

3 Chemische Untersuchung der Wehrflüssigkeit von Larven der ‚drüsentragenden Gruppe‘ der Galerucinae

3.1 Zusammenfassung

Die Wehrflüssigkeit der Larven von fünf Galerucinae-Arten wurde untersucht: *Agelastica alni*, *Agelastica coerulea*, *Agelasa nigriceps*, *Sermylassa halensis* und *Gallerucida bifasciata*. Durch vergleichende Untersuchung mit entsprechenden Hämolympfproben konnte mittels Lichtmikroskopie und Proteinmustervergleich (SDS-PAGE) eindeutig nachgewiesen werden, daß durch die Wehröffnungen Hämolymphe abgegeben wird. Die Wehrflüssigkeit von allen untersuchten Arten erwiesen sich im Biotest mit Ameisen (*Myrmica rubra*) als signifikant fraßhemmend. Die deterrenten Verbindungen sind hochpolar, hitzestabil, nicht flüchtig und weisen ein Molekulargewicht von weniger als 3 kD auf.

3.2 Einleitung

Die Larven vieler phyllophager Blattkäfer (Chrysomelidae) verbringen ihre gesamte Entwicklung auf der Oberfläche ihrer Futterpflanzen und sind daher Angriffen von Prädatoren in besonderer Weise ausgesetzt. Den fehlenden mechanischen Schutz ergänzen diese weichhäutigen Juvenilstadien durch eine Vielzahl von Verteidigungsmechanismen. Das sind zum einen die tarnende Färbung, die Strukturauflösung durch flache Körperform oder bizarre Körperanhänge (Cassidinae), das Einhüllen in Kot (Criocerinae) oder feste Köcher aus verschiedenen Materialien (Clytrinae, Cryptocephalinae) oder das blitzschnelle Fallenlassen (Galerucinae). Zum anderen werden Vorderdarminhalt (Criocerinae), Hämolymphe oder exokrine flüchtige Drüsensekrete zur Verteidigung eingesetzt (Blum 1994, Pasteels et al. 1988). Das Abwehrpotential kann durch die Aggregation und zusätzlich durch koordinierte Bewegungen der Larven, die z. B. von Larven der Galerucine *Coelomera* sp. bekannt sind (*Cycloalex*), eine Steigerung erfahren (Jolivet et al. 1990, Morris et al. 1996, Phillips 1977).

Die Abgabe von Hämolymphe an verschiedenen Körperstellen (Reflexbluten oder Autohämorrhagie) ist besonders für Blattkäfer aus der Unterfamilie Galerucinae typisch und wurde auch für einige Larven beschrieben (Wallace & Blum 1971). Auch Larven des Erlenblattkäfers *Agelastica alni* (L.) geben aus paarig am Abdomen angeordneten Tuberkeln Hämolymphe ab, die als effektive physikalische Barriere zur Verteidigung gegen kleine Prädatoren wirkt. Abgesehen von den klebrigen Eigenschaften enthält die Hämolymphe der Larven von *A. alni* chemische Verbindungen, die noch in starker Verdünnung auf Modellprädatoren wie Ameisen fraßhemmend wirken (Bünnige & Hilker 1999). Die segmentalen Strukturen, über

die Erlenblattkäferlarven ihre Hämolymphe bei Reizung abgeben, waren lange Zeit unsicher eingeordnet. Sie wurden von einigen Autoren auch für exokrine Wehrdrüsen gehalten (Böving 1929, Takizawa 1972). Diese sind jedoch nur bei Larven der Unterfamilie Chrysomelinae eindeutig identifiziert, und sowohl deren Morphologie als auch die Wehrsekrete sind unter biogenetischen, funktionalen und phylogenetischen Aspekten intensiv untersucht worden (Feld et al. 2001, Gross et al. 1999, Köpf et al. 1998, Pasteels et al. 1988, Pasteels et al. 1989, Termonia & Pasteels 1999).

Arten der Galerucinae, die Larven mit äußerlich ähnlichen, segmentalen „Wehr“-Strukturen wie *A. alni* haben und wie diese Art zur Tribus Sermlyni zählen, hat Takizawa (1972) als ‚drüsentragende Gruppe‘ der Galerucinae beschrieben. Weil aber der Nachweis der Abgabe von exokrinem Drüsensekret bisher fehlte, wird die abgegebene Flüssigkeit nicht als Drüsensekret, sondern als Wehrflüssigkeit bezeichnet. Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen hatten zum einen das Ziel, die bisher unbekannte Effektivität der abgegebenen Wehrflüssigkeit gegenüber Prädatoren bei folgenden Sermlyni-Arten zu prüfen: *Agelasa nigriceps*, *Agelastica coerulea*, *Gallerucida bifasciata* und *Sermlyssa halensis*. Zum anderen sollten Extraktionen und Fraktionierungen der larvalen Wehrflüssigkeiten dieser Arten sowie der Wehrflüssigkeit von *A. alni* Larven mit ihrer bereits bekannten fraß-hemmenden Wirkung dazu dienen, erste Anhaltspunkte für eine chemische Charakterisierung der larvalen Wehrsubstanzen von Sermlyni-Arten zu gewinnen.

3.3 Material und Methoden

Blattkäferlarven

Die untersuchten Blattkäferlarven stammen aus Deutschland und Japan (Tab. 3.1) und werden der ‚drüsentragenden Gruppe‘ nach Takizawa (1972) bzw. zur Tribus Sermlyni nach Seeno & Wilcox (1982) zugeordnet. Bis auf *Sermlyssa halensis* wurden alle Arten im Imaginalstadium gesammelt, im Labor auf ihren jeweiligen Futterpflanzen gehalten und vermehrt.

SDS-PAGE

Die Freisetzung von larvaler Wehrflüssigkeit wurde durch dorsale Reizung der Tiere mit einer Pinzette hervorgerufen. Die aus den Wehröffnungen austretende Flüssigkeit der Larvalstadien L1 bis L3 (?) wurde mit kleinen Filterpapierstückchen (Schleicher & Schuell, Dassel, D; zugeschnitten auf ca. 2x2 mm) aufgesaugt. Proben der Hämolymphe wurden durch Abschnei-

Tab. 3.1: Sammeldaten und Futterpflanzen der untersuchten Arten.. D: Deutschland; J: Japan. *: Art im Larvalstadium gesammelt.

Art	Datum	Fundort	Futterpflanze im Labor
<i>Agelasa nigriceps</i> Mots.	5/99	Tomioka, Fukushima Pref., Honshu, J	<i>Actinidia arguta</i> (Sieb. et Zucc.)
<i>Agelastica alni</i> (L.)	5/99	Krumme Lanke, Berlin, D	<i>Alnus glutinosa</i> (L.)
<i>Agelastica coerulea</i> Baly	5/99	Fujiwara, Tochigi Pref., Honshu, J	<i>Alnus glutinosa</i> (L.)
<i>Gallerucida bifasciata</i> Mots.	5/99	Tomioka, Fukushima Pref., Honshu, J	<i>Reynoutria</i> sp.
<i>Sermylassa halensis</i> (L.)	5/99*	Köppchensee, Berlin, D	<i>Galium mollugo</i> L.

den eines Teils des Tibiotarsus entnommen und ebenfalls auf Filterpapierstücken aufgenommen. Die vor Probenentnahme gewogenen Filterpapierstückchen wurden sofort danach in SDS-Probenpuffer in ein ebenfalls gewogenes Eppendorfgefäß überführt (0,15 M TrisHCl, 1% SDS; 1% Glycerin, Spuren von Bromphenolblau; pH 6,8). Aus der Differenz der Wägungen konnte auf die Masse der Proben geschlossen werden. Ein direktes volumetrisches Abmessen war wegen der starken Klebrigkeit der larvalen Flüssigkeiten nicht möglich. Vor dem Laden auf das Gel wurden die Proben zentrifugiert, 25 µl des Überstands, der 0,1-0,5 mg larvaler Flüssigkeit enthielt, wurde in einem Gradientengel (5-17,5 % Polyacrylamidgehalt; Rotiphorese 30, Fa. Roth, Karlsruhe, D) bei 200 mV und 10 °C während 2 h getrennt (Hofer™ mighty small, Amersham). Als Marker dienten 20 µl einer Proteinmischung (LMW 17-0446-01, Amersham). Die aufgetrennten Proteine wurden in einer Lösung von 0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R 250 in 10 % Essigsäure und 50 % Methanol sichtbar gemacht. Da Proben von *A. alni* bereits zuvor untersucht worden waren (vgl. Bünnige & Hilker 1999), wurden hier Proben von *Agelasa nigriceps*, *Agelastica coerulea*, *Gallerucida bifasciata* und *Sermylassa halensis* elektrophoretisch aufgetrennt.

Lichtmikroskopie

Die Wehrflüssigkeit einer Larve wurde nach Reizung und Austritt aus der Wehröffnung direkt in einen Tropfen Citrat-EDTA-Puffer (CEP) auf einem Glasobjektträger gebracht (Zusammensetzung des CEP [pH 4,6], KCl 69 mM, NaCl 27 mM, NaHCO₃ 2 mM, D(+)-Glucose 100 mM, Trikaliumcitrat 30 mM, Zitronensäure 26 mM, Na₂-EDTA 10 mM). Dazu wurden einzelne Larven aller lebend zur Verfügung stehenden Arten (Tab. 3.2) neben einen Puffertropfen gesetzt, so daß nach Reizung der Larve mit einer Pinzette die abgegebene Flüssigkeit sofort vom Puffer benetzt wurde. Zum Vergleich wurden Proben der Hämolymphe aus einem abgeschnittenen Vorderbein in gleicher Weise entnommen und im Lichtmikroskop (Dialux 22, Fa. Leitz, D) bei einer 100-400fachen Vergrößerung betrachtet.

Probenaufbereitung: Biotest und chemische Analysen

Wehrflüssigkeit der Larvalstadien L3 wurde auf gewogene Filterpapierstücke (s.o.) aufgesaugt und in einem mit Trockeneis gekühlten Probenglas (4,5 ul) gesammelt. Nach abschließender Wägung konnte aus der Differenz des zuvor bestimmten Leergewichts die Masse der Wehrflüssigkeit gemessen werden. Nachfolgend ist die weitere Behandlung der Proben für die chemische Aufreinigung dargestellt.

1. Extraktion der Filterpapiere mit Wasser

Die Filterpapiere wurden mit einem Überschuß *Aqua bidest* zweimal extrahiert (= wässriger Rohextrakt). Das Extrakt wurde mittels Unterdruck (Porzellannutsche mit Wasserstahlpumpe) von den Filterpapieren getrennt. Danach wurde die Lösung durch Einengen (Rotavapor R114, Fa. Büchi, Flawil, CH) auf eine Konzentration von 10 mg/100 µl gebracht und im Biotest (s. u.) eingesetzt.

2. Erhitzung der wässrigen Extrakte

Der Extrakt wurde für 10 min auf 90 °C erhitzt, danach zentrifugiert (8800g; BiofugeA, Fa. Heraeus, Osterode, D) und der Überstand wieder im Biotest eingesetzt.

3. Trennung des wässrigen Extraktes nach Molekülgröße

Die Lösung wurde in einem Zentrifugationsröhrchen (Centricon[®] 3000, Fa. Millipore, Eschborn, D) mit einer Ausschlußgrenze von 3 kD bei 6500g zentrifugiert, Filtrat und Retentat wurden nach Ergänzung auf das Ausgangsvolumen (2 ml) mit *Aqua bidest* im Biotest eingesetzt. Die aktive Fraktion wurde weiter aufgearbeitet.

4. Fraktionierung des wässrigen Extraktes nach Polarität

Die Lösung wurde an einer Festphase (C18: 3 mg Sorbens/1 ml; Fa. Separtis, Grenzach-Wyhlen, D) in einem Wasser-Methanol-Gradienten (0, 10 %, 50 %, 100 % Methanol) getrennt und die vier Fraktionen im Biotest eingesetzt. Aktive Fraktion/en wurden weiter aufgearbeitet wie unter Punkt 5 und 6 beschrieben.

5. Ionenaustauschchromatographische Auftrennung der wässrigen Extrakte

Die Probe (1 ml von einer 10 mg/100 µl konzentrierten Lösung) wurde an einem Anionenaustauscher mit einer Phase aus quartären Aminen (Isolute[®] SAX, Fa. Separtis, Grenzach-Wyhlen, D; 100 mg Sorbens/1 ml) aufgetrennt. Zunächst wurde das werkseitig eingebaute

Gegenion Cl^- gegen OH^- ausgetauscht, damit auch eine Wechselwirkung der Matrix mit einem schwachen Analyten möglich sein konnte. Dazu wurde die Matrix mit einer 0,1 M NaOH Lösung nach Herstellerangaben behandelt. Auf die so präparierte Säule wurde die Probenlösung gegeben, der Durchfluß aufgefangen und im Biotest eingesetzt. Daraufhin erfolgte die Desorption der Matrix mit essigsäurem Methanol (5 %; 1 ml). Nach Trocknen des Extraktes und Wiederverdünnung mit Wasser auf die Ausgangskonzentration (10 mg/100 μl) wurde das Eluat im Biotest eingesetzt. Aktive Fraktionen wurden weiter aufgearbeitet. Außerdem wurde ein Kationenaustauscher verwendet (Isolute[®] PRS mit einer Phase aus Propylsulphonsäure und K^+ als Gegenion, 100 mg Sorbens/1 ml). Dieser wurde parallel mit einer Probe der Wehrflüssigkeit (10 mg/100 μl) beladen und nach Auffangen des Durchflusses die Säule mit ammoniakalischem Methanol (5 %; 1 ml) desorbiert.

6. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die vom Anionenaustauscher SAX desorbierte Lösung wurde unter Stickstoff auf eine Konzentration von 100 mg/100 μl eingeeengt. Ein Volumen von 20 μl dieser eingeeengten Lösung wurde in einem kontinuierlichen Gradienten (0-40 % Acetonitril in Wasser; 2,7 % pro Minute) in einer C18-Säule bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min getrennt (Spherisorb ODS-2, 3 μm Partikelgröße, YMC Europe, Schermbeck, D; HPLC-DAD 440, Kontron Instruments). Die Detektion erfolgte mit einem DAD Detektor (190-400 nm). Es wurden acht Fraktionen im 2-Minutenabstand geschnitten und einzeln im Biotest eingesetzt.

Biotest

Zur Überprüfung der biologischen Wirkung der Wehrflüssigkeiten und ihrer unter Punkt 1-6 im Abschnitt ‚Probenaufbereitung‘ beschriebenen Aufarbeitungsstufen wurden Ameisen einer Laborkolonie von *Myrmica rubra* L. eingesetzt. 15 Arbeiterinnen wurden in einer Petrischale (\varnothing 9 cm) 3 Tage nur mit Wasser versorgt. Nach dieser Hungerphase wurde ein Glasobjektträger in die Petrischale gelegt, auf dem zwei Tropfen Zuckerlösung waren: Als Test-Lösung (10 μl) diente eine Lösung der jeweiligen Aufarbeitungsstufe aus larvaler Wehrflüssigkeit und als Kontrolle (10 μl) die entsprechende Aufarbeitungsstufe aus Wasser. Beide, sowohl Test- als auch Kontroll-Lösung, waren mit Saccharose in einer Endkonzentration von 0,1 M versetzt. Nach 5 min wurde protokolliert, wieviele Ameisen an welchem Tropfen tranken. Der Test wurde mit jeweils neu aus dem Nest entnommenen Ameisen mindestens 8mal durchgeführt und mit dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen ausgewertet.

3.4 Ergebnisse

Vergleich der Wehrflüssigkeit mit Hämolymphe

Allgemeines. Die Wehrflüssigkeit von Larven allen untersuchten Galerucinae-Arten erwies sich als sehr klebrig, d. h. sie koaguliert sehr schnell. Die abgegebenen Tropfen von verschiedenen Arten unterscheiden sich in der Färbung: Larvale Labkraut-Blattkäfer, *Sermylassa halensis*, und Kiwi-Blattkäfer, *Agelasa nigriceps*, haben blaßgelbe Wehrflüssigkeit, die von *Gallerucida bifasciata* ist gelb, und die beiden Erlenblattkäfer-Arten *Agelastica alni* und *A. coerulea* geben gelb-orange Wehrflüssigkeit ab. Zwischen der Wehrflüssigkeit und der Hämolymphe, die aus einem Bein abgenommen worden war, konnte kein Farbunterschied festgestellt werden.

Lichtmikroskopie. Die lichtmikroskopische Betrachtung der Proben von Hämolymphe und der über die Wehröffnungen abgesonderten Flüssigkeit zeigte für alle in Tab. 3.1 aufgeführten Arten, daß in der Wehrflüssigkeit ebenso Hämocyten zu finden sind wie in der Hämolymphe.

SDS-PAGE. Die gelelektrophoretische Auftrennung der larvalen Hämolymphe- und Wehrflüssigkeitsproben zeigte, daß die Proben der Wehrflüssigkeit ein mit der arteigenen Hämolymphe identisches Proteinmuster haben. Zwischen den Arten konnten aber Unterschiede festgestellt werden (Tab. 3.2).

HPLC. Die Proben von *A. alni* und *S. halensis* zeigten die höchsten Signale bei sehr niedrigen Wellenlängen. Die Chromatogramme sind in Abb. 1 und 2 dargestellt. Die für den Biotest geschnittenen Fraktionen sind Tab. 3.5 zu entnehmen.

Tab. 3.2: Vergleichende Analyse des Proteinmusters von larvaler Wehrflüssigkeit (WF) und larvaler Hämolymphe (H) mit SDS-PAGE. Angegeben ist die Anzahl von Banden in den durch den verwendeten Marker definierten Größenklassen. (-): keine Bande detektiert.

Größenklasse	14,4-20,1		20,1-30		30-43		43-67		67-94		>94 kD	
	WF	H	WF	H	WF	H	WF	H	WF	H	WF	H
<i>Agelasa nigriceps</i>	2	2	-	-	-	-	2	2	1	1	3	3
<i>Agelastica coerulea</i>	3	3	-	-	-	-	3	3	2	2	3	3
<i>Gallerucida bifasciata</i>	2	2	-	-	-	-	2	2	1	1	3	3
<i>Sermylassa halensis</i>	2	2	-	-	2	2	3	3	1	1	3	3

Biologische Aktivität von Wehrflüssigkeiten (nach verschiedenen Behandlungen und Fraktionierungen). Ebenso wie für Larven von *A. alni* (vgl. Bünnige & Hilker 1999) konnte auch für die weiteren in Tab. 3.1 genannten Galerucinae-Arten der Tribus Sermlyni gezeigt werden, daß ihre Wehrflüssigkeiten einen fraßhemmenden Effekt auf Ameisen ausüben.

Die Wehrflüssigkeit von Larven der Art *Gallerucida bifasciata* wurde nicht aufgearbeitet, wie für die Arten in Tab. 3.4 beschrieben, da nicht ausreichend Material zur Verfügung stand (Tab. 3.3). Hier wurde nur der wässrige Rohextrakt getestet (N=24). Die Wehrflüssigkeit von *G. bifasciata* wirkte signifikant fraßhemmend auf Arbeiterinnen der Ameise *M. rubra*.

Tab. 3.3: Ergebnisse der Biotests der Aktivität von Wehrflüssigkeit der Larven der Art *Gallerucida bifasciata* auf Ameisenarbeiterinnen *Myrmica rubra* (Zweifachwahlversuch). Kontrolle: 0,1 M Saccharose-Lösung; Test: mit 0,1 M Saccharose-Lösung vermischte Wehrflüssigkeit von Larven der Art *Gallerucida bifasciata*. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung der trinkenden Ameisen nach 5 min Versuchsdauer. N: Anzahl der Versuchswiederholungen; p: Irrtumswahrscheinlichkeit nach Wilcoxon-Test für Paardifferenzen.

Kontr.	Test	N	p
4,4±1,9	0,8±1,1	24	<0,001

Nach einer Aufarbeitung der fraßhemmend aktiven, wässrigen Rohextrakte konnte eine weitere Charakterisierung der Deterrentien erfolgen (Tab. 3.4). Die deterrenten Verbindungen sind hitzestabil, nicht flüchtig und weisen ein Molekulargewicht von weniger als 3 kD auf. Die Fraßhemmstoffe der Wehrflüssigkeit von *Agelastica alni*, *Agelastica coerulea* und *Sermylissa halensis* werden als hochpolar eingestuft, weil das fraßhemmende Agens wenig bis gar nicht mit einer apolaren C18-Matrix interagiert. Für *A. alni* und *A. coerulea* konnte eine Wechselwirkung mit dem Kationenaustauscher PRS und mit dem Anionenaustauscher SAX nachgewiesen werden, da nach Passage der Säule keine Fraßhemmung der Ameisen mehr auftrat. Nach Elution des Analyten mit angesäuertem (SAX) bzw. basischem (PRS) Methanol konnte wieder eine deterrente Wirkung auf die Ameisen festgestellt werden. Die Befunde lassen auf eine amphotere Verbindungen schließen.

Nach der Fraktionierung in der HPLC wurde eine aktive Fraktion der Wehrflüssigkeit von *A. alni* im Ameisentest festgestellt (Tab. 3.5). Alle anderen HPLC-Fractionen waren nicht signifikant fraßhemmend. Die einzelnen Fraktionen der Wehrflüssigkeit von *S. halensis* zeigten keine fraßhemmde Wirkung mehr auf *M. rubra* (Tab. 3.5).

Tab. 3.4: Ergebnisse der Biotests (Zweifachwahlversuch mit Arbeiterinnen von *M. rubra*). Kontrolle: 0,1 M Saccharose-Lösung; Test: mit 0,1 M Saccharose-Lösung vermischte Wehrflüssigkeit in verschiedenen Reinigungsstufen. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung der trinkenden Ameisen nach 5 min Versuchsdauer. N: Anzahl der Versuchswiederholungen; p: Irrtumswahrscheinlichkeit nach Wilcoxon-Test für Paardifferenzen.

	<i>Agelastica alni</i>				<i>Agelastica coerulea</i>				<i>Sermylassa halensis</i>				<i>Agelasa nigriceps</i>			
	Kontr.	Test	N	p	Kontr.	Test	N	p	Kontr.	Test	N	p	Kontr.	Test	N	p
Behandlung																
H₂O	6,0±2,2	0,3±0,6	20	≤0,001	4,8±1,9	0,3±0,9	12	≤0,001	5,3±2,3	0,2±0,4	20	≤0,001	2,4±1,8	0,9±0,9	20	≤0,001
nach Erhitzen	4,3±2,3	0,7±0,9	20	≤0,001	3,9±2,0	0,3±0,5	12	≤0,01	6,1±2,1	0,8±0,8	16	≤0,001	2,4±1,7	1,2±1,1	12	≤0,05
Fraktion <3 kD	4,7±1,6	0,2±0,4	16	≤0,001	2,8±1,4	0,4±1,3	9	≤0,05	3,6±1,9	0,1±0,4	8	≤0,05	2,1±1,6	0,8±1,1	12	≤0,05
Fraktion >3 kD	2,9±1,2	4,0±1,7	16	n.s.	0±0	2,8±1,8	12	≤0,001	2,9±1,2	3,8±1,6	8	n.s.	5,2±2,0	4,3±1,1	12	n.s.
Fraktionen C18																
H ₂ O	3,9±1,4	1,6±0,8	15	≤0,01	2,0±1,3	0,3±0,5	12	≤0,05	3,1±2,1	0,8±1,1	16	≤0,001	nicht getestet			
MeOH 10 %	1,8±1,2	2,5±1,8	12	n.s.	0,8±0,9	0,5±0,5	12	n.s.	2,2±1,4	2,3±1,2	16	n.s.				
MeOH 50 %	2,2±1,1	1,9±1,9	13	n.s.	1,0±0,9	0,8±1,0	12	n.s.	2,5±1,5	2,1±1,5	16	n.s.				
MeOH 100 %	1,6±0,9	3,8±1,5	12	n.s.	1,9±1,1	1,0±1,0	12	n.s.	3,9±2,4	2,2±2,1	16	n.s.	nicht getestet			
Ionenaustausch																
Anionen																
H ₂ O	2,5±1,7	4,7±2,8	12	n.s.	1,6±1,2	1,5±1,8	12	n.s.	3,4±0,8	0±0	11	≤0,01	nicht getestet			
MeOH/AcCOOH	4,7±2,9	1,1±1,8	12	≤0,05	2,0±1,8	1,0±1,2	12	n.s.	nicht getestet							
Kationen																
H ₂ O	2,1±1,8	2,9±1,4	12	n.s.	0,4±0,7	0±0	12	n.s.	nicht getestet							
MeOH/NH ₃	2,1±1,4	0,4±0,6	12	≤0,05	2,8±1,3	0,6±0,5	12	≤0,05								

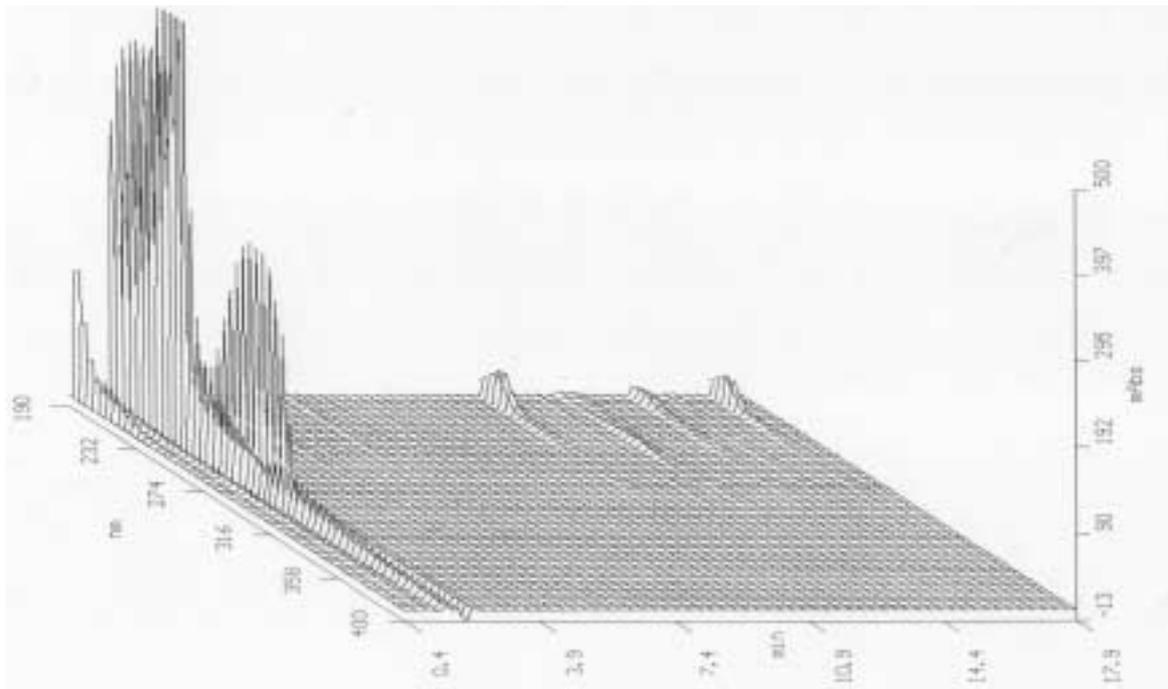


Abb. 3.1: In der HPLC mit einem kontinuierlichen Gradienten (0-40 % Acetonitril in Wasser) getrennte Bestandteile der Probe von Tuberkelflüssigkeit von *A. alni*.

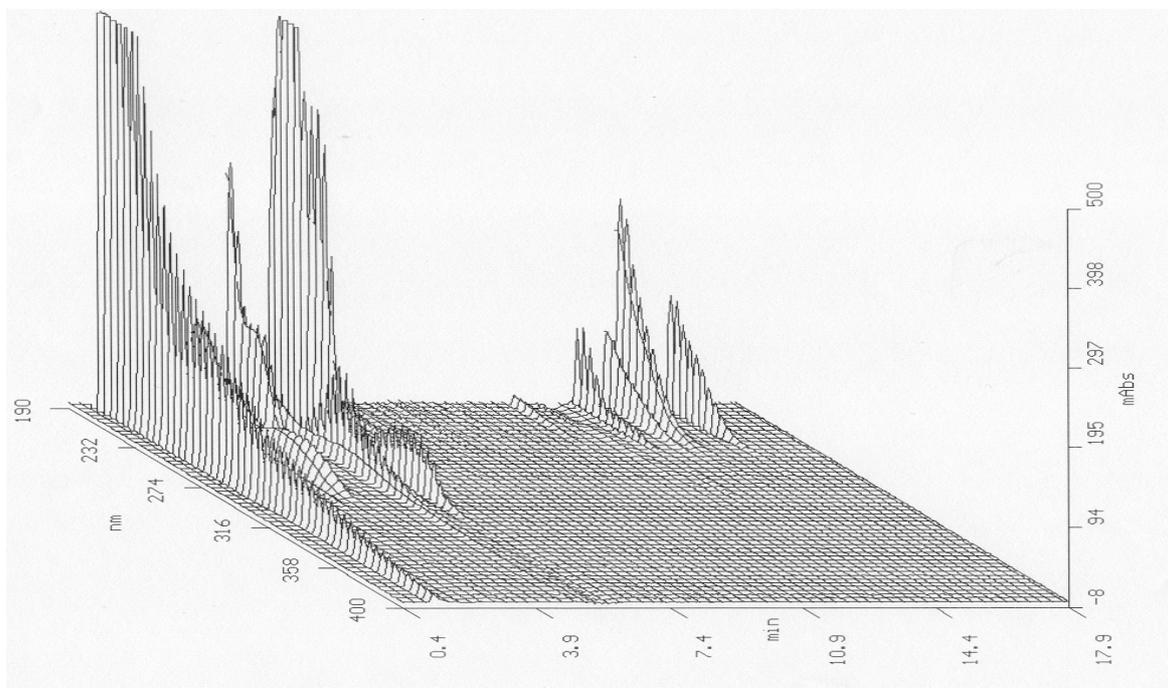


Abb. 3.2: In der HPLC mit einem kontinuierlichen Gradienten (0-40 % Acetonitril in Wasser) getrennte Bestandteile der Probe der Wehrflüssigkeit von *S. halensis*.

Tab. 3.5: Ergebnisse der Biotests der deterrenten Aktivität von HPLC-Fractionen der Wehrflüssigkeiten (Zweifachwahlversuch mit Arbeiterinnen von *M. rubra*). Kontrolle: 0,1 M Saccharose-Lösung, Test: mit Saccharose-Lösung vermischte HPLC-Fraktion. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung der trinkenden Ameisen nach 5 min Versuchsdauer. N: Anzahl der Versuchswiederholungen; p: Irrtumswahrscheinlichkeit nach Wilcoxon-Test für Paardifferenzen.

Fraktionen	<i>Agelastica alni</i>				<i>Sermylassa halensis</i>			
	Kontr.	Test	N	p	Kontr.	Test	N	p
F1 (0-2 min)	1,4±1,5	1,9±2,0	14	n.s.	2,1±1,6	2,2±2,1	12	n.s.
F2 (2,1-4 min)	2,4±2,2	0,5±0,7	12	≤0,01	2,8±2,4	1,4±1,4	12	n.s.
F3 (4,1-6 min)	2,4±1,7	2,6±1,3	12	n.s.	2,5±2,1	1,9±1,3	12	n.s.
F4 (6,1-8 min)	1,9±1,3	1,6±1,5	12	n.s.	3,1±2,8	3,5±2,9	12	n.s.
F5 (8,1-10 min)	1,0±1,4	1,8±1,3	12	n.s.	1,8±1,7	2,0±1,8	12	n.s.
F6 (10,1-12 min)	1,5±1,3	2,7±1,6	12	n.s.	2,5±2,0	2,3±1,3	10	n.s.
F7 (12,1-15 min)	2,4±1,9	1,7±1,2	12	n.s.	2,6±1,4	2,9±1,2	10	n.s.
F8 (15,1-18 min)	0,9±1,0	1,3±1,5	8	n.s.	2,8±2,0	1,7±1,2	10	n.s.

3.5 Diskussion

Die Larven aller hier untersuchten Arten enthalten sehr hitzestabile Wehrstoffe mit einer Molekülgröße kleiner als 3 kD, die eine stark fraßhemmende Wirkung auf Ameisen haben. Die Deterrentien von *A. alni* und *S. halensis* unterscheiden sich im Grad der Polarität. Dies allein ist jedoch noch kein Hinweis auf unterschiedliche Stoffgruppen, da eine mögliche Derivatisierung an demselben Grundgerüst diesen Effekt zur Folge haben kann. Es können daher keine Aussagen zur chemischen Ähnlichkeit der Fraßhemmstoffe der untersuchten Arten gemacht werden.

Chemischer Schutz durch toxische Verbindungen, die in der Hämolymphe, im Integument oder in exokrinen Drüsenorganen gespeichert werden, kann einerseits autogen generiert werden (*de novo* Synthese). Dazu werden die Wehrstoffe aus einfachen Vorstufen aus der Nahrung wie z. B. Amino- oder Fettsäuren aufgebaut. Innerhalb der Galerucinae sind bisher nur einige Gattungen aus der Tribus Galerucini bekannt, die verschiedene Anthrachinonderivate in ihrer Hämolymphe und in Eiern enthalten (*Galerucella*, *Galeruca*, *Pyrrhalta*, *Lochmaea*, *Xanthogaleruca*, *Trirhabda*) (Hilker & Schulz 1991, Hilker 1992, Hilker et al. 1992, Howard et al. 1982, Kunze 1996). Sie werden höchstwahrscheinlich *de novo* synthetisiert, da die Futterpflanzen dieser Arten keine Anthrachinone enthalten. Die Synthesorte sind unbekannt (Hilker et al. 1992). Eine Synthese durch die Insekten selbst, aber auch durch mikrobielle Symbionten wird diskutiert (Howard et al. 1982, Kunze et al. 1996). In Pflanzen und Pilzen kommen diese Anthrachinone sehr häufig vor und werden hier entweder auf dem Polyketidweg (1,8-dihydroxylierte Anthrachinone wie z. B. Chrysophanol) oder auf dem

Shikimisäureweg (1,2-dihydroxylierte Anthrachinone wie z. B. Alizarin, das in Labkrautgewächsen vorkommt) synthetisiert. Für die Synthese der bei den untersuchten Galerucinae gefundenen 1,8-dihydroxylierten Anthrachinonderivate diskutiert Hilker (1993) den Polyketidweg. Die in den untersuchten Galerucinen nachgewiesenen Anthrachinone erwiesen sich im Biotest nicht nur als hochwirksam gegen Ameisen, sondern bieten auch einen Fraßschutz vor Meisen (*Parus* spp.) (Hilker & Köpf 1994).

Andererseits ist vielfach für die chemische Abwehr von Galerucinen bekannt, daß komplexe Verbindungen aus den Wirtspflanzen aufgenommen und nach enzymatischer Entgiftung gespeichert werden können. Die Aufnahme von pflanzenbürtigen Verbindungen wird als Sequestration bezeichnet und ist für Insekten aus verschiedenen Ordnungen nachgewiesen (Dobler et al. 1998, Duffey 1980, Müller et al. 2001). Galerucinae der Tribus Luperini, *Diabrotica balteata*, *D. virgifera virgifera* und *D. undecimpunctata howardii* sowie *Acalymma vittatum* nehmen Cucurbitacine (tetracyclische Triterpene) aus ihren Futterpflanzen (Cucurbitaceae) auf (Ferguson & Metcalf 1985). Dabei konnte im Falle von *A. vittatum* auch nachgewiesen werden, daß die Larven zur Sequestration fähig sind. Die Cucurbitacine werden im Fall der *Diabrotica*-Arten von den Imagines aufgenommen und z. B. in die Eier transferiert. Sie bieten effektiven Fraßschutz vor unspezialisierten Prädatoren (Ferguson et al. 1985). Die verschiedenen Studien zum Nachweis der Abwehrwirkung von Cucurbitacinen gegenüber Fraßfeinden und Pathogenen der Luperini zeigen sehr widersprüchliche Befunde (Barbercheck et al. 1997, Eben & Barbercheck 1997, Gould & Massey 1984, Nishida & Fukami 1990, Tallamy et al. 1998).

Von der Gattung *Longitarsus* (Chrysomelidae: Alticinae) ist bekannt, daß sie aus ihren Wirtspflanzen (Asteraceae und Boraginaceae) Pyrrolizidin-Alkaloide sequestrieren können (Dobler et al. 2000). Alticinae- und Galerucinen-Arten bilden das Taxon Galerucinae *sensu lato*.

Alle bisher untersuchten Sermylini-Arten sind durch sehr effektive fraßhemmende Verbindungen geschützt. Die Larven der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Arten geben bei Berührung Hämolymphe in Form von Reflexblut ab, d. h. an präformierten Stellen des Körpers. Chemischer Schutz wird häufig mit morphologischen Spezialisierungen gekoppelt gefunden: Dies ist in vielen Fällen ein kontrastreiches Farbmuster oder metallischer Glanz, der die Tiere auf ihren Futterpflanzen sehr auffällig für visuell orientierte Räuber wie z. B. Vögel macht. In ihrer Untersuchung larvaler Blattwespen (Hymenoptera: Tenthredinidae) stellen Boevé & Schaffner (2003) z. B. eine Korrelation von effektivem chemischem Schutz

mit einer niedrigen mechanischen Resistenz des Integuments fest. Bei vielen Blattwespenlarven konnten sie Hämolympfabgabe an unterschiedlichen, nicht präformierten Körperstellen nachweisen, was sie im Unterschied zum Reflexbluten, das an bestimmten Stellen austritt, als *easy bleeding* bezeichneten (Boevé & Schaffner l.c.).

Marienkäfer – Imagines und Larven – geben an verschiedenen Stellen des Körpers *de novo* produzierte Alkaloide ab.

Ob die in den hier untersuchten Arten nachgewiesenen Fraßdeterrentien aus den Futterpflanzen bezogen werden oder ob es sich um selbst synthetisierte Verbindungen handelt, bleibt zu klären.

Während die Anthrachinon-haltigen Larven der Tribus Galerucini erst gefressen werden müssen, und daher die Vorteile eines chemischen Schutzes eher mit Verwandtenselektion zu erklären sind, kann für die Hämolympfabgabe, ob durch *easy bleeding* oder Reflexbluten, postuliert werden, daß das Individuum selbst schon Vorteil daraus zieht. Reflexbluten scheint sich als Antwort auf räuberische Ameisen entwickelt zu haben, denn es bietet eine sehr effektive Abwehr gegen diese aggressiven und häufig in Gruppen fouragierenden Prädatoren (Benfield 1974, Blum & Sanassi 1974, Wallace & Blum 1971). Die Nachteile, die aus dem Verlust der Körperflüssigkeit resultieren, müssen durch eine geringere Verletzungsgefahr ausgeglichen werden. Dies kann erzielt werden, weil das angreifende Insekt durch die rasch koagulierende Hämolymphe verklebt wird und somit von der Beute abläßt, die dann entkommen kann: Einerseits flüchten solitär lebende Larven durch Fallenlassen und Totstellen, wie auch bei *S. halensis* beobachtet wurde, andererseits durch Auflösung der Gruppen, ausgelöst durch ein gleichzeitig mit dem Reflexblut abgegebenes Alarmpheromon, wie bei den gregär lebenden Larven von *A. alni* nachgewiesen wurde (Bünnige & Hilker 1999).

3.6 Literatur

Barbercheck, M.E., Wang, J. & Hirsh, I.S. (1997): Host plants effects on entomopathogenic nematodes. *J. Invertebrate Pathology* 66: 169-177.

Blum, M.S. (1994): Antipredator devices in larvae of the Chrysomelidae: a unified synthesis for defensive eclecticism. In: *Novel aspects of the biology of Chrysomelidae*. P. Jolivet, M.L. Cox & E. Petitpierre (Hrsg.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 277-288.

Blum, M.S. & Sannasi, A. (1974): Reflexive bleeding in the lampyrid *Photinus pyralis*: Defensive function. *J. Insect Physiol.* 20: 451-460.

- Boevé, J.-L. & Schaffner, U. (2003): Why does the integument of some sawfly species disrupt so easily? The harmful hemolymph hypothesis. *Oecologia* 134: 104-111.
- Böving, A.G. (1929): Beetle larvae of the subfamily Galerucinae. *Proc. U.S. Nat. Museum* 75: 1-43.
- Benfield, E.F. (1974): Autohemorrhage in two stoneflies (Plecoptera) and its effectiveness as a defense mechanism. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 67: 739-742.
- Bünnige, M. & Hilker, M. (1999): Larval exocrine glands in the galerucine *Agelastica alni* L. (Coleoptera: Chrysomelidae): their morphology and possible functions. *Chemoecology* 9: 55-62.
- Dobler, S., Dalozé, D. & Pasteels, J.M. (1998): Sequestration of plant compounds in leaf beetles' defensive secretion: Cardenolides in *Chrysochus*. *Chemoecology* 8: 111-118.
- Dobler, S., Haberer, W., Witte, L. & Hartmann, T. (2000): Selective sequestration of pyrrolizidine alkaloids from diverse host plants by *Longitarsus* flea beetles. *J. Chem. Ecol.* 26: 1281-1298.
- Duffey, S. (1980): Sequestration of plant natural products in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 25: 447-477.
- Eben, A. & Barbercheck, M.E. (1997): Host plant and substrate effects on mortality of southern corn rootworm from entomopathogenic nematodes. *Biol. Control* 8: 89-96.
- Feld, B.K., Pasteels, J.M. & Boland, W. (2001): *Phaedon cochleariae* and *Gastrophysa viridula* (Coleoptera: Chrysomelidae) produce defensive iridoid monoterpenes *de novo* and are able to sequester glycosidically bound terpenoid precursors. *Chemoecology* 11: 191-198.
- Ferguson, J.E. & Metcalf, R.L. (1985): Cucurbitacins. Plant-derived compounds for Diabroticites (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Chem. Ecol.* 11: 311-318.
- Ferguson, J.E., Metcalf, R.L. & Fischer, D.C. (1985): Disposition and fate of cucurbitacin B in five species of Diabroticites. *J. Chem. Ecol.* 11: 1307-1321.
- Gould, F. & Massey, A. (1984): Cucurbitacins and predation of the spotted cucumber beetle, *Diabrotica undecimpunctata howardi*. *Entomol. Ex. Appl.* 36: 273-278.
- Gross, J., Müller, C., Vilcinskas, A. & Hilker, M. (1998): Antimicrobial activity of the exocrine gland secretions, hemolymph and larval regurgitat of the mustard leaf beetle *Phaedon cochleariae*. *J. Invert. Pathol.* 72: 296-303.
- Hilker, M. (1992): Protective devices of early developmental stages in *Pyrrhalta viburni* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Oecologia* 92: 71-75.

- Hilker, M. (1993): Chemische Ökologie juveniler Entwicklungsstadien der Blattkäfer (Coleoptera, Chrysomelidae). Habilitationsschrift, Universität Bayreuth, Verlag: Bayreuther Forum Ökologie.
- Hilker, M. & Schulz, S. (1991): Anthraquinones in different developmental stages of *Galeruca tanacetii* (Coleoptera, Chrysomelidae). J. Chem. Ecol. 17: 2323-2332.
- Hilker, M. & Köpf, A. (1994): Evaluation of the palatability of chrysomelid larvae containing anthraquinones to birds. Oecologia 100: 421-429.
- Hilker, M., Eschbach, U. & Dettner, K. (1992): Occurrence of anthraquinones in eggs and larvae of several Galerucinae (Coleoptera: Chrysomelidae). Naturwiss. 79: 271-274.
- Howard, D.F., Phillips, D.W., Jones, T.H. & Blum, M.S. (1982): Anthraquinones and anthrones: Occurrence and defensive function in a chrysomelid beetle. Naturwiss. 69: 91-92.
- Jolivet, P., Vasconcellos-Neto, J. & Weinstein, P. (1990): Cycloalexyn: a new concept in the larval defense of insects. Insecta Mundi 4: 133-142.
- Köpf, A., Rank, N., Roininen, H. & Tahvanainen, J. (1997): Defensive larval secretions of leaf beetles attract a specialist predator *Parasyrphus nigrirarsis*. Ecol. Entomol. 22: 176-183.
- Kunze, A., Witte, L., Aregullin, M., Rodriguez, E. und Proksch, P. (1996): Anthraquinones in the leaf beetle *Trirhabda geminata* (Chrysomelidae). Z. Naturforsch. (C) 51: 249-252.
- Morris, W., Grevstad, F. & Herzig, A. (1996): Mechanisms and ecological functions of spatial aggregation in chrysomelid beetles. In: Chrysomelidae biology, Vol. 2: Ecological studies: 303-322.
- Müller, C., Agerbirk, N., Olsen, C.E., Boevé, J.-L., Schaffner, U. & Brakefield, P. (2001): Sequestration of host plant glucosinolates in the defensive hemolymph of the sawfly *Athalia rosae*. J. Chem. Ecol. 27: 2505-2516.
- Nishida, R. & Fukami, H. (1990): Sequestration of distasteful compounds by some pharmacophagous insects. J. Chem. Ecol. 16: 151-164.
- Phillips, W.M. (1977): Observations on the biology and ecology of the chrysomelid genus *Haltica* Geoff. in Britain. Ecol. Entomol. 2: 205-216
- Pasteels, J.M., Braekman, J.C. & Daloze, D. (1988): Chemical defense in the Chrysomelidae. In: Biology of Chrysomelidae. P. Jolivet, E. Petitpierre & T.H. Hsiao (Hrsg.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 233-252.

Pasteels, J.M., Rowell-Rahier M., Braekman, J.C., Daloze, D. & Duffey, S. (1989): Evolution of exocrine chemical defense in leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Experientia* 45: 295-300.

Seeno, T.N. & Wilcox, J.A. (1982): Leaf beetle genera (Coleoptera: Chrysomelidae). *Entomography* 1: 1-221.

Takizawa, H. (1972): Descriptions of larvae of glanduliferous group of Galerucinae in Japan, with notes on subdivisions of the subfamily (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insecta Matsumurana*, Supplement 10: 1-14.

Tallamy, D.W., Whittington, D.P., Defurio, F., Fontaine, D.A., Gorski, P.M. & Gothro P.W. (1998): Sequestered cucurbitacins and pathogenicity of *Metarrhizium anisopliae* (Monaliales: Monaliaceae) on spotted cucumber beetle eggs and larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.* 27: 366-372.

Termonia, A. & Pasteels, J.M. (1999) : Larval chemical defence and evolution of host shifts in *Chrysomela* leaf beetles. *Chemoecology* 9: 13-23.

Wallace, B.S. & Blum, M.S. (1971): Reflex bleeding. A highly refined defensive mechanism in *Diabrotica* larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 64: 1021-1027.

