

## Analysis of the electromobility of different proteinic fractions of *Bovicola limbatus* (Mallophaga: Insecta)

By SUSANA MÚÑOZ PARRA, MARÍA DESAMPARADOS SOLER CRUZ<sup>1)</sup>, ROCÍO BENÍTEZ RODRÍGUEZ, ANA FLORIDO NAVÍO, MANUEL DÍAZ LÓPEZ, JESÚS MA. PÉREZ JIMÉNEZ and ISIDORO RUIZ MARTÍNEZ

From Department of Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Spain

Received: April 21, 1987

**Introduction.** The classic systematic studies organisms on basis of the quantity and measurement of morphological structures examining them under different types of microscopes while the biochemical systematic uses techniques based on the chemistry of proteins.

Many times the traditional techniques of identification of species are insufficient, therefore it is made necessary and urgent to apply the new technology to specific differentiation with a result which confirms, assures and complements the data obtained after a morphologic determination.

WHITTAKER et al. (1962) utilized electrophoresis in starch gels with taxonomic purposes, in different types of species including Orthoptera, Diptera, Coleoptera and Hymenoptera. By the same means WARREN et al. (1969), TOWSON (1969) and LUNT (1979) applied these techniques in Diptera.

With the present work the authors intend to initiate studies of biochemical taxonomy in Mallophaga applying as a method of proteinic characterization the SDS-PAGE proposed by LAEMMLI et al. (1970) and realized in our laboratory by PÉREZ et al. (1982) which we earlier adapted to our material.

**Materials and Methods.** Males and females of *Bovicola limbatus* were determined on basis of works by BENÍTEZ et al. (1984) and SOLER et al. (1986).

The specimens were stored separately in Eppendorf tubes and maintained at 4 °C.

An initial sample of 58 females and 60 males weighing 10.300 µg and 5.600 µg respectively, proportioned a quantity of 56 µg and 20 µg total proteins respectively. In all cases the quantity of sample applied was 5 µg.

The trituration made in the same Eppendorf tubes and the obtaining of total proteins was brought about by means of flocculation in TCA of soluble proteins and posterior resuspension of them besides extraction and making of hydrophobic proteins soluble with SDS. For the characterization of distinct protein bands, the following criteria were used:

- R (mb) or absolute mobility of each fraction
- % R (mb) or relative mobility
- R — % R (mb) or relation of relative mobility (IGBOKWE 1978)
- Rx or Me, electrophoretic mobility (WARREN 1969)
- Rf (REVANASIDDATH et al. 1982).
- Pm, obtained in function of the molecular weight of the patron protein. The patrons used were: bovine albumin (Pm = 66,000 daltons), egg albumin (Pm = 45,000 daltons), trypsinogen (Pm = 45,000 daltons) and lysozyme (Pm = 14,300 daltons).

**Results and Discussion.** In the case of the female of *B. limbatus*, a total of 22 bands were obtained (Tab. 1; Figs. 1, 2).

The R (mb) of these bands oscillated between 3.5 mm for the first band and 72.5 mm for the last band.

1) Head of research line.

Table 1. Analysis of electromobility of distinct proteins fractions in the males of *Bovicola limbatus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
R (mb)	8	10	15	17.5	20	27	29	35	43	45	50	52	68	72	75
% R (mb)	10.6	13.3	20.0	23.3	26.7	36.0	38.6	46.7	57.3	60.0	66.7	69.3	90.7	96.0	100.0
R-%R (mb)	1.0	1.2	1.9	2.2	2.5	3.4	3.6	4.4	5.4	5.6	6.2	6.5	8.5	9.0	9.3
Rx**	0.35	0.43	0.65	0.76	0.87	1.17	1.26	1.52	1.87	1.96	2.17	2.26	2.96	3.13	3.26
Rx*	0.09	0.12	0.17	0.20	0.23	0.31	0.34	0.40	0.50	0.52	0.58	0.60	0.79	0.83	0.87
Rf	0.07	0.09	0.14	0.16	0.19	0.25	0.27	0.32	0.40	0.42	0.46	0.48	0.63	0.67	0.69
Pm			66,000			66,000	45,000			45,000	24,000			24,000	14,300

Rx\*\* Taking as reference bovine albumin

Rx\* Taking as reference lysozyme

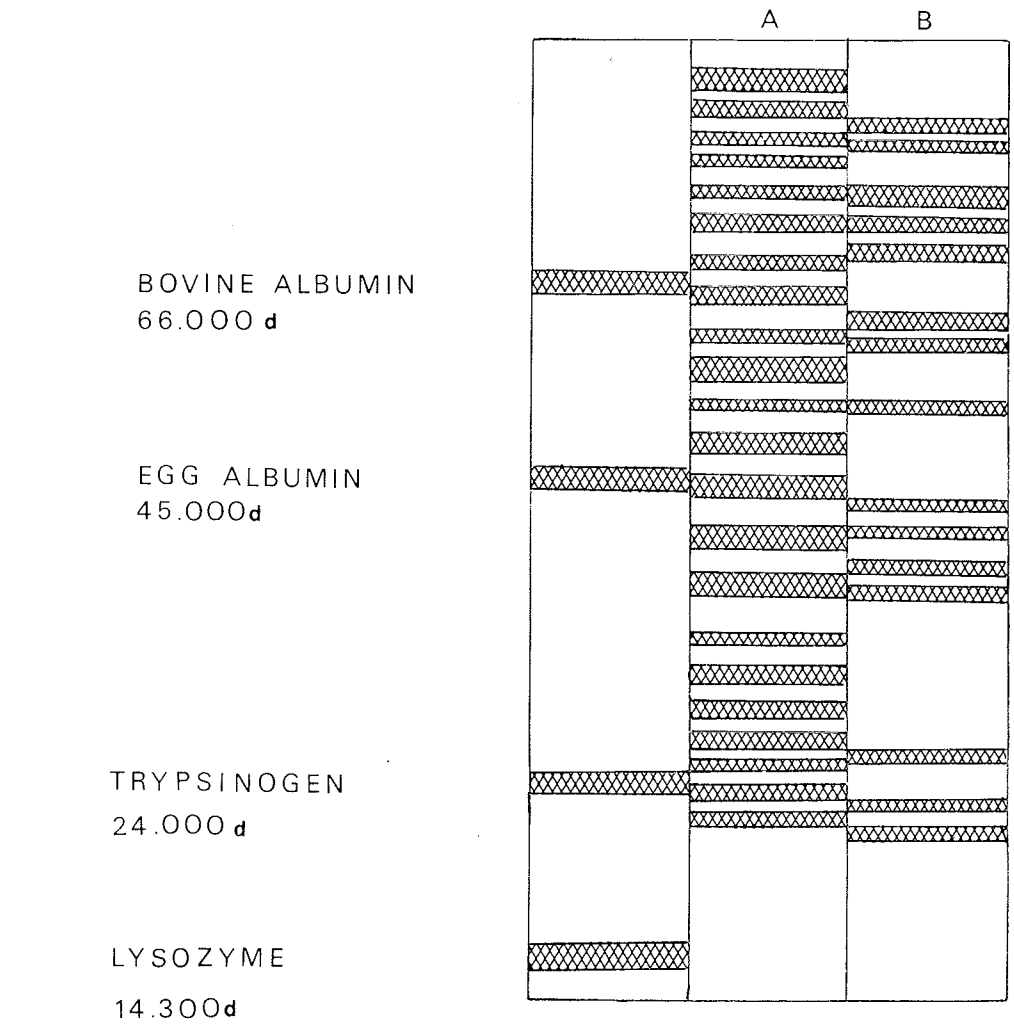


Fig. 1. A: Females of *B. limbatus*, B: Males of *B. limbatus*.

Fig. 2. Electrophoretogram of the females of *B. limbatus*.

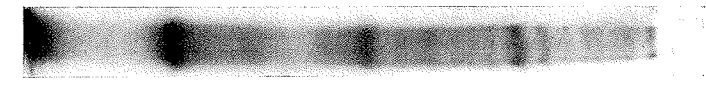


Fig. 3. Electrophoretogram of the males of *B. limbatus*.



The Rf were situated between 0.03 mm for the first band and 0.67 mm for the last band. In the case of *B. limbatus* males a total of 15 bands were obtained (Tab. 2; Figs. 1, 3). The R (mb) oscillated between 8 mm for the first band and 75 mm for the last band. The Rf were situated between 0.07 mm for the first band and 0.69 mm for the last band. If a study is made of the distribution of the number of bands in function of their Pm in the male and in the female of this species (Tab. 3), it is observed that in an interval of 66,000—24,000 daltons the number of proteins is always superior in the case of the females. In the interval 24,000—14,300 daltons the number of bands obtained was the same in both

Tab. 2. Analysis of electromobility of distinct proteinic fractions in the females of *Bovicola limbatus*

	R (mb)	% R (mb)	R-%R (mb)	Rx**	Rx*	Rf	Pm
1	3.5	4.8	1.0	0.15	0.04	0.08	↑ 66,000 d. ↓
2	7.0	9.7	2.0	0.30	0.08	0.06	
3	8.5	11.7	2.4	0.37	0.10	0.08	
4	11.0	15.2	3.2	0.48	0.13	0.10	
5	13.5	18.6	3.9	0.59	0.16	0.13	
6	17.0	23.4	4.9	0.74	0.20	0.16	
7	21.0	29.0	6.0	0.91	0.24	0.19	
8	24.0	33.1	6.9	1.04	0.28	0.22	
9	28.0	38.6	8.0	1.22	0.32	0.26	
10	31.0	42.8	8.9	1.35	0.36	0.29	
11	33.0	45.5	9.5	1.43	0.38	0.31	
12	38.0	52.4	10.9	1.65	0.44	0.35	
13	42.0	58.0	12.1	1.83	0.49	0.39	
14	47.0	64.8	13.5	2.04	0.54	0.44	
15	51.0	70.3	14.6	2.22	0.59	0.47	
16	56.0	77.2	16.1	2.43	0.65	0.52	
17	60.0	82.8	17.3	2.61	0.69	0.56	
18	62.5	86.2	18.0	2.72	0.72	0.58	
19	65.5	90.3	18.8	2.85	0.76	0.61	
20	67.0	92.4	19.3	2.91	0.77	0.62	
21	70.0	96.6	20.1	3.04	0.81	0.65	
22	72.5	100.0	20.8	3.15	0.84	0.67	

Rx\*\* Taking as reference bovine albumin.  
 Rx\* Taking as reference lysozyme.

Tab. 3. Percentage and number of protein bands in function of Pm in male and female of *Bovicola limbatus*

	Male	Female	Nr. total bands
Nr. of bands with Pm superior to 66,000 daltons	5 (33.33 %)	7 (31.81 %)	12
Nr. of bands with Pm understood amongst 66,000—45,000 d.	3 (20.00 %)	5 (22.70 %)	8
Nr. of bands with Pm understood amongst 45,000—24,000 d.	5 (33.33 %)	8 (36.40 %)	13
Nr. of bands with Pm understood amongst 24,000—14,300 d.	2 (13.33 %)	2 ( 9.10 %)	4
Nr. of bands with Pm inferior to 14,300 d.	—	—	—
Total	15	22	37

males and females. If we observe the total number of bands by intervals, it is seen that the highest number of bands (13) appears in the interval of 45,000—24,000 daltons and overhead 66,000 daltons (12 bands). The absence of bands is shown in males as well as females under 14,300 daltons.

This work has been supported by a grant from Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (C.A.I.C.Y.T. Project no. 3224/83).

**Zusammenfassung.** Analyse der Elektromobilität verschiedener Proteinfractionen von *Bovicola limbatus* (Mallophaga: Insecta). — Die Autoren charakterisierten die Gesamtproteine bei Männchen und Weibchen von *B. limbatus* GERVAIS, 1844 und bestimmten die R(mb), Rx, Rf und Pm jedes Proteins im einzelnen. Danach bestimmten sie erstmalig die Anzahl der Proteinbänder gemäß ihres Pm.

**Резюме.** Анализ электроподвижности различных протеиновых фракции *Bovicola limbatus* (Mallophaga: Insecta). — Авторы характеризуют общий белок у самцов и самок *Bovicola limbatus* и определяют R(mb), Rx, Rf и Pm каждого протеина. Затем они впервые определяют количество протеиновых банд в соответствии с их Pm.

**Summary.** The authors characterize in male and female of *Bovicola limbatus* GERVAIS, 1844 the total proteins of this species by means of SDS-PAGE determining the R(mb), Rx, Rf and Pm of each protein in particular and studying finally the number of protein bands in function with their Pm. It is the first time that this study has been made in a species of the order Mallophaga.

**References**

BENÍTEZ, RODRIGUEZ, R.; SOLER CRUZ, M. D.; GUEVARA BENÍTEZ, D. C. (1985): Morphologische Unterschiede der Weibchen von *Bovicola caprae* und *Bovicola limbata* (Mallophaga). — *Angew. Parasitol.* **26**: 241—243.  
 IGBOKWE, E. C.; DOWNE, A. E. R. (1978): Differential electrophoretic behaviour among strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). — *J. Med. Entomol.* **14** (6): 602—605.  
 LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T<sub>4</sub>. — *Nature* **227**: 680—685.  
 LUNT, S. R. (1979): The use of electrophoresis in taxonomic study of the *Aedes varipalpus* and the *A. atropalpus* group. — *Mosquito System.* **11** (4): 278—279.  
 PEREZ, M. I.; MASCARO, M. L.; MASCARO, M. C.; OSUNA, A. (1982): La electroforesis como un medio para la identificación taxonómica de Amebas limax: Protozoa, Lobosea. — *Rev. Ibér. Parasitol.* **42** (3): 335—341.  
 RAVANASIDDARAH, H. M.; CHOWDAH, B. H. (1982): Electrophoretic studies on protein changes during developmental stages of *Anopheles stephensi*. — *Indian J. Med. Res.* **75**: 40—44.  
 SOLER CRUZ M. D.; BENITEZ RODRIGUEZ, R.; FLORIDO NAVIO, A.; MUÑOZ PARRA, S. (1987): Zur Morphologie der Männchen von *Bovicola caprae* und *B. limbatus* (Mallophaga: Bovicolidae). — *Angew. Parasitol.* **28**: 109—111.  
 TOWSON, H. (1969): Electrophoretic identification of strains of *Aedes aegypti*. — *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **63**: 19—20.  
 WARREN, M. E.; BRELAND, O. P. (1969): Electrophoretic patterns in mosquitoes. — *Mosquito News* **29** (2): 172—182.  
 WHITTAKER, J. R.; WEST, A. S. (1962): A starch gel electrophoretic study of insect hemolymph proteins. — *Can. J. Zool.* **40**: 655—671.

Authors' address: c/o Dra. M. D. SOLER CRUZ, Departamento de parasitología, Universidad de Granada, Facultad de Farmacia, 18001 - Granada, Spain.

**Kulzer, E., Fiedler, M., Kling, D., Kimmich, F.** (1986): Die Toxizität der Pyrethroide bei Süßwasserorganismen dargestellt am Beispiel des Insektizides DECIS (Deltamethrin). — *Agrar- und Umweltforschung in Baden-Württemberg*, Band 15. — Stuttgart (Verlag Eugen Ulmer), 165 S., 18 Abb., 39 Tab.; 8 S. Lit; Kt. 44,00 DM. — Die negativen Aspekte der Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide und die minimale Warmblütertoxizität der Pyrethrine stimulierten die Synthese von pyrethrinähnlichen Insektiziden, die man als Pyrethroide bezeichnet und die heute schon 30% der Insektizidanwendung im Weltmaßstab bestreiten. Spitzenreiter ist Deltamethrin:  $\alpha$ -Cyano-m-phenoxybenzyl(1R, 3R)-3-(2,2-dibromvinyl)-2,2-dimethylcyclopropan-1-carboxylat: es wird als „das wirksamste Insektizid der Welt“ bezeichnet (für Fliegen ist es 5000mal so toxisch wie für Nagetiere). Weil aber Pyrethrum immer schon als besonders fischtoxisch galt und bisher über die Umweltrelevanz der Pyrethroide bzw. ihre Wirkung auf „Nicht-Zielorganismen“ nur wenig verlautete, wurde dieser Frage in der vorliegenden Arbeit nachgegangen, was in gleichzeitig als mustergültig anzusehender Form gelungen ist, denn es werden einzeln die verschiedensten Wasserlebewesen auf ihre Empfindlichkeit gegen das Präparat „DECIS“ getestet — teilweise bis zu histologischen Aussagen. Besonders gründlich werden Forellen geprüft (während Wasserflöhe erstaunlicherweise fehlen und die Eintagsfliege *Cloëon* so — also orthographisch falsch — geschrieben wird). Hervorzuheben ist dabei auch die eingehende Behandlung der Verhaltenstoxikologie bzw. Insektizidphänologie — erleichtert durch die Eigenschaften des Wirkstoffes als neurotropes Gift. Im Gesamtergebnis der Arbeit wird eine außerordentlich große Fischtoxizität festgestellt, die in folgender Formulierung kulminiert; „Als Konsequenz ergibt sich die Forderung, daß der Umgang mit Pyrethroiden in der Nähe von natürlichen Gewässern mit ganz besonderer Vorsicht erfolgen muß. Es muß sichergestellt werden, daß diese Substanz[en] weder durch Verdriftung noch durch Dränagen in die Gewässer gelangen. Von dem Einsatz der Pyrethroide in Gewässern ist mit Ausnahme der Vektoren-Bekämpfung (z. B. bei *Anopheles*) dringend abzuraten.“ Wd. EICHLER (Berlin)

**Brès, P.** (1986): Public health action in emergencies caused by epidemics. A practical guide. — Geneva (World Health Organization); 287 S., 35 Abb., 83 Tab., Lit. nach jedem Kap.; brosch. 49,00 Sfr. — Da Ausbrüche übertragbarer Krankheiten in den vergangenen Jahren im Weltmaßstab zugenommen haben und bei einem Ausbruch nicht viel Zeit für ein umfangreiches Literaturstudium über gezielte Gegenmaßnahmen verbleibt, will die WHO mit der vorliegenden Broschüre den öffentlichen Gesundheitseinrichtungen eine kurzgefaßte Anleitung zum Handeln beim Auftreten epidemiologischer Notsituationen überreichen. Zunächst werden Hinweise für die Organisation eines „Emergency Health Service“ innerhalb eines nationalstaatlichen Systems gegeben bis hin zu Indikationen für die Einschaltung von internationalen Hilfsaktionen bzw. der WHO. Es folgen Ausführungen zu Methoden der epidemiologischen Erfassung (Frühwarnsysteme, Fallfindungsmethoden, Feldeinsätze usw.). Danach werden Verfahren der Auswertung klinischen und epidemiologischen Materials besprochen (anhand sehr übersichtlicher Tabellen über wichtige Leitsymptome wie Fieber und Exantheme, über geographische Verbreitung bestimmter Infektionskrankheiten, Inkubationszeiten, Vektoren, über geeignete Labormethoden usw.). Das folgende Kapitel enthält die Bekämpfungsmaßnahmen (Desinfektion, Isolierung bzw. Quarantäne, Vakzinationen, Chemoprophylaxe; International Health Regulations). Schließlich werden die Folgemaßnahmen bzw. Auswertung nach Überwindung einer gefährlichen Epidemie besprochen. In 8 Annexen (machen mehr als 50% des gesamten Seitenumfanges aus) sind enthalten: epidemiologische Begriffe, Erfassungsmuster, typische Epidemieverläufe, statistische Methoden, kurze Beschreibungen der häufigsten übertragbaren Krankheiten, der Standard-Schutzausrüstungen, Hinweise zu sachgerechter Entnahme und zum Transport von Untersuchungsmaterial, Übersichten über Vektoren (einschließlich bildlicher Darstellungen), über Insektizide und Rodentizide, Dekontaminationsmethoden, schließlich auch eine Aufstellung der Spezialisten in der WHO auf den Gebieten der besprochenen Thematik. — Nicht enthalten sind Ausführungen zu den sexuell übertragbaren Krankheiten (bis auf einige kurze Anmerkungen zu AIDS), da sie nicht akute Notsituationen im Sinne der Definition dieser Publikation verursachen. — Insgesamt dürfte diese Broschüre für alle in der epidemiologischen Überwachung beschäftigten Mitarbeiter, besonders in den warmen Ländern, von großem Nutzen sein.

ST. SCHUBERT (Leipzig)

**Soós, Á.; Papp, L.** [Hrsg.] (1986): Catalogue of palaeartic Diptera. Volume 11: Scathophagidae — Hypodermatidae. — Budapest (Akadémiai Kiadó); 346 S., 940 Lit.; geb. 400,00 Ft. — Volume 12: Calliphoridae — Sarcophagidae. — Budapest (Akadémiai Kiadó); 265 S., zahlreiche Lit.; geb. 308,00 Ft. — Der vollständige Katalog über die paläarktischen Dipteren wird insgesamt 14 Bände umfassen und voraussichtlich 1990 vorliegen. Vol. 1: Trichoceridae — Nymphomyiidae; Vol. 2: Psychodidae — Chironomidae; Vol. 3: Ceratopogonidae — Mycetophilidae, in preparation; Vol. 4: Sciaridae — Anisopodidae, in preparation; Vol. 5: Athericidae — Asilidae; Vol. 6: Therevidae — Empididae; Vol. 7: Dolichopodidae — Platypezidae; Vol. 8: Syrphidae — Conopidae; Vol. 9: Micropezidae — Agromyzidae, 1984; Vol. 10: Clusiidae — Chloropidae, 1984; Vol. 11: Scathophagidae — Hypodermatidae, 1986; Vol. 12: Calliphoridae — Sarcophagidae, 1986; Vol. 13: Anthomyiidae — Tachinidae; Vol. 14: Index to volumes 1—13. — Herausgeber von Band 11 und 12 sind die bekannten Dipterologen NARTSHUK, E. P., PAPP, L., ROZKOŠNÝ, R., SCHUMANN, H., SOÓS, Á., ZAITZEV, V. F. Für die paläarktische Region wird als südliche Grenze die Sahara entlang 23°27' nördlicher Breite, die Arabische Halbinsel, West- und Nordpakistan, der Himalaja (außer Nepal) sowie 30° nördlicher Breite durch China und Japan definiert. Jede Dipterenfamilie ist einleitend mit Angaben zur Biologie, Entwicklung, Verbreitung und Zahl der Arten charakterisiert. Innerhalb der Familien oder Unterfamilien sowie der Gattungen sind die Synonyma alphabetisch geordnet. Die gültigen Artnamen sind innerhalb der Gattungen ebenfalls in alphabetischer Reihenfolge durch Fettdruck hervorgehoben worden. Synonyma der Artnamen treten im Kursivdruck, chronologisch geordnet, deutlich hervor. Es sind alle bis 1982 aus der Paläarktis in faunistischem bzw. entomologischem Schrifttum beschriebenen Arten enthalten. Die zweideutigen Namen, unsicheren Bezeichnungen sowie undeutbaren Artbeschreibungen werden als „nomina dubia“ oder „doubtful species“ bezeichnet. Band 11 enthält 175 Gattungen und 19 Untergattungen, 1337 Arten und 34 Unterarten in 9 Familien. Ferner sind die Synonyma von 221 Gattungen und 1412 Arten mit nahezu 360 Berichtigungen irrtümlicher Namen, Fehlbeschreibungen, nomina dubia, zweifelhafter Gattungen und Arten enthalten. Die 9 Dipterenfamilien wurden von folgenden Autoren bearbeitet: GORODKOV (Scathophagidae); PONT (Fanniidae, Muscidae); SOÓS & HURKA (Hippoboscidae); HRŮKA & SOÓS (Nycteribiidae, Streblidae); SOÓS & MIXAR (Gasterophilidae, Oestridae, Hypodermatidae). Die von PONT beschriebene Familie Muscidae basiert auf der von HENNIG (1955—1964) durchgeführten Revision der paläarktischen Musciden und der daraufhin in Europa hierzu erschienenen Literatur. Wenn HENNIG (1964) z. B. noch die Gattungen *Hydrotaea* und *Ophyra* unterschied, ordnet PONT den Gattungsbegriff *Ophyra* als Synonym von *Hydrotaea* ein. Die Artnamen *Ophyra aenescens*, *Ophyra capensis* usw. werden durch die Namen *Hydrotaea aenescens* (WIEDEMANN, 1830) bzw. *Hydrotaea capensis* (WIEDEMANN, 1818) ersetzt. — Band 12 enthält 130 Gattungen und 80 Untergattungen, 1036 Arten, 2 Unterarten in 2 Familien. Die Synonyma von 187 Gattungen und 828 Artnamen sind zusammen mit 430 Emendationen, irrtümlichen Namen, Fehlbeschreibungen, nomina dubia sowie zweifelhaften Gattungen und Arten aufgelistet. Die 2 Familien wurden von SCHUMANN (Calliphoridae) und VERVES (Sarcophagidae)