

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Biologisch-Pharmazeutische Fakultät

angefertigt am Max Planck Institut für chemische Ökologie in Jena
Abteilung für evolutionäre Neuroethologie



seit 1558

Funktion geschlechtsspezifischer Duftpinsel bei Männchen
des Tabakswärmers *Manduca sexta* – eine einleitende Untersuchung

Bachelorarbeit
zur Erlangung des Grades eines
Bachelor of Science

vorgelegt von
Johannes Körnig
aus Jena

Jena, Januar 2012

Gutachter:

Prof. Dr. Bill S. Hansson

Dr. Andreas Reinecke

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	2
2 Einleitung.....	3
3 Material und Methoden	5
3.1 <i>Manduca sexta</i>	5
3.2 Extraktgewinnung aus den Duftpinseln	6
3.3 Elektroantennographische Detektion	9
3.4 Gaschromatographie mit gekoppelter Flammionisations- detektion und Elektroantennographischer Detektion	11
3.5 Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie	13
3.6 Verhaltensexperiment	14
4 Ergebnisse.....	16
4.1 Elektroantennographische Detektion	16
4.2 Gaschromatographie mit gekoppelter Flammionisations- detektion und Elektroantennographischer Detektion	19
4.3 Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie	23
4.4 Verhalten	25
4.4.1 Männchenmassen	25
4.4.2 Verhaltensexperiment.....	27
5 Diskussion	30
6 Quellen.....	34

1 Zusammenfassung

Die Duftpinsel männlicher *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) stehen unter Verdacht eine wichtige Funktion beim Paarungsverhalten einzunehmen. Es wurde versucht einen Zusammenhang zwischen den Duftpinseln und der Partnerakzeptanz durch die Weibchen herzustellen bzw. zu zeigen, dass männliche Pheromone eine Repellentfunktion aufweisen. Es konnten mit Elektroantennographischer Detektion Antennenreaktion bei *M. sexta* –Weibchen und –Männchen auf Extrakte aus Duftpinseln ausgelöst werden. Dabei reagieren Männchen tendenziell stärker als Weibchen. Mittels vorgeschalteter Gaschromatographie und parallel laufender Flammionisationsdetektion sollten der oder die, an der Antennenreaktion beteiligten Stoffe durch ihre Retentionszeiten charakterisiert werden. Es konnte an drei Stellen eine Antennenreaktion auf Stoffe in den fraktionierten Duftpinselextrakten nachgewiesen werden. Die reizauslösenden Peaks sind jedoch nachträglich durch die angewendete Methode in die Fraktionen gelangt. Eine Reizantwort auf nicht fraktionierte Extrakte fand nicht statt.

Es wurden Duftpinselspezifische Carbonsäuren und Carbonsäurederivate in Duftpinselextrakten festgestellt, welche strukturelle Ähnlichkeiten zu den bekannten Sexualpheromonen der *M. sexta*-Weibchen aufweisen.

Den physiologischen Untersuchungen stand gleichberechtigt eine Verhaltensstudie gegenüber. Diese zeigte, dass, unter den gegebenen Bedingungen das Vorhandensein von Duftpinseln irrelevant für die Akzeptanz eines Männchens durch ein Weibchen ist. Hingegen gibt es eine Tendenz zu einer den weiblichen Pheromonen antagonistischen Funktion der Duftpinselstoffe.

Allgemein erwecken die Daten den Anschein, dass die Duftpinsel das weibliche Pheromonbukett überdecken und es so anderen Männchen erschweren ein bereits umworbenes bzw. in der Paarung befindliches Weibchen chemotakisch zu orten. Es gelang nicht die beobachteten Tendenzen in den einzelnen Methoden auf ein entsprechendes Signifikanzniveau zu bringen.

2 Einleitung

Es gibt viele Belege für die wichtige Rolle männlicher Pheromone bei Motten. Unter den Männchen der Lepidopteren haben sich bei vielen Arten verschiedenste Duftorgane entwickelt um diese zu verbreiten. Die Formen variieren von einfachen Duftscluppen bis hin zu, aus Taschen ausstülpbaren, Duftpinseln wie bei *M. sexta* (Birch, 1990).

Nicht nur eine Vielfalt bei den Formen sondern auch bei den Funktionen duftemittierender Organe ist beobachtet worden. Es gibt Untersuchungen, welche die Duftpinsel als wichtiges Organ für die Partnerakzeptanz des Weibchens bestätigen. So konnte bei der orientalischen Fruchtmotte, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae), das typische Verhalten der Weibchen nach der Duftpinselpräsentation der Männchen durch einen synthetischen Pheromonmix reproduziert werden (Baker, 1979; Nishida, 1982). Eine Erhöhung des Paarungserfolges auf Grund der von Duftpinseln abgegebenen Sexualpheromone der Männchen bzw. dem Vorhandensein von Duftorganen allgemein ist neben *G. molesta* unter anderem auch bei *Heliothis subflexa* (Lepidoptera: Noctuidae), *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) und *Ephestia elutella* (Lepidoptera: Pyralidae) belegt (Phelan, 1986; Fitzpatrick, 1988; Löfstedt, 1990; Hillier, 2004; Hillier, 2011). Zumindest eine aphrodisierende Wirkung des Duftpinselbuketts auf die Weibchen existiert bei *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) (Birch, 1989).

Emittierte Stoffe aus Duftpinseln können auch für artgleiche Männchen ein adäquater Reiz sein (Grant, 1971; Lecomte, 1998). Für einige Lepidopteren steht fest, dass der gerichtete Flug artgleicher Männchen zu Weibchen durch die von männlichen Duftorganen abgegebenen Stoffe inhibiert wird. Diese antagonistische Funktion zu dem weiblichen Pheromonbukett ist bei *H. virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), *Acrolepiopsis assectella* (Lepidoptera: Acrolepiidae) und *P. unipuncta* bekannt (Hirai, 1978; Lecomte, 1998; Hillier, 2007).

Des Weiteren fungieren zumindest unter *H. virescens* und *H. subflexa* Duftpinsel als Mittel zur Verhinderung interspezifischer Paarungen. Die Weibchen der beiden Arten können durch diese artfremde Männchen erkennen und einer Paarung entgegenwirken (Hillier, 2011).

Über die Funktion der Duftpinsel bei *M. sexta* ist hingegen nichts bekannt. Einzig glanduläre Zellen an der Basis der Taschen, in welche die Duftpinsel eingeklappt werden können, sind beschrieben wurden (Birch, 1990).

Der Sexualdimorphismus bei *M. sexta* setzt sich bei den Antennen fort, welche nicht nur morphologisch stark ausgeprägt sind (Sanes, 1976). Auch Art und Anzahl von Geruchsstoffrezeptoren sind oft geschlechtsspezifisch und noch nicht alle reizauslösenden Stimuli sind bekannt (Shields 2001; Patch, 2009; Große-Wilde, 2010).

Durch eine Kombination aus elektrophysiologischen Methoden und einer Verhaltensstudie sollte eine mögliche Funktion der Duftpinsel bei *M. sexta* nachgewiesen werden. Unter Bezugnahme dieser Daten sollten die von den Duftpinseln abgegebenen Pheromone abgeleitet werden.

3 Material und Methoden

3.1 *Manduca sexta*

Die verwendeten Tiere stammten aus der hauseigenen Zucht des Max-Plank-Institutes für chemische Ökologie in Jena. Erwachsene *M. sexta* wurden in einem Flugkäfig gehalten. Dort konnten sie sich verpaaren und ihre Eier auf einer bereitgestellten *Nicotiana attenuata*, eine ihrer natürlichen Wirtspflanzen, ablegen. Die Eier wurden drei Mal die Woche abgelesen und in Kunststoffkisten zum Schlüpfen gebracht, in denen ihnen künstliche Nahrung dargeboten wurde (s. Tab. 1 und Tab. 2). Die Eier und Larven wurden bei 27°C und einer relativen Luftfeuchte von 70% gehalten. In der Kiste befand sich ein Metallgitter, auf welchem die Nahrung bereitgestellt wurde. Erreichten die Raupen das Ende des fünften Larvenstadiums wurden sie aus den Kisten entnommen und in Verpuppungsbehälter überführt. Diese bestanden aus einer ca. 50cm langen und ca. 5cm breiten Holzbohle in die ca. 8cm tiefe und ca. 3cm breite Löcher gebohrt waren. Die Löcher wurden mit einem Holzbrett verschlossen und die Bohlen in einer Klimakammer gelagert.

Waren die Larven verpuppt, wurde das Geschlecht der Tiere bestimmt und diese entsprechend sortiert. Die für die Experimente verwendeten Lepidopteren wurden, soweit nicht anders beschrieben, im Puppenstadium bereitgestellt. Den Tieren wurde ein Tag/Nacht-Rhythmus von 16h/8h vorgegeben.

Table 1: Zusammensetzung der künstlichen Nahrung

Zutat	Menge	bezogen bei	Hersteller (soweit abweichend)	Art.- oder Kat.-nr.
Wasser	12l			
Agar	306g	Carl Roth GmbH & Co. KG		5210.2
Weizenkeime	959g	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH		W0125-5KG
Maismehl	932g	All-BIO Naturkost GmbH	RAPUNZEL NATURKOST GmbH	104781
Sojamehl (Voll-Soja)	506g	Reformhaus	„Hensel“	
Casein	499g	Fisher Scientific GmbH		276070010
Salz-Mix	160g	MP Biomedicals Germany GmbH		902851
Kristallzucker	240g	REWE		
Cholesterin	33,3g	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH		C8503-500G
Ascorbinsäure	80g	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH		A7506-1KG
Sorbinsäure	40g	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH		S1626-500G
Methyl paraben	20g	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH		H5501
Formalin (37%)	400ml (1:10)	Carl Roth GmbH & Co. KG		7398.1
Leinöl	60ml	REWE	Kunella Feinkost GmbH	7222343
Vitamin-Mix	200ml			

Tabelle 2: Zusammensetzung des Vitamin-Mixes

Zutat	Menge	bezogen bei	Art.- oder Kat.-nr.
Wasser	200ml		
Nikotinsäure	200mg	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH	N4126
Riboflavin	100mg	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH	R4500
Thiamin	46,7mg	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH	T1270
Pyridoxine	46,7mg	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH	P9755
Folsäure	46,7mg	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH	F7876
Biotin	4mg	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH	B4501

3.2 Extraktgewinnung aus den Duftpinseln

Um potentiell vorhandene und von den Duftpinseln abgegebene Pheromone zu identifizieren wurden Extrakte auf Dichlormethanbasis gewonnen.

Für die Herstellung der Proben wurden ausschließlich unverpaarte Männchen verwendet, da nicht bekannt ist, ob die gländulären Zellen an der Basis der Seitentaschen die Produktion von Pheromonen nach einer erfolgreichen Paarung reduzieren oder gar ganz einstellen (Birch, 1990). Des Weiteren wurden für die Präparationen Tiere genutzt die drei bis vier Tage alt waren um ihnen ausreichend Zeit zu geben Botenstoffe zu produzieren und gegebenenfalls zu akkumulieren. Für den Fall, dass die Biosynthese der Pheromone durch den externen Reiz jungfräulicher Weibchen und ihren Sexualpheromonen induziert wird, wurden solche separiert, aber in räumlicher Nähe zu den Männchen gehalten.

Die Präparationen für die Duftpinselextrakte fanden zwischen 22 und 24 Uhr statt, die Zeit in der sich ein Großteil der Motten zu paaren beginnt. Sollten vorhandene Pheromone sich nicht akkumulieren, sondern bedarfssynchron metabolisiert werden, sollte so eine möglichst hohe Ausbeute an Anylaten gesichert werden.

Für die Gewinnung eines Rohextraktes wurden die Duftpinselextrakte von Männchen präpariert. Die sich in separaten Aufbewahrungsboxen befindlichen Tiere wurde im Vorfeld 5 bis 15 min bei 4°C heruntergekühlt. Mit einer Rasierklinge (Apollo Herkenrath GmbH & Co. KG) wurde das Abdomen mit einem transversal verlaufenden Schnitt vorzugsweise entlang des ersten Abdominalsegmentes oder der Intersegmentalmembran, welche Metathorax und Abdomen verbindet, getrennt. Kopf

und Thorax wurden mit einem Sagittalschnitt halbiert, woraufhin die physischen Tätigkeiten des Insektes in kurzer Zeit versagten. Das Abdomen wurde, die Duftpinselapparate nach oben zeigend, auf Wachs (Erich Kopp GmbH, Erkodent®) gelegt. Mit zwei Nadeln wurde das Abdomen zuerst in einem möglichst flachen Winkel mit einem, von anterior nach posterior verlaufendem, Stich fixiert. Für einen festen Sitz des Präparates hat es sich als vorteilhaft erwiesen, wenn sich diese Nadeln überkreuzen und die Einstichstellen möglichst weit außen lagen. Eine dritte Nadel fixierte das posteriore Ende des Abdomens. Mit einer Pinzette wurde das anteriore Ende des Duftpinselapparates inklusive der Duftpinsel gegriffen und mit einer Mikroschere entlang der Seitentaschen das gesamte Organ entfernt (s. Abb. 1). Bei dem posterioren Bereich der Seitentaschen wurde besonders darauf geachtet keinen Teil am Abdomen zu lassen, da dort Drüsengewebe sitzt, welches unter dem Verdacht steht Pheromone zu produzieren (Birch, 1990).

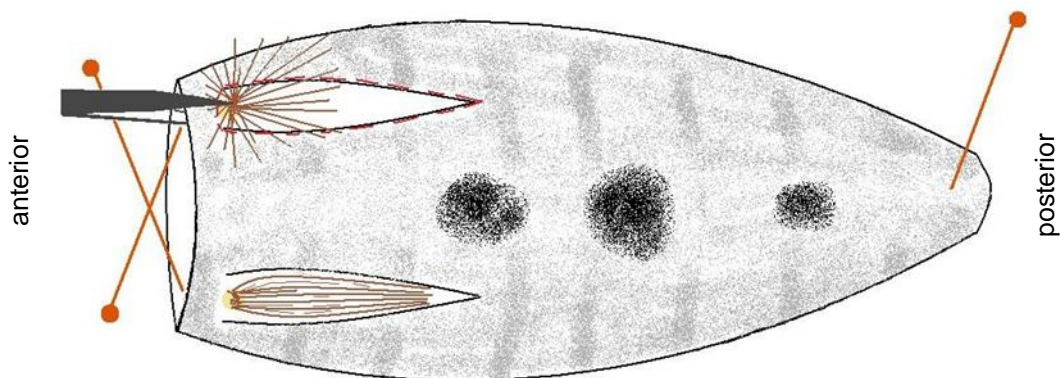


Abbildung 1: Ventralansicht auf ein präpariertes und fixiertes Abdomen von *M. sexta*, schematisch; Pinzette greift Duftpinselapparat am anterioren Ende; gestrichelte rote Linie entspricht der Schnittkante

Die Duftpinselapparate wurden über Nacht in Dichlormethan (Carl Roth GmbH, Rotisolv® HPLC) (DCM) bei -20°C extrahiert, dem wasserfreies Nartiumsulfat beigefügt war. Dieses sollte den Proben Wasser entziehen um den Verschleiß des Massenspektrometers zu minimieren. Anschließend wurde das Rohextrakt mit einer Spritze abgenommen und unter einem schwachen Argonstrom auf ein Volumen von maximal $300\mu\text{l}$ eingengt. Voruntersuchungen zeigten die Notwendigkeit einer Lagerung der Proben unter einer Argonatmosphäre bei -80°C .

Wurden für eine Probe mehr als 4 Tieren verwendet, so wurde das Extraktionsgefäß während der Präparation auf Eis gelagert um einer Verdunstung von Anylaten entgegenzuwirken.

Die eingegangenen Proben wurden für die qualitative Analyse auf einer 100-mg SI-Säule (Biotage, Isolute SI 100mg/3ml) fraktioniert. Voruntersuchungen zeigten, dass es notwendig ist die SI-Säulen vor einer Fraktionierung zu reinigen. Dazu wurde die Säule stufenweise mit je 1ml in der Folge (a) Methanol (VWR International GmbH, Pestinorm® for GC - capillary grade), (b) DCM, (c) 10% DCM in Pentan und (d) Pentan (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Chromasolv®) gereinigt. Danach wurde das Extrakt auf die Säule gegeben und mit je 1ml der Stoffe in der Reihenfolge (d), (c), (b), (a) bei einem Fluss von ca. 1ml/min eluiert. Die Fraktionen wurden unter Argon eingengt und das, einem Männchenäquivalent entsprechende Volumen vermerkt. Die Fraktionen wurden bei -80°C gelagert. Es wurde im Vorfeld überprüft, ob durch die Fraktionierung über die SI-Säule ein Verlust von Anylaten durch den Verbleib auf der stationären Phase erfolgt. Hierzu wurde ein Mix aus vier flüchtigen Substanzen (1-Nonanol, Methylbenzoat, Dodekan, Heptansäure) verwendet. Diese konnten in den Fraktionen nachgewiesen werden.

Teilweise wurden die Rohextrakte noch vor dem Einengen mit einem Filter der Maschenweite 0,2µm (Markus Bruckner GmbH & Co. KG, Chromafil PP/PTFE O-20/3 farblos) von größeren Partikeln befreit und dann unter Argon eingengt. Diese Proben wurden nicht fraktioniert.

Als Kontrolle wurden Extrakte aus ventralen Abdomenstücken gewonnen. Die herausgeschnittenen Flächen entsprachen denen der Duftpinselapparate und beinhalteten eine Intersegmentalmembran und Teile des fünften Sternites. Leerproben wurden mit DCM angefertigt.

3.3 Elektroantennographische Detektion

Zur Überprüfung der physiologischen Aktivität wurden Antennenantworten von *M. sexta* –Männchen und –Weibchen auf Duftpinselextrakte und –fraktionen aufgezeichnet.

In Vorbereitung der Elektroantennographischen Detektion (EAD) wurde ein Tier für 5-10min bei 4°C heruntergekühlt und dann auf einer Halterung mit Parafilm fixiert. Das Tier wurde vor einem permanenten Luftfluss von ~0,6l/min aus einem Keramikrohr so positioniert, dass die Antenne auf möglichst großer Fläche von diesem erfasst wurde (s. Abb. 2 und 3).

Das Tier wurde mit zwei Glaskapillarelektroden verbunden. Die Elektrodenspitze der Referenzelektrode befand sich während der EAD im Scapus. Die Potentialableitung erfolgte an der geöffneten Antennenspitze, in welche die Signalelektrode gerade soweit eingeführt wurde, dass ein Elektroantennogramm (EAG) abgelesen werden konnte. Als Elektrolyt diente Haemolymphringer (s. Tab 3). Die Elektroden waren mit einem Vorverstärker (Syntech, AC Probe) verbunden, welcher die abgeleiteten Potentiale um den Faktor 10 verstärkt und an eine Signalbox (Syntech, IDAC4) weiterleitete. Die Signale wurden mit einem PC aufgezeichnet, wobei das Programm GC-EAD 2009 v1.1.0 (Syntech) verwendet wurde.

Die Potentialableitung der Antenne wurde mittels Präsentation eines Stoffgemisches (Mix4) überprüft. Mix4 (s. Tab 4) enthält flüchtige Substanzen, welche von den Wirtspflanzen abgegeben werden und von *M. sexta* wahrgenommen werden können (Fraser, 2003; Gaquerel, 2009). Hierzu wurden 10µl Mix4 (10µg/µl) auf einen Filterpapierstreifen aufgetragen, welcher sich in einer Glaspipette befand. Diese wurde mit einem Schlauch verbunden, über welchen durch ein Pedal mittels einer Steuerungseinheit (Syntech, Stimulus Controller CS-55) für 0,5sek Luft mit einer Flusstärke von ~0,4l/min geleitet werden konnte (Puffen). Die Pipette konnte in das Keramikrohr durch ein Seitenloch eingeführt werden. Für die Zeitdauer des Reizes wurde der kontinuierliche Luftfluss um den gleichen Betrag reduziert. Analog wurde die Erregung der Antenne auf DCM protokolliert, wobei dessen aufpipettiertes Volumen dem der Duftpinselextrakte entsprach. Zwischen dem Auftragen einer

Probe und dem Puffen wurde versucht möglichst das komplette Lösungsmittel verdampfen zu lassen.

Für die Aufzeichnung der Antennenreaktionen auf die Duftpinselextrakte wurden zwei Männchenäquivalente von eingeeigneten fraktionierten bzw. nicht fraktionierten Extrakten verwendet. Durch die Pedalbetätigung wurde ein Puff ausgelöst. Der Auslösezeitpunkt und die EAGs wurden aufgezeichnet.

Für den Vergleich der EAGs wurden die Spannungsamplituden der Extraktpuffs Normiert:

$$\text{normierte EAG – Antwort} = \frac{dU_{\text{Extrakt}} - dU_{\text{DCM}}}{dU_{\text{Mix4}} - dU_{\text{DCM}}}$$

Tabelle 3: Zusammensetzung des Haemolymphringers

Stoff	Menge/l
KCl	0,48g
KH ₂ PO ₄	2,72g
MgCl ₂ *6H ₂ O	2,44g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,16g
KOH (1N)	9,6ml
Glucose	70,16g
NaCl	0,7g

Tabelle 4: Zusammensetzung des Probegemisches Mix4, Massekonzentrationen der Stoffe im Mix gleich

Stoff	CAS-Nr.	Hersteller
Z-3-Hexen-1-ol	928-96-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Z-3-Hexen-1-yl-acetate	3681-71-8	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Linalool (Racemat)	78-70-6	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Geranylaceton	3796-70-1	Fluka



Abbildung 2: für EAD auf Halterung fixiertes *M. sexta* Männchen

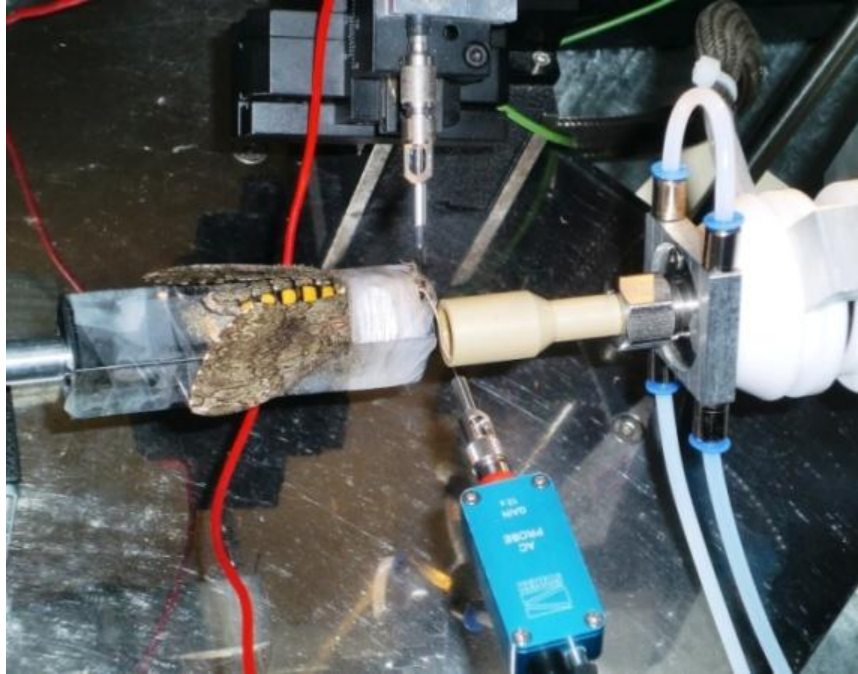


Abbildung 3: *M. sexta* in der Versuchsanordnung für die EAD, Referenzelektrode oben, Signalelektrode mit Vorverstärker unten

3.4 Gaschromatographie mit gekoppelter Flammionisationsdetektion und Elektroantennographischer Detektion

Für die Identifizierung von möglichen Pheromonen sollten elektrophysiologische Antworten von männlichen und weiblichen Antennen auf Anylate in den Proben aufgezeichnet werden.

Die Tiere wurden analog zu 3.3 vorbereitet. Die Antennenreaktionen auf Mix4 als auch auf DCM wurden zur Überprüfung der korrekten Ableitung der Antennenreaktionen genutzt und protokolliert. Die Normierung der Spannungsamplituden wurde unter Hilfenahme folgender Formel erreicht:

$$\text{normierte EAG – Antwort} = \frac{dU_{\text{Anylatpeak}}}{dU_{\text{Mix4-Puff}}}$$

Für die EAD wurde ein Probevolumen von 1-2 μ l in den Gaschromatographen (Agilent 6890 N GC) (GC) injiziert. Die Injektortemperatur lag bei 240°C. Der Ofen hielt für 1min eine Temperatur von 40°C, ehe diese um 20°C/min erhöht wurde. Es wurde eine nicht polare Säule mit einer auf (5%–Phenyl)–Methylpolysiloxan

basierenden stationären Phase genutzt (Agilent, HP-5MS UI). Als Trägergas diente Helium, mit einer Flussrate von 2ml/min bei einem Säulendurchmesser von 320µm. Aus der Säule austretende Stoffe wurden in einem Verhältnis von 1:1 aufgeteilt. Ein Teil wurde an den FID weitergeleitet und dessen Signale aufgezeichnet (Agilent, GC Chem Station). Der Andere gingen über die auf 320°C geheizte ODP-transfer-line auf die Antenne (s. Abb. 4).

Die Signale vom FID als auch die EAGs wurden über die Signalbox zu einem PC übertragen und aufgezeichnet (GC-EAD 2009).

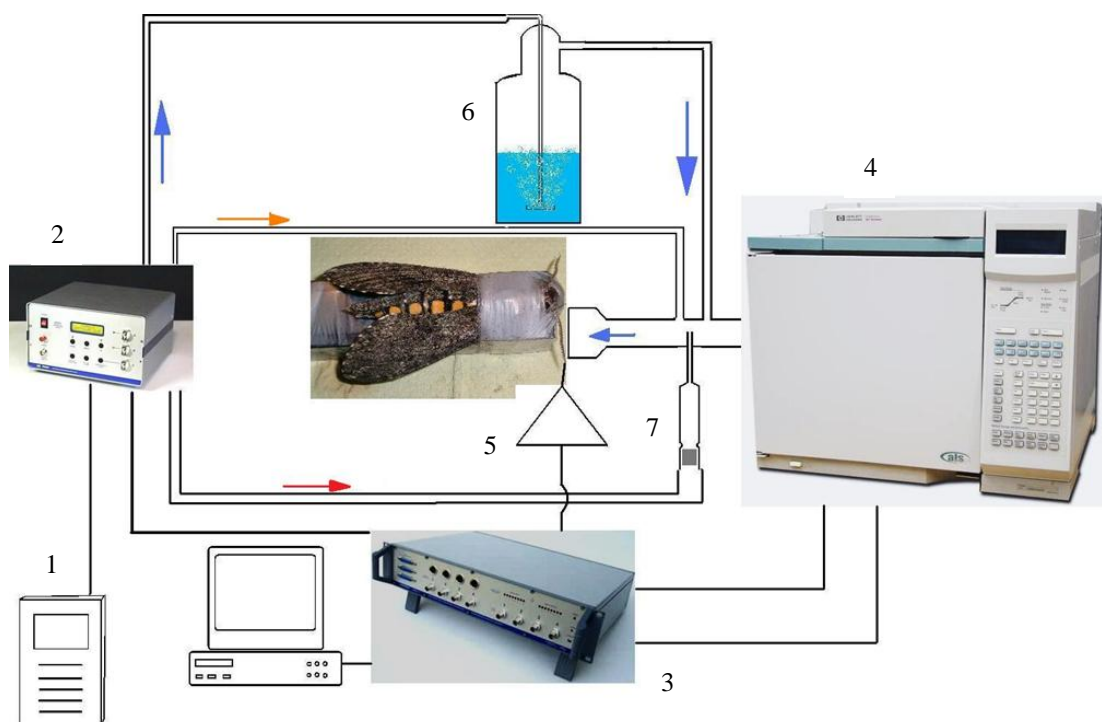


Abbildung 4: Apperaturaufbau des GC-FID-EAD, blaue Pfeile: kontinuierliche Luftflüsse, oranger Pfeil: unterbrechbarer kontinuierlicher Luftfluss, roter Pfeil: Puffstrom über Glaspipette, 1: Pedal, 2: Steuerungseinheit, 3: Signalbox, 4: GC-FID, 5: Vorverstärker, 6: Luftbefeuchter mit Wasser, 7: Glaspipette mit Filterpapierstreifen, Referenzelektrode nicht abgebildet ¹

¹ <http://www.gentechscientific.com/agilenthp-6890-gc-with-fid/>
<http://www.syntech.nl/pages/stimulus.htm>
<http://www.syntech.nl/pages/IDAC-4.htm>

Zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des gesamten Aufbaus wurde 1µl Mix4 (100ng/µl) in den GC injiziert.

Untersuchungen im Vorfeld zeigten eine hohe Konzentration an hochmolekularen Kohlenwasserstoffverbindungen wie z.B. Cholesterin in den Pentanfraktionen. Um einer Verschmutzung der GC-Säule und damit einer Erhöhung der Grundlinie der vom FID aufgezeichneten Ionenmenge entgegenzuwirken wurde auf die Untersuchung dieser Fraktionen verzichtet.

3.5 Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie

Für die chemische Analyse der Proben wurde ein baugleicher GC mit gekoppeltem Massenspektrometer (Agilent, 5975B inert XL MSD) (GC-MS) genutzt. Der GC enthielt eine HP-5-Säule mit einem Säulendurchmesser von 250µm. Beim Injizieren der Probe hielt der Ofen eine Temperatur von 40°C für 3min, ehe die Temperatur um 5°C/min bis auf 320°C anstieg. Helium wurde als Trägergas mit einer Flussrate von 1,1ml/min genutzt. Die Injektortemperatur lag bei 240°C. Aus der Säule eluierende Stoffe wurden an das gekoppelte MS weitergeleitet und ionisiert. Die resultierenden Massenspektren wurden mit Enhanced ChemStation (MSD ChemStation E.02.00.493) aufgezeichnet. Die Analyse der Spektren erfolgte mit den Programmen MSD Chem Station (Agilent), NIST - Mass Spectral Search Program (Faircom Corporation) und AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System).

Die Duftpinselextrakte und -fraktionen wurden mit den Abdomenproben und Leerproben verglichen, um für Duftpinsel charakteristische Stoffe zu erkennen. Reizauslösende Peaks der GC-FID sollten genutzt werden, um physiologisch aktive Stoffe in den Duftpinselfraktionen mittels ihres Massenspektrums zu identifizieren.

3.6 Verhaltensexperiment

Die Vermutung, dass die Duftpinsel von *M. sexta* einen Einfluss auf das Verhalten artgleicher Tiere haben sollte mit einem entsprechenden Verhaltensexperiment überprüft werden. Dazu wurden in einem Käfig (75cm x 45cm x 120cm) zwei Männchen und ein Weibchen ab 22Uhr bis zehn Minuten nach Paarungsbeginn beobachtet. Die Tiere waren jeweils zwei Tage alt und unverpaart.

Die Männchen wurden am Tag nach dem Schlupf gewogen und deren Massen protokolliert. Die Masse zweier Männchen in einem Testkäfig sollte möglichst gleich sein, um einen masseabhängigen Sexualpartnervorzug auszuschließen. Zwei Männchen wurden als gleich schwer angesehen, wenn das leichtere Tier maximal 5% weniger Masse aufwies als das Schwerere. Bei einem der Männchen wurde am ersten Tag nach dem Schlupf die beiden Duftpinsel entfernt. Bei dem Anderen wurden Schuppen an der ventralen Seite des Abdomens abgeschabt, um es einer ähnlichen Stresssituation auszusetzen (natives Männchen). Die beiden Männchen wurden eine weitere Nacht zusammen im späteren Beobachtungskäfig gehalten. Das Weibchen wurde bis spätestens 16 Uhr vor der Beobachtungsnacht in den Käfig gesetzt, um ihm genug Zeit zur Akklimatisation zu geben. Den Tieren wurde ab der ersten Nacht nach dem Schlupf Zuckerwasser (20%ig) an einer Blütenattrappe als Nahrung angeboten.

Während der Beobachtungszeit wurde festgehalten wann das letzte Tier zu fliegen begann, wann die Paarung einsetzte und ob das sich nicht paarende Männchen in den zehn Minuten vor, nach und zu Paarungsbeginn flog. Des Weiteren wurde protokolliert, ob das sich nicht paarende Tier einen Paarungsversuch in den zehn Minuten nach Kopulationsbeginn startete (s. Abb. 5). Nach Beobachtungsende wurde das sich nicht paarende Männchen separiert. Am folgenden Tag konnte überprüft werden, welches der Männchen sich gepaart hatte (nativ oder nicht nativ).

Für die Auswertung der erhobenen Daten wurde SPSS 20 von IBM genutzt. Für die Auswertung bezüglich der Partnerwahl wurden die Beobachtungen verwendet, bei denen beide Männchen am Beobachtungsabend vor der Paarung aktiv waren. Für die Auswertung der Kopulationversuche an sich schon paarenden Weibchen wurde eine Aktivität des sich nicht paarenden Männchens vorausgesetzt. Diese war gegeben, falls das sich nicht paarende Männchen während des Paarungsbeginns oder in den folgenden 10min flog. Die protokollierten Massen der Männchen wurden in die Auswertung der Daten mit einbezogen.

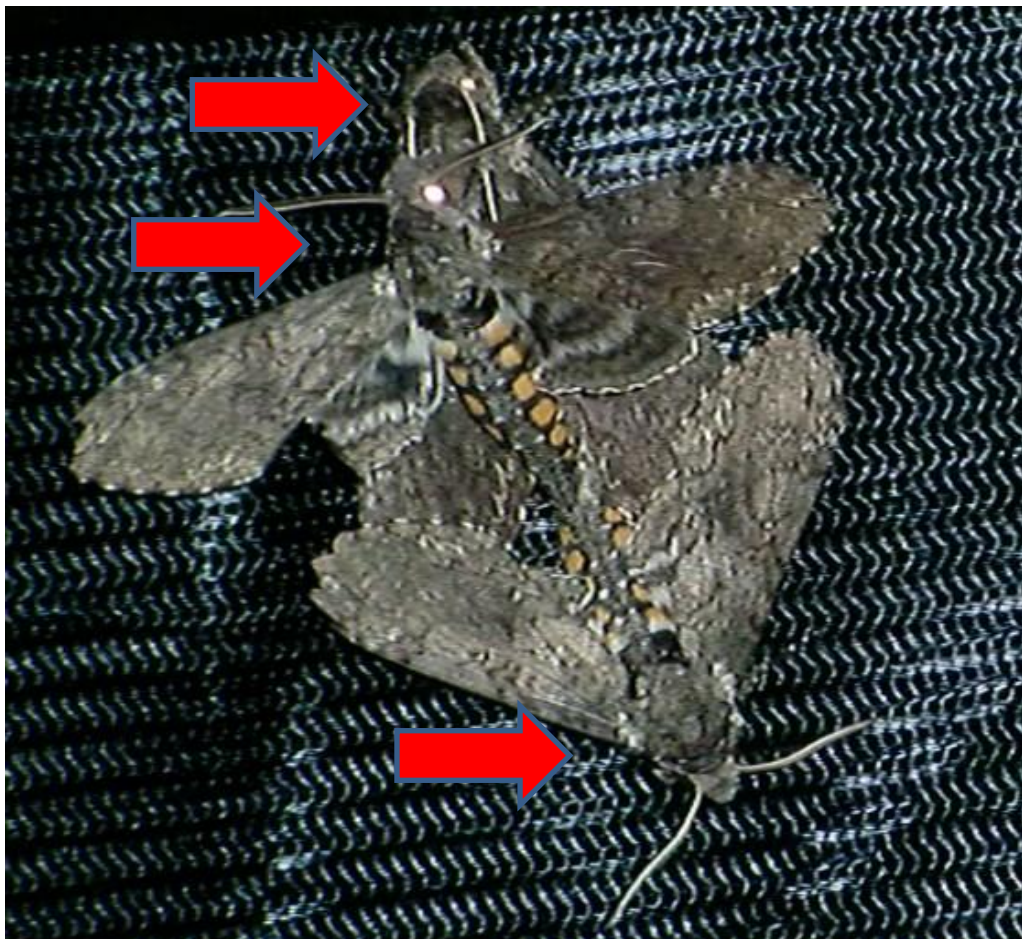


Abbildung 5: Paarungsversuch eines sich nicht paarenden Männchens (mittig) mit einem in der Paarung befindlichen Weibchen (oben), paarendes Männchen unten, Tiere mit Pfeilen markiert

4 Ergebnisse

4.1 Elektroantennographische Detektion

Es wurden mittels Puffen mit sechs verschiedenen Duftpinselextrakten (ungefilterte und nicht fraktionierte) EAGs angefertigt. Das Extrakt vom 27.5. wurde danach mit dem Chromafil-Filter filtriert und auf seine physiologische Aktivität getestet (s. Tab. 5 und Abb. 6).

Tabelle 5: normierte EAG-Antworten auf Puffs von Duftpinselextrakten getesteter *M. sexta*, rechte Spalte: Mittelwert (MW) des getesteten Tieres auf die präsentierten Extrakte, Daten im Tabellenkopf entsprechen dem Datum der Extraktgewinnung, se: Standardfehler, s: Standardabweichung

Geschlecht	Tier	26.4.	27.4.	6. und 7.5.	10.5.	16.5.	27.5.	27.5. gefiltert	MW
männlich	1				0,370				0,370
	5				0,201				0,201
	6				0,238				0,238
	8					0,390			0,390
	9					0,237			0,237
	11	1,283	1,171	1,154				1,316	1,231
	MW	1,283	1,171	1,154	0,269	0,314		1,316	0,444
weiblich	2				-0,213				-0,213
	3				0,191				0,191
	4				0,024				0,024
	7				0,112				0,112
	10						0,406	0,406	0,406
	12	0,102	0,069	0,185				0,098	0,113
	MW	0,102	0,069	0,185	0,029		0,406	0,252	0,106
se								0,083	
s								0,203	

Der Vergleich der gemittelten und normierten EAG-Antworten der Tiere auf die Präsentation von Duftpinselextrakten (s. Abb. 7) zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Männchen und Weibchen auf ($T=1,878$, $p=0,100$).

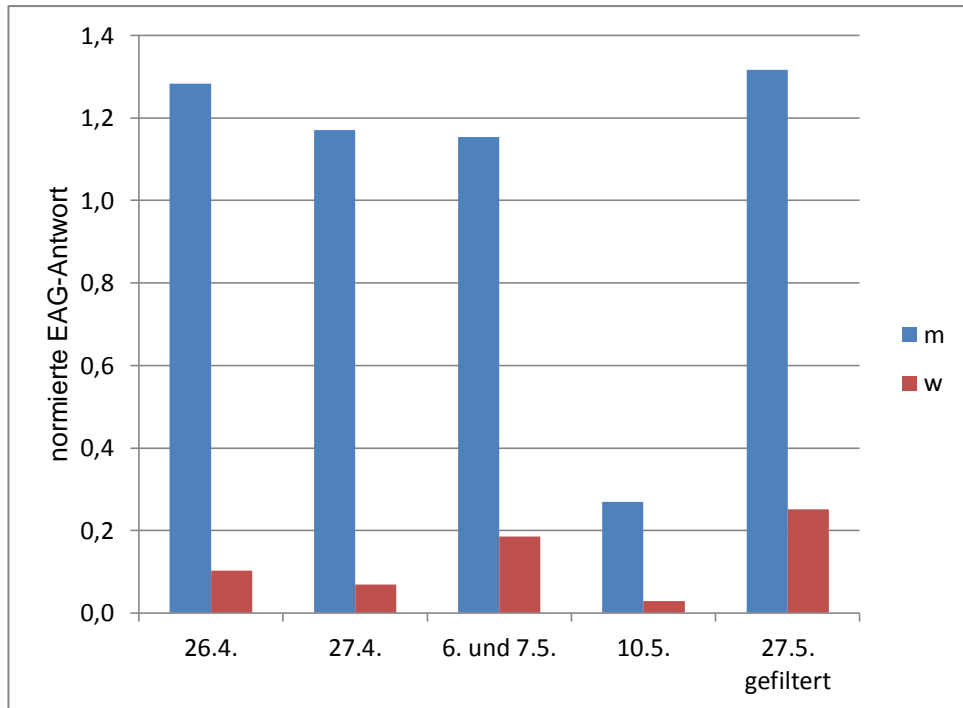


Abbildung 6: normierte EAG-Antworten von Männchen (m) und Weibchen (w) auf die Präsentation der Duftpinselextrakte angegebenen Datums, Werte sind Tab. 5 entnommen

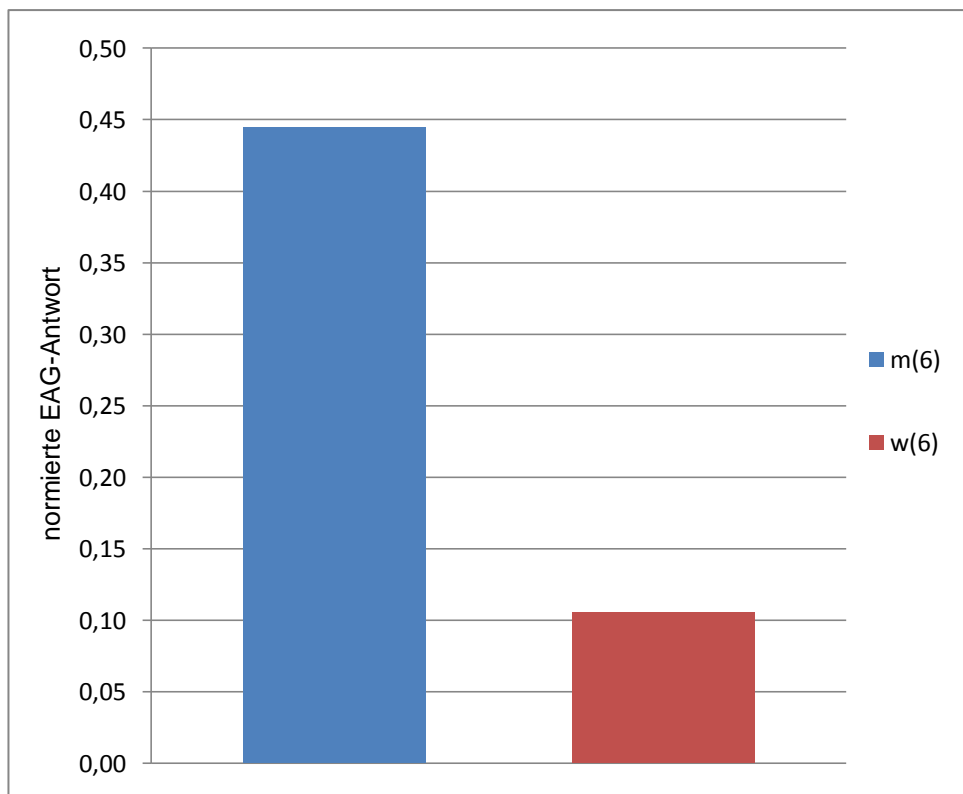


Abbildung 7: gemittelte und normierte EAG-Antworten von *M. sexta*-Männchen (m) und -Weibchen (w) auf Duftpinselextrakte, in Klammern: Anzahl getesteter Tiere, Werte sind Tab. 5 entnommen

Das Extrakt vom 16.5. konnte nicht fraktioniert und fraktioniert auf seine physiologische Aktivität an drei Tieren getestet werden und zeigte deutlich unterschiedliche Spannungsamplitude zwischen den verschiedenen Fraktionen (s. Abb. 8).

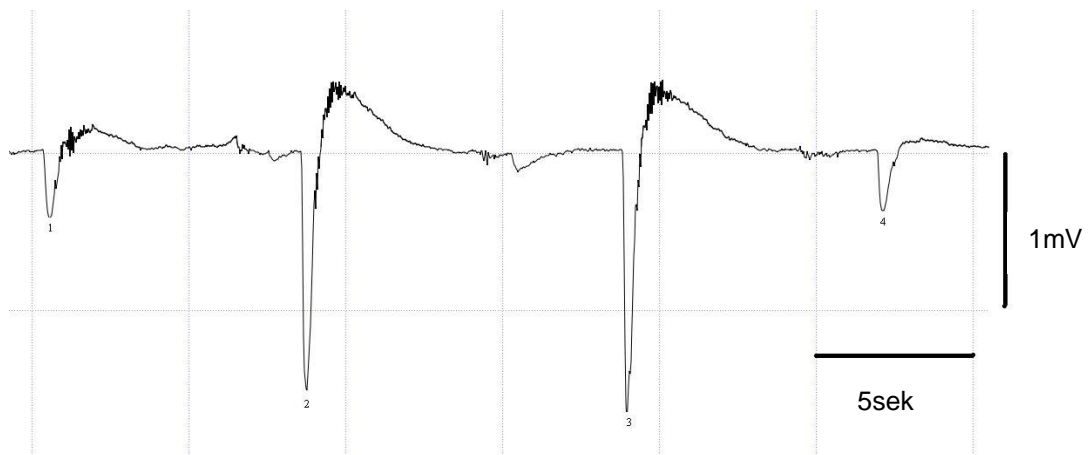


Abbildung 8: Spannungsamplituden eines Männchens in Folge der Darbietung verschiedener Fraktionen, 1: Methanolfraktion., 2: DCM-fraktion, 3: Pentan/DCM-fraktion, 4: Pentanfraktion

Die Amplituden in Folge der Reizdarbietung wurden nach der Gleichung in 3.3 normiert (s. Tab 6 und Abb. 9).

Tabelle 6: normierte und gemittelte EAG-Antworten auf Puffs von Duftpinselfraktionen (DP) und Abdomenfraktionen (AD) und -extrakten von Männchen (m) und Weibchen (w), in Klammern: Anzahl getesteter Tiere

Geschlecht	Probe	nicht fraktioniert	Pentan	Pentan DCM	DCM	Methanol
m (1)	AD 16.5.	0,135	-0,121	0,160	-0,129	-0,057
m (2)	DP 16.5.	0,314	-0,050	0,403	1,291	0,034
w (1)	DP 16.5.		-0,074	-0,136	0,143	0,056

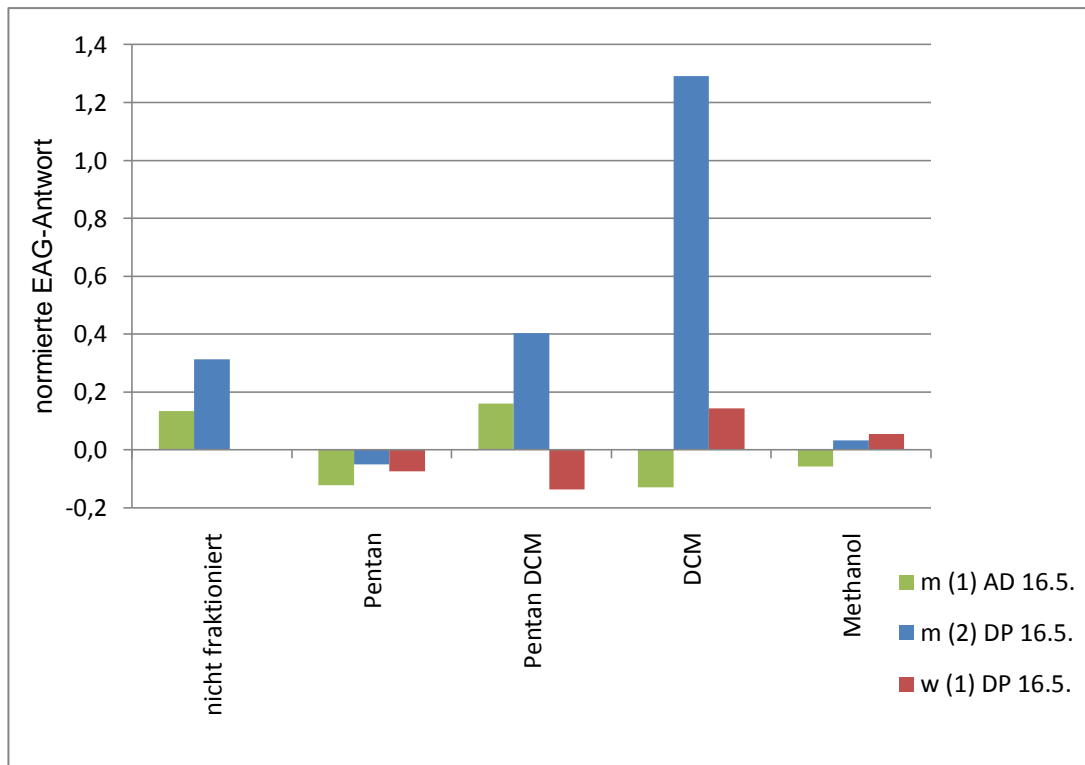


Abbildung 9: normierte und gemittelte Antennenreaktionen auf Duftpinselextrakte von Männchen (m) und Weibchen (w), Werte sind Tab. 6 entnommen

4.2 Gaschromatographie mit gekoppelter Flammionisationsdetektion und Elektroantennographischer Detektion

Die Signale der GC-FID-EAGs der Duftpinsel- und Abdomenfraktionen des 10.7. wurden aufgezeichnet (s. Abb. 10 und 11). Es gab kontinuierliche Antennenreaktionen in den Fraktionen, deren Amplituden normiert wurden. In den Abdomenfraktionen wurde je eine Reaktion in den Pentan/DCM- und dem DCM-Eluaten festgestellt. Bei den Duftpinselproben konnten in den gleichen Fraktionen zwei bzw. drei Antennenreaktionen in den DCM- bzw. Pentan/DCM-fraktionen aufgezeichnet werden (s. Tab. 7). Die Amplituden der registrierten FID-Signale der Abdomenfraktionen waren durchweg größer. In den Methanolfractionen fehlten die charakteristischen FID-Signale, welche zu einer Antwort bei den Tieren führten.

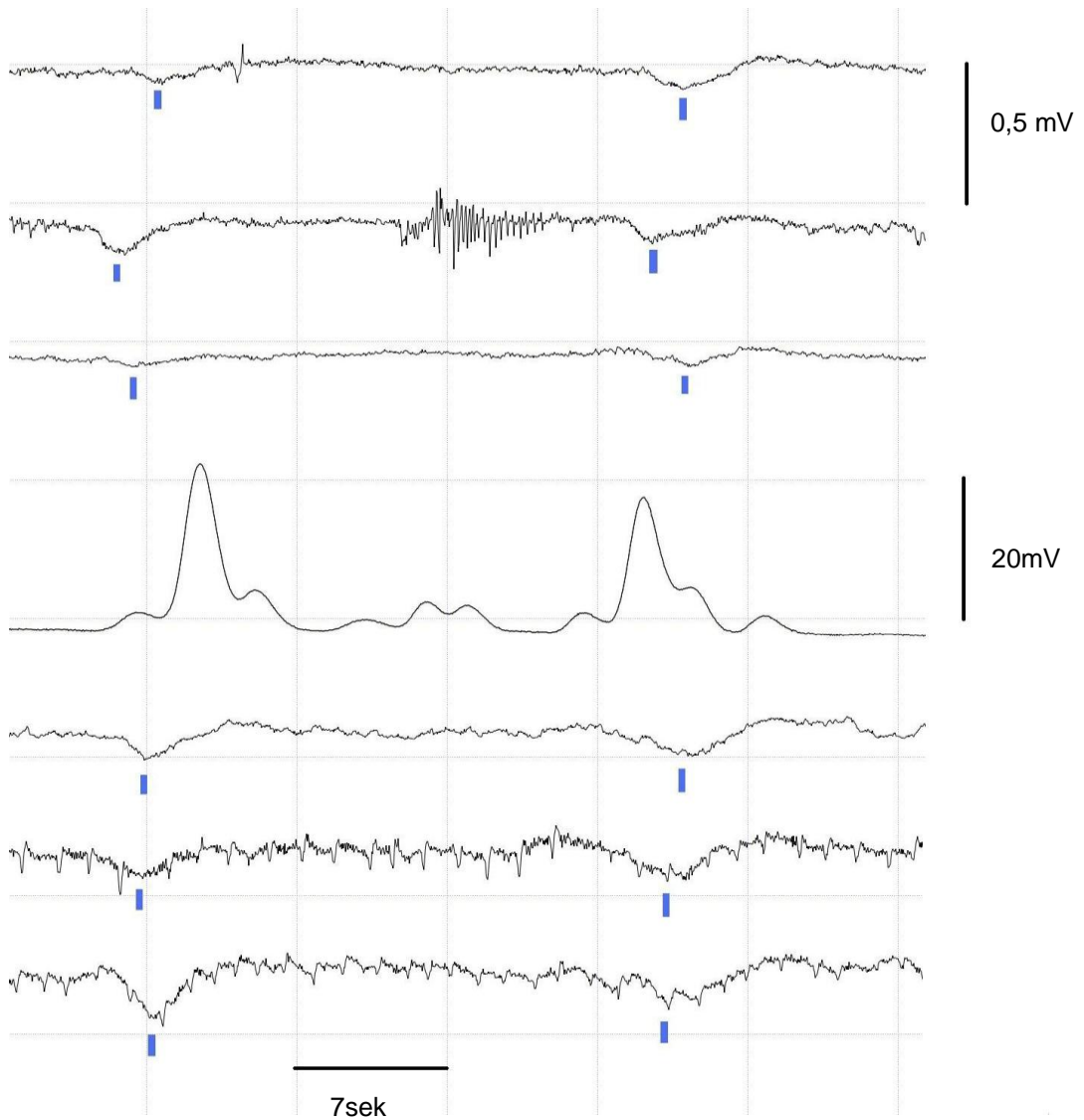


Abbildung 10: Ausschnitt aus den GC-FID-EAD Läufen der Pentan-DCM-Fractionen von Duftpinseln, EAGs von drei Männchen (oben) und drei Weibchen (unten), Antennenreaktionen der Stoffe mit den Kovatz-Indices 1052 und 1108 (v.l.n.r) sind markiert, die mittleren FID-Signale aller Durchgänge mittig

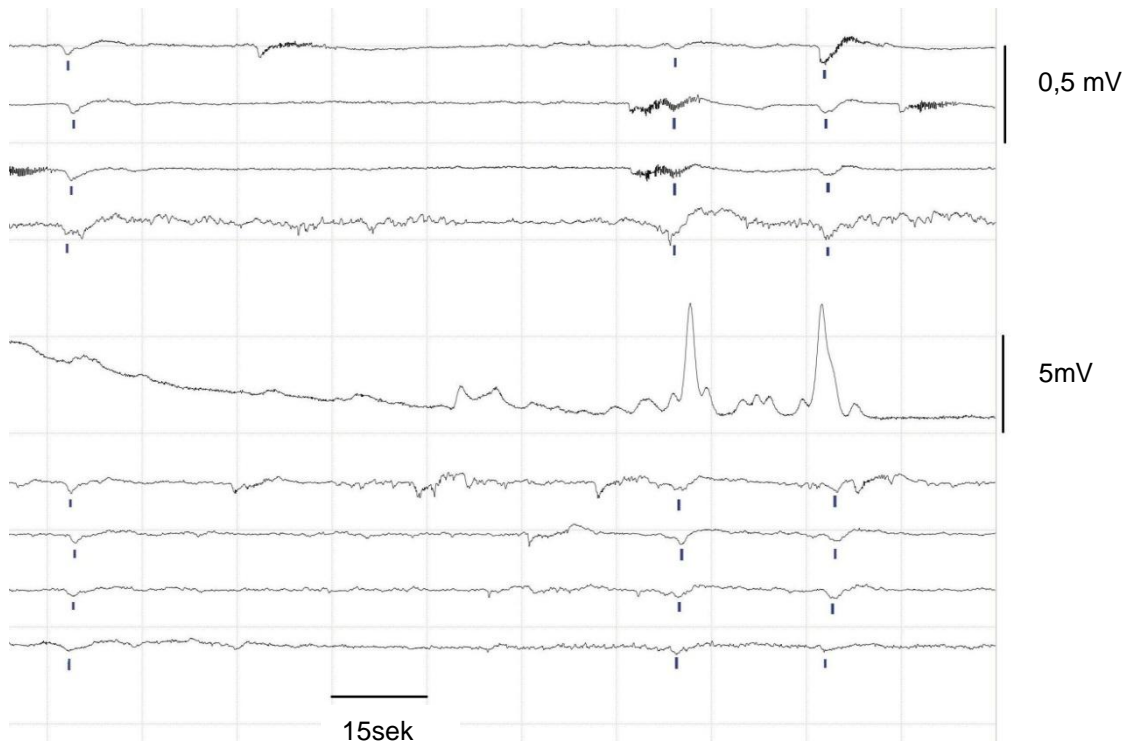


Abbildung 11: Ausschnitt aus den GC-FID-EAD Läufen der DCM-Fraktionen von Duftpinseln, EAGs von vier Männchen (oben) und vier Weibchen (unten), Antennenreaktionen sind markiert, die mittleren FID-Signale aller Durchgänge mittig

Tabelle 7: normierte und gemittelte Antennenreaktionen der Männchen (m) und Weibchen (w) in den GC-FID-EAD-Läufen auf Duftpinsel- und Abdomenfraktionen vom 10.7., KI: gemittelter Kovatz-Indice der stimulierenden Peaks, n: Anzahl getesteter Tiere

	Geschlecht	KI	n	DCM	n	Pentan DCM	MW
Duftpinsel	m	865	4	0,0424			0,0424
	w		4	0,0368			0,0368
	m	1052	4	0,0319	3	0,0290	0,0306
	w		4	0,0296	3	0,0294	0,0295
AD	m	1108	4	0,0559	3	0,0283	0,0441
	w		4	0,0341	3	0,0328	0,0335
AD	m	1108	1	0,0415	1	0,0089	0,0252
	w		3	0,0264	2	0,0121	0,0192

Der Mittelwert der normierten Antennenreaktionen auf die drei reizauslösenden Stoffe wurde verglichen. Die gemittelten und normierten Antennenreaktionen auf die drei reizauslösenden Peaks ist bei den Männchen stets größer, jedoch nicht signifikant (s. Tab. 8).

Tabelle 8: Vergleich der männlichen und weiblichen EAG-Antworten auf die reizauslösenden Peaks mit den Kovatz-Indices 865, 1052 und 1108 in den Duftpinselfraktionen, n: Anzahl getesteter Tiere, MW: Mittelwert der normierten EAG-Antworten von Männchen (m) und Weibchen (w)

KI	865	1052	1108
n	4	7	7
T	0,518	0,261	0,963
p	0,625	0,799	0,363
MW (m)	0,042	0,031	0,044
se	0,009	0,004	0,010
s	0,018	0,010	0,027
MW (w)	0,037	0,030	0,034
se	0,006	0,002	0,004
s	0,013	0,006	0,011

Bei keinem der Testläufe mit Mix4 konnte eine Antennenreaktion auf Geranylaceton festgestellt werden.

4.3 Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie

Es wurden fünf fraktionierte Duftpinselextrakte für die qualitative Untersuchung genutzt. Nach Vergleich mit den Fraktionen aus den Abdomenproben und Leerproben konnten keine charakteristischen Peaks in den Duftpinselextrakten gefunden werden (s. Abb. 12 und 13).

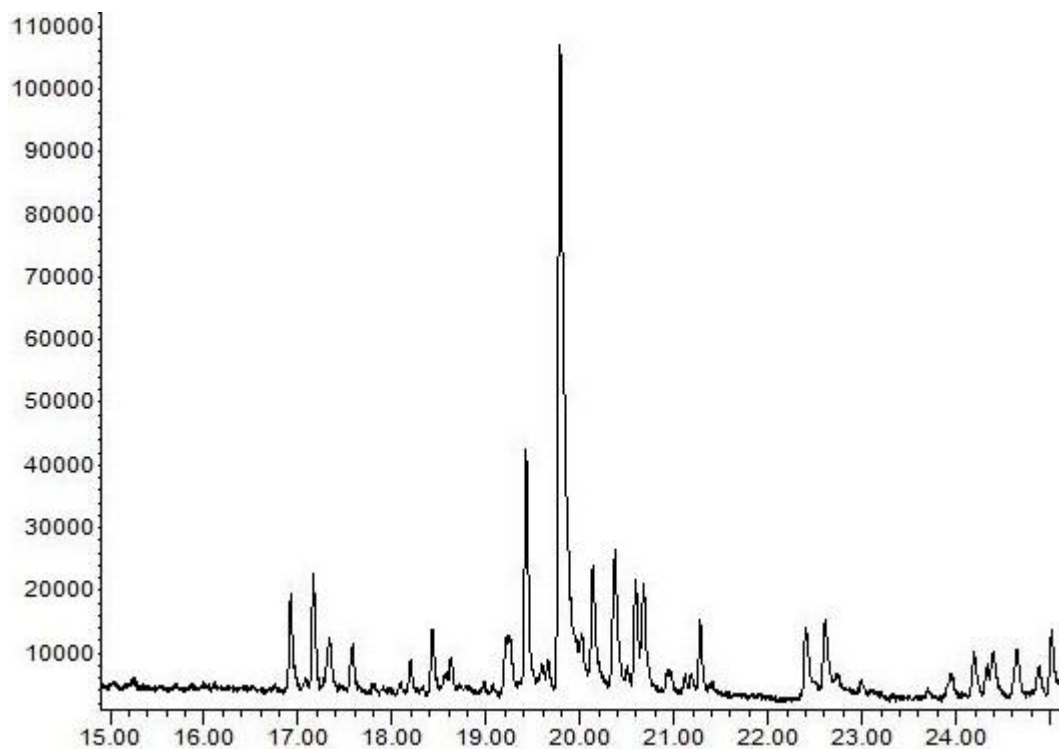


Abbildung 12: Ausschnitt aus der massenspektrometrischen Aufzeichnung der DCM-Fraktion der Abdomenprobe vom 16.5., x-Achse: Retentionszeit in min, y-Achse: Abundanz

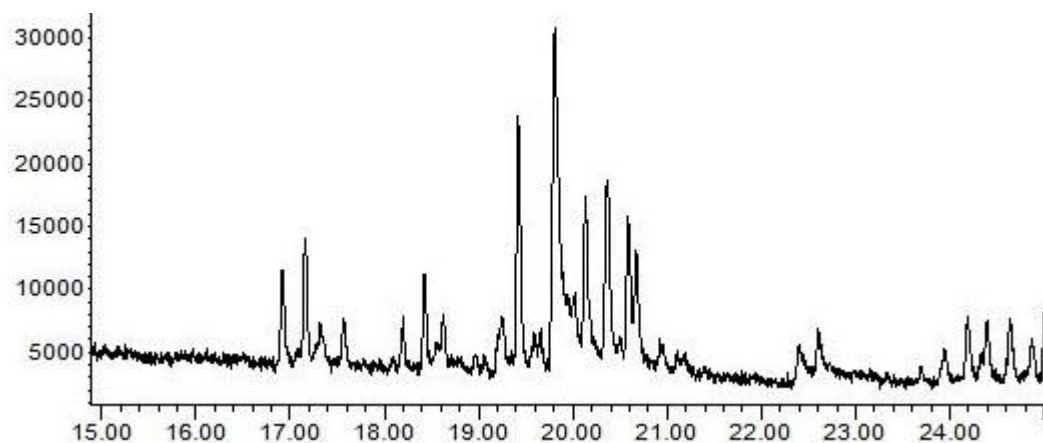


Abbildung 13: Ausschnitt aus der massenspektrometrischen Aufzeichnung der DCM-Fraktion der Duftpinselprobe vom 16.5., x-Achse: Retentionszeit in min, y-Achse: Abundanz

Nach dem Vergleich von drei nicht fraktionierten Extrakten mit den Abdomenproben und Leerproben konnten sieben, den Duftpinselextrakten eigenen, Stoffe lokalisiert werden (s. Tab. 9). Die relative Fläche der Peaks war in den Proben stark heterogen. Teilweise waren diese nicht integrierwürdig aber immer vorhanden.

Tabelle 9: Ergebnisse der Analyse der nicht fraktionierten Duftpinselextrakte, Nr.: Peaknummer, KI: gemittelter Kovatz-Indice der Anlylatpeaks, KI NIST: allgemeiner Kovatz-Indice der Stoffe (grau) bzw. Kovatz-Indice für HP5-Säulen (rot), ja: Peak exklusiv in Duftpinselprobe vorhanden ohne ausreichende Übereinstimmungen mit zum Vergleich vorhandenen Massenspektren

Nr.	KI	strukturähnliche Stoffe	CAS-Nr.	KI NIST	Spektrenähnlichkeit in den Extrakten		
					26.4.	27.4.	27.5.
		Carbonsäurederivat					
1	1947	Z-11-Hexadecensäure	2416-20-8	1976			910
		E-9-Hexadecensäure	2091-29-4	1949			877
2	2163	Oktadecensäure	57-11-4	2164	815	837	895
3	2182	Hexadekanamid	629-54-9	2182 (2020)	881	884	
4	2390	Oktadekanamid	124-26-5	2220	735	797	828
		mehrfach ungesättigter Kohlenwasserstoff					
		Z-5,17-Octadecadien-1-ol acetate		2175	769		746
		E,E,E-6,9,12-Octadekatrien-1-ol	56630-94-5	2077	791		750
		17-Octadecen-14-in-1-ol	18202-28-3	2061	813		752
6	2350	s. Nr. 5 um Methylgruppe erweitert					ja
7	2450	s. Nr. 5 um zwei Methylgruppen erweitert			ja		ja

Die bei der GC-FID-EAD reizauslösenden Peaks wurden in den Fraktionen, unter zu Hilfenahme der ermittelten Kovatz-Indices und der charakteristischen Peakabfolge, lokalisiert und durch den Vergleich der Massenspektren eine Auswahl an möglicher Substanzen getroffen (s. Tab 10). Alle drei Peaks wurden in allen fraktionierten Leerproben und Abdomenproben gefunden. In den gefilterten Extrakten und den Methanolfractionen fehlten diese Peaks.

Tabelle 10: Auswahl möglicher Stoffe für die im EAG reizauslösenden Peaks, KI: ermittelter Kovatz-Indice, KI NIST: allgemeiner Kovatz-Indice der Stoffe (grau) bzw. Kovatz-Indice für HP5-Säulen (rot), Ähnlichkeit: max. Ähnlichkeitswerte der Massenspektren der Peaks in den Proben mit den Spektren der Bibliothek

Nr.	KI	Auswahl strukturähnlicher Stoffe	CAS-Nr.	KI NIST	Ähnlichkeit
1	865	4-Methyloktan	2216-34-4	862 (DB-5)	955
		2,3-Dimethylheptan	3074-71-3	854	872
		2,3,4-Trimethylhexan	921-47-1	724	870
2	1052	2,3,6,7-Tetramethyloktan	52670-34-5	958	870
		6-Ethyl-2-methyloktan	62016-19-7	986	859
3	1108	2,6-Dimethyldekan	13150-81-7	1086	868
		4,7-Dimethylundekan	17301-32-5	1185	890

4.4 Verhalten

4.4.1 Männchenmassen

Es wurden 365 *M. sexta* –Männchen gewogen und in Klassen eingeteilt, wobei für Klasse 5 der Massenmittelwert als Klassenmitte und als Klassenbreite die Standardabweichung genutzt wurde (s. Tab. 11, 12 und Abb. 14).

Tabelle 11: Verteilung der Männchen in den Masseklassen

Klasse	Klassenmitte	untere Klassengrenze	obere Klassengrenze	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit in %
1	0,699		0,826	1	0,3
2	0,953	0,826	1,080	1	0,3
3	1,207	1,080	1,334	17	4,8
4	1,461	1,334	1,588	84	23,6
5	1,715	1,588	1,842	147	41,3
6	1,969	1,842	2,096	83	23,3
7	2,223	2,096	2,350	21	5,9
8	2,477	2,350		2	0,6

Tabelle 12: statistische Werte zu den Männchenmassen aller gewogener Tiere (gesamt) und der im Verhaltensexperiment genutzten Tiere (Experiment), MW: Mittelwert, se: Standardfehler, s: Standardabweichung, s^2 : Varianz

	gesamt	Experiment
	m in g	m in g
MW	1,715	1,758
se	0,013	0,017
s	0,254	0,224
s^2	0,065	0,050
Minimum	0,780	1,118
Maximum	2,422	2,297

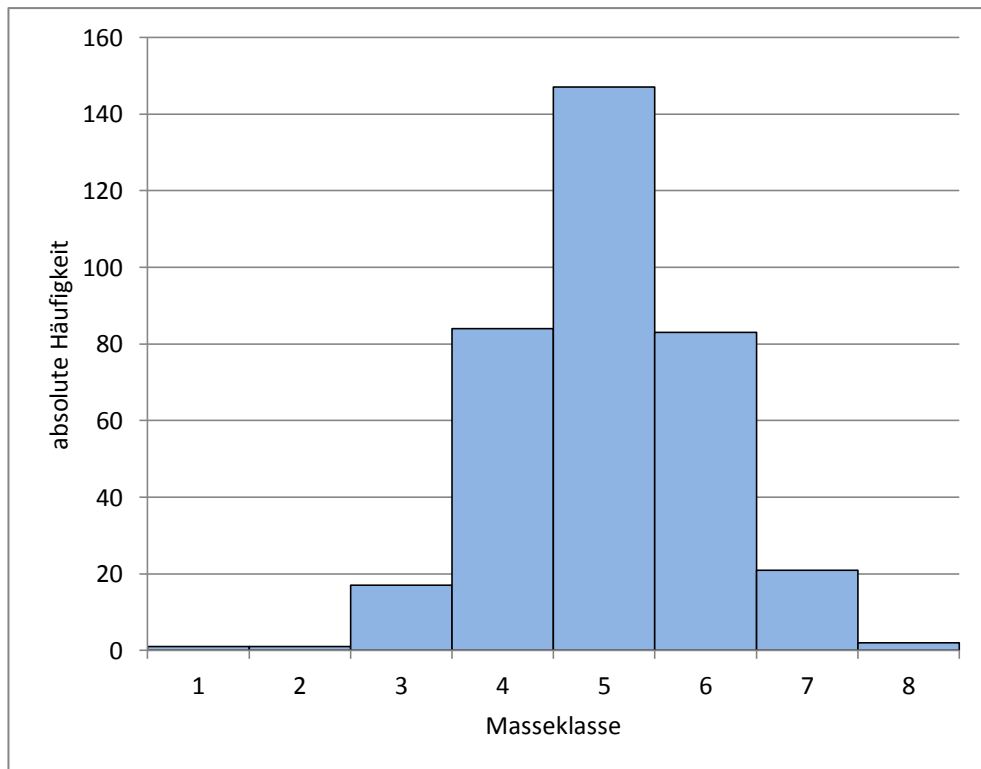


Abbildung 14: Histogramm zur Verteilung der Männchen in den einzelnen Masseklassen, die Werte sind Tab. 11 entnommen

Die Verteilung der Männchenmassen unterliegt einer Normalverteilung ausgegangen ($KS_{\text{gesamt}}=0,671$, $p=0,759$; $KS_{\text{Exp}}=0,516$, $p=0,053$).

Der Mittelwert der Massen der im Experiment genutzten Tiere weicht signifikant von dem aller gewogenen Tiere ab ($T=2,027$, $p=0,043$).

4.4.2 Verhaltensexperiment

Es wurden 122 Paarungen im Zeitraum vom 01.05.11 bis 03.06.11 angesetzt, von denen 91 verwertbare Daten lieferten (s. Tab. 13 und Abb. 15). Dabei paarte sich 47 mal ein natives und 44 mal ein nicht natives Männchen (s. Tab 13). Die Daten weisen ein Binomialverteilung auf ($B_{\text{standart}} = 0,210, p = 0,834$).

Anhand der mittleren Masse, der in einem Beobachtungskäfig vorhandenen Männchen, wurden die Paarungsbeobachtungen auf die in 4.4.1 beschriebenen Masseklassen verteilt. Nach Durchführung eines Chi-Quadrat-Homogenitätstests kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Häufigkeit des Paarungserfolges von nativen und nicht nativen Männchen in den einzelnen Masseklassen den erwarteten Häufigkeiten entspricht ($X^2 = 2,745, p = 0,601$).

Tabelle 13: Gegenüberstellung des Paarungserfolges nativer und nicht nativer Männchen in den einzelnen Masseklassen

Masse- klasse	Paarung mit		Gesamt
	nativ	nicht nativ	
1	0	0	0
2	0	0	0
3	1	0	1
4	8	10	18
5	20	19	39
6	16	11	27
7	2	4	6
8	0	0	0
Gesamt	47	44	91

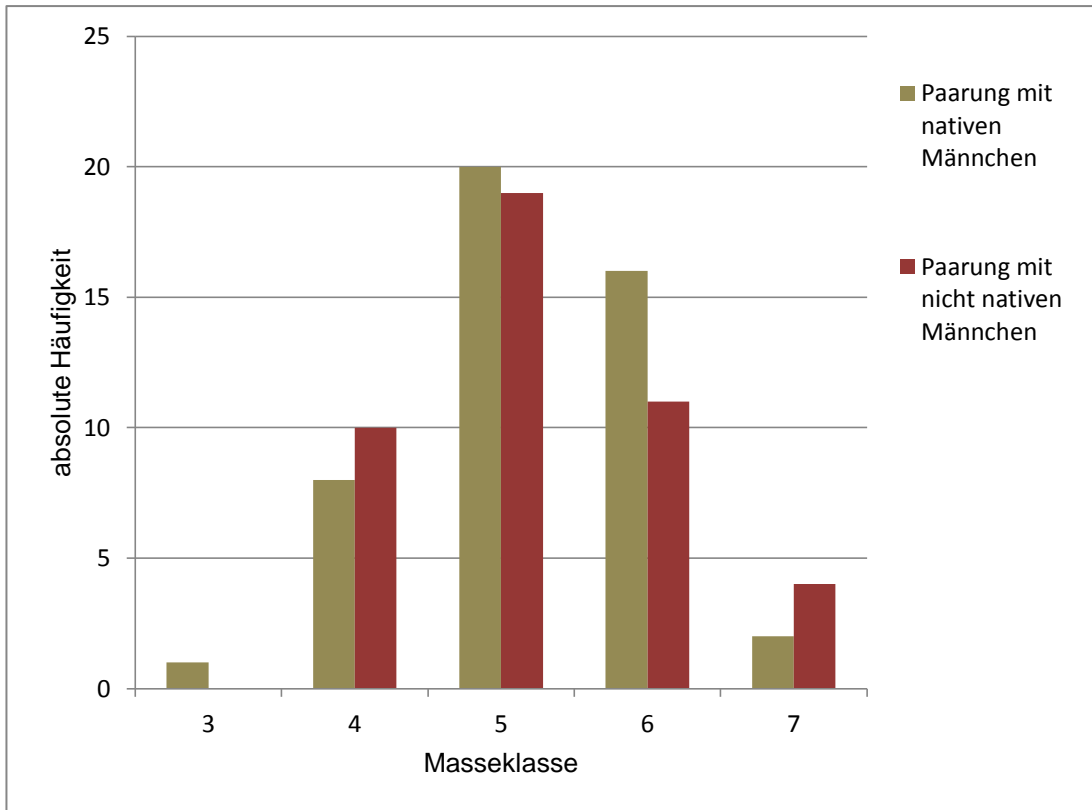


Abbildung 15: Häufigkeit des Paarungserfolges nativer und nicht nativer Männchen in den einzelnen Masseklassen, die Werte sind Tab. 13 entnommen

Es wurden Beobachtungen gemacht, dass Männchen versuchen sich mit Weibchen zu paaren, die schon einen Kopulationspartner haben. Unter den festgelegten Voraussetzungen konnten 83 verwertbare Datensätze gewonnen werden (s. Tab. 14 und Abb. 16).

Der Chi-Quadrat-Homogenitätstest setzt beobachtete und erwartete Häufigkeiten von Paarungsversuchen der sich nicht paarenden Männchen gleich ($X^2=2,047$, $p=0,152$).

Tabelle 14: Anzahl beobachteter Paarungsversuche von sich nicht paarenden Männchen mit sich schon in der Paarung befindenden Weibchen.

Paarungsversuche	Weibchen paart sich mit		Gesamt
	nativ	nicht nativ	
nein	20	14	34
ja	21	28	49
Gesamt	41	42	83

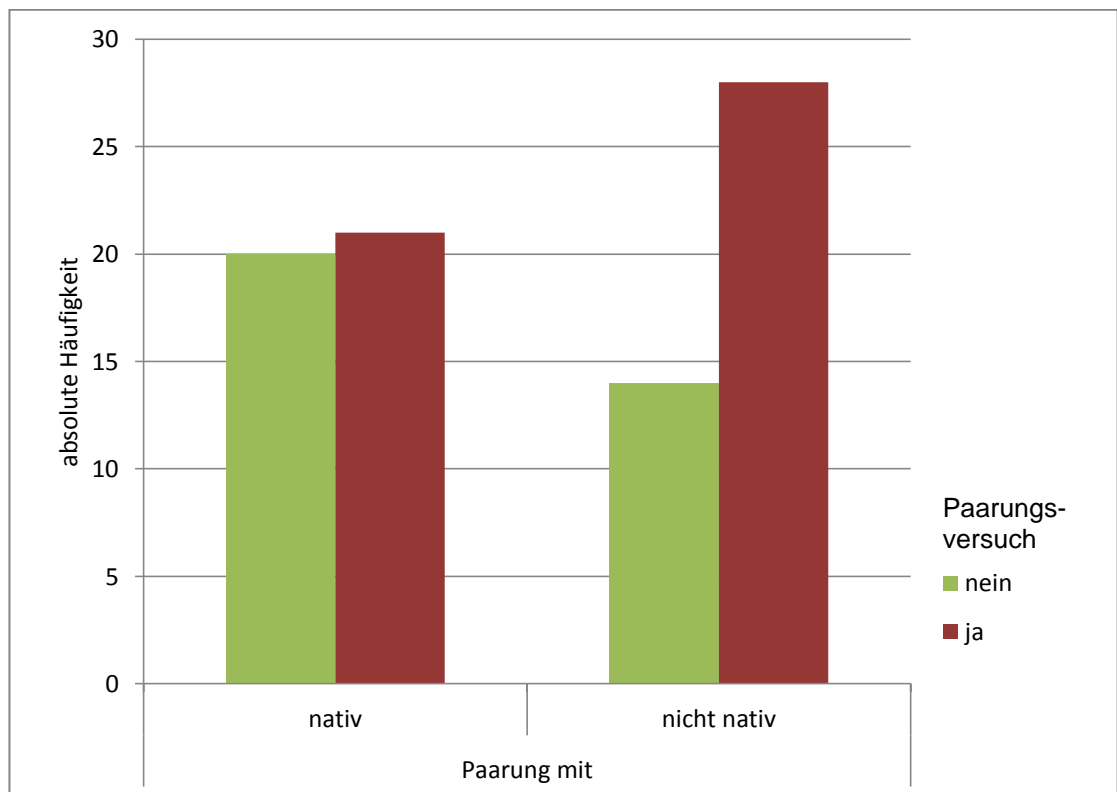


Abbildung 16: absolute Häufigkeiten von Paarungsversuchen von sich nicht paarenden Männchen mit sich schon in der Paarung befindenden Weibchen, y-Achse: Kopulationspartner, x-Achse: Paarungsversuche sich nicht paarenden Männchen mit sich in der Paarung befindenden Weibchen

5 Diskussion

Die Elektroantennogramme männlicher und weiblicher *M. sexta* zeigten deutliche Reaktionen auf die Präsentation von nicht fraktionierten Duftpinselextrakten. Die normierten Antennenreaktionen der Männchen waren dabei immer, wenn auch nicht signifikant, größer (s. Tab. 5, Abb. 6 und 7). Die normierten Daten auf die EAD-Antworten sind nicht uneingeschränkt vergleichbar. Weibliche Tiere nehmen die in Mix4 verwendeten Stoffe besser wahr (Fraser, 2003). Damit werden Antennenreaktionen auf geschlechtsneutral wahrnehmbare, flüchtige Stoffe nach der Normierung diskriminiert. Männchen zeigen somit eine prinzipiell stärkere normierte Reizreaktionsantwort. Ein Korrekturfaktor, ausgehend von den mittleren Antennenreaktionen der Männchen und Weibchen, würde die normierten Antworten auf die Präsentation der Duftpinselextrakte noch weiter aneinander annähern. Davon wurde aber Abstand genommen, da die 50ng Geranylaceton im Mix4 keine Antennenreaktion bei der GC-FID-EAD auslösten, die beim puffen verwendeten 100µg dies jedoch könnten. Die Produktion von Eiern benötigt viel Energie, welche die Weibchen über den Nektar ihrer Wirtspflanzen beziehen. So wirkt sich die verbesserte Fähigkeit zur Lokalisierung ihrer Nahrungsquellen positiv auf ihre Fitness aus, sei es die Anzahl an Eiern oder die ihnen mitgegebene Menge an Reservestoffen, was eine erhöhte Wahrnehmungsfähigkeit auf Mix4 erklären würde.

Die Analyse der Massenspektren der bei der EAD reizauslösenden Peaks (s. Tab. 7,8 und 10) brachte keine für Lepidopteren pheromontypischen Verbindungen zum Vorschein. Einzig verzweigte Kohlenwasserstoffe ohne funktionelle Gruppen zeigten ernstzunehmende Spektrenübereinstimmungen. Interessant ist, dass sich die Antennenreaktionen zwischen den Abdomen- und Duftpinselfractionen unterscheiden. Obwohl die aufgezeichneten FID-Signale eine höhere Stoffmenge der reizauslösenden Peaks in den Hinterleibsfraktionen zeigten, gab es keine Reaktionen auf die Anylate mit den Kovatz-Indices 865 und 1053 wie in den DCM-Fractionen der Duftpinselproben.

Die Differenz zwischen den Spannungsamplituden bei der EAD mittels Aufpuffens zwischen den Methanol- und Pentan/DCM- bzw. DCM-Fractionen muss durch das Vorhandensein oder Fehlen dieser drei Stoffe zustande kommen, da diese in den Methanolfractionen vollständig fehlen (s. Tab. 6, Abb. 8 und 9).

Wie dem auch sei, in keinem der nicht fraktionierten Extrakte konnte einer dieser drei Peaks nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die gleichen Massenspektren der drei Peaks auch in den DCM- und Pentan/DCM-Fractionen der Leerproben gefunden. Demnach ist es am wahrscheinlichsten, dass diese Stoffe durch die Fraktionierungsmethode in die Proben gekommen sind. Demnach wurden keine den Duftpinseln eigenen Pheromone mit der Fraktionierungsmethode identifiziert.

Den nicht fraktionierten Duftpinselextrakten konnten charakteristische Stoffe zugeordnet werden (s. Tab 9), die weder in den Leerproben noch den Abdomenproben vorhanden waren. Es sind durchweg lineare Kohlenwasserstoffe, darunter wahrscheinlich Carbonsäureamide und Ester aus Ethanol und Carbonsäuren. Teilweise wurden einfach oder mehrfach ungesättigte Carbonsäuren identifiziert. Ein Kohlenstoffrückgrat von 16 bis 20 Kohlenstoffatomen haben aber alle Stoffe gemeinsam. In relativ großer Menge trat Hexadecansäure in den Duftpinselextrakten auf, einer bekannten Säure von Membranlipiden, welche aber ebenfalls nicht in den Abdomenproben vorhanden war. Bei den *Danainae* wurden bereits Carbonsäuren und Carbonsäurederivate in Duftpinseln nachgewiesen, denen eine Pheromonwirkung nachgesagt wird (Schulz, 1993). Eine EAG-Antwort auf die duftpinseleigenen Stoffe konnte nicht nachgewiesen werden. Die Frage, ob diese keinen abundanten Reiz darstellen oder den Antennen in zu geringer Menge präsentiert wurden bleibt offen.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit dem weiblichen Pheromonbukett von *M. sexta*, treten Übereinstimmungen in der Zahl an Kohlenstoffatomen und Lage der Doppelbindungen auf. Bestandteile des weiblichen Duftes sind unter anderem Hexadecanal, Z-11-Hexadecenal und Oktadecanal (Tumlinson, 1989). Die Duftpinselproben enthalten Z-11-Hexadecensäure, Oktadecensäure und das Amid der Hexadecansäure, Hexadecanamid. *M. sexta* besitzen in ihrem Rezeptorlymphraum mindestens eine Aldehyd-Oxidase, welches die Oxidation von

Bombykal, dem Hauptbestandteil des weiblichen Pheromongemisches, zu einer Carbonsäure katalysiert. Diese katalytisch gesteigerte Umsetzung des Sexuallockstoffes ist notwendig, um sich verändernde Stoffkonzentrationen in der Luft wahrnehmen zu können und die Bombykalquelle zu orten. Die Sensillen männlicher Antennen enthalten eine größere Menge dieses Enzyms, was wahrscheinlich der Lokalisationsoptimierung dient (Rybczynski, 1989). Es ist also durchaus möglich, dass in den Antennen, vor allem den männlichen, weitere Enzyme vorhanden sind, die eine Umsetzung der Pheromone in olfaktorisch inaktive Kohlenwasserstoffe katalysieren. Enzymatische Reaktionen sind stets Gleichgewichtsreaktionen. Sollte sich die Konzentration der Edukte, den Carbonsäuren, erhöhen, sinkt die Geschwindigkeit des Aldehydabbaus. Den Männchen würde somit eine chemotaktische Ortung eines Weibchens erschwert.

Sollte sich die Säurekonzentration in der Luft soweit erhöhen, dass ein Aldehydrezeptor einer permanenten Aussetzung seines Liganden unterliegt, könnte so ein konkurrierendes Männchen in die Irre geführt werden, indem die wahrgenommene Menge an einem Aldehyd nicht mehr der realen entsprechen würde. Ein anderes Bukett könnte dazu führen, dass keine bzw. eine verringerte Taxis aufgenommen wird, da das Weibchen evtl. nicht mehr als potentieller Sexualpartner erkannt wird.

Bei *H. virescens* zeigen die von den Duftpinseln emittierten Stoffe ebenfalls strukturelle Übereinstimmungen mit den weiblichen Pheromonen ihrer Art (Klun, 1980; Teal, 1989). Allerdings gibt es bei *H. virescens* –Männchen EAG-Antworten auf einzelne Bestandteile ihres eigenen Duftes. Das Carbonsäurependant zu einem der Hauptbestandteile der weiblichen Pheromonbuketts löst bei dieser Art auch keine Antennenreaktion aus. Bei *H. virescens* bestätigten Windtunnelversuche die antagonistische Funktion von, für Männchen wahrnehmbaren, Duftpinselbestandteilen (Hillier, 2007). Verhaltenstudien mit Carbonäuredervaten der weiblichen Pheromone fehlen aber auch hier.

Bei den Verhaltensbeobachtungen wurden keine Auswirkungen durch das Fehlen von Duftpinseln auf den Kopulationserfolg der Männchen beobachtet. Auch unterschieden sich die erwarteten von den beobachteten Paarungserfolge der nativen und nicht nativen Männchen nicht voneinander (s. Tab. 11,13 und Abb. 14, 15 und 16). Es könnte ein methodischer Fehler vorliegen. Die hohe Männchendichte im Gewächshaus könnte das Ergebnis verfälscht haben, sollten *M. sexta* über ihre Duftpinsel Sexualpheromone abgeben, welchen die Akzeptanz der Weibchen steigert. Teilweise hielten sich 40 Männchen auf einem Raum von ca. 30m² auf. Männliche Pheromone könnten sich in der Luft aufkonzentriert haben und die Paarungsbereitschaft der Weibchen gegenüber jedem Freier gesteigert haben.

Einzig eine nicht signifikante Tendenz in Bezug auf die Paarungsversuche an sich schon paarenden Weibchen war feststellbar (s. Tab. 14 und Abb. 15). Sollten sich diese Differenzen auf Dauer bestätigen, würde dies die These der eingeschränkten Lokalisierungsfähigkeit durch, den weiblichen Pheromonen strukturähnlichen, Carbonsäurederivaten aus den männlichen Duftpinseln unterstützen.

6 Quellen

- Baker, T.C. & Cardé, R.T. (1979). Courtship behavior of the Oriental Fruit Moth (*Grapholitha molesta*): Experimental analysis and consideration of the role of sexual selection in the evolution of courtship pheromones in the Lepidoptera. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **72**, 173-188
- Birch, C.M., Lucas, D. & White, P.R. (1989). The courtship behavior of the Cabbage Moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae), and the role of male hair-pencils. *J. Insect Behav.*, **2**, 227-239
- Birch, M.C., Poppy, G.M., Baker, T.C. (1990). Scents and eversible scent structures of male moths. *Annu. Rev. Entomol.*, **35**, 25-58
- Fraser, A.M., Mechaber, W.L. & Hildebrand, J.G. (2003). Electroantennographic and behavioral responses of the sphinx moth *Manduca sexta* to host plant headspace volatiles. *J. Chem. Ecol.*, **29**, 1813-1833
- Fritzpatrick, S.M., McNeil, J.N., Dumont, S. (1988). Male scent in Lepidopteran communication: the role of male pheromone in mating behavior of *Pseudaletia unipuncta* (Haw.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Mem. Entomol. Soc. Can.*, **120**, 131-151
- Gaquerel, E., Weinhold, A. & Baldwin, I.T. (2009). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VIII. An unbiased GCxGC-ToFMS analysis of the plant's elicited volatile emissions. *Plan. Physiol.* **149**, 1408-1423
- Grant, G.G. (1971). Electroantennogram responses to the scent brush secretions of several male moths. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **64**, 1428-1431
- Große-Wilde, E., Stieber, R., Forstner, M., Krieger, J., Wicher, D. & Hansson, B.S. (2010). Sex-specific odorant receptors of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Front. Cell. Neurosci.*, **4**:22. published online

- Hillier, N.K. & Vickers, N.J. (2004). The role of Heliothine hairpencil compounds in female *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) behavior and mate acceptance. *Chem. Senses*, **29**, 499-511
- Hillier, N.K., Kelly, D. & Vickers, N.J. (2007). A specific male olfactory sensillum detects behaviorally antagonistic hairpencil odorants. *J. Insect Sci.*, **7**:04. published online
- Hillier, N.K. & Vickers, N.J. (2011). Hairpencil volatiles influence interspecific courtship and mating between two related moth species. *J. Chem. Ecol.*, **37**, 1127-1136
- Hirai, K., Shorey, H.H. & Gaston, L.K. (1987). Competition among courting male moths: male-to-male inhibitory pheromone. *Science*, **202**, 644-645
- Klun, J.A., Bierl-Leonhardt, B.A., Plimmer, J.R., Sparks, A.N., Primiani, M., Chapman, O.L., Lepone, G. & Lee, G.H. (1980). Sex pheromone chemistry of the female tobacco budworm moth, *Heliothis virescens*. *J. Chem. Ecol.*, **6**, 177-183
- Lecomte, C., Thibout, E., Pierre, D. & Auger, J. (1998). Transfer, perception, and activity of male pheromone of *Acrolepiopsis assectella* with special reference to conspecific male sexual inhibition. *J. Chem. Ecol.*, **24**, 655-671
- Löfstedt, C., Vickers, N.J. & Baker, T.C. (1990). Courtship, pheromone titre and determination of the male mating success in the oriental fruit moth, *Grapholitha molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Entomol. Gen.*, **15**, 121-125
- Nishida, R., Baker, T.C. & Roelofs, W.L. (1982). Hairpencil pheromone components of male oriental fruit moths, *Grapholitha molesta*. *J. Chem. Ecol.*, **8**, 947-959
- Patch, H.M., Velarde, R.A., Walden, K.K.O. & Robertson, H.M. (2009). A candidate pheromone receptor and two odorant receptors of the Hawkmoth *Manduca sexta*. *Chem. Senses*, **34**, 305-316
- Phelan, P.L., Silk, P.J., Northcott, C.J., Tan, S.H. & Baker, T.C. (1986). Chemical identification and behavioral characterisation of male wing pheromone of *Ephestia elutella* (Pyralidae). *J. Chem. Ecol.*, **12**, 135-146

- Rybczynski, R., Reagan, J. & Lerner, M.R. (1989). A pheromone-degrading aldehyde oxidase in the antennae of the moth *Manduca sexta*. *J. Neurosci.* **9**, 1341-1353
- Sanes, J.R. & Hildebrand, J.G. (1976). Structure and development of antennae in a moth, *Manduca sexta*. *Dev. Biol.*, **51**, 280-299
- Schulz, S., Boppré, M. & Vane-Wright, R.I. (1993). Specific mixtures of secretions from male scent organs of african milkweed butterflies (Danainae). *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **342**, 161-181
- Shields, V.D.C. & Hildebrand, J.G. (2001). Responses of a population of antennal olfactory receptor cells in the female moth *Manduca sexta* to plant-associated volatile organic compounds. *J. Comp. Physiol.*, **186**, 1135-1151
- Teal, P.E.A. & Tumlinson, J.H. (1989). Isolation, identification, and biosynthesis of compounds produced by male hairpencil glands of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Chem. Ecol.*, **15**, 413-427
- Tumlinson, J.H., Brennan, M.M., Doolittle, R.E., Mitchel, E.R., Brabham, A., Mazomenos, B.E., Baumhover, A.H. & Jackson, D.M. (1989). Identification of a pheromone blend attractive to *Manduca sexta* (L.) males in a wind tunnel. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **10**, 255-271

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken die mich auf Fehler hingewiesen haben ohne zu urteilen, die ermunternde Worte fanden wenn etwas nicht funktioniert hat. Die Menschen, die immer ein offenes Ohr für die vielen Fragen hatten und auch die Zeit und Geduld aufbrachten diese zu beantworten. Die Menschen, die einem die Möglichkeit gaben eigene Ideen umzusetzen und dabei auch mal aus Fehlern zu lernen.

Vielen Dank dafür meinem Praktikumsbetreuer Dr. Andreas Reinecke, Kerstin Weniger, Anna Henning, Franziska Beran und Elisabeth Eilers.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Abteilung für evolutionäre Neuroethologie um Prof. Dr. Bill S. Hansson des Max Planck Institutes für chemische Ökologie in Jena, welche mir die Erhebung meiner Daten ermöglichte.

Selbstständigkeitserklärung

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

Jena, Januar 2012
