

ZUR FRAGE DER SPERMAÜBERTRAGUNG BEI DER BIENENKÖNIGIN

von

Friedrich RUTTNER

*Außenstelle der Bundesanstalt für Bienenkunde Wien an der Biologischen Station,
Lunz am See (Österreich).*

Bei der Kopulation von Bienenkönigin und Drohn gelangt das ejakulierte Sperma durch die enge Vaginalpassage und durch einen jetzt geöffneten Ventilmeehanismus zunächst in die beiden weit dehnbaren lateralen Ovidukte, bevor es in die Spermatheka transferiert wird. Der unmittelbar nachher ejakulierte Schleim koaguliert sofort an der Luft und verschließt zusammen mit Teilen des abgerissenen Drohnenpenis (Chitintteile des Bulbus und zerfetzte Reste des häutigen Penis) als « Begattungszeichen » die Hinterleibsöffnung der Königin. Solange dieser Verschluss besteht, erscheint eine nochmalige Begattung der ♀ unmöglich. Nach den Beobachtungen von ALBER, JORDAN, RUTTNER und RUTTNER (1) wird das Begattungszeichen allerdings gewöhnlich schon wenige Minuten nach Rückkehr der Königin vom Hochzeitsflug herausgepreßt und abgestreift, und bei vielen ♀♀ scheint dies schon vorher geschehen zu sein, da trotz nachweisbarer Insemination kein Begattungszeichen festgestellt worden war. In einer viel zitierten Arbeit von SAIDA IS'HAK OGLY (2) war jedoch die Behauptung aufgestellt worden, der Generationstrakt der ♀ sei nach einer Kopulation durch 48—60 Stunden mit Schleim und Sperma verlegt. Dadurch ergab sich ein Widerspruch zu den Feststellungen einer wirksamen zweiten Insemination auf einem Ausflug längstens 1 1/2 Stunden nach dem ersten (1) oder sogar auf ein und demselben Ausflug (TABER, 3). Es ergab sich somit die Notwendigkeit, den Vorgang der Insemination nochmals eingehender zu untersuchen.

Auf einem Schnitt durch eine frischbegattete ♀ (Abb. 1) erscheinen die beiden lateralen Ovidukte stark mit Sperma gefüllt. Zwischen den dicht in verschlungenen Bündeln gelagerten Spermien befindet sich in geringen Mengen ein muköses Intermedium, das aber nach seinem färbetaechnischen Verhalten deutlich von dem reinen, koagulierenden Schleim des Begattungszeichens zu unterscheiden ist. Caudad reichen diese Spermienmassen durch den medianen Ovidukt bis in die Gegend der Vaginalpassage, oft auch noch weiter bis über das Orificium vaginae hinaus in die Bursa copulatrix. Dort findet sich eine Übergangszone, in der das Sperma mit koagu-

lierendem Schleim vermischt ist. Erst von hier an ist reiner Mucus vorhanden, der sich regelmäßig auch in die Seitentaschen der Bursa copulatrix und in die Falten in der Wandung der Stachelkammer erstreckt. Die Chitinspangen des Bulbus ragen gewöhnlich über die Spitze des letzten Tergites, diesem wie ein Schuhlöffel eng anliegend, nach außen hervor; gelegentlich sind sie aber bis in eine der Seitentaschen gelangt, womit sich diese auch funktionell als Teile der Bursa copulatrix erweisen.

Mit dem Begattungszeichen werden alle diejenigen Massen entfernt, die durch den koagulierten Schleim zu einem einheitlichen festen Körper verbunden sind. Nur in den Seitentaschen der Bursa und in den Falten der Stachelkammer bleiben Schleimreste zurück. Die Lösung des Begattungszeichens von der Spermaflüssigkeit erfolgt in der Gegend der Übergangszone (meist in der Vaginalpassage) also dort, wo das kompakte Koagulum sein Ende findet. Das in den vorderen Vaginalabschnitten und im medianen Ovidukt verbleibende Sperma setzt als relativ flüssige Masse einer weiteren Insemination keinen Widerstand entgegen. Die Dehnbarkeit der gefalteten Wände der lateralen Ovidukte ist so groß, daß diese das gesamte Sperma mehrerer ♂♂ aufnehmen können.

Eine nochmalige Insemination ist also unmittelbar nach Entfernung des Begattungszeichens anatomisch ohne weiteres möglich.

DIE FÜLLUNG DER SPERMATHEKA

Gleichzeitig mit der Abstoßung des Begattungszeichens beginnt der Prozeß der Transferierung des Spermas in die Samenblase.

Bei der Rückkehr der ♀ vom Hochzeitsflug enthält die Spermatheka nur wenige Samenfäden. Etwa 3 Stunden später ist schon eine beträchtliche Füllung festzustellen, die etwa $1/4$ — $1/3$ des maximalen Füllungsgrades betragen kann (Abb. 2); die anfangs diffus in der vorhandenen Flüssigkeit verteilten Samenfäden beginnen sich zu dieser Zeit in Bündeln anzuordnen und damit die Struktur anzudeuten, die in der Samenblase einer lebenden ♀ anzutreffen ist. Die Dauer des Füllungsprozesses hängt offenbar stark vom Grade der Insemination ab, der während eines Ausfluges erreicht wurde. Manchmal sieht man schon 8—12 Stunden nach dem Hochzeitsflug eine gute Füllung der Samenblase; in andern Fällen ist die Spermatheka auch nach 24 Stunden, bei bereits entleerten Ovidukten, nur sehr schwach gefüllt und es sind offenbar noch weitere Ausflüge nötig, um eine ausreichende Füllung herbeizuführen.

Sehr eigenartig und komplex ist der Vorgang der Überführung des Spermas aus den Ovidukten in die Spermatheka. Bisher wurde fast allgemein eine aktive Einwanderung des Spermas in die Samenblase angenommen, ausgelöst durch chemotaktische Reize von seiten des alkalischen Sekretes der Samenblasendrüse. Auf Grund einer Anzahl von ♀♀, die in bestimmten Abständen nach der Paarung fixiert und an Hand von Serienschnitten

untersucht wurden, und auf Grund des Verhaltens der ♀ nach der Paarung, ergibt sich jedoch ein wesentlich anderes Bild.

Nach einer Kopulation klaffen die sonst die Genito-analkammer verschließenden letzten Sklerite auseinander — auch dann, wenn das Begattungszeichen schon vorher abgestreift worden war. Der Stachelapparat ist caudad gerückt, sodaß der bisher verborgene Stachel über das Tergum hervorragt. Die ♀ bewegt sich jetzt viel langsamer und schwerfälliger als vor dem Hochzeitsflug. In Abständen von etwa 1—2 Minuten bleibt sie stehen, mit eingekrümmten Abdomen, durch den Körper läuft ein Zittern. Es ist schwer zu entscheiden, ob es sich um ein aktives « Pressen » handelt — rein deskriptiv sieht der Vorgang ganz ähnlich aus — oder um vorwiegend reflektorische Kontraktionen. Funktionell handelt es sich jedenfalls um ein Pressen, denn zur gleichen Zeit werden aus der Genitalöffnung gelblich-weiße, stiftförmige Körper von etwa 1 mm Länge abgestoßen. Wie TRJASKO (4) als erste festgestellt hat, bestehen diese Körper aus eingetrocknetem Sperma und Schleim. In den ersten Stunden nach der Paarung wird auf diese Weise ein ganz beträchtlicher Teil des in den lateralen Ovidukten gelagerten Spermas wieder ausgeschieden. Die Lockerung und Abstoßung des Begattungszeichens erfolgt auf ganz dieselbe Weise. Zwischen den krampfhaften abdominalen Kontraktionen sind kurzdauernde maximale Spreizungen der beiden letzten Sklerite zu beobachten; dabei wird durch die Basis des starren Stachelapparates das Orificium vaginae komprimiert und die darin steckenden Sperma- und Schleimkörper abgequetscht und herausluxiert.

Schnittpräparate von ♀♀, die in dieser Phase konserviert wurden, führten zu einem besseren Verständnis dieses zunächst rätselhaften Verhaltens. Der Zugang aus der Bursa copulatrix zu den lateralen Ovidukten ist durch ein System von Falten, Taschen und musculären Verschlüssen sehr kompliziert gestaltet. Die enge Vaginalpassage führt in einen relativ weiten (bzw. distendierbaren) Hohlraum, die *Vaginalkammer*. In ihrer Mitte ragt, auf einer queren Falte sitzend, die zungenförmige *Valvula vaginalis* (Scheidenklappe). Die Bedeutung dieser Klappe bei der natürlichen und künstlichen Insemination hat H. LAIDLAW (5) beschrieben. Im Ruhezustand befindet sich die *Valvula vaginalis* in aufrechter Stellung (Abb. 3a). Unmittelbar nach der Copula ist sie stark in kranialer Richtung geneigt; auf diese Weise gibt sie dem einströmenden Sperma den Weg frei. Beim Zusammenkrümmen des Abdomens legt sich ihre Kuppe (unter zieh-harmonikaartiger Verkürzung der gesamten Vagina) vor das kraniale Ende der Vaginalpassage, auf diese Weise einen Ventilverschluß bildend (Abb. 3b).

Die Vorderwand der Vaginalkammer gehört schon dem medianen Ovidukt an, und zwar dessen kaudalen, dorso-ventral gerichteten Ast. Der kraniale, fast waagrecht nach vorne laufende Ast des medianen Ovidukts ist in mächtige Muskelzüge eingebettet. Funktionell und topographisch sind drei Hauptgruppen dieser Muskulatur zu unterscheiden (Abb. 3; Einzelheiten sind den Arbeiten von SNODGRASS, 6, und LAIDLAW, 5, zu

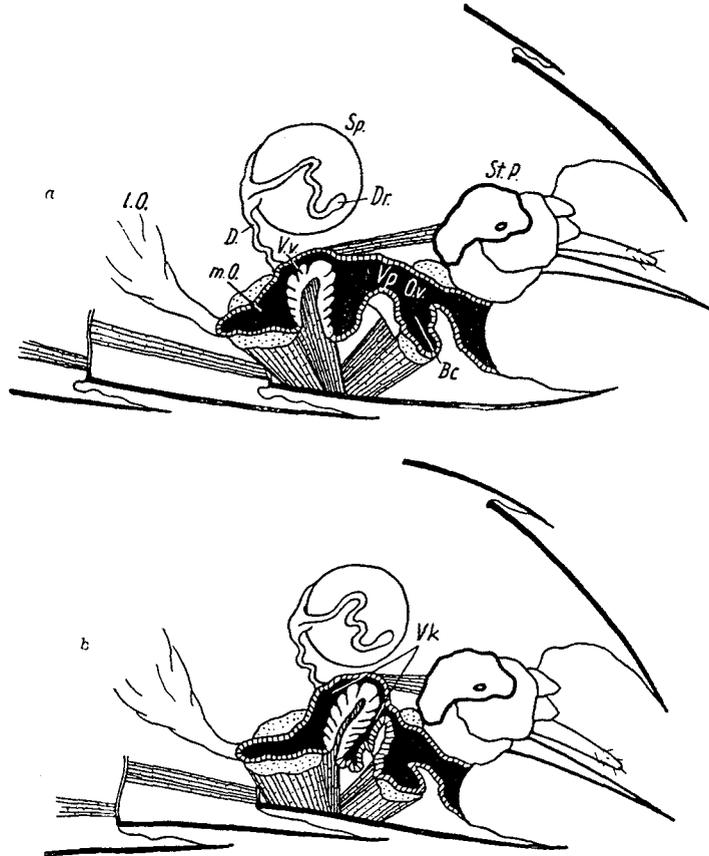


Abb. 3. — Funktion der «Spermapresse». Muskulatur schematisiert und nur teilweise eingezeichnet. Dr = Spermathekaldrüse; m.O. = medialer Ovidukt; Sp. = Spermatheka; St.P. = Stigmenplatte; Vk = Vaginalkammer; Vp = Vaginalpassage; Vv = *Valvula vaginalis*; die übrigen Bezeichnungen wie in Abb. 1.

ERKLÄRUNG DES BILDES.

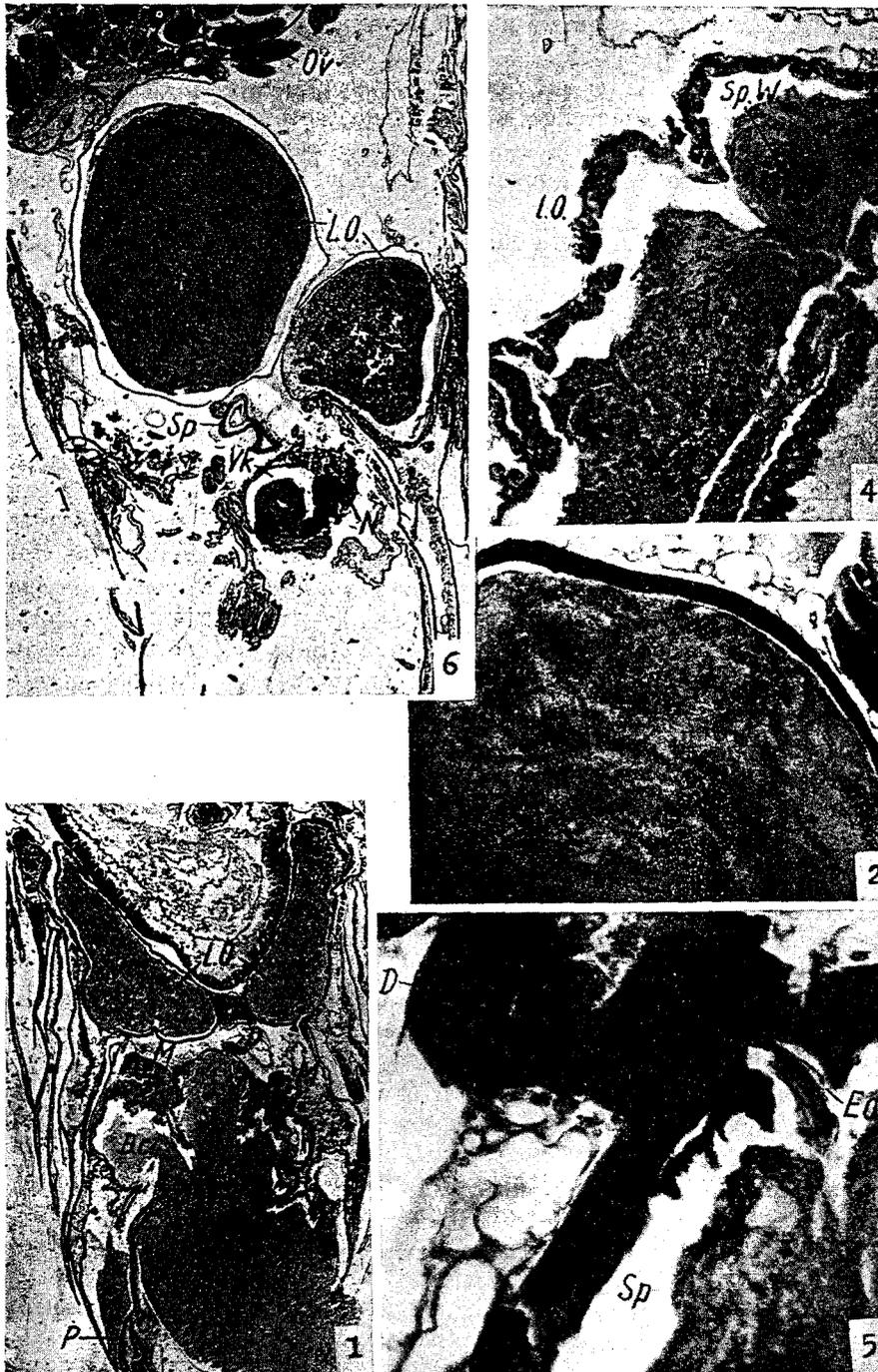
Abb. 1. — Frontalschnitt durch die kaudale Abdomenhälfte einer Bienenkönigin kurz nach der Paarung. B.c. = Seitentasche der *Bursa copulatrix*, gefüllt mit Schleim; D = *Ductus spermaticus*; l.O. = laterale Ovidukte, gefüllt mit Sperma; M = Muskulatur des medianen Oviduktes; Muc. = koagulierter Schleim (= „Begattungszeichen“); O.v. = *Orificium vaginae* (Grenze zwischen Sperma und Schleim); P = chitinöser Bulbus des Drohnenpenis.

Abb. 2. — Ausschnitt aus der Spermatheka einer Königin, 3 Stunden nach der Paarung.

Abb. 4. — Aktive Spermien in den lat. Ovidukten (l.O.) 3 Stunden nach der Paarung. Dunkle Flecken = Konglomerate von Spermienköpfen. Sp.W. = Spermienwirbel.

Abb. 5. — Einmündung des *Ductus spermaticus* (Ed) in die Spermatheka (Sp), 2 Stunden nach der Paarung. D = Querschnitt des D. sperm. in der Gegend der Breßlauschen Samenpumpe.

Abb. 6. — Frontalschnitt durch das Abdomen einer jungen ♀ mit Legestörung. N = Gewebsnekrose in der Vaginalwand; l.O. = lat. Ovidukte gefüllt mit nekrotischem Sperma; Ov = Ovar mit gereiften Eiern; Sp = fast leere Spermatheka (als Artefakt kollabiert); Vk = Vaginalkammer mit nekrotischem Sperma- und Schleimpfropf.



entnehmen) : 1 *a*) Longitudinale Faserbündel, die in kranialer und kaudaler Richtung von Antecosta und Intersternalmembran zur Ventralseite des medianen Ovidukts ziehen. — 1 *b*) Semicirkuläre, dorso-ventrale Bündel, die, ebenfalls von Antecosta und Intersternalmembran kommend, den medianen Ovidukt umgreifen und vielfach jenseits der Mittellinie auf seiner Dorsalseite ansetzen. — 2. Tergo-ventrale Bündel zwischen der Stigmenplatte des Stachelapparates und der Dorsalseite des medianen Ovidukts.

Weitere von der Antecosta entspringende Muskelzüge bilden den Kern der Scheidenklappe.

Dieser auffällig mächtige Muskelapparat um den kranialen, im Querschnitt sehr engen Ast des medianen Ovidukts besitzt eine sehr wichtige Sphinkterfunktion für die lateralen Ovidukte. In diesen weiten, faltigen Säcken werden bei der Jung-♀ die Spermien gespeichert, bei der legenden ♀ können sie reife Eier aufnehmen ; die enge Sphinkterpassage des medianen Ovidukts bildet einen sehr wirksamen Verschuß, der nach den Experimenten von W. FYG (7) offenbar durch cerebrale Impulse gesteuert werden kann.

Zusammen mit der übrigen Muskulatur des Abdomens und des Genitaltraktes der ♀ spielt dieser Muskelapparat aber auch eine sehr große Rolle bei der Überführung des Spermas aus den lateralen Ovidukten in die Spermatheka. Schon in den ersten Stunden nach der Kopulation lassen sich an den Spermien in den lateralen Ovidukten deutliche Zeichen von Aktivität erkennen. Frische Spermien in einem ihnen zusagenden alkalischen Intermedium zeigen die Tendenz, sich mit den Köpfen an einer festen Oberfläche festzusetzen. Bei entsprechend dichter Lagerung — sehr oft sitzen die Spermien Kopf an Kopf — ergibt sich zwangsläufig eine Synchronisierung der Bewegung und gleichzeitig eine Parallellagerung der Geißeln. In den Ovidukten wandern die Spermien einzeln aus dem anfänglichen Spermakonvolut aus und lagern sich in der geschilderten Weise parallel zur Wand der Ovidukte, mit den Köpfen am Epithel. Im Zentrum aber lagert sich — in Ermangelung einer andern festen Oberfläche — gelegentlich Spermienkopf an Spermienkopf. Durch die Aktivität der sich auch hier parallel orientierenden Geißeln gerät diese ganze Spermienansammlung in rotierende Bewegung, sodaß man ganz eigenartige Wirbelbildungen zu sehen bekommt (Abb. 4).

Die an der Oberfläche parallel zur Ovidukt wandung orientierten Spermien werden durch Kontraktionen der longitudinalen Muskelfasern der lateralen Ovidukte in den medianen Ovidukt und in die Vaginalkammer geschoben. Sie gelangen auf diese Weise auch in die trichterförmige Öffnung des Ductus spermaticus in der Kuppel dieses Raumes — wobei sich ganz von selbst eine Orientierung der Köpfe in Richtung der Spermatheka ergibt. Bei den kräftigen Kontraktionen des Abdomens wird die Öffnung zur Vaginalpassage in der oben beschriebenen Weise durch die Scheidenklappe (allerdings nur unvollkommen) verschlossen. Durch gleichzeitige Kontraktion der zirkulären Muskulatur des medianen Ovidukts wird das Sperma aus der Vaginalkammer durch den engen Ductus sperma-

ticus in das Receptaculum seminis gepreßt („Spermapresse“). In der nur 20—25 μ weiten Lichtung des Ductus liegen die Spermien eng aneinandergepreßt wie die Drähte in einem Kabel, in der Samenblase verteilen sie sich unter leichter Wirbelbildung zunächst diffus (Abb. 5). Ein Teil des Spermas wird durch die nur unvollständig verschlossene Vaginalpassage nach außen gepreßt. Bei Nachlassen des Druckes und Erweiterung seines Lumens füllt sich die Vaginalkammer erneut mit Spermien.

Eine Reihe von Beobachtungen spricht gegen eine aktive, chemotaktisch gelenkte Einwanderung des Spermas in die Spermatheka : 1. Sobald die Schubkräfte in den lateralen Ovidukten erlahmen, orientieren sich die Spermien in beschriebener Weise auch in entgegengesetzter Richtung. — 2. Das stundenlange „Pressen“ der ♀ nach der Copula ist in jedem Fall zu beobachten. — 3. Die Spermien sind im Ductus spermaticus so dicht gelagert, daß eine individuelle Eigenbewegung unmöglich erscheint (Abb. 5). — 4. Eine weitgehende Füllung der Spermatheka in 3—6 Stunden ist bei aktiver Wanderung durch den sehr engen Ductus spermaticus undenkbar.

Die Überführung des Spermas von den lateralen Ovidukten in die Samenblase erscheint demnach als Kombination von aktiven und passiven Vorgängen.

Diese Auffassung erfährt durch Beobachtungen an einem pathologischen Fall ihre Bestätigung. Eine ♀, die nach mehr als 6 Wochen in einem Begattungsvölkchen noch keine Eier legte, zeigte bei der Untersuchung stark aufgetriebene Ovidukte wie bei einer frisch begatteten ♀. Auf den Schnitten ist zu erkennen, daß es sich in den Ovidukten tatsächlich um in Zersetzung begriffene Spermamassen handelt (Abb. 6). Die Spermatheka enthält nur eine geringe Anzahl von Spermien. Im vorderen Abschnitt der Scheide, kaudal der Scheidenklappe, finden sich umschriebene nektrotische (melanotische) Veränderungen, die offenbar zu einer Störung der Muskelfunktion geführt und sowohl die Beförderung des Spermas in die Samenblase wie nach außen verhindert hatten. Würden die Spermien aktiv in die Spermatheka einwandern, so müßte sie bei dieser ♀ normal gefüllt sein, da die Verbindung zwischen Ovidukten und Spermatheka nicht unterbrochen war.

Infolge der aktiven Auswanderung der Spermien aus der Spermamasse der lateralen Ovidukten finden sich dort 6—18 Stunden nach dem Hochzeitsflug nur mehr wenige Samenfäden an der Wandung, während im Zentrum ein Schleimrest, gemischt mit einzelnen Spermatozoen, zurückbleibt. Da die während eines Hochzeitsfluges aufgenommene Spermamenge sehr verschieden groß ist, variiert auch die Zeit bis zur völligen Entleerung der Ovidukte sehr stark. Im allgemeinen ist der Genitaltrakt der ♀ 24 Stunden nach einer Begattung frei von Sperma und Schleim. Da zu diesem Zeitpunkt die Spermatheka oft nur ungenügend mit Sperma gefüllt ist, versteht man die Notwendigkeit zu weiteren Hochzeitsflügen an den folgenden Tagen.

ZUSAMMENFASSUNG

Zum Studium des Inseminationsvorganges wurde eine Anzahl von ♀♀ unmittelbar nach der Paarung oder 2—24 Stunden später konserviert und zum Teil an Hand von Serienschnitten untersucht. Es zeigte sich, daß der an der Luft sehr rasch erstarrende Schleim nie weiter als bis in das orificium vaginae reicht und mit dem Begattungszeichen schon kurze Zeit nach der Copula abgestoßen wird. Nach Entfernung des Begattungszeichens bestehen also keine anatomischen Schwierigkeiten für eine nochmalige Besamung.

Die Spermatozoen zeigen infolge einer charakteristischen Reaktion die Tendenz, sich parallel anzuordnen, so auch in der Kuppel des medianen Oviduktes an der Stelle des Abganges des Ductus spermaticus. Durch den engen Gang wird das Sperma aber passiv in die Spermatheka gepreßt. Die Bedeutung der *Valvula vaginalis* und der überaus kräftigen Sphinktermuskulatur für diesen Vorgang wird beschrieben. Die Beobachtung eines pathologischen Falles, bei dem die Füllung der Samenblase unterblieb, erbrachte eine Bestätigung dieser Auffassung.

Die Zeit, die für die Entfernung des während eines Hochzeitsfluges in die Ovidukte gelangten Spermatis erforderlich ist, zeigt von ♀ zu ♀ beträchtliche Schwankungen, ist aber für die Möglichkeit weiterer Paarungen ohne Belang. 5 Stunden nach der Paarung enthielten die Ovidukte oft noch erhebliche Spermamassen, nach 24 Stunden waren sie aber in allen untersuchten Fällen frei von Sperma und Schleim.

LITERATUR.

- 1) 1955. ALBER (M.), JORDAN (R.), RUTTNER (F. und H.). — Von der Paarung der Honigbiene (*Z. f. Bienenforsch.*, **3**, 1-28).
- 2) 1936. IS'HAK OGLY (S.). — *Diss.*, Berlin.
- 3) 1954. TABER (St. III). — The frequency of multiple mating of queen honey bees (*J. Econ. Entomol.*, **47**, 995-998).
- 4) 1951. TRJASKO (W. W.). — Die Zeichen der Besamung der Bienenkönigin (Russ.) (*Ptschelowodstwo*, **11**, 25-31).
- 5) 1944. LAIDLAW (H.). — Artificial insemination of the queen bee (*Apis mellifera* L.): Morphological basis and results (*I. Morph.*, **74**, 429-465).
- 6) 1933. SNODGRASS (R. E.). — Morphology of the insect abdomen, P. II. The genital ducts and the ovipositor (*Smiths. Miscell. Coll.*, **89** [8], 1-148).
- 7) 1943. FYG (W.). — Experimentelle Untersuchungen über den Eilegeakt der Bienenkönigin (*Mitt. Schweiz. Ent. Ges.*, **18**, 493-521).
- 8) 1954. RUTTNER (F. u. S.). — Über die Paarung der Bienenkönigin (*Österr. Imker*, **4**, 12-14 u. 27-30).

Summary.

As in the main anatomical objections have been made against the possibility of multiple mating, it seemed necessary to re-examine the intake of sperma in the

oviducts and into the spermatheca, multiple insemination under natural conditions having been proved by means of genetic tests. A number of queens were fixed immediately or 2 to 24 hours after mating and studied by dissection and histological sections.

It is shown that the coagulating mucus never extends farther than to the vaginal orifice and that it is extruded together with the mating sign a short time after the copula. The spermatozoa, owing to a characteristic reaction, have the tendency to arrange themselves parallelwise, for example also within the copula of the median oviduct near the origin of the spermathecal duct. Through the narrow passage however the sperma is pressed passively into the spermatheca. The importance of the valve fold and of the very vigorously developed musculature in regard to this process is discussed. The observation of a pathological case where the sperma failed to reach the spermatheca might contribute to the evidence for this interpretation.

The time which is needed to eliminate the sperma taken up into the oviducts during the one mating flight varies considerably between one queen and another; but it is without importance as to the possibility of further matings. 5 hours after mating the oviducts may contain considerable masses of sperma. 24 hours later generally they are emptied of sperma.

Résumé.

Contre l'accouplement multiple de la reine, on a invoqué surtout des causes anatomiques. Mais il y a peu de temps fut fournie la preuve génétique de l'insémination multiple. Il était indispensable de vérifier comment le sperme est transporté par l'oviducte à la spermathèque de la reine. Nous avons donc tué plusieurs reines tout de suite après l'accouplement, d'autres deux à vingt-quatre heures après, pour les examiner en pratiquant des coupes en série.

La sécrétion spermatique (mucus), se figeant rapidement à l'air, n'avance jamais plus loin que jusqu'à l'avant-cour du vagin. Après la copulation elle est vite rejetée, ainsi que le signe de copulation. Les spermatozoïdes, montrant une réaction caractéristique, cherchent à se grouper parallèlement et montrent la même tendance dans la coupole de l'oviducte médian en quittant le *ductus spermaticus*. A travers le corridor rétréci, le sperme est passé de force dans la spermathèque. L'importance de la *valvula vaginalis* et de la musculature très puissante du sphincter est soulignée. Un cas pathologique — la spermathèque ne fut pas remplie — confirma notre conception.

Quant au temps nécessaire pour repousser le sperme de l'oviducte, il diffère beaucoup selon la nature de chaque reine. Mais cela n'a aucune importance pour la possibilité d'autres accouplements. Après cinq heures, souvent il y a encore des masses de sperme dans les oviductes. Après vingt-quatre heures, les oviductes ne contiennent plus de sperme.