Friedrich-Schiller-Universität Jena Biologisch-Pharmazeutische Fakultät



Diplomarbeit

Der Einfluss von (E)- β -Farnesen auf das Wirtswahlverhalten von Myzus persicae



angefertigt am

Max Planck Institut für chemische Ökologie

vorgelegt von
Carolina Reinhold
geb. Keilich am 23.11.1984 in Jena

Jena, September 2011

Gutachter:

Dr. Grit Kunert

Prof. Jonathan Gershenzon

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
2 Grundlagen	9
2.1 Wirtswahlverhalten von Blattläusen	9
2.1.1 Prozess der Wirtspflanzenwahl	10
2.1.2 Wirtswahlrelevante Sinnesorgane von Blattläusen	12
2.1.3 Bedeutung der visuellen Wahrnehmung bei der Wirtsindung	13
2.1.4 Bedeutung der olfaktorischen Wahrnehmung bei der Wirtsindung	14
2.2 Myzus persicae SULZER	15
2.3 Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH.	17
2.4 (<i>E</i>)-β-Farnesen	19
3 Methodenentwicklung	21
3.1 Anzucht der Blattläuse und Pflanzen für die Vorexperimente	22
3.2 Kleine Arenen	23
3.3 Vorversuche mit den kleinen Arenen	24
3.3.1 Optimaler Luftaustausch	24
3.3.2 Vorversuch zum Testen der Methode	24
3.3.3 Vorversuch zur optischen Ablenkung	31
3.4 Große Arena	35
3.5 Vorversuche mit der großen Arena	37
3.5.1 Wirtswahl geflügelter Blattläuse	37
3.5.1.1 Erster Versuch	37
3.5.1.2 Zweiter Versuch	39
3.5.2 Wirtswahl mit transgenen Pflanzen	40
3.6 Vorversuche an dem Spektrophotometer	48
3.6.1 Fragestellung	48
3.6.2 Gerät	49
3.6.3 Allgemeine Durchführung	50
3.6.4 Messungen mit und ohne Blatt-Mittelrippe	51
3.6.5 Messfehler des Gerätes	53
3.6.6 Variabilität durch Messungen an leicht verschobenen Messflächen	54
3.6.7 Fazit der Spektrophotometer-Vorversuche	56

4 Material und Methoden des Hauptexperimentes	57
4.1 Verwendete Organismen	57
4.1.1 Myzus persicae Sulzer	57
4.1.2 Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH	60
4.2 Messungen der Blattreflexionen	60
4.3 Hauptexperiment zum Wirtswahlverhalten	61
4.3.1 Temperatur	61
4.3.2 Wahlverhalten der Blattläuse	61
4.3.3 Duftstoffsammlung	63
4.3.4 Analyse der Duftstoffe	64
4.3.5 Statistik	65
5 Ergebnisse des Hauptexperimentes	66
5.1 Messungen der Blattreflexionen	66
5.2 Hauptexperiment zum Wirtswahlverhalten	68
5.2.1 Temperatur	68
5.2.2 Wirtswahlversuch mit ungeflügelten Blattläusen	69
5.2.2.1 Pflanzendaten	69
5.2.2.2 Wirtswahl der ungeflügelten Blattläuse im Hauptexperiment	70
5.2.3 Wirtswahlversuch mit geflügelten Blattläusen	73
5.2.3.1 Pflanzendaten	73
5.2.3.2 Wirtswahl der geflügelten Blattläuse im Hauptexperiment	74
6 Diskussion	77
7 Zusammenfassung	85
Summary	87
Anhang	89
Literaturverzeichnis	90
Danksagung	95
Eidesstattliche Erklärung	96

1 Einleitung

Blattläuse stellen eine außerordentlich erfolgreiche Gruppe innerhalb der Klasse der Insekten dar. Sowohl die 3000 weltweit beschriebenen Arten, als auch die stammesgeschichtliche Entwicklung seit mehreren Millionen Jahren, zeichnen die kleinen Tiere als evolutionäre Sieger aus. Das älteste Blattlausfossil stammt aus der Trias, es ist jedoch wahrscheinlich, dass sich die Blattläuse bereits 60 Millionen Jahre früher, das heißt vor etwa 280 Millionen Jahren, entwickelt haben (Dixon 1998). Während der Kreidezeit nahm die Diversität stark zu. Diese regelrechte Artenexplosion ist auf die Verbreitung und Zunahme der Bedecktsamer zu Beginn der Kreide zurückzuführen (Crane *et al.* 1995). Den Blattläusen standen somit viele neue Wirtspflanzen zur Verfügung, die eine Spezialisierung und Artenbildung begünstigten. Seit dieser Zeit besteht eine enge Beziehung zwischen den pflanzensaftsaugenden Insekten und ihren Wirten.

Während des koevolutionären Prozesses haben sich auf beiden Seiten spezielle Strategien und Mechanismen herausgebildet. Die Blattläuse können ihrerseits die pflanzliche Nahrungsquelle optimal nutzen, die Pflanzen andererseits Fressfeinde abwehren. Auf der Seite der Blattläuse entwickelten sich spezielle Strategien zur Wirtsfindung, hochspezialisierte Mundwerkzeuge und chemische Mechanismen zur Umgehung der Pflanzenabwehr. So verhindert zum Beispiel der Blattlausspeichel nach dem Einstechen in die Siebröhre eine Abwehrreaktion der Pflanze. Durch diese würden die Siebzellen verschlossen und damit der Austritt des Phloemsaftes gestoppt werden, folglich wäre eine Nahrungsaufnahme für die Blattläuse unmöglich (Will *et al.* 2007).

Die Pflanze hingegen setzt unter anderem morphologische Strukturen, wie verstärkte Zellwände oder Trichome ein, um Blattläuse abzuwehren. Eine starke Behaarung der Blätter und Stängel, wie zum Beispiel bei den Raublattgewächsen, erschwert den Blattläusen das Anstechen des Phloems. Aber auch die Bildung chemischer Stoffe zur Abschreckung von Pflanzenfressern ist bekannt. Entweder sind diese Stoffe bereits vor dem Angriff vorhanden (konstitutive Abwehr) oder sie werden erst durch eine direkte Schädigung der Pflanze produziert (induzierte Abwehr). Konstitutive Abwehrstoffe sind vorwiegend Sekundärmetabolite wie Alkaloide, Isoflavone, Tannine und Glucosinolate (Strasburger 1991). Diese Stoffe haben für die Herbivoren toxische, fruchtbarkeits- oder

verdauungshemmende Wirkungen. In einem Vergleich mit fünf Ökotypen von Arabidopsis thaliana, welche unterschiedliche Mengen an Glucosinolaten aufwiesen, konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Blattlausart Myzus persicae am schlechtesten auf dem Ökotyp mit dem höchsten Glucosinolatgehalt überlebte (Mewis et al. 2006). Weniger energieaufwändig sind dagegen induzierte Abwehrmechanismen, da sie nicht ständig ausgeführt werden. Zu ihnen zählt unter anderem die Abgabe von flüchtigen, organischen Verbindungen (VOC), zu der fast alle Pflanzen in der Lage sind (Dudareva et al. 2006). Diese Duftstoffgemische können sehr komplex sein und über 200 Komponenten enthalten. Sie können direkt wirken, da sie meist giftig sind und eine abschreckende Wirkung auf die Phytophagen haben. Darüber hinaus dienen sie auch der indirekten Verteidigung, indem sie Fressfeinde und Parasitoide der Pflanzenfresser anlocken können (Francis et al. 2004; Zhu et al. 2005a). Einige Pflanzen, zum Beispiel die Sojabohne oder die Hänge-Birke produzieren nach einem Blattlausbefall unter anderem Methylsalicylat (Zhu et al. 2005b; Blande et al. 2010). Dieser Methylester wirkt sowohl abschreckend auf die Blattläuse (Pettersson et al. 1994), als auch anlockend auf Blattlausprädatoren (Zhu et al. 2005b).

Eine sehr große Gruppe innerhalb der VOCs bilden die Terpene, die wiederum sehr stark von den Sesquiterpenen (15 C-Atome) vertreten wird. Ein weit verbreitetes Sesquiterpen ist das (*E*)-β-Farnesen (EBF). Dieses wird von Pflanzen entweder kontinuierlich wie bei der Luzerne (Mostafavi *et al.* 1996) oder erst nach einem Angriff, wie zum Beispiel bei dem Mais (Bernasconi *et al.* 1998), abgegeben. Eine bedeutende Rolle spielt das EBF jedoch auch als Bestandteil des Blattlaus-Alarmpheromons. Bei Gefahr, zum Beispiel dem Angriff eines Prädators, geben die Blattläuse dieses Alarmpheromon ab. Andere Blattläuse in der Kolonie, die das EBF wahrnehmen, reagieren darauf mit Flucht, um der Gefahrenquelle zu entkommen (Montgomery *et al.* 1977b).

Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Pflanzen das Blattlaus-Alarmpheromon möglicherweise zur Verteidigung gegen Blattläuse abgeben. Es ist zum Beispiel bekannt, dass das von spezialisierten Blatttrichomen bei Berührung abgegebene EBF bei der Wilden Kartoffel (*Solanum berthaultii*) eine Abschreckung von *M. persicae* bewirkt (Gibson *et al.* 1983). Generell sind verschiedene Wirkungsweisen von Pflanzen-EBF zur Blattlausabwehr vorstellbar. Wie bei der Kartoffel beobachtet, kann das EBF dazu dienen, die Blattläuse abzuschrecken und damit eine Besiedlung der Pflanze zu verhin-

dern. Andererseits könnte es die Nahrungsaufnahme bereits vorhandener Blattläuse reduzieren, da diese nach EBF-Wahrnehmung die Nahrungsaufnahme beenden, mobil werden und fliehen (Montgomery et al. 1977b). Würden die Blattläuse weniger Zeit mit der Nahrungsaufnahme verbringen, wäre das für die Pflanze direkt von Vorteil, da ihr somit weniger Nährstoffe, insbesondere Kohlenhydrate und Aminosäuren, entzogen würden. Einen indirekten Nutzen hätte die Pflanze, wenn die Wachstumsrate der Blattläuse aufgrund des Ressourcenmangels sinken würde. Das häufige Herumlaufen der Blattläuse hätte möglicherweise zusätzlich den Effekt, dass der Anteil an geflügelten Nachkommen bei den Blattläusen steigt (Kunert et al. 2005) und somit in der nächsten Generation mehr Blattläuse die Pflanze verlassen könnten. Des Weiteren wäre es möglich, dass von der Pflanze kontinuierlich abgegebenes EBF Parasitoide und Prädatoren von Blattläusen anlockt (Al Abassi et al. 2000; Beale et al. 2006). Dies konnte bereits für EBF, welches von Blattläusen produziert wurde, nachgewiesen werden (Francis et al. 2004). Es gibt folglich viele Möglichkeiten, wie die Pflanze von einer EBF-Produktion profitieren könnte.

Eine dieser möglichen Wirkungsweisen, die direkte Abschreckung von Blattläusen, soll nun näher untersucht werden. Im Gegensatz zu der Kartoffel, die das EBF nur kurzzeitig nach Berührung abgibt (Gibson *et al.* 1983), wurden hier genetisch veränderte *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen verwendet, die EBF kontinuierlich produzieren. Columbia-Wildtyp-Pflanzen (Col-0) der Acker-Schmalwand wurden mit dem EBF-Synthase Gen aus der Pfefferminze (*Mentha X piperita*) und dem 35S-Promoter des Blumenkohl-Mosaik-Virus transformiert (Beale *et al.* 2006). Diese transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen geben das Blattlaus-Alarmpheromon EBF kontinuierlich ab, während Wildtyp-Pflanzen im Rosettenstadium keine nachweisbaren Mengen an EBF produzieren. Beale (2006) konnte zeigen, dass die Blattläuse nach einer kurzen EBF-Präsentation mit Flucht reagierten.

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, zu überprüfen, ob das von den transgenen Pflanzen kontinuierlich produzierte EBF einen Einfluss auf die Wahl der Wirtspflanzen von *M. persicae* hat. Dazu konnten die Blattläuse in einer Arena zwischen Wildtyp-Pflanzen (Col-0), wenig EBF-produzierenden Pflanzen (FS 11-4) und viel EBF-produzierenden Pflanzen (FS 9-2) wählen. Trifft die Vermutung zu, dass die Blattläuse in der Natur von

einer permanenten EBF-Abgabe der Pflanzen abgeschreckt werden, sollten die Blattläuse die transgenen Pflanzen in dem Arena-Experiment ebenfalls meiden.

Zusätzlich sollte getestet werden, ob es einen Unterschied im Wirtswahlverhalten zwischen geflügelten und ungeflügelten Blattläusen gibt. Da sich die beiden Morphen in der Ausprägung ihrer Sinnesorgane unterscheiden und sie aus verschiedenen Positionen, das heißt entweder aus der Luft oder vom Boden, die Wirtswahl durchführten, war eine unterschiedliche Besiedlung der Pflanzen vorstellbar. Hierbei war vor allem das Verhalten der geflügelten Morphen interessant, weil sie in der Natur der Migration und damit dem Auffinden neuer Wirtspflanzen dienen.

Da sich Blattläuse auch visuell orientieren, musste überprüft werden, ob sich die Testpflanzen in ihrer Farbe voneinander unterscheiden. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen an einem Spektrophotometer durchgeführt. Dadurch sollten eventuelle Unterschiede im Reflexionsspektrum zwischen den Blättern der drei verschiedenen Pflanzen-Genotypen aufgezeigt werden.

2 Grundlagen

2.1 Wirtswahlverhalten von Blattläusen

Blattläuse gehören zu den wichtigsten und am weitesten verbreiteten Schädlingen in der Agrar- und der gärtnerischen Kulturwirtschaft. Als Pflanzensaftsauger und Überträger von Krankheiten sorgen sie sowohl direkt als auch indirekt für große Ernteverluste weltweit (Van Emden *et al.* 2007). Wie viel Schaden sie dabei verursachen können, hängt unter anderem von ihrer Fähigkeit ab, neue Wirtspflanzen zu finden und zu besiedeln. Zum Auffinden der Pflanzen und vor allem zum Erkennen der Wirte, haben sich in der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt. Besonders die Auswahl der Wirtspflanzen, die von den Blattlausweiben getroffen wird, steht unter starkem selektiven Druck, da eine falsche Entscheidung nicht nur nachteilig für sie selbst, sondern auch für die nächste Generation ist.

Nicht alle Blattläuse haben dieselbe Präferenz bezüglich der Wirtswahl. Sie ist von Art zu Art verschieden, hängt aber auch innerhalb der Arten von unterschiedlichen Faktoren ab, wie zum Beispiel von der Jahreszeit und dem entsprechenden Migrationsverhalten (Powell et al. 2000). Des Weiteren hat die Wirtsspezifität einen bedeuteten Einfluss auf das Suchverhalten der Insekten. So haben zum Beispiel heterözische (wirtspflanzenwechselnde) Arten ganz andere Anforderungen als autözische (wirtstreue) Arten. Etwa 10 Prozent der Blattlausarten sind heterözisch, sie leben von Herbst bis Frühling auf dem primären Wirt und im Sommer auf dem Sekundären, der mit dem primären Wirt meist nicht näher verwandt ist (Dixon 1987). In diesem Fall müssen die Blattläuse zwischen den Wirten wandern, das bedeutet, dass sie in der Lage sein müssen, neue Wirtspflanzen ausfindig zu machen. Aber auch bei autözischen Blattlausarten, die auf nur einer Wirtsart leben, ist Migration möglich und manchmal notwendig (Klingauf 1987). So müssen sie zum Beispiel in der Lage sein, neue Pflanzen aufzusuchen, wenn die Populationsdichte der Blattläuse so sehr gestiegen ist, dass die alte Wirtspflanze nicht mehr ausreicht, um die gesamte Population zu versorgen. Dies trifft natürlich auch für heterözische Arten zu.

Neue Wirtspflanzen zu finden ist notwendig, aber auch gefährlich, es müssen dabei laut Powell (2006) drei große Hindernisse überwunden werden. Beispielsweise sind die meisten Arten bei ihrer Nahrungswahl hoch spezialisiert und nutzen nur eine oder wenige, nah verwandte Pflanzenarten als Wirt. Des Weiteren sind Blattläuse mit ihrer kleinen Körpergröße und weichen Kutikula anfällig für Austrocknung, die Suche ist somit zeitlich beschränkt. Das dritte Hindernis stellt ihre schwache Flugfähigkeit dar. Blattläuse können ihre Fluggeschwindigkeit und -richtung nur bei niedriger Windgeschwindigkeit selbst bestimmen. Als Konsequenz dieser Faktoren findet nur ein sehr kleiner Anteil der abwandernden Blattläuse geeignete Wirte. Zum Beispiel schätzte Ward (1998) den Prozentsatz der erfolgreichen Herbst-Migranten der Art *Rhopalosiphum padi*, mit der Traubenkirsche als Wirt, auf nur 0,6 Prozent.

Trotzdem sind Blattläuse in der Lage auch Wirtspflanzen mit nur geringer Abundanz zu finden und damit ihren Lebenszyklus erfolgreich durchzuführen. Die Wirtsfindung ist dabei nicht zufällig, Blattläuse haben eine Vielzahl von Sensor- und Verhaltensmechanismen entwickelt, um Wirtspflanzen zu finden und zu identifizieren.

2.1.1 Prozess der Wirtspflanzenwahl

Das klassische und oft zitierte Konzept der Wirtsfindung nach Moericke (1955) unterscheidet vier Verhaltensphasen, sogenannte Stimmungen, die geflügelte Blattläuse durchlaufen, wenn sie auf der Suche nach einem neuen Wirt sind (Abb. 2.1):

- Ruhestimmung: Sie charakterisiert die Vorabflugzeit die Zeit zwischen der letzten Häutung und dem Abflug.
- 2. Flugstimmung: Nach dem Abflug folgen die Blattläuse der relativ kurzwelligen Strahlung vom Himmel und fliegen somit nach oben, aus der Vegetation heraus. Nur so sind eine weite Ausbreitung und das Finden von möglichst vielen Wirtspflanzen möglich. Dieser Distanzflug kann mit Hilfe des Windes mehrere hundert Kilometer lang sein. Während dieser Zeit können die Blattläuse keine Pflanzensignale wahrnehmen.
- 3. Befallsstimmung: Im anschließenden Befallsflug fliegen sie wieder nahe über der Vegetation. Viele Blattlausarten sind in dieser Phase sensibel für das lang-

wellige (rötliche) Licht, das vom Boden zurück gestrahlt wird. Außerdem werden sie speziell von grünen oder gelben Oberflächen angezogen. Zusätzlich zu den visuellen Signalen vor der Landung, die jedoch nicht ausreichend sind, um einen Wirt identifizieren zu können, wird das Verhalten der Blattläuse auch durch Pflanzenduftstoffe beeinflusst. Nach der Landung zeigen die Blattläuse ein typisches Lauf- und Probierverhalten. Kutikula und Epidermis der Pflanze werden mit dem Labium und dem Stilett erforscht, wobei die kurzen Einstiche vor allem der Wirtserkennung und dem Finden von Phloem dienen (Pollard 1973). Positive Geschmacksreize erhöhen die Häufigkeit und Dauer der Proben. Auf Pflanzen, die keine Wirte darstellen, sinkt die Probierdauer und die Blattläuse laufen länger herum (Klingauf 1987). Die endgültige Annahme einer Pflanze als Wirt hängt von den qualitativen und quantitativen Anteilen des Phloemsaftes ab. Dabei ist vor allem Saccharose ein wichtiger Stimulator (Klingauf 1987). Welche Reize allerdings zur endgültigen Akzeptanz führen, ist bisher noch nicht bekannt.

4. Ansiedlungsstimmung: Wenn alle Faktoren stimmen, kommt es zur Ansiedlung und Vermehrung der Blattläuse.

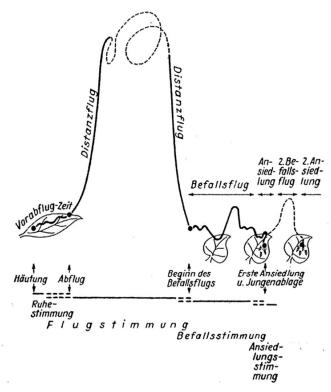


Abb. 2.1 Verhaltensphasen einer geflügelten Blattlaus während der Migration (Moericke 1955)

2.1.2 Wirtswahlrelevante Sinnesorgane von Blattläusen

Welche Signale für das Finden der Wirtspflanzen bedeutend sind, hängt davon ab, was die Blattläuse mit ihren Sinnesorganen und Rezeptoren wahrnehmen können. Das Sinnessystem der Blattläuse ist relativ unkompliziert, verglichen mit ähnlich großen Insekten. Sie besitzen eine relativ kleine Anzahl an sensorischen Strukturen, die jedoch den gewöhnlichen Insektenansprüchen genügen: Sehvermögen, Flugkontrolle, Propriozeption, Tastsinn und Geruchssinn (Anderson *et al.* 1987).

Für das Erkennen von Wirtspflanzen besitzen Blattläuse wichtige Sensoren am Kopf, in der Speiseröhre, auf den Antennen, sowie an den Beinen und Tarsen. Die meisten sensorischen Strukturen befinden sich an oder in den Antennen, sie sind für diese Arbeit besonders relevant. Die Haare auf den Antennen dienen nicht nur der Mechanorezeption, sondern sind auch für die olfaktorische Wahrnehmung verantwortlich (Bromley et al. 1979). So bekommen die Blattläuse Informationen über die Tauglichkeit des Wirtes. Einige Sensoren auf den Antennen sind bei verschiedenen Morphen (geflügelt oder ungeflügelt, adult oder als Larvenstadium, Männchen oder Weibchen) in unterschiedlicher Anzahl vorhanden. Während zum Beispiel alle Blattlausstadien primäre Rhinarien auf dem fünften und sechsten Antennensegment besitzen, kommen sekundäre Rhinarien nur bei adulten Blattläusen vor, diese befinden sich auf dem dritten und fünften Segment (Bromley et al. 1979). Beide Sensillen haben eine chemosensorische Funktion, wobei die primären Rhinarien die Hauptrezeptoren für das Alarmpheromon zu sein scheinen (Nault et al. 1973). Die sekundären Rhinarien sind bei den geflügelten und ungeflügelten Männchen in größerer Anzahl vorhanden als bei den geflügelten Weibchen und dienen bei den Männchen vorwiegend der Wahrnehmung von Sexuallockstoffen (Anderson et al. 1987). Da diese Funktion bei den Weibchen nicht nötig ist, haben die sekundären Rhinarien bei den geflügelten Weibchen eine alternative Aufgabe übernommen, möglicherweise sind sie in den Prozess der Wirtsfindung involviert. Ungeflügelte Weibchen besitzen kaum sekundäre Rhinarien. Neben den, für die Wirtsfindung Geruchs-Geschmackssinneszellen, bedeutsamen und den Mechanorezeptoren sowie dem Gleichgewichtsorgan befinden sich auch Feuchtigkeitsund Wärmerezeptoren auf den Antennen (Anderson et al. 1987).

Ein weiteres wichtiges Sinnesorgan sind die Augen. Es sind drei verschiedene visuelle Strukturen bei Blattläusen bekannt (Anderson *et al.* 1987). Ein Paar erster Facettenaugen, bestehend aus jeweils drei Einzelaugen, können nur grobe Formen wahrnehmen. Einige Wissenschaftler nehmen an, dass sie für die Orientierung im Flug verantwortlich sind (Mazokhin-Porshnyakov *et al.* 1979). Das erklärt allerdings nicht ihre Funktion bei ungeflügelten Morphen. Bei den zweiten Facettenaugen ist die Anzahl der Einzelaugen innerhalb der Arten unterschiedlich (Anderson *et al.* 1987). Außerdem steigt die Anzahl mit dem Entwicklungsstand des jeweiligen Individuums. Geflügelte Blattläuse haben mehr und größere Einzelaugen als ungeflügelte. Sie helfen ihnen bei der Orientierung im Flug und bei der Lokalisierung des Landeplatzes. Zusätzlich dienen sie dem Erkennen von Bewegungen und sind für spezielle Bereiche aus dem Lichtspektrum sensibel. Ocellen kommen nur bei geflügelten Blattläusen und Männchen vor. Eine Ocelle liegt vorne zwischen den Antennen und zwei andere liegen über den Facettenaugen. Auch sie dienen der Orientierung im Flug (Anderson *et al.* 1987).

2.1.3 Bedeutung der visuellen Wahrnehmung bei der Wirtsfindung

Wie bereits erwähnt, reagieren Blattläuse besonders stark auf "Laubblatt-Farben", das heißt auf Wellenlängen zwischen 500 und 580 Nanometer (grün bis gelb). Die Blattläuse bevorzugen dabei meist gelbgrün gegenüber reinem grün. Moericke war auf diesem Gebiet ein Pionier und hat in den 50er Jahren viele Freiland- und Laborexperimente mit Blattläusen und deren Farbwahrnehmung durchgeführt. So hat er herausgefunden, dass bei der Landung die Farbe wichtiger zu sein scheint als die Lichtintensität (Moericke 1950). Außerdem konnte er nachweisen, dass Blattläuse drei Photorezeptoren aufweisen: Einen für grünes Licht, einen für blaues Licht und einen für den UV-Bereich, wobei die letzten zwei Wellenlängenbereiche eine abschreckende Wirkung haben (Moericke 1955). Klingauf (1987) stellte fest, dass die Farbwahrnehmung von Blattläusen nicht ausreicht, um Wirtspflanzen von anderen Pflanzen zu unterscheiden. Allerdings hatte er keinen Zweifel darüber, dass die Form, der Kontrast und andere optische Eigenschaften eine wichtige Rolle als Anreiz für eine Landung spielen.

2.1.4 Bedeutung der olfaktorischen Wahrnehmung bei der Wirtsfindung

Duftstoffe geben im Vergleich zu optischen Signalen genauere Informationen über die Identität des Senders. So können die Blattläuse über olfaktorische Stoffe direkt zu ihren Wirtspflanzen finden.

In den letzten 40 Jahren gab es viele Experimente, die das Verhalten der Blattläuse auf bestimmte Duftstoffe, vorwiegend auf die der Wirtspflanzen, untersuchten. Zum Beispiel reagierte *Rhopalosiphum padi* positiv auf die Geruchsstoffe seines Winterwirts *Prunus padus* (Pettersson 1993). In einem anderen Experiment wurden Fallen mit dem Monoterpen Carvon, einem Duftstoff vieler Doldenblütler, aufgestellt. Sie fingen etwa 50-mal mehr geflügelte *Cavariella aegopodii*, ein Schädling von Karottenfeldern, als unbehandelte Fallen (Chapman *et al.* 1981). In einer umfassenden Studie mit mehreren Blattlausarten wurde herausgefunden, dass geflügelte und ungeflügelte Virginopare von *Aphis fabae* und geflügelte Virginopare von *Brevicoryne brassicae* von den Duftstoffen ihrer sowohl primären, als auch sekundären Wirtspflanzen in einem Olfaktometer angelockt wurden (Nottingham *et al.* 1991).

Aber auch abschreckende Duftstoffe sind bekannt. So hemmte zum Beispiel Linalool, ein Pflanzenduftstoff, die anlockende Wirkung von Carvon bei der Blattlausart *C. aegopodii* (Chapman *et al.* 1981). Die jeweiligen Duftstoffe von Rainfarn und dem Sommer-Bohnenkraut wirkten auf *B. brassicae* und *A. fabae* abschreckend (Nottingham *et al.* 1991). Ein weiterer für Blattläuse abschreckender Pflanzenduftstoff ist das (*E*)-β-Farnesen. Dieses wird auch von den Blattläusen selbst produziert und abgegeben, wenn sie in Gefahr sind (Edwards *et al.* 1973). Da dieses Pheromon Gegenstand der Diplomarbeit ist, soll später näher darauf eingegangen werden.

Chemische Stoffe können bei Blattläusen somit unterschiedliche Verhaltensmuster hervorrufen. Es ist nicht nur eine anlockende Wirkung, insbesondere bei den Duftstoffen von Wirtspflanzen möglich, sondern auch abschreckende oder neutrale Reaktionen wurden beobachtet.

2.2 Myzus persicae Sulzer

Ursprünglich stammt die Grüne Pfirsichblattlaus (Abb. 2.2), wie sein Hauptwirt der Pfirsich, aus Asien. Heute kann man die etwa 1,8 bis 2,3 Millimeter große Blattlaus jedoch auf der ganzen Welt finden (Blackman *et al.* 1984). Sie gehört zur Familie der Aphididae und zur Unterfamilie Aphidinae, der Röhrenblattläuse. Die Farbmorphen reichen von hellgrün, über grau-grün bis hin zu pink oder rot. Vor allem unter kälteren Bedingungen sind sie stärker pigmentiert. Die geflügelten Adulten haben einen schwarzen, dorsalen Fleck auf dem Abdomen.





Abb. 2.2: *Myzus persicae*; links ungeflügelte Morphen; rechts geflügelte Morphe (Quellen: Foto links: Luc Viatour, www.lucnix.be; rechts: Scott Bauer, www.ars.usda.gov)

M. persicae ist eine heterözische und somit polyphage Art. Primärer Wirt ist Prunus persica, der Pfirsich, seltener auch P. nigra, P. tenella, sowie P. serotina und Pfirsich-Mandel-Hybriden (Lampel et al. 2007). Sekundäre Wirte kann man in über 40 verschiedenen Pflanzenfamilien finden, unter denen sich auch wirtschaftlich sehr wichtige Arten befinden, zum Beispiel Spargel, Bohne, Erbse, Broccoli, Rosenkohl, Blumenkohl, Möhre, Kürbis, Melone, Mais, Gurke, Tomate, Petersilie, Senf, Fenchel, Pfeffer und Spinat, aber auch Tabakpflanzen und Sonnenblumen werden befallen (Lampel et al. 2007).

Bei mildem Klima können sich bis zu 20 Generationen von *M. persicae* pro Jahr entwickeln, wobei eine Generation zehn bis zwölf Tage benötigt, um alle vier Larvenstadien zu durchlaufen und Nachkommen zu produzieren. In Gebieten, in denen die Wirtspflan-

zen den Winter nicht überdauern, legen die Blattläuse Eier auf Pfirsichpflanzen ab, wo sie überwintern (Abb. 2.3). Im Frühling, wenn die Larven aus den Eiern schlüpfen (Fundatrix), saugen sie an Blüten, jungen Blättern und an der Sprossachse. Nach einigen Generationen werden geflügelte Dispersal-Morphen produziert, die zu den Sommerwirten fliegen. Dort entwickeln sich je nach Umweltbedingung geflügelte, beziehungsweise ungeflügelte lebend gebärende Weibchen. Erst, wenn die Tage im Herbst wieder kürzer werden, werden geflügelte Herbst-Migranten (Gynoparae) und geflügelte Männchen produziert, die wieder zu ihrem primären Wirt zurück fliegen. Die Gynoparae gebären auf dem primären Wirt Oviparae, diese können sich mit den Männchen sexuell fortpflanzen und legen Eier auf dem Pfirsich ab. Bis auf diese Ausnahme entstehen alle Generationen parthenogenetisch, also aus unbefruchteten Eizellen (Van Emden *et al.* 1969).

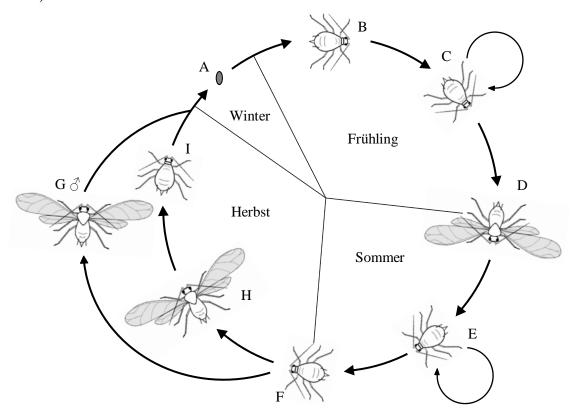


Abb. 2.3: Generationsfolge von M. persicae. A = Ei; B = Fundatrix; C = Fundatrigenie (mehrere Generationen); D = Frühlings-Migrante; E = parthenogenetisch reproduzierende Weibchen (mehrere Generationen); <math>F = Weibchen, P =

Durch sehr hohe Populationsdichten auf jungem Pflanzengewebe kann die Grüne Pfirsichblattlaus der Pflanze erheblichen Schaden zufügen. Dies kann zu Wasserstress, Welken und einer verminderten Wachstumsrate der Pflanze führen. Anhaltender Blattlausbefall kann bedeutende Ernteverluste zur Folge haben (Van Emden et al. 2007). Der Hauptschaden durch diese Blattlausart entsteht jedoch durch die Übertragung von Pflanzen-Viren. M. persicae ist der wichtigste Blattlaus-Viren-Vektor auf der Welt, er kann über 100 pflanzenpathogene Viren übertragen (Lampel et al. 2007). Sowohl mit Insektiziden, als auch mit biologischer Schädlingsbekämpfung wird versucht, die Populationsgrößen unter Kontrolle zu bekommen (Van Emden et al. 2007). Vor allem in Gewächshäusern können natürliche Feinde eingesetzt werden. Es konnten bereits Hunderte von natürlichen Feinden beschrieben werden (Van Emden et al. 1969), vorrangig Marienkäfer (Coleoptera: Coccinellidae), Schwebfliegen (Diptera: Syrphidae), Florfliegen (Neuroptera: Chrysopidae), Brackwespen (Hymenoptera: Braconidae) und entomopathogene Pilze.

Für die hier durchgeführten Experimente wurden Blattläuse des Sommerstadiums benutzt, so dass sie problemlos auf *Arabidopsis*-Pflanzen gezüchtet werden konnten.

2.3 Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH.

Die Acker-Schmalwand ist ein einjähriger Kreuzblütler (Brassicaceae) (Rothmaler 1978; Rollins 1993). Sie erreicht eine Wuchshöhe von 30 Zentimetern und die Rosettenblätter sind im Gegensatz zu den Stängelblättern meist gezähnt (Abb. 2.4). Die krautige Pflanze blüht von März bis Mai, wobei die weißen Blüten etwa drei Millimeter groß werden. Aus ihnen entwickeln sich etwa ein bis zwei Zentimeter lange Schotenfrüchte. A. thaliana kommt weltweit in den gemäßigten Klimazonen vor und wächst vor allem auf offenen sandigen Böden oder in lockerem Magerrasen.

In der Biologie dient diese Pflanze, stellvertretend für die Physiologie der höheren Pflanzen, seit den 40er Jahren als Modellorganismus, da sie viele Vorteile bietet (Davis et al. 1993). Beispielsweise lässt sie sich sehr leicht auf kleinem Raum kultivieren. Für die durchgeführten Experimente war das von Bedeutung, da unter anderem für das Hauptexperiment 240 Pflanzen annähernd gleichzeitig angezogen werden mussten. Von der Keimung bis zur Reifung der Samen dauert es nur sechs bis acht Wochen, der Generationszyklus ist somit relativ kurz, dies war insbesondere bei der Experimentplanung vorteilhaft. Des Weiteren besitzt A. thaliana nur fünf Chromosomenpaare, von denen detaillierte Karten erstellt worden sind. Die Sequenzierung des kleinen Genoms von 125 Megabasen wurde im Jahr 2000 abgeschlossen. Außerdem sind bereits viele Mutanten bekannt, die in den Stock-Centern bestellt werden können. Die Samen können problemlos über lange Zeit aufbewahrt werden. Ebenfalls



Abb. 2.4: *A. thaliana* (Quelle: S. Howell, Boyce Thompson Instit. for Plant Research, Ithaca New York)

ein wichtiger Punkt ist eine durchführbare Manipulation des genetischen Materials, zum Beispiel eine Transformation, wie sie bei den verwendeten Pflanzen-Genotypen durchgeführt wurde.

In den Experimenten diente A. thaliana als Wirtspflanze für M. persicae.

2.4 (*E*)- β -Farnesen

(E)-β-Farnesen (EBF) ist ein azyklisches Sesquiterpen mit der Summenformel $C_{15}H_{24}$ (Abb. 2.5) (Budavari 1996). Die farblose Flüssigkeit hat einen Siedepunkt von 124 Grad Celsius und riecht hölzern und süßlich.

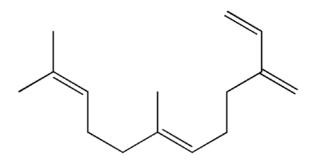


Abb. 2.5: Strukturformel von (*E*)-7,11-Dimethyl-3-methylen-1,6,10-dodecatrien (EBF)

Bei vielen Tier- und Pflanzenarten spielt EBF eine wichtige Rolle in der chemischen Kommunikation. Als Bestandteil in ätherischen Ölen kommt es sowohl bei Gymnospermen, wie der Japanischen Lärche (Nabeta et al. 1990), als auch bei Angiospermen, wie zum Beispiel der Luzerne (Mostafavi et al. 1996), der Strahlenlosen Kamille (Raal et al. 2011), dem Hanf (Hillig 2004), der Zitronen-Minze (Zaks et al. 2008) oder dem Mais (Turlings et al. 1991) vor. Aber auch im Tierreich ist dieser Duftstoff weit verbreitet. So hat man erhöhte Mengen an EBF im Urin von dominanten Mäusemännchen gefunden, bei denen es wahrscheinlich bei der Reviermarkierung eine Rolle spielt (Novotny et al. 1990). Im Urin von weiblichen Afrikanischen Elefanten konnten mehrere Insektenpheromone, darunter auch EBF, festgestellt werden (Goodwin et al. 2006). Vor allem bei den Insekten erfüllt dieser Stoff viele Aufgaben, zum Beispiel als Pheromon bei der Nestmarkierung nordamerikanischer Bienen (Fernandes et al. 1981), als Verteidigungsallomon und Spurpheromon der Arbeiter der Ameisenart Myrmecia nigriceps (Jackson et al. 1990) oder als Kairomon zum Auffinden der Beute bei einigen räuberischen Laufkäferarten, die auf EBF reagieren (Kielty et al. 1996). Ebenfalls als Kairomon dient EBF den Weibchen des Maiszünslers, die in einem Wahlexperiment bevorzugt Eier auf EBF-behandelten Stellen ablegten (Binder et al. 1995), so können sie in der Natur EBF-produzierende Wirtspflanzen wie den Mais auffinden. Dass EBF auch als Synomon dient, konnte in folgendem komplexen System nachgewiesen werden. Wenn Larven der Zuckerrübeneule auf Maiskeimlingen fressen, werden von den Pflanzen spezifische Duftstoffe, darunter auch große Mengen an EBF, abgegeben (Turlings *et al.* 1991). Dieses Duftstoffgemisch ist attraktiv für die Weibchen des Parasitoiden *Cotesia marginiventris*, die auf diesem Wege ihre Wirte, die Larven der Zuckerrübeneule, finden können.

Eine weitere wichtige Bedeutung kommt dem (*E*)-β-Farnesen als Bestandteil des Blattlaus-Alarmpheromons zu. Werden Blattläuse angegriffen, sondern sie über ihre Siphunculi, zwei röhrenförmige Strukturen auf dem Rücken, ein Sekret ab, welches das Alarmpheromon enthält (Abb. 2.6). Bei vielen Blattlausarten besteht dieses Pheromon vorwiegend oder zumindest teilweise aus (*E*)-β-Farnesen (Bowers *et al.* 1972; Edwards *et al.* 1973; Wientjens *et al.* 1973; Pickett *et al.* 1980). Bei *Myzus persicae* und elf weiteren Blattlausarten konnte EBF als alleiniger Bestandteil des Alarmpheromons nachgewiesen werden (Francis *et al.* 2005). Nehmen andere Blattläuse dieses Alarmpheromon über ihre Antennen wahr, setzt eine typische Fluchtreaktion ein. Die Blattläuse beginnen umher zu laufen oder lassen sich von der Pflanze fallen, um den Angreifern zu entkommen (Montgomery *et al.* 1977a). Außerdem werden nach regelmäßiger EBF-Wahrnehmung mehr geflügelte Nachkommen geboren, die dann die Pflanze verlassen können (Kunert *et al.* 2005). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass natürliche Blattlausfeinde von EBF angelockt werden (Al Abassi *et al.* 2000).



Abb. 2.6: *M. persicae* mit abgegebenen Alarmpheromon-Tröpfchen (Quelle: www.aphidweb.com)

3 Methodenentwicklung

In mehreren Studien mit Olfaktometern konnten anlockende oder abschreckende Wirkungen von Duftstoffen auf verschiedene Blattlausarten nachgewiesen werden (Campbell et al. 1990; Nottingham et al. 1991; Pettersson 1993; Lilley et al. 1996). Bei Olfaktometer-Experimenten können die Blattläuse die Pflanzen nicht sehen, sondern sind einem Luftstrom mit Duftstoffen der Pflanzen konfrontiert. In dieser Arbeit sollte der Einfluss des Duftstoffes (E)-β-Farnesen auf das Wirtswahlverhalten der Blattläuse unter möglichst natürlichen Bedingungen untersucht werden. Aus diesem Grund wurde für die Verhaltensexperimente eine Arena ausgewählt, in der sich die Blattläuse entsprechend frei bewegen konnten. Wie in der Natur sollten die Blattläuse alle Sinne benutzen und die Pflanzen visuell und olfaktorisch wahrnehmen können, um ihre Wirte zu wählen. In einer entsprechend großen Arena hatten die geflügelten Morphen zusätzlich die Möglichkeit, ihre Ziele im Flug auszuwählen. Allerdings mussten die Experimente so gestaltet sein, dass möglichst keine optische Anlockung oder Abschreckung bestand. Das bedeutet, dass die Insekten die Pflanzen zwar sehen sollten, der visuelle Reiz jedoch den Einfluss des Duftstoffes EBF nicht überlagern durfte. In mehreren Studien wurde allerdings gezeigt, dass die visuellen Reize bei der Wirtswahl eine wichtige Rolle spielen können (Moericke 1955; Klingauf 1987; Dilawari et al. 1989). Deshalb wurden mehrere Vorexperimente durchgeführt, um sicher zu stellen, dass eine visuelle Ablenkung der Blattläuse ausgeschlossen war. Des Weiteren waren diese Vorexperimente, welche im Folgenden dargestellt werden, nötig, um andere Störfaktoren zu beseitigen, die richtigen Bedingungen zu schaffen und den Versuchsaufbau zu optimieren. Messungen an einem Photospektrometer dienten dazu, eventuelle farbliche Unterschiede der Pflanzenblätter festzustellen. Diese möglichen Reflexionsunterschiede, insbesondere zwischen den Genotypen, hätten die Wirtswahl beeinflussen können.

Zunächst fanden die Wirtswahlexperimente in kleinen, schon vorhandenen Arenen statt, später wurde das Prinzip auf eine große Arena übertragen. Die Versuche erfolgten in einer Klimakammer mit konstanter Temperatur (20 Grad Celsius) und Luftfeuchtigkeit (70 Prozent). Für alle beschriebenen Experimente wurde die Blattlausart *Myzus persicae*, sowie die Pflanzenart *Arabidopsis thaliana* verwendet.

3.1 Anzucht der Blattläuse und Pflanzen für die Vorexperimente

Um gleichaltrige ungeflügelte Blattläuse zu erhalten, wurde zehn Tage vor einem Experiment eine bestimmte Anzahl an adulten Blattläusen (genaue Angaben bei den jeweiligen Experimenten) auf *A. thaliana*-Pflanzen des Wildtyps gesetzt. Die Blattläuse konnten nun für zwei Tage Nachkommen produzieren, danach wurden die adulten Blattläuse wieder entfernt. Nach etwa einer Woche waren die Nachkommen ebenfalls adult und konnten für die Experimente benutzt werden.

Für die Versuche mit geflügelten Blattläusen musste zunächst eine effiziente Anzuchtmethode solcher Morphen geprüft werden. Es ist bekannt, dass einige Blattlausarten, darunter auch *M. persicae*, auf schlechte Nahrungsqualität und Gedränge mit einer verstärkten Bildung von geflügelten Nachkommen reagieren (Johnson 1965; Sutherland *et al.* 1971). Deshalb wurde getestet, ob eine Anzucht mit hohen Dichten bei *M. persicae* zu einer ausreichenden Bildung geflügelter Nachkommen führt. Dazu wurden 15 adulte Blattläuse auf eine fünf Wochen alte Pflanze gesetzt. Durch die schnell zunehmende Populationsdichte kam es zu Gedränge und die Nahrungsqualität verschlechterte sich. Nach einer Woche konnten bereits Larven mit Ansätzen zur Flügelbildung beobachtet werden und nach zwei Wochen befanden sich genügend, das heißt über 30, adulte geflügelte Blattläuse unter den vielen Nachkommen. Somit konnte diese Anzuchtmethode für die folgenden Experimente mit geflügelten Blattläusen angewandt werden.

Da für die Experimente Pflanzen ohne Infloreszenz benutzt werden sollten, wurde in einer Versuchsreihe das optimale Pflanzenalter ermittelt. Mehrere Pflanzen wurden sieben Wochen, erst drei Wochen bei Kurztag- (10 Stunden Licht : 14 Stunden Dunkelheit), anschließend bei Langtagbedingungen (16 Stunden Licht : 8 Stunden Dunkelheit), beobachtet. Es stellte sich heraus, dass alle Pflanzen fünf Wochen nach der Keimung zu blühen begannen. Somit ist eine Verwendung nach der vierten Woche, also kurz vor der Infloreszenzbildung, sinnvoll. Die Pflanzen für die Vorexperimente wuchsen somit für zwei Wochen unter Kurztag- und zwei bis drei Wochen unter Langtagbedingungen und wurden mit einem Alter von vier bis fünf Wochen verwendet. Die Anzucht erfolgte in Erde mit ½ Dünger (12,5 g/100 L Osmocote® Exact Mini von Scotts Int. B.V., Heerlen, NL und 12,5 g/100 L Triabon® von COMPO GmbH & Co. KG, Münster, D).

3.2 Kleine Arenen

Für die ersten Vorversuche wurden drei kleine Arenen benutzt, die jeweils eine quadratische Grundfläche von 36 mal 36 Zentimeter und eine Höhe von 20,5 Zentimeter (Außenmaße) hatten (Abb. 3.1). Alle Seitenwände bestanden aus Plexiglas. In die beigen Bodenplatten der Arenen wurden kreisförmig jeweils sechs Löcher von je fünf Zentimeter im Durchmesser ausgeschnitten. Dabei betrug der Abstand sowohl vom Mittelpunkt der Arena bis zu einem Lochmittelpunkt, als auch von Loch- zu Lochmittelpunkt nebeneinander liegender Löcher 11,5 Zentimeter. In diese Löcher konnten Pflanzentöpfe hineingestellt werden, so dass sich nur die Pflanze (nicht der Topf) in der Arena befand. So konnten die ungeflügelten Blattläuse die Pflanzen gut wahrnehmen und leicht erreichen. Die Arenadeckel wurden fest und lückenlos angeschraubt, so dass die Blattläuse die Arenen nicht verlassen konnten. Die Arenen standen in einem Regal an der Wand, direkt unter mehreren Leuchtstoffröhren. Zum Abschirmen des einseitig auf die Arenen fallenden Deckenlichtes in der Klimakammer wurde ein dicker schwarzer Vorhang vor den Arenen angebracht. Somit wurden die Arenen ausschließlich von oben, von dem Licht in dem Regal, bestrahlt. Die festgelegten Positionen sind in Abbildung 3.1 eingezeichnet, Position 1 befindet sich an der Wand und Position 4 auf der Seite des Vorhangs.

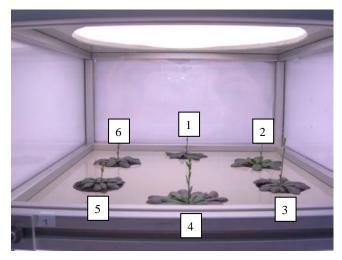


Abb. 3.1: Kleine Arena mit drei abgeklebten Seitenwänden und Positionsbezeichnung

3.3 Vorversuche mit den kleinen Arenen

3.3.1 Optimaler Luftaustausch

Ein erster Test sollte zeigen, ob ein Luftaustausch in der Arena zur Vermeidung von Kondenswasser erforderlich sein würde. Dazu standen sechs Pflanzen für einen Tag in der geschlossenen Arena. Es zeigte sich schnell, dass sich sehr viel Kondenswasser, vor allem auf dem Boden, bildete. Aus diesem Grund wurde zunächst an zwei gegenüberliegenden Arenaseiten ein Loch herausgeschnitten und mit Gaze zugeklebt, damit die Blattläuse die Arena nicht verlassen konnten. Mit dieser Veränderung kondensierte zwar weniger Wasser, allerdings war der Boden immer noch zu nass, um Blattlausexperimente durchführen zu können. Außerdem könnte so ein Luftstrom durch die Arena ziehen, der die abgegebenen Duftstoffe der Pflanzen verwirbelt und so die Wahl der Blattläuse beeinflusst. Aus diesen Gründen wurden wieder geschlossene Seitenwände eingebaut und eine große kreisförmige Fläche aus dem Deckel entfernt um einen Luftaustausch zu ermöglichen. Die Öffnung wurde mit Gaze zugeklebt, damit ein Entkommen der Blattläuse verhindert wird. Ein weiterer Test mit sechs Pflanzen, welche über Nacht in der geschlossenen Arena standen, ergab, dass sich nun kein Kondenswasser in der Arena bildete. Lediglich zwischen den Blättern und der Erde sammelte sich etwas kondensiertes Wasser. Für die folgenden Vorversuche wurden für alle drei Arenen Deckel mit einem Lüftungsloch angefertigt und verwendet.

3.3.2 Vorversuch zum Testen der Methode

Fragestellungen:

Da die kleinen Arenen erstmalig für Blattlaus-Wahlexperimente genutzt werden sollten, musste zunächst sicher gestellt werden, dass die Methode bezüglich der Wirtswahl funktioniert. Im ersten Vorversuch sollten deshalb folgende drei Hauptfragen geklärt werden:

- 1. Wählen die Blattläuse eine Wirtspflanze? Voraussetzung dafür ist, dass die Blattläuse in der Lage sind, die Petrischale zu verlassen, auf dem Boden der Arena umher zu laufen, die Pflanzen wahrzunehmen und diese zu besiedeln.
- 2. Ist eine Hungerzeit vor dem Einsetzen in die Arena nötig? Da Blattläuse einige Zeit ohne Nahrung auskommen, wäre es denkbar, dass sie zunächst in der Petrischale verweilen oder sich nach dem Umsetzen in Thanatose befinden, bevor sie auf Nahrungssuche gehen. Es wäre ebenfalls möglich, dass die Blattläuse erst ziellos in der Arena umherlaufen und bei aufkommendem Nahrungsbedürfnis die nächstliegende Pflanze aufsuchen. Dies würde die Experimente eventuell unnötig verlängern und zu einem falschen Ergebnis führen.
- 3. Bleiben die Blattläuse bei ihrer ersten Pflanzenwahl oder testen sie erst mehrere Wirte, bevor sie sich dauerhaft für eine Wirtspflanze entscheiden? Es ist wichtig, sicher zu stellen, dass die Blattläuse nach dem Experimentende ihren endgültigen Wirt gewählt haben. Befinden sie sich zu dieser Zeit noch in ihrer Wahlphase, hat das Ergebnis weniger Aussagekraft. Aus diesem Grund soll gleich zu Beginn des Experimentes das Verhalten und die Pflanzenwahl der Blattläuse beobachtet und mit der Verteilung am Ende des Experiments verglichen werden.

Des Weiteren sollten erste Anhaltspunkte gesammelt werden, ob es Unterschiede in der Wirtspflanzenwahl bezüglich der drei verschiedenen Pflanzen-Genotypen (FS 9-2 mit einer relativ hohen, FS 11-4 mit einer relativ geringen und Col-0 mit keiner Farnesen-Produktion) gibt.

Um zu testen, ob der Blattlausbefall von 24 Stunden die EBF-Produktion der Pflanzen beeinflusst, wurden zusätzlich Duftstoffanalysen durchgeführt. Falls sich die abgegebene Menge an Farnesen durch die Besiedlung von Blattläusen verändert, hätte dies möglicherweise Konsequenzen auf die Wirtswahl anderer Blattläuse und die Daten wären nicht mehr voneinander unabhängig.

Durchführung:

Damit genügend gleichaltrige Blattläuse für das Experiment zur Verfügung standen, wurden zehn Tage vor dem Experiment 15 adulte Blattläuse auf zwei Pflanzen (einmal sieben und einmal acht Blattläuse pro Pflanze) verteilt. Die adulten Blattläuse konnten nun Nachkommen produzieren, bevor sie nach zwei Tagen wieder entfernt wurden.

Nach acht Tagen konnte mit den gleichaltrigen, adulten Nachkommen das Experiment durchgeführt werden.

In diesem Versuch wurden drei kleine Arenen (im Folgenden als Arenen 1-3 bezeichnet) gleichzeitig benutzt. In den Arenen standen sich jeweils zwei Col-0-Pflanzen, zwei FS 11-4-Pflanzen und zwei FS 9-2-Pflanzen kreisförmig gegenüber, wobei in jeder Arena ein anderer Genotyp auf der jeweiligen Position stand. In jede der Arenen wurden 15 Blattläuse in einer kleinen Petrischale (Durchmesser 5,5 Zentimeter) in die Mitte auf den Boden gesetzt und etwa 45 Minuten beobachtet und notiert, wie viele Blattläuse zu den Pflanzen gingen (erste Wahl). Nach 24 Stunden wurden die Pflanzen abgesucht und die Blattlausanzahl pro Pflanze notiert (zweite Wahl). Um zu testen, ob sich die Verteilungen nach der ersten und zweiten Wahl signifikant voneinander unterscheiden, wurde mit dem Statistikprogramm R (Version 2.8.1, The R Foundation for Statistical Computing) ein Chi-Quadrat-Test (χ^2) durchgeführt.

Ebenfalls mit R wurde analysiert, ob der Anteil der Blattläuse auf den Pflanzen von den unten aufgelisteten Faktoren und deren Interaktionen abhängig war. Dazu wurden Generalisierte Lineare Modelle (GLM) mit einer quasibinomialen Fehlerstruktur benutzt. Die Modelle wurden durch schrittweises Entfernen nichtsignifikanter Werte vereinfacht (Crawley 2007). Da es nur drei Wiederholungen gab, ist die Stichprobenzahl nicht sehr repräsentativ und die Ergebnisse müssen dementsprechend vorsichtig bewertet werden. Folgende Faktoren wurden auf deren Einfluss bei der ersten und zweiten Wahl getestet:

- Genotyp: Col-0, FS 11-4, FS 9-2
- EBF: EBF vorhanden (FS 11-4 und FS 9-2), beziehungsweise nicht vorhanden (Col-0)
- Farnesen-Menge: gibt die relativ zum Standard gemessene Menge an EBF an, die pro Pflanze während der Duftstoffsammlung abgegeben wurde; statistische Analyse wurde mit dem Mittelwert der Duftstoffsammlungen vor und nach dem Experiment durchgeführt, da laut t-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den abgegebenen Mengen vor und nach dem Experiment besteht
- Arena: Arena 1, 2, 3
- Position: Positionen 1 bis 6 in der Arena

Für den Vergleich der Duftstoffanalysen wurden sowohl vor, als auch nach dem Versuch die Pflanzen für zwei Stunden (jeweils von 15:45 Uhr bis 17:45 Uhr) einer Duftstoffsammlung unterzogen (Beschreibung der Duftstoffsammlung im Kapitel "4 Material und Methoden des Hauptexperimentes"). Bei der Eluierung der Duftstoffe mit n-Hexan wurde zusätzlich ein Mikrogramm (+)-Cuparen als interner Standard hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe der Gas-Chromatographie und Massenspektrometrie (Beschreibung ebenfalls im Kapitel "4 Material und Methoden des Hauptexperimentes") analysiert. Zur Berechnung der gemessenen Farnesen-Menge wurden die Peakflächen von (*E*)-β-Farnesen und (+)-Cuparen aus dem Totalionenstrom-Chromatogramm (TIC) integriert und zueinander ins Verhältnis gesetzt (EBF/int. Std.). Um festzustellen, ob es für die jeweilige transgene Linie einen signifikanten Unterschied zwischen der Duftstoffsammlung vor und nach dem Experiment gibt, wurde der t-Test mit R benutzt.

Ergebnisse:

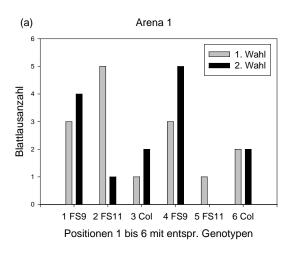
In allen drei Arenen konnte beobachtet werden, dass etwa zwei Drittel der Blattläuse innerhalb der ersten zehn Minuten losliefen und direkt ihre Wirtspflanze wählten. Spätestens nach 30 bis 40 Minuten befanden sich die meisten Blattläuse auf den Pflanzen, die sie auch (bis auf eine Ausnahme) in dieser Zeit nicht verließen.

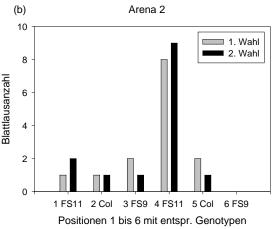
Auch nach 24 Stunden (entspricht der zweiten Wahl) hat sich die Verteilung der Blattläuse in den Arenen 2 und 3 statistisch nicht signifikant verändert (Arena $2\chi^2 = 2.8$; p = 0.73; Arena 3: $\chi^2 = 0.156$; p = 0.9995; Abb. 3.2). In Arena 1 dagegen sind die Blattlaus-Verteilungen zwischen der ersten und zweiten Wahl laut Chi-Quadrat-Test voneinander verschieden ($\chi^2 = 21.64$; p = 0.0006).

Es konnten auf fast allen Pflanzen Blattläuse gefunden werden, wobei die Verteilung der Blattläuse sowohl innerhalb der Arenen, als auch zwischen ihnen stark schwankte (Abb. 3.2). Auffällig sind dabei die Position 4 in Arena 2 (FS 11-4-Pflanze) und Position 3 in Arena 3 (ebenfalls eine FS 11-4-Pflanze). Auf beiden Pflanzen wurde jeweils etwa die Hälfte aller eingesetzten Blattläuse wiedergefunden (sowohl bei der ersten, als auch bei der zweiten Wahl). Bei Betrachtung der gesamten Blattlausverteilung über die Genotyp-Linien spiegelt sich diese ungleiche Verteilung ebenfalls wider (Abb. 3.3). Auf den FS 11-4-Pflanzen wurde etwa die Hälfte der eingesetzten Blattläuse gezählt (nach

der ersten Wahl 25 von 45, nach der zweiten Wahl 22 von 45 Blattläusen). Während auf diesem Genotyp durchschnittlich vier Blattläuse pro Pflanze gefunden wurden, waren es auf den Wildtyp- und FS 9-2-Pflanzen im Durchschnitt jeweils höchstens zwei (Abb. 3.3). Jedoch hatte der Pflanzen-Genotyp nur bei der ersten Wahl einen signifikanten Einfluss auf die Blattlausverteilung (F = 6,231; p = 0,002) (Tab. 3.1). Alle anderen Faktoren und deren Interaktionen spielten keine Rolle bei der Wirtswahl.

Die durchschnittlichen Differenzen zwischen den Duftstoffsammlungen vor und nach dem Experiment sind für beide transgenen Linien (FS 9-2 und FS 11-4) sehr gering (Abb. 3.4). Der t-Test bestätigt keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden EBF-Messreihen, weder für die FS 9-2-Linie ($t=0,415,\ p=0,695$), noch für die FS 11-4-Linie ($t=-1,102,\ p=0,332$).





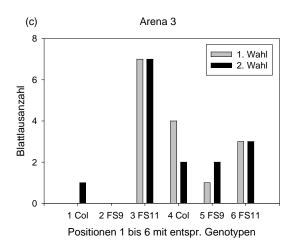


Abb. 3.2: Blattlausverteilungen auf den Pflanzen in allen drei Arenen (a-c); erste Wahl (grau) entspricht der Verteilung kurz nach dem Start, zweite Wahl (schwarz) bezieht sich auf die Verteilung nach 24 Stunden; Abkürzungen: Col = Col-0; FS9 = FS 9-2; FS11 = FS 11-4

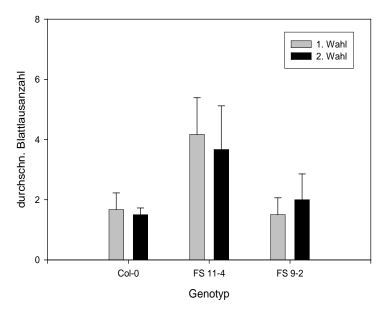


Abb. 3.3: Überblick über die durchschnittliche Blattlausanzahl nach der ersten, beziehungsweise zweiten Wahl auf den verschiedenen Pflanzen-Genotypen (Mittelwerte und Standardfehler)

Tab. 3.1: Ergebnisse der Devianzanalyse (GLM) zum Vorversuch 3.3.2 für die erste und zweite Wahl

Erste Wahl	Df	Resid. Df	F	p
Farnesen-Menge	11	2	0,000	1,000
Arena	1	14	0,000	1,000
Position	1	14	0,026	0,871
EBF	1	16	2,820	0,093
Genotyp	2	15	6,231	0,002

Zweite Wahl	Df	Resid. Df	F	p
Farnesen-Menge	11	2	0,000	1,000
Arena	1	14	7,105 e-15	1,000
Position	1	14	0,006	0,937
EBF	1	16	3,814	0,051
Genotyp	1	15	3,710	0,054

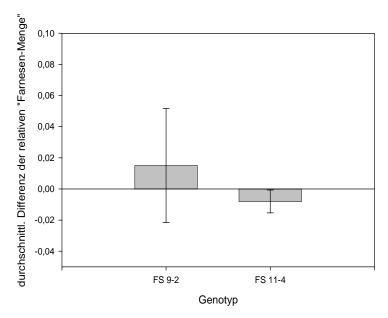


Abb. 3.4: Durchschnittliche Differenz der EBF-Messwerte vor und nach dem Experiment mit Standardfehler für beide EBF-produzierenden transgenen Linien ("Farnesen-Menge" wurde relativ zum Standard berechnet, entspricht dem Quotienten der integrierten Peakflächen des Farnesens und des internen Standards)

Diskussion:

Das Experiment diente vorrangig dazu, einen ersten Eindruck vom System, dem Funktionieren des Setups und der Durchführung zu gewinnen.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Prinzip des Versuches funktioniert, die Blattläuse wählten eine Wirtspflanze. Dabei sind die Blattläuse zügig und direkt auf eine Pflanze zugelaufen. Eine "Hungerzeit" vor dem Einsetzten ist in den späteren Versuchen also nicht nötig. Da sie im beobachteten Zeitraum von 45 Minuten ihre Pflanze nicht wieder verließen und auch der Vergleich von erster und zweiter Pflanzenwahl in den Arenen 2 und 3 keine signifikante Veränderung in der Verteilung zeigte, wurde während des Hauptexperimentes auf die Beobachtungszeit am Anfang verzichtet und lediglich die Endverteilung nach 24 Stunden notiert. Dass es in der Arena 1 einen signifikanten Unterschied zwischen der ersten und zweiten Wahl gab, lag vorrangig an der FS 11-4 Pflanze auf Position 2, von der vier von fünf Blattläusen nach der ersten Wahl wieder abgewandert sind (Abb. 3.2a). Es könnte sein, dass die Blattläuse zunächst optisch zu Position 2 angelockt (genaue Erklärung weiter unten) und später olfaktorisch durch das EBF abgeschreckt wurden. Auf den anderen Pflanzen derselben Arena sind die Unterschiede zwischen erster und zweiter Wahl im Bereich von null bis zwei Blattläusen pro Pflanze und somit ähnlich, wie in den anderen beiden Arenen.

Die transgene Linie FS 11-4 wurde bei der ersten Wahl von den Blattläusen nachweislich bevorzugt. Im Durchschnitt befanden sich auf diesen Pflanzen zum Teil mehr als doppelt so viele Blattläuse wie auf den anderen zwei Genotyp-Linien (Abb. 3.3). Da sich die FS 11-4-Pflanzen durch eine hohe EBF-Abgabe von den anderen zwei Linien unterscheidet, wurden die Blattläuse anscheinend von dem Farnesen angelockt. Die zweite Wahl der Blattläuse wurde jedoch nicht bedeutend vom Genotyp der Pflanzen beeinflusst. Es waren zwar immer noch mehr Blattläuse auf den FS 11-4-Pflanzen zu finden, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Bei Betrachtung von Abbildung 3.2 fällt auf, dass in den jeweiligen Arenen immer eine bestimmte Position mit einer FS 11-4-Pflanze bevorzugt gewählt wurde (in Arena 1: Position 2, in Arena 2: Position 4 und in Arena 3: Position 3). Demnach liegt der Schluss nahe, dass die Blattläuse zusätzlich von einem attraktiven, externen Faktor beeinflusst wurden, wie eventuell dem schwarzen Vorhang, der zur Abschirmung des Deckenlichts angebracht wurde. Aus diesem Grund sollte im nächsten Versuch der Vergleich zwischen einer "offenen" Arena, in der die Blattläuse die Umgebung außerhalb der Arena wahrnehmen können (wie sie in diesem Versuch verwendet wurde) und einer mit Papier zugeklebten Arena (Beschreibung siehe unten) stattfinden.

Da der Vergleich beider Duftstoffsammlungen keine signifikanten Unterschiede aufwies, kann davon ausgegangen werden, dass der Blattlausbefall keine Änderung in der EBF-Produktion bewirkte und somit die Wirtswahl nicht beeinflusste. Für die nächsten Experimente mit einer Duftstoffsammlung ist es somit ausreichend, wenn diese nur einmal, zum Beispiel nach dem Versuch, durchgeführt wird.

3.3.3 Vorversuch zur optischen Ablenkung

Fragestellung:

Um die optische Ablenkung von externen Faktoren, wie zum Beispiel des Vorhangs, zu vermeiden, wurden in diesem Experiment alle Seitenwände einer Arena mit weißem Papier zugeklebt. In einem Vergleich mit einer nicht zugeklebten Arena sollte herausgefunden werden, ob sich die Blattläuse durch die optische Beeinflussung anders auf die Pflanzen verteilen. Außerdem sollte beobachtet werden, ob es eine Veränderung im

Verhalten der Blattläuse gibt, wenn sie einzeln anstatt in Gruppen in die Arena gesetzt werden.

Durchführung:

Dieses Experiment wurde in vier Durchgänge unterteilt. Die ersten zwei Durchgänge fanden in einer "offenen" kleinen Arena statt, das heißt, die Seitenwände waren nicht zugeklebt und die Blattläuse konnten somit die Umgebung außerhalb des Käfigs optisch wahrnehmen. Die anderen zwei Durchgänge wurden in einer mit weißem Papier zugeklebten Arena durchgeführt.

In allen Durchgängen wurden 15 gleichaltrige Blattläuse (ebenfalls Nachkommen aus der Anzucht zum Versuch 3.3.2) in die Mitte der Arena gesetzt, dieses Mal jedoch einzeln nacheinander und mit ausschließlich Col-0-Pflanzen zur Wahl. Nachdem eine Blattlaus eine Pflanze gewählt hatte, wurde sie entfernt, die Wahl notiert und die nächste Blattlaus in die Mitte gesetzt. Hatte eine Blattlaus nach zehn Minuten noch keine Pflanze gewählt, wurde sie entfernt und nicht in die Datenaufnahme mit einbezogen. Somit kam die letzte der 15 Blattläuse erst 60 bis 90 Minuten später an die Reihe und hatte solange gehungert. Die vier Durchgänge wurden nacheinander mit denselben Pflanzen (immer an derselben Position) und jeweils 15 neuen Blattläusen durchgeführt. Die Blattlausverteilungen in den vier Durchgängen wurden mit R analysiert. Da es sich um eine kleine Stichprobenzahl handelte, wurde der Exakte Fisher-Test angewandt, um zu testen, ob die Verteilung der Blattläuse gleichmäßig auf die Pflanzen stattgefunden hat.

Ergebnisse:

In der abgeschirmten Arena war die Verteilung der Blattläuse auf die Pflanzen gleichmäßiger als in der nicht-abgeschirmten Arena (Abb. 3.5). Die Unterschiede in der Blattlausanzahl pro Pflanze waren in der "offenen" Arena größer (null bis fünf Blattläuse pro Pflanze) als in der zugeklebten Arena (ein bis drei Blattläuse pro Pflanze). Während die Verteilung der Blattläuse in der "offenen" Arena signifikant von einer Gleichverteilung abwich (p = 0.045), entsprach die Blattlausverteilung in der abgeschirmten Arena einer Gleichverteilung (p = 0.308).

Es konnte nicht beobachtet werden, dass sich die Blattläuse in diesem Versuch an einer möglichen Duftspur ihrer Vorgänger orientiert haben. Auch sonst gab es keinen Anhaltspunkt, dass sich die einzeln eingesetzten Blattläuse anders verhielten, als ihre Artgenossen, die gleichzeitig in die Arena gesetzt wurden.

In allen vier Durchgängen sind die Blattläuse, die zuletzt in die Arena gesetzt wurden und somit bereits eine Stunde warten und hungern mussten, viel schneller (meist unter einer Minute) und zielgerichteter losgelaufen, als die ersten Blattläuse. Außerdem wurde festgestellt, dass die Blattläuse in der abgeschirmten Arena insgesamt sehr viel mehr Zeit brauchten (bis zu zehn Minuten pro Blattlaus), um ihren Wirt zu wählen. Sie liefen häufiger im Kreis und orientierten sich neu.

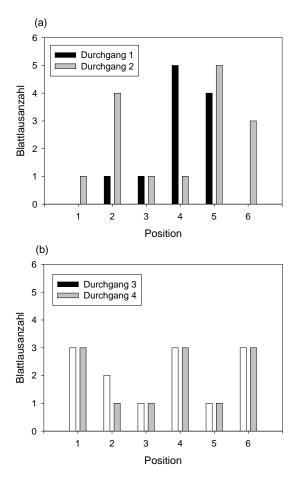


Abb. 3.5: Blattlausverteilungen in einer "offenen" (a) und in einer abgeschirmten (b) Arena

Diskussion:

Wie gezeigt wurde, haben sich die Blattläuse in einer "offenen" Arena in ihrer Pflanzenwahl anscheinend von einem externen optischen Faktor beeinflussen lassen, da hier

die Verteilung nicht gleichmäßig stattfand (Abb. 3.5a). Dass die Wirtswahl sehr stark optisch bestimmt wird, konnte schon oft nachgewiesen werden (Dilawari *et al.* 1989; Doering *et al.* 2004) und auch in diesem Experiment war der visuelle Reiz offensichtlich sehr attraktiv. Dieser Störfaktor konnte durch das Abschirmen der Arena mit weißem Papier beseitigt werden. Die Aufteilung der Blattläuse fand nun gleichmäßig auf alle Pflanzen statt (Abb. 3.5b).

Für die nächsten Versuche und vor allem für das Hauptexperiment wurden daher Arenen benutzt, die möglichst wenige Informationen von außen hereinließen, um damit alle Ablenkungsfaktoren so gering wie möglich zu halten. Der Wegfall eines Reizes durch die Abschirmung wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass die Blattläuse in den Durchgängen mit der abgeklebten Arena länger brauchten, um ihre Pflanzen zu wählen. Das heißt, dass der externe visuelle Faktor in einer "offenen" Arena vorrangig die Laufrichtung bestimmte und sehr schnell zu einer Anlockung führte. Während in einer abgeschirmten Arena nun andere Faktoren innerhalb der Arena, eventuell Duftstoffe, in diesem Fall (*E*)-β-Farnesen, eine wichtige Rolle bei der Orientierung gespielt haben dürften.

Es scheint keinen Unterschied im Verhalten der Blattläuse gegeben zu haben, abhängig davon, ob sie zusammen oder einzeln in die Arena gesetzt wurden. Das bedeutet, in beiden Fällen sind die einzelnen Individuen selbstständig und ohne Beeinflussung durch Artgenossen, die entweder gleichzeitig in der Arena waren oder eventuell schon vorher eine Spur legen konnten, auf die Pflanzen zugelaufen. Im Hauptversuch wurden deshalb alle 15 Blattläuse gleichzeitig in die Arena gesetzt.

Da die Blattläuse auch ohne Hungern relativ schnell auf Wirtssuche gingen, spielt die Beobachtung, dass ein längeres Warten ohne Nahrung die Suche beschleunigte, keine große Rolle in den folgenden Experimenten.

3.4 Große Arena

Im Hauptexperiment sollten sowohl ungeflügelte, als auch geflügelte Blattläuse getestet werden. Für Experimente mit geflügelten Morphen war eine größere Arena notwendig, damit sie ihre Wirte im Flug, das heißt "von oben" wählen konnten.

Die große Arena (Abb. 3.6) wurde speziell für diese Blattlaus-Experimente angefertigt und in den folgenden Vorversuchen, insbesondere im Hauptexperiment, verwendet. An der Außenseite war die Arena 76 Zentimeter lang und 76 Zentimeter breit, sie stand auf vier Füßen von je 15 Zentimeter Länge, die Höhe betrug 72,5 Zentimeter (ohne Füße). Die Seitenwände der Arena wurden aus Plexiglas gebaut und für die Experimente mit weißem Papier zugeklebt. In der beigen Bodenplatte befanden sich sechs Löcher (Durchmesser jeweils 10,5 Zentimeter), in die die Pflanzen im gleichen Abstand zu einander (20 Zentimeter von Topf- zu Topfmittelpunkt) in kreisförmiger Anordnung hineingestellt werden konnten (Abb. 3.6c). Der Abstand vom Topf- zum Arenamittelpunkt betrug etwa 25 Zentimeter. Die Positionen wurden wie in der Abbildung eingezeichnet festgelegt, wobei sich die Positionen 3 und 4 in Richtung der Klimakammermitte befanden. Der abnehmbare Deckel hatte zum besseren Luftaustausch ebenfalls sechs Löcher (Durchmesser jeweils 12,5 Zentimeter, genau über den Pflanzen), die mit Gaze zugeklebt waren. In der Mitte der Bodenplatte wurde ein Metallstab von 35,5 Zentimeter Höhe angebracht, auf dem eine kleine Petrischale Platz fand, von der aus die geflügelten Blattläuse ihren Flug starten konnten. Für die Experimente mit ungeflügelten Blattläusen wurde der Stab entfernt und die Petrischale auf den Boden gestellt, so dass die Blattläuse auf der Bodenplatte zu ihren Wirtspflanzen laufen konnten.

Die Beleuchtung der Arena erfolgte durch neun Leuchtstoffröhren (Osram L 36 Watt/965 Biolux), die etwa 50 Zentimeter über dem Arenadeckel an einem Lichttisch angebracht wurden. Somit wurden alle Pflanzen mit annähernd derselben Lichtintensität (~50 µmol) bestrahlt.



Abb. 3.6a: Große Arena ohne Pflanzen und ohne Abdeckung



Abb. 3.6b: Große Arena unter dem Lichttisch, mit weißem Papier zugeklebt und Bettlacken auf drei Seiten

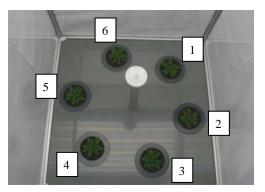


Abb. 3.6c: Große Arena mit Pflanzen und eingezeichneten Positionen



Abb. 3.6d: Perspektive auf die Pflanzen nahe über dem Arenaboden, Petrischale in der Arenamitte

3.5 Vorversuche mit der großen Arena

3.5.1 Wirtswahl geflügelter Blattläuse

3.5.1.1 Erster Versuch

Fragestellung:

Wie bereits bei den kleinen Arenen, musste zu Beginn getestet werden, ob der Versuchsaufbau und die übertragene Methode der Wirtswahl auch in der großen Arena und vor allem auch mit geflügelten Blattläusen funktioniert. Dabei wurden zunächst ausschließlich Wildtyp-Pflanzen verwendet, um olfaktorische Reize auszuschließen.

Durchführung:

Die Anzucht der geflügelten Blattläuse erfolgte wie bereits beschrieben (Kapitel "3.1 Anzucht der Blattläuse und Pflanzen für die Vorexperimente"). Da geflügelte Blattläuse getestet wurden, musste der Verlängerungsstab, auf dem die Petrischale mit den 15 geflügelten Blattläusen positioniert wurde, in die Arena eingebaut werden. Die gleichaltrigen Blattläuse konnten zwischen sechs Col-0 Pflanzen wählen. Gleich nach dem Start des Experimentes wurden die Blattläuse für 15 Minuten beobachtet. Die geflügelten Morphen hatten insgesamt 24 Stunden Zeit, ihren Wirt zu wählen, danach wurden die Pflanzen abgesucht und die Ergebnisse notiert.

Um zu testen, ob die Verteilung der Blattläuse gleichmäßig auf die Pflanzen erfolgte, wurde der Exakte Fisher-Test mit R angewandt.

Ergebnisse:

Ausschließlich auf den Pflanzen auf den Positionen 2 bis 4 befanden sich Blattläuse, wobei auf Position 3 die meisten Blattläuse zu finden waren (Abb. 3.7). Es fand eine ungleiche Verteilung (p = 0.005) der Blattläuse auf den Pflanzen statt.

In den ersten 15 Minuten des Experimentes, in denen das System beobachtet wurde, fiel zunächst auf, dass gleich nach dem Start drei Blattläuse sofort losgeflogen sind, sich allerdings die nächsten Minuten nur in einer Ecke (bei Position 3) am Deckelrand auf-

hielten. Drei andere Blattläuse sind in der Beobachtungszeit auf dem Rand der Petrischale herumgelaufen, der Rest der Blattläuse hat sich in dieser Zeit nicht bewegt.

Drei Blattläuse befanden sich nach den 24 Stunden tot in der Petrischale, drei andere Blattläuse wurden tot in einer Käfigspalte zwischen Wand und Boden gefunden.

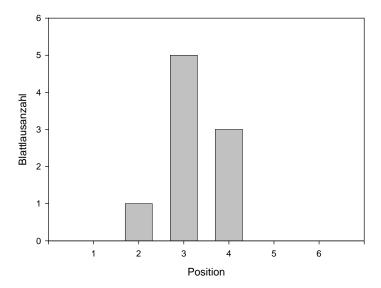


Abb. 3.7: Verteilung der Blattläuse nach dem ersten Versuch in der großen Arena (nach 24 Stunden)

Diskussion:

Die Verteilung der Blattläuse auf den Pflanzen und das Verhalten der losgeflogenen Blattläuse zeigen eindeutig, dass die Blattläuse wieder von einem unbekannten Faktor angezogen wurden, der wahrscheinlich besonders in der Nähe von Position 3 wirkte. Da diese Seite der Arena der Klimakammer zugewandt war, haben vermutlich die Deckenlampen zu einer Ablenkung geführt.

Außerdem ist bedenklich, dass so viele Blattläuse bei diesem Versuch tot aufgefunden wurden. Die Blattläuse in der Petrischale könnten eventuell beim Transport verletzt worden sein. Bei den nächsten Versuchen wurde mit den geflügelten Blattläusen besonders vorsichtig umgegangen. Gegen die Todesursache am Käfigrand wurde ebenfalls vorgegangen, indem die Spalte verschlossen wurde.

3.5.1.2 Zweiter Versuch

Fragestellung:

Verteilen sich die Blattläuse gleichmäßig auf die Col-0 Pflanzen, wenn eine Ablenkung durch die Deckenlampen der Klimakammer ausgeschlossen wird? Dazu wurde Experiment 3.5.1.1 mit verändertem Versuchsaufbau noch einmal durchgeführt.

Durchführung:

Bis auf kleine Veränderungen war die Durchführung dieses Versuches dieselbe wie im vorherigen Experiment. Verändert wurde zum Einen die Position des Käfigs, der nun genau mittig unter dem Lichttisch positioniert war. Damit wurden die Pflanzen und die Seiten außerhalb des Käfigs gleichmäßig bestrahlt. Zum Anderen wurden die Deckenlampen in der Klimakammer mit einem dicken schwarzen Vorhang zugehangen, um eine ablenkende optische Orientierung der Blattläuse zu vermeiden. Des Weiteren wurden Bettlaken am Lichttisch angebracht, die eine optische Ablenkung zwischen dem Tisch und der Arena verhindern sollten. Damit die Blattläuse nicht wieder in die Käfigspalten laufen konnten, wurden alle Kanten mit weißem Kreppband abgeklebt.

Für diesen Versuch konnten die sechs Pflanzen aus dem vorherigen Versuch benutzt werden. Diesmal wurden sie jedoch jeweils genau an der gegenüberliegenden Position in der Arena angeordnet. 15 geflügelte Blattläuse wurden auf die erhöhte Petrischale in die Arena gesetzt und nach 24 Stunden von den Pflanzen abgesammelt und die Verteilung notiert.

Der Exakter Fisher Test sollte Aufschluss über die gleichmäßige Verteilung der Blattläuse auf die Pflanzen geben.

Ergebnisse:

Alle bis auf eine Pflanze (Position 4) wurden angeflogen und besiedelt (Abb. 3.8). Die Verteilung der Blattläuse auf die Pflanzen erfolgte gleichmäßig (p = 0.217).

Kurze Zeit nach dem Öffnen der Petrischale flogen die ersten Blattläuse nach oben, gegen den Deckel, ohne eine bestimmte Vorzugsrichtung.

Eine Blattlaus lag nach den 24 Stunden tot in der Petrischale, eine andere wurde nicht wieder gefunden.

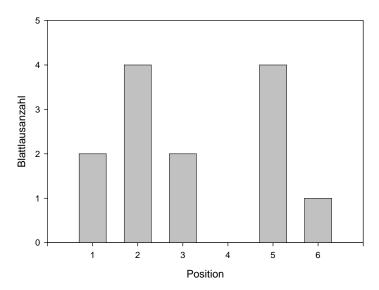


Abb. 3.8: Verteilung der Blattläuse nach dem zweiten Versuch in der großen Arena (nach 24 Stunden)

Diskussion:

Die Graphik in Abbildung 3.8 lässt vermuten, dass die Blattläuse keine Position besonders bevorzugten. Die Gleichverteilung der Blattläuse auf die Pflanzen wird von dem statistischen Test bestätigt. Da die Blattläuse nach dem Start keine Richtung bevorzugten, ist anzunehmen, dass keine Ablenkungsfaktoren mehr vorhanden waren. Das Setup und die Methode funktionieren demnach.

Die Mortalitätsrate ist akzeptabel.

3.5.2 Wirtswahl mit transgenen Pflanzen

Fragestellung:

Nun sollte in einem letzten Vorversuch getestet werden, ob auch ungeflügelte Blattläuse in der Lage sind, in der großen Arena ihre Wirtspflanzen aufzufinden. Um das System annähernd so zu testen, wie es dann im Hauptexperiment angewandt werden sollte, wurden in diesem Vorversuch transgene Pflanzen benutzt und neben den ungeflügelten,

auch geflügelte Blattläuse untersucht. Die Pflanzen wurden, wie für das Hauptexperiment geplant, einer Duftstoffsammlung unterzogen.

Durchführung:

Das Vorexperiment gliederte sich in zwei Durchgänge, einer mit geflügelten und einer mit ungeflügelten Blattläusen, wobei ein Durchgang drei Replikate (an drei aufeinanderfolgenden Tagen) mit anschließender Duftstoffsammlung umfasste.

Bei diesem Vorexperiment standen sich jeweils zwei Col-0-, FS 11-4- und FS 9-2-Pflanzen kreisförmig in der Arena gegenüber. Die Pflanzen wurden jeden Tag, das heißt nach jedem Replikat, eine Position weiter gestellt, so dass nach drei Replikaten alle drei Genotypen einmal auf jeder Position standen. Jeden Vormittag wurden 15 gleichaltrige geflügelte, beziehungsweise ungeflügelte Blattläuse vorsichtig mit einem Pinsel in eine kleine Petrischale umgesetzt und in die Mitte der Arena gestellt. Von dort konnten sich die Blattläuse frei in der Arena bewegen und ihre Wirtspflanze wählen. Bei den geflügelten Blattläusen befand sich die Petrischale auf einem erhöhten Podium. Etwa 24 Stunden später mussten die Pflanzen aus der Arena herausgenommen und vorsichtig nach Blattläusen abgesucht werden. Die gefundenen Blattläuse wurden von den Pflanzen entfernt und gezählt. Nach drei aufeinanderfolgenden Replikaten mit denselben Pflanzen und jeweils 15 neuen Blattläusen kamen die Pflanzen am vierten Tag für sechs Stunden (jeweils von 13 Uhr bis 19 Uhr) in ein Duftstoffsammelsystem. Die Proben wurden später an einem Gas-Chromatographen mit Massenspektrometer analysiert (Beschreibung der Duftstoffsammlung und der GC-MS im Kapitel "4 Material und Methoden des Hauptexperimentes"). Um die von den Pflanzen abgegebenen Mengen an EBF vergleichen zu können, wurde für jede Messung die Peakfläche der extrahierten Ionenspur m/z 93 integriert. Dieses Fragment wurde ausgewählt, da es zum Einen charakteristisch für das (E)-β-Farnesen ist und zum Anderen relativ häufig vorkommt. Dieser Wert wird im Folgenden als "Farnesenwert" bezeichnet.

Mögliche Einflussfaktoren auf die Wirtswahl der Blattläuse wurden mit R überprüft. In einem Generalisierten Linearen Modell mit quasibinomialer Fehlerstruktur wurden die Faktoren Pflanzen-Genotyp, Pflanzen-Position, EBF-Vorhandensein und die Interaktionen von allen drei Faktoren in Abhängigkeit von der Blattlausverteilung getestet. Dabei fand eine Modelsimplifizierung statt, in dem schrittweise alle nichtsignifikanten Fakto-

ren beseitigt wurden (Crawley 2007). Der Faktor "Farnesenwert" wurde nicht in die GLM-Berechnung mit einbezogen, da jeweils nur eine Duftstoffsammlung für die Versuche mit den geflügelten und ungeflügelten Blattläusen durchgeführt wurde und die Stichprobenzahl somit zu klein war.

Ergebnisse:

Die Pflanzen-Genotypen unterscheiden sich erheblich in ihrer Farnesen-Produktion (Abb. 3.9). Es ist deutlich zu erkennen, dass die FS 9-2-Pflanzen größere Peakflächen aufweisen und somit mehr EBF produzierten, als die FS 11-4-Pflanzen. Die Wildtyp-Pflanzen weisen hingegen keine oder nur sehr kleine Farnesen-Peaks auf, so dass deren integrierte Flächen im Vergleich zu denen der transgenen Pflanzen sehr gering sind.

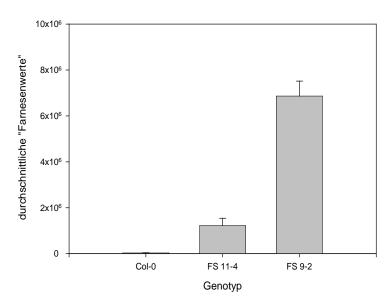


Abb. 3.9: Durchschnittliche "Farnesenwerte" (integrierte Peakfläche der extrahierten Ionenspur m/z 93) der einzelnen Pflanzen-Genotypen (Mittelwerte mit Standardfehler)

Die meisten ungeflügelten Blattläuse (43 von 45) konnten eine Wirtspflanze besiedeln. Die durchschnittliche Blattlausanzahl (ungeflügelter Morphen) auf den verschiedenen Pflanzen-Genotypen war sehr ähnlich (Abb. 3.10). Bei genauerer Betrachtung lässt sich jedoch feststellen, dass die Anzahl an ungeflügelten Blattläusen auf den einzelnen Pflanzen-Genotypen je nach Position der Pflanze in der Arena schwankte (Abb. 3.11). Während der Unterschied in der Anzahl siedelnder Blattläuse auf den Wildtyp-Pflanzen sehr gering war (Minimum zwei, Maximum drei Blattläuse), schwankte die Anzahl siedelnder Blattläuse auf FS 11-4-Pflanzen stärker (ein bis drei Blattläuse) und am stärks-

ten auf FS 9-2-Pflanzen (ein bis fünf Blattläuse). Allerdings hatten die Faktoren Pflanzen-Genotyp, Position in der Arena und EBF-Vorhandensein keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung der Blattläuse (Tab. 3.2).

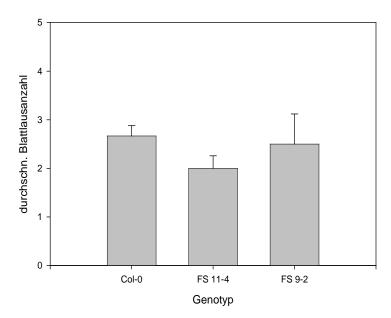


Abb. 3.10: Durchschnittliche Anzahl ungeflügelter Blattläuse auf den verschiedenen Pflanzen-Genotypen (Mittelwerte mit Standardfehler)

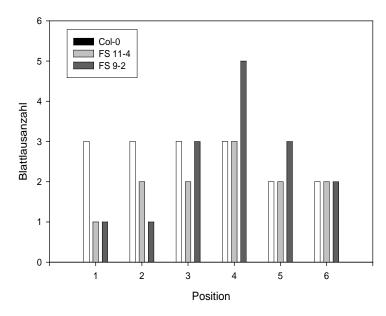


Abb. 3.11: Anzahl ungeflügelter Blattläuse auf den verschiedenen Pflanzen-Genotypen und Positionen

Tab. 3.2: Ergebnisse der Devianzanalyse (GLM) zum Vorversuch 3.5.2 für ungeflügelte Blattläuse

	Df	Resid. Df	F	p
EBF	1	16	0,986	0,344
Genotyp	2	15	1,061	0,382
Position	5	12	2,006	0,150

Auch die Mehrheit der geflügelten Blattläuse (38 von 45) war in der Lage eine Wirtspflanze zu besiedeln.

Die Anzahl geflügelter Blattläuse auf den drei Pflanzen-Genotypen lässt eine Bevorzugung der Pflanzen mit steigendem Farnesen-Gehalt erkennen (Abb. 3.12). Auf den FS 9-2-Pflanzen wurden durchschnittlich die meisten Blattläuse gefunden, während die Wildtyp-Pflanzen die wenigsten Blattläuse aufwiesen. Die Anzahlen der wiedergefundenen Blattläuse auf den einzelnen Positionen schwanken recht stark pro Genotyp (Wildtyp: 0-4; FS 11-4: 1-3; FS 9-2: 1-5 Blattläuse) (Abb. 3.13). Des Weiteren ist auffällig, dass auf Position 4 insgesamt nur drei Blattläuse gefunden wurden, während auf der benachbarten Position 5 insgesamt zwölf Blattläuse gezählt wurden.

Im Gegensatz zu den ungeflügelten Blattläusen haben hier alle drei Faktoren (EBF, Genotyp, Position) und die Interaktion "EBF: Position" einen signifikanten Einfluss auf die Wirtswahl (Tab. 3.3).

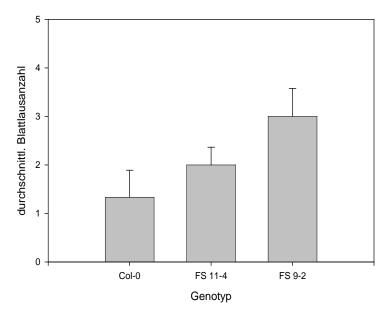


Abb. 3.12: Durchschnittliche Anzahl geflügelter Blattläuse auf den verschiedenen Pflanzen-Genotypen (Mittelwerte mit Standardfehler)

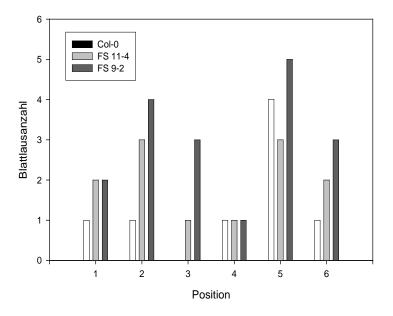


Abb. 3.13: Anzahl geflügelter Blattläuse auf den verschiedenen Genotypen und Positionen

Tab. 3.3: Ergebnisse der Devianzanalyse (GLM) zum Vorversuch 3.5.2 für geflügelte Blattläuse

	Df	Resid. Df	F	p
EBF	1	16	31,806	0,002
Genotyp	1	15	14,481	0,013
Position	5	10	17,902	0,003
EBF : Position	5	5	8,106	0,019

Diskussion:

Die Duftstoffsammlung bestätigte noch einmal die Abgabemengen an EBF für die jeweiligen Genotypen (Abb. 3.9). Während bei dem Wildtyp gar kein oder nur Spuren von EBF gemessen wurden (die kleinen Mengen an EBF sind vermutlich Verschleppungen während des Messvorgangs), konnten bei den FS 11-4-Pflanzen relativ wenig, aber deutlich vorhandene Mengen an EBF und bei den FS 9-2-Pflanzen relativ viel EBF nachgewiesen werden.

Aus den Daten geht hervor, dass auch die ungeflügelten Blattläuse in der Lage waren, ihre Wirte in der großen Arena zu wählen. Die Methode funktioniert demnach sowohl für geflügelte, als auch für ungeflügelte Blattläuse und kann im Hauptexperiment angewandt werden.

Bei den ungeflügelten Blattläusen gab es, der Devianzanalyse zufolge, keine signifikanten Einflussfaktoren (Tab. 3.2). Die getesteten Faktoren waren weder anziehend noch abschreckend bei der Wirtswahl. Demzufolge hatte auch der produzierte Duftstoff (*E*)-β-Farnesen der transgenen Pflanzen keine Rolle bei der Wirtswahl gespielt.

Hingegen hatten bei den geflügelten Blattläusen alle drei Faktoren und die Interaktion "EBF: Position" einen signifikanten Einfluss auf die Wirtswahl der Blattläuse (Tab. 3.3). Vor allem war das Vorhandensein von EBF, das heißt, ob es sich um eine transgene oder Wildtyp-Pflanze handelt, wichtig bei der Blattlausverteilung (F = 31.8) p = 0,002). Es waren durchschnittlich etwa doppelt so viele Blattläuse auf einer FS 9-2-Pflanze (Mittelwert = 3) zu finden als auf einem Wildtyp (Mittelwert = 1,3) (Abb. 3.12). Die FS 11-4-Pflanzen wiesen im Durchschnitt zwei Blattläuse pro Pflanze auf. Somit

wurden die geflügelten Blattläuse von den transgenen Pflanzen mehr angelockt als von dem Wildtyp. Dieses Phänomen konnte bereits mit ungeflügelten Blattläusen im Vorversuch 3.3.2 beobachtet werden, bei dem der Pflanzen-Genotyp ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf die Wirtswahl hatte. Es wurden ebenso die Wildtyp-Pflanzen am wenigsten besiedelt, allerdings befanden sich die meisten Blattläuse auf der anderen transgenen Linie (FS 11-4). Beide Ergebnisse entsprechen nicht den Erwartungen, demnach die Blattläuse von dem produzierten Alarmpheromon (*E*)-β-Farnesen abgeschreckt werden sollten. Da jedoch die Stichprobenzahl in beiden Experimenten relativ klein war, müssen die Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden. Möglicherweise waren bestimmte Pflanzen visuell attraktiver als andere. Im Hauptexperiment wird sich zeigen, ob sich die Beobachtung bestätigt, dass geflügelte Blattläuse von EBF-produzierenden Pflanzen angelockt werden.

Des Weiteren ist die Position der Pflanzen in der Arena für die Wirtswahl von geflügelten Blattläusen von Bedeutung (F = 17,9, p = 0,003). Fast ein Drittel der wiedergefundenen Blattläuse (12 von 38) waren auf Pflanzen auf der Position 5 zu finden (Abb. 3.13). Da jedoch kein Grund für die Bevorzugung gefunden werden konnte (die Position entspricht einer Wand-, beziehungsweise Eckposition in der Klimakammer, die keinerlei mögliche Einflussfaktoren aufweist, auch abschreckende Faktoren auf der gegenüber liegenden Seite konnten nicht identifiziert werden), kann das Ergebnis nicht weiter erklärt werden.

Falls sich die signifikant ungleiche Verteilung der geflügelten Blattläuse bestätigen sollte, hieße das, dass die geflügelten Blattläuse entweder durch ihre besseren Sinnesorgane oder durch ihre Position "von oben" die Pflanzen und die Arena anders wahrnehmen können als die ungeflügelten Morphen.

Da sich in den vorherigen Experimenten herausgestellt hat, dass optische Faktoren (wie zum Beispiel der schwarze Vorhang oder die Beleuchtung) eine wichtige Rolle bei der Orientierung der Blattläuse spielen können, wäre es möglich, dass visuelle Reize, die direkt von den Pflanzen ausgehen, ebenfalls einen Einfluss auf die Wirtswahl haben. Aus diesem Grund wurde mit einem Spektrophotometer getestet, ob sich die Pflanzenblätter in ihrem Reflexionsspektrum unterscheiden.

3.6 Vorversuche an dem Spektrophotometer

3.6.1 Fragestellung

Wie bereits beschrieben, spielen nicht nur der Duft, sondern auch visuelle Reize bei der Wirtswahl der Blattläuse eine wichtige Rolle (Moericke 1952; Hodgson et al. 1985; Doering et al. 2004). Untersuchungen an geflügelten Sommer-Migranten von Myzus persicae haben ergeben, dass diese Morphe drei Photorezeptoren mit maximalen Sensitivitäten bei 320 bis 330 Nanometer (UV), 440 bis 480 Nanometer (blau) und 530 Nanometer (grün) aufweist (Kirchner et al. 2005). Hierbei haben der UV- und der blaue Spektralbereich eine abschreckende und grüne Flächen eine anziehende Wirkung auf M. persicae (Doering et al. 2007). Des Weiteren konnte bei vielen Blattlausarten, so auch bei M. persicae, festgestellt werden, dass gelb attraktiver gegenüber grün ist (Moericke 1955). Die Blattläuse sind somit nicht nur in der Lage, grün, blau und UV wahrzunehmen, sondern unterscheiden auch Wellenlängen, die innerhalb ihrer Sensitivitätskurven liegen und können so zum Beispiel gelbliche Flächen bevorzugen. Für die Wirtswahl-Experimente ist dies interessant, da kleine Farbunterschiede der Blätter, die mit dem menschlichen Auge nicht mehr wahrgenommen werden, eventuell zu einem verändertem Wahlverhalten der Blattläuse führen können, zum Beispiel, wenn einige Blätter ein wenig gelber erscheinen als andere. Aus diesem Grund soll mit einem Spektrophotometer geklärt werden, ob es Unterschiede im Reflexionsspektrum der Blätter, insbesondere zwischen den Pflanzen-Genotypen, gibt.

Spektrophotometer-Messungen an Blattoberflächen verschiedener Pflanzen wurden bereits mehrfach veröffentlicht (Shull 1929; Birth *et al.* 1968; Carter 1993). Vor allem Shull (1929) hat in den 30er Jahren sehr viele Lichtreflexionen von Blattoberflächen verschiedener Arten (jedoch nicht von *A. thaliana*) gemessen und verglichen. So hat er festgestellt, dass die maximale Reflexion bei grünen Blättern normalerweise bei 540 bis 560 Nanometer liegt, wobei die dunkelsten der grünen Blätter in diesem Wellenlängenbereich eine Reflexion von 6 bis 8 Prozent und die hellsten Blätter von 20 bis 25 Prozent aufwiesen. In einer beachtlichen Menge der untersuchten Pflanzen führt die Absorption des Chlorophylls zu einer geringeren Reflexion bei etwa 660 bis 680 Nanome-

ter. Des Weiteren konnte Shull (1929) zeigen, dass der Reflexionswert mit dem Blattalter abnahm, das heißt junge Blätter haben eine höhere Reflexion als mittelalte oder ältere Blätter, dies hängt mit der Entwicklung des Chlorophylls zusammen. In den folgenden Messungen mit dem Spektrophotometer sollten deshalb gleichaltrige Blätter getestet werden. Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Spektrophotometer-Messungen etwa fünf Wochen alt und hatten somit das gleiche Alter wie die Pflanzen für das Hauptexperiment in der Arena.

Um zunächst einen allgemeinen Eindruck von der Messmethode zu gewinnen, wurden erste Tests mit dem Wildtyp von *A. thaliana* (Col-0) durchgeführt. Die dafür benötigten Pflanzen wuchsen in Erde mit ¾ Dünger (75g/100L Osmocote® Exact Mini von Scotts International B.V., Heerlen, NL und 75g/100L Triabon® von COMPO GmbH & Co. KG, Münster, D), zunächst zwei Wochen unter Kurztag-, danach unter Langtagbedingungen (Beschreibung im Kapitel "3.1 Anzucht der Blattläuse und Pflanzen für die Vorexperimente"). Für die Messungen wurden Rosettenblätter mit einer Mindestlänge von fünf Zentimeter verwendet.

Es standen bei diesen Vorversuchen folgende Fragen im Vordergrund: Ist es wichtig, wo am Blatt gemessen wird? In welchem Wellenlängenbereich sind Messungen sinnvoll? Wie stark sind die Messfehler vom Gerät? Wie groß ist die Variabilität, die durch Messungen an unterschiedlichen Blattstellen entsteht?

3.6.2 Gerät

In einem Spektrometer wird eine Probe beleuchtet und deren Transmission und Reflexion in Abhängigkeit von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes gemessen. In einer Kooperation mit dem Institut für Angewandte Physik (IAP) an der FSU Jena konnte ein UV/Vis/NIR-Spektrophotometer (Perkin Elmer Lambda 950, Abb. 3.14) für die Messungen benutzt werden. Diese Messungen fanden in einem Labor des IAP statt. Mit dem Gerät können Spektren von 200 Nanometer (UV) bis hin zu 3300 Nanometer (IR) aufgenommen werden. Bei den Messungen wird ein monochromatischer Lichtstrahl in zwei Strahlen aufgeteilt, wobei der eine Strahl auf die Probe und der andere Strahl auf einen Referenzsensor trifft. Der Quotient aus der gemessene reflektierten Lichtleistung

 P_R und der gemessenen Referenzleistung P_0 ist die Reflexion R. Diese wird in Prozent angegeben und für jede gemessene Wellenlänge vom Gerät aufgezeichnet.



Abb. 3.14: Spektrophotometer (Perkin Elmer Lambda 950) (Foto: www.perkinelmer.de)

3.6.3 Allgemeine Durchführung

Für die Messungen am Spektrophotometer musste ein Blatt an der Basis abgeschnitten werden. Dieses Blatt wurde vertikal, mit dem Blattstiel nach oben und mit der Blattoberseite dem Strahl zugewandt, in die Öffnung für die Proben eingespannt. Nun erfolgte die Reflexions-Messung an dem Blatt nach den eingestellten Parametern (der Wellenlängenbereich variierte, der Abstand zwischen zwei gemessenen Reflexionen betrug meist fünf Nanometer). Eine Messung des eingestellten Wellenlängenbereichs dauerte rund 15 Minuten. Die Daten wurden gespeichert (Programm Perkin Elmer UV Winlab 5.2.0.0646) und später mit Excel (Microsoft® Office Excel® 2007 (12.0.6535.5002) Microsoft Corporation) neu aufgerufen.

3.6.4 Messungen mit und ohne Blatt-Mittelrippe

Bei diesem ersten Versuch sollten zwei Messungen an unterschiedlichen Blattstellen miteinander verglichen werden. Bei der ersten Messung enthielt die Messfläche am Blatt die Mittelrippe, im Vergleich wurde eine Fläche ohne große Rippe getestet. Außerdem wurde bei der ersten Messung ein relativ großer Wellenlängenbereich von 200 bis 1500 Nanometer gescannt, um einen Überblick über das Reflexionsspektrum eines Blattes zu bekommen (Abb. 3.15). Im sichtbaren Spektralbereich befindet sich ein Reflexionsmaximum bei 550 Nanometer (grün). Ab etwa 700 Nanometer, das heißt im Infraroten Bereich, steigt die Reflexion wieder an und bleibt bis etwa 1300 Nanometer auf einem hohen Reflexionslevel von etwa 50 Prozent.

Die zweite und auch die folgenden Messungen fanden im Wellenlängenbereich von 350 bis 700 Nanometer statt. Dieser Bereich erscheint sinnvoll, da bei kleineren Wellenlängen die Daten unzuverlässig sind (Abb. 3.15). Größere Wellenlängen sind für diese Versuche uninteressant, da sie von den Blattläusen nicht mehr wahrgenommen werden können (Kirchner *et al.* 2005). Bei genauerer Betrachtung des Wellenlängenbereichs von 350 bis 700 Nanometer wird ersichtlich, dass es geringe Unterschiede in den Reflexionsspektren verschiedener Messflächen auf dem Blatt (Mittelrippe oder rippenlosen Blattspreite) gibt (Abb. 3.16). Meist liegt die Reflexionsdifferenz bei 0,2 bis 0,4 Prozentpunkten, in dem grünen Spektralbereich mit dem Reflexionsmaximum ist die Differenz relativ gering (0,1 bis 0,008 Prozentpunkte).

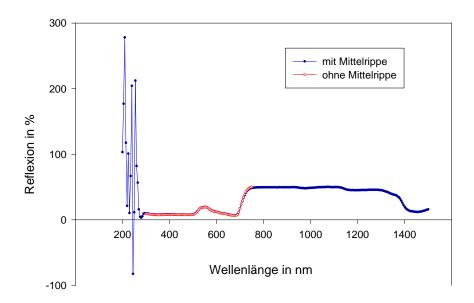


Abb. 3.15: Reflexionsspektrum von zwei Messungen an einem Blatt mit und ohne Mittelrippe

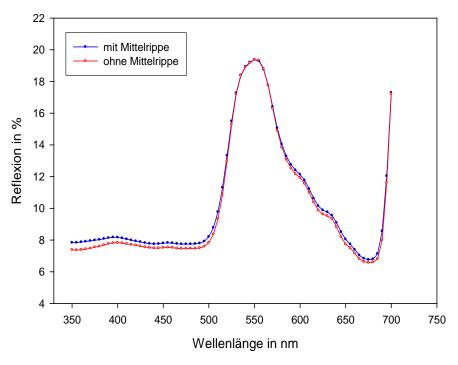


Abb. 3.16: Ausschnitt aus Abbildung 3.15 (350 bis 700 Nanometer)

3.6.5 Messfehler des Gerätes

Um zu testen, wie groß die Unsicherheit des Messvorganges ist, wurden am selben Blatt aufeinanderfolgend drei Messungen durchgeführt, die Position des Blattes wurde zwischendurch nicht verändert (Messungen 1a-c). Da es sich um eine biologische Probe handelte, die zudem noch von der Pflanze getrennt und somit nicht mehr versorgt wurde, bestand die Möglichkeit, dass sich das Reflexionsspektrum während der drei Messungen verändert.

Es wurden Spektren im Wellenlängenbereich von 350 bis 700 Nanometer mit einer Schrittweite von fünf Nanometer aufgenommen (Abb. 3.17). Die drei Reflexionskurven weisen nur sehr geringe Unterschiede auf, der maximale Standardfehler der drei Messungen ist bei einer Wellenlänge von 555 Nanometer zu finden und beträgt dort 0,02 Prozent.

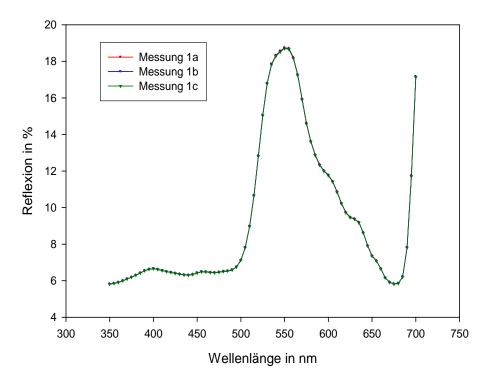


Abb. 3.17: Drei aufeinanderfolgende Messungen eines Blattes (1a-c), ohne es zwischendurch zu verändern

Weitere Messungen (Messungen 2a-b) im grünen Spektralbereich (500 bis 600 Nanometer) mit geringer Schrittweite der Wellenlänge (0,5 Nanometer) an einem zweiten Blatt derselben Pflanze zeigen kaum Unterschiede (maximale Differenz von 0,08 Prozentpunkten bei 546,5 Nanometer) (Abb. 3.18). Der Gerätefehler ist somit für diese Art von Versuchen vernachlässigbar. Eine sichtbare Veränderung des Reflexionsspektrums durch Welken des Blattes kann ausgeschlossen werden.

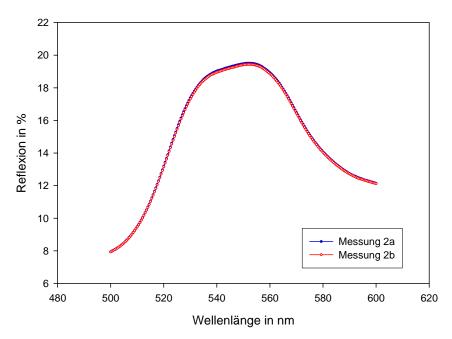


Abb. 3.18: Zwei höher aufgelöste Messungen an einem Blatt im grünen Spektralbereich, ohne Veränderung des Blattes zwischen den Messungen

3.6.6 Variabilität durch Messungen an leicht verschobenen Messflächen

Da für die wichtigen Messungen an den drei verschiedenen Genotypen mehrere Blätter von mehreren Pflanzen verglichen werden müssen, sollte vorher getestet werden, wie groß die Variabilität der Daten ist, wenn die Blätter zwischen den Messungen neu positioniert werden. Im folgenden Versuch wurde am selben Blatt fünf Mal hintereinander gemessen (Messungen 3a-e), wobei das Blatt zwischen den Messungen jeweils herausgenommen und erneut fixiert wurde. Die ersten zwei Messungen (Messungen 3a-b) fanden in vertikal eingespannter Position statt, während in den letzten drei Messungen (Messungen 3c-e) das Blatt horizontal ausgerichtet war.

Zwischen den Reflexionskurven treten Schwankungen von wenigen Prozent (maximal ein Prozentpunkt bei 550 Nanometer) auf (Abb. 3.19). Vor allem ist dabei Messung 3d auffällig, deren Graph, besonders im grünen Bereich, über den anderen Graphen liegt.

Es wurde versucht, bei den jeweiligen horizontalen oder vertikalen Messungen, immer dieselbe Blattstelle zu scannen. Da das Blatt jedoch zwischen den Messungen herausgenommen wurde, sind Messungenauigkeiten bei der Positionierung von weniger als ein Millimeter möglich. Die Unterschiede in der Reflexion sind auf die leicht verschobenen Messflächen auf dem Blatt zurück zu führen. Das Blatt ist somit bezüglich der Reflexion inhomogen über die Blattoberfläche, was die erste Messung mit und ohne Mittelrippe nicht vermuten ließ. Der größte Reflexions-Mittelwert aller fünf Messungen und zugleich die größte Variabilität zwischen den Reflexionskurven wurden bei 550 Nanometer gemessen (Mittelwert \pm SE: 19.5 ± 0.2 Prozent). Diese Reflexions-Differenzen sind bei den späteren Messungen mit den drei Genotypen zu berücksichtigen.

Des Weiteren war es irrelevant, in welcher Position das Blatt gescannt wurde. Es scheint keine erheblichen Unterschiede zu geben, ob die Messung an einem vertikal (Messungen 3a-b) oder horizontal (Messungen 3c-e) eingespannten Blatt durchgeführt wird.

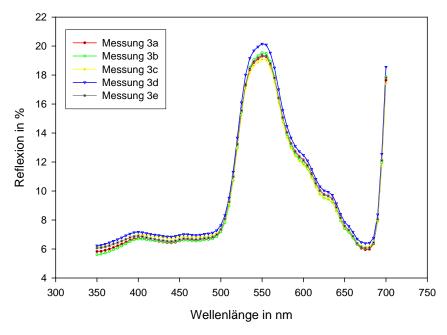


Abb. 3.19: Fünf Messungen eines Blattes, welches zwischen den Messungen neu positioniert wurde; Messungen a,b: vertikale Positionierung; Messungen c-e: horizontale Positionierung des Blattes

3.6.7 Fazit der Spektrophotometer-Vorversuche

Alle zuvor beschriebenen Reflexionskurven zeigen (in einem Wellenlängenbereich von 350 bis 700 Nanometer) indirekt beide Absorptionsmaxima der Chlorophylle a und b. Das erste Maximum, die Soret-Bande, liegt bei etwa 400 bis 500 Nanometer. In diesem Bereich ist die Reflexion dementsprechend niedrig, sie beträgt etwa sechs bis acht Prozent und steigt erst ab etwa 500 Nanometer an. Das zweite Chlorophyll-Absorptionsmaximum, die Q_y-Bande, sorgt für einen Reflexionsabfall bis auf fünf bis sieben Prozent bei 675 Nanometer. Diese Reflexionsdepression bei 660 bis 680 Nanometer konnte auch Shull (1929) in seinen Messungen feststellen. Weitere Charakteristika der gemessenen Reflexionsspektren entsprechen den genannten Kriterien von Shull (1929). So stimmen die spektrale Position des Maximums (jeweils bei 550 Nanometer) und die maximalen Reflexionswerte (bis zu etwa 20 Prozent) mit den Messungen von Shull überein (Shull: 20 bis 25 Prozent bei 540 bis 560 Nanometer).

Durch die Vorexperimente am Spektrophotometer konnten wichtige Anhaltspunkte zur Methode gesammelt werden. So sind für die Hauptmessungen an den verschiedenen Pflanzen-Genotypen folgende Faktoren zu berücksichtigen: Es sollte in einem Wellenlängenbereich von 350 bis 700 Nanometer gemessen werden, ein Abstand von fünf Nanometer zwischen den Messungen ist ausreichend. Der Gerätefehler ist vernachlässigbar und es gibt keine Reflexionsänderungen durch etwa 45-minütiges Welken der Blätter. Es scheint keinen Einfluss auf die Messungen zu haben, ob an der Mittelrippe oder an der rippenlosen Blattspreite und in welcher Messposition (vertikal oder horizontal) gemessen wird. Allerdings ist zu beachten, dass durch das Herausnehmen des Blattes zwischen den Messungen kleine Unterschiede (maximal ein Prozentpunkt) in der Reflexion entstehen. Diese Unterschiede entstehen aufgrund inhomogener Reflexionseigenschaften auf der Blattoberfläche. Die Inhomogenität tritt somit bereits in Bereichen auf, die kleiner als die Positioniergenauigkeit im Experiment sind (< ein Millimeter). Folglich zeigen sich geringe Unterschiede zwischen allen aufgenommenen Spektren, bei denen die Probe zwischen den Messungen verändert wurde. Diese sind somit auch bei den Hauptmessungen mit den verschiedenen Pflanzen-Genotypen zu erwarten.

4 Material und Methoden des Hauptexperimentes

Es sollte der Einfluss des von den Pflanzen produzierten Duftstoffes (*E*)-β-Farnesen auf die Wirtswahl der Blattläuse getestet werden. Dazu wurde die große Arena (Beschreibung im Kapitel "3.4 Große Arena") verwendet. Das Hauptexperiment fand in derselben Klimakammer wie alle Vorversuche statt (konstante Temperatur von 20 Grad Celsius und konstante Luftfeuchtigkeit von 70 Prozent). Durch eine Zeitschaltuhr wurde die große Arena von 6 Uhr bis 22 Uhr beleuchtet.

4.1 Verwendete Organismen

Im Hauptexperiment, wie auch schon in allen vorherigen Experimenten, wurden die Blattlausart *Myzus persicae* und die Pflanzenart *Arabidopsis thaliana* verwendet.

4.1.1 Myzus persicae Sulzer

Die Blattläuse wurden bereits seit mehreren Jahren kultiviert. Ursprünglich wurden sie auf Tabakpflanzen gezüchtet, seit 2005 erfolgte die Anzucht auf *A. thaliana* Columbia-Wildtyp (Col-0).

Diese Blattlausart wurde unter anderem wegen ihrer Fähigkeit als Generalist ausgewählt und kann somit gut auf A. thaliana kultiviert werden. Des Weiteren ist das (E)- β -Farnesen, dessen Einfluss auf die Wirtswahl getestet werden sollte, alleiniger Bestandteil des Alarmpheromons von M. persicae (Francis et al. 2005).

Während der Anzucht standen die Pflanzen mit den Blattläusen in einer Klimakammer mit konstanten Bedingungen (20 Grad Celsius, 70 Prozent Luftfeuchtigkeit).

In dem Hauptexperiment wurden jeweils 20 Wiederholungen mit ungeflügelten und geflügelten Blattläusen durchgeführt. Pro Replikat wurden 15 Blattläuse benötigt, wobei sich die Anzucht beider Morphen wie folgt unterschied:

Die Anzucht der ungeflügelten Blattläuse begann immer drei Wochen vor dem jeweiligen Experimenttag, in dem eine adulte Blattlaus auf eine *Arabidopsis*-Pflanze (Col-0) gesetzt wurde (Abb. 4.1). Durch die parthenogenetische Vermehrung entstanden Blattlaus-Klone, deren Mitglieder genetisch identisch sind. Dies ist für die Experimente von Vorteil, da somit Verhaltensunterschiede aufgrund genetischer Unterschiede ausgeschlossen werden können. Die Züchtung von Klonen über mehrere Generationen von nur einer Blattlaus-Mutter wird im Folgenden als "Linie" bezeichnet. Nach zwei Tagen, in denen die Blattlaus Nachkommen (NK 1) produzierte, wurde sie entfernt und die nächste Generation konnte für sieben Tage heranwachsen. Fünf Nachkommen (NK 1) wurden dann auf eine neue Pflanze gesetzt, wo sie für zwei bis drei Tage reproduzieren konnten, bevor sie wieder entfernt wurden. Nach neun bis elf Tagen konnten 15 adulte Nachkommen (NK 2) pro Replikat verwendet werden.

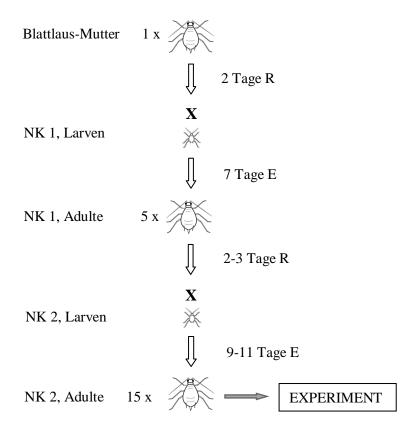


Abb. 4.1: Anzucht-Linie für ungeflügelte Blattläuse; NK = Nachkommen, R = Reproduktion, E = Entwicklung, X = Adulte Blattlaus/Blattläuse von Pflanze entfernt

Um 15 geflügelte Blattläuse zu erhalten, startete die Anzucht bereits sechs Wochen vor dem jeweiligen Experimenttag. Hierbei begann die Anzucht zunächst genauso wie für die ungeflügelten Blattläuse, allerdings liefen von Anfang an zwei Blattlaus-Linien parallel, das heißt, es wurde mit zwei Blattläusen auf zwei Pflanzen gestartet. Diese Maßnahme diente lediglich der Sicherheit, falls eine Pflanze den notwendigen Massenbefall an Blattläusen nicht überlebte. Auch hier konnten beide Blattläuse für zwei bis drei Tage Nachkommen (NK 1) produzieren, bevor sie entfernt wurden (Abb. 4.2).

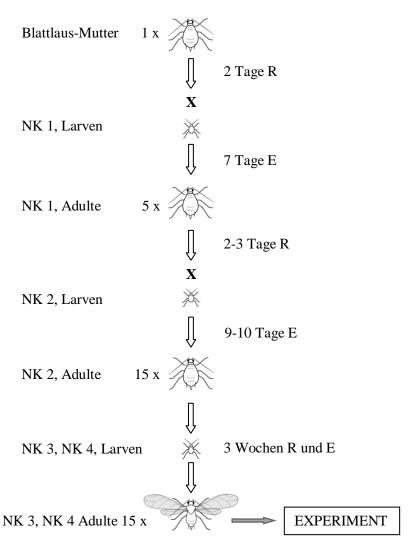


Abb. 4.2: Anzucht-Linie für geflügelte Blattläuse; NK = Nachkommen, R = Reproduktion, E = Entwicklung, X = Adulte Blattlaus/Blattläuse von Pflanze entfernt

Nach sieben Tagen wurden jeweils fünf Nachkommen (NK 1) pro Linie auf eine neue Pflanze umgesetzt, um wiederum für zwei bis drei Tage zu reproduzieren. 15 dieser Nachkommen (NK 2) wurden nach neun bis zehn Tagen Entwicklung auf eine neue

Pflanze transferiert, um eine ausreichend große Dichte für die Produktion von geflügelten Nachkommen zu erzielen. Da die Pflanzen nach zwei Wochen Massenbefall starke Welkeerscheinungen zeigten, wurden die Blattläuse eine Woche vor dem jeweiligen Experimenttag noch einmal auf neue Pflanzen umgesetzt. 15 geflügelte adulte Nachkommen (NK 3 und NK 4) konnten nun pro Replikat verwendet werden.

4.1.2 Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH.

Als Wirtspflanze für *M. persicae* diente *A. thaliana*, die Acker-Schmalwand. Auch sie ist seit mehreren Jahren in Kultivierung. Für die Experimente wurden drei verschiedene Genotypen des Ökotyps "Columbia" verwendet. Zum einen der Wildtyp Col-0 und zum anderen zwei transgene Linien, die jeweils ein Gen zur Produktion von EBF besitzen (Beale *et al.* 2006). Wobei der Genotyp FS 11-4 weniger EBF produziert als der Genotyp FS 9-2.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in Erde mit ¾ Dünger und separat in zehn Zentimeter großen Rundtöpfen.

Die Pflanzen für die Messungen an dem Photospektrometer und für das Hauptexperiment wuchsen erst zwei Wochen unter Kurztagbedingungen, danach zwei Wochen unter Langtagbedingungen.

Zur Anzucht der Blattläuse für das Hauptexperiment wurde der Wildtyp Col-0 verwendet. Nach zwei Wochen unter Kurztag- und drei Wochen unter Langtagbedingungen wurden sie im Alter von fünf Wochen mit Blattläusen besetzt.

4.2 Messungen der Blattreflexionen

Um die Frage nach Reflexionsunterschieden zwischen den drei Genotypen zu klären, wurden von fünf Pflanzen pro Genotyp je drei Blätter einmalig mit einem Spektrophotometer gescannt. Die Vorgehensweise bei den Messungen entsprach derer, die bereits im Kapitel "3.6 Vorversuche an dem Spektrophotometer" beschrieben wurde. Es wurde am selben Gerät (Perkin Elmer Lambda 950) und im selben Labor des

IAPs in Jena gemessen. Der Wellenlängenbereich von 350 bis 700 Nanometer wurde gescannt, die Schrittweite betrug fünf Nanometer.

Die gespeicherten Daten wurden mit dem Statistikprogramm R analysiert. Getestet wurde hierbei nur der Maximumbereich zwischen 540 und 565 Nanometer, da in diesem Bereich die Unterschiede in der Reflexion am größten waren. Mit einer ANOVA wurden die Reflexionswerte der jeweiligen Wellenlänge in Abhängigkeit vom Genotyp auf Unterschiede überprüft.

4.3 Hauptexperiment zum Wirtswahlverhalten

4.3.1 Temperatur

Da das Verhalten der Blattläuse temperaturabhängig ist und Temperaturschwankungen die Wirtswahl der Blattläuse beeinflussen könnten, wurde die Temperatur in der Arena überprüft. Dabei wurde während eines Replikats im Hauptexperiment mit geflügelten Blattläusen ein Datalogger mit in die Arena hinein gelegt. Dieser zeichnete die Temperatur während der 24 Stunden, in denen das Replikat durchgeführt wurde und die Blattläuse ihre Wirtspflanzen wählen konnten, auf. Die Daten konnten in Excel ausgelesen werden.

Da die Temperatur in der Klimakammer stets auf 20 Grad Celsius eingestellt war, wird davon ausgegangen, dass die Temperatur in der Klimakammer bei allen Replikaten gleich blieb. Die durchgeführte Temperaturmessung bei diesem Replikat steht somit exemplarisch für alle Replikate.

4.3.2 Wahlverhalten der Blattläuse

Das Hauptexperiment gliederte sich in zwei große Teile: Zuerst wurden ungeflügelte, danach geflügelte Blattläuse getestet, jeweils mit 20 Replikaten. Pro Replikat wurden zunächst sechs Pflanzen, jeweils zwei von jedem Genotyp, kreisförmig in die Arena gestellt. Die Pflanzen eines Genotyps standen sich dabei gegenüber (Abb. 4.3).

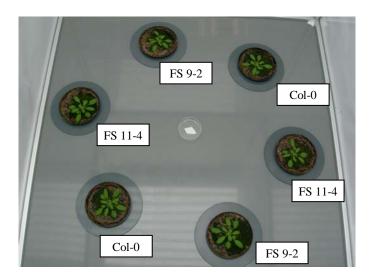


Abb. 4.3 Beispiel einer Pflanzenverteilung in der großen Arena, Petrischale mit ungeflügelten Blattläusen in der Mitte

Bei jedem neuen Replikat wurden die Pflanzen im Uhrzeigersinn eine Position weiter gestellt, so dass jeder Genotyp mehrfach auf allen Positionen stand. Nach den sechs Pflanzen wurden 15 Blattläuse in einer Petrischale in die Arena gesetzt, wobei die Petrischale mit geflügelten Blattläusen in der Mitte der Arena auf dem erhöhtem Podium stand, während sich die Schale mit den ungeflügelten Blattläusen auf dem Boden befand. Die Blattläuse hatten nun die Wahl zwischen den drei verschiedenen Arabidopsis-Genotypen. Nach 24 Stunden wurden die sechs Pflanzen nach den Blattläusen abgesucht und die gefundene Blattlausanzahl notiert. Außerdem wurden die Pflanzen fotografiert und vermessen, wobei der Mittelwert aus zwei zueinander orthogonal gemessenen Rosettendurchmessern pro Pflanze und die Infloreszenzhöhe aufgenommen wurden. Da sich bei einigen Pflanzen Tau um den Infloreszenzansatz und unter den Blättern gebildet hatte und dies eventuell eine Rolle bei der Wirtswahl spielte, wurde dieser Punkt zusammen mit den anderen Pflanzendaten in der Datenaufnahme erfasst. Im Anschluss wurde von jeder der sechs Pflanzen pro Replikat eine Duftstoffsammlung durchgeführt, um zu ermitteln, welche Pflanzen besonders viel, beziehungsweise wenig EBF abgaben und ob die produzierte EBF-Menge im Zusammenhang mit der Blattlausbesiedlung stand.

Für jedes Replikat standen jeweils sechs neue Pflanzen und 15 neue Blattläuse zur Verfügung. Zwischen den Replikaten wurde der Arenaboden mit Wasser ausgewischt, um eventuell vorhandene Spuren der Blattläuse und Erdreste zu beseitigen.

4.3.3 Duftstoffsammlung

Für die Duftstoffsammlungen wurden die sechs Pflanzen pro Replikat jeweils in Drei-Liter-Exsikkatoren gestellt (Abb. 4.4). Diese Glasbecher mit allem Zubehör wurden nach jeder Duftstoffsammlung mit Aceton und 80-prozentigem Ethanol unter einem Abzug gereinigt und für den nächsten Gebrauch bereit gestellt. Die Duftsammlungen fanden in derselben Klimakammer wie auch das Hauptexperiment statt.



Abb. 4.4: Duftstoffsammlung: Experimentpflanzen in 3 l-Exsikkatoren; gereinigte Luft wird in die Glasbehälter hinein gepumpt und entweicht durch einen Super Q-Filter, der die von der Pflanze produzierten Duftstoffe bindet

Begonnen haben die Duftstoffsammlungen immer vormittags um 11 Uhr und nach sechs Stunden, gegen 17 Uhr, wurden die Messungen beendet. Über einen speziellen Eingangsstopfen wurde kontinuierlich über Aktivkohle gereinigte Luft in das Gefäß hinein gepumpt. Die Durchflussrate betrug bei jedem Exsikkator etwa zwei Liter pro Minute. Da der Glasbecher luftdicht verschlossen war, konnte die Luft nur durch einen Super Q-Filter enthaltenen Stopfen entweichen, wobei die von der Pflanze abgegebenen Duftstoffe in dem Filter verblieben.

Nach der Duftsammlung wurden die Filter sofort unter dem Abzug mit 150 Mikroliter n-Hexan eluiert und bis zur Analyse bei -20 Grad Celsius aufbewahrt.

4.3.4 Analyse der Duftstoffe

Die Analyse der Proben erfolgte an einem Agilent 6890 Series Gas-Chromatographen, in Verbindung mit einem Agilent 5973 Massenspektrometer (quadrupole mass detector). Mit Hilfe dieser Gerätekopplung (GC-MS) konnten die verdampfbaren Proben zunächst in ihre einzelnen chemischen Komponenten aufgetrennt und diese danach identifiziert werden (Niessen 2001).

Durch einen automatischen Probengeber wurde ein Mikroliter der zu analysierenden Probe bei 220 Grad Celsius eingespritzt und splittlos auf die Trennsäule geleitet. Als Trägergas diente Helium mit einer Flussrate von zwei Milliliter pro Minute, das die zu trennenden Substanzen durch die Kapillarsäule (DB-5MS, Länge: 30 Meter, Innendurchmesser: 0,25 Millimeter, Filmdicke: 0,25 Mikrometer) bewegte. Die Anfangstemperatur des GC-Ofens betrug für drei Minuten 40 Grad Celsius und wurde mit einer Rate von acht Grad pro Minute auf 200 Grad Celsius erhöht, im Anschluss fand ein Ausheizen des Ofens mit 60 Grad Celsius pro Minute auf 300 Grad Celsius statt. Die Transfer Line, der Übergang zum Massenspektrometer, wurde auf 270 Grad Celsius erwärmt. Die MS-Quellentemperatur betrug 230 Grad Celsius, die Quadrupol-Temperatur 150 Grad Celsius und die Elektronenenergie hatte einen Wert von 70 Elektronvolt. Der MS-Scan-Bereich (m/z) lag bei 33 bis 350.

Zum Auswerten und Bearbeiten der Daten wurde das Programm MSD ChemStation (Build 75 26-Aug-2003 Agilent Technologies) verwendet. Die GC-Retentionszeit des EBFs wurde mit der eines EBF-Standards kontrolliert und die Massenspektren wurden mit denen der Wiley Bibliothek verglichen.

Um die EBF-Gehalte der einzelnen Proben vergleichen zu können, wurde die Peakfläche der extrahierten Ionenspur m/z 93 integriert. Da im Hauptexperiment bei der GC-MS-Analyse kein interner Standard hinzuzugeben wurde, wurden die Ergebnisse der Duftstoffsammlung (die integrierten Werte) ihrer Größe nach absteigend sortiert und eine tagesabhängige Rangliste erstellt. Das heißt, dem Wert mit der größten EBF-Menge pro Tag wurde Platz sechs zugewiesen, dem Wert mit der zweitgrößten Menge Platz fünf, usw.

4.3.5 Statistik

Die während des Experimentes aufgenommenen Daten, sowie die Farnesen-Rangliste wurden in Excel transferiert, mit dem Statistikprogramm R analysiert und mit SigmaPlot dargestellt.

Zunächst wurde mit Hilfe einer ANOVA getestet, ob die Pflanzengröße von dem Genotyp abhängig ist.

Der Einfluss folgender Faktoren (Erklärung nebenstehend) auf die Wirtswahl wurde analysiert:

- Genotyp: Col-0, FS 11-4, FS 9-2
- EBF: EBF vorhanden (FS 11-4 und FS 9-2), beziehungsweise nicht vorhanden (Col-0)
- Farnesen-Rang: Rangliste (Werte aus der Duftstoffsammlung) pro Tag
- Position: Positionen 1 bis 6 in der Arena
- Durchmesser: gemittelter Durchmesser der Pflanze
- Tau: Vorhandensein von Wassertröpfchen unter den Blättern
- Infloreszenz: Höhe der Infloreszenz

Es wurde getestet, ob der prozentuale Anteil an Blattläusen auf den Pflanzen von den oben stehenden Faktoren oder deren Interaktionen beeinflusst wurde. Dazu wurde ein Generalisiertes Lineares Modell mit einer quasibinomialen Fehlerstruktur angewandt und durch schrittweises Entfernen der nichtsignifikanten Faktoren simplifiziert (Crawley 2007).

Die Berechnungen für die Experimente mit geflügelten und ungeflügelten Blattläusen wurden getrennt durchgeführt. Für die Analysen mit den geflügelten Blattläusen wurde der Faktor "Infloreszenz" nicht mit einbezogen, da alle Pflanzen eine Infloreszenz von maximal einem Zentimeter hatten.

5 Ergebnisse des Hauptexperimentes

5.1 Messungen der Blattreflexionen

Es wurde getestet, ob zwischen den drei Pflanzen-Genotypen (Col-0, FS 11-4, FS 9-2) Reflexionsunterschiede auftreten. Diese könnten die Blattläuse in ihrer Wahl der Wirtspflanze beeinflussen. Mit einem Spektrophotometer wurden Messungen an 15 Pflanzenblättern pro Genotyp durchgeführt. Die Ergebnisse entsprechen dem im Kapitel "3.6.7 Fazit der Spektrophotometer-Vorversuche" bereits beschriebenem Reflexionskurvenverlauf.

Es ist bei allen Messungen an den drei Genotypen ein Reflexionsanstieg von etwa acht Prozent (bei 500 Nanometer) auf etwa 21 Prozent (bei 550 Nanometer) zu verzeichnen (Abb. 5.1). Da alle gemessenen Pflanzenblätter die größte Reflexion bei 550 Nanometer aufweisen, gibt es keine Verschiebung der Reflexionsmaxima zwischen den verschiedenen Genotypen entlang der Wellenlänge. Die geringste Reflexion in diesem Spektralbereich weisen die Wildtyp-Pflanzen auf, die Blätter der FS 9-2-Pflanzen zeigen die höchste Reflexion. Anschließend sinkt die Reflexion auf einen Wert von etwa sieben bis acht Prozent bei 680 Nanometer, gefolgt von einem weiteren starken Anstieg bis zum Ende des Messbereichs bei 700 Nanometer. Die drei Reflexionskurven, die sich aus den Mittelwerten der jeweiligen Pflanzen-Genotypen ergeben, unterscheiden sich mit weniger als 0,5 Prozentpunkten voneinander. Aus den Spektrophotometer-Vorexperimenten ist bekannt, dass die Oberfläche eines Blattes inhomogene Reflexionseigenschaften aufweist, die zu Unterschieden von etwa einem Prozentpunkt führen können.

Im grünen Spektralbereich ist die höchste Variabilität zwischen den Reflexionskurven zu finden (Mittelwert ± Standardfehler bei 550 Nanometer: 20,97 ± 0,13 Prozent) (Abb. 5.2). Aus diesem Grund wurde die Devianzanalyse in diesem Bereich durchgeführt. Bei keiner der berechneten Wellenlängen (540 bis 565 Nanometer) gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen den drei verschiedenen Genotypen (Tab. 5.1). Da die Variabilität in dem restlichen Spektralbereich kleiner ist, kann davon ausgegangen

werden, dass es insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Reflexionskurven der drei Genotypen gibt.

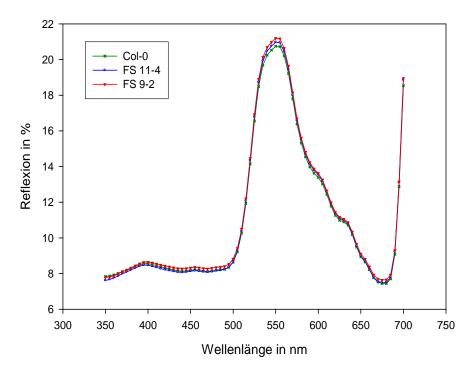


Abb. 5.1 Durchschnittliche Reflexionskurven von Messungen der Blattoberseiten der drei verschiedenen Pflanzen-Genotypen im Spektralbereich von 350 bis 700 Nanometer

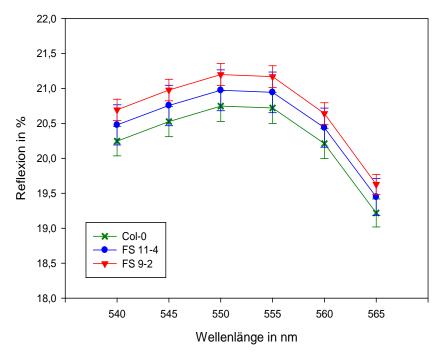


Abb. 5.2 Ausschnitt aus Abbildung 5.1, Reflexionen der drei Pflanzen-Genotypen zwischen 540 und 565 Nanometer (Mittelwerte ± Standardfehler)

Tab. 5.1: Ergebnisse der ANOVA zum Spektrophotometer-Hauptversuch, getestet wurde die jeweilige Wellenlänge (von 540 bis 565 Nanometer) in Abhängigkeit von der Reflexion der Pflanzen-Genotypen

	Df	F	p
540 nm ~ Genotyp	2	1,004	0,395
545 nm ~ Genotyp	2	0,997	0,398
550 nm ~ Genotyp	2	0,972	0,406
555 nm ~ Genotyp	2	0,958	0,411
560 nm ~ Genotyp	2	0,938	0,419
565 nm ~ Genotyp	2	0,975	0,405

5.2 Hauptexperiment zum Wirtswahlverhalten

5.2.1 Temperatur

Mit einem Datalogger wurde die Temperatur in der Arena für 27 Stunden aufgenommen. Während dieser Zeit wurde ein Replikat mit geflügelten Blattläusen durchgeführt. Die Temperatur stieg nach Beginn des Replikats um 10 Uhr auf 25 Grad Celsius an (Abb. 5.3). Während des gesamten Durchgangs bis zum Folgetag 10 Uhr (Ende des Replikats) blieb die Temperatur konstant 25 Grad Celsius und sank erst danach wieder auf die Umgebungstemperatur von 20 Grad Celsius ab.

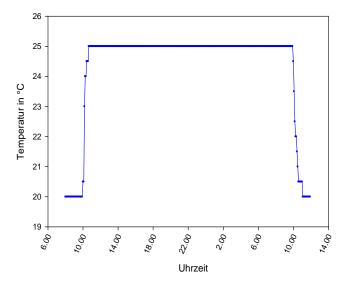


Abb. 5.3: Temperaturverlauf in der Arena während eines Replikats von 8 bis 11 Uhr des Folgetages

5.2.2 Wirtswahlversuch mit ungeflügelten Blattläusen

5.2.2.1 Pflanzendaten

Die Pflanzen, die für die Experimente mit den ungeflügelten Blattläusen benutzt wurden, hatten einen durchschnittlichen Rosettendurchmesser von 7,4 Zentimeter (Abb. 5.4). Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der Größe der Rosette zwischen den drei verschiedenen Genotypen (ANOVA: F = 0.848; p = 0.712).

Sieben der 120 Experimentpflanzen für die ungeflügelten Blattläuse besaßen keinen Infloreszenzansatz, bei 101 Pflanzen war der Spross kleiner als 0,5 Millimeter (Abb. 5.5) und die restlichen 12 Pflanzen hatten eine Sprossachse von 0,5 bis 2 Zentimeter.

Bei etwa drei Viertel der Pflanzen (87 von 120) wurden Tautropfen unter den Blättern festgestellt.

Durch eine "stressfreie" Anzucht der Pflanzen (zum Beispiel ausreichend Dünger, Beleuchtung und Bewässerung) wies keine der Pflanzen eine rötliche Färbung der Blätter auf.

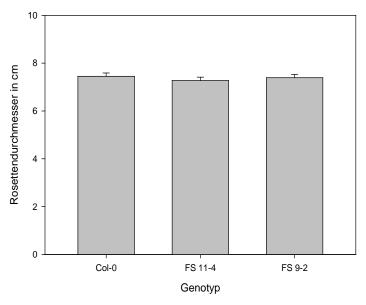


Abb. 5.4: Durchschnittlicher Rosettendurchmesser der drei Pflanzen-Genotypen; Pflanzen für die Experimente mit ungeflügelten Blattläusen (Mittelwerte und Standardfehler)



Abb. 5.5: Beispiel einer Experimentpflanze (mit einem Infloreszenzansatz kleiner als 0,5 Zentimeter)

5.2.2.2 Wirtswahl der ungeflügelten Blattläuse im Hauptexperiment

Die ungeflügelten Blattläuse besiedelten keinen Genotyp bevorzugt. Im Durchschnitt befanden sich 2,5 ungeflügelte Blattläuse auf einer Pflanze (Abb. 5.6).

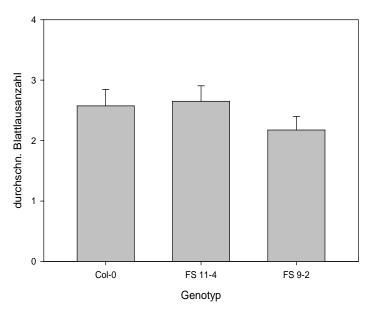


Abb. 5.6 Übersicht über die Verteilung ungeflügelter Blattläuse auf den drei Pflanzen-Genotypen (Mittelwerte und Standardfehler)

Keiner der analysierten Faktoren (Tau, Pflanzen-Position, Genotyp, Pflanzendurchmesser, Infloreszenzhöhe, EBF-Produktion und der Farnesen-Rang) oder deren Interaktionen hatten einen signifikanten Einfluss auf die Blattlausverteilung (Tab. 5.2). Weder die verschiedenen Pflanzen-Genotypen, noch die Tatsache, ob die Pflanzen EBF produzierten oder nicht spielte bei der Wirtswahl der ungeflügelten Blattläuse eine Rolle (Abb. 5.7). Auch die produzierte Farnesen-Menge von Pflanzen eines Replikates, sortiert in einer aufsteigenden Rangliste, zeigte keine signifikante Übereinstimmung mit der Verteilung der Blattläuse auf diesen Pflanzen. Es konnte nicht festgestellt werden, dass auf Pflanzen, die relativ viel oder wenig EBF produzierten, tendenziell mehr oder weniger Blattläuse gefunden wurden (Abb. 5.8).

Des Weiteren konnten mögliche Ablenkungsfaktoren, wie das Vorhandensein von Tautröpfehen, unterschiedlich große Rosettendurchmesser oder Infloreszenzhöhen bei der Wirtswahl ausgeschlossen werden, da sie ebenfalls keinen Einfluss auf das Verhalten der ungeflügelten Blattläuse hatten (Tab. 5.2). Da auch die Positionen der Experimentpflanzen in der Arena keine Rolle bei der Verteilung der Blattläuse spielten (Abb. 5.7), gab es anscheinend keine anderen Faktoren, die das Verhalten der ungeflügelten Morphen beeinflussten.

Tab. 5.2: Ergebnisse der Devianzanalyse (GLM) zum Hauptversuch; Experimente mit ungeflügelten Blattläusen; Reihenfolge der Faktoren entspricht der Modelvereinfachung, das heißt letzter Faktor (Farnesen-Rang) wurde zuerst aus dem Model entfernt

	Df	Resid. Df	F	p
Tau	1	118	1,874	0,174
Position	1	118	1,394	0,240
Genotyp	2	117	1,052	0,353
Durchmesser	1	115	0,835	0,363
Infloreszenz	2	113	0,811	0,447
EBF	1	118	0,278	0,599
Farnesen-Rang	5	97	0,704	0,622

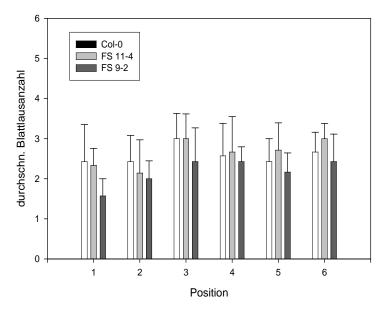


Abb. 5.7 Verteilung ungeflügelter Blattläuse über die sechs Positionen in der Arena und über die drei Pflanzen-Genotypen (Mittelwerte und Standardfehler)

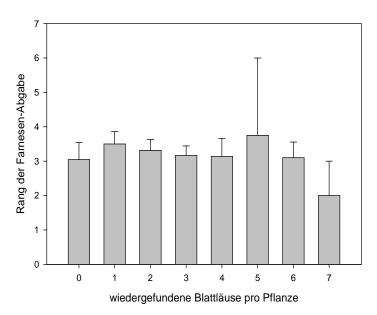


Abb. 5.8 Anzahl der wiedergefundenen ungeflügelten Blattläuse in Abhängigkeit vom Farnesengehalt; Farnesengehalte sind qualitativ als Rang angegeben (Rang 1 entspricht dem geringsten Farnesengehalt)

5.2.3 Wirtswahlversuch mit geflügelten Blattläusen

5.2.3.1 Pflanzendaten

Die durchschnittliche Größe des Rosettendurchmessers der Pflanzen in den Experimenten mit geflügelten Blattläusen betrug 7,9 Zentimeter (Abb. 5.9). Zwischen den drei Pflanzen-Genotypen gab es keinen signifikanten Unterschied in der Größe der Rosette (ANOVA: F = 1,068; p = 0,347).

Fast alle Pflanzen (112 von 120) besaßen einen Infloreszenzansatz von weniger als 0,5 Zentimeter. Bei den restlichen acht Pflanzen war die Infloreszenz bereits zwischen 0,5 und zwei Zentimeter lang.

Tautröpfchen konnten bei 114 Pflanzen festgestellt werden.

Da die Pflanzen ebenfalls unter optimalen Bedingungen angezogen wurden, war auch hier keine Rotfärbung der Blätter zu beobachten.

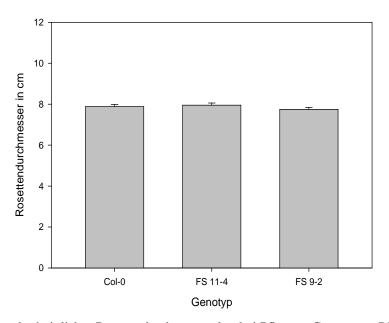


Abb. 5.9: Durchschnittlicher Rosettendurchmesser der drei Pflanzen-Genotypen; Pflanzen für die Experimente mit geflügelten Blattläusen (Mittelwerte und Standardfehler)

5.2.3.2 Wirtswahl der geflügelten Blattläuse im Hauptexperiment

Auch die geflügelten Blattläuse verteilten sich gleichmäßig auf alle Pflanzen-Genotypen. Durchschnittlich befanden sich 2,3 Blattläuse auf einer Pflanze (Abb. 5.10).

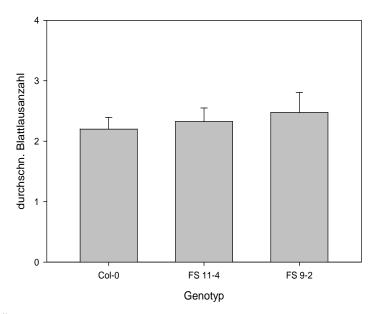


Abb. 5.10: Übersicht über die Verteilung geflügelter Blattläuse auf den drei Pflanzen-Genotypen (Mittelwerte und Standardfehler)

In den Durchgängen mit geflügelten Blattläusen gab es keinen signifikanten Einfluss von farnesenabhängigen Faktoren auf die Wirtswahl der Blattläuse (Tab. 5.3). Das heißt, weder die unterschiedlichen Genotypen, noch das Vorhandensein von EBF oder die produzierte Farnesenmenge (in Form der tagesabhängigen Rangliste) (Abb. 5.12) spielten eine Rolle bei der Verteilung der Blattläuse.

Jedoch hat die Position der Pflanzen in der Arena einen signifikanten Einfluss auf die Besiedlungsrate. Es waren mehr geflügelte Blattläuse auf Pflanzen der Position 4 zu finden als auf den anderen Positionen (Abb. 5.11).

Tautröpfchen an den Pflanzen und die Pflanzengröße beeinflussten die geflügelten Blattläuse nicht in ihrer Wahl (Tab. 5.3).

Tab. 5.3: Ergebnisse der Devianzanalyse (GLM) zum Hauptversuch; Experimente mit geflügelten Blattläusen; Reihenfolge der Faktoren entspricht der Modelvereinfachung, das heißt letzter Faktor (Durchmesser) wurde zuerst aus dem Model entfernt

	Df	Resid. Df	F	p
Position	1	118	5,317	0,023
Farnesen-Rang	6	108	1,367	0,234
Tau	1	107	0,983	0,324
Genotyp	2	113	0,342	0,711
EBF	1	114	0,314	0,576
Durchmesser	1	111	0,120	0,730

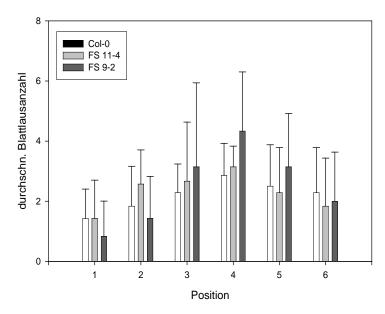


Abb. 5.11: Verteilung geflügelter Blattläuse über die sechs Positionen in der Arena und über die drei Pflanzen-Genotypen (Mittelwerte und Standardfehler)

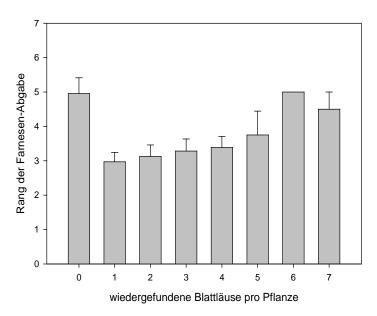


Abb. 5.12: Anzahl der wiedergefundenen geflügelten Blattläuse in Abhängigkeit vom Farnesengehalt (Mittelwerte und Standardfehler); Farnesengehalte sind qualitativ als Rang angegeben (Rang 1 entspricht dem geringsten Farnesengehalt)

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe eines Modelsystems das Wirtswahlverhalten der Blattlausart Myzus persicae zu untersuchen. Dabei sollte der Einfluss von (E)- β -Farnesen, welches kontinuierlich von Arabidopsis-Pflanzen emittiert wurde, getestet werden. In den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass das von den transgenen Pflanzen abgegebene EBF keinen Einfluss auf die Wirtswahl von M. persicae hatte.

In beiden Teilexperimenten, sowohl bei den ungeflügelten, als auch bei den geflügelten Blattläusen, haben die Blattläuse nicht signifikant auf die transgenen Pflanzen reagiert (Tab. 5.2, Tab. 5.3). Dabei spielte weder allgemein die Tatsache, ob EBF produziert wurde oder nicht, noch speziell die Menge des produzierten Farnesens eine Rolle. Die Blattläuse bevorzugten, beziehungsweise mieden keinen bestimmten Pflanzen-Genotyp. Es wurden auf allen Pflanzen, unabhängig von der EBF-Abgabe, im Durchschnitt zwei bis drei Blattläuse gefunden (Abb. 5.6, Abb. 5.10).

Dass die Blattläuse nicht auf das von den Pflanzen produzierte EBF reagierten, kann mehrere Ursachen haben:

Der benutzte Blattlausklon könnte bereits zu lange in Kultur gelebt haben. Da er seit mindestens vier Jahren keinen Fressfeinden ausgeliefert war und unter optimalen Bedingungen gehalten wurde, gab es für die Blattläuse keinen Grund für eine EBF-Abgabe. Nach dieser langen Zeit wäre es möglich, dass sie nicht mehr auf das EBF reagieren. Ein im Vorfeld durchgeführtes Experiment, in dem diesem Klon synthetisches EBF präsentiert wurde, zeigte jedoch eine deutliche Fluchtreaktion der Blattläuse (Kunert *et al.* 2010). Demzufolge reagiert dieser Blattlausklon auf EBF und ein Verlust der Reaktionsfähigkeit auf diesen Duftstoff kann ausgeschlossen werden.

Es ist allerdings möglich, dass sich die Blattläuse anders verhalten, wenn sie von transgenen Pflanzen abgegebenes Farnesen wahrnehmen. Es gibt die Vermutung, dass Blattläuse in der Natur zwischen EBF, welches von Artgenossen oder von Pflanzen produziert wird, unterscheiden können (Dawson *et al.* 1984; Bruce *et al.* 2005; Beale *et al.* 2006). Viele Pflanzen geben neben dem EBF auch andere Sesquiterpene, zum Beispiel

(E)-\(\text{\mathcal{B}}\)-Caryophyllen oder (-)-Germacren D ab. Diese Duftstoffgemische k\(\text{\text{onnen}}\) Blattl\(\text{l\text{\text{uuse}}}\) vermutlich erkennen, weshalb es zu einer reduzierten Reaktion auf das pflanzliche EBF kommt (Bruce \(et al. 2005\)). Eine wichtige Rolle spielt dabei das (E)-\(\text{\mathcal{B}}\)-Caryophyllen, welches die Wirkung von EBF auf die Blattl\(\text{\text{uuse}}\) abschw\(\text{\text{ach}}\) (Dawson \(et al. 1984\)). Dieser Duftstoff wird von \(A. \text{thaliana}\) jedoch nur von den Bl\(\text{\text{uten}}\) ten abgegeben (Chen \(et al. 2003\)) und in diesem Arena-Experiment wurden keine bl\(\text{\text{uhenden}}\) Pflanzen verwendet. Des Weiteren kann eine Beeinflussung durch andere Terpene weitestgehend ausgeschlossen werden, da diese von \(A. \text{thaliana}\) ebenfalls nur von Bl\(\text{\text{uten}}\) te mittiert werden (Chen \(et al. 2003\)).

Der Vermutung gegenüber stehen Beobachtungen, bei denen Blattläuse nachweislich durch pflanzliches EBF erfolgreich abgeschreckt wurden. Zum Beispiel gibt die Wilde Kartoffel nach Berührung EBF ab, worauf die Blattläuse mit Flucht reagieren (Gibson *et al.* 1983). Allerdings handelt es sich hierbei um reines EBF, welches von umgebildeten Blatt-Trichomen abgegeben wird. Es sind somit keine zusätzlichen Duftstoffe vorhanden, die den Blattläusen einen Hinweis auf pflanzliches EBF liefern.

Auch das EBF der transgenen *Arabidopsis*-Genotypen wirkt abschreckend auf *M. persicae* (Beale *et al.* 2006). Die Blattläuse reagierten sowohl auf die in Hexan gelösten Pflanzenduftstoffe, als auch auf headspace-Proben von den transgenen Pflanzen mit einer deutlichen Fluchtreaktion. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Blattläuse im Arena-Experiment auf das Farnesen der transgenen Pflanzen prinzipiell reagieren konnten.

Da aber keine Reaktion der Blattläuse auf die verschiedenen Pflanzen-Genotypen zu erkennen war, ist es vorstellbar, dass andere Faktoren den abschreckenden Effekt von EBF in der Arena überdeckten. Wie bereits mehrfach erwähnt und in den Vorexperimenten getestet, spielen visuelle Signale bei der Wirtsfindung eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund werden im Folgenden optische Faktoren diskutiert, die möglicherweise die abschreckende Wirkung von EBF überlagerten.

Unterschiedliche Pflanzengröße könnte zum Beispiel insofern eine Rolle spielen, dass größere Pflanzen aufgrund ihrer größeren grünen Fläche attraktiver wirken als kleinere Pflanzen (Moericke 1955). Wenn nun die FS 9-2-Pflanzen (hohe EBF-Abgabe) durchschnittlich größer als die FS 11-4-Pflanzen (mittlere EBF-Abgabe) und diese wiederum größer als die Wildtyp-Pflanzen (keine EBF-Abgabe) wären, könnte diese optische An-

lockung möglicherweise stärker wirken als die Abschreckung durch das EBF. Andererseits ist auch bekannt, dass größere Pflanzen mehr EBF produzieren (Kunert *et al.* 2010), weshalb größere Pflanzen visuell attraktiver und olfaktorisch abschreckender als kleinere Pflanzen wirken können und sich somit abschreckende und anlockende Wirkung aufheben. Wie jedoch nachgeprüft wurde, unterschied sich der durchschnittliche Rosettendurchmesser der Pflanzen-Genotypen nicht signifikant voneinander (Abb. 5.4, Abb. 5.9). Die Pflanzengröße spielte sowohl bei dem Versuch mit den geflügelten, als auch mit den ungeflügelten Blattläusen keine Rolle bei deren Verteilung auf den Pflanzen (Tab. 5.2, Tab. 5.3).

Des Weiteren könnten der Infloreszenz-Ansatz und dessen unterschiedliche Länge einen optischen Einfluss auf die Wirtswahl gehabt haben. Die ungeflügelten Blattläuse sahen die Pflanzen zunächst nur von der Seite, eine beginnende Infloreszenz könnte somit ein zusätzlich attraktives visuelles Signal darstellen. Doch auch für geflügelte Blattläuse können Infloreszenzen vorteilhaft sein, da sie weit über die bodennahen Blätter hinauswachsen können und so eventuell günstige Landemöglichkeiten bieten. Beobachtungen bei großen Kolonien zeigten, dass beide Morphen während der Nahrungsaufnahme bevorzugt am Blütenstand saßen. Bei den Experiment-Pflanzen handelte es sich jedoch nur um beginnende Infloreszenzen von weniger als zwei, meist nur 0,5 Zentimeter. Diese sollten sowohl von der Seite als auch aus der Luft von den Blattläusen kaum erkennbar gewesen sein, da die Infloreszenzen die Rosettenblätter nicht, beziehungsweise kaum überragten. Es wurde auch kein Einfluss der Infloreszenz auf die Verteilung der Blattläuse statistisch nachgewiesen (Tab. 5.2, Tab. 5.3).

Doch eventuell ist nicht die Größe und Morphologie der Wirtspflanzen, sondern deren Farbe bei der Wahl entscheidend. Pflanzen unterschiedlichen Genotyps könnten geringe Farbunterschiede aufweisen. *M. persicae* bevorzugt gelb gegenüber grün (Moericke 1950). Hätten die transgenen Pflanzen gelbere Blätter als die Wildtyp-Pflanzen, würden die transgenen Pflanzen attraktiver wirken und die Abschreckung durch das EBF wäre eventuell wieder aufgehoben. Solch ein Farbunterschied konnte jedoch durch Reflexionsmessungen mit einem Spektrophotometer widerlegt werden. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Reflexionsverhalten zwischen den Blättern der verschiedenen Pflanzen-Genotypen festgestellt werden (Tab. 5.1). Die spektrale Charakteristik, das heißt sowohl die Stärke der Reflexion, als auch die Maximumposition, unterschied

sich bei allen gemessenen *Arabidopsis*-Blättern nicht signifikant. Eine unterschiedliche Färbung der Pflanzen kann demzufolge als möglicher ablenkender Faktor während des Hauptexperimentes ausgeschlossen werden.

Möglicherweise könnte generell der visuelle Reiz der grünen Blätter den olfaktorischen Reiz überdecken. Es ist bekannt, dass Blattläuse sehr stark von grünen und gelben Flächen angelockt werden (Moericke 1962). Somit wäre es möglich, dass die grüne Farbe der Blätter attraktiver als die Abschreckung des EBFs ist. Die Blattläuse würden sich somit in erster Linie zu irgendeiner grünen Pflanze hin bewegen, unabhängig davon, ob sie Farnesen produziert oder nicht. Dafür spricht auch, dass Myzus persicae als Generalist keine spezifischen Wirtspflanzen aufsuchen muss und somit Duftstoffe bei seiner Wahl keine allzu große Rolle spielen müssen. Diese These konnte Hori (1999) mit Hilfe eines linearen Olfaktometers unterstützen. Während oligophage Blattläuse von den Gerüchen ihrer Wirtspflanzen angelockt wurden, konnte er dies für polyphage Blattläuse, darunter auch M. persicae, nicht nachweisen. Daraus schloss Hori (1999), dass generalistische Blattlausarten ihre Wirtspflanzen vermutlich vorwiegend nach visuellen Signalen aussuchen. Da sie auf mehreren Wirtsarten leben können, scheint das optische Signal ausreichend für die Wirtsfindung zu sein. Jedoch orientieren sich die Blattläuse nicht ausschließlich visuell, olfaktorische Signale spielen immer, wenn auch nur untergeordnet, eine Rolle bei der Wirtswahl. Dies sollte erst Recht der Fall sein, wenn, wie in dem Arena-Experiment, kein attraktives optisches Signal hervorsticht und sich die Pflanzen morphologisch und farblich nicht voneinander unterscheiden. Davon unabhängig handelt es sich bei EBF nicht um einen wirtspflanzenspezifischen Duftstoff, sondern um ein Alarmpheromon, welches nachweislich von den Blattläusen wahrgenommen wird. Es ist außerdem fraglich, ob die grüne Farbe der Blätter stärker anziehend wirkt als die Abschreckung durch das EBF, da in vorherigen Experimenten beobachtet wurde, dass sich die Blattläuse nach einer EBF-Wahrnehmung von den grünen Pflanzen wegbewegten.

Alle bisher diskutierten visuellen Einflussfaktoren führten offenbar zu keiner Überdeckung der EBF-Abschreckung. Allerdings gibt es einen Anhaltspunkt darauf, dass ein anderer, unbekannter Faktor bei der Wirtswahl der geflügelten Blattläuse wichtig war. Die Positionen der Pflanzen in der Arena hatten einen signifikanten Einfluss auf die Verteilung der geflügelten Blattläuse (Tab. 5.3). Position 4 in der Arena (Abb. 5.11)

zeigt durchschnittlich die höchsten Anzahlen an geflügelten Blattläusen, dabei spielte es keine Rolle, ob auf dieser Position eine transgene oder Wildtyp-Pflanze stand. Folglich wurden die Blattläuse durch einen unbekannten optischen oder olfaktorischen Faktor in ihrer Wahl beeinflusst. Dieser Faktor hatte entweder eine abschreckende Wirkung aus Richtung der Klimakammerwand oder eine Anlockende aus Richtung der Klimakammer. Es wäre zum Beispiel möglich, dass die Blattläuse trotz abschirmendem Papier und Bettlaken unterschiedliche Lichtverhältnisse in der Klimakammer, wie zum Beispiel andere Lampen, wahrgenommen haben. Somit könnte der unbekannte Faktor die abschreckende Wirkung des EBFs überdeckt haben. Allerdings ist es wahrscheinlicher, dass das EBF tatsächlich keinen Einfluss auf die Wirtswahl hatte, da die Verteilung unabhängig vom Genotyp erfolgte.

Unterstützt wird diese Annahme durch die Verteilung der ungeflügelten Blattläuse, bei der die Position 4 in der Arena nicht besonders anlockend auf die Blattläuse wirkte (Tab. 5.2). Das heißt, hier fehlte offenbar der unbekannte Faktor, der die abschreckende Wirkung des EBFs überlagern würde, beziehungsweise waren die ungeflügelten Blattläuse nicht in der Lage ihn wahrzunehmen. Dennoch haben sie sich unabhängig vom Genotyp auf den Pflanzen verteilt, das heißt, das EBF hat das Wahlverhalten der Blattläuse nicht beeinflusst.

Dass die Blattläuse in diesem speziellen Fall nicht auf das EBF reagiert haben, könnte unter anderem an einem ungeeigneten Setup liegen. In einer zu großen Arena, bei der die Pflanzen zu weit weg stehen, können insbesondere die ungeflügelten Blattläuse in der Arenamitte das EBF eventuell nicht wahrnehmen. Außerdem könnte sich das flüchtige Farnesen möglicherweise nur in der Luft über den Pflanzen befunden haben und die Blattläuse auf dem Boden kamen mit dem Duftstoff gar nicht in Berührung. Jedoch saßen fast alle Blattläuse am Ende auf einer Pflanze, demnach müssten sie spätestens dann den Geruch wahrnehmen und bei einer Abschreckung von den transgenen Pflanzen wieder fliehen.

Doch nicht nur die Arenagröße, auch andere Experimentbedingungen, wie die Temperatur oder die Beleuchtung der Arena sollten berücksichtigt werden. So sind beispielsweise beide Fortbewegungsarten der Blattläuse, sowohl das Laufen, als auch das Fliegen temperaturabhängig. Die Minimaltemperatur, unter der keine Aktivitäten zu verzeichnen sind, liegt bei *M. persicae* bei 2 Grad Celsius (Van Emden *et al.* 2007). Mit zuneh-

mender Temperatur steigt die Laufgeschwindigkeit der Blattläuse, erst ab 30 Grad Celsius nimmt diese wieder ab. Geflügelte Blattläuse fliegen unter, beziehungsweise über einer bestimmten Temperatur nicht los. Diese Temperaturgrenzen sind sowohl von der Blattlausart (Campbell et al. 1974), als auch von Morphen, Regionen und Jahreszeiten (Wiktelius 1981) abhängig. Für M. persicae liegt die Untergrenze bei 12,8 Grad Celsius (Broadbent 1949), die maximale Temperatur, bei der die meisten Blattlausarten ihren Flug starten liegt bei 31 Grad Celsius (Dry et al. 1970). Folglich war die mit dem Datalogger in der Arena gemessene Umgebungstemperatur von 25 Grad Celsius (Abb. 5.3) optimal und erfüllte sowohl die Lauf-, als auch die Flugvoraussetzungen der Blattläuse. Dies konnte auch durch die Beobachtungen während des Hauptexperimentes bestätigt werden, bei denen ein Loslaufen der ungeflügelten und ein Losfliegen der geflügelten Blattläuse beobachtet wurde. Obwohl die Temperatur in der Klimakammer nur 20 Grad Celsius betrug, stieg sie in der Arena zu Beginn des Replikates auf 25 Grad Celsius an. Dies ist zum größten Teil auf die Wärmezufuhr durch die Lampen über der Arena zurückzuführen. Da insgesamt keine Temperaturschwankungen gemessen wurden, kann eine störende Beeinflussung des Verhaltens der Blattläuse durch die Temperatur ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Faktor, der die Wirtswahl beeinflussen kann, ist die Beleuchtung. Es ist bekannt, dass die EBF-Produktion von Pflanzen im Dunkeln geringer ist (Kunert *et al.* 2010). Da bei 8 von 24 Stunden eines Replikates das Licht ausgeschaltet war, wurde während dieser Zeit möglicherweise zu wenig EBF für eine Abschreckung produziert. Andererseits sind die Blattläuse tagaktiv und eine Pflanzensuche konnte bereits kurz nach dem Experimentstart, das heißt 10 Stunden vor dem Ausschalten der Lampen, beobachtet werden.

Folglich scheint es unwahrscheinlich, dass der Experimentaufbau für die beobachtete Gleichverteilung der Blattläuse auf den Pflanzen verantwortlich ist.

Sehr viel wahrscheinlicher ist es, dass sich die Blattläuse an das EBF gewöhnt haben und deshalb keine Reaktion auf die verschiedenen Genotypen zu sehen war. Durch die permanente Farnesen-Exposition könnten die Blattläuse unsensibel auf diesen Duftstoff geworden sein. Interessante Anhaltspunkte dazu liefern die Ergebnisse von DeVos (2010). Er arbeitete ebenfalls mit *M. persicae* und transgenen *A. thaliana*-Pflanzen, welche permanent EBF produzierten. Dabei konnte er zeigen, dass Blattläuse, die mehr

als zehn Generationen auf transgenen, EBF-emittierenden Pflanzen gezogen wurden, signifikant weniger von synthetischem EBF und Pflanzen-Duftstoffen mit EBF abgeschreckt wurden als Blattläuse, die auf dem Wildtyp (ohne EBF-Abgabe) gezüchtet wurden. Folglich hat eine Gewöhnung an das EBF stattgefunden, die die Blattläuse unsensibler gegenüber dem Alarmpheromon machte. Da die Blattläuse in dieser Arbeit allerdings "nur" 24 Stunden dem EBF ausgesetzt waren, stellt sich die Frage, ab wann eine Gewöhnung an das EBF stattfindet. Geschieht dies bereits nach einigen Stunden oder braucht es in der Tat mehrere Generationen, um einen Effekt sichtbar zu machen? Auch hierzu führte DeVos (2010) ein Experiment durch und konnte nachweisen, dass bereits nach der ersten Generation die Tendenz erkennbar war, dass weniger Blattläuse auf der transgenen Pflanze auf das EBF reagierten, dieser Unterschied aber erst nach der zweiten Generation signifikant wurde. Diese Erkenntnis macht eine Gewöhnung an das EBF innerhalb von 24 Stunden unwahrscheinlich. Jedoch sollte beachtet werden, dass dieses Experiment im Vergleich zu dem Arena-Experiment auf einem anderem Setup und einer unterschiedlichen Vorgehensweise beruhte. So wurde bei DeVos (2010) zum Beispiel ein neuer, pulsartiger, synthetischer EBF-Puff hinzugegeben, um die Reaktion zu testen, während die Blattläuse in der Arena auf das permanent vorhandene Pflanzen-EBF reagieren sollten. Folglich kann eine Gewöhnung an den kontinuierlichen EBF-Geruch eine mögliche Ursache für das Ergebnis dieser Arbeit sein.

Das permanente Vorhandensein des EBFs könnte jedoch nicht nur zu einer Gewöhnung führen, sondern stellt eventuell auch ein Erkennungssignal für die Blattläuse dar, dass keine Gefahr besteht. Die EBF-Abgabe bei Blattläusen verläuft pulsartig. Möglicherweise erkannten die Blattläuse den permanenten Geruch als pflanzliche EBF-Quelle und nicht als intraspezifisches Alarmsignal. In diesem Fall bestand für die Blattläuse kein Grund, auf das EBF zu reagieren. Dafür spricht, dass die pulsartige Abgabe des Alarmpheromons von einigen Pflanzen, wie bei der Wilden Kartoffel bereits beschrieben (Gibson *et al.* 1983), Abschreckungserfolge bei Blattläusen erzielt.

Folglich scheint die Art und Weise, wie das EBF den Blattläusen präsentiert wird, ob pulsartig oder dauerhaft, ausschlaggebend für deren Reaktion zu sein. Während eine kurzzeitige EBF-Wahrnehmung zu einem Fluchtverhalten führt, wirkt permanent vorhandenes Farnesen nicht mehr abschreckend und spielt somit, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, keine Rolle bei der Wirtswahl.

Eine dauerhafte EBF-Produktion bei natürlichen Pflanzen hat demnach nicht die Funktion einer direkten Blattlausabschreckung. Trotzdem könnte es möglich sein, dass es als indirekter Verteidigungsmechanismus wirkt, indem natürliche Feinde der Blattläuse angelockt werden.

Beispielsweise haben die Blätter der transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen der Linien FS 9-2 und FS 11-4 auf kurze Entfernung eine anlockende Wirkung auf die Larven des Zweipunkt-Marienkäfers, ein Blattlaus-Prädator (Seyfarth 2010). Bei größeren Entfernungen (25 Zentimeter) konnte die anlockende Wirkung der transgenen Pflanzen nicht mehr bestätigt werden. Bei dem adulten Siebenpunkt-Marienkäfer führte eine pulsartige EBF-Präsentation zu einer Anlockung (Al Abassi *et al.* 2000). Doch auch bei Blattlaus-Parasitoiden konnte eine anziehende Wirkung nach kurzzeitiger Farnesen-Zugabe beobachtet werden (Beale *et al.* 2006). Inwieweit dauerhaft vorhandenes EBF bei diesen Blattlaus-Feinden anlockend wirkt und ob dies auch bei größeren Entfernungen noch zutrifft, müsste noch getestet werden.

Wenn die Pflanze durch die andauernde EBF-Produktion tatsächlich natürliche Feinde anlocken und den Schaden durch den Blattlausbefall verringern kann, ist das für sie von Vorteil, da der Pflanze durch die kontinuierliche EBF-Abgabe keine metabolischen Kosten entstehen (Beale *et al.* 2006; Kunert *et al.* 2010). Ökologische Kosten, zum Beispiel die Anlockung anderer Parasiten oder schädlicher Herbivoren, sind hingegen nicht ausgeschlossen und müssten untersucht werden. Am Ende entscheidet die "Kosten-Nutzen-Bilanz" darüber, ob die Pflanze von einer EBF-Produktion profitieren würde.

Im Ganzen betrachtet handelt sich somit um ein sehr komplexes System. Das EBF wirkt nicht nur intraspezifisch bei Blattläusen, sondern wird auch von Pflanzen abgegeben. Jedoch ist hierbei die Funktion zum Teil noch ungeklärt. Eine vollständige Aufklärung wird insbesondere dadurch erschwert, dass wahrscheinlich die zeitliche Abgabe des EBFs die Wirkung beeinflusst. Zusätzlich hat dieser Duftstoff Einfluss auf viele andere Arten, die mit den Blattläusen interagieren.

7 Zusammenfassung

Bei der Blattlausart *Myzus persicae* ist das Sesquiterpen (*E*)-β-Farnesen (EBF) einziger Bestandteil des Alarmpheromons. Bei Gefahr wird dieser Duftstoff von den Blattläusen abgegeben. Nehmen ihn andere Blattläuse in der Kolonie wahr, setzt eine typische Fluchtreaktion ein, das heißt, die Blattläuse beginnen herumzulaufen oder lassen sich von der Pflanze fallen. Da auch einige Pflanzen das EBF kontinuierlich abgeben, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob dies zur Abschreckung von Blattläusen führt und somit als Verteidigung der Pflanzen gegen Blattläuse dient.

In den durchgeführten Experimenten wurden genetisch veränderte *Arabidopsis*-Pflanzen benutzt, welche das EBF permanent produzieren. Dabei wurde getestet, ob das EBF eine abschreckende Wirkung auf *Myzus persicae* hat. In einem Arena-Experiment konnten sowohl geflügelte, als auch ungeflügelte Blattläuse jeweils für 24 Stunden eine Wirtspflanze wählen. Zur Auswahl standen dabei Pflanzen des Wildtyps (produzieren kein EBF), der transgenen Linie FS 11-4 (produzieren relativ wenig EBF) und der transgenen Linie FS 9-4 (produzieren relativ viel EBF).

Um sicher zu stellen, dass die Blattläuse während des Experimentes nicht durch andere Faktoren in ihrer Wahl beeinflusst werden, wurden mehrere Vorexperimente durchgeführt. Hierbei konnte das Setup so optimiert werden, dass keine störenden Faktoren mehr erkennbar waren. Um Reflexionsunterschiede und somit eine visuelle Differenzierung zwischen den verschiedenen Pflanzen-Genotypen auszuschließen wurden spektrale Messungen an den *Arabidopsis*-Blättern mit Hilfe eines Spektrophotometers durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass das von den transgenen Pflanzen kontinuierlich abgegebene EBF keinen signifikanten Einfluss auf die Wirtswahl von *Myzus persicae* hatte. Die drei verschiedenen Pflanzen-Genotypen wirkten weder sichtbar abschreckend noch anziehend auf die Blattläuse, es wurden auf allen Genotypen durchschnittlich gleich viele Individuen gefunden.

Die wahrscheinlichste Begründung für dieses Ergebnis ist eine Gewöhnung der Blattläuse an das permanent vorhandene EBF. Möglicherweise reagieren Blattläuse nur auf pulsartig auftretendes EBF mit Fluchtverhalten, da dies der Abgabe von EBF durch Blattläuse bei Gefahr entspricht. Weiterführende Experimente könnten insofern mit transgenen Pflanzen durchgeführt werden, die das EBF nur kurzzeitig und nicht kontinuierlich abgeben. Hierbei würde es vermutlich zu keiner Gewöhnung kommen und die Blattläuse würden regelmäßig abgeschreckt werden.

Das Ergebnis der Arbeit ist eine unerwartete, aber dennoch wichtige Erkenntnis auf dem sehr komplexen Gebiet der Pflanzen-Blattlaus-Interaktion. Das von Pflanzen permanent produzierte EBF dient demnach nicht zur direkten Abschreckung von Blattläusen. Inwieweit eine kontinuierliche Farnesenabgabe bei der indirekten Verteidigung, wie zum Beispiel zur Anlockung von Prädatoren und Parasitoiden von Blattläusen, wirkt sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

Summary

The alarm pheromone of Myzus persicae consists of only one volatile substance, the terpene (E)- β -farnesene (EBF). When attacked by natural enemies, aphids secrete droplets which contain this pheromone. The EBF activates several behaviour modifications in neighbouring aphids, such as increased attention, walking or dropping off the plant. However, some plants also emit EBF continuously. It should be researched to determine whether plants emit EBF to deter aphids. In this case, EBF serves as a defence-allomone.

Genetically modified *Arabidopsis*-plants, which produce EBF constantly, were used in the experiments to tests whether the plant-produced EBF had a deterrent effect on *Myzus persicae*. In an arena-experiment aphids had a choice between three plant genotypes: the wildtype, which produces no EBF, the transgenic line FS 11-4, which produces relative little EBF and the transgenic line FS 9-2, which produces a lot of EBF. Both wingless and winged aphids could choose their host-plants for 24 hours respectively.

To be sure that aphids would not be influenced by other factors during the experiment, several preliminary tests were done. The results of the tests allowed the experiment to be optimised to eliminate these external influences on the aphids. To exclude reflection differences between plant genotypes, spectral measurements of *Arabidopsis* leaves were carried out with a spectrophotometer.

It was shown that continuously emitted EBF of plants had no significant influence on host choice of *Myzus persicae*. There was no visible attraction or deterrence of aphids by the different genotypes. On all genotypes approximately the same number of individuals was found.

The most likely reason for this result is the habituation of aphids to the continuously released EBF. This suggests that aphids react only to short-time occurrence of EBF with a resulting escape response. Further experiments should be undertaken with transgenic plants, which do not emit EBF continuously. It is likely that no habituation would occur and aphids would be deterred regularly.

The unexpected result of this study is nevertheless an important finding regarding the complex plant-aphid-interaction. In conclusion, the continuous EBF-production of plants does not serve as a direct defense against aphids. The degree to which a constant emission of EBF plays a role as indirect defense, for example in attraction of predators and parasitoids of aphids, should be tested in further experiments.

Anhang

Der Anhang befindet sich auf CD, er beinhaltet Daten und zusätzliche Informationen zu den Versuchen:

A – Methodenentwicklung

- A 1 Vorversuch zum Testen der Methode (3.3.2)
- A 2 Vorversuch zur optischen Ablenkung (3.3.3)
- A 3 Wirtswahl geflügelter Blattläuse (3.5.1)
- A 4 Wirtswahl mit transgenen Pflanzen (3.5.2)
- A 5 Messungen mit und ohne Blatt-Mittelrippe (3.6.4)
- A 6 Messfehler des Gerätes (3.6.5)
- A 7 Variabilität durch Messungen an leicht verschobenen Messflächen (3.6.6)

B – Hauptexperiment

- B 1 Messungen der Blattreflexionen (5.1)
- B 2 Hauptexperiment zum Wirtswahlverhalten (5.2)
- B 3 Temperatur (5.2.1)
- B 4 Fotos aller Experiment-Pflanzen
- B 5 GC-MS-Original daten

Literaturverzeichnis

- Al Abassi S., Birkett M.A., Pettersson J., Pickett J.A., Wadhams L.J. & Woodcock C.M. (2000). Response of the seven-spot ladybird to an aphid alarm pheromone and an alarm pheromone inhibitor is mediated by paired olfactory cells. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 1765-1771.
- Anderson M. & Bromley A.K. (1987). Sensory system. In: *Aphids: Their biology, natural enemies and control* (eds. Minks AK & Harrewijn P). Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, pp. 153-162.
- Beale M.H., Birkett M.A., Bruce T.J.A., Chamberlain K., Field L.M., Huttly A.K., Martin J.L., Parker R., Phillips A.L., Pickett J.A., Prosser I.M., Shewry P.R., Smart L.E., Wadhams L.J., Woodcock C.M. & Zhang Y.H. (2006). Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 10509-10513.
- Bernasconi M.L., Turlings T.C.J., Ambrosetti L., Bassetti P. & Dorn S. (1998). Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid *Rhopalosiphum maidis. Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 87, 133-142.
- Binder B.F., Robbins J.C. & Wilson R.L. (1995). Chemically mediated ovipositional behaviors of the european corn-borer *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera, Pyralidae). *Journal of Chemical Ecology*, 21, 1315-1327.
- Birth G.S. & McVey G.R. (1968). Measuring color of growing turf with a reflectance spectrophotometer. *Agronomy Journal*, 60, 640-643.
- Blackman R.L. & Eastop V.F. (1984). Aphids on the world's crops: an identification and information guide. John Wiley & Sons, Chichester, New York etc.
- Blande J.D., Korjus M. & Holopainen J.K. (2010). Foliar methyl salicylate emissions indicate prolonged aphid infestation on silver birch and black alder. *Tree Physiology*, 30, 404-416.
- Bowers W.S., Webb R.E., Nault L.R. & Dutky S.R. (1972). Aphid alarm pheromone isolation, identification, synthesis. *Science*, 177, 1121-1122.
- Broadbent L. (1949). Factors affecting the activity of alatae of the aphids *Myzus* persicae (Sulzer) and *Brevicoryne brassicae* (L.). *Annals of Applied Biology*, 36, pp. 40-62.
- Bromley A.K., Dunn J.A. & Anderson M. (1979). Ultrastructure of the antennal sensilla of aphids. 1. Coeloconic and placoid sensilla. *Cell and Tissue Research*, 203, 427-442.
- Bruce T.J.A., Birkett M.A., Blande J., Hooper A.M., Martin J.L., Khambay B., Prosser I., Smart L.E. & Wadhams L.J. (2005). Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. *Pest Management Science*, 61, 1115-1121.
- Budavari S. (1996). *The Merck Index An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Twelfth Edition*. United States pharmaceutical company Merck & Co., Whitehouse Station, NJ

- Campbell A., Frazer B.D., Gilbert N., Gutierre A. & Mackauer M. (1974). Temperature requirements of some aphids and their parasites. *Journal of Applied Ecology*, 11, 431-438.
- Campbell C.A.M., Dawson G.W., Griffiths D.C., Pettersson J., Pickett J.A., Wadhams L.J. & Woodcock C.M. (1990). Sex attractant pheromone of damson-hop aphid *Phorodon humuli* (Homoptera, Aphididae). *Journal of Chemical Ecology*, 16, 3455-3465.
- Carter G.A. (1993). Responses of leaf spectral reflectance to plant stress. *American Journal of Botany*, 80, 239-243.
- Chapman R.F., Bernays E.A. & Simpson S.J. (1981). Attraction and repulsion of the aphid *Cavariella aegopodii* by plant odors. *Journal of Chemical Ecology*, 7, 881-888.
- Chen F., Tholl D., D'Auria J.C., Farooq A., Pichersky E. & Gershenzon J. (2003). Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell*, 15, 481-494.
- Crane P.R., Friis E.M. & Pedersen K.R. (1995). The origin and early diversification of angiosperms. *Nature*, 374, 27-33.
- Crawley M.J. (2007). The R Book. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J. .
- Davis K.R. & Hammerschmidt R. (1993). *Arabidopsis thaliana as a model for plant-pathogen interactions*. Aps Press, St. Paul, Minn.
- Dawson G.W., Griffiths D.C., Pickett J.A., Smith M.C. & Woodcock C.M. (1984). Natural inhibition of the aphid alarm pheromone. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 36, 197-199.
- De Vos M., Cheng W.Y., Summers H.E., Raguso R.A. & Jander G. (2010). Alarm pheromone habituation in *Myzus persicae* has fitness consequences and causes extensive gene expression changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 14673-14678.
- Dilawari V.K. & Atwal A.S. (1989). Response of mustard aphid *Lipaphis erysimi* Kaltenbach to visual stimulus color. *Journal of Research Punjab Agricultural University*, 26, 231-236.
- Dixon A.F.G. (1987). The way of life of aphids: Host specificity, speciation and distribution. In: *Aphids. Their biology, natural enemies and control* (eds. Minks AK & Harrewijn P). Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, pp. 197-207.
- Dixon A.F.G. (1998). Aphid ecology. Chapman & Hall London.
- Doering T.F. & Chittka L. (2007). Visual ecology of aphids a critical review on the role of colours in host finding. *Arthropod-Plant Interactions*, 1, 3-16.
- Doering T.F., Kirchner S.M., Kuehne S. & Saucke H. (2004). Response of alate aphids to green targets on coloured backgrounds. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 113, 53-61.
- Dry W.W. & Taylor L.R. (1970). Light and temperature thresholds for take-off by aphids. *Journal of Animal Ecology*, 39, 493-504.
- Dudareva N., Negre F., Nagegowda D.A. & Orlova I. (2006). Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25, 417-440.
- Edwards L.J., Siddall J.B., Dunham L.L., Uden P. & Kislow C.J. (1973). Trans-beta-farnesene, alarm pheromone of green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Nature*, 241, 126-127.

- Fernandes A., Duffield R.M., Wheeler J.W. & Laberge W.E. (1981). Chemistry of the Dufours gland secretions of north-american andrenid bees (Hymnoptera, Andrenidae). *Journal of Chemical Ecology*, 7, 453-463.
- Francis F., Lognay G. & Haubruge E. (2004). Olfactory responses to aphid and host plant volatile releases: (*E*)-beta-farnesene an effective kairomone for the predator *Adalia bipunctata*. *Journal of Chemical Ecology*, 30, 741-755.
- Francis F., Vandermoten S., Verheggen F., Lognay G. & Haubruge E. (2005). Is the (E)-beta-farnesene only volatile terpenoid in aphids? *Journal of Applied Entomology*, 129, 6-11.
- Gibson R.W. & Pickett J.A. (1983). Wild potato repels aphids by release of aphid alarm pheromone. *Nature*, 302, 608-609.
- Goodwin T.E., Eggert M.S., House S.J., Weddell M.E., Schulte B.A. & Rasmussen L.E.L. (2006). Insect pheromones and precursors in female african elephant urine. *Journal of Chemical Ecology*, 32, 1849-1853.
- Hillig K.W. (2004). A chemotaxonomic analysis of terpenoid variation in *Cannabis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 875-891.
- Hodgson C.J. & Elbakhiet I.B. (1985). Effects of color and shape of target hosts on the orientation of emigrating adult apterous *Myzus persicae* in the laboratory. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 38, 267-272.
- Hori M. (1999). Role of host plant odors in the host finding behaviors of aphids. *Applied Entomology and Zoology*, 34, 293-298.
- Jackson B.D., Morgan E.D. & Billen J.P.J. (1990). Contents of the Pygidial gland of the ant *Myrmecia nigriceps*. *Naturwissenschaften*, 77, 187-188.
- Johnson B. (1965). Wing polymorphism in aphids II. Interaction between aphids. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 8, 49-64.
- Kielty J.P., AllenWilliams L.J., Underwood N. & Eastwood E.A. (1996). Behavioral responses of three species of ground beetle (Coleoptera, Carabidae) to olfactory cues associated with prey and habitat. *Journal of Insect Behavior*, 9, 237-250.
- Kirchner S.M., Doring T.F. & Saucke H. (2005). Evidence for trichromacy in the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae). *Journal of Insect Physiology*, 51, 1255-1260.
- Klingauf F.A. (1987). Host plant finding and acceptance. In: *Aphids. Their biology, natural enemies and control* (eds. Minks AK & Harrewijn P). Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, pp. 209-223.
- Kunert G., Otto S., Rose U.S.R., Gershenzon J. & Weisser W.W. (2005). Alarm pheromone mediates production of winged dispersal morphs in aphids. *Ecology Letters*, 8, 596-603.
- Kunert G., Reinhold C. & Gershenzon J. (2010). Constitutive emission of the aphid alarm pheromone (*E*)-beta-farnesene from plants does not serve as a direct defense against aphids. *BMC Ecology*, 10, Article No.: 23.
- Lampel G. & Meier W. (2007). *Fauna Helvetica 16*. Centre Suisse de Cartographie de la Faune, Neuchâtel.
- Lilley R. & Hardie J. (1996). Cereal aphid responses to sex pheromones and host-plant odours in the laboratory. *Physiological Entomology*, 21, 304-308.
- Mazokhin-Porshnyakov G.A. & Kazyakina V.I. (1979). Structure of eyes in alate aphids (Homoptera, Aphididae). *Entomologicheskoe Obozrenie*, 58, 500-505.
- Mewis I. & Ulrichs C. (2006). Host-plant resistance of *Arabidopsis* ecotypes with different glucosinolate profile for different phytophagous insects. *Mitteilungen*

- der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie, 15, 35-39.
- Moericke V. (1950). Über das Farbsehen der Pfirsichblattlaus (*Myzodes persicae* Sulzer). *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 7, pp. 265-274.
- Moericke V. (1952). Farben als Landereize für geflügelte Blattläuse (Aphidoidea). Zeitschrift Für Naturforschung Section B a Journal of Chemical Sciences, 7, 304-309.
- Moericke V. (1955). Über die Lebensgewohnheiten der geflügelten Blattläuse (Aphidina) unter besonderer Berücksichtigung des Verhaltens beim Landen. Zeitschrift für angewandte Entomologie, 37, 29-91.
- Moericke V. (1962). Über die optische Orientierung von Blattläusen. Zeitschrift für angewandte Entomologie, 50, 70-74.
- Montgomery M.E. & Nault L.R. (1977a). Aphid alarm pheromone: dispersion of *Hyadaphis erysimi* and *Myzus persicae*. *Annals of the Entomological Society of America*, 70, 669-672.
- Montgomery M.E. & Nault L.R. (1977b). Comparative response of aphids to alarm pheromone (*E*)-beta-farnesene. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 22, 236-242.
- Mostafavi R., Henning J.A., Gardea- Torresday J. & Ray I.M. (1996). Variation in aphid alarm pheromone content among glandular and eglandular-haired *Medicago* accessions. *Journal of Chemical Ecology*, 22, 1629 1638.
- Nabeta K., Ara Y., Aoki Y. & Miyake M. (1990). Biosynthesis of monoterpenes and sesquiterpenes in *Larix leptolepis* callus from deuterated mevalonates. *Journal of Natural Products*, 53, 1241-1248.
- Nault L.R., Edwards L.J. & Styer W.E. (1973). Aphid alarm pheromones secretion and reception. *Environmental Entomology*, 2, 101-105.
- Niessen W.M.A. (2001). Current practice of gas chromatography mass spectrometry. Dekker New York, NY.
- Nottingham S.F., Hardie J., Dawson G.W., Hick A.J., Pickett J.A., Wadhams L.J. & Woodcock C.M. (1991). Behavioral and electrophysiological responses of aphids to host and nonhost plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 17, 1231-1242.
- Novotny M., Harvey S. & Jemiolo B. (1990). Chemistry of male-dominance in the house mouse *Mus domesticus*. *Experientia*, 46, 109-113.
- Pettersson J. (1993). Odor stimuli affecting autumn migration of *Rhopalosiphum padi* (L) (Hemiptera, Homoptera). *Annals of Applied Biology*, 122, 417-425.
- Pettersson J., Pickett J.A., Pye B.J., Quiroz A., Smart L.E., Wadhams L.J. & Woodcock C.M. (1994). Winter host component reduces colonization by bird-cherry oat aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) (Homoptera, Aphididae) and other aphids in cereal fields. *Journal of Chemical Ecology*, 20, 2565-2574.
- Pickett J.A. & Griffiths D.C. (1980). Composition of aphid alarm pheromones. *Journal of Chemical Ecology*, 6, 349-360.
- Pollard D.G. (1973). Plant penetration by feeding aphids (Hemiptera, Aphidoidea). *Bulletin of Entomological Research*, 62, 631-714.
- Powell G. & Hardie J. (2000). Host-selection behaviour by genetically identical aphids with different plant preferences. *Physiological Entomology*, 25, 54-62.
- Powell G., Tosh C.R. & Hardie J. (2006). Host plant selection by aphids: Behavioral, evolutionary, and applied perspectives. *Annual Review of Entomology*, 51, 309-330.

- Raal A., Kaur H., Orav A., Arak E., Kailas T. & Muurisepp M. (2011). Content and composition of essential oils in some Asteraceae species. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 60, 55-63.
- Rollins R.C. (1993). The cruciferae of continental North America: Systematics of the mustard family from the Arctic to Panama Stanford University Press, Stanford.
- Rothmaler W. (1978). Exkursionsflora. Volk und Wissen Volkseigener Verlag, Berlin.
- Seyfarth S. (2010). Do larvae of the aphid predator *Adalia bipunctata* response to plant released (*E*)-β-farnesene? In. Praktikumsbericht am Max Planck Institut für chemische Ökologie Jena.
- Shull C.A. (1929). A spectrophotometric study of reflection of light from leaf surfaces Contributions from the Hull Botanical Laboratory 391. *Botanical Gazette*, 87, 583-607.
- Strasburger E. (1991). Lehrbuch der Botanik. G. Fischer, Stuttgart.
- Sutherland O.R. & Mittler T.E. (1971). Influence of Diet Composition and Crowding on Wing Production by Aphid Myzus-Persicae. *Journal of Insect Physiology*, 17, 321-328.
- Turlings T.C.J., Tumlinson J.H., Heath R.R., Proveaux A.T. & Doolittle R.E. (1991). IIsolation and identification of allelochemicals that attract the larval parasitoid *Cotesia marginiventris* (Cresson) to the microhabitat of one of its hosts. *Journal of Chemical Ecology*, 17, 2235-2251.
- Van Emden H.F., Eastop V.F., Hughes R.D. & Way M.J. (1969). Ecology of *Myzus persicae*. *Annual Review of Entomology*, 14, 197-270.
- Van Emden H.F. & Harrington R. (2007). *Aphids as crop pests*. CAB International Wallingford.
- Ward S.A., Leather S.R., Pickup J. & Harrington R. (1998). Mortality during dispersal and the cost of host-specificity in parasites: How many aphids find hosts? *Journal of Animal Ecology*, 67, 763 773.
- Wientjens W.H., Lakwijk A.C. & Vanderma.T (1973). Alarm pheromone of grain aphids. *Experientia*, 29, 658-660.
- Wiktelius S. (1981). Diurnal flight periodicities and temperature tresholds for flight for different migrant forms of *Rhopalosiphum padi* L. (Homoptera, Aphididae). *Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie-Journal of Applied Entomology*, 92, 449-457.
- Will T., Tjallingii W.F., Thonnessen A. & van Bel A.J.E. (2007). Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 10536-10541.
- Zaks A., Davidovich-Rikanati R., Bar E., Inbar M. & Lewinsohn E. (2008). Biosynthesis of linalyl acetate and other terpenes in lemon mint (*Mentha aquatica* var. *citrata*, Lamiaceae) glandular trichomes. *Israel Journal of Plant Sciences*, 56, 233-244.
- Zhu J., Obrycki J.J., Ochieng S.A., Baker T.C., Pickett J.A. & Smiley D. (2005a). Attraction of two lacewing species to volatiles produced by host plants and aphid prey. *Naturwissenschaften*, 92, 277-281.
- Zhu J.W. & Park K.C. (2005b). Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. *Journal of Chemical Ecology*, 31, 1733-1746.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Betreuerin und "Motivatorin" Grit bedanken. Sie hat mich in das große Blattlaus-Milieu eingewiesen, mir bei der Planung der
Experimente hilfreiche Tipps gegeben, stand mir bei der Datenauswertung mit ihrem
umfangreichen Statistikwissen zur Seite und hat geduldig meine 1000 Fragen beantwortet. Des Weiteren möchte ich mich ganz besonders dafür bedanken, dass ich ohne Probleme ein Jahr aussetzen konnte und danach wieder in die hilfsbereite BlattlausArbeitsgruppe aufgenommen wurde.

Vielen Dank an Jonathan, in dessen Arbeitsgruppe ich die Diplomarbeit durchführen konnte und der es mir ermöglichte, auch nach meiner Babypause im Institut weiter zu arbeiten.

Ich möchte mich weiterhin bei Alex und Michael aus der Arbeitsgruppe bedanken, dafür, dass sie mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mir mit fachlichen Gesprächen weiter halfen

Danke an alle Gärtner (insbesondere Andreas Weber) für die Anzucht vieler, vieler Pflanzen und Danke an die Techniker (insbesondere Daniel Veit) für den Bau der Arena, des Lichttisches und weiterem Equipment.

Für die Nutzung des Spektrophotometers im Institut für Angewandte Physik (IAP) an der FSU Jena bedanke ich mich bei Prof. Pertsch.

Ganz großer Dank gilt natürlich auch meinen Eltern, die von Anfang an mein Studium (finanziell und emotional) unterstützten. Obwohl es länger als geplant dauerte und das Ende oft sehr weit weg schien, standen sie immer hinter mir und meinen Plänen.

Besonders danken möchte ich meinem Mann Jörg. Vom ersten Physikpraktikum bis zum Korrekturlesen der Diplomarbeit hat er mein Studium unterstützt, mir weiter geholfen, mich motiviert und dabei trotzdem nie seinen Humor verloren.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Jena, den 28. September 2011

Unterschrift