

Institut für den
Wissenschaftlichen Film
Göttingen



C 1746

Instrumentelle Besamung von Bienenköniginnen

Angaben zum Film:

Tonfilm (Komm., deutsch und Originalton), Farbe, 16 mm und Video, 207 m, 19 min. Hergestellt 1989, veröffentlicht 1990.

Veröffentlichung aus dem Niedersächsischen Landesinstitut für Bienenkunde, Celle, Prof. Dr. J. H. DUSTMANN, dem Institut für Bienenkunde der Universität Frankfurt/Main, Oberursel, M. KÜHNERT, dem Zentrum für kontinentale Agrar- und Wirtschaftsforschung, Sektion Tierzucht und Tierhaltung der Universität Gießen, Prof. Dr. P. SCHLEY, Herrn F.-K. TIESLER, Elsfleth, und dem Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, Dr. G. KERLEN; Kamera und Schnitt: C. GOEMANN.

Kurzinhalt:

Natürliche Paarung auf Belegstellen. Technik der instrumentellen Besamung: Vorbereitung des Tiermaterials; Spermagewinnung: homogene Spermamischung; Besamungsvorgang.

Anschrift der Autoren:

Prof. Dr. J. H. DUSTMANN, Niedersächsisches Landesinstitut für Bienenkunde, Wehlstr. 4 a, 3100 Celle
M. KÜHNERT, Institut für Bienenkunde der Universität Frankfurt/Main, Im Rotkopf 5, 6370 Oberursel/Taunus
Prof. Dr. P. SCHLEY, Zentrum für kontinentale Agrar- und Wirtschaftsforschung, Sektion Tierzucht und Tierhaltung, Universität Gießen, Otto-Behagel-Str. 10 D, 6300 Gießen
Dipl.-Ing. F.-K. TIESLER, Bardenfleth 31, 2887 Elsfleth

Bestellungen und Anfragen an: Institut für den Wissenschaftlichen Film
gem. GmbH
Nonnenstieg 72, D-3400 Göttingen
Tel.: (05 51) 2 02-0
Telefax: (05 51) 2 02-2 00

Instrumentelle Besamung von Bienenköniginnen unter Anwendung der Technik des homogenen Spermamischens

Allgemeines zur Zucht und Paarungskontrolle

Erfolge in der Züchtung sind bei der Honigbiene genauso möglich wie in der landwirtschaftlichen Tierzucht. Durch Selektion, ähnlich wie bei anderen Nutztieren, konnten in den letzten Jahrzehnten beachtenswerte Fortschritte erzielt werden. Kriterien für diese Auslese sind Honigertrag, Friedfertigkeit sowie ruhiger Sitz auf den Waben, geringe Schwarmneigung und Widerstandsfähigkeit gegenüber Krankheiten.

Jede Züchtung setzt eine gezielte Paarung voraus. Diese Paarungskontrolle bereitet jedoch in der Bienezucht große Schwierigkeiten. Die Geschlechtstiere - Königinnen und Drohnen - paaren sich in der Luft, meistens auf sogenannten Drohnensammelplätzen. Dabei legen Drohnen Entfernungen bis zu sieben, Königinnen bis zu fünf Kilometer von ihrem Heimatstock aus zurück. Selbst Höhendifferenzen von 500 m und mehr werden überwunden. Während der Hochzeitsflüge paart sich die Königin nicht nur mit einem Drohn, sondern mit mehreren; in der Regel sind es acht bis zwölf. Der Samen, den sie dabei aufnimmt, gelangt zunächst in die Eileiter und wandert von dort in die Samenblase, die Spermatheka. Er reicht für das ganze zwei- bis vierjährige Leben der Königin zur Befruchtung der Eier aus.

Um Königinnen und Drohnen gezielt zu paaren, wurden sogenannte Belegstellen eingerichtet. Das sind isoliert gelegene Plätze, auf denen Drohnenvölker und junge unbegattete Königinnen in kleinen Völkchen im Juni und Juli aufgestellt werden. Wirklich gezielte Paarungen lassen sich aber nur in einem Gebiet mit einem bienenfreien Radius von mindestens 10 km erreichen. Solche Gebiete findet man in Mitteleuropa nur selten. Daher gab es bei der Züchtung auch immer wieder Fehlschläge. Nur wenige Belegstellen im Hochgebirge und die auf den Inseln - wie im Film auf der Insel Juist - sind vor dem Zuflug fremder Drohnen sicher und daher für gezielte Zuchtprogramme einsetzbar.

Auch mit Hilfe der instrumentellen Besamung ist es möglich, das gewünschte geprüfte Zuchtmaterial zusammenzuführen. Die künstliche Samenübertragung ist in der Bienezucht keineswegs neu. Sie wird schon seit über 60 Jahren praktiziert. Die Methode wurde ständig weiterentwickelt, zunächst vorwiegend für wissenschaftliche Zwecke. Seit den siebziger Jahren hat das Verfahren verstärkt an Bedeutung für die Zuchtungspraxis gewonnen. Gegenüber der natürlichen Paarung, die sehr stark von der Witterung abhängig ist, ist die instrumentelle Besamung witterungsunabhängig, liefert höhere Ergebnisse und bietet darüber hinaus die Möglichkeit, verschiedene Drohnenherkünfte zu verwenden. So kann z. B. für jede zu besamende Königin anderes Drohnenmaterial herangezogen werden, wohingegen sich auf jeder Belegstelle alle dort aufgestellten Königinnen mit den gleichen Drohnenherkünften paaren.

Vorbereitung des Tiermaterials

Wichtigste Voraussetzung für die Besamung sind geschlechtsreife Tiere. Daher ist eine exakte Terminplanung Voraussetzung (Abb. 1).
 Drohnen benötigen vom Ei bis zur Geschlechtsreife etwa **40** Tage, Königinnen etwa 22 Tage. Deshalb ist zunächst mit der Drohnenaufzucht zu beginnen.

DROHNEN ♂				KÖNIGIN ♀		
Zu verrichtende Arbeit	Entwicklungsstufe	Tag	Datum	Tag	Entwicklungsstufe	Zu verrichtende Arbeit
10 Tage vorher Drohnenwabe geben evtl. reizfüttr. Drohnenwabe kontr. evtl. Kb. auf Drohnenwabe sperren		-10				
			- 3			
			0			
	Ei	1				starkes Pflegevolk mit viel Jungbienen evtl. durch Reizfütterung in Zuchtstimmung bringen
		2				
		3				
	Made	4				
		5				
		6				
	7					
Streckmade	8					
	9					
Verdeckeln	10					
Drohnenwabe in Pflegevolk ohne eig. Drohnen u. Drohnenbrut geben. Absperrgitter Pollen!!		11				hellbraune, honigfeuchte Wabe ins Zuchtvolk geben (Zuchtstoff)
		12				
		13				
		14				
	Puppe	15		- 2		
		16				
		17		0		
		18		1	Ei	
		19		2	"	
		20		3	"	
	21		4	Made		
	22		5		UMLARVEN	
Schlupf	23		6			
"	24		7			
	25		8			
Drohnenwabe entnehmen	26		9	Verdeckelung		
	27		10		(verschulen, Beibank)	
	28		11			
Volk nicht mehr zu Flugzeiten öffnen		29		12		
		30		13		
		31		14		(verschulen, /Pflegev)
		32		15	Schlupf	
	33		16	"	Kästchen füllen	
	34		17	"	" " zusetzen	
	35		18		Kellerhaft	
	36		19		Kellerhaft	
	37		20	5. Lebenstag	Kästchen aufstellen	
Spermaaufnahme		38		21	Geschlechts-	(mit Absperrgitter)
	volle	39		22	reife	Käfigen, CO ₂ zeichnen
	Geschlechts-	40		23	8. Lebenstag	Besamung
	reife	41		24		Kästchen nicht öffnen
		42		25		"
		43		26	möglicher Ei-	"
				27	lagebeginn	"
			28	"	"	
			29	"	"	
			30	"	Eilagekontrolle	

Abb. 1. Terminplan zur Koordinierung der Geschlechtsreife von Drohnen und Königinnen

Die Bereitschaft des Bienenvolkes zur Aufzucht und Pflege von Drohnen ist stark von Umwelteinflüssen, wie Witterung und Nahrungsangebot, abhängig. Etwa 50 Tage vor dem geplanten Besamungstermin wird dem Drohnenvolk eine leere Wabe mit Drohnenbau ins Brutnest eingehängt. Wenn die Bedingungen günstig sind (Jahreszeit, Volksstärke, Tracht, Pollenversorgung und Temperatur), wird diese Wabe von der Königin schnell bestiftet. Bis zur Verdeckelung der Zellen benötigt das Volk Wärme, Pollen und Futter im Überfluß. Bei Bedarf muß das Volk eingeeht oder gefüttert werden. Die Entwicklung der Drohnen vom Ei bis zum Schlüpfen dauert 24 Tage. Sie unternehmen schon vom 7. Lebenstag an kürzere Ausflüge. Die zur Besamung optimale Geschlechtsreife erreichen sie erst mit dem 16. Lebenstag. Während der Reifungsphase benötigt der Drohn Wärme und gute Ernährung. Er hält sich deshalb gern im Brutnest auf. Ältere Drohnen hingegen findet man auf den Randwaben. Gegen Ende der Saison, oft schon Ende Juli, sind die Bienen nicht mehr bereit, Drohnen zu pflegen. Hier können die Völker durch Entweiselung zur Weiterpflege stimuliert werden.

Drohnen vagabundieren oft von Volk zu Volk. Für die instrumentelle Besamung benötigt man jedoch Drohnen, deren Herkunft eindeutig bekannt ist. Außerdem

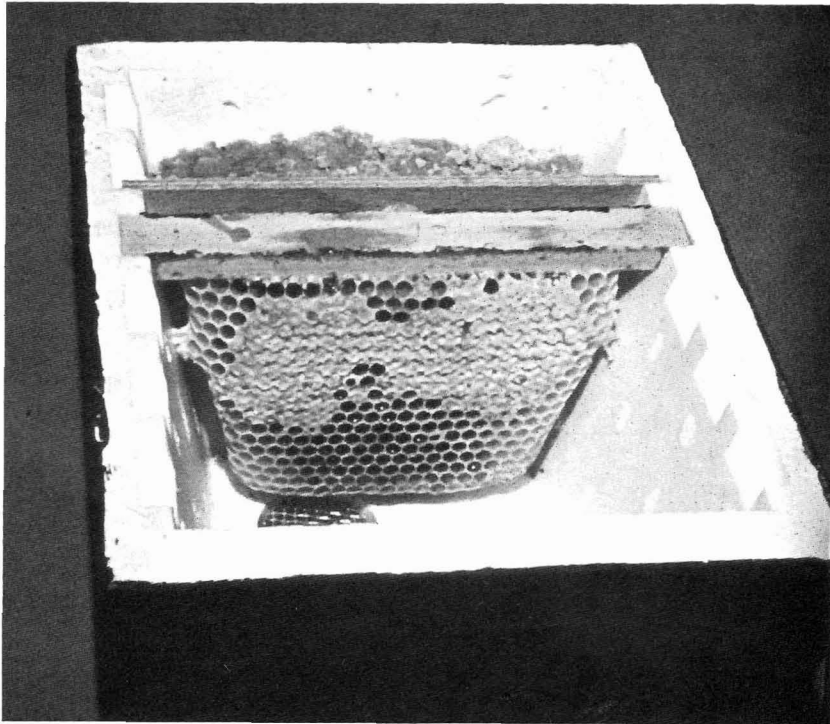


Abb. 2. Kirchhainer Begattungskästchen mit Wabe
(Foto: V. Maul)

sollte man das Alter genau bestimmen können. Neben Verfahren, bei denen die geschlüpften Drohnen über einem Absperrgitter gehalten werden, hat sich eine farbliche Kennzeichnung der frisch geschlüpften Tiere bewährt. Zum Zeichnen eignen sich Lackmalstifte in verschiedenen Farben, mit denen man das Brustschild der Drohnen betupft. Durch Kennzeichnung mit mehreren Farben lassen sich jederzeit Alter und Herkunft bestimmen. Die markierten Tiere können bis zu ihrer Verwendung frei ausfliegen. Die Verwendung von Drohnen, die im Freien abkoten konnten, vermindert das Infektionsrisiko.

Mit der Aufzucht von Königinnen beginnt man etwa 20 Tage vor dem geplanten Besamungstermin. Zur Königinnenzucht gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Verfahren, auf die hier nicht eingegangen werden kann (gesonderter Film IWF).

Die jungen unbegatteten Königinnen werden nach dem Schlüpfen mit der jeweiligen Jahresfarbe gekennzeichnet und in kleinen Begattungsvölkchen untergebracht. Bei Anwendung des Besamungsverfahrens haben sich Mehrwabenkästchen aus Schaumstoff - wie hier das Kirchhainer Kästchen - besonders bewährt (Abb. 2). Sie sind wärmeisolierend und das ist später für den Beginn der Eiablage von Bedeutung. Kleinere Kästchen, Einwabenkästchen oder Käfige in Brutschränken sind weniger geeignet.

Um den Beginn der Eiablage nach der Besamung zu beschleunigen, ist neben der Kohlendioxid-Narkose (CO₂-Narkose) während der Besamung eine zweite Kohlendioxidbehandlung der Königinnen erforderlich. Diese zusätzliche CO₂-

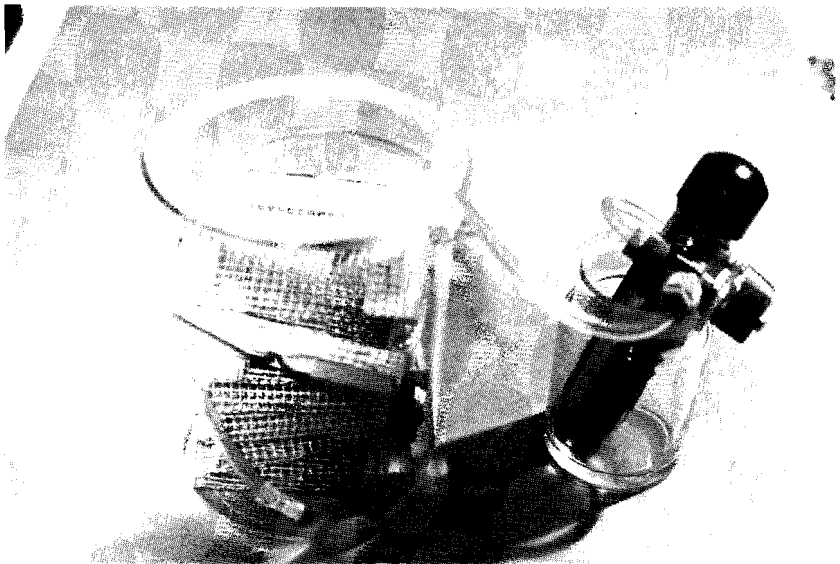


Abb. 3. CO₂-Behandlung der Königinnen einen Tag vor der Besamung

Behandlung kann vor oder nach der Besamung erfolgen und dauert etwa drei bis fünf Minuten. Aus technischen Gründen und wegen der besseren Wanderung der Spermien in die Spermatheka hat sich die Behandlung 24 Stunden vor dem Besamungstermin als besonders vorteilhaft erwiesen. Dazu werden die Königinnen aus ihren Völkchen herausgefangen, in kleine Käfige gesperrt und in ein Gefäß gegeben, in das CO₂ aus einer Druckflasche oder - wie hier - aus einer Einwegkapsel strömt (Abb. 3). Die Gasmenge wird über ein Reduzierventil reguliert. Die Königinnen in den Käfigen werden bis zur Besamung wieder in ihre Völkchen zurückgegeben.

Arbeitsplatz und Geräte

Für die Besamung selbst ist ein heller, sauberer Arbeitsplatz mit Strom- und Wasseranschluß erforderlich (Abb. 4). Der Tisch soll stabil sein und eine glatte, leicht zu reinigende Arbeitsplatte haben; Tisch- und Stuhlhöhe müssen auf die Größe des Besamers abgestimmt sein.

Kurze Wege zu den Drohnenvölkern und Begattungsvölkchen erleichtern die Arbeit. Folgende Geräte werden benötigt:

- a) Besamungsgerät mit Besamungsspritze
- b) Stereomikroskop mit geeigneter Beleuchtung
- c) Narkoseeinrichtung
- d) Käfig für die Drohnen
- e) Labormaterial und -geräte

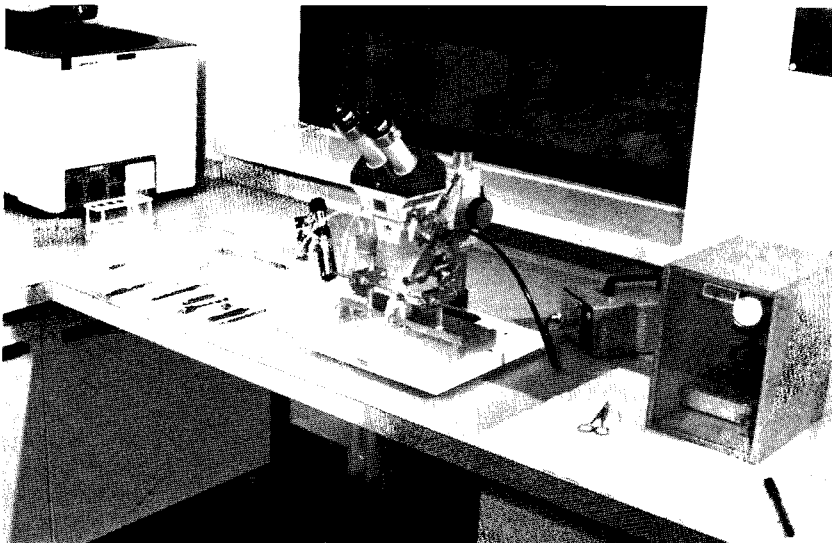


Abb. 4. Arbeitsplatz: In der Mitte das Besamungsgerät, links (sterile Seite) Zentrifuge, Labormaterial und -instrumente, rechts Käfig für die Drohnen

a) Besamungsgerät mit Besamungsspritze

Im Handel werden Besamungsgeräte unterschiedlicher Bauart angeboten. Im Film wird mit dem MACKENSEN-Gerät modifiziert nach Schley gearbeitet. Das Besamungsgerät (Abb. 5) besteht aus einer stabilen Grundplatte. Rechts und links auf dieser befinden sich zwei Säulen, die die Lagerblöcke für die Halter mit

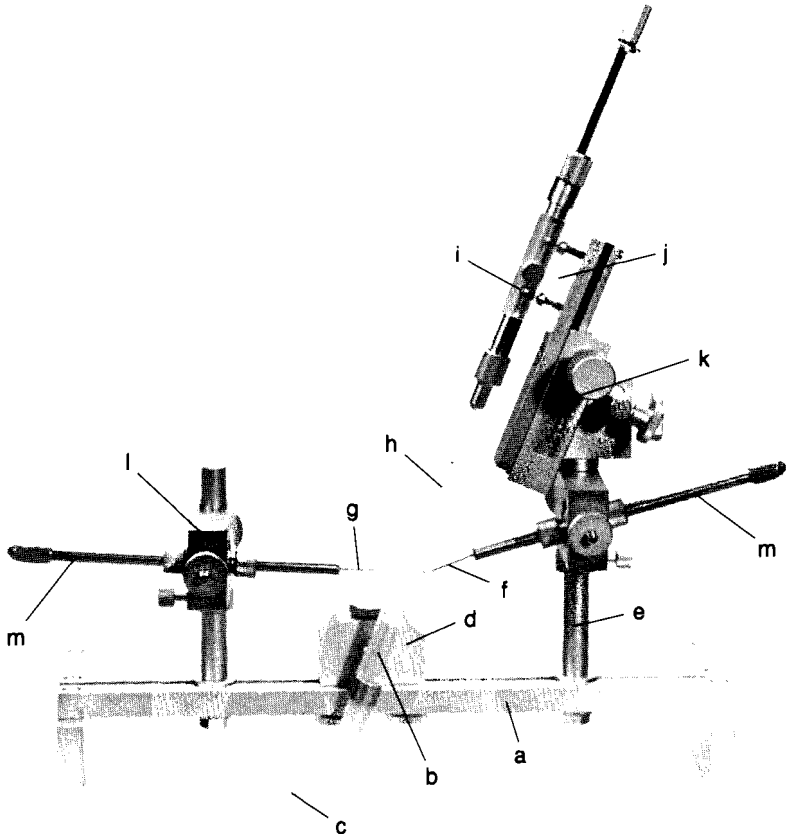


Abb. 5. Mackensen-Besamungsgerät (nach Schley modifiziert)

- | | |
|---------------------------|--------------------------------|
| a Grundplatte | h Glasspitze |
| b Königinnenhalteröhrchen | i Besamungsspritze (Schley) |
| c CO ₂ -Zufuhr | j Spritzenhalter |
| d Halteblock | k Spritzenvortrieb |
| e Stativsäule | l Lagerblöcke mit Kugelführung |
| f Dorsalhaken | m Hakenhaltegriffe |
| g Ventralhaken | |

den Häckchen zum Öffnen der Stachelkammer tragen. Mittels Kugelführung können die Handgriffe mit den Haken feinfühlig bewegt werden, ohne daß ruckartige Bewegungen auftreten. An der rechten Säule ist über dem Lagerblock der Spritzenhalter angebracht, der die Besamungsspritze aufnimmt. Bei der Spritze handelt es sich um eine Kolbenbesamungsspritze mit auswechselbaren Zylindern. Als Kanülen dienen ausgezogene Glaskapillaren mit einer geschliffenen und polierten Mündung. Zwischen den beiden Stativsäulen ist der Königinnenhalter plaziert. Das Heranführen der Spritze erfolgt mittels Zahn und Trieb. Die Spritze selbst läßt sich in drei Ebenen bewegen. Zur Besamung befindet sich die Königin im Königinnenhalter.

b) Stereomikroskop mit geeigneter Beleuchtung

Das Stereomikroskop soll einen Arbeitsabstand von 70-100 mm aufweisen. Für die Spermaaufnahme kommt eine Vergrößerung von 15 bis 25 x (Okular 10 x, Objektiv 1,5 bis 2,5 x) in Betracht.

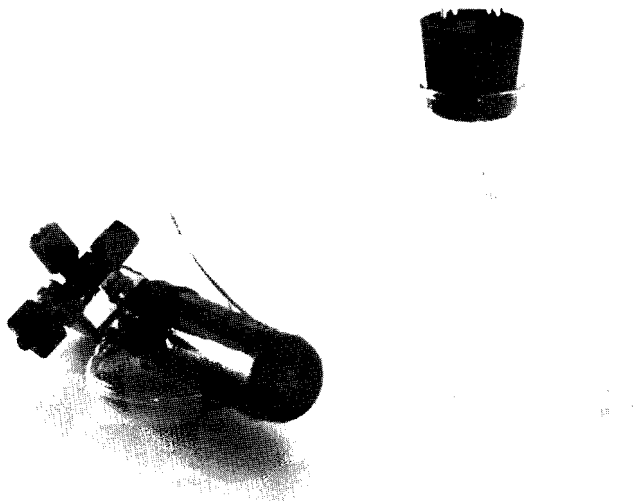


Abb. 6. Narkoseeinrichtung mit CO₂-Patronen (nach Schley)

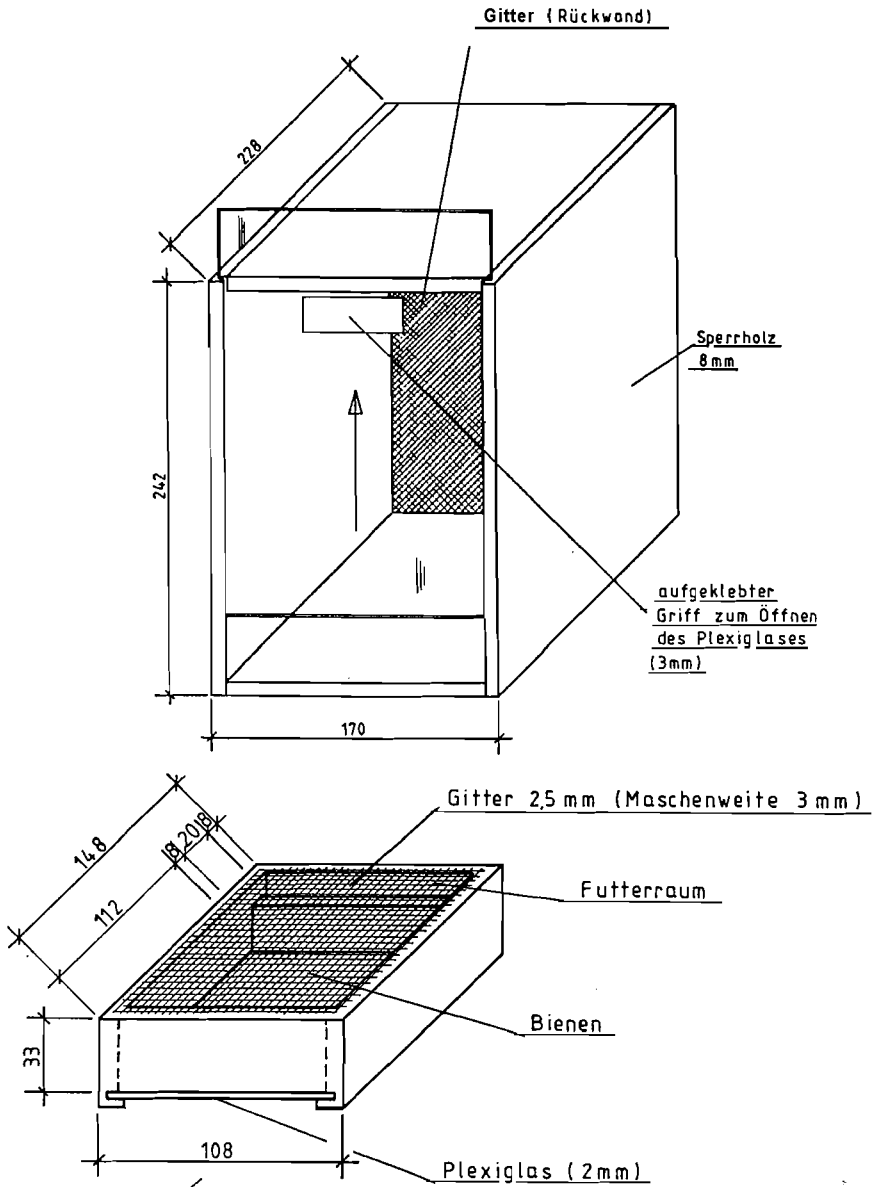


Abb. 7. Flugkäfig für die Drohnen mit Käfig für die Arbeitsbienen (nach Andersen)

Eine funktionsgerechte Beleuchtung ist für die Durchführung der Besamung unerlässlich. Wichtig ist, daß der Lichtkegel in die geöffnete Stachelkammer der Königin hineinzählt, ohne daß die Schleimhäute der Wärme ausgesetzt werden. Besonders geeignet für diesen Zweck ist eine Glasfaserlampe.

c) Narkoseeinrichtung

Zur Narkose der Königin während der Besamung wird CO₂ aus einer **Druckflasche** oder - wie im Film - aus einer Einwegflasche mit **Reduzierventil** über eine Waschflasche in das **Königinnenhalteröhrchen** geleitet (Abb. 6).

Über die zwischengeschaltete halb gefüllte Waschflasche kann durch die aufsteigenden Gasblasen die Stärke des Gasstromes kontrolliert werden. Der Königinnenhalter ist so beschaffen, daß kein reines Kohlendioxid, sondern mit Luft vermisches Gas in die Tracheen der Königin gelangt. Der Königinnenhalter weist feine Bohrungen auf, aus denen das Gas ungehindert ausströmen kann.

d) Käfig für die Drohnen

Drohnen, die in kleinen Käfigen ohne Bienen untergebracht sind, verlieren schnell ihre Aktivität. Deshalb ist es zweckmäßig, sie unmittelbar vor der Spermaaufnahme in einen Flugkäfig zu geben, aus dem heraus sie schnell abzufangen sind (Abb. 7). Bienen in einem Separaten Käfig, mit Futterteig versorgt, können die Drohnen durch eine weitmaschige Gaze füttern. Vorn ist der Flugkäfig mit einer hochschiebbaren Plexiglasscheibe versehen. Auf der gegenüberliegenden Seite befindet sich Drahtgaze. Durch eine Lampe wird von der Rückseite her für die erforderliche Wärme gesorgt.

e) Labormaterial und -geräte

- Chemikalien

Als Stopperlösung in der Besamungsspritze hat sich ein Ebersperma-Verdüner (Kiew) sowie die einfach herzustellende Salzlösung nach Hyes oder ein Tris-Puffer bewährt. Die **beiden** letzten **Verdüner** eignen sich auch für die im Film gezeigte Technik des homogenen Mischens von Drohnensperma. Ferner wird eine Labor-Reinigungslösung für die Glas-Besamungsspitzen benötigt, die auch hartnäckige **Spermarückstände** in den Kapillaren beseitigt (Mucosol, Edisonite) sowie destilliertes Wasser zum Nachspülen. Wichtig ist auch ein Flächen-desinfektionsmittel für den Tisch usw., ein mildes Mittel zur **Händedesinfektion** und Alkohol 70 % z. B. zur Zwischenreinigung der Hähchen.

- Laborgeräte

Zur Sterilisation hitzebeständiger Teile wird ein Autoklav bzw. ein **Dampfdrucktopf** benötigt, zum Trennen aufgeschwemmten Spermas vom **Verdüner** (bei Anwendung der Spermahomogenisierung) braucht man eine Zentrifuge (Tischmodell mit Schwingrotor). Zweckmäßig ist auch eine Spirituslampe oder

ein Bunsenbrenner. Eine Wasserstrahlpumpe zur Reinigung der Glaskapillaren ist vorteilhaft, aber nicht unbedingt erforderlich.

- Labormaterial

Neben diversen Glasflaschen für die Chemikalien und sterilisierbaren Behältern mit Deckel (Instrumente- und Petrischalen aus Glas) werden Einwegspritzen (10 - 50 ml) mit Sterilfilter-Vorsätzen (Porengröße 0,2 μm), Pasteurpipetten, sterile Zellstofftupfer oder Wattestäbchen, eine kleine Schere und Pinzette sowie Alufolie benötigt.

Hygienemaßnahmen

Bei der instrumentellen Besamung ist es notwendig, Infektionsgefahren nach Möglichkeit von vornherein auszuschließen oder durch Abtötung der Krankheitserreger abzuwenden. Besonders gefährlich für die Königin sind die bienenspezifischen Keime an der Körperoberfläche oder aus den Exkrementen von Bienen oder Drohnen. Arbeitsplatte und Besamungsapparat (besonders Königinnen-Einlauf- und -Halteröhrchen) müssen bisweilen mehrmals täglich mit den vorgenannten Laborreinigern desinfiziert werden. Alle hitzebeständigen Teile (Glas und Metall) wie saubere Besamungskanülen mit Quetschdichtung, Besamungsspritze, Petrischalen, Zellstofftupfer, Sonde und Häkchen (ohne Halter) werden täglich in Autoklaven bei 120 - 140° oder im Dampftopf (10 - 15 min ohne Aufheizzeit) sterilisiert. Die Sterilfiltrierung der Spermaverdünnerlösung (Kochsalzlösung oder - wie hier - ein Tris-Puffer) stellt eine wichtige Sicherheitsmaßnahme dar. Die Lösung wird in eine Einwegspritze aufgezogen. Vor diese Spritze wird ein Einwegfilter (o 30 mm, Porengröße der Membran 0,2 μm) gesteckt. Die sterile Stahlkanüle kommt auf den Filter. So kann bei Bedarf immer frisch filtrierter Verdünner entnommen werden.

Spermaaufnahme

Zur Vorbereitung der Spermagewinnung wird der Zylinder der Besamungsspritze mit sterilfiltriertem Verdünner gefüllt. Durch leichtes Klopfen mit dem Finger gegen den Spritzenzylinder entweichen die Luftblasen. Der Spritzenzylinder wird in das Spritzengehäuse gesetzt, das schmale Vorderteil des Zylinders ragt aus dem Spritzengehäuse heraus. Mittels einer Muffe und Quetschdichtung wird die Glasspitze befestigt. Über die Kolbenspindel wird die Flüssigkeitssäule bis auf einen kleinen Luftraum (2 - 4 mm) in der Glasspitze nach vorn gedrückt. Die hintere Gewindemuffe wird aufgeschraubt. Anschließend erfolgt die Montage am Besamungsgerät. Bei allen Arbeiten ist darauf zu achten, daß die Enden der Kapillaren aus hygienischen Gründen nicht mit den Fingern in Kontakt kommen. Die Aufsteckplatte mit dem Halteröhrchen für die Königin kann für die Spermaaufnahme entfernt werden, damit mehr Raum zur Verfügung steht. Der Lichtkegel der Beleuchtung und das Blickfeld des Mikroskops (16 - 20fache Vergrößerung) werden auf die Spitzenmündung eingestellt. Die im Flugkäfig von Arbeitsbienen gepflegten Drohnen werden zur Spermagewinnung einzeln ent-

nommen. Der Drohn wird an Kopf und Bruststück zwischen Daumen und Zeigefinger gehalten, die Rückenseite des Abdomens zeigt nach oben. Rollen sowie leichter Druck wirken sich bei reifen Drohnen günstig auf die Kontraktion der Hinterleibsmuskulatur aus, deutlich fühlbar am Hartwerden des Abdomens. Es kommt zur ersten Phase der Ausstülpung des Begattungsorgans. Weiterer Druck führt zur vollständigen Eversion und Ejakulation. Reifes Sperma ist am cremefarbenen Aussehen zu erkennen. Oft überzieht es - wie im Film zu sehen - den weißen Schleimpfropfen des Endophallus. Solches Sperma haben nur Drohnen, die älter als 12 Tage sind und sich in guter Verfassung befinden. Drohnen, die entweder noch nicht reif sind oder sich in einem schlechten Pflegezustand befinden, erkennt man daran, daß ihr Hinterleib beim Rollen und Druck nicht erhärtet. Auch gewaltsames Auspressen führt hier nicht zur Ejakulation. Beim Aufsaugen des Spermas wird die Spermaoberfläche mit der äußersten Spitze nur leicht berührt (Abb. 8).

Durch die Adhäsionswirkung nimmt die Kapillare das Sperma sofort an. Der Drohn kann während des Aufsaugens sogar etwas zurückgezogen werden. Beim Aufziehen des Spermas darf kein Schleim in die Spritze gelangen, um ein Verstopfen durch Pfropfenbildung in der Karüle zu vermeiden. Falls Schleim angesaugt wird, muß dieser gleich wieder herausgedrückt werden. Analog zur natürlichen Paarung wird auch bei der instrumentellen Besamung das Sperma mehrerer Drohnen nacheinander aufgenommen. Für eine Besamung werden mindestens 8 μl ($1 \mu\text{l} = 1/1000 \text{ cm}^3$) verwendet, das entspricht der Spermamenge, die von 8 bis 10 reifen Drohnen gewonnen werden kann. Diese

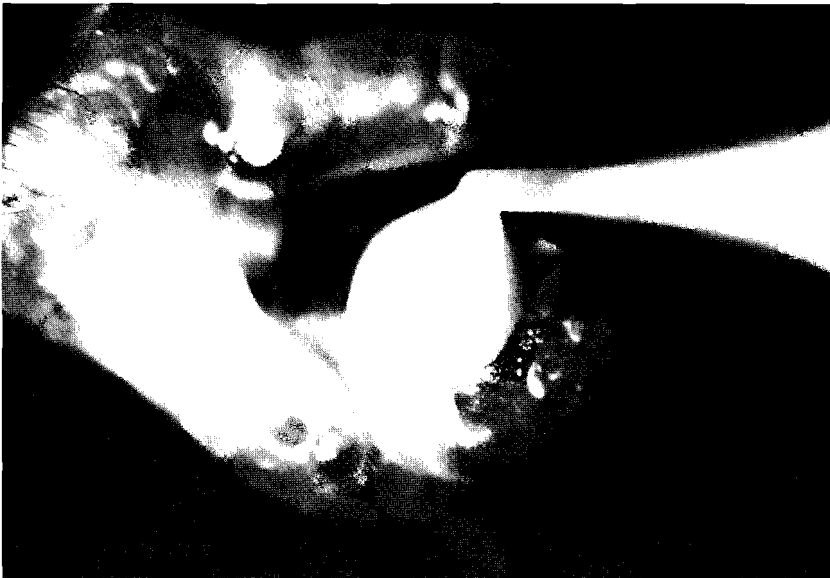


Abb. 8. Aufnehmen des Spermas

Menge ergibt in einer Glaskapillare von 1,5 mm Außen- und etwa 0,8 mm Innendurchmesser eine Spermasäule von 14 - 15 mm.

Bei Bedarf wird die Kanülenspitze mit einem sterilen Tupfer gereinigt. Ein Tropfen Verdünner verschließt die Kapillare, um ein Austrocknen zu vermeiden. Damit ist die Spritze zur Besamung vorbereitet.

Homogenes Spermamischen

Seit dem Nachweis der Mehrfachpaarung der Bienenkönigin ist es Praxis auf Belegstellen und in Besamungsstationen, ein breites Spektrum von Drohnenmaterial zur Anpaarung zu verwenden, um eine möglichst große genetische Vielfalt zu erhalten. Die Spermamenge, die eine Königin aufnehmen kann, ist begrenzt, und nur etwa 1/10 der aufgenommenen Menge wird in der Spermatheka gespeichert. Bei der natürlichen Paarung erhält die Königin das Sperma "portionsweise" von 8 - 10 Drohnen. Auch bei der herkömmlichen Besamung wird es in der Sequenz der Drohnen "schichtweise" in eine dünne Glaskapillare aufgenommen, bevor es der Königin injiziert wird. In der Spermatheka der Königin ist das Sperma gut durchmischt, jedoch sind die Drohnen zu ungleichen Anteilen mit ihrem Erbgut repräsentiert.

In jüngster Zeit gibt es ein technisches Verfahren bei der instrumentellen Besamung, mit welchem man sowohl die genetische Vielfalt erhöhen als auch eine

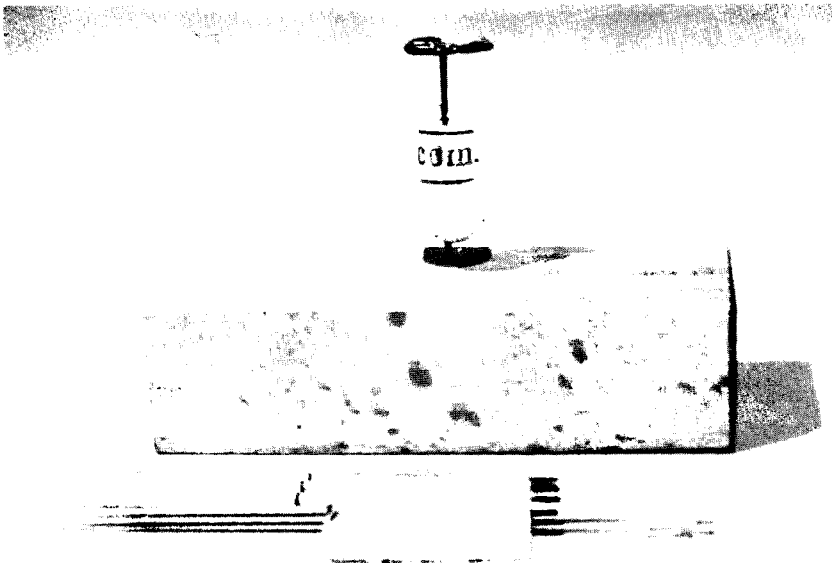


Abb. 9. In mehreren Glaskapillaren aufgezogenes Sperma unterschiedlicher Herkunft wird in der 10- bis 12fachen Menge Verdünner aufgeschwemmt

gleichmäßige Repräsentanz aller Spermien in der Königin erreichen kann, die sog. **Spermamischtechnik** oder **Spermahomogenisierung**. Für die Praxis bedeutet das, daß man Sperma von **mehreren hundert Drohnen** "poolen", d. h. zu einer Gesamtheit zusammenfassen kann. Das ergibt folgende Vorteile:

1. Eine Königin bekommt beim Besamen mit einer Portion des **Spermagesamisches** die Erbinformationen von unvergleichbar viel mehr Drohnen als bisher. Die genetische Variabilität wird damit erhöht und daher der Inzucht entgegengewirkt.
2. Gruppen von Königinnen können mit identischem Sperma besamt werden. Dadurch sind zuverlässigere Aussagen bei der Leistungsprüfung möglich.
3. Die Planung und Organisation von Zuchtprogrammen wird erleichtert, da auf der Gattenseite eine einheitliche Mischung des Spermias der für das jeweilige Programm selektierten Drohnen eingesetzt werden kann.

Als Hilfsmittel werden eine Zentrifuge und das entsprechende Zentrifugengefäß benötigt. Es eignen sich fast alle Zentrifugen, bei denen 1000 g erreicht werden. Als Zentrifugengefäß hat sich ein 0,4 ml Eppendorfgefäß, auf das die Hülse einer Einwegspritze gesteckt wird, bewährt. Die Hülse kann - für die jeweilige Zentrifuge passend - eingekürzt werden. Die in Glaskapillaren aufgezogenen Spermaportionen werden in der 10 - 12fachen Menge Spermaverdünner aufgeschwemmt (Abb. 9).

Als Spermaverdünner haben sich ein Tris-Puffer sowie auch die physiologische Salzlösung nach Hyes bewährt. In jedem Fall muß der Verdünner zuvor sterilfiltriert werden. Mit einer Pipette wird die Suspension gründlich durchmischt und in das Zentrifugengefäß gefüllt. Das gefüllte Gefäß wird in die Zentrifuge gegeben, wobei **darauf** zu achten ist, daß keine Unwucht entsteht. Nach 10 bis 15 min bei 1.000 g (das entspricht bei den meisten Standardzentrifugen 2.500 U/min) hat sich der evtl. vorhandene Schleim im unteren Teil des Röhrchens abgesetzt, darüber befindet sich das Sperma. Der Verdünner bildet einen klaren Überstand (Abb. 10), den man schnell entfernt, um erneute Aufschwemmung zu verhindern. Es ist ratsam, zentrifugiertes Sperma umgehend zu verwenden.

Das homogenisierte Sperma wird aus dem Zentrifugenröhrchen wieder in Kapillaren für die Besamung aufgezogen. Hierbei zeigt die Benutzung des 0,4 ml Eppendorf-Gefäßes den Vorteil, daß das Weichplastikmaterial leicht an der Oberfläche des Spermias geschnitten werden kann und so eine bessere Sicht gewährleistet wird. Für eine Besamung mit so behandeltem Sperma werden 10 bis 12 µl verwendet, etwas mehr als bei der herkömmlichen Besamung.

Weiterhin ist bei Anwendung der Spermamischtechnik auf strengste Einhaltung aller Hygienemaßnahmen zu achten, denn die Kontaminierung nur einer Samenportion in der Mischung kann einen Totalausfall der Serie verursachen. Insbesondere müssen alle zur Spermamischung verwendeten Geräte vor Benutzung sterilisiert werden oder aus steril verpacktem Einwegmaterial bestehen. Ein Zuchtprogramm mit Anwendung der Spermamischtechnik ist ein arbeitsintensives Unternehmen, in welchem es auf exakte Zeitplanung ankommt. Die gleichzeitige Aufzucht sehr vieler Drohnen von vielen Linien, parallel mit der

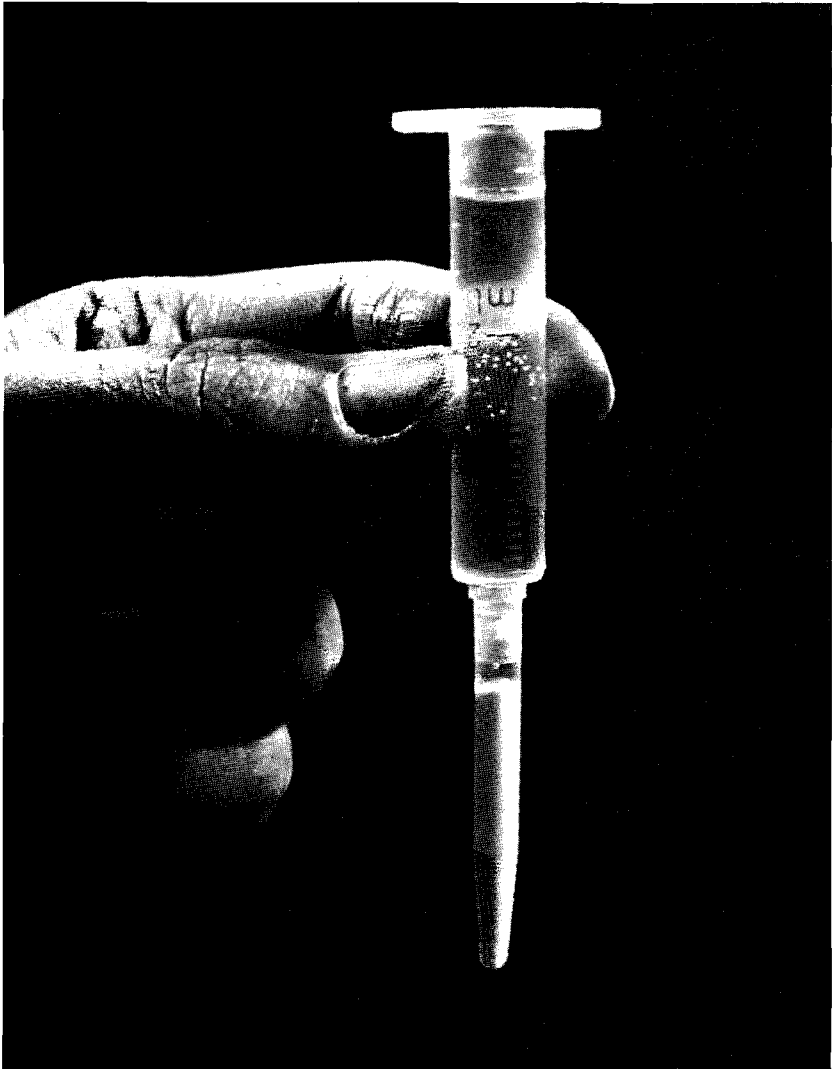


Abb. 10. Durch Zentrifugieren wurden Spermia und Verdünner voneinander getrennt (Foto: Ch. Rau)

Aufzucht der entsprechenden Jungköniginnen, muß gut geplant und koordiniert werden.

Besamungsvorgang

Die in der Regel am Vortag bereits mit CO₂ behandelte und gekäfigte Königin wird zwischen Daumen und Zeigefinger gegriffen und in das Einlaufröhrchen dirigiert. Am Ende dieses Röhrchens befindet sich nur eine kleine Öffnung, die die Königin nicht passieren kann. Sie kriecht deshalb - mit ihrem Hinterteil voran - zurück in das bereitgehaltene Halteröhrchen des Königinnenhalters, das man direkt vor die Öffnung des Einlaufröhrchens hält. Durch leichtes Pusten in das Halteröhrchen kann man etwas nachhelfen. Anschließend wird das Röhrchen mit der Königin auf den Königinnenhalter aufgesteckt und dieser am Block des Gerätes unter ca. 70° Neigung fixiert. Dabei zeigt die Rücken(Dorsal)-seite der Königin nach rechts - vom Besamer aus betrachtet -. Die letzten drei Bauchschuppen dürfen aus dem Halteröhrchen herausragen (Abb. 11).

Nun wird die Kohlensäureanlage zur Ruhigstellung der Königin in Betrieb gesetzt. Der Gasstrom wird so reguliert, daß die in der Waschflasche perlenden Blasen nicht zu stark sprudeln. Anfangs bewegt die Königin noch den Hinterleib, wird dann aber zusehends ruhiger. Mit den beiden Häkchen wird die Stachelkammer geöffnet. Zunächst wird der Ventralhaken - links vom Besamer aus gesehen - an die Königin herangeführt und unter Mikroskopkontrolle hinter der



Abb. 11. Königin im Königinnenhalter

letzten Bauchschuppe ganz am Ende des Hinterleibes eingehakt (Abb. 12, 1). Sitzt dieses linke Häkchen, das nur leicht anzuziehen ist, wird der Dorsal- oder Stachelhaken angesetzt. Im Film wird mit einem Lochhaken gearbeitet, durch dessen ovales Loch zunächst der Stachel eingefädelt wird (Abb. 12, 2 + 3). Die Stachelkammer wird vorwiegend mit dem rechten Haken auseinandergezogen (Abb. 12, 4).

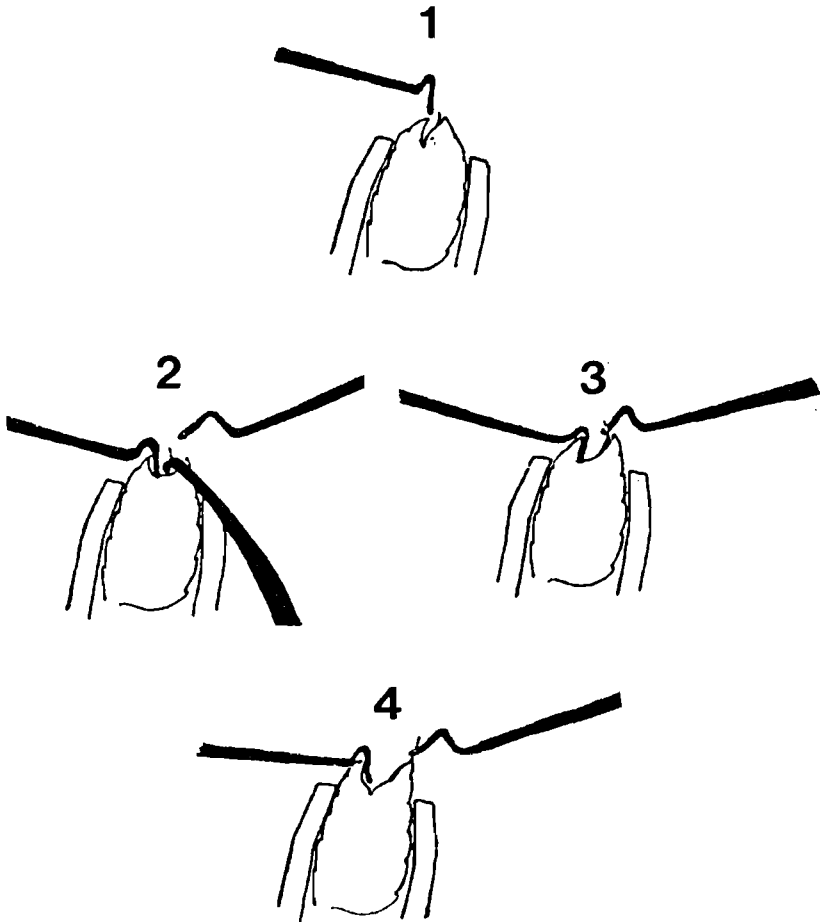
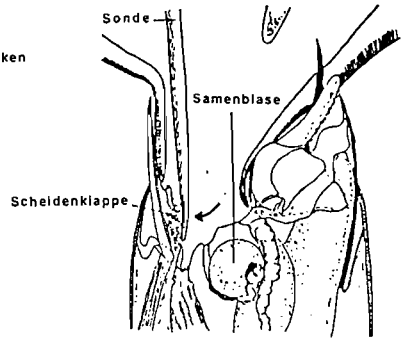
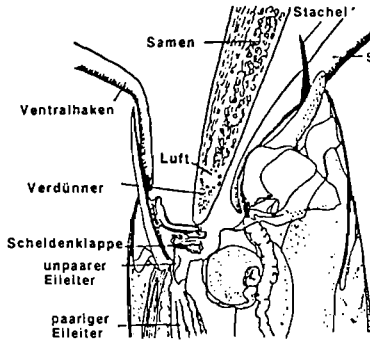


Abb. 12. Öffnen der Stachelkammer mit dem Lochhaken:

- 1 Ansetzen des Ventralhakens,
- 2 + 3 Einfädeln des Stachels in das Loch des Dorsalhakens
- hier mit Hilfe einer Sonde
- 4 Öffnen der Stachelkammer

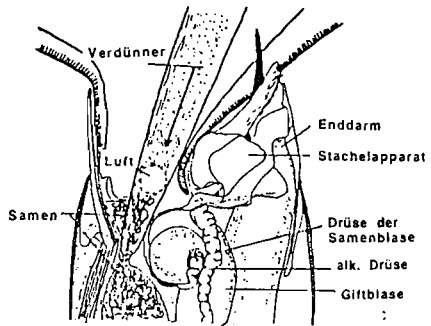
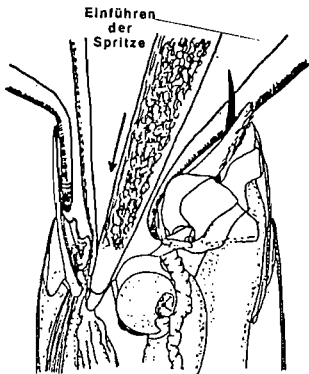
Bei Benutzung mancher Dorsalhaken ohne Loch muß die Vaginalöffnung mit einer Handsonde freigelegt werden (Abb. 13).

Mit neueren Dorsalhaken, Lochhaken oder bei Verwendung einer Pinzette anstelle des Dorsalhakens wird jedoch der Stachelapparat angehoben und die Scheidenöffnung direkt sichtbar. Die geöffnete Stachelkammer bietet dem Betrachter ein Bild runzlicher Haut mit Hauteinfaltungen und Vertiefungen.



1. Stachelkammer mit Haken geöffnet. Spritze wird auf den Scheideneingang justiert.

2. Spritze wird zurückgezogen. Scheidenklappe mit Vaginalsonde zur Seite gedrückt.



3. Einführen der Spritze in die Öffnung des unpaaren Eileiters (Geschlechtsöffnung).

4. Einspritzen des Samens in die paarigen Eileiter.

Abb. 13. Besamungsvorgang bei Benutzung des herkömmlichen Dorsalhakens ohne Loch und mit Hilfe einer Sonde (Zeichnungen: HLA - Außenstelle für Bienenzucht/Kirchhain)

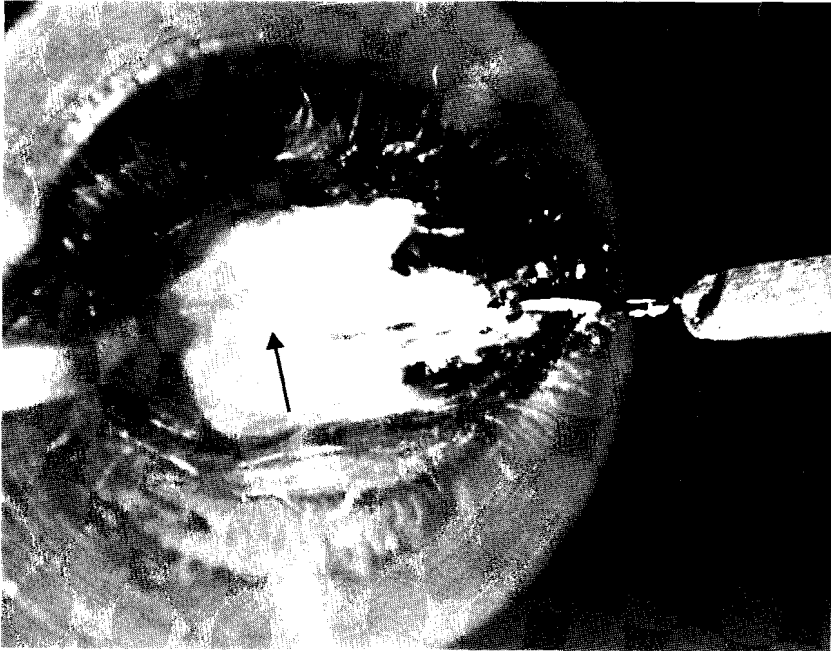


Abb. 14. Blick in die geöffnete Stachelkammer

Deutlich sichtbar sind die Stachelbögen, zwei chitinöse braune Bögen, die die Basis des Stachels bilden. Mit den beiden gegenüberliegenden Hautfalten bildet diese ein Dreieck, dessen Spitze nach links gerichtet ist. In der Mitte dieses Dreiecks liegt die Geschlechtsöffnung, die als faltige Einmündung zu erkennen ist (Abb. 14).

Mit einem sterilen Tupfer wird der Verdünnertropfen, der die Kapillare gegen Austrocknung verschlossen hat, entfernt. Unter einer Neigung von ca. 65° wird die Besamungsspritze auf die Scheidenöffnung justiert und die Spitze ca. 1,5 mm in die Scheidenöffnung eingeführt. Vorsichtig wird der Drehknopf der Spritze betätigt und dadurch das Sperma injiziert. Ist die Spritze richtig eingeführt, fließt das Sperma ohne spürbaren Widerstand in die Ovidukte der Königin, ohne daß davon etwas in die Stachelkammer austritt. Der Fluß des gelblich wolkigen Spermas in der Kanüle ist unter dem Mikroskop deutlich sichtbar (Abb. 15).

Ist die notwendige Spermamenge ($8 \mu\text{l}$ bzw. $12 \mu\text{l}$) erreicht, stoppt man die Spermazufuhr. Die Spritze wird hochgezogen und wieder gegen Austrocknung gesichert. Vorsichtig werden die Haken herausgehoben und nach hinten weggeschwenkt. Der Besamungsvorgang ist damit abgeschlossen.

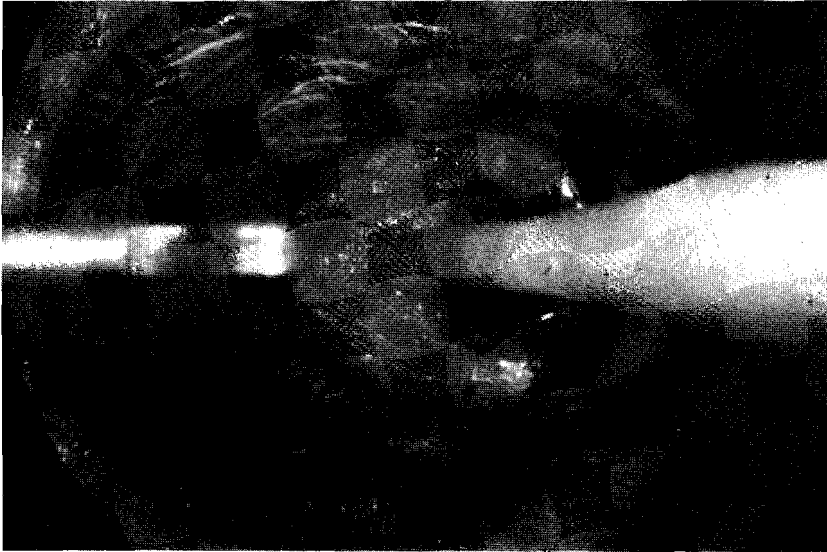


Abb. 15. Injektion des Spermas

Beim geübten Besamer läuft der Besamungsvorgang meistens so schnell ab, daß die Königin noch etwas im Königinnenhalter belassen werden muß, um sie einer ausreichend langen CO₂-Narkose zu unterziehen.

Die wichtigen Fakten (Zuchtbuchnummer der Königin, Name des Züchters, verwendetes Drohnenmaterial, Tag der CO₂-Narkose und der Besamung) werden im Besamungsbuch eingetragen (Abb. 16). So lassen sich später alle Angaben nachvollziehen.

Nach der Besamung

Die noch betäubte Königin wird aus dem Röhrchen in die hohle Hand herausgepustet. Ihr wird ein Deckflügel um 1/3 gekürzt, um ein späteres Ausfliegen zu einem unkontrollierten Begattungsflug zu verhindern. Unter Futterteigverschluß wird sie im Einhängkäfig in ihr Völkchen zurückgegeben. Ein Absperrgitter vor dem Flugloch des Begattungskästchens ist zusätzlich unerläßlich.

Je vorteilhafter die Pflege- und Temperaturbedingungen im Begattungsvölkchen sind, desto besser ist die Wanderung der Spermien in die Spermatheka gesichert und umso früher beginnt die Königin mit der Eiablage. In dem Begattungsvölkchen sollte Brutnesttemperatur herrschen, was nur beim Vorhandensein mehrerer Wabengassen gewährleistet ist. Bei unzureichenden Tempera-

Die besamten Königinnen legen große Brutnester an, können durchweg über zwei **Leistungsjahre** eingesetzt werden und stehen häufig noch im 3. Jahr für die Nachzucht zur Verfügung. Die Erfahrung hat gezeigt, daß sie den natürlich geapaarten durchaus gleichwertig sind. Die Anwendung dieser Technik wird daher in Zukunft für die imkerliche Praxis noch weiter an Bedeutung gewinnen.

Literatur

- BACKES, M.** (1989): **Verdüner** in der Königinnenbesamung. Mitteilungen Bienenbesamung, Vol. 1, Nr. 2, 16 - 17.
- COBEY, S.** und **LAWRENCE, T.** (1990): Mechanisches Mischen von **Bienen-Sperma**. Mitteilungen über Bienenbesamung, Vol. 2, Nr. 1, 3 - 4.
- HARBO, J. R.** (1985): Instrumental insemination of queen bees. Am. Bee. J. **125:197 - 202; 282 - 287.**
- HOLM, E.** (1986): Artificial insemination of the queen bee. Eigil Holm, Gedved, Denmark.
- KAFTANOGLU, O.** and **PENG, Y.** (1980): A **washing** technique for collection of honeybee semen. J. Apic. Res. 19, 105 - 211.
- KÜHNERT, M., CARRICK, M. J., ALLAN, L. F.** (1989): Use of homogenized drone semen in a bee breeding program in Western Australia. Apidologie 20, 371 - 381.
- LAIDLAW, H. H.** (1977): Instrumental insemination of honey bee queens. Datant & Sons, Illinois.
- MACKENSEN, O.** (1947): Effect of carbon dioxide on initial oviposition of artificially inseminated and virgin queen bees. J. Econ. Entomol. **40:344 - 349.**
- MACKENSEN, O.** and **ROBERTS, W. C.** (1948): A manual for the artificial insemination of queen bees. U.S. Bur. Entomol. and Plant Quar. ET-250.
- MACKENSEN, O.; TUCKER, K. W.** (1970): Instrumental insemination of queen bees. USDA Handbook No. 390, USDA, Washington DC.
- MINDT, B.** (1962): Untersuchungen über das Leben der Drohnen, insbesondere Ernährung und Geschlechtsreife. Z. Bienenforsch. 6:6 - 33.
- MORITZ, R. F. A.** (1983): Homogeneous mixing of honey bee semen by centrifugation. J. Apic. Res. **22:249 - 255.**
- MORITZ, R. F. A.** (1984 a): The effect of different diluents on the insemination success using mixed semen. J. Apic. Res. **23:164 - 167.**
- MORITZ, R.** - Herausg. (1989): Die instrumentelle Besamung der Bienenkönigin. Apimondia-Verlag, Bukarest, 191 S.
- MORITZ, R.** and **KÜHNERT, M.** (1984): Seasonal effects on artificial insemination of honey bee queens (*Apis Mellifera* L.). Apidologie, 15 (2), 223 - 231.
- RUTTNER, F.** - Herausg. (1975): Die instrumentelle Besamung der Bienenkönigin. Apimondia-Verlag, Bukarest, 2. Auflage.
- SCHLEY P.** (1990): Einführung in die instrumentelle Besamung von Bienenköniginnen. Gießen, 121 S. (Selbstverlag).
- TIESLER, F.-K.** und **ENGLERT, E.** (1989): Aufzucht, Paarung und Verwertung von Königinnen. Ehrenwirth-Verlag, München.
- WOYKE J.** and **JASINSKI Z.** (1982): Influence of the number of attendant workers on the number of spermatozoa entering the spermatheca of instrumentally inseminated queens kept outdoors in mating nuclei. J. Apic Res. 21 (3) 129 - 133.
- WOYKE J.** (1988): Problems with Queen Banks. Am. Bee. J. 4, 276 - 278.