatur und den Mucusdrüsen und sechs Fraktionen in den Vesicula seminales fest. Die Autoren nehmen, ebenso wie bei den Wirbeltieren, eine Kontrolle dieser Isoenzymgruppe durch 2 Gene an.

Nach Ergebnissen von Ivanova et al (1994) und Ivanova (1996) erscheinen im Verlauf der Ontogenese der Honigbienen bei Elektrophoresentrennung in Stärkegel 5 LDH-Fraktionen (4 Anoden- und 1 Kathodenfraktion), in Polyacrylamidgel ebenfalls 5.

Leider fanden wir in der Literatur keine weitere Information über das Auftreten der LDH-Isoenzyme bei Honigbienen und ihrer Genkontrolle. Solche Angaben fehlen auch

für die anderen Vertreter der Hymenopteren.

In der vorliegenden Arbeit werden die LDH-Isoenzyme im Verlauf der Ontogenese bei *Apis mellifera* untersucht und der Versuch der Aufklärung ihrer Genkontrolle unternommen.

MATERIAL UND METHODEN

Wir untersuchten 30 Völker von *Apis mellifera* aus der zentralen Sredna Gora, den Westrhodopen und Südostbulgarien.

Über 1000 Individuen in verschiedenen Stadien der Individualentwicklung und von verschiedenem Geschlecht wurden elektrophoretisch analysiert.

Das Material wurde in der Zeit von 1991 bis 1994 gesammelt. Die Untersuchungen wurden an Ganzkörperextrakten in den folgenden Ontogenesestadien durchgeführt: Eier; Rundmaden; Streckmaden; weißbäugige und dunkelbäugige Puppen; erwachsene Arbeiterinnen, Drohnen und Königinnen. Untersucht wurden normal entwickelte adulte Weibchen und adulte Drohnen sowie solche aus weiselosen Völkern.

Wir analysierten insgesamt 45 Gelplatten, jede davon mit 23 Proben (Kolonnen). Die auf die einzelnen Ontogenesestadien entfallenden Probenmengen zeigt Tabelle 1.

Nach dem Sammeln wurde das Material für 24 bis 48 Stunden bei $t = -20^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Wir homogenisierten ganze Individuen und extrahierten im Verlauf von 12 Stunden in TRIS-Phosphatpuffer (pH 6,7) und destilliertem Wasser im Verhältnis 1:7.

Nach der Methode von Lowry (Stambolova et al, 1978) standardisierten wir die untersuchten Eiweißmengen je Probe auf 8,5 mg/ml. Wir zentrifugierten das Homogenat je 45 Minuten bei 4000 Umdr/Min und $t = -4^{\circ}\text{C}$. Das Supernatant wurde abgetrennt und für die Analyse benutzt.

Die elektrophoretische Trennung der untersuchten Eiweißsysteme erfolgte nach dem System 1 von Maurer (1971) in Polyacrylamidgel. Wir benutzten 7,5 % Trenngel, die Kapazität der Gelplatte betrug 23 Proben. Die Polymerisation verlief in zwei Puffersystemen, einem Trichlorid- (pH 8,9) und einem TRIS-Phosphatsystem (pH 6,7). Der Anoden- und Kathodenpuffer für die Kammern war TRIS-Glycin (pH 8,3). Die Elek-

Tab I.* Mengenverteilung der analysierten Proben nach Geschlecht und Ontogenesestadium. *Jede Probe ist ein Ganzkörperextrakt mit Ausnahme der Proben aus Eiern, die aus je 10 Stück pro Probe bestehen.

Stadien	Eier	Rundmaden	Streckmaden	Puppen	Imagines	Gesamtanzahl
<i>Geschlecht</i>						
♀ ♀	50	115	115	98	230	608
♂	50	46	46	40	245	427
Gesamtanzahl	100	161	161	138	475	1035

trophorese erfolgte bei einer Temperatur von 2-4 °C in ungefähr drei Stunden. Bis zum Eintritt der Front in das Trenngel legten wir eine Spannung von 200 V an, danach 400 V.

Nach der Elektrophorese legten wir die Gele in eine Phosphatpufferlösung mit pH 7,3 unter Zusatz von NAD, NBT und FMS* und inkubierten bei 37 °C für 20. Min im Dunkeln, danach fügten wir Na-Lactat hinzu und inkubierten bis zur Entwicklung, jedoch nicht mehr als 2 Stunden. Die Fixierung erfolgte mit 14 %iger Trichloressigsäure. Die Elektropherogramme wurden in 7 %iger Essigsäure aufbewahrt.

Für den histochemischen Nachweis von LDH benutzten wir 1 M Na-Lactat, das auf 2 Arten hergestellt wurde: 1. Aus fertigem Na-Lactat MERCK, 2. Im Laboratorium aus 85 %iger Milchsäure und 1 m Na₂ CO₃ bei pH 7,0. Wir bezeichneten sie als erstes und zweites Substratsystem. Insgesamt analysierten wir 28 Polyacrylamidplatten (644 Individuen) nach Entwicklung mit dem ersten Substratsystem und 12 Polyacrylamidplatten (391 Individuen) nach Entwicklung mit dem zweiten Substratsystem.

Bei der Ablesung der Ergebnisse der Elektrophoreseuntersuchungen erfolgte der Vergleich mit Hilfe des RF-Wertes.

ERGEBNISSE

In den Elektrophoresespektren aus Eiern erscheint schwach eine Fraktion mit dem RF-Wert 0,25 (LDH-D) (Abb 1, Pos 1,2).

Bei den elektrophoretischen Analysen von Rundmaden traten zwei monomorphe

Fraktionen mit den RF-Werten 0,25 (LDH-D) und 0,50 (LDH-B) auf. Die erste Fraktion ist intensiver. Es fehlen Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern (Abb 1, Pos 3,4).

Im LDH-Spektrum von Streckmaden, weißäugigen und dunkeläugigen Puppen erschienen 2 Fraktionen: LDH-B (Rf 0,50) schwach ausgeprägt, und LDH-C (Rf 0,33) intensiv ausgeprägt. Es fehlt die für Rundmaden charakteristische Fraktion mit dem RF-Wert 0,25 (LDH-D) (Abb 1, Pos 5-8).

Bei den adulten Weibchen stellten wir das Auftreten von zwei Fraktionen mit dem RF-Wert 0,25 (LDH-D) und 0,83 (LDH-A) fest. Beide Fraktionen sind durch Monomorphie charakterisiert (Abb 1, Pos 9, 10). Bei den adulten Drohnen erschienen auch zwei andere Fraktionen mit den RF-Werten 0,33 (LDH-C) und 0,5 (LDH-B) (Abb 1, Pos 11, 12), die bei den Arbeiterinnen nicht sichtbar werden. Am intensivsten ist die Fraktion mit dem RF-Wert 0,33 (LDH-C) (Abb 2). Bei der Arbeit mit dem zweiten Substratsystem stellten wir nure bei der Königin und über 50 % der Drohnen das Auftreten einer Fraktion mit dem RF-Wert 0,19 (LDH-E) fest (Abb 1, Tab 2).

Bei den Arbeiterinnen von weiselosen Vökern erschienen die Fraktionen mit den Rf-Werten 0,83 (LDH-A) und 0,25 (LDH-D) intensiv, bei Drohnen solcher Völker

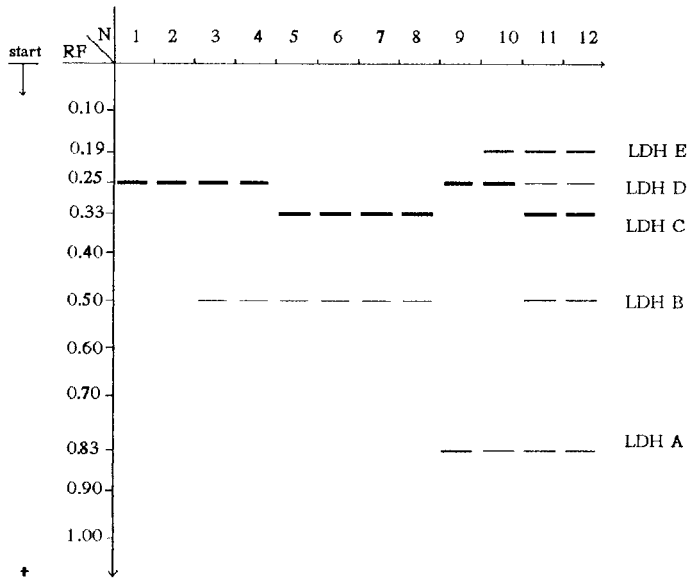


Abb 1. LDH-Spektrum in Polyacrylamidgel im Verlauf der Ontogenese, Schema: 1,2 - Eier, 3,4 - Rundmaden, 5,6 - Streckmaden, 7,8 - Puppen, 9 - Arbeiterinnen, 10 - Königinnen, 11,12 - Drohnen.

Tab II. Zahl der aufgetretenen Fraktionen im Ganzkörperextrakt je nach Alter nach histochemischer Entwicklung für LDH bei Benutzung beider Substratsysteme.

Stadien	Eier	Rundmaden	Streckmaden	Puppen	Arb	Königin	Drohnen
<i>Substratsystem</i>							
I	LDH D	LDH B LDH D	LDH B LDH C	LDH B LDH C	LDH A LDH D	LDH A LDH D LDH E	LDH A LDH B LDH C LDH D LDH E
II	LDH D	LDH B LDH D	LDH B LDH C	LDH B LDH C	LDH A	LDH A LDH D	LDH A LDH D LDH E

LDH A, B, C und D (Abb 2 d, Pos 5-9, 2 e, Pos 1-20).

DISKUSSION

Bei der Untersuchung des Isoenzympektrums der LDH bei Drohnen teilen Molod-

juk et al (1980) nach einer vergleichenden Analyse der erhaltenen Densitogramme mit, daß in den Mucusdrüsen und Skelettmuskern der Drohnen fünf LDH-Fractionen enthalten sind, in den Vesicula seminalis sechs Fractionen. Die Autoren bezeichnen diese Isoenzyme als LDH 1, 2, 3, 4, 5 und X und sind der Meinung, daß wie bei Wirbeltie-

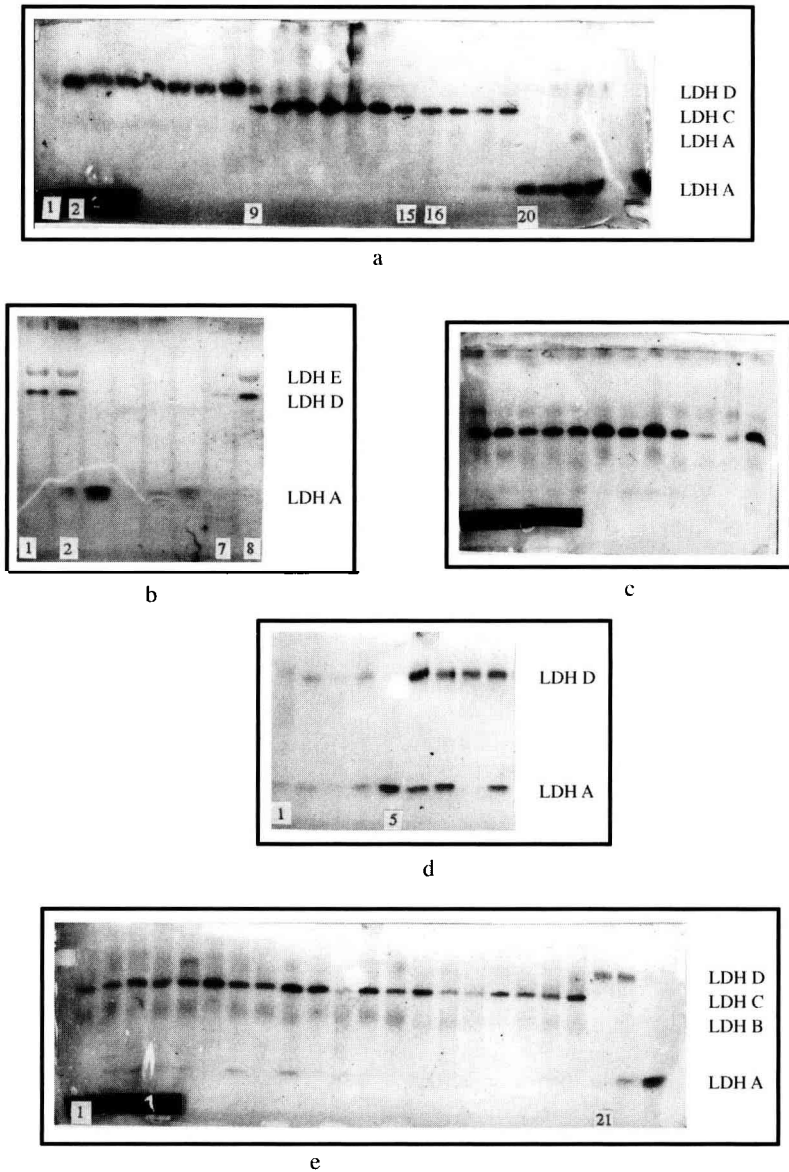


Abb 2. LDH-Spektrum bei Honigbienen. a) LDH im Verlauf der Ontogenese: 1 - Eier, 2-8 - Rundmaden, 9-14 - Streckmaden, 15 - Puppen, 16-19 - Drohnen, 20-23 - Arbeiterinnen. b) LDH bei Imagines: 1,2 - Königinnen, 3-6 - Arbeiterinnen, 7,8 - Drohnen. c) LDH bei Drohnen. d) LDH bei adulten Weibchen: 1-4 - normale Arbeiterinnen, 5-9 - eierlegende Arbeiterinnen. e) LDH bei Individuen weiselloser Völker: 1-20 - Drohnen, entwickelt aus unbefruchteten Eiern der Arbeiterinnen, 21-23 - eierlegende Arbeiterinnen: es fehlt die langsamste Fraktion, die für normal entwickelte Drohnen und Königinnen charakteristisch ist.

ren auch bei den Bienen die LDH-Isoenzyme von zwei Genen kontrolliert werden.

Nach unseren Untersuchungen ist es nicht ausgeschlossen, daß im Verlauf der Ontogenese bei Bienen eine größere Anzahl von Loci (5) wirken. Sie werden wahlweise während der einzelnen Ontogenesestadien aktiviert, wobei sie auch ihre Ausprägung ändern (Abb 1).

Die schnellste Fraktion (LDH-A) fanden wir bei Imagines beider Geschlechter. Auf den Elektrophoregrammen ist ihr Auftreten bei den weiblichen Individuen stärker.

Das LDH-B-Produkt erscheint intensiv bei Rundmaden, ist schwach ausgeprägt bei Streckmaden und Puppen und fehlt bei adulten Weibchen, tritt aber bei Drohnen auf.

LDH-C erscheint bei Streckmaden, Puppen und Drohnen. Dieses Produkt fanden wir nicht bei Rundmaden und weiblichen Bienen.

Das LDH-D-Isoenzym erscheint während der Embryonal- und Nachembryonalentwicklung (Rundmaden) und fehlt in den nächsten Stadien (Streckmaden und Puppen). Beim Imago ist er stark ausgeprägt, besonders bei den Arbeiterinnen (Abb 2).

Bei der Untersuchung adulter Drohnen und Königinnen stellten wir das Auftreten einer Fraktion mit dem schwächsten RF-Wert fest. Sie ist für alle untersuchten Bieneköniginnen charakteristisch, fehlt jedoch bei einigen Drohnen.

In den vergleichenden Polyacrylamidspektren normaler Arbeiterinnen mit Bienen aus weisellosen Völkern fiel uns auf, daß bei den zweiten die LDH-A- und LDH-D-Fraktionen stärker ausgeprägt sind, es fehlt jedoch die LDH-E-Fraktion (Abb 2). Die von uns erhaltenen Ergebnisse zeigen auch, daß die Ausprägung der LDH-A- und LDH-D-Produkte durch den Zustand des Volkes beeinflusst wird – entweder durch den Verlust der Königin oder durch die von einigen Bienen sekundär erworbene Fähigkeit des Eierlegens.

Bei den sich aus diesen unbefruchteten Eiern entwickelnden Drohnen fehlt die LDH-E-Fraktion.

Nach den hier erhaltenen Ergebnisse sowie die aus unseren früheren Untersuchungen über die LDH-Isoenzyme der Bienen gewonnenen Resultaten kann nicht ausgeschlossen werden, daß im Verlauf der Ontogenese bei Bienen eine größere Anzahl von Loci (5) wirken, da bei den haploiden Männchen 5 Banden auftreten. Es könnte sich aber auch um ein oder zwei Loci mit multiplen Allelen handeln, da in Abb 2 b und d bei den diploiden Weibchen häufig 2 deutliche Banden auftreten. Es wäre auch möglich, daß die mRNA im Verlauf der Ontogenese unterschiedlich gespleißt wurde. Die Klärung dieser Frage überschreitet jedoch den Rahmen unserer Untersuchung.

Nehmen wir die Variante einer Genkontrolle durch zwei Loci für die Synthese von zwei LDH-Untereinheiten an, die an der Bildung des Makromoleküls teilnehmen, so würde das für den Ontogeneseverlauf der Bienen folgendes bedeuten: In den früheren Entwicklungsstadien erscheinen die langsamer beweglichen Fraktionen (LDH-B, C, D), in den späteren Stadien (Imago) auch die schnellste Fraktion (LDH-A). Interessant ist hier auch das Auftreten der langsamsten Fraktion (LDH-E), die nur für einen Teil der Imagines charakteristisch ist (Königin und einige Drohnen). Nach Molodjuk et al (1980) ist die Rolle der einzelnen LDH-Isoenzyme noch nicht endgültig geklärt, die Autoren sind aber der Meinung, daß die langsamen Fraktionen für Gewebe vom anaeroben Stoffwechsellyp charakteristisch sind, die schnellen aber für Gewebe vom aeroben Stoffwechsellyp.

Wenn wir die Variante einer Genkontrolle der LDH-Isoenzyme bei den Bienen durch mehrere Gene annehmen, so wäre das ein typisches Beispiel einer Differentialregulierung der Genaktivität im Verlauf der Individualentwicklung: Der LDH-A-Locus ist beim Imago wirksam; der LDH-B-Locus

bei Maden, Puppen und einem Teil der Imagines; der LDH-C-Locus ist bei Streckmaden, Puppen und Imagines aktiviert und bei Eiern und Rundmaden inaktiviert; der LDH-D-Locus wird in den frühen Entwicklungsstadien aktiviert, bei Maden und Puppen inaktiviert und wird beim Imago erneut induziert; der LDH-E-Locus ist nur bei der Königin und den Drohnen induziert (Abb 1).

Zusammenfassung — Die vorliegende Untersuchung dient der Feststellung der LDH-Isoformen in der Ontogenese von in Bulgarien gezüchteten *Apis mellifera* L. Es ergaben sich Unterschiede in der Ausprägung der LDH-Fraktionen in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Bei Eiern handelt es sich um LDH-D (Rf Wert 0,25), bei Rundmaden LDH-B (Rf Wert 0,50) und LDH-D, bei Streckmaden und Puppen LDH-B und LDH-C (Rf Wert 0,33), bei Arbeiterinnen LDH-A (Rf Wert 0,83) und LDH-D, bei Königinnen LDH-A, LDH-D und LDH-E (Rf Wert 0,19) und bei Drohnen LDH-A, B, C, D und E.

Apis mellifera / Lactatdehydrogenase / Ontogenese / Genausprägung

Résumé — Étude des isozymes de la lactate déshydrogénase au cours de l'ontogenèse d'*Apis mellifera* L. Cette recherche a pour but d'établir la dynamique de l'expression génique de la lactate déshydrogénase (LDH) au cours de l'ontogenèse de l'abeille domestique. Nous avons prélevé 1 000 individus issus de 30 colonies provenant de trois régions différentes (Sredna Gora centrale, Rhodopen occidentale et sud-est de la Bulgarie). Les divers stades de développement ont été étudiés : œufs, couvain ouvert et operculé, nymphes aux yeux blancs et nymphes aux yeux foncés, ouvrières, mâles et reines adultes. Les analyses ont été faites par électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide, selon

le système de Maurer (1971). Cinq fractions (LDHA, LDHB, LDHC, LDHD et LDHE) ont été trouvées, qui se répartissent comme suit en fonction du stade de développement : LDHD chez les œufs, LDHB et LDHD dans le couvain ouvert, LDHB et LDHC dans le couvain operculé et chez les nymphes, LDHA et LDHD chez les ouvrières, LDHA, LDHD et LDHE chez les reines et l'ensemble des fractions (LDHA-LDHE) chez les mâles. L'une d'entre elles (LDHE) est spécifique des adultes sexués. Elle manque chez les mâles diploïdes issus d'œufs non fécondés et chez les ouvrières pondeuses.

Apis mellifera / lactate déshydrogénase / ontogenèse / isozyme

LITERATUR

- Cornuet YM (1979) The MDH system in honey bees of Guadeloupe. *J Hered* 70, 223-224
- Del Lama M, Lobo J, Soares A, Del Lama S (1990) Genetic differentiation estimated by isozymic analysis of africanized honey bee populations from Brazil and from Central America. *Apidologie* 21, 271-280
- Garstide DF (1980) Similar allozyme polymorphism in honey bee *Apis mellifera* from different continents. *Experientia* 6, 649-550
- Ivanova E (1996) Izmenchivost pri *Apis mellifera* L — ontogenetichni i populationno-genetichni aspekti. Ph D dissertation, Univ of Plovdiv, Bulgaria
- Ivanova E, Popov P, Dobrovolov I (1994) LDH-loci-expression dynamics during the ontogenesis by *Apis mellifera* L /Hymenoptera: Apidae/, 10th Balkan Biochemical Biophysical Days, Varna, p 403
- Korockin LI, Serov OL, Pudovkin AI, Aronscham AA, Borkin LJ, Maletskij SI, Poljakova EV, Mantchenko GP (1977) Isofermenti. *Moskva Nauka*
- Market CL, Lames B, Shackle, White GS (1975) Evolution of a gene. *Science* 189, 102-114
- Maurer G (1971) *Disk Electrophoresis*, Walter de Gruyter, Heidelberg
- Molodjuk AB, Beljaeva EN (1980) LDH-isoenzymi u trutnej. *Pchelovodstvo* 1, 15-16
- Nunamaker RA, Wilson WT (1982) Isozyme changes in the honey bee *Apis mellifera* during larvae morphogenesis. *Insect Biochem* 12, 99-104

- Nunamaker RA, Wilson WT, Ahmad R (1984) MDH and non-specific esterase isoenzymes of *Apis florea*, *Apis cerana*, *Apis dorsata*. *J Kans Entomol Soc* 57, 591-595
- Page RE, Metcalf RH (1988) A population estimate of MDH allozyme frequencies for the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Pan Pacif Entomol* 64, 285-289
- Shao Wen Li, Meng Yo Pin, Chang JT, Li Ju Huai (1985) Studies on the isozymes of honey bees. *Acta Entomol Sin* 8, 369-74. (In Chinese)
- Shao Wen Li, Meng Yo Pin, Chang JT, Li Ju Huai (1988) Studies on the isozymes in two species of honey bees *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Acta entomol Sin* 31, 15-19. (In Chinese)
- Shaw C, Barto E (1963) Genetic evidence for the sub-unit structure of LDH isozymes. *Ibid* 50, 211-214
- Sheppard WS, Berlocher SH (1984) Enzyme polymorphism in *Apis mellifera* from Norway. *J Apic Res* 23, 64-69
- Stambolova M, Chomaneva T, Argirov T (1978) *Rukovodstvo za prakticheski sanjatija po biochimia*. Sofia. Nauka i iskustvo.