

## 6. Die chemische Zusammensetzung der Spur von *V. vulgaris*

(In Zusammenarbeit mit Dr. Joachim Ruther)

### 6.1 Einleitung

In den bisherigen Abschnitten wurde die biologische Funktion der chemischen Spur für soziale Faltenwespen dargestellt und die Hypothese entwickelt, daß bei den Vespinae der Nestgeruch als Spur genutzt werden könnte. Mit chemischen Analysen der Spurbestandteile und des cuticulären Kohlenwasserstoffprofils wurde im folgenden exemplarisch für *V. vulgaris* überprüft, ob sich in der Spur ausschließlich Kohlenwasserstoffe, wie sie im Nestgeruch vorhanden sind, oder gesonderte spezielle Spurpheromone nachweisen lassen.

Die chemische Zusammensetzung terrestrischer Spuren, die der Nestorientierung dienen, ist besonders bei den Ameisen und Termiten gut untersucht. Bei Ameisen können an der Produktion der Spuren verschiedene Abdominaldrüsen beteiligt sein (Überblick bei JACKSON und MORGAN 1993). Bei der Mehrheit der bisher untersuchten Arten bestehen die Spuren aus dem Sekret der Giftdrüse und ihren akzessorischen Drüsen (Proteine oder Metabolite der entsprechenden Aminosäuren) sowie Kohlenwasserstoffen, die in der Dufourschen Drüse sezerniert werden (WILSON 1959, MOSER und BLUM 1963, BLUM et al. 1964, ATTYGALLE und MORGAN 1985, JACKSON und MORGAN 1993, HÖLLDOBLER und WILSON 1990). Dabei enthält das Giftdrüsensekret das eigentliche Spurpheromon und hat damit eine Orientierungsfunktion, während der Dufour-Komponente eine aktivierende Wirkung auf rekrutierte Arbeiterinnen zugeschrieben werden kann (CAMMAERTS-TRICOT 1974), des weiteren übermittelt sie die Information der Artzugehörigkeit (HÖLLDOBLER und CARLIN 1987) und dient als Territorialmarkierung (CAMMAERTS et al. 1977).

Bei den Termiten wird die Spur von der Sternaldrüse im fünften Abdominalsegment sezerniert (LÜSCHER und MÜLLER 1960, LÜSCHER 1960, 1961, STUART 1961, 1963), bei *Nasutitermes*-Arten ist das spurbildende Pheromon ein ungesättigter diterpenoide Kohlenwasserstoff (MOORE 1966).

Als Produktionsort für die Spurpheromone innerhalb der Polistinae (vgl. Abschnitt 1.2) konnte bei *Polybia sericea* die Sternaldrüse des fünften Gastersegments identifiziert werden (JEANNE 1981, JEANNE et al. 1983), deren Sekret ein Gemisch unterschiedlicher Verbindungen wie Ketone, Aldehyde, Säuren, Aromate, ein Sesquiterpen, Fettsäuren, Kohlenwasserstoffe und ein Makrolakton ist (CLARKE et al.

1999). Bei *Polybioides tabidus* ist hingegen vermutlich ebenso wie bei Ameisen die Dufoursche Drüse an der Spurproduktion beteiligt (FRANCESCATO et al. 1993). Chemische Analysen wiesen bei *P. tabidus* 1-Hexadecanol als Hauptkomponente, des weiteren höhermolekulare Kohlenwasserstoffe als Bestandteile des Dufour-Sekretes aus (DANI et al. 1997). Die Bedeutung dieser Komponenten als Spurpheromone während des Schwärmens bei *P. tabidus* ist allerdings in Biotests bisher nicht überprüft worden (CLARKE et al. 1999).

Die ersten Untersuchungen zur Spurzusammensetzung bei den Vespinae wurden von SIEBEN (1999) an *Vespa crabro* durchgeführt. Überraschenderweise ließ sich hier in chemischen Analysen nicht wie bei den oben genannten Taxa der Hymenoptera ein einzelnes Spurpheromon identifizieren, als Bestandteile wurden vielmehr ausschließlich Kohlenwasserstoffe nachgewiesen, wie sie auch im chemischen Profil der Cuticula von *V. crabro* zu finden sind. Bei *V. crabro* stimmt ebenso wie auch bei verschiedenen Hummeln und Polistinen (OLDHAM et al. 1994, DANI et al. 1996) das Kohlenwasserstoffprofil des Dufourdrüsensekrets qualitativ weitgehend mit dem Profil der Cuticula und der Spur überein (SIEBEN 1999). Die quantitative Übereinstimmung zwischen Cuticula und Spur ist jedoch wesentlich besser als zwischen Dufoursekret und Spur, so daß die Bildung der Spur über einen Abrieb der Cuticula auf dem Substrat plausibler erscheint als eine Abgabe spuraktiver Kohlenwasserstoffe aus der Dufourdrüse.

In der vorliegenden Arbeit sollten mit Untersuchungen an *Vespula vulgaris* Erkenntnisse zur Spurzusammensetzung bei einem weiteren Vertreter der Vespinae gewonnen werden. Es stellte sich die Frage, ob hier die Spur wie bei *V. crabro* aus der Gesamtheit cuticulärer Kohlenwasserstoffe gebildet wird oder ob sich, vergleichbar den Termiten und Ameisen, ein einzelnes Spurpheromon identifizieren läßt. Als mögliche Produktionsorte für das Spurpheromon wurden neben der Cuticula die Giftdrüse und die Drüsenfelder der Sternitplatten des fünften Gastersegments in den Versuchen in Betracht gezogen.

## 6. 2 Material und Methoden

### 6.2.1 Herstellung der Extrakte für die Biotests

Um Hinweise auf den Produktionsort der Spur zu erhalten, wurde in Biotests die spurfolgeauslösende Wirkung von fünften-Sternaldrüsen-, Giftdrüsen- und Cuticularextrakten von Artgenossinnen auf *V. vulgaris*-Arbeiterinnen im in 2.2. beschriebenen Versuchssystem überprüft.

Da die Spur von *V. vulgaris* nicht koloniespezifisch ist (siehe Kapitel 5), konnten die verschiedenen Extrakte von Arbeiterinnen aus insgesamt drei Kolonien für die Versuche verwendet werden. Dadurch konnte die Anzahl eingefangener Arbeiterinnen pro Kolonie und damit die Störung der sozialen Struktur innerhalb jedes Nestes möglichst gering gehalten werden.

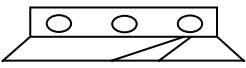
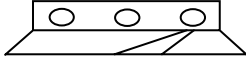
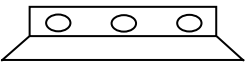
Unter dem Binokular wurden die vorher bei  $-76^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen *V. vulgaris*-Arbeiterinnen präpariert. Die fünften Sternalplatten mitsamt der Drüsenfelder und die Giftdrüsen wurden entnommen und gesondert voneinander für fünf Minuten im Ultraschallbad in jeweils 2 ml Dichlormethan (DCM; Roth, Karlsruhe, Deutschland) extrahiert. Für die Gewinnung der Cuticularextrakte wurden intakte *V. vulgaris*-Arbeiterinnen für eine Minute in 1 ml Hexan (Fisher Chemicals, Loughborough, UK) extrahiert.

In einem Experiment mit synthetischen cuticulären Kohlenwasserstoffen sollte die Spuraktivität cuticulärer Kohlenwasserstoffe untersucht werden. Im Vorgriff auf den Abschnitt 6.3 dieses Kapitels sei an dieser Stelle schon erwähnt, daß das cuticuläre Kohlenwasserstoffprofil bei *V. vulgaris* vor allem aus verzweigten, methylierten Molekülen besteht. Da zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch nur geradkettige Kohlenwasserstoffe im Handel erhältlich sind, wurde der Biotest mit einer künstlichen Spur aus einem Gemisch derjenigen Alkane durchgeführt, die auf der Cuticula von *V. vulgaris* vorhanden sind (C23-C31, ohne C30). Die synthetischen Alkane wurden in 2,5 ml Hexan im selben Mengenverhältnis zueinander wie in der Cuticula gelöst: 281 µg C23, 225 µg C24, 2053 µg C25, 307 µg C26, 1025 µg C27, 643 µg C28, 287 µg C29, 180 µg C31 (Aldrich, Steinheim, Deutschland). Die Gesamtmenge entsprach der cuticulären Gesamtkohlenwasserstoffmenge von 100 Arbeiterinnen.

### 6.2.2 Biotests

In den Versuchen wurde das gesamte Volumen der Sternit-, Giftdrüsen- und Cuticularextrakte im Testkasten des Laufsystems des Versuchsvolkes H (vgl. Tabelle 1 in Abschnitt 2.1) auf eine vorher gereinigte Glasplatte in ungewohnter Richtung nach rechts (vgl. Abschnitt 2.2) mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette als künstliche Spuren aufgetragen. Auf die gleiche Weise wurde der *V. vulgaris*-Kolonie I die synthetische Alkanmischung als künstliche Spur geboten. Als Kontrollen in beiden Versuchskolonien dienten Bodenplatten mit der eigenen Spur und gereinigte Bodenplatten. Da die jeweiligen Lösungsmittel vollständig verdampfen, ist ihr Einfluß auf das Verhalten der Arbeiterinnen sehr unwahrscheinlich. Zur Sicherheit wurden dennoch zusätzliche Kontrollen mit reinen Lösungsmittel als künstlichen "Spuren" durchgeführt. Das Laufverhalten der *V. vulgaris*-Heimkehrer im 2. Durchlaufkasten wurde in den in Tabelle 2 aufgelisteten Versuchsansätzen beobachtet und den im Abschnitt 2.2 definierten Verhaltenskategorien zugeordnet.

**Tabelle 2:**  
**Übersicht über die einzelnen Versuchsansätze zur Spuraktivität der Extrakte aus den Sternaldrüsenfeldern des fünften Gastersegments, sowie den Giftdrüsen- und Cuticularextrakten**

<p>Bodenplatte mit künstlicher Spur (2cm breit, 20cm lang) nach rechts</p> 	Sternit-Extrakt (10 <i>V. vulgaris</i> -Arbeiterinnen)
	Giftdrüsen-Extrakt (5 <i>V. vulgaris</i> -Arbeiterinnen)
	Giftdrüsen-Extrakt (10 <i>V. vulgaris</i> -Arbeiterinnen)
	Giftdrüsen-Extrakt (15 <i>V. vulgaris</i> -Arbeiterinnen)
	Cuticula-Extrakt (18 <i>V. vulgaris</i> -Arbeiterinnen)
	Cuticula-Extrakt (78 <i>V. vulgaris</i> -Arbeiterinnen)
	Cuticula-Extrakt (78 <i>V. vulgaris</i> -Arbeiterinnen) + Giftdrüsen-Extrakt (15 <i>V. vulgaris</i> -Arbeiterinnen)
	Synthetisches Alkangemisch (C23-C29+C31)
	Reines Hexan (Kontrolle I)
	Reines DCM (Kontrolle II)
Reines Hexan + DCM (Kontrolle III)	
Bodenplatte mit eigener Spur nach rechts	Kontrolle IV
	
Gereinigte Bodenplatte ohne Spur	Kontrolle V
	

Im Vorgriff auf Abschnitt 6.3 dieses Kapitels sei an dieser Stelle vorweggenommen, daß der Cuticularextrakt spuraktiv ist. Im Anschluß an die Biotests wurden daher die chemischen Profile des Cuticularextraktes und der von den Arbeiterinnen gelegten Spur mittels gekoppelter Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS) miteinander verglichen.

### **6.2.3 Aufbereitung der Spur- und Cuticularextrakte für die GC/MS-Analysen**

Zur Gewinnung des Spurextraktes wurden bei zwei *V. vulgaris*-Kolonien (zu einem Zeitpunkt in Kolonie E, zu zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten in Kolonie H) die Bodenplatten eines Durchlaufkastens auf der Lauflinie der Arbeiterinnen mit 6 gereinigten Objektträgern (75 x 25 mm) abgedeckt. Nach drei Wochen wurde die Spursubstanz von den Objektträgern mit 0,3 ml Hexan abgewaschen. Die drei Extrakte wurden unter Stickstoffzufuhr bis zum Nullvolumen eingeeengt und jeweils mit 150 µl DCM aufgefüllt, dem C<sub>22</sub> als interner Standard (10 ng/ µl) zugefügt war. Für die GC/MS-Analyse wurde 1 µl des aufbereiteten Spurextraktes verwendet.

Für die GC/MS-Analyse des Cuticularextraktes wurden 15 *V. vulgaris*-Arbeiterinnen gefangen und bei -76° C tiefgefroren, am nächsten Tag wurden sie einzeln 60 s lang in 1 ml Hexan extrahiert. Es wurden 500 µl abgenommen, unter reinem Stickstoff bis zum Nullvolumen eingeeengt und mit 50 µl DCM + internem Standard (C<sub>22</sub>, 10 ng/ µl) aufgefüllt. 1 µl dieses aufbereiteten Cuticularextraktes wurde für die GC/MS-Analyse verwendet.

### **6.2.4 GC/MS-Analysen**

(durchgeführt von Dr. Joachim Ruther, Haus Angewandte Zoologie/Chemische Ökologie im Fachbereich Biologie/Chemie/Pharmazie der Freien Universität Berlin)

Die analytische Auftrennung der Proben wurde mit Hilfe eines Gaschromatographen Modell 8060 durchgeführt, die zugehörigen Massenspektren lieferte ein MD800 Quadrupol-Massenspektrometer (ThermoFinnigan, Mainz Kastel, Deutschland). Die Extrakte (1 µl) wurden ohne Split bei einer Injektortemperatur von 240 °C injiziert. Es wurde eine 30 m x 0,32 mm ID DB-5ms Silica-Kapillarsäule verwendet, die Filmdicke betrug 0,25 µm (J & W / Fisher Scientific, Wiesbaden). Als Trägergas diente Helium bei einem Einlaßdruck von 10 kPa. Das Temperaturprogramm startete bei 150 °C und stieg mit einer Geschwindigkeit von 3°C/min auf 280°C an. Die Transferlinie

wurde bei einer Temperatur von 280°C, die Ionenquelle auf einer Temperatur von 200°C gehalten. Das Eluat der Säule wurde durch Elektronenstoßionisation (EI) bei 70 eV ionisiert. Die Identifikation der aliphatischen Kohlenwasserstoffe erfolgte durch den Vergleich ihrer Massenspektren und relativer Retentionszeiten (Kovats-Index) mit denen authentischer Referenzsubstanzen. Verzweigte Kohlenwasserstoffe wurden mit Hilfe der diagnostischen Ionen identifiziert, die aus der Fragmentierung an den Verzweigungsstellen resultierten (NELSON 1993). Die Positionen der Doppelbindungen wurden in einer Methylthiolation mit Dimethyldisulfid (FRANCIS und VELAND 1981) bestimmt.

Die relativen Peakflächen sämtlicher identifizierter Komponenten wurden mit Hilfe der Masslab 1.3-Software (ThermoFinnigan, Mainz Kastel, Deutschland) berechnet und mit der Peakfläche des internen Standards (10 ng/µl Docosan) in Beziehung gesetzt, um die jeweiligen relativen Mengen der Komponenten pro Cuticula und pro Spur berechnen zu können.

### 6.3 Ergebnisse

#### 6.3.1 Biotests

Der Cuticularextrakt aus 78 *V. vulgaris*-Arbeiterinnen war genau so spuraktiv wirksam (47% Spurfolge, Abb. 14a) wie die Originalspur selbst (46% Spurfolge). Die Spurfolgerate auf dem geringer konzentrierten Cuticularextrakt aus 18 Arbeiterinnen war weniger hoch (28%), dieser Extrakt war jedoch immer noch aktiver als die Sternit- und Giftdrüsenextrakte: In den Versuchen mit einer künstlichen Spur aus 10 Sternitplatten des fünften Gastersegmentes (Abb. 16a) liefen mit 12% nicht signifikant mehr Arbeiterinnen nach rechts als in den Kontrollen mit gereinigter Platte und reinem Lösungsmittel (jeweils um die 5%). Der Spur aus 5, 10 und 15 Giftdrüsen folgten 10%, 17% beziehungsweise 19% der Arbeiterinnen nach rechts (Abb. 15a); es liefen also auf den beiden höherkonzentrierten Giftspuren mehr Arbeiterinnen nach rechts als in den Kontrollen II und V, diese Spurfolgerate war jedoch deutlich geringer als auf der eigenen Spur. Einer kombinierten künstlichen Spur aus dem Cuticularextrakt von 18 Wespen und dem Extrakt von 15 Giftdrüsen folgten mit 25% nicht mehr Arbeiterinnen als dem Cuticularextrakt aus 18 Arbeiterinnen allein (28%,

Abb. 14a). In den Kontrollen mit gereinigter Platte und reinem Lösungsmittel liefen um die 5% der Arbeiterinnen nach rechts.

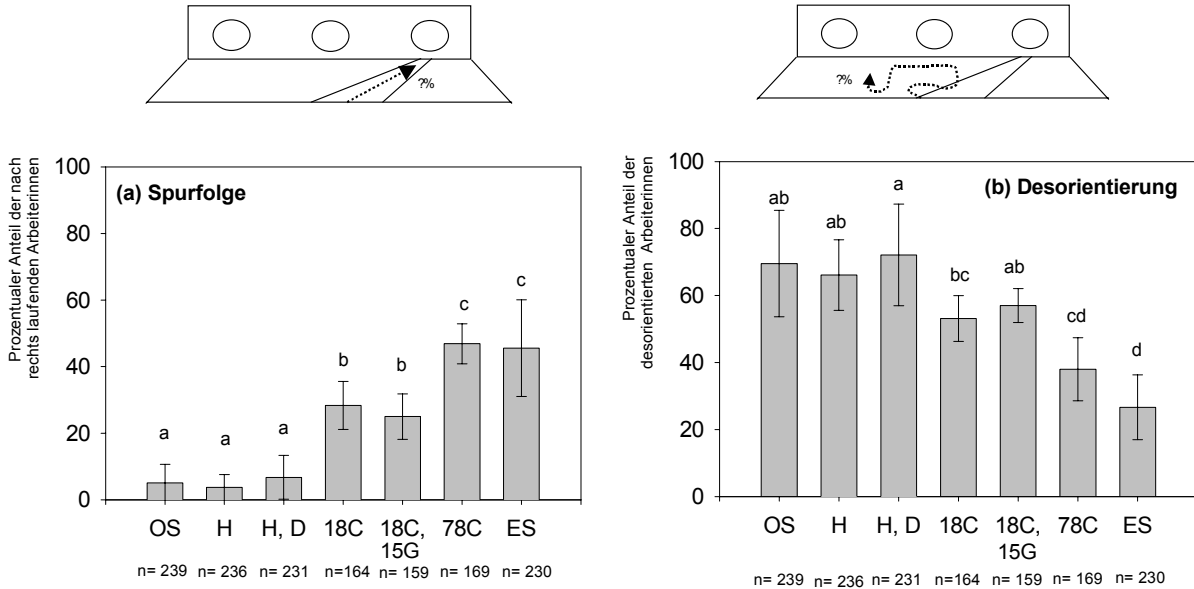
Der Anteil der desorientierten Arbeiterinnen war auf gereinigter Bodenplatte am höchsten (etwa 60%) und bei Präsentation der eigenen Spur am geringsten (etwa 30%) (Abb. 14b, 15b, 16b und 17b). Des Weiteren war die Desorientierung mit 50-60% auf denjenigen künstlichen Spuren relativ hoch, die nicht spurfolgeauslösend waren (reines Lösungsmittel, Sternitextrakt, synthetische Alkanmischung, Cuticularextrakt von 18 Arbeiterinnen). Auffällig ist die mit zunehmend konzentrierter Giftspur steigende Anzahl der Arbeiterinnen, die sich weder für die gewohnte Richtung noch für die Spurrichtung entschieden hatten (Abb. 15b). Die Zunahme der Desorientierung (von 29% auf 64%) liegt in diesen Versuchen deutlich höher als der leichte Anstieg der Folgerate auf der Giftspur (von 10% auf 19%).

Das Verhalten der *V. vulgaris*-Arbeiterinnen auf der synthetischen Alkanspur unterschied sich mit 6% Spurfolge und 67% Desorientierung nicht signifikant von den Versuchen mit gereinigter Platte und reinem Hexan (Abb. 17a und 17b).

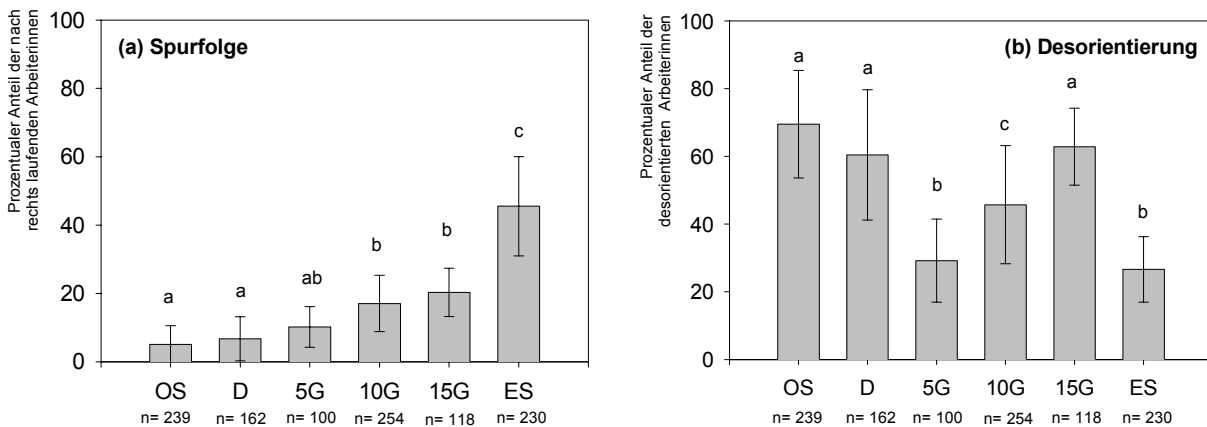
### 6.3.2 GC/MS-Analysen

Im Cuticularextrakt der *V. vulgaris*-Arbeiterinnen wurden insgesamt 95 aliphatische, methylverzweigte oder einfach ungesättigte Kohlenwasserstoffe der Kettenlänge C23 bis C35 identifiziert (Tabelle 3). Die cuticuläre Gesamtkohlenwasserstoffmenge pro Arbeiterin betrug etwa 50 µg. Davon stellten die methylverzweigten Kohlenwasserstoffe mit 64% die größte Fraktion dar, 29% waren gesättigte und 3% einfach ungesättigte aliphatische Kohlenwasserstoffe. Der 3%ige Anteil an Cholesterol im Cuticularextrakt stammt sehr wahrscheinlich aus den Zellmembranen der Wespen.

Das chemische Profil des Spurextraktes stimmt mit dem des Cuticularextraktes überein, die Mehrheit der cuticulären Kohlenwasserstoffe befindet sich in der Spur in ähnlichen Mengenverhältnissen wie in der Cuticula (Abb. 18). Die Hauptkomponenten in der Cuticula und in der Spur sind Pentacosan (C25), 3-, 7-, 9-, 11- und 13-Methylpentacosan, Heptacosan (C27) sowie 9-, 11- und 13-Methylheptacosan.

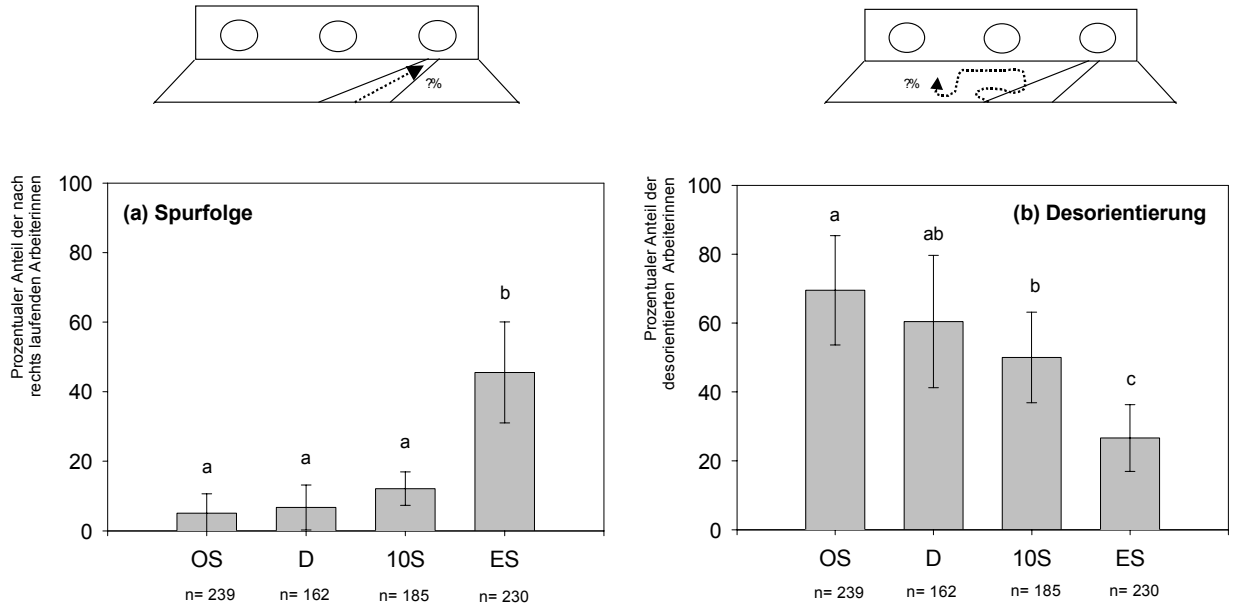


**Abb. 14a-b:** Spurfolge (a) und Desorientierung (b) der *V. vulgaris*-Arbeiterinnen auf einer Bodenplatte ohne Spur (OS), auf reinem Hexan (H), auf reinem Hexan (H) und DCM (DCM), auf dem Cuticularextrakt aus 18 bzw. 78 Arbeiterinnen (18C, 78C), auf dem Cuticularextrakt von 18 Arbeiterinnen kombiniert mit dem Extrakt aus 15 Giftdrüsen (18C, 15G) und auf der eigenen Spur; unterschiedliche Buchstaben über den Balken bedeuten signifikante Unterschiede ( $p < 0,002$ , Bonferroni-korrigierter  $\chi^2$ -Test) der Datensätze in jeder Graphik.

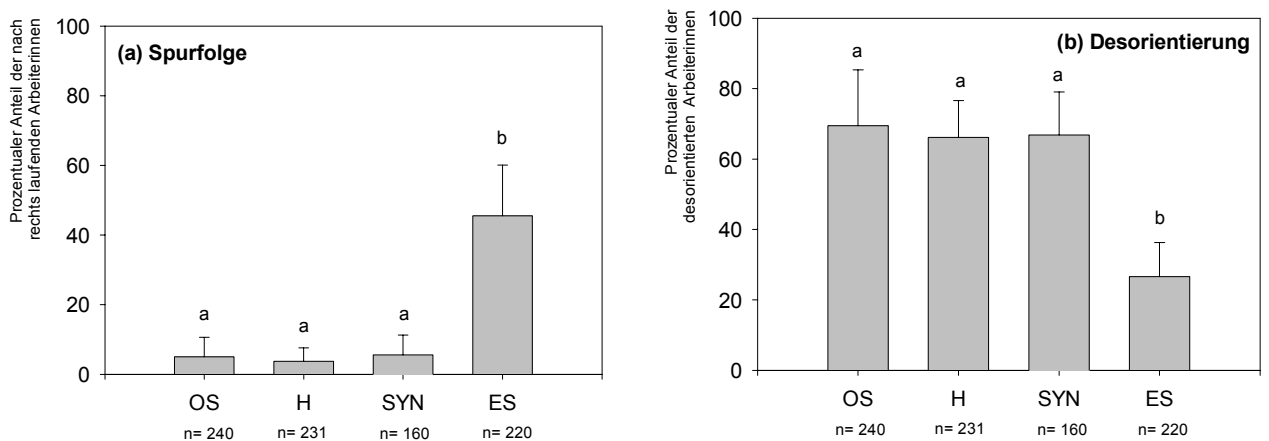


**Abb. 15a-b:** Spurfolge (a) und Desorientierung (b) der *V. vulgaris*-Arbeiterinnen auf einer Bodenplatte ohne Spur (OS), auf reinem DCM (D), auf einer unterschiedlich stark konzentrierter Giftspur (5-15 Giftdrüsen, 5G-15G), und auf der eigenen Spur (ES); unterschiedliche Buchstaben über den Balken bedeuten signifikante Unterschiede ( $p < 0,003$ , Bonferroni-korrigierter  $\chi^2$ -Test) der Datensätze in jeder Graphik.

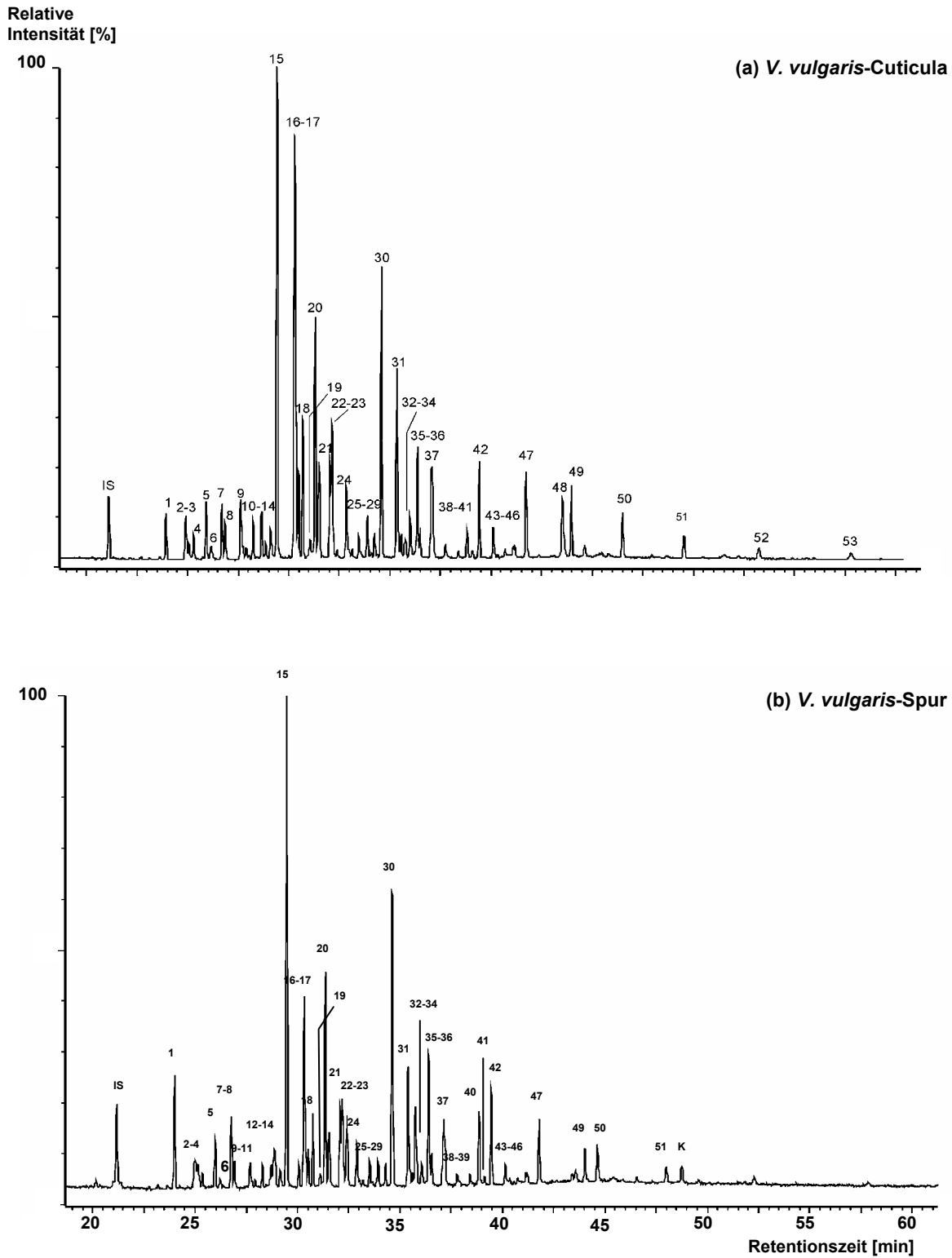




**Abb. 16a-b:** Spurfolge (a) und Desorientierung (b) der *V. vulgaris*-Arbeiterinnen auf einer Bodenplatte ohne Spur (OS), auf reinem DCM (D), auf einer Spur aus dem Extrakt von 10 Fünften Sterniten (S) und auf der eigenen Spur (ES); unterschiedliche Buchstaben über den Säulen bedeuten signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ , Bonferroni-korrigierter  $\chi^2$ -Test) der Datensätze in jeder Graphik.



**Abb. 17a-b:** Spurfolge (a) und Desorientierung (b) der *V. vulgaris*-Arbeiterinnen auf einer Bodenplatte ohne Spur (OS), auf reinem Hexan (H), auf einer Spur aus einer Mischung synthetischer Alkane (SYN) und auf der eigenen Spur (ES); unterschiedliche Buchstaben über den Balken bedeuten signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ , Bonferroni-korrigierter  $\chi^2$ -Test) der Datensätze in jeder Graphik.



**Abb. 18:** Totalionenstromchromatogramm des Cuticularextraktes einer *V. vulgaris*-Arbeiterin (a) und des Spurextraktes (b) von *V. vulgaris*; die Numerierung der Peaks entspricht derjenigen der Tabelle 3; K= Konterminante

Tabelle 3:

Mittlere relative Zusammensetzung [%] des Cuticularextraktes von *V. vulgaris*-Arbeiterinnen (n=15) und des Spurextraktes (n=3).

RI = Relativer Retentionsindex, SD=Standardabweichung, DMDS=Derivatisierung mit Dimethyldisulfid, sym=symmetrisches Molekül, die Fragmentierung führte nur zu einem Paar diagnostischer Ionen. IS=Interner Standard. Me = "Methyl-...", DiMe = "Dimethyl-..."

Nr.	RI	Verbindung	Diagnostische Ionen	Cuticula		Spur	
				Mittlerer Gehalt [%]	SD	Mittlerer Gehalt [%]	SD
IS	2200	C22 (Docosan)	310				
1	2300	C23 (Tricosan)	324	1.72	0.81	3.73	1.24
2	2335	11-MeC23 + 9-MeC23	168/169, 196/197 140/141, 224/225	1.47	1.99	0.75	2.35
3	2341	7-MeC23	112/113, 252/253	0.37	0.63	0.54	1.87
4	2349	5-MeC23	84/85, 280/281	0.54	0.82	0.30	0.48
5	2372	3-MeC23	309	1.89	2.52	1.08	1.56
6	2380	5,11-DiMeC23 + 5,9-DiMeC23	337, 84/85, 294/295, 182/183, 196/197 337, 84/85, 294/295, 154/155, 224/225	0.41	0.74	0.24	0.47
7	2400	C24 (Tetracosan)	338	1.38	1.14	2.26	0.97
8	2405	3,13-DiMeC23 + 3,11-DiMeC23 + 3,9-DiMeC23 + 3,7-DiMeC23	337, 56/57, 323, 168/169, 210/211 337, 56/57, 323, 196/197, 182/183 337, 56/57, 323, 154/155, 224/225 337, 56/57, 323, 126/127, 252/253	1.05	2.00	0.51	0.97
9	2434	12-MeC24 + 10 MeC24 + 8-MeC24	182/183, 196/197 154/155, 224/225 126/127, 252/253	1.61	2.47	0.67	0.66
10	2444	3,5-DiMeC23	337, 56/57, 322/323, 98/99, 280/281	0.21	0.34	0.17	0.11
11	2456	2-MeC24	309, 337	0.85	1.22	0.56	0.58
12	2471	C25:9 (9-Pentacosen)	444, 173, 271 (DMDS)	1.09	1.17	0.97	0.51
13	2479	C25:7 (7-Pentacosen)	444, 145, 299 (DMDS)	0.30	0.27	0.97	3.49
14	2488	4,12-DiMeC24 + 4,10-DiMeC24 + 4,8-DiMeC24	351, 70/71, 323, 196/197 (sym) 351, 70/71, 323, 168/169, 224/225 351, 70/71, 323, 140/141, 252/253	0.79	1.47	0.41	0.68
15	2500	C25 (Pentacosan)	352	12.64	7.43	15.33	7.69
16	2533	13-MeC25 + 11-MeC25 + 9-MeC25	196/197 (sym) 168/169, 224/225 140/141, 250/251	12.18	11.37	5.95	6.53
17	2540	7-MeC25	112/113, 280/281	1.51	1.85	0.77	0.96
18	2549	5-MeC25	84/85, 308/309	2.55	2.41	1.75	1.72
19	2562	9,15-DiMeC25	365, 140/141, 266/267, 168/169, 238/239	0.51	1.18	0.31	0.24

## 6. Die Zusammensetzung der Spur

+ 9,13-DiMeC25 365, 140/141, 266/267, 196/197, 210/211								
20	2572	3-MeC25		337	6.55	7.32	5.91	4.51
21	2579	5,13-DiMeC25	365, 84/85, 323, 196/197, 210/211		2.34	3.16	1.38	1.91
		+ 5,11-DiMeC25	365, 84/85, 323, 182/183, 224/225					
		+ 5,9-DiMeC25	365, 84/85, 323, 154/155, 252/253					
22	2600	C26 (Hexacosan)		366	1.89	1.59	2.99	2.50
23	2604	3,13-DiMeC25	365, 56/57, 351, 196/197, 210/211		4.02	5.96	2.24	3.44
		+ 3,11-DiMeC25	365, 56/57, 351, 182/183, 224/225					
		+ 3,9-DiMeC25	365, 56/57, 351, 154/155, 252/253					
		+ 3,7-DiMeC25	365, 56/57, 351, 126/127, 280/281					
24	2631	13-MeC26	196/197, 210/211		2.20	1.77	1.34	1.30
		+ 12-MeC26	182/183, 224/225					
		+ 10-MeC26	154/155, 252/253					
25	2643	3,5-DiMeC25	365, 56/57, 351, 98/99, 308/309		0.19	0.17	0.20	0.15
26	2656	2-MeC26		337	0.65	0.49	0.72	0.71
27	2673	C27:9 (9-Heptacosen)	472, 173, 299 (DMDS)		1.00	0.80	0.76	0.77
28	2681	C27:7 (7-Heptacosen)	472, 145, 327 (DMDS)		0.11	0.16	0.05	0.13
29	2687	4,12-DiMeC26	379, 70/71, 351, 196/197, 224/225		0.71	0.89	0.52	0.64
		+ 4,10-DiMeC26	379, 70/71, 351, 168/169, 252/253					
		+ 4,8-DiMeC26	379, 70/71, 351, 140/141, 280/281					
30	2700	C27 (Heptacosan)		380	6.31	4.41	13.35	11.83
31	2731	13-MeC27	196/197, 224/225		6.13	4.75	3.97	3.25
		+ 11-MeC27	168/169, 252/253					
		+ 9-MeC27	140/141, 280/281					
32	2739	7-MeC27	112/113, 308/309		0.40	0.38	0.37	0.50
33	2747	5-MeC27	84/85, 336/337		0.64	0.49	1.79	4.40
34	2757	11,15-DiMeC27	393, 168/169, 266/267, 196/197, 238/239		1.14	0.97	0.77	0.76
		+ 9,13-DiMeC27	393, 140/141, 294/295, 210/211, 224/225					
35	2771	3-MeC27	336/337, 364/365		3.16	3.74	4.11	2.55
36	2776	5,13-DiMeC27	393, 84/85, 351, 210/211, 224/225		0.96	0.84	0.76	0.79
		+ 5,9-DiMeC27	393, 84/85, 351, 154/155, 280/281					
37	2800	C28 (Octocosan)		394	3.96	2.81	3.56	2.77
		+ 3,13-DiMeC27	393, 56/57, 379, 210/211, 224/225					
		+ 3,11-diMeC27	393, 56/57, 379, 182/183, 252/253					
		+ 3,9-DiMeC27	393, 56/57, 379, 154/155, 280/281					
		+ 3,7-DiMeC27	393, 56/57, 379, 126/127, 308/309					
38	2829	14-MeC28	210/211, 224/225		0.67	0.58	0.59	0.27
		+ 12-MeC28	182/183, 252/253					
		+ 10-MeC28	154/155, 280/281					

		+ 8-MeC28	126/127, 308/309					
39	2857	2-MeC28		365	0.28	0.18	0.51	0.19
40	2875	C29:9 (9-Nonacosen)		500, 173, 327 (DMDS)	0.81	0.77	0.56	1.59
41	2886	4,14-DiMeC28	407, 70/71, 379, 224/225 (sym)		0.30	0.29	0.30	0.13
		+ 4,12-DiMeC28	407, 70/71, 379, 196/197, 252/253					
		+ 4,10-DiMeC28	407, 70/71, 379, 168/169, 280/281					
		+ 4,8-DiMeC28	407, 70/71, 379, 140/141, 308/309					
42	2900	C29 (Nonacosan)		408	1.77	2.02	5.86	8.43
43	2929	15-MeC29	224/225 (sym)		1.14	1.13	1.17	1.11
		+ 13-MeC29	196/197, 252/253					
		+ 11-MeC29	168/169, 280/281					
44	2955	13,17-DiMeC29	421, 196/197, 266/267 (sym)		0.34	0.27	0.31	0.21
		+ 11,15-DiMeC29	421, 168/169, 294/295, 224/225, 238/239					
		+ 9,13-DiMeC29	421, 140/141, 322/323, 210/211, 252/253					
45	2972	3-MeC29		393	0.38	0.99	0.51	0.44
46	2976	5,13-DiMeC29	421, 84/85, 378/379, 154/155, 308/309		0.39	0.39	0.27	0.09
		+ 5,9-DiMeC29	421, 84/85, 378/379, 210/211, 252/253					
47	3001	3,13-DiMeC29	421, 56/57, 407, 210/211, 252/253		1.94	2.11	2.37	0.54
		+ 3,11-DiMeC29	421, 56/56, 407, 182/183, 280/281					
		+ 3,9-DiMeC29	421, 56/56, 407, 154/155, 308/309					
48		Cholesterol			3.26	3.00	0.00	0.00
49	3100	C31 (Hentriacontan)		436	1.10	1.98	2.98	5.14
50	3200	C32 (Dotriacontan)		450	0.96	1.43	0.53	1.43
51	3300	C33 (Tricontan)		464	0.55	0.99	0.55	1.54
52	3400	C34 (Tetracontan)		478	0.38	0.71	0.00	0.00
53	3500	C35 (Pentacontan)		492	0.30	0.61	0.00	0.00

#### 6.4 Diskussion

Das cuticuläre Kohlenwasserstoffprofil von *V. vulgaris* ähnelt dem von *V. germanica* (BROWN et al. 1991). In beiden Schwesterarten stellen methylierte und aliphatische gesättigte Kohlenwasserstoffe der Kettenlänge C23 bis C31 die größten Fraktionen dar. Die Positionen der Methylierungen unterscheiden sich jedoch bei *V. vulgaris* und *V. germanica* bei zahlreichen Verbindungen, vermutlich sind dies die einzigen Unterschiede im cuticulären Kohlenwasserstoffprofil beider Arten. Von den 19 bei *V. crabro* identifizierten cuticulären Kohlenwasserstoffen (vgl. BUTTS et al. 1991, SIEBEN

1999) sind 13 ebenfalls bei *V. vulgaris* vorhanden. Insgesamt umfaßt das Kohlenwasserstoffprofil von *V. vulgaris* jedoch wesentlich mehr Komponenten, insbesondere methylierte Verbindungen, als bei *V. crabro* und ist daher als qualitativ deutlich unterschiedlich zu bewerten.

Der Cuticularextrakt war von allen getesteten Extrakten der *V. vulgaris*-Arbeiterinnen der einzige, bei dem eine spuraktive Wirkung zu beobachten war, die so hoch war wie bei der von den Arbeiterinnen selbst gelegten Spur. Das Kohlenwasserstoffprofil der Cuticula enthält dieselben Verbindungen in annähernd gleichen Mengenverhältnissen wie die natürliche Spur. Außer den cuticulären Kohlenwasserstoffen wurden keine weiteren Verbindungen in der Spur identifiziert.

Nachdem bereits bei *V. crabro* die Übereinstimmung der cuticulären Kohlenwasserstoffe mit dem Profil der Spur gezeigt worden war (SIEBEN 1999), konnte diese Arbeit zum ersten Mal experimentell zeigen, daß die Gesamtheit der cuticulären Kohlenwasserstoffe biologisch aktiv ist und als Spurpheromon fungiert.

Neben der grundlegenden Funktion cuticulärer Kohlenwasserstoffe bei landlebenden Insekten als Schutz gegen Transpiration und Austrocknung (LOCKEY 1988) können sie zur Kolonie- und Nestgenossinnenerkennung (VANDER MEER und MOREL 1998, CLÉMENT und BAGNÈRES 1998, LAHAV et al. 1999; vgl. Abschnitt 7.1), als Sexual-, Alarm- und Rekrutierungspheromone sowie als territoriale Marker eingesetzt werden (HOWARD und BLOMQUIST 1982, LOCKEY 1988, BLOMQUIST et al. 1987). Mit den hier vorgestellten Ergebnissen ergibt sich eine bisher unbekannte Funktion der cuticulären Kohlenwasserstoffe im Kontext einer Orientierungshandlung bei einer nicht rekrutierenden sozialen Insektenart.

Bei Ameisen wirken die Spurpheromone im Nanogrammbereich (JACKSON und MORGAN 1993), ab einer höheren Konzentration von etwa 1 pg/µl Lösungsmittel reagieren die Ameisenarbeiterinnen nicht mehr mit Spurfolge. Bei *V. vulgaris* scheint die Spur hingegen um so attraktiver zu sein, je stärker konzentriert sie ist - die künstliche Cuticula-Spur aus 18 Arbeiterinnen enthielt etwa 0,9 mg spuraktive Kohlenwasserstoffe, bei der Cuticula-Spur aus 78 Arbeiterinnen waren es fast 4 mg. Die mit 78 Arbeiterinnen besonders hohe Zahl an Äquivalenten, die benötigt wurde, um auf der künstlichen Cuticula-Spur eine genau so hohe Spurfolgerate wie auf der Originalspur zu erzielen, kann jedoch auch dadurch bedingt gewesen sein, daß die Wespen im Vergleich zur selbst gelegten Spur selbst eine sehr gleichmäßig applizierte künstliche Spur vielleicht als ungleichmäßig wahrgenommen haben.

Der künstlichen Spur aus dem Giftdrüsenextrakt folgten zwar ebenfalls einige Arbeiterinnen, mit zunehmender Konzentration (5 bis 15 Giftdrüsen) nahm jedoch die Rate der verwirrten, desorientierten Arbeiterinnen viel stärker zu als die Spurfolgerate. Das Giftdrüsensekret von *V. vulgaris* enthält ebenso wie bei vielen anderen Hymenopteren ein Alarmpheromon, das die Arbeiterinnen in eine aufgeregte Verteidigungshaltung versetzt (MASCHWITZ 1964, EMMERICH 1994). Das Laufen in die Richtung der künstlichen Giftspur wäre nach dieser Hypothese nicht als Spurorientierung in Richtung Nest, sondern als Laufen in Richtung einer vermeintlichen Gefahrenquelle zu werten. Des weiteren spricht gegen eine Spuraktivität des Giftes, daß gegenüber dem Cuticularextrakt von 18 Arbeiterinnen bei einer Kombination dieses Extraktes mit dem aus 15 Giftdrüsen keine Steigerung der Spurfolgerate beobachtet wurde.

Die Erkenntnis, daß zumindest bei *V. vulgaris* die Spur aus den cuticulären Kohlenwasserstoffen besteht, unterstützt sehr stark die bereits in Abschnitt 3.4 formulierte Hypothese, daß die Spur den verlängerten Nestgeruch darstellen könnte. Verschiedene Arbeiten mit sozialen Wespen (ESPELIE et al. 1990, ESPELIE und HERMANN 1990, LORENZI 1992, SINGER et al. 1992) wiesen die Übereinstimmung des chemischen Kohlenwasserstoffprofils von Cuticula und Nesthülle nach. Dem *Gestalt Modell* (CROZIER und DIX 1979, SINGER et al. 1998, LENOIR et al. 2001a) zufolge werden diese Moleküle zwischen den Arbeiterinnen sowie zwischen Arbeiterinnen und Nestsustrat ausgetauscht. Auf diese Weise entsteht der gemeinsame Koloniegeruch, der der Nest- und der Nestgenossinnenerkennung dient, so wie es bereits für mehrere Arten sozialer Hymenopteren nachgewiesen worden ist (z. B. HANGARTNER et al. 1970, BREED 1998, ESPELIE et al. 1990, LAYTON und ESPELIE 1995, SINGER et al. 1998, VANDER MEER und MOREL 1998). Es kann postuliert werden, daß die an der Cuticula haftenden Nestgeruch-Kohlenwasserstoffe passiv oder absichtlich an das Substrat abgegeben werden, wenn die Arbeiterinnen außerhalb des Nestes laufen. Auf diese Weise könnte der Nestgeruch zu einer Spur verlängert werden, die für die Heimorientierung genutzt werden kann. Das Vorkommen terrestrischer Spuren bei eigentlich fliegenden Insekten, die wie *V. vulgaris* und *V. crabro* höhlenbrütend sind und regelmäßig in der unmittelbaren Nestumgebung laufen (z.B. in einem Tunnelsystem), kann damit gut erklärt werden.

Koloniespezifische Unterschiede in der Zusammensetzung der Spuren, die nach der eben vorgestellten Hypothese vorhanden sein müßten, ließen sich leider nicht

statistisch überprüfen. Für die Gewinnung einer genügend hohen Menge an Spursubstanz mußten die Arbeiterinnen die Objektträger im Gangsystem mindestens drei Wochen belaufen. Aus diesem Grund war es nicht möglich, in jeder Kolonie genügend voneinander unabhängige Spurproben zu gewinnen, wie es für eine statistische Auswertung notwendig gewesen wäre. Nach einem ersten oberflächlichen Vergleich der drei gewonnenen Spurextrakte aus den Kolonien B und D kann lediglich festgestellt werden, daß die Unterschiede in den Mengenverhältnissen der einzelnen Substanzen in den Extrakten zwischen den verschiedenen Kolonien B und D größer sind als zwischen den beiden Extrakten aus der Kolonie B. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diesen vorläufigen Hinweis auf eine koloniespezifische Spurzusammensetzung bei *V. vulgaris* zu erhärten.

Die Tatsache, daß mit einem synthetischen Alkangemisch keine Spurfolge bei den *V. vulgaris*-Arbeiterinnen ausgelöst werden konnte, widerspricht nicht der hier vorgestellte Hypothese. Es ist nachvollziehbar, daß eine Nestgeruch-Spur erst dann als Spur wahrgenommen wird, wenn eine größere Menge oder die Gesamtheit der Kohlenwasserstoffe aus der Cuticula bzw. dem Nestgeruch vorhanden ist. Die Alkane repräsentieren jedoch weniger als ein Drittel der cuticulären Kohlenwasserstoffe. Für die Zukunft wären Biotests zur spuraktiven Wirkung eines synthetischen Gemisches interessant, das das vollständige cuticuläre Kohlenwasserstoff-Profil von *V. vulgaris* nachbildet. Wegen der sehr aufwendigen chemischen Synthese der methylierten, stereoisomeren Kohlenwasserstoffe dürfte dies jedoch ohne einen erheblichen Aufwand in nächster Zeit kaum möglich sein.



