

Diplomarbeit

Pflanzliche Abwehr gegen Blattschneider-
ameisen:

Auswirkungen von Herbivorie-induzierten
Pflanzenvolatilen auf Nahrungswahl und
Pilzwachstum von *Atta colombica*

Angefertigt im Fachbereich Biologie der Technischen
Universität in Kaiserslautern, Abteilung Pflanzenökologie
und Systematik

vorgelegt von Nicole Bischof
im Februar 2012

Dank

Mein Dank gilt vor allem meinen beiden Betreuern Dr. Rainer Wirth (Abteilung Pflanzenökologie und Systematik; TU Kaiserslautern) und Dr. Christian Kost (MPI Chemische Ökologie; Jena) für ihre Unterstützung, ihre vielen Anregungen und Verbesserungsvorschläge, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Bei Prof. Dr. Burkhard Büdel und seiner Abteilung Pflanzenökologie und Systematik möchte ich mich für die freundliche Aufnahme und die Möglichkeit der Erarbeitung der vorliegenden Untersuchung bedanken. Speziell möchte ich mich bei Hans Reichenberger und Beatrix Weber für die zahlreichen praktischen Tipps und vielen Hilfeleistungen, und bei Natalie Kunz für ihre unermüdliche Hilfe bei der Bewältigung der Statistik bedanken.

Dem Team des botanischen Gartens, besonders Ralf Pennther-Hager und Janka Bodenschatz, gilt mein Dank für die erfolgreiche Kultivierung und Pflege der Lima-
bohnen.

Den Tierpflegerinnen aus dem Tierhaus danke ich für die Pflege der Blattschneiderameisen und die zahlreichen Tipps.

Meiner Freundin Miriam Anders möchte ich für ihre wichtigen sprachlichen Korrekturhilfen danken.

Bei meinem Vater Klaus Bischof bedanke ich mich für die Unterstützung, im Geiste und den Finanzen, und meiner Schwester Melanie Bischof möchte ich für ihre liebevolle Unterstützung und Hilfe danken.

Mein besonderer Dank geht an meinen Ehemann Jochen Bischof, der mich in allen möglichen Lebenslagen geduldig unterstützte, mit viel Verständnis und Zuneigung.

In Gedenken an meine verstorbene Mutter Dagmar Bischof.

Inhaltsverzeichnis

Dank.....	i
Abkürzungsverzeichnis.....	iv
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	2
1.1 Anpassungsmöglichkeiten gegenüber Herbivoren.....	4
1.2 <i>Phaseolus lunatus</i> : Modellorganismus für die induzierte pflanzliche Abwehr.....	8
1.3 <i>Atta colombica</i> : Dominante Megaherbivoren der Neotropen.....	11
1.4 Auswirkungen pflanzlicher Abwehr auf den Mutualismus von Blattschneiderameisen und ihrem Pilz.....	15
1.5 Ziele, Hypothesen und Design der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Protagonist <i>Atta colombica</i> : Haltung der Laborkolonien.....	22
2.2 Protagonist <i>Phaseolus lunatus</i> : Kultivierung.....	24
2.3 Versuch 1: Präferenztests zur Nahrungswahl naiver BSA-Kolonien gegenüber HIPV-induzierten Limabohnen.....	25
2.3.1 Aufbau und Durchführung.....	25
2.4 Versuch 2: Wirkung von Herbivorie induzierten Pflanzenvolatilen auf das Wachstum von Pilzgärten <i>in situ</i>	28
2.4.1 Etablierung von Subkolonien.....	29
2.4.2 Behandlung der Pilzgärten mit HIPV-Paste.....	31
2.5 Versuch 3: Messungen des Duftstoffgehalts von HIPV-induzierten Blattfragmenten (<i>Phaseolus lunatus</i>) und HIPV-versetzter Lanolin-Paste (100µl).....	36
2.5.1 Aufbau und Durchführung.....	36
2.6 Auswertung und Statistik.....	39
3 Ergebnisse.....	42
3.1 Furagierverhalten von naiven Kolonien gegenüber induzierten Limabohnen.....	42
3.2 Versuch 2: Auswirkungen von HIPVs auf Pilzgärten <i>in situ</i>	44
3.2.1 HIPV-Behandlung der Subkolonien mit einer Konzentration von 2 ml.....	44

3.2.2	HIPV-Behandlung der Subkolonien mit einer Konzentration von 100 µl.....	49
3.2.3	HIPV-Behandlung der Subkolonien mit einer Konzentration von 500 µl.....	52
3.3	Versuch 3: Duftstoffemission der verwendeten HIPV-Paste (100µl) und der induzierten Blattfragmente von <i>Phaseolus lunatus</i>	59
4	Diskussion.....	63
4.1	Bleiben naive BSA-Kolonien neutral?	63
4.2	Pflanzliche Schädigung einer mutualistischen Lebensgemeinschaft.....	65
4.3	Aufschluss der Duftspektren von HIPV-Paste und induzierten Blattfragmenten (<i>Phaseolus lunatus</i>)	71
5	Literaturverzeichnis	73
6	Anhang.....	82
6.1	Massenspektren der emittierten Duftstoffe der Limabohne (<i>P. lunatus</i>).....	82
6.2	Exemplarisch Massenspektren der gemessenen emittierten Duftstoffe	84

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. colombica</i>	-	<i>Atta colombica</i>
BCI	-	Barro Colorado Island
BSA	-	Blattschneiderameisen
DMNT	-	Dimethylnonatrien
GC	-	Gas-Chromatographen
GLVs	-	green leaf volatiles (grüne Blattduftstoffe)
HIPV	-	Herbivorie-induzierte Pflanzenvolatile
JA	-	Jasmonsäure
<i>L. gongylophorus</i>	-	<i>Leucocoprinus gongylophorus</i>
LOX	-	Lipoxygenase
MPI	-	Max-Planck-Institut
MS	-	Massenspektrometer
OPDA	-	12-Oxophytodiensäure
<i>P. lunatus</i>	-	<i>Phaseolus lunatus</i>
PL	-	Phospholipase A2
TMTT	-	Trimethyltridecatetraen
VOCs	-	volatile organic compound (flüchtige organische Verbindung)

Zusammenfassung

Die hier durchgeführte Untersuchung beschäftigte sich zum einen mit der Nahrungspflanzenwahl und Selektivität der Blattschneiderameisenart *Atta colombica* und zum anderen mit den Auswirkungen der herbivorieinduzierten Pflanzenvolatile der Lima-bohne (*Phaseolus lunatus*) auf den Pilz-Ameisen-Mutualismus. Zusätzlich wurden noch ergänzende Duftstoffmessungen mit der angewendeten HIPV-Paste und induzierten Blattfragmenten von *P. lunatus* durchgeführt. Mit dieser Untersuchung soll überprüft werden, ob die bisherigen Beobachtungen in Bezug auf die Futtersuchökologie der BSA (Cherrett, 1968; Fowler & Stiles, 1980; Kost, 2006) in Einklang gebracht werden können mit der „induced-defense“ Hypothese (Kost, *et al.*, 2011).

Im Gegensatz zu Vorgängerstudien (Tremmel, 2008; Aigner, 2007) wurde bei der vorliegenden Studie ein insgesamt indifferentes Furagierverhalten gegenüber den angebotenen JA-induzierten und Kontroll-Limabohnen nachgewiesen. Dennoch konnte eine nicht signifikante Bevorzugung von JA-induzierten Limabohnen durch die BSA festgestellt werden.

Bei der gewählten Methode der Applikation der HIPVs in etablierte Subkolonien fielen ab einer Konzentration von 500 µl negative Auswirkungen auf Wachstum und Vitalität der Pilzgärten auf, während bei vergleichbaren Studien dies schon bei 100 µl der Fall war (Stephan, 2010).

Die Ergebnisse der Duftmessungen wiesen keine eindeutige Ähnlichkeit der von HIPV-versetzter Lanolin-Paste (100 µl) und den ausgestanzten Lima-Bohnen-Blattfragmenten emittierten Duftstoffe in Menge und Konzentration auf. Dabei weichen Inhaltsstoffe und -konzentrationen der Blattfragmente von der Studie von Kost und Heil (2006) ab. Unklar ist, ob dies an einem Maskierungseffekt liegt, oder ob zwischen verschiedenen Lima-Bohnen eine Variabilität von emittierten Duftstoffen vorliegt.

1 Einleitung

Bei der Phytophagie (Lehre über den „Fraß an Pflanzen“) handelt es sich um die vollständige Erfassung aller möglichen trophischen Interaktionen zwischen Pflanzen und Tieren. Die Konsumenten der pflanzlichen Reproduktionsprodukte, wie Samen, Früchte, Nektar und Pollen werden als phytophag bezeichnet. Eine wichtige Gruppe der Phytophagen stellen die Herbivoren dar, die sich aus Blatt-, Stängel- und Wurzelfressern, wie auch Pflanzensaftsaugern, Minierern und Gallenbildnern zusammensetzen. Die Herbivorie bildet für sich alleine ein weitreichendes und diffuses Netzwerk der Flora und Fauna aus. Schulze *et al.* (2002) sehen in der die Herbivorie „eines der besonders komplexen Interaktionsfelder zwischen Pflanzen und Tieren“. Zusätzlich kann sie als ökologischer Schlüsselprozesse für terrestrische und aquatische Ökosysteme gelten (Abril, 2011). Die trophischen Interaktionen der Herbivoren können den vorhandenen Artenreichtum und die Phytozönose selbst stark beeinflussen (Hulme, 1996; Bigger & Marvier, 1998). Zahlreiche Theorien und Modelle sollen die komplexen Beziehungen innerhalb der unterschiedlichen Ökosysteme erklären. Als Beispiel sei hier das Konzept der bottom-up-Kontrolle der Herbivoren von White (1978,1993) genannt. Allerdings können die meisten Modelle nur einen gewissen Teil des natürlichen Ökosystems erfassen oder lassen sich nur auf ein spezifisches Ökosystem beziehen. Die Abwehrmöglichkeiten (Kap. 1.1) von Pflanzen gegenüber Herbivorie und der Modellorganismus Limabohne (*Phaseolus lunatus*) (Kap. 1.2) sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

Eine Schlüsselrolle innerhalb der trophischen Interaktionen nehmen phytophage Insekten ein. Die mannigfaltigen Anpassungen zwischen insektoiden Herbivoren und ihren Futterpflanzen sind über Millionen Jahren evolviert und beeinflussen heute die Organisation der Ökosysteme maßgeblich (Crawley, 1983; Zwölfer, 1987). Vor allem in den Tropen werden schätzungsweise mehr als 75 Prozent des Blattbestandes durch schneidende und kauende Insekten konsumiert (Coley & Barone, 1996). Eine polyphage und dominante Schlüsselart der Insekten in den Neotropen stellen die Blattschneiderameisen (BSA) dar (Fowler *et al.* 1989). Von Wirth *et al.* (2003) und Meyer (2008) werden sie auch als Ökosystem-Ingenieure bezeichnet, was Sinnbild für ihre entscheidenden trophischen Einwirkungen innerhalb der Biozönose ist.

Innerhalb ihres Futtersuchareals mit einer Größe von ca. zwei Hektar können die BSA ca. 50 - 80 Prozent der vorkommenden Pflanzenarten beernten und somit bis zu 12,5 Prozent der vorhandenen Blattmasse eintragen (Wirth *et al.* 2003). Wenn die Nester in der Nähe von Waldrändern mit anliegenden agrarwirtschaftlich genutzten Flächen auftreten, dehnen die BSA oft ihre Futtersuche auf die angebauten Nutzpflanzen aus. Die angerichteten Schäden durch den BSA-Fraß auf den anthropogenen Nutzungsflächen belaufen sich jährlich auf Millionen (Hölldobler & Wilson, 1990). Bei der Beobachtung ihres Futtersuchverhaltens lassen sich nur schwer zu erklärende Beobachtungen machen. Beispielsweise konnte festgestellt werden, dass furagierende (auf Futtersuche befindliche) BSA-Arbeiterinnen die Kronen der von ihnen aufgesuchten Bäume meist nur zu einem Drittel beernteten (Cherrett, 1968; Fowler & Stiles, 1980; Kost, 2006). Die Futtersuchökologie der in dieser Arbeit untersuchten Art wird in Kapitel 1.3 ausführlich vorgestellt.

Die in dieser Arbeit untersuchten Zusammenhänge zwischen der induzierten Abwehr von *P. lunatus* und dem Futtersuchverhalten der BSA *Atta colombica* werden in Kapitel 1.4 aufgeführt.

1.1 Anpassungsmöglichkeiten gegenüber Herbivoren

Für Pflanzen bedeutet Herbivorie oft einen Fitnessverlust. Beispielsweise konnte von Louda (1984) nachgewiesen werden, dass das in den Rocky Mountains einheimische Schaumkraut (*Cardamine cordifolia*, Brassicaceae) ein geringeres Wachstum und eine geminderte Samenproduktion aufwies, wenn seine Blattfläche durch Blattkäfer (*Chrysomelidae*) um 25 Prozent reduziert wurde. Im Gegensatz zu der Annahme, dass Herbivorie immer einen Fitnessverlust für die Pflanze bedeutet, steht die Möglichkeit der Kompensation, sogar einer Überkompensation von Herbivorieschäden, wenn die entsprechenden Bedingungen für die Pflanzen gegeben sind. Bei einem geringen Konkurrenzdruck, einer Ressourcenfülle und innerhalb eines frühen Entwicklungsstadiums sind Pflanzen wie *Sanicula arctopoides* (Apiaceae) dazu in der Lage, eine Reduzierung ihres Doldenbestandes um ein Drittel zu kompensieren (Lowenberg, 1994).

Eine alternative Strategie gegenüber Herbivorie ist die Investierung in effektive Abwehrmechanismen. Eine konstitutive Anpassungsmaßnahme besteht in der Entwicklung eines mechanischen Schutzes, wie z.B. Dornen, Trichome oder Wachse. Pillemer und Tingey (1976) konnten feststellen, dass die Effektivität von Trichomen gegenüber Zikaden (*Empoasca fabae*) auf den Blattflächen der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) durch eine gesteigerte Anzahl (Optimum bei ca. 2000 Trichomen / cm²) zunimmt. Dagegen boten die Brennhaare von *Urtica dioica* (Brennnessel) und *Laportea canadensis* (Waldnessel) unabhängig von ihrer Dichte keinerlei Schutz gegenüber mit Chitin gepanzerten Käfern und Heuschrecken, oder den durch Schleim geschützten Schnecken (Tuberville, *et al.*, 1996). Somit stellen mechanische Barrieren je nach Form, Dichte und Größe nur gegenüber einer bestimmten Gruppe von Fressfeinden einen effektiven Schutz dar. Investiert die Pflanze nicht in eigene Abwehrmechanismen, sondern stattdessen in eine symbiotische Beziehung mit einem Konkurrent des Schädling, so kann sie diesen Nachteil vermeiden. Gegenleistungen der Pflanzen bestehen z.B. in der Anbietung eines dauerhaften Wohnsitzes oder von Nahrungsmitteln für den symbiotischen Partner. Ein bekanntes Beispiel für einen solchen Mutualismus stellen in neotropischen Gebieten die Azteca-Ameisen dar, die in den Stammhohlräumen ihres dementsprechend als „Ameisenbaum“ (*Cecropia* spp.) bezeichneten symbiotischen Partners leben. Bei den ersten Anzeichen von Blattschäden oder der Anwesenheit eines möglichen Phytophagens erfolgt die Rekrutierung eines verteidigenden

Ameisentrupps (Agrawal, 1998). Als zusätzliche Belohnung gibt der Ameisenbaum dauerhaft extrafloralen Nektar ab.

Andere Pflanzenarten investieren für ihren Schutz in sekundäre Pflanzenstoffe, die sie aus dem eigenen Stoffwechselkreislauf synthetisieren. Die drei Hauptgruppen dieser Pflanzenstoffe sind die Phenole, die Alkaloide und die Terpenoide, deren Ursprünge sich in der Kohlenhydrat-, Aminosäuren- oder Fettsynthese befinden. Weitere Substanzen können beispielsweise aus nichtproteinogenen Aminosäuren gewonnen werden. Die für die konstitutive Abwehr hergestellten Stoffe werden dauerhaft neugebildet und in den Vakuolen der Pflanzenzellen eingelagert. Swain (1979) fand heraus, dass Pflanzenmaterial mit einem Gehalt von mehr als zwei Prozent an Tanninen für die meisten Herbivoren nicht als Nahrung in Betracht gezogen wird. Der toxische Effekt entsteht wohl in der Bindungsfähigkeit dieses phenolischen Stoffes von löslichen Proteinen, aber der genaue physiologische Wirkungsmechanismus ist bisher noch ungeklärt (Hagerman & Butler, 1991). Somit besteht der Vorteil der konstitutiven Abwehr mit eingelagerten Sekundärmetaboliten darin, dass eine große Anzahl unspezialisierter Herbivoren abgewehrt wird. Monophage Spezialisten passen sich aber schnell an die ständig vorhandene Konzentration der Sekundärmetabolite an. Andere Spezialisten können die für sie eigentlich giftigen Stoffe aufnehmen und reichern sie in ihrem eigenen Organismus als Schutz vor Prädatoren an. Zu diesen speziell angepassten Nutznießern gehören die Raupen des Monarchenfalters (*Danaidae*). Sie ernähren sich überwiegend von Seidenpflanzengewächsen (*Asclepiadaceae*) und nehmen dabei Terpenoide auf, die sie vor Fraßfeinden schützen (Brower *et al.* 1968; Reichstein *et al.* 1968).

Eine nicht mit dauerhaften Energiekosten versehene Form des Schutzes ist für manche Pflanzen die induzierte Abwehr. Sie wird erst ausgelöst, wenn ein Teil des Pflanzenkormuses durch Herbivoren verzehrt wurde. Somit ist ein wichtiger Vorteil der induzierten Abwehr die ökonomischere Ressourcennutzung, da die Pflanzen ansonsten ihre Energie in Wachstum und Entwicklung investieren (Herms & Mattson, 1992; Bergelson & Purington, 1996).

Die Herbivorie beeinflusst also die Evolution von pflanzlichen Lebensstrategien. Dies wird auch als Trade-Off zwischen der Evolution kostspieliger pflanzlicher Abwehr und hohen Wachstumsraten bezeichnet (Heil & Bostock, 2002; Koricheva, *et al.*, 2004). Die Präferenz einer Pflanze gegenüber einer Überlebensstrategie wird hauptsächlich

durch die vorherrschenden Umweltbedingungen bestimmt. Beispielsweise hätte eine Pflanze mit sehr gut entwickelter Abwehr in einer Umgebung mit wenig Herbivorie eine geringere Fitness an diesem Standort als eine schnell wachsende Pflanze mit geringer Ressourceninvestition in Abwehr (Nentwig, *et al.*, 2004; Cornell & Hawkins, 2003; Arimura, *et al.*, 2009).

Die durch Herbivorie ausgelöste physiologische Reaktion zielt darauf ab, die Attraktivität der Pflanze bzw. des befallenen Pflanzenteils gegenüber den Herbivoren zu mindern (Karban & Myers, 1989). Dafür werden nach der Verletzung der Pflanze durch den Herbivoren Sekundärmetabolite in das Pflanzengewebe eingelagert, Pflanzenvolatile emittiert oder extrafloraler Nektar produziert. Bei einem Befall von Zitterpappeln (*Populus tremuloides*) durch mehrere verschiedene Raupenarten erhöhte sich die Konzentration an phenolischem Tremulacin und Salicortin im Gewebe der Pappeln (Clausen, *et al.*, 1989).

Die herbivorie-induzierten Pflanzenvolatile (HIPVs) bestehen aus flüchtigen organischen Verbindungen (engl. volatile organic compounds; VOCs), die als direkte Abwehrstoffe repellent auf Herbivoren wirken (Dicke & Van Loon, 2000; Heil, 2004a) oder als Lockstoffe für Prädatoren der Herbivoren (Arimura, *et al.*, 2005) dienen. Von ihrer Zusammensetzung her lassen sie sich den Terpenen, Acetogeninen und aromatischen Kohlenwasserstoff-Verbindungen zuordnen (Schulze *et al.* 2006). Die VOCs setzen sich auch aus kohlenstoffhaltigen Verbindungen zusammen, die schon bei mittleren Temperaturen (Raumtemperatur ca. 20°C) einen gasförmigen Aggregatzustand annehmen und dadurch flüchtig sind. Für die Pflanzen nehmen sie daher auch eine wichtige Bedeutung als intraspezifische Kommunikationsmittel (Kost, 2006) und für die Bestäubung der Pflanze ein (Heil, 2007). Im Gegensatz zu den HIPVs liegen die grünen Blattduftstoffe (engl. green leaf volatiles; GLVs) wahrscheinlich als Stoffwechselforstufen im Blattgewebe vor und werden nach Beschädigungen passiv freigesetzt (Heil, 2007). Dafür spricht ihre schnelle Freisetzung nach einer erfolgten Verwundung (ca. 20 Sekunden bei *Arabidopsis thaliana*; Matsui *et al.* 2000). Die Pflanzenvolatile, GLVs und HIPVs können im ökologischen Kontext als Info- oder Allelochemikalien bezeichnet werden. Dabei werden die Stoffe, die eine vorteilhafte Wirkung für den Sender haben, als Allomon bezeichnet. Wenn sie eine nachteilige Auswirkung für den Sender haben, sind sie Kairomone. Bei einer vorteilhaften Wirkung für Sender und Empfänger gelten sie als

Synomone (Arimura *et al.* 2009; Nentwig *et al.* 2004). In einigen Fällen können die verschiedenen Stoffzusammensetzungen oder einzelne Stoffe nicht eindeutig einer Wirkungsweise zugeordnet werden. Am Beispiel des Modellorganismus Limabohne (*P. lunatus*), der in dieser Studie verwendet wurde und ein bekannter Vertreter für die induzierte Abwehr ist, können die Wirkungsweisen der Allelochemikalien dargestellt werden (Kap. 1.2).

1.2 *Phaseolus lunatus*: Modellorganismus für die induzierte pflanzliche Abwehr

Die Limabohne ist eine einjährige (lianenartig) oder mehrjährige (krautige) Pflanze und kann eine Wuchshöhe von bis zu drei Metern (lianenartige Pflanzenarten) erreichen. Sie gehört der Familie der Fabaceae an und ist in den Neotropen Süd- und Mittelamerikas beheimatet, wie die BSA (Kap.1.3). Die natürlich auftretenden Herbivoren der Limabohne sind zumeist verschiedene Blattkäfer (z.B. *Cerotoma ruficornis* und *Gynandrobrotica guerreroensis*) und Spinnmilben (*Tetranychus urticae*) (Kost & Heil, 2006). In der Natur konnte noch keine trophische Interaktion zwischen den BSA und *P. lunatus* beobachtet werden.

Die Funktion der Limabohne als Modellpflanze in der chemischen Ökologie und der induzierten Abwehrmechanismen lässt sich durch ihre nachgewiesene Emission von HIPVs und der Sekretion von extrafloralem Nektar erklären (Heil, 2004a; Heil, 2004b; Kost & Heil, 2005a). Die extrafloralen Nektarien liegen paarig auf den Blattstielen der dreigeteilten Laubblätter. Die Sekretion von extrafloralem Nektar dient der Anlockung von Prädatoren und Parasitoiden der die Limabohne attackierenden Herbivoren, weshalb ihre Funktionsweise den Synomonen der Allelochemikalien zugeschrieben werden kann (Kost & Heil, 2005 a). In diesem Fall genießt die Limabohne als Sender den Vorteil der geminderten Herbivorie, da mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit die sie befallenden Fraßfeinde beseitigt werden. Der Vorteil für die Empfänger wie Ameisen, Fliegen und vor allem Wespen (Kost & Heil, 2005 a) besteht darin, dass ihre Nahrungssuche durch die Wegweisung der Lockstoffe verkürzt wird. Die hier aufgezeigte tritrophische Koevolution beweist, dass die Prädatoren die Duftsignale der Pflanze mit ihrer Beute erfolgreich in Verbindung bringen (Dicke & Van Loon, 2000).

Die HIPVs von *P. lunatus* können im Gegensatz zum Nektar auf Grund ihrer unterschiedlichen Wirkungen verschiedenen Allelochemikalien zugewiesen werden. Nach z.B. dem Befall durch Spinnmilben (*Tetranychus urticae*) werden mittels der emittierten Volatile Raubmilben (*Phytoseiulus persimilis*) angelockt (Gols, et al. 2003; Horiuchi, et al., 2003 a; De Boer, et al., 2004). Somit lassen sich die HIPVs in diesem Fall als Synomone bezeichnen. Dagegen kann die HIPV-Emission auch als direkte Abwehr gegen zwei Blattkäferarten (*Cerotoma ruficornis* und *Gynandrobrotica*) wirken und in diesem Fall als Allomone bezeichnet werden. In der Studie von Heil (2004 b) konnte festgestellt werden, dass die genannten Blattkäfer

Kontrollpflanzen gegenüber Pflanzen bevorzugten, die eine hohe Konzentration an HIPVs emittierten. Weitere Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass bei geringeren Konzentrationen an emittierten HIPVs keine Nahrungspräferenz mehr zu erkennen war. Anscheinend ist die Wirkung der HIPVs als Allomone dosisabhängig. Insgesamt können mehr als 60 verschiedene flüchtige Verbindungen von der Limabohne gebildet werden (Dicke, *et al.*, 1999). Ihre Zusammensetzung besteht aus unterschiedlichen Aldehyden, Ketonen, Alkoholen, Estern, Terpenen und stickstoffhaltigen Bestandteilen. Näher betrachtet besteht das HIPV-Spektrum der Limabohne überwiegend aus Hexenylacetat, Linalool, Ocimen, Caryophyllen, Dimethylnonatrien (DMNT) und Trimethyltridecatetraen (TMTT).

Bei der Induktion und Synthese dieser Abwehrstoffe übernimmt der Oktadekansäure-Weg eine wichtige Rolle (Dicke & Van Loon, 2000; Gols, *et al.*, 2003). Er wurde von Vick und Zimmermann (1984) an vielen anderen Pflanzenarten näher untersucht. Jasmonsäure (engl. jasmonic acid; JA) ist ein Produkt des Oktadekansäure-Weges

und funktioniert zugleich als wichtiges Signalmolekül (Creelman & Mullet, 1997). Beispielsweise regelt JA die Abgabe der HIPVs (Degenhardt & Lincoln, 2006; Reymond & Farmer, 1998) und informiert benachbarte Individuen der gleichen Art über die aufgetretenen Herbivorieschäden (Kost & Heil, 2006). Über exogene Elicitoren (z.B. Signalmoleküle im

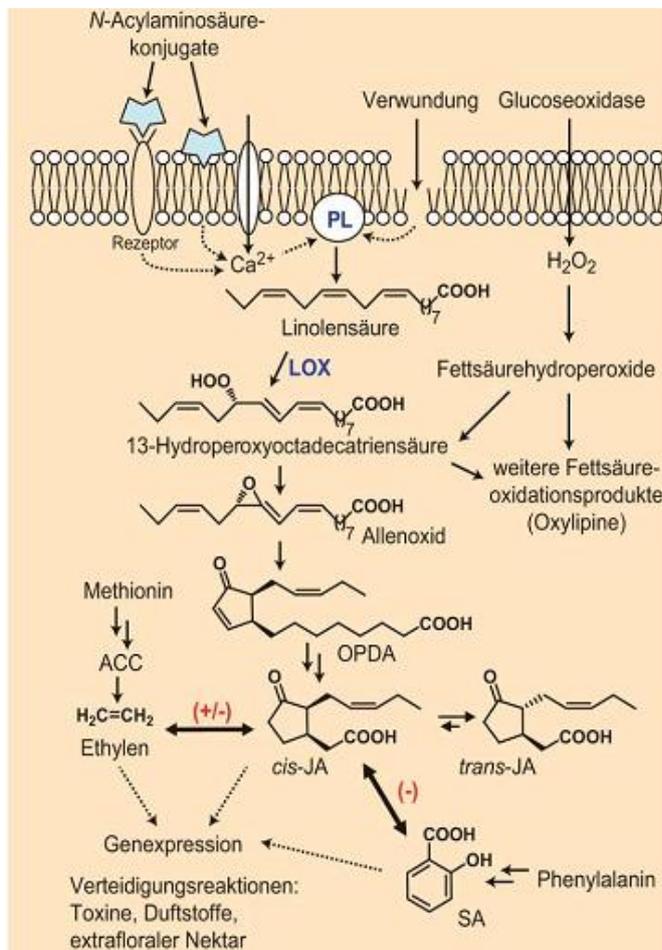


Abb. 1 Signaltransduktion für induzierte Abwehr bei Herbivorieschäden

Nach der erfolgreichen Erkennung mit Hilfe von Elicitoren eines durch Herbivoren ausgelösten Schadens des Pflanzenkormus wird der Oktadekansäure-Weg aktiviert. Als Ergebnis entsteht das wichtige Signalmolekül Methyljasmonat bzw. trans-Jasmonsäure (JA). (aus Stephan, 2010)

Speichel des Herbivoren) erkennt die Limabohne den Schaden durch den Herbivoren und induziert ihre Abwehrreaktionen (Abb. 1). Dabei bewirkt ein Einstrom an Calcium-Ionen (Ca^{2+}) in die Pflanzenzellen die Aktivierung der Phospholipase A2 (PL), die für die Lipoxygenase (LOX) Linolensäure zur Verfügung stellt. Aus der Linolensäure wird (13S)-Hydroperoxy-octadecatriensäure gebildet, die wiederum in den Chloroplasten zu 12-Oxophytodiensäure (OPDA) cyclisiert wird. Nach einer Reduktion der Doppelbindung am Ringsystem im Cytoplasma und einer anschließenden β -Oxidation der Seitenkette in den Peroxysomen entsteht cis-JA. Innerhalb der Pflanze wird sie zu trans-JA oder mit Hilfe einer JA-Carboxyl-Methyl-Transferase zu flüchtigem Methyljasmonat synthetisiert. Weitere Phytohormone (z.B. Salicylsäure, Ethylen, Auxin oder Gibberelin) können die Wirkung der JA modifizieren und über ihr Zusammenspiel eine veränderte Genexpression herbeiführen. Diese Wechselwirkungen der Phytohormone ermöglichen spezifische Verteidigungsreaktionen der Pflanzen (Arimura, *et al.*, 2000; Schulze, *et al.*, 2006). Für die Limabohne konnte festgestellt werden, dass der von Herbivoren ausgelöste Schaden einen endogenen JA-Konzentrations-Anstieg zur Folge hat, der wiederum HIPV-Produktion und Sekretion von extrafloralem Nektar auslöst (Koch, 2001). Darum verwendete Heil (2004 a, b) in seinen Untersuchungen JA, um die Abwehr der Limabohnen zu induzieren. Bei seinen Messungen der Zusammensetzungen der emittierten Duftstoffe konnte gezeigt werden, dass die Duftspektren der durch natürliche Herbivorieschäden und der durch JA induzierten Pflanzen nur geringfügige Unterschiede aufwiesen. Ein Abklingen der Duftstoffproduktion, die durch JA-Induktion ausgelöst wurde, erfolgt nach etwa 24 Stunden (Schulze, *et al.*, 2006). Die Applikation von Jasmonsäure als Induktor der pflanzlichen Duftstoffemission bei *P. lunatus* stellt somit eine einfach zu handhabende, wiederholbare und standardisierte Methode dar, um experimentell eine natürliche induzierte Pflanzenabwehr zu simulieren.

1.3 *Atta colombica*: Dominante Megaherbivoren der Neotropen

Innerhalb der eusozialen Insekten stellen die Ameisen mit mehr als 12 000 bekannten Arten, die in 16 Subfamilien gegliedert sind, die vielfältigste Gruppe dar (Hölldobler & Wilson, 1990). Dabei zeichnen sich die Pilzzüchter des Tribus *Attini* durch ihre komplexe Lebensweise aus. Diese Gruppe umfasst insgesamt 12 Gattungen und über 200 Arten. Zwei Gattungen, *Acromyrmex* und *Atta*, bilden die Gruppe der „höheren Attini“ (Wetterer, *et al.*, 1998), wobei die Gattung *Acromyrmex* eine größere Artenvielfalt (24 Arten und 35 Unterarten) vorzuweisen hat als die Gattung *Atta* (insgesamt 15 Arten, Bolton, 1995). Die pilzzüchtenden Blattschneiderameisen leben seit ca. 65 Millionen Jahren in Symbiose mit ihrem Pilz (Müller, *et al.*, 1998) und stellen somit eine der ältesten Lebensformen dar, die eine Form der Landwirtschaft betreiben. Die in dieser Studie untersuchten *Atta colombica* leben in den Neotropen Süd- und Mittelamerikas und gehören zu den sogenannten „central place foragers“ (Chase, 1998). Dies bedeutet, dass sie die gesammelte Nahrung nicht an Ort und Stelle verspeisen, sondern in ihr zentral gelegenes Nest transportieren. Auf den eingetragenen Blattstücken kultivieren die Arbeiterinnen in unterirdischen Kammern den Pilz (*Leucocoprinus gongylophorus*), mit dem sie eine mutualistische Beziehung pflegen (Abb. 2). Ein Mutualismus bedeutet, dass die Beteiligten sich gegenseitig ausbeuten, aber dennoch jeder einen Nutzen aus dieser Beziehung zieht (Herre, *et al.*, 1998). Diese mutualistischen Beziehung ist sehr gut untersucht und eine Vielzahl von Mechanismen lassen sich anhand der beiden Symbionten aufzeigen. Der angebaute Pilz gehört den Gattungen *Leucocoprinus* und *Leucoagaricus* aus der Familie der *Lepiotaceae* (Agricales: *Basidiomycota*) an (Chapela, *et al.*, 1994; Müller, *et al.*, 1998) und dient als Nahrungsgrundlage für die BSA-Kolonie (Weber, 1966). Nicht der vollständige Pilz dient als Nahrungsquelle, sondern nur die Spitzen der Hyphen, die sogenannten Gongylidien (Quinlan & Cherrett, 1978). Hauptsächlich ernähren sich die Larven von den Gongylidien, wogegen die adulten Arbeiterinnen bis zu 95 Prozent ihres Energiebedarfes mit pflanzlichem Zellsaft decken. Diesen nehmen sie während des Schneidens und der Weiterverarbeitung der Blattfragmente zu sich (Howard, 1991; Littleddyke & Cherrett, 1976), wobei sie hauptsächlich Saccharose, Glukose, Fruktose und Polysaccharide konsumieren. Einen zusätzlichen Vorteil für die BSA stellen die Enzyme des Pilzes dar. Für die BSA nicht- oder schwerverdauliche Stoffe, wie z.B. Zellulose, können von den Pilzenzymen aufgespaltet werden. Dadurch werden die sonst nicht zugänglichen Nährstoffe

verwertbar (De Siqueira, *et al.*, 1998) und teilweise werden auch giftige Substanzen durch die Enzyme abgebaut (Martin, 1979). Somit ermöglicht der Pilz den BSA ihre polyphage Lebensweise, da er auf einem weiten Spektrum an verwertbaren Nahrungspflanzen kultiviert werden kann (Rockwood, 1976; Wirth, *et al.*, 2003). Zusätzlich unterstützt die Einteilung der Arbeiterinnen in Kasten und die damit verbundene Arbeitseinteilung die Eintragsraten der Kolonie (Wirth, *et al.*, 2003). Diese einzelnen Kasten sind bei *A. colombica* stark morphologisch differenziert. Dabei stellen die großen Ameisen mit den stark entwickelten Mandibeln die Kaste der Soldaten, die hauptsächlich für den Schutz der Kolonie und die Beseitigung von größeren Hindernissen (z.B. Weg versperrende Ästchen) zuständig sind. Die Arbeiterinnen von mittlerer Statur, auch als Major-Arbeiterinnen bezeichnet, übernehmen vielfältige Aufgaben, wie z.B. das Schneiden, Einsammeln und den Transport der Blattfragmente. Die kleinsten Arbeiterinnen, die auch als Minima oder

Gärtnerinnen bezeichnet werden, übernehmen hauptsächlich Aufgaben innerhalb der Kolonie. Neben der Brutpflege vollziehen die Gärtnerinnen eine chemische und mechanische Nesthygiene (Currie & Stuart, 2001), die einen wertvollen Vorteil für den Pilz darstellt. Die angewandte Pflege verringert die Konkurrenz mit anderen Mikroorganismen. Zusätzlich wird der Fortbestand des Pilzes gesichert, indem die Arbeiterinnen Pilzmyzel auf frisches Substrat verpflanzen (Wirth, *et al.*, 2003). Innerhalb des unterirdischen Ameisenbaus werden die Pilzkammern so angelegt, dass eine hohe Luftfeuchtigkeit für optimale

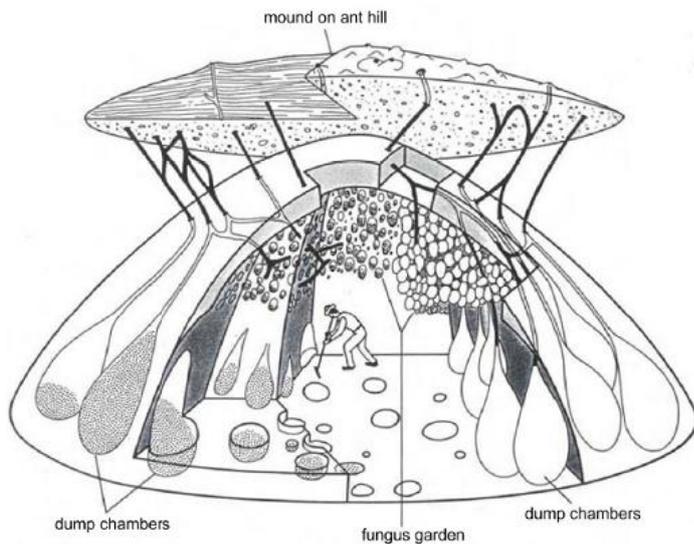


Abb. 2 Aufbau des unterirdischen Nestes von Blattschneiderameisen

Der größte Teil des BSA-Nestes liegt unterirdisch verborgen in einer Tiefe von bis zu sieben Metern (siehe zum Größenvergleich eingebrachten Menschen). Es besteht hauptsächlich aus Pilzkammern (fungus garden), in denen der symbiotische Pilz gezüchtet und gepflegt wird, und aus Abfallkammern (dump chambers), in denen nicht mehr verwertbares Pflanzenmaterial, tote BSA oder abgestorbene Pilzreste eingelagert werden. Die einzelnen Kammern sind über ein weitreichendes Tunnel-Netzwerk miteinander verbunden (aus Hölldobler & Wilson, 1990).

Wachstumsbedingungen sorgt (Abb. 2; Roces & Kleineidam, 2000).

Bei einem Befall durch den auf diesen Mutualismus angepassten parasitischen Pilz, *Escovopsis*, steht nicht nur das Überleben des symbiontischen Pilzes, sondern das der ganzen Kolonie auf dem Spiel. Darum befinden sich in den Metapleuraldrüsen der BSA antibiotisch wirkende Substanzen und ein weiterer Symbiont wurde in die Abwehr eingebunden. Dies sind Bakterien, die dem Stamm der Streptomyceten angehören (Haeder, *et al.*, 2009). Sie befinden sich auf den Ameisen und produzieren Antibiotika, z.B. Candicidin. Diese Antibiotika sind hauptsächlich für den parasitischen Pilz, aber nicht für den kultivierten Pilzgarten der BSA schädlich (Currie, *et al.*, 2003; Fernández-Marín, *et al.*, 2006). Zusätzlich konnten Haeder *et al.* (2009) beobachten, dass die eingenommene Fläche an Bakterien auf den BSA-Arbeiterinnen variiert. Blättereintragende Arbeiterinnen, die sich die meiste Zeit außerhalb der Kolonie aufhalten, weisen mehr Bakterienbewuchs auf als die sich hauptsächlich bei dem Pilzgarten befindlichen Minima-Arbeiterinnen. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit verringert, dass von außerhalb schädliche Mikroorganismen eingetragen werden und die Konzentration an Antibiotika wird in der Nähe des Pilzgartens gering gehalten.

Als polyphage Generalisten der Neotropen nehmen die BSA aus ökologischer und ökonomischer Sicht eine wichtige Rolle ein, weswegen die Untersuchung und das Verstehen ihrer Nahrungspräferenzen von hoher Relevanz sind (Fowler, *et al.*, 1989). Die Auswahl der Nahrung wird durch sogenannte „Kundschafterameisen“ vorgenommen, die aus allen Kasten stammen können. An potentiellen Nahrungspflanzen führen die Kundschafterinnen Probeschnitte durch, die ihnen chemische Informationen über den Zustand und die Qualität der Pflanze liefern. Im Nahbereich erfolgt die Information anderer foragierender Arbeiterinnen mit Hilfe von Stridulationssignalen (Markl, 1965; Roces & Nunez, 1993). Über Distanzen von bis zu 250 Metern (Wirth, *et al.*, 2003) erfolgt die Informationsweiterleitung über eine Pheromonspur. Die Spur reicht von der neuen Nahrungsquelle bis hin zum Nest und enthält Informationen über die Futterqualität (Jaffe & Howse, 1979; Roces & Hölldobler, 1994). Eine weitere Methode des Informationsaustausches stellt die Trophallaxis dar (Hölldobler & Wilson, 1990), die ein sozialer Nahrungsaustausch über den Kropf der Ameisen ist. Nach der erfolgreichen Informationsweiterleitung erfolgt eine Massenrekrutierung der Arbeiterinnen zu der neuen Futterstelle. Dabei

versuchen die BSA, den kürzesten und effektivsten Weg zu ihrem Futter zu wählen. Diese Auswahl wird durch die Intensität der Pheromonspur beeinflusst, da aufgrund der höheren Anzahl an eintragenden Individuen pro Zeit die Pheromonspur auf kürzeren Wegen stärker ausgebildet ist. Auf längeren Wegen nimmt die Intensität ab und der Weg verliert an Attraktivität (Jaffe & Howse, 1979).

Die Auswahl der Nahrungsquelle und die diese beeinflussenden Faktoren bietet Platz für ein viel diskutiertes Untersuchungsfeld, da eine Bevorzugung bestimmter Pflanzen festgestellt werden konnte (Fowler, *et al.*, 1989; Meyer, 2008; Correa, *et al.*, 2009). Allgemein zeigte sich, dass die foragierenden BSA bei der Auswahl ihrer Nahrungspflanzen höchst selektiv vorgehen. Neben dem unvollständigen Abernten eines Baumes konnte außerdem festgestellt werden, dass weiter vom Nest entfernte Pflanzen bevorzugt wurden, obwohl die gleichen Arten mit scheinbar gleicher Qualität auch näher am Nest vorhanden waren (Cherrett, 1983; Rockwood & Hubbell, 1987). Bei der Untersuchung der physiologischen Blatinhaltsstoffe, dem Nährstoffgehalt und dem chemischen Abwehrverhalten der Pflanzen zeigte sich ein interessantes Ernährungsverhalten der BSA. Beispielsweise hatte die Blatthärte einen Einfluss auf das Foragierverhalten von *Atta cephalotes* (Nichols-Orians & Schulz, 1989). Meyer *et al.* (2006) stellten fest, dass der Wassergehalt in den Blättern eine Rolle in der Selektion der Nahrungspflanzen spielt. Von Kolonie zu Kolonie unterschiedliche Faktoren, wie etwa ein abweichender Ernährungszustand oder ein koloniespezifisches „erlerntes“ Foragierverhalten, haben auch Einfluss auf die Nahrungswahl. Littleddyke und Cherrett (1975) wiesen darauf hin, dass aktivere und ausgehungerte Kolonien eine geringere Selektivität zeigten. Weitere Aspekte in Bezug auf die Nahrungsselektion und die Präferenzen gegenüber bestimmten Pflanzen werden in dem folgenden Abschnitt (Kap. 1.4) erläutert.

1.4 Auswirkungen pflanzlicher Abwehr auf den Mutualismus von Blattschneiderameisen und ihrem Pilz

Die in Kapitel 1.3 aufgezeigten Muster des im Freiland beobachteten Furagierverhaltens der BSA stehen im Widerspruch zur „optimal foraging theory“ (Theorie des optimalen Nahrungserwerbs; Pyke, *et al.*, 1977). Diese Theorie besagt, dass die aufgewendete Energie mit der Entfernung zur Kolonie linear zunimmt. Somit müssten die BSA den nächstgelegenen, verwertbaren Baum komplett entlauben, um die Bilanz zwischen minimierten Energieaufwand für Nahrungssuche und –erwerb, und größtmöglicher Energieausbeute positiv zu halten. Erst danach sollte die Attraktivität weiter entfernter Nahrungspflanzen zunehmen. Aus diesem Grund schlug Cherrett die sogenannte „resource conservation hypothesis“ (Hypothese der Erhaltung von Ressourcen) vor. Der Autor geht bei dieser Hypothese davon aus, dass die BSA die ihnen zur Verfügung stehenden Nahrungsressourcen im Verlauf der Lebensspanne der Kolonie schützen. Dafür könnte sich ein ressourcenschonender Nahrungserwerb als eine evolutionäre Anpassung an die Langlebigkeit (über 10 Jahre) und Sessilität der Kolonien entwickelt haben. Howard (1991) entwickelte eine weitere Theorie, die „nutrient balance hypothesis“ (Hypothese der ausgeglichenen Nährstoffe). Howards Hypothese spricht den BSA und ihrem unökonomischem Furagierverhalten eine Optimierung der Versorgung des symbiotischen Pilzes zu. Die Mischung verschiedener Blätter von verschiedenen Nahrungsquellen würde somit einen bessere Nährstoffversorgung garantieren. Beide Hypothesen können bisher nicht durch stichhaltige Studien gestützt werden. Der zugrunde liegende Mechanismus bedürfte noch einiger Klärung, z.B. warum die furagierenden Arbeiterinnen entscheiden, eine zuvor als qualitativ hochwertig erachtete Nahrungsquelle aufzugeben, um sich erneut der energieaufwendigen Nahrungssuche zu zuwenden.

Weiterführende Studien zum Furagierverhalten stellen fest, dass vor allem die Sekundärmetabolite für die Diskriminierung von Pflanzenarten verantwortlich sind (Howard, 1988a). Farij-Brener (2001) konnte nachweisen, dass die BSA Pionierpflanzen bevorzugen, die an Waldrändern und in gestörten Waldgebieten wachsen. Laut Coley *et al.* (1985) besitzen die Pionierpflanzen weniger Abwehrstoffe und investieren ihre aus den Ressourcen gewonnene Energie vorzugsweise in ihr Wachstum. Innerhalb eines Pflanzenindividuums selektieren die BSA zwischen mehr oder weniger attraktivem Pflanzenmaterial. Cherrett (1972) konnte zeigen, dass furagierende *Atta cephalotes* junge Blätter von Citrusbäumen gegenüber alten präferie-

ren. Diese Bevorzugung kann primär durch die physikalischen Eigenschaften der Blätter in Bezug auf Stärke und Dicke hin erklärt werden. Sekundär weisen ältere Blätter eine höhere Menge von Abwehrstoffen auf. Insgesamt ernteten *A. colombica* Arbeiterinnen bei nur 27 von 86 verfügbaren Pflanzenarten die voll entwickelten Blätter, wogegen sie die juvenilen Blätter von 43 Arten eintrugen (Rockwood, 1976). Zusätzlich kann festgehalten werden, dass innerhalb einer Baumkrone Unterschiede in den enthaltenen Mengen an Tanninen, Proteinen und Wasser der Blätter bestehen (Howard, 1990). Die Akzeptanz der BSA scheint maßgeblich von diesen Faktoren abhängig zu sein. Barrer und Cherrett (1972) konnten weiterhin nachweisen, dass Blattwundränder einen attraktiveren Ansatzpunkt für einen Schnitt durch die foragierenden Arbeiterinnen bieten als ein intakter Blattrand. In früheren Arbeiten ergaben sich Hinweise darauf, dass die Herbivorie von BSA keine Veränderungen der Blatinhaltsstoffe hervorrufen (Howard, 1990; Vasconcelos, 1997). Dagegen konnte Aigner (2007) nach einmaligen Schneiden von BSA-Arbeiterinnen die Induktion von Duftstoffen bei Limabohnen feststellen, die wohl eine repellente Wirkung auf die BSA haben. Dies wird auch dadurch belegt, dass die BSA nach einer gewissen Zeit das Nahrungssubstrat nicht mehr akzeptieren. Ausschlaggebend für eine solche verzögerte Ablehnung („delayed rejection“) könnte eine schädigende Wirkung des Substrates gegenüber dem Pilz sein, denn North *et al.* (1999) zeigten den Einfluss des Pilzes auf die Entscheidungen der foragierenden Arbeiterinnen. Ebenso konnte Tremmel (2008) mit dem Limabohnen-*A. colombica*-System eine delayed rejection nachweisen. Zuvor zeigten die foragierenden Arbeiterinnen keinerlei Präferenz oder Ablehnung gegenüber den angebotenen *P. lunatus* Individuen auf. Nach andauernder Herbivorie und steigender Duftstoffkonzentration stellte sich eine Diskriminierung der Arbeiterinnen ein, was sich durch einen geringen Eintrag an Blattmasse abzeichnete. Herz *et al.* (2008) konnten bei mit Cycloheximid infiltrierten Blattstücken eine repellente Wirkung nach neun Stunden nachweisen. Cycloheximid ist ein für die BSA nicht detektierbares Pilztoxin. Den unterschiedlichsten Blatinhaltsstoffen konnten repellente Auswirkungen gegenüber BSA nachgewiesen werden. Das Terpenoid Caryophyllen-Epoxid hatte eine dosisabhängige repellente Wirkung auf die foragierenden Arbeiterinnen (Howard, *et al.*, 1989). Dabei konnten keinerlei toxische Wirkungen des Terpenoids auf die BSA, aber dafür inhibierende auf das Pilzwachstum nachgewiesen werden (Howard, 1988a). Chen *et al.* (1984)

wiesen nach, dass BSA gegenüber Ocimen ein diskriminierendes Furagierverhalten zeigen. Die in der Umgebung der BSA-Nester wachsenden Bäume enthalten unterschiedliche Terpenoiden (trans- β -Ocimen, α -Pinen, β -Caryophyllen, α -Cubenin, α -Copaen, Germacren D und Humelen; Urbas, 2004), wogegen die Hauptbiomasse an eingetragendem Pflanzenmaterial keinerlei Gehalt an Terpenoiden beinhaltet.

Die bei den Untersuchungen von Herz *et al.* (2008) auftretende Ablehnung dauerte zwei bis drei Wochen lang an. Auch bei Ridley *et al.* (1996) erwies sich die Ablehnung als eine wochenlang aufrechterhaltende Reaktion der BSA. Sogar ein Langzeit-Lerneffekt bei Kundschaftern und Arbeiterinnen gegenüber schädigenden Substanzen über zwei bis drei Monate konnte gezeigt werden (Saverschek, *et al.*, 2010).

Beruhend auf den bisherigen Beobachtungen wurde die als „induced-defence hypothesis“ (induzierte Abwehr Hypothese) bezeichnete Theorie erstellt (Kost, *et al.*, 2011). Diese Hypothese fasst zusammen, dass die induzierten Abwehrreaktionen in der Pflanze einen Einfluss auf den Herbivoren ausüben. Wenn die Abwehr der Pflanzen durch die Schneideaktivität der BSA induziert wird, entsteht ein regelrechtes dynamisches Mosaik von Pflanzenarten mit unterschiedlichen Induktionsstufen innerhalb des Furagierbereiches der BSA. Somit könnten auch die beobachteten Verhaltensmuster der BSA-Arbeiterinnen beim Furagieren erklärt werden.

Inwiefern diese Hypothese Anwendung auf die Kommunikation zwischen dem Pilz und den BSA findet, ist bisher noch ungeklärt.

1.5 Ziele, Hypothesen und Design der Arbeit

Die direkte Auswirkung der pflanzlichen Abwehr auf das mutualistische Gefüge von BSA und ihrem Pilz ist bisher ungeklärt. Bei den Untersuchungen von Tremmel (2008) erfolgte keine Trennung von Pilz und BSA. Die BSA-Arbeiterinnen trugen die behandelten Blattfragmente ein, wodurch der Pilzgarten gegenüber den HIPVs der Limabohne nicht mehr „naiv“ war. Der „HIPV-erfahrene“ Pilz informierte wohl nach einer gewissen Zeit die Minima-Arbeiterinnen mit Hilfe von chemischen Signalen. Die Minima-Arbeiterinnen übertrugen die Informationen weiter an die anderen Arbeiterinnen und Soldaten. Bisher ist mit Sicherheit bekannt, dass die kleinen Arbeiterinnen eine wichtige Rolle in der Informationsweiterleitung einnehmen (North & Jackson, 1999). Nach der erfolgreichen Information über die wohl schädigende Wirkung der HIPVs der Limabohne auf den Pilzgarten lehnten die foragierenden Arbeiterinnen die angebotenen Limabohnen ab, die eine hohe Konzentration an Duftstoffen beinhalten. Ungeklärt bleibt bei diesem Versuchsaufbau, ob die „HIPV-naiven“ Arbeiterinnen von selbst die Duftstoff emittierenden Limabohnen meiden würden.

Diese Frage wurde in den Untersuchungen von Stephan (2010) aufgegriffen. Dafür wurden die Reaktionen auf HIPVs der Limabohnen der beiden Symbionten getrennt voneinander aufgenommen. In einem sogenannten Olfaktometerversuch, der sich hauptsächlich auf die Wahrnehmung von Gerüchen bezieht, wurden die Reaktionen der „HIPV-naiven“ BSA-Arbeiterinnen getestet. Die Arbeiterinnen zeigten kein repellentes oder bevorzugendes Verhalten gegenüber der mit HIPV-versetzten Lanolin-Paste bzw. dem reinen Lanolin, das als Kontrolle fungierte. Der symbiontische Pilz wurde auf zwei unterschiedlichen Medien gezüchtet, wobei der Pilz nur schlecht wuchs und eine hohe Kontaminationsrate auftrat. Bei der Applikation von HIPVs direkt in die Medien zeigten sich bei einer Konzentration von 100 µg des vollständigen HIPV-Spektrums der Limabohne inhibierende Einflüsse auf das Pilzwachstum. Ab 1000 µg konnten fungizide Effekte verzeichnet werden.

Aus diesen Untersuchungen ergaben sich die in dieser Arbeit behandelten Fragen und Hypothesen:

1. Frage: Zeigen „HIPV-naive“ *A. colmbica* Arbeiterinnen mit „HIPV-naivem“ Pilzgarten eine Präferenz oder Ablehnung gegenüber angebotenen induzierten und unbehandelten Limabohnen-Individuen?

1. Hypothese: Naive *A. colombica* Arbeiterinnen mit HIPV-unerfahrenem Pilz diskriminieren keine induzierten Pflanzen.

Motivation und Begründung:

Die beobachtete „delayed rejection“ bei Tremmel (2008) und die Olfaktometerversuche von Stephan (2010) weisen darauf hin, dass eine Kommunikation zwischen Pilz und BSA stattfinden muss, um eine ablehnende Reaktion der BSA gegenüber induzierten Limabohnen detektieren zu können. Dies soll nun abschließend im mutualistischen Kontext ohne die Trennung der Arbeiterinnen von ihrem Pilz überprüft werden.

Entgegengesetzt zu der induced-defence hypothesis konnte bei anderen Herbivoren-Pflanzen-Systemen eine Bevorzugung von Duftstoff-emittierenden Pflanzen beobachtet werden (Dicke, 1986; Dicke & Van Loon, 2000; Horiuchi, *et al.*, 2003 a). Somit hätten die Duftstoffe in diesen Fällen eine Wirkung als Herbivoren anlockende Kairomone. Ob diese Aussage auf das Limabohnen-*A. colombica*-System zutrifft, solange BSA und Pilz naiv bleiben, bedarf ebenfalls der Klärung in dieser Studie.

In dem hier durchgeführten Versuch 1 werden zwei HIPV-naive *Atta colombica* Kolonien verwendet. Die Induzierung der *Phaseolus lunatus* erfolgt mit Jasmonat, wie schon Heil (2004 a, b) seine Versuchspflanzen induzierte. Die Bereitwilligkeit für das Furagieren von *P. lunatus* durch *A. colombica* konnte in den Studien von Aigner (2007) und Tremmel (2008) ohne große Einschränkungen gezeigt werden, obwohl bisher in der Natur eine Interaktion der Herbivorie zwischen den beiden Organismen nicht beobachtet werden konnte. Die Naivität des Pilzes wurde bei diesem Versuch gewahrt, damit keine ungewollte Kommunikation zwischen den Symbionten stattfinden kann.

2. Frage: Haben die HIPVs von *P. lunatus* eine inhibierende Wirkung auf den Pilzgarten *in situ* und im ökologischen Kontext mit den BSA?

2. Hypothese: Die fungizide Wirkung der HIPVs hemmt den Pilzgarten im Wachstum.

Motivation und Begründung:

Die *ex situ* Beobachtungen zeigten eine inhibierende bis hin zu einer fungiziden Wirkung der HIPVs auf den symbiontischen Pilz (Stephan, 2010). Durch das schlechte Wachstum des Pilzes auf den Medien und der hohen aufgetretenen Kontaminationsrate kann aber nicht davon ausgegangen werden, dass nicht andere Faktoren die inhibierenden Effekte verstärkt oder auch ausgelöst haben. Andere Faktoren könnten beispielsweise die fehlende Pflege durch die Minima-Arbeiterinnen, das veränderte Wachstumsmilieu oder die umgestellte Nährstoffversorgung des Pilzes sein. Um diese Faktoren ausschließen zu können, werden in Versuch 2 dieser Untersuchung Subkolonien erstellt, die den natürlichen Bedingungen innerhalb einer vitalen BSA-Kolonie nachempfunden sein sollen. Nach einer Etablierungsphase dieser Subkolonien soll eine Behandlung der Pilzgärten mit HPV-versetzter Lanolin-Paste (Kost & Heil, 2006) erfolgen.

3. Frage: Ist die Duftstoffzusammensetzung der verwendeten HIPV-Lanolin-Paste innerhalb der Subkolonien vergleichbar mit der natürlichen Emission von induzierten *P. lunatus*-Blattfragmenten?

3. Hypothese: Die Zusammensetzung der Duftstoffe von HIPV-Paste und induzierten Blattfragmenten von *P. lunatus* unterscheiden sich nicht.

Motivation und Begründung:

Bisher wurde nur die Emission JA-induzierter und natürlich induzierter Limabohnen miteinander verglichen (Heil, 2004 a, b). Die angewendete Duftstoffzusammensetzung für die Lanolin-Paste in den Untersuchungen von Stephan (2010) wurde dem natürlichen HIPV-Spektrum einer Limabohne nach 24 Stunden Herbivorie nachempfunden (Kost & Heil, 2006). Aber das genaue Emissionspektrum der mit HIPVs von *P. lunatus* versetzten Lanolin-Paste wurde bisher nicht untersucht. Zusätzlich ist die Konzentration an Duftstoffen in einem bestimmten Luftvolumen von Interesse für den Versuch 2, um etwa die Menge der HIPVs bestimmen zu können, die den Pilzgarten wirklich beeinflussen.

Darum wurde in Versuch 3 der von Tremmel (2008) angewendete Versuchsaufbau für die Messung der Duftemissionen von geschnitten Limabohnen, soweit modifiziert, dass die Messungen in einem festgelegten Luftvolumen stattfanden. Dieses Volumen soll der Luftmenge innerhalb der Subkolonien entsprechen. In diesem abgeänderten Versuchsaufbau werden die Duftstoffzusammensetzungen der HIPV-Lanolin-Paste und die induzierter Blattfragmente von *P. lunatus* aufgenommen und miteinander verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Protagonist *Atta colombica*: Haltung der Laborkolonien

Die beiden verwendeten Versuchskolonien mit der Bezeichnung „1“ und „2“ der Blattschneiderameisenart *Atta colombica* stammten ursprünglich aus Panama (Gamboa, in der Nähe von BCI) und wurden im Oktober 2002 als junge Kolonien eingesammelt. Dabei bestanden die ausgegrabenen Kolonien aus einer Königin, einem Teil des Pilzgartens und einigen Arbeiterinnen. Von dem Zeitpunkt ihrer Bergung an wurden sie in einem Plastikboxensystem gehalten, wobei die einzelnen Boxen über PVC-Schläuche verbunden sind (Abb. 3). Das Boxensystem bestand aus einer Futterbox, mindestens einer Box für den Anbau des Pilzgartens und einer Abfallbox. Die Anzahl der Boxen für den Anbau des Pilzgartens wurde meist variabel gehalten, um eine vitale anbauende Kolonie nicht einzuschränken. Als Füllmaterial der Boxen diente feuchter Blähton (Lecaton, Lamstedt), um die Lebensbedingungen im feuchten Erdreich nachzustellen. Die Boxensysteme der Kolonien wurden im Normalfall bei ca. 25°C und einer Luftfeuchtigkeit von 55% in einem klimatisierten Raum des Tierhauses der TU Kaiserslautern gehalten. Aufgrund von Umbaumaßnahmen des Tierhauses waren die BSA-Kolonien während der gesamten Versuchszeit in einem Brutraum der Mikrobiologie untergebracht.

Die Boxen, die den angebauten Pilzgarten und den Abfall beinhalteten, wurden mit Zeitungen abgedeckt. Damit sollte ein direkter Lichteinfall vermieden werden, um die normalerweise unterirdisch lebende Kolonie zu schützen. Die Futterbox benötigte keine Abdeckung, da sich die BSA in der freien Natur an der Oberfläche auf Futtersuche begeben. Die Fütterung der BSA erfolgte zweimal täglich und die Bedarfsmenge an Futter richtete sich nach dem Zustand der Kolonie und der Aktivität ihres Furagierverhaltens. Als Futtermaterial dienten Brombeerblätter (*Rubus fruticosus*, Rosaceae), die von den BSA uneingeschränkt akzeptiert wurden. Die Abfallboxen wurden je nach Bedarf ca. alle zwei Wochen gesäubert.

Für den Versuch 1 wurden die beiden Kolonien direkt als Versuchsobjekte verwendet. Um den vitalen Zustand der beiden Kolonien nicht zu riskieren und die Anzahl an Replikationen zu erhöhen, wurden für Versuch 2 Subkolonien von den beiden Kolonien etabliert. Die Subkolonien gelten nach der Abtrennung von ihren Mutterkolonien und ihrer Königin als eigenständige Kolonien (Herz, *et al.*, 2008). Durch das Fehlen

einer Königin und dem von ihr gezeugten Nachwuchs sind die autarken Subkolonien nicht dauerhaft überlebensfähig.



Abb. 3 Boxensystem zur Haltung von Laborkolonien der Art *Atta colombica*

Das System besteht aus einer sogenannten Futterbox (1), vier Boxen, in denen der Pilz von den BSA kultiviert wird (2), und einer Abfallbox (3). Die Boxen werden über durchsichtige Plastikschläuche mit einander verbunden. Die Kolonie wird auf einem Holztableau und abgedeckt gelagert. Diese Haltung und der Aufbau sollen dem natürlichen System in den neotropischen Wäldern entsprechen.

2.2 Protagonist *Phaseolus lunatus*: Kultivierung

Die Limabohne (*Phaseolus lunatus*) kann leicht in großen Mengen kultiviert werden. Sie wurde, wie eingangs dargestellt, in vielen Untersuchungen und Studien verwendet und ihre Abwehrreaktionen sind gut erforscht (z.B. Heil, 2004 b). Die auslösbare Induktion der Abwehrmechanismen durch JA stellt einen weiteren Vorteil für die Verwendung dieser Versuchspflanze für die vorliegende Arbeit dar.

Die verwendeten *P. lunatus* Individuen wurden im Versuchsgewächshaus der TU Kaiserslautern gezogen. Dabei stammten die zur Aufzucht verwendeten Samen vom Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena. Dem tropischen Tagesrhythmus entsprechend konnten sie bei einer zwölfstündigen Hell-Dunkelphase von 7 bis 19 Uhr gedeihen. Die Durchschnittstemperatur in der Nacht betrug ca. 20°C. Durch die zusätzlich wärmende Beleuchtung konnten tagsüber Durchschnittstemperaturen von bis zu 25°C erreicht werden (Penntner-Hager, persönliche Mitteilung). Für die Versuche wurden mindestens vier Wochen alte Testpflanzen verwendet, die im Durchschnitt acht Blätter trugen. Die ältesten verwendeten Individuen wiesen ca. zwanzig Blätter auf, besaßen aber noch keine Blütenstände. Bei der Auswahl der Testpflanzen wurde darauf geachtet, dass sie keinen Befall durch Schädlinge oder verletzte Blätter aufwiesen. Die Induzierung der Abwehr durch die Behandlung mit JA erfolgte in einem ca. 20 m entfernten angrenzenden Raum des Gewächshauses. Dadurch sollte eine ungewollte Induktion der anderen Versuchspflanzen über die Gasphase, vor allem bei der als Kontrolle bestimmten Testpflanze, vermieden werden (Kost & Heil, 2006). Die nächsten 24 Stunden wurden die behandelte und die Kontrollpflanze voneinander getrennt aufbewahrt. Erst kurz vor dem Versuch wurden die beiden Limabohnen nebeneinander gestellt und den frugierenden BSA angeboten.

Die für die Duftmessungen (Versuch 3) induzierten Limabohnen wurden ebenfalls 24 Stunden entfernt von den anderen Testpflanzen aufbewahrt, bevor ihre Blätter für die Messungen verwendet wurden.

2.3 Versuch 1: Präferenztests zur Nahrungswahl naiver BSA-Kolonien gegenüber HIPV-induzierten Limabohnen

Mit diesen Bioassays (Nahrungspräferenztests) sollte die Hypothese überprüft werden, dass naive BSA-Kolonien weder die Kontrollpflanze noch die behandelte Testpflanze diskriminieren oder bevorzugen. Zusätzlich wurde angestrebt, dass die Kolonien im Gegensatz zu den Untersuchungen von Tremmel (2008) weiterhin naiv bleiben. Die Naivität des Pilzgartens musste gewahrt werden, damit keine Informationen des Pilzes auf die BSA-Arbeiterinnen übertragen werden konnten. Um die Kolonie als HIPV-unerfahren zu erhalten, kam aufgrund des spezifischen Furagierverhaltens von *A. colombica* Arbeiterinnen nur ein manuelles Einsammeln der Blattfragmente in Frage.

Die verwendeten Versuchspflanzen *P. lunatus* besaßen mindestens acht Blätter und ein Maximum von ca. zwanzig Blättern. Bei jedem Test wurde darauf geachtet, dass die Kontrollpflanze und die behandelte Pflanze annähernd die gleiche Menge an Blättern trugen.

2.3.1 Aufbau und Durchführung

Der Versuchsaufbau orientierte sich weitgehend an der Studie von Tremmel (2008). Die Versuchspflanzen wurden ca. 24 Stunden vor Versuchsbeginn behandelt. Dabei wurden die Blätter der Kontrollpflanze vollständig mit destilliertem Wasser besprüht. Die Blätter der zu behandelnden Pflanze wurden mit einer ein-molaren Mischung aus Jasmonsäure benetzt. Es wurde darauf geachtet, dass die Haltungsbedingungen an beiden Stellplätzen der Kontroll- und behandelten Pflanze vergleichbar waren.

Eine der beiden naiven Laborkolonien (*Atta colombica* 1 oder 2) wurde ca. 24 Stunden vor dem Versuch nicht mehr gefüttert, damit die Arbeiterinnen möglichst forciert furagieren würden. Zwischen den Präferenztests wurde mindestens ein Tag pausiert, um ein möglichst unbeeinflusstes Furagierverhalten der Kolonie pro Replikation zu erhalten.

Vor und nach dem Versuch wurden die Blätter der beiden Limabohnen bei den ersten beiden Versuchsdurchgängen konturiert, wobei die Blätter einzeln auf ein Blatt Papier gelegt und ihre Umrisse mit einem Stift nachgefahren wurden. Anschließend wurden die ausgeschnittenen Schablonen der Blattumrisse mit einem Blattflächenmessgerät (LI-3100, Li-Cor, Nebraska, USA) gemessen. Aufgrund eines erhöhten

Verletzungsrisikos der Blattränder durch die Konturierung wurden bei den weiteren Versuchsdurchgängen die Blätter mit einem Maßstab abfotografiert (Kamera: Canon Powershot G6; 7.1 Megapixel; Auflösung: 3072 x 2304, 180 dpi). Dafür wurden die Blätter vorsichtig zwischen zuvor mit destilliertem Wasser gereinigten Klarsichtfolien gelegt. Die Auswertung der Blattflächen erfolgte später mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (OpenSource-Programm, entwickelt von Wayne Rasband, Bethesda, Maryland, USA). Nach den Aufnahmen und vor dem Versuch wurden die beiden Limabohnen abgewaschen, um mögliche Überreste der Jasmonsäure auf der Blattoberfläche der Versuchspflanze zu entfernen und eine gleichmäßige Behandlung der Kontrollpflanze zu gewähren (Stephan, 2010). Die beiden Pflanzen wurden anschließend in der Versuchsarena aus Plexiglas (60 x 60cm groß) den BSA ange-



Abb. 4 Versuchsarena mit furagierenden Blattschneiderameisen

Die Versuchspflanzen wurden in die Plexiglas Arena gestellt und diese entsprechend abgedichtet. Zusätzlich ist hier ein aktives Furagierverhalten der BSA zu erkennen.

boten (Abb. 4). Die offenen Ränder der Versuchsarena wurden mit Paraffinöl präpariert, um ein mögliches Entkommen der BSA zu verhindern. Das Öl verhinderte die Haftung der Ameisenbeine an der Plexiglas-Oberfläche. Als weiterer Unterschied zu Tremmel (2008) wurde eine Plastikbox mit einem Zugang zur Arena und einem zu der Kolonie eingebunden. Die offenen Ränder der zwischengeschalteten Box wurden wie die Ränder der Versuchsarena mit Paraffinöl präpariert. Diese Box bot die Möglichkeit, die geschnittenen Blattfragmente den tragenden Arbeiterinnen vorsichtig mit Hilfe zweier

Federstahlpinzetten wegzunehmen.

Wenn ca. 20% der Blattfläche, mindestens jedoch 10% bei größeren Limabohnen, einer Versuchspflanze geschnitten waren (visuelle Einschätzung), wurde der Versuch als erfolgreich gewertet und beendet. Als ungültig wurde der Test gewertet, wenn auch nach drei bis vier Stunden weniger als 10% der Blattfläche geschnitten

worden war. Insgesamt wurde Laborkolonie 1 achtmal und Kolonie 2 siebenmal erfolgreich getestet. Als Maß für die Präferenz der Ameisen wurde der Mittlere Akzeptanzindex (MAI; $MAI = T/(K+T)$; T = geschnittene Fläche von Testpflanze; K = geschnittene Fläche der Kontrollpflanze) bestimmt (Tremmel, 2008).

2.4 Versuch 2: Wirkung von Herbivorie induzierten Pflanzenvolatilen auf das Wachstum von Pilzgärten *in situ*

In der Arbeit von Stephan (2010) wurden die Auswirkungen von HIPVs auf das Wachstum des symbiotischen Pilzes bei direkter Applikation in das Kultivierungsmedium getestet. Dabei konnte eine wachstumsinhibierende Wirkung ab 100 µg der vollständigen HIPVs festgestellt werden. Die Auswirkungen auf den symbiotischen Organismus BSA-Pilz konnten auf diese Weise nicht festgestellt werden. Um Auswirkungen auf den Mutualismus zwischen den BSA und ihrem Pilzgarten detektieren zu können, wurde der folgende Versuchsaufbau entwickelt. Für diesen Zweck wurden naive Subkolonien etabliert (Kapitel 2.4.1), um die Anzahl an möglichen Replikationen zu erhöhen und die Vitalität, wie auch die Naivität gegenüber HIPVs der Mutterkolonien nicht zu schädigen. Während der Versuchszeit besaß Kolonie 1 drei Pilzboxen und Kolonie 2 zwei Pilzboxen.

In Vorversuchen wurde getestet, wie die HIPVs erfolgreich in die Subkolonien eingebracht werden könnten. Dafür wurde die HIPV-versetzte Paste aus den Untersuchungen von Kost und Heil (2006) verwendet. Aufgrund der Flüchtigkeit der Duftstoffe wurde beschlossen, die Paste unter den Pilzgarten einzubringen. Gleichzeitig sollte gewährleistet werden, dass die aufsteigenden HIPVs den Pilzgarten gleichmäßig beeinflussen. Um diesen Bedingungen zu entsprechen, wurden mit HIPV-Paste versehene Duftstoffträger unter den Pilzgarten eingebracht (Kapitel 2.4.2). Zusätzlich sollten die Wachstumsänderungen fotografisch und gravimetrisch gemessen werden. Somit wurde nach einem für die BSA akzeptablen und flexiblen Träger für den Pilzgarten gesucht. Dies führte nach der Beachtung der weiteren Faktoren, wie dem Trägermaterial und der Feuchtigkeitsversorgung, zu der folgenden Vorgehensweise bei der Etablierung der Subkolonien und der Versuchsdurchführung.

2.4.1 Etablierung von Subkolonien

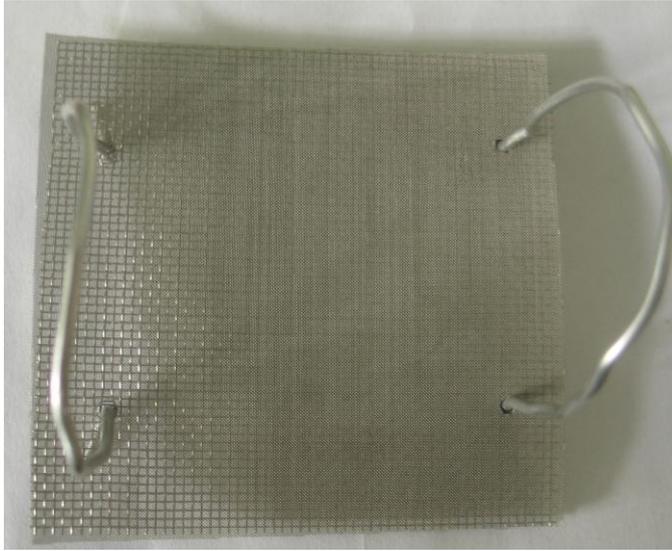


Abb. 5 Gitterträger für Pilzgärten

Neu entwickelter Gittereinsatz mit der Möglichkeit den Pilzgarten schonend aus den Subkolonien für Foto- und Gewichtsaufnahmen zu nehmen.

Für die Foramicarien der Subkolonien wurden, wie im Kapitel 2.1 beschrieben, ein Boxensystem, jedoch mit kleineren Boxen (9 x 9 x 6 cm; ca. 400 ml Fassungsvermögen), zusammengestellt. Die Boxen wurden wiederum über kleine Plastikschläuche (Durchmesser ca. 12 mm) miteinander verbunden. Die Etablierung der Subkolonien erfolgte grundsätzlich nach den Erläuterungen in Herz *et al.* (2008). Um optimale Luftfeuchtigkeit in den Boxen zu gewährleisten, wurde das Ge-

samtvolumen des Foramicariums durch Verzicht auf die Abfallbox auf zwei Boxen reduziert. Eine der beiden Boxen wurde als Futterbox verwendet; in die andere Box wurde der Pilzgarten auf einem herausnehmbaren Träger eingesetzt. Die BSA-Arbeiterinnen lagerten den Müll ohne Probleme entweder in der Futterbox oder mit maximalem Abstand zu ihrem Pilzgarten auf dem Träger ab (Abb. 5).

In Vorversuchen wurden Gipsplatten mit Aluminiumhenkeln als Träger für die anzulegenden Pilzgärten verwendet. Aber ungewollte Gewichtsveränderungen des Gips-trägers konnten bereits augenscheinlich erfasst werden, die auf ein Abtragen des Gipses durch die BSA hinwiesen. Daher wurde ein speziell entwickelter Einsatz aus zwei unterschiedlichen Edelstahlmetallgittern (Maschenweite: unteres Gitter 1 x 0.5 mm, oberes Gitter 0.5 x 0.25 mm; Abb. 5) mit zwei Aluminiumdrahthenkeln (Länge: ca. 5cm) entwickelt. Die leeren Gitterkonstruktionen wurden gewogen und anschließend wurde der vitale Pilz aus den naiven Mutterkolonien aufgetragen.

Bei der Entnahme des Pilzes aus den Mutterkolonien wurde darauf geachtet, dass die Königin nicht gestört bzw. versehentlich mit dem Pilzgarten entnommen wird. Da die Pilzgärten eine deutliche vertikale Schichtung aufweisen (Eidmann, 1932), wurde nur die oberste, vitale Pilzschicht (ca. 6cm) verwendet. Als vital wurde das Pilzmyzel deklariert, wenn es eine gräulich-schwarze Färbung, viel Brut und frisch eingearbei-

tete, verdaute Blattstücke aufwies (Abb. 6). Das zusammenhängende Myzel wurde mit einem zuvor mit Ethanol gereinigtem Esslöffel aus einer der beiden Mutterkolonien entnommen. Die Hälfte der angesetzten Subkolonien stammt von der Mutterkolonie 1 und die andere Hälfte von Mutterkolonie 2 ab. Um einer Kontaminationen der Mutterkolonien oder ungewollten Mischung des entnommen Pilzmyzels und der Ameisen zu entgehen, wurden die Subkolonien von den verschiedenen Mutterkolonien nacheinander etabliert. Das entnommen Pilzmyzel wurde in einer Plastikbox zwischengelagert. Die Arbeiterinnen und Soldatinnen wurden vor der Verteilung des Pilzmyzels auf die Träger abgesammelt. Bei der Verteilung von Myzel und Ameisen wurde darauf geachtet, dass jede Subkolonie in etwa die gleiche Menge von beidem erhielt. Die Subkolonien wurden in dem gleichen klimatisierten Raum bei 25°C und ca. 55 % Luftfeuchtigkeit gehalten wie alle anderen Laborkolonien.

Um die Subkolonien ausreichend mit Feuchtigkeit zu versorgen, wurde die Pilzgartenbox mit einer Unterlage aus zugeschnittenem Filterpapier (8.5 cm x 8.5 cm), einer Auflage von mit wassergetränkter Watte und abschließender Abdeckung aus Filterpapier (5 cm x 8.5 cm) ausgestattet. Darauf wurde das Gitterkonstrukt mit dem Pilzgarten gestellt. Der Boden der als Futterbox gewählten Plastikbox wurde mit zuvor gewässertem Blähton (Lecatón, Lamstedt) bedeckt. Die Etablierungszeit für die Subkolonien betrug mindestens eine Woche (Herz, *et al.*, 2008). Die Fütterung mit *Rubus*

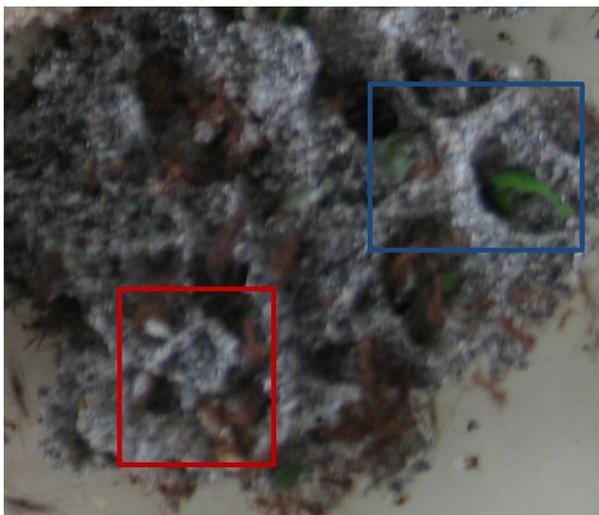


Abb. 6 Vitales Pilzmyzel

Die dunkel-graue Farbe des Myzels, wie auch eingearbeitete Blattfragmente (blauer Rahmen) und Brut (roter Rahmen) zeichnen ein frisch gewachsenes Pilzmyzel aus.

fruticosus Blättern wurde nach der Abtrennung von den Mutterkolonien auch für die Subkolonien übernommen, um Irritationen durch eine Futterumstellung auszuschließen. Die angebotene Futtermenge während der Etablierungszeit und Versuchszeit betrug die gleiche Tagesmenge (ca. 1 g Frischgewicht). Die Brombeerblätter wurden in die Futterbox gelegt und alle paar Tage nach Bedarf der Subkolonien bei allen gleichzeitig aufgefüllt oder gewechselt.

2.4.2 Behandlung der Pilzgärten mit HIPV-Paste

Um die Auswirkungen der HIPVs auf den Mutualismus von BSA und ihren Pilzgärten *in situ* aufnehmen zu können, sollte die Behandlung der Pilzgärten mit gleichmäßiger Emission der HIPV-versetzten Paste erfolgen und maßgebliche Wachstumsfaktoren aufgenommen werden. Damit die Behandlung der etablierten Pilzgärten der Subkolonien mit den flüchtigen VOCs der *P. lunatus*-HIPVs erfolgreich verlaufen konnte, wurde die folgende Methodik erstellt. Der Pilzgarten sollte über seine ganze Fläche gleichmäßig der Konzentration der HIPVs ausgesetzt werden. Dafür wurde unterhalb des verwendeten Pilzgarten-Trägers die Paste gleichmäßig eingebracht, so dass die Boxen nicht dauerhaft kontaminiert wurden und die BSA nicht die Paste innerhalb der Subkolonie unkontrolliert verteilen konnten.

2.4.2.1 Applikation der HIPVs in den Pilzgarten

Für das Einbringen der Duftstoffe wurden aus Drahtgitter (Maschenweite: 1mm x 0.5 mm) vier rechteckige Träger für die Paste aus Lanolin mit oder ohne HIPVs geformt. Die zwei längeren Pasten-Träger besaßen eine Höhe von ca. 8 cm und eine Breite von 2 cm. Die kürzer geformten Gitter wiesen eine Höhe von 6 cm und eine Breite von 2 cm auf. Die Seitenränder der vier Pasten-Träger wurden jeweils um ca. 2 mm im rechten Winkel verbogen, so dass ein Abstand zum Boden der Pilzgartenboxen entstand. So konnten die verwendeten Pasten unterhalb der Pilzgarten-Träger exponiert und gleichzeitig Kontakt der BSA mit der Paste weitestgehend vermieden werden (Abb. 7). Das Gitter wurde für die Kontrolle mit purem Lanolin (Wollfett, Sigma-Aldrich, www.sigmaaldrich.com) und für die Behandlung mit angesetztem HIPV-versetztem Lanolin mit gleicher Menge (2 ml, 100 µl, 500 µl) präpariert.



Abb. 7 Duftstoffträger mit Paste

Die insgesamt vier präparierten Gitter (hier nur zwei zu sehen) wurden zwischen Pilzgartenträger und den Boden der Pilzbox gelegt. Dabei wurden die Duftstoffträger so angeordnet, dass die flüchtigen HIPVs die größtmögliche Fläche an Pilzmyzel beeinträchtigten.

Die Bestandteile an VOCs der HIPV-Lanolin-Paste wurden aus vorherigen Untersuchungen (Kost & Heil, 2006) übernommen. Die dafür notwendigen Duftstoffe wurden freundlicherweise vom Max-Planck-Institut in Jena zur Verfügung gestellt. Nach der Untersuchung von Kost & Heil (2006) sollte mit der versetzten Paste die natürliche HIPV-Emission einer Limabohne simuliert werden, die einer vor 24 Stunden eingetretenen Herbivorie ausgesetzt war. Dafür wurde die folgende möglichst realistische Zusammensetzung an VOCs pro 1 µl Lanolin verwendet: 0,12 µg (*R*)-(-)-Linalool, 0,13 µg β-Caryophyllen, 0,19 µg Methylsalicylat, 0,26 µg (*Z*)-Jasmon, 0,02 µg (*3Z*)-Hex-3-enylacetat, 0,85 µg (*E,Z*)-β-Ocimene (Mixtur aus (*E*)-Isomer (70%) und (*Z*)-Isomer (30%)), 0,63 µg (*3E*)-4,8-Dimethylnona-1,3,7-trien (DMNT) und 0,9 µg (*3E,7E*)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen (TMTT) (Kost & Heil, 2006). Die einzelnen Duftstoffe wurden mit Hilfe einer Glasspritze (Hamilton Exmire Micro Syringes ITO Corporation, Japan) und einer Feinwaage abgemessen. Sie wurden in eine 100 ml Schott-Flasche überführt, um eine Verdunstung der leicht flüchtigen Stoffe zu verhindern. Von der im Vorfeld bei ca. 60°C im Trockenschrank geschmolzenen Lanolin-Paste wurden 100 ml abgemessen und in die Schott-Flasche gegossen. Anschließend wurde die Flasche verschlossen und geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Duftstoffe in der abkühlenden Masse zu erlangen. Um einem Entweichen und so einer ungleichmäßigen Verteilung der Duftstoffe entgegen zu wirken, wurde die Schott-Flasche mit Parafilm (BEMIS® Company Inc., www.Trademarkia.com, USA) abgedichtet und bei -18°C gelagert. Für eine leichtere Dosierung des puren Lanolins und der HIPV-versetzten Paste auf dem Duftstoffträger wurden diese kurz angetaut und mit einem Spatel in je eine 20 ml Plastik-Spritze überführt. Die Spritzen wurden mit Parafilm (BEMIS® Company Inc., www.Trademarkia.com, USA) abgedichtet und wieder eingefroren. Für die Präparation der Duftstoffträger wurden die Spritzen ca. 20 Minuten vorher aus dem Gefrierfach entnommen und die notwendigen aufzutragenden Mengen an Paste wurden mit einer Waage bestimmt. Die Pasten wurden tropfenförmig aufgetragen, damit die Duftstoffe innerhalb der Subkolonien nicht zu schnell entweichen und somit bis zu über 48 Stunden gleichmäßig abgegeben wurden (persönliche Absprache mit Dr. Christian Kost). Nach der Präparation wurden die Duftstoffträger einer Behandlungsart wieder im Gefrierfach in einer Plastikbox zwischengelagert, um eine frühzeitige Diffusion der Duftstoffe zu vermeiden. Anschließend wurden die nächsten Gitter als Duftstoffträger präpariert.

Etwa alle 48 bzw. maximal alle 72 Stunden wurden die Duftstoffträger gewechselt. Sie wurden unter den Pilzgartenträger auf die Feuchtigkeitsversorgung gelegt, so dass die HIPVs die größte mögliche Fläche des Pilzgartens beeinflussen sollten.

2.4.2.2 Verwendete Volatilkonzentrationen (2 ml, 100 µl und 500 µl)

Die in der Natur auftretenden Konzentrationen an gebildeten Sekundärmetaboliten variieren familien-, gattungs- und artspezifisch (Fraenkel, 1959). So weist z.B. die in Südamerika beheimatete *Hymenaea courbaril* eine Konzentration an Caryophyllen von 3000 µg pro g Frischgewicht auf (Howard, *et al.*, 1988b). Die ebenfalls in Südamerika vorhandenen Pflanzen *Virola gardneri* (952 µg pro g Frischgewicht), *Tovomita mangle* (2698 µg pro g Frischgewicht) und *Thyrsodium spruceanum* (77 µg pro Frischgewicht) besitzen dagegen andere Konzentrationen in ihren Blättern (Urbas, 2004). Weiterhin stellte Urbas (2004) in *V. gardneri* die Konzentration von etwa 10 µg Ocimen pro g Frischgewicht fest. Chen *et al.* (1984) konnten dagegen in der südamerikanischen *Astronium graveolens* für Ocimen einen Wert von 120 µg pro g Frischgewicht nachweisen. Ansonsten ist nur noch bekannt, dass das Verhältnis von Caryophyllen zu Ocimen zu Linalool etwa 59 zu 3 zu 1 in *Pinus caribaea* beträgt (Barnola, *et al.*, 1994).

Somit müsste sich die eingesetzte Menge an Duftstoffen nach diesen Angaben richten und konnte in einem Rahmen von 10 µg bis zu 3000 µg liegen. Bei dem ersten experimentellen Durchgang wurde eine hohe natürliche Dosierung von 2 ml (entspricht ca. 2000 µg) der vollständigen HIPV-Mischung von *P. lunatus* gewählt. Aufgrund des unbekanntes Diffusionsverhältnisses innerhalb der Subkolonien wurde diese hohe Menge getestet. In dem zweiten Versuchsdurchgang wurde die Menge an eher geringe natürlich vorkommende Verhältnisse angepasst und auf 100 µl reduziert. In einem weiteren Versuchsansatz wurde eine mittlere Konzentration von 500 µl gewählt, die auch eine eher mittlere Konzentration an natürlich vorkommenden VOCs darstellt.

2.4.2.3 Experimentelle Aufnahmen

Insgesamt wurde mit den drei gewählten Konzentrationen (2 ml, 100 µl, 500 µl) jeweils ein Versuchsdurchgang durchgeführt (Tab. 1). Während der Versuchszeit wurden das Wachstum des Pilzgartens (Oberfläche und Gewicht) und zusätzliche Vitalitätsaufnahmen (Anzahl toter Arbeiterinnen) bei jedem Wechsel der Duftstoffträger aufgenommen. Vor einer Wachstumsmessung des Pilzgartens wurden alle erkenn-

baren Arbeiterinnen und Soldatinnen vorsichtig mit einer Federstahlpinzette abgesammelt. Sie wurden in eine mit Paraffinöl präparierten größeren Plastikbox zwischengelagert und nach allen Aufnahmen wieder auf ihren Pilzgarten gesetzt. Frischer Pilz, der eventuell in der Futterbox angebaut wurde, wurde auf die Gitterkonstruktion vorsichtig überführt. Um ein Maß für das Flächenwachstum des Pilzgartens zu erhalten, wurden alle fünf Oberflächen fotografiert. Diese Flächen bestanden aus der Aufsicht und den vier Seitenflächen. Die Bilder wurden später mit ImageJ (Opensource-Programm, entwickelt von Wayne Rasband, Bethesda, Maryland, USA) ausgewertet und alle fünf Flächen aufaddiert. Der angefallene Abfall, bestehend aus abgetragenen Pilz- und Blattmaterial und toten Arbeiterinnen, wurde von dem Träger abgesammelt und verworfen. Abschließend wurde der Pilzgarten mit Träger gewogen.

Vor dem ersten Versuchsdurchgang mit 2 ml HIPV-Paste wurden die Subkolonien für Voruntersuchungen (Präferenztests) eingesetzt, die aufgrund stark eingeschränkter Furagieraktivität der Subkolonien erfolglos verliefen. Von insgesamt zehn vorhandenen Subkolonien besaßen daher acht ein höheres Alter (ca. acht Wochen) als die für die beiden anderen Versuchsdurchgänge angelegten Subkolonien. Insgesamt erfolgte die Behandlung bei dem ersten Versuchsdurchgang über 18 Tage.

Bei dem zweiten Versuchsdurchgang (100 μ l) konnten bei einer vorläufigen Auswertung der Daten keine Effekte festgestellt werden, weshalb die Behandlung nach 9 Tagen abgebrochen wurde.

Bei dem dritten Versuchsdurchgang mit einer Konzentration von 500 μ l erfolgte die Behandlung wieder über einen Zeitraum von 18 Tagen. Zu den weiteren aufgenommenen Faktoren, wie Anzahl an toten BSA-Arbeiterinnen, wurde zusätzlich die Schneiderate der furagierenden Arbeiterinnen erfasst. Für die Bestimmung einer Schneiderate innerhalb der Subkolonien wurde die eingebrachte Blattmasse gewogen, wobei darauf geachtet wurde, dass die Blätter keine Feuchtigkeit auf ihrer Oberfläche aufwiesen. Bei jeder Fütterung wurden die übrig gebliebenen Blattfragmente gewogen. Dabei musste zusätzlich zu der Feuchtigkeit darauf geachtet werden, dass sich keine furagierenden Arbeiterinnen auf den Blättern befanden. Die inneren Schwankungen des Wasserhaushaltes der Blätter und Blattfragmente konnten bei dieser üblichen Fütterungs- und Wiegetechnik nicht differenziert werden.

Ein Temperaturabfall auf 22°C ereignete sich im Verlauf eines Tages nach einem Behandlungszeitraum von vier Tagen. Die Behandlung mit 500 µl HIPV-versetzter Lanolin-Paste wurde fortgesetzt, da die Temperatur sich nach kurzer Zeit wieder normalisiert hatte und keine weiteren größeren Schwankungen bei den Messungen erfasst wurden. Die Vitalitätszustände der Subkolonien blieben auch weitgehend stabil, weshalb die einmalige Temperaturschwankung nicht als maximal invasiv angesehen wurde.

Tab. 1 Erfolgte Behandlungen der *Atta colombica*-Subkolonien mit Volatilen von *Phaseolus lunatus*

Übersicht der erfolgten Behandlungen mit HIPV-versetzter Paste in den angesetzten Subkolonien. Insgesamt erfolgten drei Behandlungsdurchgänge mit den gewählten Konzentrationen von 2 ml, 100 µl und 500 µl. Alle Konzentrationen liegen im Rahmen der möglichen natürlichen Konzentrationen (10 µg - 3000 µg). Der Behandlungszeitraum wird in Tagen [d] und die aufgewendete Etablierungszeit in Wochen angegeben. Die Anzahl der verwendeten Subkolonien mit Kontrollbehandlung (K) aus purem Lanolin und der Behandlung mit der HIPV-versetzten Lanolin-Paste (B) wurden pro Behandlungstyp vermerkt. Die erfolgten Wachstums- und Vitalitätsaufnahmen pro Konzentration wurden einzelnen aufgelistet.

Behandlung	Etablierungszeit [Wochen]	Behandlungszeitraum [d]	Subkolonien [Anzahl pro K / B]	Aufnahmen	Anmerkungen
2 ml	8	18	5 / 5	Gewicht, Fläche, tote Arbeiterinnen	Bis auf 2 neu gegründete Subkolonien, höheres Alter
100 µl	2	9	6 / 6	Gewicht, Fläche, tote Arbeiterinnen	Abbruch nach 9 Tagen
500 µl	1	18	6 / 6	Gewicht, Fläche, tote Arbeiterinnen, Schneiderate	Nach 4 Tagen Temperaturschwankung

2.5 Versuch 3: Messungen des Duftstoffgehalts von HIPV-induzierten Blattfragmenten (*Phaseolus lunatus*) und HIPV-versetzter Lanolin-Paste (100 µl)

Diese Untersuchung beschäftigte sich mit den *in situ*-HIPV-Konzentrationen im Luftraum eines BSA-Pilzgartens. Die Messungen sollten darüber Aufschluss geben, mit welchen HIPV-Mengen *L. gongylophorus* tatsächlich konfrontiert wurde, wenn er induzierten Limabohnenblättern oder HIPV-Paste ausgesetzt war. Die in Blättern bzw. HIPV-Paste angesetzten Konzentrationen waren ja aufgrund unbekannter Diffusions- und Verdünnungseffekte nicht voraussagbar. Auch wurde der Emissionsgehalt dieser beiden Duftemittenten zuvor noch nicht bestimmt. Die bisher durchgeführten Duftstoffmessungen wurden zumeist mit ganzen Limabohnenpflanzen, die der Herbivorie oder anderen Induktionsarten (Aigner, 2007; Tremmel, 2008) ausgesetzt waren, durchgeführt. Dabei wurden Bratenschläuche (Toppits®, Melitta®-Gruppe, Minden) verwendet, die keine eigenen Duftstoffe abgeben und somit keine Störungen bei den Messungen hervorriefen.

In diesem Versuchsteil wurden Limabohnen der gleichen Gewächshauspopulationen wie bei der Untersuchung der Nahrungspräferenzen verwendet. Die Behandlung der zu testenden Limabohne entsprach dem der behandelten Test-Pflanze aus dieser Untersuchung (Kap. 2.3.1). Zusätzlich wurde darauf geachtet, die Blattfragmente nicht mit zusätzlichen Geruchstoffen der menschlichen Haut oder der Umgebung zu kontaminieren. Daher wurden sie nur mit Handschuhen berührt und bearbeitet bzw. aufgetragen.

Aufgrund von logistischen Problemen konnten diese Messungen erst nach der Behandlung der Subkolonien mit den HIPVs von *P. lunatus* (Kap. 2.4) durchgeführt werden.

2.5.1 Aufbau und Durchführung

Die Untersuchung ähnelte in den Ansätzen den bisher durchgeführten Studien von Aigner (2007), Tremmel (2008) und Stephan (2010). Wie im zweiten Versuch wurde die zu untersuchende Limabohne 24 Stunden vor den Messungen mit dem Gemisch aus ein-molarer JA und reinem destilliertem Wasser behandelt. Die Blattfragmente wurden mit einem handelsüblichen Locher (Leitz®, Esselte, Uelzen) ausgestanzt. In eine Glaspetrischale wurde auf ein feuchtes Wattepad ein Filter (Durchmesser ca. 5.5 cm) gelegt. Durch das Wattepad sollten die Blattfragmente für die 24 Stunden mit

ausreichender Feuchtigkeit versorgt sein. Das Filterpapier wurde dann mit ausgestanzten Blattfragmenten bedeckt. Für die Messungen der HIPV-Lanolin-Paste wurden ca. 100 µl auf das Filterpapier aufgetragen. Die Petrischale mit den Blattfragmenten oder der HIPV-Paste wurde anschließend in einen Bratenschlauch (Toppits®, Melitta®-Gruppe, Minden) gestellt, dessen Außenseiten mit doppelseitigem Klebeband (Tesa® SE, Beiersdorf) an den Innenseiten der für die Subkolonien aus Versuch 2.2 verwendete Plastikbox befestigt wurde (Abb. 8). Somit sollte ein Volumen von ca. 400 ml in dem Bratenschlauch sicher gestellt werden. Die offenen Ränder des Bratenschlauchs wurden durch die Öffnung der Plastikbox gezogen. Das Ansaug- und Ausstromrohr der Pumpe wurden in den Bratenschlauch durch die Öffnung der Plastikbox eingeführt. Abschließend wurde der Aktivkohlefilter (1,5 mg Aktivkohle, CLSA-Filter, Le Ruisseau de Montbrun, Damauzan sur Aurize, Frankreich) in die Pumpe eingesetzt und der Bratenschlauch an den beiden Rohren festgebunden, so dass keine Luft von außerhalb eintreten konnte. Die vier präparierten Pumpen mit den Plastikboxen wurden für 24 Stunden im hellen Gewächshaus platziert und aktiviert. Nach einem Tag wurde die Apparatur im Gewächshaus abgebaut und die Kohlefilter wurden luftdicht verpackt. Insgesamt wurden vierzehn Durchgänge mit den Blattfragmenten und dreizehn mit der HIPV-Paste gemessen. Die Eluierung der Duftstoffe und die abschließende Reinigung der Aktivkohlefilter erfolgten identisch den Angaben aus der Studie von Aigner (2007). Nach Abschluss der Eluierung lagen die Duftstoffe in 20 µl einer Lösung von mit n-Bromdecan versetztem Dichlormethan

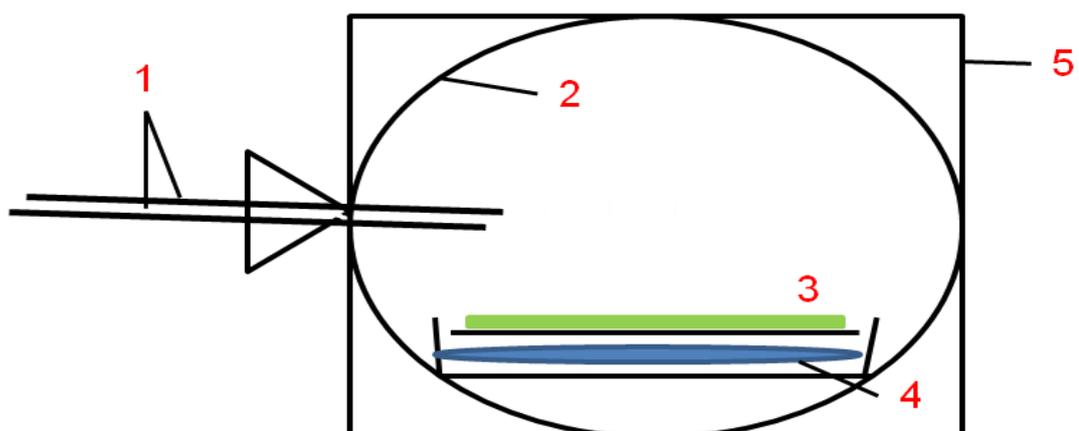


Abb. 8 Schematischer Versuchsaufbau der Duftmessungen von *Phaseolus lunatus*-Blattfragmenten und HIPV-versetzter Lanolin-Paste

Darstellung des modifizierten Versuchsaufbaus für die Messungen der emittierten Duftstoffe von ausgestanzten Blattfragmenten der Limabohne und der HIPV-versetzten Lanolin Paste. Dabei stellte 1 das Ansaug- und Ausstromrohr der Pumpe dar. 2 war der in 5 (Plastikbox: 9 x 9 x 6 cm) fixierte Bratenschlauch, der ungefähr ein Luftvolumen von 400 ml enthielt. 3 ist der verwendete Emittent, der auf das Filterpapier aufgetragen (Paste) wurde oder vollständig das Filterpapier (ca. 24 cm²) bedeckte. 4 war die feuchte Watte, die das Filterpapier mit Wasser versorgen sollte und sich in einer Glaspetrischale befand.

vor. Diese Lösung wurde im Mikroeinsatz einer Schraubampulle (Fassungsvermögen 1 ml) bei -18°C eingefroren. Die Proben wurden gekühlt an das MPI für Chemische Ökologie (Jena) geschickt. Dort wurden die Proben freundlicherweise von Dr. Christian Kost mit Hilfe einer GC-MS-Analytik (Thermo Scientific ITQ 900, Thermo, Bremen) analysiert. Diese Apparatur besteht aus einem Gas-Chromatographen (GC), der mit einem Massenspektrometer (MS) gekoppelt wurde.

Die Gaschromatographie wurde von Cremer (1950) als Gas-Adsorptionschromatographie vorgestellt. Sie gilt als eine effiziente Trennmethode, bei der ein gelöstes Substanzgemisch mit Hilfe eines Gasstromes über eine stationäre Phase geleitet wird. Die Probe wird dabei in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt und als Trägergas wird hauptsächlich Helium verwendet. Eine 10 - 50 m lange Quarzsäule (Innendurchmesser von etwa 0.2 mm) bildet die stationäre Phase, die von innen mit einem Trennmaterial belegt ist. Nach einer bestimmten Zeit (Retentionszeit) verlassen die Einzelkomponenten der Probe die Trennsäule und werden daraufhin mit einem Detektor analysiert. Das oft direkt an den GC gekoppelte MS kann die Molekülmassen bestimmen. Das MS besteht aus einer Ionenquelle, in der die gasförmigen Moleküle ionisiert werden, einem Massenanalysator, der die Ionen nach ihrem Masse/Ladungszahl-Verhältnis (m/z) auftrennt und einem Detektor, der die Intensität der erzeugten Ionen misst (Lottspeich & Zorbas, 1998). Mit Hilfe von verschiedenen Methoden kann die Ionisierung der Moleküle durchgeführt werden.

Bei dem in Jena verwendeten Gerät handelte es sich um die Elektronenstoßionisation. Die Analyseergebnisse bestehen aus einem für jede Substanz charakteristischen Massenspektrogramm (Kap. 6.1). Zur Ermittlung der Zusammensetzung und den relativen Mengen der Duftstoffe, die von der HIPV-Paste und den *P. lunatus* Blattfragmenten emittiert wurden, wurde das Programm XCalibur (Finnigan Corporation, Australien) verwendet. Die Flächen unterhalb jedes substanzspezifischen Peaks im Massenspektrogramm wurden mit diesem Programm bestimmt. Der Quotient aus der Fläche des spezifischen Duftstoffes und der Fläche unter dem Peak der Referenzsubstanz n-Bromdecan wurde gebildet, um einen Referenzwert für den Duftstoff zu erhalten. Die folgenden Umrechnungsmethoden werden im folgenden Kapitel 2.6 weiter ausgeführt.

2.6 Auswertung und Statistik

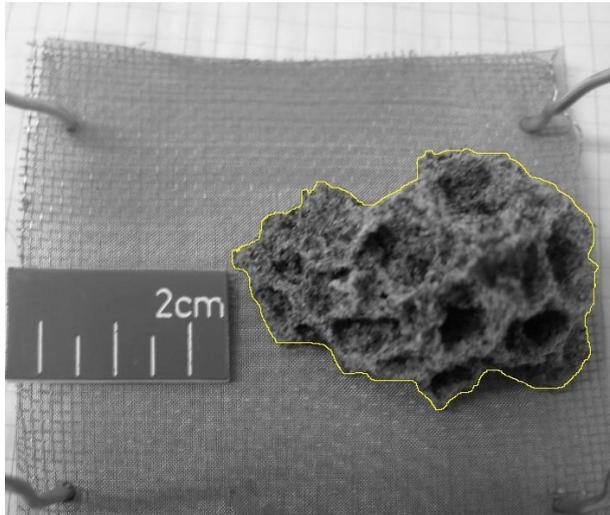


Abb. 9 Auswertung der fotografierten Pilzoberflächen mit ImageJ

Die Umrisse des Pilzes wurden per Hand nachgezeichnet. Mit Hilfe des Maßstabs konnte die Fläche berechnet werden. Für die vollständige Erfassung des Pilzwachstums wurden die Oberflächen standardisiert aus fünf Richtungen (Aufsicht und 4 Seitenansichten) erfasst und anschließend aufaddiert.

Die Auswertung des vollständigen Bildmaterials der Pilzwachstums- und Blattflächenaufnahmen wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (Opensource-Programm, entwickelt von Wayne Rasband, Bethesda, Maryland, USA) durchgeführt. Bei der Auswertung des Pilzwachstums wurden die fünf Oberflächen per Hand konturiert und die Flächen berechnet (Abb. 9). Die Bestimmung von Mittelwert, Standardabweichung und des Bestimmtheitsmaßes (R^2) der Daten wurden mit Excel (MS Office 2007) und die Statistik wurde mit STATISTICA 10 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA) berechnet. Das abfotografierte Blattmaterial wurde mit Hilfe

der „*Threshold-Funktion*“ erfasst und die Fläche berechnet. Stiele und andere störende Elemente wurden zuvor aus dem Bild gelöscht. Die in zwei Durchgängen konturierten Blätter wurden als Papierschablonen ausgeschnitten und mit einem Blattflächenmessgerät (LI-3100, Li-Cor, Nebraska, USA) ausgewertet.

Für die statistische Auswertung wurden alle Daten mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung überprüft. Die Varianzhomogenität der Daten wurde mit dem Levene-Test bestimmt. Wenn die beiden Voraussetzungen gegeben waren, konnten die parametrischen Varianzanalysen erfolgen. Erfüllten die Daten trotz Transformation nicht die Anforderungen, wurden nicht-parametrische Analysemethoden verwendet.

Die prozentual gefressenen Blattflächen jeweils von Kontroll- und Versuchspflanzen der beiden *Atta colombica* Kolonien aus den Bioassays wurden zur Ermittlung der Fraßpräferenz (Versuch 1; Kap. 2.3) mit einem gepaarten t-Test geprüft. Die Kolonien wurden gegenüber abhängigen Kontroll- und Versuchspflanzen im gleichen Durchgang an einem Tag getestet, weshalb die Daten als abhängig voneinander de-

klariert wurden. Da in bisherigen Untersuchungen keine Koloniereffekte erkannt wurden (Tremmel, 2008), wurden die Daten der Kolonien zusammengelegt.

Die erfassten Daten über die gravimetrischen und flächenbezogenen Änderungen des Pilzgartens aus der Untersuchung der Auswirkungen von HIPVs auf die Pilzgärten (Kap. 2.4) wurden mit Hilfe einer 1-faktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen analysiert. Die Interaktionen zwischen den Faktoren Behandlung und Zeit waren von Interesse. Dabei galten der relative Zuwachs von Fläche und Gewicht der Pilzgärten jeweils als abhängige Variable. Zeit und Behandlung wurden als die unabhängigen Variablen festgelegt. Obwohl die Voraussetzungen (Varianzhomogenität und Normalverteilung) für eine ANOVA nicht in Vollständigkeit (etwa 1/3 der Daten nicht normalverteilt) gegeben waren, wurde die ANOVA als legitim angesehen. Das statistische Modell der 1-faktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen im Vergleich zu separaten nicht-parametrischen Tests, die eine gleichzeitige Einbeziehung des Wiederholungsfaktors, des Haupteffektes und der Behandlung x Zeit-Interaktion nicht erlauben, wird den vorliegenden Daten eher gerecht. Der Fakt, dass die ANOVA sehr robust ist gegenüber leichten Verletzungen der Normalverteilungs- oder Varianzhomogenitätsannahmen (Fry, 1993; Zar, 1996) und die tendenziell gleichen Ergebnisse der nicht-parametrischen Test veranlassten mich dazu, dieses Testverfahren trotzdem anzuwenden. Die Verhältnisse zwischen den gravimetrischen und den flächenbezogenen Änderungen des Pilzgartens in Bezug auf die Anzahl an toten Arbeiterinnen wurden mit Hilfe von Regressionen dargestellt. Dabei wurde der relative Anteil an toten BSA-Arbeiterinnen als abhängiger Faktor gewählt, der durch die Veränderung der Pilzoberfläche bzw. des –gewichtes erklärt wird. Die Schneiderate der behandelten Subkolonien wurde wie die prozentualen geschnittenen Blattflächen der Mutterkolonien während der Nahrungspräferenztests mit einem gepaarten t-Test überprüft. Die Korrelationsgraphiken wie auch die Diagramme aus den Wachstums- und Vitalitätsaufnahmen bei der Verabreichung von HIPVs an die Pilzgärten der Subkolonien (Kap. 2.4.2.3) wurden mit Hilfe von Excel (MS Office 2007), PowerPoint (MS Office 2007) und Paint (Windows 2007) erstellt und bearbeitet.

Der Referenzwert (Kap. 2.5.1) für die einzelnen Duftstoffe aus den Duftstoffmessungen von HIPV-Paste (100 µl) und Limabohnen-Blattfragmenten wurde auf die Menge an gelösten Stoffen umgerechnet. Anschließend wurde die freigesetzte Volatilmenge pro 1 cm² oder µl bestimmt. Ergänzend wurde die prozentuale Duftstoffmenge pro 1

cm² oder µl ermittelt. Die errechneten Daten für die einzelnen Duftstoffe erwiesen sich trotz Transformierung als nicht normalverteilt und varianzhomogen. Darum wurden die einzelnen Emissionsmengen (ng / 24h) der detektierten Duftstoffe der beiden Emittenten miteinander per Wilcoxon-Test für abhängige Datensätze überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Furagierverhalten von naiven Kolonien gegenüber induzierten Limabohnen

Für die Untersuchung der Nahrungspräferenz der naiven *A. colombica*-Kolonien wurden die geschnittenen Blattfragmente per Hand abgesammelt, um eine Information des Pilzgartens und eine Informationsweiterleitung von einem „HIPV-erfahrenen“ Pilz zu unterbinden. Während der Untersuchung waren keine Anzeichen erkennbar, die auf eine ungeplante Informierung des Pilzes hinwies, wie z.B. eine verringerte Eintrags- oder Schneiderate der Arbeiterinnen (Tremmel, 2008). Zu Beginn der Tests war das Furagierverhalten der Arbeiterinnen von Kolonie 2 stark gemindert, verbesserte sich aber nach ca. acht Wochen. Darum konnte die Replikationsanzahl noch auf sieben erhöht werden. Kolonie 1 zeigte dagegen keine Schwankungen in ihrer Aktivität beim Furagieren. Darum konnte ihre Präferenz insgesamt acht Mal getestet werden.

Atta colombica Arbeiterinnen, deren Pilzgarten keinen Kontakt zu HIPV-induziertem Pflanzenmaterial hatte, wiesen bei den durchgeführten Dual-Choice-Assays ein indifferentes Furagierverhalten gegenüber den induzierten Pflanzen im Vergleich mit Kontrollpflanzen auf. Dies zeigte sich daran, dass die eingesetzten Kolonien im statistischen Mittel in etwa gleich viel Blattfläche von den behandelten ($28.868 \text{ cm}^2 \pm 16.102$) und den Kontroll-Pflanzen ($24.139 \text{ cm}^2 \pm 16.33$) ernteten (Abb. 10). Der berechnete MAI der Präferenz der BSA gegenüber angebotenen Limabohnen $0.562 (\pm 0.247)$ beweist damit, dass die Arbeiterinnen keinerlei direkte Ablehnung oder Präferenz zeigen. Nur eine minimale Bevorzugung der JA-induzierten Limabohnen ging von den Arbeiterinnen aus (Abb. 10). Somit kann die erste Hypothese bestätigt werden, dass naive *A. colombica* Arbeiterinnen mit HIPV-unerfahrenem Pilz keine induzierten Pflanzen diskriminieren.

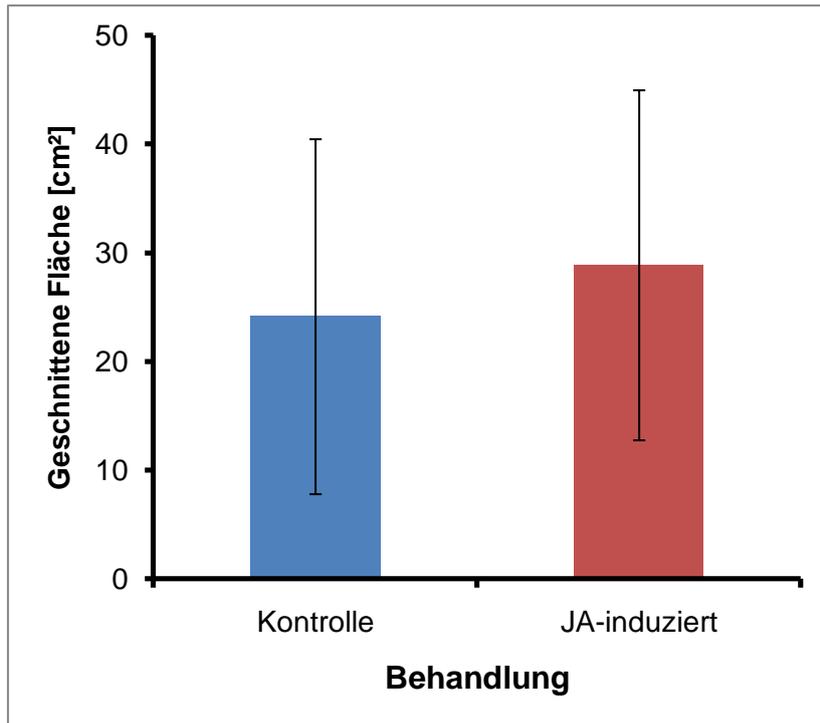


Abb. 10 Nahrungspräferenz der naiven *Atta colombica* Kolonien

Zu erkennen ist das statistische Mittel mit Standardabweichung der geschnittenen Blattflächen der Kontrollpflanzen (blau) und der JA-induzierten Limabohnenpflanzen (rot). Bei einem statistischen Vergleich (gepaarter t-Test) konnte gezeigt werden, dass sich die geschnittenen Anteile der Blattflächen nicht signifikant voneinander unterscheiden ($n = 15$; $P = 0.408$). Der ermittelte MAI der BSA gegenüber den angebotenen Testpflanzen betrug $0.562 (+/-0.247)$ und zeigt keinerlei direkte Präferenz oder Ablehnung. Nur eine geringe Bevorzugung der JA-induzierten Limabohnen geht von den Arbeiterinnen aus.

3.2 Versuch 2: Auswirkungen von HIPVs auf Pilzgärten in situ

3.2.1 HIPV-Behandlung der Subkolonien mit einer Konzentration von 2 ml

Nach dem Einbringen von 2 ml an purem Lanolin (Kontrolle; $n = 5$) bzw. HIPV-versetztem Lanolin (Behandlung; $n = 5$) wurden die Veränderungen der Pilzoberfläche und des Gewichtes der Pilzgärten aufgezeichnet. Die Anzahl der toten BSA wurde als weiteres Vitalitätsmerkmal festgehalten. Bis auf zwei neu etablierte Subkolonien wiesen die nach den Voruntersuchungen verbliebenen Subkolonien ein Durchschnittsalter von ca. acht Wochen auf. Nach einem Behandlungszeitraum von vier Tagen wurde der Pilzgarten einer der mit HIPVs behandelten Subkolonien als letal beurteilt und die nicht mehr überlebensfähige Subkolonie wurde von den weiteren Aufnahmen ausgeschlossen. Im weiteren Verlauf wurden die Pilzgärten in zwei Kontroll-Subkolonien und zwei HIPV-Behandlungen versehenen Subkolonien als nicht mehr überlebensfähig befunden. Sie wurden ebenfalls von allen weiteren Aufnahmen ausgeschlossen. Somit reduzierte sich im Untersuchungsverlauf die Zahl der zur Verfügung stehenden Subkolonien auf fünf Stück (drei Kontrollen und zwei HIPV-Behandlungen).

Das Pilzwachstum zeigte bei den gewählten Faktoren Gewicht und Oberfläche des Pilzgartens einen fortlaufenden Rückgang bei Kontroll- und HIPV-behandelten Subkolonien. Dabei nahm das Gewicht bei den Kontroll-Subkolonien im Mittel um 8.49 % (± 6.215) und bei den Behandlungen um 9.684 % (± 7.794) ab. Die Flächen verringerten sich bei den Kontrollen um 7.763 % (± 5.53) und bei den Behandlungen um 9.172 % (± 5.426) im Mittel. Insgesamt verringerte sich die ursprüngliche Oberfläche der Pilzgärten der Kontroll-Subkolonien um 62.107 % (± 20.081) und die der HIPV-behandelten Subkolonien um 73.376 % (± 14.944) im statistischen Mittel. Das Startgewicht der Pilzgärten der Kontroll-Subkolonien nahm um 67.921 % (± 14.127) und das der HIPV-behandelten um 77.474 % (± 11.186) ab. Schon die mittleren und die gesamten Abnahmen der beiden Wachstumsfaktoren belegen die geringen Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlung. Bei der statistischen Auswertung ergab sich auch kein signifikanter Effekt der Interaktion der beiden Faktoren Behandlungsdauer und HIPV-Behandlung (Abb. 11). Dies belegt statistisch die augenscheinliche Tatsache, dass der Rückgang des Pilzgartens sowohl in den Kontrollen als auch in den behandelten Subkolonien stattfand. Die Versuchsdauer wies alleine ei-

nen signifikanten Effekt auf die (negative) Entwicklung der beiden Wachstumsfaktoren auf. Die während der Behandlung erfasste Anzahl toter Arbeiterinnen wurden mit den messbaren physikalischen Änderungen des Pilzgartens in Beziehung gesetzt, um Hinweise auf die Mortalitätsursachen zu untersuchen. Bei den Kontroll-Subkolonien konnte die sinkende Sterberate der BSA-Arbeiterinnen um 54 Prozent signifikant mit der Abnahme des Pilzgartens (Gewichtes und Oberfläche) in Beziehung gebracht werden (Abb. 12). Bei der Behandlung mit HIPV-versetzter Lanolin-Paste fielen die Beziehungen schwächer aus (ca. 40% bei B und D). Die Abnahme an sterbenden Arbeiterinnen hängt wohl von einer hohen Sterberate zu Versuchsbeginn ab. Aufgrund der kleineren Zahl an Subkolonien nach dem Absterben von fünf Subkolonien reduzierte sich auch die prozentuale Sterberate. Durch die wohl größere Anzahl an Subkolonien lag die durchschnittliche prozentuale Sterberate meistens höher bei der Kontrolle (Abb. 13). Die HIPV-behandelten Subkolonien erreichten und überschritten bei keiner Aufnahme die anfängliche Sterberate.

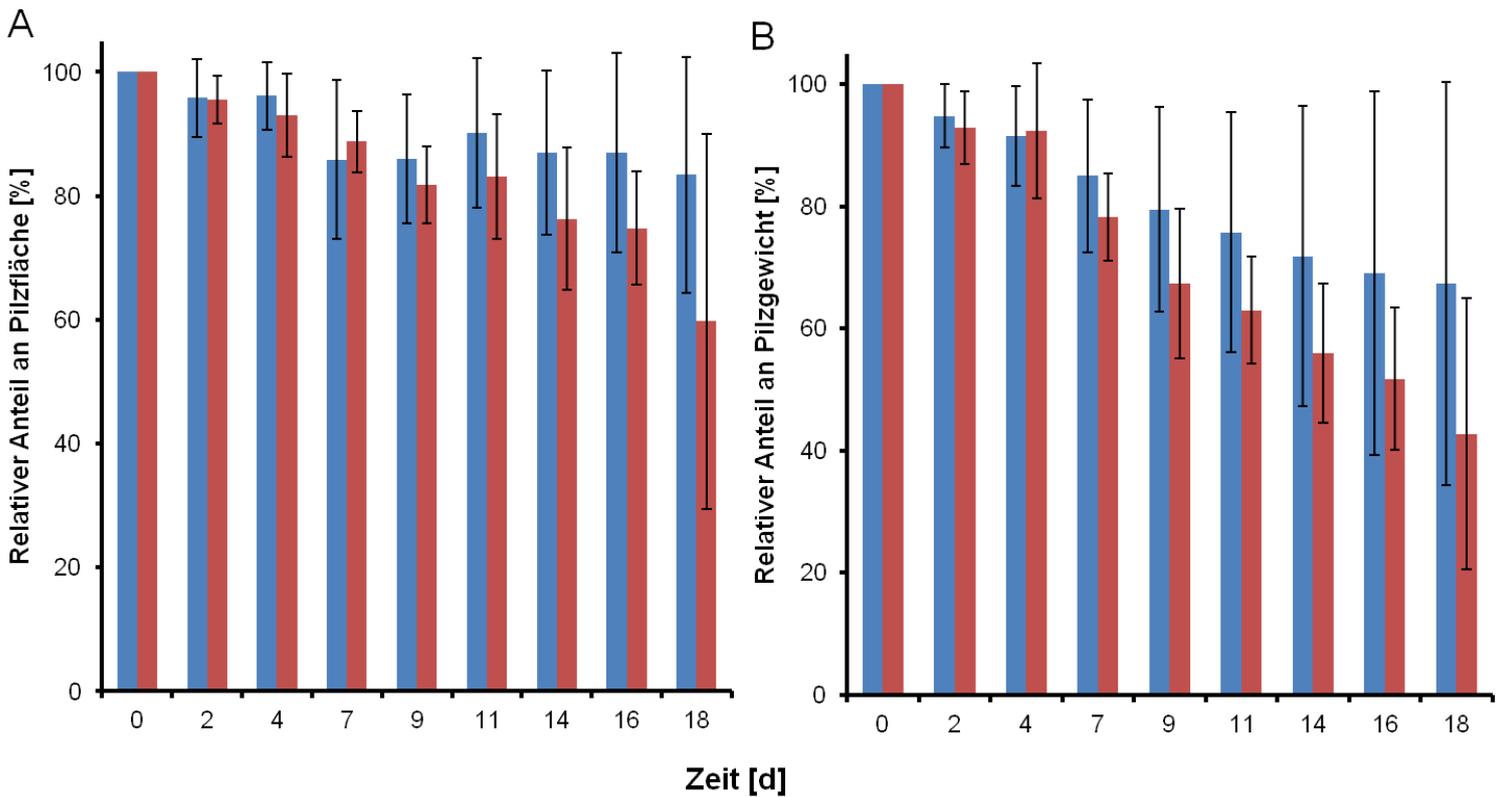


Abb. 11 Zeitlicher Verlauf des Pilzgartenwachstums in Subkolonien von *A. colombica* bei kontinuierlicher Einwirkung simulierter HIPV-Emissionen der Limabohne.

Die Behandlung bestand aus 2 ml einer HIPV-versetzten Lanolin-Paste (höchste Dosis in dieser Studie; rot dargestellt). Die relative Wachstumsveränderungen wurden auf der Ausgangsoberfläche- (A) und auf die Ausgangsgewicht (B) der Pilzgärten zu Beginn der HIPV-Behandlung ausgedrückt und hier im statistischen Mittel mit Standardabweichung dargestellt. Im Mittel verringerte sich die Oberfläche der Kontroll-Subkolonien um 7.763 % (+/-5.53) und der HIPV-behandelten Subkolonien um 9.172 % (+/-5.426). Die mittlere prozentuale Abnahme des Pilzgewichtes bei der Kontrolle betrug 8.49 % (+/-6.215) und bei der Behandlung 9.684 % (+/-7.794). Die statistischen Auswertung mit einer 1-faktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen konnte eine signifikante Auswirkung der Behandlungsdauer auf die negative Gewichts- ($P = 0.000$) und Oberflächenveränderung ($P = 0.000$) bei Kontrolle und Behandlung belegen. Die Behandlungsweisen wiesen hingegen keine signifikanten Effekte auf (Gewicht: $P = 0.611$; Fläche: $P = 0.515$; $n = 5$ zu Beginn), wobei die Anzahl der Subkolonien sich bis zum Ende der Behandlung hin halbierte (Kontrolle: $n = 2$; Behandlung: $n = 3$). Statistisch konnte auch keine Interaktion zwischen der Dauer und der Behandlung nachgewiesen werden (Fläche x Zeit: $P = 0.95$, FG = 7; Gewicht x Zeit: $P = 0.93$, FG = 7, $n = 5$).

Ergebnisse

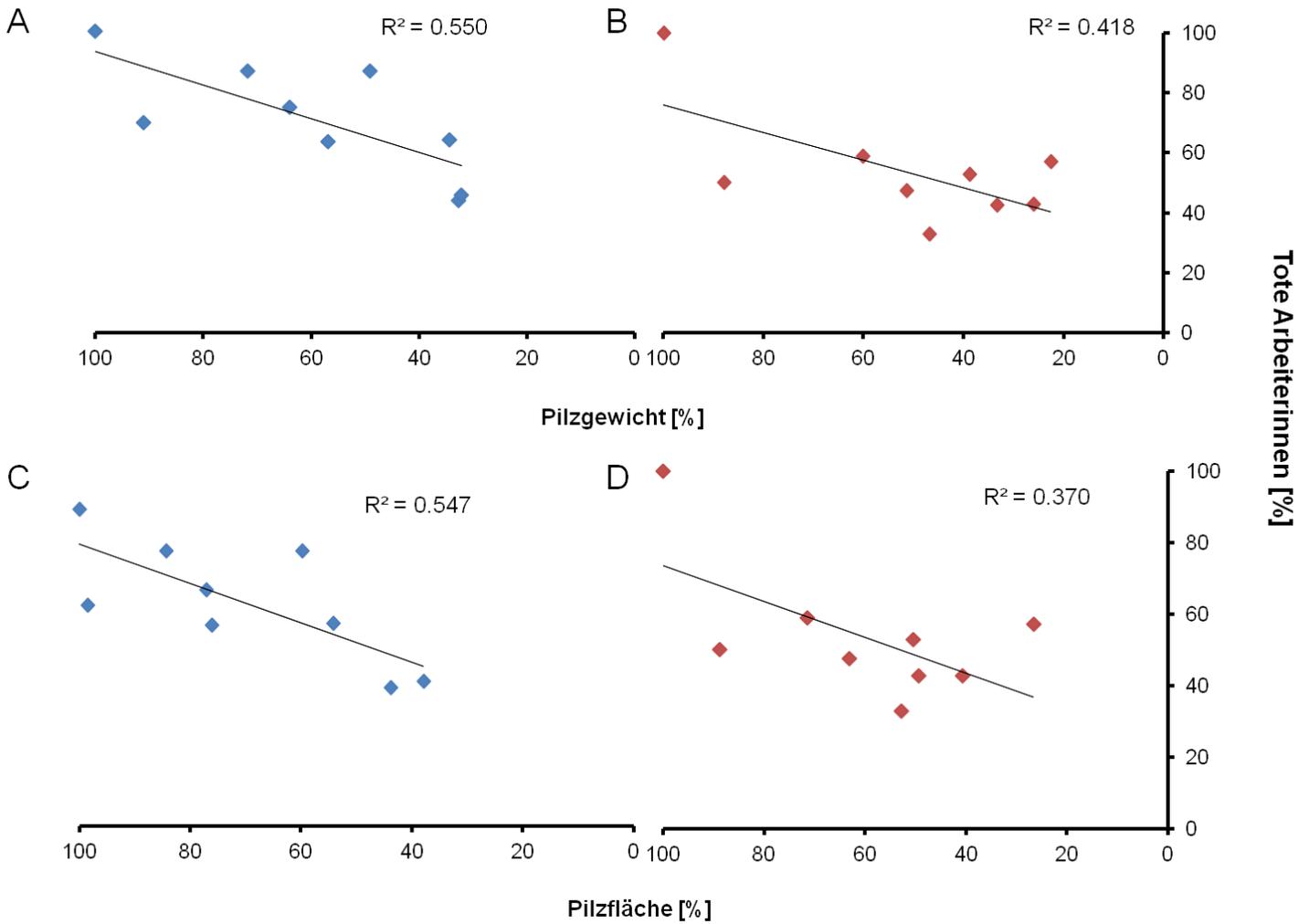


Abb. 12 Regressionen zwischen der Mortalität der Arbeiterinnen und den Wachstumsfaktoren der *Atta colombica* Subkolonien bei kontinuierlicher Einwirkung simulierter HIPV-Emissionen der Limabohne

Abhängigkeit der Mortalität von *A. colombica*-Arbeiterinnen und dem Pilzwachstum bei einer Behandlung von 2 ml HIPV-versetzter Paste (rot dargestellt). Für alle Kontroll-Subkolonien und behandelten Subkolonien konnte eine signifikante Effekt oder eine nicht signifikante Tendenz für die erklärende Beziehung zwischen der abnehmenden Anzahl an toten Arbeiterinnen und dem Pilzrückgang festgestellt werden. Dabei fiel bei den behandelten Subkolonien (Regression: Fläche: $P = 0.082$; Gewicht: $P = 0.06$; $n = 5$) das erklärende Ausmaß dieser Beziehungen geringer und nur tendenziell aus als bei den Kontroll-Subkolonien (Regression: Fläche: $P = 0.023$; Gewicht: $P = 0.022$; $n = 5$). Die Abnahme der Sterberate der Arbeiterinnen lässt sich wohl auf das höhere Alter der Subkolonien zurückführen und die schwindende Anzahl der etablierten Subkolonien.

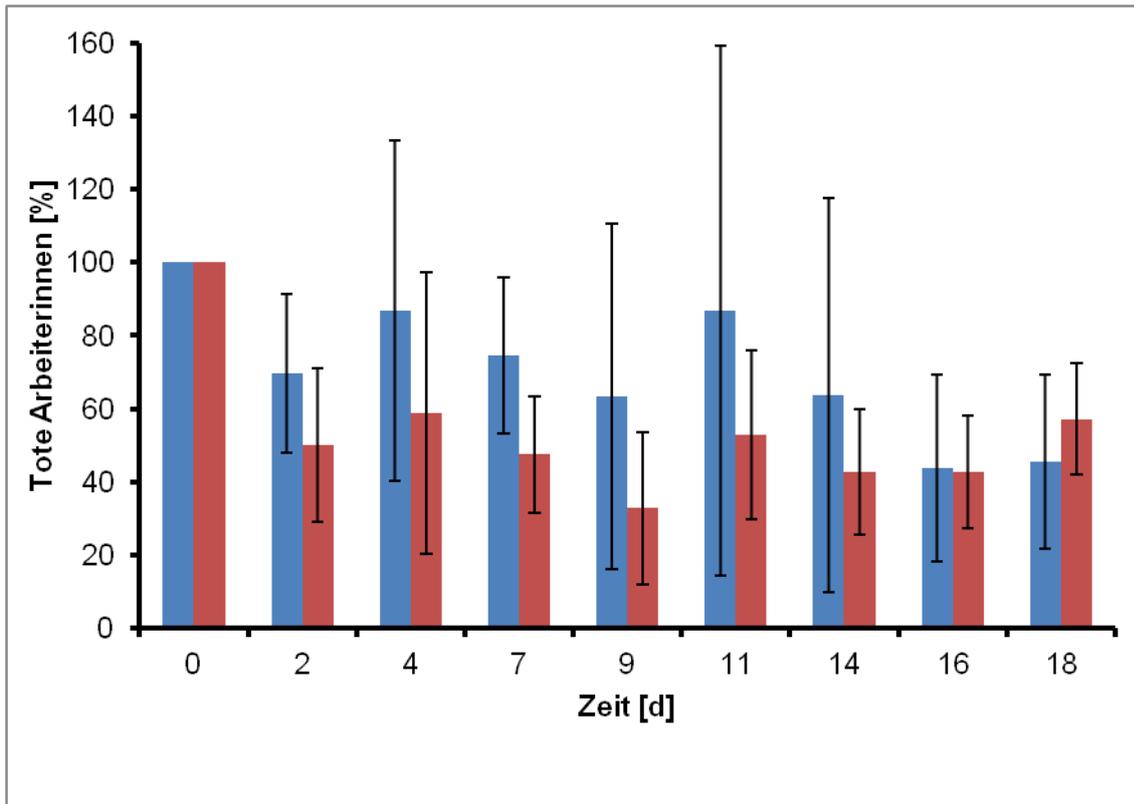


Abb. 13 Zeitlicher Verlauf des prozentualen Anteils an toten Arbeiterinnen in Subkolonien von *A. colombica* bei kontinuierlicher Einwirkung simulierter HIPV-Emissionen der Lima-bohne

Der prozentuale Anteil an toten Arbeiterinnen ist über die Versuchsdauer im statistischen Mittel mit Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung mit einer 1-faktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen ergab einen signifikanten Effekt durch die Versuchsdauer ($P = 0.043$; $FG = 7$; $n = 10$). Die Behandlung hatte leichte tendenzielle Einflüsse auf die Anzahl an toten Arbeiterinnen ($P = 0.111$; $FG = 1$; $n = 10$). Die Interaktion zwischen Versuchsdauer und Behandlungseffekten wies dagegen keine Signifikanz auf (tote Arbeiterinnen: $P = 0.702$; $FG = 7$; $n = 10$). Das während der Versuchsdauer zunehmende Alter und die abnehmende Anzahl der Subkolonien haben einen Einfluss auf die Anzahl an toten Arbeiterinnen, die möglicherweise durch die Behandlung verstärkt wurden.

3.2.2 HIPV-Behandlung der Subkolonien mit einer Konzentration von 100 μ l

Für diesen Behandlungszeitraum wurde eine geringere natürliche HIPV-Konzentration von 100 μ l gewählt. Insgesamt wurden sechs Kontroll-Subkolonien und sechs behandelte Subkolonien etabliert. Neben den Wachstumsaufnahmen des Pilzgartens wurde die Anzahl toter Arbeiterinnen aufgenommen. Nach einer vorläufigen Auswertung der Wachstumsaufnahmen wurde aufgrund mangelnder Anzeichen einer Beeinflussung der behandelten Pilzgärten die Untersuchung mit dieser Konzentration nach neun Tagen abgebrochen.

Die verkürzte Behandlungsdauer wies bei dieser gewählten Konzentration einen Effekt auf die Wachstumsfaktoren auf (Abb. 14). Obwohl die Oberfläche der Pilzgärten keine großen Veränderungen aufwies und sogar die Ausgangsflächen überstieg, sank das Gewicht des Pilzes kontinuierlich bis zu einem Verlust von insgesamt 20.524 % (+/-3.33) bei den Kontroll-Subkolonien und bis zu 24.55% (+/-2.974) bei den mit HIPVs behandelten Kolonien. Die nicht signifikante Interaktion zwischen Behandlungsdauer und der gewählten Konzentration von 100 μ l ist ein Indiz dafür, dass der leichte Rückgang des Gewichtes und die kaum veränderliche Oberfläche des Pilzgartens bei Kontroll- und HIPV-behandelten Subkolonien auftraten. Die Behandlung selbst hatte, wie auch augenscheinlich beobachtet wurde, keine signifikanten Auswirkungen auf das Pilzwachstum. Zusätzlich weist die abnehmende Mortalität der Arbeiterinnen (Abb. 15) trotz des leicht sinkenden Pilzgewichtes daraufhin, dass die Effekte der HIPVs auf die Pilzgärten sehr gering ausfielen oder überhaupt nicht vorhanden waren. Somit konnten auch keine verwendbaren Beziehungen zwischen den Wachstumsfaktoren und der Arbeiterinnen-Mortalität gezogen werden (Abb. 15). Die Abnahme des Pilzgewichtes scheint hauptsächlich durch die Behandlungsdauer beeinflusst worden zu sein. Die anderen aufgenommen Faktoren (Arbeiterinnen-Mortalität und Pilzoberfläche) zeigten keinerlei Beeinflussung durch die Behandlung mit einer HIPV-Konzentration von 100 μ l.

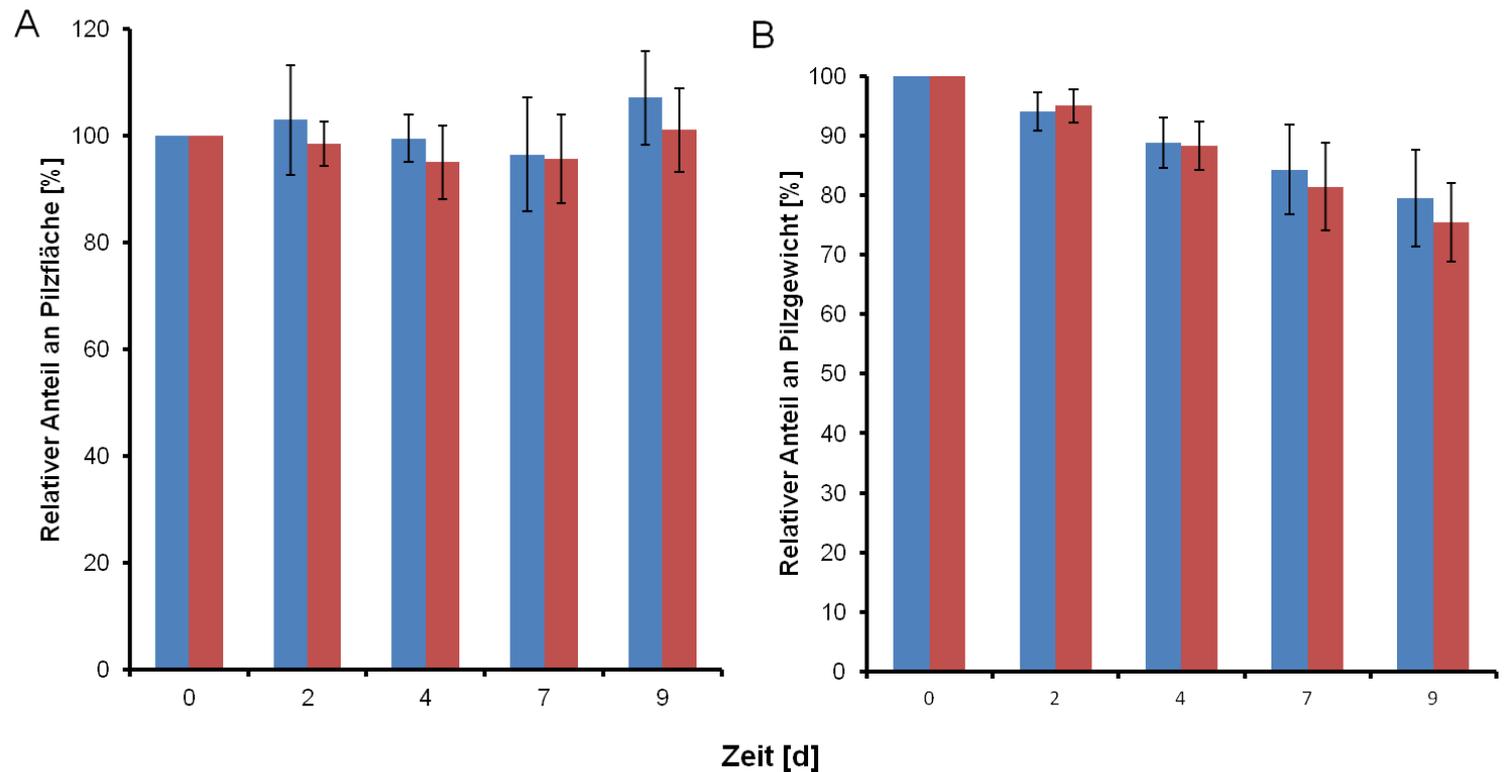


Abb. 14 Zeitlicher Verlauf des Pilzgartenwachstums in Subkolonien von *A. colombica* bei kontinuierlicher Einwirkung simulierter HIPV-Emissionen der Limabohne

Die Behandlung bestand aus der geringsten Konzentration an HIPV-versetzter Paste in dieser Untersuchung (100 μ l; rot dargestellt). Die aufgenommenen relativen Wachstumsfaktoren waren Fläche (A) und Gewicht (B) der Pilzgärten und sind im statistischen Mittel mit Standardabweichung dargestellt. Der relative Wert der gemessenen Flächen schwankte um den Ursprungswert zu Beginn der Untersuchung. Das Gewicht nahm kontinuierlich um 5-6 % ab (Kontrolle: 5.131 (+/-0.656); Behandlung: 6.138 (+/-0.871)). Bei der statistischen Auswertung (1-faktorielle ANOVA mit Messwiederholungen) konnte eine signifikante Auswirkung der Versuchsdauer festgestellt werden (Fläche: $P = 0.000$; Gewicht $P = 0.003$; FG = 3; $n = 6$). Die Behandlung wies keinen signifikanten Effekte gegenüber den Wachstumsfaktoren auf (Fläche: $P = 0.31$; Gewicht: $P = 0.61$; FG = 7). Die Versuchsdauer und die Behandlung zeigten auch keine signifikante Interaktion (Fläche: $P = 0.631$; Gewicht: $P = 0.129$; FG = 3; $n = 6$). Nur die Versuchsdauer schien die Abnahme des Pilzgewichtes von Kontroll- und HIPV-behandelten Subkolonien zu beeinflussen.

Ergebnisse

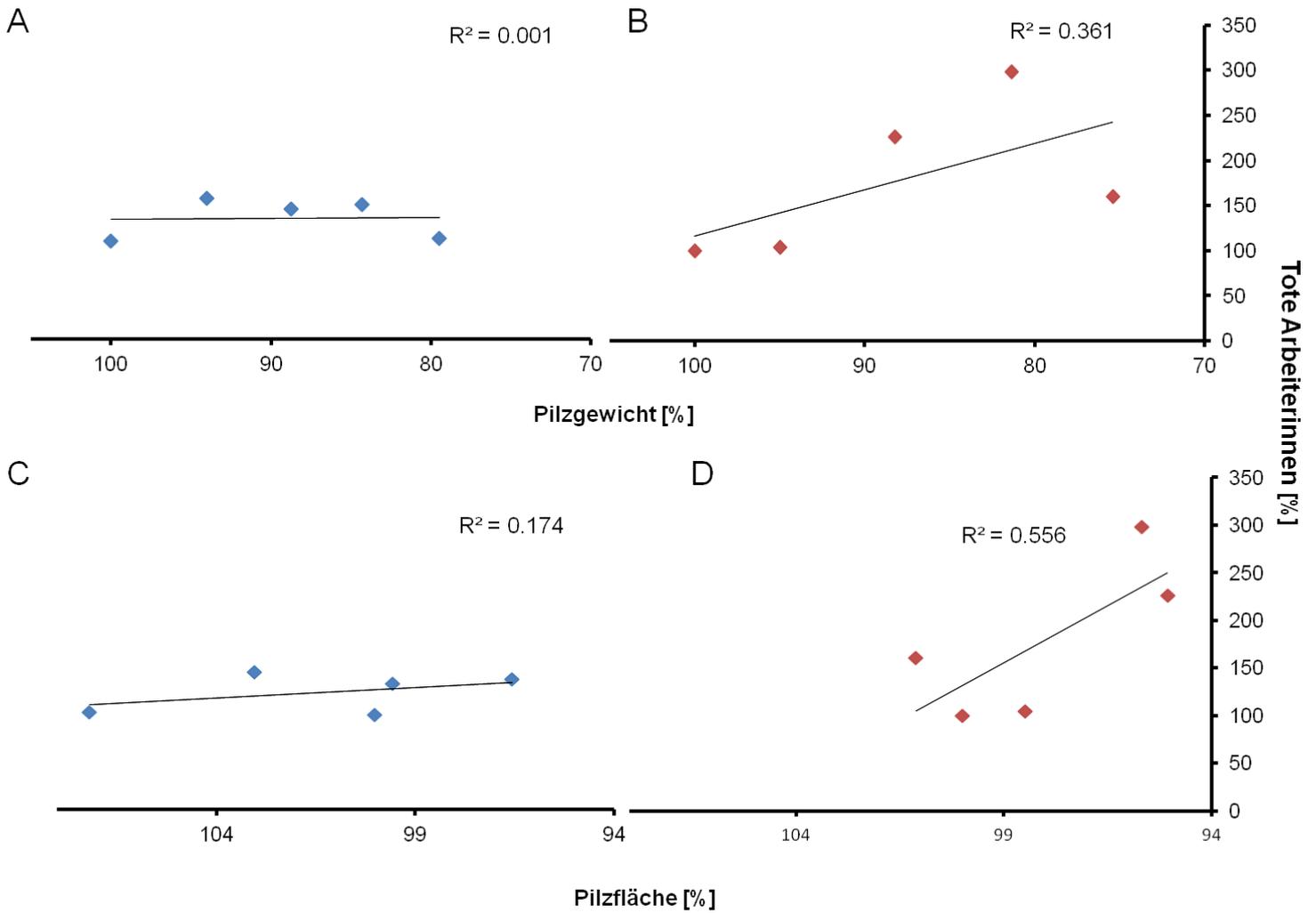


Abb. 15 Regressionen zwischen der Mortalität der Arbeiterinnen und den Wachstumsfaktoren der *Atta colombica* Subkolonien bei kontinuierlicher Einwirkung simulierter HIPV-Emissionen der Limabohne

Abhängigkeit der Mortalität von *A. colombica*-Arbeiterinnen und dem Pilzwachstum bei einer Behandlung von 100 µl HIPV-versetzter Paste (rot dargestellt). Dabei konnte für die Kontroll-Subkolonien (blau) keine signifikante oder erklärende Beziehung zwischen der abnehmenden Anzahl an toten Arbeiterinnen und dem Pilzwachstum festgestellt werden (Regression: Fläche: $P = 0.485$; Gewicht: $P = 0.955$; $n = 6$). Bei den HIPV-behandelten Subkolonien konnte die Mortalität der Arbeiterinnen nicht signifikant durch die Abnahme des Pilzgewichtes bzw. tendenziell durch den um den Anfangswert schwankend relativen Pilzflächenwachstum erklärt werden (Regression: Fläche: $P = 0.148$; Gewicht: $P = 0.284$; $n = 6$). Somit beeinflusste die Behandlung nicht die Wachstumsfaktoren der Pilzgärten, die wiederum keine Auswirkungen auf die Anzahl an toten Arbeiterinnen ausübten.

3.2.3 HIPV-Behandlung der Subkolonien mit einer Konzentration von 500 μ l

Die Behandlung des Pilzgartens erfolgte bei diesem dritten Versuchsdurchgang mit einer mittleren Dosis von 500 μ l HIPV-versetzter Paste über einen Zeitraum von 18 Tagen. Zusätzlich wurden bei dieser Behandlungsreihe neben den Wachstumsfaktoren (Gewicht und Fläche der Pilzgärten) und der Anzahl an toten Arbeiterinnen die Schneiderate und die Menge des angefallenen Abfalls (tote Arbeiterinnen, unverwertbare Pflanzen- und Pilzreste) aufgenommen. Vor den Aufnahmen am siebten Tag ereignete sich ein kurzzeitiger Temperaturabfall auf 22°C (persönliche Mitteilung der Tierpflegerinnen). Nach wenigen Stunden normalisierte sich die Temperatur wieder auf 25°C. Leichte Auswirkungen auf die aufgenommenen Faktoren konnten festgestellt werden. Beispielsweise war nach sieben Tagen der prozentuale Anteil an toten *A. colombica* Arbeiterinnen stark angestiegen (Abb. 20, B). Insgesamt erwiesen sich die Vitalitätszustände der Subkolonien als stabil. Vor den letzten Aufnahmen wies eine HIPV-behandelte Subkolonie eine Kontamination ihres Pilzgartens durch eine Schimmelpilzart auf. Deshalb wurde diese Subkolonie als nicht mehr überlebensfähig angesehen und aufgelöst. Ein exemplarischer Versuchsdurchgang wurde in Abb. 16 anhand von Bildern der Pilzoberfläche in Aufsicht dargestellt.

Die beiden gemessenen Wachstumsfaktoren der Pilzgärten sanken wieder über die Versuchsdauer hin (Abb. 17 A, B). Dabei lag der Verlust der Oberflächen der Pilzgärten der Kontroll-Subkolonien bei insgesamt 16.59 % (+/-5.823). Der gesamte Verlust der HIPV-behandelten Pilzgärten an Oberfläche erreichte dagegen 40.218% (+/-8.638). Die Abnahmen der Oberflächen erfolgten nicht kontinuierlich, denn es konnten bei allen Subkolonien geringe positive Zunahmen verzeichnet werden. Statistisch konnte kein Behandlungseffekt nachgewiesen werden, aber die insgesamt deutlicheren Verluste der behandelten Subkolonien belegen eine Inhibition des Pilzwachstums durch HIPVs der Limabohne. Somit kann hier von einem nicht signifikanten Trend mit einem Signifikanzniveau von 10% (Abb. 17, A) gesprochen werden. Die Versuchsdauer übte einen signifikanten Effekt auf beide Wachstumsfaktoren aus. Ein signifikanter Behandlungseffekt konnte bei den reinen Gewichtsverlusten nicht festgestellt werden. Insgesamt verloren die Kontroll-Subkolonien 32.64 % (+/-11.257) und die behandelten Subkolonien 57.258 % (+/-5.984) ihres ursprünglichen Startgewichtes. Die Interaktion zwischen der Versuchsdauer und dem Behandlungseffekt war signifi-

kant (Abb. 17, B). Über die Versuchsdauer hin scheint die Behandlung mit den HIPVs stärker das Wachstum der Pilzgärten zu inhibieren. Diese Annahme kann ebenfalls durch den teils signifikanten und teils tendenziellen Zusammenhang zwischen den abnehmenden Wachstumsfaktoren und der steigenden Mortalität der Arbeiterinnen unterstützt werden (Abb. 18). Zu beinahe 60 % ließ sich die Mortalität durch die Änderungen des Pilzgewichtes bei den Kontroll-Subkolonien erklären, wobei die Regression zu 56 % bei den behandelten Subkolonien erklärt werden konnte (Abb. 18, A und B). Der zweite Wachstumsfaktor der Pilzgärten (Fläche) konnte zu 50 % signifikant die steigende Mortalität der Arbeiterinnen bei den Kontroll-Subkolonien und zu 40 % mit einer starken Tendenz bei den HIPV-behandelten Kolonien erklären (Abb. 18, C und D).

Das Furagierverhalten der Arbeiterinnen gegenüber den gefütterten Brombeerblättern der behandelten Subkolonien sank stark nach sieben Tagen ab und verblieb auf einem niedrigen Niveau über die restliche Versuchsdauer (Abb. 19, B). Die negativen Schneideraten sind durch die Schwankung des Wassergehaltes innerhalb der Blätter zu erklären. Die Kontroll-Subkolonien wiesen leichte Schwankungen in ihrer Aktivität beim Furagieren auf, aber ein vollständiger Rückgang oder hohe Inaktivität konnte nicht aufgezeigt werden. Im statistischen Vergleich konnte ein signifikanter Unterschied in der Furagieraktivität der Kontroll- und HIPV-behandelten Subkolonien festgestellt werden (Abb. 19, A). Der dadurch bedingte unterschiedliche Blatteintrag begründet damit die höheren Einschränkungen des Pilzgartenwachstums bei den behandelten Subkolonien.

Die Anlagerung von Abfall verlief indifferent bei allen Subkolonien (Abb. 20, A). Allgemein konnte ein Anstieg nach einem sieben-tägigen Behandlungszeitraum festgestellt werden. Die Versuchsdauer hatte einen signifikanten Effekt auf die produzierte Abfallmenge. Signifikante Behandlungseffekte auf die Menge des Abfalls konnten nicht ermittelt werden. Somit scheint das fortschreitende Alter der Subkolonien die Anlagerung von Abfall und den Abbau des Pilzes zu fördern. Die Behandlung beeinflusste also eher das Wachstum der Pilzoberflächen und das Furagierverhalten der Arbeiterinnen, die wiederum einen Einfluss auf die Masse des Pilzes und die Vitalität der Subkolonien hatten.

Ergebnisse



Kontrolle nach 0 Tagen



Kontrolle nach 9 Tagen



Kontrolle nach 18 Tagen



Behandlung nach 0 Tagen



Behandlung nach 9 Tagen



Behandlung nach 18 Tagen

**Abb. 16 Exemplarischer Versuchsverlauf der Subkolonien mit einer kontinuierlichen Behandlung an HIPVs der Lima-
bohne**

Diese Bilder stellen den Verlauf zweier exemplarisch ausgewählter Subkolonien dar, bei einer andauernden Behandlung mit einer Konzentration von 500 µl HIPV-versetzter Lanolin-Paste. Die oberen drei Bilder zeigen die Oberflächen einer Kontroll-Subkolonie nach einer Behandlungsdauer von 0, 9 und 18 Tagen. Auf den unteren Bildern sind die Veränderungen der Pilzoberfläche einer HIPV-behandelten Subkolonie im Versuchsverlauf (0, 9 und 18 Tage) zu erkennen. Gräuliche Farbe und frisch eingearbeitete Blätter sind Indizien für einen vitalen Pilzgarten. Die bei der HIPV-Behandlung auftretende bräunliche Verfärbung des Pilzmyzels weist daraufhin, dass der Pilzgarten sich in keinem guten Zustand befand.

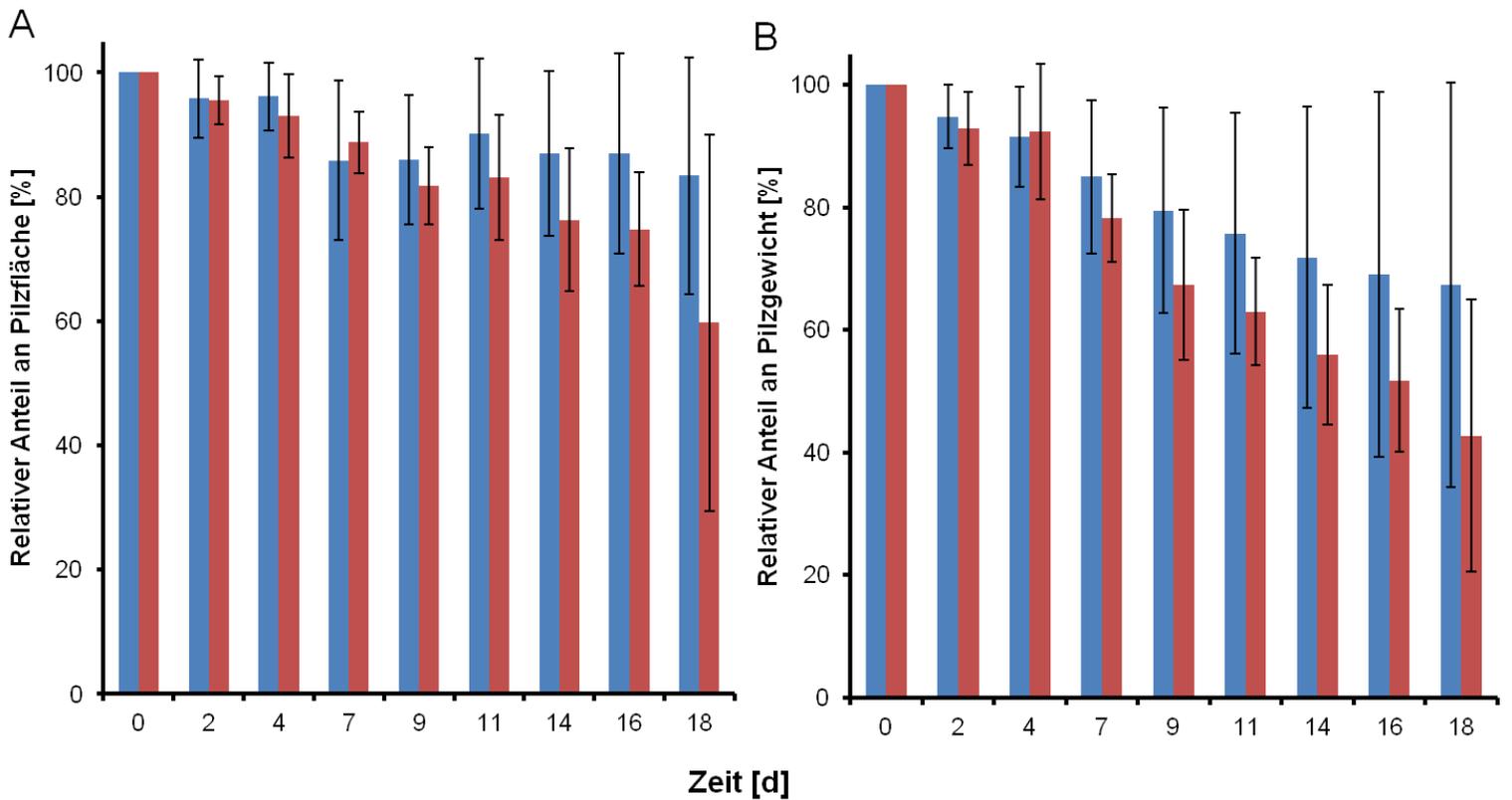


Abb. 17 Zeitlicher Verlauf des Pilzgartenwachstums in Subkolonien von *A. colombica* bei kontinuierlicher Einwirkung simulierter HIPV-Emissionen der Limabohne

Die Behandlung bestand aus einer mittleren natürlichen Konzentration an HIPV-versetzter Paste (500 µl; rot dargestellt). Die aufgenommenen relativen Wachstumsfaktoren waren Fläche (A) und Gewicht (B) der Pilzgärten, die im statistischen Mittel mit Standardabweichung dargestellt sind. Die Fläche der Pilzgärten nahm bei Kontroll- und HIPV-behandelten Subkolonien ab. Dabei betrug der durchschnittliche prozentuale Verlust der Pilzoberfläche der Kontroll-Subkolonien 2.074 % (+/- 4.277). Der Verlust der HIPV-behandelten Subkolonien lag bei 5.027 % (+/- 4.856). Das Gewicht nahm kontinuierlich um 4.08 % (+/-1.585; Kontrolle, blau) und um 5.027 (+/-4.856; Behandlung; rot) ab. Bei der statistischen Auswertung mit einer 1-faktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen konnte eine signifikante Auswirkung der Versuchsdauer (Fläche: $P = 0.000$; Gewicht $P = 0.000$; FG = 6; $n = 12$) festgestellt werden. Die Behandlung wies keine signifikanten Effekte gegenüber dem Gewicht auf ($P = 0.21$; FG = 7; $n = 12$), aber tendenzielle Behandlungseffekte wirkten auf die Flächenveränderung der Pilzgärten ($P = 0.104$; FG = 6; $n = 12$) ein. Die Interaktion von Behandlungseffekten und Versuchsdauer waren signifikant bei der Gewichtsveränderung ($P = 0.036$; FG = 7; $n = 12$) und wies eine Tendenz bei den Veränderungen der Pilzoberflächen auf ($P = 0.095$; FG = 6; $n = 12$).

Ergebnisse

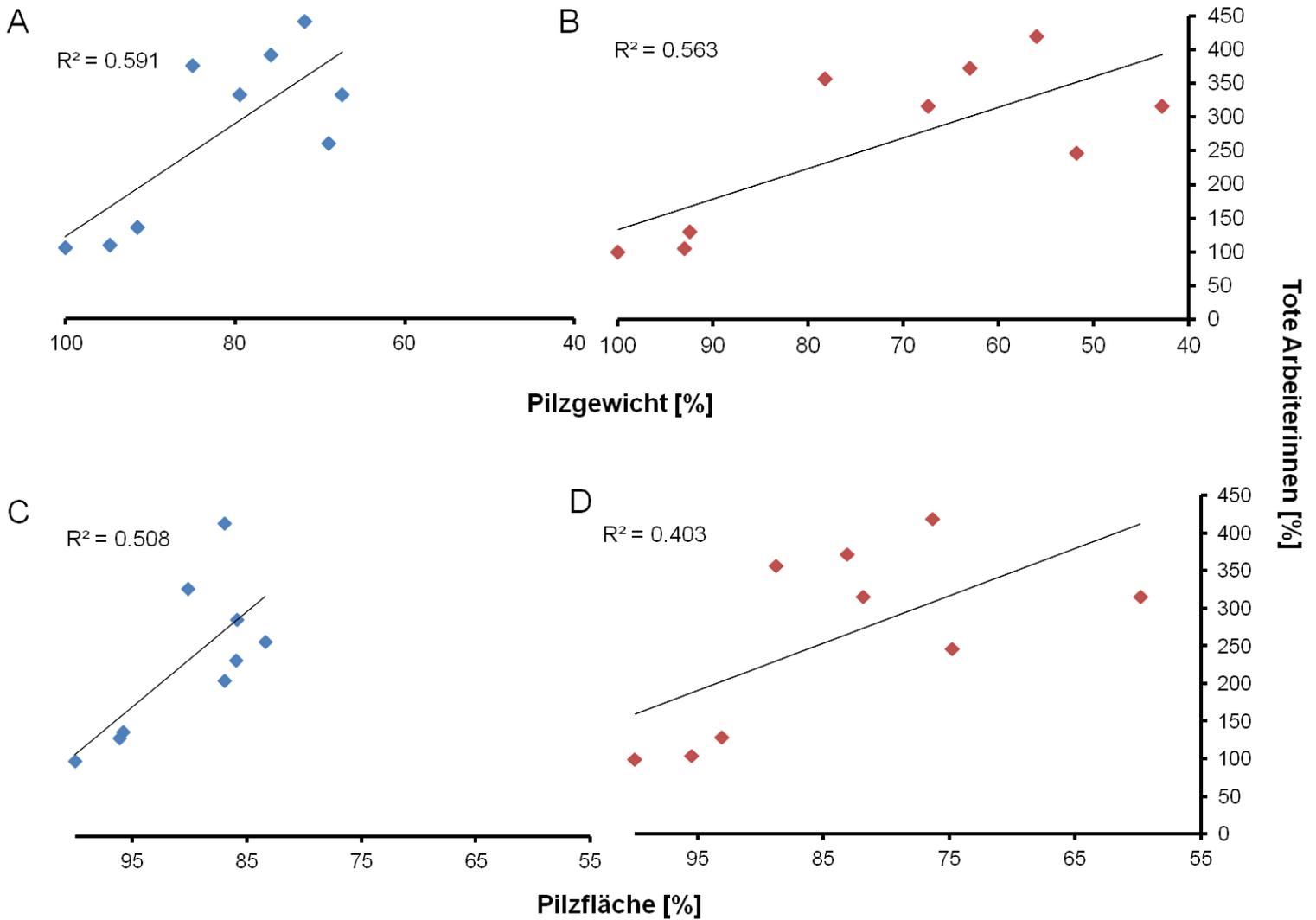


Abb. 18 Regressionen zwischen der Mortalität der Arbeiterinnen und den Wachstumsfaktoren der *Atta colombica* Subkolonien bei kontinuierlicher Einwirkungen simulierter HIPV-Emissionen der Limabohne

Die oberen Regressionen (A und B) stellen die Beziehung zwischen den toten Arbeiterinnen und den Veränderungen des Pilzgewichtes bei Kontroll- (A) und HIPV-behandelten (B) Subkolonien dar. Die unteren Regressionen (C und D) stehen für die Beziehungen der Anzahl toter Arbeiterinnen und den Wachstumsveränderungen der Pilzoberfläche der behandelten (D) und der Kontroll-Subkolonien (C). Die Konzentration der HIPV-Behandlung betrug 500 μ l. Die Interaktionen der steigenden Anzahl toter Arbeiterinnen und dem abnehmenden Pilzgewicht konnten signifikant (Kontrolle: $P = 0.031$; Behandlung: $P = 0.02$) bis zu fast 60% (A) und 56 % (B) erklärt werden. Die Veränderungen der Pilzoberfläche konnten bei den Kontroll-Subkolonien zu 50% (C) signifikant ($P = 0.031$) die steigende Anzahl toter Arbeiterinnen erklären. Bei den HIPV-behandelten Subkolonien konnte um 40% (D) tendenziell ($P = 0.066$) die Beziehung der Oberflächenänderungen der Pilzgärten und den toten Arbeiterinnen nachgewiesen werden.

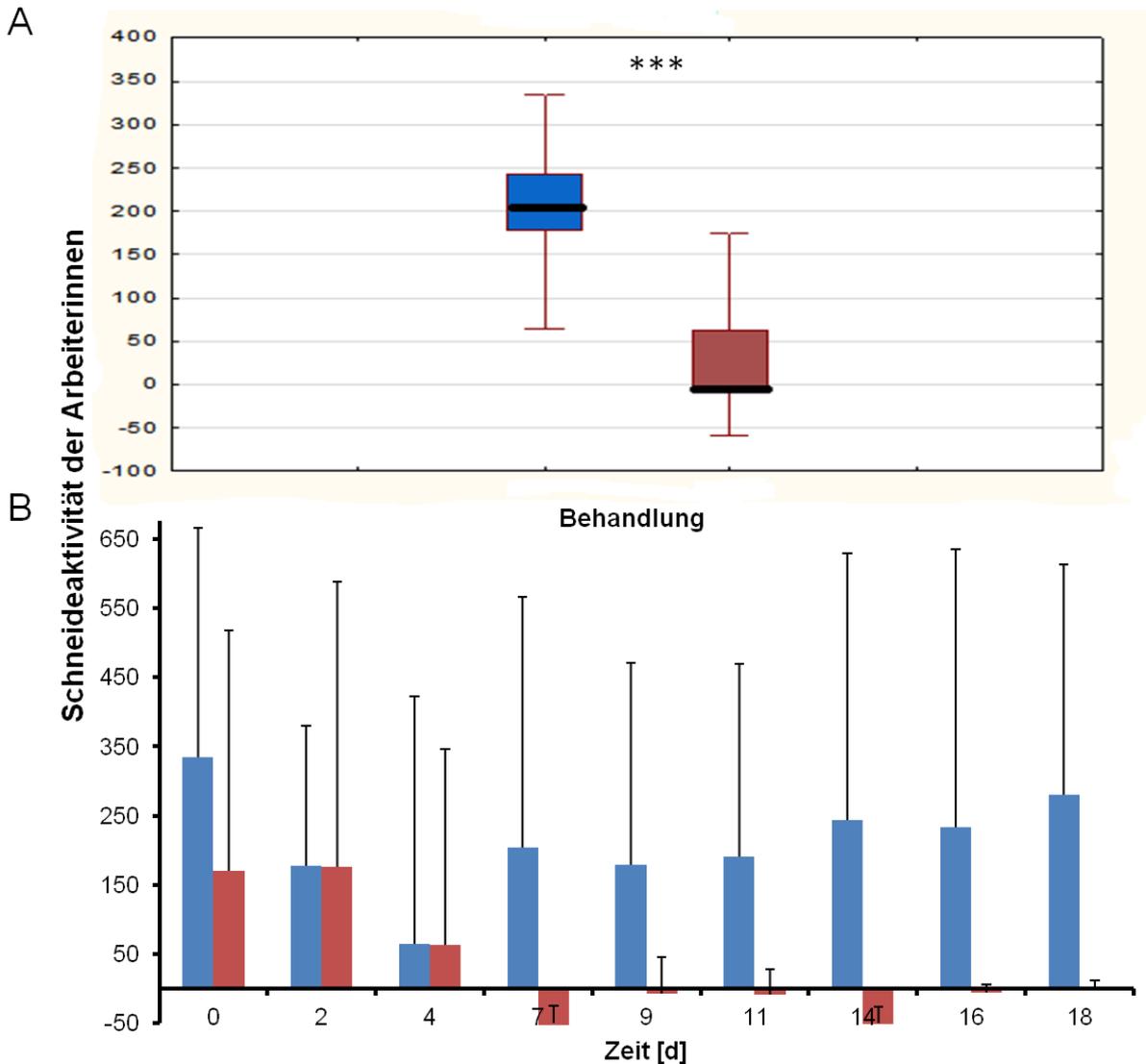


Abb. 19 Furagierverhalten der Arbeiterinnen in Subkolonien von *A. colombica* bei kontinuierlicher Einwirkung simulierter HIPV-Emissionen der Limabohne

Die erfasste Schneideaktivität von Kontroll- (blau) und HIPV-behandelten (rot) Subkolonien mit einer kontinuierlichen Behandlung an 500 µl HIPV-versetzter Paste ist im direkten Vergleich von Kontrolle und Behandlung (A) und über die Versuchsdauer dargestellt (B). Die Versuchsdauer betrug insgesamt 18 Tage. Die aufgenommenen Differenzen an geschnittenem Blattmaterial (*Rubus fruticosus*) zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlung (gepaarter t-Test: A: $P = 0.008$; ***; A). Im Laufe der Behandlung zeigte sich, dass ab dem siebten Tag die Schneideaktivität der HIPV-behandelten Subkolonien stark abnimmt und sich nicht mehr erholt (B). Somit hatte die Behandlung einen inhibierenden Effekt auf das Furagierverhalten der Arbeiterinnen.

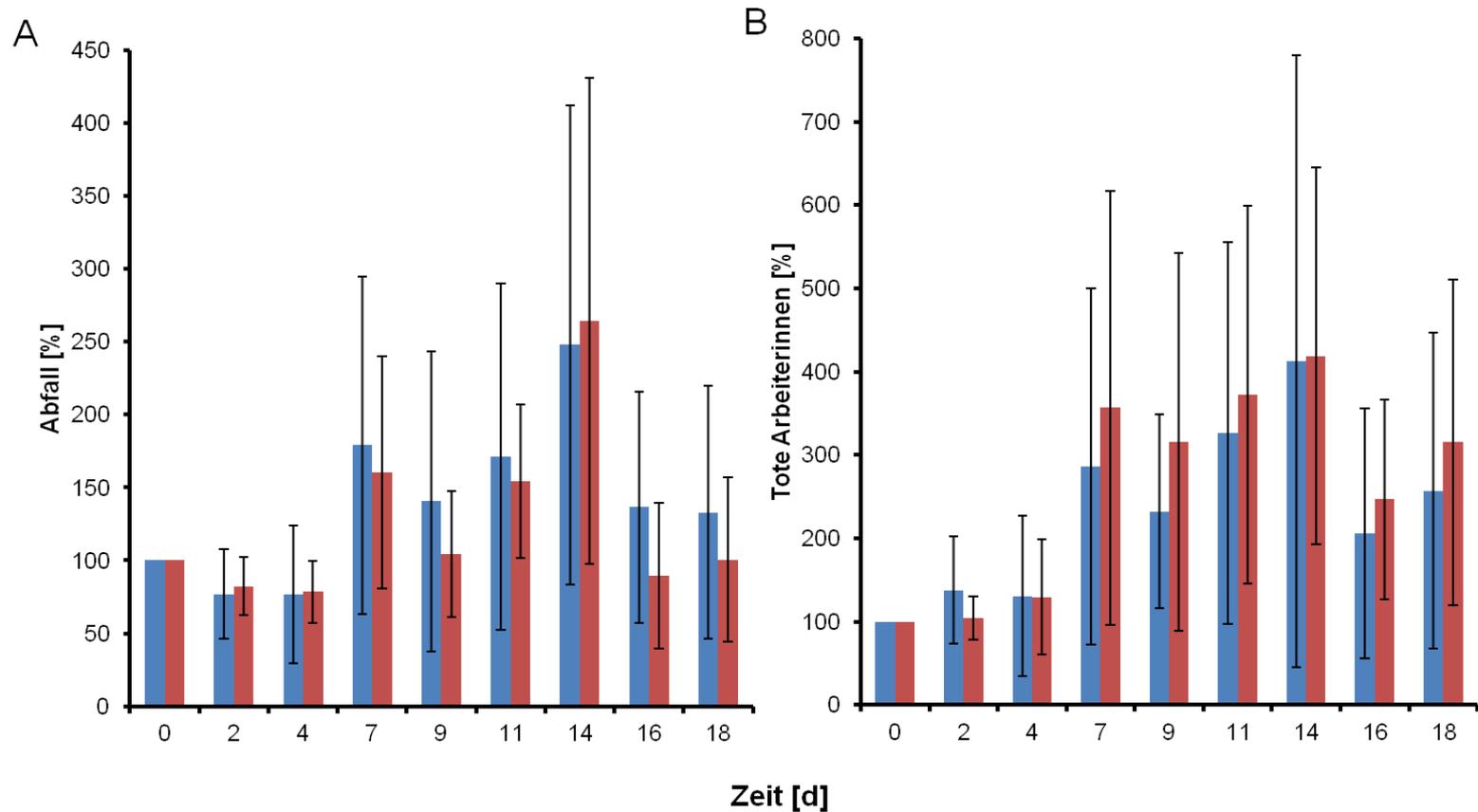


Abb. 20 Zeitlicher Verlauf des anfallenden Abfalls und der Anzahl an toten Arbeiterinnen in Subkolonien von *A. colombica* bei kontinuierlicher Einwirkung simulierter HIPV-Emissionen der Limabohne

Der prozentual angefallene Abfall (A) und der prozentuale Anteil an toten Arbeiterinnen (B) sind hier über die Versuchsdauer im statistischen Mittel mit Standardabweichung dargestellt. Dabei wiesen die beiden Faktoren ähnliche Veränderungen im Behandlungsverlauf auf. Die statistische Auswertung mit einer 1-faktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen ergab bei dem angefallenen Abfall und dem prozentualen Anteil an toten Arbeiterinnen einen signifikanten Effekt durch die Versuchsdauer (Abfall: $P = 0.001$; FG = 7; $n = 12$; tote Arbeiterinnen: $P = 0,000$; FG = 7; $n = 12$). Die Behandlung hatte keine direkten signifikanten Einflüsse auf die Abfallmenge ($P = 0.547$; FG = 1; $n = 12$) und die Anzahl an toten Arbeiterinnen ($P = 0.657$; FG = 1; $n = 12$). Die Interaktion zwischen Versuchsdauer und Behandlungseffekten wies auch keine Signifikanz auf (Abfall: $P = 0.486$; FG = 7; $n = 12$; tote Arbeiterinnen: $P = 0.802$; FG = 7; $n = 12$). Das während der Versuchsdauer zunehmende Alter der Subkolonien hatte einen Einfluss auf die anfallenden Mengen von Abfall und die Anzahl an toten Arbeiterinnen.

3.3 Versuch 3: Duftstoffemission der verwendeten HIPV-Paste (100µl) und der induzierten Blattfragmente von *Phaseolus lunatus*

Für diesen Versuch wurden die Duftemissionen von gestanzten Blattfragmenten der Limabohnen, die 24 Stunden zuvor mit JA induziert wurden, und der mit 100 µl dosierten Lanolin-Paste, die mit den HIPVs der Limabohne versetzt war (Kost & Heil, 2006; Stephan, 2010), gemessen. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die aufbereiteten Proben wurden in Jena an dem MPI für Biochemische Ökologie mit Hilfe eines Gaschromatographen, der mit einem Massenspektrometer gekoppelt war, ausgewertet. Die erhaltenen Chromatogramme der Emissionsspektren (Abb. 21) von jeweils 13 Proben der beiden verwendeten Emittenten (HIPV-Paste und Blattfragmente) wurden mit Massenspektrogrammen (Kap. 6.1) der einzelnen Duftstoffe abgeglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass in den Emissionsspektren der Limabohnen-Blattfragmente die beiden VOCs (*R*)-(-)-Linalool und TMTT nicht in einer Probe vorzufinden waren (Abb. 21). Im Normalfall sollte eine JA-induzierte *P. lunatus* nach 24 Stunden diese beiden Duftstoffe emittieren (Kost & Heil, 2006). Diese beiden VOCs und zusätzlich der Duftstoff DMNT konnten auch nicht in jedem Emissionsspektrum der HIPV-versetzten Lanolin-Paste aufgefunden werden, obwohl diese Stoffe der Paste bei der Herstellung hinzugefügt wurden (Kap. 2.5.1). Eine mögliche Ursache könnten maskierende Emissionseffekte des Lanolins, der verwendeten Watte oder des Filters sein (Kap. 6.2). Eventuell könnten auch die Duftstoffe beim Auftauen entwichen sein bei einzelnen Durchgängen.

Die Zusammensetzung der applizierten VOCs in das Lanolin sollte der natürlichen Emission einer durch Herbivorie induzierten Limabohne nach 24 Stunden entsprechen. Bei den Untersuchungen von Heil (2004) konnten nur minimale Konzentrationsunterschiede zwischen natürlich durch Herbivorie-induzierten und JA-induzierten Limabohnen festgestellt werden. Die in der vorliegenden Untersuchung berechneten Mengen der in 24 Stunden emittierten Duftstoffe von Paste und Blattfragmenten unterschieden sich im direkten Vergleich dagegen signifikant voneinander (Abb. 21). Bei der Betrachtung der einzelnen VOCs zeigte sich, dass nur (3Z)-Hex-3-enylacetat und Methylsalicylat in vergleichbaren Mengen emittiert wurden (Abb. 22). Die anderen VOCs waren in signifikant unterschiedlichen Mengen in den Duftspektren der beiden Emittenten vorhanden. Dabei wurden die einzelnen VOCs, bis auf Methylsali-

cylat, in geringeren Konzentrationen von den JA-induzierten Limabohnen-Blattfragmenten emittiert. Somit entspricht die Zusammensetzung der emittierten VOCs der Paste nicht denen der JA-induzierten Blattfragmente. Das bedeutet, dass die Paste kein natürlicher Ersatz für die natürliche Emission einer Limabohne ist. In Zukunft wäre zu klären, ob die Menge der gestanzten Limabohnenblätter für die Messung zu gering war und welche Varianz die Limabohne bei den emittierten VOCs zeigt.

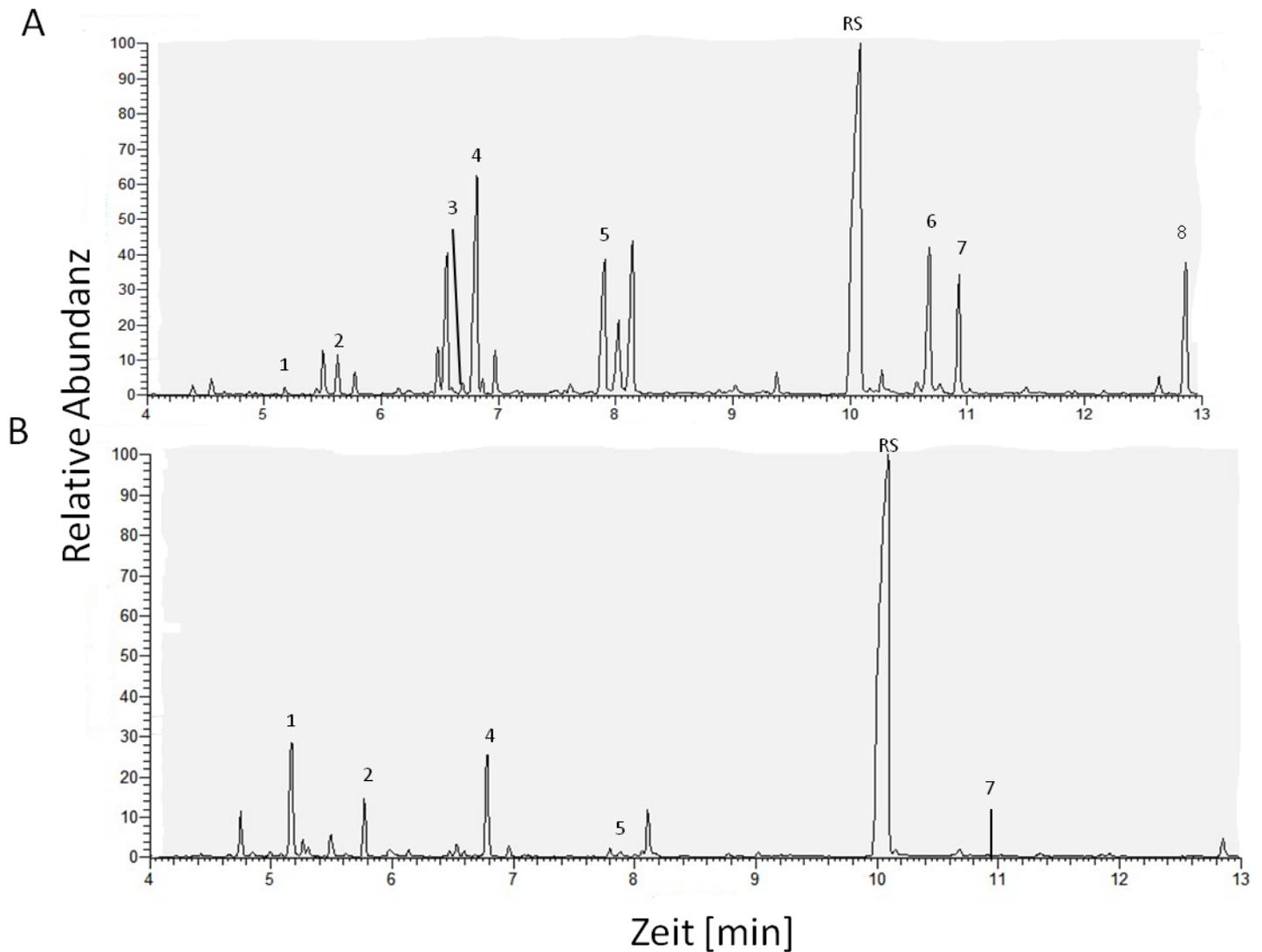


Abb. 21 Exemplarische Chromatogramme der Duftemissionen von HIPV-versetzter Lanolin-Paste und *Phaseolus lunatus* Blattfragmenten

Der direkte Vergleich der Chromatogramme zeigt deutlich die Unterschiede zwischen der mit HIPVs-versetzten Lanolin-Paste (A; $n = 13$) mit einer Dosis von $100 \mu\text{l}$ und den Blattfragmenten von *P. lunatus* (B; $n = 13$), die eine Fläche von ca. 24 cm^2 bedeckten. Deutlich zu erkennen ist, dass die Duftstoffe **3** und **8** nicht in dem Emissionsspektrum der Limabohnen-Blattfragmente enthalten sind. Dagegen enthielt das hier ausgewählte Emissionsspektrum der Paste alle VOCs. Mit dem Wilcoxon-Test wurden die berechneten Duftstoffmengen der Emissionen von HIPV-versetzter-Paste und den Blattfragmenten der Limabohne verglichen, wobei sich ein signifikanter Unterschied ergab ($P = 0.017$; $n = 8$).

1 (3Z)-Hex-3-enylacetat; **2** (E,Z)- β -Ocimene; **3** (R)-(-)-Linalool; **4** (3E)-4,8-Dimethylnona-1,3,7-trien (DMNT); **5** Methylsalicylat; **6** (Z)-Jasmon; **7** β -Caryophyllen; **8** (3E,7E)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen (TMTT); **RS** = Referenzsubstanz 1-Bromdecan

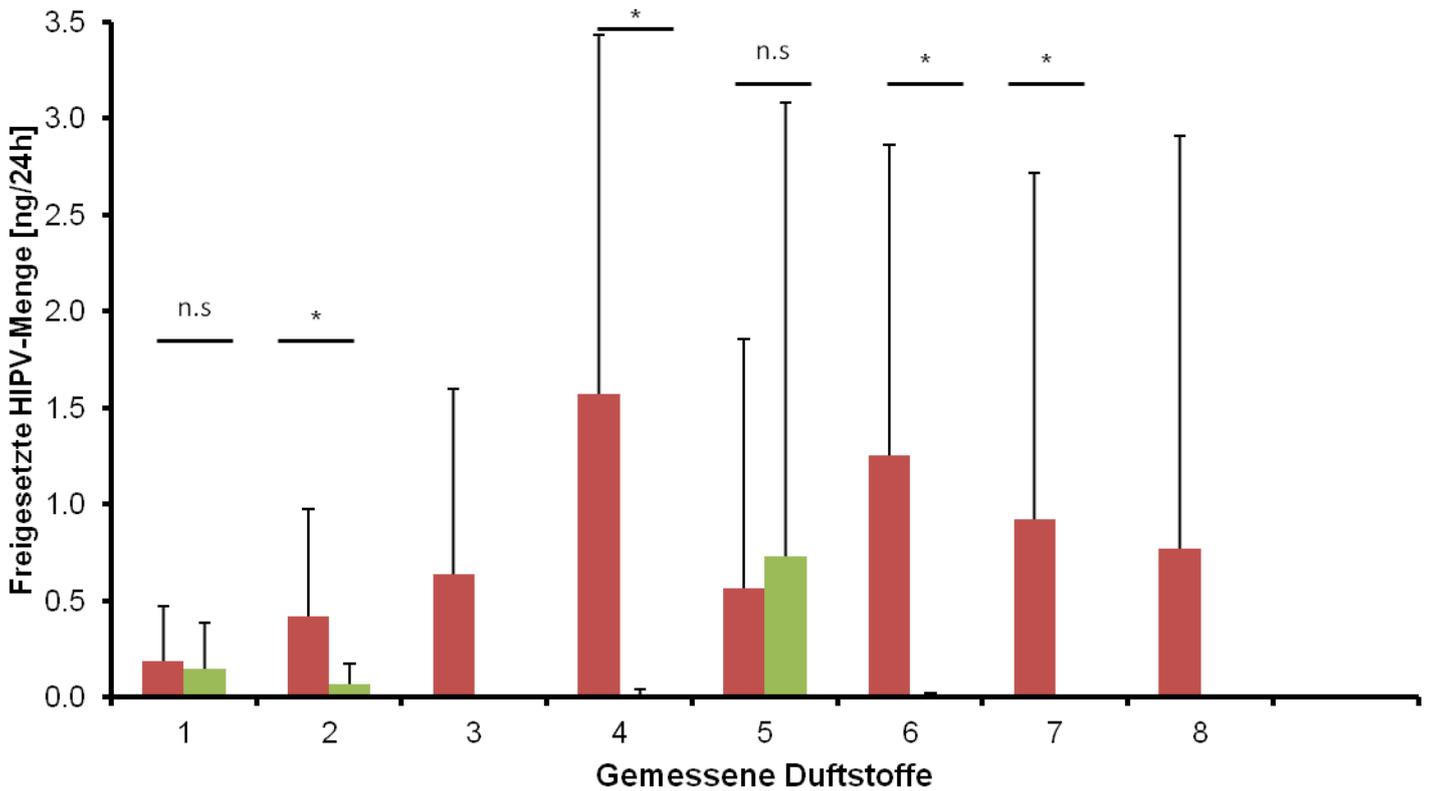


Abb. 22 Emissionsmengen der einzelnen Duftstoffe von HIPV-versetzter Paste und Limabohnen-Blattfragmenten nach der 24-stündigen Messung

Die Aufschlüsselungen der emittierten Duftstoffe der mit 100µl dosierten HIPV-Paste (rot) und der Blattfragmente von *P. lunatus* (grün) ist in diesem Diagramm mit der Menge [ng] pro 24 Stunden dargestellt. Die Duftstoffe **3** und **8** konnten in den Emissionen der Limabohnen-Blattfragmente bei keiner einzigen Messung aufgefunden werden. Die ermittelten Mengen der emittierten Duftstoffe der Blattfragmente fielen, den Duftstoff **5** davon ausgenommen, niedriger aus als die Emissionen der HIPV-Paste. Nur in vereinzelter Messungen der Pasten-Emission konnten bestimmte Duftstoffe wie **3,4** und **8** nicht immer erfasst werden. Bei der Auswertung der in Lanolin-Paste und Blattfragmenten vorhandenen Duftstoffe mit dem Wilcoxon-Test ergab sich, dass nur zwei Stoffe (**1**: $P = 0.507$ und **5**: $P = 0.087$; n.s. = nicht signifikant) keinen signifikanten Unterschied aufwiesen. Die anderen vier Duftstoffmengen pro 24h zeigten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Emittenten auf (**2**: $P = 0.023$; **4**: $P = 0.004$; **6**: $P = 0.001$; **7**: $P = 0.001$; * = signifikant). Diese Unterschiede der Emissionszusammensetzung der HIPV-versetzten Lanolin-Paste und der Blattfragmente von *P. lunatus* könnten durch maskierende Emissionen der verwendeten Materialien oder innerartliche Schwankungen der Emissionen von Limabohnen verursacht worden sein. Eine vorzeitige Emission aus der auftauenden Paste oder den gestanzten Blatträndern könnte auch ein möglicher Grund sein.

1 (3Z)-Hex-3-enylacetat; **2** (E,Z)-β-Ocimene; **3** (R)-(-)-Linalool; **4** (3E)-4,8-Dimethylnona-1,3,7-trien (DMNT); **5** Methylsalicylat; **6** (Z)-Jasmon; **7** β-Caryophyllen; **8** (3E,7E)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen (TMTT)

4 Diskussion

4.1 Bleiben naive BSA-Kolonien neutral?

Bei der Untersuchung der Nahrungspräferenzwahl wurde den beiden *Atta colombica* Kolonien mit einem „HIPV-naiven“ Pilz (*Leucocoprinus gongylophorus*) JA-induzierte und unbehandelten Limabohnen (Kontrolle) angeboten. Dabei wurde festgestellt, dass die „HIPV-naiven“ Arbeiterinnen keine Diskriminierung gegenüber einer der angebotenen Pflanzen zeigten. Dagegen konnte eine geringe Bevorzugung der Arbeiterinnen gegenüber den JA-induzierten Limabohnen festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei einer Vermeidung des Kontaktes zwischen Pilz und HIPV-emittierenden Blattstücken keine Ablehnung von Pflanzen mit induzierter Abwehr durch die BSA stattfindet. Die in den Untersuchungen von Tremmel (2008) und Herz *et al.* (2008) beobachtete „delayed rejection“ tritt also nur auf, wenn der Pilz durch die Arbeiterinnen mit Substrat, das fungizide Stoffe beinhaltet, versorgt wird. Die induzierte Abwehr der Pflanzen mit HIPVs hat auf die BSA selbst keinen Einfluss. Dieser Fakt wird durch die Untersuchung von Stephan (2010) bestätigt, bei der die Reaktion beider Symbionten auf HIPVs getrennt aufgenommen wurde. Die Bedeutung für die in dieser Untersuchung mit einbezogene mutualistische Beziehung besteht darin, dass die „induced-defense“ Hypothese (Kost, *et al.*, 2011) nur auf einen Symbionten anwendbar ist. Der Pilz stellt den anfälligen Symbiose-Partner gegenüber den induzierten HIPVs der Pflanzen dar (Stephan, 2010) und übernimmt eine wichtige Entscheidungsinstanz bei der Nahrungspflanzenwahl der BSA (North & Jackson, 1999). Die BSA können somit ohne Information des Pilzes nicht selbstständig zwischen für ihren symbiontischen Partner schädlichen oder unschädlichen Substanzen unterscheiden. Die Weiterleitung der chemischen Informationen zwischen Pilz und den foragierenden Arbeiterinnen erhält dadurch eine Bedeutung als überlebenswichtiger Aspekt dieses mutualistischen Zusammenspiels.

Die leichte Präferenz der Arbeiterinnen gegenüber den JA-induzierten Limabohnen steht in Einklang mit denen in der Natur beobachteten anderen Herbivoren-Pflanzen-Systemen, bei denen HIPV-emittierende Pflanzen bevorzugt wurden (Dicke, 1986; Dicke & Van Loon, 2000; Horiuchi, *et al.*, 2003 a). Durch abiotische Faktoren gestresste Pflanzen stellen ihre Genexpression um und produzieren oft Phytohormone, die eine Duftstoffemission auslösen können. In diesem Zeitraum können die ge-

stressten Pflanzen dagegen weniger effektiv ihre Ressourcen in die Abwehr von Herbivoren investieren. Dadurch stellen diese Pflanzen ein attraktiveres Ziel für die Herbivoren dar. Diese Bevorzugung der gestressten Pflanzen wurde auch bei furagierenden BSA-Arbeiterinnen durch Meyer *et al.* (2006) nachgewiesen. Somit weisen die HIPVs der Limabohne eine zusätzliche Wirkung als Kairomone auf, in dem sie Herbivoren anlocken und dadurch dem Sender schaden. Die Wirkungsweise der HIPVs hängt somit von der emittierten Konzentration ab (Heil, 2004 b).

Abschließend lässt sich zu diesem Untersuchungsteil sagen, dass die erste Hypothese in allen Punkten bestätigt werden konnte. Naive *Atta colombica* Arbeiterinnen, deren Pilzgarten HIPV-naiv ist, weisen gegenüber JA-induzierten und Kontroll-Limabohnen ein indifferentes Furagierverhalten auf. Zusätzlich konnte die beim Furagieren beobachtete leichte Bevorzugung der JA-induzierten Limabohnen im ökologischen Kontext erklärt werden (Meyer, *et. al.*, 2006).

4.2 Pflanzliche Schädigung einer mutualistischen Lebensgemeinschaft

Die drei verwendeten Konzentrationen lagen innerhalb des natürlich vorkommenden Emissionsbereiches von tropischen Pflanzen. Die bisher bekannte Obergrenze an eingelagerten VOCs liegt bei *Hymenaea courbaril* für Caryophyllen bei 3000 µg pro g Frischgewicht (Howard, *et al.*, 1988b). Die Untergrenze dürfte bei 10 µg an Ocimen pro g Frischgewicht in *Virola gardneri* erreicht sein (Urbas, 2004). Somit wurden die Konzentrationen von 2 ml (entspricht ca. 2000 µg), 100 µl (ca. 100 µg) und 500 µl (ca. 500 µg) gewählt. Die Konzentrationen an Sekundärmetaboliten variieren sehr stark, wie die beiden genannten Beispiele belegen und sind zusätzlich noch familien-, gattungs- und artspezifisch (Fraenkel, 1959). In der vorliegenden Arbeit hatten unterschiedliche Konzentrationen an HIPVs der Limabohne auch unterschiedliche Effekte auf die Pilzgärten.

Die höchste der verwendeten Konzentrationen von 2 ml HIPV-versetzter Paste wies eine hohe Mortalität der Pilzgärten auf. Die Hälfte der etablierten Subkolonien war bis zum Ende der Aufnahmen nicht weiter verwendbar. Fünf von zehn Subkolonien wurden aufgelöst, wovon 2 Kontroll- und 3 HIPV-behandelte Subkolonien waren. Da auch die Pilzgärten der Kontroll-Subkolonien als nicht mehr überlebensfähig eingestuft wurden, kann die gewählte Konzentration an HIPV-Paste nicht der Grund für die Mortalität der Pilzgärten sein. Eine mögliche Erklärung wären Seneszenzeffekte, die durch das höhere Alter der Subkolonien bei Versuchsbeginn bedingt wurden. Bis auf zwei zuvor neu etablierte Subkolonien wiesen alle ein Alter von acht Wochen zu Versuchsbeginn auf. Leider ist nicht genau bekannt, wie lange die Lebensspanne einer Subkolonie im Durchschnitt beträgt. Da bei den anderen beiden gewählten Konzentrationen die Subkolonien ein Alter von maximal zwei Wochen zum Versuchsbeginn hin aufwiesen und nur insgesamt 1 von 24 Subkolonien als nicht mehr überlebensfähig eingestuft wurde, spricht das für eine altersbedingte Mortalität der Subkolonien bei der gewählten Konzentration von 2 ml. Diese Seneszenzeffekte maskierten wohl auch die möglichen Behandlungseffekte bzw. die Seneszenz wurde durch die Behandlung womöglich verstärkt, so dass nur über die Zeit ein inhibiertes Wachstum der Pilzgärten zu erkennen war. Die abnehmende Mortalität der Arbeiterinnen in den Subkolonien wies eine positive Korrelation mit dem abnehmenden Gewicht und der Fläche der Pilzgärten auf. Dies stellt eine eher ungewöhnliche Beziehung dar, da

eigentlich eine negative Korrelation erwartet wurde. Die Inhibition des Pilzgartenwachstums sollte eigentlich zu einer Erhöhung der Arbeiterinnensterberate führen, da durch die abnehmende Fläche und Masse der Pilzgärten ein geringerer Teil an BSA versorgt werden kann. Eine mögliche Erklärung wäre wieder das höhere Alter der BSA. Dies könnte zu Beginn der Versuchsdauer zu einer erhöhten Sterberate der Arbeiterinnen geführt haben, die durch die sich verringernde Abundanz an Subkolonien über die Zeit hin abnahm. Die erste behandelte Subkolonie musste schon nach einer Versuchsdauer von vier Tagen von den Aufnahmen ausgeschlossen werden. Der Verlust der zu Beginn verstorbenen Arbeiterinnen hatte eine schlechtere Versorgung der Pilzgärten zur Folge, was wiederum eine mögliche Ursache wäre, die die Mortalität der Subkolonien mit ausgelöst haben könnte. Diese Untersuchungseinheit sollte erneut durchgeführt werden, wobei jüngere Subkolonien verwendet und weitere Vitalitätsaufnahmen, wie z.B. Schneideaktivität der foragierenden Arbeiterinnen, aufgenommen werden sollten.

Eine Konzentration von 100 µl an HIPV-Paste wurde für einen Versuchsdurchgang gewählt, da Stephan (2010) inhibierende Wachstumseffekte des symbiontischen Pilzes bei direkter Applikation von 100 µg der vollständigen Zusammensetzung an HIPVs der Limabohne in das Kulturmedium verzeichnen konnte. Bei der Applikation der HIPVs in die Pilzgärten und der über die Gasphase stattfindende Kontaminierung waren die Verdünnungseffekte anscheinend zu hoch. Die Aufnahmen der Pilzoberflächen, die bei dieser Konzentration vorgenommen wurden, wiesen auf keinerlei Inhibition des Pilzwachstums hin. Nach einer Versuchsdauer von neun Tagen wurde sogar eine leichte Zunahme an Oberfläche der behandelten Pilzgärten festgestellt. Im Gegensatz zu der Oberfläche als Wachstumsparameter, nahm das Gewicht aller Pilzgärten kontinuierlich ab. Dieser Effekt trat bei Kontroll- und behandelten Subkolonien ohne signifikanten Unterschied auf, weshalb diese Abnahme nicht in Zusammenhang mit einer möglichen Inhibition durch die HIPVs gebracht werden kann. Auch die Mortalität der Arbeiterinnen schien durch den Gewichtsverlust nicht beeinflusst zu werden, da keine Zunahme der Sterberate verzeichnet werden konnte. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Pilzgärten über die Zeit an Feuchtigkeit verloren. Die Subkolonien waren nicht hermetisch verschlossen und die BSA mussten auch ausreichend mit Luft versorgt werden. Dabei könnte die Austrocknung stärker in den kleinen etablierten Foramicarien erfolgt sein als in den großen Mutterkolonien.

Anscheinend haben die Feuchtigkeitsversorgung in der Pilzbox und die Reduzierung des Boxensystems nicht ausgereicht, um diesen Verlust auszugleichen. Somit sollte die Feuchtigkeitsversorgung der Pilzgärten für mögliche weitere Untersuchungen optimiert werden. Die Untersuchung mit dieser Konzentration wurde nach neun Tagen abgebrochen, da die gewählte Konzentration keinen Effekt auf die behandelten Pilzgärten hatte.

Als mittlere Konzentration wurden 500 µl an HIPV-versetzter Paste als Behandlung gewählt. Eine der behandelten Subkolonien wurde aufgrund einer Kontamination des Pilzgartens durch eine Schimmelpilzart von der letzten Messung ausgeschlossen. Die Pilzoberflächen der behandelten Subkolonien wiesen Tendenzen (Signifikanzniveau bei ca. 10%) einer Inhibition des Wachstums auf. Somit konnten bei dieser Konzentration die ersten tendenziellen Behandlungseffekte auf einen der ausgewählten Wachstumsfaktoren festgestellt werden. Die Veränderungen des Gewichtes der Pilzgärten von Kontroll- und behandelten Subkolonien verliefen nicht über die ganze Versuchsdauer hin gleich, aber die Unterschiede waren nicht signifikant. Die möglicherweise erhöhte Austrocknungsrate in den Foramicarien, die bei der Konzentration von 100 µl wohl schon Gewichtsverluste verursacht haben könnte, könnte eventuell aufgetretene Behandlungseffekte überlagert haben. Ein weiteres Anzeichen für einen bestehenden Behandlungseffekt wäre der Zusammenhang zwischen den Wachstumsfaktoren und der Mortalität der Arbeiterinnen. Das Abnehmen beider Wachstumsfaktoren hatte signifikant Auswirkungen auf die Zunahme der Sterberate. Durch die Abnahme der Oberfläche und des Gewichtes konnten die Arbeiterinnen wohl nicht mehr ausreichend durch den Pilz versorgt werden. Die Kontamination durch eine Schimmelpilzart einer der behandelten Pilzgärten könnte durch die eingeschränkte Nesthygiene (Currie & Stuart, 2001) entstanden sein, die durch die abnehmende Abundanz an Arbeiterinnen eventuell forciert wurde.

Zusätzlich konnte bei der Behandlung mit 500 µl eine „delayed rejection“ wie bei Tremmel (2008) und Herz *et al.* (2008) beobachtet werden. Nach einer Versuchsdauer von sieben Tagen sank die Schneideaktivität der foragierenden Arbeiterinnen gegenüber den angebotenen *Rubus fruticosus* Blättern in den behandelten Subkolonien gegen Null und blieb die restliche Zeit fast unverändert. Die verwendeten fungizid wirkenden HIPVs der Limabohne (Stephan, 2010; Rosenthal & Berenbaum, 1991) veranlassten über den Pilz die Arbeiterinnen dazu, das angebotene Futter, das sonst

ohne Einschränkungen geschnitten wurde, zu diskriminieren. Somit scheint der Pilz nicht dazu in der Lage zu sein, die ihm zugefügten schädlichen Stoffe und ihre Quelle spezifizieren zu können, sondern registriert das ihm bei der Behandlung verabreichte Substrat als Schadensquelle. Darüber erfolgt die Informierung der Arbeiterinnen, die daraufhin die eigentlich Pilz-unschädliche Nahrungspflanze meiden. Weiterführende Untersuchungen könnten in Bezug auf die Dauer des diskriminierenden Verhaltens gegenüber der verabreichten Nahrungspflanze unternommen werden, ob diese genauso lange anhält wie bei der direkten Verabreichung von schädigenden Substanzen an den Pilzgarten (Saverschek, *et al.*, 2010; Herz *et al.* 2008). Bei einer Weiterführung der hier angewendeten Behandlung könnte ergänzend überprüft werden, ob nach dem Auftreten der Diskriminierung der angebotenen Futterpflanze weitere Futterpflanzen mit anhaltender HIPV-Behandlung diskriminiert werden würden. Diese Ergebnisse könnten möglicherweise für die Agrarwirtschaft in den durch BSA geschädigten Gebieten (Hölldobler & Wilson, 1990) interessant sein. Mit einer andauernden Verabreichung von HIPVs in eine BSA-Kolonie könnte eine eventuell dauerhafte Diskriminierung von den eingetragenen Substraten erreicht werden. Fraglich wäre nur, ob diese Methode nicht aufwendiger und kostenintensiver ist als die bisherigen Schädlingsbekämpfungsmaßnahmen. Für den Schutz der tropischen Umwelt vor den giftigen Wirkungen der verwendeten Pestizide und den biologischen Anbau von Nahrungspflanzen wäre eine Erwägung dieser Methode aber eventuell lohnenswert.

Der Rückgang des Furagierverhaltens der Arbeiterinnen der behandelten Subkolonien hat wiederum Auswirkungen auf das Pilzwachstum. Durch den fehlenden Blatteintrag kann der Pilz nicht weiter kultiviert werden und die Versorgung der Arbeiterinnen durch den Pilz wird auch vermindert. Die HIPV-Behandlung beeinflusst letztlich durch die Inhibition des Pilzwachstums und die ausgelöste Diskriminierung der Nahrungspflanzen durch die Arbeiterinnen eine verstärkte Abnahme des Pilzgartens, die außerdem die Mortalität der Arbeiterinnen verstärkt. Rücklaufend verursacht die steigende Mortalität der Arbeiterinnen einen Mangel in der Versorgung des Pilzes, wodurch die Nesthygiene (Currie & Stuart, 2001) und der Blatteintrag über die Zeit vernachlässigt werden. Der Einfluss der HIPVs auf den Pilz kann vollständig die mutualistische Beziehung zum Erliegen bringen und das Ableben der beiden Symbionten bedeuten. In der freien Natur ist ein solch verheerender Einfluss der HIPVs

nicht möglich, da die aufgezeigten Furagiermuster (z.B. Howard, 1988a; Cherrett J. M., 1972) der BSA eine dauerhafte Belastung des Symbiose-Partners durch HIPVs vermeiden.

Der angefallene Abfall wurde anscheinend nur durch das Altern der Subkolonien beeinflusst. Auf eine Beziehung zu anderen Faktoren kann nur indirekt geschlossen werden. Durch den Abbau des Pilzgartens und die anfallenden Blattreste, die nicht mehr für den Pilz verwendet werden können aufgrund der Diskriminierung dieses schon eingetragenen Substrates, wird mehr Abfall durch die Arbeiterinnen zusammengetragen. Ob dieser Faktor für die Aufnahmen weiterer Untersuchungen sinnvoll ist, ist fraglich. Vielleicht sollte nur die Menge an angefallenen Pilz- und Pflanzenresten gemessen werden, wodurch eine bessere Aufschlüsselung des Verhältnisses von toten Arbeiterinnen und dem restlichen Abfall möglich wäre.

Abschließend lässt sich zu dieser gewählten Konzentration von 500 μ l sagen, dass Behandlungseffekte tendenziell auftreten und einen weitreichenden Einfluss auf die unterschiedlichen Faktoren dieses komplexen BSA-Pilz-Mutualismus haben. Weiterführende Untersuchungen könnten mehr Klarheiten über die Auswirkungen von andauernden Behandlungseffekten auf den Mutualismus liefern und die Dauer der ausgelösten Diskriminierung der Nahrungspflanzen durch diese Behandlung.

Zusammenfassend für alle angewendeten Konzentrationen lässt sich sagen, dass wohl erst ab einer Konzentration von 500 μ l tendenzielle Auswirkungen der HIPVs der Limabohne erfasst werden können. Dadurch kann die zweite Hypothese tendenziell durch die gewählte mittlere Konzentration bestätigt werden.

Seneszenzeffekte und eine erhöhte Austrocknung in den Subkolonien können mögliche Behandlungseffekte verbergen. Die Aufnahme der Oberflächen und des Gewichtes als Wachstumsfaktoren des Pilzes erachte ich insgesamt als sinnvoll. Befürchtete Ungenauigkeiten beim Wiegen des Pilzes durch methodische Ineffizienz bei z.B. dem Einsammeln der Arbeiterinnen von den Pilzgärten oder einem stärkeren Einfluss der Feuchtigkeit im Pilzmyzel, sind wohl unbegründet. Die Austrocknungseffekte trotz der Reduzierung der Foramicarien auf zwei Boxen und den hinzugefügten Befeuchtungsmaßnahmen müssten noch weiter eingeschränkt werden.

Die Aufnahme der Schneideaktivität erwies sich als sehr sinnvoll und müsste höchstens in der Methodik verfeinert werden. Die Schwankung der in den Blättern enthal-

tenen Feuchtigkeit führte zu negativen Schneideraten und könnte weniger ausgeprägte Ergebnisse beeinträchtigen. Durch das auffällige Furagierverhalten der behandelten Subkolonien konnten in dieser Untersuchung eindeutige Aussagen getroffen werden, aber geringere Effekte könnten mit dieser Methodik eventuell nicht erfasst werden. Die Aufnahme des Abfalls als weiteren Faktor für die Vitalität der Subkolonien sollte für zukünftige Untersuchungen weiter modifiziert werden.

4.3 Aufschluss der Duftspektren von HIPV-Paste und induzierten Blattfragmenten (*Phaseolus lunatus*)

Bei der Messung der Duftemissionen konnten einige verunreinigende Peaks festgestellt werden, die neben den charakteristischen Peaks der Duftstoffe vorhanden waren (Kap. 6.2). Diese erfassten Verunreinigungen könnten von den verwendeten Materialien stammen. Das Lanolin gibt auch für den Menschen wahrnehmbare Gerüche ab und könnte durch seine eigene Emission diese zusätzlichen Peaks in den Spektren verursacht haben. Zusätzlich könnten die feuchten Watte pads oder die Filter, auf die die Paste aufgetragen oder die komplett mit Blattfragmenten bedeckt waren, ungewollte Duftstoffe emittiert haben. Eine weitere Möglichkeit, die überprüft werden müsste, wären innerartliche Schwankungen der Emissionsspektren von induzierten Limabohnen. Desweiteren könnten die flüchtigen Duftstoffe schneller aus den Wundrändern der gestanzten Blattfragmente emittiert sein im Gegensatz zu der HIPV-versetzten Paste.

Die der Lanolin-Paste hinzugefügten VOCs und ihre Zusammensetzung sollten einer natürlich induzierten Limabohne nach 24 Stunden entsprechen (Kost & Heil, 2006). Leichte Konzentrationsunterschiede konnten von Heil (2004a) zwischen den natürlich durch Herbivorie und JA-induzierten Limabohnen festgestellt werden. Fraglich ist nur, ob diese bekannten Konzentrationsunterschiede mit verantwortlich, für die signifikanten Unterschiede in den emittierten Mengen pro 24 Stunden der gemessenen Duftstoffe von der HIPV-versetzten Paste und den JA-induzierten Limabohnen-Blattfragmenten sind. Im Einzelvergleich unterschieden sich nur zwei Duftstoffe, nämlich (3Z)-Hex-3-enylacetat und Methylsalicylat, in den emittierten Mengen pro 24 Stunden bei der HIPV-Paste und den induzierten Blattfragmenten nicht voneinander. Ein weiterer Grund für diesen Unterschied könnte sein, dass die verwendeten Mengen der beiden Emittenten nicht vergleichbar waren. Nur Methylsalicylat wurde mengenmäßig mehr von den Blattfragmenten emittierte. Alle anderen Duftstoffe wurden in höheren Konzentrationen von der HIPV-Paste abgegeben. Die Blattfragmente bedeckten die Filteroberfläche mit einer Fläche von ca. 24 cm² und von der HIPV-Paste wurden 100 µl auf den Filter aufgetragen. Für weitere Messungen sollten die Mengen der Emittenten angepasst werden. Beispielsweise sollten beide Emittenten in gleicher Menge verwendet werden, anstelle der unterschiedlichen und nicht direkt vergleichbaren Einheiten von Fläche und Volumen, wie in dieser Untersuchung.

Es bleibt schwer zu erklären, warum bestimmte Duftstoffe, wie (*R*)-(-)-Linalool und TMTT, in keinem einzigen Emissionsspektrum der Blattfragmente vorhanden waren oder detektiert werden konnten. Entweder waren die maskierenden Effekte durch zusätzliche Emissionen der Materialien in den entsprechenden Bereichen dieser beiden Stoffe ausschlaggebend oder diese beiden flüchtigen VOCs wurden aus unbekanntem Gründen nicht gebildet oder vor den Messungen nur kurzfristig emittiert. Die Emissionsspektren von durch Herbivorie induzierten und den JA-induzierten Lima-bohnen sollten sich maximal in den Konzentrationen (Heil, 2004a) und nicht in der Zusammensetzung der Duftstoffe unterscheiden. Mögliche Schwankungen der Zusammensetzung der emittierten Duftstoffe von JA-induzierten und durch Herbivorie-induzierte Lima-bohnen sollten möglicherweise überprüft werden.

Bei der HIPV-versetzten Paste konnte die vollständige Zusammensetzung aller hinzugefügten Duftstoffe nachgewiesen werden. Dabei konnten aber auch die beiden oben genannten Duftstoffe und DMNT (einmalig) nicht in allen Emissionsspektren nachgewiesen werden, obwohl mehrere Messungen aus einer angesetzten Pasten-Charge entstammten. Somit sind Messfehler eher unwahrscheinlich, da alle Duftstoffe mindestens einmal in verschiedenen Messungen detektiert werden konnten. Am wahrscheinlichsten erscheinen noch die maskierenden Auswirkungen der ungewollten Emissionen der eingesetzten Materialien und innerartliche Schwankungen, wie auch eine frühzeitige Emission während dem Auftauen der Paste.

Die dritte Hypothese muss aufgrund der Ergebnisse in diesem speziellen Fall falsifiziert werden, denn die Zusammensetzung und die Konzentrationen der beiden Emit-tenten waren nicht vergleichbar.

5 Literaturverzeichnis

- Abril, A. (2011). *The leaf-cutting ant-plant interaction from a microbial ecology perspective*. Springer; All Flesh is Grass: Plant-Animal Interrelationships; pp 39-63.
- Agrawal, A. (1998). *Leaf damage and associated cues induce aggressive ant recruitment in a neotropical ant-plant*. Kalifornien: Ecology, 79(6): pp 2100–2112.
- Aigner, J. (2007). *Effekte fraßinduzierter Pflanzenvolatile auf das Ernteverhalten von Blattschneiderameisen*. TU Kaiserslautern: Diplomarbeit.
- Arimura, A., Matsui, K., & Takabayashi, J. (2009). *Chemical and Molecular Ecology of Herbivore-Induced Plant Volatiles: Proximate Factors and Their Ultimate Functions*. Plant and Cell Physiology, 50(5): pp 911–923.
- Arimura, G., Kost, C., & Boland, W. (2005). *Herbivory-induced, indirect plant defences*. Biochimica et Biophysica Acta, 1734:91-111 .
- Arimura, G., Ozawa, R., Nishioka, T., Boland, W., Koch, T., Kühnemann, F., & Takabayashi, J. (2002). *Herbivory-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants* . The Plant Journal, 29(1):87-98.
- Arimura, G., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka, T., Boland, W., & Takabayashi, J. (2000). *Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves*. Nature, 406:512-515.
- Ballhorn, D., Heil, M., & Lieberei, R. (2006). *Phenotypic plasticity of cyanogenesis in Lima bean Phaseolus lunatus — activity and activation of b-glucosidase*. Journal Chemical Ecology, 32:261–275.
- Ballhorn, D., Heil, M., Pietrowski, A., & Lieberei, R. (2007). *Quantitative effects of cyanogenesis on an adapted herbivore*. Journal of Chemical Ecology, 33:2195–2208.
- Barnola, L., Hasegawa, M., & Cedeno, A. (1994). *Mono- and sesquiterpene variation in Pinusaribaea needles and its relationship to Atta laevigata herbivory*. Biochemical Systematics and Ecology, 22:437–445.
- Barrer, P., & Cherrett, J. (1972). *Some factors affecting the site and pattern of leaf-cutting activity in the ant Atta cephalotes (L.)*. Journal of Entomology, 47:15-27.
- Bergelson, J., & Purington, C. (1996). *Surveying patterns in the cost of resistance in plants*. The American Naturalist, 148:536–558.
- Bigger, D., & Marvier, M. (1998). *How different would a world without herbivory be? A search for generality in ecology* . Integrative Biology, 1:60–67 .
- Bolton, B. (1995). *A new general catalogue of the ants of the world*. USA: Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts.

- Brower, L., Ryerson, W., Coppinger, L., & Glazier, S. (1968). *Ecological chemistry and the palatability spectrum*. Science, 161:1349-1350 .
- Chambliss, O., & Jones, C. (1966). *Cucurbitacins: Specific insect attractants in Cucurbitaceae*. Science, 153:1392-1393.
- Chapela, I., Rehner, S., Schultz, T., & Müller, U. (1994). *Evolutionary History of the Symbiosis Between Fungus-Growing Ants and Their Fungi*. Science, 266:1691-1694.
- Chase, J. (1998). *Central Place-Forager Effects on Food Web Dynamics and Spatial Pattern in Northern California Meadows*. Ecology, 79(4):1236–1245.
- Chen, T., Wiemer, D., & Howard, J. (1984). *A Volatile Leafcutter Ant Repellent from Astronium graveolens*. Naturwissenschaften, 71:97-98.
- Cherrett, J. (1968). *The foraging behaviour of Atta cephalotes L. (Hymenoptera, Formicidae) I. Foraging pattern and plant species attacked in tropical rain forest*. Journal of Animal Ecology, 37:387-403 .
- Cherrett, J. (1982). *The economic importance of leaf cutting ants; In: The Biology of social insects; Proceedings of the Ninth Congress of the International Union for the Study of Social Insects*. Boulder, Colorado: Westview Press, pp.114-118.
- Cherrett, J. (1983). *Resource conservation by the leaf-cutting ant Atta cephalotes in tropical rain forest*. Ecology and Management (Special Publication), 2:253-263.
- Cherrett, J. M. (1972). *Some factors involved in the selection of vegetable substrate by Atta cephalotes (L.) (Hymenoptera: Formicidae) in tropical rain forest*. Journal of Animal Ecology, 41:647-660.
- Clausen, T. P., Reichardt, B., P., Bryant, J. B., Werner, R. A., Post, K., & Frisby, K. (1989). *Chemical model for short-term induction in quaking aspen (Populus tremuloides) foliage against herbivores*. J Cem Ecol, 15:2335-2346.
- Coley, P., & Barone, J. (1996). *Herbivory and plant defenses in tropical forests*. Annual Review of Ecology and Systematics, 27:305-335.
- Coley, P., Bryant, J., & Chapin, F. (1985). *Resource Availability and Plant Antiherbivory Defense*. Science, 230:895-899.
- Cornell, H., & Hawkins, B. (2003). *Herbivore responses to plant secondary compounds: a test of phytochemical coevolution theory*. The American Naturalist, 161:507-522.
- Correa, M., Silva, P., Wirth, R., Marcelo, T., & Leal, I. (2009). *How leaf-cutting ants impact forests: drastic nest effects on light environment and plant assemblages*. Oecologia, 162:103-115 .
- Crawley, M. (1983). *Herbivory the dynamics of animal plant interactions*. Oxford: Blackwell Science.

- Creelman, R., & Mullet, J. (1997). *Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plants*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48:355-381.
- Currie, C., & Stuart, A. (2001). *Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants*. The Royal Society, 268:1033-1039.
- Currie, C., Bot, A., & Boomsma, J. (2003). *Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites*. Oikos, 101:91-102.
- De Boer, J., Posthumus, M., & Dicke, M. (2004). *Identification of volatiles that are used in discrimination between plants infested with prey or nonprey herbivores by a predatory mite*. Journal of Chemical Ecology, 30:2215-2230.
- De Siqueira, C., Bacci, J. M., Pagnocca, F., Bueno, O., & Hebling, M. (1998). *Metabolism of Plant Polysaccharides by Leucoagaricus gongylophorus, the Symbiotic Fungus of the Leaf-Cutting Ant Atta sexdens L.* Applied and Environmental Microbiology, 64:4820-4822.
- DeBach, P. (1964). *Biological control of insect pests and weeds*. London: Chapman & Hall.
- Degenhardt, D., & Lincoln, D. (2006). *Volatile Emissions from an Odorous Plant in Response to Herbivory and Methyl Jasmonate Exposure*. Journal of Chemical Ecology, 32:725-743.
- Dicke, M. (1986). *Volatile spider-mite pheromone and host-plant kairomone, involved in spaced-out gregariousness in the spider mite Tetranychus urticae*. Physiological Entomology, 11:251-262.
- Dicke, M., & Van Loon, J. (2000). *Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 97:237-249.
- Dicke, M., Gols, R., Ludeking, D., & Posthumus, M. (1999). *Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants*. Journal of Chemical Ecology, 25:1907-1922.
- Eidmann, H. (1932). *Beiträge zur Kenntnis der Biologie, insbesondere des Nestbaues der Blattschneiderameise Atta sexdens L., In: Zoomorphology*. Springer, 25:154–183.
- Farji-Brener, A. (2001). *Why are leaf-cutting ants more common in early secondary forests than in old-growth tropical forests? An evaluation of the palatable forage hypothesis*. Oikos, 92:169-177.
- Fernández-Marín, H., Zimmerman, J., Rehner, S., & Wcislo, W. (2006). *Active use of metapleural glands by ants in controlling fungal infection*. Proceedings of The Royal Society Biological Sciences, 273:1689–1695.

- Fowler, H., & Stiles, E. (1980). *Conservative resource management by leaf-cutting ants? The role of foraging territories and trails, and environmental patchiness*. *Sociobiology*, 5:25-41.
- Fowler, H., Pagani, M., da Silva, O., Forti, L., da Silva, V., & de Vascoceles, H. (1989). *A Pest is a Pest is a Pest? The Dilemma of Neotropical Leaf-Cutting Ants: Keystone Taxa of Natural Ecosystems*. *Environmental Management*, 13: 671-675.
- Fraenkel, G. (1959). *Raison d'être of secondary plant substances*. *Science*, 129:1466–1470.
- Fry, J. (1993). *Biological data analysis: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 418 pp.
- Gols, R., Roosjen, M., Dijkman, H., & Dicke, M. (2003). *Induction of direct and indirect plant responses by jasmonic acid, low spider mite densities, or a combination of jasmonic acid treatment and spider mite infestation*. *Journal of Chemical Ecology*, 29:2651-2666 .
- Haeder, S., Wirth, R., Herz, H., & Spiteller, D. (2009). *Candidicin-producing Streptomyces support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus Escovopsis*. *PNAS Early Edition*, 10.1073.
- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1991). *Tannins and lignins*. In: Rosenthal, G. A.; Janzen, D. H. (eds) *Herbivores. Their interaction with secondary plant metabolites*. 2te Edition. Vol1 . San Diego: Academic Press, pp 355-388.
- Heil, M. (2004 b). *Induction of two indirect defences benefits lima bean in nature*. *Journal of Ecology*, 92:527-536 .
- Heil, M. (2004a). *Direct defence or ecological costs: Responses of herbivorous beetles to volatiles released by wild lima bean (Phaseolus lunatus)*. *Journal of Chemical Ecology*, 30:1298-1295.
- Heil, M. (2007). *Indirect Defence – Recent Developments and Open Questions*. *Progress in Botany*, 15:360-382.
- Heil, M., & Bostock, R. (2002). *Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences*. *Annals of Botany*, 89:503–512.
- Herms, D., & Mattson, J. (1992). *The dilemma of plants: to grow or defend*. *Quarterly Review of Biology*, 67:283–335.
- Herre, E., Knowlton, N., Mueller, U., & Rehner, S. (1998). *The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation*. *Trends in Ecology & Evolution*, Vol14:49-53.
- Herz, H., Hölldobler, B., & Roces, F. (2008). *Delayed rejection in a leaf-cutting ant after foraging on plants unsuitable for the symbiotic fungus*. *Behavioral Ecology*.

- Herzog, S. (2010). *Effekte von herbivorieinduzierten Pflanzenvolatilen auf Blattschneiderameisen*. TU Kaiserslautern: Protokoll eines Forschungspraktikums.
- Hölldobler, B., & Wilson, E. (1990). *The Ants*. Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong : Springer.
- Horiuchi, J., Arimura, G., Ozawa, R., Shimoda, T., Dicke, M., Takabajashi, J., & Nishioka, T. (2003 a). *Lima bean leaves exposed to herbivore-induced conspecific plant volatiles attract herbivores in addition to carnivores*. *Applied Entomology and Zoology*, 38(3):365-368.
- Howard, J. (1988a). *Leaf cutting ant diet selection: Relative influence of leaf chemistry and physical features*. *Ecology*, 69:250-260.
- Howard, J. (1990). *Infidelity of leafcutting ants to host plants: resource heterogeneity or defense induction?* *Oecologia*, 82:394-401.
- Howard, J. (1991). *Resource quality and cost in the foraging of leaf-cutter ants; In: Ant-plant interactions, C. R. Huxley and D. F. Cutler, eds*. Oxford: Oxford University Press, pp 42-50.
- Howard, J. (2001). *Cost of trail construction and maintenance in the leaf-cutting ant *Atta colombica**. *Behavioural Ecology and Sociobiology*, 49:348-356.
- Howard, J., Cazin, J. J., & Wiemer, D. (1988 b). *Toxicity of terpenoid deterrents to the leafcutting ant *Atta cephalotes* and its mutualistic fungus*. *Journal of Chemical Ecology*, 14(1):59-69.
- Howard, J., Green, T., & Wiemer, D. (1989). *Comparative deterrence of two Terpenoids to two genera of attine ants*. *Journal of Chemical Ecology*, 15:2275-2288.
- Hulme, P. (1996). *Herbivory plant regeneration, and species coexistence*. *Journal of Ecology*, 84:609–615 .
- Jaffe, K., & Howse, P. (1979). *The mass recruitment system of the leaf cutting ant, *Atta cephalotes* (L.)*. *Animal Behaviour*, 27:930–939.
- Jones, D. (1962). *Selective eating of the acyanogenic form of the plant *Lotus corniculatus* by various animals*. *Nature*, 193:1109–1110.
- Karban, R., & Myers, J. (1989). *Induced plant responses to herbivory*. *Annual Review Ecological Systems*, 20:331-348.
- Kessler, A., & Baldwin, I. (2001). *Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature*. *Nature*, 291:2141-2144.
- Kjellsson, G. (1985 a). *Seed fate in apopulation of *Carex pilulifera* L. II. Seed predation and its consequences for dispersal and seed bank*. *Oecologia*, 67:416-423.
- Koch, T. (2001). *Analytik pflanzlicher Signalstoffe: Phytohormone und Abwehr*. Jena: Dissertation, Bioorganic Chemistry, Max Planck Institute for Chemical Ecology.

- Koricheva, J., Nykänen, H., & Gianoli, E. (2004). *Meta-analysis of trade-offs among plant antiherbivore defences: are plants jacks-of-all-trades, masters of all?* The American Naturalist, 163: 64–75.
- Kost, C. (2006). *Herbivore-induced indirect plant defences of Lima Bean (Phaseolus lunatus, Fabaceae)*. Friedrich-Schiller Universität Jena: Dissertation.
- Kost, C., & Heil, M. (2005 a). *Increased avail-ability of extrafloral nectar reduces herbivory in Lima beans (Phaseolus lunatus, Fabaceae)*. Basic and Applied Ecology, 6:237-248 .
- Kost, C., & Heil, M. (2006). *Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants*. Journal of Ecology; 94, 619–628.
- Kost, C., & Heil, M. (2006). *Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants*. Journal of Ecology, 94:619–628.
- Kost, C., Tremmel, M., & Wirth, R. (2011). *Do leaf cutting ants cut undetected? Testing the effect of ant-induced plant defences on foraging decisions in Atta colombica*. PLoS ONE, 6(7):e22340 .
- Littleddyke, M., & Cherrett, J. (1975). *Variability in the selection of substrate by the leaf-cutting ants Atta cephalotes (L.) and Acromyrmex octospinosus (Reich.) (Formicidae, Attini)*. Bulletin of Entomological Research, 65:33-47 .
- Littleddyke, M., & Cherrett, J. (1976). *Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants Atta cephalotes (L.) and Acromyrmex octospinosus (Reich) (Formicidae, Attini)*. Bulletin of Entomological Research, 66:205-217.
- Littleddyke, M., & Cherrett, J. (1978). *Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants Atta cephalotes (L.) and Acromyrmex octospinosus (Reich.) (Formicidae, Attini)*. Bulletin of Entomological Research, 66:205-217.
- Lottspeich, F., & Zorbas, H. (1998). *Bioanalytik*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Louda, S. (1984). *Herbivore effect on stature, fruting and leaf dynamics of a native crucifere*. Ecology, 65:1379-1385.
- Lowenberg, G. (1994). *Effects of floral herbivory on maternal reproduction in Sanicula arctopoides (Apiaceae)*. Ecology, 75:359-369.
- Markl, H. (1965). *Stridulation in leaf-cutting ants*. Science, 149:1392-1393.
- Martin, M. (1979). *Biochemical implications of insect mycophagy*. Biological Rewiews of the Cambridge Philosophical Society, 54:1-24 .
- Matsui, K., Kurishita, S., Hisamitsu, A., & Kajiwara, T. (2000). *A lipid-hydrolyzing activity involved in hexenal formation*. Biochemical Society Transactions, 28:857-860.

- Meyer, S. (2008). *Ecosystem engineering in fragmented forests: Edge-mediated hyperabundance of leaf-cutting ants and resulting impacts on forest structure, microclimate, and regeneration*. TU Kaiserslautern: Dissertation.
- Meyer, S., Roces, F., & Wirth, R. (2006). *Selecting the drought stressed: Effects of plant stress on intraspecific and within plant herbivory patterns of the leaf-cutting ant *Atta colombica**. *Functional Ecology*, 20:973-981.
- Müller, U., Rehner, S., & Schultz, T. (1998). *The Evolution of Agriculture in Ants*. *Science*, 281:2034-2038.
- Nentwig, W., Bacher, S., Beierkuhnlein, C., Brandl, R., & Grabherr, G. (2004). *Ökologie*. München: Spektrum Akademischer Verlag.
- Nichols-Orians, C., & Schulz, J. (1989). *Leaf Toughness Affects Leaf Harvesting by the Leaf Cutter Ant, *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae)*. *Biotropica*, 21:80-83.
- North, R., & Jackson, C. H. (1999). *Communication between the fungus garden and workers of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa*, regarding choice of substrate choice of substrate for the fungus*. *Physiological Entomology*, 24:127–133.
- Pillemer, E., & Tingey, W. (1976). *Hooked trichomes: A physical plant barrier to a major agricultural pest*. *Science*, 193:482-484.
- Pyke, G., Pulliam, H., & Charnov, G. (1977). *Optimal foraging: A selective review of theory and tests*. *Quarterly Review of Biology*, 52:137-154.
- Quinlan, R., & Cherrett, J. (1978). *Aspects of the symbiosis of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* and its food fungus*. *Ecological Entomology*, 3:221-230.
- Reichstein, T., van Eeuw, J., Parsons, J., & Rothschild, M. (1968). *Heart poisons in the Monarch butterfly*. *Science*, 161:861-866.
- Reymond, P., & Farmer, E. (1998). *Jasmonates and salicylate as global signals for defense gene*. *Current Opinion in Plant Biology*, 1:404-411.
- Ridley, P., Howse, P., & Jackson, C. (1996). *Control of the behaviour of leaf-cutting ants by their 'symbiotic' fungus*. *Experientia*, 52:631–635.
- Roces, F., & Hölldobler, B. (1994). *Leaf density and a trade-off between load-size selection and recruitment behavior in the ant *Atta cephalotes**. *Oecologia*, 97:1-8.
- Roces, F., & Kleineidam, C. (2000). *Humidity preference for fungus culturing by workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa**. *Insectes Sociaux*, 47:348–350 .
- Roces, F., & Nunez, J. (1993). *Information about food quality influences load-size selection in recruited leaf-cutting ants*. *Animal Behaviour*, 45:135-143 .
- Rockwood, L. (1976). *Plant selection and foraging patterns in two species of Leaf-cutting ants (*Atta*)*. *Ecology*, 57:48-61.

- Rockwood, L., & Hubbell, S. (1987). *Host-plant selection, diet diversity and optimal foraging in a tropical leafcutting ant*. *Oecologia*, 74:55-61.
- Rosenthal, G., & Berenbaum, M. (1991). *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. New York: Academic Press.
- Saverschek, N., Herz, H., Wagner, M., & Roces, F. (2010). *Avoiding plants unsuitable for the symbiotic fungus: learning and long-term memory in leaf-cutting ants*. *Animal Behaviour*, 79(3):689-698.
- Schulze, B., Kost, C., Arimura, G., & Boland, W. (2006). *Duftstoffe: Die Sprache der Pflanzen*. *Chemie unserer Zeit*, 40:366-377v.
- Schulze, E., Beck, E., & Müller-Hohenstein, K. (2002). *Pflanzenökologie*. Berlin: 707 : Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Stephan, J. (2010). *Perzeption und Effekte von herbivorieinduzierten Pflanzenvolatilen auf Blattschneiderameisen und ihren symbiotischen Pilz*. TU Kaiserslautern: Diplomarbeit.
- Swain, T. (1979). *Tannins and lignins*. In: Rosenthal, G. A.; Janzen, D. H. (eds) *Herbivores. Their interaction with secondary plant metabolites*. . New York: Academic Press, pp 657-682.
- Theis, N., & Lerdau, M. (2003). *The evolution of function in plant secondary metabolites*. *International Journal of Plant Science*, 164:93-102.
- Tremmel, M. (2008). *Induzierte chemische pflanzliche Abwehr erst bei kumulativen Fraßschäden? Die Effekte anhaltender Blatternte durch *Atta colombica* auf Emission und Abwehrwirkung fraßinduzierter Pflanzenvolatile der Limabohne (*Phaseolus lunatus*)*. TU Kaiserslautern: Diplomarbeit.
- Tuberville, T., Dudley, P., & Pollard, A. (1996). *Responses of invertebrate herbivores to stinging trichomes of *Urtica dioica* and *Laportea canadensis**. *Oikos*, 75:83-88.
- Urbas. (2004). *Effects of forest fragmentation on bottom-up control in leafcutting ants*. TU Kaiserslautern: Dissertation.
- Vasconcelos, H. (1997). *Foraging activity of an Amazonian leaf-cutting ant: responses to changes in the availability of woody plants and to previous plant damage*. *Oecologia*, 112:370-378.
- Vick, B., & Zimmermann, D. (1984). *Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species*. *Plant Physiology*, 75:458–461.
- Weber, N. (1966). *Fungus-Growing Ants*. *Science*, 153:587-604.
- Wetterer, J., Schultz, T., & Meier, R. (1998). *Phylogeny of Fungus-Growing Ants (Tribe Attini) Based on mtDNA Sequence and Morphology*. *Molecular Phylogenetics And Evolution*, 9:42-47.

- Wilson, E. (1986). *The defining traits of fire ants and leaf-cutting ants*; In: Meer, R.K.(eds.) 1986: *Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management* Lofgreen, Vander, C.S. Boulder: Westview Press.
- Wirth, R., Herz, H., Ryel, R., Beyschlag, W., & Hölldobler, B. (2003). *Herbivory of Leaf-Cutting Ants*. Berlin, Heidelberg: Springer .
- Wirth, R., Meyer, S. T., Almeida, W. R., Ara´ujo, M. V., Barbosa, V. S., & Leal, I. R. (2007). *Increasing densities of leaf-cutting ants (Atta spp.) with proximity to the edge in a Brazilian Atlantic forest*. *Journal of Tropical Ecology*, 23:501–505.
- Zar, J. (1996). *Biostatistical analysis (3te Edition)*. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River. 662 pp.
- Zwölfer, H. (1987). *Species richness, species packing, and evolution in insect-plant systems*; In: Schulze, E.D.; Zwölfer, H. (eds): *Potential and limitations of ecosystems analyses*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, pp 301-319.

6 Anhang

6.1 Massenspektren der emittierten Duftstoffe der Limabohne (*P. lunatus*)

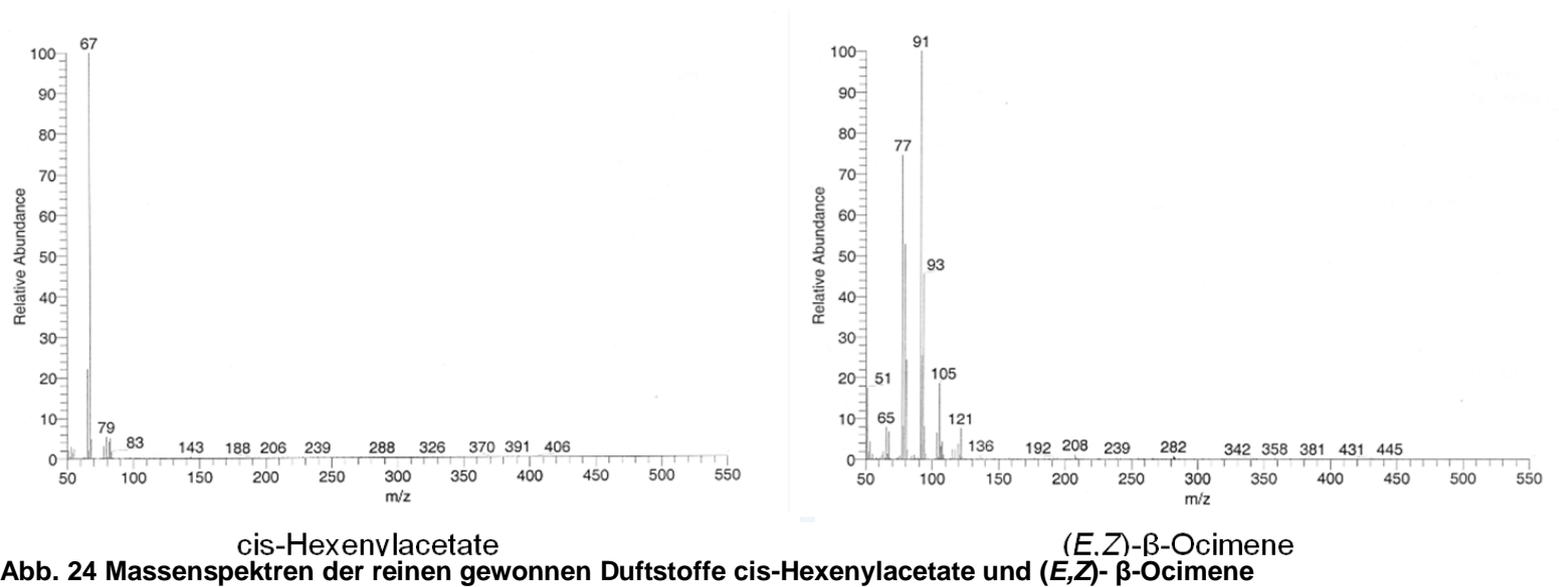


Abb. 24 Massenspektren der reinen gewonnenen Duftstoffe *cis*-Hexenylacetate und (*E,Z*)- β -Ocimene

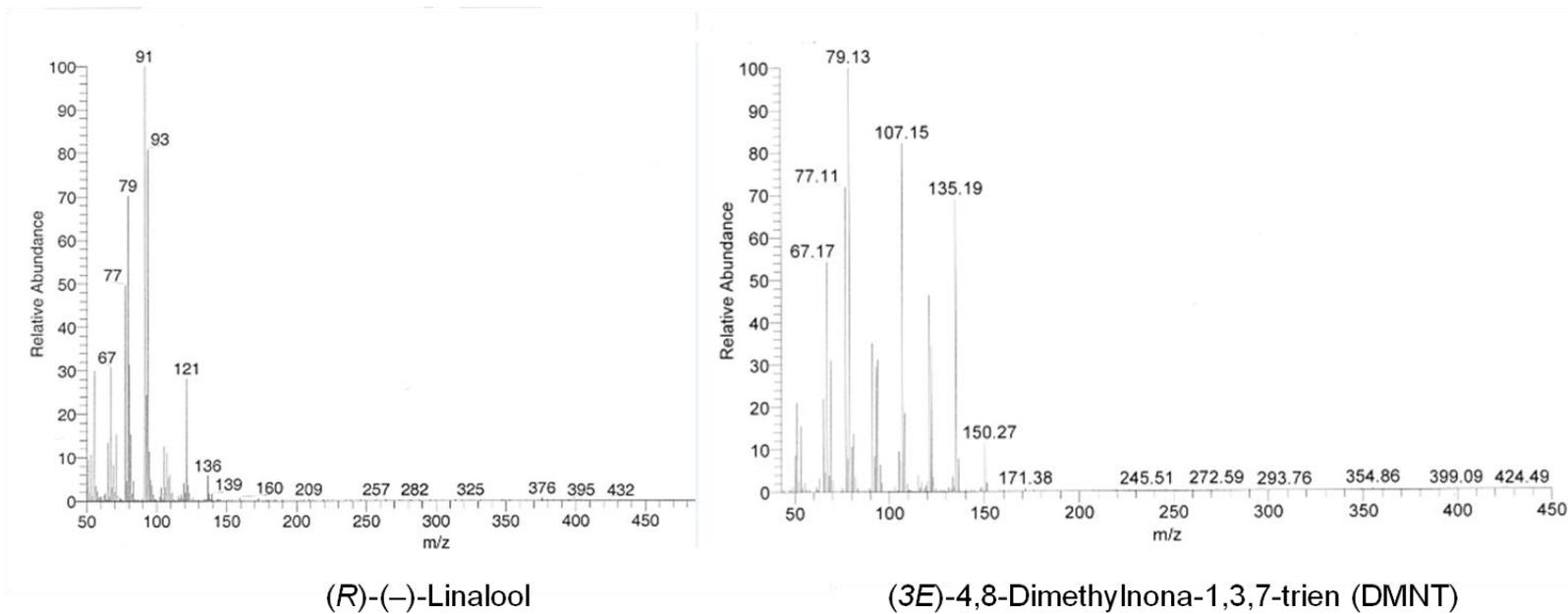
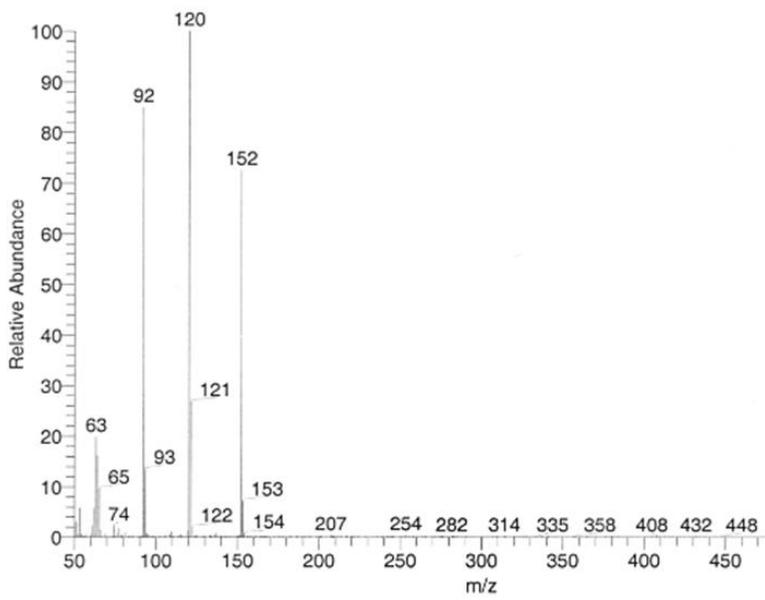
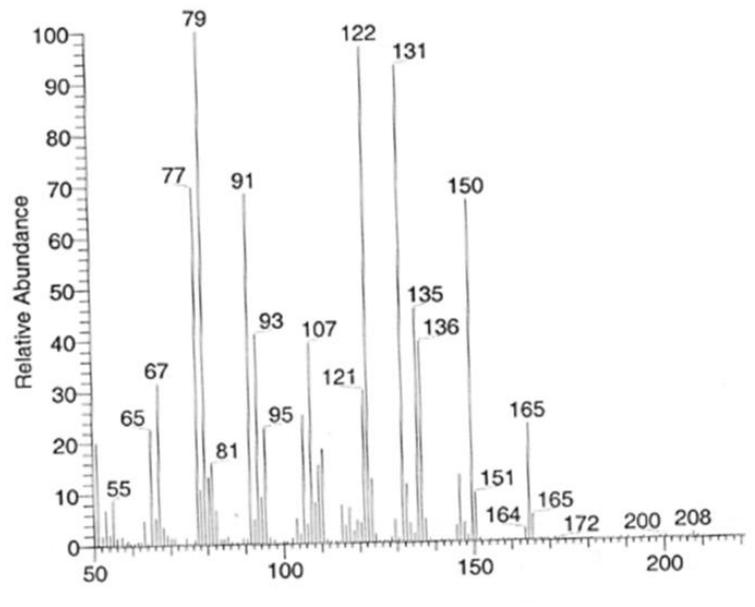


Abb. 23 Massenspektren der reinen gewonnenen Duftstoffe (*R*)-(-)-Linalool und (*3E*)-4,8-Dimethylnona-1,3,7-trien

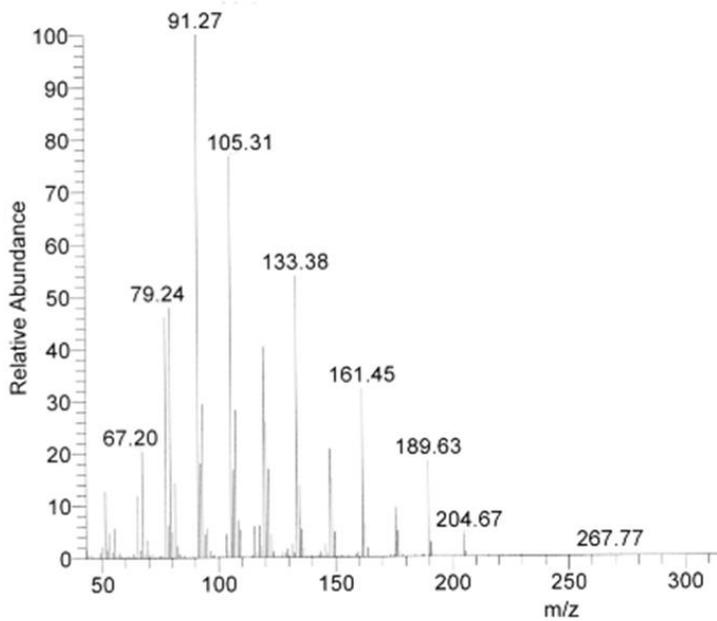


Methylsalicylat

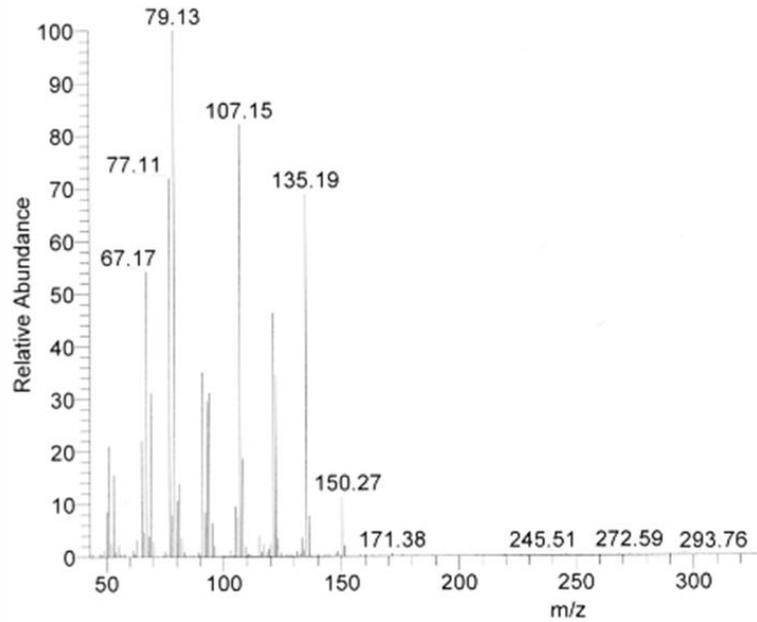


(Z)-Jasmon

Abb. 25 Massenspektren der reinen gewonnen Duftstoffe Methylsalicylat und (Z)-Jasmon



Caryophyllene



(3E,7E)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen

Abb. 26 Massenspektren der reinen gewonnen Duftstoffe Caryophyllene und (3E,7E)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen

6.2 Exemplarische Massenspektren der gemessenen emittierten Duftstoffe (HIPV-versetzte Lanolin-Paste)

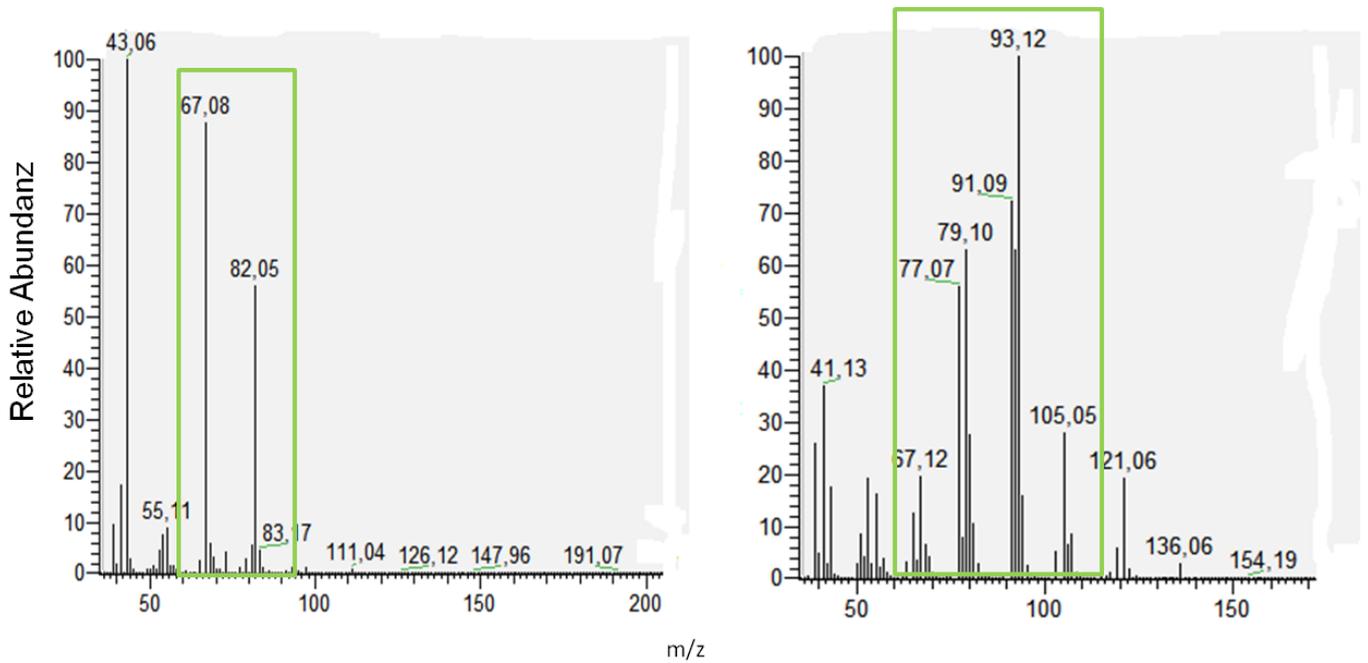


Abb. 28 Massenspektren der emittierten Duftstoffe cis-Hexenylacetate und (E,Z)- β -Ocimene aus der HIPV-versetzten Lanolin-Paste (100 μ l)

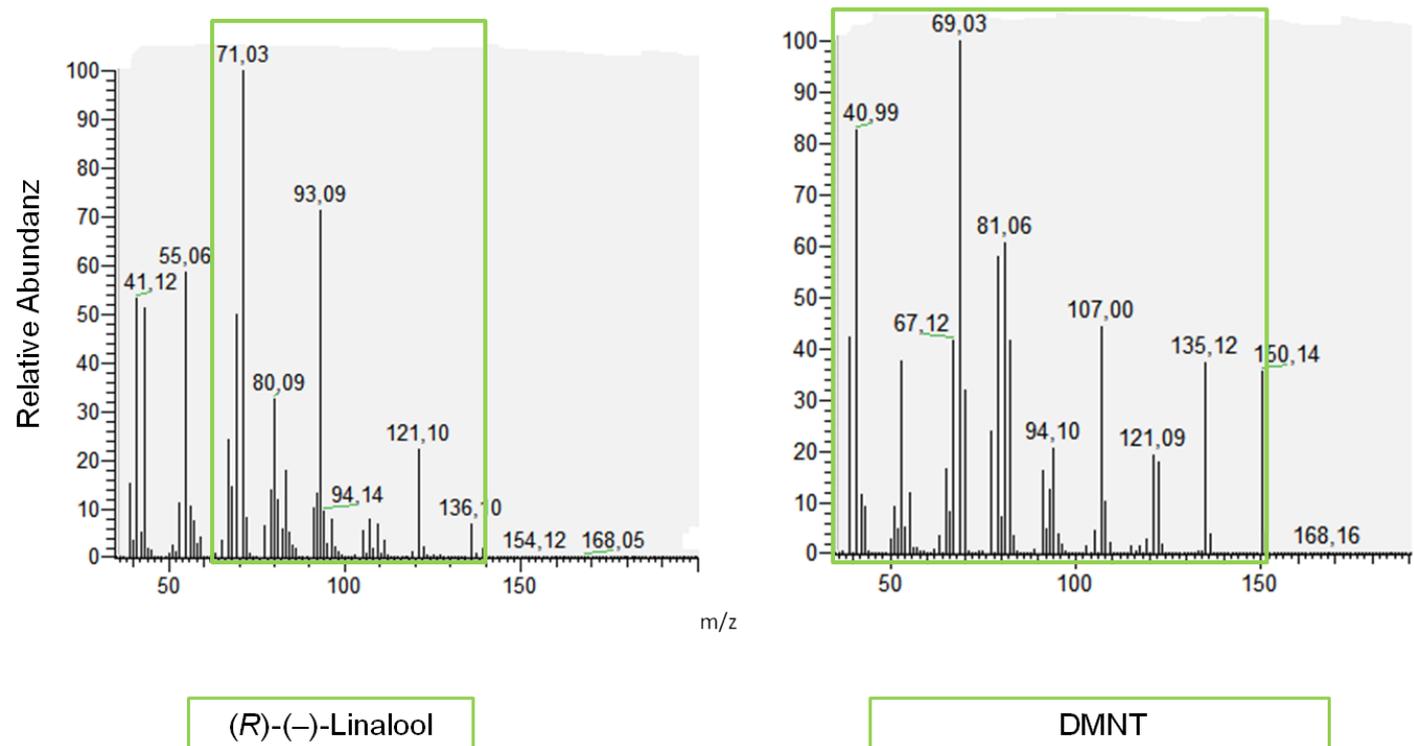


Abb. 27 Massenspektren der emittierten Duftstoffe (R)-(-)-Linalool und (3E)-4,8-Dimethylnona-1,3,7-trien aus der HIPV-versetzten Lanolin-Paste (100 μ l)

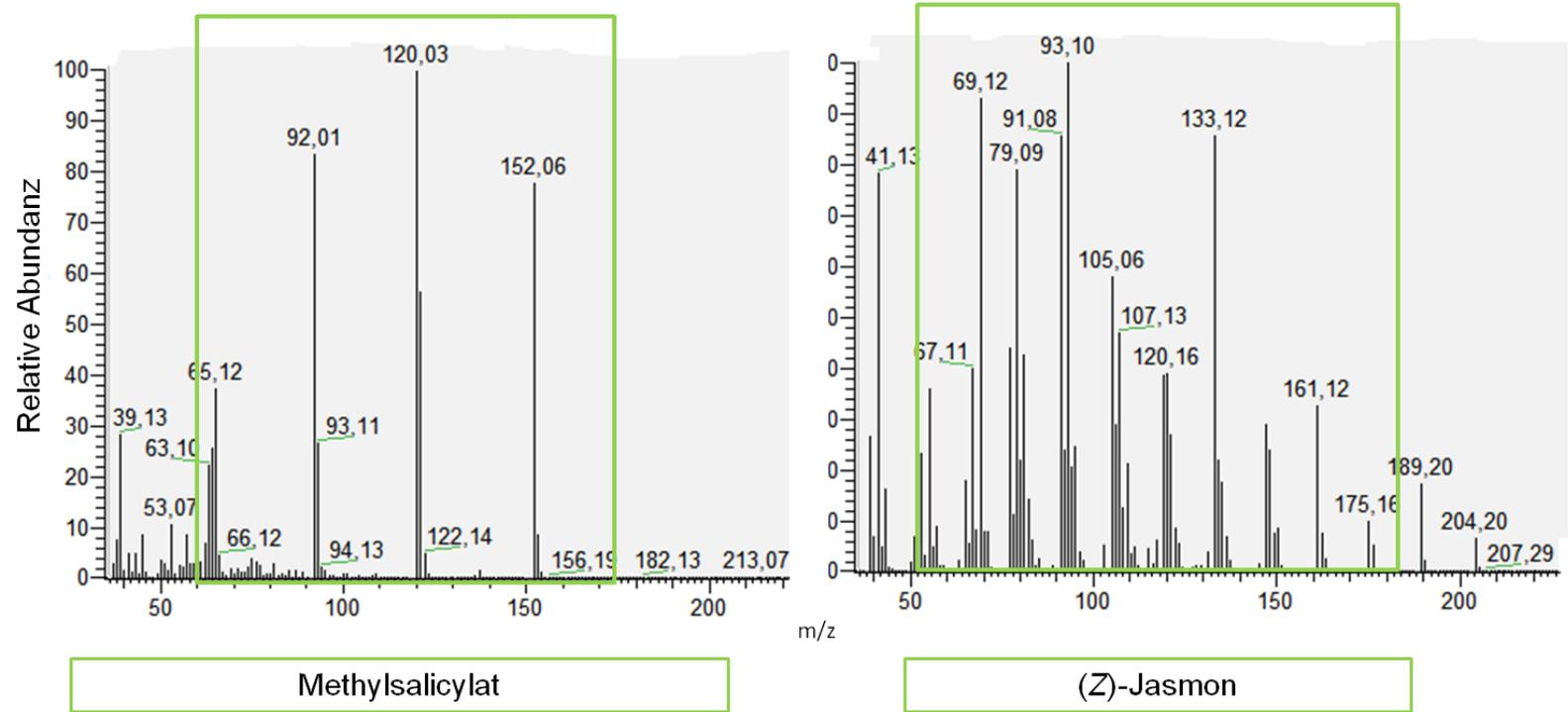


Abb. 29 Massenspektren der emittierten Duftstoffe Methylsalicylat und (Z)-Jasmon aus der HIPV-versetzten Lanolin-Paste (100 µl)

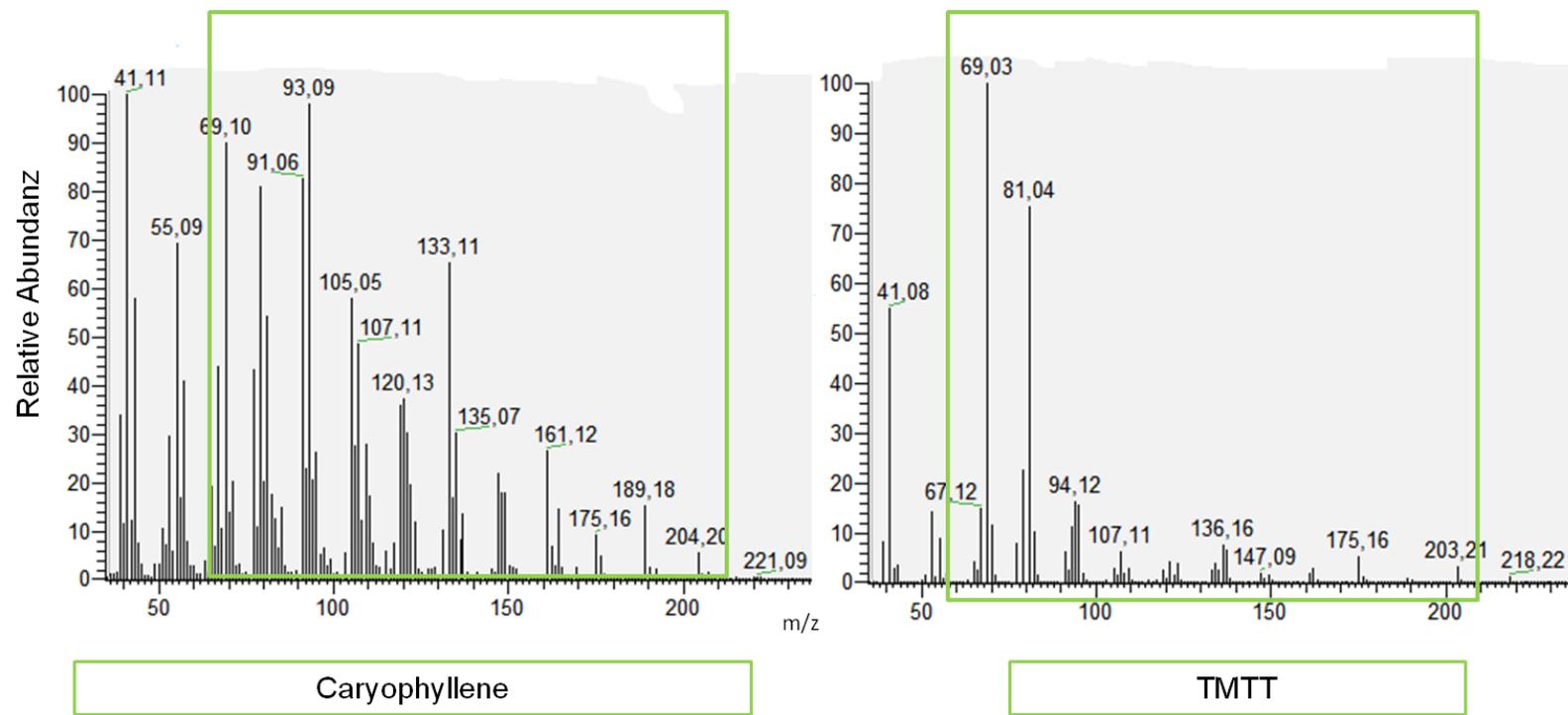


Abb. 30 Massenspektren der emittierten Duftstoffe Caryophyllene und (3E,7E)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen aus der HIPV-versetzten Lanolin-Paste (100 µl)