

ATTRAKTIVITÄT DER BRUTZELLEN FÜR *VARROA DESTRUCTOR* AUFGRUND VON SIGNALEN DES LARVENFUTTERS

F. NAZZI, N. MILANI, G. DELLA VEDOVA

Dipartimento di Biologia Applicata alla Difesa delle Piante, Università di
Udine, via delle Scienze 208, 33100 Udine, ITALIEN
e-mail: francesco.nazzi@pldef.uniud.it

Resümee

Die Untersuchung befaßte sich mit dem Studium der chemischen Signalisierungssubstanzen, die die Milben veranlassen, in die Brutzellen zur Reproduktion einzudringen.

Von Anfang an wurde an die mögliche Existenz gewisser Signale gedacht, die von den Bienenlarven befreit werden. Die Untersuchung bewies, daß das in der Brutzelle enthaltene Larvenfutter eine bedeutende Rolle in dem Eindringen in die Zellen spielt.

Die vorliegende Untersuchung bringt Informationen über die Identifizierungselemente der Larvenfutterbestandteile, die für das Anziehen der Varroamilben in die Brutzellen verantwortlich sind.

Stichwörter: Larvenfutter/*Varroa destructor*/Zellenbefall/chemische Substanzen

Einleitung

Varroa destructor Oud. dringt für ihre Vermehrung in die Brutzelle mit einer Bienenlarve noch vor deren Verdeckelung ein (BOOT et al., 12992). Die Idee, daß gewisse Anziehungsmittel, die an diesem Vorgang teilnehmen, bei der Bekämpfung der Milbe genau so Anwendung finden könnten wie andere Anziehungsmittel in der Bekämpfung von Schädlingen, veranlaßte uns, diese Untersuchung zu unternehmen.

Einige Verfasser untersuchten die Stimuli, die das Eindringen der Milbe in die Zellen verursachen. Von Anfang an konzentrierte sich die Untersuchung auf die von den Bienenlarven befreiten Reizsubstanzen. LE CONTE et al. (1989) zeigte, daß die Varroamilben durch gewisse Estere der einfachen aliphatischen Fettsäuren angezogen werden, die in der Larve im 5. Entwicklungsstadium vorkommen. RICKLEY et al. (1992) bewiesen, daß die Palmitinsäure, die sich in der die Bienenlarven umhüllenden Luft befindet, die Varroamilben anzieht. Ebenfalls RICKLEY et al. (1994) und AUMEIER und ROSENKRANZ (1995) veranschaulichten, daß gewisse gesättigte und ungesättigte Kohlenstoffe, die auf der Larvenkutikula vorkommen, die Varroamilben im Laufe eines Bioversuchs aktiv beeinflussten.

Die Milbe verläßt die Ammenbiene, um in die Brutzelle, die eine Bienenlarve enthält, einzudringen. Die Vorliebe der Milbe eher für die Ammenbienen als für die Bienenlarven (KRAUS, 1993; LEDOUX et al., 2000) suggeriert, daß an diesem Vorgang des Eindringens Reizmittel aus anderen Quellen als die Brut beteiligt sind. Die Brutzellen enthalten außer den Larven einige Milligramme Larvenfutter, die die Ammenbienen für die wachsenden Larven hinterlassen haben. Nach ihrem Eindringen in die Zelle nimmt die Milbe mit dem Zellboden Kontakt und bleibt im Larvenfutter stecken (IFANTIDIS, 1988).

Schon 1985 wurde die Hypothese aufgestellt, daß das Drohnenlarvenfutter eine Anziehungskraft ausübt (ISSA et al., 1985). MILANI und CHIESA (1991) bewiesen, daß das Larvenfutter die Reproduktion von *V. destructor* beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit bringen wir die Ergebnisse einer Untersuchung, im Laufe derer wir uns mit der Wirkung des Larvenfutters auf die Verhaltensweise der Milben befaßten, um seine Rolle während des Eindringens in die Zellen festzustellen. Einige Ergebnisse dieser Untersuchung wurden schon von NAZZI et al. (2001) mitgeteilt.

Material und Methode

Biologisches Material

Die in der Untersuchung verwendeten Bienenlarven und Milben stammten aus unbehandelten *Apis mellifera*-Bienenvölkern, die in Udine (Nordosten Italiens) aufgestellt waren. Sie wurden den Brutzellen entnommen, die im Laufe von 15 Stunden vor der Entnahme (10-15 VE) gedeckelt worden sind. Die Bienenlarven im 5. Larvenstadium wurden 15 Stunden vor der Deckelung (15 VD) mit der Hand den ungedeckelten Zellen entnommen. Das Larvenfutter wurde mithilfe einer Spachtel den Drohnenzellen entnommen, die Larven im 4. und 5. Larvenstadium enthielten, und bis zur Verwendung in geschlossenen Fläschchen bei -20°C gehalten.

Bioversuch

Dieser Bioversuch erfolgte, um unter Laborbedingungen die Stimuli zu untersuchen, die an dem Eindringen in die Zellen teilnehmen. Im Bioversuch wurde ein Deckglas verwendet, das dem von ROSENKRANZ (1993) verwendeten ähnelt und mit 4 Vertiefungen (7 mm Durchmesser, 8 mm Tiefe)

versehen ist, die von der Mitte gleich entfernt sind (1 cm) (Abb.1). Die Behandlung erfolgte in zwei gegenüberliegenden Vertiefungen, wobei die beiden anderen der Kontrolle dienten. In jede Vertiefung kam 1 Larve. Am Anfang des Versuchs wurde in die Mitte des Deckglases ein adultes Milbenweibchen getan. Ihre Position wurde 30 Minuten lang in jeder 5. Minute beobachtet. Die Deckgläser wurden während des gesamten Bioversuchs in einem Schrank bei 35 °C und 75% RL gehalten. Es wurden gleichzeitig 20 Deckgläser verwendet, mit Replikationen an verschiedenen Tagen.

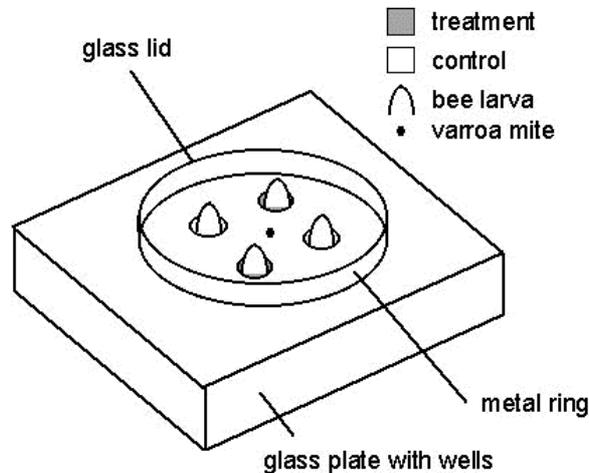


Abb. 1 – Beim Bioversuch verwendetes Deckglas
■ Behandlung, □ Kontrolle, ∩ Bienenlarve, • Varroamilbe

Unternommene Versuche

(a) Larvenalter

Zur Prüfung der Wirksamkeit des Bioversuchs und zum Aussuchen des geeignetsten Larvenalters wurde ein präliminärer Versuch durchgeführt, der die Anziehungskraft der Bienenlarven in zwei unterschiedlichen Altersstadien auf die Milbe untersuchte. Dafür wurde je eine 15 VD Larve in zwei gegenüberliegenden Vertiefungen und je eine 0-15 VE Larve in die zwei anderen Vertiefungen eingeführt.

(b) Larvenfutter

Untersucht wurde auch die mögliche Wirkung des Larvenfutters auf das Verhalten der Milbe, wobei zwei gegenüberliegende Vertiefungen mit je 10 mg Larvenfutter versehen wurden und die zwei anderen leeren Vertiefungen als Kontrolle dienten. In alle Vertiefungen kamen 0-15 VE Larven.

(c) Larvenfutter-Extrakte

Zur Prüfung der Hypothese, daß die biologische Aktivität des Larvenfutters von gewissen chemischen Bestandteilen abhängt, wurde das Larvenfutter mit zwei verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert und die erhaltenen Extrakte im Laufe des Bioversuchs geprüft.

Das Larvenfutter wurde mit Azeton und Biäthylether extrahiert und bei einer Konzentration von 10 mg Äqu. Larvenfutter in 10 µl Lösungsmittel/behandelte Vertiefung analysiert. In die Kontrollvertiefungen kamen je 10 µl Lösungsmittel. In allen Vertiefungen befanden sich 0-15 VE Larven.

Statistische Analyse der Daten

Für jede Vertiefung wurde errechnet, wie oft die Varroamilbe in den Behandlungs- und Kontrollvertiefungen im Laufe von 30 Minuten gesichtet worden ist, wobei diese Zahl als Grundlage der statistischen Analyse diente. Die Ergebnisse der Behandlungs- und Kontrollvertiefungen im Rahmen eines bestimmten Satzes wurden anhand eines wahllosen Proben-tests verglichen (MANLY, 1991; SOKAL & ROHLF, 1995). In diesem Fall wurde die wahllose Verteilung 10⁶mal mit einem eigens dafür geschriebenen Computerprogramm neu gemustert.

Ergebnisse

a) Larvenalter

In den Vertiefungen mit Larven aus ungedeckelten Zellen (15 VD) wurden viel mehr Milben gefunden als in denjenigen mit Larven aus gedeckelten Zellen (0-15 VE) (P = 0,016) (Tab. I).

Antwort von *V. destructor* auf Larven unterschiedlichen Alters.
Summe der Ergebnisse von 20 Milben in Vertiefungen mit Larven im 5. Stadium (15) oder Larven in gedeckelten Zellen (0-15 VE). P steht für die statistische Signifikanz der beobachteten Differenzen

Replikation	15	0-15	P
1	33	8	0,027
2	36	36	0,521
3	37	32	0,418
4	40	16	0,066
5	33	12	0,067
6	32	24	0,333
Insgesamt	211	128	0,016

(b) Larvenfutter

Die Zahl der Milben in den Vertiefungen mit Larvenfutter war kennzeichnend größer ($P < 0,001$) als in den Kontrollvertiefungen (Tab. II).

Tabelle II

Antwort von *V. destructor* auf das Larvenfutter und deren Extrakte.
Angeführt ist auch die Summe der Ergebnisse der behandelten und leeren Vertiefungen. P stellt die statistische Signifikanz der beobachteten Differenz dar

Behandlung	Replikationen	behandelt	Kontrolle	P
Larvenfutter	5	249	54	< 0,001
Larvenfutter – Ätherextrakt	8	152	56	< 0,001
Larvenfutter – Azetonextrakt	4	110	110	< 0,001

(c) Larvenfutter-Extrakt

Sowohl das Äther- als auch das Azetonextrakt des Larvenfutters erweckten in *V. destructor* eine bedeutende Antwort, geäußert in der signifikant unterschiedlichen Zahl der Milben ($P < 0,001$), die die behandelten Vertiefungen vorgezogen haben (Tab. II).

Diskussionen

Die in unserem Bioversuch verwendeten Varroamilben reagierten eher auf die Bienenlarven im 5. Larvenstadium vor der Deckelung als auf die Larven in gedeckelten Zellen. Dieses könnte eine Folge der Bestandteile sein, die sich auf der Kutikula der Larven im 5. Stadium befinden, könnte aber auch von den aktiven Bestandteilen abhängen, die sich in der Kutikula befinden und deren Verseuchung durch Substanzen hervorgerufen wurde, die sich in der Zelle befinden, wie z.B. das Larvenfutter. Jedenfalls bestätigte das Ergebnis dieser Untersuchung die Wirksamkeit des Bioversuchs und stimulierte die Wahl der weniger aktiven 0-15 VE Larven für die folgenden Untersuchungen über die biologische Aktivität der Nichtlarven-Stimuli.

Als im Rahmen des Bioversuchs das Larvenfutter getestet wurde, wurde eine klare Antwort von *V. destructor* festgestellt. Die biologische Aktivität der Extrakte bewies, daß die beobachtete Wirkung eine Folge der chemischen Substanzen ist, die im Larvenfutter enthalten sind und nicht anderer unspezifischer Indizes, wie z.B. die Feuchtigkeit.

Die Ergebnisse führten an, daß die Indizes, die an dem Eindringungsprozeß der Varroamilben in die Zellen teilnehmen, von chemischer Natur sind und von anderen Quellen als der Wirt stammen, was ziemlich unerwartet ist. Damit diese Funktion praktisch stattfindet, müssen die chemischen Indizes verlässlich sein, d.h. sie müssen den Wahrnehmenden eindeutig die Anwesenheit und Disponibilität des Wirtes übermitteln. Die bis jetzt identifizierten Stimuli, wie die Larvenkutikula, erfüllen diese spezifische Forderung nicht, da sie überall innerhalb des Bienenvolkes verteilt sind. Das Larvenfutter seinerseits besitzt eine ihm eigene Zusammensetzung, zu der auch einige Hydroxysäuren gehören (LERCKER et al., 1994).

Die Extrahierung der chemischen Substanzen, die für die biologische Aktivität des Larvenfutters verantwortlich sind, öffnete den Weg für ihre Identifizierung. Dieses könnte zu einer besseren Verständnis der Milbenbiologie führen und suggeriert andererseits neue Bekämpfungsmethoden des Parasiten.

LITERATUR

- Aumeier P., Rosenkranz P. (1995) Welche Faktoren der Bienenlarvenkutikula beeinflussen die Wirtsfindung der Varroa-Weibchen, *Apidologie* 26, 327-329
- Boot W.J., Calis J.N.M., Beetsma J. (1992) Differential period of Varroa mite invasion into worker and drone cells of honey bees, *Exp. Appl. Acarol.* 16, 295-301
- Ifantidis M.D. (1988) Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honey bee (*Apis mellifera*) brood cells, *Apidologie* 19, 387-396
- Issa M.R.C., De Jong D., Gonçalves L.S. (1985) Étude sur la preference de l'acarien *Varroa jacobsoni* pour les faux bourdons d'*Apis mellifera*, Proc. XXXth Congr. Apicult., Nagoya, 1985, Apimondia Publishing House, Bucharest, 168-170
- Kraus B. (1993) Preferences of *Varroa jacobsoni* for honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages, *J. Apic. Res.* 32, 57-64
- Le Conte Y., Arnold G., Trouiller J., Masson C., Chappe B., Ourisson G. (1989) Attraction of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* to the drone larvae of honeybees by simple aliphatic esters, *Science* 245, 638-639
- LeDoux M.N., Pernal S.F., Higo H.A., Winston M.L. (2000) Development of a bioassay to test the orientation behaviour of the honey bee ectoparasite *Varroa jacobsoni*, *J. Apic. Res.* 39, 47-54
- Lercker G., Vecchi M.A., Piana L., Nanetti A., Sabatini A.G. (1994) Composition de la fraction lipidique de la gelée de larves d'abeilles reines et ouvrières (*Apis mellifera ligustica* Spinola) en fonction de l'âge des larves, *Apidologie* 15, 303-314
- Manly B.F.J. (1997) Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology, Chapman & Hall, London
- Milani N., Chiesa F. (1991) Some stimuli inducing oviposition in *Varroa jacobsoni* Oud, Proc. Intern. Symp. Recent research on bee pathology, Gent 1990, Ritter W. ed., Apimondia, Bucharest, 27-33.
- Nazzi F., Milani N., Della Vedova G., Nimis M. (2001) Semiochemicals from larval food affect the locomotory behaviour of the varroa mite, *Apidologie*, 32, 149-155
- Rickli M., Guerin P.M., Diehl P.A. (1992) Palmitic acid released from honeybee worker larvae attracts the parasitic mite *Varroa jacobsoni* on a servosphere, *Naturwissenschaften* 79, 320-322
- Rickli M., Diehl P.A., Guerin P.M. (1994) Cuticle alkanes of honeybee larvae mediate arrestment of bee parasite *Varroa jacobsoni*, *J. Chem. Ecol.* 20, 2437-2453
- Rosenkranz P. (1993) Biotest zur Untersuchungen des Wirtsfindenverhaltens von *Varroa jacobsoni*, *Apidologie* 24, 486-488
- Sokal R.R., Rohlf F.J. (1995) Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research, Freeman and Co., New York, 3rd ed.