

V. Differentielle Konditionierungen von Honigbienen auf Bienenwachse mittels des Rüsselstreckreflexes

V.1. Einleitung

Die chemische Zusammensetzung von Waben- und Kutikulawachsen der Honigbiene *Apis mellifera carnica* Pollm. ist sehr komplex und variabel (Hepburn 1986), jedoch besitzen beide Wachsorten die gleiche qualitative Zusammensetzung, Unterschiede gibt es nur in den relativen Anteilen der jeweiligen Substanzen: Wabenwachs unterschiedlicher Altersklassen haben verschiedene chemische Zusammensetzungen (Kapitel II.3.1., Fröhlich et al. 2000a), Wabenwachs unterschiedlicher Kolonien variieren beträchtlich (Breed et al. 1995a), die chemische Zusammensetzung von Kutikulawachsen der Honigbienen variiert bei unterschiedlichen Kasten und Geschlechtern (Kapitel II. 3.3., Fröhlich et al. 2000a) und Berufsgruppen (Kapitel II.3.4.). Daß in den Waben- und Kutikulawachsen der Honigbienen Schlüssel für die Verwandten- und Nestgenosserkennung vorhanden sind, wurde im Kapitel I.5. ausführlich dargestellt. Ebenso könnte das Erkennen von Kasten, Geschlechtern, Berufsgruppen und Alter des Wabenwachses in den Unterschieden der chemischen Zusammensetzung der Wachs verschlüsselt sein.

Eventuell sind die Bienen auch in der Lage, aus der chemischen Zusammensetzung der Wachs auf deren physikalische Eigenschaften zu schließen bzw. anhand einer Veränderung der chemischen Zusammensetzung der Wachs die physikalischen Eigenschaften der Wachs zu beeinflussen. Dies würde jedoch ein Erkennen der Wachszusammensetzung voraussetzen (Kapitel IV.4.).

Die Perzeption von Wachs scheint sowohl auf einer Kontaktchemoperzeption als auch auf olfaktorischer Perzeption zu beruhen. Über die Sinnesphysiologie bei der Erkennung von Wachsen über Kontaktchemorezeptoren ist kaum etwas bekannt. Lediglich Martin und Lindauer beschrieben 1966 eine „Terminalborste“ an den Antennen als kombinierten Mechano-Chemorezeptor. Die Sinnesphysiologie der Duftperzeption bei Honigbienen wurde schon in einigen Studien untersucht (Esslen und Kaissling 1976, Vareschi 1971, Joerges et al. 1997). Honigbienen lernen bestimmte Düfte von verschiedenen Substanzklassen (Säuren, Alkohole, Oxo-Säuren, Ketone, Terpenole und Blumendüfte) sehr gut zu unterscheiden (Vareschi 1971). Weniger flüchtige Substanzen, z.B. Kutikulabestandteile des Thorax, können genauso gut unterschieden werden (Getz et al. 1986). Da das Wachs bis zu 70 % aus aliphatischen Komponenten besteht (Kapitel II.1., Fröhlich et al. 2000a, Hepburn 1986), und die Profile dieser Aliphaten stark variieren, konzentrierte man sich bei der Suche nach

aliphatischen Kohlenwasserstoffe (Reviews: Howard 1993, Smith and Breed 1995). Bis jetzt ist immer noch unklar, welche Substanzen denn tatsächlich von den Honigbienen zur Erkennung genutzt werden (Breed et al. 1995, Breed et al. 1998).

In diesem Kapitel wird der Frage nachgegangen, ob die signifikanten chemischen Unterschiede, die mit der Analytik gefunden wurden, auch für die Bienen relevant sind. Nutzen die Bienen eben diese Unterschiede als Schlüssel bei der Wachserkennung, oder sind die Unterschiede für die Bienen nicht von Bedeutung? Und in welchen Substanzklassen liegen die Erkennungsschlüssel für die Bienen? Anhand der differentiellen Konditionierung des Rüsselstreckreflexes (Bitterman et al. 1983, Getz et al. 1988, Menzel et al. 1993) mit verschiedenen Wachsen und Wachsfraktionen wurden Honigbienen auf ihre Fähigkeit, zwischen den Wachsen zu unterscheiden, getestet.

V.2. Material und Methoden

V.2.1. *Wabenwachse unterschiedlicher Altersklassen.* Für die Rüsselstreckreflexversuche mit Wabenwachsen unterschiedlicher Altersstufen wurden dieselben Wachse verwandt, die auch für die chemischen Analyse herangezogen wurden (Kapitel II.2.1.). Die Wachsschuppen und Wabenwachse wurden in Chloroform mit einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Im Sommer 1998 wurden mittels Festphasenextraktion zwei Fraktionen der Wachse durch Elution mit Hexan (Fraktion A) und anschließend mit Diethylether (Fraktion B) gewonnen. Im Sommer 1999 wurden drei Fraktionen durch Elution mit Hexan (Fraktion A), Isopropylchlorid (Fraktion C) und Diethylether (Fraktion D) erhalten, wobei die Fraktion B des Vorjahres den Fraktionen C+D entspricht (Abb. V.1). Die vorangegangenen chemischen Analysen haben gezeigt, daß eine dritte bzw. vierte Fraktion (Fraktion E) mit einer Mischung aus Chloroform, Methanol und dest. Wasser (13:5:1) eluiert werden kann. Diese Fraktion war aber aufgrund ihrer polaren Bestandteile nicht direkt für eine GC-MS-Analyse geeignet (Kapitel II.3.1.).

V.2.2. *Kutikulawachse unterschiedlicher Geschlechter.* Für die Gewinnung der Kutikulawachse unterschiedlicher Geschlechter wurden Innendienstbienen und Drohnen unterschiedlichen Alters im Sommer 1999 aus einem 2-rahmigen Beobachtungsstock abgefangen. Die Bienen wurden sofort nach dem Abfangen in flüssigem Stickstoff (N₂) getötet und bis zur weiteren Verarbeitung bei – 18 °C aufbewahrt. Es wurden Wachsextrakte mit Chloroform gemäß den Angaben in Kapitel II.2.3. hergestellt. Einziger Unterschied bestand darin, daß für die Lösungen bei den Rüsselstreckreflexversuchen Gruppen von je 6 bzw. je 20 Arbeiterinnen oder Drohnen bei der Extraktion gepoolt wurden. Die Wachse wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml Chloroform aufgenommen und mittels einer Festphase in drei Fraktionen getrennt. Fraktion A wurde mit Hexan, Fraktion C mit Isopropylchlorid und Fraktion D mit Diethylether eluiert (Fraktion B = Fraktion C+D).

V.2.3. *Kutikulawachse unterschiedlicher Berufsgruppen.* Für die Gewinnung von Kutikulawachsen unterschiedlicher Berufsgruppen wurden Bienen aus dem Beobachtungsstock abgefangen, der auch für die Gewinnung der Kutikulaextrakte für die chemische Analyse verwendet wurde (Kapitel II.2.4.). Die Bienen wurden im Alter von 11-14 Tagen abgefangen, in flüssigem Stickstoff (N₂) getötet und bis zur weiteren Verarbeitung bei – 18 °C aufbewahrt. Gruppen von je 20 Sammlerinnen, Innendienstbienen und Hofstaatbienen wurden mit Chloroform extrahiert (Kapitel II.2.4.) und die Gesamtextrakte in Chloroform in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst.

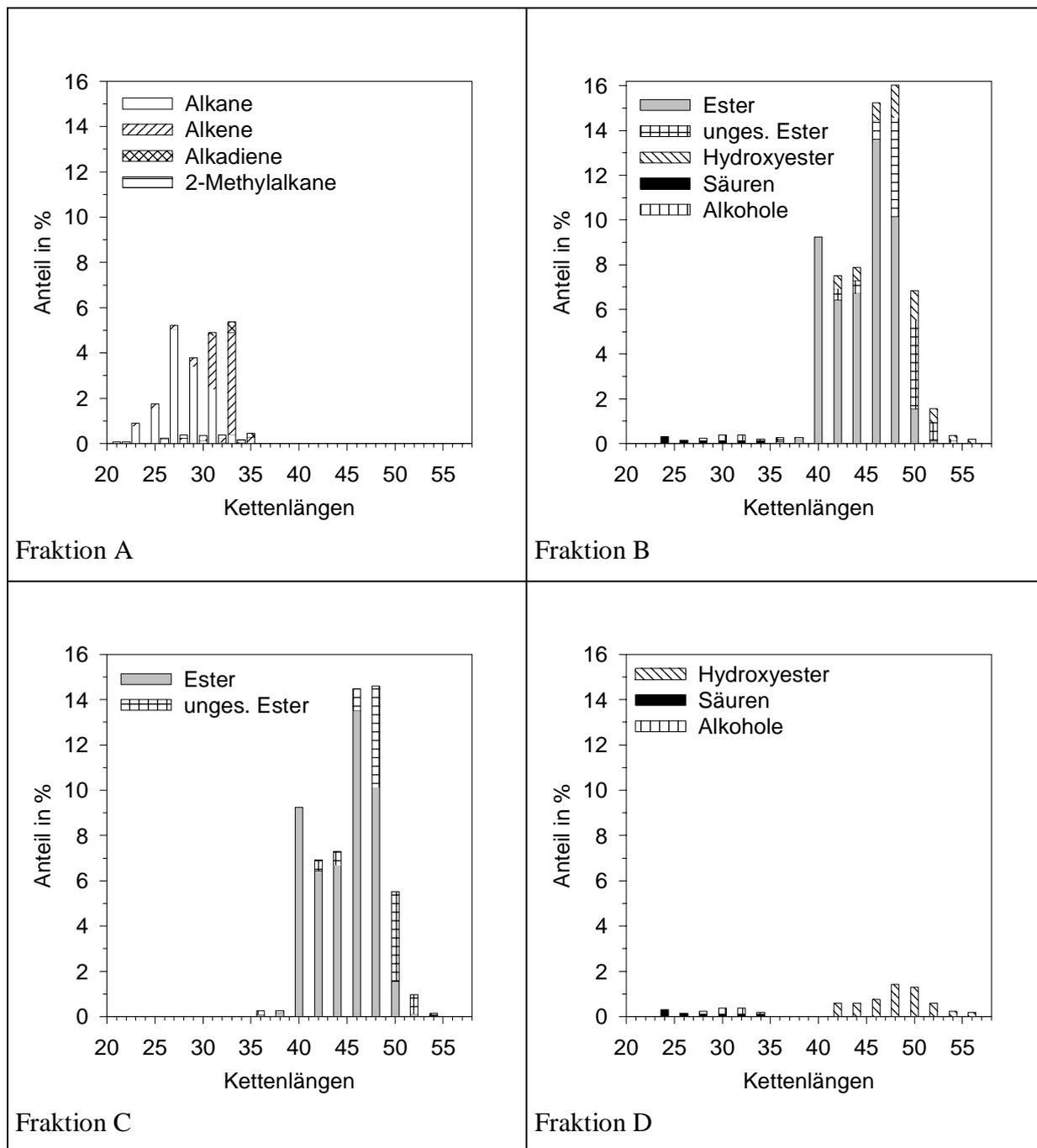


Abbildung V.1: Relative chemische Zusammensetzungen und Kettenlängenverteilungen der Fraktionen A bis D eines mittelalten Wabenwachses von *Apis mellifera carnica* Pollm.

V.2.4. *Auftragung der Wachse.* Um die Wachse den Bienen bei der Rüsselstreckreflexdressur anbieten zu können, wurden sie auf Glasstäbchen aufgetragen. Dabei wurden sowohl von den Gesamtextrakten, als auch von den einzelnen Fraktionen ca. 100-200 µl Wachslösung auf die Stäbchen appliziert und das Lösungsmittel bei Raumtemperatur verdampft. Die Wabenwachse wurden zusätzlich bei 90 °C für 3 min im Heizschrank eingeschmolzen. Bei den

eliminieren. Die vorbereiteten Wachsstäbchen wurden im Gefrierschrank bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Um die Oberflächen der Wachse auf den Stäbchen mit denen unter natürlichen Bedingungen vergleichen zu können, wurden rasterelektronische Aufnahmen von den nativen Wachsoberflächen und von den künstlichen Wachsoberflächen auf den Stäbchen angefertigt.

V.2.5. Konditionierungen. Honigbienen reagieren auf eine Reizung der Antennen mit einem starken Stimulus, wie zum Beispiel Zuckerwasser mit einem bedingten Reflex, nämlich mit einem Ausstülpfen des Rüssels (Proboscis). Dieser bedingte Rüsselstreckreflex wird bei Verhaltensversuchen zum Lernvermögen von Honigbienen genutzt. (Vareschi 1971, Bitterman 1983, Menzel et al. 1993). Dabei wird z.B. die Berührung der Antennen mit einer Wachsoberfläche als relativ neutraler Stimulus, auf den die Bienen nicht mit einem bedingten Reflex reagieren, mit einer Reizung der Antennen mit Zuckerwasser gepaart und damit der Rüsselstreckreflex ausgelöst. Anschließend wird die Biene mit Zuckerwasser belohnt, indem sie an dem Zuckerwasser saugen kann. Diese Abfolge von Wachsstimulus, Zuckerstimulus und Zuckergabe wird als ein Lernakt definiert. Durch diese Abfolge von Wachs und Zuckerwasser lernen die Bienen nach wenigen Lernakten, das Wachs mit der Zuckergabe zu assoziieren und es erfolgt eine Rüsselstreckung schon auf die Reizung der Antennen mit Wachs. Allgemein ausgedrückt wird ein für naive Testbienen relativ neutraler Stimulus (konditionierender Stimulus, CS) mit einem sehr starken Stimulus wie z.B. Zuckerwasser gepaart und darauf belohnt (unkonditionierender Stimulus, US). Nach erfolgreichem Lernen kann allein der relativ neutrale CS (z.B. Wachs auf einem Glasstab) den Rüsselstreckreflex auslösen. Es wird dann von einer klassischen Konditionierung gesprochen.

Eine weitere Methode ist die differentielle klassische Konditionierung des Rüsselstreckreflexes. Mit dieser kann geprüft werden, ob Bienen zwischen zwei Stimuli (mit bzw. ohne Zuckergabe) diskriminieren können (Menzel et al. 1993). Dazu werden zwei verschiedene CS verwendet. In dieser Studie waren dies verschiedene Wabenwachse oder Kutikulawachse unterschiedlicher Kasten, Geschlechter oder Berufsgruppen der Bienen auf Glasstäbchen. Bei der differentiellen Konditionierung wird ein Wachs als positiv konditionierender Stimulus (CS+, erregende Eigenschaften) mit dem Zuckerstimulus und anschließender Belohnung (US+) gepaart, beim anderen Wachs als negativ konditionierender Stimulus (CS-, inhibitorische Eigenschaften) wird weder mit Zuckerwasser die Antennen gereizt, noch erhält die Biene eine Belohnung (US-). Somit ist zu erwarten, daß nach wenigen Lernakten die getesteten Bienen auf den CS+ mit einem Rüsselstreckreflex reagieren, wie auch bei der oben beschriebenen klassischen Konditionierung. Auf den CS-, bei dem die

Konditionierung zu überprüfen, werden nach einer gewissen Anzahl an Lernakten Testakte durchgeführt, bei denen die Bienen nur noch die beiden verschiedenen CS angeboten bekommen und der US weggelassen wird. Eine Diskrimination der beiden Stimuli erfolgt dann, wenn die Reaktion der Bienen (Rüsselstreckung) in den Testakten auf den CS+ höher ist als auf den CS-. Diese Diskrimination kann jedoch nur stattfinden, wenn die Unterschiede zwischen den Wachsen von den Bienen erlernt werden können. Für die differentielle Konditionierung muß der unconditionierende Stimulus sehr rasch auf den konditionierenden Stimulus folgen (in einem Abstand von 2-3 Sekunden). Zwischen den einzelnen Lernakten sollten mindestens 30 Sekunden liegen (Menzel et al. 1993). In dieser Studie lagen zwischen den einzelnen Lernakten mehrere Minuten.



Abbildung V.2: Rüsselstreckreflex der Honigbiene *Apis mellifera carnica* Pollm. auf den unconditionierenden Stimulus US+ (Zuckerwasser, links) und den konditionierenden Stimulus CS+ (Wachs, rechts).

Die differentielle klassische Konditionierung des Rüsselstreckreflexes erfolgte nach einer bei Menzel et al. (1993) ausführlich beschriebenen Methode, die leicht verändert wurde. Am Stockeingang wurden abfliegende Sammlerinnen als Testbienen abgefangen. Die Testbienen für die Wabenwachse stammten aus einem anderen Stock als die Wachse selbst, bei den Kutikulawachsen stammten die Wachse und die Testbienen aus demselben Stock. Die Testbienen wurden in Röhrchen eingespannt, so daß sie nur die Mundwerkzeuge und die Antennen frei bewegen konnten (Abbildung V.2). Als unconditionierender Stimulus wurde 1-molare Glucoselösung verwendet.

Die differentiellen Konditionierungen wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Lernakte:	1	2	3	4	5	6
CS:	+	-	-	+	-	+
US:	+	-	-	+	-	+
Testakte:	7	8	9	10	11	12
CS:	+	-	-	+	-	+

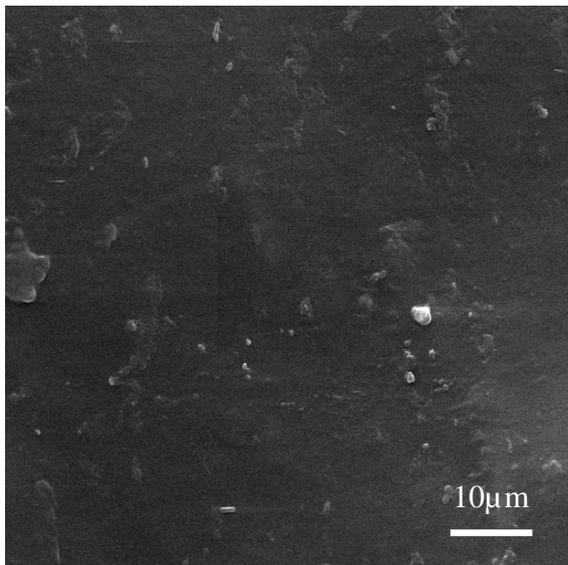
Das Schema ist folgendermaßen zu verstehen: Beim ersten Lernakt erfolgte eine Reizung mit CS+ und eine darauffolgende Präsentation von US+, d.h. Zuckerstimulus und Belohnung (Lernakt 1: CS+, US+). Beim zweiten Lernakt wurden die Antennen nur mit CS- stimuliert und es erfolgte keine Zuckergabe (Lernakt 2: CS-, US-) usw. Bei den Testakten wurde, wie oben schon erwähnt, nicht mehr mit Zuckerwasser belohnt. Die Abfolge der Lernakte und Testakte mit CS+ bzw. CS- war pseudozufallsverteilt.

Für jedes Experiment wurden zwei Wiederholungen mit je 20 Bienen durchgeführt. Als nicht zu erlernende Kontrolle wurden Wachse aus derselben Lösung auf zwei verschiedene Glasstäbchen aufgetragen und als CS+ und CS- konditioniert. Die Kontrolle im Jahr 1998 bestand aus 3 Wiederholungen, die Kontrolle im Jahr 1999 bestand aus sieben Wiederholungen. Bienen, die im ersten Lernakt spontan mit einem Rüsselstreckreflex auf den CS+ Stimulus reagierten (Spontanreaktionen), wurden aus dem Versuch genommen.

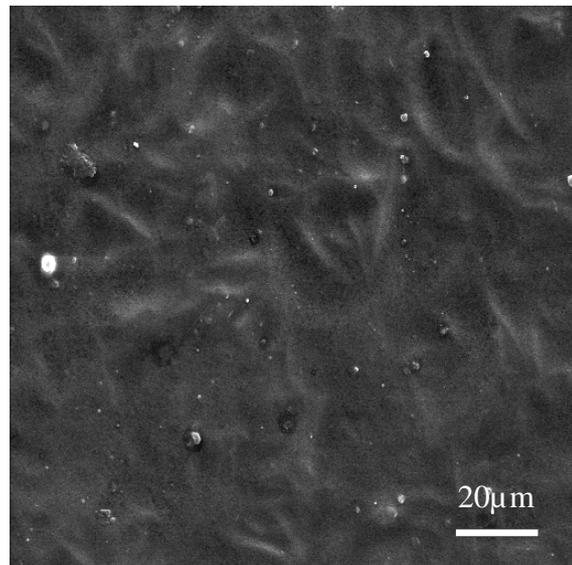
V.2.6. *Auswertung der Daten.* Die Fehler pro Biene in der Testphase wurden gemäß Getz et al. (1986) ermittelt. Es wurden Fehlerhäufigkeitsverteilungen mit der Anzahl der Individuen, die 0 bis 6 Fehler machten, für jede Gruppe von ca. 40 Bienen aufgestellt. Zusätzlich wurden die Mediane dieser Fehlerverteilungen berechnet. Mit Hilfe von Chi^2 -Anpassungstests wurden die Fehlerverteilungen der Versuche mit denen der Kontrollexperimente verglichen. Bei signifikanten Unterschieden zwischen Versuch und Kontrolle kann davon ausgegangen werden, daß die Bienen die Wachse des Versuches unterscheiden können. Um den Fehler 1. Art bei der statistischen Auswertung zu verringern, wurden folgende Signifikanzniveaus definiert: signifikant bei $p \leq 0,0001$, nicht signifikant bei $p > 0,0001$.

V.3. Ergebnisse

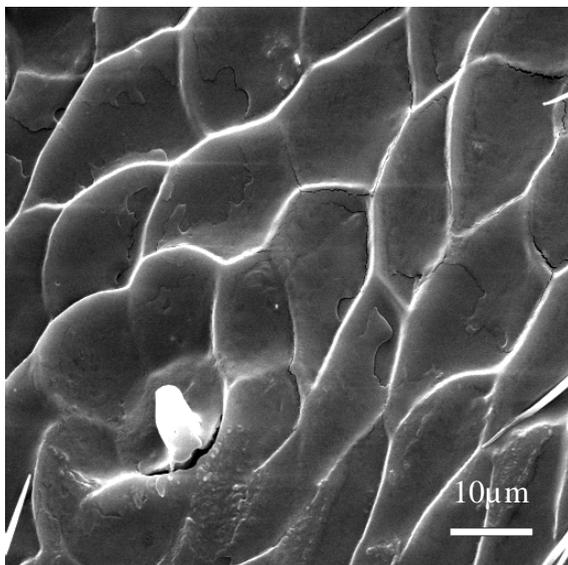
V.3.1. *Wachsoberflächen.* Anhand von REM-Aufnahmen konnten die Oberflächen der Wachse verglichen werden. Die Oberflächen der Wabenwache auf den Glasstäbchen waren der nativen Oberfläche des Wabenwachses (Zellenwand innen) sehr ähnlich. Die Oberflächen waren glatt und wiesen keine Kristallbildung auf (Abb. V.3: A+B).



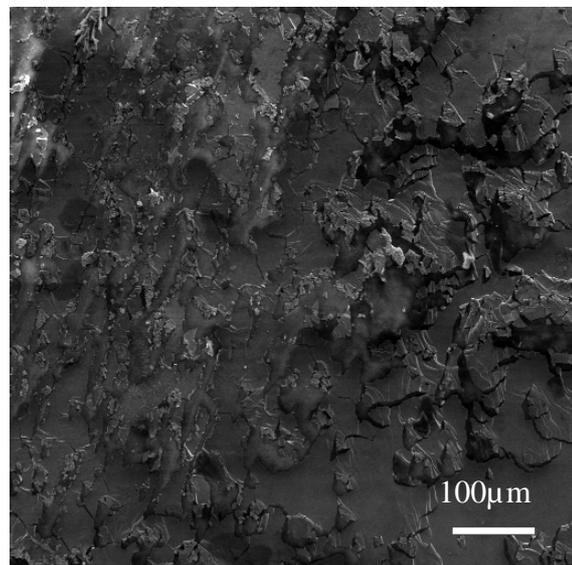
A



B



C



D

Abbildung V.3: Rasterelektronische Aufnahmen von A: Zellwand von mittelaltem Wabenwachs, B: mittelaltes Wabenwachs eingeschmolzen auf Glasstab, C: Thorax einer Arbeiterin mit Kutikulawachs, D: Kutikulawachs einer Arbeiterin aufgetragen auf Glasstab

Bei den Kutikulawachsen ergab sich durch das Fehlen des Schmelzvorgangs eine etwas andere Oberfläche auf dem Glasstab als im nativen Zustand des Kutikulawachses. Die artifiziellen Oberflächen der Kutikulawachse wiesen eine geringe Kristallbildung auf (Abb. V.3: C+D).

V.3.2. *Vorversuche für die Kutikulawachse.* Um Angaben darüber zu bekommen, wieviel Individuen gepoolt werden müssen, um eine Diskriminierung der Wachse aufgrund von Individualerkennung ausschließen zu können, wurden Wachsextrakte von zwei Gruppen mit je 6 (ID6/1 und ID6/2) bzw. je 20 (ID20/1 und ID20/2) Innendienstbienen auf Glasstäbchen aufgetragen und Testbienen aus demselben Stock differentiell auf diese Wachse konditioniert.

Tabelle V.1: Lernexperimente mit Kutikulawachsextrakten von Innendienstbienen mit unterschiedlicher Gruppengröße: Anzahl der getesteten Bienen (n) und Median der Fehler (Z_e) für jede Kombination der Wachse (Kontrolle 1998: n=50, $Z_e=2,99$).

Innendienst		ID6/1	Innendienst		ID20/1
6 Individ.		+	20 Individ.		+
ID6/2	-	38 (n) 1,40 (Z_e) sign	ID20/2	-	36 2,96 ns

sign = signifikanter Unterschied, ns = nicht signifikant

Dabei konnten die Bienen signifikant zwischen Kutikulawachsen von Gruppen mit je 6 Individuen unterscheiden ($Z_e = 1,40$). Die Diskriminierung bei Gruppen von 20 Individuen ($Z_e = 2,96$) gelang nicht mehr (Tab. V.1).

V.3.3. *Auftragung der Wachse.* Um flüchtige Substanzen nicht auszuschließen, wurden die Kutikulawachse auf den Glasstäbchen nicht eingeschmolzen. Mit einem Vorversuch sollte überprüft werden, welche Rolle das Einschmelzen der Wachse bei der Diskriminierung spielt. Dabei konnte gezeigt werden, daß der Vorgang des Einschmelzens auf die Diskriminierung der Wachse durch die Bienen keinen Einfluß hat. Lediglich bei der Konditionierung von Arbeiterinnen- (CS+) und Drohnenwachs (CS-) konnten die Bienen das nicht eingeschmolzenen Wachs besser unterscheiden, allerdings ist der Unterschied zwischen den Fehlerverteilungen der beiden Versuche nicht signifikant ($\chi^2 = 2,29$, FG = 1) (Tab. V.2).

Tabelle V.2: Lernexperimente mit Kutikulawachsextrakten bei unterschiedlicher Wachsauftragung auf die Glasstäbchen: Anzahl der getesteten Bienen (n) und Median der Fehler (Z_e) für jede Kombination der Wachse (Kontrolle 1999: $n=125$, $Z_e=2,96$).

nicht eingeschmolzen		ID6/1
		+
ID6/2	-	38 (n) 1,40 (Z_e)

eingeschmolzen		ID6/1
		+
ID6/2	-	37 (n) 0,58 (Z_e)

alle Ergebnisse sind signifikant

nicht eingeschmolzen		Drohne	
		+	-
Arbeiterin	+		38 (n) 2,64 (Z_e)
	-	34 2,17	

eingeschmolzen		Drohne	
		+	-
Arbeiterin	+		39 (n) 2,78 (Z_e) ns
	-	39 1,22	

ns = nicht signifikant

V.3.4. *Konditionierungen auf Wabenwachse.* Honigbienen können verschiedene Altersklassen von Wabenwachsen bei differentieller Konditionierung mit den Gesamtextrakten signifikant ($p < 0,0001$) unterscheiden. Die mittleren Fehler (Mediane) von 0,6 bis 2,17 lagen deutlich unter dem mittleren Fehler der Kontrolle mit 2,99. Bei den Konditionierungen von Wachsschuppen gegen verarbeitete Wabenwachse waren die Mediane bei Wabenwachs als positiv konditionierender Stimulus (CS+) geringer als bei Wachsschuppen als CS+. Dieser Unterschied zwischen den Medianen war jedoch nicht signifikant, es lag keine asymmetrische Konditionierung vor. (Tab. V.3)

Tabelle V.3: Lernexperimente von 1998 mit den Gesamtextrakten der Wabenwachse: verschiedene Kombinationen von CS+ und CS- Wachsen, Anzahl der getesteten Bienen (n) und Median der Fehler (Z_e) für jede Kombination der Wachse (Kontrolle 1998: n=50, $Z_e=2,99$, siehe Abb. V.4: B).

Gesamtextrakte		alt		mittelalt		jung	
		+	-	+	-	+	-
Schuppen	+		34 (n) 2,17 (Z_e)		38 2,10		37 1,86
	-	28 1,33		38 1,88		37 0,60	
jung	+		34 1,25		36 1,32		
	-	34 1,00		36 2,25			
mittelalt	+		33 1,92				
	-	31 2,33					

Box bezieht sich auf Abb.V.4: A, alle Paare ergeben signifikante Unterschiede.

Nach einer Fraktionierung der Wabenwachse wurde auf die einzelnen Fraktionen differentiell konditioniert. Bei der Auftrennung in die Fraktionen A und B (Sommer 1998) konnten die Bienen anhand der Fraktion A (Alkane, Alkene, Alkadiene, 2-Methylalkane) die Altersklassen der Wachse nicht unterscheiden. Die Unterscheidung der Altersstufen durch die Bienen aufgrund der Fraktion B (Alkylester, ungesättigte Alkylester, Hydroxyalkylester, Säuren und Alkohole) war genauso gut wie die Unterscheidung anhand der Gesamtextrakte (Tab. V.4).

In den Lernexperimenten im Sommer 1999 mit den Fraktionen A, C und D konnten die Bienen wiederum die Altersklassen der Wabenwachse aufgrund der Fraktion A nicht unterscheiden. Die Diskriminierung war auch bei der Konditionierung mit der Fraktion C (Alkylester, ungesättigte Alkylester) nicht möglich. Bei einer Konditionierung mit der Fraktion D unterschieden die Bienen die Altersklassen der Wachse signifikant ($p < 0,0001$) (Tab. V.5). In allen Kontrollversuchen gelang es den Bienen nicht, zwischen denselben

Tabelle V.4: Lernexperimente von 1998 mit den Fraktionen A und B von Wabenwachsen: verschiedene Kombinationen von CS+ und CS- Wachsen, Anzahl der getesteten Bienen (n) und Median der Fehler (Z_e) für jede Kombination der Wachse (Kontrolle 1998: n=50, $Z_e=2,99$).

Fraktion A		alt		mittelalt		Schuppen	
		+	-	+	-	+	-
jung	+		36 (n) 2,80 (Z_e) ns		39 2,73 ns		40 2,68 ns
	-	37 2,60 ns		35 2,77 ns		37 2,84 ns	

ns: nicht signifikant

Fraktion B		alt		mittelalt		Schuppen	
		+	-	+	-	+	-
jung	+		39 (n) 0,75 (Z_e)		36 1,30		37 1,25
	-	38 1,00		37 1,31		38 1,92	

Box bezieht sich auf Abb. V.4: D, alle Paare ergeben signifikante Unterschiede

Tabelle V.5: Lernexperimente von 1999 mit den Fraktionen A, C und D von altem und jungem Wabenwachs: verschiedene Kombinationen von CS+ und CS- Wachsen, Anzahl der getesteten Bienen (n) und Median der Fehler (Z_e) für jede Kombination der Wachse (Kontrolle 1999: n=125, $Z_e=2,96$).

Fraktion A		alt	
		+	-
jung	+		38 (n) 2,90 (Z_e) ns
	-	38 2,96 ns	

Box bezieht sich auf Abb. V.4: C,
ns: nicht signifikant

Fraktion C		alt	
		+	-
jung	+		57 (n) 2,99 (Z_e) ns
	-	57 2,83 ns	

Box bezieht sich auf Abb. V.4: E,
ns: nicht signifikant

Fraktion D		alt	
		+	-
jung	+		39 (n) 2,69 (Z_e)
	-	39 1,58	

Box bezieht sich auf Abb. V.4: F, alle
Paare ergeben signifikante Unterschiede

Diese Diskriminierungsunterschiede bei den Konditionierungen auf verschiedene Fraktionen der Wachse wurden auch in den Diskriminierungskurven deutlich. Je höher die CS+ - Kurve anstieg und je größer der Unterschied zwischen CS+ und CS- war, desto besser konnten die Bienen die angebotenen Wachse und Fraktionen von Wachsen unterscheiden. War eine Unterscheidung nicht möglich, z.B. in der Kontrolle, dann lagen die beiden Kurven für CS+ und CS- aufeinander und der Anteil des Rüsselstreckreflexes lag bei beiden Stimuli bei annähernd 50 %.

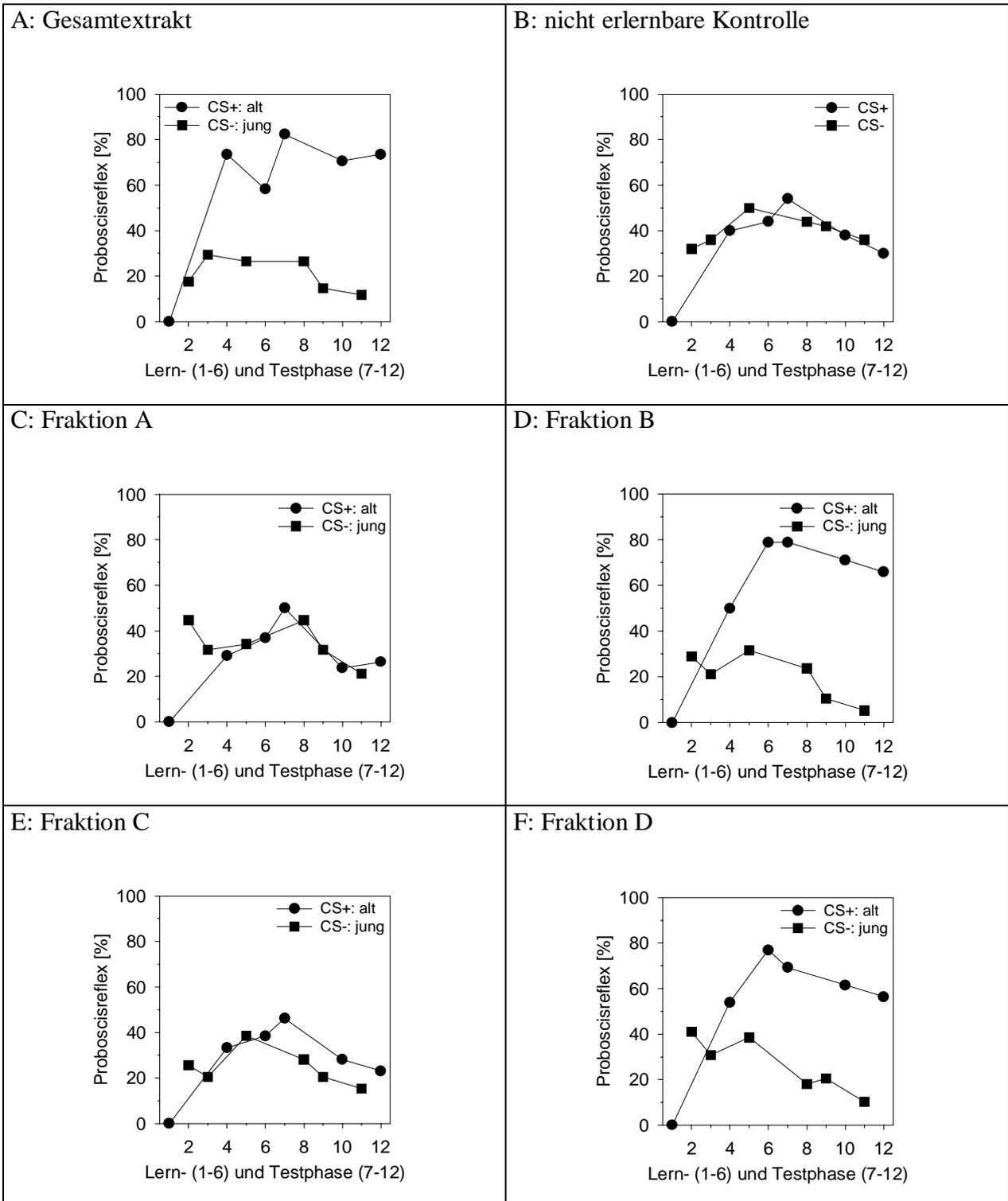


Abbildung V.4: Diskriminierungskurven (n = 20 + 20 Bienen für jeden Plot) als Ergebnis der differentiellen Konditionierung des Rüsselstreckreflexes bei *Apis mellifera carnica* Pollm. Es wurden zwei Wabenwachse (alt und jung) als Gesamtextrakte und als einzelne Fraktionen A bis D getestet.

A, D und F: Bienen unterscheiden die Wachse

V.3.5. Konditionierungen auf Kutikulawachse unterschiedlicher Geschlechter.

Tabelle V.6: Lernexperimente von 1999 mit den Gesamtextrakten und den Fraktionen A - D von Arbeiterinnen- und Drohnen- Kutikulawachs: verschiedene Kombinationen von CS+ und CS- Wachsen, Anzahl der getesteten Bienen (n) und Median der Fehler (Z_e) für jede Kombination der Wachse (Kontrolle 1999: n=125, Z_e =2,96).

Gesamtextrakt		Drohne	
		+	-
Arbeiterin	+		38 (n) 2,64 (Z_e)
	-	34 2,17	

Fraktion A		Drohne	
		+	-
Arbeiterin	+		40 (n) 2,95 (Z_e) ns
	-	36 2,79 ns	

Fraktion B		Drohne	
		+	-
Arbeiterin	+		37 (n) 2,42 (Z_e)
	-	34 2,00	

Fraktion C		Drohne	
		+	-
Arbeiterin	+		40 (n) 2,05 (Z_e)
	-	38 2,50	

Fraktion D		Drohne	
		+	-
Arbeiterin	+		39 (n) 1,78 (Z_e)
	-	37 1,45	

ns = nicht signifikant, alle anderen Paare sind signifikant unterschiedlich.

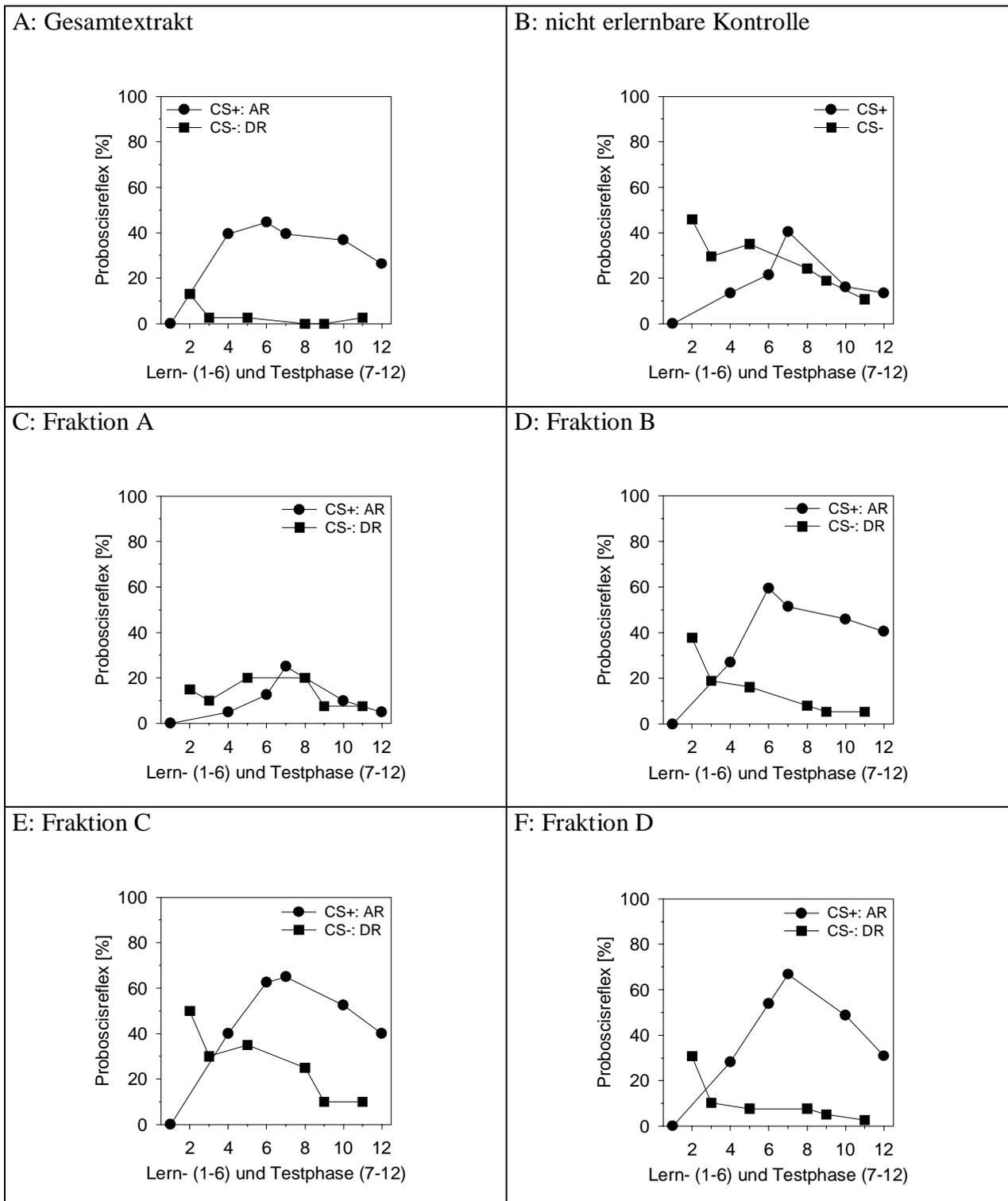


Abbildung V.5: Diskriminierungskurven (n = 20 + 20 Bienen für jeden Plot) als Ergebnis der differentiellen Konditionierung des Rüsselstreckreflexes bei *Apis mellifera carnica* Pollm. Es wurden zwei Kutikulawachse (Arbeiterinnen AR und Drohnen DR) als Gesamtextrakte und als einzelne Fraktionen A bis D getestet.

A, D, E und F: Bienen unterscheiden die Wachse

B und C: Bienen unterscheiden die Wachse nicht

Bei der differentiellen Konditionierung auf Kutikulawachse unterschiedlicher Geschlechter (Arbeiterinnen AR und Drohnen DR) konnten die Bienen die Kutikulawachse anhand der Gesamtextrakte und anhand der Fraktionen B, C und D signifikant unterscheiden. Anhand der Alkane, Alkene, Alkadiene und 2-Methylalkane der Fraktion A war eine Unterscheidung der Geschlechter nicht möglich (Tab. V.6). Die beste Unterscheidung erfolgte bei Konditionierung auf Fraktion D (Hydroxyalkylester, Säuren und primäre Alkohole) mit Fehlermedianen von 1,78 und 1,45.

In den Diskriminierungskurven wurde ebenfalls deutlich, daß die Bienen anhand der Fraktion A die Wachse nicht unterscheiden konnten. In der Kontrolle bei Konditionierung auf dasselbe Wachs auf unterschiedlichen Glasstäbchen trat ebenfalls keine Unterscheidung auf. Insgesamt lagen die Werte des Rüsselstreckreflexes bei Konditionierung auf Kutikulawachse um ca. 20 % niedriger als bei den Diskriminierungskurven, die aus den Konditionierungen auf Wabenwachse hervorgingen. (Abb. V.5)

V.3.6. Konditionierungen auf Kutikulawachse unterschiedlicher Berufsgruppen. Bei den Kutikulawachsen unterschiedlicher Berufsgruppen wurde nur auf die Gesamtextrakte der Wachse konditioniert. Dabei konnte gezeigt werden, daß Honigbienen in der Lage sind, Sammlerinnen, Innendienstbienen und Hofstaatbienen anhand der Kutikulawachse zu unterscheiden. Dabei war die Diskriminierung am besten, wenn auf das Wachs von Hofstaatbienen als positiv konditionierender Stimulus trainiert wurde (Mediane der Fehler: 1,04 und 1,39). Diese Asymmetrie in der Konditionierung war signifikant mit $\text{Chi}^2 = 50,38$ (FG = 3). (Tab. V.7)

Tabelle V.7: Lernexperimente von 1998 mit Kutikulawachsen unterschiedlicher

getesteten Bienen (n) und Median der Fehler (Z_e) für jede Kombination der Wachse (Kontrolle 1998: n=50, $Z_e=2,99$).

Gesamtextrakte		Sammlerin		Hofstaat	
		+	-	+	-
Innendienst	+		74 (n) 2,70 (Z_e)		72 2,58
	-	75 2,51		76 1,04	
Hofstaat	+		38 1,39		
	-	38 1,93			

alle Paare ergeben signifikante Unterschiede

V.4. Diskussion

V.4.1. Wachsoberflächen. Aus den rasterelektronischen Bildern der Wachsoberflächen ist ersichtlich, daß die nativen und artifiziellen Oberflächen teilweise unterschiedlich beschaffen sind. Bei den Wabenwachsen erhält man durch den Vorgang des Aufschmelzens auf das Glas Oberflächen, die mit den nativen Oberflächen vergleichbar sind. Da durch das Einschmelzen flüchtige Substanzen, die bei der Wachsdiskriminierung eine Rolle spielen könnten, abdampfen könnten, wurden die Unterschiede zwischen den artifiziellen Oberflächen und den nativen Oberflächen bei den Kutikulawachsen in Kauf genommen.

Die Diskriminierung der Wachse durch die Bienen anhand der artifiziellen Oberflächen ist nicht auf deren unterschiedliche Beschaffenheit zurückzuführen, denn in den Kontrollversuchen mit demselben Wachs auf unterschiedlichen Glasstäbchen und damit mit unterschiedlichen Oberflächen konnten die Bienen die Stäbchen nicht unterscheiden. Ebenso wurden bei differentieller Konditionierung auf Glasstäbchen mit demselben einmal eingeschmolzenen und einmal nicht eingeschmolzenen Wachs diese Stäbchen nicht unterschieden.

Die differentiellen Konditionierungen wurden mit einer pseudozufallsverteilten Abfolge von CS+ und CS- Stimuli durchgeführt, um zu verhindern, daß die Bienen durch eine regelmäßigen Abfolge von CS+ und CS- aufgrund dieser Abfolge positiv auf das CS+ Wachs reagieren.

V.4.2. Vorversuche für die Kutikulawachse. Wenn Gruppen von 20 Bienen und mehr für die Kutikulawachsextrakte gepoolt werden, dann kann davon ausgegangen werden, daß die Diskriminierung der Wachse nicht auf den individuellen Unterschieden in den Kutikulawachsen der Bienen beruht. Untersuchungen von Getz et al. (1986) zur Unterscheidung zwischen Gruppen von Arbeiterinnen innerhalb eines Stockes ergaben gleiche Ergebnisse. So konnten 2 Gruppen von je 2 Arbeiterinnen unterschiedlicher Patrilinearitäten von Bienen signifikant unterschieden werden, bei 2 Gruppen von je 20 Arbeiterinnen unterschiedlicher Patrilinearitäten war die Unterscheidung nicht signifikant.

V.4.3. Konditionierungen auf Wachse. Bei Konditionierungen des Rüsselstreckreflexes lernten die Bienen auf sämtliche Wachse und Wachsfraktionen zu reagieren, denn es wurde jedes Wachs und jede Fraktion sowohl als positiver als auch als negativer konditionierender Stimulus getestet. Somit kann ausgeschlossen werden, daß die Bienen deshalb bestimmte Wachse nicht unterscheiden können, weil sie auf diese Wachse überhaupt nicht reagieren. Es konnte bei jedem Wachs als CS+ - Stimulus ein Rüsselstreckreflex als konditionierte Antwort

Eine Diskriminierung der Wache durch die Honigbienen ist auf der Basis der aliphatischen Kohlenwasserstoffe (Fraktion A: Alkane, Alkene, Alkadiene, 2-Methylalkane) nicht möglich. Anhand der Fraktion A konnten die Bienen weder die verschiedenen Altersklassen von Wabenwachsen noch die Kutikulawachse von verschiedenen Geschlechtern unterscheiden. Die Altersklassen der Wabenwache konnten anhand der Fraktion D, die Kutikulawachse unterschiedlicher Geschlechter anhand der Fraktionen C und D unterschieden werden. Somit benutzen die Bienen zur Unterscheidung bevorzugt die Alkylester und ungesättigten Alkylester (Kutikulawachse) und die Hydroxyalkylester, Säuren und primären Alkohole (Waben- und Kutikulawachse) (Abbildungen V.6 und V.7). Vareschi konnte schon 1971 zeigen, daß Bienen Düfte verschiedener polarer Substanzen (z.B. C₄-C₁₄ Säuren und C₅-C₁₀ Alkohole) sehr gut lernen können. Eine weitere Auftrennung der beiden Fraktionen C und D mittels Dünnschichtchromatographie und Konditionierungen von Bienen mit den dann erhaltenen Fraktionen könnte Aufschluß darüber geben, in welchen Substanzklassen tatsächlich die Erkennungsschlüssel für die Bienen liegen.

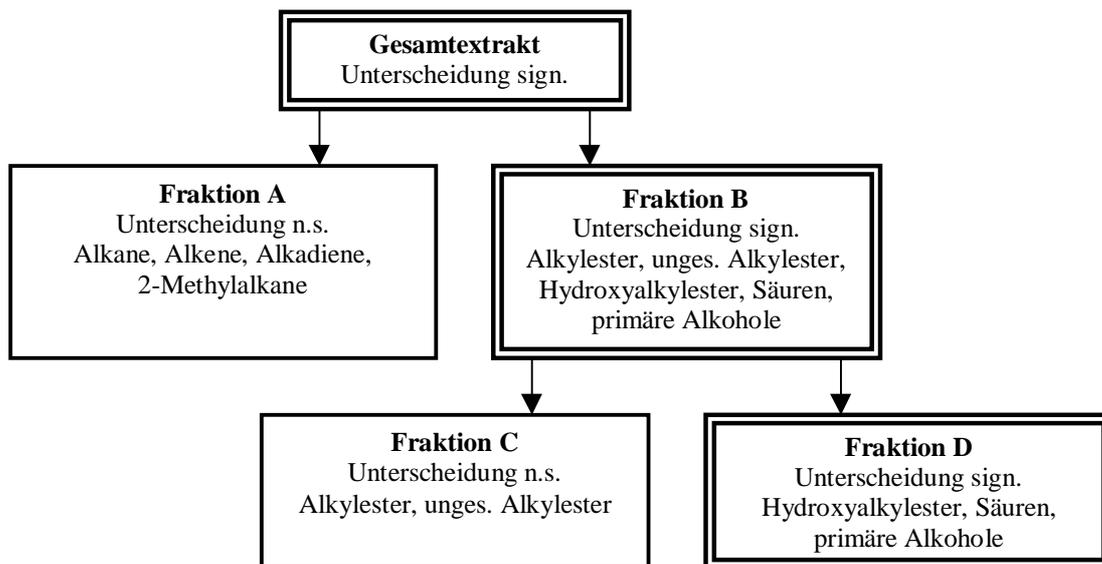


Abbildung V.6: Illustration zur Unterscheidung der Wabenwache durch Honigbienen mit Hilfe des Gesamtextrakts und verschiedenen Fraktionen mit unterschiedlichen chemischen Zusammensetzungen (sign. = signifikant, n.s. = nicht signifikant).

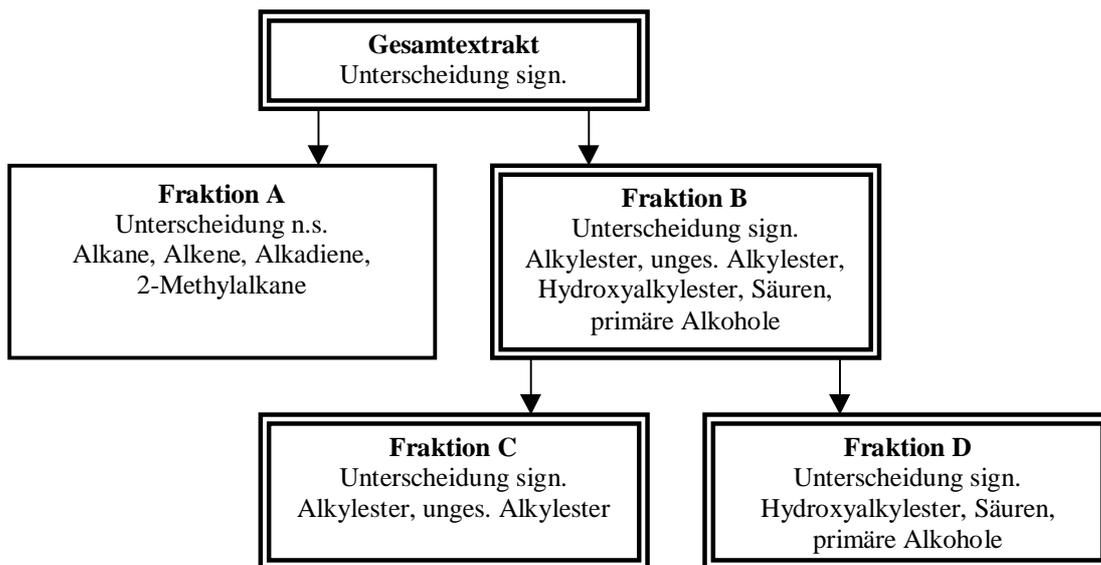


Abbildung V.7: Illustration zur Unterscheidung der Kutikulawachse durch Honigbienen mit Hilfe des Gesamtextrakts und verschiedenen Fraktionen mit unterschiedlichen chemischen Zusammensetzungen (sign. = signifikant, n.s. = nicht signifikant).

Bei Konditionierungen mit Kutikulawachsen unterschiedlicher Berufsgruppen trat eine Asymmetrie der Konditionierung auf. Bei Kutikulawachsen von Hofstaatbienen als positiv konditionierender Stimulus war die Diskriminierung der Wachse besser, d.h. die Kutikulawachsextrakte von Hofstaatbienen, die kurz vor dem Abfangen direkten Kontakt zur Königin hatten, sind für die Bienen recht leicht von den anderen Kutikulawachsen zu unterscheiden. Hier scheint nicht nur das Wachs selbst, sondern auch das Pheromon der Königin (Königinsubstanz) einen Einfluß auf die Konditionierungen zu haben. Durch „Verunreinigungen“ mit dem Pheromon sind die Kutikulawachse von Hofstaatbienen eventuell wesentlich attraktiver bzw. besser zu lernen. Solche Anteile von Pheromon am Wachs sind aufgrund der Auftragungsmethode der Kutikulawachse auf die Glasstäbchen durchaus denkbar, da diese Wachse nicht wie die Wabenwachse eingeschmolzen wurden. In diesem Zusammenhang erscheint es sehr wichtig, die flüchtigen Komponenten der Wachse in die chemischen Analysen mit einzubeziehen (siehe auch Kapitel VI.1.).

Die Bienen reagierten im allgemeinen auf die Konditionierungen der Kutikulawachse mit einem Rüsselstreckreflex von maximal 70 % (Abb. V.5), bei den Wabenwachsen lagen die Werte durchweg höher (max. 83 %, Abb. V.6). Das heißt, die Bienen waren auf die

Hinweis darauf sein, daß das Erkennen der Wabenwache für die Bienen von größerer Bedeutung für die chemische Orientierung im Stock ist als das Erkennen von Kutikulawachsen. Dies würde für die Theorie von Breed und Stiller (1992) sprechen, die in der Erkennung von Wabenwachs die evolutive Basis für die Verwandtenerkennung sehen.

Für Hexan- und Pentan-extrahierbare Kohlenwasserstoffe des Kutikulawachses von Bienen wird weithin angenommen, daß sie als Erkennungsschlüssel für die Verwandten- und Nestgenossenerkennung dienen und so eine wichtige Rolle bei der intrakolonialen Kommunikation zwischen Individuen spielen (Mc Daniel et al. 1984, Francis et al. 1985, Page et al. 1991, Getz und Page 1991, Breed et al. 1995b, Arnold et al. 1996). Diese Hypothese beruht oft nur auf einer korrelativen Argumentation. Es gibt nur sehr wenige Studien, welche die direkte Erkennung von Kohlenwasserstoffen bei sozialen Insekten nachweisen (review bei Breed et al. 1998). Einem direkten Beweis am nächsten kommt eine Arbeit von Lahav et al. 1999, die bei der Ameise *Cataglyphis niger* gezeigt haben, daß die Ameisen anhand von Kohlenwasserstoffen (Hexan-Extrakt) aus der Postpharyngealdrüse Nestgenossinnen von fremden Ameisen unterscheiden. Die Autoren schließen daraus, daß die Erkennung auch über die Kohlenwasserstoffe der Kutikulawachse funktioniert, da die Kohlenwasserstoffe des Kutikulawachses der Ameisen eine ähnliche Zusammensetzung wie die des Postpharyngealdrüsenextraktes besitzen. Eine weitere Studie zeigt bei sozialen Wespen (*Polistes biglumis bimaculatus*) chemische Variationen in den Kohlenwasserstoffen der Kutikulawachse zwischen Kolonien und diese Wespen unterscheiden Nestgenossen von fremden Wespen anhand von Pentanextrakten der Kutikula (Lorenzi et al. 1997).

Die Fähigkeit von Honigbienen, zwischen Düften oder Komponenten zu unterscheiden, die sich chemisch sehr ähneln, ist sehr gut ausgeprägt (Getz and Smith 1987). Sie können zwischen verschiedenen Mischungen von Tricosan und Pentacosan genauso wie zwischen Mischungen von Undecan- und Dodecansäure unterscheiden, solange die Mischungsverhältnisse sehr unterschiedlich sind (z.B. 1:10 und 10:1). Aber die offensichtlichen Unterschiede in den Alkadienen und Alkenen der Kohlenwasserstoff-Fraktion (Fraktion A), die mit der chemischen Analytik gefunden wurden, scheinen für die Bienen bei der Unterscheidung der Wachse nicht relevant zu sein. In dieser Fraktion liegen die Kohlenwasserstoffe in den Qualitäten und Verteilungen vor, wie sie natürlicherweise auch in den Kutikulawachsen vorkommen und nicht, wie in den vorher erwähnten Versuchen, als Einzelsubstanzen oder Mischungen weniger Substanzen. Dieses „Bouquet“ von Kohlenwasserstoffen könnte für die Bienen zu komplex sein, um die Unterschiede in den

Mischungen von Düften bei Honigbienen auf der sinnesphysiologischen Ebene dieselben Erregungsmuster in den Glomeruli der Antennalloben wie Einzelsubstanzen. Zu komplexe Mischungen führten sogar zu einem inhibitorischen Effekt bei der Erregung.

Zusätzlich zu den Fraktionen C und D, für die gezeigt wurde, daß die Bienen sie zur Unterscheidung nutzen, könnten Unterscheidungsmerkmale auch noch in den Substanzklassen der Fraktion E (25-43 % der Gesamtmasse der Wachse, Kapitel II.3.1. und II.3.3.) liegen. Diese Fraktion könnte noch weitere Säuren, Alkohole, Hydroxysäuren, Diole und sogar Mono- und Diglyceride enthalten (Davidson and Hepburn 1986). Aber das Auslassen dieser Fraktion, die nur sehr schwer analytisch zugänglich ist, hat keinen Einfluß auf die Tatsache, daß Bienen die aliphatischen Kohlenwasserstoffe der Wachse nicht zur Unterscheidung nutzen.

Bei Absenken des Signifikanzniveaus ($p < 0,05$) war bei 4 von 9 Fällen die Unterscheidung der Wachse anhand der Fraktion A signifikant mit Medianen von 2,68 bis 2,80 Fehlern pro Biene. Verglichen mit den Medianen der Kontrollversuche (2,96 und 2,99) ist die Unterscheidung anhand der Fraktion A jedoch sehr schwach.

Die Hypothese, daß Honigbienen die physikalischen Eigenschaften der Wachse durch eine Veränderung der chemischen Zusammensetzung der Wachse beeinflussen könnten (Kapitel IV.4. und V.1.), setzt ein Erkennen der chemischen Zusammensetzung durch die Bienen voraus. In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal reine Wachse und Fraktionen von Wachsen mit einer natürlichen Verteilung der Substanzen in den Fraktionen mit Hilfe des Rüsselstreckreflex-Paradigmas getestet. Honigbienen sind in der Lage, chemisch unterschiedliche Wachse zu diskriminieren. Es konnte gezeigt werden, daß Honigbienen die polareren und länger-kettigen Bestandteile der Wachse (Alkylester, ungesättigten Alkylester, Hydroxyalkylester, Säuren und primäre Alkohole) anstatt der aliphatischen Kohlenwasserstoffe nutzen, um zwischen Wachsen zu unterscheiden (Fröhlich et al. 2000b) Dies ergab einen neuen und sehr interessanten Einblick in die chemische Kommunikation der Honigbienen.