

**Floral Scent in *Salix* L.
and the Role of Olfactory and Visual Cues
for Pollinator Attraction of *Salix caprea* L.**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Vorgelegt der

Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften

der Universität Bayreuth

von

Ulrike Füssel

Bayreuth, im Oktober 2007

Content

Content	1
Part A Detailed Summary	3
1 General Introduction and Aims of the Research	4
1.1 Background	5
1.1.1 The Genus <i>Salix</i> : Distribution and Taxonomy	5
1.1.2 Pollination System of <i>Salix</i>	5
1.1.3 Floral Signals and Rewards of <i>Salix</i>	6
1.2 Aims of the Research	11
2 Material and Methods.....	12
2.1 Plant Material	12
2.2 Determination of Flower Visitors (Publication 2).....	12
2.3 Floral Scent Collection and Analysis (Publications 1, 2, and 4).....	13
2.4 Gas Chromatography Coupled to Electroantennographic Detection (GC-EAD) (Publications 2 and 3).....	14
2.5 Behavioural Tests (Publications 2, 3, and 4).....	16
2.6 Sugar Composition and Concentration of Nectar in Flowers of <i>Salix caprea</i> (Publication 4).....	21
2.7 Pollination Experiment (Publication 2).....	21
3 Results and Discussion.....	22
3.1 What Is the Chemical Composition of <i>Salix</i> Floral Scent? How Does it Vary with Species, Gender, and Time of the Day? (Publications 1, 2, and 4).....	22
3.2 Which Are the Flower Visitors of <i>Salix caprea</i> ? (Publication 2)	27
3.3 Which Floral Scent Compounds Can Be Detected by Flower Visitors of <i>Salix</i> ? (Publications 2 and 3).....	29
3.4 Do Electrophysiological Active Compounds Act as Attractants for Potential Pollinators of <i>Salix caprea</i> ? (Publications 2 and 3)	30

3.5	Which Gender of <i>Salix caprea</i> Is More Attractive to <i>Apis mellifera</i> ? What Role Do Visual and Olfactory Cues Play? (Publication 4).....	31
3.6	Does the Nectar Reward of Male and Female Flowers of <i>Salix caprea</i> Differ? (Publication 4).....	32
3.7	What Is the Contribution of Different Pollen Vectors to Reproductive Success? (Publication 2).....	33
3.8	Is <i>Salix caprea</i> a Generalist or a Specialist Regarding the Pollination System? (Publications 1, 2, 3, and 4).....	34
4	References	36
5	Short Summary.....	47
Part B	Publications.....	50
1	Inter- and Intraspecific Variation in Floral Scent in the Genus <i>Salix</i> and its Implication for Pollination	53
2	<i>Salix caprea</i> : an Interaction Generalist and Multi-Specialist with Bimodal Adaptations of Floral Scent to Bees and Moths.....	77
3	1,4-Dimethoxybenzene, a Floral Scent Compound in Willows that Attracts an Oligolectic Bee.....	113
4	Floral Reward and Advertisement in Dioecious <i>Salix caprea</i>	121
5	Summary	150
6	Zusammenfassung.....	155
7	Erklärung	VIII

1 General Introduction and Aims of the Research

Numerous studies have shown that flowers are complex systems in which floral features such as shape, nectar, colour, and odour work together for the benefit of the plants' sexual reproduction. Pollen transfer is either achieved by attraction and manipulation of pollinators (e.g. Stensmyr et al. 2002; Schiestl 2005; Raguso et al. 2007) or by abiotic factors such as wind and water (Ackermann and Kevan 2005). Both diversity and similarity of flowers have been interpreted since Darwin as adaptations to different types of pollinating agents (e.g. Darwin 1862; Delpino 1868-1875; Knuth 1906; Vogel 1954; Baker 1963; Grant and Grant 1965; Stebbins 1970; Fægri and van der Pijl 1979; Johnson and Steiner 2000; Fenster et al. 2004). More or less specialised relationships between abiotic and biotic pollinating agents and plant species are reflected in the widely adopted classification of flowers with different pollination syndromes (Faegri and van der Pijl 1979). Pollination systems of flowers which attract numerous animal species with a broad taxonomic spectrum, or achieve pollination by a mixture of pollination modes and vectors (Robertson 1928; Vroege and Stelleman 1990; Ellis and Ellis-Adam 1993; Ollerton 1996; Waser et al. 1996; Memmott 1999), have long been neglected. But in fact, such generalistic pollination systems seem to be more common than previously thought (Waser et al. 1996). For example, a combination of wind and insect pollination has been found in a number of species from a wide range of taxa and these show a various mixture of traits attributed to wind- and insect pollination (Proctor et al. 1996; de Figueiredo and Sazima 2000; Culley et al. 2002).

Especially, species of the genus *Salix* L. (willows) were often described as pollination generalists (e.g. Karrenberg et al. 2002), because they show traits of insect as well as wind pollination (Stebbins 1970; Faegri and van der Pijl 1979). Depending on species and ecological context, insects (Kevan 1972; Sacchi and Price 1988; Elmqvist et al. 1988; Douglas 1997) as well as wind (Argus 1974; Vroege and Stelleman 1990; Fox 1992) are both important pollen vectors. Besides this mixture of pollination modes, a variety of insects are known as flower visitors and potential pollinators (Vroege and Stelleman 1990; Hilty 2006). Despite their worldwide distribution and great ecological importance, little is known about the specific interaction of *Salix* species with their pollinators and the mechanisms of pollinator attraction, pollination success, and hybridisation. In willows that seemingly combine different pollination modes and a wide array of potential pollinators, nothing is known about the signals that prompt pollinators to visit flowers of both genders repeatedly to ensure pollination. Taking all its features together, the genus *Salix* seemed to be an interesting case to

be studied within the scope of the graduate college 678 “Ecological significance of natural compounds and other signals in insects – from structure to function”. The present work focuses mainly on plant-insect interactions in the genus *Salix* and the role of floral scent for the attraction of insects. Besides a general survey of floral scent in willow species, I conducted a detailed case study on its role in plant-pollinator interactions of *Salix caprea* L.

1.1 Background

1.1.1 The Genus *Salix*: Distribution and Taxonomy

The genus *Salix* L. comprises 400 to 500 species (Fang 1987; Skvortsov 1999) with a nearly worldwide distribution. *Salix* species occur predominantly in temperate to arctic regions of the northern hemisphere. In Central Europe about 40 species occur, many sympatrically (Lautenschlager-Fleury and Lautenschlager-Fleury 1994; Rothmaler 2002).

From a taxonomical point of view, *Salix* is a problematic genus with difficulties in the delimitation of many species, mainly because of high morphological variability (Argus 1997; Skvortsov 1999), and suggested widespread hybridisation and introgression (Mosseler 1990; Fritz et al. 1998). There are several, different phylogenetic classifications of this genus available, all based on morphological characters (Dorn 1976; Argus 1997: American species, Skvortsov 1999: Eurasian species). The classification used in this study is that of Skvortsov (1999), because it is the most comprehensive for Eurasian species. He divided *Salix* in three subgenera (*Chamaetia*, *Salix*, and *Vetrix*), each with several sections listed in Füssel et al. (2007) (see Part B, Chapter 1).

1.1.2 Pollination System of *Salix*

Salix species are dioecious with often hundreds of flowers arranged in catkins (Kay 1985; Karrenberg et al. 2002) (see Figure 1). The plants show traits of insect as well as of wind pollination. Stiff erect catkins, availability of nectar, and floral scent production fit well with insect pollination, whereas small flower size, absence of a perianth, predominant flowering early in spring before leaf unfolding, and release of large amounts of small pollen are characteristic for wind pollination. Hence, the importance of either mode of pollination in the genus *Salix* is controversial (Karrenberg et al. 2002). Nevertheless, most species are thought

to be mainly entomogamous, though in certain species wind contributes to some degree to pollination (Argus 1974; Sacchi and Price 1988; Vroege and Stelleman 1990; Ohara and Higashi 1994; Peeters and Totland 1999; Totland and Sottocornola 2001; Karrenberg et al. 2002). Reported ratios of insect to wind pollination range from 20-70 % wind pollination in *Salix repens* (Vroege and Stelleman 1990), to 50 % insect pollination in *S. caprea* (Vroege and Stelleman 1990), and almost total insect pollination in *S. arctica* (Kevan 1972). Depending on species and ecological context both, insects (Kevan 1972; Sacchi and Price 1988; Elmqvist et al. 1988; Douglas 1997) and wind (Argus 1974; Vroege and Stelleman 1990; Fox 1992) seem to be important pollen vectors.

With regards to insect pollination it is known that social and solitary bees (Apoidea, Hymenoptera) are the most common flower visitors of many *Salix* species (e.g. van der Werf et al. 1982; Vroege and Stelleman 1990; Hilty 2006). *Salix* is a genus that hosts many different oligolectic bee species (e.g. *Andrena vaga*), probably because of its readily accessible pollen (Michener 2000). Some generalistic bees (e.g. *Apis mellifera*), often visit willow catkins for their pollen and nectar (e.g. van der Werf et al. 1982; Vroege and Stelleman 1990; Hilty 2006).

Some Diptera (van der Werf et al. 1982; Pellmyr and Kärkkäinen 1987; Totland and Sottocornola 2001) and some Lepidoptera and Coleoptera species (Vroege and Stelleman 1990; Urban and Kopelke 2004) have been also observed as flower visitors. However, studies that differentiate the importance of the different insect groups and of diurnal and nocturnal flower visitors, or compare them separately with wind pollination are missing. In most cases it is not clear to what extent particular flower visitors are contributing to pollination (van der Werf et al. 1982).

1.1.3 Floral Signals and Rewards of *Salix*

Floral signals consist in most cases of visual and olfactory cues. Attractants include the visual stimulus of floral shape and colour as well as the production of floral odour (Fraegri and van der Pijl 1979; Passarelli and Bruzzone 2004). The attractivity of floral signals is usually based on the possibility for the animal to find a reward, such as nectar (e.g. Molina-Faeaner et al. 2004), pollen (e.g. Fleming and Nicolson 2002), or other substances (Fraegri and van der Pijl 1979).

5 Summary

The present work was performed within the framework of the graduate college 678 “Ecological significance of natural compounds and other signals in insects – from structure to function” at the University of Bayreuth.

For the first time, the role of floral scents for the interaction of dioecious willows (*Salix* spp., Salicaceae) with their pollinators was examined in detail. Willows are mainly pollinated by wind and/or insects, but the flower visitor composition of specific willow species is mostly as unknown as the contribution of particular insect species or wind to the reproductive success of these willows. Flower-visiting insects are primarily attracted to the catkins by visual and olfactory signals of the flowers. However, up to now there are no thorough studies of the relative significance of olfactory and visual cues, and the importance of single floral scent compounds for pollinator attraction.

In this thesis, the chemical composition of floral scent of different willow species as well as its variability on the inter- and intraspecific level were analysed in general. In a subsequent case study (*Salix caprea*), the role of floral scent for attracting the identified flower visitors was examined in detail by means of electroantennographic studies and bioassays in the field, in a flight cage, and in a wind tunnel. The relevance of different pollen vectors for the reproductive success of this willow species was examined by pollination experiments.

Chemical composition and variability of the floral scent of *Salix*

For the determination of the chemical composition and the variability of floral scent within the genus *Salix* the inflorescence odour of 93 different individuals (male and female) from 34 species was examined. The floral scent of several catkins of an individual was collected using a dynamic headspace MicroSPE method and analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Isoprenoids (e.g. α - and β -pinene, D-limonene, *cis*- and *trans*- β -ocimene, and linalool) and aromatic compounds (e.g. benzaldehyde and 1,4-dimethoxybenzene) were identified as typical floral scent compounds of the genus *Salix*. Particularly 1,4-dimethoxybenzene and *trans*- β -ocimene were responsible for the interspecific variation (both qualitatively and semiquantitatively).

Eight out of 34 willow species were examined with higher sample sizes (at least in each case three male and three female individuals). In half of the 28 pairwise species comparisons differences in floral scent were significant. In three of these eight willow species differences

in the floral scent pattern between the two genders could be determined. For example, the floral scent of male *Salix fragilis* individuals emitted higher relative amounts of *trans*- β -ocimene and 1,4-dimethoxybenzene, whereas female individuals contained more D-limonene and D-verbenone.

The circadian rhythm of floral scent emission was exemplarily studied in *Salix caprea*. The floral scent emission changed both semiquantitatively and qualitatively in the course of the day. Generally, a larger quantity of floral scent was emitted during the day than at night. Thereby, the quantity of floral scent correlated positively with the air temperature. Primarily, the several isomers of the monoterpene lilac aldehyde were responsible for significant differences between day and night. Lilac aldehyde is produced in higher quantities at night, which could be interpreted as an adaptation to nocturnal pollinators – e.g. the moth *Orthosia gothica*, which responded strongly of lilac aldehyde in bioassays.

Flower visitors of *Salix caprea*

Insect species from different orders (Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, and Lepidoptera) were identified as flower visitors and are regarded as potential pollinators of *Salix caprea*. The visiting frequency was highest for Hymenoptera (primarily honeybees, bumblebees, and solitary wild bees such as *Andrena vaga*) and Lepidoptera (many nocturnal and only few diurnal species). Both frequency and species spectrum of flower visitors varied within a day: During the day primarily bees (honeybee, bumblebees and solitary wild bees) and butterflies dominated, whereas during and after dawn moths were the only flower visitors. Altogether, nocturnal flower visitors had clearly a lower frequency than diurnal visitors.

Responses of *Apis mellifera* and *Orthosia gothica* to 1,4-dimethoxybenzene and lilac aldehyde

1,4-Dimethoxybenzene and lilac aldehyde are main compounds of the floral scent of *Salix caprea*. 1,4-Dimethoxybenzene dominated the floral scent day and night, but its proportion decreased over night, while the proportion of emitted lilac aldehyde increased at night. Both compounds are electrophysiological active and elicited signals in antennae of both *Apis mellifera*, the most frequent diurnal visitor, and *Orthosia gothica*, the most frequent nocturnal visitor. The effect of the two floral scent compounds on these two insect species was examined in biotests. The biotests were performed in a flight cage (*Apis mellifera*) and in

a wind tunnel (*Orthosia gothica*), respectively. The honeybee was attracted most strongly by 1,4-dimethoxybenzene; in contrast, *Orthosia gothica* was attracted most strongly by lilac aldehyde.

Responses of *Andrena vaga* to single components of floral scent of *Salix caprea* and *S. atrocinerea*

Floral scent of *Salix caprea* and *S. atrocinerea* were analysed with GC-MS and tested for their physiological activity on the oligolectic wild bee *Andrena vaga* by gas chromatography coupled with electroantennography (GC-EAD). Altogether 16 floral scent components of both *Salix* species induced clear signals in the antennae of *A. vaga*. The main component of the examined extracts, 1,4-dimethoxybenzene, led to the strongest antennal signals. Interestingly, in the biotest 1,4-dimethoxybenzene attracted many female *A. vaga*, but no male individuals.

Behavioural responses of *Apis mellifera* to male and female individuals of *Salix caprea*

The attractiveness of male and female flowering twigs of *Salix caprea* for honeybees (*Apis mellifera*) was examined in biotests in a flight cage.

In the experiment, male willow inflorescences attracted more honeybees than female inflorescences. Considering the relatively high similarity of floral scent of both genders, this is most likely due to visual cues. Because of their conspicuously yellow-coloured pollen presentation, the male catkins of *Salix caprea* are obviously visually more attractive than the pollen-lacking insipid greenish female catkins. Male and female *S. caprea* individuals differed also in the sugar composition of nectar. While females produced hexose-rich nectar, in contrast males had sucrose-dominated nectar. Further investigation should highlight if these differences also contribute to the different attractiveness of both genders to *Apis mellifera*. The higher visit frequency to male willows may be of ecological importance, since it increases the probability that flower visitors collect sufficient pollen – of possibly several male individuals – before visiting a female individual. Thus not only the probability for successful pollination and fertilisation, but also the genotypic variability might increase within a population.

Importance of diurnal and nocturnal insects as well as wind for the reproductive success of *Salix caprea*

In order to quantify the relative contribution of diurnal (primarily bees) and nocturnal insects (primarily moths) as well as wind to a successful pollination, pollination experiments were conducted at five selected female *Salix caprea* individuals. During flowering, insects were excluded from flower visits by covering inflorescences with nylon nets either at night (testing diurnal pollination), during the day (testing nocturnal pollination), or for the entire day (testing wind pollination). After the flowering season, seeds were counted to quantify the reproductive success. Exposure to diurnal flower visitors resulted in higher reproductive success, than exposure to nocturnal flower visitors. The reproductive success that can be attributed to wind pollination is also relatively low. Most likely, low nocturnal air temperatures in the investigation year and a consequently low activity of moths, were the main reason for the low contribution of nocturnal insects.

Altogether, the case study of *Salix caprea* is challenging the existing concepts of specialisation/generalisation of plant-pollinator interactions. Regarding the aspect of interactions (diurnal and nocturnal flower visitors vs. wind), *S. caprea* is a generalist, but looking at the aspect of adaptations, *S. caprea* can be regarded as a multi-specialist with respect to its floral scent emission.

In summary,

- (1) The catkins of several species of the genus *Salix* (willows) emit a rich species-specific bouquet of floral scent compounds. Within some species also gender-specific differences were found.
- (2) A high variety of diurnal and nocturnal insects (mainly bees and moths) visit the catkins of the willow (*S. caprea*), but the frequency of diurnal visitors is essentially higher than those of nocturnal insects.
- (3) Both diurnal and nocturnal flower visitors can detect a large number of floral scent compounds.
- (4) The floral scent of *Salix caprea* is subjected to a circadian rhythm, which correlates with the change of the flower visitor spectrum over day and night.
- (5) *Apis mellifera* (diurnal pollinator) is stronger attracted to 1,4-dimethoxybenzene than to lilac aldehyde, while *Orthosia gothica* (nocturnal pollinator) prefer lilac aldehyde over 1,4-dimethoxybenzene.
- (6) Male *Salix caprea* individuals are more attractive to *Apis mellifera* than females, most likely due to the yellow pollen colour.
- (7) Female *Salix caprea* produce hexose-rich nectar, while males had sucrose-dominated nectar.
- (8) Diurnal insects play a larger role in pollination of *Salix caprea* than nocturnal insects and wind.
- (9) In conclusion, the pollination system of *Salix caprea* (and probably also those of other willow species) is a generalistic one, but exhibits specific adaptations to different functional groups of pollinators.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Gradiertenkollegs 678 „Ökologische Bedeutung von Wirk- und Signalstoffen bei Insekten – von der Struktur zur Funktion“ an der Universität Bayreuth durchgeführt.

Die Rolle der Blütendüfte für die Interaktion von diözischen Weiden (*Salix* spp., Salicaceae) und ihren Bestäubern wurde erstmals detailliert untersucht. Weiden werden überwiegend von Insekten, aber auch vom Wind bestäubt, wobei nur für wenige Arten die Bedeutung der Anemogamie genauer bekannt ist. Ebenfalls nur unzureichend erforscht ist für verschiedene Weidenarten das Artenspektrum blütenbesuchender Insekten. Welche dieser Blütenbesucher tatsächlich eine Rolle als Bestäuber spielen, ist bisher überhaupt nicht untersucht worden. Insekten werden vor allem durch olfaktorische und visuelle Signale der Blütenkätzchen angelockt. Konkrete Untersuchungen, welche Bedeutung der Blütenduft bzw. einzelne Duftkomponenten als Signal für potenzielle Bestäuber hat, gab es bislang nicht.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde deshalb die chemische Zusammensetzung des Blütenduftes verschiedener Weidenarten sowie dessen Variabilität auf inter- und intraspezifischer Ebene analysiert. Anhand eines Fallbeispiels (*Salix caprea*) wurde die Bedeutung von Blütenduft für die Anlockung der gefundenen Bestäuber mittels Elektroantennographie und Biotests in Feld, Flugkäfig und Windtunnel ausführlich untersucht. Mithilfe von Bestäubungsexperimenten wurde die Bedeutung verschiedener Pollenvektoren für den Reproduktionserfolg dieser Weidenart bestimmt.

Chemische Zusammensetzung und Variabilität des Blütenduftes bei *Salix*

Zur Bestimmung der Zusammensetzung und der Variabilität des Blütenduftes innerhalb der Gattung *Salix* wurde der Duft von 93 verschiedenen Individuen (männliche und weibliche) von 34 Arten untersucht. Dazu wurde der Blütenduft von jeweils mehreren Blütenkätzchen eines Individuums mittels der „dynamic headspace MicroSPE“-Methode gesammelt und mit Hilfe von gekoppelter Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert. Typische Duftstoffkomponenten der Gattung *Salix* waren Isoprenoide (z. B. α - und β -Pinen, D-Limonen, *cis*- und *trans*- β -Ocimen und Linalool) und aromatische Verbindungen (z. B. Benzaldehyd und 1,4-Dimethoxybenzol). Besonders 1,4-Dimethoxybenzol und *trans*- β -Ocimen waren für die interspezifische Variation (sowohl qualitativ als auch semiquantitativ) verantwortlich.

Von den 34 Arten wurden acht eingehender untersucht (mindestens jeweils drei männliche und drei weibliche Individuen). Die Hälfte der paarweise verglichenen Arten unterschied sich signifikant im Duft. Bei drei von acht untersuchten Weidenarten konnten Unterschiede im Duft zwischen den beiden Geschlechtern festgestellt werden. Beispielsweise enthielt der Blütenduft männlicher *Salix fragilis*-Individuen höhere Anteile an *trans*- β -Ocimen und 1,4-Dimethoxybenzol, während weibliche Individuen dieser Art mehr D-Limonen und D-Verbenon emittierten.

Am Beispiel von *Salix caprea* wurde die tageszeitliche Rhythmik der Duftstoffemission untersucht. Der Blütenduft zeigte sowohl quantitativ als auch qualitativ eine tageszeitliche Variation. Generell wurde tagsüber mehr Duft emittiert als nachts. Die Duftstoffmenge korrelierte hierbei positiv mit der Lufttemperatur. Für die Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung waren in erster Linie die verschiedenen Isomere des Monoterpens Lilakaldehyd verantwortlich, die nachts in höheren Mengen produziert wurden als tagsüber. Dies ist vermutlich als Anpassung an nachtaktive Bestäuber – z. B. den Nachtfalter *Orthosia gothica*, der in den durchgeführten Biotests stark von Lilakaldehyd angelockt wurde – zu interpretieren.

Blütenbesucher von *Salix caprea*

Als Blütenbesucher von *Salix caprea* und damit als potenzielle Bestäuber konnten zahlreiche Insektenarten aus unterschiedlichen Ordnungen (Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera und Lepidoptera) nachgewiesen werden. Die Besuchsfrequenz war bei Hymenopteren (in erster Linie Honigbienen, Hummeln und solitäre Wildbienen wie z. B. *Andrena vaga*) und Lepidopteren (viele nachtaktive und nur wenige tagaktive Schmetterlinge) am höchsten. Sowohl die Häufigkeit als auch das Artenspektrum der Blütenbesucher variierten innerhalb eines Tages: tagsüber dominierten in erster Linie Bienen (Honigbiene, Hummeln und solitäre Wildbienen) und Tagfalter, nach Einbruch der Dämmerung dagegen waren Nachtfalter die Blütenbesucher. Nachtaktive Blütenbesucher wiesen insgesamt eine wesentlich geringere Frequenz auf als die tagaktiven Besucher.

Reaktionen von *Apis mellifera* und *Orthosia gothica* auf 1,4-Dimethoxybenzol und Lilakaldehyd

1,4-Dimethoxybenzol und Lilakaldehyd sind die Hauptkomponenten des Blütenduftes von *Salix caprea*. Dabei dominiert 1,4-Dimethoxybenzol gegenüber Lilakaldehyd sowohl tagsüber als auch nachts. Nachts ist der relative Anteil von 1,4-Dimethoxybenzol geringer als tagsüber, während der relative Anteil von Lilakaldehyd ansteigt. Beide Substanzen sind elektrophysiologisch aktiv, sie lösten Signale in den Antennen sowohl bei *Apis mellifera*, dem häufigsten Blütenbesucher am Tag, als auch bei *Orthosia gothica*, dem häufigsten nachtaktiven Besucher, aus. In Biotests wurde die anlockende Wirkung der beiden Blütenduftstoffe auf diese beiden Insektenarten untersucht. Die Biotests wurden in einem Flugkäfig (*Apis mellifera*) bzw. im Windkanal (*Orthosia gothica*) durchgeführt. Die Honigbiene wurde am stärksten von 1,4-Dimethoxybenzol angelockt, *Orthosia gothica* dagegen von Lilakaldehyd.

Reaktionen von *Andrena vaga* auf einzelne Blütenduftkomponenten von *Salix caprea* und *S. atrocinerea*

Der Blütenduft von *Salix caprea* und *S. atrocinerea* wurden mittels GC-MS analysiert und die Reaktion der oligolektischen Wildbiene *Andrena vaga* auf den Duft mit Hilfe der gekoppelten Gaschromatographie und Elektroantennographie (GC-EAD) getestet. Insgesamt 16 Komponenten des Blütenduftes beider *Salix*-Arten riefen deutliche Signale in den Antennen von *A. vaga* hervor. Die Hauptkomponente der untersuchten Duftextrakte, 1,4-Dimethoxybenzol, führte zu den stärksten Signalen. In einem Biotest im Freiland lockte 1,4-Dimethoxybenzol weibliche *A. vaga* an, aber keine männlichen.

Verhaltensreaktionen von *Apis mellifera* auf männliche und weibliche Individuen von *Salix caprea*

Die Attraktivität von männlichen und weiblichen Blütenzweigen von *Salix caprea* für Honigbienen (*Apis mellifera*) wurde in mehreren Biotests in einem Flugkäfig untersucht.

Männliche Weidenzweige wurden mit höherer Intensität angefliegen als weibliche. Bei nur geringen Unterschieden im Blütenduft beider Geschlechter waren die Blütenkätzchen männlicher Sal-Weiden wegen des gelben Pollens attraktiver als die grünlichen weiblichen Blütenkätzchen. Männliche und weibliche *S. caprea*-Individuen unterschieden sich außerdem

in ihrer Nektarzusammensetzung. Während die Weibchen Hexose-reichen Nektar produzierten, erzeugten die Männchen Saccharose-dominierten. Ob diese Unterschiede ebenfalls zur unterschiedlichen Attraktivität beider Geschlechter beitragen, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Für die Bestäubung bei *Salix caprea* ist diese höhere Attraktivität männlicher Individuen eventuell von Bedeutung, da dadurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, dass schon vor dem Anflug einer weiblichen Weide Pollen von – möglicherweise sogar mehreren – männlichen Individuen gesammelt worden ist und sich dadurch die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Bestäubung erhöht.

Anteil von tag- und nachtaktiven Insekten sowie Wind am Reproduktionserfolg von *Salix caprea*

Um den Beitrag von tag- (v. a. Bienen) und nachtaktiven Insekten (v. a. Nachtfalter) sowie des Windes zur erfolgreichen Bestäubung von *Salix caprea* zu quantifizieren, wurden an fünf ausgewählten weiblichen *Salix caprea*-Individuen Bestäubungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden in drei Versuchsvarianten blühende Zweige nachts (Test auf Tagbestäubung), tagsüber (Test auf Nachtbestäubung) und Tag und Nacht (Test auf Windbestäubung) vor Insekten geschützt. Zur Quantifizierung des Reproduktionserfolgs wurden die Samen ausgezählt. Tagaktive Blütenbesucher hatten den größten Anteil am Reproduktionserfolg, während nachtaktive Blütenbesucher und Wind nur zu einem geringen Teil dazu beitrugen. Vermutlich spielten niedrige nächtliche Lufttemperaturen im Untersuchungsjahr und eine daraus resultierende geringe Aktivität von Nachtfaltern eine Hauptrolle für den geringen Anteil der Bestäubung durch nachtaktive Insekten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die herkömmlichen Konzepte bezüglich der Interaktionen zwischen Pflanzen und Bestäubern (Spezialisierung vs. Generalisierung) hinterfragt werden müssen. Hinsichtlich des Bestäubungssystems (tagaktive und nachtaktive Blütenbesucher vs. Wind) ist *S. caprea* ein Generalist, der jedoch spezifische Anpassungen (unterschiedliche Duftemission) an bestimmte Insektenarten als potenzielle Bestäuber aufweist und somit als Multispezialist charakterisiert werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- (1) Die Blütenkätzchen der Arten der Gattung *Salix* (Weiden) geben ein reiches artspezifisches Bouquet an Duftstoffen ab. Bei einigen Arten sind auch geschlechtsspezifische Unterschiede nachweisbar.
- (2) Eine Vielzahl tag- und nachtaktiver Insekten (hauptsächlich Bienen und Nachtfalter) sind Blütenbesucher bei *Salix caprea*. Tagaktive Insekten sind dabei wesentlich häufiger als nachtaktive.
- (3) Verschiedene tag- und nachtaktive Blütenbesucher reagieren auf eine Vielzahl einzelner Komponenten des Blütenduftes von *Salix caprea*.
- (4) Der Blütenduft von *Salix caprea* unterliegt einer tageszeitlichen Rhythmik, die mit dem rhythmischen Wechsel des Blütenbesucherspektrums korreliert.
- (5) *Apis mellifera* (tagaktiver Blütenbesucher) bevorzugt 1,4-Dimethoxybenzol, während für *Orthosia gothica* (nachtaktiver Blütenbesucher) Lilakaldehyd attraktiver ist.
- (6) Männliche *Salix caprea*-Individuen sind – vermutlich aufgrund der gelben Pollenfarbe – für *Apis mellifera* attraktiver als weibliche.
- (7) Weibliche *Salix caprea*-Individuen produzieren Hexose-reichen Nektar, männliche Individuen dagegen Saccharose-dominierten.
- (8) Für die Bestäubung von *Salix caprea* sind tagaktive Insekten von großer Bedeutung, während nachtaktive Insekten und der Wind nur eine geringe Rolle spielen.
- (9) Als Schlussfolgerung ergibt sich, dass das Bestäubungssystem von *Salix caprea* (und vermutlich auch anderer Weidenarten) ein generalistisches ist, welches spezifische Anpassungen an bestimmte Bestäubergruppen aufweist.