

**Friedrich-Schiller-Universität Jena**  
**Biologisch-Pharmazeutische Fakultät**



---

seit 1558

**Die Nase auf der Zunge: Der Tabakswärmer *Manduca sexta* erkennt Blütendüfte mit dem Proboscis**

Bachelorarbeit zur Erlangung des Grades eines Bachelor of Science

vorgelegt von

**Tamara Spingler**

geboren am 10.01.1991 in Bietigheim-Bissingen

Angefertigt am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie  
in der Abteilung Evolutionäre Neuroethologie  
Arbeitsgruppe Dr. Markus Knaden

Jena, Oktober 2016

Gutachter:

Prof. Dr. Jürgen Bolz

Dr. Markus Knaden

## Inhaltsverzeichnis

I. Tabellenverzeichnis.....	3
II. Abbildungsverzeichnis.....	4
III. Abkürzungsverzeichnis.....	5
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>7</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>8</b>
2.1 Einführung.....	8
2.2 Aufbau Insektengehirn.....	10
2.3 Olfaktorische Verarbeitung.....	12
2.4 Gustatorische Verarbeitung des Proboscis.....	13
2.5 Zielstellung.....	14
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
3.1 Geräte und Laborausstattung.....	15
3.2 Chemikalien.....	16
3.3 Puffer, Medium, Lösungen und Antikörper.....	16
3.4 Immunhistochemie.....	17
3.5 Injektionsfärbung.....	18
3.6 Lucifer Yellow Färbung.....	18
3.7 Konfokal Mikroskop.....	18
3.8 Pflanzen.....	19
3.9 Insekten.....	19
3.10 Windkanal.....	20
3.11 Probosciswahl.....	20
3.12 Statistik.....	21
3.13 Attraktivitätsindex.....	22
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>23</b>
4.1 Verhaltenstests.....	23
4.2 Morphologische Analysen.....	27
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>29</b>

5.1	Ausblick .....	33
A	Literaturverzeichnis .....	34
B	Danksagung .....	40
C	Selbstständigkeitserklärung.....	41

## I. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Shapiro-Test.....	25
Tabelle 2: Fligner-Test.....	25
Tabelle 3: Wilcoxon-Test .....	25
Tabelle 4: Präferenz - Shapiro-Test .....	26
Tabelle 5: Präferenz - Fligner- und Kruskal-Test.....	26
Tabelle 6: Präferenz - Wilcoxon Rangsummentest .....	26

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>M. sexta</i> saugt den Nektar aus der Blüte von <i>N. alata</i> .....	9
Abbildung 2: Abbildung des Neuropiles im Gehirn von <i>M. sexta</i> .....	10
Abbildung 3: Verhaltensexperiment mit <i>M. sexta</i> .....	23
Abbildung 4: Wahl der Motte beim ersten Kontakt .....	24
Abbildung 5: Attraktivitätsindex (AI) .....	26
Abbildung 6: Konfokal Mikroskopische Bilder von <i>M. sexta</i> .....	27
Abbildung 7: Detailaufnahme SOG .....	28

### III. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	micro
AD	äußerer Durchmesser
AL	Antennallobus
aL	α-Lobus
AMMC	Antennales mechanosensorische Motorzentrum
BA	Benzylacetat (4-Phenyl-2-Butanon)
bL	β-Lobus
c	centi
ca.	circa
Ca	Calyx
CB	Zentralkörper
DC	Deutocerebrum
g	Gramm
gL	γ-Lobus
GR	gustatorischer Rezeptor
h	Stunde
Hz	Hertz
ID	innerer Durchmesser
IR	ionotroper Rezeptor
l	Liter
LbH	Labialnerv
LH	Laterales Horn
m	Meter
m	milli
M	Molar
MdN	Mandibularnerv
min	Minute
MxN	Maxillarnerv
NGS	Ziegen Normal Serum (normal goat serum)
∅	Durchmesser
OBP	Geruchs-Bindendes-Protein
Oe	Oesophagus

## Abkürzungsverzeichnis

---

OR	Geruchsrezeptor
ORCo	olfaktorischer Ko-Rezeptor
OSN	Rezeptorneuron
P	Pedunculus
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Protocerebrum
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SOG	Suboesophagealganglion
TC	Tritocerebrum
z.B.	zum Beispiel



## 1 Zusammenfassung

Um sich in ihrer Umgebung optimal zu orientieren, Futterquellen aufzuspüren und einen geeigneten Partner zu finden, sind Tiere neben der visuellen und akustischen Wahrnehmung auch auf olfaktorische Sinneseindrücke angewiesen. Vor allem bei Insekten ist die olfaktorische Wahrnehmung bei der Partnerwahl, der Eiablage oder bei der Suche nach Nahrung essentiell und erlaubt es dem Tier angemessen auf sich verändernde Umweltbedingungen zu reagieren. Bei dem Tabakswärmer *Manduca sexta* beginnt die olfaktorische Wahrnehmung über die gepaarten Geruchsorgane, die Antennen. In diesen werden spezifische Rezeptorneuronen durch passende Duftmoleküle aktiviert. Das chemische Signal wird so in ein elektrisches Signal umgewandelt und an das olfaktorische Gehirnareal, den Antennallobus, übertragen. Neben dem sensorischen Input der Antennen verfügt der Proboscis ebenfalls über Rezeptorneurone, die bei der olfaktorischen Reizweiterleitung eine wichtige Rolle spielen und insbesondere bei der Erkennung von Nektarpflanzen mitwirken.

Anhand Verhaltenstests konnte gezeigt werden, dass *Manduca sexta* in der Lage ist, zwischen verschiedenen Düften mit ihrem Proboscis zu unterscheiden. Dabei wurde zum einen der Duftstoff Benzylaceton, der vor allem in der Blüte der bevorzugten Tabakpflanze *Nicotiana attenuata* vorkommt und als Lockstoff dient, untersucht. Neben Benzylaceton wurde das Alkaloid Nikotin verwendet, für den ebenso eine Präferenz gegenüber der duftfreien Kontrolle festgestellt werden konnte. Obwohl die im Nektar vorkommende Hauptkomponente eine wirkungsvolle Verteidigung gegenüber Herbivoren darstellt, ist sie gegenüber *M. sexta* zwecklos. Schon im Larvenkörper wird das Nikotin über die Blätter aufgenommen und wirkungslos gemacht. Bei morphologischen Tests wurden die Proboscisnerven bzw. die Maxillarnerven mit Tetramethylrhodamine-Dextran angefärbt um festzustellen, ob es eine Verbindung zu der olfaktorischen Zentrale, den Antennalloben, gibt. Es konnte allerdings nur gezeigt werden, dass die zwei Nervenstränge in das Suboesophagealganglion (SOG) innervieren. Denkbar wäre jedoch, dass es lokale Interneuronen gibt, die das SOG mit den Antennalloben verbinden.

## 2 Einleitung

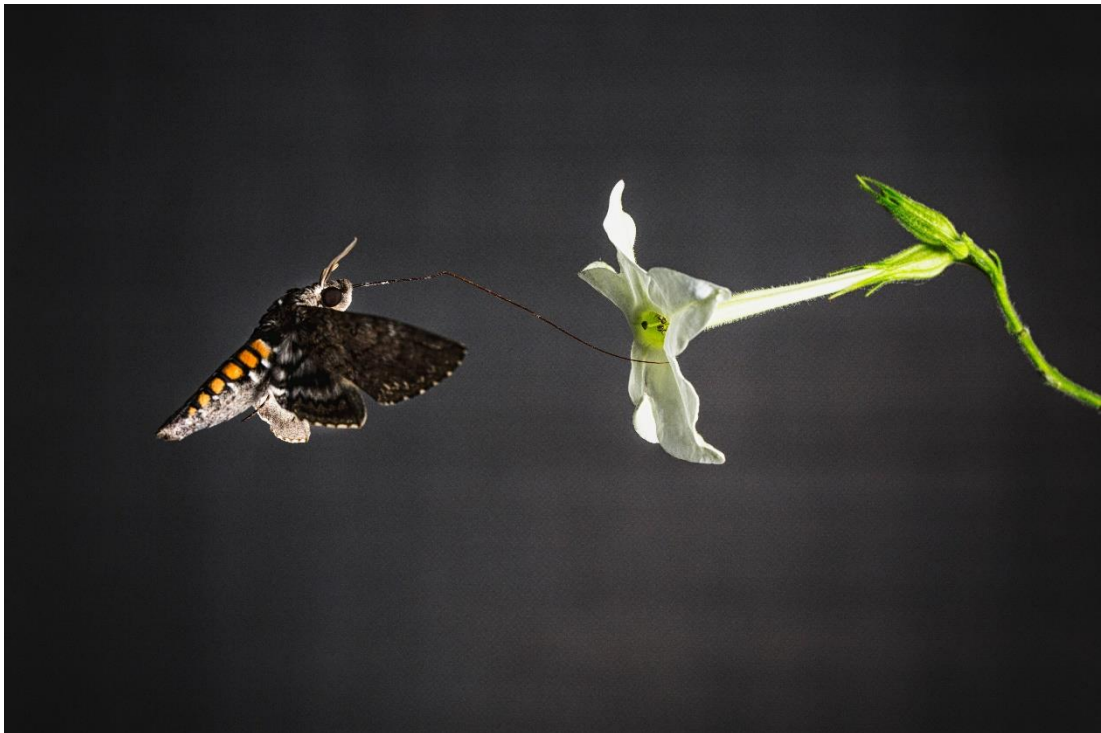
### 2.1 Einführung

Vor rund 480 Millionen Jahren haben sich Insekten, zeitgleich mit den ersten Landpflanzen, aus marinen Arten entwickelt und zählen heute, mit mehr als 70 % aller Arten, zu einer der vielfältigsten Gruppe aller bekannten Tiere. Aufgrund ihrer optimalen Adaption an ihre jeweiligen Umweltbedingungen waren sie in der Lage, sämtliche Lebensräume auf der Erde erfolgreich zu besiedeln. Dies ist vor allem wegen ihrer ständigen Interaktion mit ihrer aktuellen Umgebung möglich. Neben der visuellen und akustischen Wahrnehmung fungiert die olfaktorische Wahrnehmung oft als Schlüsselreiz für bestimmte Verhaltensweisen und sorgt dafür, dass sich Insekten in ihrer Umwelt zurechtfinden. So ist die olfaktorische Wahrnehmung von flüchtigen Substanzen wie auch die Unterscheidung von verschiedenen Düften bei der Nahrungssuche, bei der Wahl eines geeigneten Ortes für die Eiablage, bei der Vermeidung von Prädatoren oder bei der intraspezifischen Kommunikation über Pheromone von zentraler Bedeutung (Hildebrand and Shepherd, 1997).

Die Informationen der Sinneseindrücke werden über das Nervensystem bis an das Gehirn geliefert, verarbeitet und erlauben dem Tier, angemessen auf die jeweilige Situation zu reagieren (Hansson and Stensmyr, 2011). Durch die Entschlüsselung dieser Vorgänge lassen sich Rückschlüsse von einzelnen Neuronen über komplexe neuronale Netzwerke zu bestimmten Verhaltensmustern ziehen. Insbesondere das Wissen um die Ähnlichkeit der olfaktorischen Verarbeitungsstrukturen von Insekten und Vertebraten macht Insekten zu einem nützlichen Modellorganismus, der zur Erforschung der Grundlagen der Informationsverarbeitung und -integration im Gehirn geeignet ist (Hildebrand and Shepherd, 1997). Außerdem können Insekten als Organismen in der Neurobiologie wegen ihres relativ einfachen Nervensystems, der leichten Aufzucht und den geringen Laborkosten hervorragend für Forschungszwecke genutzt werden.

In dieser Arbeit soll es um den Tabakswärmer *Manduca sexta* gehen. Er gehört zu der Familie der *Sphingidae* in der Ordnung *Lepidoptera* und ist einer der am besten untersuchten Lepidopteren. *M. sexta* ist in Nord- und Südamerika beheimatet und ernährt sich im adulten Stadium von dem Nektar der

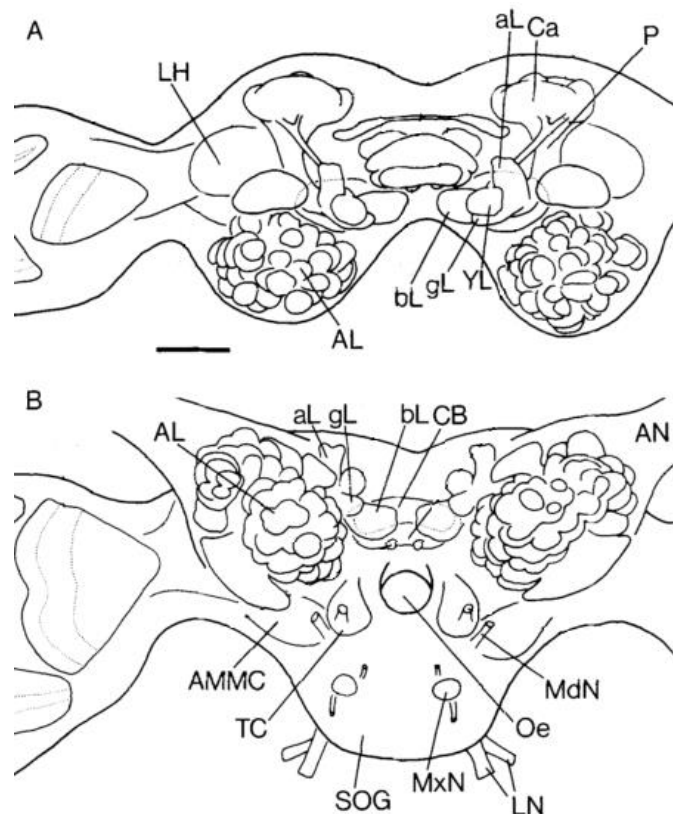
Nachtschattengewächse, vorwiegend verschiedener *Nicotiana*-Spezies sowie von dem Stechapfel *Datura wrightii* (Riffell et al., 2014). *M. sexta* ist einer der wichtigsten Bestäuber des Kojotentabaks *Nicotiana attenuata*, der ebenso wie auch andere Tabakpflanzen das Alkaloid Nikotin als Schutzmechanismus gegenüber Herbivoren produziert (Steppuhn et al., 2004). Im Larvenstadium dienen die Blättern der Pflanzen als Nahrungsquelle, wobei das Alkaloid für den Tabakswärmer relativ ungefährlich ist. Die Raupen nehmen das hochgiftige Nikotin über die Blätter auf, geben es teilweise über ihre Atemwege wieder ab und schützen sich so vor der Wolfsspinne *Camptocosa parallela* (Kumar et al., 2014). Ebenso konnte gezeigt werden, dass sich die Raupe mit einer höheren Nikotinkonzentration erfolgreicher gegen die endoparasitische Schlupfwespe *Cotesia congregata* schützen kann. Die abgelegten Eier des Parasiten auf der Raupe reifen zwar trotzdem zu Larven heran, aber die Entwicklung bis zur adulten Wespe nimmt mit steigender Nikotinkonzentration ab (Thorpe and Barbosa, 1986).



**Abbildung 1: *M. sexta* saugt den Nektar aus der Blüte von *N. alata***  
Foto: Anna Schroll

## 2.2 Aufbau Insektengehirn

Das Gehirn der Motten bzw. aller Insekten kann in vier große Bereiche unterteilt werden, die sich in höheren Organismen im Laufe der Evolution untereinander verbunden haben: die Supraesophageal Ganglien mit Deutocerebrum (DC), Protocerebrum (PC) und Tritocerebrum (TC) und das Suboesophagealganglion (SOG).



**Abbildung 2: Abbildung des Neuropiles im Gehirn von *M. sexta***

(A) Dorsal (B) Frontal AL: Antennallobus; AMMC: Antennales mechanosensorische Motorzentrum; AN: Antennalnerv; CB: Zentralkörper; LH: Laterales Horn; LbN: Labialnerv; Pilzkörper (Ca: Calyx; P: Pedunculus; aL:  $\alpha$ -Lobus; bL:  $\beta$ -Lobus; gL:  $\gamma$ -Lobus); MdN: Mandibularnerv; MxN: Maxillarnerv; Oe: Oesophagus; SOG: Suboesophagealganglion; TC: Tritocerebrum. Teile der optischen Loben sind in der Abbildung nur teilweise zu sehen. Maßstabsbalken = 200 $\mu$ m (verändert nach Homberg et al., 1987).

Das Deutocerebrum ist in die Antennalloben (AL) und die Antennalen mechanosensorischen Motorzentren (AMMCs) unterteilt. Die olfaktorische Information von den Antennen wird mittels der Rezeptorneuronen, deren Axone mit lokalen Interneuronen und Projektionsneuronen Synapsen bilden, zu den Antennalloben übertragen. Diese bilden das primäre olfaktorische Zentrum für die Informationsverarbeitung im Insektengehirn und sind jeweils in ~ 70 Untereinheiten (Grosse-Wilde et al., 2011), die Glomeruli unterteilt. Dabei erhält

ein einzelner Glomerulus den Input aller Rezeptorneuronen (OSNs) die die gleichen Duftrezeptoren exprimieren (Vosshall et al., 2000). Die hauptsächlich GABAergen lokalen Interneuronen bilden zum einen mit anderen lokalen Interneuronen innerhalb der Glomeruli bzw. mit Projektionsneuronen Synapsen.  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) fungiert dabei als ein inhibitorischer Neurotransmitter im zentralen wie auch dem peripheren Nervensystem von Insekten. Im Tabakswärmer *M. sexta* wird GABA in den optischen und den Antennalloben aus Glutamat synthetisiert und im Antennallobus gespeichert (Maxwell et al., 1978). Die Axone der cholinergen Projektionsneuronen leiten die Information an höhere Hirnareale, wie etwa die Pilzkörper und das laterale Horn, weiter (Matsumoto and Hildebrand, 1981; Tolbert and Hildebrand, 1981). Das AMMC erhält Axone von mechanosensorischen Neuronen und wird zudem von Dendriten der antennalen-muskulären Motorneuronen innerviert (Homborg, 1989).

Das Protocerebrum ist mit den optischen Loben und den Ocellen verbunden und lässt sich in den Zentralkörper, die Pilzkörper (Corpora pedunculata) und das laterale Horn unterteilen. Untersuchungen bei *Drosophila melanogaster* haben gezeigt, dass das laterale Horn in drei Bereiche unterteilt werden kann. Zum einen kommt es zu einer Verarbeitung von attraktiven und abstoßenden Düften und zum anderen wird die Intensität einzelner Düfte bewertet und abgebildet (Strutz et al., 2014). Diese hedonische Valenz bei *D. melanogaster* lässt sich möglicherweise auch auf andere Insekten wie *M. sexta* übertragen, deren olfaktorische Systeme eine ähnliche Struktur aufweisen (Martin et al., 2011). Die Pilzkörper sind in Calyx, Pedunculus und bei *M. sexta* in drei Loben (Alpha, Beta, Gamma) gegliedert. Die Pilzkörper sind vor allem an Prozessen wie Lernen und Gedächtnis entscheidend beteiligt (Fahrbach, 2006; O'Donnell et al., 2004) und bestehen aus parallel verlaufenden intrinsischen Neuronen, den Kenyon-Zellen. Über extrinsische Neuronen sind die Pilzkörper mit anderen Gehirnstrukturen verbunden, dabei fungieren Pedunculi und die drei Loben als Ein- und Ausgang, wohingegen die Calyxbereiche nur Eingänge enthalten. Dabei erhalten die äußeren Calyxbereiche visuellen Input, wohingegen die inneren Bereiche die olfaktorische Information aufnehmen (Stöckl et al., 2016).

In höheren Insekten sind Tritocerebrum und das Suboesophagealganglion (SOG) allmählich zusammengewachsen und lassen sich schwer voneinander trennen.

Das SOG wird von Mandibular-, Maxillar- und Labialnerven innerviert und projiziert zu anderen Teilen des Gehirns wie dem Deutocerebrum, Protocerebrum sowie zu Frontal- und Thorakal-Ganglien (Kvello et al., 2010). Im SOG liegen die meisten gustatorischen Rezeptoren, die vor allem die Information über die Nektarqualität an das Gehirn weiterleiten. In Interneuronen des SOGs wie auch im Mittelhirn konnte Serotonin nachgewiesen werden (Homborg and Hildebrand, 1989). Der zu den biogenen Aminen gehörende Botenstoff ist im Nervensystem weit verbreitet und fungiert z.B. bei der Neuromodulation als Aktivator von sekundären Botenstoffen.

### **2.3 Olfaktorische Verarbeitung**

Die olfaktorische Verarbeitung besteht aus den olfaktorischen Sensillen der Antennen, dem Antennallobus des Deutocerebrums und zwei Protocerebralen Arealen, dem Pilzkörper und dem lateralen Horn. Von den gepaarten Antennen werden Düfte über spezielle Rezeptoren wahrgenommen. Auf den Antennen befinden sich die Riechhaare, die so genannten Sensillen. Innerhalb jedes Sensillum liegen die Rezeptorneuronen (OSNs), die durch spezifische Duftmoleküle aktiviert werden. Dabei gelangen die Duftmoleküle durch Poren der Sensillumkutikula und der Lymphe (Steinbrecht, 1997) bis zu den so genannten Geruchs-Bindenden-Proteinen (OBPs, (Vogt and Riddiford, 1981)). Mit Hilfe dieser Proteine werden die Duftmoleküle wahrscheinlich zu den Rezeptoren transportiert. Chemosensorische Rezeptoren lassen sich in drei verschiedene Rezeptortypen unterscheiden. Neben den gustatorischen Rezeptoren (GRs) und den antennalen ionotropen Rezeptoren (IRs) gibt es die Geruchsrezeptoren (ORs). Bei *D. melanogaster* wurden ORs sowohl in den Antennen als auch in den Maxillarpalpen gefunden (Vosshall et al., 2000). Sie bilden mit dem so genannten Korezeptor ORCo einen Komplex, der dabei als Chaperon agiert (Larsson et al., 2004) und bei der Konvertierung der chemischen Information in ein elektrisches Signal beteiligt ist. Das Rezeptorsignal wird so in ein Aktionspotential umgewandelt und über die OSNs an den Antennallobus weitergeleitet. Neben den antennalen Rezeptorneuronen gibt es noch spezielle Rezeptorzellen zur Detektion von CO<sub>2</sub>. Sie befinden sich in dem so genannten Labialpalpen Grubenorgan, von dem Axone direkt in die einzelnen Glomeruli, dem Labialpalpen Grubenorgan Glomeruli, im Antennallobus ziehen (Guerenstein et al., 2004).

## 2.4 Gustatorische Verarbeitung des Proboscis

Neben dem sensorischen Input der Antennen gibt es im Proboscis ebenfalls eine sensorische Informationsverarbeitung. Der Proboscis der Motten enthält eine Vielzahl an chemosensorischen Sensillen, die jeweils zwei bis vier gustatorische Rezeptorneuronen (GRNs) enthalten (Mitchell et al., 1999). Im Genom von *M. sexta* konnten 45 Gene für gustatorische Rezeptoren (GRs) identifiziert werden (Koenig et al., 2015). Die meisten Rezeptoren sind dabei für nichtflüchtige Substanzen vorhanden, um z.B. Nahrung aufzuspüren oder toxische Chemikalien zu vermeiden (Montell, 2009), wohingegen einige andere Rezeptoren sensitiv auf Temperatur reagieren (Ni et al., 2013). Mittels der beiden Maxillarnerven (Davis and Hildebrand, 2006) projizieren die GRNs vom Proboscis zum Suboesophagealganglion (Ito et al., 2014). In der Honigbiene konnte ein Interneuron vom Proboscis, das sich im SOG verzweigt und bis in Neurophile des Gehirns, den Glomeruli der Antennalloben, dem lateralen Protocerebrum und dem Pilzkörper reicht, nachgewiesen werden (Hammer, 1993). Dabei dient das Interneuron zur Übertragung des unconditionierten Stimulus bei dem assoziativen Lernen.

*M. sexta* gehört zu den natürlichen Bestäubern des wilden Tabaks *Nicotiana attenuata* im Great Basin Desert (USA). Neben verschiedenen Verbindungen konnte zum einen Benzylaceton als Hauptkomponente in der Blüte nachgewiesen werden (Kessler and Baldwin, 2007). Benzylaceton dient vor allem als Locksignal und hat z.B. in großen Mengen eine positive Auswirkung auf das Verhalten der Weibchen in Bezug auf die Eiablage. Je mehr Nektar von der Pflanze produziert wird, umso mehr Eier werden vom Tabakschwärmerweibchen auf der Pflanze abgelegt (D. Kessler et al., 2015). Zum anderen konnte Nikotin als ein Hauptbestandteil im Nektar identifiziert werden (Kessler and Baldwin, 2007). Nikotin wird in den Wurzeln der Pflanze synthetisiert (Winz and Baldwin, 2001) und stellt eine wirkungsvolle Verteidigung gegenüber Herbivoren dar (Steppuhn et al., 2004). Der hauptsächlich aus primären Pflanzenstoffen bestehende Nektar setzt sich aus Zucker- und Aminosäureverbindungen zusammen, die potenzielle Bestäuber anlocken sollen. Sekundäre Pflanzenstoffe, wie Alkaloide oder Phenole, sind ebenfalls im Nektar zu finden. Sie haben aber eine abschreckende Wirkung und fungieren als Abwehrmechanismus. Diese schützende Wirkung des Alkaloids gegenüber *M.*

*sexta* konnte jedoch nicht gezeigt werden. Das bittere Nikotin wird, nachdem der Schwärmer durch das Benzylaceton angelockt wurde, aufgesaugt (Kessler et al., 2008). Bei Kolibris (*Archilochus alexandri* und *Selasphorus rufus*) konnte eine abstoßende Wirkung gegenüber Nikotin festgestellt werden, allerdings wirkt es sich bei der Bestäubung positiv aus, da die Kolibris zuerst einmal durch den Lockstoff der Pflanze angelockt werden. Durch das im Nektar enthaltene bittere Nikotin wird von den Kolibris zwar weniger Nektar getrunken, dies führt aber dazu, dass Sie deswegen mehr verschiedene Blüten besuchen und somit zur Pollenübertragung beitragen (Kessler and Baldwin, 2007; Kessler et al., 2012). Von Hummeln wird das enthaltene Nikotin im Nektar nicht geschmeckt und wirkt dementsprechend auch nicht abstoßend. Dies birgt allerdings eine Gefahr für die nahrungssuchenden Hummeln, die das Nikotin trotz seiner schädlichen Wirkung aufnehmen und zum Teil an ihre Kolonie abgeben (S. C. Kessler et al., 2015).

### **2.5 Zielstellung**

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Verhaltenstest festzustellen ob *M. sexta* zwischen verschiedenen Düften bzw. einer Kontrolle ohne Duftstoff signifikant mit dem Proboscis unterscheiden kann. Für die Experimente im Windkanal wurden die Düfte Benzylacetaton (4-Phenyl-2-Butanon) und Nikotin verwendet. Neben den Verhaltenstest sollte mit Hilfe morphologischer Analysen untersucht werden, welche Hirnareale von den Nerven des Proboscis innerviert werden. Ebenso sollte geprüft werden, ob gegebenenfalls eine direkte Verbindung zum ersten olfaktorischen Zentrum, den Antennalloben nachgewiesen werden kann.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte und Laborausstattung

Bromsiliertes Glas mit Filament (AD: 1 mm, ID: 0,5 mm)	Science products, USA
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific, Menzel Gläser, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Elektronische Präzisionswaage	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Filterpapier (Ø 12 mm)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glasgefäße 50 ml	Schott, Mainz, Deutschland
IM 300 Microinjection	Narishige International, New York, USA
Kaltlichtquelle CL1500 ECO	Schott, Mainz, Deutschland
Konfokal Laser Scanning Mikroskop LSM 510 Meta	Zeiss, Jena, Deutschland
Model P-97 Flaming/ Brown Micropipette Puller	Sutter Instruments Co., Novato, USA
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Menzel Gläser, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Olympus Stereomikroskop SZX16	Olympus, Tokyo, Japan
Olympus Stereo-Zoommikroskop SZX10	Olympus, Tokyo, Japan
Pipetten	Gilso, Middleton, USA
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Programms EthoVision	Nodlus, Wageningen, Niederlande
Softwareprogramm Media record	Noldus, Wageningen, Niederlande
Teflon-Schlauch (Ø 4 mm)	Ammerflon, Diessen a. Ammersee, Deutschland
Vortex Schüttler	Scientific Industries, New York, USA
Webkamera C615 (ohne Infrarotfilter)	Logitech, Apples, Schweiz
Wippschüttler Mini-Rocker	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Y- maze (5 cm x 3 cm x 0,5 cm)	MPI, Jena, Deutschland

### 3.2 Chemikalien

Benzylaceton	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd (37 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutaraldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lucifer Yellow CH (4 %)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methylsalicylat	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nikotin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tetramethylrhodamine-Dextran (5 %)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

### 3.3 Puffer, Medium, Lösungen und Antikörper

10 x PBS (pH 7,4)	76g NaCl (1,3 M)9,94g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,07 M) 3,6g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,03 M) 1l Aqua bidest
1 x PBS	100ml 10xPBS 900ml Aqua bidest
1 x PBS-T (1 % Triton)	5ml 10xPBS 50µl 1% Triton X-100 45ml Aqua bidest
Blockierlösung 2% NGS	50ml PBS-T 1ml NGS
Fixationslösung	8ml PBS 1ml Formaldehyd 1ml Methanol
Ringerlösung ( <i>Manduca</i> ) (ph 6,9)	150 mM NaCl, 3 mM CaCl <sub>2</sub> , 3 mM KCl, 10 mM TES buffer, 25 mM Sucrose

Antikörper	Synapsin 1:1 3C11 Syn-ORF 1 (mouse) in Glycerol (Verdünnung 1:100 in PBS-T mit 1 % NGS)
	Goat anti-mouse 633 1:1 in Glycerol (Verdünnung 1:3000 in PBS-T und 1 % NGS)
	Streptavidin 555 1:1 in Glycerol

### 3.4 Immunhistochemie

Die Motten wurden in 15-ml Falconröhrchen überführt, wobei der Kopf freigelegt und mit Dentalwachs auf einem Objektträger fixiert wurde. Nach dem Öffnen der dorsalen Kopfkapsel wurden alle Gewebe, die das Gehirn bedeckten, entfernt. Um ein Austrocknen der Gehirne während der Präparation zu verhindern wurden die Gehirne mit Ringerlösung gespült. Das freigelegte Gehirn wurde entnommen und anschließend drei Stunden bei Raumtemperatur (RT) mit einem Teil Formaldehyd, einem Teil Methanol und acht Teilen phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) fixiert. Danach wurden die Gehirne mit PBS-T nach 1, 5, 15, 30 und 45 min oder über Nacht gewaschen. Anschließend wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem Ziegen Normal Serum (NGS) blockiert, damit unspezifische Bindestellen abgesättigt werden. NGS wurde verwendet, da der sekundäre Antikörper aus der gleichen Spezies stammte. Im Folgenden wurde der monoklonale primäre Antikörper (Syn-ORF 1) aus der Maus, der sich gegen ein Fusionsprotein richtet, verwendet. Dieses Protein besteht aus einer Glutathion-S-Transferase und der ersten Aminosäure des präsynaptischen Vesikelproteins Synapsin 1 (Klagges et al., 1996). Für 4 - 5 Tage wurden die Gehirne im Kühlschrank inkubiert, wobei der primäre Antikörper das NGS von den spezifischen Bindestellen verdrängte. Danach wurden die Gehirne wie oben beschrieben gewaschen und der sekundäre Ziegen-Anti-Maus-Antikörper, welcher mit Cy5 (Indodicarbocyanin) konjugiert wurde, inkubierte ebenfalls für 4 - 5 Tage im Kühlschrank. Dieser sekundäre Antikörper richtete sich gegen den primären Maus-Antikörper. Mit Hilfe einer Ethanol-Reihe (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 99 %, 3x 100 %, alle 15 Minuten) wurden die Gehirne dehydriert und anschließend mit Methylsalicylat für mind. 40 min aufgeklärt.

### **3.5 Injektionsfärbung**

Die Motten wurden wie oben beschrieben fixiert und mit der ventralen Seite nach oben mit Wachs auf einem Objektträger befestigt. Der Proboscis wurde ausgerollt und mit Wachs fixiert, damit ein Zugang von der ventralen Seite der Kopfkapsel möglich war. Diese wurde geöffnet und die Labialpalpen, das Exoskelett und die Tracheen, welche das Suboesophagealganglion (SOG) bedeckten, wurden entfernt, so dass die zwei Maxillarnerven gut sichtbar waren. Zum einen wurden für das Einbringen des Farbstoffes die Nerven kurz vor dem Gehirn mit einer Glaskapillare angestochen und ein Kristall (Tetramethylrhodamin) injiziert. Zum anderen wurde bei der Mikroinjektion mit Hilfe eines Bromsilierten Glases mit Filament eine Tetramethylrhodmin-Lösung durch Luftdruck in die Nerven gedrückt (1µl). Daraufhin wurden die Gehirne entweder zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 5° C stehen gelassen. Danach wurde wie oben beschrieben gewaschen, dehydriert und aufgeklärt. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Gehirne in Objektträgern mit einer Vertiefung in Methylsalicylat eingelegt.

### **3.6 Lucifer Yellow Färbung**

Für die Lucifer Yellow Färbung wurden die Gehirne wie in 3.4 präpariert, fixiert und gewaschen. Anschließend folgte eine Dehydrierung durch eine Ethanolreihe (50 %, 70 %, 90 %, 100 %, jeweils 10 min). Als Nächstes wurden die Gehirne für 10 min in Methylsalicylat gelegt und danach mit einer absteigenden Ethanolreihe und anschließend für 15 min in PBS gewaschen. Nachdem die Gehirne über Nacht bei 4° C in 500 µl PBS-T und 1 µl Lucifer Yellow inkubierten, wurden sie 2 x 10 min in PBS gewaschen. Nach einer weiteren Ethanolreihe wurden die Gehirne in Methylsalicylat eingebettet.

### **3.7 Konfokal Mikroskop**

Zur Visualisierung des neuronalen Gewebes wurden die Gehirne in Methylsalicylat in Objektträgern eingebettet und mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gescannt. Für Cy3 und Lucifer Yellow wurde der Argon Laser bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm verwendet. Bei Cy5 wurde der Neon Laser bei 633 nm genutzt. Die Scans wurden entweder mit einem 10x oder einem 20x Luftobjektiv gemacht. Die Auflösung lag dabei bei 1024 x 1024

Pixeln und wurde in einem Intervall von 6,41  $\mu\text{m}$  durchgeführt. Jeder Frame wurde vier Mal gescannt und dann gemittelt. Die Scanzeit pro Frame lag bei 20,26 s. Der Bandpass-Filter war von 550 – 600 nm eingestellt.

### 3.8 Pflanzen

Für die Studie wurde die Pflanze *Nicotiana glauca* verwendet die im Glashaus des MPIs angezogen wurden. Nach dem sogenannten Elongationswachstum wurden die Pflanzen in eine Klimakammer überführt, die auf die Photoperiode der Kammer, in denen die Motten gehalten wurden, abgestimmt wurde (Tag: 25° C, 60 % Luftfeuchtigkeit, 16 h Licht, 100 % Lichtintensität; Nacht: 23° C, 80 % Luftfeuchtigkeit, 8 h dunkel). Mindestens eine Woche vor der experimentellen Verwendung wurden die Pflanzen zur Eingewöhnung in der Kammer angezogen. Die Pflanzen wurden täglich mit 100 ml Wasser, ergänzt mit 0,12 g l<sup>-1</sup> Dünger (Peters Professional Allrounder, Planta Düngemittel, Germany, nutrient composition: 20 % N, 20 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 20 % K<sub>2</sub>O, 0,015 % Cu, 0,12 % Fe, 0,06 % Mn, 0,01 % Mo und 0,015 % Zn) bewässert.

### 3.9 Insekten

Die Motten *M. sexta* wurden im Max-Planck-Institut für chemische Ökologie gezüchtet. Die ausgewachsenen Motten hatten die Möglichkeit, sich in einem Flugkäfig zu paaren. In diesem Käfig befand sich die Pflanze *Nicotiana attenuata*, welche zur Eiablage benutzt wurde. Die Eier wurden dreimal pro Woche abgesammelt und in Plastikboxen in eine Klimakammer überführt. Die Kontrollbedingungen liegen tagsüber bei 26° C, 80 % Luftfeuchtigkeit, 16 h Lichtintensität, 100% Lichtintensität und in der Nacht bei 27° C, 80 % Luftfeuchtigkeit, 8 h Dunkelheit. Nach dem Schlüpfen der Larven wurden diese in neue Plastikboxen in der gleichen Klimakammer übertragen und mit Nahrung versorgt (46 g Agar, 144 g Weizenkeime, 140 g Maismehl, 76 g Sojamehl, 75 g Kasein, 24 g Salz, 36 g Zucker, 5 g Cholesterin, 12 g Ascorbinsäure, 6 g Sorbinsäure, 3 g Methylparaben, 9 ml Leinöl, 60 ml 37 %iges Formalin, 30 mg Nikorinsäure, 15 mg Roboflavin, 7 mg Thiamin, 7 mg Pyridoxin, 7 mg Folsäure und 0,6 mg Biotin je 1,8 ml Wasser). Die Larven wurden dreimal pro Woche in neue Boxen mit neuem Futter übertragen. Am Ende des letzten Larvenstadiums wurden die Larven in Holz-gebohrten Löchern in einer anderen Klimakammer, mit

den gleichen Bedingungen, für die Verpuppung platziert. Die für die Aufzucht ausgewählten Puppen wurden nach Geschlechtern getrennt und zum Schlüpfen in einen Flugkäfig gelegt. Für die Experimente wurden 2 - 3 Tage alte Männchen getestet.

### 3.10 Windkanal

Die Y-maze Versuche wurden in einem Windkanal aus Plexiglas (220 cm x 90 cm x 90 cm) durchgeführt. Die Lufttemperatur und die relative Luftfeuchtigkeit wurden auf 25° C und 70 % eingestellt. Die Experimente wurden von ca. 14:00 – 16:30 Uhr durchgeführt, eine Stunde vor dem Start des Experiments wurden die Motten in eine kleine Kammer, in der die gleichen Licht- und Klimaverhältnisse wie im Windkanal herrschten, gebracht. Die *M. sexta* Motten wurden dafür separat in kleinen Käfigen (15 cm x Ø 13 cm) gehalten und für jeden Durchgang wurde eine einzelne Motte mit dem geöffneten Käfig auf eine 35 cm Höhe Plattform, 20 cm vom Windkanalende und 45 cm von jeder Außenseite entfernt, in den Windkanal gesetzt. Dabei befindet sich die Motte gegenüber des Setups.

### 3.11 Probosciswahl

Die olfaktorische Präferenz des Proboscis wurden in einem speziell angefertigten Y-maze getestet. Zum einen wurden 10 µl einer 0,1 mM Benzylacetaton-Lösung in destilliertem Wasser gegen die gleiche Menge an destilliertem Wasser (Kontrolle) untersucht. Zum anderen wurden zwei unterschiedliche Nikotinkonzentrationen verglichen. Dabei wurden jeweils 10 µl einer 0,01 mM und 0,1 mM Nikotinlösung in destilliertem Wasser gegen die Kontrolle getestet. Alle Lösungen wurden auf ein kleines rundes Filterpapier pipettiert und in 50 ml Glasgefäße gelegt. Für den Lufteinstrom wurden die zwei Gefäße an die Arme der Y-maze mittels Teflon-Schlauch angeschlossen. In die Gefäße wurde aktiv kohlegefilterte Luft geblasen um so einen gleichmäßigen Lufteinstrom (0,1 l/min) in jedem Arm der Y-maze zu gewährleisten. Um sicherzustellen, dass die Motte mit ihren Antennen nicht mit den Düften in Kontakt kommt, wurde die Luft über einen weiteren Schlauch, der am Anfang der Y-maze angebracht war, abgeleitet (0,2 l/min). Um die Motten anzulocken, wurde eine frisch abgeschnittene Blüte des Flügeltabaks *N. alata* in die Öffnung der Y-maze platziert. *N. alata* wurde dafür gewählt, da sie kein Benzylacetaton in die Öffnung der Y-maze freisetzt

(Raguso et al., 2003). Spezielle Duftstoffe, die sich aufgrund der Koevolution mit dem Schwärmer immer stärker angepasst haben, dienen zur Anlockung der Motte und sorgen neben anderen Faktoren für eine hohe Attraktivität der Blüte (Haverkamp et al., 2016). Das Setup mit dem Y-maze wurde im Windkanal wie unter 3.10 geschrieben aufgebaut. Motten, die nicht innerhalb der ersten 5 min. mit dem Schlagen der Flügel begannen, wurden nicht in die Auswertungen aufgenommen. Nachdem die Motte losgeflogen war, durfte sie sich 4 min frei im Windkanal bewegen. Die Bewegungen der Motten und speziell des Proboscis in dem Y-maze wurden durch eine Videokamera mit 30Hz aufgezeichnet. Die Videos des Proboscis wurden mit dem Softwarepaket Media record aufgenommen und anschließend mit Hilfe des Programms EthoVision manuell analysiert. Die Ergebnisse wurden schließlich mittels Boxplot dargestellt. Das Y-maze, die Teflon-Schläuche und die Glasgefäße wurden nach dem Experiment mit Ethanol und Aceton gewaschen, durchgespült und bei 55° C (Y-maze) bzw. 200° C (Teflon-Schläuche und Glasgefäße) aufgeheizt.

### 3.12 Statistik

Die Auswertungsmethode der Versuchsergebnisse wird zunächst mit dem Shapiro-Wilk-Test bestimmt, der eine Aussage darüber macht, ob die Werte normalverteilt sind. Die Nullhypothese  $H_0$  besagt dabei, dass die Werte normalverteilt sind. Damit die Nullhypothese angenommen werden kann, muss der P-Wert über 0,05 liegen. Liegt er unter 0,05 wird die Alternativhypothese  $H_1$  angenommen, bei der die Werte nicht Normalverteilt sind. Der Test ist zwar genauer als der Quantile-Quantile-Plot (QQ-Plot), allerdings gegenüber Extremwerten empfindlicher. Mit dem QQ-Plot erhält man eine graphische Darstellung wobei die echten Werte der Größe nach sortiert werden. Diese Werte werden dann gegen die nach der Normalverteilung vorher gesagten Werte aufgetragen und verglichen. Haben die zwei Merkmale die gleiche Verteilung, ergeben die Punkte eine Gerade.

Die Nullhypothese  $H_0$  des Fligner-Tests prüft die Gleichheit der Varianz zwischen den Gruppen.

Der nichtparametrische Wilcoxon Vorzeichen Rangtest bestimmt die Gleichheit zweier gepaarter Stichproben. Liegt der P-Wert über 0,05 sind die Werte nicht signifikant verschieden. Der nichtparametrische Kruskal-Test prüft, ob der Anteil der Varianzen zwischen den Proben an der Gesamt-Varianz signifikant größer ist

als der Anteil der Varianz innerhalb der Proben. Anhand der Varianzen wird geprüft, ob die unabhängigen Stichproben signifikant ungleich sind ( $P < 0,05$ ).

### **3.13 Attraktivitätsindex**

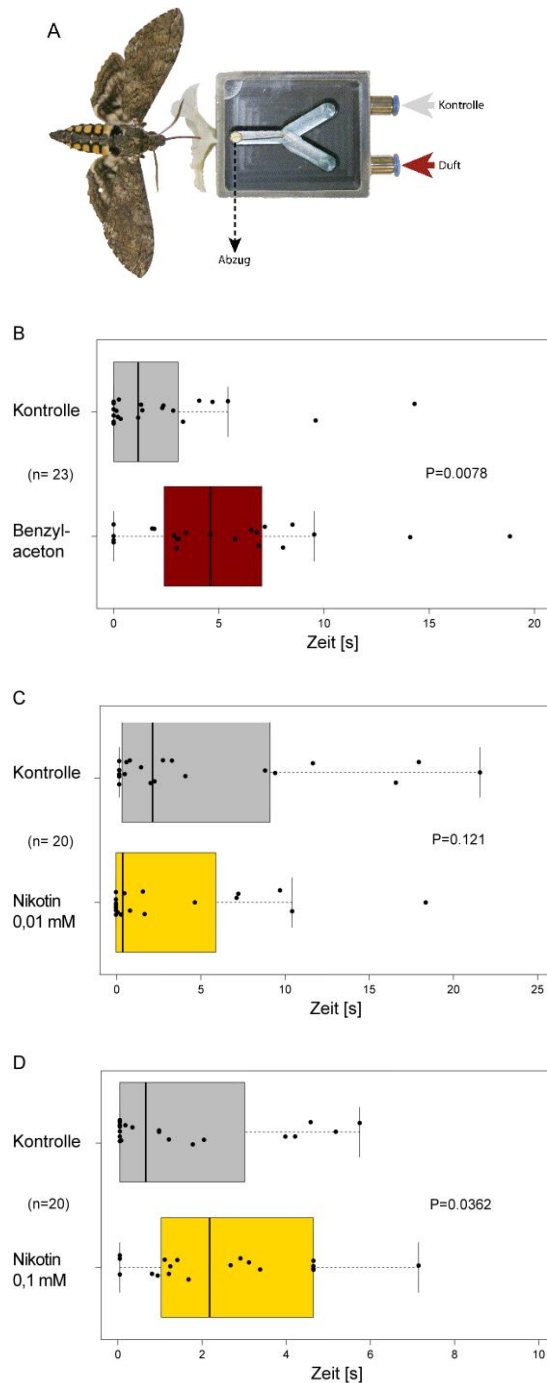
Mit dem Attraktivitätsindex ( $-1 \leq AI \leq 1$ ) soll die Präferenz von *M. sexta* auf die getesteten Düfte verdeutlicht werden. Der Attraktivitätsindex errechnet sich aus der Differenz der Zeit, in der sich die Motten für den Duft oder die Kontrolle entschieden haben, geteilt durch die Gesamtzeit:

Verbringen die Motten die ganze Zeit an der Kontrolle beträgt der  $AI = -1$ . Entscheiden sich alle für den Duft ist  $AI = 1$ . Alle anderen Variationen befinden sich dazwischen. Die Daten wurden statistisch mit dem Statistikprogramm R ausgewertet.



## 4 Ergebnisse

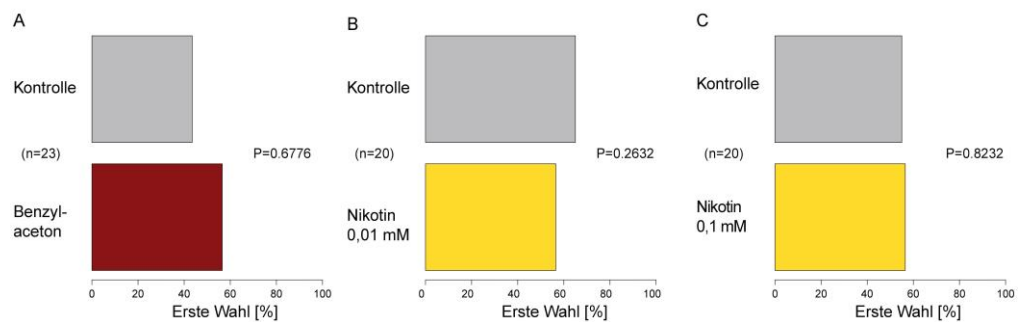
### 4.1 Verhaltenstests



**Abbildung 3: Verhaltensexperiment mit *M. sexta***

(A) Die Reaktion auf die angefeuchtete Luft mit BA (0,1 mM) bzw. Nikotin (0,01 mM und 0,1 mM) oder nur auf die angefeuchtete Luft ohne Duftstoff wurde getestet. Der Abzug schließt antennale Olfaktion aus. (B) Motten haben ihren Proboscis signifikant länger in den Arm, in dem BA vorhanden war, hineingesteckt als in den Arm ohne Duftstoff (Wilcoxon Vorzeichen Rangtest). (C) Bei einer Nikotinkonzentration von 0,01 mM konnte keine Präferenz für Nikotin festgestellt werden, allerdings war bei der Konzentration von 0,1 mM (D) eine signifikante Präferenz für Nikotin nachweisbar. (A) Grafik: Alexander Haverkamp

Innerhalb der vorgegebenen Zeit entschieden sich die Motten signifikant länger für den Arm mit dem enthaltenen BA-Luftstrom ( $P = 0,0078$ ; Abbildung 3B; Tabelle 3) als für den Arm ohne Duftstoff. Allerdings haben sich die Motten bei dem ersten Kontakt gleich häufig zwischen den beiden Y-maze-Armen entschieden, die entweder den duftenden Luftstrom mit BA oder die Kontrolle enthielten ( $P = 0,6776$ ; Abbildung 4A).



**Abbildung 4: Wahl der Motte beim ersten Kontakt**

Die Motten wählten beim ersten Kontakt gleich oft zwischen den Armen der Y-maze, die den Duft oder die duftfreie Kontrolle enthielten. Sowohl bei Benzylacetone (A), als auch bei den zwei Nikotin-Konzentrationen (B und C) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Um zu untersuchen, ab welcher Konzentration Nikotin wahrgenommen werden kann, wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen (0,01 mM und 0,1 mM) getestet. Dabei wurden diese Konzentrationen aufgrund ihres natürlichen Vorkommens im Nektar gewählt (Tiedeken et al., 2014). Bei der geringeren Konzentration konnte keine Präferenz für Nikotin festgestellt werden ( $P = 0,121$ ; Abbildung 3C; Tabelle 3), ebenso wenig wie bei der ersten Wahl der Motten ( $P = 0,2632$ ), vielmehr entschieden sie sich für den Y-maze-Arm, der die Kontrolle, also keinen Duftstoff, enthielt (Abbildung 4B). Bei der Konzentration von 0,1 mM zeigte sich bei dem ersten Kontakt keine signifikante Wahl für Nikotin ( $P = 0,8232$ ; Abbildung 4C), allerdings lässt sich in der gesamten Zeit in der die Motten in dem duftenden und dem nicht-duftenden Arm verbracht haben, eine signifikante Präferenz für den Nikotin-Luftstrom feststellen ( $P = 0,0362$ ; Abbildung 3D; Tabelle 3).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass *M. sexta* in der Lage ist, die BA- bzw. Nikotin-enhaltene Luft ab einer bestimmten Konzentration mit ihrem Proboscis aufzuspüren und sich für die duftende Lösung zu entscheiden.

**Tabelle 1: Shapiro-Test**

	Benzylacetone		Nikotin 0,01 mM		Nikotin 0,1 mM	
	BA	Kontrolle	Nikotin	Kontrolle	Nikotin	Kontrolle
W	0,888	0,7019	0,6978	0,7636	0,7495	0,7682
P-Wert	0,0145	1,482 e-05	3,37 e-05	0,0003	0,0002	0,0003

**Tabelle 2: Fligner-Test**

	Benzylacetone	Nikotin 0,01 mM	Nikotin 0,1 mM
med chi-squared	15,932	13,339	13,696
df (Freiheitsgrade)	16	15	12
P-Wert	0,4577	0,5761	0,3205

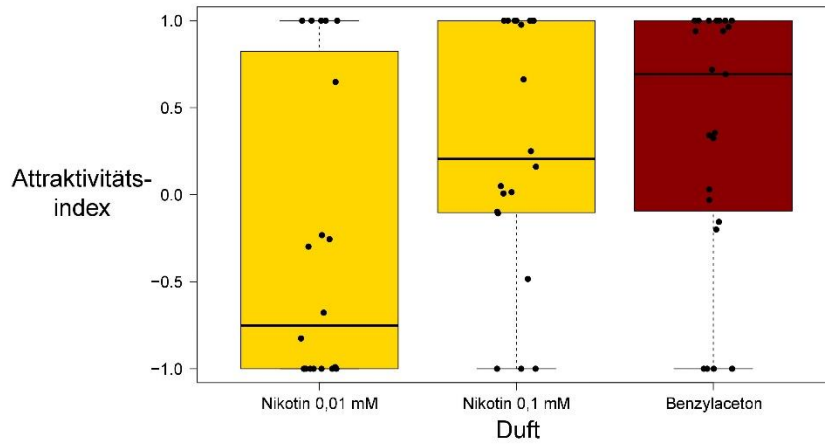
**Tabelle 3: Wilcoxon-Test**

	Benzylacetone	Nikotin 0,01 mM	Nikotin 0,1 mM
V	226	63	161
P-Wert	0,0078	0,121	0,0362

Da die P-Werte des Shapiro-Tests (Tabelle 1) alle deutlich unter 0,05 liegen, wird die Alternativhypothese angenommen, bei der die Werte nicht normalverteilt sind. Bei dem Wilcoxon-Test (Tabelle 3) sind die P-Werte von Benzylacetone (P = 0,0078) und Nikotin (0,1 mM; P = 0,0362) beide signifikant. Die Werte von Nikotin (0,01 mM) sind nicht signifikant unterschiedlich, da P = 0,121.

Bei dem Attraktivitätsindex (AI) entspricht ein AI = 1 einer 100 %igen Wahl für den jeweiligen Duft, wohingegen sich alle Motten bei einem AI = - 1 für die Kontrolle entschieden haben. Bei den Düften Benzylacetone (AI = 0,6919) und Nikotin (0,1 mM; AI = 0,2054) konnte eine deutliche Präferenz für den jeweiligen Duft gezeigt werden, wohingegen bei Nikotin (0,01 mM) keine Präferenz beobachtet wurde (AI = -0,7515; Abbildung 5). Die statistischen Auswertungen zeigen zum einen keine Normalverteilung, da die P-Werte des Shapiro-Tests alle deutlich unter 0,05 liegen. Der P-Wert des Kruskal-Tests liegt mit 0,0645 an der Grenze zur Signifikanz (P < 0,05; Tabelle 5). Bei den Verhaltenstests wurden 20 bzw. 23 Versuchstiere in die Ergebnisse mit einbezogen. Bei einer größeren Anzahl an Versuchstieren ließe sich möglicherweise eine klare Signifikanz feststellen. Da bei dem Kruskal-Test keine Signifikanz festgestellt werden konnte,

sind die Paarweisen Vergleiche der Werte des Wilcoxon Rangsummentest nicht aussagekräftig (Tabelle 6).



**Abbildung 5: Attraktivitätsindex (AI)**

AI = 1 entspricht einer 100 %igen Wahl für den jeweiligen Duft, wohingegen sich alle Motten bei einem AI = -1 für die Kontrolle entschieden haben. Nikotin (0,01 mM) zeigt eine deutliche Tendenz zur Kontrolle, Nikotin (0,1) und Benzylacetone tendieren deutlich zu dem jeweiligen Duft.

**Tabelle 4: Präferenz - Shapiro-Test**

	Benzylacetone	Nikotin 0,01 mM	Nikotin 0,1 mM
W	0,8012	0,7402	0,8425
P-Wert	0,0004	0,0001	0,004

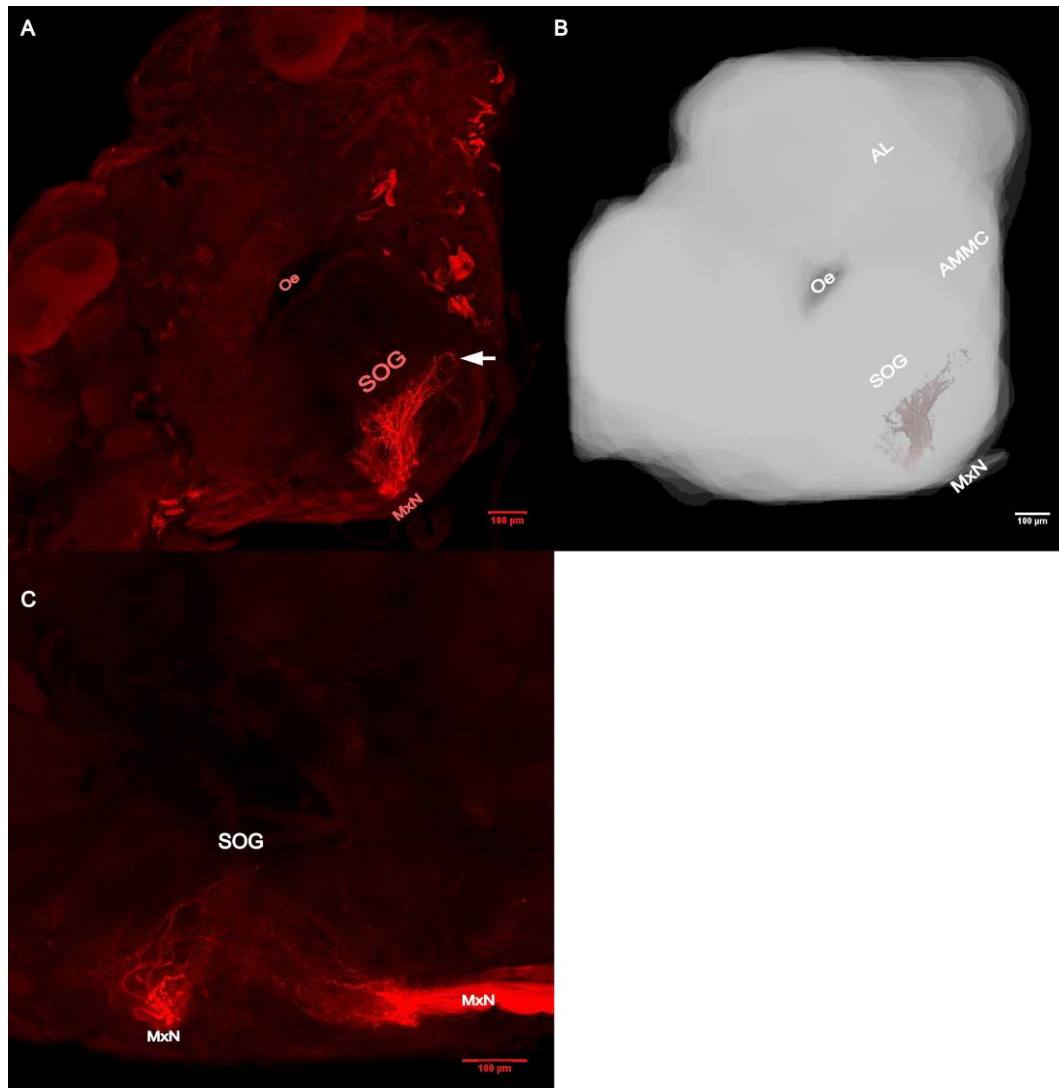
**Tabelle 5: Präferenz - Fligner- und Kruskal-Test**

Fligner-Test		Kruskal-Test	
med chi-squared	0,2063	med chi-squared	5,4683
Df	2	df	2
p-value	0,902	p-value	0,0645

**Tabelle 6: Präferenz - Wilcoxon Rangsummentest**

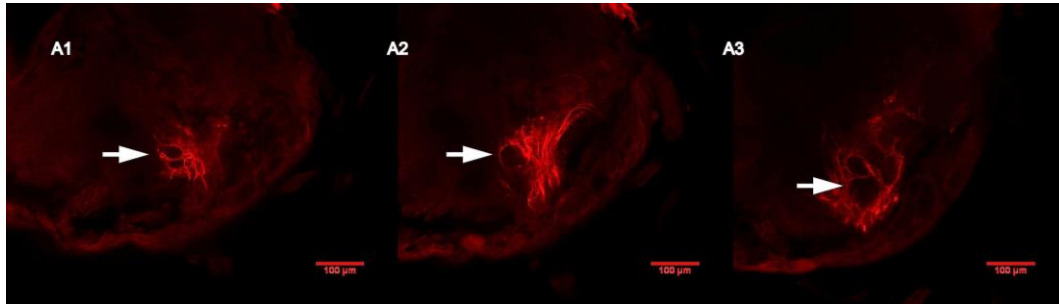
	Nikotin 0,01	Nikotin 0,1
BA	0,13	0,88
Nikotin 0,1	0,13	

## 4.2 Morphologische Analysen



**Abbildung 6: Konfokal Mikroskopische Bilder von *M. sexta***

Frontale Sicht auf das Mottengehirn. (A) Sowohl contra- als auch ipsilaterale Nervenstränge des einen, mit Tetramethylrhodamin gefüllten, Maxillarnervs sind sichtbar. Ringförmige Strukturen sind erkennbar (Pfeil). (B) 3D-Bild des Mottengehirns, das auch in (A) sichtbar ist. (C) Beide Maxillarnerven wurden mit Tetramethylrhodamin injiziert. AL: Antennallobus; AMMC: Antennales mechanosensorische Motorzentrum; Oe: Oesophagus; MxN: Maxillarnerv; SOG: Suboesophagealganglion.



### **Abbildung 7: Detailaufnahme SOG**

Durch die Färbung mit Tetramethylrhodamin konnten zirkuläre Strukturen sichtbar gemacht werden (weiße Pfeile). Die einzelnen Aufnahmen (A1 - A3) liegen dabei übereinander, wobei frontal mit den Aufnahmen begonnen wurde.

Die Axone der Neuronen des Proboscis ziehen über die Maxillarnerven zu einem Bereich, der unter dem Oesophagus liegt. Bei *Drosophila* ist diese Region in „saddle“ (SAD) und „adult gnathal ganglion“ (GNG) bzw. dem SOG aufgeteilt. GNG ist die Region, die unter dem Oesophagus liegt, wobei die dorsale und posteriore Fläche vom SAD bedeckt wird (Ito et al., 2014). Es konnten sowohl auf der contra- wie auch der ipsilateralen Seite des SOG gefärbte Strukturen nachgewiesen werden, obwohl der Farbstoff nur in einen der beiden Maxillarnerven injiziert wurde (Abbildung 6A). Die Nervenstränge legen sich dabei um zirkuläre Strukturen herum (Pfeil) (Abbildung 6A, Abbildung 7). Ebenso konnten einzelne Nerven sichtbar gemacht werden, die eine Verbindung der beiden Maxillarnerven im SOG zeigen (Abbildung 6C). Es konnten allerdings keine Nervenstränge festgestellt werden, die in die Bereiche der Antennalloben oder der AMMCs ziehen (Abbildung 6B).

Bei der Immunhistochemie wie auch bei der Lucifer Yellow Färbung konnten keine Ergebnisse dokumentiert werden.

## 5 Diskussion

Da Schwärmer während ihres Schwebeflugs einen hohen Energieverbrauch aufweisen, ist es für sie besonders wichtig, Blütendüfte zu erkennen und zu bewerten. Bisher war jedoch unklar, ob Motten Düfte mit der erforderlichen Genauigkeit wahrnehmen. Mit dieser Arbeit sollte zum einen untersucht werden, ob *M. sexta* zwischen unterschiedlichen Düften und einer Kontrolle mittels ihres Proboscis unterscheiden kann. Eine weitere Fragestellung war, ob es eine Verbindung der Proboscisnerven zu Hirnarealen bzw. zur olfaktorischen Zentrale, den Antennalloben gibt. Hierfür konnte allerdings kein Nachweis erbracht werden. Mit Hilfe von Verhaltenstest konnte jedoch gezeigt werden, dass *M. sexta* in der Lage ist, Düfte mit unterschiedlichen Konzentrationen mittels des Proboscis zu unterscheiden.

Der olfaktorische Input der Blütendüfte wird zuerst von den zwei Antennen aufgenommen. Da der Proboscis während der Nektaraufnahme vollständig ausgerollt ist, vergrößert sich der Abstand von der Blüte und dem Nektar zu den Antennen, was dazu führt, dass dadurch die räumliche Wahrnehmung der Antennen möglicherweise zu gering ist, um zwischen einzelnen Pflanzen zu unterscheiden (Willis et al., 2013). Der Proboscis könnte so als zweiter Input bei der Orientierung an der Blüte und bei der Einschätzung der Qualität der Pflanzen bzw. des Nektars eine wichtige Rolle spielen (Goyret and Raguso, 2006). Anhand molekularer Tests wurde der olfaktorische Korezeptor ORCo in der Spitze des Proboscis nachgewiesen (Haverkamp et al., 2016) und mittels der Verhaltenstests konnte bewiesen werden, dass die Motte in der Lage ist, die Düfte Benzylaceton und Nikotin ab einer bestimmten Konzentration mit Ihrem Proboscis aufzuspüren. Benzylaceton dient als Hauptkomponente in der Blüte primär als Locksignal für potentielle Bestäuber (Kessler and Baldwin, 2007; D. Kessler et al., 2015). Die Wahrnehmung von Benzylaceton, mit Hilfe des Proboscis, ist demnach essentiell für die Motte, um zwischen einzelnen Blüten zu unterscheiden und um zu der richtigen Pflanze und dem bevorzugten Nektar zu gelangen. Im Nektar konnte Nikotin als ein Hauptbestandteil festgestellt werden (Kessler and Baldwin, 2007) und lieferte bei den Ergebnissen positive Werte hinsichtlich der Attraktivität des Duftes.

Bei Untersuchungen mit Bienen und Hummeln wurde die Wirkung synthetisch hergestellter Neonikotinoide untersucht. Dabei binden diese Insektizide, wie das

natürlich vorkommende Nikotin, an die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren im Nervensystem und stören die Reizweiterleitung der Nerven. Bei den Experimenten konnte festgestellt werden, dass die Insekten Neonikotinoide bevorzugen, obwohl diese eigentlich eine abschreckende Wirkung haben sollten (S. C. Kessler et al., 2015). Demzufolge könnten Neonikotinoide eine ähnliche Wirkung wie Nikotin haben und als Droge wirken. Die mit diesen Wirkstoffen enthaltene Nahrung könnte eine belohnende Wirkung auf die Insekten haben. Zusätzlich zu der berauschenden Wirkung konnten sowohl bei Bienen als auch bei Hummeln Veränderungen im Wachstum und bei der Fortpflanzung festgestellt werden (Rundlöf et al., 2015). Bei Bienen führt es zudem zu Beeinträchtigungen des Lernvermögens und der Orientierung (Fischer et al., 2014). Bei den Experimenten dieser Arbeit konnte bei *M. sexta*, wie auch bei Bienen und Hummeln, ebenfalls eine Bevorzugung des Duftes Nikotin vernommen werden, was sich auf eine ähnliche Wirkung zurückzuführen lässt. Ob es durch die Aufnahme von Nikotin ebenfalls zu Veränderungen wie Wachstum, bei der Fortpflanzung oder dem Lernverhalten kommt, müssen weitere Studien untersuchen. Allerdings ist es möglich, dass das Nikotin bei *M. sexta* keine Auswirkungen aufweist, da der Organismus schon seit dem Larvenstadium an das Alkaloid angepasst ist und einen Mechanismus entwickelt hat, um das schädliche Nervengift abzubauen und wirkungslos zu machen.

Um ein eindeutiges Lernverhalten der Motten zu untersuchen, müsste man den Versuchsaufbau so ändern, dass es den Versuchstieren möglich wäre, sich nach der ersten Wahl nochmal um zu entscheiden. Die hier durchgeführten Verhaltensexperimente wurden mit einem speziellen Y-maze durchgeführt, bei dem die zwei Arme getrennt sind. Dadurch war es nicht möglich, die eigentliche Wahl der Motten komplett nachzuverfolgen. Sobald sich die Motte für einen Arm entschieden hatte, konnte sie nicht mehr zu dem anderen Arm wechseln. Durch einen anderen Versuchsaufbau, bei dem die Versuchstiere auch im fortlaufenden Experiment noch die Möglichkeit besitzen, sich anders zu entscheiden, könnte man die verursachte Ungenauigkeit in den aktuellen Ergebnissen beheben und ein mögliches Lernverhalten aufzeigen.

Die Duftorientierung der Motte lässt sich sehr gut mit anderen Insekten wie z.B. der Biene vergleichen, da sie beide über paarige Geruchsorgane verfügen. Bei Bienen beruht die Duftorientierung auf der Osmotropotaxis, also der



reizsymmetrischen Einstellung im Duftfeld. Dabei werden die unterschiedlichen Duftkonzentrationen von den paarigen Geruchsorganen, den Antennen aufgenommen, verglichen und so die Biene zu der bevorzugten Blüte und dem Nektar geleitet (Lindauer and Martin, 1963). Bei *Manduca* stehen die paarigen Antennen, im Vergleich zu Bienen, viel weiter vom restlichen Körper weg, was zu einer geringeren räumlichen Auflösung führt. Zudem sind die Antennen von Motten für das Gleichgewicht halten während des Fluges essentiell (Sane et al., 2007). Eine Folge davon kann sein, dass *Manduca* potentielle Blüten schwerer lokalisieren kann. Bienen können dagegen, vor allem auch wegen ihrer kleineren Körpergröße und ihrer größeren Beweglichkeit, spezielle Blüten in einem Duftfeld flexibler ansteuern.

Anhand der morphologischen Untersuchungen konnte eine Verbindung der Maxillarnerven des Proboscis zum Antennallobus nicht nachgewiesen werden. Die Färbungen der einzelnen Nerven führen lediglich zum SOG, verzweigen sich dort und enden auch in dieser Region. Da diese Region noch weitestgehend unerforscht und bei *Manduca* wenig spezifiziert ist, wäre es in Zukunft von Bedeutung, diese näher zu benennen. Vor allem die zum Teil symmetrischen zirkulären Strukturen die schon bei den aktuellen Ergebnissen beobachtet werden konnten, könnten unter anderem bei einer größeren Auflösung näher spezifiziert werden. Ebenso sollte die Verbindung der Maxillarnerven zu höheren Gehirnstrukturen weiterhin untersucht werden um somit die weitere Informationsverarbeitung detaillierter zu erklären.

Bei den Experimenten könnte die Inkubationszeit der Färbung mit Tetramethylrhodamin nicht ausreichend gewesen sein, sodass sich der Farbstoff in den einzelnen Neuronen nicht weit genug ausbreiten konnte. Zudem ist Tetramethylrhodamin ein sehr lichtempfindlicher Stoff, der durch die verschiedenen Bearbeitungs- und Waschvorgänge an Farbintensität verloren haben könnte. Denkbar wäre auch, dass sich die Neuronen so sehr verzweigen und immer feiner werden, dass die Moleküle des Farbstoffs nicht in die feinen Strukturen vordringen konnten. Durch Verwendung anderer Farbstoffe wie z.B. Lucifer Yellow könnte möglicherweise ein besseres Ergebnis der feinen Nervenstränge erzielt werden. Zudem könnte durch verschiedene Inkubationszeiten des Farbstoffes ein genaueres Ergebnis erreicht werden. Bei der Immunhistochemie konnten mit Hilfe der Antikörper kein zufriedenstellendes

Ergebnis erzielt werden. Zum einen könnte die gewählte Inkubationszeit der Antikörper womöglich zu kurz gewesen sein oder die Waschvorgänge könnten zur Abschwächung beigetragen haben. Bei der Lucifer Yellow Färbung könnte es ebenso durch ähnliche Ursachen zu einem mangelnden Ergebnis gekommen sein.

Ebenso besteht die Möglichkeit, dass es keine direkte Verbindung zu anderen Strukturen wie den Antennalloben oder den AMMCs gibt. Allerdings könnte es eine Verbindung mittels Interneuronen geben, welche wie in der Honigbiene, vom Proboscis bis in Neurophile des Gehirns, wie den Glomeruli, der Antennalloben, dem lateralen Protocerebrum und dem Pilzkörper reicht (Hammer, 1993). Bei der Motte *Heliothis virescens* konnten sowohl antennale Axone, die sich im AMMC verzweigen und bis zum SOG reichen, wie auch gustatorische Rezeptorneurone des Proboscis die zum SOG projizieren, nachgewiesen werden (Jørgensen et al., 2006). Des Weiteren konnten bei Mosquitos olfaktorische Rezeptorneurone, die sich in sensorischen Haaren in der Spitze des Stiletts, einem durchstechenden Mundwerkzeug, befinden, identifiziert werden. Sie spielen bei der Suche der passenden Wirtstiere und der Lokalisation der Blutgefäße eine wichtige Rolle und projizieren ihre Axone zu zwei getrennten Glomeruli in den Antennalloben. Ebenso konnten neuronale Bahnen vom SOG zum AL beobachtet werden (Jung et al., 2015). Aufgrund dieser Erkenntnisse bei anderen Insekten ist es ebenso vorstellbar, dass es ähnliche Verbindungen bei *M. sexta* zu höheren Hirnarealen gibt.

## 5.1 Ausblick

Zum einen könnte durch weitere Verhaltenstests Präferenzkurven, mit unterschiedlichen Duftkonzentrationen von Nikotin und Benzylaceton, erstellt werden, um die Schwelle der noch wahrnehmbaren und signifikant unterscheidbaren Konzentrationen ermitteln zu können. Ebenso könnten die Duftstoffe mit einer Zuckerlösung vermischt werden, um so die Wirkung der gustatorischen Präferenz für den Nektar festzustellen.

Bei weiteren morphologischen Tests könnten Detailaufnahmen von den Enden der angefärbten Maxillarneven hilfreich sein, um festzustellen ob diese wirklich im SOG enden oder noch weiter in höhere Areale reichen. Falls letzteres eintreten sollte, könnte gegebenenfalls mit anderen Farbstoffen versucht werden, feinere Strukturen nachzuweisen.

Neben Verhaltenstests und morphologischen Untersuchungen sind physiologische und molekulare Experimente ebenso von Bedeutung und sollten miteinander in Zusammenhang gestellt werden, um die Fragen der olfaktorischen Reizweiterleitung und der chemischen Kommunikation genauer zu klären. Ebenso ist es wichtig, die Erkenntnisse mit den ökologischen Aspekten und der Evolutionsgeschichte der jeweiligen Arten mit zu berücksichtigen.

## A Literaturverzeichnis

- Davis, N.T., Hildebrand, J.G., 2006. Neuroanatomy of the sucking pump of the moth, *Manduca sexta* (Sphingidae, Lepidoptera). *Arthropod Struct. Dev.* 35, 15–33. doi:10.1016/j.asd.2005.07.001
- Fahrbach, S.E., 2006. Structure of the Mushroom Bodies of the Insect Brain. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 209–232. doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.150954
- Fischer, J., Müller, T., Spatz, A.K., Greggers, U., Grünewald, B., Menzel, R., 2014. Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *PLoS One* 9, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0091364
- Goyret, J., Raguso, R.A., 2006. The role of mechanosensory input in flower handling efficiency and learning by *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 209, 1585–1593. doi:10.1242/jeb.02169
- Grosse-Wilde, E., Kuebler, L.S., Bucks, S., Vogel, H., Wicher, D., Hansson, B.S., 2011. Antennal transcriptome of *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7449–7454. doi:10.1073/pnas.1017963108
- Guerenstein, P.G., Christensen, T.A., Hildebrand, J.G., 2004. Sensory processing of ambient CO<sub>2</sub> information in the brain of the moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 190, 707–725. doi:10.1007/s00359-004-0529-0
- Hammer, M., 1993. An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366, 59–63. doi:10.1038/366059a0
- Hansson, B.S., Stensmyr, M.C., 2011. Evolution of insect olfaction. *Neuron* 72, 698–711. doi:10.1016/j.neuron.2011.11.003
- Haverkamp, A., Bing, J., Badeke, E., Hansson, B.S., Knaden, M., 2016a. Innate olfactory preferences for flowers matching proboscis length ensure optimal energy gain in a hawkmoth. *Nat. Commun.* 7, 11644. doi:10.1038/ncomms11644
- Haverkamp, A., Yon, F., Keeseey, I.W., Mißbach, C., Koenig, C., Hansson, B.S., Baldwin, I.T., Knaden, M., Kessler, D., 2016b. Hawkmoths evaluate scenting

- flowers with the tip of their proboscis. *Elife* 5. doi:10.7554/eLife.15039
- Hildebrand, J.G., Shepherd, G.M., 1997. MECHANISMS OF OLFACTORY DISCRIMINATION : Converging Evidence for Common Principles Across Phyla 595–631. doi:10.1146/annurev.neuro.20.1.595
- Homberg, U., 1989. Structure And Function Of The Deutocerebrum In Insects. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 477–501. doi:10.1146/annurev.ento.34.1.477
- Homberg, U., Hildebrand, J.G., 1989. Serotonin-immunoreactive neurons in the median protocerebrum and suboesophageal ganglion of the sphinx moth *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.* 258, 1–24. doi:10.1007/BF00223139
- Homberg, U., Kingan, T.G., Hildebrand, J.G., 1987. Immunocytochemistry of GABA in the brain and suboesophageal ganglion of *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.* 248, 1–24. doi:10.1007/BF01239957
- Ito, K., Shinomiya, K., Ito, M., Armstrong, J.D., Boyan, G., Hartenstein, V., Harzsch, S., Heisenberg, M., Homberg, U., Jenett, A., Keshishian, H., Restifo, L.L., Rössler, W., Simpson, J.H., Strausfeld, N.J., Strauss, R., Vosshall, L.B., 2014. A systematic nomenclature for the insect brain. *Neuron* 81, 755–765. doi:10.1016/j.neuron.2013.12.017
- Jørgensen, K., Kvello, P., Almaas, T.J., Mustaparta, H., 2006. Two closely located areas in the suboesophageal ganglion and the tritocerebrum receive projections of gustatory receptor neurons located on the antennae and the proboscis in the moth *Heliothis virescens*. *J. Comp. Neurol.* 496, 121–134. doi:10.1002/cne.20908
- Jung, J.W., Baeck, S.-J., Perumalsamy, H., Hansson, B.S., Ahn, Y.-J., Kwon, H.W., 2015. A novel olfactory pathway is essential for fast and efficient blood-feeding in mosquitoes. *Sci. Rep.* 5, 13444. doi:10.1038/srep13444
- Kessler, D., Baldwin, I.T., 2007a. Making sense of nectar scents: The effects of nectar secondary metabolites on floral visitors of *Nicotiana attenuata*. *Plant J.* 49, 840–854. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02995.x
- Kessler, D., Baldwin, I.T., 2007b. Making sense of nectar scents: the effects of nectar secondary metabolites on floral visitors of *Nicotiana attenuata*. *Plant J.* 49, 840–54. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02995.x

- Kessler, D., Bhattacharya, S., Diezel, C., Rothe, E., Gase, K., Schöttner, M., Baldwin, I.T., 2012. Unpredictability of nectar nicotine promotes outcrossing by hummingbirds in *Nicotiana attenuata*. *Plant J.* 71, 529–538.  
doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05008.x
- Kessler, D., Gase, K., Baldwin, I.T., 2008. Field experiments with transformed plants reveal the sense of floral scents. *Science* 321, 1200–1202.  
doi:10.1126/science.1160072
- Kessler, D., Kallenbach, M., Diezel, C., Rothe, E., Murdock, M., Baldwin, I.T., 2015. How scent and nectar influence floral antagonists and mutualists. *Elife* 4, 1–16. doi:10.7554/eLife.07641
- Kessler, S.C., Tiedeken, E.J., Simcock, K.L., Derveau, S., Mitchell, J., Softley, S., Stout, J.C., Wright, G. a., 2015. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature* 521, 74–76. doi:10.1038/nature14414
- Klagges, B.R.E., Heimbeck, G., Reifegerste, R., Reisch, D., Godenschwege, T.A., Buchner, S., Hofbauer, A., Buchner, E., 1996. Invertebrate Synapsins : A Single Gene Codes for Several Isoforms in *Drosophila* 16, 3154–3165.
- Koenig, C., Hirsh, A., Bucks, S., Klinner, C., Vogel, H., Shukla, A., Mansfield, J.H., Morton, B., Hansson, B.S., Grosse-Wilde, E., 2015. A reference gene set for chemosensory receptor genes of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 66, 51–63. doi:10.1016/j.ibmb.2015.09.007
- Kumar, P., Rathi, P., Schöttner, M., Baldwin, I.T., Pandit, S., 2014. Differences in nicotine metabolism of two *Nicotiana attenuata* herbivores render them differentially susceptible to a common native predator. *PLoS One* 9, 1–10.  
doi:10.1371/journal.pone.0095982
- Kvello, P., Jørgensen, K., Mustaparta, H., 2010. Central gustatory neurons integrate taste quality information from four appendages in the moth *Heliothis virescens*. *J. Neurophysiol.* 103, 2965–2981.  
doi:10.1152/jn.00985.2009
- Larsson, M.C., Domingos, A.I., Jones, W.D., Chiappe, M.E., Amrein, H., Vosshall, L.B., 2004. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* 43, 703–714.  
doi:10.1016/j.neuron.2004.08.019

- Martin, J.P., Beyerlein, A., Dacks, A.M., Reisenman, C.E., Riffell, J. a, Lei, H., Hildebrand, J.G., 2011. The neurobiology of insect olfaction: sensory processing in a comparative context. *Prog. Neurobiol.* 95, 427–47. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.09.007
- Maxwell, G.D., Tait, J.F., Hildebrand, J.G., 1978. Regional synthesis of neurotransmitter candidates in the CNS of the moth *Manduca sexta*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp.* 61, 109–119. doi:10.1016/0306-4492(78)90120-X
- Mitchell, B.K., Itagaki, H., Rivet, M.P., 1999. Peripheral and central structure involved in insect gustation. *Microsc Res Tech* 47, 401–415.
- Montell, C., 2009. A taste of the *Drosophila* gustatory receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 345–353. doi:10.1016/j.conb.2009.07.001
- Ni, L., Bronk, P., Chang, E.C., Lowell, A.M., Flam, J.O., Panzano, V.C., Theobald, D.L., Griffith, L.C., Garrity, P.A., 2013. A gustatory receptor paralogue controls rapid warmth avoidance in *Drosophila*. *Nature* 500, 580–584. doi:10.1038/nature12390
- O'Donnell, S., Donlan, N.A., Jones, T.A., 2004. Mushroom body structural change is associated with division of labor in eusocial wasp workers (*Polybia aequatorialis*, Hymenoptera: Vespidae). *Neurosci. Lett.* 356, 159–162. doi:10.1016/j.neulet.2003.11.053
- Raguso, R.A., Levin, R.A., Foose, S.E., Holmberg, M.W., McDade, L.A., 2003. Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination “syndromes” in *Nicotiana*. *Phytochemistry* 63, 265–284. doi:10.1016/S0031-9422(03)00113-4
- Riffell, J.A., Shlizerman, E., Sanders, E., Abrell, L., Medina, B., Hinterwirth, A.J., Kutz, J.N., 2014. Flower discrimination by pollinators in a dynamic chemical environment. *Science (80- )*. 344, 1515–8. doi:10.1126/science.1251041
- Rundlöf, M., Andersson, G.K.S., Bommarco, R., Fries, I., Hederström, V., Herbertsson, L., Jonsson, O., Klatt, B.K., Pedersen, T.R., Yourstone, J., Smith, H.G., 2015. Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature* 521, 77–80. doi:10.1038/nature14420

- Sane, S.P., Dieudonné, A., Willis, M. a, Daniel, T.L., 2007. Flight Control in Moths. *Science* (80-. ). 315, 863–866. doi:10.1126/science.1133598
- Steinbrecht, R.A., 1997. Pores structures in insect olfactory sensilla: A review of data and concepts. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 26, 229–245. doi:10.1016/S0020-7322(97)00024-X
- Steppuhn, A., Gase, K., Krock, B., Halitschke, R., Baldwin, I.T., 2004. Nicotine's defensive function in nature. *PLoS Biol.* 2. doi:10.1371/journal.pbio.0020217
- Stöckl, A., Heinze, S., Charalabidis, A., el Jundi, B., Warrant, E.J., Kelber, A., 2016. Differential investment in visual and olfactory brain areas reflects behavioural choices in hawk moths. *Sci. Rep.* 6:26041, 1–10. doi:10.1038/srep26041
- Strutz, A., Soelter, J., Baschwitz, A., Farhan, A., Grabe, V., Rybak, J., Knaden, M., Schmucker, M., Hansson, B.S., Sachse, S., 2014. Decoding odor quality and intensity in the *Drosophila* brain. *Elife* 3, e04147. doi:10.7554/eLife.04147
- Thorpe, K.W., Barbosa, P., 1986. Effects of consumption of high and low nicotine tobacco by *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) on survival of gregarious endoparasitoid *Cotesia congregata* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Chem. Ecol.* 12, 1329–1337. doi:10.1007/BF01012352
- Tiedeken, E.J., Stout, J.C., Stevenson, P.C., Wright, G. a, 2014. Bumblebees are not deterred by ecologically relevant concentrations of nectar toxins. *J. Exp. Biol.* 1620–1625. doi:10.1242/jeb.097543
- Vogt, R.G., Riddiford, L.M., 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature.* doi:10.1038/293161a0
- Vosshall, L.B., Wong, a M., Axel, R., 2000. An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 102, 147–59. doi:10.1016/S0092-8674(00)00021-0
- Willis, M.A., Ford, E.A., Avondet, J.L., 2013. Odor tracking flight of male *Manduca sexta* moths along plumes of different cross-sectional area. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 199, 1015–1036. doi:10.1007/s00359-013-0856-0
- Winz, R. a, Baldwin, I.T., 2001. Molecular interactions between the specialist



herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. IV. Insect-Induced ethylene reduces jasmonate-induced nicotine accumulation by regulating putrescine N-methyltransfer. *Plant Physiol.* 125, 2189–202. doi:10.1104/pp.125.4.2189

## **B Danksagung**

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Bill S. Hansson der es mir ermöglicht hat meine Bachelorarbeit am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena zu schreiben.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Markus Knaden, in dessen Abteilung ich die Arbeit über *Manduca sexta* schreiben konnte.

Mein besonderer Dank gilt Alexander Haverkamp, für seine Unterstützung bei den Experimenten und die hilfreiche Betreuung meiner Arbeit.

## **C Selbstständigkeitserklärung**

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig ausgeführt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn entsprechend aus anderen Arbeiten übernommen wurden, sind mit Quellenangabe als Zitat kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde in dieser oder veränderter Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Jena, den 01.10.2016

---

Tamara Spingler