

Original Artikel

**Elektrophoretische Untersuchungen
der wasserlöslichen Proteine bei der Honigbiene
Apis mellifera L. im Verlauf der Ontogenese**

Evgenia IVANOVA*, Petar POPOV, Ivan DOBROVOLOV

Paissij-Hilendarski-Universität Plovdiv, Biologische Fakultät,
Sektion Genetik. Zar Assenstr. 24, Plovdiv, Bulgarien

(Received 30 October 1999; revised 15 March 2000; accepted 20 July 2000)

Zusammenfassung – Durch Elektrophorese in Polyacrylamid- und Stärkegel von wasserlöslichen Proteine mit Totalextrakten von Honigbienen konnte eine Veränderung im Vorkommen der Proteine während der Ontogenese der Bienen nachgewiesen werden: Bei PAGE wurden 17 Fraktionen bei Rundmaden, 19 bei Streckmaden und 14 bei Puppen gefunden. Bei den Imagines konnten je 1 spezielle Fraktion für Königinnen und 1 für Drohnen nachgewiesen werden. Im Stärkegel wurden bei Rundmaden 8, bei Streckmaden 11, bei Puppen 10 Fraktionen und jeweils 2 königinnen – bzw. 2 drohnenspezifische Fraktionen nachgewiesen. Durch isoelektrische Fokussierung in dünnem und ultradünnem Polyacrylamidgel gelang eine Feinauftrennung mit bis zu 52 Fraktionen, deren Verteilung ebenfalls variierte.

***Apis mellifera* L. / Ontogenese / wasserlösliche Proteine**

1. EINLEITUNG

In der Literatur finden sich quantitative Untersuchungen über das Gesamteiweiß der Haemolymphe [1, 2, 5, 9, 14, 19] Mitteldarm [23] und der Hypopharynxdrüsen [10, 11, 15, 20, 21] der Bienen. Qualitative Untersuchungen betreffen hauptsächlich das Vorkommen von globulin- und albuminähnlichen Stoffen in der Haemolymphe

[8, 23] und insbesondere von Vitellogenin und juvenilen Hämolympheproteinen [6, 16, 25, 29–31]. Außerdem wurde eine Veränderung der Eiweißzusammensetzung in Abhängigkeit vom verschiedenen Grad der Invasion durch *Varroa jacobsonii* bei Honigbienen nachgewiesen [4, 7, 13, 26], Unterschiede in Konzentration und Vorkommen der wasserlöslichen Proteine bei Imagines von *Apis mellifera* wurden in

* Correspondence and reprints

Abhängigkeit von Geschlecht und Fertilität durch Elektrophorese in Polyacrylamidgel von Popov & Ivanova [22] und Ivanova [12] festgestellt.

In der vorliegenden Arbeit wird durch verschiedene elektrophoretische Methoden das Auftreten der wasserlöslichen Proteine bei *Apis mellifera* im Verlauf ihrer Ontogenese untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

Wir untersuchten elektrophoretisch etwa 2000 Individuen verschiedenen Geschlechts von *Apis mellifera* in verschiedenen Stadien ihrer Individualentwicklung. Wir verglichen Eier, 5 Tage alte Rund- und 7 Tage alte Streckmaden, 3 Tage alte weissäugige und 7 Tage alte dunkeläugige Puppen. Bei Adulten untersuchten wir 7 Tage alte Arbeiterinnen, 10 Tage alte Drohnen und 1-jährige Königinnen. Alle Proben bestanden aus Totalextrakten von Einzeltieren, mit Ausnahme der Proben aus Eiern, bei der 20 Eier pro Versuch genommen wurden. Als Extraktionsmittel wurde 0,1M Tris-Phosphatpuffer mit pH 6,7 benutzt. Die untersuchte Eiweissmenge in einer Probe war 8,5 µg/ml nach der Methode von Lowry [17]. Wir zentrifugierten bei 900 g über 45 Minuten für Polyacrylamid- und 30 Minuten für Stärkegel.

Die elektrophoretische Trennung in 7,5 % PAAG führten wir nach Maurer [18] mit einigen Modifikationen durch. Die benutzte Gelplatte hatte eine Kapazität von 23 Proben. Das konzentrierende Gel hatte eine Konzentration von 3,3 % und pH 6,7, das Trenngel 7,5 % und pH 8,9. Anoden- und Kathodenpuffer der Kammern war 0,05M Tris- 0,2M Glycin mit pH 8,3. Gefärbt wurde mit Coomassie in 14 % iger Trichloressigsäure, fixiert in 7 % iger Essigsäure.

Die Elektrophorese in Stärkegel (SG) wurde nach Smithies [28] in der Modifikation von Dobrovlov [3] durchgeführt. Wir arbeiteten mit 13 % SG, die Hauptpuffer-

lösung bei der elektrophoretischen Analyse war 0,05M Tris-EDTA-Boratpuffer mit pH 8,1. Wir benutzten das unterbrochene Puffersystem nach Dobrovlov [3] mit 0,05M Tris-EDTA-Boratpuffer mit pH 8,1 und 0,3M Natriumborat-Elektrodenpuffer mit pH 8,9 und 0,155M Tris-Zitratpuffersystem mit pH 8,0. Wir entwickelten mit Amidoschwarz und bewahrten die Platten in 5 % iger Essigsäure auf.

Die isoelektrische Fokussierung wurde in ultradünnem PAAG durchgeführt. Die Gewebefragmente wurden durch 15 Minuten zentrifugieren bei 900 g abgetrennt.

Zur Trennung in ultradünnem Gel benutzen wir Firmenplatten Servalyt Precotes mit pH-Gradient von 3 bis 10 und 0,3 mm Gelstärke. Gearbeitet wurde bei 2000 V, 10 mA, 6 W in 3 Stunden.

Die Färbung wurde mit Coomassie Brilliant Blue R – 250 bei 60 °C in 15–20 Min. durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Bei der in PAGE durchgeführte Elektrophorese traten insgesamt 24 Fraktionen wasserlöslicher Eiweisse auf. Dabei erwies sich eine Dynamik ihres Auftretens in Abhängigkeit von Ontogenesestadium, Geschlecht und Fertilität der Individuen als charakteristisch: bei den Sammelproben von Eiern ließen sich 10 Fraktionen, bei Rundmaden 17 Fraktionen, bei Streckmaden 18 Fraktionen, bei Puppen (weiss- und dunkeläugigen) 14 Fraktionen nachweisen. Bei Imagines fanden wir 18 Fraktionen bei Arbeiterinnen und Drohnen und 19 Fraktionen bei der Königin.

Wir bezeichneten die Fraktionen mit den Buchstaben A-Y, ihr Auftreten wird auf Tabelle I und Abbildung 1 dargestellt.

Tabelle I. Durch Elektrophorese in Polyacrylamidgel nachgewiesene wasserlösliche Proteine bei *Apis mellifera* L.
+ Auftreten; – Fehlen.

Stadien \ Fraktionen	Eier	Rundmaden	Streckmaden	Puppen	Arbeiterinnen	Königin	Drohnen
A	–	–	+	–	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+	+
C	–	–	+	–	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+
E	–	+	–	–	–	–	–
F	–	+	+	+	–	–	–
G	–	–	–	–	+	+	+
H	–	+	+	+	+	+	+
I	–	–	–	+	+	+	+
J	+	+	+	+	+	+	+
K	–	+	+	–	+	+	+
L	+	+	+	+	–	–	–
M	–	–	–	–	–	+	+
N	–	–	–	–	+	+	–
O	–	+	+	–	+	+	+
P	+	+	+	+	+	+	+
R	+	+	+	+	+	+	+
S	+	+	+	+	+	+	+
T	–	+	+	–	+	+	+
U	–	+	–	+	+	+	+
V	+	+	+	+	+	+	+
W	+	+	+	+	–	–	–
X	–	–	+	–	+	+	+
Y	+	+	+	+	–	–	–

3.2. Stärkegel

Die Auftrennung im Stärkegel ergab bei den einzelnen Entwicklungsstadien der Bienen insgesamt 20 Banden, die wir mit den Buchstaben SA-SU kennzeichneten (Tab. II, Abb. 2). Bei den Eiern erhielten wir keine sichtbaren Bande. Bei Imagines beider Geschlechter fanden wir unterschiedliche Anzahlen von Fraktionen: bei Arbeiterinnen 9, bei der Königin 12 und bei Drohnen 11. Die für Königinnen charakteristischen Fraktionen SA und SB liegen im Anodenbereich, die für Drohnen typischen Banden ST und SU lagen im Kathodenbereich (Tab. II, Abb. 2).

3.3. Isoelektrische Fokussierung in ultradünem Polyacrylamidgel

Die isoelektrische Fokussierung in ultradünem Polyacrylamidgel führte zu einer größeren Anzahl von Banden. Bei Eiern konnten 31 (17 Anoden- und 14 Kathodenfraktionen), bei Rundmaden 50 (33 Anoden- und 17 Kathodenfraktionen), bei Streckmaden 50 (33 Anoden- und 17 Kathodenfraktionen), bei Puppen 48 (33 Anoden- und 15 Kathodenfraktionen), bei Arbeiterinnen 52 (36 Anoden- und 15 Kathodenfraktionen) und bei Drohnen 48 (31 Anoden- und 17 Kathodenfraktionen) nachgewiesen werden (Abb. 3).

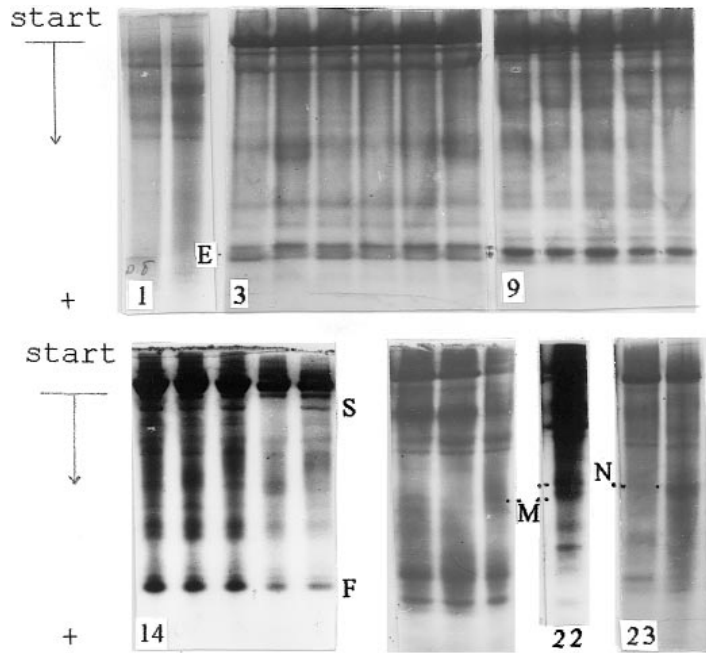


Abb. 1. Auftreten der wasserlöslichen Proteine in Polyacrylamidgel: 1,2 Eier; 3-8 Rundmaden; 9-13 Streckmaden; 14-18 Puppen; 19-21 Drohnen; 22 Königin; 23, 24 Arbeiterinnen.

Tabelle II. Durch Elektrophorese in Stärkegel nachgewiesene wasserlösliche Proteine bei *Apis mellifera* L.

+ Auftreten; - Fehlen.

Stadien Fraktionen	Rundmaden	Streckmaden	Puppen	Arbeiterinnen	Königin	Drohnen
SA	-	-	-	-	+	-
SB	-	-	-	-	+	-
SC	-	+	+	+	+	+
SD	+	+	+	+	+	+
SE	+	+	+	-	+	+
SF	-	-	-	+	-	-
SG	-	-	-	-	+	+
SH	+	+	+	-	-	-
SI	-	+	+	+	+	-
SJ	+	+	+	+	+	+
SK	-	+	+	-	-	+
SL	+	+	+	+	+	+
SM	+	-	-	+	+	-
SN	+	-	-	+	+	+
SO	-	+	+	-	-	-
SP	+	-	-	-	-	-
SQ	-	+	+	-	-	-
SR	-	+	-	+	+	+
ST	-	-	-	-	-	+
SU	-	-	-	-	-	+

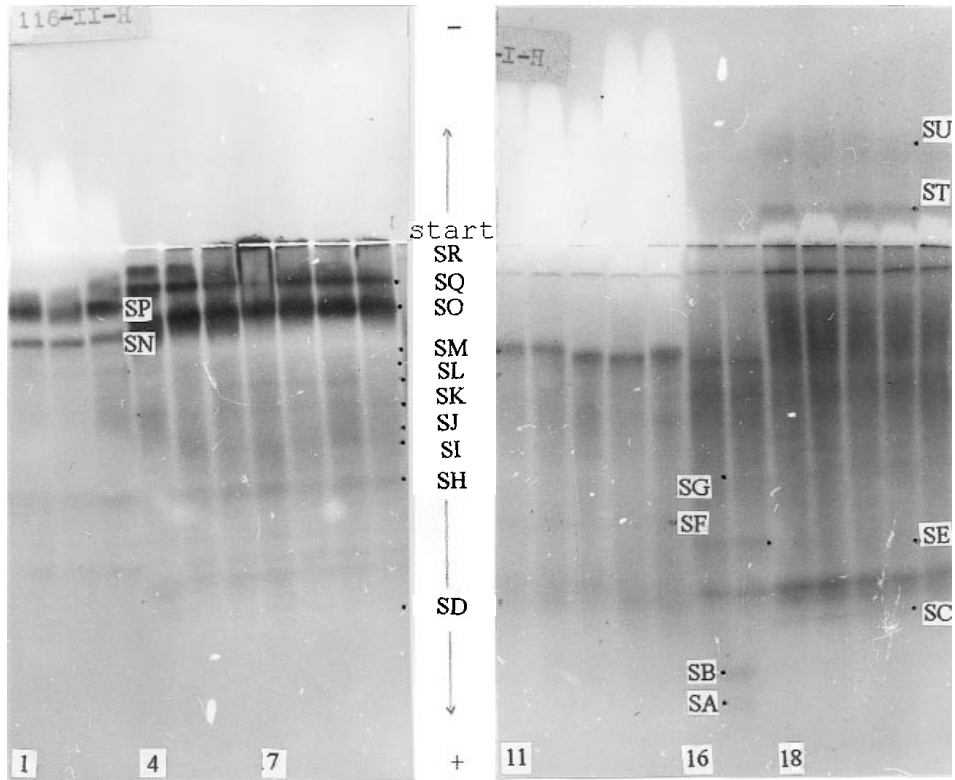


Abb. 2. Auftreten der wasserlöslichen Proteine in Stärkegel. 1–3 Rundmaden; 4–6 Streckmaden; 7–10 Puppen; 11–15 Arbeiterinnen; 16, 17 Königin; 18–22 Drohnen.

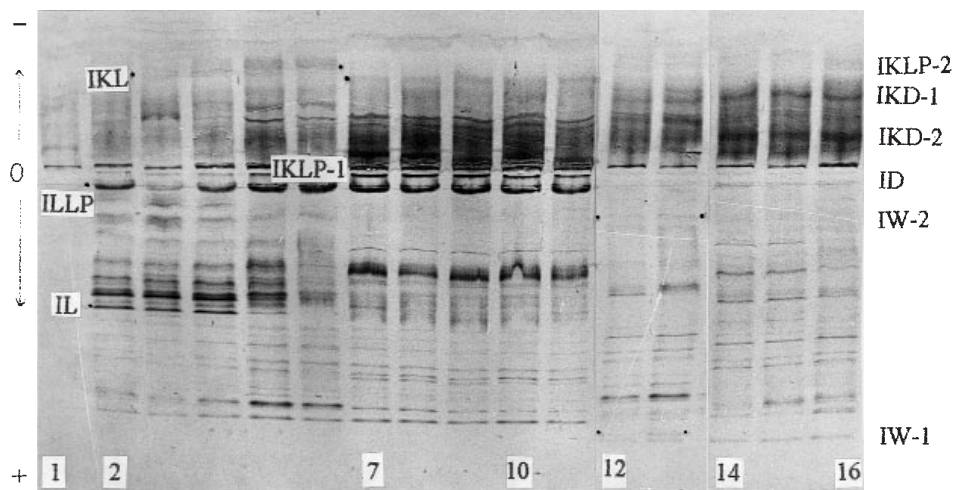


Abb. 3. Isoelektrische Fokussierung in ultradünnem Polyacrylamidgel: 1 Eier; 2–6 Rundmaden; 7–9 Streckmaden; 10–11 Puppen; 12–13 Arbeiterinnen; 14–16 Drohnen.

Mit IL bezeichnen wir die Bande in der Anodenzone die für Rundmaden typisch sind, mit ILP die stark ausgeprägte Bande bei Streckmaden und Puppen. ILLP Bande sind im Larven- und Puppenstadium ausgeprägt. In der Kathodenzone erscheinen Bande, die wir als IKL, IKLP-1 und IKLP-2 bei Rundmaden, Streckmaden und Puppen bezeichneten.

Bei adulten Arbeiterinnen und Drohnen waren 3 Fraktionen aus der Anodenzone wichtig, die mit IW-1, IW-2 und ID gekennzeichnet wurden, und zwei Fraktionen der Kathodenzone, bezeichnet als IKD-1 und IKD-2. Die Proteinbanden IW-1 und IW-2 kommen nur bei Arbeiterinnen, ID, IKD-1 und IKD-2 nur bei Drohnen vor.

4. DISKUSSION

Die Elektrophorese in Polyacrylamidgel ergab eine Variation in der Zahl der Eiweißfraktionen von 10 bis 19 in den einzelnen Entwicklungsstadien, wobei ihre Anzahl im Spektrum der Streckmaden und der Imagines am größten ist.

Die Auswirkung der Wachstums- und Morphogenesestadien auf die Zahl der Fraktionen soll diskutiert werden. Die für Rundmaden charakteristischen Prozesse sind hauptsächlich mit ihrem Wachstum verbunden, während bei Streckmaden Metamorphoseprozesse in Verbindung mit der Histogenese bei den Puppen vorherrschen.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Veränderung im Vorkommen der Proteine während der Ontogenese der Bienen besteht. Allerdings zeigten sich nur bei zwei Trennungsmethoden bei den Streckmaden die meisten Banden (PAGE: 17 Fraktionen bei Rundmaden, 19 bei Streckmaden und 14 bei Puppen; Stärkegel: 8 Fraktionen bei Rundmaden, 11 bei Streckmaden und 10 bei Puppen). Nach Shao Wen Li et al. [27] tritt im Eiweißspektrum der Larven ein "Larvenprotein" auf, vermutlich Arylphorin [24], das bei den Imagines verschwindet. Unsere

Untersuchungen weisen ebenfalls in diese Richtung.

Im PAGE Spektrum von adulten Arbeiterinnen und Drohnen ist die Zahl der nachweisbaren Fraktionen 18, bei Königinnen 19, wobei nur bei den weiblichen (Arbeiterinnen und Königin) die Fraktion N auftritt, und bei Drohnen und Königin die Fraktion M (Tab. I, Abb. 1).

Shao Wen Li et al. [27] stellen durch PAGE das Auftreten von 11 Fraktionen bei Arbeiterinnen fest. Fraktion Nr. 5 ist nach den Autoren bei den untersuchten weiblichen Individuen Vitellogenin. Sabatini & Fluri [25] fanden einen höheren Gehalt an Vitellogenin bei Königinnen im Vergleich zu Arbeiterinnen. Beim Vergleich mit unseren Ergebnisse halten wir eine Ähnlichkeit oder Übereinstimmung zwischen der nur bei weiblichen Individuen auftretenden N-Fraktion mit der Vitellogeninfraktion für möglich.

Das Spektrum der wasserlöslichen Proteine in der Stärkeplatte zeigt Unterschiede zwischen adulten Arbeiterinnen, Königinnen und Drohnen (Tab. II, Abb. 2). Für alle Imagines ist das Auftreten der Fraktionen SC, SD, SJ, SL, SN und SR charakteristisch, wobei zwei von ihnen, SC und SN, bei weiblichen Individuen (Königinnen und Arbeiterinnen) schwach und bei männlichen stark vertreten sind.

Die SF-Fraktion tritt nur bei Arbeiterinnen auf und SM bei allen weiblichen Individuen (Königinnen und Arbeiterinnen), nicht bei adulten Drohnen. Da im PAGE – Spektrum auch eine typisch weibliche Fraktion N vorkommt, wird unsere Auffassung bestärkt, dass es für weibliche Individuen spezifische wasserlösliche Proteine gibt.

Bei Königinnen und Drohnen sind zwei Fraktionen ausgeprägt SE- und SG. SE fehlt nur bei Arbeiterinnen, SG außerdem auch bei Larven und Puppen. Bei der Trennung im Stärkegel ist die Fraktion SE bei allen Entwicklungsstadien vorhanden mit Ausnahme der adulten Arbeiterinnen. Die

Fraktion SG kommt nur bei Königinnen und Drohnen vor. Auch bei PAGE erhielten wir eine nur bei Drohnen und Königinnen vorkommende Fraktion M. Das legt die Vermutung nahe, dass es sich um eine für Geschlechtsstadien typische Eiweißfraktion handeln könnte.

Es fanden sich 2 jeweils für Geschlechtsstadien typische Fraktionen auf Stärkegelelektrophoreseplatten: nur bei Proben von Königinnen traten die beiden Fraktionen SA und SB im Anodengebiet auf, die Fraktionen ST und SU dagegen traten nur bei Drohnen in der Kathodenzone auf (Tab. II, Abb. 2). Diese Produkte fehlen im Larven-, Vorpuppen- und Puppenstadium der Ontogenese der Bienen, und ebenso bei allen weiblichen Imagines.

Nach der Feinfraktionierung mit isoelektrischer Fokussierung in ultradünner Servalytgel erscheint eine große Anzahl von Banden, von denen einige spezifisch für ein bestimmtes Stadium der Ontogenese, andere charakteristisch für alle Ontogenesestadien von *Apis mellifera* sind (Abb. 3). So sind die Bande IL für Rundmaden spezifisch, ILP für Streckmaden und Puppen, ILLP kommt im Larven- und Puppenstadium vor, IKL, IKLP-1 und IKLP-2 bei Rundmaden, Streckmaden und Puppen.

Die Fraktionen IW-1 und IW-2 kommen nur bei Arbeiterinnen, ID, IKD-1 und IKD-2 nur bei Drohnen. Das weist nach unserer Meinung auf einen Geschlechtsdimorphismus bei *Apis mellifera* hin.

Auf der Basis unserer Ergebnisse können wir verallgemeinern, dass wir durch die verschiedenen Methoden der nativen Elektrophorese eine Dynamik des Auftretens der Proteine im Verlauf der Ontogenese sowie auch Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern feststellen können.

Summary – Electrophoretic study of water-soluble proteins during the honeybee (*Apis mellifera* L.) ontogenesis.

Two thousand specimens of *Apis mellifera* L. from three domesticated populations in Bulgaria were investigated by means of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), starch gel electrophoresis (SGE) and isoelectric focusing in ultra-thin polyacrylamide gel. Specimens of different developmental stages and sexes were compared: unsealed and sealed larvae, white-eyed and dark-eyed pupae, and imago forms (7-day worker bees, 10-day drones, and one-day queen). All samples were total extracts of individuals, except the egg samples which were made up of 20 eggs. PAGE was performed according to Maurer [18]. SGE was performed according to Smithies [28] as modified by Dobrovolov [3]. The soluble proteins were visualised with Coomassie Brilliant Blue R250.

A total of 24 fractions of water-soluble proteins were found in the spectra of analyzed organs in PAGE: 10 in eggs, 17 in unsealed larvae, 18 in sealed larvae, 14 in pupae, 18 in workers and drones and 19 in queens (Tab. I, Fig. 1). In SGE 20 fractions were found: 8 in unsealed larvae, 11 in sealed larvae, 10 in pupae, 9 in workers, 11 in drones and 12 in queens (Tab. II, Fig. 2). With isoelectric focusing 31 fractions were found in eggs, 50 in unsealed and sealed larvae, 48 in pupae, 52 in workers and 48 in drones (Fig. 3).

After separation in starch gel we found 2 queen specific and 2 drone specific bands. With PAGE, more bands were obtained but only one sex specific band (M) could be found. The best separation with up to 52 fractions was obtained by isoelectric focusing. There was 1 band at the anode and 2 bands at the cathode which occurred only in drones. With both SGE and PAGE we found protein bands which occurred during the larval and pupal but not in the adult stages (SQ and SH – F, L, W and Y respectively) which may point to specific larval proteins.

***Apis mellifera* / ontogenesis / water-soluble proteins**

Résumé – Étude par électrophorèse des protéines hydrosolubles au cours de l'ontogénèse chez l'abeille *Apis mellifera* L.

Deux mille abeilles (*Apis mellifera* L.) de Bulgarie ont été étudiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (EGPA), sur gel d'amidon (EGA) et par isoélectrofocalisation en gel ultrafin de polyacrylamide à divers stades de développement. Nous avons comparé des œufs, des larves de 5 et 7 jours, des nymphes de 3 jours aux yeux blancs et de 7 jours aux yeux noirs, des ouvrières de 7 jours, des mâles de 10 jours et des reines âgées d'un jour. Tous les échantillons étaient constitués d'extraits totaux d'individus, sauf les échantillons d'œufs qui comportaient 20 œufs. Un tampon de tris-phosphate à pH 6,7 a été utilisé comme milieu d'extraction pour l'EGPA et de l'eau distillée pour l'EGA. Les échantillons ont été extraits pendant 24 h à 4 °C, puis centrifugés durant 45 min pour l'EGPA et 30 min pour l'EGA à 900 g. L'EGPA a été faite selon Maurer [18] et l'EGA selon Smithies [28] modifié par Dobrovolev [3]. Les protéines solubles ont été visualisées à l'aide du bleu de Coomassie R-250.

L'EGPA a fourni un total 24 bandes de protéines hydrosolubles : 10 chez les œufs, 17 chez les larves non operculées, 18 chez les larves operculées, 14 chez les nymphes, 18 chez les ouvrières et les mâles et 19 chez les reines (Tab. I, Fig. 1). L'EGA a fourni 20 bandes : 8 chez les larves non operculées, 11 chez les larves operculées, 10 chez les nymphes, 9 chez les ouvrières, 11 chez les mâles et 12 chez les reines (Tab. II, Fig. 2). L'isoélectrofocalisation a fourni un nombre de bandes beaucoup plus élevé : 31 chez les œufs, 50 chez les larves operculées et non operculées, 48 chez les nymphes, 52 chez les ouvrières et 48 chez les mâles (Fig. 3). Après séparation sur gel d'amidon on a trouvé deux bandes spécifiques des reines et deux bandes spécifiques des mâles. Avec l'EGPA on a obtenu un plus grand nombre de bandes mais une seule est spécifique du sexe (M). La meilleure séparation, qui a fourni jusqu'à 52 fractions, a

été obtenue par l'isoélectrofocalisation. Il y avait une bande à l'anode et deux à la cathode qui n'étaient présentes que chez les mâles. Avec l'EGA comme l'EGPA nous avons trouvé des bandes protéiniques présentes seulement chez la larve et la nymphe mais absentes des stades adultes (SQ et SH (F, L, W et Y respectivement) qui peuvent désigner des protéines spécifiques des larves.

***Apis mellifera* / ontogénèse / protéine hydrosoluble**

LITERATUR

- [1] Arbuthnot P.B., Cantill R.C., Herbum H.R., An electrophoretic characterization of African worker honey bee hemolymph proteins during development, *Comp. Biochem. Physiol. B* 74 (1983) 467–471.
- [2] Danty E., Arnold G., Burmester T., Huet J.C., Huet D., Pernollet J.C., Masson C., Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28 (1998) 387–397.
- [3] Dobrovolev I.S., Mikroelektroforeza varchu skorbelen gel, *Izvestija Niors-Varna* 12 (1973) 157–162.
- [4] Domackaja T.F., Grobov O.F., Gemolimfa pcel pri varoatoze, *Pchelovodstvo* 7 (1980) 8–12.
- [5] Engels W., Fahrenhorst H., Age-dependent and caste-dependent changes in hemolymph protein patterns of *Apis mellifera*, *Wilhelm Roux Arch. Entwickl. Mech. Org.* 174 (1974) 285–296.
- [6] Fluri P., Wille H., Gerig L., Lüscher M., Juvenile hormone, vitellogenin and hemocyte composition in winter worker honeybees (*Apis mellifera*), *Experientia* 33 (1977) 1240–1241.
- [7] Glinski Z., Jarosz J., Alterations in hemolymph proteins of drone honey bee larvae parasitized by *Varroa jacobsoni*, *Apidologie* 15 (1984) 329–338.
- [8] Glinski Z., Jarosz J., Polyacrylamide gel electrophoresis in observations on insect haemolymph, *Med. Wet.* 3 (1986) 159–164 (in Polish).
- [9] Glinski Z., Jarosz J., Werniski A., An immunoelectrophoretic analysis of soluble blood proteins of coiled and upright larvae of the worker honey bee, *Apis mellifera*, *Apidologie* 16 (1985) 247–265.
- [10] Halberstadt K., Elektrophoretische Untersuchungen zur Sekretionstätigkeit der Hypopharynxdrüse der Honigbiene (*Apis mellifera* L.), *Insectes Soc.* 27 (1980) 61–77.

- [11] Huang Z.Y., Otis G.W., Teal P.E., A Nature of brood signal activating the protein synthesis of hypopharynge gland in honey bees, *Apis mellifera* (Apidae, Hymenoptera), *Apidologie* 20 (1989) 455–464.
- [12] Ivanova E., *Izmencivost pri Apis mellifera – ontogenetichni i populacionno-geneticni aspekti*, Dissert. Univ. Plovdiv, 1996.
- [13] Kolev D.A., Shabanov M., Changes in the haemolymph proteins of drone larvae and pupae parasitized by *Varroa jacobsoni* Oud. 1904, *Acta Microbiol. Bulg.* 24 (1989) 41–44 (in Bulgarian, English summary).
- [14] Krieg P., Marek M., Protein and esterase changes in the hemolymph of the queens of honey bee, *Apis mellifera* L., *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. & Mol. Biol.* 75 (1983) 513–517.
- [15] Kubo T., Sasaki M., Nakamura J., Sasagawa H., Ohashi K., Takeuchi H., Natori S., Change in the expression of hypopharyngeal gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and /or role, *J. Biochem.* 119 (1996) 291–295.
- [16] Lin H.R., Winston M.L., Haunerland N.H., Slessor K.N., Influence of age and population size on ovarian development, and of trophalaxis on ovarian development and vitellogenin titres of queenless worker honey bee (Hymenoptera: Apidae), *Can. Entomol.* 131 (1999) 695–706.
- [17] Lowry O., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [18] Maurer G., *Disk-elektroforez*, Mir, Moskva, 1971.
- [19] Michelette E., Engels W., Concentration of hemolymph proteins during postembryonic worker development of Africanized honey bees in Brazil and Carniolans in Europe, *Apidologie* 26 (1995) 101–108.
- [20] Ohashi K., Sawata M., Takeuchi H., Natori S., Kubo T., Molecular cloning of cDNA and analysis of expression of the gene for alpha-glucosidase from the hypopharyngeal gland of the honeybee *Apis mellifera* L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221 (1996) 380–385.
- [21] Ohashi K., Natori S., Kubo T., Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L., *Eur. J. Biochem.* 249 (1997) 797–802.
- [22] Popov P., Ivanova E., Electrophoretic studies on the total soluble protein in imago forms of *Apis mellifera* L., *Animalia* 30 (1994) 53–56.
- [23] Raolison C., Sutter B., An intestinal insulin-like molecule in *Apis mellifera*., *Comp. Biochem. Physiol. A* 69 (1981) 79–83.
- [24] Ryan R.O., Schmidt J.O., Law J.H., Arylphorin from the haemolymph of the larval honeybee, *Apis mellifera*, *Insect Biochem.* 14 (1984) 515–520.
- [25] Sabatini A., Fluri P., Blood juvenile hormone, protein and vitellogenin titres in laying and non-laying queen honey bee, *J. Apic. Res.* 20 (1981) 221–225.
- [26] Schatton-Gadelmayer K., Engels W., Haemolymph-Proteine und Körpergewicht frischgeschlüpfter Bienen-Arbeiterinnen nach unterschiedlich starker Parasitierung durch Brutmilben, *Entomol. Genet.* 14 (1988) 93–101.
- [27] Shao-Wen Li, Jang Qwen Mei, Meng Jo-Pin, Chang L., Studies on the haemolymph protein pattern of two species of honey bees *Apis mellifera*, *Acta Entomol. Sin.* 25 (1982) 185–190 (in Chinese).
- [28] Smithies O., Zone electrophoresis in starch gels, *Biochem. J.* 61 (1955) 629–641.
- [29] Trenczek T., Zillikens A., Engels W., developmental patterns of vitellogenin hemolymph titer and rate of synthesis in adult drone honey bees (*Apis mellifera*), *J. Insect Physiol.* 35 (1989) 475–481.
- [30] Wheeler D.E., Kawooya J.K., Purification and characterization of honey bee Vitellogenin, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 14 (1990) 253–267.
- [31] Zillikens A., Age and juvenile hormone-dependent vitellogenin synthesis in imaginal honey bee drones, *Apidologie* 16 (1985) 237–238.