# Reproduktionsbiologie und olfaktorisches Verhalten des Kleinen Beutenkäfers *Aethina tumida* MURRAY 1867 (Nitidulidae)

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**
**Fakultät Naturwissenschaften**
**Universität Hohenheim**

Institut für Zoologie / Landesanstalt für Bienenkunde
vorgelegt von

*Sandra Gabriele Mustafa*
*aus Tübingen*
*2014*

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer

1. berichtende Person: Prof. Dr. Johannes Steidle

2. berichtende Person: Prof. Dr. Robert Paxton

Eingereicht am: 28.07.2014
Mündliche Prüfung am: 31.10.2014

Die vorliegende Arbeit wurde am 06.10.2014 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen ..... IV
1 Allgemeine Einleitung ..... 1
1.1 Aktuelle Verbreitung ..... 2
1.2 Systematische Einordnung und Morphologie ..... 4
1.3 Lebenszyklus ..... 6
1.4 Untersuchungsgebiete ..... 9
2 Biotests zum Nachweis chemischer Kommunikation beim Kleinen Beutenkäfer 13
2.1 Einleitung ..... 13
2.2 Material und Methoden ..... 15
2.2.1 Versuchstiere ..... 15
2.2.2 Aggregationstest ..... 18
2.2.3 Präferenztest ..... 20
2.2.4 Filtertest ..... 21
2.2.5 Extraktherstellung und chemische Analysen ..... 22
2.3 Ergebnisse ..... 24
2.3.1 Aggregationstest ..... 24
2.3.2 Präferenztest ..... 26
2.3.3 Filterpapiertest ..... 28
2.3.4 Chemische Analyse von Käferextrakten mit GC-MS-Methoden ..... 30
2.4 Diskussion ..... 32
3 Das Paarungsverhalten des Kleinen Beutenkäfers ..... 37
3.1 Einleitung ..... 37
3.2 Material und Methoden ..... 39
3.2.1 Verhaltensbeobachtungen ..... 39
3.2.2 Sexualverhalten und Aggregation ..... 41
3.2.3 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Körperoberfläche ..... 41
3.3 Ergebnisse ..... 42
3.3.1 Verhaltensbeobachtungen ..... 42
3.3.2 Kopulation und Aggregation ..... 52
3.3.3 Homosexuelles Verhalten ..... 54
3.3.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Körperoberfläche ..... 55
3.4 Diskussion ..... 58

4 Die Reproduktionsstrategie des Kleinen Beutenkäfers und ihr Einfluss auf die praktische Bienenhaltung ..... 65
4.1 Einleitung ..... 65
4.2 Material und Methoden ..... 66
4.2.1 Untersuchungsgebiet ..... 66
4.2.2 Ablegerbildung und Versuchsgruppen ..... 67
4.2.3 Statistische Analyse ..... 68
4.3 Ergebnisse ..... 69
4.3.1 Käferbefall ..... 69
4.3.2 Reproduktion der Käfer bei Ablegern und Wirtschaftsvölkern ..... 70
4.4 Diskussion ..... 71
5 Vorversuche zur Fernorientierung ..... 74
5.1 Einleitung ..... 74
5.2 Material und Methoden ..... 75
5.2.1 Versuchstiere ..... 75
5.2.2 Olfaktometer-Test ..... 75
5.2.3 Flugkäfigversuche ..... 77
5.3 Ergebnisse ..... 79
5.3.1 Olfaktometer ..... 79
5.3.2 Flugkäfigversuche zur Attraktivität von Gärstoffen ..... 80
5.4 Diskussion ..... 80
6 Allgemeine Diskussion und Ausblick ..... 83
7 Zusammenfassung ..... 87
8 Summary ..... 90
9 Anhang ..... 93
10 Literatur ..... 98
Danksagung ..... 108
Eidesstattliche Versicherung gemäß § 7 Absatz 7 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat ..... 110
Eidesstattliche Versicherung, Belehrung ..... 111

# Abkürzungen

* = Signifikanz-Niveau $p < 0,05$

** = Signifikanz-Niveau $p < 0,01$

*** = Signifikanz-Niveau $p < 0,001$

♂ = Männchen

♀ = Weibchen

bzw. = beziehungsweise

d = Tag(e)

df = degrees of freedom

GC = Gaschromatographie

MS = Massenspektroskopie

n = Anzahl

n. s. = nicht signifikant

p = Wahrscheinlichkeit, dass ein auftretender Unterschied auf Zufall beruht

S.D. = Standardabweichung

u. a. = unter anderem

$\bar{x}$ = Mittelwert

z. B. = zum Beispiel

z. T. = zum Teil

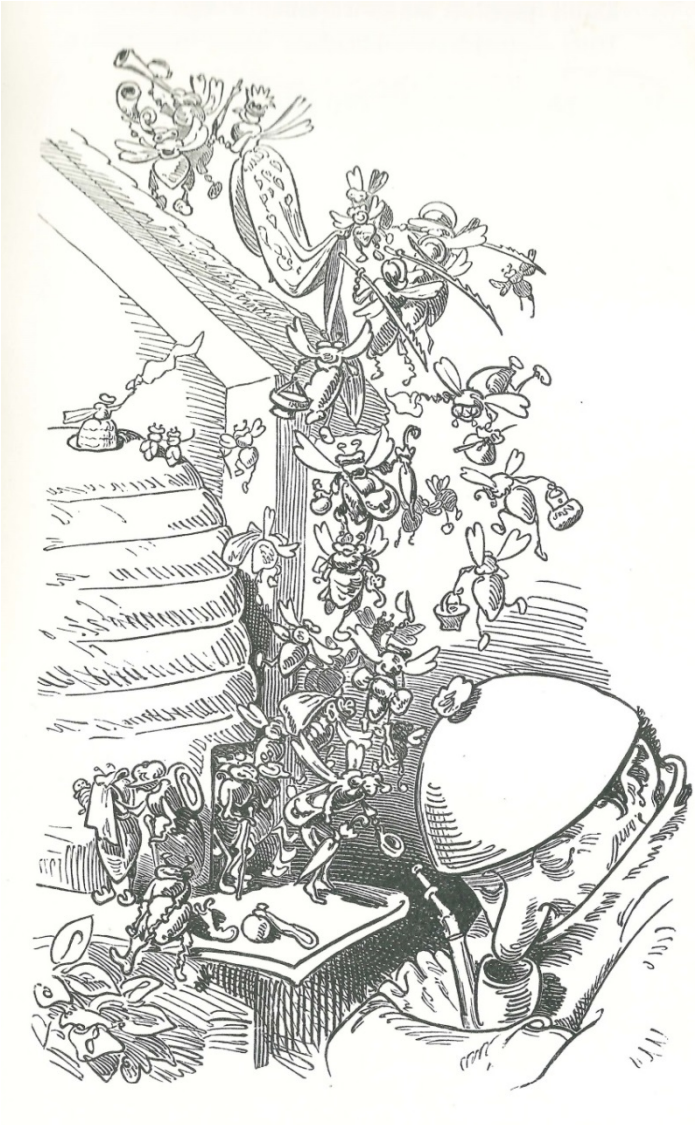
*I will arise and go now, and go to Innisfree,*

*And a small cabin build there, of clay and wattles made;*

*Nine bean rows will I have there, a hive for the honey bee,*

*And live alone in the bee loud glade.*

**Auszug aus „The Lake of Innisfree“ William Butler Yeats (1892)**



**Aus Schnurrdiburr oder die Bienen im Neuen Wilhelm Busch Album (1949).**

# 1 Allgemeine Einleitung

Der Kleine Beutenkäfer (deutscher Trivialname für *Aethina tumida,* Murray 1867, Nitidulidae) ist ein Honigbienenparasit, der in seinem ursprünglichen Verbreitungsgebiet, dem südlichen Afrika, zwar ubiquitär vorkommt (Hepburn und Radloff, 1998, Johannsmeier, 2001), als Schädling aber eher eine untergeordnete Rolle spielt (Neumann und Elzen, 2004). Nach seiner Erstbeschreibung (Murray, 1867) wurde er bis zu seiner Einschleppung in die USA 1996 (Elzen et al., 1999, Hood, 2004, Neumann und Elzen, 2004, Neumann und Ellis, 2008) und Australien 2001 (Gillespie et al., 2003, Spiewok et al., 2007) mit Ausnahme weniger früher Arbeiten (Lundie, 1940, Schmolke, 1974) weitgehend von der wissenschaftlichen Welt ignoriert. In den neuen Verbreitungsgebieten verursachte er insbesondere in feucht-heißen Gebieten, wie z.B. Florida massive Schäden bei befallenen Bienenvölkern und in Vorratslagern (Hood, 2004). Damit reiht sich der Kleine Beutenkäfer in die Liste der Krankheitserreger und Parasiten ein, die im Zuge einer globalen Imkerei aus ihrem Ursprungsgebiet hinaus verbreitet wurden und eine ernsthafte Bedrohungen für die Bienenzucht darstellen (UNEP, 2010). Dies führte auch dazu, dass Lebensweise sowie Diagnose- und Bekämpfungsmöglichkeiten des Kleinen Beutenkäfers heute intensiver wissenschaftlich untersucht werden.

Die bisherigen Untersuchungen konzentrierten sich auf Aspekte wie Management und Bekämpfungsstrategien (Hood und Miller, 2005, Hood, 2006, Ellis et al., 2010, Ellis et al., 2004c, Ellis et al., 2002a, Arbogast et al., 2007, Elzen et al., 1999), Honigbiene-Käfer Interaktionen (Neumann et al., 2001, Ellis et al., 2002c, Ellis et al., 2004a, Ellis und Delaplane, 2008a), Populationsdynamik (Spiewok et al., 2007, El-Niweiri et al., 2008, Hassan und Neumann, 2008, Spiewok et al., 2008) oder olfaktorische Orientierung im Hinblick auf die Wirtsfindung (Suazo et al., 2003, Torto et al., 2005, Torto et al., 2007a, Nolan und Hood, 2008).

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, verschiedene Aspekte der bisher kaum untersuchten Reproduktionsbiologie und des Aggregationsverhaltens aufzuklären und in diesem Zusammenhang das olfaktorische Verhalten in den verschiedenen Lebensabschnitten der Adulti zu untersuchen. Insbesondere sollte die Frage geklärt werden, ob hierbei Aggregations- und/oder Sexualpheromone eine Rolle spielen und

ob diese zur Diagnose und biologischen Bekämpfung des Kleinen Beutenkäfers beitragen könnten. Hierfür wurden zunächst verschiedene Labor-Biotests entwickelt, mit denen das Reproduktions- und Aggregationsverhalten der Käfer unter verschiedenen Bedingungen erfasst wurden. Das Kopulationsverhalten wurde mit Verhaltensbeobachtungen und in weiteren Biotests eingehend untersucht. In weiteren Versuchen wurden die Attraktivitäts- bzw. Repellentwirkungen verschiedener Käferstadien, Käferextrakte sowie synthetischer Substanzen im Fern- und Nahbereich untersucht. Mit einem Versuch an Kleinvölkern in Australien wurde simuliert, wie sich eine Einschleppung des Kleinen Beutenkäfers nach Deutschland auf die in der hiesigen Imkerpraxis weit verbreitete Ablegerbildung auswirken könnte.

## 1.1 *Aktuelle Verbreitung*

Nachdem *A. tumida* 1996 erstmals in South Carolina entdeckt wurde, hat er sich in den folgenden Jahren rasch über einen großen Teil der USA ausgebreitet (Eischen et al., 1998). Neben der Fähigkeit der Käfer, über weite Strecken zu fliegen, spielten Wanderimker, die Bienenvölker zu Bestäubungszwecken vor allem entlang der Ostküsten transportierten, bei der Verbreitung des Parasiten eine entscheidende Rolle. Darüber hinaus haben die in den USA früher üblichen, ungekühlten Lagerhallen die Etablierung der Populationen gefördert. Die gelagerten Beuten mit Wachs und Honigwabenresten boten für den Kleinen Beutenkäfer ideale Reproduktionsbedingungen. Inzwischen ist der Parasit über den Großteil der Ostküste und einen Teil der Westküste verbreitet (Abb. 1), wobei sich die größte Populationsdichte in den Südstaaten findet (Spiewok et al., 2007).

In Australien hat sich der Kleine Beutenkäfer nach den ersten Nachweisen 2001 (Gillespie et al., 2003) in der Gegend nord-westlich von Sydney, vermutlich entlang der Ostküste, ausgebreitet, wobei auch hier die Populationsdichte und der Invasionsdruck in den nördlichen, heißeren Regionen dichter ist als beispielsweise im südlichen Victoria mit gemäßigtem Klima. Des Weiteren gibt es neuere Berichte über erste Funde im Nord-Osten Westaustraliens (Abb. 1; Annand, 2011).

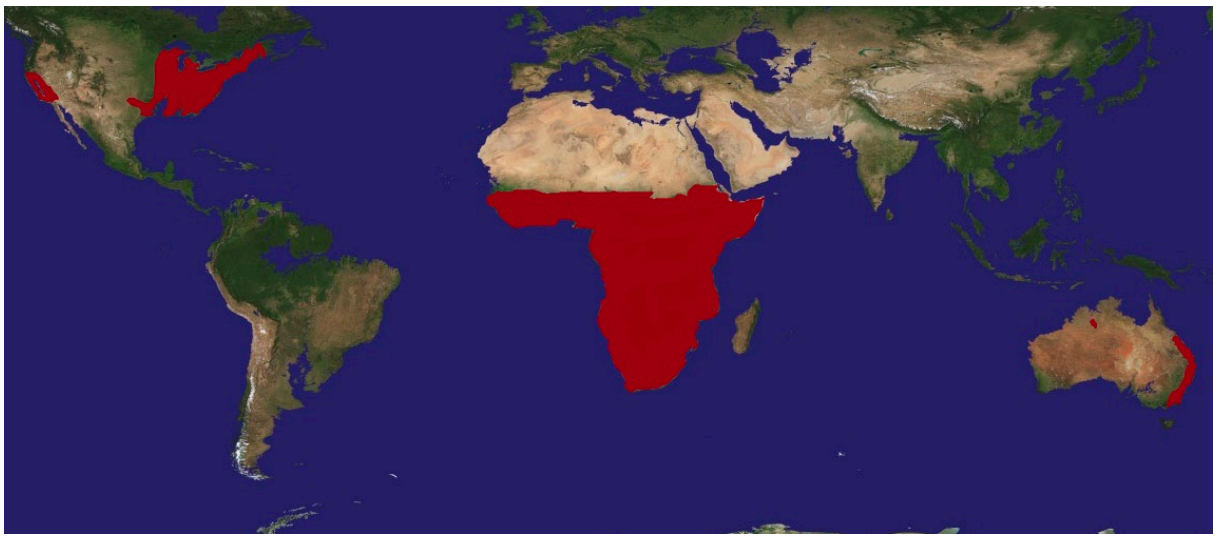


**Abb. 1: Verbreitung (in rot) des Kleinen Beutenkäfers *A. tumida*. Karte von http://www.johnstonsarchive.net/spaceart/cylmaps.html bearbeitet und modifiziert nach Neumann und Ellis (2008) und Annand (2011).**

Auch nach Europa wurde der Kleine Beutenkäfer eingeschleppt, hier aber sofort nach seiner Einführung in Portugal erfolgreich wieder ausgemerzt. Ähnliches wurde aus Kanada berichtet, wo der Parasit dreimal unabhängig voneinander sofort ausgemerzt wurde (Lounsberry et al., 2010). In Afrika hat *A. tumida* sein Verbreitungsgebiet inzwischen weiter nach Norden ausgebreitet; Funde in Ägypten (Mostafa und Williams, 2002) konnten bei einem zweiten Monitoring allerdings nicht bestätigt werden (Hassan und Neumann, 2008).

Molekulargenetische Analysen mit Mikrosatelliten lassen vermuten, dass die Einschleppung in die beiden Kontinente Amerika und Australien unabhängig voneinander vom südlichen Afrika aus erfolgte (Lounsberry et al., 2010). Die Einschleppung in Kanada erfolgte einmal von den USA nach Quebec. Darüber hinaus wiesen Proben aus Manitoba und Alberta dieselben Haplotypen auf wie australische Proben. Für eine Einführung aus Australien spricht auch ein reger Handel mit „package bees“ zwischen den beiden Kontinenten, der zwischen Südafrika und Kanada nicht existiert (Lounsberry et al., 2010).

## 1.2 *Systematische Einordnung und Morphologie*

Innerhalb der Coleoptera sind die Nitidulidae wie der Großteil der Käferfamilien den Polyphaga zuzuordnen, die sich durch zahlreiche apomorphe Merkmale, wie telotrophe Ovariolen und vollständige Clyptopleurie, auszeichnen (Hennig, 1994). Weiter gehören sie gemeinsam mit den Marienkäfern (Coccinellidae) und einigen anderen Familien zur Überfamilie der Cucujoidea, u. a. zu erkennen an den keulenförmigen Fühlern (Hennig, 1994; Abb. 2).

Nitidulidae sind meist recht klein (2-3 mm), oval geformt und schwarz-braun gefärbt. In Mitteleuropa existieren etwa 140 Arten, weltweit ca. 2500. Sie ernähren sich typischerweise von Pollen, Pflanzensäften oder Aas und spielen als Schädlinge an Kulturpflanzen oder Vorräten, möglicherweise aber auch als Bestäuber, eine Rolle (Jacobs und Renner, 1998). *A. tumida* ist somit durch seine Ernährung mit Pollen, Honig und Larven oder Honigbienenkadavern ein typischer Vertreter der Nitidulidae, dessen Speiseplan im Gegensatz zu den Spezialisten in dieser Familie sogar das komplette Nahrungsspektrum umfasst.

Die Imagines des Kleinen Beutenkäfers selbst sind etwas größer als die meisten anderen Vertreter dieser Familie (ca. 5 mm lang und 3 mm breit; Abb. 2). Morphologisch zeichnen sie sich u. a. durch einen konvex geformten Oberkörper in Längsreihen behaarte Elytren (Murray, 1867) und eine je nach Altersstufe hellbraune (junge Käfer) bis dunkelbraune, fast schwarze, Farbe aus (ältere Käfer; persönliche Beobachtung; (Schmolke, 1974). Die lateralen Körperränder wie Thorax, Elytren und Pygidium sind mit dicken, kurzen Haaren besetzt. Die letzten Segmente des Abdomens liegen von den Elytren unbedeckt und frei, wobei ein großes, breites und punktförmig zulaufendes Pygidium sichtbar wird. Das Pronotum läuft nach hinten spitz zu, die Elytren sind am oberen Ende zur Körpermitte hin konkav ausgeschnitten, wodurch ein halbmondförmiger Ausschnitt des Abdomens frei sichtbar ist (Murray, 1867). Männchen und Weibchen sind nur an den Genitalien sicher zu unterscheiden, Weibchen sind jedoch durchschnittlich etwas größer und schwerer (Ellis et al., 2002b).

**Abb. 2: *A. tumida* Imago auf einer Honigwabe. Zu erkennen sind die für die Cucujoidea typischen keulenförmigen Antennen und schwach die in Längsreihen angeordneten Setae auf der Körperoberfläche. Foto: M. O. Schäfer.**

Meinem persönlichen Eindruck nach sind Männchen in der Form z. T. etwas abgeflachter. Die Größe zwischen und innerhalb der verschiedenen Populationen oder auch Zuchten variiert jedoch zu sehr, um dies als verlässlichen Anhaltspunkt zur Geschlechterbestimmung zu verwenden (persönliche Beobachtung). Mechanisch lässt sich das Geschlecht leicht durch sanften Druck auf den hinteren Teil des Abdomens bestimmen. Dabei wird bei den Weibchen der Ovipositor, bei den Männchen das letzte Abdominaltergit ausgestülpt. Die Larven (Abb. 3) sind im letzten (L4) Stadium ca. 1,2 cm lang, weiß-beige gefärbt und dorsal mit einer Doppelreihe Borsten behaart. Dorsolateral findet sich auf jeder Seite eine weitere Borstenreihe. Die Eier sind weiß, fast durchsichtig und ca. 1,5 x 0,25 mm groß (Boecking, 2005).

**Abb. 3: Larve des Kleinen Beutenkäfers neben einem südafrikanischen 20 Cent Stück (ähnlich 10€ Cent Stück). Man beachte die dorsal sichtbaren Borsten. Foto: P. Rosenkranz**

## 1.3 *Lebenszyklus*

Die Entwicklung findet im Erdboden von Käferlarven über eine Präpuppe zur Puppe und zur Imago statt. Nach dem Schlupf aus der Erde begeben sich die Käfer auf Wirts- und Nahrungssuche. Sie sind ausgezeichnete Flieger und können in einem Radius von bis zu 16 km schwache oder gestresste Völker erkennen (Neumann und Elzen, 2004). Ist kein geeigneter Wirt zu finden, können alternativ auch Früchte als Nahrungsquelle genutzt werden (Buchholz et al., 2008). Steht jedoch ein geeignetes Wirtsvolk in nächster Nähe zur Verfügung, wie häufig an einem herkömmlichen Bienenstand, kann es passieren, dass die Käfer in ein nur wenige Meter entferntes Volk einwandern (Spiewok et al., 2008). Bei der Wirtsfindung spielen vermutlich olfaktorische Reize eine Rolle, worauf in Kapitel 5 näher eingegangen wird. Wie bei vielen holometabolen Insekten, gibt es Unterschiede in der Ernährung bei Imagines und Larven. Ähnlich, wie z.B. bei Wespen oder Netzflüglern ist die Ernährung der Larven eher proteinreich im Gegensatz zur zuckerreichen Ernährung der Adulti.

Innerhalb des Bienenstocks ernähren sich die Imagines von Pollen und Honig. Sie zeigen aber auch kannibalisches Verhalten und können außerdem häufig beim

Verzehr toter Bienen beobachtet werden (persönliche Beobachtung). Der eigentliche Schaden im Bienenvolk wird durch die Larven verursacht, die sich durch Brut und Honigwaben fressen. Außer dem hierbei verursachten Brutschaden sind auch die Exkremente der Larven und die damit einhergehende symptomatische Verschleimung der Waben für den Zusammenbruch des Volkes verantwortlich (Abb. 4). Damit es jedoch so weit kommt, muss es den Käfern erst einmal gelingen, sich erfolgreich im Bienenvolk zu reproduzieren. So können stark mit Käfern befallene Völker ohne Schäden bleiben, so lange es den Bienen gelingt, Eier und Larven der Käfer effektiv auszuräumen oder zu fressen. Es findet hier ein Wettlauf zwischen dem Hygieneverhalten der Bienen und den reproduzierenden Käfern statt. Die Käfer schützen sich vor den Bienen, indem sie Aggregationen in den für Bienen unzugänglichen Ritzen und Spalten bilden oder sich bei einer Begegnung mit den Bienen flach auf den Boden pressen. Die Bienen halten wiederum die Verbreitung der Käfer innerhalb des Volkes durch den Bau von „Gefängnissen“ in Schach, indem die Ritzen mit Ansammlungen von Käfern mit Propolis verschlossen werden (Ellis et al., 2004d). Trotzdem konnte auch Trophallaxis zwischen Käfern und Bienen beobachtet werden. Die Käfer werden also einerseits als Feind erkannt und eingesperrt, anderseits gelingt es ihnen, am Leben zu bleiben und gefüttert zu werden, indem sie einzelnen Bienen mit den Antennen Betrillern (Ellis et al., 2002c).

Typischerweise werden die Eier in Spalten und Ritzen abgelegt oder durch Perforation mit dem Ovipositor in die Brutzellen (Ellis et al., 2003, Ellis et al., 2004b, Ellis und Delaplane, 2008b). Eine Ursache für die höhere Anfälligkeit der europäischen gegenüber den afrikanischen Bienen könnte im Hygieneverhalten liegen. Allerdings wurde bei Versuchen kein Unterschied zwischen den verschiedenen Rassen gefunden werden (Ellis et al., 2004b).

**Abb. 4: Typisches Schadbild einer mit Beutenkäferlarven befallenen Wabe. Foto: S. Spiewok.**

Ein Faktor, der die stärkere Toleranz afrikanischer Honigbienen gegenüber dem Beutenkäfer begünstigt, ist sicherlich die geringer ausgeprägte Ortstreue (Hepburn und Radloff, 1998). Bei Störung oder Parasiten innerhalb des Bienenstocks schwärmt das Volk aus. Sie verlieren so zwar Brut- und Honigwaben, auf denen Kleine Beutenkäfer sich nun ungehindert fortpflanzen kann, entgehen aber der Gefahr an starkem Beutenkäferbefall zu kollabieren. Dieses als "absconding" bezeichnete Verhalten ist bei den europäischen Bienenrassen gar nicht oder nur sehr selten zu beobachten. Die Eier des Kleinen Beutenkäfers entwickeln sich innerhalb von zwei bis drei Tagen zur L1 Larve und über drei weitere Häutungen in zehn bis 14 Tagen zur so genannten Wanderlarve. Diese verlässt den Bienenstock, lässt sich zu Boden fallen, begibt sich auf die Suche an einem geeigneten Ort zur Verpuppung und kann dabei beträchtliche Entfernungen von vielen Metern zurücklegen. Ist ein geeigneter Fleck Erde gefunden, graben sie sich bis zu 1,5 Meter tief ein und entwickeln sich innerhalb von drei Tagen zur beweglichen Präpuppe, verbleiben in diesem Stadium

durchschnittlich vier Tage, weitere acht im Puppenstadium und schlüpfen dann innerhalb der nächsten ein bis zwei Tage aus der Erde (Schmolke, 1974). Je nach Bedingungen kann die Entwicklung zum Imago auch bis zu sechs Wochen andauern. Nach dem Schlupf aus der Erde begeben sich die Käfer wieder auf Wirtssuche und der Zyklus schließt sich.

## 1.4 *Untersuchungsgebiete*

Der Kleine Beutenkäfers ist in Deutschland bisher nicht verbreitet und wird als Seuche deklariert, weshalb Untersuchungen vor Ort aus seuchenrechtlichen Gründen nicht möglich waren. Die Untersuchungen dieser Arbeit fanden deshalb an insgesamt drei Standorten statt:

1. Rhodes University, Grahamstown, Südafrika (33° 18′ 14.14″ S, 26° 31′ 59.6″ E).

Grahamstown befindet sich am Fuße einer Bergregion zwischen Kapstadt und Port Elisabeth mit klimatischen Bedingungen ähnlich den mediterranen Gebieten Europas. Die Region ist ein natürliches Verbreitungsgebiet des Käfers mit moderatem Befallsdruck. Dieser liegt in der Regel zwischen zehn und ca. 100 Käfern pro Volk, aber es finden sich auch regelmäßig einzelne Völker mit mehreren hundert Käfern (Spiewok et. al., 2007). Hier wurden im südafrikanischen Sommer (Januar und Februar 2006) Olfaktometerversuche zur Attraktivität von Bienenprodukten (Pollen, Honig), Bienen und synthetischen Bienenduftstoffen durchgeführt. Daneben wurden Proben für die späteren gaschromatographischen Analysen gesammelt.

2. Bee Research Laboratory, USDA, Beltsville, Maryland, USA (39° 2′ 15″ N, 76° 55′ 4″ W).

Das Klima in Beltsville, einem Vorort von Washington D.C., ist unserem mitteleuropäischen Klima ähnlich. Der Befallsdruck der Völker mit Käfern ist dort sehr gering (keine bis 20 Käfer pro Volk; Spiewok et. al. 2007) und es gibt kaum Völkerverluste, die auf den Kleinen Beutenkäfer zurückzuführen sind. Hier wurden im Sommer 2006 Proben von Käfern für chemische Analysen genommen, sowie Labor- und Feldarbeiten durchgeführt, unter anderem Biotests zum Aggregationsverhalten und erste Videoaufnahmen zur Analyse des Kopulationsverhaltens.

3. University of Western Sydney, Richmond, Australien (33° 35′ 48.8″ S, 150° 45′ 9.36″ E).

Richmond liegt am Fuße der Blue Mountains, dem Hawkesbury District, einer Gegend, westlich von Sydney. Sowohl die klimatischen Bedingungen (heiße Sommer mit Temperaturen um die 30°C und kühle Winter mit um die 5°C) als auch die Käferbefallszahlen ähneln denen in Südafrika (Spiewok et. al., 2007). Im Gegensatz zu Südafrika verursacht der Kleine Beutenkäfer in dieser Region wirtschaftliche Schäden und kann sogar für Völkerverluste verantwortlich sein (Gillespie et al., 2003, Spiewok et al., 2008). Hier wurden in den Winterhalbjahren 2006/2007 und 2007/2008 Biotests zur Attraktivität von Käferextrakten sowie Versuche zum Kopulations- und Aggregationsverhalten durchgeführt. Daneben wurden ein Feldversuch zur Anfälligkeit von Kleinvölkern sowie weitere Videoaufnahmen zur Analyse des Kopulationsverhaltens durchgeführt.

Alle Untersuchungen dieser Doktorarbeit fanden im Rahmen des DUKAT (**D**iagnose **u**nd **K**ontrolle von *Aethina tumida*) Projektes statt. Es handelte sich hierbei um ein Gemeinschaftsprojekt der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, CVUA Freiburg, Biozentrum - Universität Würzburg und der Universität Hohenheim (Landesanstalt für Bienenkunde). Jeder der Projektpartner war zuständig für die Bearbeitung von Modulen, welche verschiedene Themenkomplexe umfassten.

**Abb. 5: Untersuchungsgebiet auf dem Campus der University of Western Sydney, wo ein Großteil der Versuche durchgeführt wurde. Oben ein Teil des Imkereigeländes; unten das Labor.**

Von unseren Projektpartnern wurden Fragestellungen zu alternativen Nahrungsquellen, Populationsdynamik, Genetik und dem Verhalten von *A. tumida* bearbeitet. Die Verhaltensuntersuchungen umfassten Fragenstellungen zur Parasit-Wirt Interaktion sowie die genaue Untersuchung der Reproduktionsbiologie (letzteres wurde von uns, der Landesanstalt für Bienenkunde, untersucht).

Weitere Aspekte umfassten die Untersuchung von potentiellen natürlichen Feinden und verschiedener imkerischer Praktiken als Kontroll- und Diagnosemöglichkeit. Ein Teil dieses Moduls zum Einfluss der imkerischen Praxis wurde von uns bearbeitet. Hauptaugenmerk unserer Versuche lag auf der Durchführung von Biotests zum Nachweis von Pheromonen, welche im Hinblick auf Pheromonfallen zum Monitoring und der Bekämpfung von Nutzen sein könnten. Die Arbeitsplätze an den schon oben erwähnten Institutionen (siehe 1.4) wurden freundlicherweise von unseren jeweiligen Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt.

# 2 Biotests zum Nachweis chemischer Kommunikation beim Kleinen Beutenkäfer

## *2.1 Einleitung*

Untersuchungen zur chemischen Ökologie des Kleinen Beutenkäfers decken bisher erst ein kleines Feld ab und viele basale biologische Fragen wie die Aktivierung und der genaue Ablauf von Paarung und Reproduktion sowie die Rolle intraspezifischer, chemischer Kommunikation sind immer noch offen. Die folgenden Biotests hatten das Ziel, zu untersuchen, wie Alter und Geschlecht das Sexual- und Aggregationsverhalten beeinflussen und inwiefern Pheromone hierbei eine Rolle spielen könnten.

Bei einigen anderen als Vorratsschädlinge bekannten Käfern, wie *Prostephanus truncatus* (Bostrichidae) und dem nah verwandten Nitidulidae *Carpophilus hemipterus* wird der Lebenszyklus der Imagines in zwei bzw. drei Phasen unterteilt: In der ersten (präreproduktiven) Phase wird das Verhalten durch Futtersuche geprägt. Entsprechend zeigten die Käfer in dieser Zeit eine erhöhte Flugaktivität, die durch Licht und bei *C. hemipterus* auch stark durch das Anbieten von attraktiven Gerüchen, wie Apfelessig, beeinflusst werden konnte (Fadamiro und Wyatt, 1996, Blackmer und Phelan, 1991). In der zweiten interreproduktiven Fortpflanzungsphase nimmt das phototaktische Verhalten ab; die Flugaktivität bleibt erhöht und die Orientierung findet zusätzlich nach Aggregationspheromonen gerichtet statt, bis schließlich, in der postreproduktiven Phase, wenn der Peak des Reproduktionsverhalten überschritten ist, die Flugaktivität abnimmt (Fadamiro und Wyatt, 1996). Beide Arten und alle Schädlinge der Gattung *Carpophilus sp.* zeigen, wie *A. tumida,* ein stark ausgeprägtes und an den Wirt gebundenes Aggregationsverhalten. Entsprechend lässt sich auch bei A*. tumida* der Lebenszyklus der Imagines in zwei bzw. drei Phasen einteilen: Die Wirtssuche, bis zum Eindringen in den Stock als „präreproduktive Phase“, das Leben im Bienenstock mit einem Peak im Reproduktionsverhalten bis zum Nachlassen der Fruchtbarkeit und das Sterben der Käfer als „inter- und postreproduktive Phase“.

Das Aggregationsverhalten von *A. tumida* lässt sich im natürlichen Habitat der Käfer, dem Bienenstock, leicht beobachten, da die Käfer dort meist in kleinen Aggregationen in Ecken oder Spalten, z. B. zwischen Rähmchen und Beute zu finden sind. Im Labor können Aggregationen induziert werden, indem Käfer in einer Zuchtbox neu zusammen gebracht werden. Innerhalb weniger Sekunden bis Minuten bilden die Käfer dann eine Aggregation.

Des Weiteren zeigen die Kleinen Beutenkäfer ein stark ausgeprägtes thigmotaktisches Verhalten. Sie vermeiden das Laufen über offene Flächen und verkriechen sich, wenn möglich, in Ritzen und Spalten. Dieses Verhalten stellt eine weitere Anpassung an das Leben im Bienenstock dar, mit der sie sich nach Eindringen in den Bienenkasten vor dem Hygiene- und Abwehrverhalten größeren Honigbienen schützen können (Elzen et al., 1999).

Bisher ist ungeklärt zu welchem Zeitpunkt nach dem Eindringen in den Bienenstock und aufgrund welcher Reize die Käfer mit der Paarung beginnen. Ein besseres Verständnis des Aggregationsverhaltens und der Signale, die dieses Verhalten auslösen, könnte zudem für die Entwicklung von Käferfallen im Rahmen von Monitoring oder Bekämpfung der Käferpopulation im Bienenvolk verwendet werden.

Um alters- und geschlechtsabhängige Unterschiede im Aggregations- und Sozialverhalten im Zusammenhang mit olfaktorischen Reizen genauer zu untersuchen, wurden mehrere Labor-Biotests entwickelt und durchgeführt:

Aggregationstest: Mit Hilfe modifizierter Käferfallen aus Plexiglas wurde das Aggregationsverhalten quantitativ erfasst und es wurde untersucht, wie sich Alter und Geschlecht der Käfer darauf auswirken.

Präferenztest: Dabei hatten die eingesetzten Testkäfer die Wahl zwischen Käfern unterschiedlichen Geschlechts. Damit sollte untersucht werden, ob es eine altersabhängige Geschlechterpräferenz gibt.

Filtertest: Mit den beiden ersten Biotests ist keine Aussage über die biologisch aktiven Signale möglich. In diesem Biotest wurde geprüft, ob olfaktorische Reize an der Artgenossensuche und Partnerwahl beteiligt sind. Hierfür wurden von Käfern belaufene Filterpapiere bzw. Filterpapiere mit Käferextrakten im Test angeboten.

Schließlich wurden Käfer verschiedenen Geschlechts, Paarungszustands, Alters und Herkunft in Lösungsmitteln extrahiert und mit GC-MS analysiert, um geschlechts- oder stadienspezifische Muster im Duftstoffbouquet zu erfassen.

## *2.2 Material und Methoden*

### *2.2.1 Versuchstiere*

Soweit im Text nicht anders erwähnt, wurden Käfer aus der eigenen Zucht (nach Mürrle und Neumann, 2004) verwendet. So standen unter standardisierten Bedingungen aufgezogene Käfer definierten Alters zur Verfügung.

Zur Gründung der Zucht wurden aus lokalen Völkern abgesammelte Elterntiere verwendet und auf Waben mit Pollen und Honig in einem fest verschlossenen Gefäß gehalten. Die sich daraus entwickelnden Larven wurden abgesammelt, sobald sie das Wanderlarvenstadium erreicht hatten und auf kleine zylinderförmige Behälter mit feuchter, leicht sandiger Erde gegeben. Als besonders praktisch erwiesen sich Moskitozuchtbehälter (Australian Entomological Supplies Pty. Ltd.), die für alle späteren Zuchten verwendet wurden (Abb. 6). Die Gefäße bestehen aus zwei aufeinander geschraubten Plastikzylindern, einer davon mit einer nach oben gerichteten, trichterförmigen Öffnung. Nach dem Schlupf, im unteren mit Erde gefüllten Teil, flogen die Kleinen Beutenkäfer durch den Trichter nach oben. Das Zurückfliegen wurde durch die schmale Öffnung erschwert. Die Käfer häuften sich so separat im oberen Teil an und konnten leicht abgesammelt werden (Abb. 6). Alle Zuchtgefäße wurden in einem Brutschrank bei 27°C unter ständiger Befeuchtung bis zur Entwicklung zum Adultstadium gehalten (Abb. 6). Nach dem Schlupf wurden die Käfer sofort abgesammelt, das Geschlecht bestimmt und Männchen und Weibchen in speziell präparierten Behältern (Tupper) getrennt und auf einer Honig-Wasser Diät

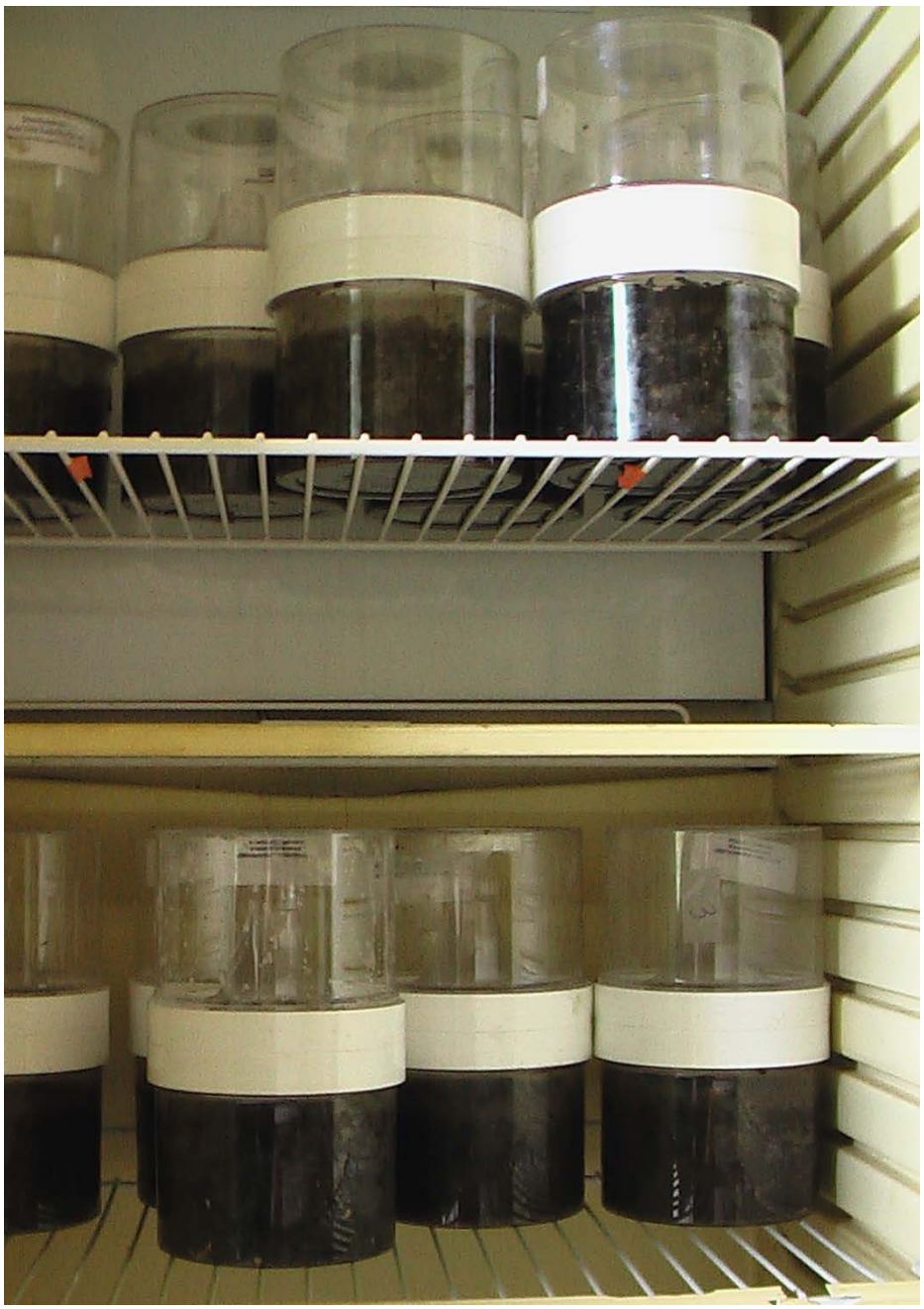


**Abb. 6: Die für die Käferzucht verwendeten Mosktiozuchtbehälter im Brutschrank.**

gehalten. Frühzeitige Paarungen sollten so vermieden werden, konnten aber nicht ausgeschlossen werden. Aus dem Deckel der Behälter wurde eine Öffnung mit ca. 5 cm Durchmesser geschnitten und mit Gaze versehen (Abb. 7). So wurde die Luftzufuhr gesichert und Wasser konnte leicht zugeführt werden, ohne das Gefäß zu öffnen. Der Honig zur Fütterung wurde auf einen Wattebausch gegeben und gemeinsam mit etwas zerknülltem Küchenpapier im Behälter platziert. Das Papier sollte den Käfern Unterschlupf gewähren, außerdem wurde dadurch das Handling erleichtert, da beim Öffnen des Gefäßes nicht alle Käfer gleichzeitig aufflogen (Abb.

7). Pollen wurde außer in speziellen Versuchen (siehe 2.2.4 Filterpapiertests) nicht zur Fütterung verwendet. Dadurch sollte verhindert werden, dass befruchtete Weibchen zur Eiablage kommen und die entstehenden Larven die Gefäße verschleimen und möglicherweise Elterntiere fressen. Da alle Versuche mit den Imagines von *A. tumida* durchgeführt wurden, beziehen sich die Altersangaben im gesamten folgenden Text immer auf die Zeit, die seit dem Schlupf der Imagines aus der Erde vergangen ist.

Für den Aggregationstest und die Versuche mit belaufenem Filterpapier wurden die Larven zur Verpuppung einzeln in kleine Schnappdeckelgläser mit einem Sand-Erde-Gemisch gegeben und im Brutschrank bei 27°C gehalten. So wurde sichergestellt, dass es sich um unverpaarte Käfer handelte. Käfer, die in den jeweiligen Biotests eingesetzt und deren Verhalten aufgezeichnet wurde, werden im Folgenden als Testkäfer bezeichnet.

**Abb. 7: Die präparierten Behälter (Tupper), in denen die Kleinen Beutenkäfer nach dem Schlupf nach Geschlechtern getrennt gehalten wurden.**

### *2.2.2 Aggregationstest*

Diese Versuche wurden zum großen Teil in den USA durchgeführt, einige fehlende Kombinationen wurden im November/Dezember 2006 in Australien ergänzt. Für den Aufbau des Aggregationstests wurden kleine Fallen aus Plexiglas gebaut, wobei die von Elzen et al. (1999) entwickelte Pappkartonfalle als Vorlage diente. Die verwendeten Plexiglasplatten von 10 x 10 cm Größe wiesen je 13 halbrunde Gänge von 0,5 cm Höhe auf, die nach dem Auflegen auf eine glatte Fläche den Käfern die Möglichkeit zum Unterschlupf und aufgrund ihrer Abmessung gleichzeitig einen thigmotaktischen Reiz boten. Das Plexiglas wurde nachpoliert, so dass auch von oben zu beobachten war, ob und wie viele Käfer sich in den Gängen befanden (Abb. 8).
Je eine Platte mit 13 halbrunden Gängen wurde unter eine Petrischale von 20 cm Durchmesser und ca. 3 cm Höhe gestellt. Für einen Testdurchlauf wurden 15 lebende Käfer definierten Geschlechts und Paarungszustands zusammen unter die Petrischale gesetzt. Die mittleren drei der 13 Fallengänge (Reihe sechs bis acht) wurden mit toten Käfern definierten Geschlechts, Alters und Paarungszustandes versehen (Abb. 8). Sie waren zuvor durch Einfrieren bei -20° C getötet worden, vor dem Test der Gefriertruhe entnommen und umgehend in die Arena gegeben. Folgende Stadien wurden für die Testdurchläufe verwendet und entweder als Testkäfer oder frisch eingefroren angeboten: drei Tage alte Männchen, drei Tage alte Weibchen, 21 Tage alte Männchen und 21 Tage alte Weibchen.

**Tab. 1: Aufstellung aller bei den Aggregationstests durchgeführten Kombinationen von Geschlecht und Alter der lebenden Testkäfer und angebotenen, toten Käfer. + = Test durchgeführt; - kein Test durchgeführt.**

| **Angebotene tote, gefrorene Käfer** | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Lebende Käfer** | 3d ♂♂ | 21d ♂♂ | 3d ♀ | 21d ♀♀ |
| 3d ♂♂ | + | - | + | + |
| 21d ♂♂ | - | + | + | + |
| 3d ♀♀ | + | + | + | - |
| 21d ♀♀ | + | + | - | + |

Getestet wurden alle möglichen Kombinationen dieser vier Stadien mit der Ausnahme von gleichgeschlechtlichen Käfern mit unterschiedlichem Alter. Der Aufenthaltsort und Kontakt zu den toten, angebotenen Käfern wurde von allen lebenden Käfern jeweils nach einer halben Stunde und nach drei Stunden erfasst, um das zeitliche

Bewegungsmuster der Käfer mit zu erfassen. In die statistische Auswertung flossen nur die nach drei Stunden erhobenen Daten, um Pseudoreplikationen zu vermeiden.
Als Kontrollen dienten Versuchsansätze mit 15 lebenden Käfern mit definiertem Geschlecht, Alter und Verpaarungsstatus, die in Versuchsarenen ohne die toten Käfer in den drei mittleren Reihen der Plexiglasfallen eingesetzt wurden. Für jede Kombination wurden drei Versuchs- und vier bis fünf Kontrolldurchgänge durchgeführt. Wurden Käfer bei einem Versuch verletzt, so wurde dieser wiederholt, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch das nekrophagisches Verhalten der Käfer zu vermeiden.

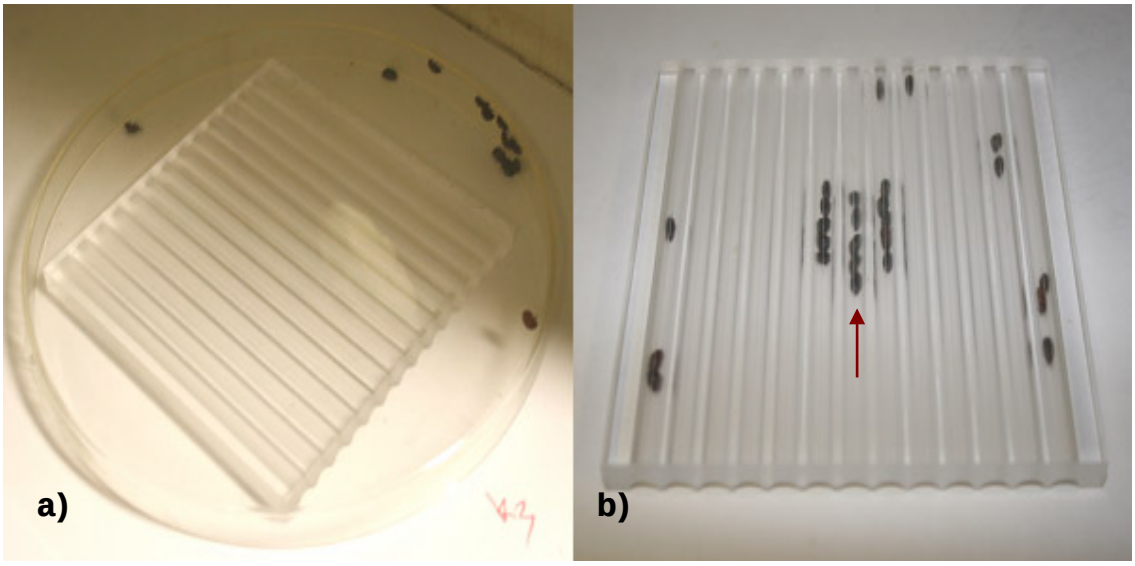



**Abb. 8: Aufbau des Aggregationstests mit Plexiglas: a) Kontrolle mit 15 frei laufenden Käfern und ohne tote Käfer; b) Testdurchlauf mit 15 frei laufenden Käfern und 15 toten, frisch aufgetauten Käfern in den 3 mittleren Reihen; der Pfeil deutet auf einen Versuchskäfer in Kontakt mit einem der eingefrorenen Käfer.**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem $\chi^2$-Test (df = 2) mit Hilfe der 2x3 Tabelle auf http://www.vassarstats.net/fisher2x3.html. Dabei wurde zwischen Versuchs- und Kontrolldurchgängen die Verteilung der Käfer wie folgt verglichen:

- Käfer in den Reihen 6-8 (diese enthielten die angebotenen, toten Käfer)
- Käfer in den umgebenden Reihen (Reihen 1-5 und 9-13)
- Käfer in der Petrischale, außerhalb der Falle

Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 wurden in diesem und allen folgenden statistischen Analysen als signifikant bezeichnet.

### *2.2.3 Präferenztest*

Zur Untersuchung des Präferenzverhaltens gegenüber dem anderen Geschlecht wurden jeweils zehn tote, frisch eingefrorene Männchen und Weibchen unter einer Petrischale je einem Männchen oder Weibchen angeboten und das Verhalten dieses Käfers für fünf Minuten direkt mit dem Softwarepaket Observer® 3.0 aufgezeichnet (Abb. 9). Mit diesem Programm ist es möglich im Vorfeld jeder Observationsreihe mögliche Verhaltensweisen und Observationsdauer zu programmieren und zu definieren. In diesem Fall wurde der soziale Kontakt zwischen Testkäfern und toten Käfern zeit- und geschlechtsabhängig in Echtzeit aufgezeichnet. Die folgenden aktiven und passiven Sozialkontakte wurden registriert und flossen gesammelt als eine Verhaltensweise (Kontakt) in die Auswertung ein:

Aktiv:

- Berührung mit den Antennen oder Tarsen
- Kopulaversuche

Passiv:

- Körperkontakt mit den toten Käfern ohne Bewegung

Der Test wurde mit je 15 männlichen und weiblichen Einzeltieren in zwei Altersstufen (sieben und 18 Tage alt) durchgeführt. Die Altersstufen wurden auf Grund der bisherigen Beobachtungen und Erfahrungen mit den Kleinen Beutenkäfer gewählt. Die eingefrorenen Käfer wurden nicht länger als eine Stunde verwendet und dann durch neue, frisch aufgetaute Käfer ersetzt.

Für jedes Einzeltier wurde die Gesamtzeit an Sozialkontakten mit Männchen oder Weibchen erfasst und die Unterschiede mit dem Wilcoxon Matched-Pairs Test auf statistische Signifikanz analysiert (Software: Statistica® 5.0).

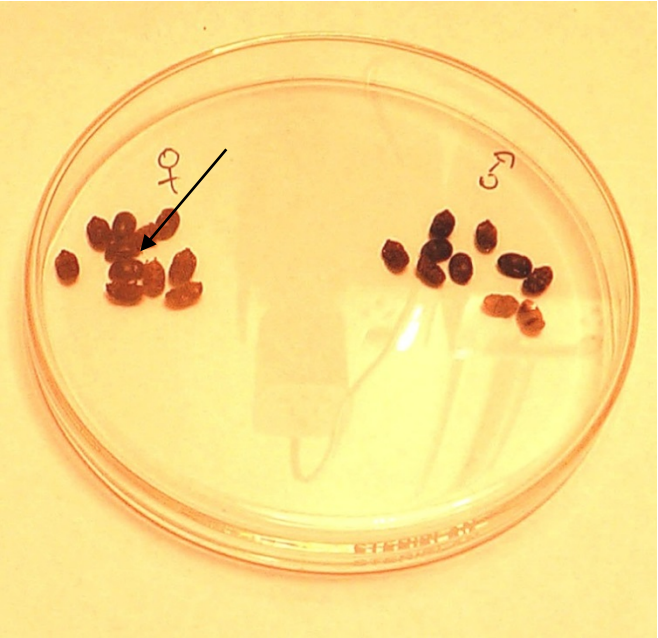



**Abb. 9: Aufbau des Präferenztests: Lebendes Test-Männchen (Pfeil) in Kontakt mit einem eingefrorenen Weibchen.**

### *2.2.4 Filtertest*

Mit diesen Versuchen sollte geklärt werden, ob chemische Substanzen am Präferenzverhalten der Käfer in den Aggregationstests beteiligt sind. In eine Petrischale mit 10 cm Durchmesser wurden jeweils zwei Stück Filterpapier (jeweils ein Viertel eines 9 cm Durchmesser Rundfilterpapiers (Double Rings 102; qualitativ 1/8) platziert. Ein Stück Testfilterpapier war mit der zu testenden Komponente versehen und ein Stück Kontrollfilterpapier blieb unbehandelt. In jede Petrischale wurde ein Käfer definierten Geschlechts und Paarungszustandes gesetzt und über 15 min beobachtet. Innerhalb dieser Zeit wurde in Abständen von 3 min der Aufenthaltsort des Käfers notiert, was mit dem Startzeitpunkt (0 Minuten) insgesamt sechs „Zählereignisse“ ergab. Erfasst wurden Anwesenheit auf einem der Filterpapiere (Test- oder Kontrollfilter) und Aufenthalt außerhalb der Filterpapiere. Eine Testreihe wurde, wenn nicht anders vermerkt, immer parallel mit 30 Käfern durchgeführt (je ein Käfer in einer Petrischale). Die Petrischalen der einzelnen Testansätze wurden dabei immer um 90° versetzt ausgerichtet, um den Einfluss phototaktischen Verhaltens auszuschließen. Pro Versuch wurde die Häufigkeit der Anwesenheit eines einzelnen Käfers auf Test- bzw. Kontrollfilter erfasst (sechs

Zählereignisse) und der Unterschied mit dem Wilcoxon Matched-Pairs Test auf Signifikanz geprüft. Folgende Testreihen wurden durchgeführt:

Testreihen mit belaufenen Filterpapieren: Rundfilter wurden passgenau in einer Petrischale mit Deckel ausgelegt, 20 Käfer definierten Geschlechts und Paarungszustandes darauf gegeben und für zwei Tage dort belassen. Für den Test wurden diese Filterpapierstücke jeweils zusammen mit einem unkontaminierten Kontrollfilterpapier in einer Petrischale angeboten.

Extrakte aus belaufenen Filterpapieren: Belaufene (kontaminierte) Filterpapiere wurden mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert (Details zu Extraktionszeiten und Lösungsmitteln siehe Anhang; Tab. I). Hierfür wurden ausschließlich Filterpapiere verwendet, die von verpaarten Käfern im Alter von zwei bis drei Wochen stammten und zwei bis fünf Tage belaufen wurden.

Käferextrakte: Käfer mit unterschiedlichem Geschlecht, Alter und Paarungsstatus wurden mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert (Details siehe Anhang; Tab. II). Diethyletherextrakte wurden wegen des starken Eigengeruchs vor den Versuchen eingedampft und dann in Pentan wieder aufgenommen. Wegen der langen Verdampfungszeit von Wasser mussten die mit Wasserextrakten versehenen Filter bis zu einer Stunde zum Trocknen ausgelegt werden. Einige der Zuchtkäfer für die Extraktansätze wurden mit Pollen gefüttert. Es wäre möglich, dass der unter natürlichen Bedingungen zum Nahrungsspektrum gehörende Pollen Proteine enthält, die nicht nur essentiell für die Fortpflanzung sind, sondern auch den Pheromonstoffwechsel beeinflussen. Es sollte so sichergestellt werden, dass unsere Ergebnisse kein Artefakt der Honigdiät (siehe 2.2.1) darstellen.

### *2.2.5 Extraktherstellung und chemische Analysen*

Es wurden jeweils zwölf Käfer in ein Gefäß mit 1-2 ml Lösungsmittel überführt und dort für mehrere Wochen extrahiert. Während der Arbeiten in Südafrika und Richmond, Australien (Grahamstown und Port Elizabeth) wurden Käfer mit definiertem Geschlecht, Alter und Paarungsstatus gesammelt und in Pentan, Dichlormethan und Ethanol überführt (Tab. 2). Es wurden auch Extrakte einiger

Wildfängen angefertigt, wobei hier Alter und Verpaarungsstatus nicht zu bestimmen waren. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass sie mindestens ein bis zwei Wochen alt und generell eher älter und verpaart waren. Da sie im Bienenstock abgesammelt wurden hatten sie mit Sicherheit die erste Phase des Lebenszyklus von *A. tumida* schon abgeschlossen. Außerdem wurden Wasserextrakte von fünf Tage belaufenem Filterpapier angefertigt (Weibchen; sieben Tage alt, Tab. 2).

**Tab. 2: Auflistung der angefertigten Extrakte für chemische Analysen. Weibchen und Männchen wurden getrennt extrahiert; jeweils 3 x 12 Käfer pro Kombination wurden in 1-2 ml Lösungsmittel extrahiert; a = Extrakte aus Australien; s = Extrakte aus Südafrika**

| Geschlecht | Alter | Paarungsstatus | Lösungsmittel | Laborzucht / Wildtyp |
|---|---|---|---|---|
| ♀♀, ♂♂s | frisch geschlüpft | unverpaart | Dichlormethan | Labor |
| ♀♀, ♂♂s | 7d | unverpaart | Dichlormethan | Labor |
| ♀♀, ♂♂s | 5d | verpaart | Dichlormethan | Labor |
| ♀♀, ♂♂s | 7d | in Kopula | Dichlormethan | Labor |
| ♀♀, ♂♂s | unbekannt | verpaart | Dichlormethan | Wildtyp |
| ♀♀, ♂♂a | aus der Erde gegraben | unverpaart | Dichlormethan | Labor |
| ♀♀, ♂♂a | frisch geschlüpft | vermutlich unverpaart | Dichlormethan, Pentan | Labor |
| ♀♀, ♂♂a | 7d | verpaart | Dichlormethan | Labor |
| ♀♀, ♂♂a | 30d | verpaart | Dichlormethan, Pentan, Ethanol | Labor |

Zur Analyse wurde ein Gaschromatograph (Agilent Technologies 6890N Network GC-System gekoppelt an einen 5973 Network Mass selective Detector), der an ein Massenspektrometer mit Fused-silica-Kapillarsäule (HP 5 MS, 30 m, 0,25 mm Durchmesser und 0,25 µm film thickness) angeschlossen war, verwendet. Folgendes Temperaturprogramm wurde zur Auftrennung der Extrakte verwendet: 60°C (3 min), 60°C auf 300°C mit 3°C/min, 300°C (45 min). Mit dieser Methode und diesem Temperaturprogramm konnten kutikuläre Substanzen aus der Käferfamilie der Nitidulidae bereits erfolgreich detektiert werden (Bartelt 1999).

## 2.3 Ergebnisse

### 2.3.1 Aggregationstest

Bereits nach 30 min waren bei fast allen Testansätzen mehr Käfer in den drei mittleren Reihen zu finden, d.h. in der Nähe der toten Käfer, als in den Kontrollansätzen. Nach drei Stunden war dieser Effekt noch deutlicher (Abb. 10 bis Abb. 13). Außer bei jungen, unverpaarten Weibchen (Abb. 12), die insgesamt ein schwächeres Aggregationsverhalten zeigten und auf ältere Männchen gar nicht reagierten, war bei allen Kombinationen ein hochsignifikanter Aggregationseffekt festzustellen (Abb. 10, Abb. 11, Abb. 13).

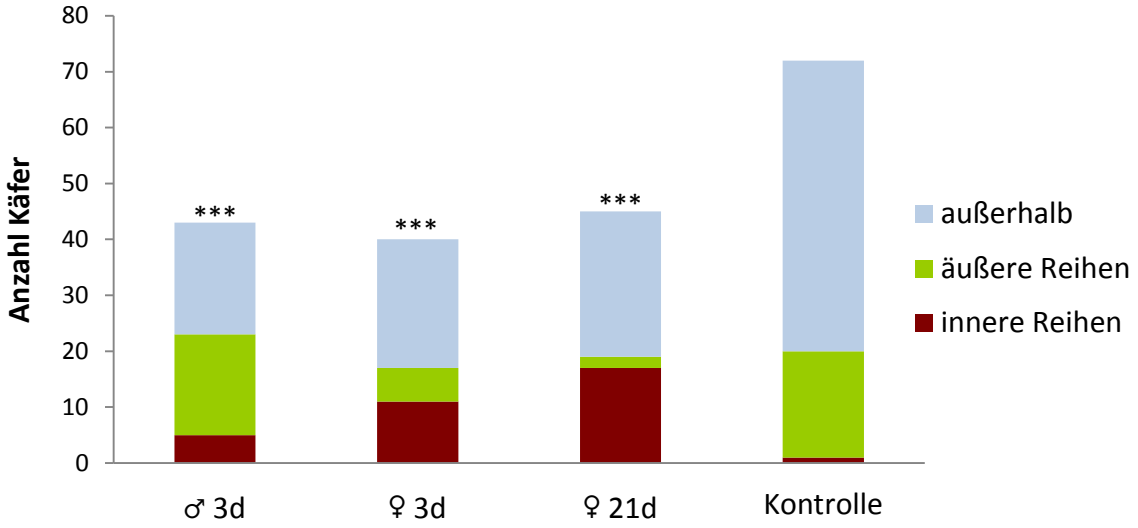



**Abb. 10: Reaktion von 3d alten Männchen auf Artgenossen verschiedenen Geschlechts und Alters nach 3h. Aufgetragen sind die Aufenthaltsorte außerhalb der Falle oder in den äußeren (Reihen 1-5 und 9-13) oder inneren Reihen (Reihen 6-8) der Falle. ***: P < 0,001, $\chi^2$-Test im Vergleich zur Kontrolle.**

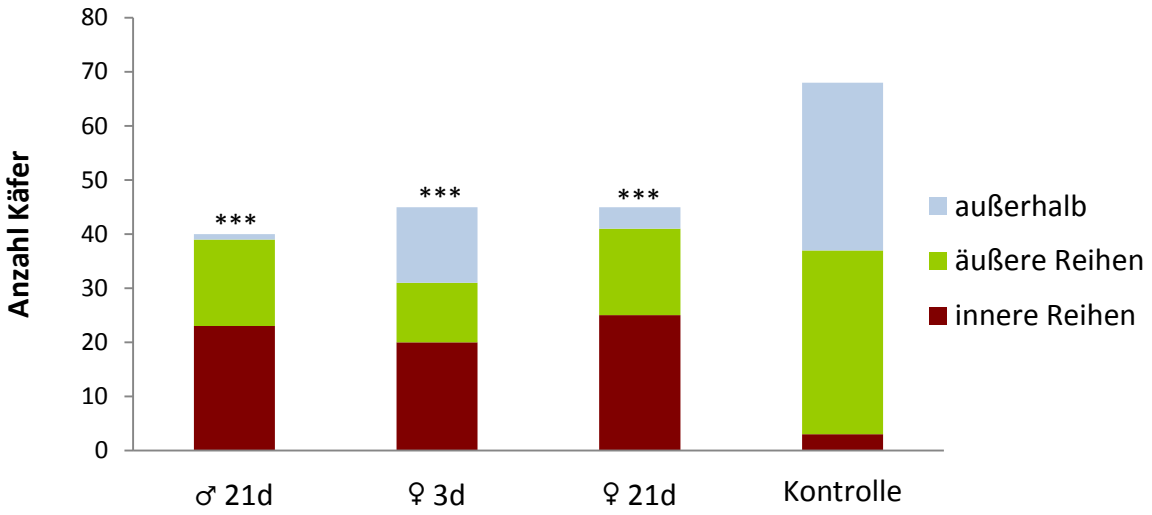



**Abb. 11: Reaktion von 21d alten Männchen auf Artgenossen verschiedenen Geschlechts und Alters nach 3h. Aufgetragen sind die Aufenthaltsorte außerhalb der Falle oder in den äußeren (Reihen 1-5 und 9-13) oder inneren Reihen (Reihen 6-8) der Falle. ***: P < 0,001, $\chi^2$-Test im Vergleich zur Kontrolle.**

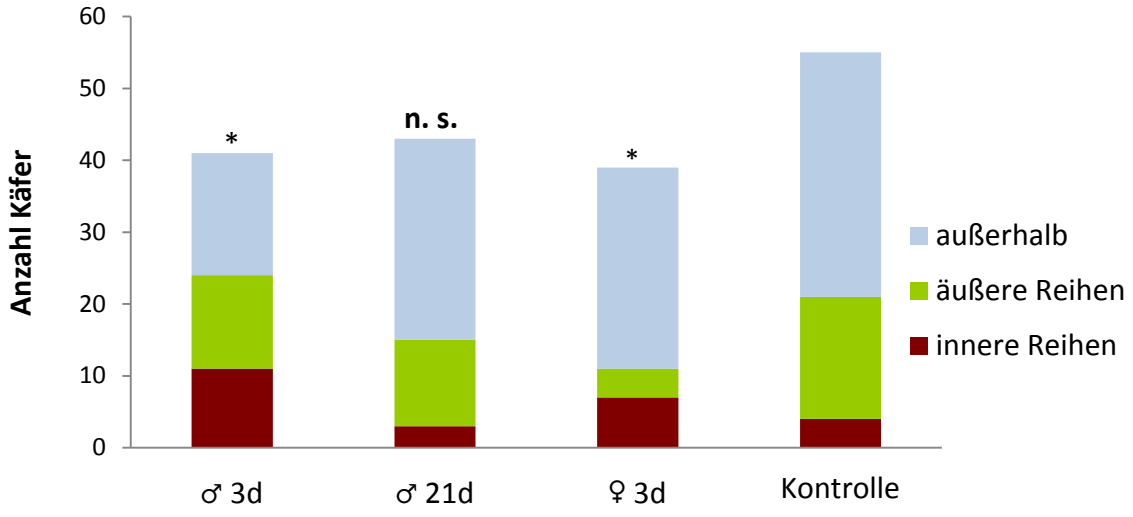



**Abb. 12: Reaktion von 3d alten Weibchen auf Artgenossen verschiedenen Geschlechts und Alters nach 3h. Aufgetragen sind die Aufenthaltsorte außerhalb der Falle oder in den äußeren (Reihen 1-5 und 9-13) oder inneren Reihen (Reihen 6-8) der Falle. *: P < 0,05; n. s.: Nicht signifikant, $\chi^2$-Test im Vergleich zur Kontrolle.**

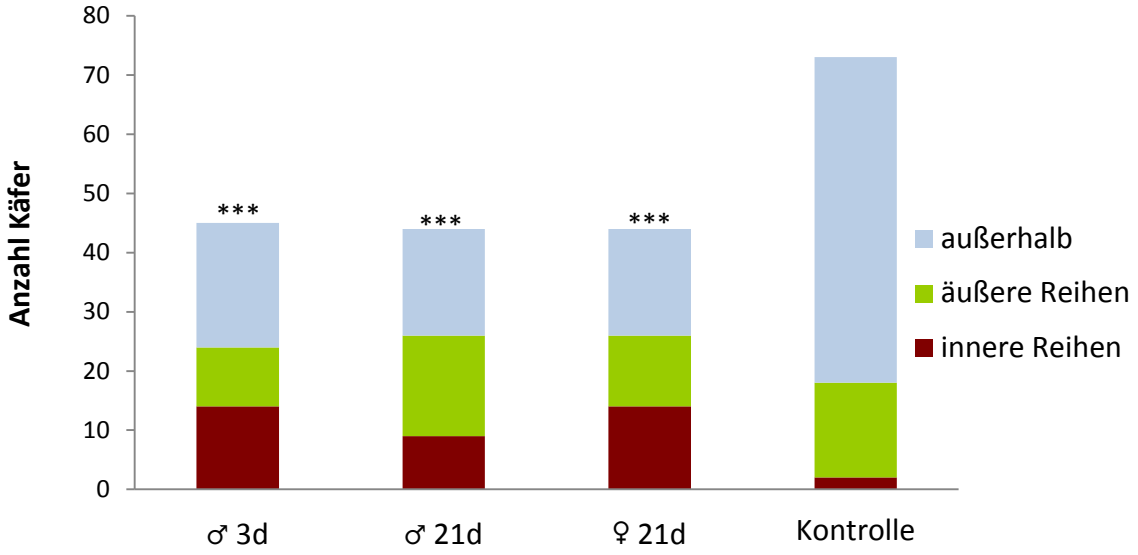



**Abb. 13: Reaktion von 3d alten Weibchen auf Artgenossen verschiedenen Geschlechts und Alters nach 3h. Aufgetragen sind die Aufenthaltsorte außerhalb der Falle oder in den äußeren (Reihen 1-5 und 9-13) oder inneren Reihen (Reihen 6-8) der Falle. ***: P < 0,001, $\chi^2$-Test im Vergleich zur Kontrolle.**

### *2.3.2 Präferenztest*

Beide Geschlechter zeigten bei diesem Biotest eine klare, altersabhängige Präferenz für das jeweils andere Geschlecht. Während junge sieben Tage alte Männchen und Weibchen keine Präferenz zeigten (Abb. 14, Abb. 15), wiesen Käfer im Alter von 18 Tagen eine signifikant längere Kontaktzeit mit dem jeweils anderen Geschlecht auf. Weiterhin hatten jüngere Weibchen insgesamt weniger Kontakte mit anderen Artgenossen ($p < 0,05$; Mann-Whitney U-Test). Junge Weibchen verbrachten im Durchschnitt nur 39,5 ± 58,4 s bei anderen Artgenossen, im Vergleich zu 74,1 ± 68,4 s Kontaktzeit der älteren Weibchen. Bei den Männchen war dieser Unterschied nicht vorhanden (n. s.; Mann-Whitney U-Test): Junge Männchen verbrachten im Durchschnitt ähnlich lange Zeit bei anderen Artgenossen (88,9s ± 95,0) wie ältere Männchen (71,2s ± 88,7).

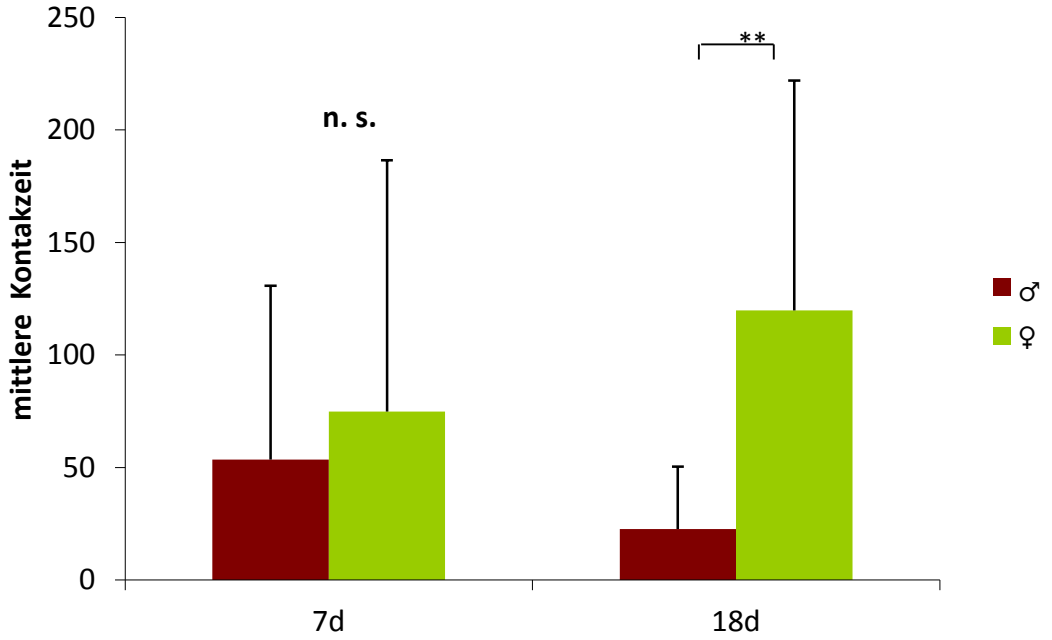



**Abb. 14: Mittlere Kontaktzeit (± S.D.) (s) von 7d (n = 15) und 18d (n = 15) alten Männchen mit jeweils zehn eingefrorenen Männchen und Weibchen im selben Alter. n. s.: Nicht signifikant; **: P < 0,01, Wilcoxon Matched-Pairs Test.**

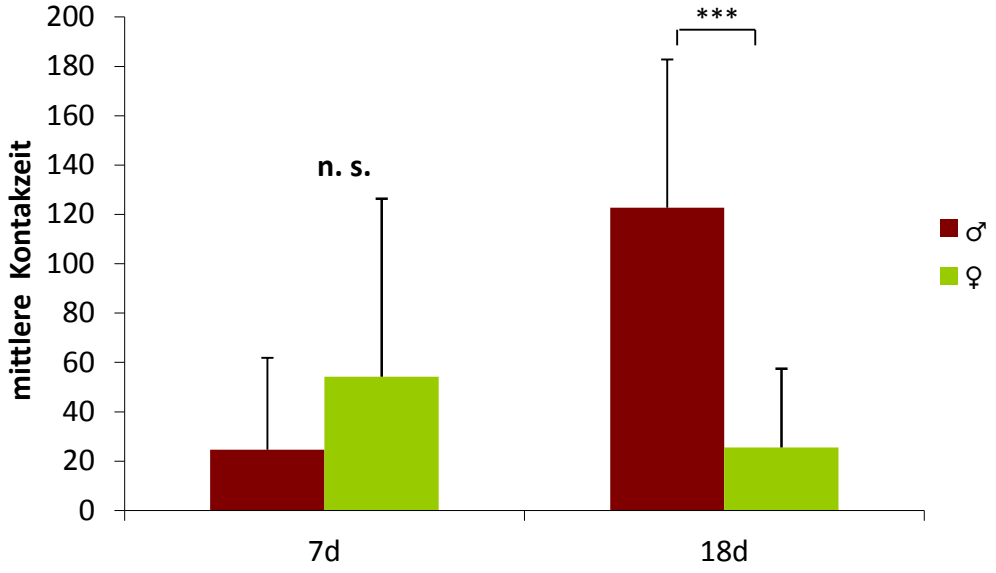



**Abb. 15: Mittlere Kontaktzeit (± S.D.) (s) von 7d (n = 15) und 18d (n = 15) alten Weibchen mit jeweils zehn eingefrorenen Männchen und Weibchen im selben Alter. n. s.: Nicht signifikant; ***: P < 0,001, Wilcoxon Matched-Pairs Test.**

### *2.3.3 Filterpapiertest*

2.3.3.1 Kontaminierte Filter

Junge, unverpaarte Käfermännchen zeigten altersspezifische Unterschiede. Sie reagierten nur signifikant auf das von älteren, verpaarten Weibchen belaufene Filterpapier (Abb. 16). Verpaarte, 21 Tage alte Testkäfer beider Geschlechter hielten sich signifikant häufiger auf Filterpapieren auf, die zuvor von Käfern des anderen Geschlechts belaufen wurden (Abb. 17; Abb. 18). Wurde ihnen dagegen ein von Käfern desselben Geschlechts „kontaminiertes" Filterpapier angeboten, war dieser Effekt nicht zu bemerken (Abb. 17; Abb. 18). Junge, unverpaarte Weibchen zeigten eine hochsignifikante Präferenz für zuvor von Weibchen desselben Alters und Verpaarungsstatus' belaufenes Filterpapier, wobei in diesem Fall keine anderen Stadien getestet wurden.

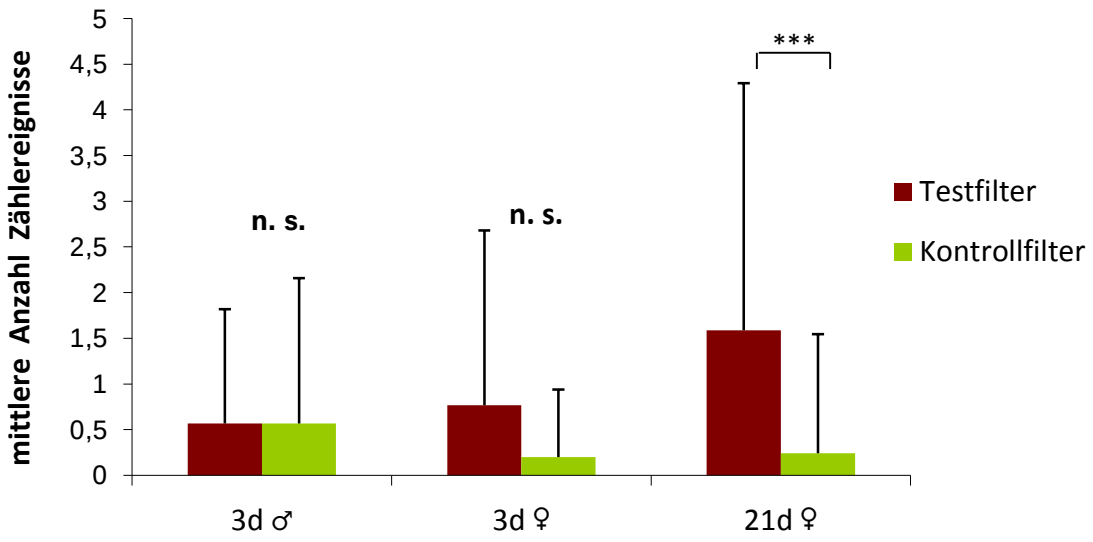



**Abb. 16: Reaktion (mittlere Anzahl Zählereignisse) 3d alter, unverpaarter Männchen auf Filterpapiere, die von Männchen und Weibchen verschiedenen Alters kontaminiert wurden; n. s.: nicht signifikant; ***: P< 0,001, Wilcoxon Matched-Pairs Test.**

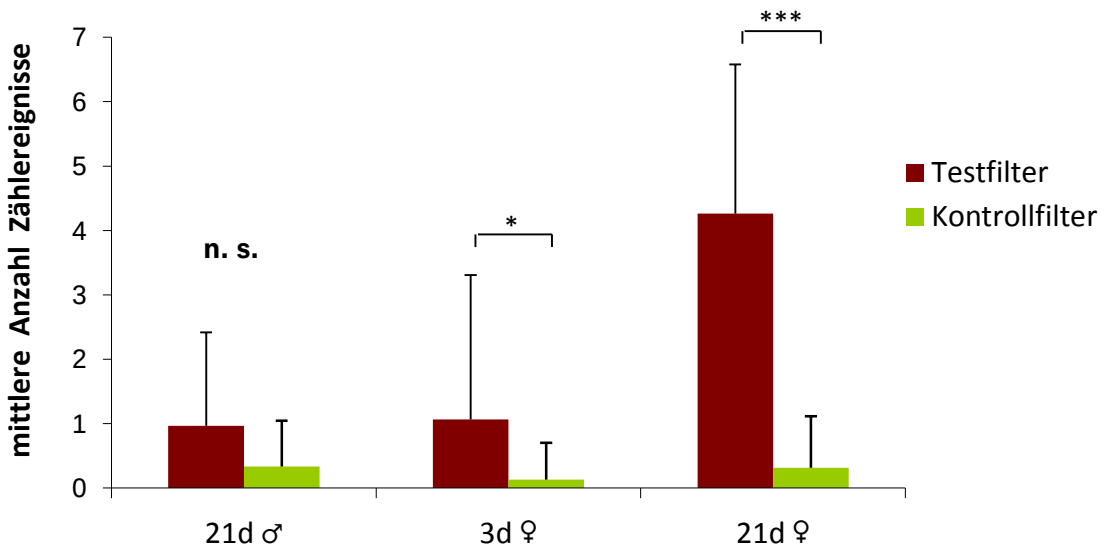



**Abb. 17: Reaktion (mittlere Anzahl Zählereignisse) 21d alter, verpaarter Männchen auf Filterpapiere, die von Männchen und Weibchen verschiedenen Alters kontaminiert wurden; n. s.: nicht signifikant; *: p < 0,05; ***: p < 0,001, Wilcoxon Matched-Pairs Test.**

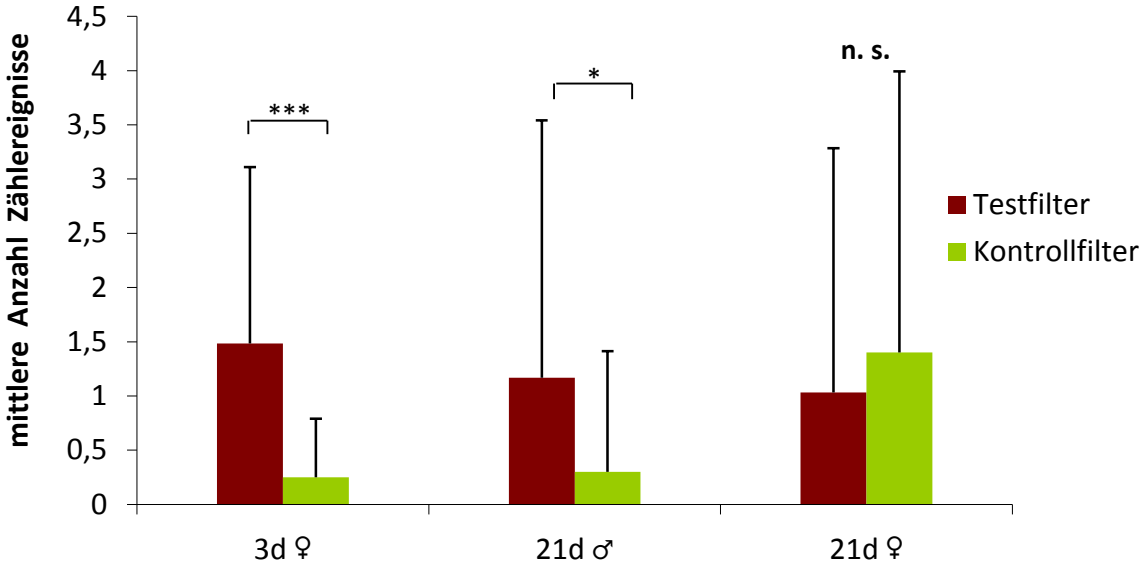



**Abb. 18: Reaktion (mittlere Anzahl Zählereignisse) 3d alter unverpaarter Weibchen auf Filterpapiere, die von 3d alten Weibchen kontaminiert wurden und 21d alter, verpaarter Weibchen auf Filterpapiere, die von 21d alten Männchen und Weibchen kontaminiert wurden. n. s.: Nicht signifikant; *: P < 0,05; ***: P < 0,001, Wilcoxon Matched-Pairs Test.**

2.3.3.2 Extrakte aus Filtern und Käfern

Mit keiner der hier verwendeten Kombination aus Lösungsmitteln (verschiedener Polarität und Extraktionsdauer) und Käfern (verschiedenen Alters, Geschlechts, Konzentration und auf unterschiedlichem Substrat gehalten) konnten Extrakte gewonnen werden, die im Biotest aktiv waren. In den insgesamt durchgeführten 92 Testreihen á 30 Einzelkäfern (siehe Anhang, Tab. I-III) traten bei sieben Testreihen signifikante Unterschiede auf, in denen zweimal die Extrakte und fünfmal die Kontrollen bevorzugt wurden. Nach einer Korrektur zur Vermeidung des α-Fehlers bei multiplen post-hoc-Tests (Bonferroni) ließe sich allerdings lediglich noch für zwei Fälle diese Signifikanz bestätigen.

### *2.3.4 Chemische Analyse von Käferextrakten mit GC-MS-Methoden*

Bei den chemischen Analysen wurde eine Reihe von Kohlenwasserstoffverbindungen in den Ganzkörperextrakten der Käfer nachgewiesen (Tab. 3). Es handelt sich um unverzweigte Alkane und Alkene mit überwiegend ungeradzahligen Kettenlängen. In keiner der untersuchten Altersgruppen und Paarungsgruppen wurden Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern festgestellt. Allerdings treten Unterschiede zwischen Käfern der verschiedenen Altersgruppen und von verschiedener Herkunft auf. Der relative Anteil der geradkettigen Kohlenwasserstoffe nimmt mit dem Alter ab (z.B. Tetracosan, Hexacosan, Octacosan) und der Anteil der Alkene deutlich zu (z.B. Z-9-Tricosen, Z-7-Pentacosen). Alkane der Kettenlängen C14 bis C20 waren ausschließlich in den Käfern aus den Zuchtansätzen zu finden, nicht aber bei Käfern, die im Freiland gefangen worden waren.

**Tab. 3: Identifizierte Substanzen in Ganzkörperextrakten von *A. tumida* Männchen und Weibchen verschiedener Herkunft, unterschiedlichem Paarungsstatus und Alter. WK: Wildkäfer; LK: Laborkäfer; uv: Unverpaart; v: Verpaart; MW: Molekulargewicht; ****: Dominierende Hauptkomponente; ***: Hauptkomponente; **: Nebenkomponente; * Spurenkomponente.**

| | **Herkunft** | **WK** | | **LK** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Paarungsstatus | v | v | uv | uv | uv | uv | v | v |
| | Alter | ? | ? | 1d | 1d | 5d | 5d | 5d | 5d |
| | Geschlecht | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ |
| **Substanzen** | **MW (g/mol)** | | | | | | | | |
| Tetradecan | 198 | | | **** | ** | * | * | * | * |
| Pentadecan | 212 | | | ** | ** | * | * | * | * |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hexadecan | 226 | | | ** | ** | * | * | * | * |
| Heptadecan | 240 | | | ** | ** | * | * | * | * |
| Octadecan | 254 | | | ** | ** | * | * | * | * |
| Nonadecan | 268 | | | ** | ** | * | * | * | * |
| Eicosan | 282 | | | ** | ** | * | * | * | * |
| (Z)-9-Heneicosen | 294 | ** | ** | | | | | * | * |
| Heneicosan | 296 | ** | ** | ** | ** | * | * | * | * |
| (Z)-9-Docosen | 308 | * | * | | | | | | |
| Docosan | 310 | * | * | ** | ** | * | * | * | * |
| (Z)-9-Tricosen | 322 | *** | *** | | | ** | ** | *** | *** |
| (Z)-7-Tricosen | 322 | * | * | | | | | | |
| Tricosan | 324 | *** | *** | *** | *** | ** | ** | *** | *** |
| (Z)-9-Tetracosen | 336 | ** | ** | | | * | * | * | * |
| Tetracosan | 338 | ** | ** | *** | *** | ** | ** | * | * |
| | | *** | | | | | | | |
| (Z)-9-Pentacosen | 350 | * | **** | *** | *** | *** | *** | **** | **** |
| (Z)-7-Pentacosen | 350 | * | * | | | * | * | * | * |
| | | *** | | | | | | | |
| Pentacosan | 352 | * | **** | **** | **** | **** | **** | **** | **** |
| (Z)-9-Hexacosen | 364 | * | * | | | | | | |
| Hexacosan | 366 | * | * | *** | *** | ** | ** | * | * |
| (Z)-9-Heptacosen | 378 | *** | *** | ** | ** | ** | ** | *** | *** |
| Heptacosan | 380 | *** | *** | **** | **** | *** | *** | *** | *** |
| Octacosan | 394 | ** | ** | *** | *** | ** | ** | * | * |
| (Z)-12-Nonacosen | 406 | ** | ** | | | | | ** | ** |
| (Z)-9-Nonacosen | 406 | ** | ** | | | | | ** | ** |
| Nonacosan | 408 | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| Triacontan | 422 | | | ** | ** | * | * | * | * |
| Hentriacontan | 436 | ** | ** | ** | ** | * | * | * | * |

## *2.4 Diskussion*

Mit den Ergebnissen der durchgeführten Biotests konnte gezeigt werden, dass das Aggregationsverhalten der Kleinen Beutenkäfer in allen Altersstufen (mit der Ausnahme von jungen Weibchen) gegenüber allen Stadien stark ausgeprägt ist, wohingegen eine altersabhängige Präferenz für das jeweilige andere Geschlecht existiert (Präferenztest). Mit den Ergebnissen des Filtertests mit belaufenen Filtern ist eindeutig und erstmals gezeigt, dass intraspezifische chemische Substanzen des Kleinen Beutenkäfers für die Anlockung von Artgenossen verantwortlich sind.
Vermutlich steht die Aggregationsbildung und Wirtsfindung in der präreproduktiven Phase, im Alter bis zu 14 Tagen, im Vordergrund, während die interreproduktive und reproduktive Phase mit sexueller Aktivität in Aggregation in der Zeit danach anzusetzen ist. Dementsprechend ist eine, nach altersspezifischen Schlüsselreizen gerichtete, olfaktorische Orientierung zu vermuten. Die Vorteile des ausgeprägten Aggregationsverhaltens in jedem Alter sind bei Betrachtung der Lebensweise und Biologie von *A. tumida* offensichtlich. Sie decken sich mit den sogenannten „Allee Effekten“, benannt nach Allee, der 1931 erstmals die folgenden Vorteile vom Zusammenleben in einer Gruppe definierte (Wyatt, 2003):

1. Erhöhter Schutz vor Prädatoren

Zwar unterliegen die Käfer keinem Prädatorendruck im eigentlichen Sinne, sie sind jedoch permanent dem Hygiene- und Abwehrverhalten ihres Honigbienenwirts ausgesetzt. Bienen könnten problemlos einzelne Käfer, Eier und Larven aus dem Stock entfernen und somit die erfolgreiche Vermehrung des Wirts und Schädigung des Volkes verhindern. Mit steigender Anzahl der Käfer wird es immer schwieriger, diese aus dem Stock zu entfernen oder durch Einsperren in Propolisgefängnisse daran zu hindern, zur Nahrungsaufnahme auf die Waben zu gelangen (Ellis et al., 2004c).

2. Reduktion der Kosten für die Futtersuche

Das Auffinden einer Aggregation mit Artgenossen ist gleichzeitig mit dem Erschließen von Nahrungsressourcen verknüpft. Außerdem kann bei den natürlichen Wirten, wie *A. m. scutellata* und *A. m. capensis*, eine große Anzahl Käfer zum so genannten

„absconding“ führen (Neumann und Elzen, 2004). Die Bienen verlassen ihr Nest und hinterlassen damit ihrem Parasiten eine Fülle an Nahrungs- und damit auch Reproduktionsressourcen. Die Wirtsdüfte könnten kombiniert mit dem sich ändernden Geruch bei einem Befall mit dem Kleinen Beutenkäfer bei der Fernorientierung als eine Art Aggregationspheromon fungieren. Ähnliches wurde z. B. bei *Ceratitis capitata*, einer die Zitrusfrucht schädigenden Fliege, festgestellt. In diesem System wird der Effekt von Aggregationspheromonen durch den Geruch schon angefressenen Orangen verstärkt, die die Anwesenheit anderer Artgenossen indizieren (Papadopoulos et al., 2001).

3. Reduzierte Kosten bei der Partnersuche

Käfer, die sich in einer Aggregation befinden, müssen keine Kosten mehr für die Partnersuche investieren. Wie eng Aggregations- und Reproduktionsverhalten bei dem Kleinen Beutenkäfer miteinander verknüpft sind, wird noch in späteren Versuchen zum Verhalten gezeigt (siehe Kapitel 4).

Die Fokussierung auf Aggregationsbildung und Nahrungssuche in der präreproduktiven Phase könnte auch eine Erklärung für die widersprüchliche Reaktion junger, unverpaarter Weibchen sein. Im Aggregationstest reagierten sie schwächer und nur auf junge Käfer. Außerdem verbrachten sie beim Vergleich der gesamten Kontaktzeit signifikant weniger Zeit im Sozialkontakt mit andern Artgenossen, als die Männchen. Im Filterpapiertest wurden sie wiederum durch von jungen Weibchen belaufene Filter angelockt. Die Bevorzugung gleichgeschlechtlicher Artgenossen bei jungen Weibchen könnte das Auffinden von geeigneten Verstecken innerhalb des Bienenvolkes und die Nahrungssuche für die spätere Reproduktion erleichtern. Weibchen sind auf das Eiweiß im Pollen angewiesen, um die Eiproduktion in Gang zu bringen. Alternative Nahrungsressourcen könnten dies nur unzureichend bis gar nicht ersetzen (Buchholz et al., 2008). Jegliche vorzeitige Interaktion mit dem anderen Geschlecht wäre somit eine unnötige Verschwendung von Energiekosten. Die zeitweilige Anlockung gleichgeschlechtlicher Artgenossen von jungen Weibchen, während die Männchen in erster Linie auf Weibchen reagieren, könnte zusätzlich die Bildung gemischtgeschlechtlicher, großer Aggregationen fördern.

Borkenkäferweibchen der Gattung *Dendroctonus spp.* locken ebenfalls gleichgeschlechtliche Artgenossen an, um möglichst große Aggregationen zu bilden (Wyatt, 2003). Es handelt sich bei vielen *Dendroctonus spp.* um Borkenkäferarten, die lebende Bäume attackieren und ähnlich wie der Kleine Beutenkäfer darauf angewiesen sind, die Abwehr ihres Wirtes zu überwinden, um sich fortzupflanzen. Bei Borkenkäferarten, die totes und verwesendes Holz oder Bäume befallen, findet sich dieses Verhalten nicht (Wyatt, 2003).

Für das Einsetzen der sexuellen Aktivität und die Abgabe von Sexualpheromonen ab dem Alter von ca. 14 Tagen sprechen vor allem die Ergebnisse des Präferenztests und Filtertests: Ältere Käfer verbrachten signifikant mehr Zeit im Kontakt mit dem jeweils anderen Geschlecht. Ebenso zeigten jungen Männchen beim Filterpapiertest nur eine signifikante Reaktion gegenüber von 18 Tage alten Weibchen belaufenen Filtern und ältere Männchen eine höher signifikante, Reaktion. Ältere Weibchen reagierten ebenfalls nur auf von älteren Männchen belaufenes Filterpapier. Geht man davon aus, dass es für die Käfer im Bienenvolk und unter unseren Testbedingungen keine optischen o. ä. Reize zur Unterscheidung der Geschlechter vor der Paarung gibt, bestätigt dies die Existenz von geschlechtsspezifischen chemischen Signalen, die auf dem Filtern hinterlassen wurden. Vor allem bei älteren Käfern kann häufig beobachtet werden, dass sie sich permanent mit Antennen und den Tarsen betasten, ein möglicher Hinweis darauf, dass chemische Information auf Kontaktbasis übertragen werden. Bedenkt man weiter den stark mit Gerüchen gesättigten Bienenstock, erscheint ein über kurze Distanzen und Kontaktbasis übertragenes Pheromon sinnvoll. Ähnliches Verhalten verbunden mit Pheromontransmission über die kutikulare Oberfläche, wurde bei anderen Insektenarten, wie z. B. *Drosophila sp*. (Scott et al., 1988), *Neoclytus acuminatus acuminatus*, einem Cerambyciden (Lacey et al., 2008), dem Zweipunktmarienkäfer *Adalia bipunctata* (Hemptinne et al., 1998) einem nahen Verwandten der Nitidulidae (Hennig, 1994) und beim Vektor der Chagaskrankheit, *Triatoma infestans* (Figueiras et al., 2009), gefunden. Attraktive Substanzen könnten natürlich auch im Kot oder anderen Exkreten enthalten sein. Bei der Wanderheuschrecke *Schistocerca gregaria* bestehen die Aggregationspheromone der Nymphen aus drei Komponenten: Säuren und Aldehyde, die direkt von den Nymphen ausgeschieden werden und phenolische Komponenten, die mit dem Fekes ausgeschieden werden (Torto et al., 1996). In jedem Fall hinterlassen die Käfer in

irgendeiner Form Stoffe auf dem Filterpapier, die attraktiv auf andere Artgenossen wirken. Eine weitere Möglichkeit hierfür wäre, dass die von Torto et al. (2007) auf den Tarsen von *A. tumida* identifizierte Hefe *Kodamaea ohmeri* für die Abgabe von olfaktorisch aktiven Substanzen (identisch mit dem Honigbienenalarmpheromon Isopentyl-Acetat) verantwortlich ist. Dagegen sprechen jedoch die stadienspezifischen Unterschiede. Zudem gibt die Hefe die attraktiven Stoffe offensichtlich nur in Verbindung mit Pollen ab (Torto et al., 2007c) und unsere Zuchtkäfer wurden in der Regel nicht auf Pollen gehalten. Durch einen Nebenversuch konnte gezeigt werden, dass es sich vermutlich um flüchtige Substanzen handelt: Belaufene Filter verloren, wenn über Nacht aufbewahrt, ihre Attraktivität.

Leider war es bei den Filterpapiertests mit verschiedenen Extrakten nicht möglich, einen aktiven Extrakt herzustellen. Bei den wenigen signifikanten Ergebnissen dürfte es sich aufgrund der hohen Zahl an Wiederholungen um „falsch positive Ergebnisse“ aufgrund der Kumulierung des α-Fehlers handeln.

Die wichtigste Erkenntnis aus diesen Versuchen ist, dass mit den bei Insekten häufig und erfolgreich verwendeten Extraktionsmethoden (Bartelt et al., 1985, Subchev et al., 2009) keine aktiven kutikulären Substanzen gewonnen werden konnten; dies sollte bei der Planung evtl. folgender Arbeiten berücksichtigt werden. Ein Zusatzversuch, bei dem einige ältere Käfer nach deren Pentan-Extraktion noch immer im Aggregationstest attraktiv waren, spricht dafür, dass mit den in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden die aktiven Substanzen nicht ausreichend extrahiert werden konnten.

Dementsprechend konnte bei der vergleichenden GC-MS Analyse von Extrakten keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern gefunden werden. Substanzen aus den Verbindungsgruppen anderer Pheromone, die innerhalb der Käferfamilie Nitidulidae vorkommen (mehrfach methyl- und/oder ethyl- verzweigte Polyene (James et al., 1994, Bartelt et al., 1995, Petroski und Weisleder, 1997, Zilkowski et al., 1999) wurden ebenfalls nicht detektiert. Das typische Oberflächenprofil der Käfer wird erst im Verlauf der ersten Lebenstage aufgebaut. Der relative Anteil von geradkettigen Kohlenwasserstoffen nimmt mit dem Alter ab (z.B. Tetracosan, Hexacosan, Octacosan) und der Alken Anteil zu (z.B. Z-9-Tricosen, Z-7-Pentacosen). Für die chemische Kommunikation dürften diese Substanzen aufgrund fehlender Aktivität im Biotest keine oder allenfalls eine synergistische Funktion haben. Eine andere

Möglichkeit wäre, dass die Konzentration (die Käferäquivalente) der angebotenen Extrakte eine größere Rolle spielen, was in zukünftigen Versuchen noch genauer zu überprüfen wäre. Bei *T. infestans* löste z. B. eine zu hohe Konzentration der Äquivalente einen Repellenteffekt aus (Figueiras et al., 2009).

Offen bleibt die Frage, inwiefern das bekannterweise stark ausgeprägte, thigmotaktische Verhalten (Elzen et al., 1999, Schäfer et al., 2008) bei der Aggregationsbildung eine Rolle spielt. Die (fast) einheitlich positiven Ergebnisse des Aggregationstests könnten darauf hindeuten. Es könnte sich hier in vieler Hinsicht um ein ähnliches System wie bei dem Chagas Vektor *Triatoma infestans* (Figueiras et al., 2009) handeln. Hier wird das Aggregationsverhalten der Nymphen über Thigmotaxis vermittelt und im Alter über Aggregationspheromone (langkettige Fettsäuren). Bei einigen Schabenarten wird Aggregation und eine Erhöhung der Metabolismusrate durch taktile Reize ausgelöst (Lihoreau und Rivault, 2008).

Viel spricht für ein komplexes Zusammenspiel von Thigmotaxis, Sexual- und Aggregationspheromon(en). Vorstellbar wäre auch ein Szenario mit einem auf etwas größere Distanz wirkenden Aggregationspheromon oder Wirtskairomon und einem auf sehr geringer Distanz wirkenden Sexualpheromon in Verbindung mit thigmotaktischen Reizen.

# 3 Das Paarungsverhalten des Kleinen Beutenkäfers

## *3.1 Einleitung*

In den folgenden Beobachtungen und Versuchen sollte Reproduktionsbiologie des Kleinen Beutenkäfers auf Verhaltensebene genauer untersucht und die bisherigen Ergebnisse ergänzt werden. Nach gängigen Theorien können die Fortpflanzungsstrategien verschiedener Spezies als evolutives Produkt natürlicher und sexueller Selektion (Darwin, 1871) angesehen werden (Choe und Crespi, 1997). Wichtige Variablen sind dabei die Verfügbarkeit von Ressourcen und Geschlechtspartnern, Kosten und Nutzen der Interaktion und in welchem Maß ein Geschlecht dominant ist (Brown et al., 1997). Beeinflusst werden diese Variablen durch die Biologie und Ökologie einer Spezies. Die sexuelle Selektion wird in erster Linie durch den Konflikt zwischen Männchen und Weibchen geprägt (Darwin, 1871). Männchen versuchen ihre Gene möglichst viel zu verbreiten, wohingegen die Weibchen danach streben, das beste Genmaterial für ihre Nachkommen zu sichern.
Das eigentliche Paarungsverhalten bei Vertebrata und Invertebrata läuft häufig in Form einer Abfolge fest definierter Verhaltensweisen vor, während und nach der eigentlichen Kopulation ab (Arnaud und Haubruge, 1999, Franz, 2003, Puniamoorthy et al., 2009, Rivers und Morin, 2009). Einige Verhaltensweisen, wie z. B. das Besteigen des Partners, kommen bei den meisten Arten vor, andere können auf Taxaebene spezifisch sein und sogar für phylogenetische Analysen verwendet werden (Turco et al., 2003, Schutze et al., 2007, Arbuthnott und Crespi, 2009, Puniamoorthy et al., 2009). Aggression und Konkurrenzkampf spielen häufig eine wichtige Rolle bei polygamen Arten. Polygame Arten, bei denen es vor der Kopulation nicht zu Kämpfen zwischen den Männchen kommt, zeigen häufig eine größere Plastizität des Verhaltens (Rivers und Morin, 2009). Eine wichtige Komponente dieser Verhaltensabläufe ist das Balzverhalten. Darunter versteht man meist ein stereotypes Verhalten des Männchens mit dem Zweck, das Weibchen zu stimulieren und gefügig zu machen (Eberhard, 1997). Der Erfolg des Balzverhaltens wird daran gemessen, ob es einem Männchen gelingt, zur Kopulation zu kommen. Dies ist häufig bei

monogamen Arten zutreffend oder bei durch Männchen dominierten, polygamen Arten, bei denen das Männchen dadurch Vorteile erhält, das erste (bzw. letzte), begattende Männchen zu sein („sperm precedence“ Strategie). Den Weibchen wurde dabei lange nur die eher passive Rolle des wählerischen Geschlechts zugestanden, das sich für den besten, verfügbaren Partner entscheidet. Inzwischen gibt es immer mehr Hinweise und Beispiele auf eine aktive Einflussnahme der Weibchen. Diese wird, etwas missverständlich, „cryptic female choice“ genannt, da das Weibchen nicht direkt den Kopulationspartner wählt, sondern selektiert, mit welchen Spermien die Eier befruchtet werden. Weibchen besitzen verschiedenste Strategien, wie sie mechanisch (z. B. durch Ausscheiden von Spermien), physiologisch (z. B. durch Pheromone) und/oder durch ihr Verhalten den Erfolg einer Befruchtung beeinflussen (Eberhard, 1997).

In den folgenden Untersuchungen sollte das bisher nicht untersuchte Paarungsverhalten des Kleinen Beutenkäfers genau beschrieben und bezüglich besonders auffälliger und variabler Komponenten analysiert werden. Inwiefern lässt sich das Kopulationsverhalten des Kleinen Beutenkäfers mit typischen Fortpflanzungsstrategien anderer polygamer oder in Gruppen lebender Taxa vergleichen? Inwiefern entspricht es einem seiner Lebensweise nach zu erwartendem System? Wo variiert es und welches Geschlecht dominiert?

Charakteristische Verhaltensweisen sollen zunächst in Form eines Ethograms festgehalten werden, um daraus dann komplexere Verhaltensabläufe als Flussdiagramm darzustellen. Darüber hinaus sollen die Hinweise auf die chemische Kommunikation beim Kleinen Beutenkäfers auf Verhaltensebene ergänzt werden. Unsere bisherigen Experimente lassen vermuten, dass auf geringer Distanz oder auf Kontaktebene wirkende Substanzen eine Rolle beim Aggregations- und Paarungsverhalten des Kleinen Beutenkäfers spielen. Mit Hilfe detaillierter Videoanalysen sollen die beim Kopulationsverhalten involvierten Körperpartien identifiziert werden und möglicherweise Aufschluss darüber geben, an welchen Stellen eine Pheromonabgabe stattfinden könnte.

Auch andere Erkenntnisse aus den Biotests, wie der Beginn der sexuellen Aktivität ab einem Alter von ca. zwei Wochen, sollten mit Verhaltensbeobachtungen geprüft und außerdem die Rolle der Aggregationen beim Paarungsverhalten genauer untersucht werden. Im Rahmen unserer Versuche wurde auch häufig homosexuelles Verhalten

bei *A. tumida* beobachtet: Weibchen saßen auf anderen Weibchen und betrillerten diese und Männchen versuchten mit anderen Männchen zu kopulieren. Altersabhängigkeit und Häufigkeit des homosexuellen Verhaltens bei *A. tumida* Männchen sollten dokumentiert und mit dem Auftreten von heterosexuellem Verhalten verglichen werden.

## *3.2 Material und Methoden*

### *3.2.1 Verhaltensbeobachtungen*

Für die Beobachtungen des Kopulationverhaltens wurde eine Observationsbox von 10 x 10 cm sowie 3 cm Tiefe hergestellt. Seiten- und Rückwand bestanden hierbei aus Holz, vorne befand sich eine kleine, verschiebbare Glasscheibe, durch die die Käfer beobachtet und das Handling reguliert werden konnte. Die Versuchskäfer entstammten aus einer Zucht, die wie in 2.2.1 beschrieben angesetzt wurde, mit dem Unterschied, dass die Larven zur Verpuppung jeweils in ein Einzelgefäß mit einem Sand-/Erdgemisch gegeben wurden. Männchen und Weibchen wurden dann bis zur Beobachtung des Paarungsverhaltens getrennt gehalten. So wurde gewährleistet, dass bis zur Beobachtung kein Kontakt mit dem jeweils anderen Geschlecht auftrat. Falls nicht anders im Text erwähnt, waren alle Käfer zwischen zwei und drei Wochen alt. Ab diesem Alter besteht nach unseren bisherigen Versuchen bei allen Käfern eine Präferenz für das andere Geschlecht (siehe Kapitel 2). In die Beobachtungsbox wurden acht Männchen und acht Weibchen gegeben. Zur Geschlechterunterscheidung wurden die Käfer mit Hilfe eines Edding® Deco Marker mit zwei verschiedenen Farben markiert. Den Käfern wurde eine halbe Stunde Zeit zur Akklimatisierung gegeben. Daraufhin wurden alle Verhaltensweisen in der sich inzwischen gebildeten Käferaggregation für zwei Stunden auf Video aufgezeichnet (16:00 bis 18:00). Danach wurden die Käfer in der Box belassen und am folgenden Morgen (9:00 bis 11:00) zwei weitere Stunden aufgezeichnet. Alle Beobachtungen von Käfern in einer Aggregation wurden mit dem Panasonic PV-GS80 Digital Camcorder auf Kassette aufgezeichnet und dem zugehörigen Software Programm (MotionDV Studio® und Video Soft®) digitalisiert. Falls eine Nachbearbeitung oder Schneiden der Filme erforderlich war, erfolgte dies mit der Freeware Avidemux und VirtualDub.

#### 3.2.1.1 Ethogram

Zur Erstellung des Ethograms wurden die unter 3.2.1 erwähnten Videoaufnahmen mehrfach analysiert und spezifische, wiederkehrende Verhaltensweisen definiert und mit einem Namen versehen, der das jeweilige Verhalten möglichst gut beschrieb. Diese Bezeichnungen wurden dann bei der Programmierung der möglichen Verhaltensweisen („events“) im Observer® 5.0 verwendet.

#### 3.2.1.2 Computergestützte Auswertung der Videosequenzen

Die insgesamt 4-stündige Videosequenz mit 16 Käfern (acht Männchen und acht Weibchen) in Aggregation wurde Frame (Einzelbild) genau mit dem Softwarepaket Observer® 5.0 ausgewertet und analysiert. Vor der Auswertung wurden zunächst die Anzahl und das Geschlecht möglicher Fokustiere, die Verhaltensweisen und mögliche Aufenthaltsorte (in diesem Fall der vorhandene oder der fehlende Kontakt zu anderen Artgenossen) in einem „workspace“ definiert und gespeichert. Insgesamt wurden 22 Beobachtungssequenzen, die eine oder mehrere Kopulationen beinhalteten, im „workspace“ ausgewertet und gespeichert. In einer Sequenz konnte durch mehrfaches Überarbeiten das Verhalten von bis zu vier Käfern gleichzeitig aufgenommen werden. Mit der im Programm integrierten „Lag Sequential Analyse“ wurden die Daten weiter ausgewertet. Als Ergebnis erhält man die prozentuale Wahrscheinlichkeit (oder alternativ die Häufigkeit innerhalb einer Sequenz/aller Sequenzen) mit der eine Verhaltensweise auf eine andere folgt. Die Signifikanz dieser Übergänge wurde mit einer Standardized Residual Analyse mit Hilfe des Statistikprogramms MatMan® geprüft. Bei der Auswertung wurden die beiden Verhaltensweisen „Betasten“ und „Betrillern“ (Tab. 4) als gleichwertig betrachtet und für die Lag Sequential Analyse gepoolt, um die Darstellung zu vereinfachen. Sie erfolgen häufig gleichzeitig, abwechselnd oder überlappend. „Putzen“, „Laufen“ und „Sitzen“ wurden zu „unspezifisches Verhalten“ gepoolt, da es sich um keine sozialen Verhaltensweisen handelte und sie für den Ablauf des Paarungsverhaltens irrelevant waren. Auch die drei nach Einführen des Aedegus auftretenden Verhaltensweisen („Tarsenreiben-Elytren“, „-Mandibeln“ und „Wippen“) wurden für die Lag Sequential Analyse zu der Verhaltensweise „Kopulation“ gepoolt, da sie mehrfach und in schneller Abfolge nacheinander auftraten und sich sonst eine Verfälschung der Prozentzahlen des Gesamtschemas ergeben hätte.

### *3.2.2 Sexualverhalten und Aggregation*

3.2.2.1 Vergleich des Verhaltens von Paaren in Aggregation und Einzelpaaren

Die Anzahl stattfindender Kopulationen wurde in diesem Versuch bei Einzelpaaren (n = 30) und Aggregationen von sechs bis zehn Paaren (n = 4) verglichen. Dabei wurde eine vergleichbare Gesamtzahl an Einzel- und Aggregationspaaren angestrebt. Der Versuch wurde mit frisch geschlüpften, sieben und 18 Tage alten Käfern durchgeführt. Die 30 einzelnen Käferpaare verschiedener Altersstufen wurden für acht Minuten in einer kleinen Petrischale mit Deckel (5 cm ø) beobachtet und das Verhalten direkt mit dem Observer 3.0 Softwarepaket aufgezeichnet. Die Käfer waren im Vorfeld, wie zuvor beschrieben (siehe 3.3.1), geschlechtsspezifisch markiert und bis zum Versuch vom anderen Geschlecht getrennt gehalten. Es wurden immer neue, sterile oder zuvor gründlich mit Ethanol und destilliertem Wasser geputzte Petrischalen verwendet. Für die statistische Auswertung wurde ausschließlich das Auftreten von Kopulationen (Einführen des Aedegus) erfasst. Mit den kleinen Aggregationen wurde identisch verfahren, wobei hier die Beobachtungsarena mit der Videokamera für acht Minuten gefilmt und das Verhalten aller Paare später auswertet wurde.

3.2.2.2 Homo- und heterosexuelles Verhalten innerhalb der Aggregationen

Für diesen Vergleich wurden die in 3.2.2.1 beschriebenen Videoaufnahmen (jeweils zwölf Minuten) von Aggregationen verschiedener Altersstufen weiter ausgewertet. Neben den heterosexuellen Kopulationen wurden die auftretenden homosexuellen Kopulationen gezählt und verglichen. Zusätzlich wurde, unter zu 3.2.2.1 identischen Bedingungen, das Verhalten von vier Aggregationen mit zehn Käferpaaren von 60 Tagen Alter aufgezeichnet. In diesem Alter könnte, basierend auf allgemeinen Beobachtungen, die postreproduktive Phase eingesetzt und die sexuelle Aktivität nachgelassen haben.

### *3.2.3 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Körperoberfläche*

Für die Untersuchungen wurden *A. tumida* Wildfänge verwendet, die der Population in Südafrika entstammten (siehe 2.2). Sie wurden bis zur Präparation in 100-prozentigem Ethanol gelagert, daher war keine weitere Entwässerung notwendig. Neben der Ober- und Unterseite von männlichen und weiblichen Käfern wurden

verschiedene Körperteile untersucht. Ihre Auswahl basierte auf den Ergebnissen der Videoanalysen, Beobachtungen im täglichen Umgang mit den Kleinen Beutenkäfern und der Zugehörigkeit zum Genitaltrakt. Die Elytren wurden besonders häufig bei sozialen Interaktionen betastet oder mit den Antennen betrillert. Die Laufbeinpaare wurden ständig, während der Beobachtungen, aneinander gerieben. Daher wurden folgende Körperpartien untersucht:

- je ein Eyltrenpaar pro Geschlecht (dorsale und ventrale Aufsicht)
- die drei Laufbeinpaare, je einmal pro Geschlecht (dorsale und ventrale Aufsicht)
- die drei letzten Abdominalglieder von je einem Männchen und Weibchen (ventrale Aufsicht)

Nach der Präparation und Probenvorbereitung erfolgte die Kritisch-Punkt-Trocknung in flüssigem $CO_2$ und Besputterung der Proben mit einer Palladium-Gold-Mischung (Schichtdicke 20 nm). Die Aufnahmen in verschiedener Vergrößerung wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop (Cambridge Stereoscan 250, Mk2) an der der Eberhard-Karls-Universität im Institut für Evolution und Ökologie Insektenökologie aufgenommen. Die Nachbearbeitung der Bilder erfolgte mit der Adobe Photoshop® Software.

## *3.3 Ergebnisse*

### *3.3.1 Verhaltensbeobachtungen*

#### 3.3.1.1 Ethogram

In Tabelle 4 finden sich 20 für den Kleinen Beutenkäfer definierte Verhaltensweisen. Die Verhaltensweisen wurden bezüglich ihrer Relevanz für das Sozial- und Kopulationsverhalten in Kategorien unterteilt.

**Tab. 4: Ethogram der Verhaltensweisen, die beim Kleinen Beutenkäfer *A. tumida* auftreten. Die Beschreibung beruht auf den Beobachtungen einer Käferaggregation von acht Männchen und acht Weibchen in Abwesenheit von Bienen.**

| Verhaltenskategorie | Bezeichnung | Beschreibung |
|---|---|---|
| Unspezifisch | Laufen | Fortbewegung in durchschnittlicher Geschwindigkeit |
| | Rennen | Fortbewegung schneller als Laufen |
| | Sitzen | Käfer bewegt sich nicht fort, zeigt auch keine anderen Verhaltensweisen |
| | Putzen | Reinigen des Körpers mit Tarsen, Mandibeln und Maxillen |
| | Taxieren | Kopf und Antennen werden während des Laufens in verschiedene Richtungen auf und ab bewegt |
| | Beine Reiben | Reiben der ersten und zweiten Laufbeinpaare aneinander. |
| Sozialverhalten | Betasten | Berühren eines anderen Käfers mit Tarsen. |
| | Betrillern | Berührung eines anderen Käfers mit den Antennen |
| | Aufsitzen | Sitzen auf einem anderen Käfer |
| | Abstieg | Heruntersteigen von einem Artgenossen, nach vorherigem Aufsitzen |
| | Verfolgung | Rennen hinter anderem Käfer nach vorheriger Verhaltensinteraktion |
| | Flucht | Rennen vor anderem Käfer nach Verhaltensinteraktion |
| | Stoßen | Ein Käfer schiebt oder hebelt einen zweiten Käfer aus seiner der aktuellen Position |
| | Kontakt | Sitzen mit gleichzeitigem Körperkontakt zu anderen Artgenossen |
| | Pronotum Betrillern | Betrillern des Pronotums und der Kopfregion eines Artgenossen mit gleichzeitigem Aufsitzen |
| Kopulationsverhalten | Rutschen | Ein auf einem anderen Artgenossen befindlicher Käfer gleitet entlang der Elytren herab bis Abdomen an Abdomen aufliegt |
| | Begattungshaltung | Männchen nimmt endgültige Paarungsposition |

| | |
|---|---|
| | ein, dabei Einführen des Aedegus |
| Tarsenreiben Elytren | schnelles Reiben der Tarsen des ersten Laufbeinpaares der Männchen über die Elytren während der Kopulation |
| Tarsenreiben Mandibeln | schnelles Gegeneinander Reiben der Tarsen des ersten Laufbeinpaares, wobei zwischendurch wiederholt Tarsen mit Antennen durch die Mandibeln gezogen werden |
| Wippen | wenige, langsame Auf- und Abbewegungen in großem Radius, während der Kopulation |
| Kopulationsende | Herausziehen des Aedegus mit Abstieg |
| Unterbrechung | Ein dritter Käfer stört die Kopulation zweier Käfer durch einen durch Stoßen, Betrillern oder Betasten eines Paares. |

#### 3.3.1.2 Beschreibung des Paarungsverhalten im Flussdiagram

Insgesamt wurden 33 Kopulationen und 477 Ereignisse analysiert, wobei mehrere Kopulationsversuche mit demselben Weibchen immer als eine Kopulation gewertet wurden. Die Kopulation und die damit assoziierten Verhaltensweisen folgen einem festen Schema mit einigen variablen Komponenten, die sich meist durch die Störung durch andere Artgenossen ergeben. Einige der Verhaltensweisen des Ethograms fehlen, da sie während des Paarungsverhaltes nicht auftreten.

Die prozentuale Wahrscheinlichkeit, dass bei einem Männchen eine Verhaltensweise auf eine weitere folgt, ist in Tabelle 5 dargestellt. Aus den statistisch signifikanten Übergängen wurde ein Flussdiagramm der Verhaltensabfolgen erstellt (Abb. 22). Eingeleitet wird die Paarung durch eine erste Annährung des Männchens, bei der es das Weibchen an verschiedenen Körperregionen betrillert und betastet (Abb. 19), um es daraufhin zu besteigen („Aufsitzen“). Manchmal betrillert und betastet ein Männchen erst verschiedene Weibchen, bevor es eines besteigt oder ein Weibchen flieht bei Annäherung sofort. In etwa der Hälfte aller Fälle besteigt ein Männchen das Weibchen nach vorherigem „Betasten“ (Abb. 20) und „Betrillern“ nicht. Ist das Weibchen bereit zur Paarung und unternimmt es nicht schon in der ersten Phase oder nach einer Störung einen Fluchtversuch, verhält es sich während der Kopulation ruhig und bewegungslos. Ohne Störung durch andere Käfer läuft eine Paarung wie

folgt ab. Das Männchen rutscht nach dem Aufsitzen ein Stück vor und betrillert das Pronotum, Kopf und Antennen („Pronotum Betrillern“, Abb. 20; Abb. 25) des Weibchens. Darauf rutscht es dorsal an Elytren und Abdomen („Rutschen“) herab, bis es den Aedegus einführen kann („Begattungshaltung“). Während der Kopulation klammert sich das Männchen mit dem zweiten und dritten Beinpaar am Weibchen fest. Auffällig sind die Bewegungen des ersten Beinpaares: Die Tarsen werden auf den Elytren auf und ab gerieben („Tarsenreiben-Elytren“) und dabei immer wieder abwechselnd über die Antennen und durch die Mandibeln gezogen („Tarsenreiben-Mandibeln“, Abb. 21). Diese Verhaltensweisen finden in schneller Abfolge mit längeren Unterbrechungen durch die Verhaltensweise „Tarsenreiben-Elytren“ statt. Abschließend macht das Männchen einige weiter ausholende Auf- und Abbewegungen („Wippen“), es folgt noch einmal eine kurze Sequenz mit „Tarsenreiben-Elytren“, worauf das Männchen den Aedegus heraus zieht, absteigt und unspezifisches Verhalten wie Putzen. Laufen oder Sitzen zeigt. Eine Kopulation beginnt und endet immer mit „Tarsenreiben-Elytren“, gefolgt von „Tarsenreiben-Mandibeln“ (Abb. 21). Je nach Dauer treten diese Verhaltensweisen ein- bis sechsmal pro Kopulation auf. „Wippen“ tritt immer nur einmal (gegen Ende einer länger andauernden Kopulation; persönliche Beobachtung) auf. Die mittlere Kopulationsdauer vom Einführen bis zum Herausziehen des Aedegus beträgt 21,5 ± 13,8 s (Min. = 7,2 s; Max. = 67,9 s). Die große Variation ergibt sich aus der Tatsache, dass kaum eine Kopulation ohne Störung vonstatten geht. Störungen können durch andere Käfer auftreten, wenn z.B. ein anderes Männchen bzw. meistens Weibchen das kopulierende Paar „stößt“ („Unterbrechung“) oder wenn das Weibchen paarungsunwillig ist und flieht („Flucht“). In beiden Fällen kann es dem oben aufsitzenden Männchen gelingen, sich weiter an dem Weibchen festzuklammern (siehe Tab. 5), wobei die Flucht meist gelingt und unspezifische Verhaltensweisen folgen und es dem Männchen nach einer Unterbrechung in der Regel gelingt, sitzen zu bleiben (Abb. 22).

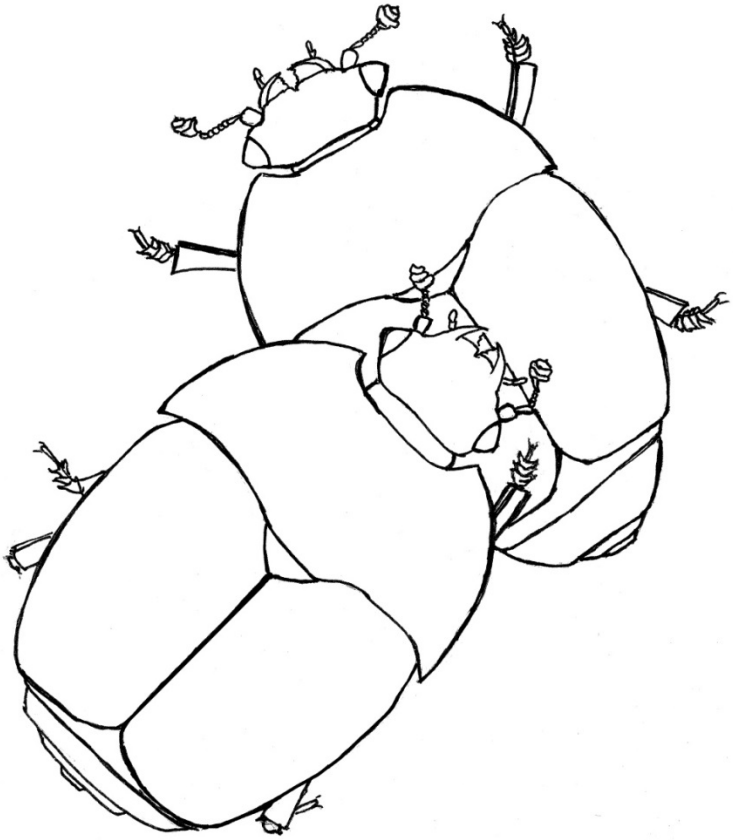


**Abb. 19: Ein Männchen „betastet“ ein Weibchen, bevor es aufsteigt („Aufsitzen“).**

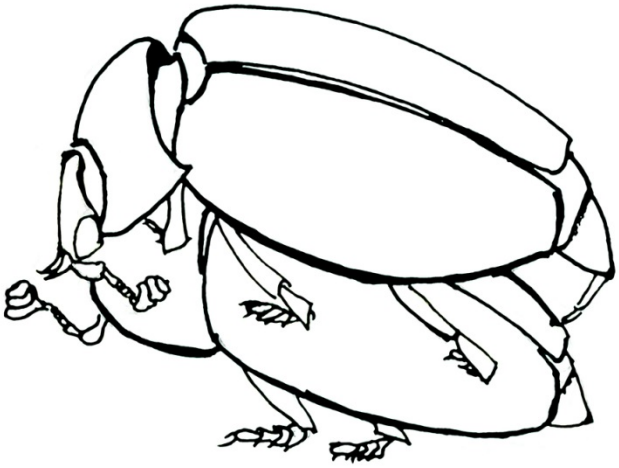


**Abb. 20: Männchen betrillert das Pronotum eines Weibchens, bevor es am Abdomen des Weibchens in die Begattungshaltung rutscht („Rutschen“). Der Aedegus des Männchens ist dabei häufig schon ausgeklappt.**

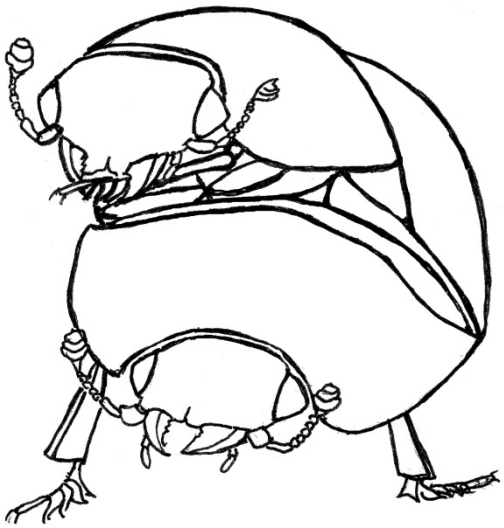


**Abb. 21: „Tarsenreiben-Mandibeln“: Während der Kopulation zieht das Männchen die Tarsen durch die Mandibeln (und über die Antennen).**

Das Männchen verweilt dann einige Zeit ruhig sitzend auf dem Weibchen, bis es die typischen Verhaltensweisen, angefangen mit dem Betrillern des Pronotums (Abb. 21, Abb. 25), von neuem aufnimmt (Abb. 22). Die Zeit, die ein Männchen nach dem Aufsteigen bis zum erzwungenen oder freiwilligen Abstieg auf einem Weibchen verbringt, kann entsprechend wesentlich länger sein als die eigentliche Kopulation und variiert stärker ($\bar{x}$ = 128,6 ± 168,6 s; Min. = 23,4 s; Max. = 732,0 s). Zwei Drittel der Kopulationen gehen ohne Störung vonstatten, 30% der Kopulationen werden unterbrochen, worauf das Männchen in 38% der Fälle erst einmal ruhig auf dem Weibchen sitzen bleibt und es ihm in 33% der Fälle gelingt, ungestört fortzufahren (Tab. 5). In den restlichen Fällen kommt es zum Ende der Kopulation, indem das Männchen nach der Störung einfach absteigt oder das Weibchen die Chance zur Flucht nützt (Tab. 5). Weibchen fliehen zwar immer wieder, aber sie „Betasten“ (Abb. 20), „Betrillern“ oder besteigen sogar häufig selbst die Männchen. Nicht in die Auswertung eingeflossen, aber dennoch erwähnenswert sind die sporadisch auftretenden Kopulationen, bei denen ein Männchen ein bereits kopulierendes Paar besteigt. Es kann sich hierbei um ein hetero- oder homosexuelles Pärchen handeln.

**Tab. 5: Prozentuale Wahrscheinlichkeit der Abfolge von Verhaltensweisen eines Männchens. Die Leserichtung erfolgt in Richtung Reihe nach Spalte, signifikante Übergänge in rot markiert (Standardized Residual Analyse).**

| Verhaltensweisen | Betrillern/ Betasten | Auf-steigen | Pronotum Betrillern | Rutschen | Begattungs-haltung | Kopulation | Kopulations-ende | Absteigen | unspezifisches Verhalten | auf Weibchen sitzen | Unterbrechung | Flucht |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Betrillern/ Betasten | 0 | **88** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 |
| Aufsteigen | 5 | 0 | **73** | 9 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Pronotum Betrillern | 0 | 0 | 0 | **79** | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 14 | 0 | 3 |
| Rutschen | 0 | 0 | 11 | 0 | **77** | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Begattungshaltung | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | **100** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kopulation | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | **46** | 0 | 0 | 11 | **30** | **11** |
| Kopulationsende | 0 | 0 | 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | **62** | 0 | 0 |
| Absteigen | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | **90** | 0 | 0 | 0 |
| unspezifisches Verhalten | **72** | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| auf Weibchen sitzen | 0 | 0 | **33** | 14 | 0 | 0 | 0 | **33** | 0 | 0 | 0 | **19** |
| Unterbrechung | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 25 | 0 | 13 | 13 | **38** | 0 | 13 |
| Flucht | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | 0 | **63** | 25 | 0 | 0 |

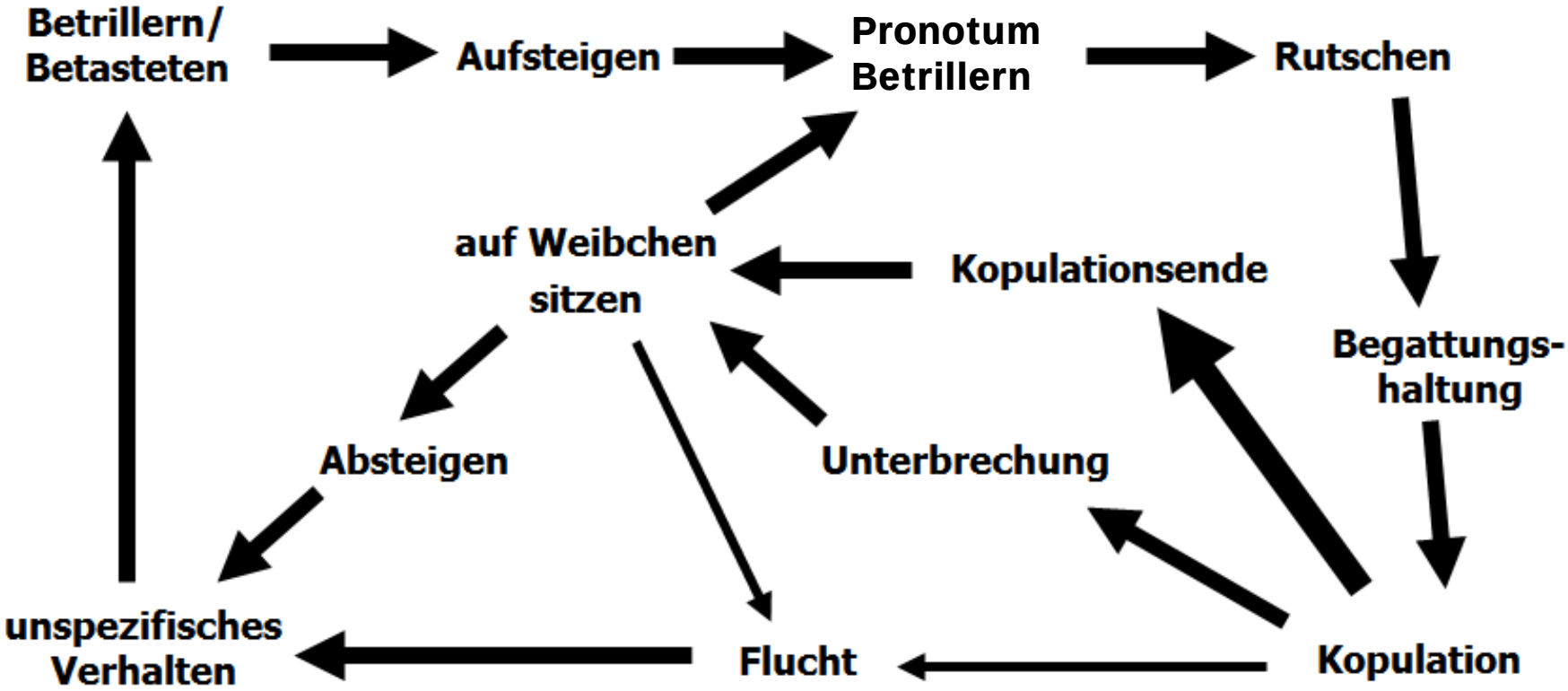



**Abb. 22: Flussdiagramm der Verhaltensweisen eines Männchens bei der Kopulation. Es sind nur die signifikanten Übergänge der Verhaltensweisen dargestellt sind nur, der Ablauf erfolgt in Pfeilrichtung. Es folgen lediglich auf „auf Weibchen sitzen“ und „Kopulation“ mehrere mögliche, signifikante Übergänge. Unterschiede der Übergangswahrscheinlichkeit sind in diesen beiden Fällen durch die Pfeildicke dargestellt.**

3.3.1.3 Geschlechtsspezifisches Stoßverhalten

Das Ereignis „Stoßen“ ist eine äußerst prägnante und häufig auftretende Komponente des Sozialverhaltens und wurde daher neben dem Begattungsverhalten genauer analysiert. Käfer hebeln oder stoßen hierbei andere Käfer oder Paare aus ihrer aktuellen Position (siehe Ethogram Tab. 4). Der stoßende Käfer schiebt dabei meist seinen Kopf unter den Körper eines anderen und nützt so die Hebelkräfte aus oder er zieht die Kraft aus einem kurzen Anlauf oder kombiniert beides. Für die Auswertung wurden alle in den vierstündigen Videoaufzeichnungen auftretenden Stoßereignisse gezählt und Donor und Rezipient des jeweiligen Ereignisses notiert. Manchmal stieß ein Käfer mehrere Käfer hintereinander aus dem Weg oder ein Käfer wurde mehrfach gestoßen, letzteres wurde als nur ein Ereignis gewertet. Fast ausschließlich Weibchen zeigten diese Verhaltensweise. Sie stießen hochsignifikant häufiger (n = 111), als Männchen (n = 7). Außerdem stießen sie signifikant häufiger Weibchen (n = 66) als Männchen (n = 45). Zusätzlich stießen die Weibchen elfmal ein Paar (zwei aufeinander sitzende oder aufeinander sitzende und kopulierende Käfer), die Männchen hingegen nur einmal ($p < 0,05$, $\chi^2$-Test).

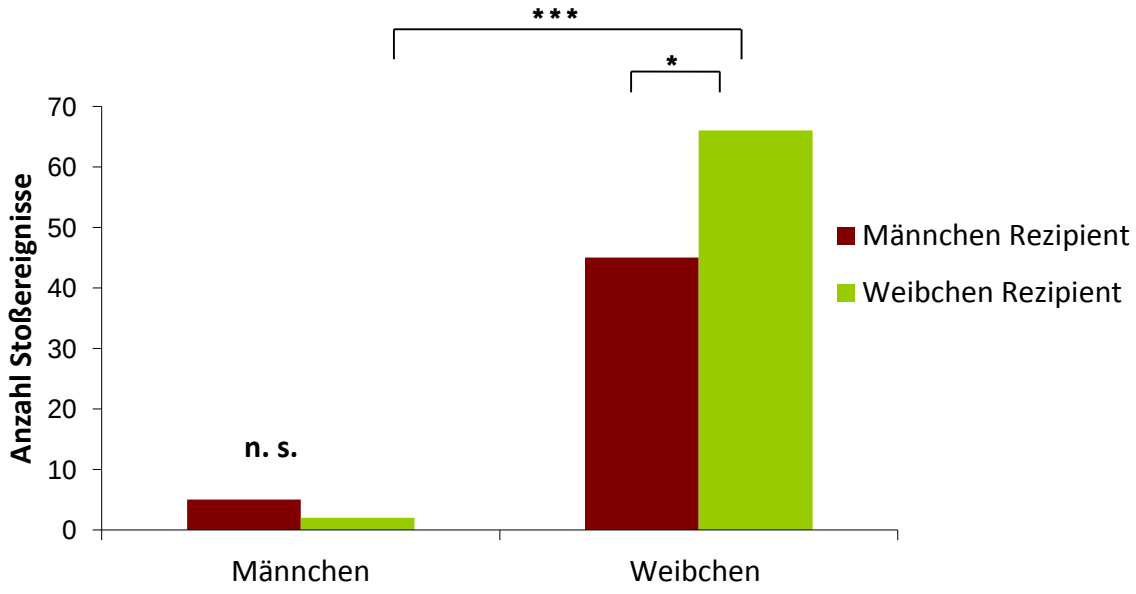



**Abb. 23: Von Männchen und Weibchen ausgeführte Stoßereignisse (n = 131). Die Balken geben Auskunft, wer gestoßen wird (Rezipient). *: P < 0,05; ***: P < 0,001, $\chi^2$-Test.**

### *3.3.2 Kopulation und Aggregation*

Männchen unternahmen fast ausschließlich Begattungsversuche, wenn sie sich in Aggregation befanden und Kopulationen traten erst ab dem Alter von 18 Tagen in größerer Zahl auf (Abb. 23). Bei den Einzelpaaren wurden kaum Kopulationen oder Kopulationsversuche beobachtet (Abb. 26) während dieselben Käferindividuen in Aggregation sofort begannen zu kopulieren (Abb. 24). Weibchen von Einzelpaaren wurden häufig dabei beobachtet, dass sie inaktive Männchen besteigen und das Pronotum betrillern, d.h. identische Verhaltensweisen wie sich paarende Männchen zeigen (siehe 3.3.1.2). Die Männchen saßen währenddessen regungslos da.

Bei jüngeren Käfern konnten auch in Aggregation kaum Verpaarungen beobachtet werden. Sie waren, ähnlich den Einzelpaaren, eher inaktiv und zeigten nur wenige Verhaltensinteraktionen. Bei den frisch geschlüpften Käfern kopulierten nur zwei der insgesamt 33 Paare in Aggregation (Abb. 26). Geringfügig mehr waren es dann im Alter von einer Woche (acht Kopulationen bei insgesamt 29 Paaren in Aggregation; Abb. 26). Im Alter von 18 Tagen kam es dann zu einem massiven Anstieg der Kopulationen: 39 Kopulationen bei 27 Paaren in Aggregation, ein eindeutiger und hochsignifikanter Unterschied zu den beobachteten Einzelpaaren (Abb. 25) und allen anderen Alterstufen ($p < 0{,}001$, $\chi^2$-Test). Eine der vier Aggregationen mit kopulierenden Käfern ist in Abbildung 26 zu sehen.

**Abb. 24: Kopulierende Käfer in Aggregation. Es handelte sich um die identischen Käfer, die zuvor als Einzelpaare kein Begattungsverhalten gezeigt hatten. Bei den markierten Käfern handelt es sich um Männchen, bei den unmarkierten Käfern um Weibchen.**

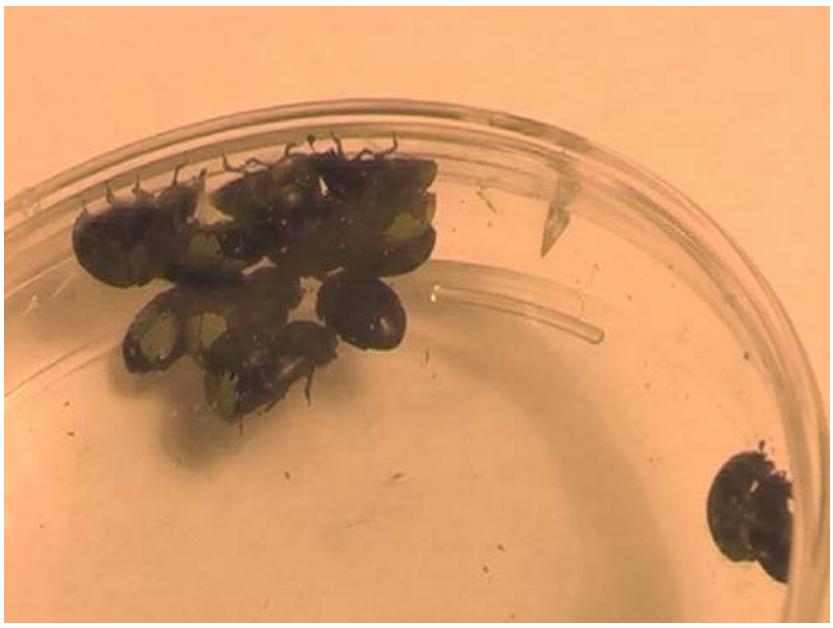


**Abb. 25: Aggregation mit kopulierenden Käfern. Bei den markierten Käfern handelt es sich um Männchen, bei den unmarkierten Käfern um Weibchen. Rechts unten ist zu sehen, wie ein Männchen das Pronotum eines Weibchens betrillert.**

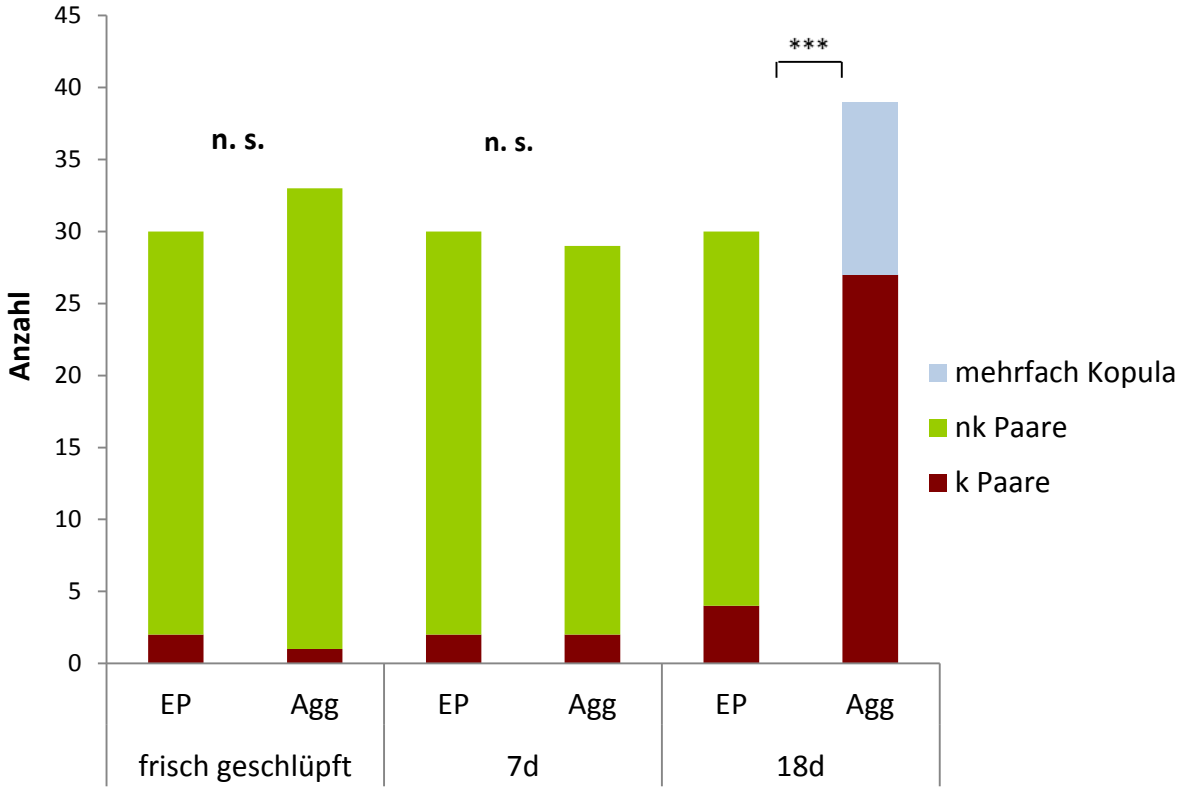



**Abb. 26: Anzahl nicht kopulierender (nk Paare) und kopulierender (k Paare) bei Einzelpaaren (EP) und Paaren in Aggregation (Agg) in 3 Altersstufen (frisch geschlüpft, 7d alt, 18d alt). n. s.: Nicht signifikant; ***: P < 0,001, $\chi^2$-Test.**

### *3.3.3 Homosexuelles Verhalten*

Lediglich im Alter von 18 Tagen fanden signifikant mehr heterosexuelle als homosexuelle Kopulationen statt (Abb. 27). Die Auszählung der homo- und heterosexueller Kopulationen ergab bei allen anderen Altersstufen keine Unterschiede. Bei frisch geschlüpften, sieben Tage und 18 Tage alten Käfern traten drei, zwei und acht homosexuelle Kopulationen bei insgesamt 33, 29 und 29 Paaren auf, im Vergleich zu zwei, acht und 39 Kopulationen zwischen Männchen und Weibchen (Abb. 27). Im Alter von 60 Tagen überwogen die homosexuellen Kopulationen, wenn auch nicht signifikant. Bei 40 Paaren fanden 21 hetero-, und 29 homosexuelle Kopulationen statt (Abb. 27). Der Vergleich der verschiedenen Altersstufen zeigte, dass die Käfer im Alter von 60 Tagen signifikant häufiger ($\chi^2$-Test) mit anderen Männchen kopulierten, als frisch geschlüpfte ($p < 0{,}001$), sieben Tage alte ($p < 0{,}001$) oder 18 Tage alte ($p < 0{,}05$) Käfer. Bei frisch geschlüpften, männlichen Käfern wurde häufig beobachtet, dass sie beim Zusammenführen in der Petrischale sofort zu kopulieren begannen.

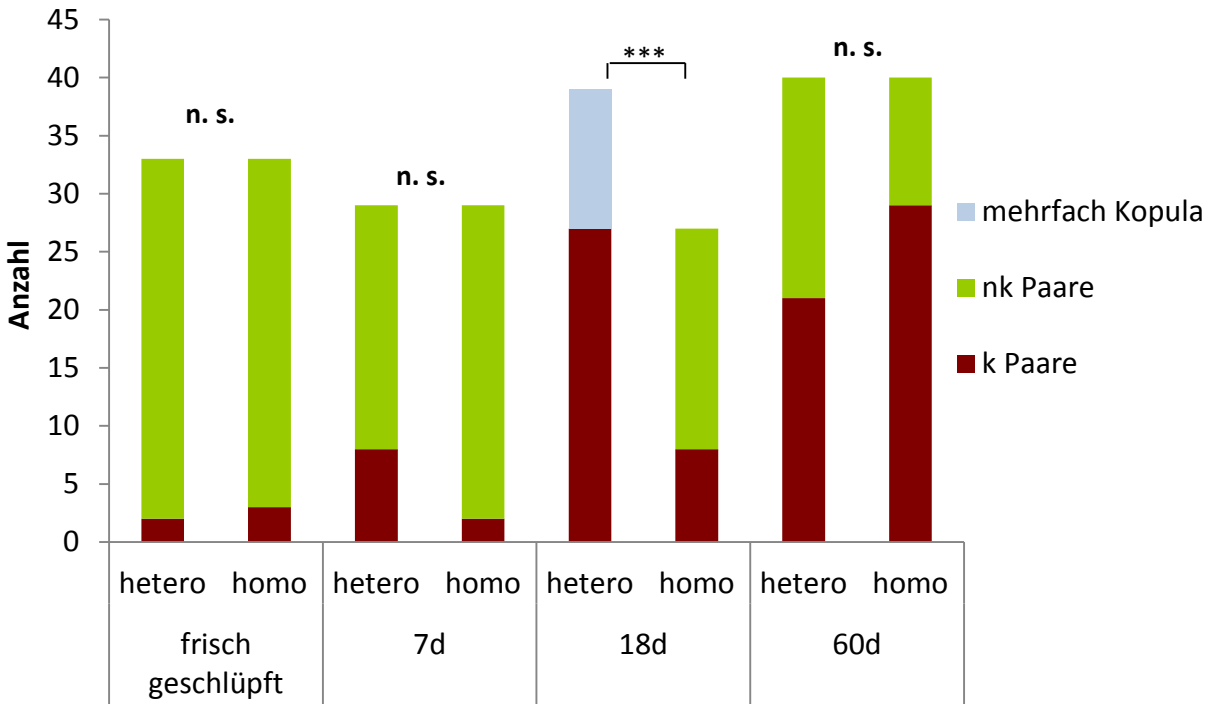



**Abb. 27: Anzahl aller homo- und heterosexuellen Kopulationen bei Aggregationen aus frisch geschlüpften, 7d alten, 18d alt und 60d alten Käfern. nk Paare: Nicht kopulierende Paare; k Paare: Kopulierende Paare; n. s.: Nicht signifikant; ***: P < 0,001; $\chi^2$-Test.**

Dieses Verhalten währte aber nie länger als wenige Sekunden, war somit zu Beginn der Datenaufnahme immer schon vorüber und konnte nicht in diese einfließen.

### *3.3.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Körperoberfläche*

Im Folgenden ist eine Auswahl der relevant erscheinenden Aufnahmen dargestellt. Zur Übersicht ist erst die Gesamtansicht eines Weibchens dargestellt (Abb. 28), im Folgenden dann detailliertere Aufnahmen der Körperregionen, die in Verhaltensinteraktionen involviert sind. Die ventrale Ansicht der Elytren ist nicht dargestellt. Außer im Genitalbereich konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen festgestellt werden. Es fanden sich lediglich, vermutlich der Flügelhaftung dienende (Gorb, 1998), Strukturen, welche für unsere Untersuchungen nicht von Interesse waren. Erste auffällige Strukturen fanden sich auf den Coxae des ersten Laufbeinpaars, wo jeweils eine große Öffnung ins Körperinnere zu sehen war (Abb. 28, Abb. 29). Diese Öffnung ist auch schon bei geringer Vergrößerung (x100) bei ventraler Aufsicht auf den ganzen Käfer sichtbar (Abb. 28).

Besonders die Elytren und die letzten Abdomenglieder im Genitalbereich waren dicht mit Chaetae besetzt (Abb. 30 und Abb. 31). Vor jeder Chaeta befand sich in Wuchsrichtung ein Feld mit einer Öffnung in das Körperinnere (Abb. 30). In anderen Körperregionen (siehe, z. B. Abb. 29) fehlten diese Felder mit Poren.

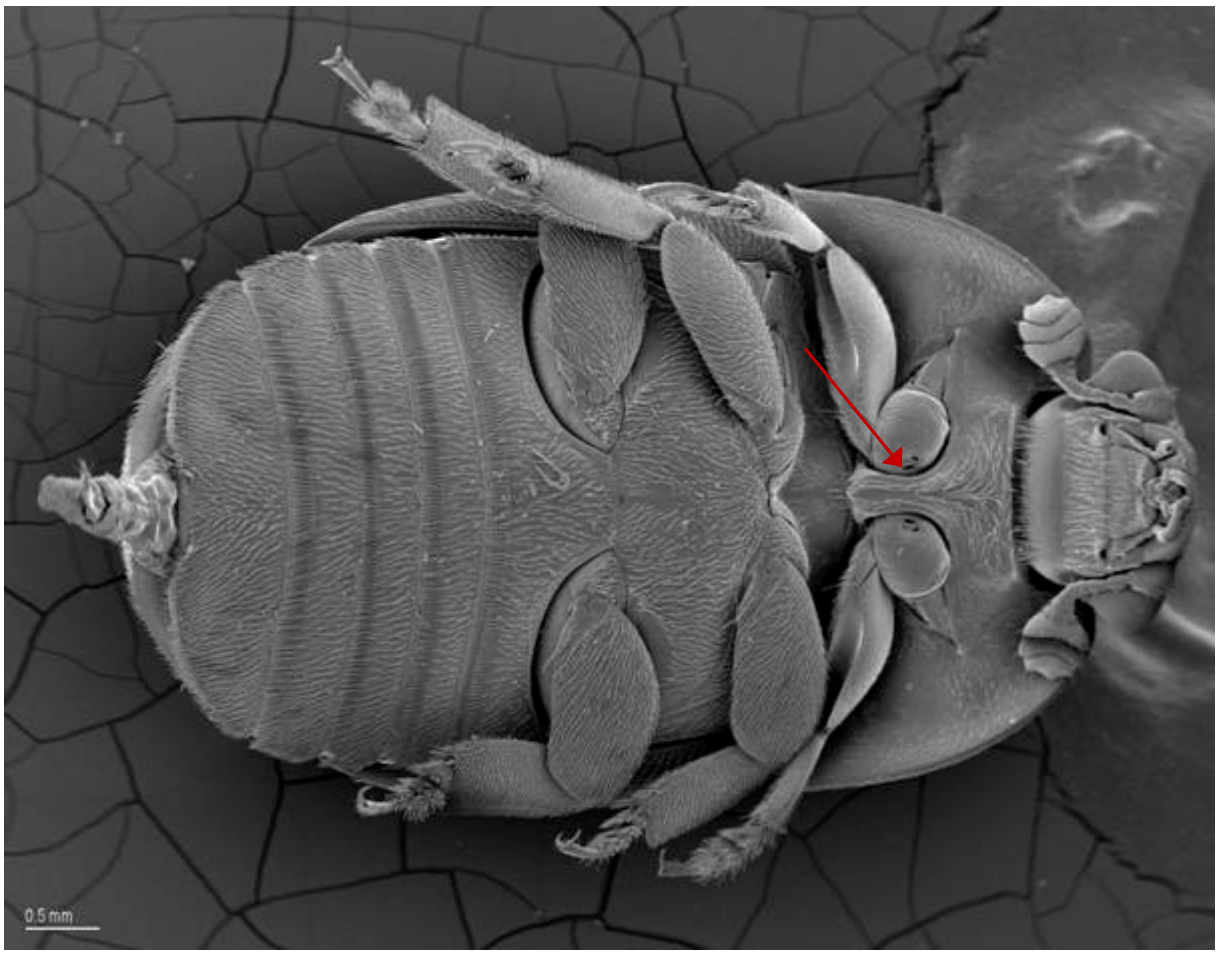



**Abb. 28: Ventralaufsicht eines *A. tumida* Weibchens (x 100) mit ausgefahrenem Ovipositor. Sichtbar auch hier die große Körperöffnung an der Coxa des ersten Laufbeinpaars (roter Pfeil).**

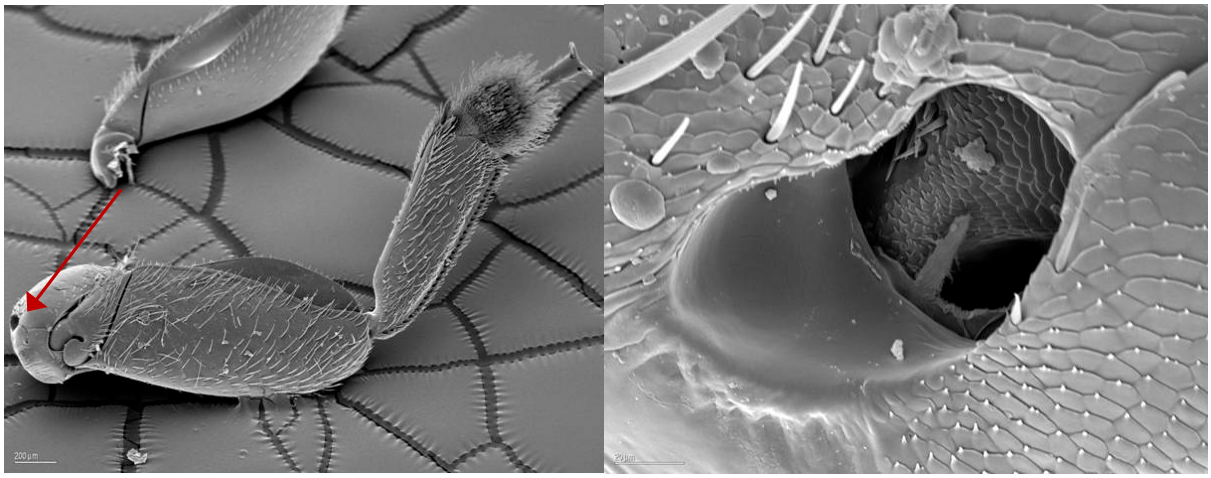


**Abb. 29: Aufnahmen der Coxa des ersten Laufbeinpaars mit großer Öffnung ins Beininnere. Gesamtansicht (rechts, x200, roter Pfeil) des Beins und Nahaufnahmen der Öffnung (links x2000).**

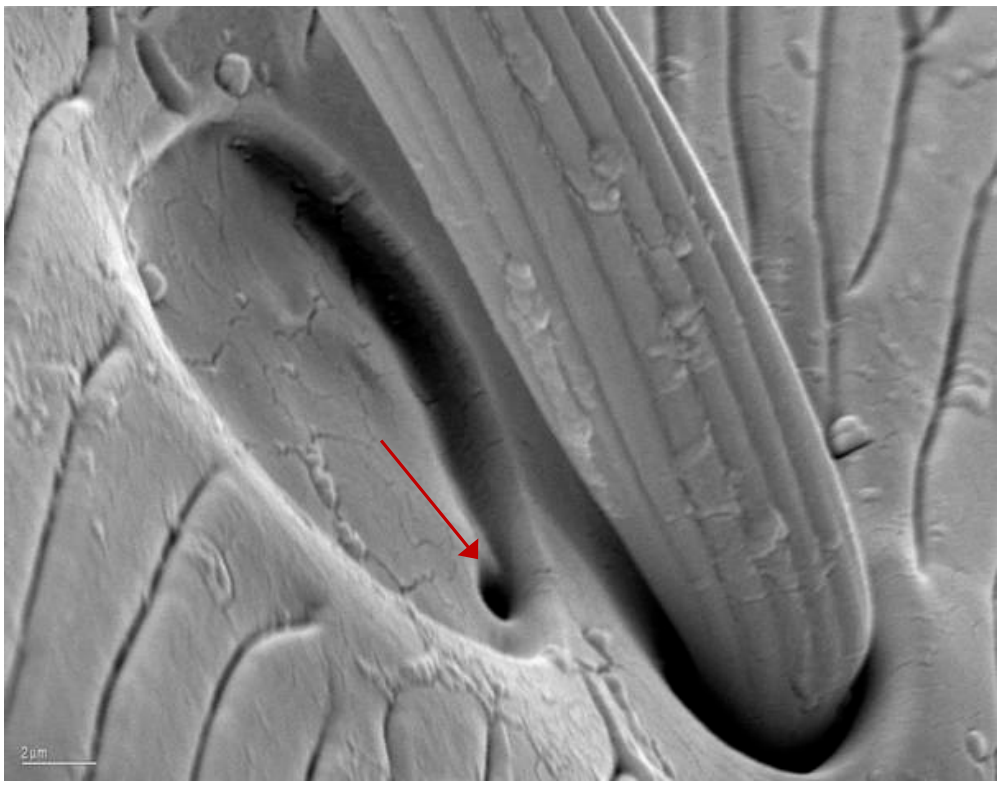



**Abb. 30: Nahaufnahmen der Elytren eines Weibchens (x2000; dorsal). Chaeta und distal davon liegendes Feld mit Öffnung Pore (roter Pfeil).**

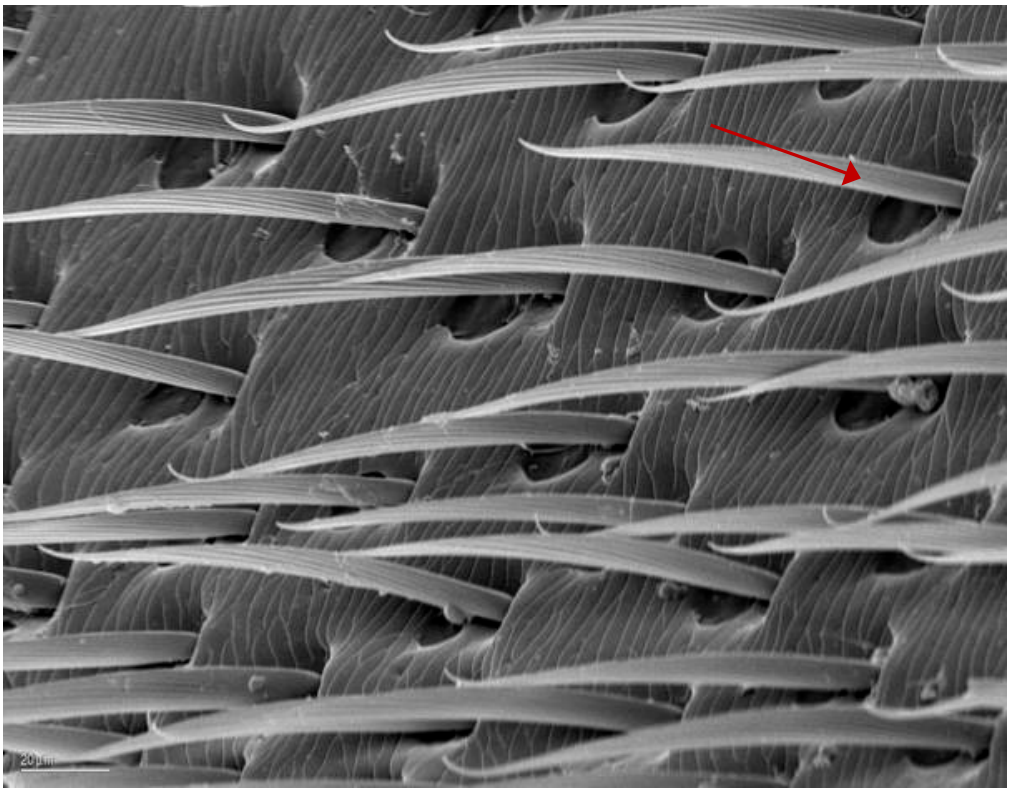



**Abb. 31: Zahlreiche Haare (Chaetae) mit den davor liegenden potentiellen Drüsenfeldern auf den letzten Abdomengliedern. Der Pfeil markiert eines dieser Felder (x 500).**

## *3.4 Diskussion*

Durch unsere Beobachtungen konnte eine feste Abfolge von Verhaltensweisen vor und während der Kopulation identifiziert werden, in die andere Käfer, meist Weibchen, häufig störend eingreifen. Die sexuelle Aktivität setzt ungefähr ab dem Alter von zwei Wochen nach dem Schlupf aus der Erde ein. Eine ungewöhnliche Besonderheit des Paarungsverhaltens des Kleinen Beutenkäfers wurde beim Vergleich der Kopulationen von Einzelpaaren und Paaren in Aggregation offengelegt: Die Kleinen Beutenkäfer kopulieren fast ausschließlich in Aggregation. Einzelpaare kopulieren nur sehr selten oder gar nicht.

Die Verhaltensweisen „Betrillern“, „Betasten“ und „Pronotum Betrillern“ vor der eigentlichen Kopulation sind sicherlich als Balzverhalten zu interpretieren. Dass die Männchen nach Störungen das Kopulationsverhalten bei „Pronotum Betrillern“ wieder aufnehmen, spricht dafür, dass es sich hier um Balzverhalten im klassischen Sinne handelt, welches das Weibchen gefügig machen soll. Bei den ersten zwei initial auftretenden Verhaltensweisen, dem „Betrillern“ und „Betasten“, könnte es sich zusätzlich um eine Art Auswahlverfahren handeln. Männchen brechen in der Hälfte aller Fälle nach diesen Verhaltensweisen (z. T. gefolgt von kurzem Auf- und Absteigen) das Kopulationsverhalten wieder ab und beginnen von neuem bei einem anderen Weibchen, bis sie sich für eines entscheiden. Eine naheliegende Erklärung für dieses Verhalten wäre, dass chemische Information über die Empfängnisbereitschaft des Weibchens, andere Geschlechtspartner oder sonstige für das Männchen entscheidende Faktoren gesammelt werden.

Verglichen mit vielen anderen Taxa handelt es sich beim Kleinen Beutekäfer um ein recht schwach ausgeprägtes Balzverhalten. Bei den verschiedensten Tiergruppen, wie Säugetieren, Vögeln, Molluscen und Insekten finden sich ausgeprägte Balzrituale oder Kämpfe zwischen den Männchen (Arnaud und Haubruge, 1999, Wyatt, 2003, Clutton-Brock, 2009, Rivers und Morin, 2009). Innerhalb der Insekten wären beispielsweise die aufwendigen Tänze der Wasserjungfern (Zygoptera), der Schmeißfliege oder die Kämpfe verschiedener gehörnter Käfer zu nennen (Franz, 2003, Clutton-Brock, 2009, Maklakov und Bonduriansky, 2009).

Bei Betrachtung der Sozialstruktur dieser Taxa stellt man fest, dass es sich meist um monogame Spezies oder Taxa mit nur wenigen Weibchen handelt, die erobert

werden müssen (Clutton-Brock, 2009, Maklakov und Bonduriansky, 2009, Arnaud und Haubruge, 1999). In Aggregation lebende, polygame Taxa wie *A. tumida* können dieses kostenaufwendige Verhalten reduzieren. Wenn ein Weibchen erfolglos bebalzt wird, stehen weitere Weibchen zur Verfügung (Clutton-Brock, 2009). Viele andere polygame Spezies, wie z. B. Stabheuschrecken *Timema sp.*, Mehlkäfer *Trifolium castaneum* oder Samenkäfer *Callosobruchus maculatus* zeigen ein ähnlich reduziertes Balzverhalten (Arnaud und Haubruge, 1999, Bloch Qazi, 2003, Arbuthnott und Crespi, 2009, Maklakov und Bonduriansky, 2009, Rivers und Morin, 2009).

Eine andere Erklärung wäre, dass es sich bei vielen polygamen Arten, wie dem Kleinen Beutenkäfern, um eine Art mit „cryptic female choice“ Mechanismen handelt und der Erfolg des Balzverhaltens nicht an dem Stattfinden der Kopulation, sondern an der nachfolgenden Befruchtung der Eier gemessen werden sollte. In diesem Fall könnte das Verhalten des Männchens während der Begattung besonders wichtig sein. Eberhard (1997) postulierte daher am Beispiel zahlreicher Insekten und Arachnidenarten, dass der Begriff des Balzverhaltens neu überdacht werden sollte und bei vielen Arten während der Kopulation stattfindendes Balzverhalten existiert. Das Männchen stimuliert hierbei durch spezifisches Verhalten das Weibchen während der Kopulation und fördert so die Befruchtung der Eier durch seinen Samen. Das stereotype „Tarsenreiben-Elytren“ könnte dieses Kriterium erfüllen.

Weitere Hinweise auf „cryptic female choice“ Mechanismen sind das ungewöhnlich aggressive Verhalten der Weibchen und die lange Zeit, die ein Männchen häufig auf dem Rücken eines Weibchens verbringt. Bei den Chrysomelidae verweilt das Männchen, ähnlich wie bei dem Kleinen Beutenkäfer, lange auf dem Rücken des Weibchens und kopulierten wiederholt mit ihm. Hier konnten interne Strukturen bei den Weibchen identifiziert werden, die möglicherweise regulieren, wie viel Spermien die Weibchen von einem Männchen aufnehmen (Dickinson, 1997). Ebenso wehren sie sich mit verschiedenen Strategien gegen die Befruchtung ihrer Eier durch unerwünschte Männchen (Eberhard, 1997). Bei der Flucht der Beutenkäferweibchen vor manchen Männchen könnte es sich um eine ähnliche Strategie auf Verhaltensebene handeln.

Würde es sich um eine „sperm precedence“ Strategie handeln, wäre ein Konkurrenzkampf zwischen den Männchen zu erwarten. Fast ein Drittel der Kopulationen wurden aber durch „stoßende“ Weibchen unterbrochen. Weibchen

„stoßen“ häufiger als Männchen und häufiger das eigene Geschlecht. In der Regel findet Aggression und Konkurrenzverhalten zwischen Weibchen nur um limitierte Nahrungsressourcen satt (Brown et al., 1997). Reichlich vorhandene Nahrungsressourcen führen, wie bei dem Kleinen Beutenkäfer, zur Aggregation, jedoch in der Regel ohne aggressives Verhalten (Brown et al., 1997). Ein Konkurrenzkampf zwischen Weibchen um geeignete Geschlechtspartner wäre während der Kopulation zu erwarten, dem Moment, in dem die Spermien des Männchens empfangen werden (Brown et al., 1997). Bei den Weibchen des Kleinen Beutenkäfers ist dies tatsächlich der Fall. Unter den wenigen weiteren Beispielen für den Kampf um Geschlechtspartner zwischen Weibchen wären die im Harem lebenden Zoroptera Weibchen, *Zorotypus gurneyi* zu nennen: Auch sie attackieren beim Wettkampf um das einzige Männchen kopulierende Paare (Choe, 1997). Ein anderes Beispiel sind Hummerweibchen und soziale Insekten, die durch Pheromone die Empfängnisbereitschaft oder sexuelle Reife ihrer Konkurrentinnen sabotieren (Brown et al., 1997). Bei *T. castaneum* wurde festgestellt, dass wesentlich weniger Spermien übertragen werden, wenn eine Kopulation durch äußere Eingriffe abgebrochen wird. Das Maximum an Spermien wird wiederum übertragen, wenn sich das Weibchen während einer störungslosen Kopulation ruhig verhält und nicht bewegt (Bloch Qazi, 2003). Falls bei *A. tumida* Weibchen ähnliche Mechanismen existieren, könnten sie die Anzahl Spermien, die ihre Konkurrentinnen aufnehmen, durch direktes Eingreifen reduzieren und durch ihr ruhiges und bewegungsloses Verhalten während der Kopulation die Befruchtung ihrer Eier fördern. Für eine aktive Einflussnahme auf das Kopulationsverhalten spricht bei den beobachteten Einzelpaaren, dass die Weibchen die paarungsunwilligen Männchen intensiv „Betrillern“, „Betasten“, das „Pronotum Betrillern“ und „Besteigen“. Inzwischen wurde bei morphologischen Untersuchungen der Ovariolen der Kleinen Beutenkäfer Weibchen Ovariolen mit einer Spermatheka identifiziert, womit die Grundvoraussetzungen für die „cryptic female choice“ Strategie erfüllt sind (Löwe et al., 2012).

Die einmalig gegen Ende der Kopulation auftretende Verhaltensweise „Wippen“. Die Tatsache, dass dieses Verhalten nur auftritt, wenn ein Männchen ohne Störung zum „Kopulationsende“ kommt, könnte darauf hinweisen, dass das Männchen seine Spermatophoren nun vollständig entleert hat. Eine andere Möglichkeit ist, dass das Männchen mit dieser Verhaltensweise mechanisch die Befruchtung von Eiern mit

seinen Spermien fördert oder für nachfolgende Männchen selbiges erschwert. Es findet sich eine Vielzahl von Beispielen für derartige Anpassungen. So klopft beispielsweise das Männchen der Fliege *Dryomyza anilis* am Ende der Kopulation rhythmisch auf die Genitalien des Weibchens und beeinflusst so den Speicherort seiner Spermien und wie viel Eier durch sie befruchtet werden (Otronen, 1997).

Bei der Betrachtung dieser ständig „betastet“ und „betrillerten“ Regionen, den Elytren und dem Genitaltrakt, fanden sich tatsächlich interessante Strukturen. Auffällig sind beim Vergleich anderer REM Aufnahmen des Exoskeletts und der Elytren anderer Insekten (z. B. http://www.geller-grimm.de/morph/morph09.htm oder Wagner et al., 1996) oder Coleoptera (Kim et al., 1999, Turco et al., 2003, Moon et al., 2008, Stavenga et al., 2011, Martins et al., 2012, Sun et al., 2012) die hohe Dichte der Chaetae und die große Öffnung ins Körperinnere auf der Coxa des ersten Laufbeinpaars. Chaetae sind in der Regel an Mechano- oder Chemosensillen, geknüpft (Müller, 1997). Vor jeder Chaeta (Sensille im Folgenden) fand sich jeweils ein ovales Feld mit einer Pore, es wäre somit möglich, dass die Elytren beim Kleinen Beutenkäfer sensorische und sekretorische Funktionen erfüllen. Zweipunktmarienkäfer Männchen können allein durch Dummies mit aufgeklebten Elytren zur Kopulation bewegt werden (Hemptinne et al., 1998). In die große Öffnung an der Coxa könnten mehrere Drüsen in eine große Öffnung münden, wodurch beim Laufen der Boden mit Duftstoffen markiert werden könnte. Für eine Abgabe von Pheromonen über die Laufbeine sprechen die positiven Biotests mit belaufenen Filterpapieren und auf Verhaltensebene das permanente „Beine Reiben“ der Kleinen Beutenkäfer. Chemotaktisch wirkende Pheromone werden häufig mechanisch, durch Putzen und ähnliche Verhaltensweisen, weiterverteilt (Turco et al., 2003). Turco et al. (2003) fanden bei REM Aufnahmen verschiedener Melionidae ebenfalls eine Übereinstimmung zwischen hoher Sensillendichte und Regionen der Köperoberfläche, die häufig in Verhaltensinteraktionen involviert sind. Die sexuell dimorphen Melionidae putzen sich gegenseitig als Teil des Sexualverhaltens, entsprechend waren die Antennen, Tibiae und Maxillarpalpen auffällig (Turco et al., 2003). Auf den besonders stark involvierten Maxillarpalpen fand sich eine sekretorische Region mit besonders vielen Poren und weitere Poren auf der Tibia, wo beispielsweise bei dem Kleinen Beutenkäfer keine Poren gefunden wurden. Bei dem Kleinen Beutenkäfer könnte ganz ähnlich durch „Tarsenreiben-Elytren“ Information

aufgenommen und durch „Tarsenreiben-Mandibeln“ an die Sensillen an den Antennen und die Organen der Mundwerkzeuge weiter gegeben werden.
Die Übereinstimmung der gefundenen Strukturen mit den Regionen, an denen Verhaltensinteraktionen stattfinden, sind ein erster Hinweis auf den Ort von Drüsenausgängen. Zur Klärung dieses Sachverhalts wären jedoch weitere morphologische und physiologische Untersuchungen notwendig.
Das bei dem Vergleich von Einzelpaaren und Paaren in Aggregation festgestellte, verspätet einsetzende Sexualverhalten deckt sich gut mit den Ergebnissen des Präferenztests und des Filterpapiertests mit kontaminierten Filtern. Alles deutet darauf hin, dass Weibchen nur während einer bestimmten Zeit ein Sexualpheromon abgeben. Die Weibchen müssen in der paarungs- und möglicherweise empfängnis-bereiten Zeit auf sich aufmerksam machen, um attraktiver als Männchen oder andere Weibchen zu sein. Durch den temporären Ausstoß von einem Sexualpheromon wären Weibchen in der nicht-paarungsbereiten Zeit oder, wenn sie genügend Spermien gesammelt haben, geschützt. Heterosexuelle Kopulationen sind für Weibchen sehr kostenintensiv (den Hollander und Gwynne, 2009, Maklakov und Bonduriansky, 2009), weswegen das Einstellen der Pheromonabgabe ab einem bestimmten Alter sinnvoll ist. Mit diesem verzögert einsetzenden Sexualverhalten reihen sich die Kleinen Beutenkäfer bei anderen polygamen und aggregationsbildenden Taxa ein, die nach dem Schlupf Zeit benötigen, um andere Artgenossen zu finden (Arnaud und Haubruge, 1999, Latty et al., 2009). Dem gegenüber stehen viele monogame Arten, bei denen es schon kurz nach dem Schlupf zur Kopulation kommt (Arnaud und Haubruge, 1999, Latty et al., 2009).
Dass das Reproduktionsverhalten nur ab einer gewissen Anzahl Käfer in Aggregation stattfindet, kann als gute Adaption an das Leben im Bienenstock betrachtet werden. Die Kleinen Beutenkäfer haben nur in ausreichender Zahl, also durch Massenvermehrung und durch Kollaps oder „absconding“ ihres Honigbienenwirtes eine Chance sich im Stock zu reproduzieren, ähnlich den schon erwähnten baumschädigenden Borkenkäferarten (siehe Kapitel 2). Die Eier und Larven von einzelnen Paaren würden mit Sicherheit von den Bienen ausgeräumt und Kopulationen zwischen einzelnen Paaren wären somit für die Käfer Energieverschwendung. Zusätzlich könnte dieses Verhalten der Synchronisierung der Reproduktion dienen und damit die Massenvermehrung fördern. Ähnliches findet sich

bei der Wanderheuschrecke *Schistocerca gregaria*, die als Nymphe solitär lebt und als Imagines in riesigen Aggregationen und Schwärmen ganze Landstriche zerstören kann (Hassanali und Torto, 1999). Hier wird die Synchronisierung der Reproduktion einer ganzen Population dadurch erreicht, dass das Aggregationspheromon der Nymphen die sexuelle Reife aller Stadien inhibiert, wohingegen das Aggregationspheromon der Adulti diese fördert (Hassanali und Torto, 1999).

Eine Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass die richtige Konzentration des Pheromons zum Auslösen des Sexualverhaltens erst durch eine gewisse Anzahl an Käfer erreicht wird. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Sexualverhalten taktil, also durch die Berührung mit zahlreichen Artgenossen ausgelöst wird. Hierfür könnten die bei sehr jungen Männchen nur kurzzeitig auftretenden, homosexuellen Kopulationen sprechen. Das Sexualverhalten wird durch die intensive Berührung beim Zusammenwerfen in der Petrischale kurzzeitig ausgelöst, bricht aber sofort wieder ab, da die sexuelle Reife noch nicht erreicht ist. Pheromone spielen in diesem System sicherlich eine wichtige Rolle. Es könnte jedoch gut sein, dass zusätzlich ein Schlüsselreiz auf Verhaltens- oder taktiler Ebene benötigt wird um das Sexualverhalten zu induzieren.

Die Untersuchungen zum homosexuellen Verhalten unterstreichen wiederum die Rolle der chemischen Kommunikation. Zwei Monate alte Männchen waren in Aggregation immer noch sexuell hochaktiv, kopulierten aber vermehrt mit anderen Männchen. Über die Bedeutung von homosexuellem Verhalten wurde viel spekuliert und einige der möglichen Vorteile, wie z. B. die Schädigung anderer Männchen oder der passiven Übertragung des eigenen Samens, untersucht (Scharf und Martin, 2013). Die Kosten sind vor allem bei Männchen mindestens so hoch wie heterosexuelle Interaktionen (Maklakov und Bonduriansky, 2009). Scharf und Martin (2013) verglichen 109 Studien zu homosexuellem Verhalten bei Insekten. Sie kamen zum Schluss, dass bei einem Großteil der Fälle (87) die schon häufiger diskutierte (Harari et al., 2000, Levan et al., 2009) „lack of recognition“ Theorie am wahrscheinlichsten ist. Diese besagt, dass Männchen vieler Arten Weibchen und Männchen einfach nicht unterscheiden können und es deshalb zu Fehlpaarungen kommt. Die Männchen des Kleinen Beutenkäfers kopulieren nur im Alter von zwei bis drei Wochen signifikant häufiger mit Weibchen. Dies spricht für eine

Sexualpheromonabgabe von Weibchen in diesem Alter und das Unvermögen Weibchen und Männchen in den anderen Altersstufen unterscheiden zu können.

Das häufig beobachte, aber nicht näher untersuchte homosexuelle Verhalten der Weibchen ist schwieriger zu erklären. Möglich wäre die von Harari et. al (2000) postulierte und bei *Diaprepes abbreviatus* durch vergleichende Experimente bestätigte Theorie, dass Weibchen so versuchen, sich attraktiver für das andere Geschlecht zu machen. Sie imitieren ein kopulierendes Paar und erregen so die Aufmerksamkeit der Männchen. Bei *D. abbreviatus* handelt es sich um große, Aggregationen bildende Rüsselkäfer, bei denen, wie bei *A. tumida*, häufig kopulierende Paare mit einem dritten Männchen zu finden sind. Es existieren wesentlich weniger Studien zu diesem Thema und die Mechanismen sind schwieriger zu erklären. Eine genauere Untersuchung wäre beim Kleinen Beutenkäfer sehr interessant, da Weibchen sich sogar gegenseitig bebalzen, worüber Berichte bei anderen Insektenarten bisher fehlen (Scharf und Martin, 2013).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser etho- und morphologischen Untersuchungen die Annahme einer chemotaktischen Kommunikation beim Kleinen Beutenkäfer stützen. Sexualpheromone werden von Weibchen vermutlich in einem bestimmten Alter abgegeben und das Sexualverhalten entweder durch die Kombination mit Aggregationspheromonen oder Thigmotaxis oder beidem ausgelöst.

# 4 Die Reproduktionsstrategie des Kleinen Beutenkäfers und ihr Einfluss auf die praktische Bienenhaltung

## *4.1 Einleitung*

Die erfolgreiche Ausbreitung des Kleinen Beutenkäfers innerhalb kurzer Zeit ist vermutlich auf das Zusammenspiel verschiedener Faktoren zurückzuführen. Nach der Einschleppung des Parasiten beschleunigte der Mensch die Verbreitung über große Distanzen durch Wanderimkerei und eine Etablierung der Populationen durch die in den USA und z. T. auch Australien typische Imkerei mit hoher Kolonienzahl (tausende) und riesigen Lagerhallen (Neumann and Elzen, 2004). Die europäischen Bienenrassen in den neuen Verbreitungsgebieten sind anfälliger, da ihnen verhaltensphysiologische Abwehrmechanismen, wie das „absconding“ der afrikanischen Bienen fehlen (siehe Einleitung Kapitel 1; Elzen et al., 2001, Neumann und Härtel, 2003) und die auf Massenvermehrung ausgelegte Reproduktionsstrategie des Kleinen Beutenkäfers fördert zusätzlich eine Etablierung der lokalen Gesamtpopulation. Es gelingt den Käfern nicht immer, sich innerhalb eines Bienenvolkes fortzupflanzen und somit ein Volk zu überwältigen. Sind sie jedoch hierbei erfolgreich, führt dieses eine Ereignis zu einem enormen Populationszuwachs mit Tausenden von Käfern, die sich rasch ausbreiten können.

Diese Reproduktionsstrategie ist auch wichtig bei der Betrachtung der Pathologie. Eine Wirtsschädigung tritt nur bei einem Befall mit Larven auf, also nach erfolgreicher Fortpflanzung der Käfer. Es ist somit also sowohl für die natürliche Honigbienenpopulation als auch für die Imkerei wichtig, solche Massenreproduktionen weitgehend zu verhindern. Im folgenden Versuch sollte daher untersucht werden, inwieweit die Reproduktionsstrategie des Kleinen Beutenkäfers Einfluss auf praktische Bienenhaltung haben kann. Eine einfache und grundsätzliche Frage hierbei ist, ob die Stärke eines Bienenvolkes den Reproduktionserfolg des Käfers beeinflusst. Es erscheint naheliegend, dass kleinere Völker mit weniger Bienen anfälliger gegenüber *A. tumida* sind als starke Völker. Kleinvölker kommen zwar in der Natur kaum vor und sind für die Honigwirtschaft nicht von Bedeutung, werden

aber häufig zur Völkervermehrung (Liebig, 2000), in der Landwirtschaft zur Bestäubung (Keasar et al., 2007) und als Begattungseinheiten für die Königinnenzucht (Laidlaw und Page, 1998) verwendet. Tatsächlich konnten bei einem Gespräch mit einem Imker (Tim Malfroy) in Richmond Klagen über die erhöhte Anfälligkeit von Kleinvölkern (Begattungskästchen, Ableger) vernommen werden und ein ähnlicher Bericht fand sich auch in der dortigen lokalen Zeitung (Anonymus, 2005).

Um die Hypothese einer stärkeren Gefährdung von Kleinstvölkern im Vergleich zu starken so genannten Wirtschaftsvölkern wissenschaftlich zu untersuchen, wurden Ableger aus gesunden, kräftigen Wirtschaftsvölkern gebildet und nach einer vierwöchigen Versuchsperiode der Befall und der Gesundheitszustand der Wirtschaftsvölker und Ableger verglichen. Das Untersuchungsgebiet in Richmond, NSW eignete sich dabei ideal für diese Fragestellung. Es handelt sich um eine Region mit moderatem Befallsdruck, bei dem die Imker zwar unter der Präsenz des Käfers leiden und immer wieder Verluste zu vermelden haben, es jedoch nicht wie in anderen feucht-heißen Regionen zum massenhaften Zusammenbruch von Bienenvölkern kommt. Eine Region mit moderatem Befallsdruck bietet im Gegensatz zu Gebieten mit sehr geringem oder sehr hohen Befallszahlen die Möglichkeit, dass in einzelnen Völkern die Schadensschwelle durch die Vermehrung des Käfers überschritten wird, es aber nicht zu flächendeckenden Schäden oder häufigen Zusammenbrüchen bei den Bienenvölkern kommt.

## *4.2 Material und Methoden*

### *4.2.1 Untersuchungsgebiet*

Die Untersuchung wurde im Hawkesbury District, Richmond New South Wales (NSW) durchgeführt. Vermutlich wurde der Kleine Beutenkäfer 2002 in dieser Gegend eingeschleppt (Gillespie et al., 2003). Heute findet sich dort eine stabile Beutenkäferpopulation mit moderatem Invasionsdruck (Spiewok et al., 2008). Die 48 Versuchsvölker wurden gleichmäßig auf dem Apiary des Hawkesbury Campus und einem zweiten 3 km davon entfernten Apiary (Gretchen's Apiary) verteilt. Trachtbedingungen und Klima waren an beiden Standorten nahezu identisch.

### *4.2.2 Ablegerbildung und Versuchsgruppen*

Es wurden zwei Gruppen á 24 Völkern in Langstrothbeuten gebildet: In der ersten Gruppe wurden vor der Ablegerbildung alle Käfer aus dem ursprünglichen Volk mit Hilfe eines Exhaustors abgesammelt, in der zweiten Gruppe, wurden keine Käfer abgesammelt. Es sollten hiermit optimale (käferfreie) und weniger optimale Ausgangsbedingungen für die Ableger imitiert werden. Dies sollte Hinweise geben, inwieweit der ursprüngliche Befall des Volkes oder Neuinfektion mit dem Kleinen Beutenkäfer ausschlaggebend für das Überleben des Ablegers ist.

Methodisch wurde hierbei nach Spiewok et al. (2007) vorgegangen: Als Erstes wurden der Deckel und die oberen Ecken und Kanten auf die Anwesenheit von Beutenkäfer untersucht, darauf die Honigwaben nacheinander entnommen, ebenfalls untersucht und in eine neue, leere, Beute versetzt. Abschließend wurde(n) die leere(n) Beute(n) und der Boden gründlich inspiziert. Alle detektierten Käfer wurden sofort mit dem Exhaustor aufgesaugt und alle Käfer eines Volkes nach der vollständigen Inspektion jeweils in eine Sammelbox gegeben und später gezählt. Bienen wurden bei diesem Prozedere nicht abgeschüttelt, um ein gleichzeitiges Abschütteln von Käfern zu vermeiden; bei dicht mit Bienen besetzten Waben wurden die Bienen durch leichtes Anpusten dazu bewegt, die Sicht auf die Waben frei zu geben. Nach diesem Absammeln der Käfer wurde aus jedem Volk ein Ableger bestehend aus einer Brut- und Honigwabe und ca. 1500 Bienen gebildet. Die alte Königin wurde aus dem Muttervolk abgesammelt und auch in den Ableger versetzt. Auf diese Weise sollten optimale Startbedingungen für den Ableger gewährleistet werden und zum Beutenkäferbefall konvergente Stressfaktoren, wie die Gewöhnung an eine neue Königin, minimiert werden. Muttervolk und Ableger wurden nebeneinander gestellt und diese Paare über das jeweilige Gelände verteilt (Abb. 32). Nach Ablauf der vierwöchigen Versuchsperiode wurden von allen Völkern die Käfer, wie zuvor beschrieben, abgesammelt und gezählt. Völker, die vor Ablauf der Versuchsperiode verendeten, wurden registriert und von dem Gelände entfernt. Noch intakte Völker mit Larven wurden gezählt und in die Auswertung miteinbezogen.

**Abb. 32: Ein Wirtschaftsvolk mit dem daraus gebildeten und daneben platzierten Ableger auf einem unserer Versuchsgelände. Foto: S. Spiewok**

### *4.2.3 Statistische Analyse*

Da eine Normalverteilung der Daten nicht bestätigt werden konnte (Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk Test), wurde die Anzahl Käfer der verschiedenen Gruppen mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test auf signifikante Unterschiede verglichen. Eingegangene Völker wurden nicht in die statistische Analyse miteinbezogen. Für den Vergleich der Befallszahlen von Wirtschaftsvölkern und Ableger wurde der Wilcoxon Matched-Pairs Test verwendet, da eine Korrelation der Befallszahlen von Ablegern und ihrem jeweiligen Muttervolk nahe liegt. Die Unterschiede in der Symptomatik (keine offensichtliche Schädigung, Anwesenheit von Käferlarven in einer noch lebenden Kolonie und verendete Völker) zwischen Ablegern und Muttervölkern wurde mit dem Pearsons $\chi^2$-Test (df = 2) verglichen. Für die Analyse wurde die Software SPSS Statistics 17.0 verwendet.

## 4.3 Ergebnisse

### 4.3.1 Käferbefall

Alle Versuchsvölker waren nach der vierwöchigen Versuchsperiode mit Käfern befallen. Die Anzahl Käfer pro Volk schwankte zwischen fünf und 89 Käfern pro Volk mit Ausnahme eines stark befallenen Volkes (n = 306) in der Testgruppe. Der Befall dieses Volkes wurde als Ausreißer nicht in den statistischen Vergleich (Mann-Whitney U–Test) der Gruppen miteinbezogen. Mittelwert und Standardabweichung der Befallszahlen aller Gruppen sind in Abb. 33 dargestellt, der Befall aller Völker im Einzelnen findet sich im Anhang (Tab. III). Der initiale Befall der Käfer in den zwölf Völkern der Gruppe mit vorherigem Absammeln der Käfer schwankte zwischen 28 und 224 Käfern ($\bar{x}$ = 80 ± 54).

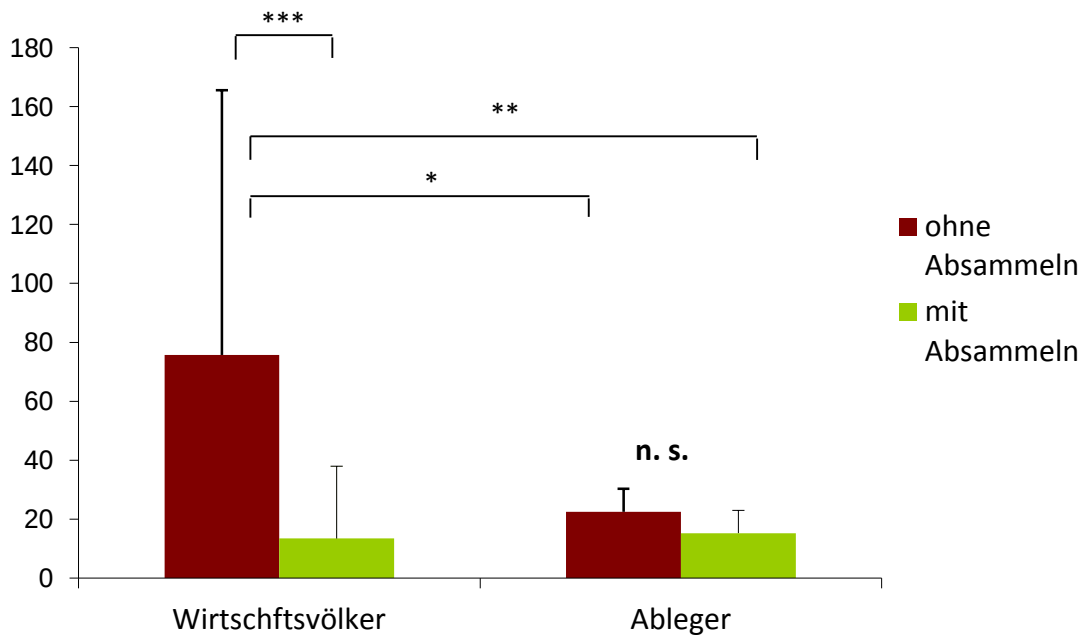



**Abb. 33: Mittlere Befallszahlen (± S.D.) bei Ablegern und Wirtschaftsvölkern in den Versuchsgruppen mit oder ohne vorheriges Absammeln der Käfer. *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001, Mann-Whitney U-Test.**

Unterschiede fanden sich beim Vergleich der Befallszahlen der beiden Gruppen und zwischen Ablegern und Wirtschaftsvölkern: Die Wirtschaftsvölker aus der Gruppe ohne vorheriges Absammeln der Käfer waren hochsignifikant mit mehr Käfern befallen als Wirtschaftsvölker mit vorherigem Absammeln (Abb. 33). Signifikant war auch der Unterschied zu den beiden Ablegergruppen mit und ohne vorheriges

Absammeln der Käfer (Abb. 33). Der Unterschied beim Gruppenvergleich der Ableger (Abb. 33) und der Vergleich der Befallszahlen von Ablegern und ihrem jeweiligen Muttervolk waren nicht signifikant ($p < 0,05$; Wilcoxon Matched-Pairs Test).

### *4.3.2 Reproduktion der Käfer bei Ablegern und Wirtschaftsvölkern*

Das Auftreten von Käferreproduktion und Befallssymptomatik wurde beschrieben, wobei zwischen dem Auftreten von Larven in einem (noch) intakten Volk (Larvenbefall), und dem kompletten Zusammenbruch eines Volkes in Verbindung mit starkem Larvenbefall (n Larven > 100) unterschieden wurde. Eine Reproduktion der Käfer konnte nur bei Ablegern, nicht bei den Wirtschaftsvölkern nachgewiesen werden. Es überlebten alle Wirtschaftsvölker und es fand sich auch in keinem einzigen dieser Völker Befall mit Larven (ohne Zusammenbruch). Im Gegensatz hierzu gelang es den Käfern nachweislich, sich in zwölf der 24 Ablegern zu vermehren: In sieben Ablegern fanden sich Käferlarven, fünf davon in der Gruppe ohne vorheriges Absammeln zwei in der Gruppe mit vorherigem Absammeln der Käfer. Alle Larven waren am Ende ihres Entwicklungszyklus im Wanderlarvenstadium oder eine Häutung davor. Fünf weitere Ableger überlebten auf Grund des starken Befalls mit Larven nicht bis zum Ende der Versuchsperiode, zwei davon in der Gruppe ohne vorheriges Absammeln, drei in der Gruppe mit vorherigem Absammeln der Käfer.

Der Vergleich der Reproduktionsereignisse zwischen Ablegern und Wirtschaftsvölkern ergibt unabhängig von Gruppe und Ort einen hochsignifikanten Unterschied ($\chi^2 = 16,0$; $p < 0,0001$). Beim Vergleich zwischen Ablegern und Wirtschaftsvölkern innerhalb der Orte oder Gruppen ergab sich ein Unterschied zwischen $p < 0,05$ (Gruppe mit vorherigem Absammeln der Käfer; Gretchen's Apiary; $\chi^2 = 6,3$) und $p < 0,01$ (Gruppe ohne vorheriges Absammeln; Hawkesbury Apiary; $\chi^2 = 9,9$). Die Verteilung der einzelnen Reproduktionsereignisse der Ableger und Wirtschaftsvölker sind unabhängig von Ort und Gruppe in Abbildung 32 dargestellt.

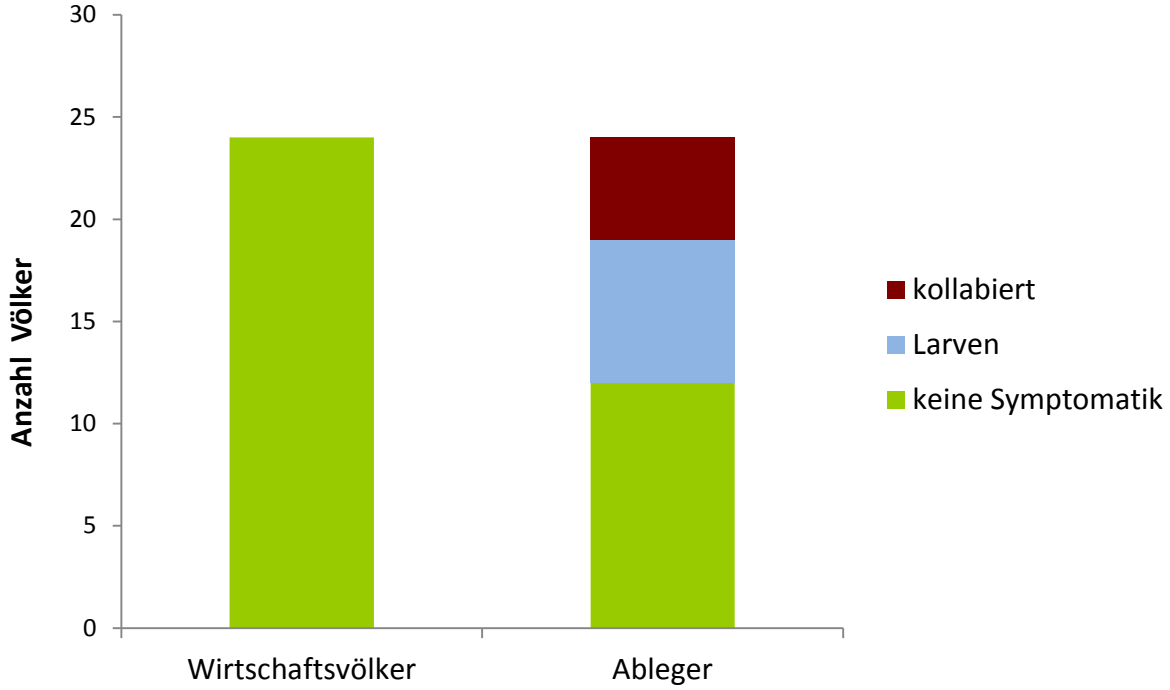



**Abb. 34: Symptomatik des Kleinen Beutenkäferbefalls bei Wirtschaftsvölkern und Ablegern, unabhängig von Ort und Gruppe.**

## *4.4 Diskussion*

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass Kleinstvölker und Ableger tatsächlich anfälliger gegenüber dem Kleinen Beutenkäfer sind. Dabei unterschieden sich Ableger und Wirtschaftsvölker zwar nicht signifikant in ihren Befallszahlen, Käferreproduktion und die damit verbundene Schädigung der Völker trat jedoch nur bei Ablegern auf.

Fünf Ableger kollabierten noch vor Versuchende und in sieben weiteren konnten Larven nachgewiesen werden. Aus dem Entwicklungsstadium der Larven lässt sich schließen, dass die Eier ein bis zwei Wochen nach Versuchsbeginn gelegt wurden, bei den kollabierten Völkern vermutlich schon früher. Das Auftreten von Larven in größerer Zahl in einem noch intakten Volk stellt möglicherweise ein Befallslevel zwischen Koexistenz und Schädigung dar, welches bei Wirtschaftsvölkern nur selten nachzuweisen ist. Intakten, kräftigen Völkern gelingt es normalerweise lange Zeit Larven und Eier zu entfernen. Larven sind lediglich in sehr frühen Stadien im Gemüll zu finden (Spiewok und Neumann, 2006a). Kippt der Befall mit Imagines zur

Schädigung durch Larven, scheint sich dies derart schnell zu vollziehen, dass man meist erst das kollabierte Volk mit Larvenmassen und verschleimten Waben findet. Im Allgemeinen passiert dies bei intakten Wirtschaftsvölkern nur bei sehr hohem Käferbefall, wie er vor allem in feucht-heißen Regionen, wie z. B. in Florida oder einigen Regionen der australischen Ostküste vorkommt (Elzen et al., 1999, Ellis et al., 2003b, Spiewok et al., 2007) oder nach stark invasiven Eingriffen durch den Imker, wenn die Völker empfindlicher gegenüber Parasiten und anderen Krankheitserregern sind (Hood, 2004). Bei unserem Versuch mit einem vergleichsweise geringen Befallsdruck konnte keine Korrelation zwischen den Käfer- und Larvenzahlen nachgewiesen werden. Dass die Ovipositionsrate nicht direkt mit der Anzahl der Käferweibchen korreliert ist, stellten aber auch Ellis und Delaplane (2008b) in einem Versuch fest.

Naheliegend ist, dass es den Bienen in Ablegern auf Grund ihrer geringeren Zahl, schlechter gelingt, effektiv Larven und Eier auszuräumen. Afrikanische Honigbienen eines Wirtschaftsvolkes können beispielsweise bis zu 300 Larven innerhalb eines Tages entfernen (Spiewok und Neumann, 2006b). Das Käfer-Bienenverhältnis ist bei Ablegern wesentlich ungünstiger, weswegen einzelne Bienen relativ gesehen mehr Brut versorgen müssen als Bienen in starken Völkern. Die Arbeiterinnen sind daher zu sehr von à priori Aufgaben, wie Futtersuche und Aufzucht der Brut, eingenommen, um ausreichend Wächterbienen zu rekrutieren und es gelingt ihnen schlechter die Reproduktion der Käfer zu verhindern. Dies ermöglicht eine langsame Übernahme des Volkes durch den Parasiten, wofür auch spricht, dass es den Larven in den Ablegern gelang, bis zum Ende ihres Entwicklungszyklus zu kommen, ohne entfernt zu werden.

Die Befallszahlen in der Gruppe mit vorherigem Absammeln unterschieden sich kaum zwischen Wirtschaftsvölkern und Ablegern. Damit wird die schnelle Reinfestierung käferfreier Völker mit Beutenkäfer Imagines auch in Regionen mit moderatem Befallsdruck bestätigt. Dies, ebenso wie die hohe Variation der Befallszahlen zwischen den Völkern (6-89, inklusive eines Ausreißer mit 306 Käfern pro Volk), ist konform mit den Ergebnissen vorheriger Studien (Spiewok et al., 2007, Spiewok et al., 2008) in derselben Region. Der signifikante Unterschied der Befallszahlen zwischen den Gruppen zeigt, dass trotz dem Auftreten von Reinvasion vier Wochen offensichtlich nicht ausreichten, um in der käferfreien Gruppe eine gleich hohe

Käferpopulation zu etablieren wie in den Völkern ohne Absammeln der Käfer. Der fehlende Unterschied im Befall zwischen den Ablegern und ihrem ursprünglichen Muttervolk, aus dem sie gebildet wurden, zeigt, dass Käfer vom Muttervolk auf die Ableger übertragen wurden.

Die Wirtschaftsvölker hatten eine z. T. zehnfach größere Bienenpopulation als die Ableger mit nur 1500 Bienen und dennoch ähnliche Befallszahlen. Dies deutet darauf hin, dass der Beutenkäferbefall und somit vermutlich auch die Attraktivität eines Volkes nicht mit Koloniestärke oder Größe korreliert ist. Andere Autoren kamen bei der Untersuchung von Befallszahlen verschiedener Kolonietypen (unterschiedliche Rassen und Königinnenstati) zu ähnlichen Schlussfolgerungen (Neumann und Elzen, 2004, Schäfer et al., 2008, Spiewok et al., 2008).

Das Level der Reinfestierung ist sicherlich das Resultat des Befallsdruckes innerhalb einer Region und der Verfügbarkeit von Futterressourcen (Spiewok et al., 2007). Die große Variation des Befalls zwischen den Völkern an einem Standort hängt neben Umwelteinflüssen wie Schatten oder Sonne (Arbogast et al., 2007, Arbogast et al., 2009) vermutlich von volkspezifischen Faktoren, wie attraktiven Stockdüften (Suazo et al., 2003, Torto et al., 2005) oder dem jeweiligen Abwehrverhalten eines Volkes ab (Elzen et al., 2001, Ellis et al., 2002c, Ellis et al., 2004c, Spiewok und Neumann, 2006).

Auf Grund unserer Ergebnisse kann für die imkerische Praxis die Empfehlung ausgesprochen werden, dass Ableger nur in *A. tumida* -freien Zonen zur Völkervermehrung oder Königinnenzucht verwendet werden sollten. Imker in betroffenen Regionen sollten über alternative Praktiken nachdenken oder zumindest etwas kräftigere Ableger verwenden.

# 5 Vorversuche zur Fernorientierung

## *5.1 Einleitung*

Sehr wahrscheinlich spielt die olfaktorische Orientierung bei der Wirtsfindung eine zentrale Rolle und findet gerichtet nach spezifischen Substanzen oder attraktiven Stoffgemischen statt. Die genaue Untersuchung der ausschlaggebenden Reize und Verhaltensmechanismen könnte für die Entwicklung von Freilandfallen verwendet werden. Idealerweise könnten die Käfer damit noch vor dem Eindringen in den Stock abgefangen und so den Befallsdruck reduziert werden, weshalb dieser Aspekt der Biologie von *A. tumida* zu den besser untersuchten gehört (Elzen et al., 1999, Arbogast et al., 2007, Arbogast et al., 2009).

Eine Möglichkeit zur Befallsreduktion wäre es, den Kleinen Beutenkäfer mit alternativen Nahrungsquellen, wie Früchten, zu locken und vom Stock abzulenken. Von verschiedenen getesteten Früchten erwiesen sich Bananen als besonders geeignet, was möglicherweise an dem Proteinreichtum der Bananen liegt (Buchholz et al., 2008). Es konnten jedoch keine Käfer mit Fruchtfallen im Freiland gefangen werden (Buchholz et al., 2008). Außerdem wurden in Laborversuchen Bienenprodukte bei Wahlmöglichkeit immer gegenüber Früchten bevorzugt (Buchholz et al., 2008).

Bei anderen Freilandfallenversuchen erwiesen sich vergorene Substanzen wie Apfelessig als noch attraktiver als Bienenprodukte wie Pollen (Nolan und Hood, 2008). Bienenprodukte erwiesen sich außerdem bei Freilandversuchen nur in Kombination mit lebenden Bienen als attraktiv, im Gegensatz zu Bienen oder Bienenprodukten, die alleine angeboten wurden (Elzen et al., 1999). Auch andere Versuche bestätigten einen synergetischen Effekt durch die Präsenz von Bienen: Brutkämme besetzt mit Bienen sind signifikant attraktiver als unbesetzte Brutkämme. (Suazo et al., 2003, Torto et al., 2007a, Torto et al., 2007b). Die Anwesenheit der Bienen könnte den Käfern signalisieren, dass das Volk noch intakt ist und somit Ressourcen für die Reproduktion vorhanden sind. In Windtunnelversuchen richteten die Käfer ihren Flug bevorzugt in Richtung verschiedener Einzelkomponenten von

Bienenvolatilen aus, einschließlich des Alarmpheromons Isopentyl-Acetat (Torto et al., 2007c).

Ziel der folgenden Versuche war es, zwei Testsysteme auf Eignung und das Verhalten von *A. tumida* gegenüber einigen als attraktiv beschriebenen Substanzen zu überprüfen. Unter anderem sollten die bei der Vergärung von Honig entstehenden Einzelkomponenten bezüglich ihrer Lockwirkung untersucht werden. Honiggärung tritt bei starkem Befall mit beginnender Reproduktion auf. Die Exkremente der Larven führen zur Verschleimung der Waben, welche wiederum die Vergärung des Honigs forciert (Torto et al., 2005). In diesem Übergangsstadium scheinen Bienenvölker besonders attraktiv zu sein und die Vermutung liegt nahe, dass Gärstoffe hierbei eine Schlüsselreizfunktion einnehmen.

## *5.2 Material und Methoden*

### *5.2.1 Versuchstiere*

Siehe 2.2.1.

### *5.2.2 Olfaktometer-Test*

Bei dieser auch „4-Feldarena“ genannten Apparatur handelt es sich um einen runden Hartplastikzylinder mit vier getrennten Kammern, auf denen ein engmaschiges Drahtnetz aufliegt. In eine dieser Kammern wird die zu testende Substanz bzw. Käfer gegeben. Die Versuchskäfer wurden in ein Eppendorf-Gefäß in der Mitte der Arena gegeben, von wo aus sie sich frei über das Drahtgitter bewegen konnten (Abb. 35). Die komplette Arena wurde mit einem quadratischen Stück Glas oder Plexiglas bedeckt, wodurch die Käfer im Versuchsareal gehalten wurden, aber beobachtet werden konnten.

Der Aufenthaltsort sowie bestimmte Verhaltensreaktionen der Käfer wurden für sechs Minuten mit dem Softwarepaket Observer 3.0 erfasst. Über einen Friedman ANOVA-Test (Statistica 4.3, StatSoft) wurde überprüft, ob es signifikante Abweichungen hinsichtlich der Aufenthaltsdauer der Käfer auf den vier Feldern gab. Der Unterschied zwischen Test und Kontrollfeld wurde mit dem Wilcoxon Matched-Pairs Test überprüft. Bei einem attraktiven bzw. abstoßenden Effekt der unter Feld C

angebotenen Substanzen müsste die Aufenthaltsdauer hier höher bzw. geringer sein als auf den anderen Feldern.

In einer der vier Kammern des Olfaktometers wurden verschiedene potentiell attraktive Proben aus einem Bienenvolk nämlich ein 3 x 3 cm großes Stück Honigwabe, fünf Puppen und fünf Larven angeboten, indem sie jeweils auf einer kleinen Glaspetrischale in einer der Kammern platziert wurden. An chemischen Substanzen wurden auf einem kleinen Wattestück in einer Petrischale Decanal, 2-Nonanon und Isopentyl- Acetat (das Alarmpheromon) getestet.

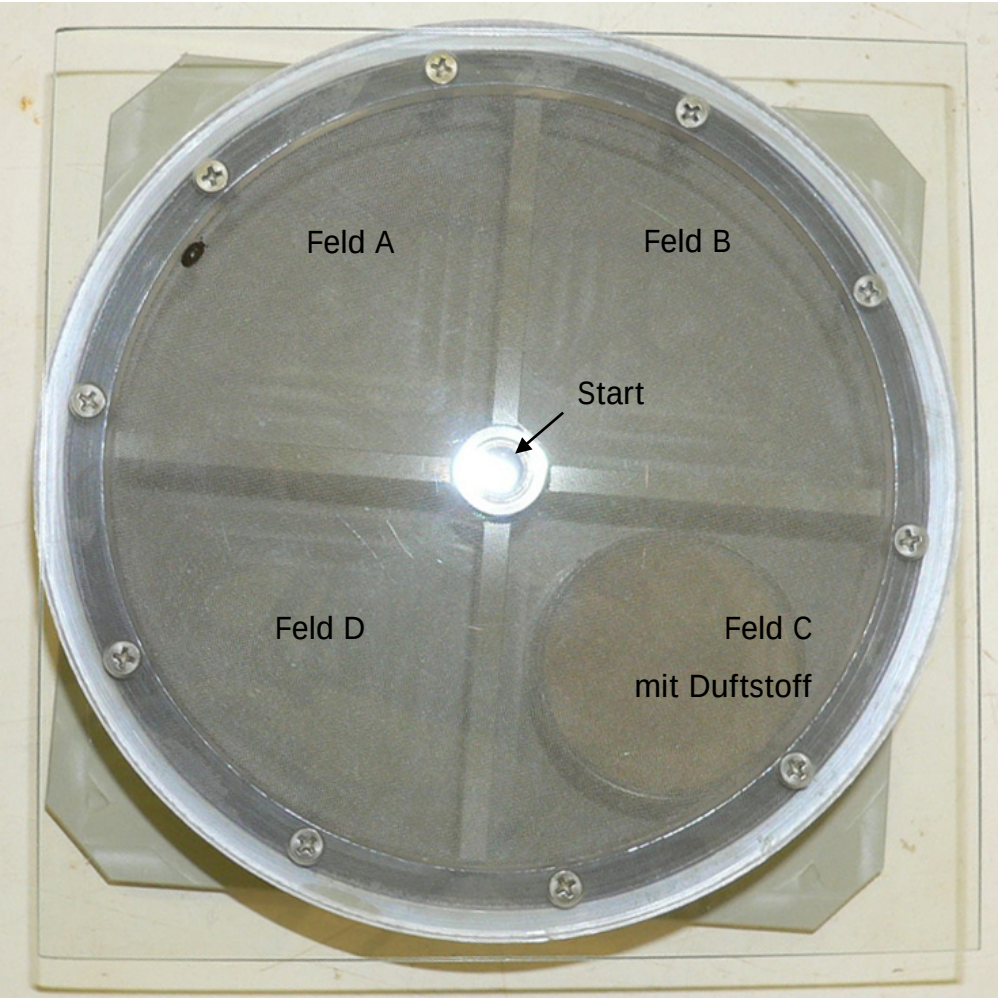



**Abb. 35: Olfaktometer („4-Feldarena“) mit den Feldern A-D, dem Eppendorf-Gefäß als Startpunkt und einem Testkäfer auf dem Drahtgitter in Feld A. Die zu testende Substanz befindet sich in Feld C.**

Die chemischen Substanzen wurden in verschiedener Konzentration und Menge getestet (siehe 5.3.1). Fünf Individuen der zu testenden Käferstadien wurden in eine Hälfte einer mit Gaze bespannten Petrischale gesetzt und mit möglichst geringem

Abstand zum Drahtgitter angeboten. Von den zu testenden lebenden Bienen wurden ebenfalls Individuen in einem Königinnenkäfig gehalten. Die Versuche wurden sowohl mit Käfern aus Wildfängen als auch mit definierten Käferstadien aus Laborzuchten durchgeführt. Nach jeweils fünf Durchläufen wurde das Olfaktometer komplett mit Ethanol und destilliertem Wasser gereinigt, um Geruchsrückstände oder mögliche Markierungen der Käfer die Ergebnisse nicht verfälschen. Die Versuche fanden in einem dunklen Raum bei Rotlicht statt und das Olfaktometer wurde nach jedem Lauf um 90° gedreht, um den Einfluss von Licht auf die Reaktion der Käfer auszuschließen.

### *5.2.3 Flugkäfigversuche*

Der 2,50 cm x 1,30 cm x 1,60 cm große Flugkäfig wurde in einem komplett verdunkelten Raum bei 26°C aufgestellt. In dem Flugkäfig wurden jeweils eine Kontrollbox und eine mit Gärsubstanz versehene Plastikbox mit einer Einflugöffnung im vorderen Bereich aufgestellt. Je 100 µl der 100%igen Gärsubstanz wurden auf ein Wattestückchen in einer Petrischale gegeben und in die Testbox gestellt, entsprechend wurde ein Wattestückchen ohne Chemikalienzusatz in einer Petrischale in die Kontrollbox gestellt (Abb. 36). Auf Attraktivität getestet wurden synthetisches Acetaldehyd, Ethanol, 2-Methyl-1-propanol, Ethylacetat, Ethylbutyrat, 3-Methyl-butanol, 2-Methyl-1-butanbutanol (Sigma Aldrich, Australien), alles bei der Honiggärung auftretenden chemischen Komponenten (Schröder, 2002).

Vorversuche zeigten, dass die Reaktion der Käfer stark von den Versuchsbedingungen (Temperatur, Versuchszeit, Luftzufuhr, Menge der Testsubstanzen etc.) und dem Alter der Käfer abhängt. Für die standardisierten Versuche wurden jeweils 150, ausschließlich junge, frisch geschlüpfte, ungefütterte Käfer verwendet. Zu Versuchsbeginn wurden die frisch geschlüpften Käfer von den Zuchtboxen abgesammelt und sofort anschließend innerhalb des Flugkäfigs freigelassen. Nach 2 h wurde Anzahl der Käfer in und auf Kontroll- und Versuchsbox gezählt.

**Abb. 36: Versuchsaufbau der Flugkäfigversuche mit der Versuchsbox vorne und der Kontrollbox hinten im Bild.**

Zwischen den Versuchen wurden der Raum je nach Geruchsintensität der Substanz eine Stunde bis zwei Tage lang gelüftet und die Position von Kontroll- und Testbox vertauscht, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch zuvor durchgeführte Versuche zu vermeiden. Es wurden neue, saubere Plastikboxen für jeweils immer nur eine Substanz verwendet, um zu verhindern, dass sich die aromatischen, lipophilen Chemikalien, die sich im Plastik festsetzen, die Versuche verfälschen. Da es sich um den letzten Forschungsaufenthalt handelte und die Zeit zusätzlich durch eine verendete Käferzucht limitiert wurde, konnte pro Substanz nur eine Stichprobe unter den standardisierten Bedingungen genommen werden. Auf eine statistische Analyse wurde daher verzichtet; die Ergebnisse sollen lediglich als Anhaltspunkt für spätere Versuche dienen.

## *5.3 Ergebnisse*

### *5.3.1 Olfaktometer*

Es konnten mit diesem Testsystem keine spezifischen Reaktionen gegenüber Honig, Bienen, Bienenbrut und auch anderen Käfer nachgewiesen werden. Dies war unabhängig davon, welche Käfer (Männchen, Weibchen, Laborzucht, Wildtyp) für die Tests verwendet wurden (siehe Anhang; Tab. IV). Die einzige Ausnahme bildeten weibliche unverpaarte Käfer (3 Tage alt), denen unverpaarte Männchen (3 Tage alt) angeboten wurden. Hier ergab sich eine statistisch signifikante Repellentwirkung, d. h. die Weibchen hielten sich signifikant weniger auf dem Feld mit den angebotenen Männchen auf. Die Weibchen zeigten wiederholt ein spezifisches Verhalten, nachdem sie sich dem Feld mit den Männchen genähert hatten: Sie liefen eine kurze Strecke weg, blieben dann stehen und zeigten Putzverhalten. Weitere Repellenteffekte gab es gegenüber den geprüften Substanzen Decanal, 2-Nonanon und zwar sowohl gegenüber einer hochkonzentrierten Applikation (100% Lösung, 30 µl/Test) als auch gegenüber einer deutlich geringeren Konzentration (1% Lösung, 30 µl/Test). Die Konzentration von Nonanon und Decanal wurde nach den ersten Versuchen mit Repellenteffekten stufenweise in Einzelversuchen bis zum Ausbleiben einer Reaktion verringert. Ebenso wurde mit bei Isopentyl-Acetat verfahren, dem ebenfalls keine attraktive Wirkung nachgewiesen werden konnte (100% Lsg; 2µl/Test).

### *5.3.2 Flugkäfigversuche zur Attraktivität von Gärstoffen*

Bei den Substanzen 2-Methyl-1Propanol, Acetaldehyd, 3-Methyl-butanol, 2-Methyl-butanbutanol und Ethanol fanden zehn bis 28 Prozent der im Flugzelt befindlichen Käfer auf der Versuchsbox, wohingegen auf der Kontrollbox höchstens 5 (3%) der 150 Käfer zu finden waren (Tab. 6). Bei Ethylbutyrat fanden eine ähnliche Anzahl Käfer auf Test (n = 12) und Kontrollbox (n =7). Bei Ethylacetat waren nur auf der Kontrollbox drei Käfer zu finden (Tab. 6). Die Käfer auf den Kontrollboxen fanden sich in der Regel auf der zur Testbox gerichteten Seite. Innerhalb und außerhalb der Boxen bewegten sich die Käfer frei und einzeln und bildeten keine Aggregation.

**Tab. 6: Anzahl (n) und prozentualer Anteil aller 150 im Flugkäfig befindlichen Käfer auf / in der Test-(T) und Kontrollbox (K).**

| Gärsubstanz | nT | nK | T | K |
|---|---|---|---|---|
| 2-Methyl-1-Propanol | 15 | 0 | 10% | 0% |
| Ethylbutyrat | 12 | 7 | 8% | 5% |
| Ethylacetat | 0 | 3 | 0% | 2% |
| Acetaldehyd | 16 | 0 | 11% | 0% |
| 3-Methyl-1-butanol | 29 | 4 | 19% | 3% |
| 2-Methyl-1-butanbutanol | 20 | 5 | 13% | 3% |
| Ethanol | 42 | 3 | 28% | 2% |

## *5.4 Diskussion*

Die Ergebnisse des Flugzeltversuchs erscheinen vielversprechend und könnten als Basis für weitere Untersuchungen verwendet werden. Fünf der sieben getesteten Honigvergärungskomponenten (Schröder, 2002) schienen eine Lockwirkung auf die frisch geschlüpften Käfer auszuüben. Die Möglichkeit, dass sich die Käfer durch Aggregationseffekten aus der Testbox sammeln besteht erscheint aber bei Betrachtung des Verhaltens eher unwahrscheinlich: Die Käfer bewegten sich frei und einzeln im Raum und auf den Boxen und waren nicht, wie sonst, in kleinen Aggregationen zu finden. Gegensatz hierzu erwies sich das Olfaktometer bei dem Kleinen Beutenkäfer als eher ungeeignetes Testsystem. Es konnten damit keine Attraktivität von Bienenprodukten, Bienen oder Bienenvolatilen nachgewiesen werden, alles Substanzen, die eigentlich anziehend wirken sollten.

Dass bzw. falls Gärstoffe noch vor bienenspezifischen Volatilen einen Schlüsselreiz ausüben spricht für die Theorie, dass Gärstoffe auf ein schon geschwächtes Volk

hinweisen. Stockdüfte könnten entsprechend ihrer Zusammensetzung dem Kleinen Beutenkäfern Auskunft darüber geben, ob das entsprechende Volk gute Bedingungen für eine erfolgreiche Fortpflanzung bietet. Völker mit abnehmendem, aber noch vorhandenem Bienenvolatilen, bei starkem Käferbefall und beginnendem Larvenbefall (zunehmendem Gärgeruch), könnten besonders attraktiv sein, da hier Reproduktionsbedingungen optimal sind. Es sind noch Nahrungsressourcen vorhanden, die Bienen aber anfälliger und nicht mehr wehrfähig. Die Vorstufe, ein noch intaktes Volk, bietet Unterschlupf und Nahrung, verbunden mit der potentiellen Möglichkeit zur Fortpflanzung in der Zukunft. Ein kollabiertes Volk, ohne spezifische Bienenvolatile, wäre dagegen weniger verlockend, da hier die Ressourcen bereits weitgehend verbraucht sind.

Die getesteten Substanzen würden sich zum Einsatz im Freiland in Kombination mit Fallen anbieten. Interessant wäre hierbei ein Vergleich mit dem standardmäßig verwendeten Apfelessig (Elzen et al., 1999, Ellis, 2004, Hood, 2006, Nolan und Hood, 2008) oder die Untersuchung synergetischer Effekte der Gärsubstanzen untereinander oder kombiniert mit z. B. Bienenprodukten. Nolan und Hood (2008) stellten beim Vergleich der Lockwirkung von Apfelessig mit der Hefe *Kodamaea ohmeri* versetzen Pollenteig (nach Torto et al., 2007b) fest, dass die mit Pollenteig versetzten Fallen eine größere Lockwirkung ausüben. Zuvor hatten Torto et al. (2007a) einen Großteil der im Flugzelt getesteten Gärstoffe auch in dem mit Hefe versetzten Pollenteig identifiziert. Es ist gut möglich, dass es ein ideales, besonders attraktives Stoffgemisch der verschiedenen Fermentierungsprodukte gibt.

Im Olfaktometer war selbst bei angebotenen Wirtsstadien (Bienen und Bienenbrut) oder Honig, von welchen eine attraktive Wirkung ausgehen sollte, keine Reaktion zu vermerken. Bezüglich der Bienenvolatile ist eine Überdosierung der Substanzen sehr wahrscheinlich, es gelang aber auch nicht eine attraktive Dosierung zu bestimmen (bei zu niedrigen Dosierungen fehlte jegliche Reaktion). Die Käfer schienen, dem Eindruck nach generell keine normalen Verhaltensreaktionen im Olfaktometer zu zeigen: Die ersten Minuten verbrachten sie meist damit, am Rand der Versuchsarena entlang im Kreis zu rennen, ein Hinweis, dass dieses Testsystem für den Kleinen Beutenkäfer ungeeignet ist. Eine Erklärung wäre, dass die Käfer weder ihrem ausgeprägte Thigmotaktischen- noch dem Aggregationsverhalten nachkommen können. Die Erklärung für den eigenartigen "Repellenteffekt“, den die Männchen auf

die Weibchen ausübten, könnte dadurch zu erklären sein, dass junge Weibchen auch in den vorherigen Versuchen andere Artgenossen eher mieden.

Für zukünftige Laborversuche, die sich mit Fernorientierung beschäftigen, sollte eher ein Modell, wie das Flugzelt gewählt werden. Es entspricht eher den natürlichen Gegebenheiten bei der Fernorientierung und verspricht bessere Ergebnisse.

# 6 Allgemeine Diskussion und Ausblick

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass olfaktorisches Verhalten und die damit verbundene olfaktorische Orientierung in allen Phasen des Lebenszyklus der Imagines von *A. tumida* eine wichtige Rolle spielen. Chemische Kommunikation zwischen den Artgenossen scheint dabei ab der reproduktiven Phase von zwei bis drei Wochen stattzufinden. Wie bei vielen polygamen Arten setzt das Reproduktionsverhalten etwas verspätet und nicht direkt nach dem Schlupf der Imagines ein. Die Fortpflanzungsstrategie des Kleinen Beutenkäfers ist auf Massenvermehrung ausgerichtet und eng mit dem Aggregationsverhalten assoziiert.

In der ersten präreproduktiven Phase von bis zu einer oder höchstens zwei Wochen nach dem Schlupf stehen die Wirtsfindung und die olfaktorische Fernorientierung im Vordergrund. Gärstoffe, wie sie bei Befall mit Larven und der damit verbundenen Honigvergärung entstehen, schienen bei ersten Versuchen in einem Flugkäfig auf frisch geschlüpfte, ungefütterte Käfer attraktiv zu wirken. Es wären jedoch weitere Datenerhebungen notwendig, um diese Ergebnisse zu stützen. Generell scheinen Bienenvölker bei beginnender, erfolgreicher, Reproduktion des Parasiten und dem damit einhergehenden Larvenbefall mit Verschleimung der Waben besonders attraktiv zu sein. Sobald das Volk kollabiert und die Futtervorräte verbraucht sind, sinkt die Attraktivität wieder. Unterschiede zwischen den drei Befallstypen sind selbst für die weniger sensible, menschliche Nase wahrnehmbar und somit mit großer Wahrscheinlichkeit auch für die olfaktorisch sensibleren Kleinen Beutenkäfer. Stark mit Käfern befallene Völker riechen leicht milchig, lebendige Völker mit Larvenbefall vergoren und von verendeten Völkern geht schwacher Verwesungsgeruch aus. Gärstoffe könnten eine Schlüsselreizfunktion bei der Wirtsfindung einnehmen und würden sich daher gut für Freilandfallen eignen. Nicht möglich war es uns, die Attraktivität von verschiedenen Bienenprodukten und Bienenvolatilen, die mit großer Wahrscheinlichkeit auch bei der Fernorientierung eine Rolle spielen, im Olfaktometer nachzuweisen. Vermutlich handelte es sich um ein ungeeignetes Testsystem.

Altersabhängige Unterschiede im Verhalten wurden vor allem bei unseren Biotests offensichtlich. Alles deutet darauf hin, dass das stark ausgeprägte Aggregationsverhalten den Übergang zwischen Wirtsfindung im jungen Alter (bis zu einer Woche nach dem Schlupf) und Reproduktionsverhalten (zwei bis drei Wochen

nach dem Schlupf) einleitet. Geschlechtsunabhängiges Aggregationsverhalten konnte im Test mit einer Ausnahme (jungen Weibchen getestet auf alte Männchen) bei allen Stadien nachgewiesen werden. Fraglich bleibt, inwiefern es auf Pheromone und/oder Thigmotaxis zurückzuführen ist.

Mit den folgenden Präferenz- und Filtertests konnten wiederum erste Hinweise auf chemische Kommunikation und somit die Existenz von Pheromonen gefunden werden. Bei beiden Testsystemen reagierten ältere (14 bis 18 Tage alte) Käfer hochsignifikant auf Käfer des anderen Geschlechts im selben Alter, indem sie entweder mehr Zeit im Kontakt mit dem jeweils anderen Geschlecht verbrachten oder stark auf das, von älteren Käfern des anderen Geschlechts belaufene, Filterpapiere reagierten.

Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Verhaltensuntersuchungen, bei denen sich zeigte, dass der Peak der sexuellen Aktivität erst mit dem Alter von zwei bis drei Wochen erreicht wird. Männchen zeigen lediglich in dieser Altersstufe mehr hetero-, als homosexuelles Verhalten. Männchen anderer Altersstufen können vermutlich nicht zwischen den Geschlechtern unterscheiden („lack of recognition“ Theorie). Weibchen und Männchen scheinen also ab einem Alter von ca. zwei Wochen besonders attraktiv für das jeweils andere Geschlecht zu sein, was für eine Abgabe von Sexualpheromonen beider Geschlechter ab diesem Alter spricht.

Junge Käfer befanden sich im Präferenztest gleichlang mit beiden Geschlechtern im Kontakt, ein weiterer Hinweis, dass die Kleinen Beutenkäfer darauf prädeterminiert sind, eine Aggregation zu bilden, bevor sie sich fortpflanzen. Junge Weibchen, die im Aggregationstest nur eine schwache Reaktion gezeigt hatten, zeigten beim Filtertest eine hochsignifikante Reaktion auf von anderen jungen Weibchen belaufene Filterpapiere. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wäre, dass Weibchen im jungen, präreproduktiven Alter eher gleichgeschlechtliche Artgenossen suchen, da diese, wie sie selbst, darauf angewiesen sind, einen geeigneten Wirt und damit auch Nahrungsressourcen zu finden, bevor sie sich fortpflanzen können. Zusätzlich kann so die Bildung großer, gemischtgeschlechtlicher Aggregationen gefördert werden.

Trotz zahlreicher weiterer Filterpapiertests mit Käferextrakten und Extrakten aus belaufenem Filterpapier mit verschiedenen Lösungsmitteln, Extraktionszeiten und Käferäquivalenten, war es nicht möglich, ein aktives Extrakt zu gewinnen. Es sollten daher bei zukünftigen Versuchen über andere Extraktionsmethoden nachgedacht

werden. Entsprechend konnten keine geschlechtsspezifischen chemischen Substanzen im GC-MS identifiziert werden. Identifiziert wurden alters- und ortsspezifische Unterschiede.

Die Betrachtung des Paarungsverhaltens des Kleinen Beutenkäfers ergab eine feste Abfolge von Verhaltensweisen und eine für polygame Spezies typische Fortpflanzungsstrategie mit spät einsetzendem Sexualverhalten. Außergewöhnlich ist das stark ausgeprägte Konkurrenzverhalten zwischen den Weibchen. Sie zeigten häufig aggressives Verhalten, indem sie vor allem Weibchen und Paare „stießen“ und so störend in Kopulationen eingriffen. Im Gegensatz dazu tritt dieses Verhalten den Männchen nur sehr selten auf. Das alles deutet auf eine sehr aktive und dominante Rolle der Weibchen beim Reproduktionsverhalten hin und mag ein Indikator für „cryptic female choice“ (Sammeln und Selektieren der Spermien durch die Weibchen) der Kleinen Beutenkäfer Weibchen sein. Ein weiterer Indikator ist das vor der Kopulation reduzierte und dafür vermutlich während der Kopulation stattfindende Balzverhalten der Männchen.

Bei Betrachtung des Paarungs- und Sozialverhaltens fanden sich Hinweise auf chemotaktische Kommunikation. Die Kleinen Beutenkäfer betasten und betrillern sich ständig und während der Kopulation reiben die Männchen die Elytren des Weibchens mit den Tarsen, um darauf die Tarsen gegeneinander zu reiben und mit den Antennen durch die Mandibeln zu ziehen. Dies könnte auf Pheromonabgabe über die kutikuläre Oberfläche hindeuten.

Unabhängig davon könnte es sich bei der Verhaltensweise „Taxieren“, bei der der Kopf mit Antennen in alle Richtungen geschwenkt wird um olfaktorische Orientierung während der Fortbewegung handeln, während durch das häufig auftretende „Beinereiben“ Pheromone auf den Boden abgegeben werden könnten, worauf auch die Filterpapiertests hindeuten. Eine ungewöhnlich große Öffnung ins Körperinnere war auf der Coxa des ersten Laufbeinpaars auf den REM Aufnahmen zu finden. Andere, bei auffälligen Verhaltensinteraktionen involvierte Körperpartien (Elytren und Genitaltrakt), deckten sich mit dem Vorkommen zahlreicher Sensillen und Poren auf den Aufnahmen. Für eine endgültige Aussage wären jedoch weitere morphologische und physiologische Untersuchungen nötig.

Die ungewöhnlichste Besonderheit des Begattungsverhaltens des Kleinen Beutenkäfers zeigte sich bei dem Vergleich der Kopulationen von Einzelpaaren und

Aggregationen. Offensichtlich ist das Vorhandensein einer Aggregation ein unabdingbarer Schlüsselreiz zum Auslösen des Sexualverhaltens. Kopulationen finden in erster Linie in Aggregation satt und sind bei Einzelpaaren eine Ausnahme. Mögliche Mittler dieses Verhaltens könnten entweder eine erhöhte Konzentration von Pheromonen bei vielen Käfern oder die Summe taktiler Reize durch das gegenseitige Berühren der Käfer, sein. Biologisch gesehen handelt es sich hierbei um eine gute Adaption an das Leben im Bienenstock. Eine Übernahme des Volkes ist nur durch Massenreproduktion möglich, die Eier von Einzelpaaren würden sofort von Bienen ausgeräumt werden, wohingegen ab einer gewissen Menge an Eiern und Larven das Hygieneverhalten der Bienen nicht mehr zur vollständigen Entfernung ausreicht. Zusätzlich fördert solches Verhalten die Synchronisation der Reproduktion und damit ebenfalls die Massenvermehrung.

Festzuhalten bleibt, dass das Reproduktionsverhalten durch ein sehr komplexes Zusammenspiel von Verhaltensreizen und chemischen Reizen geprägt ist. Die Rolle thigmotaktischer Reize in diesem System sollte noch weiter untersucht werden.

Die eng mit dem Aggregations- und Reproduktionsverhalten assoziierte Massenvermehrung bis hin zur Überwindung des Wirts ist der Schlüssel der biologischen Strategie des Kleinen Beutenkäfers, was sich auch im praktischen Versuch mit Ablegern zeigt.

Mit diesem Versuch konnte bestätigt werden, dass Kleinvölker auch unter einem moderaten Befallsdruck, der für größere Wirtschaftsvölker kaum eine Gefahr darstellt, anfällig auf Befall mit dem Kleinen Beutenkäfer reagieren. Berichte der australischen Imkerschaft über die Schäden oder gar Zusammenbrüchen von Kleinvölkern konnten damit bestätigt werden. Bei einer Einschleppung des Kleinen Beutenkäfers nach Europa sollten also vordringlich Maßnahmen zum Schutz von Kleinvölkern umgesetzt werden. Dies bedeutet z. B., dass alternative Methoden bei der Königinnenzucht und der Völkervermehrung entwickelt werden sollten, wobei auf die Bildung schwacher Ableger in großen Einheiten (wenig Bienen bei viel Wabenfläche) vermieden werden sollte.

# 7 Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war es das olfaktorische Verhalten und die Reproduktionsbiologie des Kleinen Beutenkäfer (*Aethina tumida*, Nitidulidae) in allen Abschnitten des Lebenszyklus der Adulti zu untersuchen. Die verschieden Aspekte sollten möglichst interdisziplinär beleuchtet werden, da die Erforschung des Kleinen Beutenkäfers noch kaum über die Grundlagenforschung hinausgeht.

Es wurden hierzu Biotests, chemische Untersuchungen, Verhaltensbeobachtungen, elektronenmikroskopische Aufnahmen und ein praktisch-imkerischer Versuch im aktuellen Verbreitungsgebiet von *A. tumida*, Südafrika, Maryland, USA und New, South Wales, Australien durchgeführt.

Der Fokus unserer Untersuchungen lag auf der zweiten Lebensphase des Lebenszyklus der Adulti, wenn die Käfer in ihrer natürlichen Umgebung nach dem Schlupf aus der Erde in den Honigbienenstock (*Apis mellifera sp.*) eingewandert sind. Dort bilden sie Aggregationen und beginnen sich zu reproduzieren. Aggregations- und/oder Sexualpheromone könnten bei diesen sozialen Interaktionen involviert sein. Ziel war es diese zu identifizieren oder zumindest ihre Existenz nachzuweisen.

Unter anderem wurden drei Labor-Biotests (Aggregationstest, Filtertest und Präferenztest) zur Untersuchung dieser Aspekte entwickelt. Mit dem Aggregationstest konnte ein geschlechts- und altersunabhängiges Aggregationsverhalten nachgewiesen werden, mit dem Präferenztests eine altersabhängige Präferenz für das andere Geschlecht (Käfer bevorzugen ab einem Alter von ca. 14 Tagen Kontakt mit dem anderen Geschlecht) und mit dem Filtertest konnte erstmals nachgewiesen werden, dass hierbei olfaktorisch aktive Substanzen eine Rolle spielen. Von bestimmten Käferstadien belaufe Filterpapiere wirkten auf andere Käfer attraktiv. Es war jedoch nicht möglich aus dem Filterpapier oder direkt aus den Käfern ein aktives Extrakt zu gewinnen.

Weitere Informationen zur chemischen Kommunikation sollten über die Verhaltensbeobachtungen und die exakte Beschreibung des Begattungsverhaltens gewonnen werden. Beim Begattungs- und Sozialverhalten wiesen Verhaltensweisen, wie intensives Betasten und Reiben der Tarsen oder das Betrillern mit den Antennen an der kutikulären Körperoberfläche, auf chemotaktische Kommunikation hin. Über rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen konnte eine hohe Sensillendichte und

Porenöffnungen auf den Elytren und den Laufbeinen der Käfer dokumentiert werden, die sich mit den häufig betastet bzw. betrillerten Regionen deckten.

Aus Videosequenzanalysen wurde ein Ethogramm sowie ein Flussdiagramm des Ablaufs des Paarungsverhaltens erstellt. In diesen festen Ablauf griffen häufig und fast ausschließlich Weibchen störend ein, indem sie das kopulierende Paar stießen. Auch sonst zeigten Weibchen im Gegensatz zu den Männchen sehr häufig dieses, als aggressiv zu wertende, Verhalten. Wenn nicht gegenüber Paaren, dann meist gegenüber anderen Weibchen. Dies und das stark reduzierte bzw. eher während der Kopulation anzusetzende Balzverhalten können als Hinweisen auf eine „cryptic female choice“ Strategie des Kleinen Beutenkäfers angesehen werden.

Der Vergleich des Paarungsverhaltens von kleinen Aggregationen und Einzelpaaren in verschiedenen Altersstufen zeigte, dass die sexuelle Aktivität, wie schon auf Grund der Biotests vermutet, tatsächlich erst ungefähr ab einem Alter von 14 Tagen ihren Peak erreicht und nur in diesem Alter mehr hetero- als homosexuelle Kopulationen auftreten. Vermutlich können Männchen nur in dieser Zeit Weibchen von Männchen unterscheiden. Dass Weibchen während dieser Zeit Sexualpheromonen emittieren, erscheint als naheliegende Erklärung.

Weiter zeigte sich, dass Kopulationen fast ausschließlich in Aggregation stattfinden. Dieser außergewöhnliche und einzigartige Umstand kann als gute evolutive Anpassung an den Honigbienenwirt betrachtet werden. Eier und Larven von einzelnen Paaren würden sofort von Arbeiterinnen ausgeräumt werden und eine erfolgreiche Überwindung der Wirtsabwehr wäre ausgeschlossen. Mit dieser Strategie wird die Verschwendung von Energiekosten vermieden und zudem eine Synchronisierung des Reproduktionsverhaltens innerhalb einer Käferpopulation gewährleistet. All diese Faktoren fördern die Massenvermehrung des Kleinen Beutenkäfers innerhalb des Bienenvolkes.

Dass die Massenvermehrung als Strategie bei dem Kleinen Beutenkäfer eine zentrale Rolle spielt, zeigte sich auch bei einem Freilandversuch zur Anfälligkeit von Ablegern gegenüber dem Befall mit *A. tumida*. Ableger waren in einem Gebiet mit vergleichsweise moderatem Befallsdruck wesentlich anfälliger als Wirtschaftsvölker. Die Hälfte aller 24 Ableger im Versuch kollabierte oder zeigte Befall mit Larven, im Gegensatz zu den 24 Wirtschaftsvölkern, die nach der vierwöchigen Versuchsperiode keine Symptomatik zeigten. Imker in befallenen Gebieten sollten dies vor allem bei

der Königinnenzucht oder Volksvermehrung berücksichtigen und keine zu schwachen Ableger verwenden. Das evolutive Wettrennen zwischen Wirt und Parasit läuft in diesem System offensichtlich stark auf einer quantitativen Ebene ab: Wem es gelingt mehr Individuen zu produzieren, kann die andere Seite kontrollieren und das eigene Überleben sichern. Im Gegensatz zu vielen anderen Parasiten, die die Strategie verfolgen, ihren Wirt möglichst lange am Leben zu lassen, ist der Kleine Beutenkäfer darauf angewiesen, dass das Bienenvolk kollabiert, um sich selbst erfolgreich fortpflanzen zu können.

Nachdem sich die Larven in der Erde verpuppt haben und wieder als adulte Käfer schlüpfen, steht in dieser ersten Lebensphase der Adulti die olfaktorische Fernorientierung zur Wirtsfindung und Erschließung von Nahrungsressourcen im Vordergrund. Bei der Verschleimung der Waben durch die Larven entstehen Gärstoffe, welche einen Schlüsselreiz für den Kleinen Beutenkäfer darstellen könnten. Ein Volk das im Zusammenbruch begriffen ist sollte besonders attraktiv sein, da hier noch genügend Ressourcen zur Nahrungsaufnahme und Fortpflanzung zu Verfügung stehen, die Bienen aber nicht mehr wehrkräftig sind. Erste Flugzeltversuche wiesen auf eine Lockwirkung der, bei der Honigfermentierung entstehenden, Gärstoffe hin. Diese Substanzen würden sich für Freilandfallen anbieten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass chemische Kommunikation über Pheromone, vermutlich auf Kontaktebene, in diesem System existiert und die olfaktorische Orientierung in allen Lebensphasen der Adulti eine wichtige Rolle spielt. Daran eng geknüpft sind, auf Verhaltens- und Fortpflanzungsebne, Aggregation und die Strategie der Massenreproduktion. Der Zusammenschluss dieser Faktoren stellt den Schlüssel zur in manchen Gebieten hohen Pathogenität und zum Erfolg dieser invasiven Spezies dar.

# 8 Summary

This dissertation aimed to investigate the olfactory behaviour and reproductive biology of the small hive beetle (*Aethina tumida*, Nitidulidae) in all stages of its live cycle. An interdisciplinary approach was chosen as investigations of the small hive beetle started only recently and there is a lot to be discovered.

Bioassays, behavioural, chemical, apicultural and some morphological (electron microscopy) investigations were undertaken to its purpose. Study areas were South Africa, the Maryland, USA and New South Wales, Australia.

Our investigations focused on the second part of the small hive beetle life cycle, after beetles emerged from the ground and invaded a honeybee (*Apis mellifera*) hive. Once in the hive, beetles show strong developed aggregation behaviour and start reproducing.

We suspected the involvement of aggregation- and/or sexual pheromones in these social interactions. Our goal was to identify or at least to prove the existence of the latter. Three laboratory bioassays were developed on this purpose: aggregation-assay, filter-assay and choice-assay. Gender and age independent aggregation behaviour was revealed by the aggregation assay. The choice assay revealed a gender and age dependent preference for the opposite sex in both genders (beetles preferred to be in contact with opposite sex from the age of 14 days onwards).

The involvement of chemical substances in this system was proved by the filter-assay. Pieces of filter paper, which were left with certain beetle stages to leave marks on it proved to be attractive when offered to other beetles. Unfortunately it was not possible to generate an active extract neither from attractive filters nor from beetles as a whole.

A detailed description of the mating behaviour was supposed to reveal further information about chemical communication in the small hive beetle. Therefore an ethogram and flow diagram were compiled through video analysis of the mating behaviour. Several behaviours observed before, after and during copulation indicated chemical communication on tactile level; this included tapping, thrilling or rubbing of the cuticle surface of fellow mates. Electron microscopy pictures showed a high density of sensillae and pores on the areas involved in frequent behavioural interactions.

The description of the mating behaviour revealed several indications for cryptic female choice mechanisms. One was the distinct aggressive behaviour of females in contrast to males. They pushed other beetles in high frequency and often interrupted matings this way.

Comparison of matings in single pairs and aggregations showed that small hive beetles only copulate in aggregations and sexual behaviours reaches its peak at the ages from two to three weeks. It is further the only age in which more hetero- than homosexual matings occur. All these facts added up indicate female pheromone emission from the age of two weeks on.

This feature might be seen as an extraordinary and unique adaption to their honey bee host. Single pairs would never be able to compete with the hygienic behaviour of the honeybees and all their offspring and eggs would be cleaned out immediately. It further helps synchronizing reproduction of all beetles in an aggregation which in turn favours mass reproduction and surrendering the host.

The central role of this mass reproduction strategy became further obvious when investigating the susceptibility of small nucleus hives to invasion of the small hive beetle. Nucleus hives were far more vulnerable to invasion of the small hive beetle than full sized colonies. After a four week study period under moderate invasion pressure half of all 24 nucleus colonies showed signs of small hive beetle reproduction, namely they either collapsed or were infected with larvae in their final development stage. In contrast none of the full-sized colonies showed any symptoms. Beekeepers in affected areas should consider this in their daily tasks and avoid using too small nucleus colonies for queen rearing or colony propagation. This also reveals a purely quantitative aspect of the evolutionary race between host and parasite in this system. The party which manages to produce the most individuals and offspring wins and surrenders the other party. The small hive beetle depends on the collapse of the colony to ensure its reproduction in contrast to many other parasites which try to keep their host alive as long as possible.

In the first stage of the adult live cycle, after pupation and emergence from the ground foraging and host-finding behaviour have first priority. Volatiles from fermenting honey might be a key trigger during this time. Infection with larvae incites fermentation of honey and pollen which produces the typical slimy combs in the end. Colonies in the stage between collapse and symptom-free infestation are

supposed to be the most attractive. There are still food resources available but the honey bee host is already weak and vulnerable. In a preliminary trial under canvas we investigated the effect of various ferment products. They seemed to be attractive and could be considered as lure for traps in the field after further experiments.

In conclusion one can say that it was possible to prove the existence of chemical-probably chemotactical communication via pheromones in the small hive beetle *A. tumida.* Olfactory orientation is present in all stages of the life cycle and aggregation and a mass reproduction strategy is closely connected to it on the reproductive and behavioural level. Thereby, this effective mass reproduction strategy may be the key to the success of this invasive species.

# 9 Anhang

**Tab. I: Mittlere Anzahl ($\bar{x}$) Zählereignisse von Käfern auf Filterpapier mit Extrakten aus kontaminiertem Filterpapier; n: Anzahl getesteter Käfer in einer Versuchsreihe, DE: Diethylether, dF: Anzahl Tage, die die Käfer auf Filter gehalten wurden, T: Geschlecht Testkäfer, F: Geschlecht der auf Filterpapier gehaltenen Käfer, p: Wilcoxon Matched-Pairs Test.**

| Lösungs-mittel | T | F | $\bar{x}$T | $\bar{x}$K | Extraktions-zeit | dF | Substrat | n | p-Wert |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hexan | ♂ | ♀ | 1,73 ± 2,09 | 0,27 ± 0,59 | 5 min | 5 | Pollen | 15 | 0,03* |
| | ♂ | ♀ | 0,27 ± 0,80 | 2,60 ± 2,69 | 5 min | 2 | Pollen | 15 | 0,02* |
| | ♂ | ♀ | 1,07 ± 1,71 | 1,07 ± 1,87 | 5 min | 2 | Pollen | 15 | 0,86 |
| | ♂ | ♀ | 0,47 ± 0,64 | 0,67 ± 1,35 | 5 min | 2 | Pollen | 15 | 1,00 |
| | ♂ | ♀ | 0,80 ± 1,37 | 2,07 ± 2,31 | 5 min | 2 | Honig | 15 | 0,13 |
| | ♀ | ♂ | 1,00 ± 1,20 | 0,87 ± 1,51 | 5 min | 2 | Honig | 15 | 0,48 |
| | ♂ | ♀ | 0,40 ± 1,30 | 2,20 ± 2,34 | 10 min | 2 | Honig | 15 | 0,22 |
| | ♂ | ♀ | 0,67 ± 1,45 | 2,27 ± 2,28 | 10 min | 5 | Honig | 15 | 0,07 |
| | ♂ | ♀ | 1,73 ± 2,49 | 1,93 ± 2,46 | 10 min | 5 | Honig | 15 | 0,80 |
| | ♂ | ♀ | 1,93 ± 2,15 | 1,73 ± 2,22 | 10 min | 5 | Honig | 15 | 0,89 |
| | ♂ | ♀ | 1,73 ± 2,46 | 1,60 ± 1,88 | 10 min | 5 | Honig | 15 | 0,94 |
| | ♀ | ♂ | 1,27 ± 2,02 | 2,67 ± 2,44 | 10 min | 2 | Honig | 15 | 0,21 |
| | ♀ | ♀ | 0,67 ± 1,59 | 3,47 ± 2,67 | 10 min | 5 | Honig | 15 | 0,03* |
| | ♂ | ♀ | 0,93 ± 1,22 | 0,87 ± 1,06 | 15 min | 2 | Honig | 15 | 0,95 |
| | ♂ | ♀ | 0,33 ± 0,62 | 0,67 ± 0,90 | 30 min | 2 | Honig | 15 | 0,16 |
| | ♂ | ♀ | 0,60 ± 1,24 | 0,60 ± 1,35 | 45 min | 2 | Pollen | 15 | 1,00 |
| | ♀ | ♀ | 0,40 ± 0,74 | 1,27 ± 2,15 | 45 min | 5 | Pollen | 15 | 0,40 |
| | ♂ | ♀ | 0,53 ± 0,74 | 1,27 ± 1,58 | 4 1/2h | 2 | Honig | 15 | 0,21 |
| Wasser | ♂ | ♀ | 1,47 ± 2,07 | 0,93 ± 1,75 | 15 min | 2 | | 15 | 0,50 |
| | ♀ | ♂ | 1,10 ± 1,95 | 2,57 ± 2,54 | 30 min | 5 | | 30 | 0,06 |
| | ♂ | ♂ | 1,87 ± 2,29 | 2,03 ± 2,24 | 1 h | 2 | | 30 | 0,79 |
| | ♂ | ♀ | 2,17 ± 2,41 | 1,67 ± 2,43 | 1 h | 5 | Honig | 30 | 0,69 |
| | ♀ | ♂ | 1,87 ± 2,29 | 2,03 ± 2,24 | 1 h | 2 | | 30 | 0,86 |
| | ♂ | ♀ | 1,20 ± 1,66 | 1,00 ± 1,65 | 4 1/2h | 2 | | 15 | 0,67 |
| | ♂ | ♀ | 2,00 ± 2,33 | 0,73 ± 1,39 | 4 1/2h | 2 | | 15 | 0,15 |
| EtOH | ♂ | ♀ | 1,43 ± 2,21 | 1,71 ± 2,40 | 10 min | 5 | | 15 | 0,81 |
| | ♂ | ♀ | 1,43 ± 2,38 | 1,43 ± 2,28 | 10 min | 5 | | 15 | 0,68 |
| | ♂ | ♀ | 1,14 ± 1,35 | 0,86 ± 1,35 | 10 min | 5 | | 15 | 0,59 |
| | ♂ | ♀ | 1,07 ± 1,33 | 0,80 ± 1,32 | 10 min | 5 | Honig | 15 | 0,53 |
| | ♂ | ♀ | 1,93 ± 2,12 | 1,07 ± 1,33 | 10 min | 5 | | 15 | 0,33 |
| | ♂ | ♀ | 2,47 ± 2,67 | 1,53 ± 2,29 | 10 min | 5 | | 15 | 0,42 |
| | ♀ | ♂ | 1,80 ± 2,04 | 1,93 ± 2,37 | 10 min | 5 | | 15 | 0,93 |
| | ♀ | ♂ | 0,60 ± 1,35 | 0,67 ± 1,11 | 10 min | 2 | | 15 | 0,60 |
| DE | ♂ | ♀ | 0,53 ± 0,74 | 1,53 ± 1,92 | 10 min | 2 | | 15 | 0,13 |
| | ♂ | ♀ | 0,93 ± 1,91 | 1,27 ± 2,05 | 30 min | 2 | Honig | 15 | 0,64 |
| | ♂ | ♀ | 0,60 ± 1,30 | 0,53 ± 0,52 | 30 min | 2 | | 15 | 0,71 |
| | ♂ | ♀ | 0,67 ± 0,98 | 1,60 ± 1,92 | 4 1/2 h | 2 | | 15 | 0,24 |
| Pentan | ♂ | ♀ | 0,27 ± 0,59 | 1,33 ± 2,09 | 15 min | 5 | Honig | 15 | 0,14 |

**Tab. II: Mittlere Anzahl ($\bar{x}$) Zählereignisse von Käfern auf Filterpapier mit Ganzkäferextrakten; n: Anzahl getesteter Käfer pro Versuchsreihe, E: Geschlecht Extraktkäfer, DM: Dichlormethan, DE: Diethylether; Mix: Extrakt aus Männchen und Weibchen, EtOH: Ethanol, WK: Wildkäfer, tWK: Tote Wildkäfer, VD: Verdampfungszeit, Käqu: Käferäquivalent pro Filterstück, uv: Unverpaarte, 3d alte Käfer (in Einzelgefäßen aufgezogen), v: Verpaarte Käfer, 21d alt, EZ: Extraktionszeit, p: Wilcoxon Matched-Pairs Test.**

a)

| Lösungs-mittel | T | E | $\bar{x}$T | $\bar{x}$K | EZ | VZ | Käqu | n | p-Wert |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | uv ♂ | uv ♀ | 1,10 ± 2,04 | 0,87 ± 1,83 | 2d | 5 min | 0,2 | | 0,44 |
| | uv ♂ | uv ♀ | 0,93 ± 1,86 | 0,60 ± 1,40 | 2d | 5 min | 0,2 | | |
| | uv ♂ | uv ♀ | 0,37 ± 1,00 | 1,00 ± 1,64 | 2d | 5 min | 0,5 | | 0,44 |
| | uv ♂ | uv ♀ | 0,33 ± 1,27 | 0,93 ± 1,57 | 2d | 15 min | 1 | | 0,18 |
| | uv ♂ | v ♀ | 1,93 ± 2,21 | 0,97 ± 1,99 | 2d | 5 min | 1 | | |
| Pentan | uv ♀ | uv ♂ | 0,17 ± 0,75 | 0,77 ± 1,50 | 2d | 5 min | 1 | | 0,57 |
| | uv ♀ | uv ♀ | 0,67 ± 1,49 | 0,70 ± 1,44 | 2d | 5 min | 1 | 30 | 0,78 |
| | v ♂ | v ♀ | 1,57 ± 1,62 | 1,00 ± 1,59 | 2d | 5 min | 1 | | |
| | v ♂ | v ♀ | 1,43 ± 1,59 | 0,90 ± 1,42 | 2d | 5 min | 1 | | 0,30 |
| | v ♂ | v ♀ | 1,93± 2,23 | 2,13± 2,43 | 2d | 5 min | 1 | | |
| | v ♀ | v ♂ | 1,25 ± 1,73 | 0,89 ± 1,62 | 2d | 5 min | 1 | | 0,30 |
| | v ♀ | v ♀ | 0,97 ± 1,22 | 0,53 ± 0,82 | 2d | 5 min | 1 | | 0,13 |
| | ♀WK | uv ♀ | 0,37 ± 1,16 | 0,07 ± 0,25 | 9h | 45 min | 1 | | 0,14 |
| | uv ♂ | uv ♀ | 0,93 ± 1,64 | 0,80 ± 1,83 | | | 1 | | 0,71 |
| | uv ♀ | uv ♂ | 0,20 ± 0,48 | 0,47 ± 0,97 | | | 0,2 | | 0,27 |
| | uv ♀ | uv ♂ | 0,63 ± 1,65 | 0,67 ± 1,79 | | | 0,4 | | 0,96 |
| | uv ♀ | uv ♀ | 0,63 ± 1,65 | 1,43 ± 2,30 | | | 1 | | 0,20 |
| | uv ♀ | uv ♀ | 1,03 ± 2,19 | 0,40 ± 1,30 | 2d | 5 min | 1 | 30 | 0,24 |
| DM | uv ♀ | uv ♀ | 0,90 ± 1,90 | 1,00 ± 1,91 | | | 1M | | 0,92 |
| | uv ♀ | uv ♀ | 1,00 ± 1,84 | 0,83 ± 1,60 | | | 1M | | |
| | ♂WK | ♂WK | 0,93 ± 1,82 | 2,00 ± 2,33 | | | 1 | | 0,08 |
| | ♂WK | ♀WK | 0,53 ± 1,55 | 0,07 ± 0,25 | | | 1 | | 0,13 |
| | ♀WK | ♀WK | 0,53 ± 1,06 | 0,07 ± 0,26 | 9h | 45 min | 1M | 15 | 0,40 |
| | ♀WK | ♀WK | 0,47 ± 1,55 | 0,21 ± 0,58 | | | | | |
| | ♀WK | ♀WK | 0,13 ± 0,35 | 0,67 ± 1,23 | 9h | 45 min | 1 | 30 | 0,15 |
| | ♀WK | ♀WK | 0,40 ± 0,83 | 1,00 ± 1,96 | | | | | |

**b) Testkäfer verpaart und 20 bis 25 d alt; vier Käferäquivalente (Käqu) pro Filterstück; Mix: Extraktkäfer gemischten Alters und Geschlechts; z = zehn Käqu**

| Lösungsmittel | T | E | x̄T | x̄K | EZ | VD | n | p-Wert |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ♂ | ♂tWK | 0,53 ± 1,55 | 2,93 ± 2,78 | | | | 0,005* |
| | ♂ | ♂ | 1,17 ± 2,13 | 1,83 ± 2,56 | | 5min | | 0,06 |
| | ♂ | ♀ tWK | 2,33 ± 2,90 | 2,33 ± 2,73 | | 5min | | 0,19 |
| | ♂ | ♀ tWK | 1,10 ± 1,97 | 2,83 ± 2,83 | | 5min | | |
| | ♂ | ♀ WK | 2,10 ± 2,62 | 1,23 ± 1,99 | | 5min | | 0,23 |
| | ♂ | ♀ | 1,97 ± 2,17 | 1,73 ± 2,21 | | 5min | | 0,17 |
| | ♂ | ♀ | 2,17 ± 2,12 | 1,23 ± 1,81 | | 5min | | |
| Pentan | ♀ | ♂ tWK | 1,90 ± 2,28 | 2,33 ± 2,28 | | 5min | 30 | 0,17 |
| | ♀ | ♂ tWK | 1,33 ± 1,83 | 2,47 ± 2,42 | 2d | 5min | | |
| | ♀ | ♂ | 0,93 ± 1,95 | 2,47 ± 2,76 | | 5min | | 0,06 |
| | ♀ | ♀ tWK | 1,25 ± 2,30 | 3,00 ± 2,65 | | 1 min | | 0,09 |
| | ♀ | ♀ tWK | 1,27 ± 2,07 | 2,40 ± 2,58 | | 25 min | | 0,16 |
| | ♀ | ♀ | 1,27 ± 1,98 | 1,93 ± 2,50 | | 5 min | | 0,90 |
| | ♀ | ♀ | 1,57 ± 2,10 | 1,07 ± 1,84 | | 5 min | | |
| | ♀ | ♀z | 0,20 ± 0,42 | 3,20 ± 2,53 | | 5 min | 10 | 0,01* |
| | ♂ | | 3,07 ± 3,01 | 2,87 ± 3,04 | | 2h | | 0.98 |
| Wasser | ♀ | | 2,87 ± 2,70 | 1,87 ± 2,47 | 6h | 2h | 30 | 0,54 |
| | ♀ | Mix | 0,73 ± 0,88 | 0,27 ± 0,46 | | 30 min | | 0,08 |
| EtOH | ♂ | | 2,47 ± 2,80 | 2,27 ± 2,76 | | 15 min | 30 | 0,90 |
| | ♀ | | 2,93 ± 2,60 | 1,47 ± 2,42 | | 15 min | | 0,35 |

**c) Testkäfer 7d alt, Alter: Alter der extrahierten Käfer; Extraktionszeit Pentan 4 h, Diethylether 1d oder 8 h (<); Käqu = Käferäquivalente pro Filterstück; verschiedene Substrate (Honig und Pollen).**

| Lösungs-mittel | T | E | x̄T | x̄K | Alter | Substrat | Käqu | n | p-Wert |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ♂ | ♂ | 0,67 ± 1,24 | 4,10 ± 2,02 | 7d | Pollen | 5 | 30 | 0,0001*** |
| Pentan | ♂ | ♀ | 1,23 ± 1,89 | 2,67 ± 2,59 | 7d | Pollen | 5 | 30 | 0,07 |
| | ♂ | ♀ | 1,43 ± 1,48 | 1,67 ± 1,69 | 7d | Honig | 5 | 30 | 0,64 |
| | ♂ | ♂ | 0,30 ± 0,95 | 2,20 ± 1,93 | 21d | Honig | 13 | 10 | 0,03* |
| | ♂ | ♀< | 1,47 ± 1,89 | 2,20 ± 2,20 | 10d | Honig | 5 | 30 | 0,25 |
| DE | ♀ | ♂ | 0,73 ± 1,05 | 1,17 ± 1,62 | 10d | Honig | 5 | 30 | 0,43 |
| | ♀ | ♂ | 1,50 ± 1,35 | 0,80 ± 1,03 | 21d | Honig | 13 | 10 | 0,29 |
| | ♀ | ♀ | 1,93 ± 2,08 | 2,07 ± 2,24 | 10d | Honig | 5 | 30 | 0,84 |

**Tab. III: Anzahl Käfer (nK) in Ablegern und Wirtschaftsvölkern (Volk) an den beiden Standorten (Gretchen's und Campus). a): Mit vorherigem Absammeln der Käfer; b): Ohne vorheriges Absammeln der Käfer; x: Kollabiert.**

a)

| Volknr. | Gretchen's | | Campus | |
|---|---|---|---|---|
| | nK Ableger | nK Volk | nK Ableger | nK Volk |
| 1 | 12 | 26 | 21 | 10 |
| 2 | x | - | 10 | 8 |
| 3 | 16 | 9 | 13 | 6 |
| 4 | 10 | 18 | 33 | 26 |
| 5 | 8 | 10 | x | - |
| 6 | 14 | 8 | x | - |

b)

| Volknr. | Gretchen's | | Campus | |
|---|---|---|---|---|
| | nK Ableger | nK Volk | nK Ableger | nK Volk |
| 1 | 7 | 51 | 17 | 33 |
| 2 | 12 | 60 | 77 | 61 |
| 3 | 48 | 20 | x | 89 |
| 4 | 7 | 306 | x | 17 |
| 5 | 7 | 18 | 22 | 77 |
| 6 | 5 | 28 | x | 32 |

**Tab. IV: Ergebnisse der Olfaktometer-Tests: n: Anzahl Testdurchläufe; Test: Mittelwert ± S.D. der Aufenthaltsdauer in Sekunden auf dem Testfeld mit Probe; Kontrolle: Mittelwert ± S.D. der Aufenthaltsdauer in Sekunden auf dem Testfeld gegenüber liegenden Kontrollfeld. Signifikanzen traten nur in Form von Repellentwirkungen auf (Effekt), Wilcoxon Matched-Pairs Test.**

| Probe Testfeld | Geschlecht Testkäfer | n | Test | Kontrolle | P | Effekt |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Decanal (100%) | ♀ Wildkäfer | 30 | 11,68 ± 15,65 | 188,98 ± 134,62 | < 0,0001 | Repellent |
| Decanal (1%) | ♂ Wildkäfer | 15 | 4,06 ± 5,98 | 242,99 ± 91,79 | < 0,001 | Repellent |
| 2-Nonanon (100%) | ♀ Wildkäfer | 30 | 11,8 ± 21,21 | 148,95 ± 96,10 | < 0,0001 | Repellent |
| 2-Nonanon (1%) | ♂ Wildkäfer | 30 | 5,60 ± 19,74 | 154,46 ± 123,14 | < 0,0001 | Repellent |
| Isopentyl-Acetat | ♀ Laborzucht | 30 | 69,09 ± 37,91 | 92,92 ± 62,18 | 0,14 | - |
| v♂ | uv♀ Lab | 13 | 34,93 ± 38,94 | 167,85 ± 114,26 | < 0,01 | Repellent |
| v♀ | uv♂ Lab | 13 | 58,10 ± 34,63 | 96,66 ± 49,10 | < 0,05 | Repellent |
| v♀ | v♂ Lab | 23 | 74,02 ± 57,07 | 96,27 ± 62,82 | 0,05 | - |
| v♂ mit v♀ | uv♂ Lab | 30 | 89,14 ± 56,60 | 78,14 ± 69,78 | 0,59 | - |
| lebende Bienen | ♂ Wildkäfer | 15 | 86,01 ± 98,28 | 103,01 ± 89,70 | 0,33 | - |
| | ♀ Wildkäfer | 15 | 91,07 ± 98,90 | 106,74 ± 115,99 | 0,91 | - |
| Honig | ♂ Wildkäfer | 30 | 77,96 ± 44,48 | 106,30 ± 44,33 | 0,32 | - |
| | ♀ Wildkäfer | 30 | 93,28 ± 64,57 | 88,92 ± 83,22 | 0,84 | - |
| | ♀ Lab | 10 | 137,35 ± 98,65 | 69,72 ± 50,17 | 0,14 | |
| Larven | ♂ Wildkäfer | 10 | 67,74 ± 41,37 | 159,28 ± 128,54 | 0,29 | - |
| | ♀ Wildkäfer | 10 | 124,12 ± 135,85 | 146,86 ± 87,21 | 0,11 | - |
| Puppen | ♂ Wildkäfer | 5 | 50,58 ± 40,20 | 104,84 ± 69,75 | 0,12 | - |
| | ♀ Wildkäfer | 5 | 69,76 ± 39,61 | 190,12 ± 138,90 | 0,14 | - |
| Kontrolle | ♂ Wildkäfer | 15 | 89,80 ± 33,03 | 111,58 ± 43,50 | < 0,05 | Repellent |
| (Testfeld leer) | ♀ Wildkäfer | 15 | 109,84 ± 131,84 | 82,98 ± 68,51 | 0,57 | |

# 10 Literatur


ANONYMOUS (2005) Loosing queens at Londonderry, *The Land, Upfront News*: 24th March 2005.

ANNAND, N. 2011. *Small Hive Beetle (Aethina tumida) Fact Sheet* [Online]. NHIS. Available: http://nahis.animalhealthaustralia.com.au/pmwiki/pmwiki.php?n=Factsheet.162-2?skin=factsheet [Accessed 27.10.2013 2013].

ARBOGAST, R. T., TORTO, B. & TEAL, P. E. A. 2009. Monitoring the small hive beetle *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) with baited flight traps: Effect of distance from bee hives and shade on the numbers of beetles captured. *Florida Entomologist,* 92**,** 165-166.

ARBOGAST, R. T., TORTO, B., VAN ENGELSDORP, D. & TEAL, P. E. A. 2007. An effective trap and bait combination for monitoring the small hive beetle, *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *Florida Entomologist,* 90**,** 404.

ARBUTHNOTT, D. & CRESPI, B. J. 2009. Courtship and mate discrimination within and between species of *Timema* walking-sticks. *Animal Behaviour,* 78**,** 53-59.

ARNAUD, L. & HAUBRUGE, E. 1999. Mating behaviour and male mate choice in *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Behaviour,* 136**,** 67-77.

BARTELT, R., SCHANER, A. & JACKSON, L. 1985. cis-Vaccenyl acetate as an aggregation pheromone in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Chemical Ecology,* 11**,** 1747-1756.

BARTELT, R. J., WEAVER, D. K. & ARBOGAST, R. T. 1995. Aggregation pheromone of *Carpophilus dimidiatus* (F) (Coleoptera: Nitidulidae) and responses to *Carpophilus* pheromones in South Carolina. *Journal Of Chemical Ecology,* 21**,** 1763-1779.

BLACKMER, J. L. & PHELAN, P. L. 1991. Behaviour of *Carpophylus hemipterus* in a vertical flight chamber: transition from phototactic to vegetative orientation. *Entomologia Experimentalis Et Applicata,* 58**,** 137-148.

BLOCH QAZI, M. C. 2003. A potential mechanism for cryptic female choice in a flour beetle. *Journal Of Evolutionary Biology,* 16**,** 170-176.

BOECKING, O. 2005. Der Kleine Beutenkäfer *Aethina tumida*: Wichtige morphologische Bestimmungsmerkmale und Lebenszyklus.

BROWN, W. D., CRESPI, B. J. & CHOE, J. C. 1997. Sexual conflict and the evolution of mating systems. *In:* Choe, J. C. & Crespi, B. J. (eds.) *Mating Systems in Insects and Arachnids.* Cambridge University Press.

BUCHHOLZ, S., SCHÄFER, M. O., SPIEWOK, S., PETTIS, J. S., DUNCAN, M., RITTER, W., SPOONER-HART, R. & NEUMANN, P. 2008. Alternative food sources of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *Journal of Apicultural Research,* 47**,** 202.

BUSCH, W. 1949. *Neues Wilhelm Busch Album,* Gütersloh, Bertelsmann Verlag.

CHOE, J. C. 1997. The evolution of mating systems in Zoraptera: mating variations and sexual conflicts. *In:* Choe, J. C. & Crespi, B. J. (eds.) *Mating Systems in Insects and Arachnids.* Cambridge University Press.

CHOE, J. C. & CRESPI, B. J. E. (eds.) 1997. *The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids*: Cambridge University Press.

CLUTTON-BROCK, T. 2009. Sexual selection in females. *Animal Behaviour,* 77**,** 3-11.

DARWIN, C. 1871. *The descent of man and selection in relation to sex,* London, John Murray.

DEN HOLLANDER, M. & GWYNNE, D. T. 2009. Female fitness consequences of male harassment and copulation in seed beetles, Callosobruchus maculatus. *Animal Behaviour,* 78**,** 1061-1070.

DICKINSON, J. L. 1997. Multiple matings, sperm competition and cryptic female choice in leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *In:* Choe, J. C. & Crespi, B. J. (eds.) *Mating Systems in Insects and Arachnids.* Cambridge University Press.

EBERHARD, W. G. 1997. Erratum: Female control: Sexual selection by cryptic female choice (Animal Behavior (1997) 53 (445)). *Animal Behaviour,* 53**,** 1127.

EISCHEN, F. A., BAXTER, J. R., ELZEN, P. J., WESTERVELT, D. & WILSON, W. T. 1998. Is the small hive beetle a serious pest of US honey bees? *American Bee Journal,* 138**,** 882-883.

EL-NIWEIRI, M. A. A., EL-SARRAG, M. S. & NEUMANN, P. 2008. Filling the Sudan gap: The northernmost natural distribution limit of small hive beetles. *Journal of Apicultural Research,* 47**,** 184.

ELLIS, A. & DELAPLANE, K. S. 2008a. Effects of nest invaders on honey bee (*Apis mellifera*) pollination efficacy. *Agriculture, Ecosystems and Environment,* 127**,** 201-206.

ELLIS, J., D., HEPBURN, R. & ELZEN, P., J. 2004a. Confinement of small hive beetles (*Aethina tumida*) by Cape honeybees (*Apis mellifera capensis*). *Apidologie,* 35**,** 389-396.

ELLIS, J. D. & DELAPLANE, K. S. 2008b. Small hive beetle (*Aethina tumida*) oviposition behaviour in sealed brood cells with notes on the removal of the cell contents by European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal Of Apicultural Research,* 47**,** 210-215.

ELLIS, J. D., DELAPLANE, K. S., HEPBURN, R. & ELZEN, P. J. 2002a. Controlling small hive beetles (*Aethina tumida* Murray) in honey bee (*Apis mellifera*) colonies using a modified hive entrance. *American Bee Journal,* 142**,** 288-290.

ELLIS, J. D., DELAPLANE, K. S. & HOOD, W. M. 2002b. Small hive beetle (*Aethina tumida* Murray) weight, gross biometry, and sex proportion at three locations in the southeastern United States. *American Bee Journal,* 142**,** 520-522.

ELLIS, J. D., DELAPLANE, K. S., RICHARDS, C. S., HEPBURN, R., BERRY, J. A. & ELZEN, P. J. 2004b. Hygienic behavior of Cape and European Apis mellifera (Hymenoptera : Apidae) toward *Aethina tumida* (Coleoptera : Nitidulidae) eggs oviposited in sealed bee brood. *Annals Of The Entomological Society Of America,* 97**,** 860-864.

ELLIS, J. D., HEPBURN, R. & ELZEN, P. J. 2004c. Confinement behavior of Cape honey bees (*Apis mellifera capensis* Esch.) in relation to population densities of small hive beetles (*Aethina tumida* Murray). *Journal Of Insect Behavior,* 17**,** 835-842.

ELLIS, J. D., HEPBURN, R. & ELZEN, P. J. 2004d. Confinement of small hive beetles (*Aethina tumida*) by Cape honeybees (*Apis mellifera capensis*). *Apidologie,* 35**,** 389-396.

ELLIS, J. D., HEPBURN, R., LUCKMAN, B. & ELZEN, P. J. 2004e. Effects of soil type, moisture, and density on pupation success of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *Environmental Entomology,* 33**,** 794.

ELLIS, J. D., PIRK, C. W. W., HEPBURN, H. R., KASTBERGER, G. & ELZEN, P. J. 2002c. Small hive beetles survive in honeybee prisons by behavioural mimicry. *Naturwissenschaften,* 89**,** 326-328.

ELLIS, J. D., RICHARDS, C. S., HEPBURN, H. R. & ELZEN, P. J. 2003. Oviposition by small hive beetles elicits hygienic responses from Cape honeybees. *Naturwissenschaften,* 90**,** 532-535.

ELLIS, J. D., SPIEWOK, S., DELAPLANE, K. S., BUCHHOLZ, S., NEUMANN, P. & TEDDERS, W. L. 2010. Susceptibility of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) larvae and pupae to entomopathogenic nematodes. *Journal Of Economic Entomology,* 103**,** 1-9.

ELZEN, P. J., BAXTER, J. R., NEUMANN, P., SOLBRIG, A., PIRK, C., HEPBURN, H. R., WESTERVELT, D. & RANDALL, C. 2001. Behaviour of African and European subspecies of *Apis mellifera* toward the small hive beetle, *Aethina tumida*. *Journal Of Apicultural Research,* 40**,** 40-41.

ELZEN, P. J., BAXTER, J. R., WESTERVELT, D., RANDALL, C., DELAPLANE, K. S., CUTTS, L. & WILSON, W. T. 1999. Field control and biology studies of a new pest species, *Aethina tumida* Murray (Coleoptera, Nitidulidae), attacking European honey bees in the Western Hemisphere. *Apidologie,* 30**,** 361-366.

FADAMIRO, H. Y. & WYATT, T. D. 1996. Factors influencing response of flying *Prostephanus truncatus* to its male-produced aggregation pheromone. *Physiological Entomology,* 21**,** 179-187.

FIGUEIRAS, A., GIROTTI, J., MIJAILOVSKY, S. & JUAREZ, M. P. 2009. Epicuticular lipids induce aggregation in Chagas disease vectors. *Parasites & Vectors,* 2**,** 8.

FRANZ, N. M. 2003. Mating behaviour of *Staminodeus vectoris* (Coleoptera : Curculionidae), and the value of systematics in behavioural studies. *Journal Of Natural History,* 37**,** 1727-1750.

GILLESPIE, T., STAPLES, J., KING, C., FLETCHER, M. & DOMINIAC, B. 2003. Small hive beetle, *Aethina tumida* (Murray, Coleoptera: Nitidulidae) in New South Wales. *Gen. Appl. Ent.,* 32**,** 5-7.

GORB, S. N. 1998. Frictional surfaces of the elytra-to-body arresting mechanism in tenebrionid beetles (Coleoptera: Tenebrionidae): Design of co-opted fields of microtrichia and cuticle ultrastructure. *International Journal of Insect Morphology and Embryology,* 27**,** 205-225.

HARARI, A. R., BROCKMANN, H. J. & LANDOLT, P. J. 2000. Intrasexual mounting in the beetle *Diaprepes abbreviatus* (L.). *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences,* 267**,** 2071-2079.

HASSAN, A. R. & NEUMANN, P. 2008. A survey for the small hive beetle in Egypt. *Journal Of Apicultural Research,* 47**,** 186-187.

HASSANALI, A. & TORTO, B. 1999. *Grasshoppers and locusts*. CABI Publishing, New York.

HEMPTINNE, J. L., LOGNAY, G. & DIXON, A. F. G. 1998. Mate recognition in the two-spot ladybird beetle, *Adalia bipunctata*: role of chemical and behavioural cues. *Journal Of Insect Physiology,* 44**,** 1163-1171.

HENNIG, W. 1994. *Wirbellose II*, Gustav Fischer Verlag Jena.

HEPBURN, H. R. & RADLOFF, S. 1998. *Honeybees of Africa,* Heidelberg, Springer Verlag.

HOOD, W. M. 2004. The small hive beetle, *Aethina tumida*: a review. *Bee World,* 85**,** 51-59.

HOOD, W. M. 2006. Evaluation of two small hive beetle traps in honey bee colonies. *American Bee Journal,* 146**,** 873.

HOOD, W. M. & MILLER, G. A. 2005. Evaluation of an upper hive entrance for control of Aethina tumida (Coleoptera: Nitidulidae) in colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology,* 98**,** 1791.

JACOBS, W. & RENNER, M. 1998. *Biologie und Ökologie der Insekten,* Stuttgart.

JAMES, D. G., BARTELT, R. J. & FAULDER, R. J. 1994. Attraction Of *Carpophilus spp* (Coleoptera, Nitidulidae) To Synthetic Aggregation Pheromones And Host-Related Coattractants In Australian Stone Fruit Orchards - Beetle Phenology And Pheromone Dose Studies. *Journal Of Chemical Ecology,* 20**,** 2805-2819.

JOHANNSMEIER, M. F. (ed.) 2001. *Beekeeping in South Africa*. Agricultural Research Council of South Africa, Plant Protection Research Institute.

KEASAR, T., SHIHADEH, S., SHMIDA, A., MAJALI, N., WEIL, D. & REUVEN, N. 2007. An evaluation of mini-nucleus honey bee hives for the pollination of honeydew melons in enclosures. *Journal of Apicultural Research,* 46**,** 264-268.

KIM, J. L., PARK, S. O. & YAMASAKI, T. 1999. Sensilla on the aedeagi of the genus *Damaster* (Insecta, Coleoptera, Carabidae). *Korean Journal of Biological Sciences,* 3**,** 23-28.

LACEY, E. S., GINZEL, M. D., MILLAR, J. G. & HANKS, L. M. 2008. 7-methylheptacosane is a major component of the contact sex pheromone of the cerambycid beetle *Neoclytus acuminatus acuminatus*. *Physiological Entomology,* 33**,** 209-216.

LAIDLAW, H. H. & PAGE, R. E. 1998. *Queen Rearing and Bee Breeding,* Kalamazoo, Michigan, Wicwas Press, LLC.

LATTY, T. M., MAGRATH, M. J. L. & SYMONDS, M. R. E. 2009. Harem size and oviposition behaviour in a polygynous bark beetle. *Ecological Entomology,* 34**,** 562-568.

LEVAN, K. E., FEDINA, T. Y. & LEWIS, S. M. 2009. Testing multiple hypotheses for the maintenance of male homosexual copulatory behaviour in flour beetles. *Journal Of Evolutionary Biology,* 22**,** 60-70.

LIEBIG, G. 2000. Völker vermehren – leicht gemacht, Bildung von Jungvölkern in vier Schritten. *Deutsches Bienen Journal* 5**,** 4-7.

LIHOREAU, M. & RIVAULT, C. 2008. Tactile stimuli trigger group effects in cockroach aggregations. *Animal Behaviour,* 75**,** 1965-1972.

LOUNSBERRY, Z., SPIEWOK, S., PERNAL, S. F., SONSTEGARD, T. S., HOOD, W. M., PETTIS, J., NEUMANN, P. & EVANS, J. D. 2010. Worldwide diaspora of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae), a nest parasite of honey bees. *Annals Of The Entomological Society Of America,* 103**,** 671-677.

LÖWE, A., NEUMANN, P., PETTIS, J. S. & FERENZ, H. J. Reproductive anatomy of the Small Hive Beetle *Aethia tumida*, Coleoptera Nitidulidae. Eurbee 5, 2012 Halle an der Saale.

LUNDIE, A. 1940. The small hive beetle *Aethina tumida*. *In:* 3, U. O. S. A. D. O. A. A. F. E. S. (ed.) *Science Bulletin 220.* Pretoria: Government Printer.

MAKLAKOV, A. A. & BONDURIANSKY, R. 2009. Sex differences in survival costs of homosexual and heterosexual interactions: evidence from a fly and a beetle. *Animal Behaviour,* 77**,** 1375-1379.

MARTINS, C. B. C., DE ALMEIDA, L. M. & ZARBIN, P. H. G. 2012. Scanning electron micrographs of *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae), plastron structure and swimming behavior. *Micron,* 43**,** 321-325.

MOON, M.-J., PARK, J.-G., OH, E. & KIM, K.-H. 2008. External microstructure of the ambrosia beetle *Platypus koryoensis* (Coleoptera: Curculionidae: Platypodinae). *Entomological Research,* 38**,** 202-210.

MOSTAFA, A. M. & WILLIAMS, R. N. 2002. New record of the small hive beetle in Egypt and notes on its distribution and control. *Bee World,* 83**,** 99-108.

MÜLLER, W. A. 1997. *Tier- und Humanphysiologie*, Springer Verlag.

MURRAY, A. 1867. List of Coleoptera received from Old Calabar. London: Annual Magazin of Natural History.

MÜRRLE, T. & NEUMANN, P. 2004. Mass production of small hive beetles (*Aethina tumida*, Coleoptera: Nitidulidae). *Journal of Apicultural Research,* 43**,** 144-145.

NEUMANN, P. & ELLIS, J. D. 2008. The small hive beetle (*Aethina tumida* Murray, Coleoptera: Nitidulidae): Distribution, biology and control of an invasive species. *Journal of Apicultural Research,* 47**,** 181-183.

NEUMANN, P. & ELZEN, P. J. 2004. The biology of the small hive beetle (*Aethina tumida*, Coleoptera: Nitidulidae): Gaps in our knowledge of an invasive species. *Apidologie,* 35**,** 229-247.

NEUMANN, P. & HÄRTEL, S. 2003. Removal of small hive beetle (*Aethina tumida* Murray) eggs and larvae by African honeybee colonies (*Apis mellifera scutellata* Lepeletier). *Apidologie,* 34**,** 31-36.

NEUMANN, P., PIRK, C. W. W., HEPBURN, H. R., SOLBRIG, A. J., RATNIEKS, F. L. W., ELZEN, P. J. & BAXTER, J. R. 2001. Social encapsulation of beetle parasites by Cape honeybee colonies (*Apis mellifera capensis* Esch.). *Naturwissenschaften,* 88**,** 214-216.

NOLAN, M. P. & HOOD, W. M. 2008. Comparison of two attractants to small hive beetles, *Aethina tumida*, in honey bee colonies. *Journal Of Apicultural Research,* 47**,** 229-233.

OTRONEN, M. 1997. Sperm numbers, their storage and usage in the fly *Dryomyza anilis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences,* 264**,** 777-782.

PAPADOPOULOS, N. T., KATSOYANNOS, B. I., KOULOUSSIS, N. A. & HENDRICHS, J. 2001. Effect of orange peel substances on mating competitiveness of male *Ceratitis capitata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata,* 99**,** 253-261.

PETROSKI, R. J. & WEISLEDER, D. 1997. Inhibition of *Carpophilus freemani* Dobson (Coleoptera: Nitidulidae) aggregation pheromone response by a Z-double-

bond pheromone analog. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry,* 45**,** 943-945.

PUNIAMOORTHY, N., ISMAIL, M. R. B., TAN, D. S. H. & MEIER, R. 2009. From kissing to belly stridulation: Comparative analysis reveals surprising diversity, rapid evolution, and much homoplasy in the mating behaviour of 27 species of sepsid flies (Diptera: Sepsidae). *Journal Of Evolutionary Biology,* 22**,** 2146-2156.

RIVERS, T. J. & MORIN, J. G. 2009. Plasticity of male mating behaviour in a marine bioluminescent ostracod in both time and space. *Animal Behaviour,* 78**,** 723-734.

SCHÄFER, M., O., PETTIS, J., S., RITTER, W. & NEUMANN, P. 2008. A scientific note on quantitative diagnosis of small hive beetles, *Aethina tumida*, in the field. *Apidologie,* 39**,** 564-565.

SCHARF, I. & MARTIN, O. Y. 2013. Same-sex sexual behavior in insects and arachnids: prevalence, causes, and consequences. *Behavioral Ecology and Sociobiology***,** 1-12.

SCHMOLKE, M. D. 1974. Study of *Aethina tumida*: The Small Hive-Beetle. University of Rhodesia.

SCHRÖDER, A. 2002. *Charakterisierung der Fermentation von Honig (Honigverderb) anhand chemischer, physikalischer, mikrobiologischer und sensorischer Parameter*. Dissertation, Universität Hohenheim.

SCHUTZE, M. K., YEATES, D. K., GRAHAM, G. C. & DODSON, G. 2007. Phylogenetic relationships of antlered flies, *Phytalmia Gerstaecker* (Diptera: Tephritidae): The evolution of antler shape and mating behaviour. *Australian Journal of Entomology,* 46**,** 281-293.

SCOTT, D., RICHMOND, R. C. & CARLSON, D. A. 1988. Pheromones exchanged during mating a mechanism for mate assessment in *Drosophila*. *Animal Behaviour,* 36**,** 1164-1173.

SPIEWOK, S., DUNCAN, M., SPOONER-HART, R., PETTIS, J. S. & NEUMANN, P. 2008. Small hive beetle, *Aethina tumida*, populations II: Dispersal of small hive beetles. *Apidologie,* 39**,** 683-693.

SPIEWOK, S. & NEUMANN, P. 2006. The impact of recent queenloss and colony phenotype on the removal of small hive beetle (*Aethina tumida* Murray) eggs and larvae by African honeybee colonies (*Apis mellifera capensis* Esch.). *Journal Of Insect Behavior,* 19**,** 601-611.

SPIEWOK, S., PETTIS, J. S., DUNCAN, M., SPOONER-HART, R., WESTERVELT, D. & NEUMANN, P. 2007. Small hive beetle, *Aethina tumida*, populations I: Infestation levels of honeybee colonies, apiaries and regions. *Apidologie,* 38**,** 595.

STAVENGA, D. G., WILTS, B. D., LEERTOUWER, H. L. & HARIYAMA, T. 2011. Polarized iridescence of the multilayered elytra of the Japanese jewel beetle, *Chrysochroa fulgidissima*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences,* 366**,** 709-723.

SUAZO, A., TORTO, B., TEAL, P. E. A. & TUMLINSON, J. H. 2003. Response of the small hive beetle (*Aethina tumida*) to honey bee (*Apis mellifera*) and beehive-produced volatiles. *Apidologie,* 34**,** 525-533.

SUBCHEV, M., TOSHOVA, T., KOSHIO, C., FRANKE, S., TROEGER, A., TWELE, R., FRANCKE, W., PICKETT, J. A., WADHAMS, L. J. & WOODCOCK, C. M. 2009. Identification and biological activity of sex pheromone components from females of the plum moth *Illiberis rotundata* Jordan (Lepidoptera: Zygaenidae: Procridinae). *Chemoecology,* 19**,** 47-54.

SUN, M., LIANG, A., WATSON, G. S., WATSON, J. A., ZHENG, Y. & JIANG, L. 2012. Compound Microstructures and Wax Layer of Beetle Elytral Surfaces and Their Influence on Wetting Properties. *PLoS One,* 7**,** e46710.

TORTO, B., ARBOGAST, R. T., ALBORN, H., SUAZO, A., VAN ENGELSDORP, D., BOUCIAS, D., TUMLINSON, J. H. & TEAL, P. E. A. 2007a. Composition of volatiles from fermenting pollen dough and attractiveness to the small hive beetle *Aethina tumida*, a parasite of the honeybee Apis mellifera. *Apidologie,* 38**,** 380.

TORTO, B., ARBOGAST, R. T., VAN ENGELSDORP, D., WILLMS, S., PURCELL, D., BOUCIAS, D., TUMLINSON, J. H. & TEAL, P. E. A. 2007b. Trapping of *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae) from *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) colonies with an in-hive baited trap. *Environmental Entomology,* 36**,** 1018.

TORTO, B., BOUCIAS, D. G., ARBOGAST, R. T., TUMLINSON, J. H. & TEAL, P. E. A. 2007c. Multitrophic interaction facilitates parasite–host relationship between an invasive beetle and the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 104**,** 8374-8378.

TORTO, B., NJAGI, P., HASSANALI, A. & AMIANI, H. 1996. Aggregation pheromone system of nymphal gregarious desert locust, *Schistocerca gregaria* (forskal). *Journal of Chemical Ecology,* 22**,** 2273 - 2281.

TORTO, B., SUAZO, A., ALBORN, H., TUMLINSON, J. H. & TEAL, P. E. A. 2005. Response of the small hive beetle (*Aethina tumida*) to a blend of chemicals identified from honeybee (*Apis mellifera*) volatiles. *Apidologie,* 36**,** 523-532.

TURCO, F., DI GIULIO, A. & BOLOGNA, M. A. 2003. Sexual and cleaning behavior and related morphology in the genus *Cerocoma* (Coleoptera: Meloidae). *Journal of Insect Behavior,* 16**,** 257-278.

UNEP 2010. Global Honey Bee Colony Disorder and Other Threats to Insect Pollinators). *UNEP Emerging Issues*.

WAGNER, T., NEINHUIS, C. & BARTHLOTT, W. 1996. Wettability and contaminability of insect wings as a function of their surface sculptures. *Acta Zoologica (Stockholm),* 77**,** 213-225.

WYATT, T. D. 2003. *Pheromones and Animal Behaviour*, Oxford Press.

ZILKOWSKI, B. W., BARTELT, R. J., BLUMBERG, D., JAMES, D. G. & WEAVER, D. K. 1999. Identification of host-related volatiles attractive to pineapple beetle *Carpophilus humeralis*. *Journal Of Chemical Ecology,* 25**,** 229-252.

# Danksagung

Als Erstes gilt mein Dank meinen Betreuern Peter Rosenkranz und Hannes Steidle für ihre Unterstützung und Geduld. Mit ihrer Hilfe konnte ich dieses interessante Thema bearbeiten, dessen Reiz und Herausforderung darin bestand, sich mit einem so wenig untersuchten Organismus, dem Kleinen Beutenkäfer (*Aethina tumida*) zu beschäftigen.

Robert Paxton danke ich für das Erstellung des Zweitgutachtens, Aufmunterung und Präsenz im Hintergrund.

Sehr großer Dank gilt all unseren Kooperationspartnern auf der ganzen Welt, ohne die unsere Forschung niemals möglich gewesen wäre. Außer uns ihre Labore und Arbeitsutensilien zur Verfügung zu stellen, wurden wir von ihnen überall herzlichst aufgenommen und empfangen.

In Südafrika sind zu nennen: Randall und seine wunderbare Frau Colleen Hepburn, Thomas Mürrle, der uns Bienenvölker zur Verfügung stellte und tatkräftige Unterstützung lieferte, und Martin Hill.

In den USA Jeff Pettis, Nathan und Barth. Bob (RIP) und Bobby danke ich für Unterkunft, vor allem und im speziellen das Baumhaus und den Aufenthalt auf ihrem wunderbaren Grundstück mit einem der bizarrsten Häuser, das ich je kennenlernen durfte. Jay Evans danke ich, außer für temporäre Unterkunft, dafür, dass er mich immer wieder aufegbaut hat, wenn ich den Glauben an mich verloren hatte.

In Australien, wo ich die meiste Zeit verbracht habe, danke ich Michael Duncan für Unterstützung auf allen Ebenen, Robert-Spooner Hart für die Gastfreundschaft und Hilfe beim den Papers, Peter und Samita für die Hilfe bei Beschaffung von Arbeitsutensilien und Laborplätzen, Roisaly Laing, der Gute Seele des Instituts, und Gillian für Verwaltungsarbeiten, Albert für den Flugkäfig.

Den Imkern Frank Malfroy, Pat Carroll und Gretchen Ween (RIP) danke ich für Königinnen und Stellplätze für unsere Bienenvölker.

Meinen Kollegen Sebastian Spiewok, Marc Schäfer, Sven Buchholz und Peter Neumann für jegliche Hilfe und die Gesellschaft während unserer Forschungsaufenthalte.

Till Tolasch danke ich für die chemischen Analysen, Charly Helmer für das Erstellen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit mir und Professor Bessei für den

uneingeschränkten Zugang zu einem Computer mit Observer Software, an dem ich unzählige Stunden verbrachte. Kim Krauss danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Für finanzielle Unterstützung meiner Forschung und Forschungsreisen danke ich dem BLE, sowie den Hohenheimer Freunden für temporäre Unterstützung.

Meinen Eltern Mahmoud und Brigitte Mustafa, sowie meiner Schwester Carmen danke für ihre immerwährende, uneingeschränkte Unterstützung in jeglicher Form. Ebenso danke ich all meinen Freunden einfach fürs Dasein und das Ertragen meiner selbst in dieser Zeit. Hier sind insbesondere Rainer Radtke, Shanthi Schwinge, Tobi, der Rudle, Udo (dem ich auch für die Nachbearbeitungen der Zeichnungen danke) und Nik zu nennen.

Die Arbeit ist Emma Mina und Herbert Noller, El Zaher und dem Karle gewidmet.

# Eidesstattliche Versicherung gemäß § 7 Absatz 7 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat.

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema:
   Reproduktionsbiologie und olfaktorisches Verhalten des Kleinen Beutenkäfers *Aethina tumida* MURRAY 1867 (Nitidulidae)
   handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.

4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich: Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Tübingen, 09.07.2014 S. G. Mustafa

# Eidesstattliche Versicherung, Belehrung

Die Universität Hohenheim verlangt eine Eidesstattliche Versicherung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistungen, um sich glaubhaft zu versichern, dass die Promovendin bzw. der Promovend die wissenschaftlichen Leistungen eigenständig erbracht hat.

Weil der Gesetzgeber der Eidesstattlichen Versicherung eine besondere Bedeutung beimisst und sie erhebliche Folgen haben kann, hat der Gesetzgeber die Abgabe einer falschen eidesstattlichen Versicherung unter Strafe gestellt. Bei vorsätzlicher (also wissentlicher) Abgabe einer falschen Erklärung droht eine Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder eine Geldstrafe.

Eine fahrlässige Abgabe (also Abgabe, obwohl Sie hätten erkennen müssen, dass die Erklärung nicht den Tatsachen entspricht) kann eine Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder eine Geldstrafe nach sich ziehen.

Die entsprechenden Strafvorschriften sind in § 156 StGB (falsche Versicherung an Eides Statt) und in § 161 StGB (Fahrlässiger Falscheid, fahrlässige falsche Versicherung an Eides Statt) wiedergegeben.

<u>§ 156 StGB: Falsche Versicherung an Eides Statt</u>
Wer vor einer zur Abnahme einer Versicherung an Eides Statt zuständigen Behörde eine solche Versicherung falsch abgibt oder unter Berufung auf eine solche Versicherung falsch aussagt, wird mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

<u>§ 161 StGB: Fahrlässiger Falscheid, fahrlässige falsche Versicherung an Eides Statt</u>
Abs. 1: Wenn eine der in den §§ 154 und 156 bezeichneten Handlungen aus Fahrlässigkeit begangen worden ist, so tritt Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe ein.

Abs. 2: Straflosigkeit tritt ein, wenn der Täter die falsche Angabe rechtzeitig berichtigt. Die Vorschriften des § 158 Absätze 2 und 3 gelten entsprechend.

Ich habe die Belehrung zur Eidesstattlichen Versicherung zur Kenntnis genommen.

Tübingen, 09.07.2014 S. G. Mustafa