

Diplomarbeit

Perzeption und Effekte von herbivorieinduzierten Pflanzenvolatilen auf Blattschneiderameisen und ihren symbiotischen Pilz

angefertigt im Fachbereich Biologie
der technischen Universität Kaiserslautern
Abteilung Pflanzenökologie und Systematik

vorgelegt von
Jörg Stephan
Im März 2010

Danke

Dr. Rainer Wirth für die Betreuung der Arbeit, die aufbauenden Besprechungen und der hilfreichen Kritik der Rohversion dieser Arbeit, Dr. Christian Kost für die Tipps und Ratschläge während den Versuchen, für die Einladung an das Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena und für die Übernahme der Zweitkorrektur, Dr. Dieter Spiteller für die Sequenzierung, der gesamten Abteilung Pflanzenökologie und Systematik der TU Kaiserslautern, insbesondere Beatrix Weber für die Hilfe im Labor, der Abteilung Bioorganische Chemie am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena, besonders Dr. Stefan Bartram für die Hilfe und Vermessung der Proben, den Tierpflegerinnen des Tierhauses der TU Kaiserslautern für die Versorgung der Ameisen, den Gärtnern der TU Kaiserslautern für den Anbau und die Pflege der Versuchspflanzen, den Elektronischen Werkstätten der TU Kaiserslautern für den Bau eines zweiten Olfakotmeters, Nicole Bischof und David Finkler für das Engagement und die Ausdauer während ihrer Praktika, Katharina Müller für die moralischen Unterstützung und der Hilfe mit den Pilzkulturen und natürlich meinen Eltern für die Unterstützung während des Studiums

Inhaltsangabe

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1. Pflanzen und ihre Abwehr – Modellorganismus Limabohne	2
1.2. Blattschneiderameisen und ihre Futtersuche	8
1.3. Interaktion zwischen symbiotischem Pilz und Blattschneiderameisen	12
1.4. Ziele und Motivation der vorliegenden Arbeit	15
2. Material und Methoden.....	19
2.1. Untersuchungsansatz und experimentelle Herangehensweise.....	19
2.2. <i>Atta colombica</i> -Kolonien und ihre Haltung.....	19
2.3. Konfrontation der BSA mit HIPVs der Limabohne	20
2.3.1. Experimentelle Behandlungen in den Olfaktometerversuchen	21
2.3.2. Vorbereitungen für die Behandlungen	22
2.3.3. Entwicklung und Durchführung der Wahlexperimente mit dem Olfaktometer	25
2.3.4. Nachweis des Vorhandenseins von HIPVs im Olfaktometer	29
2.4. Inhibitionsassays zur Messung der HIPV-Wirkung auf den symbiotischen Pilz.....	31
2.4.1. Wahl des Mediums und Isolation des symbiotischen Pilzes	32
2.4.2. Einarbeitung der HIPVs in die Kulturmedien.....	34
2.4.3. Durchführung der Bioassays und Messung der Wachstumsinhibition.....	34
2.5. Datenverarbeitung und statistische Auswertung	37
3 Ergebnisse.....	38
3.1 Reaktion von <i>Atta colombica</i> -Arbeiterinnen auf pflanzliche Duftstoffe im Olfaktometer	38
3.1.1 Überprüfung der Olfaktometerfunktion.....	38
3.1.2. Reaktion der BSA auf simulierte HIPV-Emission	39
3.1.3. Reaktion der Blattschneiderameisen auf natürliche HIPV-Emissionen der Limabohne	41
3.1.4. HIPV-Konzentrationen im Olfaktometer	42
3.2. HIPV-Wirkung auf das Wachstum des symbiotischen Pilzes von <i>Atta colombica</i>	44
4. Diskussion	51
4.1. Einfluss der HIPV-Emission auf die Wegentscheidung der Blattschneiderameisen	52
4.2. Inhibierung des Wachstum des symbiotischen Pilzes durch die HIPVs.....	57
4.3. Auswirkung der Ergebnisse auf das Verständnis der Futtersuchökologie von Blattschneiderameisen.....	61
4.4. Fazit	67
5. Literaturverzeichnis	68

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Blattschneiderameise
DMNT	4,8-Dimethyl-1,3,7-Nonatrien
GLV	green leaf volatile
GC-MS	Gaschromatograph mit gekoppeltem Massenspektrometer
HIPV	herbivore-induced plant volatile (herbivorie-induzierte Pflanzenvolatile)
JA	Jasmonsäure
LOX	Lipoxygenase
MW	Mittelwert
OPDA	Oxophytodiensäure
PDA	Potato-Dextrose-Agar (Kartoffel-Dextrose-Agar)
PDB	Potato-Dextrose-Broth (Kartoffel-Dextrose-Flüssigmedium)
PL	Phospholipase
STABW	Standardabweichung
SFM	Soy-Flour-Medium (Sojamehl-Medium)
TMTT	(3E,7E)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-Tetraen
VOC	volatile organic compound (flüchtige organische Verbindung)
YNB	Yeast-Nitrogen-Base-Medium
YNBG	Yeast-Nitrogen-Base-Medium mit Glucose
YNBGC	Yeast-Nitrogen-Base-Medium mit Glucose und Chloarmphenicol

1. Einleitung

Die wissenschaftliche Erforschung von Tier-Pflanzen Interaktionen ist ein zentrales Themengebiet der Ökologie, dessen Bedeutung für das Verständnis sowohl funktionell ökologischer als auch evolutionärer Zusammenhänge zunehmend erfasst wird. Neben positiven mutualistischen Beziehungen, wie Bestäubung oder Samenverbreitung durch Tiere, sind auch antagonistische Interaktionen, wie etwa die Herbivorie von Interesse. Durch Konsumierung von Pflanzenmaterial können Herbivoren das Überleben und die Fitness von Pflanzen beeinflussen (Crawley 1983, Marquis 1984). Der Einfluss dieser trophischen Interaktion auf eine Pflanzengesellschaft wird als mindestens ebenso stark eingeschätzt, wie die Konkurrenz innerhalb dieser und hat dadurch großen Einfluss auf das dortige vorhandene Artenreichtum und die Organisation der Pflanzengesellschaft (Bigger und Marvier 1998, Hulme 1996). Herbivoren können die Eigenschaften von Ökosystemen wie der Primärproduktion, der Diversität der Nahrungsnetze oder den Nährstoffkreislauf wesentlich beeinflussen (Crawley 1983, Huntly 1991).

Insbesondere Interaktionen von herbivoren Insekten und Pflanzen spielen eine große Rolle, da sie einen großen Einfluss auf fast alle Ökosysteme haben. Die Interaktionen der Koevolution von Pflanzen und Insekten werden als große treibenden Kräfte in der Organisation von Ökosystemen angesehen (Crawley 1983, Zwölfer 1987). Es wird zum Beispiel geschätzt, dass mehr als 75 % des jährlichen Blätterkonsums in den Tropen durch kauende und schneidende Insekten erfolgt (Coley und Barone 1996).

Blattschneiderameisen (BSA), von Fowler *et al.* (1989) als Schlüsselarten und von Wirth *et al.* (2003) und Meyer (2008) als Ökosystem Ingenieure bezeichnet, zählen zu den dominanten Herbivoren in den Neotropen (Wilson 1986) und können im bis zu 2 ha großen Futtersuchareal ihrer Kolonie bis zu 12,5% der gesamten Blattmasse eintragen (Wirth *et al.* 2003). Die Schäden an Nutzpflanzen verursacht durch BSA-Fraß pro Jahr gehen in die Millionen (Hölldobler und Wilson 1990). Der komplexe Prozess der Auswahl von Futterpflanzen ist Resultat evolutionärer und ökologischer Faktoren (siehe Kap. 1.2). Pflanzliche Abwehr spielt hierbei eine entscheidende Rolle (siehe Kap. 1.1). Bei BSA, als besonders polyphagen Herbivoren, ist beispielsweise auch von Interesse, wie sie die komplexen und multiplen Abwehrmaßnahmen ihrer

Futterpflanzen umgehen. Im Gegensatz zu anderen Herbivoren leben BSA in Symbiose mit einem Pilz, der Nahrungsgrundlage für einen Großteil der Ameisen und ihrer Brut ist.

Thema der vorliegenden Arbeit ist daher die Reaktion von BSA inklusive ihrem symbiontischen Pilzpartner auf induzierte chemische Pflanzenabwehr und die dabei freigesetzten Herbivorie induzierten Pflanzenvolatile (HIPVs). In dieser Untersuchung wird somit, aufbauend auf zwei rezenten Diplomarbeiten in der selben Arbeitsgruppe (Aigner 2007, Tremmel 2008), die chemische Ökologie der Fraßpflanzenwahl von BSA untersucht. Aufgrund des Einflusses des symbiotischen Pilzes auf die Futtersuche der BSA wird auch der Pilz mit den HIPVs von Pflanzen konfrontiert, um der Frage nachzugehen, ob die BSA direkt oder nur indirekt durch Beeinflussung durch den Pilz auf die emittierten Stoffe reagieren (Rahbe *et al.* 1988, Knapp *et al.* 1990).

Um die oben genannten Themenkomplexe im Kontext der hier verwendeten Modellorganismen (Blattschneiderameisen *Atta colombica* (Hymenoptera, Formicidae) und ihre Futterpflanze *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) zu erläutern und das Verständnis für die wissenschaftliche Hypothesenformulierung dieser Studie zu verbessern, werde ich diese Einleitung wie folgt strukturieren: Bevor auf die konkreten Zusammenhänge der Futtersuchökologie der BSA eingegangen wird (Kap. 1.2), sollen generelle Aspekte pflanzlicher Abwehrmechanismen sowie der aktuelle Wissensstand bezüglich der Reaktion von BSA auf die induzierte Abwehr der Limabohnen charakterisiert werden (Kap. 1.1). Nachfolgend werden der symbiotische Pilze und sein Einfluss auf die Futtersuchökologie der BSA beschrieben (Kap. 1.3.).

1.1. Pflanzen und ihre Abwehr – Modellorganismus Limabohne

Schäden durch Herbivoren können z.B. durch schnelles Wachstum und Entwicklung kompensiert werden (Kompensationswachstum *sensu* Coley 1988). Eine andere Strategie besteht in der Ausbildung von Herbivorieresistenz (Baldwin *et al.* 2006), also pflanzliche Abwehr durch physikalische (z.B. Schutz durch Trichome (Jander *et al.* 2001), Blatthärte (Lucas *et al.* 2000)), chemische (z. B.: Wachse aus Drüsen

Einleitung

(Fernandes *et al.* 1994, Eigenbrode und Espelie 1996) oder biologische (Theis und Lerchau 2003; Arimura *et al.* 2009) Faktoren. Pflanzliche Abwehr kann in direkte und indirekte Abwehr unterteilt werden, wobei direkte Abwehr sich direkt gegen Herbivoren richtet (Baldwin *et al.* 2006), bei der indirekten Abwehr dagegen Parasiten oder Räuber der Herbivoren angelockt werden (Arimura *et al.* 2005, Kost 2006). Bezüglich der zeitlichen Verfügbarkeit von Abwehragenzien/Abwehrstrategien kann man konstitutive und induzierte Abwehr unterscheiden.

Zur konstitutiven Abwehr zählen sowohl mechanische Einrichtungen, als auch dauerhaft in das pflanzliche Gewebe eingelagerte Sekundärmetaboliten wie Phenole und Tannine (Hagerman 2002, Karban und Baldwin 1997). Aber auch das dauerhafte Beherbergen symbiotischer Partner zur Herbivorenabwehr ist ein konstitutiver (indirekter) Abwehrmechanismus (Bailey 1922, Jolivet 1996). Der Vorteil der konstitutiven Abwehr liegt darin, dass sie aufgrund der ständig vorhandenen Abwehreinrichtungen/Abwehrstoffe gegen viele unspezialisierte Herbivoren wirksam ist. Andererseits ist es einfacher für Herbivoren Resistenzmechanismen gegen konstitutive Abwehrmechanismen zu entwickeln, da sie über viele Generationen ständig in Kontakt mit ihnen kommen. Beispielsweise kann der Tabakschwärmer (*Manduca sexta*) das Nikotin der Tabakpflanze tolerieren und sogar zu seiner eigenen Abwehr einsetzen (Nentwig *et al.* 2004). Die anhaltend hohen Investitionen von Energie und Ressourcen in die Herbivorenabwehr kann neben der Evolution von Spezialisten außerdem auch eine Fitness-Einbuße gegenüber solchen Pflanzen darstellen, welche nicht in diese Art der Abwehr investieren (Herms und Mattson 1992, Cornell und Hawkins 2003).

Induzierte Abwehr bezeichnet dagegen die Synthese von repellenten oder toxischen Metaboliten gegen die Herbivoren (direkt) sowie die Anlockung natürlicher Feinde der Herbivoren mittels Metabolite (indirekt), welche vorher nicht von der Pflanze gebildet wurden und erst durch die Herbivorie ausgelöst werden (Theis und Lerchau 2003, Arimura *et al.* 2009). Diese induzierten Abwehrmechanismen beinhalten die Einlagerung von Sekundärmetaboliten in das Pflanzengewebe, Emission von Pflanzenvolatilen oder die Sekretion extrafloralen Nektars. Diese Mechanismen können lokal, also direkt am beschädigten Gewebe bzw. Organen, oder systemisch, also in der gesamten Pflanze oder in anderen, von der Fraßstelle entfernten Pflanzenteilen induziert werden. Die induzierte Abwehr bringt den Vorteil einer ökonomischeren Ressourcennutzung mit sich, da die Kosten der

Einleitung

Metabolitenproduktion nur bei direkter Bedrohung anfallen und ansonsten in Wachstum und Entwicklung investiert werden können (Herms und Mattson 1992; Bergelson und Purington 1996). In diesem Kontext beeinflusst Herbivorie die Evolution von pflanzlichen Lebensstrategien, welche als Trade-Off zwischen der Evolution kostspieliger pflanzlicher Abwehr und hohen Wachstumsraten zu verstehen sind (Heil und Bostock 2002, Koricheva *et al.* 2004). Die Begünstigung einer Strategie wird dabei hauptsächlich durch vorherrschende Umweltbedingungen bedingt. Eine Pflanze mit sehr gut entwickelter Abwehr in einer Umgebung mit wenig Herbivorie hat an diesem Standort eine geringere Fitness als eine schnell wachsende Pflanze mit geringer Ressourceninvestition in Abwehr (Nentwig *et al.* 2004, Cornell und Hawkins 2003, Arimura *et al.* 2009).

Ein zentraler Mechanismus im Kontext induzierter pflanzlicher Abwehr sind die durch Herbivorie induzierten Pflanzenvolatile (HIPVs). HIPVs sind flüchtige organischen Verbindungen (engl. *volatile organic compounds*; VOCs), die sowohl indirekt der Anlockung natürlicher Feinde der Herbivoren dienen können (Arimura *et al.* 2005), als auch direkt repellent auf Herbivoren wirken (Heil 2004a, Dicke und van Loon 2000). Als VOCs sind Verbindungen definiert, welche Kohlenstoff enthalten, leicht verdampfen (flüchtig sind) bzw. schon bei niedrigen Temperaturen (z. B. Raumtemperatur) gasförmig vorliegen. VOCs haben Bedeutung für die Bestäubung von Pflanzen (Heil 2007) und dienen der Kommunikation zwischen Pflanzenindividuen (Kost 2006). Die HIPVs werden nach Herbivorieschäden *de novo* synthetisiert und lassen sich den drei chemischen Verbindungsklassen Terpene, Acetogenine und aromatische Verbindungen zuordnen (Schulze *et al.* 2006). Auch grünen Blattduftstoffe (engl. *green leaf volatiles*; GLVs) gehören zu den VOCs, liegen aber im Gegensatz zu den HIPVs wohl als Vorstufen bereits im Blattgewebe vor und werden nach einer Beschädigung passiv freigesetzt (Heil 2007). Dafür spricht jedenfalls die schnelle Freisetzung nach Verwundung (ca. 20 Sekunden bei *Arabidopsis thaliana*; Matusi *et al.* 2000). Ökologisch können Pflanzenvolatile, einschließlich der GLVs und der HIPVs, als Info- oder Allelochemikalien bezeichnet werden. Diese Bezeichnung beinhaltet, im Gegensatz zu Pheromonen, auch eine zwischenartliche Kommunikation. Die Kommunikation kann zum Vorteil des Senders (Allomone), zum Nachteil des Senders (Kairomone) oder zum Vorteil des Senders und des Empfängers (Synomone) sein (Nentwig *et al.* 2004, Arimura *et al.* 2009). Es ist allerdings nicht immer möglich einzelne Stoffe oder Stoffzusammensetzungen

Einleitung

einer einzigen Funktion zuzuordnen. Dies soll am Beispiel der auch in diesen Untersuchungen verwendeten Limabohne gezeigt werden. Ihre extraflorale Nektarien, welche paarig auf den Blattstielen der dreigeteilten Blätter und an den Blattstängeln angeordnet sind, dienen der Anlockung von Prädatoren und Parasitoiden der Herbivoren der Limabohne und sind damit zu den Synomonen zu rechnen (Kost und Heil 2005). Als Sender genießt die Limabohne den Vorteil der

höheren Wahrscheinlichkeit der Beseitigung ihres Fraßfeindes und ist damit einer geringeren Herbivorie ausgesetzt. Der Empfänger, in diesem Fall Ameisen, Fliegen aber vor allem Wespen (Kost und Heil 2005) kommen in den Vorteil nicht so lange nach Nahrung suchen zu müssen. Die HIPVs der Limabohne können hingegen verschiedenen Allelochemikalien zugeordnet werden. Die Limabohne lockt zum Beispiel nach Befall durch Spinnmilben (*Tetranychus urticae*) mittels ihrer Volatile Raubmilben (*Phytoseiulus persimilis*) an (Gols *et al.* 2003, Horiuchi *et al.* 2003a, De Boer *et al.* 2004) und die HIPVs dienen hier somit als Synomone. Durch diese indirekte Abwehr ist es der Pflanze möglich ihren

Fraßschaden einzudämmen. Dieser Mechanismus funktioniert, da die Raubmilben über eine bestimmte Duftstoffzusammensetzung angelockt werden, welche nur ausgesendet wird, wenn ihre Beute auch anwesend ist. Im Laufe dieser tritrophischen Koevolution haben die Prädatoren gelernt, das Duftsignal der Pflanze mit ihrer Beute in Verbindung zu bringen (Dicke und van Loon 2000). Gleichzeitig wurde aber auch festgestellt, dass die HIPV-Emission der Limabohne als direkte Abwehr gegen zwei Blattkäfer (*Cerotoma ruficornis* und *Gynandrobrotica*

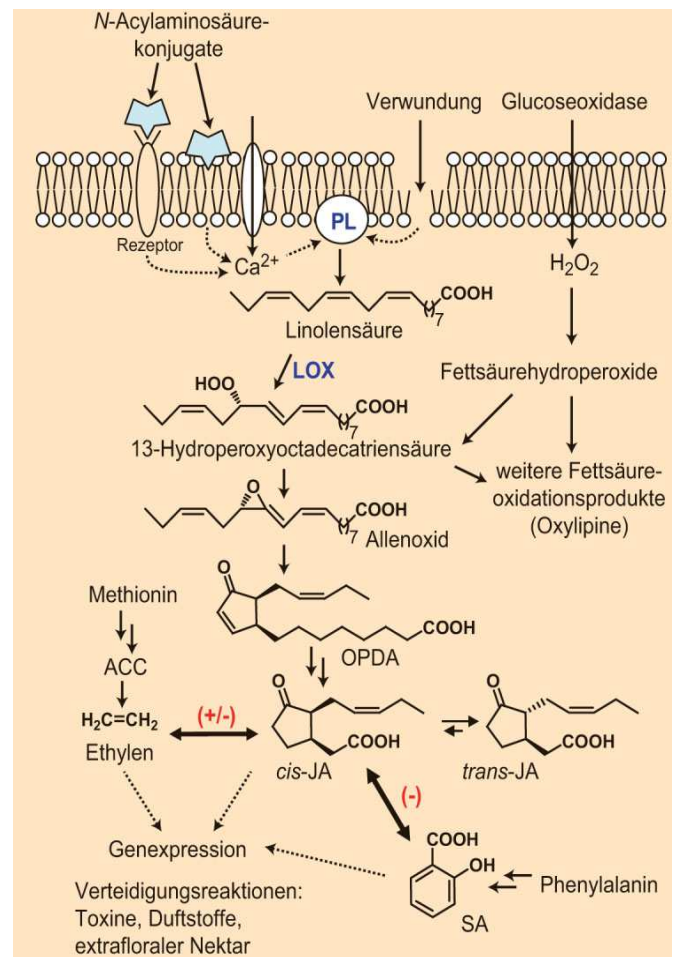


Abbildung 1: Signaltransduktion für herbivorie-induzierte Pflanzenabwehr. Über den Oktadecansäure-Weg findet letztlich eine Induzierung der Verteidigung statt. Nähere Erklärung siehe Text © 2006 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co

Einleitung

guerreroensis), beide natürliche Herbivoren der Limabohne, dienen. Diese Käfer bevorzugten Kontrollpflanzen gegenüber Pflanzen, die HIPVs in hohen Konzentrationen bildeten (Heil 2004b). Die selben HIPVs dienten hier somit als Allomone und schützten die Pflanze vor Herbivorieschäden. In diesen Untersuchungen wurde aber auch gezeigt, dass bei geringer Konzentration der HIPVs keine Bevorzugung der Kontrollpflanze mehr stattfand. Scheinbar hängen solche Interaktionsformen von der Dosis der HIPVs ab, wie auch Tremmel in seiner Arbeit über die Interaktion zwischen BSA und Limabohnen zeigen konnte (Tremmel 2008). Während die BSA dort anfänglich eine Präferenz für Pflanzen zeigten, welche wenig HIPVs abgaben, stellte sich mit ansteigender HIPV-Emission durch andauernde Herbivorie eine Repellenz ein, die durch geringeren Eintrag von Blattmasse in die Kolonie belegt werden konnte. In anderen Herbivoren–Pflanzen-Interaktionen wurde wiederum bewiesen, dass HIPVs Herbivoren auch anlocken können, also auch als Kairomone wirken können (Dicke 1986, Dicke und van Loon 2000, Horiuchi *et al.* 2003a).

Da in dieser Arbeit die Wirkung von HIPVs der Limabohne auf die Nahrungswahl von Ameisenindividuen und ihren symbiotischen Pilz beobachtet werden soll, folgt eine genauere Vorstellung der Limabohne und ihrer induzierten Abwehr.

Die Limabohne, eine einjährige oder mehrjährige Liane mit Wuchshöhen von bis zu 3 Metern, ist wie die BSA in Mittel- und Südamerika beheimatet. Sie fungiert als Modellpflanze in der chemischen Ökologie und indirekte Abwehrmechanismen, wie die Emission von HIPVs oder die Sekretion von Nektar aus EFNs wurden nachgewiesen (Heil 2004ab, Kost und Heil 2005). Die Produktion von cyanogenen Verbindungen, welche wegen ihrer toxischen Wirkung auf Herbivoren ein Teil der direkten chemischen Abwehr der Limabohne darstellen (Jones 1962, Ballhorn *et al.* 2007), können scheinbar ebenfalls durch den Fraß von Herbivoren induziert werden (Ballhorn *et al.* 2006). Dies sind in ihrem natürlichen Habitat verschiedene Blattkäfer (z.B. *Cerotoma ruficornis* und *Gynandrobrotica guerreroensis*), Spinnmilben (*Tetranychus urticae*) und andere Herbivore (Kost 2006). Dass die Limabohne als natürliche Nahrungspflanze der (mittelamerikanischen) BSA-Arten dienen kann, wurde noch nicht *in situ* dokumentiert, allerdings wurde sie von den Ameisen bereitwillig geerntet (Aigner 2007). Insgesamt sind über 60 verschiedene flüchtige Verbindungen bekannt (Dicke *et al.* 1999), die von der Limabohne gebildet werden. Dabei handelt es sich um verschiedene Stoffe wie Aldehyde, Ketone,

Einleitung

Alkohole, Ester, Terpene und stickstoffhaltige Bestandteile. Das HIPV-Spektrum der Limabohne besteht zu großen Anteilen aus Hexenylacetat, Linalool, Ocimen, Caryophyllen sowie Dimethylnonatrien (DMNT) und Trimethyltridecatetraen (TMTT) (Arimura *et al.* 2005, Boland *et al.* 1995). Bei der Induktion der chemischen Abwehr der Limabohne gegen Herbivorie spielt, wie bei vielen Pflanzen der von Vick und Zimmermann (1984) vorgeschlagene Oktadecansäure-Weg eine zentrale Rolle (Dicke und van Loon 2000, Gols *et al.* 2003; Abb. 1). Jasmonsäure (JA), als ein Produkt des Oktadecansäure-Weges, stellt dabei ein wichtiges Signalmolekül dar (Creelman und Mullet 1997) und regelt zum Beispiel die Abgabe der HIPVs (Degenhardt und Lincoln 2006, Reymond und Farmer 1998). Schäden durch Herbivorie bewirken einen Einstrom von Ca^{2+} in die Zellen, wodurch es zu einer Aktivierung der Phospholipase A2 (PL) kommt. Oft spielen hierbei exogene Elicitoren eine Rolle, d.h. Signalmoleküle im Speichel von Herbivoren, über welche die Pflanze Herbivoren erkennt und die Induktion der Abwehr einleitet. Die Aktivierung der Phospholipase A2 macht Linolensäure zugänglich für eine Lipoxygenase (LOX); die daraus gebildete (13S)-Hydroperoxy-octadecatriensäure wird in den Chloroplasten zu 12-Oxophytodiensäure (OPDA) cyclisiert. Durch Reduktion der Doppelbindung am Ringsystem im Cytoplasma und anschließender β -Oxidation der Seitenkette in den Peroxysomen entsteht *cis*-Jasmonsäure. Schon in der Pflanze wird diese zu *trans*-JA oder über eine JA-Carboxyl-Methyl-Transferase zum flüchtigen Methyljasmonat umgewandelt. Andere Phytohormone wie z.B. Salicylsäure, Ethylen, Auxin oder Gibberelin modifizieren die Wirkung der JA und bewirken über ihr Zusammenspiel eine veränderte Genexpression, welche eine spezifische Verteidigungsreaktionen der Pflanze ermöglicht (Arimura *et al.* 2000, Schulze *et al.* 2006).

Da Koch *et al.* (2001) zeigten, dass Herbivorieschaden einen vorübergehenden Anstieg der endogenen JA-Konzentration bei der Limabohne hervorruft und sowohl die HIPV-Produktion als auch die Nektar-Sekretion in den EFNs durch JA ausgelöst werden, induzierten Heil *et al.* (2004a/b) die Abwehr der Limabohne mit JA. Dabei stellten sie fest, dass die Zusammensetzung der abgegebenen Duftstoffe nahezu identisch ist mit der nach Herbivorenbefall abgegebenen. Lediglich geringfügige Konzentrationsunterschiede einzelner Verbindungen konnten im Vergleich zur natürlichen Herbivorie festgestellt werden. Die durch JA-Induktion ausgelösten Duftstoffproduktion klingt nach Untersuchungen von Schulze *et al.* (2006) nach etwa 24 Stunden ab. Mit der Applikation von JA liegt also für die Limabohne eine leicht

wiederholbare, standardisierte Methode vor, mit der die natürliche Pflanzenabwehr experimentell simuliert werden kann.

1.2. Blattschneiderameisen und ihre Futtersuche

In dieser Studie wurde die BSA-Art *Atta colombica* verwendet. Sie zählen zu den polyphagen, d.h. mehrere Nahrungspflanzen nutzende, Herbivoren und gelten als dominante Herbivoren in den neuweltlichen Tropen (Wilson 1986). Durch die Organisation dieser sozialen Insekten in Kasten und der dadurch möglichen Arbeitsteilung innerhalb des Staates ist es einer Kolonie möglich innerhalb eines Jahres bis zu 243 kg Biomasse einzutragen (Wirth *et al.* 2003). Die Wahl der Futterpflanze und



Abbildung 2: Herbivorieschäden von *Atta cephalotes* in einem *Pseudobombax septenatum* Baum in Panama. Anstatt einen Baum vollständig abzuernten hören die BSA typischerweise vorher auf und suchen sich einen neuen Baum als Futterquelle. © R. Wirth

die Faktoren die diese Wahl beeinflussen und verändern sind ein viel diskutiertes Feld. Wegen ihrer Bedeutung für das Ökosystem ist es für die Forschung interessant zu erfahren, weshalb bestimmte Pflanzen von den Ameisen bevorzugt werden (Fowler *et al.* 1989, Meyer 2008, Correa *et al.* 2010). Die Auswahl der Pflanze wird von sogenannten Kundschafterameisen vorgenommen, welche Probeschnitte an potentiellen Nahrungspflanzen durchführen. Die darauffolgende Rekrutierung von anderen Arbeiterinnen erfolgt im Nahbereich mit Hilfe von Stridulationssignalen, welche über Substratleitung in der Pflanze übermittelt werden und Information über die Futterqualität enthalten (Markl 1965, Roces *et al.* 1993). Das wichtigere Signal aber ist die Pheromonspur welche über Distanzen bis 250 m (Wirth *et al.* 2003) von dem Ort des Schneidens bis zum Nest führt und Informationen über Futterqualität enthält (Jaffe *et al.* 1979, Roces und Hölldobler 1994). Neben der Trophallaxis (Hölldobler und Wilson 1990), dem sozialen Nahrungsaustausch über den Kropf der Tiere, sind dies die Wege der Informationsweitergabe über die Qualität der

Einleitung

Nahrungsquelle. Darauf basierend erfolgt die Massenrekrutierung von BSA an den aktuellen Futterplatz. Dabei ist es den BSA möglich den kürzesten und effektivsten Weg zu ihrem Futter zu finden, da auf dem kürzesten Weg aufgrund der höheren Anzahl an Individuen pro Zeit die Pheromonspur stark ausgebildet bleibt. Auf dem längerem Weg nimmt die Stärke ab und somit die Attraktivität diese Weges (Jaffe *et al.* 1979). Da BSA zu den *central-place-foragern* gehören (Transport der Nahrung in ein zentral gelegenes, sessiles Nest), nimmt die aufgewendete Energie linear mit der Entfernung zur Kolonie zu. Nach der Theorie des optimalen Nahrungserwerbs (*optimal foraging theory*; Pyke *et al.* 1977), welche die Nahrungswahl als Bilanz zwischen minimiertem Energieaufwand für Nahrungssuche und -transport und größtmöglicher Energieausbeute der Nahrung vorhersagt, sollten die BSA immer den nächstgelegenen, genießbaren Baum komplett entlauben und erst dann weiter entfernt liegende Nahrungspflanzen nutzen. Stattdessen wurde im Freiland ein Verlassen der Pflanzen beobachtet, bevor diese komplett entlaubt sind, obwohl diese zu den bevorzugten Nahrungspflanzen gehören (Cherrett 1968, Fowler & Stiles 1980). Dies erscheint angesichts des großen Energieaufwands zur Freiräumung neuer Futtersuchpfade (Howard 2001) nicht im Einklang mit der Theorie des optimalen Nahrungserwerbs. Cherrett (1982) stellte daraufhin die sogenannte *resource conservation hypothesis* auf, welche besagt, dass BSA den Schaden an nahe gelegenen oder besonders attraktiven Futterpflanzen limitieren, um diese Ressourcen im Verlauf der Lebensspanne der Kolonie zu erhalten. Selbst unter der Annahme, dass sich ein solcher ressourcenschonender Nahrungserwerb als evolutionäre Anpassung an die Langlebigkeit (> 10 Jahre) und Sessilität der Kolonien entwickelt haben könnte, ist bis heute unklar welches die zugrundeliegenden Mechanismen sind, die dazu führen, dass aktuell futtersuchende Arbeiterinnen eine zuvor als qualitativ hochwertig erachtete Nahrungsquelle wieder aufgeben, um erneut Nahrungssuche zu betreiben. Deshalb wurde nach verifizierbaren Mechanismen gesucht um die beobachteten Muster der Futtersuche von BSA zu erklären. Trotz intensiver Forschungen zur Nahrungspflanzenwahl (z.B. Howard 1988a/b, Howard 1991, Meyer *et al.* 2006, Rockwood und Hubbell 1987, Aigner 2007, Tremmel 2008) ist die intra- und interspezifische Nahrungswahl von BSA jedoch noch immer nicht vollständig geklärt. Neben dem unvollständigem Abernten eines Baumes wurde außerdem beobachtet, dass BSA entfernt vom Nest foragieren, obwohl andere Bäume der gleichen Art mit scheinbar gleicher Blattqualität näher am

Nest liegen (Cherrett 1983; Rockwood und Hubbell 1987). Littleddyke und Cherrett (1975) wiesen darauf hin, dass die Nahrungspflanzenselektion einer individuellen BSA-Kolonie durch ihren Ernährungszustand und ihre Foragieraktivität beeinflusst wird, denn ausgehungerte und aktivere Kolonien zeigten sich weniger selektiv. Nichols-Orians und Schulz (1989) zeigten, dass Blatthärte einen Einfluss auf das Ernteverhalten der Art *Atta cephalotes* hat. Meyer *et al.* (2006) verifizierte, dass auch Wasser-, Aminosäure- und Kohlenhydratgehalt in den Blättern eine Rolle bei der Nahrungspflanzenselektion spielt. Sekundärmetabolite scheinen ebenfalls für die Diskriminierung einer Pflanzenart verantwortlich zu sein (Howard *et al.* 1988a). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Ocimen repellent auf BSA wirkt (Chen *et al.* 1984). Oder, dass die häufigsten Baumarten in der Umgebung von BSA-Kolonien im Inneren eines atlantischen Regenwaldbestandes verschiedene Terpenoide (trans- β -Ocimen, α -Pinen, β -Caryophyllen, α -Cubenin, α -Copaen, Germacren D und Humelen) enthielten, während die am meisten geernteten fünf Pflanzenarten keinerlei Terpenoide aufwiesen (Urbas 2004). Howard (1990) konnte feststellen, dass innerhalb eines Baumes der Gehalt an Tanninen, Proteinen und Wasser in den Blättern variiert und die Akzeptanz durch BSA von diesen Faktoren beeinflusst wird. Dies könnte die fleckenhafte Verteilung von BSA-Herbivorie innerhalb von Baumkronen (Wirth *et al.* 2003) erklären, indem unerwünschte Stoffe gemieden und/oder erwünschte Stoffe präferiert werden (Fowler und Stiles 1980, Rockwood und Hubbell 1987). Unterstützt wird diese Annahme durch Beobachtungen von Cherrett (1972), der eine Bevorzugung von jungen Citrusbaumblättern gegenüber alten beobachtete, wobei er auch zeigte, dass die Bildung repeller Stoffe erst in den älteren Blättern von Citrusbäumen stattfindet. Die dokumentierten intraspezifischen und intraindividuellen Unterschiede in der Blattqualität von Nahrungspflanzen könnten somit als möglicher Mechanismus für die Erklärung des unvollständigen Aberntens fungieren. Die selbe Argumentationslinie verfolgt die *nutrient balance hypothesis*, welche die Vorgehensweise des BSA-Staates beim Foragieren mit einer Optimierung der Versorgung des symbiotischen Pilzes erklärt (Howard 1991). Verschiedene Blätter von verschiedenen Pflanzen würden demnach einen besseren Mix aus den nötigen Nährstoffen garantieren. Beiden Hypothesen mangelt es allerdings an stichhaltigen Studien. Neuere Versuche mit Pflanzen deren Abwehr induziert wurde (siehe Abschnitt 1.1) deuten auf eine andere Erklärung für das Foragiermuster innerhalb eines Baumes: nach der *induced-defence hypothesis*

induziert die Herbivorie der BSA die Pflanzenabwehr an den betroffenen Stellen und schafft ein zeitlich und räumlich dynamisches Mosaik aus induzierter, wenig induzierter und nicht induzierter Pflanzenabwehr in ganzen Pflanzen und Pflanzenbereichen, aus welchem die BSA auswählen (Aigner, eingereicht 2010). So konnte Aigner (2007) zeigen, dass Limabohnenpflanzen, deren Abwehr mittels Jasmonsäure induziert wurde, von BSA gegenüber unbehandelten Pflanzen diskriminiert wurden. Tremmel (2008) beobachtete, dass BSA die Abwehr dieser Pflanzen auch selbst induzieren können. Während BSA am Vortag geschnittene Pflanzen präferierten, konnte bei anhaltendem Fraß innerhalb der nächsten Tage eine Abnahme der Präferenz für diese Pflanzenindividuen registriert werden, welche mit einer gleichzeitigen Zunahme der HIPV-Produktion einherging. Das Muster der Nahrungspflanzenselektion konnte also mit der Induktion der Pflanzenabwehr erklärt werden, da die Konzentration der HIPVs erst nach drei Tagen eine Schwelle erreichte, die eine Repellenz der Pflanzen für BSA darstellte. Die *induced-defence hypothesis* stellte neben der *resource conservation hypothesis* und der *nutrient balance hypothesis* eine mögliche Erklärung für die Foragiermuster der BSA dar. Da in den Untersuchungen von Tremmel (2008) nur eine Korrelation zwischen Ablehnung und dem Vorhandensein von HIPVs durchgeführt wurde, fehlt ein Beweis für einen präzisen kausalen Zusammenhang beider Faktoren. Um die Stichhaltigkeit der *induced-defence hypothesis* zu überprüfen und die Futtersuchökologie der BSA weiter zu verstehen ist eine Untersuchung von HIPVs und ihren Effekten auf die BSA und den Pilz nötig. In fast allen aufgeführten Untersuchungen wurde über den Einfluss des Pilzes auf die Nahrungspflanzenselektion spekuliert, ausführliche Untersuchungen wurden allerdings noch wenige unternommen. Ein Einfluss des Pilzes auf die Entscheidungen der BSA bei der Nahrungssuche wurde schon nachgewiesen (North *et al.* 1999, nähere Erklärung siehe Abschnitt 1.3.), die Erforschung der Kommunikation zwischen Ameise und Pilz steht allerdings noch am Anfang. Um nun einen Zusammenhang zwischen den HIPVs der Limabohne und der Wegentscheidung von BSA-Individuen während ihrer Futtersuche nachzuweisen, werde ich die HIPVs in dieser Arbeit den BSA-Arbeiterinnen in einem Olfaktometer anbieten und so ihre Ablehnung/Präferenz evaluieren. Bei dieser Methode findet kein Eintrag von Blattmaterial in den Pilzgarten statt, wodurch die BSA keine Signale vom Pilz über die Futterqualität erhalten können. Um dennoch den Einfluss des Pilzes auf

die Nahrungspflanzenwahl zu evaluieren, werden die HIPVs dem Pilz in Wachstumsassays angeboten und ihre Wirkung dokumentiert.

Da wie erwähnt auch der symbiotische Pilzpartner eine entscheidende Rolle spielen kann bei der ultimativen Nahrungspflanzenwahl, werde ich im Folgenden den diesbezüglichen Kenntnisstand zusammenfassen.

1.3. Interaktion zwischen symbiotischem Pilz und Blattschneiderameisen

Mutualismus ist ein wichtiger Bestandteil biologischer Lebensgemeinschaften und hat großen Einfluss auf alle Ebenen der Organisation biologischer Systeme (Boucher 1988, Douglas 1995). Die Symbiose zwischen BSA und Pilzen ist ein klassisches Beispiel eines hochentwickelten Mutualismus (Martin 1970, Chapela *et al.* 1994) und entstand nach aktuellem Kenntnisstand vor ca. 50 bis 60



Abbildung 3: BSA im Pilzgarten der Kolonie. Durch Lecken des Substrates und Entfernen von Fremdorganismen versucht die Kolonie das Wachstum des symbiotischen Pilzes zu optimieren. © Alex Wild

Millionen Jahren (Müller *et al.* 2001). Bei dem Pilz handelt es sich um die Gattungen *Leucocoprinus* und *Leucoagaricus* aus der Klasse der Basidiomyceten (Wirth *et al.* 2003). Um das Wachstum dieser Pilze zu gewährleisten zerkleinern die BSA das Blattsubstrat, wobei konkurrierende und parasitierende Mikroorganismen beseitigt und die Wachstumsoberfläche für den Pilz vergrößert wird (Quinlan und Cherrett 1977; Currie und Stuart 2001). Durch Jäten von infiziertem Material, kontinuierliches Lecken des Substrates, gegenseitigem Putzen sowie durch Applikation von antibiotischen Substanzen sorgen die BSA für eine möglichst geringe Invasion durch Fremdorganismen (Maschwitz *et al.* 1970, Beattie *et al.* 1985, do Nascimento *et al.* 1996). Den BSA gelingt es allerdings nicht ihren Pilzgarten komplett frei von anderen Organismen zu halten. Stattdessen fanden mikrobiologische Studien eine relativ häufige Kontamination mit fremden Pilzen (Currie *et al.* 1999). Dazu gehört

Einleitung

Escovopsis (Ascomycota: Hypocreales), ein extrem virulenter parasitischer Pilz mit ausschließlicher Spezialisierung auf pilzkultivierende BSA (Currie *et al.* 1999, Currie *et al.* 2001a/b), der fähig ist in BSA-Kolonien zu überleben und nicht selten zum kompletten Zusammenbruch infizierter Pilzgärten (Currie *et al.* 1999) führt und somit zu erhöhter Mortalität von BSA-Kolonien. Neben den Nest-hygienischen Maßnahmen, tragen auch Kompartimentierung und Klimaregulation in den Bauten zur erfolgreichen Kultur der Pilzgärten bei (Kleineidam *et al.* 2001, Bollazzi und Roces 2002). Im Gegenzug nutzen die Ameisen die verdickten nährstoffreichen zellsaftenthaltenden Hyphenenden des Pilzes, die sog. Gongylidien, zur Ernährung ihrer Brut und ihrer Königin (Quinlan und Cherrett 1978). Die Ansammlungen von Gongylidien werden Staphylae (Kreisel 1972) genannt. Im Gegensatz zu den Larven ernähren sich adulte Arbeiterinnen der BSA zwar teilweise auch von diesem Pilz, decken jedoch 95% ihres täglichen Energiebedarfs über Zellsaft, den sie während dem Schneiden, Eintragen und Verarbeiten von Blattfragmenten aufnehmen (Howard 1991, Littledyke und Cherrett 1976). Durch das Aufspalten von schwer verdaulichen Stoffen wie die Zellulose, werden die darin enthaltenen Nährstoffe für die Ameisen zugänglich (Martin und Weber 1969, Erthal *et al.* 2009). Aus diesem Grund und der Fähigkeit des Pilzes zur Detoxifikation ist das Spektrum der verwertbaren Pflanzen durch den Pilz erweitert (Martin 1979, Dowd 1992). BSA können dadurch zwischen 50 und 77 % aller ihnen zu Verfügung stehenden Pflanzenarten als Nahrungsquelle nutzen (Rockwood 1976, Wirth *et al.* 2003).

Die Fähigkeit giftige Substanzen zu verdauen hat natürlich auch ihre Grenzen (spätestens seit Paracelsus wissen wir: „Allein die Menge macht das Gift“). Darüber hinaus gibt es pflanzliche Sekundärmetabolite mit direkt fungizider Wirkung auf den Pilzgarten. Als Chen *et al.* (1984) die repellente Wirkung des pflanzlichen Terpenoids β -Ocimen auf BSA nachwiesen, vermuteten sie erstmals einen Zusammenhang zwischen der Ablehnung des Stoffes und seiner fungiziden Wirkung; die Diskriminierung dieser Verbindung durch BSA ließe sich also teilweise als Schutz des Pilzes interpretieren (Chen *et al.* 1984). Die Wirkung des Terpenoids Caryophyllen wurde von Howard *et al.* (1988b) erstmals nicht nur auf BSA sondern auch auf ihren Pilz getestet. Dabei überlebten die Ameisen denen 1 mM Caryophyllen angeboten wurde durchschnittlich länger als die Kontrollgruppe, während das Pilzwachstum bei einer Konzentration von 0,014 mg/ml Medium nur 75 % des Wachstums der Kontrolle aufwies. Dies bestärkte die Vermutung, dass Blätter

mit bestimmten Blatinhaltsstoffen nicht aufgrund der repellenten Wirkung auf die BSA, sondern eventuell aufgrund der fungiziden Wirkung auf ihren Symbionten gemieden werden.

Die Entdeckung der fungiziden Wirkung von Blatinhaltstoffen und Pflanzenvolatilen auf den symbiotischen Pilz der BSA führte zu ähnlich Argumentationen wie bei der *nutrient balance hypothesis* (Howard 1991), indem die BSA bevorzugt Blattmaterial mit geringem Anteil an Fungiziden eintragen um das Wachstum des Pilzes nicht negativ zu beeinflussen (North *et al.* 1999, Ridley *et al.* 1996). Demnach spielt bei der Wahl der Nahrungspflanzen durch BSA nicht nur die bessere Versorgung mit Nährstoffen, sondern auch die Vermeidung fungizider Stoffe eine Rolle.

In diesem Zusammenhang wurde auch über gegenläufige Nahrungsbedürfnisse von BSA und Pilz spekuliert (Hubbell *et al.* 1983, Roces 2002). Vorausgesetzt der attraktivste Zellsaft einer Pflanze für BSA-Arbeiterinnen stellt nicht die optimalste Wachstumsgrundlage des Pilzes dar, kann die Deckung des Energiebedarf der BSA-Arbeiter während des Schneidens im Konflikt mit der Wahl der besten Nahrung für den Pilzes stehen (Roces 2002).

In diesem Kontext ist ebenfalls interessant, dass es Substanzen gibt, die zwar das Wachstum des symbiotischen Pilzes inhibieren, von den BSA aber dennoch zunächst in das Nest eingetragen werden, um dann zu einem späteren Zeitpunkt abgelehnt zu werden. Dies wurde in der Literatur als verzögerte Ablehnung (*delayed rejection*) beschrieben (Rahbe *et al.* 1988, Knapp *et al.* 1990). In einer experimentellen Untersuchung des Phänomens wurde Granulat aus Orangenschale versetzt mit dem Fungizid Cycloheximid angeboten und beobachtet, dass eine verzögerte Ablehnung nach zwei Tagen auftrat und mindestens 10 Tage anhielt (Ridley *et al.* 1996). Bemerkenswert war dabei, dass die Kolonien selbst Orangenschalengranulat ohne Cycloheximid ablehnten. Da zuvor mit Saccharose versetztes Cycloheximid von den BSA ohne Auftreten einer Ablehnung getrunken wurde, war bewiesen, dass BSA das Fungizid nicht selbst erkennen und ablehnen, sondern gelernt hatten, dass das toxische Material mit einer schädlichen Wirkung auf ihren Pilz in Verbindung steht und es deshalb vermieden (Ridley *et al.* 1996). North *et al.* (1999) konnten darüber hinaus zeigen, dass auch naive BSA, welche also keinen Kontakt mit dem cycloheximidhaltenden Orangenschalengranulat hatten und mit Pilzgarten konfrontiert wurden, welcher Cycloheximid enthielt, die gleiche Ablehnung zeigten. Daraus folgt, dass eine Kommunikation zwischen den beiden

symbiotischen Partnern stattfindet. Der Mechanismus für diese Kommunikation konnte bis jetzt zwar noch nicht nachgewiesen werden; die Schnelligkeit der Reaktion weist jedoch auf ein chemisches Signal hin und nicht etwa darauf, dass die Ameisen schlechteres Wachstum des Pilzes registrieren (Herz *et al.* 2008). Im Laufe der Untersuchungen von Tremmel (2008) zur Wirkung von HIPVs der Limabohne auf die Nahrungspflanzenwahl von BSA trat in drei Fällen nach zwei Versuchstagen eine absolute Diskriminierung von induzierten Limabohnenpflanzen auf. Selbst nach dem Austauschen gegen neue, unbehandelte Testpflanzen änderte sich nichts an dieser Diskriminierung. Je nach Kolonie hielt sie bis zu drei Wochen an, wobei die Futterpflanze *Rubus fruticosus* (während der Versuche nie in induziertem Zustand angeboten) weiterhin als Nahrungspflanze akzeptiert wurde (Tremmel 2008). Tremmel interpretierte diese Ablehnung der Testpflanzen als Reaktion der BSA auf fungizide Eigenschaften der Limabohnenblätter bzw. der von ihnen emittierten HIPVs. Aus diesem Grund werde ich in meinen Untersuchungen den symbiotischen Pilz mit den HIPVs der Limabohne in Bioassays konfrontieren, um der Frage nachzugehen inwieweit die registrierte Ablehnung der Futterpflanzen mit der fungiziden Wirkung der HIPVs erklärt werden kann.

1.4. Ziele und Motivation der vorliegenden

Arbeit

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu klären, welche Mechanismen dazu beitragen, dass BSA Pflanzen mit induzierter chemischer Herbivorieabwehr ablehnen. Von besonderem Interesse ist hierbei, die spezifische Rolle der beiden symbiotischen Partner des BSA-Systems (Ameisen und Pilz) und mögliche Interaktionen zwischen ihnen aufzuklären. Zu diesem Zweck sollen die HIPVs der Limabohne einzelnen BSA-Arbeiterinnen der Art *Atta colombica* in Wahlversuchen angeboten werden, um ihre Entscheidung nach der Perzeption im Zwei-Arm-Olfaktometer (siehe Abb. 5) zu beobachten. Der Olfaktometeransatz hat dabei, im Gegensatz zu anderen Versuchsdesigns, den Vorteil, dass kein Eintrag von (induziertem) Blattmaterial in die Kolonie erfolgt und die Entscheidung somit spezifisch auf die Arbeiterinnen zurückgeführt werden kann und Effekte durch mögliche Pilzsignale ausgeschlossen werden können. Um andererseits spezifisch

die Reaktion des symbiotischen Pilzes *Leucoagaricus gongylophorus* auf die HIPVs der Limabohne zu beurteilen, werden darüber hinaus Biosassays zum Nachweis von Wachstumsinhibition durchgeführt.

Konkret wurden folgende Hypothesen formuliert und im Rahmen dieser Arbeit untersucht:

Hypothese 1: BSA verhalten sich gegenüber der HIPV-Emission der Limabohne ablehnend, indem sie sich in einem Zwei-Arm-Olfaktometer häufiger zur experimentellen Kontrolle hin orientieren.

Hypothese 1.1: Indem die Zahl der Entscheidungen in Richtung der HIPV-Emission abnimmt korrelierte die Stärke der Ablehnung der Arbeiterinnen positiv mit der Zunahme der Konzentration der HIPV-Emission.

Motivation und Begründung:

Es bleibt zu klären, ob die Perzeption der HIPVs wirklich verantwortlich ist für die Nahrungspflanzenwahl einzelner BSA-Individuen und welche Rolle diese Entscheidung in der Futtersuchökologie der BSA spielt. In bisherigen Studien fand das Anbieten der HIPVs mit kompletten Kolonien statt, also auch dem symbiotischen Pilz des Ameisenstaates. Auch wenn dies keineswegs bedeuten muss, dass die Diskriminierung eines Stoffes auf dessen Repellenz für die Ameisenindividuen selbst zurückzuführen ist, ist davon auszugehen, dass viele Pflanzeninhaltsstoffe repellent auf die Arbeiterinnen der BSA wirken. Abgesehen von der Tatsache, dass die olfaktorische Wahrnehmung enorm wichtig ist für BSA, so zum Beispiel für die Rekrutierung bei der Futtersuche (Tumlinson *et al.* 1971, Jaffe und Howse 1979) oder der Erkennung der Koloniezugehörigkeit (Bonavita-Cougourdan *et al.* 1987), wurde schon gezeigt, dass BSA auf Pflanzenvolatile reagieren. Mit Ocimen versetzte Reisflocken wurden zum Beispiel deutlich weniger von BSA mitgenommen, wenn sie auf ihren Futtersuchweg gelegt wurden (Chen *et al.* 1984). Diese Entscheidung wurde innerhalb von einer Stunde von einzelnen BSA-Individuen getroffen.

Einleitung

Andererseits konnten Hubbel *et al.* (1983) keine Ablehnung gegenüber Caryophyllen feststellen, sowohl in Labor- als auch in Freilandversuche nicht. Dass Caryophyllen wahrgenommen werden kann, konnten North *et al.* (2000) zeigen. Selbst bei 10 cm Abstand zur Duftquelle zeigten noch signifikant mehr BSA ein interessiertes Verhalten im Vergleich zur Kontrolle, indem mehr Ameisen innehielten. Aigner (2007) konnte zeigen, dass die HIPV-Emission von JA-induzierten Limabohnen die Nahrungspflanzenwahl von BSA-Kolonien negativ beeinflusst, da in Wahlversuchen mit ganzen Pflanzen mehr Blattfläche von Kontrollpflanzen geerntet wurde. H 1 ist aus dieser Untersuchung und der nachgewiesenen Perzeptionsfähigkeit plausibel zu erwarten. Tremmel (2008) ist es darüber hinaus gelungen eine Zunahme der HIPV-Emission mit abnehmender Attraktivität der Pflanze für die BSA zu korrelieren, weshalb ich ebenfalls eine Zunahme in der Stärke der Ablehnung bei Zunahme der HIPV-Emission erwarte (H 1.1.).

Hypothese 2: Das Wachstum des symbiotischen Pilzes der BSA wird durch das natürliche HIPV-Spektrum der Limabohne inhibiert.

Hypothese 2.1: Bei höherer Konzentration des HIPV-Spektrums im Medium ist eine stärkere Inhibition des symbiotischen Pilzes zu registrieren.

Hypothese 2.2: Einzelsubstanzen des HIPV-Spektrums bewirken ebenfalls eine Inhibition des Wachstums des symbiotischen Pilzes.

Motivation und Begründung:

Da in den olfaktometrischen Versuchen zu H1 eine spezifische Beurteilung des Ameisenpartners vorgenommen wird, soll hier eine separierte Konfrontation des anderen symbiotischen Partners mit dem HIPV-Spektrum der Limabohne stattfinden. Da Rückschlüsse über die Wirkung der HIPVs auf die Futtersuchökologie von BSA-Kolonien gezogen werden sollen und der Pilz einen Einfluss auf die BSA und ihre Futtersuche hat (Rahbe *et al.* 1988, Knapp *et al.* 1990, North *et al.* 1999), sind Untersuchungen zur fungiziden Wirkung dieser Stoffe nötig. Für die im HIPV-Spektrum der Limabohne befindlichen Stoffe Linalool (Pattnaik *et al.* 1997),

Einleitung

Methylsalicylat und Hexenylacetat (Cardoza *et al.* 2002) wurden fungizide Wirkungen auf andere Pilze beobachtet. Einzig für Caryophyllen konnte eine fungizide Wirkung auf den Pilz der Ameisen nachgewiesen werden (Howard *et al.* 1988b). Für Ocimen wird ebenfalls eine fungizide Wirkung vermutet (Chen *et al.* 1984). Auch wenn nur fünf von den acht HIPVs im natürlichen Mix fungizide Eigenschaften aufweisen wird eine Inhibition des symbiotischen Pilzes durch den Mix erwartet (H 2). Ähnlich den Untersuchungen mit Caryophyllen wird davon ausgegangen, dass eine höhere Konzentration der HIPVs eine größere Inhibition hervorruft (Howard *et al.* 1988b). Um mögliche antagonistische Effekte der einzelnen Substanzen auszuschließen wird der Pilz zusätzlich mit alle HIPVs einzeln konfrontiert. Dabei wird für die oben genannten HIPVs in separaten Inhibitionsassays ebenfalls eine Inhibition des Pilzes erwartet (H2.2).

2 Material und Methoden

2.1. Untersuchungsansatz und experimentelle Herangehensweise

Zur Überprüfung der Hypothesen wurde jeweils eine Bioassay-Methode für beide Partner der Symbiose gewählt. Zur Evaluation der Reaktion von BSA-Arbeiterinnen auf HIPVs wurde die Olfaktometrie angewendet, mittels derer die olfaktometrische Wahrnehmung der BSA registriert werden kann. Diese Methode hat sich bei anderen Insektenarten (Takabayashi und Dicke 1992, Guevara *et al.* 2000, Hedlund *et al.* 1995) als auch bei BSA (Littledyke *et al.* 1978, Kleineidam 1999) bewährt. Dabei wird in einem Olfaktometer durch Laufrichtungsänderungen einzelner Individuen die Repellenz/Attraktivität von Düften bestimmt. Die ausführliche Beschreibung des Designs und der Durchführung dieses Untersuchungsteils wird in Kapitel 2.3.3. gegeben. Im zweiten Untersuchungsteil wurde mittels Inhibitionsassays die Reaktion des symbiotischen Pilzes auf die HIPVs evaluiert. Bei dieser mikrobiologischen Standardmethode wird der zu untersuchende Stoff in einem Medium gelöst, auf/im welchem der zu untersuchende Organismus kultiviert wird. Durch Vergleich des Wachstumserfolges zu Kontrollen, welche den zu untersuchenden Stoff nicht enthalten, ist eine Bestimmung der Inhibition des Organismus durch diesen Stoff möglich. In Kapitel 2.4.3. werden die verwendeten Assays und ihre Durchführung beschrieben.

2.2. *Atta colombica*-Kolonien und ihre Haltung

Die Art *Atta colombica* und weitere 14 *Atta*-Arten, sowie 24 Arten der Gattung *Acromyrmex* gehören zu den pilzkultivierenden Ameisen (Hymenoptera: Formicidae: Attini) und werden als Blattschneiderameisen bezeichnet, weil sie im Gegensatz zu den anderen Vertretern des Stammes frische Blätter als Pilzsubstrat schneiden. Ihr Vorkommen beschränkt sich auf die Neotropen (Fowler *et al.* 1989; Wirth *et al.* 2003), wobei sich das Verbreitungsgebiet der Art *Atta colombica* über das nördliche Süd- und Mittelamerika erstreckt (Herz 2001). Zwei der verwendeten Kolonien (im

folgenden „Kolonie-Nr.1“ und „2“) stammen aus Panama (Gamboa, in der Nähe von BCI) und wurden dort im Oktober 2002 als junge Kolonie, bestehend aus der Königin, einem Teil des Pilzgartens sowie einigen Arbeiterinnen, ausgegraben. Die dritte Kolonie („Kolonie-Nr. 10“) wurde freundlicherweise von Prof. F. Roces (Universität Würzburg) als Leihgabe zur Verfügung gestellt. Die Kolonien sind in Plastikboxen, welche mit PVC-Schläuchen verbunden sind, untergebracht. Jeder Kolonie stehen 4 bis 6 Boxen zur Verfügung, wobei zur Fütterung zweimal täglich Brombeerblätter in eine sog. „Futterbox“ gelegt werden. Diese Blätter werden von den Ameisen geschnitten und in die „Pilzboxen“ transportiert. Verbrauchtes Pilzmaterial sowie tote Ameisen gelangen letztlich in die „Abfallbox“. Diese Organisation der Laborkolonien orientiert sich an der von natürlichen Kolonien mit den entsprechenden unterirdischen Kammern für Pilzgärten und Abfall und dem oberirdischen Futtersuchareal. Die Böden der Boxen sind mit Blähton bedeckt um eine hohe Luftfeuchte zu gewährleisten. Die Luftfeuchte im Raum war während der Experimente relativ konstant bei $43,5 \% \pm 3,2 \%$ (MW \pm STABW, n=35), minimal 36% und maximal 50 %. Durch Fußbodenheizung und zusätzlich im Winter durch einen thermostatgesteuerten Heizlüfter wird ein Absinken der Temperatur im Raum unter $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ verhindert. Während des Untersuchungszeitraum es lag die Temperatur bei $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,7$ (MW \pm STABW, n=35) minimal $23,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ und maximal $26,7\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3. Konfrontation der BSA mit HIPVs der Limabohne

Die Limabohne ist in Meso- und Südamerika beheimatet (Gutiérrez Salgado *et al.* 1995). Untersuchungen zeigten, dass der Wildtyp in zwei Gruppen aufgeteilt werden kann: Einen mesoamerikanischen, dessen Hauptverbreitung im neotropischen Tiefland liegt, sowie eine zweite Linie, die auf die westlichen Anden begrenzt zu sein scheint (Gutiérrez Salgado *et al.* 1995). Die in vorliegenden Versuchen verwendete Sorte gehört zu dem mesoamerikanischen Genotyp (Heil 2004b). Im Gegensatz zu *Phaseolus vulgaris* sind die Laubblätter etwas lanzettlicher; die Nebenblätter sind klein, lanzettlich, etwa 3,5 mm lang und 1,5 mm breit. Auf ihnen befinden sich extraflorale Nektarien für die indirekte Verteidigung. Die traubigen Blütenstände sind kürzer als die Laubblätter und bilden 6 bis 20 Blüten aus, wobei Selbst- und

Fremdbefruchtung vorkommt. Die Hülsen sind 8 bis 18 cm lang, abgeflacht, sichelförmig gebogen mit einer kurzen, geraden Spitze. Die darin enthaltenden Samen sind groß, oval bis rundoval, nur wenig nierenförmig, mit einem stärker abgeflachten Rand und einem länglich ovalen, verhältnismäßig kleinen Nabel. Die Limabohne ist eine ein- oder mehrjährig Pflanze und kann Wuchshöhen 2 bis 3 m erreichen. Die in diesen Untersuchungen verwendeten Pflanzen waren ca. 35 cm groß und hatten 10 bis 15 Blätter. Die Aufzucht fand in einem klimatisierten Gewächshaus mit künstlichem Licht und regelmäßiger Bewässerung statt. Limabohnenpflanzen, welche HIPVs ausgesetzt werden, aktivieren Gene für die Produktion von Abwehrstoffen (Arimura *et al.* 2000). Benachbarte Limabohnenpflanzen produzieren nach Kontakt mit HIPVs Ethylen (Arimura *et al.* 2002), welches meist synergistisch mit Jasmonsäure wirkt (Schulze *et al.* 2006). Sie sind also fähig über HIPVs benachbarte von Herbivoren befallene Pflanzen zu "belauschen" und ihrerseits Abwehrmechanismen in Gang zu setzen, wenn die Gefahr eines Befalls von einer benachbarten Pflanze aus besteht (Baldwin *et al.* 2006). Um zu verhindern, dass abgegebene Volatile der Testpflanzen eine ungewollte Bildung von Sekundärmetaboliten in den Kontrollpflanzen induziert, wurden die Testpflanzen im Gewächshaus abseits der Kontrollpflanzen gelagert.

2.3.1. Experimentelle Behandlungen in den Olfaktometerversuchen

Es wurde mit drei verschiedenen Behandlungen versucht die Reaktion der BSA auf HIPVs zu evaluieren. Um den BSA unterschiedliche Konzentrationen der HIPV im Olfaktometer anbieten zu können, wurde die natürliche HIPV-Emission der Limabohne simuliert. Dies wurde erreicht durch das Dazugeben von reinen HIPVs in eine Matrix, aus der die HIPVs emittieren konnten (Behandlung I). Bevor und während eine induzierte Limabohne HIPVs emittiert, werden auch andere VOCs von der Pflanze in die Umgebung abgegeben. Dazu gehören zum Beispiel die GLVs, welche durch Verwundung freigesetzt werden (Matusi *et al.* 2000), oder Ethylen, welches synergistisch mit Jasmonsäure auf die Verteidigungsreaktionen von Pflanzen wirkt (Arimura *et al.* 2002, O'Donnell *et al.* 1996, Schulze *et al.* 2006). Die hier beschriebene synthetische HIPV-Emission aus der Lanolinpaste hat zwar nachweislich ausgereicht die Nektarproduktion für die indirekte Abwehr der

Limabohne zu stimulieren (Kost und Heil 2006), um aber auszuschließen, dass die zu untersuchenden HIPVs nur in Kombination mit anderen unbekanntem pflanzenspezifischen VOCs eine Reaktion bei den BSA provozieren, wurden den BSA gleichzeitig zu der Paste mit HIPVs mechanisch beschädigte Blätter der Limabohne angeboten (Behandlung II). Diese Kombination stellt einen Zwischenschritt zwischen dem Anbieten der Lanolinpaste mit HIPVs und dem Anbieten einer ganzen induzierten Pflanze dar. Das Anbieten von einzelnen Blättern und ihrer Emissionen in einem Olfaktometer wurde schon im Zusammenhang mit Ameisen erfolgreich durchgeführt, indem die Ameisenart *Pheidole minutula* ihren mutualistischen Partner *Meieta guianensis* von anderen Pflanzenarten unterscheiden konnte (Datillo *et al.* 2009). Das Anbieten einer ganzen Pflanze fand ebenfalls statt, indem komplette induzierte Pflanzen an das Olfaktometer angeschlossen wurden (Behandlung III). Der Anschluss von ganzen Pflanzen an ein Olfaktometer wurde beispielsweise mit den Ameisengattungen *Azteca* und *Allomerus* in Verbindung mit ihrer Wirtspflanze *Cordia nodosa* erfolgreich durchgeführt (Edwards *et al.* 2006). In Untersuchungen mit der Limabohne und zwei ihrer Herbivoren (*Cerotoma ruficornis* und *Gynandrobrotica guerreroensis*) fand ebenfalls ein Anschluss kompletter Pflanzen an ein Olfaktometer statt (Heil 2004a).

In den Wahlexperimenten wurden somit folgende Behandlungen durchgeführt, welche im nächsten Kapitel näher beschrieben werden:

- I *Simulation natürlicher HIPV-Emission der Limabohne*
- II *Simulation natürlicher HIPV-Emission der Limabohne zusammen mit weiteren Pflanzenvolatilen*
- III *Natürliche HIPV-Emission der Limabohne durch Induktion mit Jasmonsäure*

2.3.2. Vorbereitungen für die Behandlungen

I Simulation natürlicher HIPV-Emission der Limabohne

Versuche mit Limabohnenpflanzen haben, neben dem logistischen und zeitlichen Aufwand, den Nachteil, dass die Emission von HIPVs variieren kann. Dabei spielen abiotische Faktoren, wie zum Beispiel Lichtintensität und Wasserverfügbarkeit eine

Rolle (Schulze *et al.* 2006, Takabayashi *et al.* 1994). Um die BSA-Arbeiterinnen mit einem olfaktorischen Signal mit definierter Zusammensetzung zu konfrontieren wurde deshalb eine künstliche HIPV-Emission aus einzelnen synthetischen VOCs hergestellt. Die freundlicherweise durch das MPI in Jena bereitgestellten Duftstoffe wurden dafür in Lanolinpaste (Sigma-Aldrich, www.sigmaaldrich.com) gebracht. Die Paste dient hierbei als Matrix aus der die VOCs diffundieren. Durch die Arbeiten von Kessler und Baldwin (2001) sowie von Kost und Heil (2006) war es möglich einen Mix zu produzieren, dessen VOC-Abgabe qualitativ die natürlichen Emissionen einer Limabohne entspricht, welche 24 Stunden Herbivorie ausgesetzt war. Diese Emission simuliert somit das natürliche HIPV-Spektrum, und wurde durch definierte Mengenverhältnisse von VOCs (siehe Kost und Heil 2004) wie folgt hergestellt. Mit einer Hamilton Glasspritze (Exmire Micro Syringes ITO Corporation, Japan) wurden die reinen Stoffe abgewogen und in eine gekühlte 100 ml Schottflasche (Vermeidung von Verdunstung) überführt. Die Lanolinpaste wurde bei 60 °C in einem Trockenschrank geschmolzen und 100 ml davon mittels eines erwärmten Messkolbens in die Schottflasche mit den Volatilen gekippt. Dann wurde die Schottflasche schnell geschlossen und zur gleichmäßigen Verteilung kräftig über mehrere Minuten geschüttelt. Zu Herstellung des HIPV-Mixes mit realistischer Duftzusammensetzung wurden folgenden VOC-Mengen 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 (3*Z*)-Hex-3-enylacetat, 0,85 µg (*E,Z*)-β-Ocimene (Mixtur aus (*E*)-Isomer (70%) und (*Z*)-Isomer (30%)), 0,63 µg (3*E*)-4,8-Dimethylnona-1,3,7-trien (DMNT) und 0,9 µg (3*E,7E*)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen (TMTT) (siehe Kost und Heil 2006). Um die mit den sehr flüchtigen VOCs versehene Lanolinpaste lange verwenden zu können wurde die Schottflasche zusätzlich mit Parafilm verschlossen und bei -20 Grad im Gefrierschrank aufbewahrt. Zur Dosierung wurde die Paste mittels Spatel in 5 ml-Spritzen und 1 ml-Spritzen befördert. Die Spritzen wurden ebenfalls verschlossen und bei - 20 Grad gelagert. Um die Pasten im Olfaktometer einsetzen zu können wurden die Spritzen mittels Körpertemperatur erwärmt bis definierte Mengen in Glasschälchen abgefüllt werden konnten. Die gefüllten Glasschälchen wurden in die Probenkammern des Olfaktometer gestellt. In den darauffolgenden Versuchen bestanden die Testsubstanzen aus verschiedenen Mengen Lanolinpaste welche verschiedene Mengen an VOCs emittierten, wobei das Verhältnis der einzelnen VOCs gleich blieb und immer dem natürlichem HIPV-

Spektrum der Limabohne nach 24 Stunden Herbivorie (Kost und Heil 2006) entsprach. Den BSA wurden 60, 120 und 240 μl sowie 1, 2 und 4 ml der Paste als Testsubstanzen angeboten. Als Kontrolle wurde jeweils die gleiche Menge Lanolinpaste ohne VOCs verwendet. Die HIPVs sind sehr flüchtig, weshalb mit einer Abnahme der Menge an emittierten HIPVs mit der Zeit zu rechnen ist. Zur Gewährleistung einer konstanten HIPV-Emission aus der Paste, wurden die Test- und Kontrollsubstanzen jeweils maximal 3 Stunden verwendet und dann durch neue ausgetauscht (C. Kost, persönliche Kommunikation).

II Simulation natürlicher HIPV-Emission der Limabohne zusammen mit weiteren Pflanzenvolatilen

Da BSA mechanisch beschädigte Limabohnen 24 h nach dem Schaden deutlich präferierten (Aigner 2007), wurden Limabohnenblätter *in situ* 24 Stunden vor ihrer Verwendung im Olfaktometer mittels einer Schere beschädigt (Entfernung von etwa 50 % der Blattfläche), um die Emission von Ethylen und anderer nicht in dem natürlichen HIPV-Mix enthaltener VOCs zu induzieren. Nach einem Waschen der Blätter unter fließendem Wasser, wurden dies über den gesamten Zeitraum eines Messtages in das Probenfach an das Ende des Olfaktometerarmes hinter das Glasschälchen mit der Paste gelegt. Die einzelnen Blätter stammten von unterschiedlichen Limabohnenpflanzen.

III Natürliche HIPV-Emission der Limabohne durch Induktion mit Jasmonsäure

Um die Synthese von Volatilen in den Versuchspflanzen zu starten wurde 1 mmolare Jasmonsäure verwendet. Bei dieser bewährten Methode (Heil 2004a/b, Aigner 2007, Tremmel 2008) wird die Pflanze mit der Jasmonsäure einmalig tropfnass eingesprüht. Nach 24 Stunden ist dann mit einer HIPV-Emission durch Induktion der Pflanzenabwehr (Heil 2004a/b) ähnlich einer 24stündigen Herbivorie zu rechnen. Da aus früheren Versuchen bekannt war (Aigner 2007), dass beim Anschluss getopfter Pflanzen an das Olfaktometer eine beträchtliche Verdünnung der abgegebenen HIPV-Konzentration stattfindet, wurde versucht die im Olfaktometer ankommende Konzentration der HIPVs zu steigern. Deshalb wurden die Pflanzen gleich nach einer Trocknungszeit für die Jasmonsäure von etwas 45 Minuten komplett in eine Folie

(Toppits 'Bratenschlauch', Melitta, Minden) verpackt, welche selbst nachweislich keine Volatile abgibt (Kost und Heil 2006). Unterhalb des untersten Blattes wurde der Bratenschlauch verschlossen und zur Versorgung mit frischer, reiner Luft ein Kohlefilter (Dr. Perl junior, Vauen Pfeifen-Filter) angeschlossen. Am oberen Ende wurde der Bratenschlauch ebenfalls verschlossen und ein Schlauch für den Anschluss an das Olfaktometer angebracht. Nach 24 Stunden wurden die Pflanzen für die Wahlexperimente verwendet, wobei die emittierten HIPVs sich in dem geschlossenen Bratenschlauch gesammelt haben sollten. Die Kontrollpflanzen erfuhren die gleiche Behandlung, nur dass statt Jasmonsäure mit Wasser besprüht wurde. Um ausschließen zu können, dass intraspezifische Variation der natürlichen Duftemission von nicht-induzierten Pflanzen ausreicht, um eine Reaktion der BSA zu provozieren, wurden nicht nur induzierte Pflanzen und nicht-induzierte Pflanzen gleichzeitig (Behandlung III A), sondern auch zwei nicht-induzierte Pflanzen (Behandlung III B) an die Arme des Olfaktometers angeschlossen.

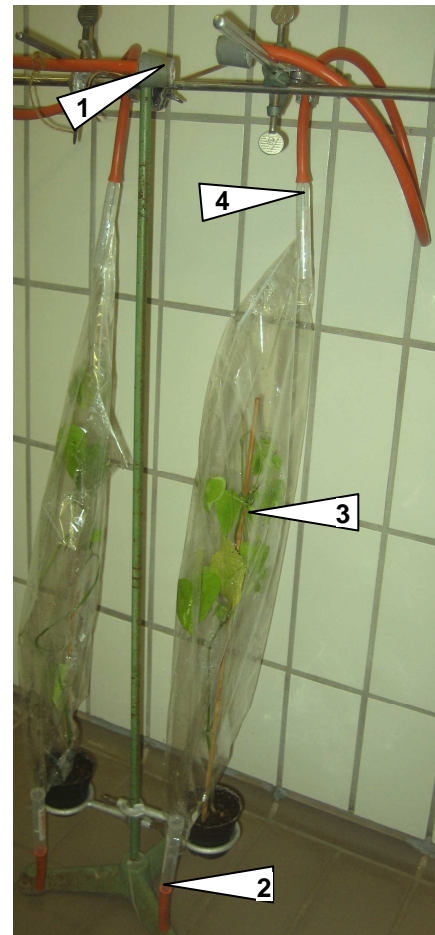


Abbildung 4: Zwei Pflanzen für den Anschluss an das Olfaktometer. Die Vorrichtung beinhaltet einen Stopfen zum Anschluss an den Olfaktometer (1), einen Kohlefilter zum Ansaugen gereinigter Luft (2), den Bratenschlauch zur Umhüllung der Pflanze (3) und einen zum Olfaktometer führenden Schlauch am oberen Ende des Bratenschlauches (4). Nähere Erklärungen siehe Text.

2.3.3. Entwicklung und Durchführung der Wahlexperimente mit dem Olfaktometer

Die durchgeführten Wahlexperimente waren in allen Fällen sog. ‚dual-choice Tests‘, in denen die Ameisen die Wahl zwischen zwei Möglichkeiten haben. Sie wurden mit einem extra für Evaluation von Duftpräferenzen von Ameisen angefertigtem Zwei-Arm-Olfaktometer durchgeführt (Abb. 5). Die Ameisen finden auf den 5 mm breiten Stegen ausreichenden Halt und die Probenkammern sind durch Gitter von der Laufkammer abgetrennt. In der einen Probenkammer wurde die Testsubstanz

platziert, in der anderen die jeweilige Kontrolle. Für die Versuche mit ganzen Pflanzen wurde der Schlauch von der einen Pflanze an einen Arm und der Schlauch der anderen Pflanze an den anderen Arm des Olfaktometers angeschlossen. Die Häufigkeit der Wege-Wahl getesteter BSA-Individuen zum Duft der Testsubstanz oder zum Duft der Kontrolle wurde als Maß für Präferenz *versus* Repellenz verwendet.

Um eine experimentell kontrollierte Durchführung der Wahlexperimente sicherzustellen, mussten einige Faktoren ausgeschlossen werden, welche einen potentiellen Einfluss auf die Richtungswahl der BSA haben. So wurde das Olfaktometer mit roter Folie bezogen, um einen Einfluss von Lichtquellen im Raum auf die Seitenpräferenz auszuschließen (Edwards *et al.* 2006, Dattilo *et al.* 2009). Um die Ameisen mit den Duftstoffen zu konfrontieren wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe am Einlass des Olfaktometers ein Sog erzeugt. Wie in anderen

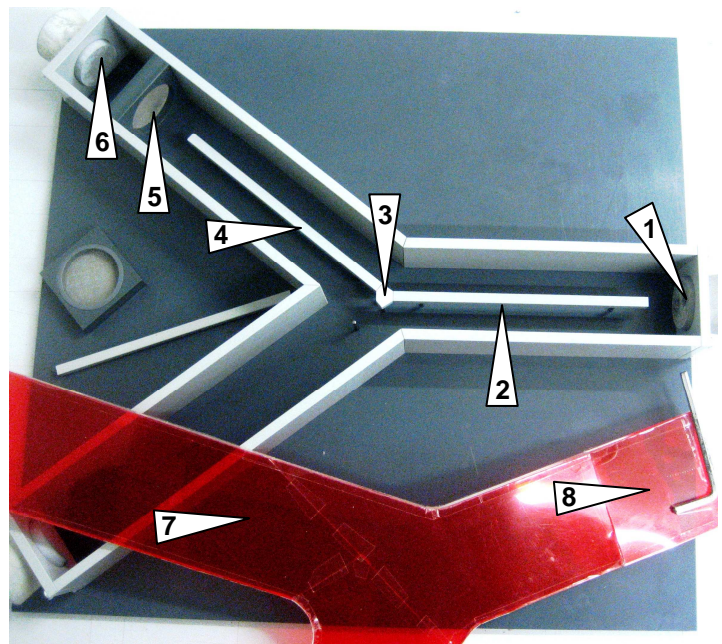


Abbildung 5: Olfaktometer zur Konfrontation der BSA mit HIPVs. Das Gerät besteht aus einem Stopfen mit Schlauch zur Wasserstrahlpumpe (1), einer Zuführungsbrücke (2) zum Entscheidungspunkt (3), Entscheidungsstegen (4) (linker aktuell demontiert; Punkt der Konzentrationsmessung), einem Gitter zur Trennung von Lauf- und Probenkammer (5), einer Anschlussstelle für den Stopfen mit Schlauch zu den Pflanzen (6) und einem mit roter Folie bezogenem Deckel (7) mit einer Klappe (8). Nähere Erklärung ziehe Text.

olfaktometrischen Studien vorgeschlagen (Sabelis *et al.* 1983), wurde die dafür benötigte Wasserstrahlpumpe in einen anderen Raum verlegt. Dadurch wurde eine Kontamination des Raumes mit den Versuchssubstanzen verhindert. Eine Problematik bei der Olfaktometrie mit sozialen Ameisenkolonien besteht (im Gegensatz zu nicht-sozialen Tieren) darin, individuelle Arbeiterinnen ohne Störung aus ihrem sozialen Kontext zu entfernen und in das Olfaktometer zu leiten. Dieser Umstand erforderte zusätzliche Weiterentwicklungen der Methode. Um einzelne Tiere ‚unbemerkt‘ abzuleiten wurde eine Brücke mit einer Zuführungsbrücke (Abb. 6) angefertigt, welche über das Olfaktometer führte und die Futterbox der Untersuchungskolonie mit der Versuchsfutterbox verband. Durch Absenken der

Zuführungsbrücke konnten Ameisen auf den Zuführungssteg im Olfaktometer gelangen. Die so abgeleiteten Tiere zeigten typische Verhaltensmerkmale futtersuchender Kundschafterameisen, wie das Heben des Kopfes und das Bewegen der Antennen und keinerlei Anzeichen von Stress, wie Zubeißen oder Spreizen der Mandibeln (Hölldobler *et al.* 1990). Dadurch, dass ein permanenter Futtersuchpfad oberhalb des Olfaktometers etabliert wurde, standen den ganzen Tag über ausreichend Ameisen für die Versuche zur Verfügung. Die Position des Pfades senkrecht oberhalb des Olfaktometers ist von Bedeutung für eine weitere Problematik derartiger Bioassays mit Richtungs-Wahl - die sogenannte Idiothetik. Darunter versteht man, im Gegensatz zur allothetischen Orientierung, eine Richtungsänderung ohne raumrichtungsanzeigende Reize (Mittelstaedt *et al.* 1973, Hughes 2008). Insekten, die schon vor der Richtungswahl im Olfaktometer gezwungen werden ihre Laufrichtung zu ändern, neigen zu einer idiothetischen Ausgleichsbewegung am Entscheidungspunkt, wodurch die Wirkung des Duftstoffs u.U. überlagert wird. Ein solches Verhalten wurde schon bei olfaktometrischen Versuchen mit Blattschneiderameisen demonstriert (Kleineidam 1999).

Trotz der erwähnten methodischen Verbesserungen, stellte sich in Vorversuchen heraus, dass die Anzahl der ungestört in den Olfaktometer abgeleiteten Arbeiterinnen zu klein war, um ausreichende Stichprobengrößen für die geplanten Versuche zu erzielen. Eine Erklärung für diese Schwierigkeiten liegt wohl darin, dass sich individuelle *Atta colombica*-Ameisen generell ungerne/zögerlich auf neues Terrain bewegen (Dr. C. Kleineidam, Univ. Würzburg, persönliche Kommunikation), während sich beispielsweise die phylogenetisch primitiveren *Acromyrmex*-Ameisen relativ bereitwillig in den Olfaktometer ableiten lassen (Theobald 2009). Die Lösung dieses Problems war das Aufbringen von Pheromonspuren auf die Olfaktometerstege indem diese zuvor in den Futtersuchpfad integriert wurden. Um Effekte auf die Richtungswahl dieser Spuren auszuschließen wurden alle drei Stege randomisiert. Aus Vorversuchen mit sublimierendem Kohlenstoffdioxid aus Trockeneis zur Visualisierung der Gasströme im Gerät war außerdem bekannt, dass sich Ameisen etwa drei cm nach dem Entscheidungspunkt (Wegekreuz im Olfaktometer) vollständig im Luftstrom des jeweiligen Seitenastes des Olfaktometers befanden. Soziale Insekten entscheiden auch aufgrund ihrer Erfahrung (Raveret-Richter und Waddington 1993). Die Lernfähigkeit von Ameisen auf olfaktometrische Reize wurde schon nachgewiesen (Dupuy *et al.* 2006, Josens *et al.* 2009). Für

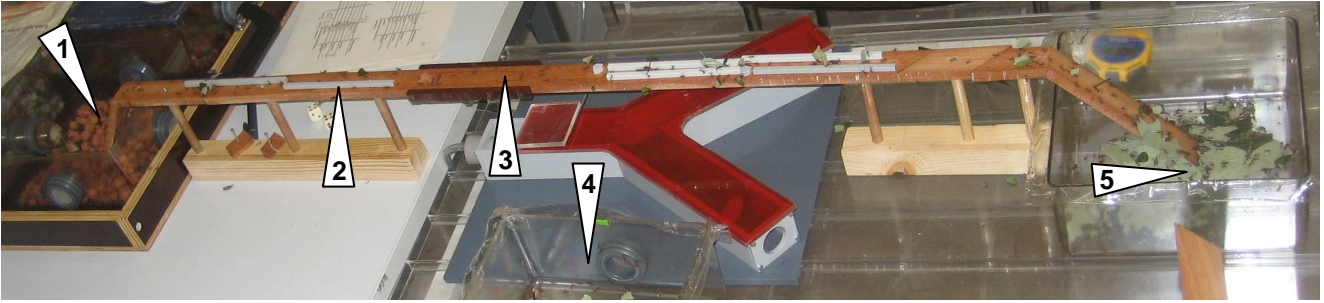


Abbildung 6: Versuchsaufbau der Wahlversuche. Von der Koloniefutterbox (1), aus der die Kolonie normalerweise ihr Futter bekommt, führt die Brücke über das Olfaktometer zur Versuchsfutterbox (5). Zur Applikation von Pheromonspuren auf die Olfaktometerstege sind diese momentan auf die Brücke gelegt (2). In die Brücke ist eine Zuführungsbrücke eingelassen mit welcher BSA auf den Zuführungssteg des Olfaktometers gelassen werden können (3). Verwendete BSA wurden in einer separaten Box aufbewahrt (4). Nähere Erklärung siehe Text.

Blattschneiderameisen konnte eine Assoziation eines Duftes mit der Futterquelle während der Futtersuche über einen Tag gezeigt werden (Roces 1990, Roces 1994). Subkolonien assoziierten nach 2 bis 3 Tagen ebenfalls den Duft einer Futterquelle mit Schaden an dem Pilzgarten (North *et al.* 1999). Genauen Angaben über das Gedächtnis einzelne BSA-Individuen liegen allerdings nicht vor. Um den Einfluss von Erfahrung auf die Entscheidung Arbeiterinnen zu reduzieren, wurde jedes Individuum nur einmal am Tag benutzt und dann in einer separaten Box aufbewahrt. Optimal wäre eine einmalige Verwendung während der ganzen Versuche gewesen, was allerdings aus praktischen Gründen nicht möglich war.

Das Olfaktometer wurde zwar schon in einer Diplomarbeit (Aigner 2007) und einigen Praktika verwendet (Stephan 2007, Theobald 2009, Repp 2009, Schmidt 2009), doch aufgrund der Optimierung des Versuchsaufbaus und der Änderungen in der Durchführung der Wahlversuche, wurde vor dem Beginn der eigentlichen Messungen ein Funktionstest des Olfaktometers durchgeführt. Ähnlich einer Studie mit einem Myrmekopyhten und ihren symbiotischen Ameisen (Bruna *et al.* 2008), wurden den BSA gemörserte Blätter ihrer Futterpflanze (Brombeere) angeboten. Als Kontrolle diente hierbei ein leeres Probenfach. Dabei wird erwartet, dass die BSA eine Präferenz für die gemörserten Blätter zeigen (Cherrett und Seaforth 1970), indem sie öfter in Richtung dieser laufen. Durch eine Bestätigung der Präferenz für gemörserte Blätter wäre ein Beweis für die Tauglichkeit des entwickelten Gerätes und des Versuchsaufbaus für die Evaluation der Reaktion der BSA auf Düfte erbracht. Dieser Funktionstest wurde auf exakt die gleiche wie die eigentlichen Messungen durchgeführt, wobei die gemörserten Blätter spätestens nach drei Stunden erneuert wurden.

Das endgültige Protokoll für den Ablauf eines olfaktometrischen Wahlversuchs gestaltete sich wie folgt:

Der Start eines Versuchs beginnt mit dem Herunterklappen der Zuführungsbrücke, so dass ca. eine bis drei Ameisen zufällig auf den Zuführungsteg gelangen. Dann wird der Olfaktometerdeckel zugeklappt und somit der Luftstrom etabliert. Das Verhalten einer Arbeiterin wird als „keine Entscheidung“ (k.E.) bewertet, wenn sie (i) nach Ablauf von 2 Min. keine eindeutige Richtungswahl getroffen hat (wobei bei einer Vorwärtsbewegung in Richtung Entscheidungspunkt erst nach einem Umkehren der Ameise abgebrochen wird) (ii) sich sichtlich alarmiert und mit offenen Mandibeln im Olfaktometer bewegt oder (iii) von den Stegen herunterklettert. Ein gültiger Wahlversuch ist dann gegeben, wenn eine Arbeiterin mindestens drei cm auf einem der beiden Entscheidungsstege zurücklegt. Nur die Entscheidung der ersten Ameise wird gewertet und alle verwendeten Individuen werden in eine separate Box getan. Danach findet, wie nach jedem Wahlversuch (gültige sowie ungültige), die erwähnte Randomisierung der Stege mittels Würfelwurf statt. Um andere unbekannte Effekte auf die Richtungswahl der Ameisen auszuschließen, wird Test- und Kontrollsubstanz nach jeweils fünf Wahlversuchen (gültige sowie ungültige) vertauscht bzw. die Schläuche der Pflanzen gewechselt. Vor dem Tausch werden beide Probenkammern mit 50% Ethanol gereinigt und erst nach einer Trocknungszeit von min. einer Minute der nächste Wahlversuch gestartet.

2.3.4. Nachweis des Vorhandenseins von HIPVs im Olfaktometer

Zwar entsprach die HIPV-Emission der hergestellten Paste qualitativ der einer Limabohne nach 24 Stunden Herbivorie, die für Ameisen im Olfaktometerraum einstehende Konzentration der Duftstoffe war jedoch unbekannt und sollte daher bestimmt werden. Für die Probennahme wurde hierzu mittels einer Pumpe Luft aus dem Olfaktometer abgesaugt. Das Absaugen fand in einem Arm des Olfaktometers statt (Nr. 4 Abb.5). Die HIPVs wurden dabei in einem Glasröhrchen mit integrierten Aktivkohlefiltern (1,5 mg Aktivkohle, CLSA-Filter, Le Ruisseau de Montbrun, Damazan sur Aurize, Frankreich) gebunden. Durch dieses Verfahren konnten die HIPVs gesammelt und später mittels Gas-Chromatographen-Massenspektrometer (GC-MS) bestimmt werden. Konkret wurden hierfür 60 µl der Lanolinpaste mit HIPVs

in das Probenfach des Olfaktometers gegeben. Um die gleichen Bedingungen wie bei den Wahlexperimenten zu gewährleisten, wurde die Wasserstrahlpumpe mit identischer Stärke angeschaltet (siehe Abschnitt 2.3.3.). Wie in den Wahlexperimenten wurde aufgrund der hohen Flüchtigkeit der HIPVs die Pasten jeweils nur etwa drei Stunden beprobt. Da andererseits eine minimale Menge an Volatilen im Kohlefilter vorhanden sein muss, um ihre Menge mit der GC-MS bestimmen zu können, wurde die Beprobung über 24 h vorgenommen. Die Pasten wurden in diesem Zeitraum acht Mal erneuert. Nach der Beprobung wurde der Aktivkohlefilter mit den gebundenen Pflanzenvolatilen wie folgt ausgewaschen: (1) Mit einem Plastikröhrchens (ca. 5 mm) wurde das Glasröhrchen mit einem Mikroeingang für Schraubampullen verbunden und 20 µl des Lösungsmittels Dichlormethan, in dem sich auch die für die GC-MS nötige Referenzsubstanz n-Bromdecan (200 ng/µl) befand, in das Röhrchen gegeben. Dies geschah mit einer zuvor mit Dichlormethan und Methanol gereinigten Hamilton-Glasspritze. (2) An das andere Ende des Röhrchens wurde ebenfalls mit einem Plastikröhrchen eine 5ml-Spritze befestigt, mit der das Lösungsmittel durch den Aktivkohlefilter gedrückt werden konnte. Dabei wurde das Lösungsmittel nicht auf einmal durch den Aktivkohlefilter in den Mikroeingang gedrückt, sondern zuvor mindestens fünf Mal durch Druck und Unterdruck durch den Filter bewegt. (3) Die Spritze wurde wie erwähnt gereinigt und der komplette Vorgang wiederholt, so dass sich am Ende 40 µl des Lösungsmittels mit den aus dem Filter gewaschenen HIPVs im Mikroeingang befanden. Dieser wurde mit einer Feder für Mikroeingänge (5 x 30 mm) in eine 2 ml-Schraubampulle gesetzt, verschraubt und bei -20 °C gelagert. (4) Zur Reinigung wurde das verwendete Glasröhrchen auf eine Saugflasche gesteckt und der Aktivkohlefilter mit einer Pasteurpipette sukzessive mit den Lösungsmitteln Methanol, Methanol / Chloroform (3:1), Chloroform, Dichlormethan und Aceton durchspült (ca. 1 – 2 ml). Nach der Trocknung bei 60 °C für mindestens 3 h konnte das Glasröhrchen wieder verwendet werden. Die Analyse der gesammelten Duftstoffproben erfolgte im Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena mittels eines Thermo Finnigan Trace GC-MS (Thermo, Bremen, Germany). Methodische Details zu verwendeter Säule, Auswertung des Massenspektrogramms etc. finden sich bei Tremmel (2009). Analog zur Konzentrationsmessung der aus der Lanolinpaste diffundierenden HIPVs wurde auch eine Bestimmung der HIPV-Mengen induzierter Limabohnen vorgenommen. Zwei Pflanzen wurden 24 Stunden an das Olfaktometer

angeschlossen. Die Behandlung und der Anschluss der Pflanzen an das Olfaktometer erfolgten dabei genau so wie für die oben beschriebenen Wahlexperimente (Kap. 2.3.2. und Kap. 2.3.3.), die Vorgehensweise bei der Duftstoffmessung entsprach derjenigen bei der Lanolinpaste.

2.4. Inhibitionsassays zur Messung der HIPV- Wirkung auf den symbiotischen Pilz

Der Pilz im unterirdischen Garten von *A. colombica*-Kolonien ist ein saprophytisch lebender Pilz, welcher auf dem eingetragenen Pflanzenmaterial wächst und in obligater Symbiose mit den BSA lebt (Belt 1874, Weber 1966; Cherrett *et al.* 1989). Neben Teilen von Früchten, Blüten sowie nicht-grünen Nebenblättern wird von den BSA vor allem frisches Pflanzenmaterial als Substrat für den Pilzgarten eingetragen (Wirth *et al.* 2003, Quinlan und Charrett 1979). Vor allem mittels Proteinasen und Polysaccharidasen verdaut der Pilz das Blattmaterial (Cherrett *et al.* 1989, Siqueira *et al.* 1998). Die durch die Verdauung gewonnenen Nährstoffe werden in den Gongylidien eingelagert und stehen den BSA als Nahrungsquelle zur Verfügung (Kreisel 1972).

Trotz vielen Untersuchungen mit Kulturen des symbiotischen Pilzes (Howard *et al.* 1988b, Bot *et al.* 2002, Schiøtt *et al.* 2008, Erthal *et al.* 2008, Haeder *et al.* 2009) musste ein beträchtlicher Teil der methodischen Grundlagen für diesen Teil der vorliegenden Arbeit von mir selber entwickelt werden (Kap. 2.4.1.). Bisherige Studien beschäftigten sich mit der Degradationsfähigkeit (Schiøtt *et al.* 2008, Erthal *et al.* 2008) oder der Optimierung der Kultivierung (Cazin *et al.* 1989, Silva-Pinhati *et al.* 2005). In dieser Studie soll systematisch die Wachstumsinhibition durch Pflanzenstoffe untersucht werden. Versuche im Kontext der Inhibierung durch sekundäre Pflanzenstoffe, um Rückschlüsse auf die Futtersuchökologie der BSA zu ziehen, fanden schon statt (Howard *et al.* 1988b, Pagnocca *et al.* 1990), wobei der Fokus in meine Untersuchungen auf der Inhibition des Pilzwachstums durch flüchtige HIPVs liegt. Hierfür wurden zwei experimentelle Versuchsansätze etabliert (Kap. 2.4.2. und 2.4.3). In einem ersten Ansatz („Versuchskultur: Agarkulturen“) wurde der Pilz auf Agarmedium mit HIPVs kultiviert, um dessen Wachstumsrate als Durchmesser bewachsener Fläche im Vergleich zur Kontrolle ohne HIPVs zu

bestimmen. Dies ist ein für diesen Organismus erprobten Methode (Howard *et al.* 1988b, Silva *et al.* 2006a/b). Parallel dazu wurde die Wachstumsrate in Flüssigmedium („Versuchskultur: Flüssigkulturen“) durch Wiegen des Biomassezuwachses im Vergleich zur Kontrolle evaluiert. Da das Messen des Durchmessers in den Agarkulturen aufgrund der dreidimensionalen Struktur des Myzels ungenauer ist als die Messung der Biomasse durch Wiegen, erhoffe ich mir eine Etablierung dieser Methode zur besseren Bestimmung der Unterschiede der Inhibition des Pilzes. Um die inhibitorische Wirkung des natürlichen HIPV-Spektrums sowie der einzelnen HIPV zu bestimmen, wurde der Pilz mit verschiedenen Konzentrationen konfrontiert. Aufgrund der Unkenntnis der Dosisabhängigkeit des Pilzwachstums von den HIPVs der Limabohne wurde ein möglichst breites Konzentrationspektrum über 3 Zehnerpotenzen gewählt, welches im Flüssigmedium noch um zwei intermediäre Konzentrationen ergänzt werden konnte (Tab. 1).

2.4.1. Wahl des Mediums und Isolation des symbiotischen Pilzes

Da das Wachstum des Pilzes hauptsächlich in der oberen Region des Pilzgartens stattfindet (Bass und Charrett 1996), wurde mittels einer Pinzette Gartenmaterial mit Pilzhyphen vom oberen Teil des Gartens in eine Petrischale überführt. Zur Herstellung von Reinkulturen des symbiotischen Pilzes wurde zuerst mittels einer Lanzette Gartenmaterial mit Hyphen auf ein Medium mit dem Breitbandantibiotika Chloramphenicol aufgebracht. Das Medium für diese Isolationskulturen war Yeast-Nitrogen-Base-Medium (YNB, Formedium CYNO201) versetzt mit 5 g Glucose (Merk, 1.083337.1000), 17 g Agar (AppliChem, A2111.1000) und 0,1 g Chloramphenicol (Sigma C0378-5G) pro Liter (Silva-Pinhati *et al.* 2005). Auf diesem sog. YNBGC-Medium wuchs der Pilz im durchschnitt etwa 40 Tage, wobei erwartungsgemäß über 75 % der Kulturen aufgrund von Kontamination durch Fremdorganismen aussortiert werden mussten (Silva-Pinhati *et al.* 2005). Danach wurde das Myzel auf verschiedene Medien aufgebracht, auf denen in vorherigen Studien eine Kultivierung gelungen ist: YNBG-Medium (YNBGC-Medium ohne Chloramphenicol), Soy-Flour-Medium (SFM) bestehend aus 20 g Sojamehl (Hensel, W. Schoenenberger GmbH), 20g Mannitol (AppliChem A1903.0250) und 20 g Agar (AppliChem, A2111.1000) pro Liter und Potato-Dextrose-Medium (PDA) bestehend

aus 100 g gekochten Kartoffeln, 10 g Glucose und 7,5 g Agar pro Liter (Silva-Pinhati *et al.* 2005, Haeder *et al.* 2009, Howard *et al.* 1988b). All diese Stammkulturen war ebenso wie die Isolationskulturen im gleichen Raum untergebracht wie die Ameisenkolonien und mit Parafilm verschlossen. Wie in Abbildung 7 zu sehen, unterschied sich die Wachstumsrate des Pilzes auf den verschiedenen Medien der Stammkulturen nach 21 Tagen, wobei der Pilz auf PDA am schnellsten wuchs. Auf SFM trat außerdem eine eher konvexe Wachstumsform auf, welches ungeeignet ist für eine zuverlässige zweidimensionale Flächenmessung. Aus diesem Grund, sowie dem Auftreten der größten Wachstumsrate, wurden

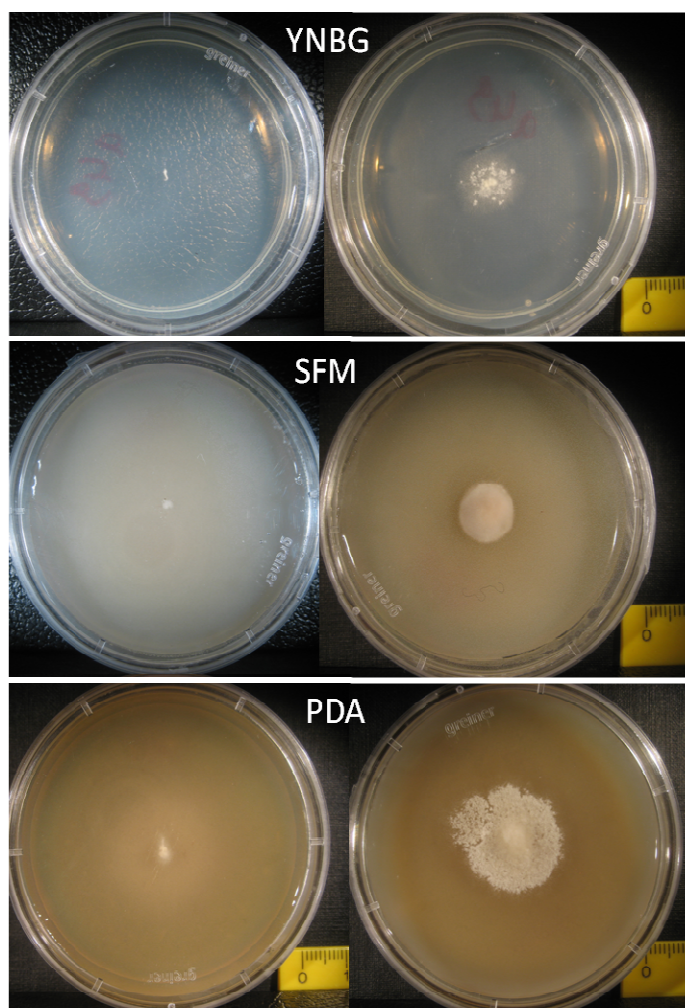


Abbildung 7: Wachstumsverhalten von *Leucoagaricus gongylophorus* im exemplarischen Vergleich der drei verwendeten Kulturmedien. Durch medienspezifische Wuchsformen und unterschiedlich starke Wachstumsraten auf den drei Medien (**YNBG**: Yeast-Nitrogen-Base-Glucose-Medium, **SFM**: Soy-Flour-Medium, **PDA**: Potato-Dextrose-Agar) wiesen die Kulturen drei Wochen nach der Inoculation (rechte Seite) unterschiedliche Radien auf. Weitere Details siehe Text.

für die anschließenden Versuchskulturen zur Evaluation der Wachstumsinhibierung durch HIPVs PDA (Agarkulturen) und PDB (Flüssigkultur) verwendet. PDB stellt dabei PDA ohne Agar dar. Zur Vermeidung von Artefakten beim Wiegen wurde das grobe PDB für die Flüssigkulturen vor der Verwendung filtriert (Whatman 595½). Aufgrund der hohen Kontaminationsgefahr gepaart mit dem einschlägig bekannten langsamen Wachstum des Gartenpilzes (Silva-Pinhati *et al.* 2005) musste sichergestellt werden, dass es sich tatsächlich um Reinkulturen des symbiotischen Pilzes *L. gongylophorus* handelt. Hierzu dienten folgende Kriterien: (1) keine Sporenproduktion und das Vorhandensein von 30 bis 50 µm großen Gongyliiden (Wirth *et al.* 2003) unter dem Mikroskop, sowie makroskopisch erkennbarer

Staphylae und (2) extrem langsames Wachstum (Cazin *et al.* 1989). Als weiteres Indiz für die Pilzidentität diente ein Bioassay mit den Ameisen der Herkunftskolonie. Wie in einer anderen Studie vorgeschlagen, wurde einmalig Agar mit Myzel in einem Glaskolben überführt und an eine Kolonie angeschlossen. Darauf bauten die Ameisen in dem Glaskolben einen neuen Pilzgarten auf und zeigten dadurch die Zugehörigkeit dieser Kultur zu ihrem Pilzgarten (siehe Cazin *et al.* 1989). Neben der Bestimmung des Pilzes auf allen Platten durch die beschriebenen Indizien fand eine exemplarische Identifizierung der Identität mittels Sequenzierung statt. Diese wurde von Dr. Spitteller am MPI in Jena durchgeführt und ergab eine Wahrscheinlichkeit von 99 % für *L. gongylophorus* (pers. Komm. Dr. D. Spitteller, MPI Jena).

2.4.2. Einarbeitung der HIPVs in die Kulturmedien

Um die Konzentrationen 10µg, 100µg und 1000µg des jeweiligen HIPVs pro ml PDA in das Agar und zusätzlich 50µg und 500 µg in die Flüssigmedien einzuarbeiten (siehe Tab. 1), wurden folgende Schritte unternommen: Die verschiedenen Mengen der HIPVs wurden in Tween 80 (Merk-Schuchardt) gelöst und mit destilliertem und autoklaviertem Wasser verdünnt. Diese Lösung wurde mit zweimal autoklaviertem handwarmem PDA (Agarkulturen) bzw. kaltem PDB (Flüssigkulturen) vereinigt und gründlich gemischt. Von dem Flüssigmedium wurden je 10 ml auf 15ml-Falkons verteilt. Bis auf das Abwiegen der Volatile geschah der ganze Vorgang unter sterilen Bedingungen. Die Agar-Platten enthielten damit zusätzlich zu den HIPVs 0,5% Tween 80 und die Flüssigmedien 0,025% Tween 80. Die Platten und die Falkons der Kontrollen wurden daraufhin ebenfalls mit der entsprechenden Konzentration Tween 80 versehen.

2.4.3. Durchführung der Bioassays und Messung der Wachstumsinhibition

Im Folgenden wird die Inokulation der Versuchskulturen auf PDA und in PDB beschrieben. Die dafür verwendeten HIPVs und Konzentrationen sind in Tabelle 1 aufgelistet. Von 166 angesetzten Stammkulturen auf YNBG-Agar standen nach Aussortierung aufgrund von Kontamination 37 Platten für die Agarkulturen zu

Verfügung. Das Myzel für die Inokulation der Flüssigkulturen stammte von sämtlichen Stammkulturen auf SFM und PDA.

Agarkulturen

Um für die Wachstumsmessungen eine standardisierte Anfangsbiomasse zu gewährleisten, wurde mittels eines Korkbohrers ein Loch in die Mitte aller Versuchsplatten gestochen. Dieses Loch wurde mit einem aus den Stammplatten ausgeschnittenen Myzel-Agar-Zylinder gefüllt. Die Wachstumdauer wurde auf 45 Tage festgelegt, in welchen die Platten wie oben beschrieben gelagert wurden. Für die Ermittlung der Wachstumsrate in Millimeter pro Tag wurde mittels Schieblehre der Durchmesser der sichtbaren bewachsenen Fläche gemessen (d.h. auf der Agaroberfläche wachsendes Myzel). Aus den Werten zweier um 90° versetzter Durchmesser messungen, wurde für die weitgehend kreisrund bewachsenen Flächen der Mittelwert des Durchmessers ermittelt. Durch den Vergleich der Wachstumsraten von Test- und Kontrollplatten konnte so die Inhibition bestimmt werden.

Flüssigkulturen

Das Myzel der SFM- und PDA-Stammplatten wurde in einem Potter-Homogenisator in PDB zerkleinert und in einer Schottflasche gesammelt. Um auch hier in allen Test- und Kontrollkulturen die gleiche Anfangsbiomasse zu gewährleisten, wurden von diesem Stammansatz jeweils 0,3 ml in die oben beschriebenen Falkons mit den verschiedenen HIPV-Konzentrationen in PDB überführt. Die Falkons wurden in einem Inkubator (Labert 311DS) bei 26°C und gelegentlichem Schütteln für 35 Tage gelagert. Zur Bestimmung der Endbiomassen wurden die gewachsenen Flüssigkulturen mittels Wasserstrahlpumpe, Saugflache und Büchnertrichter mit aufgelegten Filtern der Porengröße 0,7 µm (Glass Microfibre Filter GF/F, Whatman) filtriert. Die Festlegung der Porengröße der Filter basierte auf vorherigen mikroskopischen Messungen, welche einen Hyphendurchmesser von min. 1 µm ergaben. Somit wurde ein Zurückhalten der kompletten Biomasse auf den Filtern gewährleistet. Nach Trocknung der beladenen Filter über min. 24 Stunden bei 65 °C wurde diese gewogen. Die absolute Biomasse wurde durch Subtraktion des durchschnittlichen Gewichtes eines Filters (N=6) ermittelt.

Als Maß für die Wachstumsinhibition wurde für beide Versuchsansätze die Relative Inhibitionsrate (RIR) eingeführt. Diese berechnet sich durch

$$RIR = 1 - \frac{DWR_B}{DWR_K}$$

wobei DWR_B für die durchschnittliche Wachstumsrate auf/in den behandelten Platten/Flüssigmedien und DWR_K für die durchschnittliche Wachstumsrate auf/in den Kontrollplatten/-flüssigmedien steht. Die RIR kann einen Wert zwischen minus Eins und Eins annehmen, wobei Null keinen Unterschied durch die Behandlung im Vergleich zur Kontrolle anzeigt, Eins eine vollständige Inhibition (d.h. kein Wachstum auf den behandelten Platten oder in den Flüssigmedien) und minus Eins ein doppelt so hohes Wachstum als die Kontrolle anzeigt. Eine Kurzfassung der Ansätze sowie eine Auflistung der verwendeten HIPVs und ihrer Konzentrationen ist in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1 Übersicht über die beschriebenen experimentellen Ansätze zur Messung der Wachstumsinhibition des symbiotischen Pilzes *L. gongylophorus* mit den HIPVs der Limabohne. Nähere Beschreibung siehe Text.

Ansatz			verwendete Volatile	verwendete Konzentrationen [µg/ml PDA bzw. PDB]
Nr.	Beschreibung	Maß für Wachstumsinhibition		
1	Agarblock mit Myzel in PDA- Agar mit Volatilen	Radialer Flächenzuwachs im Vergleich zur Kontrolle	Hexenylacetat Ocimen Linalool DMNT	10 [µg /ml] 100 [µg /ml] 1000[µg /ml]
2	Myzel aus Stammlösung in PDB- Flüssigmedium mit Volatilen	Zunahme der Trockenbiomasse im Vergleich zur Kontrolle	Jasmon Caryophyllen TMTT Methylsalicylat Mix aus allen HIPVs	10 [µg /ml] 50 [µg /ml] 100 [µg /ml] 500 [µg /ml] 1000 [µg /ml]

2.5. Datenverarbeitung und statistische

Auswertung

Die Verarbeitung der Daten fand mittels Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA) sowie mit Graphpad Prism 5 plus (Statcon, USA) statt. Statistische Analysen wurden mit Statistica 7.0 Studentenversion (StatSoft, USA) sowie mit R (<http://www.r-project.org>) durchgeführt. Die Auswertung der Daten zu den Duftstoffemissionen der Lanolinpaste und der Limabohnen erfolgte mit Hilfe des Programms Xcalibur (Finnigan Corporation, Australien).

Die statistischen Voraussetzungen von Normalverteilung und Varianzhomogenität der Messwerte wurden mit Hilfe des Bartlett- bzw. Kolmogorov-Smirnov-Tests überprüft ($p > 0.05$). Die Messwerte der Pilzassays waren normalverteilt, worauf die eine zweifaktoriellen ANOVA, mit HIPV-Art und Konzentration als unabhängigen und Fläche bzw. Biomassen als abhängige Variable, durchgeführt wurde. Die Messwerte der Wahlversuche im Olfaktometer waren nicht normalverteilt und die Auswertung erfolgte mittels Chi²-Test für beobachtete versus erwartete Häufigkeiten, wobei als Grundannahme von einer 50:50 Verteilung bei der Auswahl für die Seitenarme des Olfaktometers ausgegangen und mit den tatsächlich festgestellten Häufigkeiten verglichen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Reaktion von *Atta colombica*-Arbeiterinnen auf pflanzliche Duftstoffe im Olfaktometer

3.1.1 Überprüfung der Olfaktometerfunktion

Vor dem Beginn der eigentlichen Messungen wurde das Olfaktometer auf die Tauglichkeit zur Evaluation der Reaktion der BSA auf olfaktometrische Reize getestet. Dafür wurden die BSA im Olfaktometer mit den Duftemissionen gemörserter Blätter ihrer Standardfutterpflanze (der Brombeere) konfrontiert. Aufgrund der bekannten Präferenz von BSA für den Saft ihrer Nahrungspflanzen, wurde die entsprechende Wahrnehmung und Wegentscheidung von Arbeiterinnen als positiver Beleg für die Funktionstüchtigkeit des Olfaktometers betrachtet. Die Arbeiterinnen aller drei BSA-Kolonien zeigten eine starke Präferenz für die gemörserteren Blätter (Abb. 8). So entschieden sich zum Beispiel 80 Ameisen der Kolonie-Nr. 1 für den Olfaktometerweg in Richtung der gemörserteren Blätter und 41, also nur etwa halb so viele, für den Weg zum leeren Probenfach. Der statistische Test ergab eine hochsignifikante Präferenz für gemörserter Blätter ($\chi^2 = 12,57$; $F = 1$; $p < 0,0004$) bei Kolonie-Nr. 1 sowie signifikante Präferenzen bei Kolonie-Nr. 10 ($\chi^2 = 6,84$; $F = 1$; $p < 0,0089$) und Nr. 2 ($\chi^2 = 9,15$; $F = 1$; $p < 0,0025$). Das

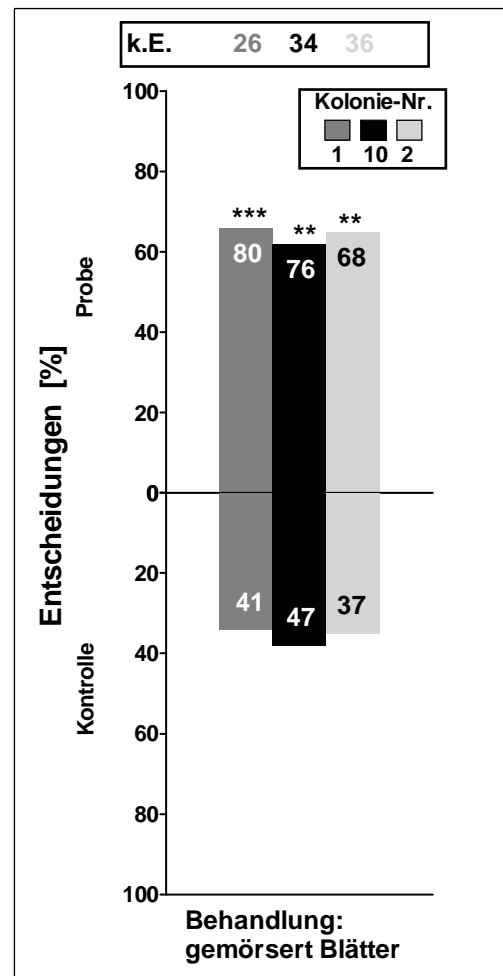


Abbildung 8: Entscheidungen von *A. colombica*-Arbeiterinnen für/gegen den Duft gemörserter Blätter der Brombeere im Olfaktometer-Wahlversuch. Arbeiterinnen der drei eingesetzten Laborkolonien (Kolonie-Nr. 1, 10, 2) wurden separat getestet; die Anzahl getesteter Individuen pro Kolonie ist im jeweiligen Balken angegeben. Als Kontrolle diente eine leere Probenkammer. Die Anzahl der ungültigen Laufversuche für die jeweiligen Kolonien ist als „keine Entscheidung“ (k.E.) aufgeführt. χ^2 -Ergebnisse: **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

Testergebnis wurde als Beleg dafür betrachtet, dass *A. colombica*-Arbeiterinnen in der verwendeten Olfaktometervorrichtung grundsätzlich in der Lage sind (i) Duftsignale zu perzipieren und (ii) sich durch Wahl eines Seitenarmes für oder gegen einen Duftgradienten zu entscheiden.

3.1.2. Reaktion der BSA auf simulierte HIPV-Emission

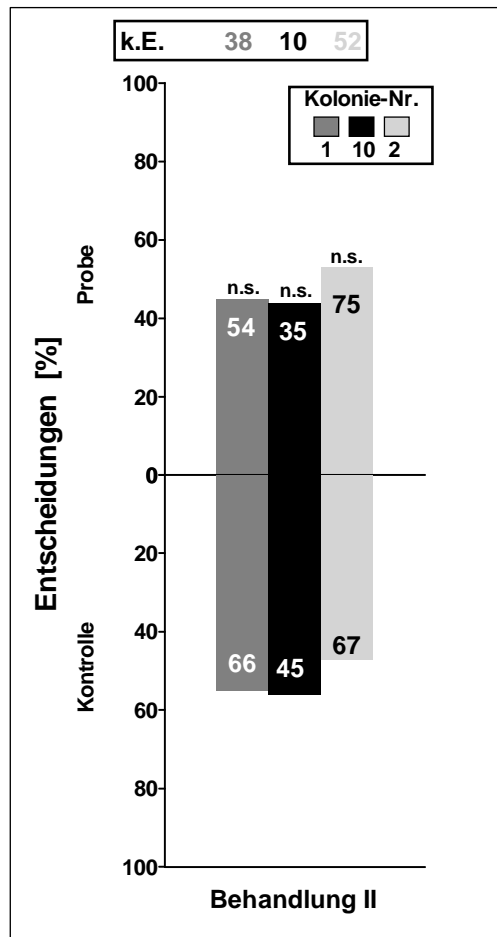


Abbildung 10: Entscheidungen einzelner *A. colombica*-Arbeiterinnen für 1 ml Lanolinpaste mit HIPVs und einem mechanisch beschädigtem Blatt. Zur Ergänzung des HIPV-Spektrums aus der Paste wurde zusätzlich ein mechanisch beschädigtes Blatt in die Probenkammer getan. Als Kontrolle diente 1 ml Lanolinpaste ohne HIPVs. Die Anzahl der ungültigen Laufversuche für die jeweiligen Kolonien ist als „keine Entscheidung“ (k.E.) aufgeführt und die Anzahl getesteter Individuen pro Kolonie ist im jeweiligen Balken angegeben. Chi²-Ergebnisse: n.s.: $p > 0,05$

Die Lanolinpaste mit den HIPVs wurde den BSA in verschiedenen Mengen angeboten, wobei die Konzentration der emittierten HIPVs mit der Menge der Lanolinpaste steigt, das HIPV-Spektrum aber gleich bleibt. Wie in Abbildung 9 zu sehen, wurden den BSA im Olfaktometer sechs verschiedene Konzentrationen des simulierten natürlichen HIPV-Mixes angeboten. Der Chi²-Test ergab bei keinem Verhältnis der Wegentscheidungen signifikante Unterschiede, womit belegt ist, dass Arbeiterinnen von *A. colombica* weder Präferenz noch Ablehnung für die HIPV-Emission aller angebotenen Konzentrationen zeigten. Eine probeweise Erhöhung der Entscheidungsanzahl auf 80 Entscheidungen pro Pastenmenge (je 40 an zwei unabhängigen Tagen), erbrachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Verhalten der Ameisen.

Um auszuschließen, dass die zu untersuchenden HIPVs nur in Kombination mit anderen unbekanntem pflanzenspezifischen VOCs eine Reaktion bei den BSA hervorrufen, wurden den Arbeiterinnen gleichzeitig zu der Paste mit HIPVs mechanisch beschädigte Blätter der Limabohne angeboten. Beim

Anbieten von 1 ml Lanolinpaste mit HIPVs in Verbindung mit einem mechanisch beschädigten Limabohnenblatt (Abb. 10), entschieden sich jeweils zehn Ameisen der

Ergebnisse

Kolonie-Nr. 10 ($\chi^2 = 1$; $F = 1$; $p < 0,32$) und zwölf Ameisen der Kolonie-Nr. 1 ($\chi^2 = 1,25$; $F = 1$; $p < 0,26$) weniger für die Emissionen aus der Lanolinpaste und dem Blatt. Von Kolonie-Nr. 2 wählten 8 Ameisen mehr den Weg in Richtung der HIPVs ($\chi^2=0,451$; $F=1$ $p<0,502$). Die Arbeiterinnen aller drei Kolonien zeigten somit ebenfalls keine Präferenz oder Ablehnungen bei dieser Behandlung.

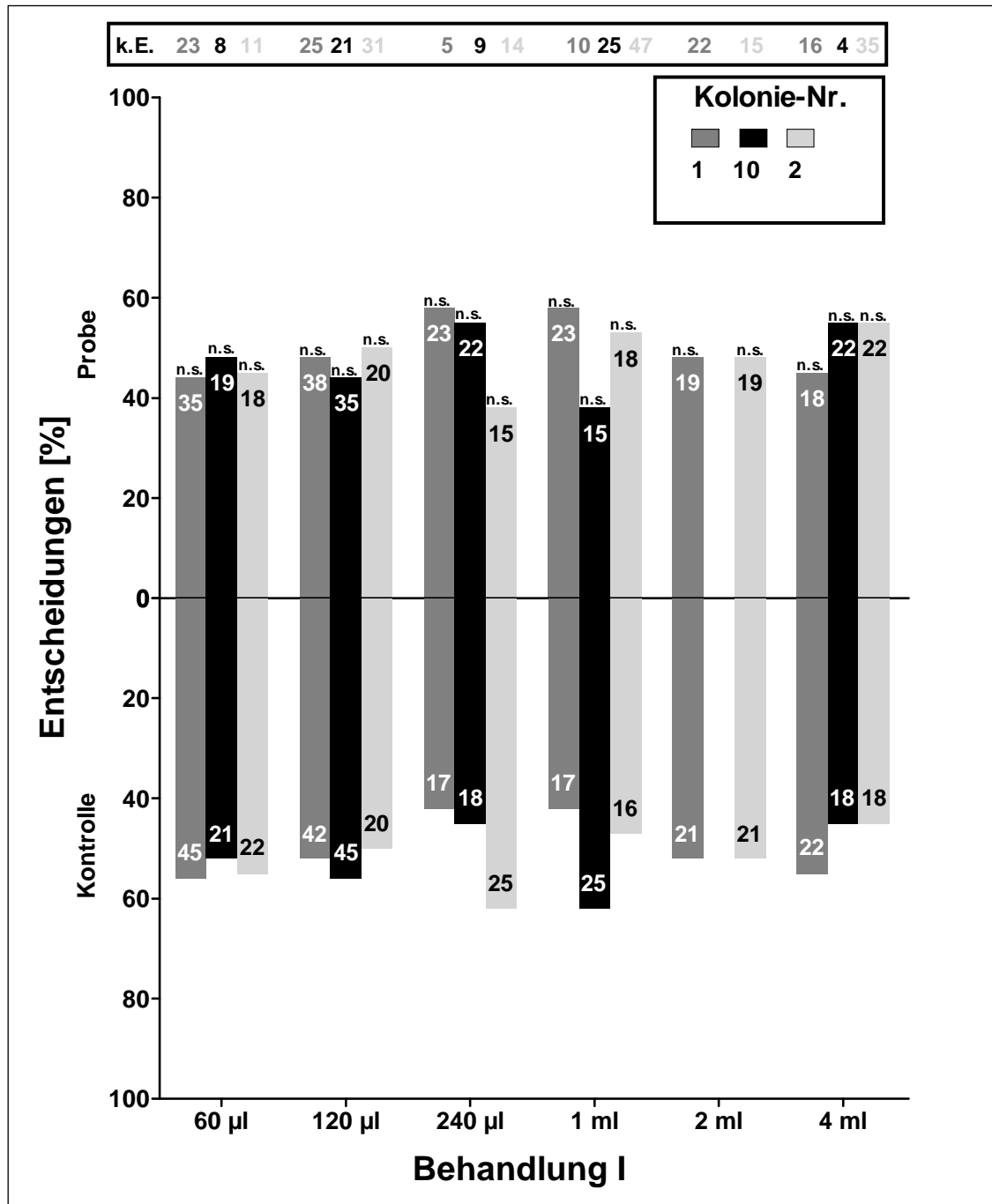


Abbildung 9: Entscheidungen einzelner *A. colombica*-Arbeiterinnen für verschieden Mengen an Lanolinpaste mit HIPVs. Die Verwendung unterschiedlicher Pastenmengen impliziert unterschiedliche Gesamtmengen emittierender Duftstoffe; der relative Anteil der Einzelkomponenten des HIPV-Spektrums ist jedoch gleichbleibend. Die Anzahl der ungültigen Laufversuche für die jeweiligen Kolonien ist als „keine Entscheidung“ (k.E.) aufgeführt und die Anzahl getesteter Individuen pro Kolonie ist im jeweiligen Balken angegeben. χ^2 -Ergebnisse: n.s.: $p > 0,05$

3.1.3. Reaktion der Blattschneiderameisen auf natürliche HIPV-Emissionen der Limabohne

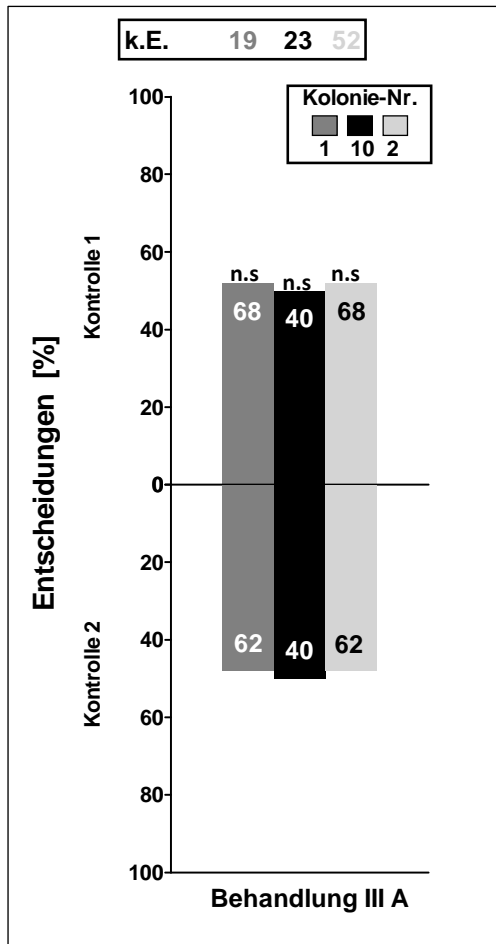


Abbildung 11: Entscheidungen einzelner *A. colombica*-Arbeiterinnen für Emissionen von nicht induzierten Pflanzen. Kolonie-Nr. 1 und Kolonie-Nr. 2 wurden drei Pflanzenpaare an drei unabhängigen Tagen, Kolonie-Nr. 10 zwei Pflanzenpaare an zwei unabhängigen Tagen angeboten und die Anzahl der Entscheidungen pro Kolonie aufsummiert. Die 8 Pflanzen der Kontrolle 1 wurden auf die gleiche Weise verpackt und angeschlossen wie die 8 Pflanzen der Kontrolle 2. Die Anzahl der ungültigen Laufversuche für die jeweiligen Kolonien ist als „keine Entscheidung“ (k.E.) aufgeführt und die Anzahl getesteter Individuen pro Kolonie ist im jeweiligen Balken angegeben. Chi²-Ergebnisse: n.s.: $p > 0,05$

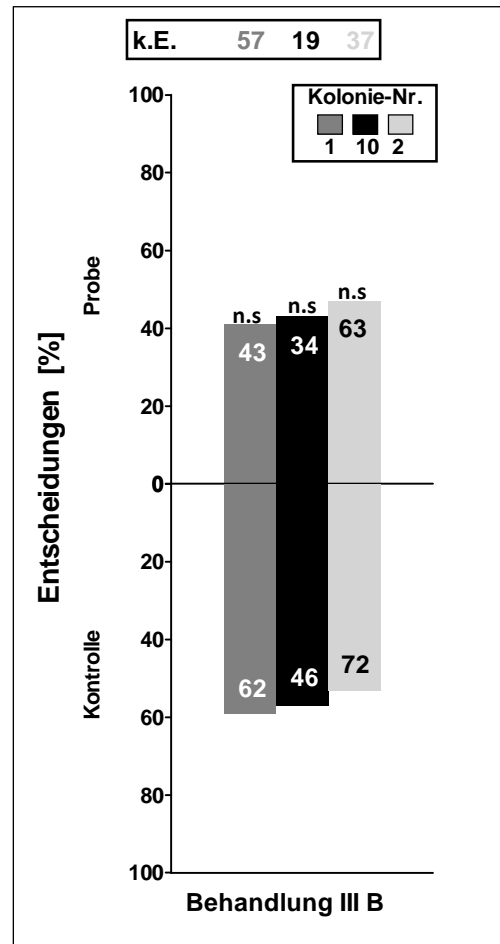


Abbildung 12: Entscheidungen einzelner *A. colombica*-Arbeiterinnen für Emissionen von nicht-induzierten versus induzierten Pflanzen. Kolonie-Nr. 1 und Kolonie-Nr. 2 wurden drei Pflanzenpaare an drei unabhängigen Tagen, Kolonie-Nr. 10 zwei Pflanzenpaare an zwei unabhängigen Tagen angeboten und die Entscheidungsanzahl pro Kolonie aufsummiert. Die 8 induzierten Pflanzen der Probe waren wie im Text beschrieben behandelt und auf die gleiche Weise verpackt und angeschlossen wie die 8 nicht-induzierten Pflanzen der Kontrolle. Die Anzahl der ungültigen Laufversuche für die jeweiligen Kolonien ist als „keine Entscheidung“ (k.E.) aufgeführt und die Anzahl getesteter Individuen pro Kolonie ist im jeweiligen Balken angegeben. Chi²-Ergebnisse: n.s.: $p > 0,05$

Um ausschließen zu können, dass intraspezifische Variation der natürlichen Duftemission von nicht-induzierten Pflanzen ausreicht, um eine Reaktion der BSA zu provozieren, wurden jeweils zwei nicht-induzierte Pflanzen an die Arme des Olfaktometers angeschlossen und die Präferenz/Ablehnung evaluiert (Behandlung III A). Wie aus Abbildung 11 zu entnehmen, zeigten die getesteten *A. colombica*-Arbeiterinnen aller drei Kolonien weder Ablehnung noch Präferenz gegenüber einzelnen Individuen nicht-induzierter Pflanzen. Die Ergebnisse dieses Experiments implizieren, dass das individuelle Duftprofil keiner der insgesamt 16 angebotenen Pflanzen eine Verhaltensreaktion der Ameisen auslöste.

Wurden den Arbeiterinnen eine induzierte und eine nicht-induzierte Kontrollpflanze angeboten (Behandlung III B), so entschieden sich gleichviele Ameisen für die Emissionen der Kontrolle wie für die Emissionen der Probe (Abb. 12). Bei Kolonie-Nr. 1 war als einziges ein Trend zur Ablehnung der induzierten Pflanzen zu beobachten, indem 43 Arbeiterinnen in Richtung induzierter Pflanze und 62 in Richtung nicht-induzierter Pflanze liefen ($\chi^2 = 3,44$; $F = 1$; $p < 0,06$).

3.1.4. HIPV-Konzentrationen im Olfaktometer

Um das Vorhandensein und die Konzentrationen von HIPVs für Ameisen während der Wahlexperimente zu prüfen, wurden Konzentrationsmessungen im Test-Arm des Olfaktometers vorgenommen. Alle HIPVs konnten mittels GC-MS registriert und identifiziert werden (Abb. 13). Diese Messungen ergaben eindeutig, dass die HIPVs sowohl bei simulierten (aus Lanolinpaste), als auch natürlichen Emissionen (aus induzierten Pflanzen) durch den Sog der Wasserstrahlpumpe bis in den Seitenarm des Olfaktometers gelangten (Tab. 2 und 3). Die aus 60 μl Lanolinpaste emittierte relative Gesamtmenge der HIPVs betrug mit 1,045 etwas mehr als die aus induzierten Pflanzen emittierte Menge (0,625). Für die Limabohnenpflanzen konnte die HIPV-Menge auch auf die dazugehörige Blattmasse bezogen werden; sie lag in 24 Stunden pro g Frischgewicht bei $0,223 \pm 0,176 \text{ g}^{-1}$. Zwar wurden auch andere nichtidentifizierte Substanzen in großen Mengen detektiert (Abb. 13), doch alle Terpenoide (Ocimen, Linalool, DMNT, Caryophyllen, TMTT), Ester (Methylsalicylat, Hexenylacetat) und Ketone (Jasmonsäure) waren in allen vier gemessenen Spektren vorhanden und es ist somit davon auszugehen, dass die Arbeiterinnen während der Wahlexperimente mit diesen konfrontiert wurden.

Ergebnisse

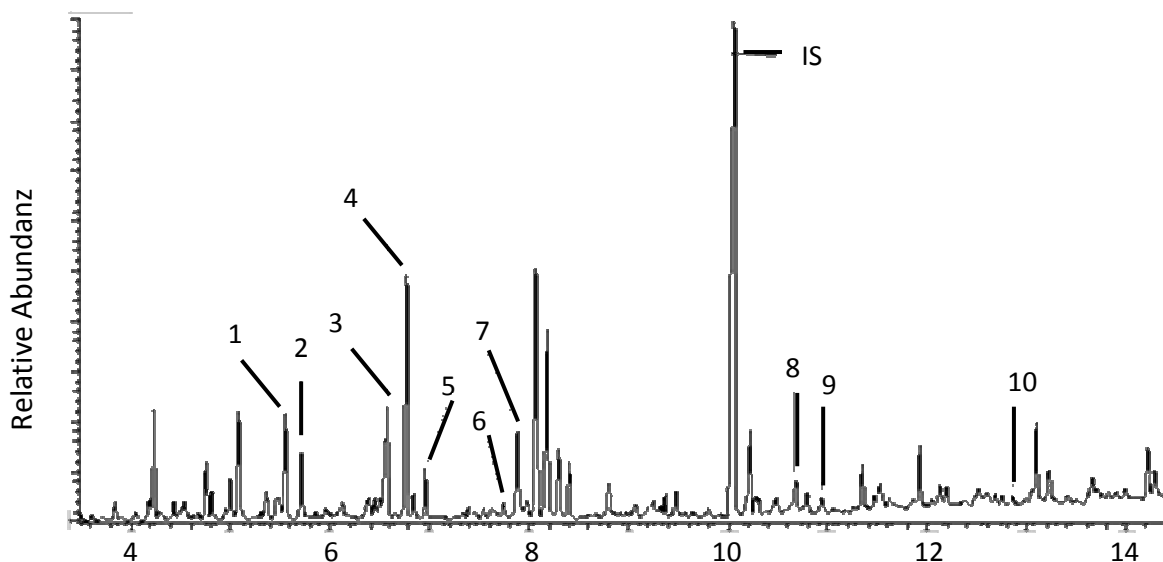


Abbildung 13: Exemplarisches GC-MS-Spektrum einer HIPV-Emission aus 60 µg Lanolinpaste. Die HIPVs wurden mittels einer Pumpe in einem Kohlefilter gesammelt, gelöst und anhand der Retentionszeit konnten die HIPVs (3Z)-Hex-3-enylacetat (1), (E,Z)-β-Ocimen (2), (R)-(-)-Linalool (3), DMNT (4), C₁₀H₁₄ (5), Methylsalicylat (6), C₁₀H₁₆O (7), (Z)-Jasmon (8), β-Caryophyllen (9), TMTT (10) identifiziert werden. Bei C₁₀H₁₄ und C₁₀H₁₆O handelt es sich um Spaltprodukte von Ocimen, die bei der Verwendung von Aktivkohle als Adsorbtionsstoff entstehen (Kost 2006). Als interner Standard (IS) diente 1-Bromodecan. Die Bestimmung der relative Menge der einzelnen Volatile (s. Tab. 2 und 3) basierte auf zwei Stichproben der in Aktivkohle (über 24 h) gesammelten Duftproben aus dem Olfaktometer.

Tabelle 2: Relative Mengen der aus 60 µg Lanolinpaste über 24 h emittierten HIPV-Komponenten im Olfaktometer. Aus den Spektrogrammen (siehe Abb. 13) wurde der Quotient aus der Fläche unter den Peaks der einzelnen Duftstoffe und der Fläche unter dem Peak des internen Standards berechnet. Durch Addition konnte die Gesamtmenge der HIPVs ermittelt werden.

HIPV-Komponente	Relative HIPV-Menge (MW±STAB; N=2)	
Hexenylacetat	0.106	± 0.031
Ocimen	0.063	± 0.027
Linalool	0.224	± 0.003
DMNT	0.350	± 0.019
C ₁₀ H ₁₄	0.051	± 0.015
Methylsalicylat	0.020	± 0.004
C ₁₀ H ₁₆ O	0.128	± 0.014
Jasmon	0.066	± 0.020
Caryophyllen	0.024	± 0.006
TMTT	0.014	± 0.002
Gesamtmenge	1.045	± 0.141

Tabelle 3: Relative Mengen der aus induzierten Limabohnenpflanzen über 24 h emittierten HIPV-Komponenten im Olfaktometer. Durch Anschluss der Pflanzen für 24 h an das Olfaktometer konnte die emittierte HIPV-Menge mit welcher die Arbeiterinnen konfrontiert wurden evaluiert werden. Aus den Spektrogrammen (siehe Abb. 13) wurde der Quotient aus der Fläche unter den Peaks der einzelnen Duftstoffe und der Fläche unter dem Peak des internen Standards berechnet. Durch Addition konnte die Gesamtmenge der HIPVs ermittelt werden. Durch Addition wurde die Gesamtmenge und durch anschließende Division mit der Blattmasse die Gesamtmenge pro g Frischgewicht ermittelt.

HIPV-Komponente	Relative HIPV-Menge (MW±STAB: N=2)	
Hexenylacetat	0.062	± 0.017
Ocimen	0.110	± 0.024
Linalool	0.007	± 0.003
DMNT	0.075	± 0.014
C ₁₀ H ₁₄	0.241	± 0.120
Methylsalicylat	0.008	± 0.003
C ₁₀ H ₁₆ O	0.055	± 0.045
Jasmon	0.039	± 0.009
Caryophyllen	0.021	± 0.019
TMTT	0.007	± 0.000
Gesamtmenge	0.625	± (0.226)
Gesamtmenge/g	0.223	± (0.176)

3.2. HIPV-Wirkung auf das Wachstum des symbiotischen Pilzes von *Atta colombica*

Um systematisch die Wachstumsinhibition des symbiotischen Pilzes durch die HIPVs untersuchen zu können, wurden zwei experimentelle Versuchsansätze etabliert. In Agarkulturen wurde der Pilz auf Agarmedium mit HIPVs kultiviert und die Wachstumsrate als Durchmesser bewachsener Fläche bestimmen. Parallel dazu wurde in Flüssigkulturen die Wachstumsrate in Flüssigmedium durch Wiegen des Biomassezuwachses evaluiert. Um die einer Nahrungswahl der BSA zu Grunde liegenden biologisch aktiven Substanzen identifizieren zu können, wurden in beiden Versuchsansätzen nicht nur der Mix aus allen HIPVs, sondern alle HIPVs einzeln verwendet. Als Maß für die Wachstumsinhibition diente in beiden Ansätzen die RIR, welche die durchschnittliche Wachstumsrate der Kulturen mit HIPVs mit der durchschnittlichen Wachstumsrate der Kulturen ohne HIPVs vergleicht.

Agarkulturen

Die Durchmesser der bewachsenen Fläche der Kulturen des symbiotischen Pilzes auf den Agar-Platten wurden nach 45 Tagen vermessen. Während dieser 45 Tage mussten viele Kulturen aufgrund von Kontamination mit Fremdorganismen verworfen werden, weshalb einzelne Assays weniger bis gar nicht repliziert sind. Außerdem trat eine konvexe Wuchsform, wie in den Vorversuchen auf SFM zu beobachten, auf.

Die statistische Auswertung der Wachstumsassays auf Agarmedium belegte, trotz der verringerten Replikationszahl, Effekte beider unabhängiger Variablen: sowohl die HIPV-Behandlung als auch die Dosisabhängigkeit ihrer Wirkungen waren deutlich und hochsignifikant (zweifaktorielle ANOVA, Effekt HIPV: $FG = 9$; $F = 41,235$; $p < 0,000$; Effekt Konzentration: $FG = 3$; $F = 184,972$; $p = 0,000$).

Betrachtet man die HIPVs ohne Rücksicht auf die Konzentration, so unterschied sich, mit Ausnahme von TMTT, DMNT und Caryophyllen, das Wachstum signifikant von dem der Kontrolle (Abb. 14). In der Einzelbetrachtung aller 27 getesteten Kombinationen von HIPV und Dosis zeigt sich, dass der Pilz nur in 4 Fällen keine Inhibition (d.h. negative RIRs) erfuhr (Abb. 15), wobei allerdings mittels Post-Hoc-Tests kein signifikanter Unterschied zum Wachstum der Kontrolle nachgewiesen werden konnte (Abb.14). Paarweise Post-Hoc-Tests im Vergleich zum Wachstum der Kontrolle zeigten, dass sechsmal das Wachstum des symbiotischen Pilzes durch die HIPVs inhibiert wurde (Tuckey's HSD-Test: $p < 0,05$), wobei dreimal eine völlige Inhibition entrat ($RIR=1$). Da das vorhandene Pilzmyzel in diesen drei Fällen abgestorben war, stellt dies eine fungizide Konzentration für den symbiotischen Pilz dar.

Die fungizide Wirkung fand bei den Einzelkomponenten ausschließlich in den Kulturen mit hohen Dosen (jeweils 1000 μg Jasmonsäure und Linalool) statt, während die Wirkung beim simulierten HIPV-Mix schon ab 100 μg inhibitorisch wirkte und bei 1000 μg fungizid. Die wachstumshemmende Wirkung des HIPV-Mixes ist dabei insbesondere auf die inhibierende Wirkung von TMTT und Caryophyllen, sowie der fungiziden Wirkung von Linalool und Jasmonsäure zurückzuführen. Grundsätzlich gab es, außer für DMNT, bei allen HIPVs eine Tendenz zu stärkerer Inhibition bei höherer Konzentration (Abb. 14). Die Post-Hoc-Vergleiche verschiedener HIPV-Dosen innerhalb eines HIPVs zeigten nur einen signifikanten konzentrationsbedingten Unterschied im Wachstum bei Ocimen (1000 μg zu 100 μg),

Ergebnisse

Linalool und Jasmonsäure (10 und 100 µg zu 1000 µg) sowie beim Mix (Tuckey's HSD-Test: $p < 0,05$). Beim Mix unterschied sich das Wachstum zwischen allen drei Konzentrationen signifikant (Tuckey's HSD-Test: $p < 0,05$).

Betrachtet man die Interaktion der beiden experimentellen Einflussgrößen (HIPV-Behandlung, Dosisabhängigkeit) auf das Wachstum des Pilzes, so zeigt sich, dass die Effekte auch gegenläufig waren (zweifaktorielle ANOVA, HIPV * Konzentration: $FG = 16$; $F = 19,298$; $p < 0,000$) und manche Kulturen bei großer HIPV-Konzentration besser wuchsen.

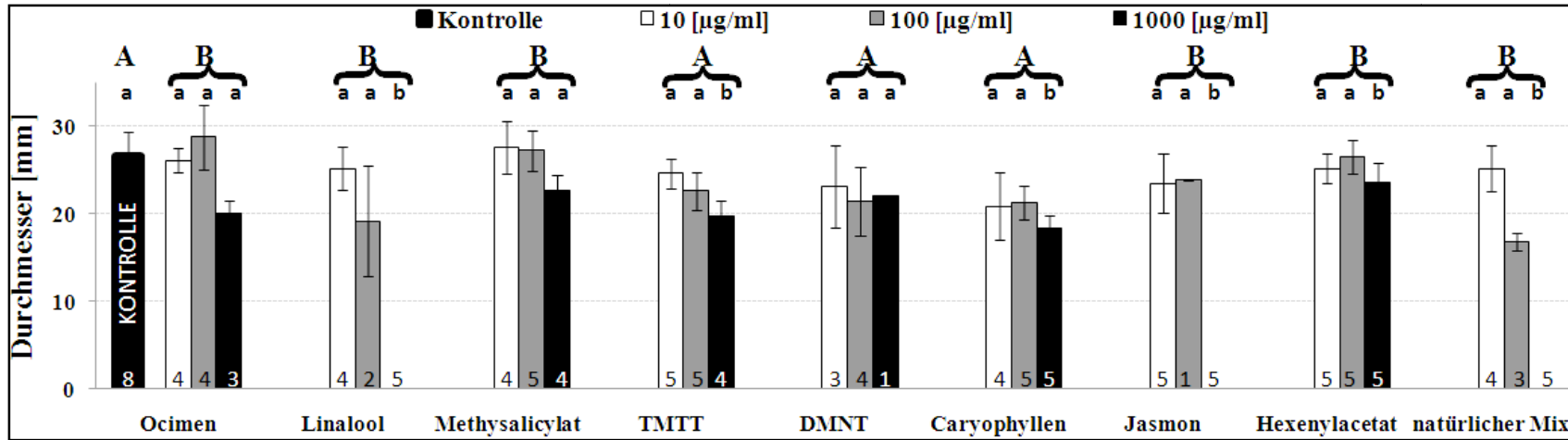


Abbildung 14: Dosisabhängigkeit und wachstumsinhibierende Wirkungen von HIPVs der Limabohne auf den Pilzsymbionten *Leucoagaricus gongylophorus* auf Agarmedium. Als Maß für das Wachstum des Pilzes diente der mittlere Durchmesser der weitgehend runden Agarkulturen. Als Kontrolle dienten Kulturen mit dem Lösungsmittel Tween 80 in gleicher Konzentration wie in den restlichen Kulturen. Ungleiche Groß- und Kleinbuchstaben signalisieren signifikante Wachstumsunterschiede gegenüber der Kontrollkultur (Tuckey's HSD-Test). Die Anzahl der einzelnen Replikationen sind in den Balken aufgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte.

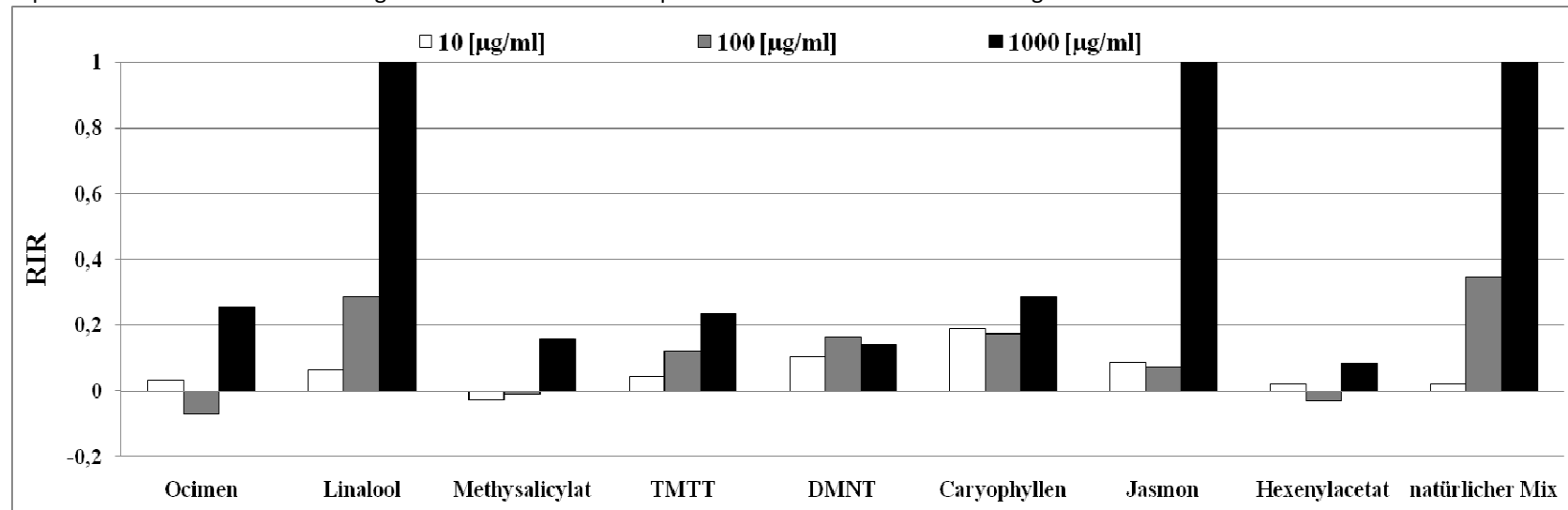


Abbildung 15: Errechnete Relative Inhibitionsrate der einzelnen Konzentrationen der HIPVs der Limabohne auf den Pilzsymbionten *Leucoagaricus gongylophorus* auf Agarmedium. Die Relative Inhibitionsrate (RIR) vergleicht das Wachstum der Kulturen (siehe Abb. 14) im Verhältnis zur Kontrolle. Ausführliche Beschreibung der Berechnung siehe Kapitel 2.4.3.

Ergebnisse

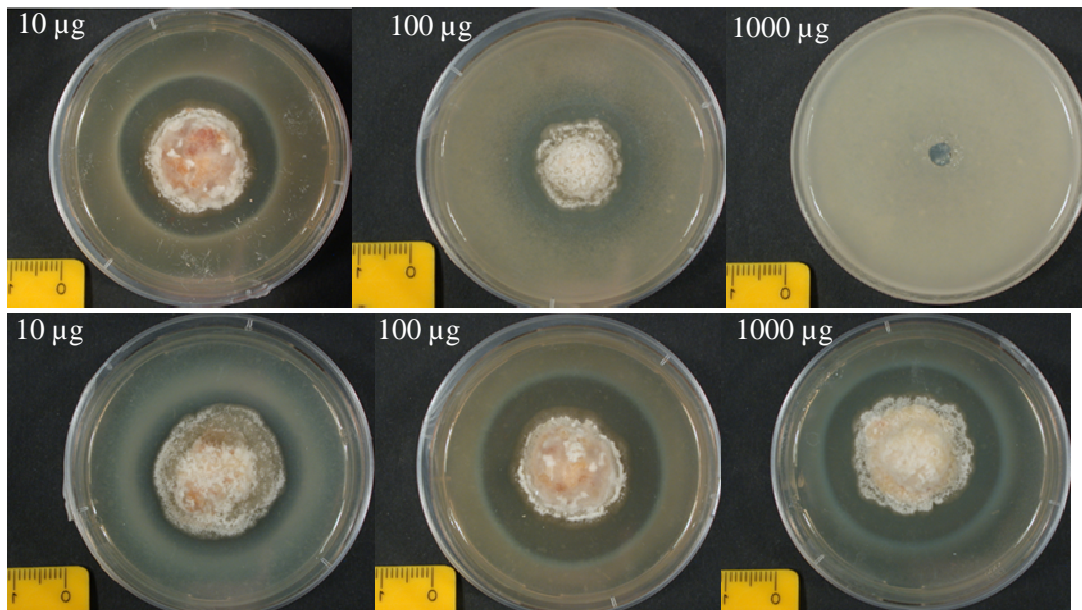


Abbildung 16: Exemplarische Darstellung von Wachstumsinhibitionsassays des Pilzsymbionten *Leucoagaricus gongylophorus* nach 45tägigem Wachstum auf Agarplatten mit HIPVs versetzt. Durch den deutlich kleineren Durchmesser der bewachsenen Flächen mit weißem Pilzmyzel, ist die inhibitorische Wirkung des Mixes bei 100 µg im Vergleich zu 10 µg visuell zu erkennen (obere Reihe). Die Kultur auf Agar mit 1000 µg Mix hat nicht überlebt und es kommt in der Mitte der Platte der hellere inokulierte Agarblock in dem, durch die große Menge an HIPVs dunkler gefärbterem, Agar zum Vorschein. Bei den Kulturen mit Hexenylacetat (untere Reihe) trat kein konzentrationsbedingter Wachstumsunterschied auf. Viele Kulturen wiesen Veränderungen im Agar in der Peripherie der bewachsenen Fläche in Form von konzentrischen Ringen auf.

Flüssigkulturen:

In einem alternativen Versuchsansatz wurden inhibitorische Effekte von HIPVs auf das Biomassewachstum des Pilzsymbionten evaluiert. Die hierzu erforderlichen Flüssigkulturen konnten erfolgreich für neun HIPV-Arten und je fünf Konzentrationen angelegt werden. Wie die statistische Analyse zeigte, wurde die Pilzbiomasse signifikant von den HIPVs beeinflusst (zweifaktorielle ANOVA, Effekt HIPV: $FG = 9$; $F = 112,27$; $p < 0,000$).

Betrachtet man die 45 Kombinationen von HIPV und Dosis einzeln, so zeigt sich in 2 Fällen keine Inhibition (d.h. negative RIRs; Abb. 18), wobei die Post-Hoch-Tests kein signifikanter Unterschied zum Wachstum der Kontrolle nachgewiesen (Abb. 19). Vergleicht man das Wachstum der Kulturen mit dem Wachstum des Pilzes in den Kontrollkulturen ohne Berücksichtigung der jeweiligen HIPV-Dosis, so ergab sich im Gegensatz zum Flächenwachstum auf Agar (Abb. 14 und 15) allerdings kein signifikanter Unterschied (Tuckey's HSD-Test, Abb. 17). Paarweise Post-Hoc-Tests wiesen allerdings bei 14 von 45 Einzelkonzentrationen ein signifikant reduziertes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle nach.

Ergebnisse

Auch die Konzentration der jeweiligen HIPVs hatte einen Einfluss auf das Wachstum des Pilzes (zweifaktorielle ANOVA, Effekt Konzentration: $FG = 5$; $F = 130,78$; $p < 0,000$). Die gemessene durchschnittliche Biomasse bei einer einzelnen Konzentration eines HIPVs unterschied sich allerdings nur in vier Fällen (10 und 50 μg gegenüber 100, 500 und 1000 μg Caryophyllen; 100 und 500 μg gegenüber 10, 50 und 1000 μg Jasmonsäure) von der durchschnittlichen Biomasse einer anderen Konzentration des selben HIPVs (Tuckey's HSD-Test: in allen Fällen $p < 0,05$). Der Interaktionsterm ergab für beide unabhängige Variablen (HIPV-Behandlung, Dosisabhängigkeit), dass die Effekte auch gegenläufig waren (zweifaktorielle ANOVA, HIPV * Konzentration: $FG = 32$; $F = 60,6$; $p < 0,000$) und manche Kulturen bei großer HIPV-Konzentration besser wuchsen.

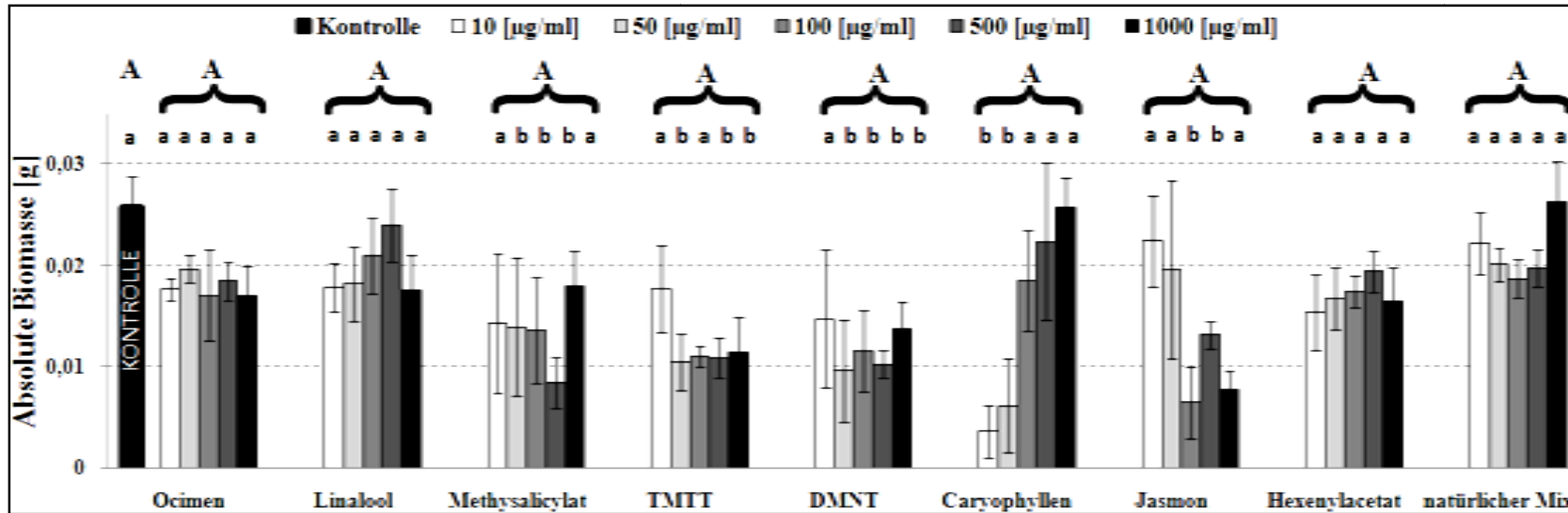


Abbildung 17: Dosisabhängigkeit und wachstumsinhibierende Wirkungen von HIPVs der Limabohne auf den Pilzsymbionten *Leucoagaricus gongylophorus* in Flüssigmedium: Als Maß für das Wachstum des Pilzes diente das mittlere Gewicht des gewachsenen Myzels. Als Kontrolle dienten Kulturen mit dem Lösungsmittel Tween 80 in gleicher Konzentration wie die restlichen Kulturen. Ungleiche Groß- und Kleinbuchstaben signalisieren signifikante Wachstumsunterschiede gegenüber der Kontrollkultur (Tuckey's HSD-Test). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte. N = 5.

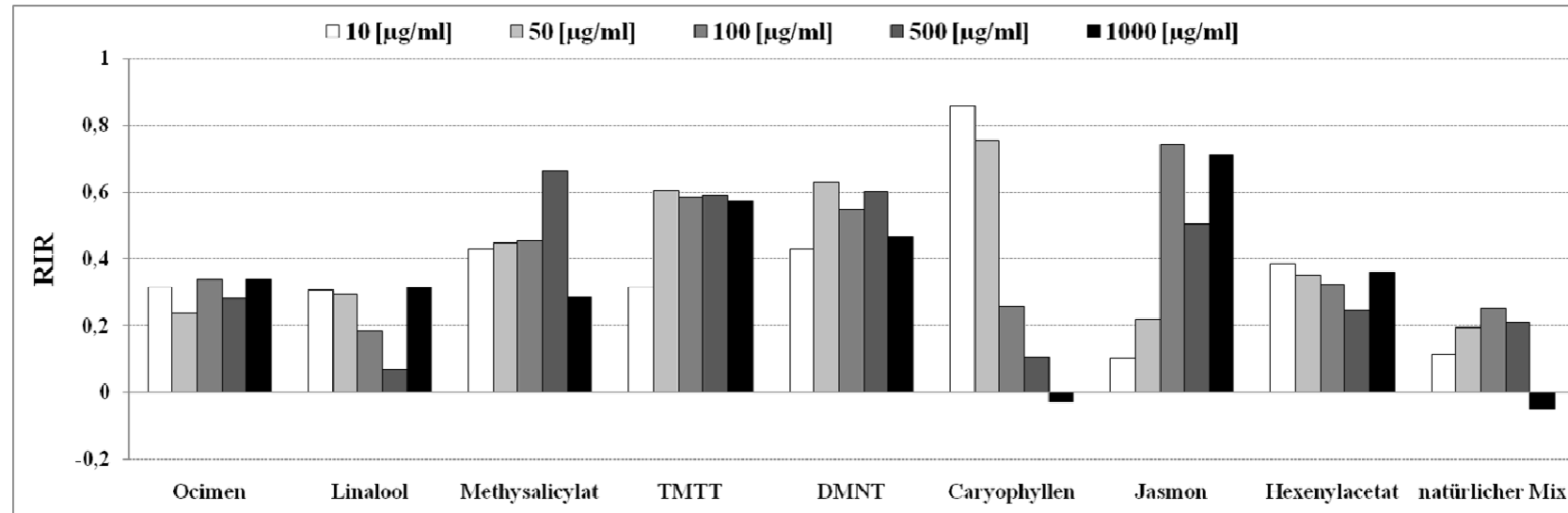


Abbildung 18: Errechnete Relative Inhibitionsrate der einzelnen Konzentrationen der HIPVs der Limabohne auf den Pilzsymbionten *Leucoagaricus gongylophorus* in Flüssigmedium. Die Relative Inhibitionsrate (RIR) vergleicht das Wachstum der Kulturen (siehe Abb. 17) im Verhältnis zur Kontrolle. Ausführliche Beschreibung der Berechnung siehe Kapitel 2.4.3.

4. Diskussion

In dieser Untersuchung zur Perzeption und Effekten induzierter pflanzlicher Abwehr auf Blattschneiderameisen und ihren symbiotischen Pilz wurden folgende Schlüsselergebnisse erzielt: Wurden einzelnen Arbeiterinnen der Blattschneiderameisenart *A. colombica* das natürliche HIPVs-Spektrum der Limabohne angeboten, so zeigten diese weder Ablehnung noch Präferenz für die emittierten HIPVs. Auch die Erhöhung der Konzentration, bei gleichbleibendem Verhältnis der Einzelkomponente des Spektrums, führte zu keiner Bevorzugung oder Ablehnung durch die Arbeiterinnen. Gleichzeitig wurde in dieser Studie erstmalig nachgewiesen, dass das Wachstum des symbiotischen Pilzes *L. gongylophorus* aus dem Pilzgarten der BSA durch das Spektrum der von der Limabohne emittierten HIPVs inhibiert wird. Dabei fanden sich deutliche Unterschiede bei den einzelnen Komponenten des HIPV-Mixes, insofern, dass einzelne HIPVs keine und andere wiederum starke antimykotische Eigenschaften zeigten.

Die Induktion pflanzlicher Abwehr beinhaltet unter anderem die Bildung verschiedener Sekundärmetabolite sowie die Emission von HIPVs (Karban und Baldwin 1997, Arimura *et al.* 2005). Es wurde schon nachgewiesen, dass BSA HIPVs wahrnehmen können (Batista-Pereira *et al.* 2006, North *et al.* 2000) und es gibt Untersuchungen, die einen Einfluss von HIPVs auf die Nahrungspflanzenwahl von BSA-Arten zeigen (Chen *et al.* 1984, Aigner 2007, Tremmel 2008). Es stellt sich also die Frage, warum die in dieser Arbeit olfaktometrisch untersuchten Individuen von *A. colombica* keinerlei Reaktion auf die HIPVs der Limabohne zeigten. Durch das Versuchsdesign wurde gewährleistet, dass es keinen Eintrag von Blattmaterial in die Kolonie gab und somit auch keine Veränderung des Pilzwachstums aufgrund antimykotischer Eigenschaften der Blattinhaltsstoffe stattfand. Ebenfalls wurde verhindert, dass Arbeiterinnen, welchen die HIPVs angeboten wurden, Nestgenossinnen beeinflussen konnten. Dadurch können die untersuchten Kolonien/Arbeiterinnen als ‚naiv‘ bezüglich ihrer vorherigen Erfahrung mit den flüchtigen Substanzen betrachtet werden.

In anderen Studien mit BSA-Kolonien, in denen mit fungiziden Substanzen versetztes Blattmaterial oder Roggenflocken angeboten wurde, wurde nach einiger Zeit eine Ablehnung dieses Nahrungsangebotes durch die Arbeiterinnen registriert (North *et*

al. 1999, Ridley *et al.* 1996, Herz *et al.* 2008). Diese Ablehnung wurde als Schutz des symbiotischen Pilzes durch die Arbeiterinnen interpretiert. Die wahrscheinlichste Erklärung für die hier registrierte Gleichgültigkeit der Arbeiterinnen gegenüber den HIPVs liegt in der Anwendung dieser generellen Mechanismen. In den olfaktometrischen Tests waren die Arbeiterinnen außerhalb ihres Koloniekontextes, also konnten weder mit Nestgenossinnen, noch mit ihrem Pilz kommunizieren. Kommunikation zwischen den symbiotischen Partnern etwa in Form eines Signals des Pilzes an die Arbeiterinnen HIPVs und damit induzierte Pflanzen mit erhöhter Menge an fungiziden Inhaltsstoffen, zu vermeiden, war hier experimentell ausgeschlossen. Ein Beleg für diese Interpretation sind auch frühere Studien, in denen *A. colombica*-Kolonien HIPV-emittierende Limabohnen deutlich ablehnten, nachdem sie zuvor Blattmaterial der induzierten Pflanzen in ihre Pilzgärten eingetragen hatten (Aigner 2007, Tremmel 2008). Wenngleich die Natur/Chemie des postulierten Pilzsignals nicht bekannt ist (Herz *et al.* 2008), kann angenommen werden, dass in diesen beiden Untersuchungen eine Informationsweitergabe vom Pilz zu den BSA stattfand und daraufhin die BSA die HIPVs bzw. die induzierte Pflanze vermieden.

Sollten sich die hier erzielten Ergebnisse durch weitere Untersuchungen bestätigen und BSA-Kolonien nur bei gleichzeitigen Eintrag von Biomasse ablehnend auf HIPVs reagieren, ist dies ein bisher unbeachteter Zusammenhang in der Interpretation von Daten zur Nahrungspflanzenwahl von BSA. Ich werde aufgrund der eventuellen großer Tragweite meiner Ergebnisse für das Verständnis der Futtersuchökologie der BSA zuerst genauer auf die Reaktion der Arbeiterinnen auf die HIPVs eingehen, indem ich systematisch Faktoren, welche die Versuche beeinflussen, diskutiere (4.1.). Danach werde ich die fungizid Wirkung der HIPVs und ihre Relevanz für die Futtersuche der BSA näher betrachten (4.2.). Als letztes wird die Bedeutung meiner Ergebnisse für die Futtersuchökologie der BSA erörtert (4.3.).

4.1. Einfluss der HIPV-Emission auf die Wegentscheidung der Blattschneiderameisen

Da in allen drei Behandlungen naive, vom Pilz unbeeinflusste Arbeiterinnen aller drei Kolonien kein ablehnendes Verhalten gegenüber den HIPVs der Limabohne zeigten,

müssen Hypothesen 1, welche eine Ablehnung der HIPVs der Limabohne postulierte, falsifiziert werden. Da somit auch keine Zunahme der Stärke der Ablehnung bei Zunahme der Konzentration registriert wurde, muss Hypothese 1.1. ebenfalls zurückgewiesen werden. Um die Aussagekräftigkeit der Ergebnisse einzuschätzen, werden im Folgenden Faktoren diskutiert, welche möglicherweise zu einer Beeinflussung der Wahlexperimente geführt haben.

In vielen anderen Untersuchungen mit anderen Herbivoren wurde durch Verhaltensbeobachtungen eine Reaktion auf HIPVs beobachtet (Dicke 1986, Dicke und van Loon 2000, Horiuchi *et al.* 2003a/b). Um die Reaktion der BSA in meinen, sowie in Aigners (2007) und Tremmels (2008) Wahlexperimenten mit der Perzeption von HIPVs in Verbindung bringen zu können, muss erörtert werden, ob die BSA die hier verwendeten HIPVs der Limabohne perzipieren können. BSA weisen ein gut entwickeltes olfaktorisches System auf und olfaktorische Reize spielen eine große Rolle in der Wahrnehmung ihrer Umwelt (Hölldobler und Willson 1990). Die Organisation einer Kolonie wäre zum Beispiel ohne die Erkennung der Koloniezugehörigkeit (Bonavita-Cougourdan *et al.* 1987) oder der Perzeption der Pfadpheromone (Tumlinson *et al.* 1971, Jaffe und Howse 1979) nicht möglich. Im Zusammenhang mit der Rekrutierung ist es Kleineidam *et al.* (2005) gelungen mit Hilfe der Elektroantennographie einen eindeutigen Beweis für die Perzeption der Pfadpheromone durch die BSA zu erbringen. Auch für das hier verwendete HIPV Caryophyllen konnte mit dieser Technik ein eindeutiger Beweis für die Wahrnehmungsfähigkeit durch die Ameisenart *Atta sexdens rubropilosa* erbracht werden (Batista-Pereira *et al.* 2006). Darüber hinaus gibt es eine Reihe indirekter Belege dafür, dass die hier verwendeten HIPVs von den BSA perzipiert werden können. In den klassischen Wahlexperimenten mit Koloniekontext wurde unter Berücksichtigung der hier erzielten Ergebnisse zwar nicht unbedingt die Repellenz/Attraktanz von Stoffen für die Arbeiterinnen evaluiert, sondern eventuell die Beeinflussung des Pilzes durch diese Stoffe, trotzdem können Schlussfolgerungen zu der individuellen Wahrnehmungsfähigkeit der Arbeiterinnen gemacht werden. Ohne die Fähigkeit die Stoffe zu perzipieren könnte auch keine, möglicherweise vom symbiotischen Pilz veranlasste, Ablehnung oder Präferenz aufgenommen werden. Bei Versuchen mit *Atta sexdens* wurde durch Verhaltensbeobachtung eine Reaktion auf Caryophyllen festgestellt und indirekt eine Perzeption gezeigt (North *et al.* 2000). Chen *et al.* (1984) konnten zeigen, dass mit

Ocimen versetzte Roggenflocken weniger von den BSA der Art *Atta cephalotes* aufgenommen und ins Nest eingetragen wurden als Roggenflocken ohne Ocimen. Da Aigner (2007) und Tremmel (2008) in ihren Studien ebenfalls eine Ablehnung für Limabohnenpflanzen mit hoher HIPV-Emission zeigten und andere die Nahrungspflanzenwahl beeinflussende Faktoren, wie zum Beispiel Rekrutierung ausschließen konnten, gehe ich nicht davon aus, dass die Arbeiterinnen die HIPVs nicht perzipieren können.

Da die Reaktion auf HIPVs auch konzentrationsabhängig sein kann (Dicke 1986, Horiuchi *et al.* 2003a/b, Heil 2004a/b, Arimura *et al.* 2005), könnte ein weiterer Grund für die Verteilung der Wegentscheidungen der Arbeiterinnen eine biologisch nicht relevante Konzentration der HIPVs sein. In ihren Versuchen behandelten Chen *et al.* (1984) Reisflocken mit 70 µg Ocimen pro Flocke, was eine Ablehnung zur Folge hatte. In den hier durchgeführten Versuchen wurden 0,85 µg Ocimen pro ein µl Lanolin, also 51 µg pro 60 µl und 3400 µg pro 4 ml verwendet. Ocimen hatte mit über 27 % einen großen Anteil an der Menge der HIPVs in der Lanolinpaste und selbst mit einer Verdünnung der Konzentration innerhalb des Olfaktometers sollte spätestens bei 4 ml Lanolin eine biologisch relevante Konzentration der emittierten HIPVs erreicht worden sein. Howard *et al.* (1989) zeigten eine Ablehnung gegenüber einer absoluten Konzentration von 4200 µg Caryophyllen. Die maximale Konzentration bei den hier durchgeführten Versuchen (mit 4 ml Lanolinpaste) betrug 520 µg und war somit möglicherweise unterhalb der erforderlichen Minimalkonzentration für eine Ablehnung. Weitere Studien zur Konzentrationsabhängigkeit der HIPV-Wirkung auf BSA liegen jedoch nicht vor, weswegen Literaturvergleiche hier nur cursorisch durchgeführt werden können. Neben den Messungen der HIPV-Konzentration im Olfaktometer wurden auch Messungen direkt an den Pflanzen vorgenommen (endgültige Daten lagen zu Redaktionsschluss noch nicht vor). Diese Messungen wurden ebenfalls mittels Induktion durch JA, Verpackung in Folie, Absaugen und Sammeln der Emissionen und Bestimmung der Konzentration durch GC-MS durchgeführt, wobei die Pumpe zum Absaugen nicht an das Olfaktometer, sondern direkt an Pflanze angeschlossen war. Aufgrund solcher Messungen direkt an den Pflanzen wurden die Zusammenhänge der HIPV-Emission und der BSA-Herbivorie bisher erforscht (Aigner 2007, Tremmel 2008). Vergleicht man die im Olfaktometer gemessene relative Gesamtmenge der acht untersuchten HIPVs mit Emissionsmessungen direkt an der Pflanze, so entsprachen die Emissionen aus 60

µl Lanolinpaste etwa 1/7 der Menge einer induzierten Pflanze. Spätestens bei der Emission aus 1 ml Lanolinpaste (einer mittleren Dosis in vorliegenden Versuchen) sollte damit die HIPV-Emission quantitativ einer Emission einer Limabohnenpflanze nach 24 Stunden Herbivorie entsprechen. Die ermittelte Gesamtmenge der HIPVs emittiert von induzierten Pflanzen entsprach etwas 1/4 der direkt an Pflanzen gemessenen Menge. Zumindest für die simulierte HIPV-Emission mittels Lanolinpaste (Behandlung I und II) schließe ich damit aus, dass die Konzentration der HIPVs zu gering war um eine Ablehnung bei den BSA auszulösen. Ich schlage vor die Olfaktometerexperimente mit induzierten Pflanzen (Behandlung III) zu wiederholen und dabei die Emissionsmenge im Olfaktometer an die direkt an den Pflanzen gemessenen anzugleichen. Es sollte außerdem erwähnt werden, dass ich die Feststellung einer geringeren Konzentration im Olfaktometer im Vergleich zu direkt an den Pflanzen gemessenen als nicht so problematisch einschätze. In den Untersuchungen in denen ein Zusammenhang der BSA-Herbivorie mit der Emission der HIPVs (Aigner 2007), sowie den Untersuchungen in denen eine Korrelation zwischen Abnahme der BSA-Herbivorie und Zunahme der HIPV-Emission festgestellt wurde (Tremmel 2008), fand das Anbieten der Limabohnenpflanzen zur Evaluation der BSA-Herbivorie in einer Arena statt und die Messungen der Emissionen wurden separat direkt an Pflanzen vorgenommen. Die absolute Menge gemessen direkt an Pflanzen ist dadurch nicht die Menge, mit der die BSA in der Arena konfrontiert wurden und auf deren Grundlage sie eine Ablehnung für die induzierten Pflanzen zeigten, da die Emission der Pflanzen in der Arena durch die Raumluft stark verdünnt wurde. Dagegen fand in meinen olfaktometrischen Wahlversuchen die Konzentrationsmessung an dem Punkt statt, an dem die Arbeiterinnen ihre Entscheidung fällten.

Um die Ablehnung der HIPVs durch die Arbeiterinnen in vorigen Untersuchungen mit der gefundenen Gleichgültigkeit in meinen Untersuchungen vergleichen zu können, muss ein weiterer Punkt diskutiert werden. Die Ablehnung von induzierten Pflanzen bei Aigner (2007) und Tremmel (2008) wurde durch verringerte Schneideaktivität evaluiert. Dabei hatten die BSA direkten Kontakt zu den Pflanzen, wodurch neben der Perzeption von HIPVs wohl auch die Perzeption anderer Blatinhaltsstoffe und Blatteigenschaften (s. z.B. Howard 1991, Meyer *et al.* 2006, Rockwood und Hubbell 1987) einen Einfluss auf die Wahl der Versuchspflanzen hatte. Aigner (2007) beobachtete allerdings in seinen Arenaversuchen, „dass die meisten Ameisen zu

Anfang der Versuche zunächst die Richtung weg von der Testpflanze einschlagen“. Dass die Nutzung von Volatilen zum Auffinden der Nahrung nicht einhergehen muss mit physischen Kontakt zur Nahrungsquelle ist bekannt und wurde etwa auch für andere Ameisenarten nachgewiesen (Helmy *et al.* 2003 für *Camponotus pennsylvanicus*). Da Volatilen generell ein großer Einfluss auf die Nahrungspflanzenwahl von Herbivoren zugesprochen wird (Dicke und van Loon 2000, Horiuchi *et al.* 2003a/b, Heil 2004a/b) liegt es nahe, dass auch die BSA nicht nur durch zusätzliche Schneideaktivität auf HIPVs reagieren. Durch die durchgeführten Versuche mit gemörserten Blättern wurde außerdem zweifelsfrei festgestellt, dass die hier verwendeten BSA-Arbeiterinnen auf flüchtige Verbindungen von Pflanzen reagieren.

Ein Kompromiss im Versuchsdesign war die Applikation von Pheromonspuren auf den Stegen des Olfaktometers zur Steigerung der Stichprobengrößen, da sich Arbeiterinnen der BSA-Art *Atta colombica* generell ungerne/zögerlich auf neues Terrain bewegen. Zwar konnte durch Randomisierung der drei Stege ein Einfluss unterschiedlich ausgeprägter Pheromonspuren auf die Wegentscheidung einzelner BSA ausgeschlossen werden, die Frage, ob Pheromonsignale die HIPV-Perzeption der BSA dennoch beeinflusst haben könnte, bleibt zu klären. Andererseits wurde diese mögliche Querbeeinflussung der Duftperzeption durch Pheromonspuren bisher noch nie berücksichtigt. In allen Studien zur Perzeption von Ocimen (Chen *et al.* 1984), Caryophyllen (North *et al.* 2000), Ölen oder Blättern (Littledyke und Cherrett 1978) wurde die Reaktion von einzelnen BSA auf einem Futtersuchpfad oder in einer Arena, umgeben von vielen anderen Individuen, evaluiert. Die Ameisen zeigten trotz der vermeintlichen Präsenz von Pheromonspuren in all diesen Fällen deutliche Reaktionen auf Düfte. Dass die BSA sich auf einem markierten Weg befanden, kann somit nicht der Hauptgrund für die Verteilung der Entscheidungen im Olfaktometer sein.

Es könnte argumentiert werden, dass die Anzahl der statistisch auswertbaren Einzelentscheidungen zu gering war um eine Ablehnung/Präferenz bei sozialen Insekten zu registrieren. In einschlägigen Untersuchungen zur HIPV-Perzeption/Wirkung auf andere Ameisen, wurden jedoch eher geringere Stichprobenzahlen verwendet. So waren in anderen Untersuchungen mit Myrmekophyten und ihrer Wirtspflanze minimal 26 und maximal 45 Entscheidungen nötig um eine signifikante Ablehnung zu registrieren (Dáttillo *et al.* 2009). Im Vergleich

zu anderen olfaktometrischen Experimenten war somit die Zahl der Einzelentscheidungen mit minimal 20 und maximal 142 pro Behandlung in meinen Untersuchungen relativ hoch und zeigt, dass dieser Parameter für die Registrierung einer Ablehnung/Präferenz konservativ gewählt war.

Zusammenfassend gehe ich davon aus, dass das Ergebnis unter Einbeziehung der Ergebnissen von Aigner (2001) und Tremmel (2008), als ein Ausbleiben der Ablehnung der HIPVs durch die Arbeiterinnen gesehen werden kann.

4.2. Inhibierung des Wachstum des symbiotischen Pilzes durch die HIPVs

Wie meine Versuche mit simulierter Zusammensetzung des natürlichen HIPV-Spektrums zeigten, sind die von der Limabohne nach Herbivorieschädigung freigesetzten HIPVs fähig das Wachstum des symbiotischen *Leucoagaricus*-Pilzes der BSA zu beeinflussen. Wie die Wachstumsassays auf den Agar-Platten belegten, werden die Pilz-Kulturen von den HIPVs inhibiert. Der Mix wies bei einer Konzentration von 100 µg eine teilweise und bei 1000 µg pro ml Medium eine vollständige Inhibition des Pilzes auf. Meine eingangs formulierte Hypothese 2 (das Wachstum des symbiotischen Pilzes wird durch HIPVs der Limabohne inhibiert) kann damit als verifiziert betrachtet werden. Da sich die Inhibitionsraten aller drei Konzentrationen des Mixes signifikant unterschieden, kann Hypothese 2.1. (eine höherer Konzentration des HIPV-Spektrums führt zu einer stärkeren Inhibition) ebenfalls angenommen werden kann. Die Richtigkeit von Hypothese 2.2. (Einzelsubstanzen bewirken eine Inhibition des Wachstums) konnte für die HIPVs Linalool, TMTT, Caryophyllen und Jasmonsäure nachgewiesen werden.

Soweit mir bekannt ist, wurde hier erstmalig versucht Wachstumsinhibition des Pilzes *L. gongylophorus* mittels Biomassemessungen in Flüssigkulturen zu evaluieren. Die Ergebnisse dieser Flüssigkulturen werden allerdings aus folgenden Gründen als nicht aussagekräftig für die Bewertung der antimykotischen Wirkung der HIPVs auf den symbiotischen Pilz erachtet: Trotz mehrmaligem Schütteln wurde bei vielen Kulturen ein Wachstum auf der Oberfläche des Kulturmediums beobachtet. Daraus resultierte eine große Variabilität in der Biomasse am Ende der Wachstumsphase zwischen Replikationen der einzelnen Kulturen mit HIPVs. Nach 35-tägigem Wachstum wurde

außerdem nur eine maximale Biomasse von 0,032 g erreicht. Die resultierenden geringen Unterschiede im Wachstum waren deshalb nicht ausreichend für eine statistisch robuste Evaluation der HIPV-Wirkung. Erschwert wurde die Evaluierung der geringen Biomasse zusätzlich durch die großen Schwankungen in den Filtermassen, was allerdings durch Messung der Einzelfiltermassen vermieden werden kann. Der erreichte Maximalwert der Biomasse aller Flüssigkulturen (0,032 g) stammt außerdem von einer Replikation des Mixes bei 1000 µg. In den Agarkulturen starb der Pilz bei dieser hohen Konzentration ab. Ich werte den Verlauf dieser Versuche und die gegensätzlichen Ergebnisse im Vergleich zu den Agarkulturen daher als starkes Indiz für die Notwendigkeit eines festen Untergrundes zur Gewährleistung eines schnellen Wachstums – ein Zusammenhang der beispielweise auch für das Wachstum von Pilz *Botrytis cinerea* gezeigt wurde (Doehlemann *et al.* 2006). Aus diesen Gründen werden im Folgenden nur die Ergebnisse des Wachstums auf Agar-Platten (Agarkulturen) näher betrachtet. Dieses ähnelt zweifellos auch mehr dem natürlichen Wachstum im Pilzgarten der Ameisen.

Bei fast allen HIPVs trat bei der höchsten Konzentration ein geringeres Wachstum im Vergleich zur Kontrolle auf. Da allerdings nur bei Linalool und Jasmonsäure eine fungizide Wirkung und bei TMTT und Caryophyllen eine signifikante Inhibition des Pilzes nachweisbar war, erscheint es plausibel die Gesamtwirkung des Mixes hauptsächlich auf die fungiziden/inhibitorischen Eigenschaften dieser HIPV-Komponenten zurück zu führen. Die antimikrobielle und fungizide Wirkung von Linalool wurde bereits von Pattnaik *et al.* (1997) nachgewiesen. Bei ihren Versuchen war Linalool das zweitstärkste Fungizid von fünf untersuchten Substanzen in ätherischen Ölen und inhibierte zehn von zwölf filamentösen Pilz-Arten. Eine Inhibierung der Weißfäule (Cardoza *et al.* 2002) sowie anderen Pilze (Hammer *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2006) durch Linalool konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Die Inhibition in meinen Assays erweitert somit die Kenntnisse zur fungiziden Wirkung dieses Stoffes. Für Methylsalicylat und Hexenylacetat wurde ebenfalls ein Inhibition der Weißfäule nachgewiesen (Cardoza *et al.* 2002). In meinen Assays wuchs der symbiotische Pilz auf methylsalicylatversetztem Agar nur etwa 15 % weniger gegenüber der Kontrolle und zeigte keine sehr starke inhibitorische Eigenschaft gegenüber *L. gongylophorus*. Die pflanzenpathogenen Pilze *Monilinia fructicola* und *B. cinerea*, welche ebenfalls mit der Abwehr von Pflanzen konfrontiert sind, wurden beispielsweise bei einer Konzentration von etwa 430 µg Methylsalicylat pro ml

vollständig inhibiert (Wilson *et al.* 1987). Hexenylacetat zeigt neben der inhibierenden Eigenschaft gegen die Weißfäule auch unterstützende Eigenschaften für den phytopathogenen Rostpilz *Uromyces fabae* bei der Haustorienbildung (Mendgen *et al.* 2006). Das Wachstum des symbiotischen Pilzes wurde in meinen Bioassays nur geringe durch diese Substanz beeinflusst. In den Kulturen mit Ocimen wies zwar keine der drei getesteten Konzentrationen eine signifikante Inhibition auf, die gepoolten Werte aller Konzentrationen deuteten jedoch trotzdem auf einen signifikanten, negativen Inhibitionseffekt hin. Für Ocimen wird zwar eine Unterstützung in der Verteidigung von Tomatenpflanzen gegen pathogene Pilze vermutet (Chen *et al.* 1984), konkrete Aussagen über die Wirkung auf den Pilz der Ameisen lassen sich aber nicht machen. Die durchschnittlichen Wachstumsraten der Kulturen auf Agar versetzt mit DMNT, TMTT und Jasmonsäure waren immer geringer als die der Kontrollen, wobei nur die höchsten Konzentrationen von TMTT und Jasmonsäure eine signifikante Inhibition aufwiesen. Für DMNT und TMTT sind bisher keine antimykotischen Eigenschaften bekannt. In meinen Untersuchungen wurde vermutlich erstmalig die fungizide Eigenschaft von Jasmonsäure nachgewiesen. Jasmonsäure induziert unter anderem die Bildung von Proteinaseinhibitoren in Pflanzen (Creelman *et al.* 1997, Farmer *et al.* 1990). Da Proteinase zum Arsenal der Verdauungsenzyme des symbiotischen Pilzes gehören (Richard *et al.* 2005, Rønhede *et al.* 2004), hat Jasmonsäure durch Stimulierung der Proteinaseinhibitoren einen indirekten Einfluss auf die Degradationsfähigkeit des symbiotischen Pilzes für pflanzliches Material. Durch die nachgewiesene fungizide Wirkung auf den symbiotischen Pilz ist nun ebenfalls ein direkter Beitrag von Jasmonsäure zur Verteidigung gegen BSA-Fraß denkbar, indem Jasmonsäure die Verdaulichkeit des Blattmaterials durch den symbiotischen Pilz negativ beeinflusst. Für Caryophyllen liegen als einziges Daten zur Inhibition des Wachstums des Pilzes der BSA vor. Howard *et al.* (1988b) stellten ein geschätztes verringertes Wachstum von 50 % bei einer Konzentration von 140 µg Caryophyllen pro ml Medium fest. Die inhibitorische Wirkung wurde in meinen Assays durch nichtsignifikantes verringertes Wachstum um etwa 20 % bei 10 µg und 100 µg und einem signifikant geringerem Wachstum um 30 % im Vergleich zur Kontrolle bestätigt.

Um die Relevanz der Wirkung der verwendeten HIPVs auf das Wachstum des symbiotischen Pilzes bewerten zu können, ist ein Vergleich der verwendeten Konzentrationen mit den natürlich vorkommenden Konzentrationen in Blättern nötig.

Hierbei nehme ich an, dass die eingetragenen Blattstücke wahrscheinlich auch nach dem Transport in den Pilzgarten weiterhin HIPVs emittieren, was eine Konfrontation des Pilzes nicht nur mit den HIPVs innerhalb der Blätter, sondern ebenfalls mit den emittierten HIPVs mit sich bringt. Untersuchungen zur Emission geschnittener Blattstücke wurden allerdings noch nicht gemacht, weshalb nur die Konzentration in den Blättern näher betrachtet wird. Es ist bekannt, dass Sekundärmetabolite familien-, gattungs- und artspezifisch sind (Fraenkel 1959). Auch die Konzentration in den Blättern hängt von der einzelnen Art ab. So beträgt die Konzentration von Caryophyllen in der in Südamerika beheimateten *Hymenaea courbaril* zum Beispiel 3000 µg pro g Frischgewicht (Howard *et al.* 1988b). In den ebenfalls in Südamerika vorhandenen Pflanzen *Viola gardneri* (952 µg pro g Frischgewicht), *Tovomita mangle* (2698 µg pro g Frischgewicht) und *Thyrsodium spruceanum* (77 µg pro Frischgewicht) wurden andere Konzentrationen festgestellt (Urbas 2004). In *V. gardneri* konnte ebenfalls die Konzentration von etwa 10 µg Ocimen pro g Frischgewicht festgestellt werden (Urbas 2004). In der südamerikanischen *Astronium graveolens* wurde für Ocimen dagegen ein Wert von 120 µg pro g Frischgewicht gefunden (Chen *et al.* 1984). Weitere Angaben über absolute Konzentrationen der verwendeten HIPVs in Blattmaterial sind nicht bekannt. Barnola *et al.* (1994) fanden ein Verhältnis von Caryophyllen zu Ocimen zu Linalool von etwa 59 zu 3 zu 1 in *Pinus caribaea*. Diese Beispiele zeigen die große intra- und interspezifische Variabilität verschiedener HIPVs in Pflanzen. Auch wenn die Konzentrationen einzelner Stoffe sehr unterschiedlich sein können und Menge pro Frischgewicht sicher nicht gleichzusetzen ist mit Menge pro Agar, befinden sich alle von mir experimentell eingesetzten Konzentrationen in dem gefundenen Bereich zwischen 10 und 3000 µg. Ich gehe deshalb davon aus, dass die verwendeten Konzentrationen im Bereich natürlich vorkommender Konzentration in Blättern entsprechen.

Um den tatsächlichen Einfluss der verwendeten HIPVs auf das Wachstum des symbiotischen Pilzes in seiner natürlichen Umgebung bewerten zu können, ist ein Vergleich des Wachstums im Pilzgarten mit dem Wachstum in den Kulturen nötig. Die BSA sorgen durch Techniken wie zum Beispiel gezielte Verteilung der frischen Blätter über den Pilzgarten (Forti *et al.* 1989) oder mechanisches und chemisches Entfernen von Fremdorganismen (Currie und Stuart 2001) für ein kontinuierliches Wachstum ihres Symbionten. Außerdem findet eine Applikation von fäkalen Tropfen auf das frische Blattmaterial statt, bevor dieses in den Pilzgarten eingearbeitet wird

(Weber 1972). Diese Sekrete enthalten Proteine des Pilzes, welche von den BSA aufgenommen und unverdaut wieder abgegeben werden (Boyd *et al.* 1975, Martin *et al.* 1975, Rønhede *et al.* 2004). Außerdem wurden in ihnen Enzyme gefunden, wobei unklar ist, ob diese von den BSA, ihrem symbiotischen Pilz oder anderen Mikroorganismen stammen (Richard *et al.* 2005, D’Ettorre *et al.* 2002, Martin *et al.* 1975, Rønhede *et al.* 2004). Da der Einfluss des Ameisenpartners in meinen Wachstumsassays naturgemäß fehlt, bleibt ungeklärt ob/wie Verhaltensweisen der Ameisen die beobachtete fungizide Wirkung der HIPVs in einem Pilzgarten beeinflussen. Es wurde außerdem beobachtet, dass der Pilz in unterschiedlichen Kulturmedien unterschiedliche Enzyme produziert (Siqueira *et al.* 1998, Silva *et al.* 2006a/b). Die entstandenen ringförmigen Veränderungen im Agar in der Peripherie der bewachsenen Fläche der Agarkulturen sprechen für metabolische Vorgänge über welche aus Mangel an bisherigen Erkenntnissen allerdings keine konkreten Aussagen gemacht werden können. Ein Einfluss des Mediums auf die Fähigkeit des Pilzes auf die HIPVs zu reagieren (etwa ihre fungizide Wirkung abzuschwächen oder sie zu detoxifizieren) kann jedenfalls nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund dieser Zusammenhänge und der sub-optimalen Wachstumsbedingungen in Agar-Wachstumsassays, schätze ich es als durchaus realistisch ein, dass die fungizide Wirkung von HIPVs in einem Pilzgarten nicht so stark hervortritt wie in vorliegenden Experimenten.

Selbst unter Berücksichtigung der möglicherweise eingeschränkten Rückschlüsse über tatsächliche Vorgänge im Pilzgarten, deuten meine Ergebnisse eindeutig darauf hin, dass die gefundenen fungiziden Eigenschaften der HIPVs von höchster Relevanz sind für das Wachstum dieses Pilzes in seiner natürlichen Umgebung.

4.3. Auswirkung der Ergebnisse auf das Verständnis der Futtersuchökologie von Blattschneiderameisen

BSA wurden aufgrund ihres Einflusses auf ihre Umgebung von Wirth *et al.* (2003) und Meyer (2008) als Ökosystemingenieure bezeichnet. Eine *Atta*-Kolonie kann bis zu 243 kg pflanzlicher Biomasse pro Jahr in ihr Nest transportieren (Wirth *et al.*

2003). Dieses vorwiegend aus Blättern bestehende Pflanzenmaterial wird aus der Umgebung des Nestes foragiert. Für verschiedene Faktoren wie Wasser-, Aminosäure- und Kohlenhydratgehalt der Blätter (Meyer *et al.* 2006), Blatthärte (Nichols-Orians *et al.* 1989) oder Ernährungsstatus der Kolonie (Littledyke und Cherrett 1975) wurde ein Einfluss auf die Wahl der Futterquelle gezeigt. Wie erst kürzlich im Rahmen von Diplomarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt, und für andere Herbivoren seit längerem dokumentiert (Dicke 1986, Dicke und van Loon 2000, Horiuchi *et al.* 2003a/b), scheinen hierbei auch HIPVs eine Rolle zu spielen, da Limabohnenpflanzen mit hoher HIPV-Emission abgelehnt wurden (Aigner 2007, Tremmel 2008). Das Ziel dieser Arbeit war den kausalen Zusammenhang zwischen der Ablehnung der Limabohne durch die BSA und ihrer hohen HIPV-Emission nach Herbivorie zu finden. Sollten sich die hier erzielten Ergebnisse durch weitere Untersuchungen bestätigen und die Arbeiterinnen, ohne gleichzeitigen Eintrag von Biomasse und somit unbeeinflusst von ihrem symbiotischen Pilz, nicht auf HIPVs reagieren, kann die von Tremmel (2008) beschriebene Korrelation zwischen steigender HIPV-Emission und zunehmen der Repellenz von induzierten Pflanzen allein auf die fungiziden Eigenschaften der HIPV zurückgeführt werden. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Pflanzen als die Limabohne, sowie das Vorhandensein dieses Mechanismus nicht nur im Labor, sondern auch im Freiland, muss allerdings noch ausführlich überprüft werden. Ließe sich der Mechanismus für andere Arten bestätigen, wäre ein entscheidender Faktor in der Nahrungspflanzenwahl von BSA identifiziert, welcher das bisher ungeklärte zeitlich-räumliche Futtersuchmuster der BSA besser erklären könnte. Der Wechsel der aktuellen Nahrungsquelle während des Foragierens könnte somit keine Reaktion von BSA-Individuen auf eine repellente Konzentration von HIPVs sein (Aigner *et al.* 2010, eingereicht), sondern eine zeitlich verzögerte Reaktion des Pilzes auf zu hohe Konzentrationen fungizid wirksamer Substanzen.

Zu den bisher nicht verstandenen Beobachtungen der Futtersuche von BSA gehören solche, die nicht in Übereinstimmung mit der Theorie des optimalen Nahrungserwerbs (Pyke *et al.* 1977) stehen. Dazu gehören beispielsweise das fleckenhafte Foragieren innerhalb eines Baumes (Cherrett 1968, Fowler und Stiles 1980), sowie das präferierte Schneiden weiter von der Kolonie entfernter Bäume bei gleichzeitiger Diskriminierung weniger entfernter artgleicher Bäumen mit scheinbar gleicher Ressourcenqualität (Cherrett 1983; Rockwood und Hubbell 1987). Für

dieses Futtersuchverhalten wurden drei Erklärungstheorien vorgelegt: Nach der *resource conservation hypothesis* (Cherrett 1982) limitieren die BSA den Schaden an nahe gelegenen oder besonders attraktiven Futterpflanzen um diese Ressource über die Lebensspanne der Kolonie zu erhalten. Ein Vorschlag zum zugrundeliegenden Mechanismus zur Untermauerung dieser Theorie wurde allerdings noch nicht formuliert. Die *nutrient balance hypothesis* (Howard 1991), welche eine ungleiche Verteilung der geeigneten Nährstoffe für den Pilz innerhalb der Baumkronen voraussetzt, erklärt das fleckenhafte Foragieren mit einer Optimierung der Versorgung des symbiotischen Pilzes mit Nährstoffen (Fowler und Stiles 1980; Rockwood und Hubbell 1987). Bisher liegen allerdings keine stichhaltigen Belege für eine Übereinstimmung der ungleichen Verteilung der Nährstoffe mit dem Muster des Foragierens vor. Die *induced-defence hypothesis* (Aigner 2010, eingereicht) erklärt das fleckenhafte Foragieren mit einer Induktion der Pflanzenabwehr durch die Herbivorie der BSA, welche an den betroffenen Stellen ein zeitlich und räumlich dynamisches Mosaik aus induzierter, wenig induzierter und nicht induzierter Pflanzenabwehr in ganzen Pflanzen und Pflanzenbereichen entstehen lässt, aus dem die BSA auswählen (Aigner *et al.* 2010, eingereicht). Sie vermeiden dabei induzierte Pflanzen und Pflanzenbereiche deren Abwehr induziert wurde, wobei die Induktion durch die Emission von HIPVs von den BSA registriert werden könnte (Aigner 2007, Tremmel 2008). Da die BSA in einer Symbiose leben und optimale Versorgung des symbiotischen Pilzes zur individuellen Fitness der Kolonie beiträgt (Cherrett 1982), wurde auch über den Einfluss des Pilzes bei der Futtersuche spekuliert (Hubbell *et al.* 1983b). In Laborversuchen wie auch im Freiland wurden von den BSA Nahrungsquellen mit fungizider Wirkung für den Pilz assoziiert und gemieden (North *et al.* 1999, Ridley *et al.* 1996, Rahbe *et al.* 1988, Knapp *et al.* 1990). Dadurch wurde eine Kommunikation des Pilzes und der Ameisen als auch ein Einfluss des Pilzes auf die Futtersuchwahl der BSA-Kolonien gezeigt. Die Vermeidung trat dabei nicht sofort auf, sondern verzögert; sog. verzögerte Ablehnung (*delayed rejection*). Die relativ kurze Verzögerungszeit wurde als Indiz für ein (bisher unbekanntes) chemisches Signal gewertet (North *et al.* 1999).

Das Ziel dieser Arbeit war den kausalen Zusammenhang zwischen Ablehnung von HIPVs-emittierenden induzierten Limabohnenpflanzen durch BSA-Kolonien zu untersuchen. Die hier beobachtete Gleichgültigkeit der Arbeiterinnen gegenüber den HIPVs im Zusammenhang mit der fungiziden Wirkung der HIPVs auf den

symbiotischen Pilz, lassen nur den Mechanismus der verzögerten Ablehnung als Erklärung für die Korrelation der Abnahme der Attraktivität der Limabohnenpflanzen bei Zunahme der HIPV-Emission dieser Pflanzen zu. Ich schlage daher folgende Interaktion zwischen BSA und (Limabohnen-) Pflanzen vor: Die BSA reagieren nur im Koloniekontext auf die HIPVs (nicht jedoch als Individuen wie im ersten Teil der Arbeit gezeigt), indem sie die Abwehr der Pflanzen inklusive HIPV-Emission nach einer gewissen Zeit der Blätternte induzieren und HIPV-enhaltendes und emittierendes Blattmaterial eintragen (Aigner *et al.* 2010, eingereicht). Der Pilz signalisiert daraufhin eine Beeinflussung des Wachstums, wodurch die BSA die HIPVs mit einer fungiziden Wirkung für den Pilz assoziieren. Dies führt zu einer Ablehnung der HIPV-emittierenden Pflanzen und könnte letztendlich in einem Wechsel der aktuellen Nahrungsquelle resultieren. Wie von der *induced-defence hypothesis* vorhergesagt, fungieren die HIPVs dabei als Informationsquelle für die Arbeiterinnen über die Qualität der Nahrungsquelle und sind Grund für das Verlassen des aktuellen Nahrungsplatzes. Die Bewertung der Qualität der Nahrungsquelle wird dabei allerdings von den BSA nicht direkt, sondern indirekt über den Pilz vorgenommen. Die Informationsweitergabe erfolgt hierbei entweder durch eine Registrierung einer Veränderung im Wachstum oder durch ein biochemisches Signal des symbiotischen Pilzes.

Wie in Kapitel 4.2. diskutiert, haben die natürlich vorkommenden Konzentrationen der HIPVs in den Blättern einen Einfluss auf das Wachstum des symbiotischen Pilzes. Sekundäre Pflanzenstoffe haben oft fungizide Eigenschaften (Rosenthal und Berenbaum 1991). Ob alleine die HIPVs durch ihre fungizide Wirkung für eine Ablehnung der induzierten Pflanzen verantwortlich sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Ebenso könnten die HIPVs für die Arbeiterinnen nur als Signal für eine induzierte Pflanze fungieren, welche durch Induktion auch andere fungizide Blatinhaltsstoffe synthetisiert oder deren Synthese steigert. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Menge an cyanogenen Verbindungen, welche aufgrund ihrer toxischen Wirkung auf Herbivoren ein Teil der direkten chemischen Abwehr der Limabohnen darstellen und in den Pflanzenzellen vorliegen (Jones 1962, Ballhorn *et al.* 2007), ebenfalls durch Induktion durch Herbivorie ansteigen kann (Ballhorn *et al.* 2006). Die Abgabe cyanogener Verbindungen ist allerdings abhängig vom Zellschaden, weshalb dieser Abwehrmechanismus hauptsächlich gegen kauende Herbivoren (Cork 1996; Ballhorn *et al.* 2005) und weniger gegen saugende Insekten

wirksam ist (Schreiner *et al.* 1984). BSA zählen nicht zu den kauenden oder saugenden Insekten, sondern ihr Modus der Blattflächenentfernung entspricht eher einem Scherenschnitt wodurch z. B. die Induktion der HIPVs erst relativ spät stattfindet (Aigner 2007). Über einen Einfluss von BSA-Herbivorie auf die Abgabe cyanogener Verbindungen kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden und ob diese Verbindungen überhaupt durch den Modus der Blattflächenentfernung der BSA hervorgerufen werden und eine Rolle in der Nahrungspflanzenwahl der BSA spielen ist noch unklar. Zwar ist die Wirkung dieser Verbindungen auf den symbiotischen Pilz ebenfalls nicht bekannt, diese Beispiel zeigt allerdings, dass Herbivorie Veränderungen in der Blattchemie induziert und die beobachtete Vermeidung der HIPV-emittierenden Versuchspflanzen (Aigner 2007, Tremmel 2008) nicht unbedingt alleine auf die fungiziden Eigenschaften der HIPVs, sondern eventuell auch auf andere unbekannte induziert fungizide Stoffe zurückgeführt werden kann.

Um das fleckenhafte Futtersuchverhalten der BSA mit dem Induzieren der Pflanzenabwehr und dem Mechanismus der verzögerten Ablehnung erklären zu können, müsste der Zeitpunkt des Verlassens der Nahrungsquelle mit der Zeit bis zum Eintreten einer verzögerten Ablehnung übereinstimmen. Das Verlassen eines Baumes durch die BSA geschieht je nach Attraktivität des Blattmaterials innerhalb von 1 bis etwa 15 Tagen. Der größte Teil der einzelnen Bäume wird dabei innerhalb der ersten fünf Tage wieder verlassen und ein foragieren an ihnen findet nicht mehr, oder erst nach einem längeren Zeitraum wieder statt (Kost 2001). In den Untersuchungen von Tremmel (2008) konnte die Kinetik der durch BSA induzierten HIPV-Emission bei Limabohnen beschrieben werden. In den ersten 24 h blieb eine Induktion völlig aus, danach trat eine langsame Induktion der Pflanzenabwehr auf. Die zunehmende Ablehnung der induzierten Pflanze ab dem 3ten Tag steigerte sich bis zu einer ca. 80-prozentige Ablehnung am 4ten Tag. In Laborversuchen wurde das Eintreten einer verzögerten Ablehnung nach 10 (Herz *et al.* 2008) und im Freiland nach 24 Stunden beobachtet (Saverschek *et al.* 2010). Das Verlassen eines Baumes könnte also plausibel mit dem induzieren der Abwehr und einer folgenden verzögerten Ablehnung erklärt werden. Obwohl bei diesem Vorgang sicher noch andere Faktoren eine Rolle spielen, widerspricht der zeitliche Rahmen des ganzen Vorgangs prinzipiell nicht der Dauer bis zum Verlassen eines Futterplatzes. Weitere Untersuchungen in Richtung dieser zeitlichen Dynamik könnten einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Futtersuchökologie der BSA leisten.

Faktoren die hierbei allerdings beachtet werden müssen und noch wenig erforscht sind, ist beispielsweise die Notwendigkeit viele Arbeiterinnen in möglichst kurzer Zeit über die Qualität eines bestimmten Nahrungsplatzes zu informieren. Die Kommunikation zwischen Pilz und Arbeiterinnen wurden schon nachgewiesen (North *et al.* 1999) und eine homogene Verteilung des Blattmaterials im Pilzgarten innerhalb von 24 bis 48 Stunden (Forti *et al.* 1989, Pretto *et al.* 2000; Moreira *et al.* 2003) macht eine schnelle Informationsweitergabe an viele Arbeiterinnen möglich. Der konkrete Ablauf dieses Mechanismus, angefangen bei der Induktion der Pflanzenabwehr über die Entscheidungen einzelner Arbeiterin und letztendlicher Beeinflussung des Futtersuchverhalten einer Kolonie bedarf sicherlich noch intensiver Forschung. Sollten sich der vorgeschlagene Mechanismus allerdings in weiteren Untersuchungen bestätigen, hätte dies eine große Tragweite für das Verständnis der Futtersuchökologie der BSA-Kolonien und würde einen weiteren Beitrag zum Wissen über die mutualistische Beziehung zwischen beiden Partnern leisten.

Neben dem Einfluss der Ergebnisse auf die Futtersuchökologie wird auch die Sicht auf das symbiotische Verhältnis beider Partner erweitert. Da die Ameisen in dieser Symbiose durch Verhaltensweisen wie physikalisches Manipulieren des Pilzes im Pilzgarten eine leicht erkennbar aktive Rolle spielen, führten anfängliche anthropozentrische Analogien zur Agrarwirtschaft des Menschen, zu der Einschätzung, dass der Pilz von den Ameisen domestiziert wurde (Batra und Batra 1967, Mueller *et al.* 1998). Andererseits ist von vielen Mikroorganismen bekannt, dass sie differenzierte Mechanismen zur Manipulation ihrer symbiotischen tierischen Partner evolviert haben (Ewald 1994). Auch für symbiotische Beziehungen mit Pilzen und Ameisen wurden Mechanismen gefunden, welche das Verhalten der Ameisen beeinflussen (Marikovsky 1962, Oi und Pereira 1993, Schmid-Hempel 1998). Die beschriebene verzögerte Ablehnung ist ein Beispiel der Einflussnahme des symbiotischen Pilzes auf das Verhalten der Arbeiterinnen. Der hier vorgeschlagene Mechanismus für die Reaktion von BSA-Kolonien auf HIPVs trägt zu einem umfassenderen Verständnis des komplexen mutualistischen Zusammenspiels beider Partner bei.

4.4. Fazit

Wie ich zeigen konnte führt die Konfrontation von *A. colombica*-Arbeiterinnen mit HIPVs der Limabohne zu keiner Ablehnung in olfaktometrischen Wahlexperimenten. Andererseits reagieren BSA-Kolonien ablehnend auf HIPVs der Limabohne, wenn gleichzeitig ihr symbiotischer Pilz mit diesen HIPVs konfrontiert wird (Aigner 2007, Tremmel 2008). Meine Ergebnisse zur inhibitorischen Wirkung der HIPVs gegenüber dem symbiotischen Pilz können eine Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch liefern, denn es ist bekannt, dass die Arbeiterinnen fungizide Stoffe mit einer Schädigung des Pilzes assoziieren und diese dann während der Futtersuche vermeiden. Dieser Zusammenhang könnte ebenfalls für die HIPVs gelten. Somit kann die vorliegende Studie als Unterstützung der *induced-defence hypothesis* gelten, da sie einen Mechanismus zur Erklärung dieser Theorie liefert. So kann die Induktion pflanzlicher Abwehr etwa als Grund für das fleckenhafte Foragieren der BSA dienen, indem durch das Schneiden die lokale Emission von HIPVs induziert wird. Über die hier dokumentierte Pilzschädigung/-inhibition und die bekannte Möglichkeit, dass Arbeiterinnen diese Schädigung mit den HIPV-Quellen assoziieren, ist letztendlich ein Verlassen/Wechseln des aktuellen Futterplatzes erklärbar.

5. Literaturverzeichnis

Aigner J. (2007): Effekte fraßinduzierter Pflanzenvolatile auf das Ernteverhalten von Blattschneiderameisen; Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern

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

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., Kost C., Boland W. (2005): Herbivory-induced, indirect plant defences; *Biochimica et Biophysica Acta* 1734: 91-111

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): 911–923

Bailey I.W. (1922): The anatomy of certain plants from the Belgian Congo with special reference to myrmecophytes; *Bulletin American Museum of Natural History* Vol. XLV

Ballhorn D. J., Lieberei R., Ganzhorn J. U. (2005): Plant cyanogenesis of *Phaseolus lunatus* and its relevance for herbivore–plant interaction: the importance of quantitative data; *Journal of Chemical Ecology* 31, 1445–1473

Ballhorn D.J., 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. J., Heil M., Pietrowski A., Lieberei R. (2007): Quantitative effects of cyanogenesis on an adapted herbivore; *Journal of Chemical Ecology* 33, 2195–2208

Baldwin I.T., Halitschke R., Paschold A., von Dahl C.C., Preston C.A. (2006): Volatile Signalling in Plant-Plant Interactions: “Talking Trees“ in the Genomic Era; *Science* 311: 812-815

Barnola L.F.; Hasegawa M., Cedeno A. (1994): Mono- and sesquiterpene variation in *Pinus caribaea* needles and its relationship to *Atta laevigata* herbivory. *Biochemical Systematics and Ecology* 22:437–445

Literaturverzeichnis

- Barrer P. M., Cherrett J. M. (1972): Some factors affecting the site and pattern of leaf-cutting activity in the ant *Atta cephalotes* (L.); *Journal of Entomology* 47: 15-27
- Bass M., Cherrett J.M. (1996): Leaf-cutting ants (Formicidae, Attini) prune their fungus to increase and direct its productivity; *Functional Ecology* 10: 55–61
- Batista-Pereira L.G., Fernandes J.B., da Silva M.F.G.F., Vieira P.C., Bueno O.C., Correa A.G. (2006): Electrophysiological responses of *Atta sexdens rubropilosa* workers to essential oils of eucalyptus and its chemical composition. *Zeitschrift für Naturforschung Section C Journal of Biosciences* 61: 749-55
- Batra S. W. T., Batra L. R. (1967): The fungus gardens of insects; *Scientific American* 217:112–120
- Belt T. (1874): *The naturalist in Nicaragua*. J. Murray; London
- Beattie A. J., Turnbull C., Hough T., Jobson S., Knox R. B. (1985): The vulnerability of pollen and fungal spores to ant secretions: Evidence and some evolutionary implications; *American Journal of Botany* 72(4):606–614
- Bergelson J., Purington C.B. (1996): Surveying patterns in the cost of resistance in plants; *The American Naturalist* 148: 536–558
- Bigger D.S., Marvier M.A. (1998): How different would a world without herbivory be? A search for generality in ecology; *Integrative Biology* 1:60–67
- Boland W., Hopke J., Donath J., Nüske J., Bubitz F. (1995): Jasmonic acid and Coronatin induce Odor Production in Plants; *Angewandte Chemie International Edition Engl.* 34, Nr. 15
- Bollazzi M., Roces F. (2002): Thermal preference for fungus culturing and brood location by workers of the thatching grass-cutting ant *Acromyrmex heyeri*; *Insectes Sociaux* 49: 153-157
- Bonavita-Cougourdan A., Clément J. L., Lange C. (1987): Nestmate recognition: cuticular hydrocarbons and colony odor in the ant *Camponotus vagus* Scop; *Journal of Entomological Science* 22: 1–10
- Bot A.N.M., Ortius-Lechner D., Finster K., Maile R., Boomsma J.J. (2002): Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants; *Insectes sociaux* 4: 363–370

Literaturverzeichnis

Boucher DH (1988): The biology of mutualism: ecology and evolution. Oxford University Press, New York

Boyd N.D., Martin M.M. (1975): Faecal proteinases of the fungus-growing ant, *Atta texana*: properties, significance and possible origin. *Insect Biochemistry* 5: 619–635

Bruna E. M., Darrigo M. R., Pacheco A.M. F., Vasconcelos H.L.(2008): Interspecific variation in the defensive responses of ant mutualists to plant volatiles; *Biological Journal of the Linnean Society* 94, 241–249

Cardoza Y.J., Alborn H.T., Tumlinson J.H. (2002): In Vivo Volatile Emissions From Peanut Plants Induced By Simultaneous Fungal Infection and Insect Damage; *Journal of Chemical Ecology* 28:161–174

Cazin J.Jr., Wiemer D.F., Howard J.J. (1989): Isolation, Growth Characteristics, and Long-Term Storage of Fungi; Cultivated by attine Ants; *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1346-1350

Chapela I.H., Rehner S.A., Schultz T.R., Mueller U.G. (1994): Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi; *Science* 266:1691–1697

Chen T.K., Wiemer D.F., Howard J.J. (1984): A Volatile Leafcutter Ant Repellent from *Astronium graveolens*; *Naturwissenschaften* 71: 97-98

Cherrett J.M. (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. M., Seaforth C. E. (1970): Phytochemical arrestants for the leafcutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich), with some notes on the ants' response; *Bulletin of Entomological Research* 59: 615-626

Cherrett J. M. (1972a): Chemical aspects of plant attack by leaf-cutting ants; *Phytochemical Ecology* (Ed. by J.B. Harbourn), Academic Press, London

Cherrett J.M. (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*, pp. 114-118. Westview Press, Boulder, Colorado

Cherrett J. M. (1983): Resource conservation by the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* in tropical rain forest; *Ecology and Management (Special Publication)*, 2, 253-263.

Literaturverzeichnis

- Cherrett J.M., Powell R.J., Stradling D.J. (1989): The mutualism between leaf-cutting ants and their fungus, pp.93-120. In N. Wilding, N.M. Collins, P.M. Hammond & J.F. Weber (eds.), *Insect-fungus interactions*. Academic Press, San Diego, 146p
- Coley P.D., Bryant J.P., Chapin F.S. (1985): Resource Availability and Plant Antiherbivory Defense; *Science* 230: 895-899
- Coley P.D. (1988): Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense; *Oecologia* 74: 531-536
- Coley P. D., Barone J. A. (1996): Herbivory and plant defenses in tropical forests; *Annual Review of Ecology and Systematics* 27, 305-335.
- Correa M.M., Silva P.S.D., Wirth R., Marcelo T., Leal I.R. (2010): How leaf-cutting ants impact forests: drastic nest effects on light environment and plant assemblages, *Oecologia* 1: 103-115
- Cork S.J. (1996): Optimal digestive strategies for arboreal herbivorous mammals in contrasting forest types: why Koalas and Colobines are different; *Australian Journal of Ecology* 21: 10–20
- Cornell H. V., Hawkins B. A. (2003): Herbivore responses to plant secondary compounds: a test of phytochemical coevolution theory; *The American Naturalist* 161, 507-522
- Crawley M.J. (1983): *Herbivory the dynamics of animal plant interactions*; Blackwell Science, Oxford
- Creelman R.A., Mullet J.E. (1997): Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plants; *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 355-381
- Currie C.R., Mueller U.G., Malloch D. (1999): The agriculture pathology of ant fungus gardens; *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 7998-8002
- Currie C.R. (2001a): Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism; *Oecologia* 128: 99-106
- Currie C.R. (2001b): A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis; *Annual Review of Microbiology* 55: 357-80
- Currie C.R., Stuart A.E. (2001): Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proceedings of the Royal Society London*; 268: 1033-1039

Literaturverzeichnis

Dáttillo W.F., Izzo T.J., Inouye B.D., Vasconcelos H.L., Bruna E.M. (2009): Recognition of Host Plant Volatiles by *Pheidole minutula* Mayr (Myrmicinae), an Amazonian Ant-Plant Specialist. *Biotropica* 41: 642-646

De Boer J.G., Posthumus M.A., 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

Degenhardt D.C., Lincoln D.E. (2006): Volatile Emissions from an Odorous Plant in Response to Herbivory and Methyl Jasmonate Exposure; *Journal of Chemical Ecology* 32: 725-743

D'Ettorre P., Mora P., Dibangou V., Rouland C. (2002): The role of the symbiotic fungus in the digestive metabolism of two species of fungus-growing ants; *Journal of Comparative Physiology* 172 B: 169–176

Dicke M., Van Loon J.J.A. (2000): Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context; *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 97: 237-249

Dicke M., Groeneveld A. (1986): Hierarchical structure in kairomone preference on the predatory mite *Amblyseius potentillae*: Dietary component indispensable for diapause induction affects prey location behaviour. *Ecological Entomology*, 11: 131-138

Dicke M., Gols R., Ludeking D., Posthumus M.A. (1999): Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants; *Journal of Chemical Ecology* 25: 1907-1922

Do Nascimento R. R., Schoeters E., Morgan D. E., Billen J., Stradling D. (1996): Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants; *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes* and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae); *Journal of Chemical Ecology* 22:987–1000

Douglas AE (1995): The ecology of symbiotic microorganisms; *Advances in Ecological Research* 26:69–103

Dowd P. F. (1992): Insect fungal symbionts: A promising source of detoxifying enzymes; *Journal of Industrial Microbiology* 9:149–161

Dupuy, F., Sandoz, J.-C., Giurfa, M. & Josens, R. 2006. Individual olfactory learning in *Camponotus* ants. *Animal Behaviour*, 72, 1081–1091

Edwards D. P., Hassall M., Sutherland W.J., Yu D. W. (2006): Assembling a mutualism: Ant symbionts locate their host plants by detecting volatile chemicals. *Insectes Sociaux* 53: 172–176

Literaturverzeichnis

Eigenbrode S.D., Espelie K.E. (1996). Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores. *Annual Review of Entomology* 40: 171-194

Erthal M. Jr., Silva C. P., Cooper R.M., Samuels R.I. (2009): Hydrolytic enzymes of leaf-cutting ant fungi; *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 152: 54–59

Ewald P. W. (1987): Transmission modes and evolution of the parasite-mutualism continuum; *Annals of the New York Academy of Sciences* 503:295–306

Ewald P. W. (1994): *The evolution of infectious disease*. Oxford University Press, Oxford

Farmer E.E., Ryan C.A. (1990): Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves; *Proceedings of the National Academy of Science* 87: 7713–7716

Fernandes G.W. (1994): Plant mechanical defenses against insect herbivory; *Revista Brasileira de Entomologia*; 38:421–433

Forti L. C., Silveira Neto S. (1989): Distribuição de substrato em colônia de *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera, Formicidae); *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil* 18, 347–356

Fowler H.G., Pagani M.I., da Silva O.A., Forti L.C., da Silva V.P., de Vasconcelos H.L. (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

Fowler H. G., Stiles E. W. (1980): Conservative resource management by leaf-cutting ants? The role of foraging territories and trails, and environmental patchiness; *Sociobiology* 5:25-41

Fraenkel G.S. (1959): Raison d'être of secondary plant substances; *Science* 129: 1466–1470

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

Guevara R., Rayner A.D.M., Reynolds S.E. (2000): Orientation of specialist and generalist fungivorous ciid beetles to host and non-host odours; *Physiological Entomology* 25: 288-295

Gutiérrez Salgado, A., Gepts, P., Debouck, D.G. (1995): Evidence for two gene pools of the Lima bean, *Phaseolus lunatus* L., in the Americas. *Genetic Resources and Crop Evolution* 42: 15–28

Literaturverzeichnis

Hagerman A.E. (2002): Tannin Handbook; Oxford.
(<http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>)

Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. (2003): Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil; *Journal of Applied Microbiology* 95: 853-860

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*; *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:4742–4746

Hedlund K., Bengtsson G., Rundgren S. (1995): Fungal odour discrimination in two sympatric species of fungivorous collembolans; *Functional Ecology* 9: 869-875

Heil M., Bostock R. M. (2002): Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences; *Annals of Botany* 89,503–512

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. (2004b): Induction of two indirect defences benefits lima bean in nature; *Journal of Ecology* 92: 527-536

Heil M. (2007): Indirect Defence – Recent Developments and Open Questions; *Progress in Botany*, 15: 360-382

Helmy O., Jander R. (2002): Topochemical learning in black carpenter ants (*Camponotus pennsylvanicus*) *Insectes Sociaux* 50: 32–37

Herms D. A., Mattson W. J. (1992): The dilemma of plants: to grow or defend; *Quarterly Review of Biology* 67, 283–335

Herz H. (2001): Blattschneiderameisen im tropischen Regenwald: Freilanduntersuchungen zur Populationsdynamik sowie zu trophischen und nichttrophischen Effekten von *Atta colombica* in Panama; Dissertation, Universität Bielefeld

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* 19: 575–582

Hölldobler B., Wilson E.O. (1990): *The Ants*; Springer Verlag Berlin Heidelberg London Paris Tokyo Hong Kong

Literaturverzeichnis

- Horiuchi J., Arimura G., Ozawa R., Shimoda T., Dicke M., Takabayashi J., Nishioka T. (2003a): Lima bean leaves exposed to herbivore-induced conspecific plant volatiles attract herbivores in addition to carnivores; *Applied Entomology and Zoology* 38(3): 365-368
- Horiuchi J., Arimura G., Ozawa R., Shi-moda T., Takabayashi J., Nishioka T. (2003b): A comparison of the responses of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) to volatiles emitted from Lima bean leaves with different levels of damage made by *T. urticae* or *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Entomology and Zoology*, 38: 109-116
- Howard J.J. (1988a): Leaf cutting ant diet selection: Relative influence of leaf chemistry and physical features; *Ecology* 69: 250-260
- Howard J.J., Cazin Jr J., Wiemer D.F. (1988b): Toxicity of terpenoid deterrents to the leafcutting ant *Atta cephalotes* and its mutualistic fungus; *Journal of Chemical Ecology* 14(1): 59-69
- Howard J.J., Green T.P., Wiemer D.F. (1989): Comparative deterrence of two Terpenoids to two genera of attine ants; *Journal of Chemical Ecology* 15:2275-2288
- Howard J.J. (1990): Infidelity of leafcutting ants to host plants: resource heterogeneity or defense induction?; *Oecologia* 82: 394-401
- Howard J.J. (1991): Resource quality and cost in the foraging of leaf-cutter ants; *Ant-plant Interactions*, C. R. Huxley and D. F. Cutler, eds. Oxford University Press, Oxford, pp 42-50
- Howard J. J. (2001): Cost of trail construction and maintenance in the leaf-cutting ant *Atta colombica*; *Behavioural Ecology and Sociobiology*, 49, 348-356
- Hubbell S. P., Wiemer D. F., Adejare A. (1983): An anti-fungal terpenoid defends a neotropical tree (Hymenaea) against attack by fungus-growing ants (*Atta*); *Oecologia* 60: 321-327
- Hughes RN (2008): An intra-species demonstration of the independence of distance and time in turn alternation in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*; *Behavioural Processes* 78:38-43
- Hulme P.E. (1996): Herbivory plant regeneration, and species coexistence; *Journal of Ecology* 84:609-615
- Huntly N. (1991): Herbivores and the dynamics of communities and ecosystems; *Annual Review of Ecology and Systematics* 22:477-503

Literaturverzeichnis

- Jaffe K., Howse P.E. (1979): The mass recruitment system of the leaf cutting ant, *Atta cephalotes* (L). *Animal Behaviour* 27:930–939
- Jander G., Cui J.P., Nhan B., Pierce N.E., Ausubel F.M. (2001): The *TASTY* locus on chromosome 1 of *Arabidopsis* affects feeding of the insect herbivore *Trichoplusia ni*. *Plant Physiology* 126: 890–898
- Jolivet P. (1996): *Ants and Plants-an Example of Coevolution*; Backhuys Publishers Leiden
- Jones D. A. (1962): Selective eating of the acyanogenic form of the plant *Lotus corniculatus* by various animals; *Nature* 193: 1109–1110
- Jones G.R., Oldham N.L. (1999): Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques; *Journal of Chromatography A* 843: 199–236
- Josens R., Eschbach C., Giurfa M. (2009): Differential conditioning and long-term olfactory memory in individual *Camponotus fellah* ants; *Journal of Experimental Biology* 212: 1904–1911
- Karban R., Baldwin I.T. (1997): *Induced Responses to Herbivory*; The University of Chicago Press, Chicago
- Kessler A., Baldwin I. T. (2001): Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature; *Science* 291: 2141-2144
- Kleineidam C., Ernst R., Roces F. (2001): Wind-induced ventilation of the giant nests of the leaf-cutting ant *Atta vollenweideri*; *Naturwissenschaften* 88: 301-305
- Kleineidam C. J., Obermayer M., Halbach W., Rossler W. (2005): A macroglomerulus in the antennal lobe of leaf-cutting ant workers and its possible functional significance; *Chemical Senses* 30: 383-392
- Kleineidam C. (1999): *Sensory Ecology of Carbon Dioxide Perception in Leaf-cutting Ants*; Dissertation Universität Würzburg, Fakultät für Biologie
- Knapp J. J., Howse P. E., Kermarrec A. (1990). Factors controlling foraging patterns in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich). In: *Applied Myrmecology: a World Perspective* (Ed. by R. K. Vander Meer & K. Jaffe), pp. 382–409. Boulder, Colorado: Westview Press.
- Koch T. (2001): *Analytik pflanzlicher Signalstoffe: Phytohormone und Abwehr*. Dissertation, Bioorganic Chemistry, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Jena

Literaturverzeichnis

Kost (2001): Futtersuchstrategien und Diversität des symbiotischen Streptomyceten bei Blattschneiderameisen (Formicidae: Attini); Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern

Kost C., Heil M. (2005a): Increased availability of extrafloral nectar reduces herbivory in Lima beans (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae). *Basic and Applied Ecology* 6: 237-248

Kost C. (2006): Herbivore-induced indirect plant defences of Lima Bean (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae); Dissertation, Friedrich-Schiller Universität Jena

Koricheva J. (2002): Meta-Analysis of sources of variation in fitness costs of plant antiherbivore defences; *Ecology*, 83, 176–190.

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

Kreisel H. (1972): Pilze aus Pilzgärten von *Atta insularis* in Kuba; *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 12: 643-54

Littledyke M., Cherrett J.M. (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

Littledyke M., Cherrett J. M. (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

Littledyke M., Cherrett J.M. (1978): Olfactory Responses of Leaf-Cutting Ants *Atta-Cephalotes* (L) and *Acromyrmex-Octospinosus* (Reich) (Hymenoptera-Formicidae) in *Laboratory Bulletin of Entomological Research* 2: 273-282

Lucas P. W., Turner I.M., Dominy N.J., Yamashita N. (2000). Mechanical defences to herbivory; *Annals of Botany* 86, 913-920

Marikovsky P. I. (1962): On some features of behavior of the ants *Formica rufa* L. infected with fungus disease; *Insectes Sociaux* 9:173–179

Markl H. 1965. Stridulation in leaf-cutting ants. *Science* 149: 1392-1393.

Marquis R.J. (1984): Leaf herbivores decreased fitness of a tropical plant; *Science* 226:537–539

Literaturverzeichnis

- Marikovskiy P. I. (1962): On some features of behavior of the ants *Formica rufa* L. infected with fungus disease; *Insectes Sociaux* 9:173–179
- Martin M.M., Weber N.A. (1969): The Cellulose-Utilizing Capability of the Fungus Cultured by the Attine Ant *Atta colombica* tonsipes; *Annals of the Entomological Society of America* 62: 1386-1387
- Martin M. M. (1970): The biochemical basis of the fungus–attine ant symbiosis; *Science* 169:16–20
- Martin M.M., Boyd N.D., Gieselmann M.J., Silver R.G. (1975): Activity of fecal fluid of a leaf-cutting ant toward plant cell wall polysaccharides; *Journal of Insect Physiology* 21:1887-1892
- Martin M.M. (1979): Biochemical implications of insect mycophagy; *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 54: 1-24
- Maschwitz U., Koob K., Schildknecht H. (1970): Ein Beitrag zur Funktion der Metathorakaldrüse der Ameisen; *Journal of Insect Physiology* 16:387–404
- Matusi K., Kurishita S., Hisamitsu A., Kajiwara T. (2000): A lipid-hydrolyzing activity involved in hexenal formation; *Biochemical Society Transactions* 28: 857-860
- Mendgen K., Wirsig S.G.R., Jux A., Hoffmann J., Boland W. (2006): Volatiles modulate the development of plant pathogenic rust fungi; *Planta* 224:1353–1361
- 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
- Meyer S. (2008): Ecosystem engineering in fragmented forests: Edge-mediated hyper-abundance of leaf-cutting ants and resulting impacts on forest structure, microclimate, and regeneration, Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern
- Mittelstaedt H., Mittelstaedt M.-L. (1973): Mechanismen der Orientierung ohne richtende Außenreize; *Fortschritte der Zoologie* 21: 46-58
- Moreira A. A., Forti L. C., Boaretto M. A. C., Andrade A. P. P., Rossi M. N. (2003): Substrate distribution in fungus chambers in nests of *Atta bisphaerica* Forel, 1908 (Hym., Formicidae); *Journal of Applied Entomology* 127, 96–98
- Mueller U. G., Wcislo W. T. (1998): Nesting biology of the fungus-growing ant *Cyphomyrmex longiscapus* Weber (Attini, Formicidae); *Insectes Sociaux* 45:181–189

Literaturverzeichnis

- Mueller U. G., Schultz T. R., Currie C. R., Adams R. M. M., Malloch D. (2001): The Origin of the Attine Ant-Fungus Mutualism; *The Quarterly Review of Biology* 76(2):169-197
- Nentwig W., Bacher S., Beierkuhnlein C., Brandl R., Grabherr G. (2004): *Ökologie*; Spektrum Akademischer Verlag München
- Nichols-Orians C.M., Schulz J.C. (1989): Leaf Toughness Affects Leaf Harvesting by the Leaf Cutter Ant, *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae); *Biotropica* 21: 80-83
- North R.D., Jackson C.W., Howse P.E. (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
- North R. D., Howse P. E., Jackson C. W. (2000): Agonistic Behavior of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens rubropilosa* Elicited by Caryophyllene; *Journal of Insect Behavior*, 13: 1-13
- O'Donnell P.J., Calvert C., Atzorn R., Wasternack C., Leyser H.M.O., Bowles D.J. (1996): Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants; *Science* 274: 1914-1917
- Oi D. H., Pereira R. M. (1993): Ant behavior and microbial pathogens (Hymenoptera: Formicidae); *Florida Entomologist* 76:63–74
- Orthius-Lechner D., Maile R., Morgan E. D., Boomsma J. J. (2000): Metapleural gland secretion of the leaf-cutter ant *Acromyrmex octospinosus*: new compounds and their functional significance; *Journal of Chemical Ecology* 26: 1667–1683
- Pagnocca F.C., O.A. Silva, M.J. Hebling-Beraldo, O.C.Bueno, J.B. Fernandes, P.C. Vieira (1990) Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants; *Bulletin of Entomological Research* 80: 349-352
- Pattnaik S., Subramanyam V.R., Bapaji M., Kole C.R. (1997): Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils; *Microbios* 89(358): 39-46
- Pretto D. R., Forti L. C. (2000): Dyed baits distribution in nests of *Atta sexdens* L. (Hym., Formicidae); *Journal of Applied Entomology* 124, 37–39
- Pyke G., Pulliam H.R., Charnov G.L. (1977): Optimal foraging: A selective review of theory and tests; *Quarterly Review of Biology* 52: 137-154

Literaturverzeichnis

- Quinlan R.J., Cherret J.M. (1977): The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. *Ecological Entomology* 2: 161-70
- Quinlan R. J., Cherrett J. M. (1978): Aspects of the symbiosis of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* and its food fungus; *Ecological Entomology* 3: 221-230
- Quinlan R.J., Cherrett J.M. (1979): The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L); *Ecological Entomology* 4: 151–160
- Rahbe Y., Febvay G., Kermarrec A. (1988): Foraging activity of the attine ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera, Formicidae) on resistant and susceptible yam varieties; *Bulletin of Entomological Research* 78: 329–337
- Raveret-Richter M.A., Waddington K.D. (1993): Increases and Decreases in Food Quality: Effects of Experience on Honeybee Perception and Behavior. *Animal Behavior* 46: 123-128
- Repp K. (2009): Perzeption von Metapleuraldrüsenlaktone und die Reaktion von Ameisen der Gattungen *Atta colombica* und *Acromyrmex niger* auf diese; Praktikumsprotokoll
- Reymond P., Farmer E.E. (1998): Jasmonates and salicylate as global signals for defense gene expression; *Current Opinion in Plant Biology* 1: 404-411
- Richard F.-J., Mora P., Errard C., Rouland C. (2005): Digestive capacities of leaf-cutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material; *Journal of Comparative Physiology B* 175: 297–303
- Ridley P., Howse P. E., Jackson C. W. (1996): Control of the behaviour of leafcutting ants by their 'symbiotic' fungus; *Experientia* 52: 631–635
- Roces F. (1990): Olfactory conditioning during the recruitment process in a leaf-cutting ant; *Oecologia* 83: 261-261
- Roces F., Nunez J.A. (1993): Information about food quality influences load-size selection in recruited leaf-cutting ants; *Animal Behaviour* 45: 135-143
- Roces F. (1994): Odour learning and decision-making during food collection in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii*; *Insectes Sociaux*
- Roces F., Holldobler B. (1994): Leaf density and a trade-off between load-size selection and recruitment behavior in the ant *Atta cephalotes*; *Oecologia* 97: 1-8

Literaturverzeichnis

- Roces F. (2002): Individual complexity and self-organization in foraging by leaf-cuttings ants; *Biological Bulletin* 202, 306-313
- Rockwood L.L. (1976): Plant selection and foraging patterns in two species of Leaf-cutting ants (*Atta*); *Ecology* 57: 48-61
- Rockwood L.L., Hubbell S.P. (1987): Host-plant selection, diet diversity and optimal foraging in a tropical leafcutting ant; *Oecologia* 74: 55-61
- Rosenthal G.A., Berenbaum M.R. (1991): *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*, Academic Press, New York
- Rønhede S., Boomsma J.J., Rosendahl S. (2004): Fungal enzymes transferred by leafcutting ants in their fungus gardens. *Mycological Research* 108: 101–106
- Sabelis M.W., Van de Baan H. E. (1983): Location of distant spider mite colonies by phytoseiid predators: demonstration of specific kairomones emitted by *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi*; *Experimental and Applied Entomology* 33: 303-314
- 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* ARTICLE IN PRESS
- Schiøtt M., De Fine Licht H.H., Lange L., Boomsma J.J. (2008): Towards a molecular understanding of symbiont function: Identification of a fungal gene for the degradation of xylan in the fungus gardens of leaf-cutting ants; Open Access article (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>)
- Schmidt S. (2009): Lactonperzeption durch Blattschneiderameisen der Gattung *Acromyrmex*; Praktikumsprotokoll
- Schmid-Hempel P. (1998): *Parasites in social insects*; Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Schreiner I., Nafus D., Pimentel D. (1984): Effects of cyanogenesis in bracken fern (*Pteridium aquilinum*) on associated insects; *Ecological Entomology* 9, 69–70
- Schulze B., Kost C., Arimura G., Boland W. (2006): Duftstoffe: Die Sprache der Pflanzen; *Chemie unserer Zeit* 40: 366-377v

Literaturverzeichnis

- Silva A., Bacci M., Pagnocca F. C., Bueno O. C., Hebling M. J. A. (2006): Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Moller (Singer), the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (L.); *Current Microbiology* 53: 68–71
- Silva A., Bacci M., Pagnocca F. C., Bueno, O. C., Hebling, M. J. A., (2006): Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants; *Microbiological Research* 161: 299–303
- Silva-Pinhati A.C.O., Bacci M.Jr., Hinkle G., Sogin M.L., Pagnocca F.C., Martins V.G., Bueno O.C., Hebling M.J.A. (2004): Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae) *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37: 1463–1472
- Silvia-Pinhati A. C. O., Bacci M.Jr., Siqueira C.G., Silvia A., Pagnocca C.F., Bueno O.C., Hebling M.J.A. (2005): Isolation and Maintenance of Symbiotic Fungi of Ants in the Tribe Attini (Hymenoptera: Formicidae); *Neotropical Entomology* 34(1):001-005
- Siqueira C. G., Bacci Jr. M., Pagnocca F. C., Bueno O. C., Hebling M. J. A. (1998) Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (L); *Applied and Environmental Microbiology* 12: 4820–4822
- Takabayashi J., Dicke M., Posthumus M.A. (1994): Volatile Herbivore-Induced Terpenoids In Plant-Mite Interactions: Variation caused by Biotic And Abiotic Factors; *Journal of Chemical Ecology* 20:1324-1354
- Takabayashi J., Dicke M. (1992): Response of predatory mites with different rearing histories to volatiles of uninfested plants; *Entomologia Experimentalis et Applicata* 64: 187-193
- Thaler J.S. 1999. Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism of herbivores. *Nature* 399: 686-688
- Theis, N., Lerdau, M. (2003): The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Science* 164, 93-102
- Theobald S. (2009): Repellenz von Blattschneiderameisen der Gattung *Acromyrmex niger* durch Enantiomere von γ -Laktonen; *Praktikumsprotokoll*
- Tumlinson J.H., Silverstein R.M., Moser J.C., Brownlee R.G., Ruth, J.M. (1971): Identification of the trail pheromone of a leaf-cutting ant, *Atta texana*; *Nature* 234: 348–349

Literaturverzeichnis

- 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*); Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern
- Urbas (2004): Effects of forest fragmentation on bottom-up control in leaf-cutting ants; Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern
- Urbasch, I. (1981): *Naturwissenschaften* 68, 204-205
- Vick B.A., Zimmermann D.C. (1984): Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species; *Plant Physiology* 75: 458–461
- Weber N. A. (1966): Fungus-growing ants; *Science* 153:587–604
- Weber N. A (1972): *Gardening Ants: The Attines*. Philadelphia: American Philosophical Society
- Wilson E.O. (1986): The defining traits of fire ants and leaf-cutting ants; Lofgreen, C.S., Vander Meer, R.K., eds., 1986: *Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management*; Westview Press, Boulder
- Wilson C. L., Franklin J. D., Otto B. E. (1987): Fruit volatiles inhibitory to *Monilinia fructicola* and *Botrytis cinerea*; *Plant Disease* 71: 316-319
- Wirth R., Herz H., Ryel R.J., Beyschlag W., Hölldobler B. (2003): *Herbivory of Leaf-Cutting Ants*; Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Zhang Z.Z., Li Y.B., Qi L., Wan X.C. (2006): Antifungal activities of major tea leaf volatile constituents toward *Colletorichum camelliae* Masea; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 3936-3940
- 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*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp 301-319

Erklärung

Hiermit versichere ich, Jörg Stephan, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und dabei keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Kaiserslautern, den _____
