

4 Zum Alarmpheromon der Larven von *Agelastica alni* (L.)

4.1 Zusammenfassung

Larven der Galerucinae *Agelastica alni* (Chrysomelidae) fressen gregär auf Erlen und sondern bei taktiler Reizung aus segmental am Abdomen lokalisierten Wehröffnungen Hämolymphe als Wehrflüssigkeit ab. Diese Abwehrreaktion einzelner Larven führt zu einer Fluchtreaktion konspezifischer Larven aus derselben Gruppe. Im Zentrum der Untersuchung stand die Frage, ob das Sekret der an diesen Wehröffnungen entdeckten exokrinen Drüsen die Alarmreaktion auslöst. Dazu wurden auch Tests mit Hämolymphe durchgeführt, die aus einem Bein entnommen worden war. Weiterhin wurde geprüft, ob die Alarmstoffe bereits in den Eiern enthalten sind. Hierzu wurden mit Dichlormethan extrahierte Eigelege von *A. alni* im Biotest mit konspezifischen Larven eingesetzt. Sowohl die von den Beinen entnommenen Hämolympfproben wie auch die Eierextrakte erwiesen sich als alarmauslösend, so daß die exokrinen Drüsen als Quelle für das Alarmpheromon nicht infrage kommen. Allerdings wirkte die Wehrflüssigkeit, die potentiell ein Drüsensekret enthält, geringfügig stärker alarmauslösend als die Hämolymphe ($P < 0.05$). Die angereicherten Duftstoffe aus Wehrflüssigkeit und Hämolymphe wurden außerdem vergleichend chemisch analysiert (GC-MS). Dabei konnten 11 Verbindungen detektiert werden. Die Rolle der exokrinen Drüsen an den Wehröffnungen von *A. alni* wird diskutiert.

4.2 Einleitung

Larven des Erlenblattkäfers *Agelastica alni* (Chrysomelidae: Galerucinae) fressen gregär auf den Blättern von Schwarzerlen (*Alnus glutinosa*). Sie geben bei Angriffen nach taktiler Reizung eine gelbe Flüssigkeit ab, die aus paarig angeordneten Tuberkeln der Abdominalsklerite austritt. Flüchtige Inhaltsstoffe aus dieser Wehrflüssigkeit veranlassen konspezifische Larven derselben Gruppe, sich schnell von dieser Duftquelle fortzubewegen (Bünnige & Hilker 1999). Damit konnte erstmals für einen Blattkäfer ein Alarmpheromon nachgewiesen werden.

Chemisch basierte Alarmsysteme sind vor allem bei eusozialen Hymenopteren und Isopteren bekannt und gut untersucht (Überblick in Blum 1969, Blum 1996, Harborne 1977). Bei einer Wanze (Pyrrhocoridae) wurde erstmals auch bei nicht eusozialen, aber gregären Insekten ein Alarmpheromon nachgewiesen (Calam & Youdeowei 1968). Seitdem sind Alarmpheromone bei verschiedenen Insektenordnungen entdeckt worden, insbesondere bei Aphidae und Membracidae (Dahl 1970, Ishiwatari 1974, Kislow & Edwards 1972, Nault et al. 1974).

Eine Voraussetzung für ein chemisches Alarmsignal ist die Aggregation der interagierenden Individuen (Blum 1969, Nault & Phelan 1984). Alarmpheromone sind die am wenigsten

spezifisch wirksamen Signalstoffe im Insektenreich. So sind z. B. 41 Aphiden-Arten bekannt, die auf (*E*)- β -Farnesen, das über die Hörnchenflüssigkeit abgegeben wird, mit Alarmverhalten reagieren (Xiangyu et al. 2002). Vielfach sind aber keine spezifischen Strukturen für die Produktion oder die Sekretion bekannt, sondern der Alarmstoff wird erst bei Verletzung eines Individuums freigesetzt (Tannert & Hien 1976, Shimano et al. 2002).

Lichtmikroskopische Untersuchungen der Wehrflüssigkeit von Larven des Erlenblattkäfers *A. alni* zeigten, daß diese Hämocyten enthält. Weitere morphologische Untersuchungen ergaben, daß neben der Wehröffnung eine exokrine Drüsenzelle lokalisiert ist. Somit ist zu vermuten, daß *A. alni* Larven über die Wehröffnungen Hämolymphe zusammen mit dem Drüsensekret abgeben (Bünnige & Hilker 1999). Unklar war aber, welche Rolle das Drüsensekret für die Abgabe des Alarmpheromons spielt. Erste vergleichende Untersuchungen zur Aktivität von Wehrflüssigkeit (Hämolymphe plus Drüsensekret) und Hämolymphe (aus einem abgeschnittenen Larvalbein entnommen) hatten gezeigt, daß Wehrflüssigkeit hochsignifikant Alarmverhalten auslöst, während mit Hämolympheproben kein signifikanter Effekt zu erzielen war (Bünnige & Hilker 1999). Diese Versuche hatten die Vermutung aufgeworfen, daß an den Wehröffnungen lokalisierte Drüsenzellen möglicherweise eine Rolle bei der Produktion des Alarmpheromons spielen. Diese Hypothese wurde zunächst dadurch gestützt, daß bei Arten mit solitär lebenden Larven keine exokrinen Drüsenzellen in direkter Verbindung zu ihren Wehröffnungen gefunden wurden (Kap. 2).

Auch wenn die Hämolympheproben von *A. alni* keinen statistisch zu sichernden Alarmeffekt gezeigt hatten, gab es dennoch Larven, die auf Hämolympheproben mit Alarmverhalten reagierten (vgl. Bünnige & Hilker 1999). Daher sollte in den hier beschriebenen Untersuchungen nochmals mit einer größeren Anzahl Larvengruppen geprüft werden, ob Hämolymphe an sich auch einen Alarmeffekt auslösen kann. Die Stärke eines möglicherweise durch Hämolymphekomponenten erzielten Effekts sollte mit der Alarmeffektstärke von Proben der Wehrflüssigkeit verglichen werden. Zusätzlich zu Proben der Wehrflüssigkeit und der Hämolymphe wurden konspezifische Eigelege im Biotest eingesetzt. Weiterhin sollten flüchtige Verbindungen aus Wehrflüssigkeit und Hämolymphe der *A. alni*-Larven isoliert und mittels gekoppelter Gaschromatographie-Massenspektroskopie analysiert werden.

4.3 Material und Methoden

Larven des Erlenblattkäfers *Agelastica alni* (L.) wurden aus von den Imagines unter Laborbedingungen abgelegten Eiern aufgezogen und auf Blättern der Schwarzerle *Alnus glutinosa* (L.) in Petrischalen (Ø 9 cm) in klimatisierten Räumen bei 20 °C und einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16:8 h gehalten. Alle Versuche wurden mit L1- und mit L2-Stadien als Test-Tiere durchgeführt.

Zur Gewinnung von Wehrflüssigkeit wurden Larven (L2- und L3-Stadium) mit einer Pinzette dorsal gereizt. Die austretende Wehrflüssigkeit wurde mit kleinen Filterpapierstücken (Fa. Schleicher & Schuell, Dassel, D; Größe ca. 2x2 mm) aufgesogen. Zur Gewinnung von Hämolymphe wurde Larven (L3-Stadium) der Tibiotarsus eines Beins abgeschnitten und die austretende Hämolymphe ebenfalls mit Filterpapierstücken aufgesogen.

Alarmpheromontest

(a) mit Wehrflüssigkeit bzw. Hämolymphe

Einer Gruppe von 3-10 Larven auf einem runden Erlenblattstück (Ø 14 mm) wurden nacheinander zwei kleine Filterpapierstücke (2x2 mm) vorgelegt: 1. ein unbehandeltes Filterpapier (Kontrolle) und 2. ein Filterpapierstück, das mit der Wehrflüssigkeit von einer Larve getränkt war (Test). Die Papierstückchen wurden unmittelbar neben die Larvengruppe gelegt. Jeweils 1 min nach Vorlegen der Kontroll- bzw. Testpapiere wurden die noch auf dem Blatt befindlichen Tiere gezählt. In gleicher Weise wurde die larvale Hämolymphe getestet. Mit Wehrflüssigkeit wurden N=59 Tests durchgeführt, mit larvaler Hämolymphe N=57. Der statistische Vergleich der Reaktion auf Kontroll- und Testpapiere erfolgte mit dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen.

(b) mit Duftproben von Wehrflüssigkeit bzw. Hämolymphe

Es wurden angereicherte Düfte aus der larvalen Wehrflüssigkeit und larvalen Hämolymphe im Alarmtest eingesetzt. Dazu wurde pro Test 1 µl/100 mg Einwaage larvaler Flüssigkeit der Dichlormethan-Extrakte eingesetzt und den Larven ebenso und unter denselben Bedingungen vorgelegt wie oben beschrieben. Die Herstellung dieser Extrakte wird im Abschnitt „Dynamische Duftstoffanreicherung“ beschrieben. Um die Aktivität der aus Wehrflüssigkeit angereicherten Düfte zu testen, wurden N=40 Larvengruppen mit insgesamt 9 Duftproben der Wehrflüssigkeit konfrontiert. Die Alarmaktivität von 6 Hämolymphe-Duftproben wurde an N=30 Larvengruppen getestet. Die jeweils verwendeten Kontrollfilterpapierstücke waren demselben Duftanreicherungsverfahren ausgesetzt wie die Testpapierstücke. Bevor die mit Kontroll- oder Testextrakt getränkten Filterpapiere den Larven vorgelegt wurden, konnte das

Lösungsmittel Dichlormethan 10 s abdampfen. Der statistische Vergleich der Reaktion auf Kontroll- und Testpapiere erfolgte wiederum anhand des Wilcoxon-Tests für Paardifferenzen. Zusätzlich wurde die Reaktion der Tiere auf Wehrflüssigkeit- und Hämolympfproben mit Hilfe des U-Tests nach Mann & Whitney verglichen.

(c) mit Eiern

Weiterhin wurde geprüft, ob auch von den Eiern ausgehende flüchtige Verbindungen einen Alarmpheromoneffekt haben. Dazu wurden Dichlormethan-Extrakte aus Eigelegen von *A. alni* hergestellt. Es wurden jeweils 5 Eigelege (ca. 400 Eier, 1-3 Tage alt) mit 200 µl Dichlormethan homogenisiert und der klare, gelbe Überstand als Testlösung verwendet. Davon wurden 1 µl auf ein Filterpapierstück (2x2 mm) gebracht, das Kontrollfilterpapier wurden mit 1 µl Dichlormethan getränkt. Es wurden wie oben beschrieben N=30 Larvengruppen zunächst mit den Kontrollfilterpapierstüben und dann nach jeweils 1 min mit den Testpapierstücken konfrontiert. An 30 Larvengruppen wurden 5 Eiextrakte getestet. Die Abdampfzeit des Lösungsmittels betrug 10 s. Die statistische Auswertung erfolgte wie bei den Tests mit Hämolympf- bzw. Wehrflüssigkeitsproben.

Dynamische Duftstoffanreicherung

Von ca. 100 Larven (L2- und L3-Stadium) wurde Wehrflüssigkeit auf Filterpapierstücke gesammelt und während des Sammelns auf Trockeneis in einem Probenglas (1,5 ml, mit Teflonseptum und Schraubdeckel) aufbewahrt. Die zuvor ermittelte Masse von Probenglas und unbeladenen Filterpapierstücken wurde nach dem Sammeln und erneuter Wägung der Probe vom Gesamtgewicht abgezogen. Ein speziell für das kleinvolumige Sammelgefäß angefertigter Aufsatz aus ineinandergesteckten Teflonschläuchen verschiedener Durchmesser (Prototyp: F. Müller, FU Berlin) gewährleistete den Luftein- und -ausstrom. Vor dem Start wurden 100 µl Dichlormethan/100 mg Einwaage auf die Filterpapiere gegeben. Die daraus emittierten Düfte wurde über eine Dauer von 60 min bei Raumtemperatur auf einem Aktivkohlefilter (5 mg, Fa. Gränicher & Quartero, Daumazan, F) bei einer Fließgeschwindigkeit der gereinigten Luft von 110 ml/min angereichert. Die auf dem Aktivkohlefilter anhaftenden Substanzen wurden danach mit je 20 µl Dichlormethan desorbiert. Von den so gewonnenen Proben wurde jeweils 1 µl auf ein 4 mm² großes Filterpapier gegeben und im Alarmtest auf biologische Aktivität getestet. Als Kontrolle wurden unbeladene Filterpapierstücke in gleicher Weise behandelt. Es konnten 40 Larven-Gruppen und 9 Proben von Düften der Wehrflüssigkeit sowie 30 Larven-Gruppen und 6 Proben der Hämolymphe-Düfte getestet werden.

Online-Analyse der emittierten Duftstoffe: purge and cold trap (=PCT)

Mit diesem Verfahren (Ruther & Hilker 1998) ist es möglich, Duftstoffe ohne Lösungsmittel in ein Analysegerät zu bringen, in diesem Fall in einen Gaschromatographen, an den ein Massenspektrometer angeschlossen war (GC-MS). Flüchtige Verbindungen werden aus dem Probenglas (1,5 ml, mit Teflonseptum im Schraubdeckel) mit Teflon-Spülaufsatz (s. o.) durch einen Luftstrom (Fließgeschwindigkeit 27,5 ml/min) in eine mit flüssigem Stickstoff gekühlte Kryofalle geleitet. Die Sammelzeit betrug 5 min. Mit Hilfe eines 6-Klappen-Ventils wird die sauerstoffhaltige Luft durch Helium ausgetauscht, die desorbierten Duftstoffe im *cryofocuser* konzentriert und dann im Heliumstrom auf die Trennsäule geleitet. Die Duftstoffe von jeweils 6 Proben der Wehrflüssigkeit und 6 Proben der larvalen Hämolymphe wurden auf diese Art analysiert (pro Messung wurden von etwa 100 Tieren Proben entnommen). Die Proben mit gleichen Nummern wurden am selben Tag gemessen, z. B. 1a Wehrflüssigkeit und 1b Hämolymphe aus einem Bein. Zur Quantifizierung wurden die Filterpapiere vor und nach der Probenentnahme gewogen.

Zur Bestimmung des linearen Retentionsindex (LRI) wurden nacheinander eine Reihe von geradkettigen Alkanen (Kettenlänge C7-C15) in die Kühlfalle der PCT-Anlage gebracht. Von den einzelnen Alkanen wurde das in Tab. 4.1 angegebene Volumen des jeweiligen Alkans mit einer gasdichten Spritze aus der Gasphase entnommen und in das an die Anlage angeschlossene Sammelgefäß überführt.

Gaschromatographie-Massenspektroskopie

Die chromatographische Trennung der angereicherten Duftstoffe erfolgte in einer 30 m langen Säule (DB-1701 megabore, Fisons) mit der Schichtdicke 0,25 mm und Helium als Trägergas bei ansteigenden Temperaturen der GC-Säule. Es wurde bei 40 °C gestartet, nach 1 min wurde die Temperatur um 4 °C/min erhöht, bis die maximal für die Säule zulässige Temperatur von 260 °C erreicht war. Der Gaschromatograph (Fisons 8060 GC) war direkt an ein Massenspektrometer (Fisons MD Quadrupol MS) angeschlossen. Die im GC getrennten Verbindungen wurden mittels Elektronenstoß bei 70 eV ionisiert. Die Massenspektren der verschiedenen Verbindungen wurden mit Bibliotheksspektren (NIST, eigene Bibliothek der AG) im Programm Masslab verglichen. Zur quantitativen Auswertung wurden die Peakflächen im *valley-to-valley*-Modus integriert. Wegen der Verwendung unterschiedlicher Einwaagen der jeweiligen Proben mußten die berechneten Flächen von jedem Lauf auf 100 mg Einwaage normiert werden, um die Signalstärken vergleichen zu können.

Tab. 4.1: Sammelbedingungen von geradkettigen Alkanen (C7-C15) in der PCT-Anlage zur Bestimmung des linearen Retentionsindex der Analyten.

	C7/C8	C9/C10	C11/C12	C13-C15
	0,005	0,013	0,017	0,030
Einwaage Alkan (g)	0,010	0,021	0,022	0,033
				0,037
Vorratsgefäß mit Aufsatz (ml)	340	340	80	4
Gasphase Alkan (µl)	500	500	2000	5000
Sammelgefäß mit Anschluß (ml)	340	340	80	4
Sammelzeit (min)	1	3	20	30

4.4 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungen zeigen, daß sowohl in der Wehrflüssigkeit als auch in der Hämolymphe von *A. alni*-Larven solche Verbindungen enthalten sind, die in konspezifischen Larvengruppen Alarmverhalten auslösen. Bei Wahrnehmung von Düften aus Wehrflüssigkeit bzw. Hämolymphe laufen die Larven einer Gruppe auseinander (Tab. 4.2). Sowohl aus der Wehrflüssigkeit als auch aus der Hämolymphe können die alarmauslösenden Substanzen in einem Verfahren zur dynamischen Duftanreicherung auf Aktivkohle gesammelt werden und mittels Dichlormethan von dort desorbiert werden (Tab. 4.3).

Ein statistischer Vergleich der beiden Versuchsreihen mit angereicherten Duftstoffen aus der Hämolymphe einerseits und der Wehrflüssigkeit andererseits mit dem Mann-Whitney-U-Test zeigt jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Testsubstanzen an. Von Wehrflüssigkeit gesammelte Düfte haben einen signifikant stärker alarmauslösenden Effekt als von Hämolympfproben abgesammelte Duftstoffe (Tab. 4.3).

Die zusätzlich durchgeführten Versuche mit dichlormethanhaltigen Eiextrakten zeigen, daß auch von den Eiern alarmauslösende Komponenten isoliert werden können (Tab. 4.4).

Tab. 4.2: Reaktion von *A. alni* L1 auf Düfte aus arteigener Wehrflüssigkeit und Hämolymphe. Registriert wurde die Anzahl Larven, die nach Vorlage eines Kontroll- bzw. Testfilterpapiers die Larvalgruppe verläßt. Angegeben sind flüchtende Larven (Mittelwerte mit Standardabweichung). N: Anzahl der getesteten Larvalgruppen. p: Irrtumswahrscheinlichkeit nach Wilcoxon-Test für Paardifferenzen.

	Kontrolle	Test	N	p
Wehrflüssigkeit	2,8±7,5	95,9±14,4	59	≤0,001
Hämolymphe	8,8±17,7	39,7±44,0	57	≤0,001

Tab. 4.3: Reaktion von *A. alni* L1 auf im CLS-Verfahren angereicherte Düfte aus Wehrflüssigkeit und Hämolymphe. Registriert wurde die Anzahl Larven, die nach Vorlage eines Kontroll- bzw. Testfilterpapierstücks die Larvalgruppe verläßt. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung. N: Anzahl der getesteten Larvalgruppen. p: Irrtumswahrscheinlichkeit nach Wilcoxon-Test für Paardifferenzen. U-Test: Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde geprüft, ob sich die Reaktion der Larven auf Wehrflüssigkeitsproben von der Reaktion der Larven auf Hämolympfproben unterscheidet. Unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den Testreihen an ($p \leq 0,05$).

	Kontrolle	Test	N	p	U-Test
Wehrflüssigkeit	2,0±7,6	85,3±28,4	40	≤0,001	a
Hämolymphe	6,6±11,8	53,2±8,4	30	≤0,001	b

Tab. 4.4: Reaktion von *A. alni* L1 auf Dichlormethan-Extrakte aus Eigelegen von *A. alni*. Registriert wurde die Anzahl Larven, die nach Vorlage eines Kontroll- bzw. Testfilterpapierstücks die Larvalgruppe verlassen. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung. N: Anzahl der Larvalgruppen p: Irrtumswahrscheinlichkeit nach Wilcoxon-Test für Paardifferenzen.

	Kontrolle	Test	N	p
Eiextrakt	1,9±7,8	81,7±36,5	30	≤0,001

GC-MS nach purge and cold trap

Es konnten 11 Verbindungen aus der Gasphase über der Wehrflüssigkeit (N=6) oder der Hämolymphe (N=6) nachgewiesen werden. Die Verbindungen, ihre Retentionszeiten, der lineare Retentionsindex sowie die Peakflächen sind Tab. 4.5 zu entnehmen. Die ermittelten Peakflächen wurden auf 100 mg Einwaage bezogen, weil die Nettoeinwaage der larvalen Flüssigkeiten bei verschiedenen Messungen variierte (69 mg–130 mg).

Alle detektierten flüchtigen Verbindungen, die von der Wehrflüssigkeit von *A. alni* ausströmen, kommen bis auf eine Ausnahme auch in der Gasphase über der Hämolymphe vor. Auch die nicht eindeutig identifizierten Verbindungen in den Hämolymphe- und Wehrflüssigkeitsproben zeigen klare Übereinstimmungen in Massenspektren und Retentionszeiten. Es wurden nur Signale ausgewertet, die mindestens doppelt so stark waren wie das Untergrundrauschen. Nur wenn eine Verbindung in mehreren Läufen mit klarem Signal detektiert worden war, wurde nach diesem Spektrum auch im Untergrund gesucht. Eine Ausnahme ist 2-Methoxyisopropylpyrazin, da Alkylpyrazine schon in sehr geringer Dosis biologisch wirksam sind. Stimmt die charakteristischen Massen dieser zumeist sehr schlechten Spektren mit dem Referenzspektrum überein, galt die Verbindung als in Spuren vorhanden (sp), wurde aber nicht quantitativ erfaßt. Wenn keine eindeutige Zuordnung möglich war, galt die Verbindung als nicht detektiert (n.d.).

In Abb. 4.1 ist ein Totalionenstromchromatogramm einer Messung der Wehrflüssigkeit dargestellt. Nicht bei jeder Messung wurden die 11 insgesamt detektierten Verbindungen gefunden. Die Unterschiede gehen aus Tab. 4.5 hervor. Es sind bis auf eine Ausnahme (s. u.) keine qualitativen Unterschiede im Duftmuster von Hämolymphe und Wehrflüssigkeit nachweisbar. Ein auffälliger quantitativer Unterschied ist die höhere Konzentration von (*E*)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien in den Proben von Wehrflüssigkeit. Von einem nicht sicher bestimmbar Pyrazin (eventuell 2-Methoxy-3-(1-methylpropyl)-pyrazin) konnten in den Proben der Wehrflüssigkeit charakteristische Massen über die Ionenspur gemessen werden, die über dasselbe Verfahren in Hämolymphe-Proben nicht zu finden waren (Massenspektrum: Abb. 4.2).

Tab. 4.5: In larvaler Wehrflüssigkeit und larvaler Hämolymphe von *A. alni* detektierte flüchtige Verbindungen. Angegeben sind Peakflächen in Millionen. scan: Retentionszeit in s; BP: größter detektierter Peak in Massenspektrum; MP: Peak im Massenspektrum, der dem ionisierten Molekül entspricht; LRI: linearer Retentionsindex; Vorschlag: Vergleich mit Bibliotheksspektren mit einer Übereinstimmung (*fit*) von mehr als 80 % (*forward fit* und *reversed fit*). ?: Spektrum mit geringerer Übereinstimmung als 80 %.

Nr.	scan	BP	MP	LRI	Vorschlag	Fläche: 10 ⁶ /100 mg larvaler Wehrflüssigkeit						
						1a	2a	3a	4a	5a	6a	MW ± SD
1	393	41	98	850	(<i>Z</i>)-2-Hexenal	sp	n.d.	sp	n.d.	0,94	1,19	1,06±0,18
2	816	43		1004	Octanal	1,59	sp	0,43	1,22	0,95	0,78	0,84±0,33
3	897	57		1030	2-Ethyl-1-hexanol	1,59	n.d.	sp	n.d.	0,54	0,53	1,19±0,57
4	945	93	136	1045	(<i>E</i>)-Ocimen	27,16	12,05	0,70	23,96	81,96	35,45	30,29±28,16
5	1115	93	136	1100	Terpen	2,84	n.d.	n.d.	0,77	0,47	0,79	1,22±1,09
6	1128	57	114	1105	Nonanal	2,05	1,08	1,56	3,97	4,12	2,80	2,78±1,45
7	1154	69	150	1113	(<i>E</i>)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien	6,81	2,42	sp	21,70	5,56	3,36	6,65±7,74
8	1311	138	151	1164	2-Methoxyisopropylpyrazin?	sp	sp	sp	sp	sp	sp	-
9	1438	57		1206	Decanal	2,30	0,72	1,50	2,17	1,10	1,31	1,51±0,62
10	1901	119	204	1368	Copaen?	1,98	sp	sp	n.d.	n.d.	n.d.	-
11	19	81	204	1375	beta-Bourbonen?	0,64	sp	sp	sp	sp	n.d.	-

Nr.	scan	BP	MP	LRI	Vorschlag	Fläche: 10 ⁶ /100 mg larvaler Hämolymphe						
						1b	2b	3b	4b	5b	6b	MW ± SD
1	393	41	98	850	(<i>Z</i>)-2-Hexenal	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,40	-
2	816	43	112	1004	Octanal	0,51	0,77	sp	1,87	1,70	1,09	0,69±0,15
3	897	57		1030	2-Ethyl-1-hexanol	sp	n.d.	n.d.	sp	1,57	sp	-
4	945	93	136	1045	(<i>E</i>)-Ocimen	2,76	4,00	5,42	28,41	37,87	14,78	15,54±14,59
5	1115	93	136	1100	Terpen	n.d.	n.d.	n.d.	1,07	0,71	0,35	0,71±0,36
6	1128	57	114	1105	Nonanal	1,45	3,81	0,63	9,56	7,34	5,49	4,71±3,43
7	1154	69	150	1113	(<i>E</i>)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien	sp	sp	sp	0,46	0,28	0,92	0,30±0,35
8		138				n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
9	1438	57	128	1206	Decanal	1,53	2,30	0,53	4,36	2,76	1,76	2,20±1,30
10	1901	119	204	1368	Copaen?	sp	sp	sp	n.d.	n.d.	n.d.	-
11	19	81	204	1375	beta-Bourbonen?	sp	sp	sp	n.d.	sp	n.d.	-

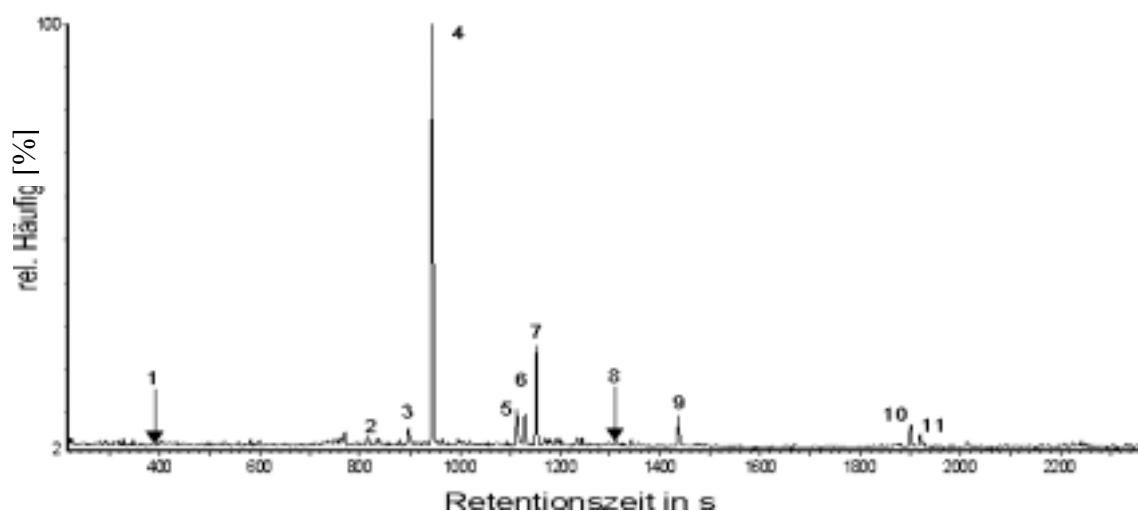


Abb. 4.1: Totalionenstromchromatogramm der Däfte aus Wehrflüssigkeit aus larvalen *A. alni*, im Purge-and-cold-trap-Verfahren angereichert. Die Nummern über den Peaks entsprechen den in Tab. 4.5 gelisteten 11 Verbindungen.

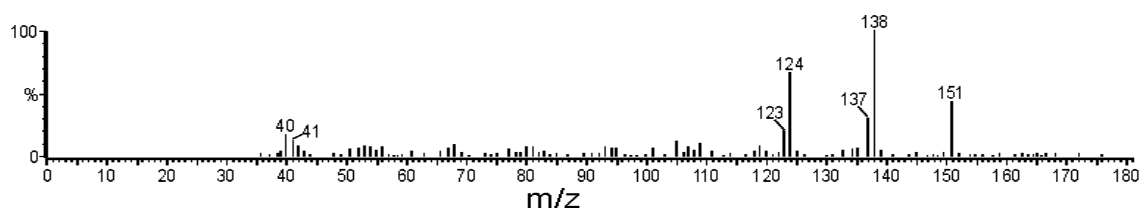


Abb. 4.2: Massenspektrum von Verbindung 8 mit dem linearen Retentionsindex 1164 (DB-1701): Pyrazin-Derivat?

4.5 Diskussion

Die gregär lebenden Larven von *A. alni* werden nach den hier durchgeführten Untersuchungen durch Duftproben sowohl aus larvaler Wehrflüssigkeit, als auch larvaler Hämolymphe als auch aus Eigelegen von *A. alni* alarmiert. Das weist darauf hin, daß die exokrinen Drüsenzellen an den ausstülpbaren Säckchen als Quelle für einen einzelnen alarmauslösenden Faktor nicht infrage kommen.

Allerdings zeigen die Wehrflüssigkeitsdüfte einen signifikant stärkeren alarmauslösenden Effekt als die Däfte von Hämolymphe. Es konnte bei der vergleichenden Analyse der Duftmuster von Hämolymphe und Wehrflüssigkeit ein qualitativer Unterschied für nur eine Verbindung detektiert werden: Während Wehrflüssigkeit ein Pyrazinderivat enthält, ist dieses nicht in der Hämolymphe vorhanden. Das in der Wehrflüssigkeit in deutlich größeren

Mengen abgegebene (*E*)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien hat *per se* keinen alarmauslösenden Effekt (Daten nicht gezeigt).

Die Frage, welche Rolle das Sekret der an der segmentalen Wehröffnung von *A. alni* lokalisierten Drüse hat, bleibt somit weiterhin offen. Folgende Funktionen des Drüsensekretes können diskutiert werden:

(a) Möglich ist, daß über die Drüse der Hämolymphe Stoffe (Lösungsmittel) zugesetzt werden, die zu einer erhöhten Volatilität der auch in der Hämolymphe vorhandenen alarmauslösenden Verbindungen führt, so daß sich die alarmierende Wirkung effektiver entfalten kann. In diesem Zusammenhang fallen die erhöhten Mengen von (*E*)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien in der Wehrflüssigkeit im Vergleich zu der in der Hämolymphe ins Auge. Andere Studien zeigen, daß eine bioaktive Substanz durch Zusatzstoffe eine Effektivitätssteigerung erfahren kann (Eisner et al. 1968, Steidle & Dettner 1993). Bei drei Pentatomiden-Arten konnte zwar eine Reinsubstanz als Alarmpheromon erfolgreich eingesetzt werden, Ganzkörperextrakte der betreffenden Arten erbrachten jedoch eine deutlich höhere Reaktion, was die Existenz einer synergistisch wirksamen Komponente nahe legt (Ishiwatari 1974). Synergisten für Alarmpheromone sind bereits bei den Aphiden *Lipaphis erysimi* und *Megoura viciae* identifiziert (Dawson et al. 1987, Pickett & Griffith 1980). Von Ameisen der Art *Oecophylla longinoda* ist ein Alarmpheromon aus mindestens vier Komponenten bekannt (Bradshaw et al. 1975), wobei die verschiedenen Verbindungen unterschiedliche Verhaltens-elemente der Alarmreaktion beeinflussen.

(b) Eine weitere potentielle Funktion der exokrinen Drüsenzelle an den Wehröffnungen von *A. alni* ist die Produktion eines Warnduftes. So könnte aus an den Wehröffnungen lokalisierten Drüsenzellen auch ein flüchtiges Repellens hervorgehen. In der Wehrflüssigkeit, aber nicht in der Hämolymphe, konnte ein alkyliertes Pyrazin in Spuren nachgewiesen werden. Diese Stoffklasse ist bekannt dafür, daß schon geringste Mengen eine biologische Wirkung entfalten. Methylierte Alkylpyrazine sind bei Insekten, aber auch in vielen Pflanzen sowie in Kot und Urin von Säugetieren weit verbreitet (Moore et al. 1990) und wirken möglicherweise, vergleichbar mit den kontrastreichen Hell-Dunkel-Färbungen für den visuellen Kanal, als Warnsignal im olfaktorischen Bereich als Hinweis auf zusätzlich vorhandene, aber erst bei Verletzung freigesetzte, nicht flüchtige Fraßhemmstoffe (Moore et al. 1990).

(c) Die Produktion eines Aggregationspheromons, das die Gruppenbildung und den Gruppenzusammenhalt steuert, ist eine dritte mögliche Funktion für die exokrine Drüsenzelle. In Olfaktometerversuchen konnte aber keine attraktive Wirkung von Wehrflüssigkeit (der mutmaßlich das Drüsensekret beigemischt ist) auf konspezifische Larven festgestellt werden (Bünnige, unveröffentlicht). Für Gruppenbildung und -zusammenhalt bei phyllophagen Insekten scheint die Produktion eines spezifischen Pheromons aber weniger wichtig als z. B. Duftstoffe aus den verletzten Pflanzen und/oder taktile Reize (Clark & Faeth 1997, Ghent 1960, Gregoire 1988). Von Blattwespenlarven sind Klopfsignale beschrieben worden, die den Gruppenzusammenhalt steuern (Meyer-Rochow 1972).

4.6 Literatur

Blum, M.S. (1969): Alarm pheromones. *Ann. Rev. Entomol.* 14: 57-80.

Blum, M.S. (1996): Semiochemical parsimony in the Arthropoda. *Ann. Rev. Entomol.* 41: 353-374.

Bradshaw, J.W.S., Baker, R. & Howse, P.E. (1975): Multicomponent alarm pheromone of the weaver ant. *Nature* 258: 230-231.

Bünnige, M. & Hilker, M. (1999): Larval exocrine glands in the galericine *Agelastica alni* (L.) (Coleoptera: Chrysomelidae): their morphology and possible functions. *Chemoecology* 9: 55-62.

Calam, D.H. & Youdeowei, A. (1968): Identification and functions of secretion from the posterior scent gland in the fifth instar larva of the bug *Dysdercus intermedius*. *J. Insect Physiol.* 14: 1147-1158.

Clark, B.R. & Faeth, S.H. (1997): The consequence of larval aggregation in the butterfly *Chlosyne lacinia*. *Ecol. Entomol.* 22: 408-415.

Dahl, M.L. (1970): Über einen Schreckstoff bei Aphiden. *Dtsch. Ent. Z.* 18: 121-127.

Dawson, G.W., Griffith, D.C., Pickett, J.A., Wadhams, L.J. & Woodcock, C.M. (1987): Plant-derived synergists of alarm pheromone from turnip aphid, *Lipaphis (Hydraphis) erysimi* (Homoptera, Aphididae). *J. Chem. Ecol.* 13: 1663-1671.

Eisner, T., Meinwald, Y.C., Alsop, D.W. & Carrel, J.E. (1968): Defense mechanisms of arthropods. XXI. Formic acid and *n*-nonyl acetate in the defensive spray of two species of *Helluomorpha*. *Ann. Soc. Am.* 61: 610-613.

- Ghent, A.W. (1960): A study on the group feeding behaviour of larvae of the Jack Pine sawfly *Neodiprion pratti banksianae* Roh. Behaviour 16: 110-148.
- Gregoire, J.-C. (1988) : Larval gregariousness in the Chrysomelidae. In: Biology of Chrysomelidae. P. Jolivet, E. Petitpierre & T.H. Hsiao (Hrsg.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: 253-260.
- Harborne, J.B. (1977): Introduction to ecological biochemistry. Academic press, London: 152-177.
- Ishiwateri, T. (1974): Studies on the scent of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) I. Alarm pheromone activity. Appl. Ent. Zool. 9 (3): 153-158.
- Kislow, C.J. & Edwards L.J. (1972): Repellent odor in aphids. Nature 235: 108-109.
- Meyer-Rochow, V.B. (1972): Verständigungsweisen bei koloniebildenden Blattwespen- und Käfer-Larven. Z. Tierpsychol. 30: 451-455.
- Moore, B.P., Brown, W.V. & Rothschild M. (1990): Methylalkylpyrazines in aposematic insects, their hostplants and mimics. Chemoecology 1: 43-51.
- Nault, L.R., Wood, T.K. & Goff, A.M. (1974): Treehopper (Membracidae) alarm pheromones. Nature 249: 387-388.
- Nault, L.R. & Phelan, P.L. (1984): Alarm pheromones in pre-social insects. In: Chemical ecology of insects. W. J. Bell & R.T. Cardé (Hrsg). Chapman & Hall, London: 237-256.
- Pickett, J.A. & Griffith, D.C. (1980): Composition of aphid alarm pheromone. J. Chem. Ecol. 6: 349-360.
- Ruther, J. & Hilker, M. (1998): A versatile method for on-line analysis of volatile compounds from living samples. J. Chem. Ecol. 24: 525-534.
- Shimano, S., Sakata, T., Mizutani, Y., Kuwahara, Y. & Aoki, J.-I. (2002): Geranial: the alarm pheromone in the nymphal stage of the oribatid mite, *Nothrus palustris*. J. Chem. Ecol. 28: 1831-1837.
- Steidle, J.L.M. & Dettner, K. (1993): Chemistry and morphology of the tergal gland of freelifving adult beetle *Bledius* (Coleoptera, Staphylinidae, Oxytelinae) is adjusted to naturally occurring predators. Chemoecology 4: 63-71.
- Tannert, W. & Hien, B.C. (1976): Nachweis und Funktion eines „Repellentpheromons“ der Larven von *Trogoderma granarium* Everts (Coleopt.-Dermestidae). Zool. Jb. Physiol 80: 69-81.

Xiangyu, J.-G., Zhang, F., Fang, Y.-L., Kan, W., Zhang G.-X. & Zhang, Z.-L. (2002): Behavioural response of aphids to the alarm pheromone (*E*)- β -Farnesen in the field. *Physiol. Entomol.* 27: 307-311.