

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studie epidermaler Mikrostrukturen von Blütenpetalen und deren Auswirkungen auf die spektrale Reflexion

#### 2.1.1 Blütenmaterial

Im Botanischen Garten der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurden im Zeitraum von Juni 2014 bis August 2015 Blüten von 37 verschiedenen Pflanzenspezies aus insgesamt 19 Familien (Tab. 1) als Untersuchungsobjekte mit freundlicher Genehmigung des Gartenleiters Herrn Fischbach gesammelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass nur Blüten im Endzustand der Maturation mit augenscheinlich voll entwickelten Staubgefäßen oder Staubgefäßimitationen abgetrennt wurden. Weiterhin wurden möglichst fünf gleichfarbige Phänotypen oder fünf Blüten eines Pflanzen-individuums gesammelt. Von *Tibouchina urvilleana* wurde die doppelte Menge an Blütenmaterial genommen, weil hiervon die adaxiale und abaxiale Mikrostruktur des Petalums untersucht werden sollte. Als Referenz für eine glatte, glänzende Oberfläche wurde zusätzlich ein Laubblatt der immergrünen *Magnolia grandiflora* in die Materialauswahl einbezogen. Gesammelt wurden die Blüten früh morgens bei nicht zu warmen, relativ lichtreichen Bedingungen und hoher Luftfeuchtigkeit, sodass der interne Turgor der Blütenzellen aufrechterhalten werden konnte. Eine weitere Voraussetzung für die Auswahl der Blüten waren möglichst große Petale, die sich für die Anfertigung von Attrappen gut eigneten, was aber nicht immer möglich war. Einige zusätzlich untersuchte Spezies, wie Unterarten von Windengewächsen oder *Papaver rhoeas* waren nicht geeignet aufgrund ihres extrem instabilen Blütengewebes.

Für die bestäubungsbiologische Relevanz dieser Blüten wurde darauf geachtet, dass möglichst natürliche Pflanzen und keine Hybride eingesetzt wurden und Insekten, bevorzugt Hummeln an der Pflanze gesichtet werden konnten oder aber die Attraktivität auf diese Bestäuber aus der Literatur bekannt war.

Der Transport des Pflanzenmaterials in das Labor des Instituts für Sinnesökologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf erfolgte in luftdicht verschließbaren Aufbewahrungsboxen, ausgelegt mit angefeuchtetem Recyclingpapier. Durch die auf diese

Weise gewährleisteten, günstigen, klimatischen Bedingungen konnte ein vorzeitiges Altern, beziehungsweise Schrumpfen des Blütenmaterials für einige Stunden sicher verhindert werden. Durch Einlagern der Aufbewahrungsboxen in einen Kühlschrank bei max. + 8° C konnten die Blüten über eine relativ große Zeitspanne bis zur weiteren Verarbeitung frisch gehalten werden.

**Tab. 1** Auflistung der untersuchten Blütenspezies; analysiert wurde die adaxiale Epidermis von 37 verschiedenen Blütenspezies, zusätzlich ein Laubblatt von *Magnolia grandiflora* und die abaxiale Epidermis (Rückseite) von *Tibouchina urvilleana*

Art	Familie	Art	Familie
<i>Ipheion uniflorum</i>	Amaryllidaceae	<i>Fritillaria imperialis</i>	Liliaceae
<i>Narcissus</i> 'Pink Charme'	Amaryllidaceae	<i>Magnolia</i> × <i>soulangeana</i>	Magnoliaceae
<i>Narcissus</i> <i>pseudonarcissus</i>	Amaryllidaceae	<i>Magnolia grandiflora</i> (Laubblatt)	Magnoliaceae
<i>Vinca minor</i>	Apocynaceae	<i>Malva sylvestris</i>	Malvaceae
<i>Muscari armeniacum</i>	Asparagaceae	<i>Tibouchina urvilleana</i> (Vorderseite)	Melastomataceae
<i>Helianthella quinquenervis</i>	Asteraceae	<i>Tibouchina urvilleana</i> (Rückseite)	Melastomataceae
<i>Helianthus annuus</i>	Asteraceae	<i>Primula auricula</i>	Primulaceae
<i>Rudbeckia fulgida</i>	Asteraceae	<i>Primula auricula</i>	Primulaceae
<i>Pulmonaria officinalis</i>	Boraginaceae	<i>Primula rosea</i>	Primulaceae
<i>Cheiranthus cheiri</i>	Brassicaceae	<i>Anemone hupehensis</i>	Ranunculaceae
<i>Lobelia cardinalis</i>	Campanulaceae	<i>Anemone nemorosa</i>	Ranunculaceae
<i>Calystegia sepium</i>	Convolvulaceae	<i>Delphinium elatum</i>	Ranunculaceae
<i>Cucurbita pepo</i>	Cucurbitaceae	<i>Helleborus niger</i>	Ranunculaceae
<i>Rhododendron augustinii</i>	Ericaceae	<i>Helleborus niger</i>	Ranunculaceae
<i>Rhododendron</i> <i>calophytum</i>	Ericaceae	<i>Prunus sargentii</i>	Rosaceae
<i>Crocus flavus</i> subsp. <i>flavus</i>	Iridaceae	<i>Rosa</i> 'Agnes Bernauer'	Rosaceae
<i>Crocus sieberi</i> subsp. <i>sublimus</i> 'Tricolor'	Iridaceae	<i>Rosa</i> 'Heidi'	Rosaceae
<i>Crocus vernus</i> 'Grand Maitre'	Iridaceae	<i>Bergenia cordifolia</i>	Saxifragaceae
<i>Crocus vernus</i> 'Jeanne d'Arc'	Iridaceae	<i>Tropaeolum majus</i>	Tropaeolaceae
<i>Crocus vernus</i> 'King of the Striped'	Iridaceae		

### 2.1.2 Fotografien der gesammelten Blüten

Um die für anfliegende Insekten wesentlichen, visuellen Eigenschaften der Blütenpetale möglichst realitätsgetreu festhalten zu können, wurden im ersten Schritt Fotografien der gesammelten Blüten angefertigt. Hierzu wurde eine Blüte am Receptaculum vorsichtig auf eine Präparationsnadel gesteckt, die über einen Schaumstoffstopfen in einem Drosophila-Röhrchen fixiert war, sodass die Position der Blüte sowohl horizontal als auch vertikal in etwa der natürlichen Anordnung entsprach. Diese Anordnung (Abb. 10) wurde auf einer Drehscheibe im Winkel von 90° zum



**Abb. 10** Fotolabor; im Vordergrund das Stativ, auf dem die Kamera angebracht wurde und die auf das Untersuchungsobjekt ausgerichtete Tageslichtlampe; die Blüten wurden im Zentrum der Drehscheibe auf eine Präparationsnadel gesteckt; grüne Folie diente zur Simulation eines natürlich, grünen Hintergrundes

Betrachter neben einem Weißstandard, bestehend aus in Eppendorf-Deckelchen gepresstem Bariumsulfat (99,00 %, Grüssing GmbH Analytika, Filsum, Deutschland) und einem Schwarzstandard aus gemörserter Aktivkohle (Windstar Medical AG, Wehrheim, Deutschland) positioniert. Eine mit grüner PVC-Folie (Plotterfolie Oracal 631, Exhibition Cal, 064 gelbgrün, RAL 6018, ORAFOL® Europe GmbH, Oranienburg, Deutschland) überzogene Kunststoffplatte fungierte als Hintergrund, vor dem die Blüten fotografiert wurden. In einem Abstand von 40 cm und einem horizontalen Winkel von ca. 30° zur Blüte befand sich eine Lichtquelle (Tageslichtlampe für die Produktfotografie, 25 / 125 Watt, Tageslichtlampen24.de, Kiel, Deutschland), die auf das Untersuchungsobjekt ausgerichtet wurde. Als Aufnahmegerät diente eine spezielle, UV-sensitive Kamera (Panasonic Lumix, Panasonic Marketing Europe GmbH, Hamburg, Deutschland), die auf Blütenebene, unterhalb der Lichtquelle, auf einem Stativ (Primax 180, Cullmann®, Langenzenn, Deutschland) montiert war. Der Fokus der Kamera lag auf einem ausgewählten Bereich des Petalums, der auch bei der nachfolgenden Anfertigung der Präparationen für die Mikroskopie herangezogen wurde.

### 2.1.3 Dünnschnittpräparate und Zellmikroskopie

Um die Stabilität des Petalums zur Anfertigung von zellmikroskopischen Aufnahmen zu erhalten, wurde zügig weitergearbeitet. Aus dem Bereich des Blütenblatts, der während der Digitalfotografie im Fokus lag, wurde mit einer Rasierklinge (Wilkinson Sword Classic, Wilkinson Sword GmbH, Solingen, Deutschland) vorsichtig ein Rechteck von ca. 5 mm x 20 mm herausgeschnitten (Abb. 11). Aus diesem Rechteck konnten bis zu 40 Dünnschnittpräparate angefertigt werden, die besten 5 Schnitte wurden weiter untersucht. Notwendig waren hauchdünne Querschnitte, maximal 3 Zellreihen tief (das entspricht etwa einer Breite von 0,06 mm), damit die Konturen der Epidermiszellen deutlich zu erkennen waren. Bei der Anfertigung der Präparate wurde darauf geachtet, dass die Klinge möglichst senkrecht zum Objekt gehalten wurde und der Schnitt durch Ziehen der Klinge ohne Druck auf die Gewebeschicht erfolgte, um das umliegende Zellgewebe nicht zu beschädigen und den Verbund der Gewebeschichten des Blütenblattes zu erhalten.



**Abb. 11** Herausgetrenntes Rechteck von etwa 5 mm x 20 mm aus der Mitte des Laubblattes von *Magnolia grandiflora* zur Anfertigung von Dünnschnittpräparaten

Die Dünnschnitte erfolgten direkt auf dem Objektträger (ECN 631-1550, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland). Die Schnittfläche wurde mit einem Wassertropfen über eine Pasteurpipette (REF 612-2849, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) benetzt, um dem vorzeitigen Austritt des Zellsaftes aus der Zellmembran und folglich dem Schrumpfvorgang vorzubeugen. Anschließend wurde das Präparat mit einem Deckglas (ECN 631-1570, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) versehen und unter einem Mikroskop (Zeiss Axio Scope.A1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland), gekoppelt an ein Aufnahmegerät (Zeiss AxioCam MRc, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland), betrachtet. Über die Software Zen 2 (blue edition 2011, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) wurden Bilddateien erstellt und mit allen wesentlichen Informationen und Metadaten gespeichert.

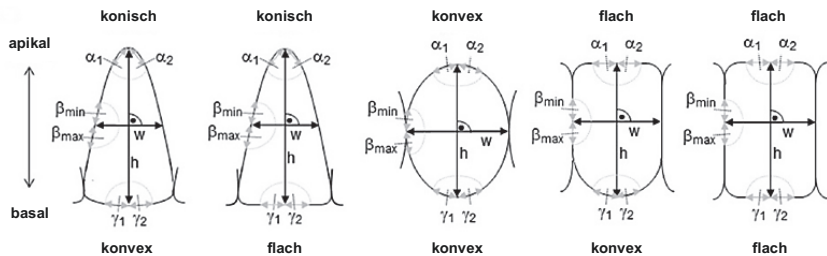
Die in den Vakuolen lokalisierten, wasserlöslichen Pigmente, wie die häufig vorkommenden Anthocyane, konnten nur selten auf dem Bildmaterial festgehalten werden, da sie sofort nach dem Aufschneiden der Zelle ausliefen und sich im umliegenden Wasser lösten.

#### 2.1.4 Vermessung zur Klassifizierung der Zellstrukturen

Die Aufnahmen der Dünnschnittpräparate wurden herangezogen, um die epidermale Zellform zu vermessen und über den Formen-Index (PAPIOREK et al. 2014) zu klassifizieren. Der Formen-Index (FI) ist das Produkt der apikalen, lateralen und basalen Winkelmaße einer Zelle (Abb. 12):

$$FI = \frac{\alpha_1 + \alpha_2}{180} * \frac{\gamma_1 + \gamma_2}{180} * \frac{\beta_{min}}{\beta_{max}} \quad (\text{PAPIOREK et al. 2014})$$

Zur Vermessung einer epidermalen Zelle wird zunächst eine vertikale Symmetrieachse durch die Zelle gelegt und auf der Hälfte dieser Strecke das Bezugsmaß für die lateralen Winkel  $\beta_{min}$  und  $\beta_{max}$  abgetragen. Am apikalen und basalen Ende der Strecke wird ein Kreisbogen mit einem Radius von 5  $\mu\text{m}$  um den Schnittpunkt der Symmetrieachse mit der Zellwand geschlagen und die Schnittpunkte von Symmetrieachse und Zellwand sowie Bogen und Zellwand miteinander verbunden, als Bezugsmaß für die Winkel  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ . In gleicher Weise wird mit der Senkrechten zur Symmetrieachse am Schnittpunkt mit der Zellwand verfahren, um die Winkel  $\beta_{min}$  und  $\beta_{max}$  zu bestimmen. Die Winkel werden vermessen und mit ihnen der Formen-Index der Zelle bestimmt.



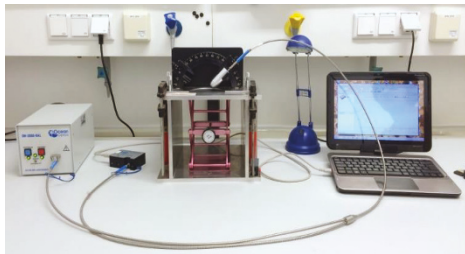
**Abb. 12** Modelle verschiedener Epidermiszellformen; apikal zur Atmosphäre ausgerichtet ist die Zellspitze, die maßgeblich an der Reflexion und Bündelung des einfallenden Lichtes beteiligt ist, basal befindet sich die Zellbasis, die an das darunterliegende Mesophyll grenzt; neben der absoluten Zellhöhe  $h$  und der Zellbreite  $w$  werden die Winkel  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_{min}$ ,  $\beta_{max}$ ,  $\gamma_1$  und  $\gamma_2$  abgetragen, als Maß der Krümmung des apikalen, lateralen und basalen Teils der Zelle (dargestellt als graue, gestrichelte Linien) zur Berechnung des Formen-Index (PAPIOREK et al. 2014)

Diese Berechnungen wurden an allen 195 Fotografien der Dünnschnittpräparate durchgeführt, sodass sich für jedes der 39 Untersuchungsobjekte ein Formen-Index, arithmetisch gemittelt aus 5 einzeln vermessenen, epidermalen Zellen ergibt.

### 2.1.5 Spektralanalysen und Farbhexagon

Zur Erfassung der Reflexionseigenschaften der untersuchten Blüten in Abhängigkeit von der Struktur der Epidermiszellen, wurden Spektralanalysen angefertigt. Hierzu wurde ein Spektrophotometer (USB 4000, Ocean Optics, Inc. Ostfildern, Deutschland) mit einer Lichtquelle (UV-VIS-NIR LIGHTSOURCE, DH - 2000 - BAL, Ocean Optics, Inc. Ostfildern, Deutschland) über ein koaxiales Glasfaserkabel (QR 400-7-UV-VIS, Ocean Optics, Inc. Dunedin, FL. USA) verbunden (Abb. 13). Vor den eigentlichen

Messungen wurde das Messgerät mit einem Dunkelstandard (schwarzes PTFE-Pulver, Spectralon®, Schwarz-Reflexion von 2,00 %, Reflexionsstandard SRS-02-010, Labsphere, Inc. North Sutton, USA) und einem Hellstandard (weißes PTFE Pulver, Spectralon®, Weiß-Reflexion von 99,00 %, Reflexionsstandard SRS-99-010, Labsphere, Inc. North Sutton, USA) kalibriert. Mit einem



**Abb. 13** Spektrophotometrischer Aufbau; links im Bild die Lichtquelle, die über ein koaxiales Glasfaserkabel mit dem Spektrophotometer verbunden ist; der Messkopf ist in einem Winkel von 45° Grad auf das Untersuchungsobjekt ausgerichtet und detektiert das reflektierte Licht

Skalpell (16021, Novus Dahle GmbH & Co. KG, Lingen, Deutschland) wurde ein rechteckiger Ausschnitt des Petalums (1,8 cm x 1,2 cm) der gleichen Blüte, wie auch in den zuvor beschriebenen Arbeitsschritten verwendet, herausgetrennt und auf eine achromatische, hellgraue Pappunterlage gelegt.

Von entscheidender Bedeutung bei der Messung der Lichtreflexion ist eine einheitliche und konstante Entfernung des Pflanzenpräparates zum Messkopf. Daher wurden die Untersuchungsobjekte auf einem Hubtisch (Hebebühne Swissboy 110, Rudopf Grauer AG, Degersheim, Schweiz) positioniert, mit dem sie zum Messkopf hin justiert werden konnten. Um unterschiedliche Lichteinfallswinkel, vergleichbar mit den natürlichen Bedingungen im Freiland simulieren zu können, erfolgte die Messung in Winkeln der Deuterium-Halogenlampe von 45°, 55°, 65°, 75°, 85° und 90° zur Ebene des

Messflecks. Die Messungen fanden in einem vollständig abgedunkelten Laborraum statt, um eine Verfälschung der reflektierten Lichtmenge an der Grenzschicht durch eine Raumbelichtung auszuschließen.

Die ermittelten Reflexionskurven der verschiedenen Blütenoberflächen wurden für die beiden Winkel 45° und 90° in das Farbhexagon (CHITTKA 1992) übertragen, um Aussagen zur spektralen Reinheit treffen zu können. Zur Berechnung der Erregungswerte wurden Sensitivitätskurven für *Bombus terrestris* (PEITSCH et al. 1992), die Standardbeleuchtung D65 (WYSZECKI & STILES 1982) und die eingesetzte grüne Plotterfolie als Hintergrund verwendet. Vom unbunten Mittelpunkt aus wird die Erregung der drei Photorezeptoren, die einen Wert zwischen Null und Eins annehmen kann, vektoriell addiert, wodurch sich ein Farbort bestimmen lässt (CHITTKA 1992). Mit zunehmendem Abstand des Farbortes vom unbunten Mittelpunkt des Farbhexagons aus nehmen der Kontrast zum Hintergrund und damit die spektrale Reinheit zu. Die Erregungswerte der drei Photorezeptoren werden in Hexagoneinheiten angegeben und können maximal einen Wert von 1 erreichen, (CHITTKA 1992; SPAETHE et al. 2001; DYER & CHITTKA 2004a). Ein Wert von 0 würde bedeuten, dass der Farblocus sich nicht vom Hintergrund unterscheidet. Nach DYER et al. (2008) kann *Bombus terrestris* zwei Farborte ab einer Distanz von 0,02 Hexagoneinheiten sicher unterscheiden. Die durch eine Linie verbundenen Farborte innerhalb des Farbhexagons stellen den an die Helligkeit des vorherrschenden Hintergrundes adaptierten Spektralfarbenzug für *Bombus terrestris* dar, auf dem die Farborte der monochromatischen Lichter mit der maximalen spektralen Reinheit liegen (LUNAU et al. 1996; RHODE et al. 2013).

### 2.1.6 Bestimmung weiterer Blütenparameter

Zur Klassifizierung der visuellen Eigenschaften der vermessenen Blüten wurden weitere Parameter wie Farbton, Farbkontrast, spektrale Reinheit, Intensität und Grünkontrast erhoben.

Den Farbton (H) einer Blüte bestimmt der höchste Reflexionswertes ( $R_{\max}$ ) der Reflexionskurven (Vgl. Punkt 2.1.5), gemessen bei einer spezifischen Wellenlänge ( $\lambda$ ) im betrachteten Spektrum zwischen 300 nm und 700 nm:

$$H = \lambda (R_{\max})$$

Der Farbkontrast ergibt sich aus der Distanz zwischen dem Farblocus und dem unbunten Mittelpunkt des Farbhexagons (Vgl. Punkt 2.1.5) (MENZEL & SHMIDA 1993). Je größer der Farbkontrast, desto höher ist die spektrale Reinheit (LUNAU et al. 1996). Diese beiden Parameter korrelieren positiv miteinander.

Zur Ermittlung der spektralen Reinheit (SR) finden sich in der Literatur zwei unterschiedliche Ansätze. Nach VALIDO et al. (2011) wird sie allein aus Daten der Reflexionskurven gebildet:

$$SRV = \frac{R_{\max} - R_{\min}}{R_{\text{Mittelwert}}}$$

$R_{\max}$	=	maximaler Reflexionswert der Reflexionskurve
$R_{\min}$	=	minimaler Reflexionswert der Reflexionskurve
$R_{\text{Mittelwert}}$	=	arithmetisches Mittel des betrachteten Spektralbereichs

Der Ansatz von LUNAU et al. (1996) berücksichtigt die Erregung der Photorezeptoren und bestimmt die spektrale Reinheit aus dem Farbhexagon anhand der Distanzen zwischen dem unbunten Mittelpunkt und dem aus den Reflexionskurven ermittelten Farblocus, sowie aus der Distanz zwischen unbuntem Mittelpunkt und Spektralfarbenzug, abgetragen als Strecke durch den Farblocus (PAPIOREK et al. 2013):

$$SRL = \frac{H_{(\text{Farblocus} - \text{Hintergrund})}}{H_{(\text{Spektralfarbenzug} - \text{Hintergrund})}}$$

$H_{(\text{Farblocus} - \text{Hintergrund})}$	= Distanz zwischen Farblocus und Hintergrund
$H_{(\text{Spektralfarbenzug} - \text{Hintergrund})}$	= Distanz zwischen Spektralfarbenzug und Hintergrund

In ähnlicher Weise lässt sich mit den Farbloci im Hexagon der Grünkontrast (GK) bestimmen. Es wird davon ausgegangen, dass der Mittelpunkt im Zentrum des Hexagons von der Hummel achromatisch wahrgenommen wird und somit den Ort mit der geringsten spektralen Reinheit darstellt. Das Bienenauge ist halbmaximal an den Hintergrund adaptiert, sodass die Erregung einen Wert von 0,5 für alle drei Rezeptoren ergibt und daher dieser Betrag von dem Erregungswert des Stimulus (EG) subtrahiert wird (LAUGHLIN 1981; CHITTKA 1992):

$$GK = EG - 0,5$$

Die Intensität einer Farbe wird nach DAUMER (1956) als ihre Helligkeit definiert. Sie wird dargestellt als Quotient aus der Summe der Erregungswerte des UV-, Blau- und Grün-Rezeptors und der Anzahl der Photorezeptoren:

$$I = \frac{\sum E (UV, B, G)}{3}$$

Je größer die Summe der Erregungswerte der Photorezeptoren E (UV, B, G) und je stärker die Reflexion, desto höher ist die Intensität.

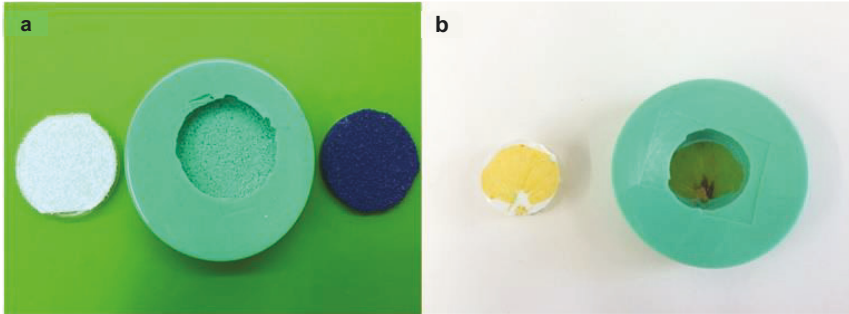
## 2.2 Wahlversuche mit *Bombus terrestris* zur Bestimmung der Attraktivität mikrostrukturierter Oberflächen auf Bestäuber

### 2.2.1 Anfertigung der Attrappen für die Wahlversuche mit *Bombus terrestris*

Von den untersuchten Pflanzenspezies wurde aufgrund der für die Anfertigung der künstlichen Attrappen günstigen Größe je ein Petalum der Rose 'Agnes Bernauer' und *Tibouchina urvilleana* aus der Familie der Schwarzmundgewächse, wobei hiervon die adaxiale und abaxiale Oberfläche abgeformt wurde, sowie ein Laubblatt der immergrünen *Magnolia grandiflora* ausgewählt. Diese vier natürlichen Vorlagen für Blütenattrappen wurden um drei weitere künstliche Oberflächen ergänzt. Die Strukturen bestanden aus der glatten Unterseite einer Glasschale mit einem Durchmesser von 38 mm, die zum einen direkt als Attrappe abgebildet wurde und zum anderen jeweils mit zwei verschiedenen grobkörnigen Glaskugeln ( $150 \mu\text{m} < \varnothing < 300 \mu\text{m}$ ;  $420 \mu\text{m} < \varnothing < 840 \mu\text{m}$ ) (Worf Glaskugeln GmbH, Mainz, Deutschland) bestreut wurde. Für alle Attrappen diente diese Glasschale als Basis. Auch die Petale wurden auf ihr, wie die Glaskugeln über doppelseitiges Klebeband (tesafix® 51570, Tesa SE, Norderstedt, Deutschland) fixiert, um einen Abdruck anzufertigen.

Das Glasschälchen mit der jeweiligen Oberflächenstruktur wurde am Boden einer größeren Glasschale mit einem Durchmesser von 8 cm und einer Höhe von 5 cm ebenfalls mit doppelseitigem Klebeband befestigt, sodass die abzuformende Oberfläche oben lag und mit einer zuvor nach den Herstellerangaben angerührten, niedrigviskosen Silikonabformmasse (Viskosität  $< 950 \text{ mPas}$ ), (TFC4001, Troll factory, Riede, Deutschland) vollflächig übergossen werden konnte. Das verwendete Silikon, ein Zwei-Komponenten-System (Mischungsverhältnis 1 : 1) zeichnet sich durch eine

bei Raumtemperatur ablaufende Additionsvernetzung aus, sodass die abzubildenden Materialien weder durch Spaltprodukte der chemischen Reaktion noch durch Reaktionswärme belastet werden, was für den detailgetreuen Abdruck eines Blütenblattes von großer Bedeutung ist. Nach einer Aushärtezeit von 40 Minuten konnte die kleine Glasschale vorsichtig aus dem Silikonblock gelöst werden (Abb. 14).

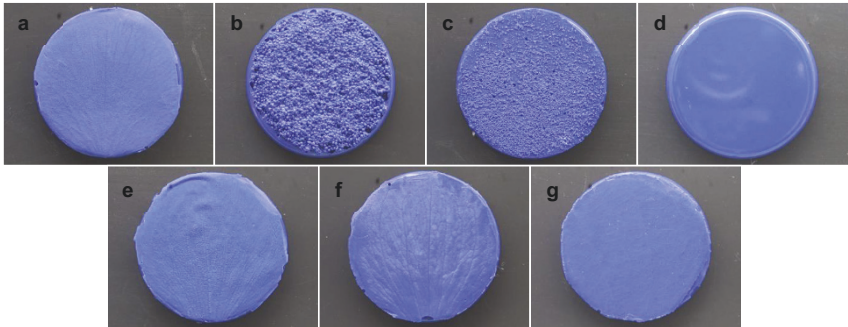


**Abb. 14** Anfertigung der Blütenattrappen; **a** links Oberfläche mit Glaskugeln ( $\varnothing$  420  $\mu\text{m}$  - 840  $\mu\text{m}$ ), Mitte: Silikonabdruck; rechts: Epoxidharz-Attrappe mit blauem Pigment; **b** links frisches Petalum des Rosen-Hybrids 'Agnes Bernauer'; rechts: Silikonabdruck mit abgelöster Epidermis

Das in dieser Weise angefertigte Negativ, in Form einer Mulde im Silikonblock, wurde mit einer Epoxidharzmischung ausgegossen, um das entsprechende Positiv zu generieren. Das Epoxidharz (Typ 4305 und Härter 313, DD Composite GmbH, Bad Liebenwerda, Deutschland) wurde im Mischungsverhältnis 2 Teile Harz : 1 Teil Härter angesetzt und mit einer 10,00 %igen Beigabe einer systemkompatiblen, ultramarinen Farbpaste (RAL 5002, DD Composite GmbH, Bad Liebenwerda, Deutschland) versehen.

Die drei Bestandteile wurden über Gewichtsprozent mit einer Feinwaage (H120, SARTORIUS GmbH, Göttingen, Deutschland) in ein 50 ml fassendes Falcon-Tube gefügt und durch vorsichtiges Rühren, zur Vermeidung von Luftblasen, mit einem Metallspatel homogenisiert. In einigen Fällen war vor der Anfertigung einer Attrappe zuerst ein Reinigungsschritt der Silikonform mit Epoxidharz notwendig, um Rückstände, wie Teile des Petalums oder Glaskugeln zu entfernen (Abb. 14 b). Dazu wurde wie oben beschrieben vorgegangen und die Silikonform mit Harz ausgegossen. Nach der Abbindezeit des Harzes hatten sich die Rückstände aus der Silikonform mit dem Harz verbunden und konnten mit dem Harzabdruck entfernt werden.

Die Silikonform wurde mit insgesamt 5 g des vorbereiteten, angesetzten Epoxidharz-Gemisches befüllt und 24 Stunden zur Aushärtung unter einem Abzug belassen. Nach dieser Vorgehensweise wurden insgesamt von jeder Silikonvorlage 20 Exemplare erstellt als Attrappen für die Wahlversuche mit *Bombus terrestris*. Einen Eindruck der Oberflächenbeschaffenheit der angefertigten Attrappen vermittelt Abbildung 15.



**Abb. 15** Eingesetzte Epoxidharz-Blütenattrappen mit unterschiedlichen Oberflächenstrukturen; **a** Rosen-Petalum; **b** Oberfläche aus groben Glaskugeln ( $420 < \varnothing < 840 \mu\text{m}$ ); **c** Oberfläche aus feinen Glaskugeln ( $150 < \varnothing < 300 \mu\text{m}$ ); **d** spiegelglatte Oberfläche; **e** *Tibouchina urvilleana* adaxial; **f** *Tibouchina urvilleana* abaxial; **g** *Magnolia grandiflora* Laubblatt

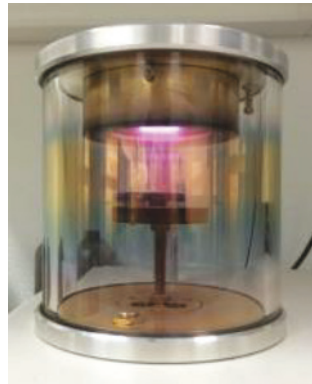
In der Mitte der kreisrunden Attrappen wurden mit einem Metallbohrer ( $\varnothing = 5 \text{ mm}$ ) kleine Mulden (2 mm tief) erzeugt, die als Nektartöpfchen dienten. Die Aussparungen waren groß genug, um  $7 \mu\text{l}$  einer 50,00 %igen Zuckerlösung als Belohnung für die Versuchstiere aufzunehmen. Durch diese Anordnung in der Mitte der Attrappe und Ausbildung des Nektartöpfchens als Mulde war es erforderlich, dass die Versuchstiere auf der Attrappen-Oberfläche mit allen 6 Beinen landen mussten, um den Nektarersatz mit dem Rüssel aufnehmen zu können.

### 2.2.2 Rasterelektronenmikroskopie

Von den biomimetischen Abbildungen der natürlichen Strukturen wurden weiter rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen im Center for Advanced Imaging der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, mit freundlicher Unterstützung von Steffen Köhler angefertigt (Rasterelektronenmikroskop, Leo 1430 VP, Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Deutschland). Im Einzelnen wurden die Epoxidharz-Abdrücke des Petalums der Rosen-Hybride 'Agnes Bernauer', des Magnolienblattes sowie der Vorder- und Rückseite des *Tibouchina*-Petalums gerastert. Um einen möglichen Unterschied in der Oberflächenstruktur zwischen einem natürlichen Petalum und dessen Epoxid-

harz-Abdruck sichtbar zu machen, wurde zusätzlich ein natürliches *Tibouchina*-Blütenblatt für die REM-Aufnahme vorbereitet. Dafür wurde das Petalum zuerst über einen Zeitraum von 48 Stunden in einem Schaffer'schen Gemisch, bestehend aus einem Teil Formaldehyd 35,00 % ( $\text{CH}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich®, München, Deutschland) und zwei Teilen Ethanol 96,00 % ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , Merck®, Darmstadt, Germany) gelagert, um die Zellstrukturen zu konservieren und anschließend 3 Mal in Ethanol (96,00 %) gewaschen.

Für REM-Aufnahmen müssen die Proben zuvor mit einer elektrisch leitfähigen Oberfläche versehen werden. Dazu werden die Attrappen in einer Vakuumkammer unter einer Schutzgasatmosphäre aus Argon mit einer dünnen Goldschicht, bestehend aus 2 - 3 Atomlagen, gesputtert (Abb. 16). Im Rasterelektronenmikroskop wird dann das Präparat mit einem Primärelektronenstrahl (Durchmesser 0,5 nm - 10 nm), der durch Erhitzen eines Wolfram-Drahtes erzeugt und in einem elektrischen Feld mit einer Spannung von etwa 30 kV beschleunigt wird, abgetastet. Die durch diesen Elektronenbeschuss, aus dem Präparat herausgelösten, energiearmen Sekundärelektronen bzw. Rückstreuелеktronen werden von einem Detektor (Elektronenfänger) in eine Spannung umgewandelt und zur Erzeugung des REM-Bildes verstärkt (Gerätesoftware ZEN, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Der Prozess erfolgt im Hochvakuum ( $p \leq 10^{-3} \text{ Pa} = 10^{-5} \text{ mbar}$ ), um Wechselwirkungen der Atome mit Molekülen der Luft zu vermeiden.



**Abb. 16** Sputtern, oder Kathodenzerstäubung, Atome aus einem Target (Goldnugget) werden durch Beschuss mit energiereichen Edelgas-Ionen (Argon) herausgetrennt und über die Gasphase als Strahl auf der Attrappen-Oberfläche abgelagert als Vorbehandlung für REM-Aufnahmen

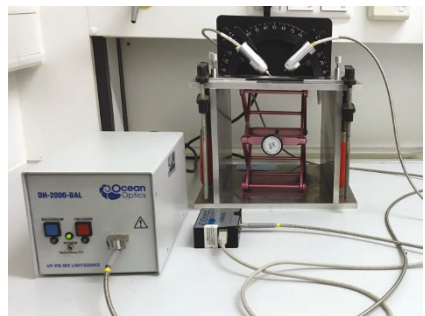
Die hohe Tiefenschärfe des Rasterelektronenmikroskops und das maximale Auflösungsvermögen von 1 nm, definiert als kleinster Abstand zweier Punkte, die gerade noch als getrennt abgebildet werden können, ermöglicht die detailgetreue Wiedergabe der Topographie einer Objektoberfläche. Dabei hängt die Qualität eines Bildes von der Geschwindigkeit beim Scannen der Oberfläche ab. Um eine hohe Bildqualität der Mikrostrukturen zu erreichen, wurde der Prozess für die Dauer von etwa 30 Minuten für jede Attrappe und jede natürliche Oberfläche fortgeführt.

### 2.2.3 Digitalfotographie der Blütenattrappen bei diffuser und gerichteter Lichtquelle

Um die spektrale Reflexion und die Glanzeigenschaften der Attrappen für das menschliche Auge zu visualisieren, wurden Fotografien mit einer Einzelbildkamera (Panasonic, Lumix, Panasonic Marketing Europe GmbH, Hamburg, Deutschland) angefertigt. Hierzu wurden die Attrappen bei diffuser Raumbelichtung bestehend aus 9 Decken-Leuchtstoffröhren (BIOLUX T8, L 58 W/965, OSRAM GmbH, München, Deutschland) und einem Spot-Light Setup unter konstantem Lichteinfallswinkel von  $45^\circ$  durch den LED-Spotstrahler (LED 9414, Zweibrüder Optoelectronics, Solingen, Deutschland) unter verschiedenen Anstellwinkeln der Kamera von  $45^\circ$ ,  $55^\circ$ ,  $65^\circ$ ,  $75^\circ$ ,  $85^\circ$  und  $90^\circ$  fotografiert. Es sollte sichtbar gemacht werden, ob sich die Reflexionseigenschaften der künstlichen Attrappen unter verschiedenen Betrachtungswinkeln verändern.

### 2.2.4 Spektralanalysen der Blütenattrappen

Die Erfassung der Reflexionseigenschaften der Blütenattrappen erfolgte mit einem Spektrophotometer (USB 4000, Ocean Optics, Inc. Ostfilden, Germany), welches mit einer Lichtquelle (UV-VIS-NIR LIGHTSOURCE, Ocean Optics, DH - 2000 - BAL) über ein koaxiales Glasfaserkabel QR 400-7-UV-VIS (Ocean Optics, Inc. Dunedin, Fl. USA) verbunden war. Das Messgerät wurde wie unter Punkt 2.1.5 beschrieben kalibriert und die Attrappen ebenso vermessen. Da hier Lichtquelle und Detektor in einem Messkopf angeordnet sind (spektrophotometrischer Aufbau), können Spiegelreflexionen und daraus resultierende Glanzeffekte nicht erfasst werden. Es wurde daher ein weiterer Aufbau gewählt (goniometrischer Aufbau) (Abb. 17), bei dem Lichtquelle und Detektor getrennt angebracht wurden und die Lichtquelle in einem konstanten Winkel von  $45^\circ$  zur Messfläche fixiert wurde, während der Detektor im Bereich  $45^\circ$ ,  $55^\circ$ ,  $65^\circ$ ,  $75^\circ$ ,  $85^\circ$ ,  $90^\circ$  zur Attrappen-Oberfläche variierte.



**Abb. 17** Goniometrischer Aufbau zur Spektrophotometrie; die Lichtquelle und der Detektor für das reflektierte Licht stehen sich gegenüber; die Lichtquelle befindet sich immer in einem festen Winkel von  $45^\circ$  zur Oberfläche, während der Detektor-Winkel variiert wird

Die Messungen fanden in einem vollständig abgedunkelten Laborraum statt, um eine Verfälschung der reflektierten Lichtmenge an der Grenzschicht durch eine Raumbeleuchtung auszuschließen. Die ermittelten Reflexionskurven wurden für die Extremwerte  $45^\circ$  und  $90^\circ$  in das Farbhexagon (CHITTKA 1992) übertragen. Mit den goniometrisch ermittelten Messwerten wurde die spektrale Reinheit nach LUNAU et al. (1996) bestimmt. Diese Messungen, gemeinsam mit den Weißflächen-Berechnungen anhand der Fotografien der Attrappen unter 2.2.3 unterstützen die Evaluierung der Glanzeffekte und das davon möglicherweise abhängige Wahlverhalten von *Bombus terrestris*.

### 2.2.5 Versuchstierhaltung

Der zweite Teil dieser Arbeit besteht aus Wettbewerbsexperimenten mit den zuvor angefertigten Blütenattrappen und einzelnen blütennaiven Individuen von *Bombus terrestris*. Dabei wurden einzelnen Hummeln simultan verschiedene Attrappen bei variablen Beleuchtungsbedingungen angeboten und die Präferenzen der Versuchstiere aufgezeichnet.

Die Versuchsreihen wurden mit zwei Minivölkern der Firma BIObest, Westerlo, Belgien im Zeitraum von Juni 2015 bis November 2015 im Institut für Sinnesökologie durchgeführt. Das Nest bestand aus einer lichtundurchlässigen Plastikbox, aufgestellt in einem künstlich beleuchteten Versuchsraum mit 9 Leuchtstoffröhren (BIOLUX T8, L 58 W / 965, OSRAM GmbH, München, Deutschland), die über dem Nest und auch über der Versuchsarena angebracht waren. Im Versuchsraum befanden sich keine Fenster, sodass kein Tageslicht einfallen konnte und der von WILLMER (2011) beschriebene Effekt, dass Hummeln ihr Sammelverhalten von den über einen Tag variierenden Lichtverhältnissen abhängig machen, ausgeschlossen werden konnte. Die Leuchtkörper wurden über eine Zeitschaltuhr täglich von 9:00 Uhr bis 18:00 Uhr eingeschaltet, um den Versuchstieren einen künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus vorzugeben.

Das Raumklima während der Wahlversuche variierte zwischen  $22,7^\circ\text{C}$  und  $23,9^\circ\text{C}$ , die relative Luftfeuchtigkeit lag zwischen 17,00 % und 22,20 % RLF. Die Werte wurden täglich von einem Thermo-Hygrometer (Kat. Nr. 30.5014.02, TFA Dostmann,

Wertheim-Reicholzheim, Deutschland), das Mindest- und Maximalwerte eines vorgewählten Zeitraums speicherte, abgelesen.

Über einen Plexiglasgang war das Nest mit einem Flugraum (Höhe: 80,5 cm, Breite: 62,3 cm, Tiefe: 60,2 cm) verbunden, zu dem die Tiere ständig Zugang hatten und in dem ihnen, in an der Decke hängenden Falcon-Tubes, (Abb. 18 a) Biogluc®, einem 30,00 %igen Nektarersatz, bestehend aus Glucose, Fructose und Konservierungsmitteln, angeboten wurde. Eine Kordel, die in die Zuckerlösung getaucht war und sich durch Kapillarkräfte vollzog, diente den



**Abb. 18** a Nektarfeeder im Flugraum; b Innenaufnahme des Nests von *Bombus terrestris* mit spanischem Blütenpollen

Hummeln als Landeplatz und Futterstelle. Zur Eiweißversorgung, die besonders entscheidend ist für die Vitalität der Nachkommen, wurde von Honigbienen gesammelter Höschchenpollen (Heinrich Holtermann KG, Brockel, Deutschland) in den Deckeln von Falcon-Tubes im Nest gefüttert (Abb. 18 b).

### 2.2.6 Versuchsaufbau – Wahlversuche bei diffuser Beleuchtung

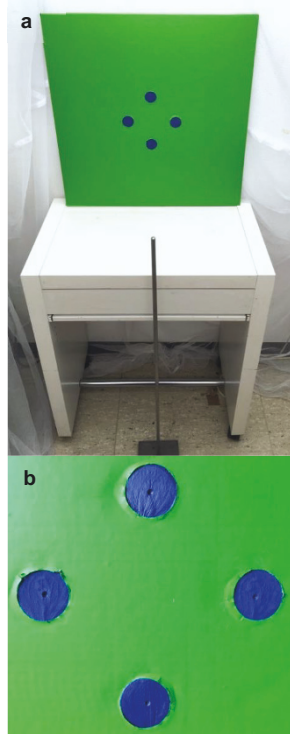
Als Versuchsarena für die Wahlversuche bei diffuser Beleuchtung diente ein mit einem Moskitonetz abgegrenzter Bereich (Höhe: 1,75 m, Breite: 1,46 m, Tiefe: 1,00 m) auf der gegenüberliegenden Seite des Nests (Abb. 19 a). In diesem Bereich befand sich ein Tisch (Höhe: 1,25 m, Breite: 0,7 m, Tiefe: 0,4 m) zur Präsentation der Attrappen. Als Aufnahmebord diente ein mit grüner PVC-Folie (Plotterfolie Oracal 631, Exhibition Cal, 064 gelbgrün, RAL 6018, ORAFOL® Europe GmbH, Oranienburg, Deutschland) beklebter, fester Karton mit den Maßen 60 cm x 60 cm (Abb. 19 b) und vier kreisrunden Ausschnitten von 3,8 cm im Durchmesser, in die die Attrappen von der Rückseite des Kartons eingefügt werden konnten. Die PVC-Folie hatte an den Ausschnitten einen leichten Überstand von ca. 1 mm, sodass die zumeist ungleichmäßigen Ränder der Attrappen hierdurch abgedeckt wurden und für die Versuchstiere nur die zu testende Oberfläche zu sehen war.

Als Beleuchtungsstärken der 9 Leuchstoffröhren über dem Versuchsaufbau und zum Vergleich über dem Flugraum wurden für die diffuse Beleuchtung mittels Luxmeter (Typ BEHA 93408, Firma BEHA Amprobe®, Glottertal, Deutschland), dessen Messsensor parallel zur Attrappen-Oberfläche, wie in der Bedienungsanleitung des Herstellers empfohlen, positioniert und somit in Anflugrichtung der Hummeln ausgerichtet wurde, folgende Werte ermittelt:

Versuchsaufbau, Decke:	11.100 Lux
Versuchsaufbau, Boden:	1.300 Lux
Flugraum, Mitte:	1.330 Lux
Flugraum, Decke:	3.240 Lux

Das Aufnahmebord wurde in den Versuchsreihen sowohl auf dem Tisch liegend, horizontal als auch auf dem Tisch stehend, in einem steilen Winkel gegen die Wand gelehnt, vertikal angeordnet. Eine innerhalb des Netzes, vor dem Tisch auf einem Stativ (Primax 180, Cullmann®, Langenzenn, Deutschland) positionierte Videokamera (Panasonic HC-V707, Panasonic Marketing Europe GmbH, Hamburg, Deutschland), die auf die Attrappen im Aufnahmebord ausgerichtet war, diente als Aufnahmegerät. Ein Laborstativ vor der Tischplatte

mit einer Entfernung von 42 cm zum Aufnahmebord diente als Einlasshilfe der Hummeln bei der vertikalen Anordnung der Attrappen. Bei horizontaler Anordnung der Attrappen wurden die Versuchstiere auch in einer Entfernung von 42 cm von der Mitte der Attrappen-Unterlage entfernt in einer Höhe von 20 cm darüber eingesetzt, diesen Punkt markierte ebenfalls ein Laborstativ.

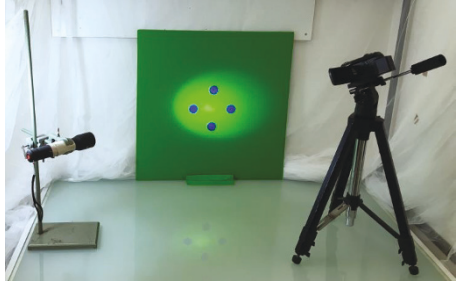


**Abb. 19** a Versuchsarena; die Spitze des Stativs im Vordergrund diente als Einlass-Markierung für *Bombus terrestris*; b Anordnung der vier simultan angebotenen Attrappen auf dem Aufnahmebord

## 2.2.7 Versuchsaufbau – Wahlversuche bei gerichtetem Spot-Light

Für diesen Versuchsaufbau wurde eine größere Tischfläche zur Befestigung des Leuchtmittels benötigt, sodass sich eine Versuchsarena (Abb. 20) von ca. 1 m<sup>3</sup> (Höhe: 1,00 m, Breite: 1,26 m, Tiefe: 0,80 m) ergab. Das Aufnahmebord für die Attrappen aus

den Wahlversuchen bei diffuser Beleuchtung (siehe Pkt. 2.2.6) kam auch hier zur Anwendung. Ebenso wurden die Attrappen auch hier horizontal, auf dem Tisch liegend und vertikal, auf dem Tisch stehend, in steilem Winkel gegen die Wand gelehnt, präsentiert. Als Leuchtmittel wurde eine LED-Taschenlampe (LED Lenser® P 14.2, Zweibrüder Optoelectronics, Solingen,



**Abb. 20** Versuchsarena der Testreihen bei gerichtetem Spot-Light; der Lichtstrahl der LED-Taschenlampe wurde auf das Zentrum der Attrappen-Unterlage ausgerichtet

Deutschland) auf einem Laborstativ mit einer Klemme links vom Aufnahmebord auf der Tischfläche positioniert und in einem Winkel von 45° auf die Mitte des Aufnahmebords gerichtet. Wie auch in den Wahlversuchen bei diffuser Beleuchtung wurde eine Videokamera (Panasonic HC-V707, Panasonic Deutschland, Hamburg) auf einem Stativ (Primax 180, Cullmann®, Langenzenn, Deutschland), jetzt aber rechts neben dem Tisch, genau gegenüber der LED-Taschenlampe, 15 cm höher positioniert und auf die Mitte des Aufnahmebords gerichtet. Als Markierung für den Einlass der Versuchstiere in Lichteinfallrichtung wurde die obere Seite der LED-Taschenlampe genutzt. Die Markierung für den Einlass der Versuchstiere gegen die Lichteinfallrichtung war eine auf dem Stativ mit Klebeband markierte Stelle gleicher Entfernung und Höhe.

Als Beleuchtungsstärken für die Spot-Light Beleuchtung wurden über dem Versuchsaufbau mit dem Luxmeter (Typ BEHA 93408, Firma BEHA Amprobe®, Glottertal, Deutschland) parallel zur Attrappen-Oberfläche folgende Werte ermittelt:

Versuchsaufbau, Decke:	50 Lux
Aufnahmebord, oberer Rand:	220 Lux
Aufnahmebord, Mitte:	28.400 Lux
Aufnahmebord, unterer Rand:	180 Lux
Aufnahmebord, linker Rand:	390 Lux
Aufnahmebord, rechter Rand:	120 Lux
Obere Attrappe, Mitte:	840 Lux
Untere Attrappe, Mitte:	860 Lux
Linke Attrappe, Mitte:	1.960 Lux
Rechte Attrappe, Mitte:	710 Lux

## 2.2.8 Regeln für die Versuchsdurchführung

Die Versuche wurden mit blütennaiven Individuen durchgeführt. Um auszuschließen, dass ein Versuchstier durch Erfahrung und Lernen bereits Vorlieben für visuelle Muster ausgebildet hat, wurde jedes getestete Versuchstier im Anschluss an den Testlauf mit einem Opalith-Plättchen (Holtermann, Brockel, Deutschland) auf dem Thorax markiert.

Die Testläufe der einzelnen Wahlversuche wurden so oft wiederholt, bis die zuvor festgelegte Anzahl an Individuen erfolgreich mitgearbeitet hat (Tab. 2).

**Tab. 2** Testreihen mit unterschiedlichen Attrappen-Kombinationen, durchgeführt bei variierenden Lichtbedingungen

Nr.	Beleuchtung	Präsentation	Attrappen				n
1	Diffus	Horizontal	Grobe Glaskugeln	Feine Glaskugeln	Glatte Fläche	Rosen-Petalum	16
2	Diffus	Vertikal	Grobe Glaskugeln	Feine Glaskugeln	Glatte Fläche	Rosen-Petalum	16
3	Diffus	Vertikal	<i>Tibouchina</i> adaxial	Magnolie	<i>Tibouchina</i> adaxial	Magnolie	20
4	Diffus	Vertikal	<i>Tibouchina</i> adaxial	<i>Tibouchina</i> abaxial	<i>Tibouchina</i> adaxial	<i>Tibouchina</i> abaxial	20
5	Spot-Light	Horizontal in Lichteinfall	Grobe Glaskugeln	Feine Glaskugeln	Glatte Fläche	Rosen-Petalum	10
6	Spot-Light	Horizontal gegen Lichteinfall	Grobe Glaskugeln	Feine Glaskugeln	Glatte Fläche	Rosen-Petalum	10
7	Spot-Light	Vertikal in Lichteinfall	<i>Tibouchina</i> adaxial	Magnolie	<i>Tibouchina</i> adaxial	Magnolie	20
8	Spot-Light	Vertikal gegen Lichteinfall	<i>Tibouchina</i> adaxial	Magnolie	<i>Tibouchina</i> adaxial	Magnolie	20
9	Spot-Light	Vertikal in Lichteinfall	<i>Tibouchina</i> adaxial	<i>Tibouchina</i> abaxial	<i>Tibouchina</i> adaxial	<i>Tibouchina</i> abaxial	20
10	Spot-Light	Vertikal gegen Lichteinfall	<i>Tibouchina</i> adaxial	<i>Tibouchina</i> abaxial	<i>Tibouchina</i> adaxial	<i>Tibouchina</i> abaxial	20

Es wurden nur Hummeln auf dem Weg vom Nest zum Flugraum abgefangen. Sobald eine Hummel in die Versuchsarena eingesetzt war, wurde die Videoaufnahme gestartet. Hat das Versuchstier mit allen sechs Beinen für mehr als 2 Sekunden eine Attrappe berührt, wurde das als Landung und somit Entscheidung für eine Oberfläche gewertet und der Versuch war beendet. Hat eine Hummel in einem Zeitraum von 4 Minuten kein Interesse an einer Attrappe gezeigt, wurde der Versuch abgebrochen.

Die Anzahl der Versuchstiere, die nicht erfolgreich getestet werden konnten, wurde dennoch erfasst.

### 2.2.9 Versuchsdurchführung

Vor den eigentlichen Wahlversuchen erfolgten ein bis drei Trainingsdurchläufe, in denen jedes Versuchstier auf das vertikal angeordnete Aufnahmebord, jedoch bestückt mit vier achromatischen, grauen künstlichen Blüten aus Karton und einer 50,00 %igen Zuckerlösung in Deckeln von Eppendorf-Gefäßen trainiert wurde. Sobald die Hummel alle vier Nektartöpfchen aufgesucht und geleert hatte, wurde sie abgefangen und mit einem Opalith-Plättchen markiert. Im Anschluss wurde die Hummel ins Nest entlassen, wo sie ihren Honigmagen entleeren konnte. Sobald sie wieder auf dem Weg zum Flugraum war, wurde sie erneut abgefangen für die anschließenden, bewerteten Testdurchläufe. Anhand der Opalith-Markierung konnte festgestellt werden, ob ein Versuchstier bereits an Training und Testdurchlauf teilgenommen hatte, sodass sichergestellt werden konnte, dass ausschließlich blütennaive Tiere zum Test eingesetzt wurden.

Bei den Wahlversuchen bei diffuser Beleuchtung wurde jedes Versuchstier für eine Serie von vier Einzelversuchen eingesetzt. Sobald eine Hummel auf einer Attrappe gelandet war (Abb. 21), wurde sie mit einem Drosophila-Röhrchen abgefangen. Das Röhrchen wurde verschlossen, die Attrappen gereinigt und erneut mit Nektarersatzlösung befüllt, sowie das Aufnahmebord um 90° gedreht. Anschließend wurde die Hummel wieder eingesetzt und wiederum die Entscheidung für eine Attrappe beobachtet und gewertet. Danach erfolgte das gleiche Procedere solange bis jede der vier Attrappen auf jeder der vier Positionen (oben - unten - rechts - links, bzw. vorne - hinten - links - rechts) getestet war, um eventuelle Positionspräferenzen der Hummel mit erfassen zu können. Diese Vorgehensweise wurde auf jeden der vier Testdurchläufe angewendet.



**Abb. 21** Wertung einer Landung; alle sechs Beine müssen auf der Attrappen-Oberfläche aufgesetzt sein

Die Wahlversuche mit *Bombus terrestris* bei Spot-Light bestanden aus Serien von acht Einzelversuchen pro Versuchstier, und zwar vier Einzelversuchen mit gedrehtem Aufnahmebord bei Einlass der Hummel in Lichteinfallrichtung und vier Einzelversuchen mit gedrehtem Aufnahmebord und Einlass der Hummel gegen die Lichteinfallrichtung. Diese Versuchsreihen fanden bei ausgeschalteter Raumbeleuchtung statt, sodass die Attrappen nur durch das Spot-Light ausgeleuchtet waren. Auch hier wurde die Hummel nach einer Landung auf einer Attrappe abgefangen, das Aufnahmebord um 90° gedreht und gereinigt und die Nektartöpfchen der Attrappen aufgefüllt. Anschließend wurde das Versuchstier wieder in die Arena eingesetzt.

## 2.2.10 Auswertung der erhobenen Daten

Die gesamte Aufbereitung und Auswertung der erhobenen Daten erfolgte über Microsoft® Excel 2010, GraphPad InStat® (Version 3.10 – © 1992 - 2009 GraphPad Software, Inc., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)), sowie der frei zugänglichen Statistik-Software R-Studio® (Version 0.98.1103 – © 2009 - 2014 RStudio, Inc., [www.rstudio.com](http://www.rstudio.com)).

Zur Analyse des Einflusses epidermaler Mikrostrukturen von Blütenblättern auf das Reflexionsverhalten wurden neben den unter 2.1.5 und 2.1.6 durchgeführten Reflexionsmessungen, Berechnungen unterschiedlicher Blütenparameter und der Anfertigung von Farbhexagonen der insgesamt betrachteten Blütenspezies, die erhaltenen Daten statistisch untersucht mit Hilfe der Pearson-Korrelation. Zur Festlegung der relevanten Betrachtungswinkel für die Auswertung wurden stichprobenartig für einzelne Blüten die Werte der spektralen Reinheit nach LUNAU et al. (1996) aufgetragen gegen die unterschiedlichen Messwinkel der Spektrophotometrie und auf signifikante Unterschiede untersucht. Besonderes Augenmerk wurde bei der Auswertung auf die Veränderung der Parameter bei unterschiedlichen Messwinkeln gelegt, sodass mehrfach die Differenzen der Parameter in Korrelation gesetzt wurden.

Die Fotografien der Blütenattrappen bei gerichtetem Spot-Light in und gegen die Richtung des einfallenden Lichtes unter 2.2.3 wurden zur Bewertung von Glanzeffekten herangezogen. Mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland) wurde hierzu die Fläche der Attrappen in Pixel umgerechnet. Durch das Bild Tool ‚Lichter‘ wurden die hellsten Bildpartien oder Weißflächen ebenfalls in der Einheit Pixel ausgewiesen. Mit der

Vorgabe einer Toleranz (hier 30 von maximal 255 Einheiten) für den auszuwählenden Farbwert wurde festgelegt, wie ähnlich sich die Pixel in der Farbe sein müssen, um als Weiß erkannt zu werden.

Die Auswertung der Wahlversuche erfolgte mit dem Statistik-Programm R. Dazu wurden die gesammelten Daten in einem ersten Schritt mit dem Shapiro-Test auf Normalverteilung untersucht. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Friedman-Test, ein nichtparametrisches statistisches Verfahren zum Vergleich mehrerer voneinander abhängiger Stichproben herangezogen, um die Unterschiede im Wahlverhalten von *Bombus terrestris* hinsichtlich verschiedener Blütenattrappen zu analysieren. Im Fall der Testreihen mit vier Attrappen, bei diffusem Licht als auch bei Spot-Light, war aufgrund der Anzahl die Anwendung eines Post-hoc Tests erforderlich. Mit dem gepaarten Wilcoxon-Test ohne Fehlerkorrektur wurde geprüft, zwischen welchen der vier simultan angebotenen Attrappen signifikante Unterschiede verzeichnet werden konnten.

Dieser anschließende Schritt des Post-hoc Tests war überflüssig bei nur zwei unterschiedlichen Attrappen, hierbei reichte der Friedman-Test aus, um signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen herauszustellen. Bei allen einzelnen Versuchsreihen (Tab. 2) wurde sowohl die Gesamtzahl der Landungen, die relative Häufigkeit und die Erstreaktion ausgewertet mit Hilfe des zuvor beschriebenen statistischen Prüfverfahrens.

Um die erhaltenen Ergebnisse auf Positionspräferenzen der Versuchstiere überprüfen zu können wurden auch hierbei in einem ersten Schritt die Daten auf Normalverteilung analysiert. Anschließend wurden die Daten einer ANOVA Varianzanalyse unterzogen, um eine Abhängigkeit zwischen Attrappen-Position und Landehäufigkeit der Versuchstiere zu visualisieren. Miteinander in Bezug gesetzt wurde hierbei die Anzahl der Landungen mit den unterschiedlichen Positionen 'links', 'rechts', 'oben', 'unten' bei der vertikalen Präsentation des Attrappenbords und den Positionen 'links', 'rechts', 'vorne' und 'hinten' bei der horizontalen Darbietung, unabhängig von der dort angebotenen Attrappe.

Mit Hilfe der Pearson-Korrelation wurde die Abhängigkeit des Wahlverhaltens der Hummeln von der spektralen Reinheit der Attrappen bei unterschiedlichen Licht-

bedingungen offengelegt. Die Korrelationskurven wurden für alle Versuchsreihen angefertigt und die Signifikanzniveaus ermitteln.

Epidermale Mikrostrukturen von Blütenblättern  
Einfluss auf spektrale Reflexion und Attraktivität für  
Hummeln

Wilmsen, S.

2017, XVII, 132 S. 52 Abb., 10 Abb. in Farbe., Softcover

ISBN: 978-3-658-18604-3