

**QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER 9-OXODECENSÄURE  
IM LEBENSZYKLUS DER KAPBIENE  
(*APIS MELLIFERA CAPENSIS* ESCHOLTZ)\***

***Étude quantitative de l'acide céto-9 décène-2 oïque  
au cours du cycle biologique de l'abeille du Cap  
(*Apis mellifera capensis* Escholtz)***

C. HEMMLING, N. KOENIGER und F. RUTTNER

*Fachbereich Biologie d.J.W.Goethe-Universität,  
Institut für Bienenkunde  
Im Rothkopf 5, D-6370 Oberursel/Ts.*

**SUMMARY**

**QUANTIFICATION OF 9-OXO-DECENOIC ACID  
IN THE LIFE HISTORY OF THE CAPE HONEYBEE  
(*APIS MELLIFERA CAPENSIS* ESCHOLTZ)**

9-oxo-decenoic acid was quantified by a new, direct gaschromatographic analysis. Single newly emerged Cape honeybee workers were kept together each with 70-80 young workers of *Apis mellifera carnica* in small cages. The Cape bees started with oviposition on the 8th and 9th day under these conditions. 9-OD was found in 78 % of all Cape workers in the experiments. The first occurrence of 9-OD was noticed on the fourth day (after emergence) and the quantity of 9-OD increased with the age. On the 10th day an average of 50 µg 9-OD and on the 80th day 300 µg 9-OD per worker were found.

Both, 9-OD production and oviposition were observed in 79 workers, while 8 worker bees had no 9-OD though they layed eggs. 12 out of 18 bees, which did not oviposit, produced 9-OD. So oviposition and 9-OD production are not directly correlated.

**ZUSAMMENFASSUNG**

Mit Hilfe einer neuen direkten gaschromatographischen Methode wurde die 9-Oxodecensäure (9-OD) quantitativ bestimmt.

---

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Jeweils eine frischgeschlüpfte Kap-Arbeiterin wurde in kleinen Versuchskästen mit 70-80 *Carnica*-Jungbienen zusammengesetzt. Im Durchschnitt begannen diese weiselos gehaltenen Kap-Arbeiterinnen zwischen dem 8. und 9. Lebenstag mit der Eiablage.

Bei 78 % der Kap-Arbeiterinnen wurde 9-OD festgestellt. Das erste Auftreten konnte am 4. Lebenstag registriert werden. Die gemessene 9-OD Menge nahm mit dem Alter der Bienen kontinuierlich zu, wobei die ermittelten Werte im unteren Bereich der Mengen lagen, die bei Königinnen gefunden wurden.

Sowohl Eiablage wie auch 9-OD Produktion wurde bei 79 Kap-Arbeiterinnen beobachtet, während 8 eierlegende Arbeiterinnen keine 9-OD hatten. 12 von 18 Bienen, die keine Eier legten, produzierten 9-OD. Eiablage und 9-OD Produktion hängen demnach nicht direkt voneinander ab.

## EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Als Hauptkomponente des Mandibeldrüsensekrets der Königin wurde trans-9-Oxo-2-decensäure (9-OD) isoliert (BARBIER und LEDERER, 1960; CALLOW und JOHNSTON, 1960).

RUTTNER *et al.* (1976) konnten 9-OD erstmals auch bei legenden Arbeiterinnen von *Apis mellifera capensis* nachweisen.

Dieser erste nur wenige Proben umfassende Nachweis von 9-OD bei Arbeitsbienen war die Grundlage für diese Untersuchung, die sich mit folgenden Fragestellungen befasste :

1. Ist die Bildung von 9-OD eine Eigenschaft aller Kap-Arbeiterinnen, oder ist sie auf legende Arbeiterinnen beschränkt?

Ist die Ovaentwicklung mit der 9-OD-Produktion gekoppelt?

2. In welchem Alter beginnt die 9-OD Bildung, und wie verändert sich die Pheromonmenge in Abhängigkeit vom Lebensalter der Kap-Arbeiterinnen?

3. Sind die bei den Kap-Arbeiterinnen gefundenen Ergebnisse mit denen von Königinnen zu vergleichen?

## MATERIAL UND METHODE

### 1. Material

Für die Versuche wurden Arbeiterinnen von *Apis mellifera capensis* ESCHOLTZ verwendet, einer Rasse, die seit einigen Jahren am Institut für Bienenkunde in Oberursel gehalten wird.

Das natürliche Verbreitungsgebiet der Kapbiene ist die Südspitze Afrikas im eng begrenzten Gebiet der Kapregion. Von anderen weiter nördlichen Bienenrassen (*scutellata-adansonii*-Gruppe) kann die *Capensis* mit den üblichen biometrischen Methoden nicht einwandfrei getrennt werden, da äussere Merkmale, wie dunkle Körperpigmentierung und eine erhöhte Borstenzahl auf den Vorderflügeln, keine ausreichenden Unterscheidungsmerkmale darstellen (RUTTNER, 1977).

Die exakten Kriterien sind in der Art der Reproduktion und in der Ausbildung der Fortpflanzungsorgane bei den Arbeiterinnen zu finden. Aus den unbefruchteten Eiern von Kap-Arbeiterinnen entwickeln

sich normale weibliche Tiere -- thelytoke Parthenogenese (ONIONS, 1912; RUTNER, 1976) --, während aus den Eiern von Arbeiterinnen anderer Rassen Drohnen schlüpfen.

Daneben sind die Arbeitsbienen von *A.m. capensis* schon von ihrer Anlage her königinnenähnlicher als Arbeiterinnen anderer Rassen. Sie besitzen eine Spermatheka und eine erhöhte Ovariolenzahl.

## 2. Methode

### 2.1. Erzeugung und Haltung von legenden Kap-Arbeiterinnen

Die für die Versuche notwendige grosse Anzahl von legenden Kap Arbeiterinnen definierten Alters wurde auf folgende Weise erreicht.

In kleine Holzkäfige (7,5 × 7 × 9 cm) wurde je eine frischgeschlüpfte, markierte Kap-Arbeiterin mit 70-80 Jungbienen von *A.m. carnica* zusammengesetzt. Dieser Ansatz beruht auf der unterschiedlichen Entwicklungszeit der Ovarien bei den genannten Rassen. Die Kap-Arbeiterinnen benötigen eine wesentlich kürzere Zeit bis zur Entwicklung ihrer Ovarien (6-7 Tage) als die *Carnica*-Arbeiterinnen (etwa 30 Tage; HESSE, 1977).

Die Bienen wurden über die gesamte Versuchsdauer mit Zuckerteig, Wasser und frischem Pollen versorgt. In jedem Versuchskäfig war ein kleines Stück bereits bebaute Mittelwand (ca. 5 × 3 cm) angebracht (PAIN, 1966). Täglich erfolgte eine Inspektion der Kästen mit Fütterung, Feststellung einer etwaigen Eiablage sowie Entfernung der toten Bienen. Die Versuchskästen wurden im Brutschrank bei 27 °C gehalten. Nach 30-35 Tagen Versuchsdauer stieg der Totenfall der *Carnica*-Bienen meist so stark an, dass es notwendig war, die Kap-Arbeiterin in ein neues Kästchen mit Jungbienen umzusetzen. Während der 1. Periode (2.-12. Tag) wurden für jeden Tag 10-20 Versuchskästen angesetzt. Vom 15.-50. Lebenstag wurde ein 5-Tage Rhythmus eingehalten, mit 5-10 Kästchen pro Ansatz. Insgesamt wurden 246 Kap-Arbeiterinnen bekannten Alters ausgewertet, gewonnen aus einem Ansatz von ursprünglich 254 Kästchen. Die Altersverteilung der Arbeiterinnen zur Zeit der Auswertung ist aus Tab. 1 ersichtlich. Die Bienen wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei ca. -16 °C aufbewahrt.

Als Kontrollversuch wurden zur selben Zeit Kap-Arbeiterinnen einem weiselrichtigen Kap-Volk zugesetzt. Die im Brutschrank bei 32 °C geschlüpfen Kapbienen wurden täglich von der Brutwabe abgesammelt und vor dem Zusetzen in das Kapvolk farbig markiert. Insgesamt wurden dem Kapvolk von Mitte Juli bis Ende August 1 200 gezeichnete Arbeiterinnen zugegeben. Vom 2.-10. Lebenstag der Kap-Arbeiterinnen wurden täglich 10-20 Bienen abgefangen. Vom 15. bis 60. Lebenstag wurden die Kap-Arbeiterinnen im 5-Tage-Rhythmus abgesammelt.

### 2.2. Präparation der Kap-Arbeiterinnen

Die Präparation der Ovarien erfolgte nach der Methode von G. HESS (1942). Bei 20-facher Vergrößerung wurden die Ovarien unter dem Binokular ausgewertet.

Als Kriterium für die Beurteilung des Entwicklungsgrades der Ovarien wurde die Kammerung der Ovariolen gewählt. Es erfolgte eine Einteilung in 3 Stufen (SAKAGAMI und AKAHIRA, 1958; VELTHUIS, 1970):

Mit Stufe 1 wurden alle Ovarien bezeichnet, die völlig unentwickelt waren, d.h. bei denen die Ovariolen keine Einschnürungen aufwiesen.

Unter Stufe 3 wurden die Ovarien gezählt, bei denen legereife Eier in den Ovariolen erkennbar waren.

Stufe 2 umfasste alle Zwischenformen, d.h. vom Beginn der Kammerung der Ovariolen bis hin zu ganz deutlicher Kammerung.

Die Spermatheka, die an der Stelle liegt, wo sich der *Oviductus communis* in die beiden lateralen Ovidukte aufspaltet, wurde bei 40-facher Vergrößerung unter dem Binokular ausgemessen. Bei jeder Spermatheka wurden zwei senkrecht aufeinanderstehende Durchmesser angegeben.

### 2.3. Quantifizierung der 9-Oxodecensäure

Der klassische Nachweis von 9-OD (CALLOW und JOHNSTON, 1960) wird über eine Veresterung durchgeführt. Dabei werden die Köpfe der zu untersuchenden Bienen mit Äther extrahiert und die Säure-

ren durch Zugabe von Diazomethan in die entsprechenden Methylester überführt. Erst dann kann die gaschromatographische Aufarbeitung erfolgen. Um die quantitativen Ungenauigkeiten, die bei der Methylierung mit Diazomethan entstehen, auszuschliessen und um die Empfindlichkeit auf die für diese Untersuchung erforderliche Stufe zu erhöhen, haben wir direkt chromatographiert. Diese Messmethode hat neben geringerem Arbeitsaufwand den Vorteil, dass auch sehr kleine Mengen 9-OD gemessen werden können. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 0,5  $\mu\text{g}$ .

Die Messungen erfolgten an einem Gaschromatographen der Firma Hewlett-Packard Series 5720 1. Es wurde mit einem FID und einer Stahlsäule (Länge 1,8 m, Durchmesser aussen 3,2 mm, innen 2,7 mm, 2,5 % SP 1000, Chromosorb G, AW-DMCS, 80-100 mesh) gearbeitet. Die Temperatur im Säulenofen war konstant 240 °C (Einspritzblock 280 °C, Detektor 300 °C).





Als Trägergas wurde Stickstoff verwendet (Strömungsgeschwindigkeit 40 ml/min).

Zur Messung wurde der Kopf einer einzelnen Kap-Arbeiterin in einem Eppendorfhütchen mit 50-100  $\mu\text{l}$  Aceton als Lösungsmittel zerquetscht. Nach 15-stündiger Aufbewahrung im Kühlschrank erfolgte die gaschromatographische Messung, wobei 1-3  $\mu\text{l}$  des Acetonextrakts in den Probeneinlass gegeben wurden. Wenn mehrere Köpfe von gleichaltrigen Arbeiterinnen zusammen in einer Probe verarbeitet wurden, erhöhte sich die Menge des Lösungsmittels entsprechend.

Bei den Kapbienen aus dem weiselrichtigen Volk wurden für jede Altersstufe 10 Bienen untersucht, wobei 2 Messungen mit jeweils 5 gleichaltrigen Bienen erfolgten. Bei den Kap-Arbeiterinnen aus den Versuchskästen wurde dagegen grösstenteils Einzelmessungen vorgenommen. Am 2., 3., 5., 6., 7., 9. und 11. Lebensstag wurden allerdings 2-6 Köpfe jeweils in einer Probe aufgearbeitet.

TAB. 1. — Altersverteilung der Kap-Arbeiterinnen zum Zeitpunkt der Auswertung.

TABL. 1. — Distribution de l'âge des ouvrières du Cap au moment de l'expérience.

Alter der Kap-  in Tagen Age en jours des  du Cap	2-5	6-9	10-15	16-20	21-30	31-40	41-50	51-75	> 80
Anzahl der Kap-  Nombre d'  du Cap	41	62	37	20	18	31	16	10	11

Mit Hilfe einer Vergleichslösung aus synthetischem 9-OD, in Aceton gelöst, die nach jedem Chromatogramm mit Kopfextrakt gespritzt wurde, konnte ermittelt werden, ob in der untersuchten Probe 9-OD vorhanden war und wenn ja, in welcher Menge (Abb. 1).

Die quantitative Auswertung erfolgte über eine angenäherte Flächenbestimmung des Peaks : Peakhöhe  $\times$  Halbwertsbreite. (Halbwertsbreite = Breite eines Peaks in halber Höhe zwischen Maximum und Grundlinie.)

## ERGEBNISSE

### 1. Verhalten der Bienen in den Versuchskästen

#### Bautätigkeit

Bei der täglich durchgeführten Inspektion wurde für jeden Versuchskasten der Beginn des Zellenbaus an das eingeklebte Wabenstück bestimmt, wobei als Kriterium deutlicher Anbau in Form von mindestens einer Zelle gewählt wurde.

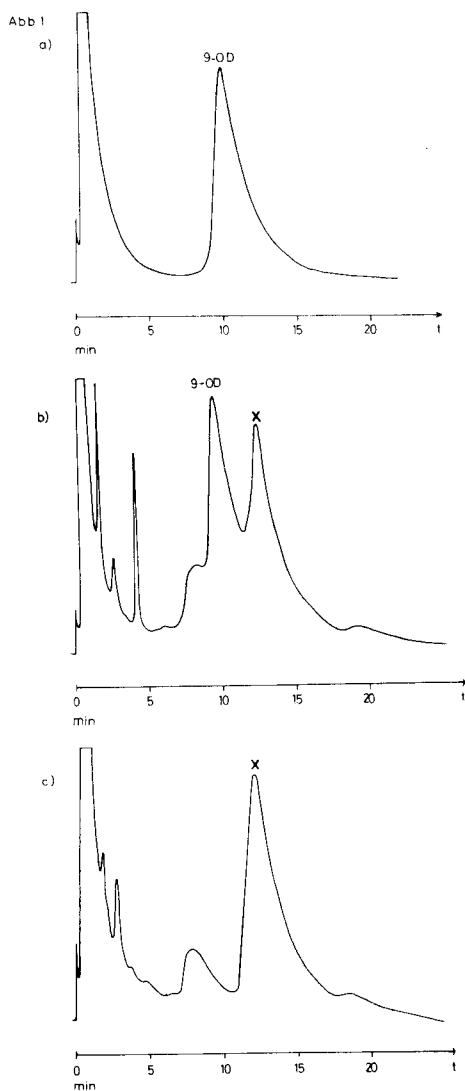


ABB. 1. — Gaschromatogramme.

- a) 4  $\mu\text{g}$  synthetische 9-OD  
 b) 2  $\mu\text{l}$  Extrakt (5 20-tägige Kap- $\text{♀♀}$  aus dem weiselrichtigen Volk, in 150  $\mu\text{l}$  Aceton gelöst)  
 X = nicht identifizierter Peak (9-Hydroxy-Decensäure?)  
 c) 1  $\mu\text{l}$   $\text{♀}$  Extrakt (45-tägig, in 100  $\mu\text{l}$  Aceton gelöst), 276  $\mu\text{g}$  9-OD  
 X = nicht identifizierter Peak (9-Hydroxy-Decensäure?)


FIG. 1. — Chromatogrammes gazeux



- a) 4  $\mu\text{g}$  d'acide ceto-9 synthétique  
 b) 2  $\mu\text{l}$  d'extrait de 5 ouvrières du Cap âgées de 20 jours, provenant d'une colonie avec reine et macérées dans 150  $\mu\text{l}$  d'acétone  
 X = pic non identifié (acide hydroxy-9 décén-2 oïque?)  
 c) 1  $\mu\text{l}$  d'extrait d'ouvrière (âgée de 45 jours, dissout dans 100  $\mu\text{l}$  d'acétone), 276  $\mu\text{g}$  d'acide ceto 9.

Zwischen dem 5. und 7. Versuchstag war die grösste Bauaktivität zu beobachten. Bis einschliesslich des 6. Versuchstages hatten die Bienen in 39,9 % der Kästen mit dem Anbau von Zellen an das Wabenstück begonnen. Am Ende des 7. Versuchstages wiesen schon 60,1 % der Kästen angebaute Zellen auf. Wenn bis zum 10. Versuchstag keine Zellen angebaut wurden, blieb das Wabenstück bis zum Versuchsende unberührt. Das war bei 22,3 % der Kästen der Fall.

Für jede Kap-Arbeiterin wurde der Beginn der Eiablage bestimmt (Tab. 2). Im Durchschnitt begannen die Kap-Arbeiterinnen am 8,7. Lebenstag mit der Eiablage. Wenn die Arbeiterinnen bis zum 15. Lebenstag nicht legten, gingen sie auch später nicht mehr in Eilage. Von 105 Arbeiterinnen, die ein Alter von mehr als 15 Lebenstagen erreichten, legten 18 (= 17,1 %) während der gesamten Versuchsdauer keine Eier.

Bei der täglichen Inspektion der Versuchskästen wurde in vielen Fällen ein Hofstaat um Kap Arbeiterinnen beobachtet. Diese mehr zufälligen Beobachtungen erlaubten keine systematische Auswertung.

TAB. 2. — *Beginn der Eilage von 138* TABL. 2. — *Début de la ponte chez 138 ouvrières.*

Tag Jour	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.
Anzahl d. 	1	1	20	50	38	13	8	4	1	2
Nombre d' 	1	1	20	50	38	13	8	4	1	2

### 2. Alter der Kap-Arbeiterinnen

Über das Lebensalter und die Dauer der Eilage kann nur bei einigen Kap-Arbeiterinnen eine Aussage gemacht werden, da die Versuche vom Ansatz her ein Abtöten der Bienen nach bestimmten Zeitintervallen bedingten. 13 Kap-Arbeiterinnen erreichen eine Lebensdauer von über 75 Tagen. 4 Arbeiterinnen legten im Alter von über 100 Tagen (102-, 103-, 116- und 126-tägig) noch Eier. Die älteste Kap-Arbeiterin wurde 137-tägig getötet.

### 3. Spermatheka und Ovaentwicklung der Kap-Arbeiterinnen

Von 190 präparierten Kap-Arbeiterinnen aus dem weiselrichtigen Volk wurde bei 66 % eine Spermatheka gefunden. Die Grösse betrug im Durchschnitt  $0,45 \times 0,44$  mm (min :  $0,27 \times 0,27$  mm; max. :  $0,55 \times 0,62$  mm) und war vom Alter der Bienen unabhängig.

In den Versuchskästen wiesen von 221 untersuchten Kap-Arbeiterinnen 64,7 % eine Spermatheka auf. Die durchschnittliche Grösse betrug  $0,5 \times 0,5$  mm (min :

0,25 × 0,25 mm; max. : 0,87 × 0,80 mm). Eine Abhängigkeit der Spermathecagröße vom Alter der Bienen konnte auch hier nicht festgestellt werden.

Die Ovarien der Kap-Arbeiterinnen aus dem weiselrichtigen Volk waren völlig unentwickelt, d.h. sie wurden der Entwicklungsstufe 1 zugeordnet.

Die Ovarpräparation der Kap-Arbeiterinnen aus den Versuchskästen ergab folgende Ergebnisse: Am 2. und 3. Lebenstag wurden nur unentwickelte Ovarien gefunden. Am 4. Lebenstag konnten bereits bei einer Kap-Arbeiterin Ovarien mit Entwicklungsstufe 2 registriert werden. Am 5. Tag waren es von 12 Bienen schon 5, die entwickelte Ovarien aufwiesen.

#### 4. 9-OD Menge in den Kap-Arbeiterinnen

Bei den 190 Kap-Arbeiterinnen aus dem weiselrichtigen Volk konnte in keiner der 38 untersuchten Bienenproben 9-OD nachgewiesen werden.

Bei den weisellos gehaltenen Kap-Arbeiterinnen wurde von 117 durchgeführten Einzelmessungen bei 78 % der Arbeiterinnen 9-OD festgestellt.

Der Beginn der 9-OD-Bildung und die 9-OD-Menge in Abhängigkeit vom Alter der Kap-Arbeiterinnen wird an der Kurve in Abb. 2 deutlich.

Der Verlauf der Kurve zeigt, dass die gemessene 9-OD-Menge mit dem Alter der Kap-Arbeiterinnen kontinuierlich zunimmt. (Regressionsgerade:  $m = 3,18$ ;  $y(x=0) = 24,22$ ). Das erste Auftreten von 9-OD wurde am 4. Lebenstag der Kap-Arbeiterinnen registriert. Von 10 einzeln untersuchten Kap-Arbeiterinnen dieser Altersstufe konnte bei 4 Tieren 9-OD festgestellt werden. Die durchschnittliche Menge betrug  $12,5 \mu\text{g}$  pro Arbeiterin. Der höchste 9-OD-Wert aller Einzelmessungen wurde bei einer 111 Tage alten Kapbiene mit  $633,6 \mu\text{g}$  gemessen.

#### 5. 9-OD Menge und Ovarentwicklung

Wird der 9-OD-Gehalt in Zusammenhang mit der Ovarentwicklung der Kap-Arbeiterinnen betrachtet, so zeigen sich folgende Ergebnisse: Gleichzeitig mit dem ersten Auftreten von entwickelten Ovarien am 4. Lebenstag der Kap-Arbeiterinnen wurde, wie schon oben angeführt, zum ersten Mal 9-OD festgestellt.

Parallel zur Häufigkeit von Arbeitsbienen mit entwickelten Ovarien erhöht sich auch die 9-OD-Menge. Diese Parallelentwicklung gilt für Arbeiterinnen bis zum 10. Lebenstag, später jedoch nicht mehr. Während sich dann die mittlere Ovarstufe der älteren Arbeiterinnen (vom 10. bis 50. Lebenstag) auf einen Wert um 3 einstellt (d.h. fast alle Kap-Bienen legen Eier), nimmt die gemessene 9-OD-Menge noch weiter zu. Bei Kap-Arbeiterinnen mit einem Alter von mehr als 50 Tagen, bei denen zum Zeitpunkt der Messung die höchsten 9-OD-Werte erhalten wurden, waren die Ovarien zwar immer noch sehr stark entwickelt, legereife Eier wurden dagegen nur selten gefunden. Der Entwicklungsgrad wurde daher mit Stufe 2 bewertet.

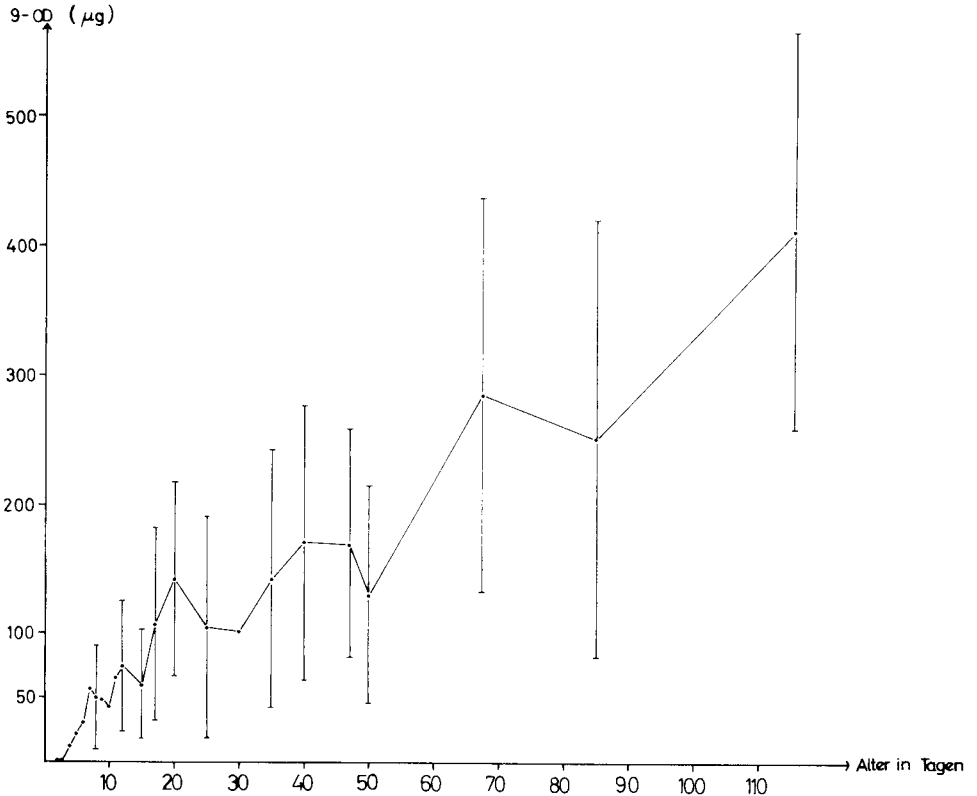


ABB. 2. — 9-OD Menge in Abhängigkeit vom Alter der  $\text{♀♀}$

Abzisse: Alter der  $\text{♀♀}$  in Tagen  
 Ordinate: 9-OD ( $\mu\text{g}$ )

FIG. 2. — Quantité d'acide céto-9 en relation avec l'âge des ouvrières

Abscisses: âge des ouvrières en jours  
 Ordonnées: acide céto-8 ( $\mu\text{g}$ )

Die Tatsache, dass keine legereifen Eier in den Ovarien zu finden waren, bedeutet aber noch nicht, dass die Kap-Arbeiterinnen die Eilage völlig beendet hatten und nicht mehr in der Lage waren, erneut Eier zu legen. Das Alter der Begleitbienen hat nach unseren Beobachtungen einen entscheidenden Einfluss auf die Legetätigkeit der Kap-Arbeiterinnen. Ein Beleg für diese Annahme ist darin zu sehen, dass 15 von 22 Kap-Arbeiterinnen durch Umsetzen in Kästen mit *Carnica*-Jungbienen ihre unterbrochene Legetätigkeit wieder aufnahmen.

Kap-Arbeiterinnen, die in den Versuchskästen bis einschliesslich des 15. Lebensstages nicht mit der Eilage begonnen hatten, legten bis zum Versuchsende keine Eier mehr. Von 18 Kap-Arbeiterinnen, die älter als 15 Tage waren und keine Eier legten, wurden bei 10 Tieren Ovarien mit Entwicklungsstufe 2 und bei 8 Tieren Ovarien



mit Entwicklungsstufe 1 gefunden. Über den Zusammenhang zwischen Eilage und 9-OD-Gehalt gibt Tab. 3 Aufschluss. Der Anteil der Tiere, die 9-OD produzieren, ist bei den eierlegenden Arbeiterinnen signifikant grösser ( $x^2 = 7,45$ ) als bei den Bienen, die während der Versuche keine Eier legten. Betrachtet man jedoch bei beiden Gruppen nur die Tiere mit positivem 9-OD-Befund, so ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Menge (151,6  $\mu\text{g}$  bei Eilage und 194,3  $\mu\text{g}$  ohne Eilage).

TAB. 3. — 9-OD Produktion und Eilage  
(Arbeiterinnen älter als 15 Tage).

TABL. 3. — Production d'acide céto-9 et ponte  
(ouvrières âgées de plus de 15 jours).

	9-OD Acide céto-9	Keine 9-OD Pas d'acide céto-9
In Eilage Ponte	79	8
Nicht in Eilage Pas de ponte	12	6

## DISKUSSION

### 1. Verhalten der Bienen in den Versuchskästen

#### 1.1. Bautätigkeit

Die Beobachtung, dass die Begleitbienen zwischen dem 5. und 7. Versuchstag mit dem Anbau von Zellen an das eingeklebte Wabenstück begannen, stimmt mit den Angaben von ROGER (1971) überein. In Versuchskäfigen mit 50 Bienen konnte er den Anbau von Zellen an die Mittelwand zwischen dem 6. und 7. Lebenstag feststellen, wobei er der Königin eine primäre Bedeutung für das Bauverhalten zuschreibt. DARCHEN (1957, 1960) hatte zuvor in Versuchen mit unterschiedlicher Bienenzahl diesen Einfluss der Königin genauer beschrieben. Bei Anwesenheit einer Königin, unbegattet oder begattet, konnte auch er bei 50 sechstägigen Arbeiterinnen eine Bautätigkeit feststellen. Ohne Königin wurde nur gebaut, wenn 10 000 Bienen vorhanden waren. Bei Anwesenheit von eierlegenden Arbeiterinnen genügten nach den Versuchen von DARCHEN bereits 5 000 Bienen, um ein Bauverhalten auszulösen.

Unter unseren Versuchsbedingungen haben sich die Begleitbienen so verhalten, wie in den Versuchen von DARCHEN bei Anwesenheit von einer Königin. So kann die Beobachtung der Bautätigkeit in den Versuchskästen bereits einen ersten Hinweis

darauf geben, dass die Kap-Arbeiterinnen auf die Begleitbienen eine Wirkung als « Ersatzköniginnen » ausüben.

## 1.2. Eiablage

Es ist bekannt, dass sich bei Weisellosigkeit die Ovarien der Arbeitsbienen entwickeln, und legende Arbeiterinnen auftreten (DE GROOT und VOOGD, 1954; VOOGD, 1955, 1956; BUTLER, 1957 b).

Zwischen den einzelnen Rassen bestehen jedoch Unterschiede in der Latenzzeit, d.h. in der Zeit, die die Ovarien benötigen, um sich zu entwickeln, und die ersten Eier abgelegt werden können.

Versuche an reinen Kap-Völkern ergaben, dass nach Entfernen der Königin die ersten Eier noch schneller auftreten als in den Versuchskästen, in denen *Carnica* Jungbienen als Begleitbienen verwendet wurden : nach 2-3 Tagen (ONIONS, 1912), nach 4-8 Tagen (ANDERSON, 1963) und nach 6-7 Tagen (HESSE, 1977).

Das Vorhandensein von Eiern am 2. bis 3. Tag nach Entweiselung kann wohl nur damit erklärt werden, dass immer einige Arbeiterinnen mit bereits entwickelten Ovarien (Entwicklungsstufe 2-3) im Volk anwesend sind. Diese Annahme wird von der Beobachtung ANDERSONS (1963) bestätigt, der in fast allen Kolonien trotz Anwesenheit der Königin bei 20 % der Arbeiterinnen entwickelte Ovarien vorfand.

## 2. Alter der Kap-Arbeiterinnen

Über die Lebensdauer von legenden Kap-Arbeiterinnen liegen noch keine Untersuchungen vor, aber unsere Ergebnisse zeigen, dass legende Arbeiterinnen in Versuchskästen bis zu 140 Tagen alt werden können. Sommerbienen in frei fliegenden Versuchsvölkern haben eine Lebensdauer von 25-35 Tagen, max. 60-70 Tagen, während Winterbienen 6-7 Monate alt werden können (MAURIZIO, 1946, 1961). BERTHOLF (1942) konnte zeigen, dass weder die Anwesenheit einer Königin, noch die Möglichkeit, Reinigungsflüge zu unternehmen, einen Einfluss auf die Lebensdauer von gefangen gehaltenen Bienen hat.

Neben zahlreichen morphologischen Verschiedenheiten zwischen adulten Königinnen und Arbeiterinnen besteht ein wesentlicher Unterschied beider Kasten in der Lebensdauer. Durch die gegenüber reproduktiv inaktiven Arbeiterinnen verlängerte Lebenszeit ist die legende Kap-Arbeitsbiene auch in diesem Merkmal königinnenähnlicher.

## 3. Spermatheka bei Kap-Arbeiterinnen

Die Grösse der Spermatheka liegt mit einem Durchmesser von durchschnittlich  $0,45 \times 0,44$  mm im weiselrichtigen Volk und  $0,5 \times 0,5$  mm in den Versuchskästen im Bereich der Werte, wie sie für Kap-Arbeiterinnen bereits beschrieben wurden (RUTNER, 1977).

ANDERSON (1963) stellte eine geringe Grössenzunahme der Spermatheka bei legenden Arbeiterinnen im Vergleich zu nicht legenden fest: Spermatheka bei legenden Arbeiterinnen  $0,29 \times 0,35$  mm, bei nicht legenden  $0,25 \times 0,3$  mm. Grössenunterschiede in der gleichen Ordnung, von  $0,04-0,06$  mm, konnten auch bei unseren Messungen beobachtet werden.

Der Nachweis einer Spermatheka bei 65 % der Versuchsbienen ist zugleich ein Beweis dafür, dass es sich tatsächlich um Kap-Arbeiterinnen gehandelt hat. *Carnica*-Arbeiterinnen besitzen höchstens Rudimente von Spermatheken.

#### 4. 9-OD Menge in den Kap-Arbeiterinnen

Da bis jetzt noch keine quantitativen Untersuchungen über den 9-OD Gehalt bei legenden Arbeiterinnen vorliegen, werden die bei Kap-Arbeiterinnen erhaltenen Ergebnisse mit solchen von Königinnen verglichen.

Bei Königinnen wurde bereits am ersten Tag nach dem Schlüpfen 9-OD festgestellt. BUTLER und PATON (1962) fanden  $7,2 \mu\text{g}$ , PAIN und ROGER (1976) ca.  $20 \mu\text{g}$  9-OD pro Königin. Bei Kap-Arbeiterinnen konnte das erste Auftreten von 9-OD erst am 4. Lebenstag mit einer durchschnittlichen Menge von  $12,5 \mu\text{g}$  pro Arbeiterin registriert werden. Die 9-OD Menge nimmt dann mit dem Alter kontinuierlich zu. Ob die hohen Werte an 9-Oxodecensäure bei alten Arbeiterinnen auf eine vermehrte Bildung des Sekrets oder auf eine Akkumulation zurückgehen, bleibt zu diskutieren. Möglich wäre, dass ältere Begleitbienen aufgrund eines reduzierten Futterraustausches die legende Arbeiterin nicht mehr so oft berühren, und sich dadurch die Menge an 9-OD in dieser anreichert. Die mit dem Alter der Kap-Arbeiterinnen registrierte Zunahme des 9-Oxodecensäure-Gehalts muss deshalb nicht unbedingt auf eine vermehrte 9-OD Bildung zurückgehen, denn es kann auch so sein, dass ständig mehr 9-OD produziert als abgegeben wird.

Die kontinuierliche Zunahme der 9-Oxodecensäure mit dem Alter der Kap-Arbeiterinnen entspricht den Angaben, wie sie von BUTLER und PATON (1962) und PAIN *et al.* (1962, 1967) für Königinnen gemacht wurden.

PAIN und ROGER (1976), die ebenfalls die 9-OD Menge in Abhängigkeit vom Alter unbegatteter Königinnen untersuchten, stellten jedoch ein 9-OD Maximum bei 16-20-tägigen Königinnen fest (durchschnittlich  $1107 \mu\text{g}$ ). Mit zunehmendem Alter der Königinnen sank die 9-OD Menge dann wieder ab (bei 46 bis 50-tägigen auf  $282 \mu\text{g}$ ). Eine Erklärung für die verminderte 9-OD Menge im Alter wird von den Autoren in den unnatürlichen Versuchsbedingungen gesehen. Sie nehmen an, dass ältere Begleitbienen der Königin nicht mehr alle wichtigen Elemente liefern, die sie benötigt, um 9-OD zu bilden. Demnach ist die 9-OD Menge stark abhängig vom physiologischen Zustand, dem Alter und der Anzahl der Begleitbienen (PAIN *et al.*, 1972).

Ein Vergleich der 9-OD Mengen zwischen Kap-Arbeiterinnen und Königinnen zeigt, dass die durchschnittlichen Werte, die bei legenden Kap-Arbeiterinnen gefunden

wurden, durchaus mit denen von Königinnen zu vergleichen sind, obgleich die bei diesen gefundenen Höchstwerte in unserer Versuchsserie nicht erreicht wurden.

Grosse individuelle Unterschiede im 9-OD Gehalt, wie sie für gleichaltrige Kap-Arbeiterinnen bei dieser Untersuchung gefunden wurden, sind auch bei Königinnen gleichen Alters bekannt (PAIN *et al.*, 1967).

Ovarentwicklung bzw. Eilage und 9-OD-Produktion treten bei den meisten hier untersuchten Bienen gleichzeitig auf. Aber auch Bienen, die nicht in Eilage gegangen sind, zeigen 9-OD-Produktion. So kann vermutet werden, dass in der Regel beide Organe (Mandibeldrüse und Ovarien) bei Weisellosigkeit über neurosekretorische Zentren aktiviert werden. Jedoch scheint wie bei der Königin (BUTLER, 1959; GARY, 1961) keine direkte Verknüpfung zu bestehen.

*Eingegangen im April 1979.*

*Reçu pour publication en avril 1979.*

### RÉSUMÉ

Il existe de nombreuses données concernant la corrélation entre l'âge et la production d'acide céto-9 décène-2 oïque (acide céto-9) chez les reines (BUTLER et PATON, 1962; PAIN et ROGER, 1976, 1978; PAIN *et al.*, 1967, 1972, 1974). Dans ce travail on a cherché à savoir si la quantité de phéromone variat également avec l'âge chez les ouvrières pondeuses.

La détermination quantitative de la teneur en acide céto-9 en fonction de l'âge a été effectuée chez les ouvrières d'*A.m. capensis*. Les ouvrières des abeilles du Cap (Origine : pointe sud de l'Afrique) se distinguent par une caractéristique biologique : les œufs des ouvrières pondeuses donnent naissance à des individus femelles diploïdes (parthénogenèse thélytoque). En outre les ouvrières du Cap sont de prime abord plus proches d'une reine que des ouvrières des autres races : elles possèdent une spermathèque (diamètre 0,3-0,8 mm) et un nombre élevé d'ovarioles (15-30).

Dans des cagettes expérimentales on a rassemblé 70-80 jeunes abeilles d'*Apis mellifica carnica* sans reine et une ouvrière du Cap fraîchement éclosée et marquée. Cette disposition garantit que les œufs qui vont apparaître les premiers proviennent du Cap.

Les cagettes étaient munies d'un petit morceau de rayon et conservées à l'étuve à 27 °C. Les abeilles étaient approvisionnées en eau, candi et pollen. Comme témoin on a ajouté des ouvrières du Cap fraîchement écloses et marquées à une colonie du Cap possédant une reine.

On a tué à intervalles déterminés les ouvrières du Cap des cagettes expérimentales et celles de la colonie avec reine. On a examiné l'état de développement de leur ovaires, mesuré la spermathèque, quand elle existait, et déterminé par chromatographie gazeuse la teneur en acide céto-9. Pour cette dernière opération les mesures n'ont pas été effectuées selon la méthode classique, dans laquelle les acides sont transformés en leurs esters méthylés correspondants par addition de diazométhane. Elles ont été effectuées sur un chromatographe à gaz de la firme Hewlett-Packard de la série 5720 A, équipé d'un FID et d'une colonne acier (longueur 1,8 m; diamètre extérieur 3,2 mm; intérieur 2,7 mm; 2,5 % SP 1000; Chromosorb G; AW-DMCS; 80-100 mesh). La température dans le four des colonnes était maintenue constante, à 240 °C (chambre d'injection 280 °C, détecteur 300 °C).

On a utilisé l'azote comme gaz vecteur (vitesse de débit 40 ml/min).

Pour effectuer les mesures on a broyé la tête d'une ouvrière du Cap dans une coupelle Eppendorf et dilué avec 50-100 µl d'acétone. Après le maintien en chambre froide pendant 15 heures, on a effectué la mesure en chromatographie gazeuse en introduisant 1-3 µl de l'extrait par acétone dans la chambre d'admission des échantillons. Si l'on traitait les têtes de plusieurs abeilles de même âge dans un même échantillon, la quantité de solution était élevée proportionnellement.

Chez les abeilles du Cap provenant de la colonie avec reine, on a pris 10 abeilles par tranche d'âge. Sur les 5 premières abeilles on a effectué une mesure et sur les 5 suivantes une autre mesure. Par contre chez les ouvrières du Cap provenant des cagettes expérimentales on a procédé en majorité à des mesures individuelles. Tous les 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup>, 5<sup>e</sup>, 7<sup>e</sup>, 8<sup>e</sup> et 11<sup>e</sup> jour de vie on a analysé de 2 à 6 têtes d'abeilles.

A l'aide d'une solution témoin d'acide céto-9 synthétique dilué dans l'acétone, que l'on injectait après chaque chromatogramme d'extrait de tête, on a pu savoir si de l'acide céto-9 était présent dans l'échantillon analysé et, si oui, dans quelle proportion (Fig. 1).

L'évaluation quantitative a découlé de la détermination approximative de la surface des pics : hauteur d'un pic x base médiane (base médiane = largeur du pic à la moitié de la hauteur entre le maximum et la ligne de base).

Entre le 5<sup>e</sup> et le 7<sup>e</sup> jour d'expérimentation les abeilles des cagettes expérimentales ont commencé à construire des cellules sur le morceau de rayon, ce qui indique déjà que les ouvrières accompagnatrices acceptaient l'ouvrière du Cap comme « reine de substitution ».

Au 9<sup>e</sup> jour de leur vie 79 % des ouvrières du Cap avaient commencé à pondre.

Toutes les ouvrières du Cap provenant de la ruche avec reine ont montré des ovaires non développés et chez aucune des ouvrières testées on n'a pu mettre en évidence d'acide céto-9.

L'acide céto-9 était par contre présent chez 78 % des ouvrières du Cap provenant des cagettes expérimentales. Il a été enregistré pour la première fois chez les ouvrières de 4 jours avec une moyenne de 12,5 µg/ouvrière du Cap. La quantité d'acide céto-9 mesurée a augmenté ensuite continuellement et atteint chez les ouvrières de plus de 100 jours une moyenne de 412,9 µg/abeille. Aucune diminution de la teneur en acide céto-9 n'a été mise en évidence chez les ouvrières qui, au moment de la mesure, n'étaient pas ponduses.

Le développement ovarien des ouvrières du Cap, semble n'avoir aucune influence sur la formation de l'acide céto-9, bien que la majorité des ouvrières du Cap, chez lesquelles on a mesuré la quantité d'acide céto-9, possédât des ovaires développés et fût en partie ponduse.

## LITERATUR

- ANDERSON R. H., 1963. — The laying worker in the Cape honeybee, *Apis mellifera capensis*. *J. Apic. Res.*, **2**, 85-92.
- BARBIER M., LEDERER E., 1960. — Structure chimique de la substance royale de la reine d'abeille (*Apis mellifica* L.). *C.R. Acad. Sci. Paris*, **250**, 4 467-4 469.
- BERTHOLF L. M., 1942. — Effect of certain biological factors on the longevity of caged bees. *J. Econ. Entomol.*, **35**, 887-891.
- BUTLER C. G., 1957 a. — The process of queen supersedure in colonies of honey-bees (*Apis mellifera* L.). *Insectes sociaux*, **4**, 211-223.
- BUTLER C. G., 1957 b. — The control of ovary development in worker honeybees (*A. mellifera*). *Experientia*, **13**, 256.
- BUTLER C. G., 1959. — Queen substance. *Bee World*, **40** (11), 269-275.
- BUTLER C. G., PATON P. N., 1962. — Inhibition of queen rearing by queen honeybees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Proc. R. ent. Soc. Lond. A*, **37**, 114-116.
- CALLOW R. K., JOHNSTON N. C., 1960. — The chemical constitution and synthesis of queen substance of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Bee World*, **41**, 152.
- DARCHEN R., 1957. — La reine d'*Apis mellifica*, les ouvrières ponduses et les constructions cirières. *Insectes sociaux*, **4** (1), 322-325.
- DARCHEN R., 1960. — Les régulations neurohormonales de l'instinct constructeur des ouvrières d'*Apis mellifica*. *Ann. Abeille*, **3** (4), 329-333.

- GARY N. E., 1961. — Queen honey bee attractiveness as related to mandibular gland secretion. *Science*, **133**, 1 479-1 480.
- GROOT A. P. de, VOOGD S., 1954. — On the ovary development in queenless worker bees (*Apis mellifica* L.). *Experientia*, **10**, 384-385.
- HESS G., 1942. — Über den Einfluss der Weisellosigkeit und des Fruchtbarkeitsvitamins E auf die Ovarien der Bienenarbeiterin. *Beih. schweiz. Bienenztg*, **1**, Heft 2.
- HESSE B., 1977. — Ovarientwicklung und Eiablage bei Arbeiterinnen verschiedener Rassen von *Apis mellifera* (vergleichende Untersuchungen). Examensarbeit am Inst. f. Bienenkunde, Obersursel.
- MAURIZIO A., 1946. — Beobachtungen über die Lebensdauer und den Futterverbrauch gefangen gehaltenen Bienen. *Beih. schweiz. Bienenztg*, **2**, Heft 13.
- MAURIZIO A., 1961. — Lebensdauer und Altern bei der Honigbiene (*Apis mellifica* L.). *Gerontologie*, **5**, 110-128.
- ONIONS G. W., 1912. — South African « Fertile - Worker Bees ». *Aprie. J. Un. S. Afr.*, **3** (5), 720-728.
- PAIN J., 1966. — Nouveau modèle de cagettes expérimentales pour le maintien d'abeilles en captivité. *Ann. Abeille*, **3**, 71-76.
- PAIN J., BARBIER M., BOGDANOWSKI D., LEDERER E., 1962. — Chemistry and biological activity of the secretions of queen and worker honeybees (*Apis mellifica*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **6**, 233-241.
- PAIN J., BARBIER M., ROGER B., 1967. — Dosages individuels des acides céto-9 décène-2 oïque et hydroxy-10 décène-2 oïque dans les têtes des reines et des ouvrières d'abeilles. *Ann. Abeille*, **10**, 45-52.
- PAIN J., ROGER B., 1976. — Variation de la teneur en acide céto-9 décène-2 oïque en fonction de l'âge chez les reines vierges d'abeille (*Apis mellifica ligustica* S.). *C.R. Acad. Sci. Paris*, **283** (7), 797-799.
- PAIN J., ROGER B., 1978. — Rythme circadien des acides céto-9 décène-2 oïque, phéromone de la reine et hydroxy-10 décène-2 oïque des ouvrières d'abeilles *Apis mellifica ligustica* S. *Apidologie*, **9** (4), 263-272.
- PAIN J., ROGER B., THEURKAUFF J., 1972. — Sur l'existence d'un cycle annuel de la production de phéromone (acide céto-9 décène-2 oïque) chez les reines d'abeilles (*Apis mellifica ligustica* S.). *C.R. Acad. Sci. Paris*, **D**, **275**, 2399-2402.
- PAIN J., ROGER B., THEURKAUFF J., 1974. — Mise en évidence d'un cycle saisonnier de la teneur en acides céto-9 et hydroxy-9 décène-2 oïque des têtes de reines vierges d'abeille (*Apis mellifica ligustica* S.). *Apidologie*, **5** (4), 319-355.
- ROGER B., 1971. — L'influence de la reine d'abeille (*Apis mellifica* L.) sur la prise de nourriture des ouvrières accompagnatrices. *Apidologie*, **2** (2), 123-155.
- RUTTNER F., 1976. — The Cape bee — a biological curiosity. Intern. Symposium on biology, taxonomy and selection of African Bees, Pretoria 17. — 25.11.76.
- RUTTNER F., 1977. — The problem of the cape bee (*Apis mellifera capensis* Escholtz): parthenogenesis-size of population - evolution. *Apidologie*, **8** (3) 281-294.
- RUTTNER F., KOENIGER N., VEITH H. J., 1976. — Queen substance bei eierlegenden Arbeiterinnen der Honigbiene (*Apis mellifica* L.). *Naturwissenschaften*, **63**, 434.
- SAKAGAMI S. F., AKHIRA Y., 1958. — Comparison of ovarian size and number of ovarioles between workers of the Japanese and European honeybees. *Kontyu*, **26**, 103-109.
- VELTHUIS H. H. W., 1970. — Ovarian development in *Apis mellifera* worker bees. *Ent. exp. and appl.*, **13**, 377-394.
- VOOGD S., 1955. — Inhibition of ovary development in worker bees by extraction fluid of the queen. *Experientia*, **11**, 181-182.
- VOOGD S., 1956. — The influence of a queen on the ovary development in worker bees. *Experientia*, **12**, 199-201.