

**Die Steuerung physiologischer Anpassungen
von Blattläusen an veränderte ökologische Bedingungen
durch endokrine Signale**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Nora Kim Becker
aus Karlsruhe

Bayreuth, Juli 2007

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Tierökologie I der Universität Bayreuth unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Matthias Walther Lorenz durchgeführt und entstand im Zeitraum von April 2004 bis Juli 2007.

Tag der Einreichung: 13. Juli 2007

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 13. Dezember 2007

Prüfungsausschuss:

PD Dr. M. W. Lorenz (erster Gutachter)

Prof. Dr. K. H. Hoffmann (zweiter Gutachter)

Prof. Dr. E. Komor (Vorsitzender)

Prof. Dr. K. Dettner

Prof. Dr. K. Seifert

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Abkürzungen

AKH / HrTH	adipokinetisches / hypertrehalosämisches Hormon
CA	Corpora allata
CC	Corpora cardiaca
DAG	Diacylglyceride
dpm	disintegrations per minute
FL-Detektion	Fluoreszenz-Detektion
H × B × T	Höhe × Breite × Tiefe
HPAE-PAD	High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection Hochauflösende Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion
JH	Juvenilhormon
LDLp	Low-Density Lipophorin
LSC	Flüssigszintillationszähler Liquid Scintillation Counter
MAG	Monoacylglyceride
RPCH	red pigment concentrating hormone
RP-HPLC	Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
TAG	Triacylglyceride
UV-Detektion	Ultraviolett-Detektion

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	8
2.1	Haltung und Zucht der Versuchstiere	8
2.1.1	<i>Acyrtosiphon pisum</i> Harris	8
2.1.1.1	Wirtspflanze <i>Vicia faba</i> L.	9
2.1.2	<i>Gryllus bimaculatus</i> de Geer	10
2.2	Materialien	10
2.2.1	Chemikalien	10
2.2.2	Geräte	11
2.2.2.1	Allgemeine Geräte	11
2.2.2.2	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)	12
2.2.2.3	Hochauflösende Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, HPAE-PAD)	12
2.2.2.4	Sonstiges	12
2.3	Aufreinigung von Blattlausmaterial und <i>in vitro</i> -Bioassay	13
2.3.1	Extraktion und Aufreinigung durch Festphasen-Extraktion	13
2.3.2	RP-HPLC-Aufreinigung	13
2.3.3	<i>In vitro</i> -Bioassay: Messung des Acetateinbaus in Lipide bei Grillen	15
2.4	Suche nach AKH im <i>A. pisum</i> Genom	15
2.5	Stoffbestand	16
2.5.1	Frisch- und Trockengewicht	16
2.5.2	Extraktion von Protein, Glykogen, freien Kohlenhydraten und Lipid	16
2.5.3	Bestimmung von Protein	17
2.5.4	Bestimmung von Glykogen und freien Kohlenhydraten	17
2.5.5	Bestimmung von Lipid	17
2.5.6	Färbung	18
2.6	Lipid- und Glykogensynthese in Blattläusen	18
2.6.1	Messung des Acetateinbaus in Lipide	18
2.6.2	Lipidauftrennung mittels Dünnschichtchromatographie	18

2.6.3	Messung des Glucoseeinbaus in Glykogen	19
2.6.4	Messung des Trehaloseeinbaus in Glykogen	20
2.6.5	Protease-Inhibitor	20
2.6.6	Grybi-AKH und Methopren	21
2.7	Bestimmung der Trehalosekonzentration in der Hämolymphe	21
2.7.1	Hämolymphentnahme	21
2.7.2	Messung der Zuckerkonzentrationen mittels HPAE-PAD	22
2.7.3	Grybi-AKH	23
2.8	Graphische Darstellung und Statistik	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Aufreinigung von Blattlausmaterial und <i>in vitro</i> -Bioassay	24
3.2	Suche nach AKH im <i>A. pisum</i> Genom	30
3.3	Stoffbestand	35
3.3.1	Frischgewicht	35
3.3.2	Trockengewicht	36
3.3.3	Protein	37
3.3.4	Glykogen	37
3.3.5	Freie Kohlenhydrate	38
3.3.6	Lipid	39
3.3.7	Stoffbestand gesamt	40
3.4	Einfluss der Färbung der Blattläuse auf Gewicht und stoffliche Zusammensetzung	41
3.4.1	Frischgewicht	41
3.4.2	Stoffbestand	43
3.5	Glykogensynthese	45
3.5.1	Protease-Inhibitor	45
3.5.2	Einbau von Glucose in Glykogen	46
3.5.3	Einbau von Trehalose in Glykogen	47
3.6	Lipidsynthese	48
3.6.1	Protease-Inhibitor	48
3.6.2	Einbau von Acetat in Gesamtlipide	48
3.6.3	Einbau von Acetat in unterschiedliche Lipidklassen	50
3.6.4	Einfluss von Grybi-AKH auf den Einbau von Acetat in Gesamtlipide	52

3.6.5	Einfluss von Methopren auf den Einbau von Acetat in einzelne Lipidklassen	52
3.7	Zuckergehalt in der Hämolymphe	54
3.7.1	Veränderung der Zuckerzusammensetzung einer Hämolympheprobe bei Raumtemperatur	54
3.7.2	Zuckergehalt in der Hämolymphe von Apteræ und Alatae	55
3.7.3	Zuckergehalt in der Hämolymphe von Adulttieren (Tag 0-4)	56
3.7.4	Einfluss von Grybi-AKH auf den Zuckergehalt in der Hämolymphe	57
4	Diskussion	58
4.1	Versuch der Identifizierung des <i>A. pisum</i> AKHs	58
4.2	Stoffbestand	59
4.3	Glykogen- und Lipidsynthese	66
4.3.1	AKH	70
4.3.2	Methopren	71
4.4	Zuckergehalt in der Hämolymphe	73
4.4.1	AKH	75
4.5	Ausblick	77
5	Zusammenfassung	78
6	Summary	80
7	Literatur	82
8	Anhang	94
8.1	cDNA-Sequenzen bekannter AKH/RPCH	94

1 Einleitung

Blattläuse sind fast überall auf der Welt verbreitete Schädlinge (HILL, 1975). Das verdanken sie ihrer großen Anpassungsfähigkeit und ihrer hohen Reproduktionsrate, denn sie können sich sowohl zwei- als auch eingeschlechtlich fortpflanzen. Parthenogenetisch entstandene Lebensformen können zwar schnell hohe Dichten erreichen, leiden aber meist an mangelnder Anpassungsfähigkeit an veränderte Lebensbedingungen. Blattläuse dagegen können, obwohl genotypisch identisch, unterschiedliche Morphen bilden, um sich den Lebensumständen anzupassen (DIXON, 1998). Bei ungünstigen Umweltbedingungen produzieren sie geflügelte Morphen, die sich ausbreiten und neue Wirtspflanzen besiedeln können. Durch ihren Polyphänismus sind Blattläuse ideale Systeme, Fragen nach dem Trade-off zwischen Flugfähigkeit und Reproduktion und nach den physiologischen Grundlagen der Anpassungen zu beantworten.

Der Lebenszyklus der Erbsenblattlaus *Acyrtosiphon pisum* ist ein Holozyklus ohne Wirtswechsel (LAMPEL, 1968). Dabei alternieren bisexuelle und eingeschlechtliche (parthenogenetische) Generationen. Auf mehrere parthenogenetische Generationen, die lebende Junge gebären (Viviparie), folgt gegen Ende der Vegetationsperiode eine sich bisexuell fortpflanzende Generation, deren Weibchen befruchtete Eier legen (Oviparie), die das Überwinterungsstadium darstellen. Aus diesen Eiern entwickeln sich im Frühjahr die Stammütter, die sich wie ihre Nachkommen wieder parthenogenetisch fortpflanzen. Durch die zyklische Parthenogenese können Blattläuse die Vorteile zweier Fortpflanzungsformen nutzen (DIXON, 1998). Bei der sexuellen Fortpflanzung können sie durch Rekombination eine genetische Variabilität aufrechterhalten, die bei einer sich verändernden Umwelt notwendig ist. Durch die Parthenogenese sind Blattläuse in der Lage, vorteilhafte Genotypen beizubehalten und sich so unter günstigen Umweltbedingungen schnell zu vermehren. Die am weitesten entwickelten Embryonen in einer sich parthenogenetisch fortpflanzenden Virginopara enthalten ihrerseits bereits Embryonen. Blattläuse tragen also schon ihre Enkelinnen in sich und können sich so extrem schnell vermehren (DIXON, 1995).

Virginoparae treten als ungeflügelte (aptere) und geflügelte (alate) Morphen auf. Sie sind trotz ihrer unterschiedlichen Phänotypen genotypisch identisch. Welchen Vorteil bringt der Polyphänismus den Blattläusen? Schließlich ist die Produktion von geflügelten Morphen energieaufwendig. Die Antwort liegt wohl darin, dass nicht das Individuum, wohl aber der Klon einen Vorteil davon hat. Oft sind einjährige Pflanzen von Blattläusen besetzt, die alle

von einem einzigen Tier abstammen. Durch die Abwanderung der Alatae wird für die restlichen Tiere die Konkurrenz um die Ressource verringert. Hinzu kommt, dass die geflügelten Blattläuse neue Pflanzen von besserer Qualität besiedeln und sich räumlich ausbreiten können (DIXON, 1998).

Obwohl durch Parthenogenese nur Klone gebildet werden, sind Blattläuse also in der Lage, sich über Polyphänismus in jeder Generation an die Umwelt anzupassen. Das kann zu einem Trade-off zwischen der Reproduktionsfähigkeit und den Lipidreserven, bzw. der Flugfähigkeit führen. Blattläuse mit kleinen Gonaden können über eine längere Zeit Hungerperioden standhalten als solche mit großen Gonaden, welche natürlich eher Vorteile bei der Besetzung von Habitaten guter Qualität haben. So kann jede Generation ihre Ressourcen in Gonaden oder Energiereserven stecken, je nachdem, wie die Umweltbedingungen gerade sind (LEATHER et al., 1983; WALTERS & DIXON, 1983; WALTERS et al., 1988; DIXON, 1995). Geflügelte Blattläuse unterscheiden sich von ungeflügelten nicht nur durch Flügel und Flugmuskeln, sondern haben, passend zu ihrer Lebensweise, noch andere Merkmale: z.B. eine stärkere Sklerotisierung, größere Komplexaugen, Ocellen, längere Antennen und mehr Rhinarien (BRAENDLE et al., 2006). Es gibt nicht nur morphologische Unterschiede: Die larvale Entwicklung von Geflügelten dauert länger, sie haben eine längere prä-reproduktive Periode und weniger Nachkommen als ungeflügelte Tiere und sind resistenter gegenüber Hungerphasen (DIXON, 1998). Die Faktoren, die zur Produktion von Alatae bei parthenogenetischen Weibchen führen, sind vielfältig untersucht worden. Taktile Stimulation, verursacht durch eine hohe Populationsdichte, sowohl von Blattläusen einer Art, als auch von unterschiedlichen Arten, ist einer der wichtigsten Auslöser (JOHNSON, 1965; LAMB & MACKAY, 1987). Daher ist die am häufigsten angewandte Methode zur Produktion von Alatae das sogenannte „crowding“, die Anhäufung vieler Blattläuse auf kleiner Fläche (LEES, 1966). Aber auch die Nahrung, d.h. die Qualität und das Alter der Wirtspflanze, kann bei manchen Blattlausarten eine Rolle spielen (SUTHERLAND, 1969b). Zusätzlich können Räuber und Parasitoide (WEISSER et al., 1999; SLOGGETT & WEISSER, 2002; KUNERT & WEISSER, 2003), Ameisen (KLEINJAN & MITTLER, 1975), Pathogene und abiotische Faktoren, wie Temperatur und Photoperiode, (MÜLLER et al., 2001) das Auftreten von geflügelten Blattläusen beeinflussen. Daneben hat die Morphe der Mutter und der Großmutter Auswirkungen auf den Phänotyp der Nachkommen. In vielen Blattlausarten produzieren geflügelte Weibchen fast ausschließlich ungeflügelte Nachkommen, während ungeflügelte Weibchen besonders gut auf Flügel-induzierende Stimuli reagieren (DIXON, 1998; BRAENDLE et al., 2006). Die sensitive Phase, d.h. der Zeitabschnitt während der

Entwicklung, in der die Morphendetermination stattfindet, liegt bei der Erbsenblattlaus kurz vor ihrer Geburt (SUTHERLAND, 1969a). Lange wurde, aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit der ungeflügelten Adulttiere mit den Larven, davon ausgegangen, dass das Juvenilhormon (JH) die Apterisierung bewirkt. In vielen Studien wurde der Effekt von JH untersucht, indem der Synthesort von JH, die Corpora allata (CA), entfernt oder deren Zellen durch Precocin zerstört wurden (BRAENDLE et al., 2006). Auch JH I, II und III, JH-Analoga, JH-Vorstufen, oder einfach nur Extrakte, die JH enthielten, wurden an Blattläusen getestet. Die Ergebnisse waren zum Teil gegensätzlich und ein klarer Beleg dafür, dass JH die Morphenbildung induziert, fehlt bis heute (BRAENDLE et al., 2006). Es besteht durchaus auch die Möglichkeit, dass die Ausbildung der geflügelten Morphe nicht durch JH unterdrückt, sondern durch bestimmte Signale induziert wird. JOHNSON & BIRKS (1960) dekapitierten Weibchen, die dahingehend behandelt worden waren, geflügelte Nachkommen zu produzieren, und erhielten fast ausschließlich flügellose Nachkommen. Einiges deutet darauf hin, dass Signale vom Gehirn oder den Corpora allata der Mutter über die Hämolymphe die Flügelbildung induzieren (LEES, 1966; BRAENDLE et al., 2006). Dabei scheinen Ecdysteroide für die Flügelinduktion nicht in Frage zu kommen (APPLEBAUM et al., 1975). Nach einer Studie von HARREWIJN (1976) könnten allerdings biogene Amine die Produktion von geflügelten Morphen beeinflussen.

Blattläuse werden oft als schlechte Flieger bezeichnet, die eine Fluggeschwindigkeit von nur 1,6 bis 3,2 km/h haben. Allerdings sind sie durch Windverdriftungen in der Lage, in 300 bis 900 m Höhe über Strecken von bis zu 1300 km zu fliegen (DIXON, 1998). Die meisten Blattlausarten besitzen Endosymbionten, die vorwiegend in Bakeriozyten (bestimmte Bakterien beherbergende Zellgruppen) leben und von der Mutter auf die Nachkommen weitergegeben werden. Der am weitesten verbreitete Symbiont ist das Bakterium *Buchnera aphidicola*. Endosymbionten spielen eine Rolle in der Biosynthese von Vitaminen, Lipiden und essentiellen Aminosäuren und haben eine Funktion im Stickstoff-Metabolismus der Blattläuse (DIXON, 1998).

Der Hauptspeicher für Lipide, aber auch für Kohlenhydrate und Protein, ist bei Insekten der Fettkörper. Er ist das Zentrum des intermediären Metabolismus (BEENAKKERS et al., 1985). Lipide sind durch ihre Löslichkeit in Lösungsmitteln niedriger Polarität gekennzeichnet. In diese Gruppe gehören Fettsäuren, Acylglyceride, Phosphoglyceride, Wachse, Terpene, Steroide, Prostaglandine, Sphingolipide, Lipoproteine und Glycolipide (BEENAKKERS et al., 1985). Bei den meisten Insekten haben die Triacylglyceride (TAG), die zu den Acylglyceriden gehören, den größten Anteil am Lipidgehalt, in vielen Insekten besteht

mehr als 90% des Fettkörperlipids aus TAG. TAG dienen als Speicher für Fettsäuren und sind eine wichtige Energiequelle. Der größte Teil der TAG wird im Fettkörper gespeichert (BEENAKKERS et al., 1985; DOWNER, 1985). Nach dem Abbau zu Diacylglyceriden (DAG) werden sie von LDLp (Low-Density Lipophorin) in der Hämolymphe bis zu ihrem Zielort transportiert (VAN DER HORST et al., 1993). Über den Lipidtransport von Blattläusen ist wenig bekannt, es gibt aber Hinweise darauf, dass statt DAG hauptsächlich TAG und Kohlenwasserstoffe transportiert werden (DILLWITH et al., 1993). Die meisten Organismen besitzen hauptsächlich TAG aus Palmitin- und Stearinsäuren, Blattläuse dagegen enthalten mindestens vier ungewöhnliche Fettsäuren, wobei Myristinsäure am häufigsten vorkommt (DILLWITH et al., 1993). Auch in Bezug auf Phospholipide sind Blattläuse ungewöhnlich. Im Gegensatz zu den meisten anderen Insekten und Vertebraten besitzen Blattläuse mehr Phosphatidylethanolamin als Phosphatidylcholin (DILLWITH et al., 1993). Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin sind die am häufigsten vorkommenden Phospholipide, die gemeinsam über 70% des Phospholipidgehalts bei den meisten Insekten ausmachen (DOWNER, 1985). Phospholipid ist die Hauptkomponente in biologischen Membranen. Außerdem ist es eine wichtige Komponente von Vitellogenin (Dotterprotein) und spielt damit auch eine Rolle in der Embryoentwicklung (BEENAKKERS et al., 1985).

Der Phloemsaft von Pflanzen enthält viele Kohlenhydrate und kleinere Mengen an Aminosäuren, aber nur sehr wenig Lipid. Daher müssen Blattläuse den Großteil der Fettsäuren, die sie brauchen, selbst, oder mithilfe ihrer Symbionten synthetisieren (DILLWITH et al., 1993). Bei der Fettsäuresynthese wird zunächst Acetyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase zu Malonyl-CoA umgesetzt. Danach katalysiert die Fettsäuresynthetase die Kondensation von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA zu langkettigen Fettsäuren (DOWNER, 1985). Der Gehalt und die Zusammensetzung von Fettsäuren ist bei Blattläusen vom Alter (DE RENOBALLES, 1990) und der Nahrung der Tiere abhängig (BERGMAN et al., 1991; FEBVAY et al., 1992). Werden Blattläuse auf einer Wirtspflanze schlechterer Qualität gehalten, ist der Myristin- und Palmitinsäuregehalt höher als auf einer Wirtspflanze besserer Qualität (BERGMAN et al., 1991). Auch bei Dormanz steigt die Akkumulation von Lipid, hauptsächlich von TAG, an, während die Reproduktionsrate sinkt (SUTHERLAND, 1968).

Für viele Insekten ist Lipid eine wichtige Energiequelle für den Flug und auch bei Blattläusen scheint das so zu sein (COCKBAIN, 1961; LIQUIDO & IRWIN, 1986). Die Schwarze Bohnenblattlaus *Aphis fabae* nutzt hauptsächlich Fett, aber auch Kohlenhydrate als Brennstoff für den Flug (COCKBAIN, 1961). Kohlenhydrate werden nur in der Anfangsphase des Fluges verwendet, während Lipide die Hauptenergiequelle nach einer Stunde Flug ist. Bei Tieren, die

bis zum Ende ihrer Kräfte geflogen sind, waren die Fett- und Glykogenreserven in den Fettkörperzellen des Thorax und Abdomens deutlich verringert. Ähnliche Ergebnisse erzielten LIQUIDO & IRWIN (1986) bei Untersuchungen an der Maisblattlaus *Rhopalosiphum maidis*. Auch bei anderen Insektenarten, die sowohl Lipid als auch Kohlenhydrate als Energiequelle für das Fliegen nutzen, werden Kohlenhydrate in der Anfangsperiode und Lipid während der späteren Flugphase verbraucht (BEENAKKERS et al., 1985). Im Allgemeinen geht die Flugaktivität mit einem erhöhten DAG-Gehalt in der Hämolymphe einher. DAG wird vom Fettkörper über die Hämolymphe zum Flugmuskel transportiert und dort als Energiequelle für den Flug genutzt (BEENAKKERS et al., 1985). Flugfähige Insekten besitzen daher generell größere Mengen an DAG (SCHAL, 1998).

Kohlenhydrate können wie Lipide im Fettkörper gespeichert werden, zusätzlich aber auch im Flugmuskel und im Darm, und zwar hauptsächlich in Form von Glykogen (WYATT, 1967). Glykogen kann zu Trehalose abgebaut und in die Hämolymphe freigesetzt werden. Trehalose wird dann, z.B. in den Flugmuskeln, zu Glucose umgewandelt und als Energiequelle genutzt (WYATT, 1967; THOMPSON, 2003). Trehalose ist der Hauptzucker in der Hämolymphe der meisten Insekten. Sie dient als Energiespeicher, Proteinstabilisator, Komponente im Feedback-Mechanismus, die das Fressverhalten reguliert, und als Frostschutz. Der Trehalosegehalt liegt bei Insekten meist zwischen 10 und 50 mM (THOMPSON, 2003), dabei ist die Konzentration der Trehalose in der Hämolymphe oft viel höher als im Gewebe (WYATT, 1967, WHEELER, 1989). Kohlenhydrate, besonders Trehalose, sind für Hymenopteren und Dipteren wichtige Energiequellen für den Flug. Es wird davon ausgegangen, dass Insekten, die über längere Distanzen fliegen, hauptsächlich Lipid nutzen, während Kurzstreckenflieger eher auf Kohlenhydrate setzen (BEENAKKERS et al., 1985; CANDY et al., 1997). Die Aminosäure Prolin wird von der Tsetsefliege *Glossina moritans* und von vielen Käfern als wichtigstes Flugs substrat verwendet (GÄDE et al., 1997). Prolin kann in hohen Konzentrationen in der Hämolymphe und in den Flugmuskeln gespeichert werden und hat den Vorteil wasserlöslich zu sein, was den Transport in der Hämolymphe erleichtert (WHEELER, 1989; CANDY et al., 1997).

Neuropeptide aus der Familie der adipokinetischen / hypertrehalosämischen Hormone (kurz AKH genannt) kontrollieren den intermediären Metabolismus (GÄDE et al., 1997). Ihre Wirkungen kann man mit dem Glukagon von Säugetieren vergleichen. Durch die Aktivierung der Enzyme Glykogen-Phosphorylase und Triacylglycerol-Lipase im Fettkörper erhöhen sie den Kohlenhydrat- und Lipidgehalt in der Hämolymphe. Kohlenhydrate und Lipide können

dann als Energiequelle dienen. Zusätzlich hemmen diese Peptide die Lipid-, Protein-, und RNA-Synthese, erhöhen den Lipidtransport und die Kontraktionsfrequenz bestimmter Muskeln und haben einen Einfluss auf das Immunsystem (GÄDE et al., 1997; GOLDSWORTHY et al., 2003). AKHs können je nach Tierart unterschiedliche Funktionen haben. Ein AKH, das bei dem einem Tier eine adipokinetische Wirkung hat, kann bei einem anderen Tier einen hypertrehalosämischen Effekt auslösen (GÄDE et al., 1997). Das AKH-Peptid wird von den Zellen des Corpus cardiacum (CC), einem Neurohämalorgan des Kopfes, synthetisiert und gespeichert (GÄDE et al., 1997). In fast allen Insektenordnungen wurden bisher AKH-Peptide nachgewiesen. Erstmals wurde 1969 von einem Hormon berichtet, das die Lipidfreisetzung stimuliert, und zwar unabhängig voneinander bei der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* (MAYER & CANDY, 1969) und der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* (BEENAKKERS, 1969). Flugaktivität ist der bisher einzig bekannte natürliche Stimulus, der die Freisetzung von AKH bewirkt (SHARP-BAKER et al., 1995, 1996).

WIGGLESWORTH fand in den 30er und 40er Jahren bei Arbeiten an der Wanze *Rhodinus proxilus* einen Stoff, der von den CA produziert wird und auf die Metamorphose einwirkt (WIGGLESWORTH, 1936). Er folgerte daraus, dass die Konzentration des CA-Hormons, das Juvenilhormon (JH), die Art der Häutung (Juvenil- oder Adulthäutung) bestimmt (WIGGLESWORTH, 1948). Juvenilhormone haben bei adulten Tieren eine gonadotrope Wirkung. Sie regulieren die Synthese von Vitellogenin und die Oocyten-Entwicklung bei Weibchen, sowie die Spermatogenese und das Wachstum der akzessorischen Drüsen bei Männchen (GÄDE et al., 1997). Juvenilhormone beeinflussen auch den Lipidmetabolismus, allerdings ist noch nicht vollständig geklärt, in welcher Art und Weise. Es sind unterschiedliche Effekte je nach Spezies bekannt (DILLWITH et al., 1993; CHEN et al., 2005; ZERA & ZHAO, 2006). Bei Blattläusen wurde nur das JH III gefunden (HARDIE et al., 1985). Wie bei anderen Insekten hat es auch hier einen Einfluss auf die Metamorphose. Die topikale Applikation von JH oder JH-Analogen führt zu larval-adulten Mischlingen oder zu einem zusätzlichen larvalen Stadium anstelle des Adultstadiums (LEES, 1966). JH kann auch die Art der Reproduktion (Oviparie oder Viviparie) und die Morphenbildung beeinflussen (HARDIE, 1981; HARDIE & LEES, 1985). In der Vergangenheit wurde vielfach untersucht, welchen Einfluss JH auf die Produktion von geflügelten Morphen bei sich parthenogenetisch fortpflanzenden Blattläusen hat. Die Ergebnisse waren sehr widersprüchlich und so ist bis heute noch nicht geklärt, welchen Einfluss JH auf die Morphendetermination hat (HARDIE et al., 1995; BRAENDLE et al., 2006).

Aufgrund der geringen Größe von Blattläusen ist bisher nicht allzu viel über die physiologischen Vorgänge bei diesen Tieren bekannt. Ein bei vielen anderen Insekten wichtiger Regulator des intermediären Metabolismus ist das AKH. Um mehr über den Stoffwechsel von Blattläusen, besonders in Bezug auf deren Fähigkeit zur Bildung verschiedener Morphen, zu erfahren, wurde zunächst versucht, das *A. pisum*-AKH zu isolieren und zu identifizieren. Die Aufreinigung erfolgte mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC), in Kombination mit einem *in vitro*-Bioassay. Später wurde das *A. pisum* Genom nach mutmaßlichen Acypi-AKH durchsucht. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf den physiologischen Grundlagen der unterschiedlichen Morphen. Dafür wurden die Unterschiede im intermediären Metabolismus zwischen der geflügelten und der ungeflügelten Morphe untersucht. Der Stoffbestand (Lipid, freie Kohlenhydrate, Glykogen und Protein) und der Zuckergehalt in der Hämolymphe der zwei Morphen wurde analysiert. Über den Einbau von Acetat in Lipid sollte näheres über die Lipidsynthese in Erfahrung gebracht werden. Dabei konnten auch die einzelnen Lipidklassen bestimmt werden. Die Glykogensynthese wurde über den Einbau von Glucose und Trehalose in Glykogen untersucht. Zusätzlich wurde die hormonelle Steuerung der Energiespeicher durch Hormone, wie dem AKH und dem JH-Analog Methopren untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Haltung und Zucht der Versuchstiere

2.1.1 *Acyrtosiphon pisum* Harris

Den rosafarbenen Biotyp der Erbsenblattlaus *Acyrtosiphon pisum* Harris (Homoptera: Aphididae) gibt es in Europa schon seit vielen Jahren (HARPER et al., 1978). Als Versuchstier diente der Klon PJ1 (Pink Jena 2001) der Erbsenblattlaus. *A. pisum* ist wegen ihrer für Blattläuse beachtlichen Größe und der nahen Verwandtschaft zu wichtigen Schädlingsarten gut als Versuchstier geeignet. Der gesamte Lebenszyklus der Tiere kann auf einer einzigen Wirtspflanze stattfinden. Im Frühling schlüpfen die Stammütter (Fundatrices), die sich wie ihre Nachkommen (Virginoparae) parthenogenetisch fortpflanzen (LAMPEL, 1968). Im Herbst wird, aufgrund der abnehmendem Tageslänge und sinkender Temperaturen, eine Generation (Sexuparae) geboren, die Männchen und Weibchen (Sexuales) produziert. Diese verpaaren sich und die Sexuales-Weibchen legen Diapause-Eier ab, die den Winter überdauern. Aus ihnen schlüpfen im Frühling wieder die Fundatrices (Abb. 1).

Die Blattläuse wurden auf der Wirtspflanze *Vicia faba* unter Langtag-Bedingungen (L:D = 16:8 h) bei $21 \pm 1^\circ\text{C}$ aufgezogen, um nur Virginoparae (genotypisch identische Weibchen) zu erhalten, die sich ausschließlich parthenogenetisch fortpflanzen. Im Folgenden wird, wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, nur von Virginoparae gesprochen. Virginoparae können als ungeflügelte (aptere) und geflügelte (alate) Morphen auftreten. Die ungeflügelten Blattläuse beginnen bereits wenige Stunden nach der Häutung zum Adulttier damit, Larven abzusetzen. Die geflügelten Blattläuse dagegen fliegen auf der Suche nach neuen Wirtspflanzen los und bringen ihre ersten Nachkommen frühestens am zweiten, oft erst am dritten Tag des Adultstadiums zur Welt (eigene Beobachtungen). Der größte Trade-off zwischen Reproduktion und Flugfähigkeit müsste bei den zwei Morphen also zwischen Tag null und drei des Adultstadiums vorhanden sein. Darum wurde in der vorliegenden Arbeit viel Wert auf diesen Entwicklungsabschnitt gelegt. *Acyrtosiphon pisum* durchläuft in ihrer Entwicklung vier Larvenstadien. Um Tiere definierter Altersstadien und Morphen zu erhalten, wurden adulte ungeflügelte Weibchen für 24 Stunden auf einer isolierten Wirtspflanze gehalten. Die in dieser Zeit geborenen Nachkommen wurden auf eine neue, ebenfalls isolierte Wirtspflanze gesetzt. Während der Entwicklungszeit der Blattläuse wurden die Pflanzen bei Bedarf ersetzt. Die im Folgenden „Junge L4“ benannten Tiere wurden zu Beginn des vierten Larvenstadiums (7 bis 8 Tage nach ihrer Geburt) für die Messungen verwendet. „Alte L4“

genannte Tiere wurden nach 9 bis 10 Tagen abgesammelt und die adulten Tiere („Adult Tag 0“), erkennbar durch den nach oben gebogenen Ovipositor, wurden maximal 24 Stunden nach der letzten Häutung an Tag 10 bis 11 gesammelt. Die im Folgenden „Adult Tag 3 / 10 / 20“ genannten Blattläuse wurden an den Tagen 3 / 10 / 20 nach der Häutung zum Adulttier abgesammelt und für Versuche verwendet. „Geflügelte Larven“ konnten an den Flügelanlagen als zukünftige Alatae erkannt werden.

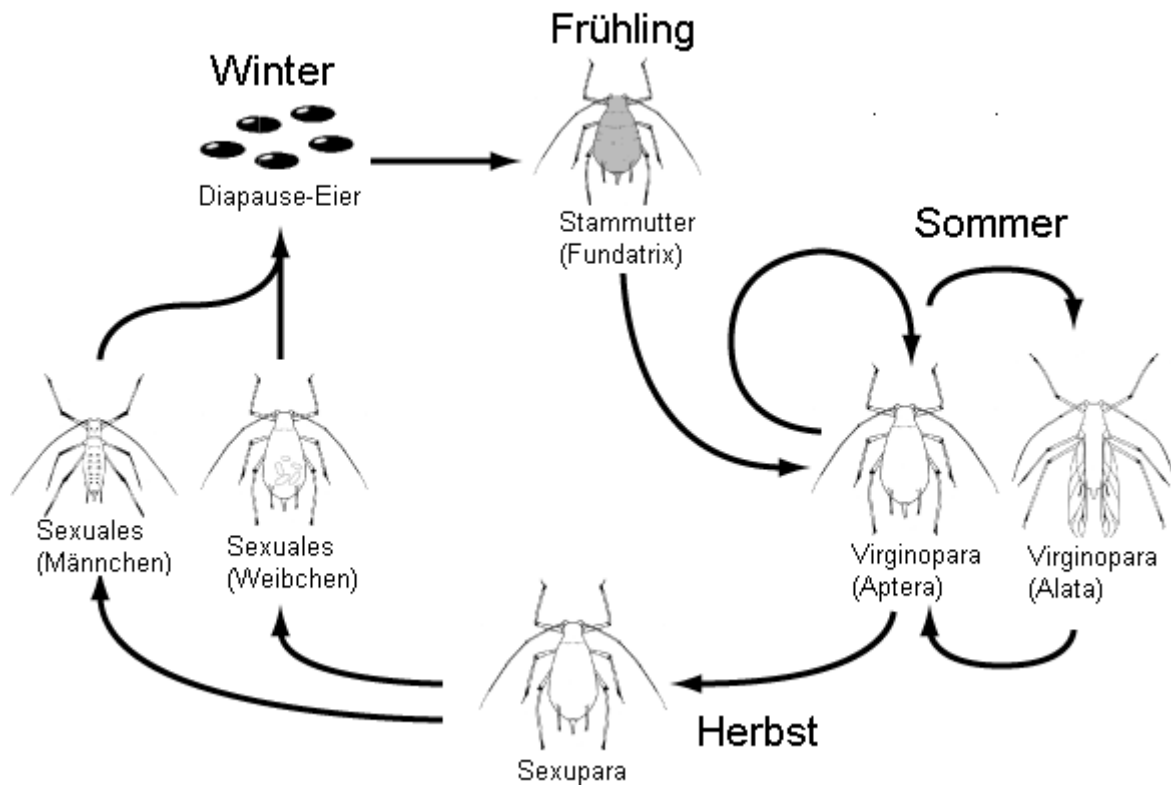


Abb. 1: Lebenszyklus der Erbsenblattlaus *Acyrthosiphon pisum* aus: SHINGLETON et al. (2003)

2.1.1.1 Wirtspflanze *Vicia faba* L.

Als Wirtspflanze wurde eine Zwergart der Acker- bzw. Saubohne *Vicia faba* L. (The Sutton; Thompson & Morgan, UK) verwendet, die nur eine Höhe von etwa 30 cm erreicht. *V. faba* ist eine weit verbreitete, einjährige Kulturpflanze aus der Familie *Fabaceae*. Die Anzucht der Bohnen fand in den Gewächshäusern des Lehrstuhls für Pflanzensystematik der Universität Bayreuth statt, bei einer Temperatur zwischen 20 und 25°C und zusätzlicher achtstündiger Beleuchtung durch Pflanzenstrahler von September bis Mai. Die Keimdauer

betrug mindestens sechs Tage. Ab einer Größe von ca. 5 bis 10 cm (ca. zwölf Tage alt) wurden sie mit Blattläusen besetzt. Wenn es nötig war, die Blattläuse auf einer einzelnen Pflanze zu isolieren, wurde eine Zellophantüte (Armin Zeller GmbH, 4900 Langenthal, Schweiz) über die Wirtspflanze gestülpt. Für die Isolierung mehrerer Pflanzen wurde ein Käfig aus Fliegengitter verwendet.

2.1.2 *Gryllus bimaculatus* de Geer

Grillen von der Firma b.t.b.e. Insektenzucht (Schnürpflingen), gekreuzt mit Grillen, die von Dr. Seiji Tanaka in Japan (Ishigaki-Islands, Okinawa) gesammelt worden waren, wurden unter Langtag-Bedingungen (L:D = 16:8 h) bei 27°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 30 bis 40% in Plastikwannen (30 × 40 × 60 cm; H × B × T) mit Eierstapelkartons gehalten. Als Futter wurde eine 2:4:1 Mischung aus Standarddiät 1310 für Ratten und Mäuse, Haltungsdiet 2021 für Kaninchen und Haltungsdiet 5030 für Katzen (Altromin, Lage) angeboten. Das Wasser wurde dreimal in der Woche gewechselt. Für die Zucht wurden je 50 adulte Weibchen und Männchen zusammengesetzt. Zusätzlich wurden runde Kunststoffbecher (8 cm Durchmesser, 3,5 cm Höhe), gefüllt mit feuchtem Sand oder Torf, zur Eiablage angeboten und alle zwei bis drei Tage ausgewechselt. Die Kunststoffbecher wurden in Plastikkästen (10 × 20 × 20 cm; H × B × T) mit Deckel umgesetzt und feucht gehalten. Nach vier bis fünf Tagen konnten die frisch geschlüpften Larven in Plastikwannen gesetzt und, wie zuvor beschrieben, aufgezogen werden. Alle Versuche wurden an 1 Tag alten adulten virginen Weibchen durchgeführt.

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

- [1-¹⁴C]-Na-Acetat, MC125 (1,7 GBq [1-¹⁴C] Na-Acetat pro mmol); Hartmann Analytic, Braunschweig
- [¹⁴C(U)] D-Glucose (9,7 GBq [¹⁴C(U)] D-Glucose pro mmol); Hartmann Analytic, Braunschweig
- [¹⁴C(U)] D-Trehalose 1249 (22,2 GBq [¹⁴C(U)] D-Trehalose pro mmol); American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, USA
- Acetonitril, RotiSolv HPLC-grade; Roth, Karlsruhe
- Anthron, A-1631; Sigma, Steinheim
- Bovine Serum Albumin (BSA), A-3294; Sigma, Steinheim
- Cholesterol; Sigma, Steinheim

- 1,2-Distearoyl-rac-Glycerol; Sigma, Steinheim
- 1,3-Distearin; Larodan AB, Malmö, Schweden
- DMSO (Dimethylsulfoxid), D-5879; Sigma, Steinheim
- Ficoll 400; No.17-0400-01; Amersham
- Grybi (*Gryllus bimaculatus*)-AKH (pQVNFSTGWamid); Bachem Biochemica, Heidelberg
- Helium 4.6; Rießner Gase, Lichtenfels
- HEPES (4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid), H-3375; Sigma, Steinheim
- HFBA (Heptafluorbutansäure); Sigma, Steinheim
- H₂O für die Chromatographie; Merck, Darmstadt
- Lumasafe Plus, Lamac LSC B.V.; Groningen, Niederlande
- L- α -Phosphatidyl-ethanolemine (L- α -Cephalin); Type VI from dog brain, P-7514; Lot 104H8377; Sigma, Steinheim
- Medium TC199, M-7653; Sigma, Steinheim
- Methanol, HPLC-grade; Roth, Karlsruhe
- Monopalmitin, Larodan AB, Malmö, Schweden
- Palmitinsäure; Sigma, Steinheim
- 2,2,3,3,3-Pentafluorpropionsäure (PFPA); Merck, Darmstadt
- Pfu Pyroglutamate Aminopeptidase; TaKaRa, Japan, über MoBiTec
- Protease-Inhibitor-Cocktail P2714; Sigma, Steinheim
- Ringerlösung (NaCl: 5g/l [86mM], KCl: 0,4 g/l [5,4mM], CaCl₂: 0,44 g/l [3mM])
- Rotiszint eco; Roth, Karlsruhe
- TFA (Trifluoressigsäure); Sigma, Steinheim
- Tristearin; Sigma, Steinheim
- Vanillin; Fluka, Neu-Ulm
- Alle anderen Chemikalien waren, falls nicht angegeben, in p.A. Qualität von Merck und Sigma

2.2.2 Geräte

2.2.2.1 Allgemeine Geräte

- Cleanbench Lamin Air HBB 2448; Heraeus Instruments, Hanau
- Hand-held homogenizer, No.749540-0000; Kontes Glass Company, Vineland, New Jersey, USA
- Inkubator, BK 6160; Heraeus Instruments
- Liquid Scintillation Counter (LSC) Tri-Carb 2100 TR; Caberra-Packard GmbH, Dreieich
- Liquid Scintillation Counter (LSC) Tri-Carb 2800 TR; Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
- Sonifier, W-250; Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
- Spektrophotometer, Ultraspec III; Pharmacia LKB, Freiburg
- Speed-Vac-Concentrator: Alpha RVC; Heraeus Christ GmbH, Osterode
Beta RVC; Heraeus Christ GmbH, Osterode
- Ultraschallbad, Transsonic 310; Elma, Singen/Htwl.
- Waage MC 210 P Sartorius, Freising
- Zentrifugen: Biofuge 13; Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
Sigma 3K12; Sigma Laborzentrifugen, Osterode

2.2.2.2 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)

Jasco Series 900 System (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Großumstadt):

Detektor	UV-Detektor UV-975 (214 nm) Fluoreszenz-Detektor FP-1520 ($\lambda_{\text{ex}} = 276\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 350\text{ nm}$)
Pumpen	zwei PU-980 HPLC Pumpen
Injektionsventil	Injektor Rheodyne 7125 (Rheodyne Inc., Cotati, CA, USA)
Degaser	DG-980-50 online Degaser
Säulentermostat	Säulentermostat Jet-streamer Peltier (25°C)
Software	Borwin 1.50 Software (JMBS, Grenoble, Frankreich)

Wechselnde Säulen, Probenschleifenvolumen, Durchflussraten und Laufmittel (siehe 2.3.2)

2.2.2.3 Hochauflösende Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, HPAE-PAD)

Säule	CarboPAC™ PA-100 (250 × 4 mm), (Dionex, Idstein)
Vorsäulen	AminoTrap CarboPAC™ PA-100, 50 × 4 mm und CarboPAC™ PA-100 Guard, 50 × 4 mm (Dionex, Idstein)
Detektor	ED-40 Elektrochemischer Detektor mit Gold-Arbeits Elektrode und Ag/AgCl Referenzelektrode (Messbereich 100 nC) (Dionex, Idstein)
Pumpe	PU-1580 Intelligent HPLC Pump (Jasco, Großumstadt)
Injektionsventil	LC10-1 (Dionex, Idstein)
Mixer	LG-1580-04 Quartary Gradient Unit (Jasco, Großumstadt)
Säulentermostat	Jet Stream Plus (Jasco, Großumstadt) (30°C)
Probenschleifenvolumen	50 µl (Dionex, Idstein)
Durchflussrate	1,0 ml/min
Software	Borwin 1.21 Chromatography Software (JMBS, Grenoble, Frankreich)
Laufmittel A	Milli-Q-Wasser
Laufmittel B	0,5 M NaOH (frisch hergestellt aus 50% Natriumhydroxidlösung; J.T. Baker)

2.2.2.4 Sonstiges

- Syringe Filter, 0.2 µm, No.17597K; Sartorius AG, Göttingen
- Dünnschichtchromatographie-Platten: Kieselgel 60 F₂₅₄; Merck, Darmstadt
- Dünnschichtchromatographie-Platte: Kieselgel G; Roth, Karlsruhe
- Mikroplatten; G.Kisker GbR, Steinfurt
- C18-E Strata Giga-Tubes; Phenomenex, Aschaffenburg
- 0,5 µl Einmalkapillarpipette; CAMAG, Berlin
- 10 µl Hamilton-Spritze 1701RNR mit PB-600 Adapter

2.3 Aufreinigung von Blattlausmaterial und *in vitro*-Bioassay

2.3.1 Extraktion und Aufreinigung durch Festphasen-Extraktion

Um eine große Menge an Blattlausmaterial zu erhalten, wurden ganze Blattläuse aller Altersstadien verwendet. 1 g Blattläuse wurde zunächst in 3 ml Extraktionsmedium (Methanol: H₂O: Essigsäure, 100: 10: 1, v/v/v) mittels Sonifier auf Eis homogenisiert und bei 4°C und 20.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und unter Stickstoff eingengt. Das Pellet wurde in 5 ml Extraktionsmedium resuspendiert, gevortext, im Ultraschallbad behandelt und zentrifugiert. Zu den vereinigten Überständen von fünf aufeinander folgenden Extraktionen einer "Blattlaus-Portion" wurden 4 ml Isooctan zugegeben. Nach Vortexen, Behandlung im Ultraschallbad und Zentrifugation wurde der Lipidanteil extrahiert und verworfen. Die Lipidextraktion wurde 5mal wiederholt. Insgesamt wurden 62 g (ca. 62000 Blattlausäquivalente) auf diese Weise gereinigt. Der aufgereinigte Extrakt wurde vakuumgetrocknet und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die weitere Aufreinigung der Extrakte erfolgte mittels Festphasenextraktion auf C18-E Strata Giga-Tubes, die zunächst mit 20 ml Acetonitril gewaschen und mit 32 ml H₂O equilibriert wurden. Der Blattlausextrakt (250 mg pro Säule) wurde auf die Säulen geladen, mit 16 ml H₂O gewaschen, gefolgt von 16 ml 10% Acetonitril, bevor das Peptidmaterial mit 50 ml 60% Acetonitril eluiert wurde. Das Peptidmaterial wurde vakuumgetrocknet und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.3.2 RP-HPLC-Aufreinigung

Das Peptidmaterial der 10-60% Fraktion wurde mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatographie, RP-HPLC) Trennung weiter aufgereinigt. Dazu wurden die Fraktionen nach jedem Trennungsschritt mittels *in vitro*-Bioassay (siehe 2.3.3) auf ihre Lipidsynthese-hemmende Wirkung getestet. Das adipokinetische Hormon (AKH) hemmt den Einbau von Acetat in Lipide im Fettkörper adulter Grillen. HPLC-Fraktionen, in denen ein inhibierender Faktor vorhanden war, d.h. die am stärksten hemmenden Fraktionen, wurden in weiteren HPLC-Läufen gereinigt.

1. HPLC Trennungsschritt: Kromasil C18 Säule, 100 Å, 5 µm, 250 × 10 mm (Maisch, Ammerbuch, Germany), 2000 µl Probenschleife; Laufmittel A: Wasser mit 0,115% TFA; Laufmittel B: Acetonitril mit 0,1% TFA; Gradient: 10-40% B in 90 min bei einer Flussrate von 4 ml/min. Insgesamt wurden acht Läufe mit je 8000 und ein Lauf mit 6000 Blattlausäquivalenten durchgeführt. Für den Biotest wurden ½ min-Fractionen abgesammelt. Die Fraktionen von 36-50 min zeigten die stärkste Hemmung des Acetateinbaus in Lipide und wurden daher weiter aufgereinigt.
2. HPLC Trennungsschritt: gleiche Bedingungen wie im 1. Trennungsschritt. Zwei Läufe mit je 27000 Blattlausäquivalenten. Die aktiven Fraktionen 49₁ und 49₂ wurden im nächsten Lauf weiter aufgereinigt.
3. HPLC Trennungsschritt: gleiche Bedingungen wie im 1. Trennungsschritt, aber 0,13% HFBA anstelle von 0,1% TFA mit 52500 Blattlausäquivalenten. Die aktiven Fraktionen 48₂ und 49₁ wurden weiter aufgereinigt.
4. HPLC Trennungsschritt: gleiche Bedingungen wie im 3. Trennungsschritt, aber 0,1% PFPA anstelle von 0,13% HFBA mit 51500 Blattlausäquivalenten. Die Peaks wurden abgesammelt und, um Material zu sparen, ohne getestet zu werden weiter aufgereinigt.
5. HPLC Trennungsschritt: ReproSil-Pur C18-AQ Säule, 120 Å, 5 µm, 250 × 4,6 mm, mit Vorsäule 10 × 4,6 mm (Maisch, Ammerbuch, Deutschland); Laufmittel A: 20 mM NH₄Ac (pH 6,9); Laufmittel B: 20 mM NH₄Ac in 80% Acetonitril; Gradient: 10-40% B in 90 min bei einer Flussrate von 1 ml/min. Von den Peakfraktionen aus dem 4. Trennungsschritt wurden in einem Lauf 12875 Blattlausäquivalente und in zwei weiteren Läufen je 19312,5 Blattlausäquivalente injiziert. Die Peaks wurden abgesammelt und die aktiven Fraktionen (Peak 44-46 min) aus den drei Läufen gepoolt und weiter aufgereinigt.
6. HPLC Trennungsschritt: gleiche Bedingungen wie im 5. Trennungsschritt, aber 0,1% TFA anstelle von 20 mM NH₄Ac mit 50500 Blattlausäquivalenten. Der Peak wurde abgesammelt und nicht getestet um Material zu sparen.

Die Deblockierung des mutmaßlichen AKHs wurde durch die Inkubation des gereinigten Peakmaterials mit Pfu Pyroglutamat Aminopeptidase (TaKaRa) für 30 min bei 75 °C erreicht. Nach der Deblockierung wurde der Extrakt im nächsten HPLC-Lauf aufgereinigt, um die deblockierten Peptide von den unverdauten Peptiden zu trennen.

7. HPLC Trennungsschritt: ReproSil-Pur ODS-3, 300 Å, 5 µm, 250 × 3 mm (Maisch, Ammerbuch, Deutschland); 500 µl Probenschleife; Laufmittel wie im 6. HPLC Trennungsschritt; Gradient: 10-50% B in 40 min bei einer Flussrate von 0,4 ml/min.

Der Peak der mutmaßlich deblockierten Peptide wurde abgesammelt und an Dr. R. Kellner (Merck KGaA) zur Sequenzierung geschickt.

2.3.3 *In vitro*-Bioassay: Messung des Acetateinbaus in Lipide bei Grillen

Wegen der geringen Größe der Blattläuse wurden die Tests der Fraktionen auf Lipidsynthese-hemmende Wirkung an Fettkörpern der Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus* durchgeführt. Aus jeder Grille wurden vier gleich große Fettkörpervierviertel präpariert und die Menge des in Lipide eingebauten radioaktiv markierten Acetats bestimmt, wie in LORENZ (2001) beschrieben, mit einigen wenigen Änderungen. Die Fettkörper wurden in 95 µl radioaktivem Medium TC199 (1,46-1,55 kBq) in 2 ml Eppendorfgefäßen bei 27°C für 60 min inkubiert. Durch Zugabe einzelner HPLC-Fraktionen in das Medium konnte deren Wirkung auf den Acetateinbau in Lipide gemessen werden. Das Inkubationsmedium bestand aus Medium TC199 mit 10 mM Na-Acetat, 12 mM Glucose, 18 mM Trehalose, 3 mM Ca²⁺, 25 mM HEPES, 1% Ficoll 400 bei einem pH von 7,20-7,25. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 200 µl Methanol gestoppt. Danach wurden 500 µl Isooctan und 500 µl 1 M NaCl zugegeben. Nach dem Vortexen wurden die Proben für 30 min bei 4°C gekühlt. Nach nochmaligem Vortexen und eiskaltem Ultraschallbad für 5 min wurden die Proben bei 4°C und 20.000 g für 5 min zentrifugiert. Von der oberen organische Phase wurde ein 200 µl Aliquot in Szintillationscocktail (Rotiszint eco) pipettiert und der Anteil des in Lipide eingebauten radioaktiv markierten Acetats mittels Flüssigszintillationszähler (Liquid Scintillation Counter, LSC) gemessen. Die Referenz enthielt keinen Fettkörper und wurde wie die Proben behandelt.

2.4 Suche nach AKH im *A. pisum* Genom

Mit den im Human Genome Sequencing Center (HGSC) klonierten Nukleinsäuresequenzen wurde eine Blast Analyse mit den bereits bekannten Aminosäuresequenzen von AKH-Peptiden durchgeführt (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/blast/blast.cgi?organism=Apisum>). Es wurden mehrere Klone gefunden, deren

Aminosäuresequenzen homolog zu den bekannten AKH-Peptiden waren. Mit dem ExPASy Translate tool (<http://expasy.org/tools/dna.html>) wurde die Nukleinsäuresequenz der Klone in ihre Aminosäuresequenz übersetzt. Sequenzen, die homologe Peptidsequenzen zu den bekannten AKHs enthielten, wurden mit dem Signal P 3.0 Server (<http://cbs.dtu.dk/services/SignalP>) geprüft, um das Signalpeptid zu identifizieren (BENDTSEN et al., 2004). Das in seiner Aminosäuresequenz kodierte mutmaßliche AKH-Peptid und das Signalpeptid wurden mithilfe des Expasy-Servers <http://www.expasy.ch/cgi-bin/peptidecutter> untersucht, um die Schnittstellen des Peptids zu identifizieren (GASTEIGER et al., 2005). Für das Alignment zwischen den AKH/RPCH Präprohormonen wurden Gensequenzen aus der Genbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> verwendet (siehe 8.1). Das Alignment und die phylogenetische Analyse wurde wie bei ABDEL-LATIEF & HOFFMANN (2007) beschrieben durchgeführt. Der Neighbor-joining Stammbaum wurde mithilfe des PHYLIP package (FELSENSTEIN, 2005) hergestellt und basiert auf der Übereinstimmung von 1000 Bootstrap Replikaten. Der Stammbaum wurde mit TreeView 1.6.6. (PAGE, 1996) dargestellt. Als Außengruppe wurden die RPCH Präprohormone von Crustaceen verwendet, wie zuvor bei MARTÍNEZ-PÉREZ et al. (2002) beschrieben.

2.5 Stoffbestand

2.5.1 Frisch- und Trockengewicht

Zehn Blattläuse wurden pro Probe in ein vorgewogenes Eppendorfgesäß gegeben und aus der Gewichts Differenz zwischen Eppendorfgesäßen mit und ohne Blattläusen das Frischgewicht berechnet. Für die Bestimmung des Trockengewichts wurde zunächst das Frischgewicht gemessen und die Proben anschließend für ca. 24 Stunden vakuumgetrocknet, um danach erneut gewogen zu werden.

2.5.2 Extraktion von Protein, Glykogen, freien Kohlenhydraten und Lipid

Die Extraktion und Bestimmung von Protein, Glykogen, freien Kohlenhydraten und Lipid wurde, mit einigen Modifikationen, wie bei LORENZ (2003) beschrieben durchgeführt. Pro Probe wurden zehn ganze Tiere verwendet. Zur Extraktion des Protein- und Glykogenanteils wurden 1% KOH verwendet.

2.5.3 Bestimmung von Protein

Für die Proteinbestimmung wurden die Proben in einer Mikrotiterplatte in 200 μl Roti-Quant bei 50°C für 20 min inkubiert und dann bei 515 nm gegen eine Referenz, die nur Roti-Quant und 0,25% Glykogen und 1,66% Na_2SO_4 in 0,166% KOH enthielt, gemessen. Über eine Standardkurve von 0 bis 100 μg BSA gegen A_{515} konnte die Proteinkonzentration berechnet werden. Die Ergebnisse wurden über die bekannte Wiederfindungsrate von $72,7 \pm 2,6\%$ korrigiert.

2.5.4 Bestimmung von Glykogen und freien Kohlenhydraten

Glykogen und freie Kohlenhydrate wurden mithilfe der Anthronmethode (MOKRASCH, 1954), mit einigen Änderungen, bestimmt. Dazu wurden die Proben in 100 μl konzentrierter Schwefelsäure und 1 ml Anthronreagenz (0,13% Anthron in 67% Schwefelsäure) bei 90°C für 10 min erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Absorption bei 585 nm gegen eine Referenz, die nur Schwefelsäure und Anthron enthielt, gemessen. Über eine Standardkurve von 0 bis 20 μg Glykogen gegen A_{585} konnte die Glykogen- und Kohlenhydratkonzentration berechnet werden. Die Ergebnisse wurden über die bekannten Wiederfindungsraten von $83,4 \pm 1,9\%$ für Glykogen und $96,5 \pm 2,4\%$ für freie Kohlenhydrate korrigiert.

2.5.5 Bestimmung von Lipid

Die Lipidbestimmung wurde mit der Sulphophosphanillin-Methode nach ZÖLLNER & KIRSCH (1962), mit einigen Modifikationen, durchgeführt. Die Proben wurden in 100 μl konz. Schwefelsäure bei 100°C für 10 min erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde 1 ml 0,2% Phosphovanillin in 57% *ortho*-Phosphorsäure zugegeben und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Die Absorption wurde bei 530 nm gegen eine Referenz, die nur Schwefelsäure und Phosphovanillinreagenz enthielt, gemessen. Über eine Standardkurve von 0 bis 20 μg Cholesterol gegen A_{530} konnte die Lipidkonzentration berechnet werden. Die Ergebnisse wurden über die Wiederfindungsrate von $91,1 \pm 2,1\%$ korrigiert.

2.5.6 Färbung

Ein Teil der für die Stoffbestandsbestimmung verwendeten Blattläuse wurde nach drei Farbabstufungen sortiert und die Proben als rosa, hellrosa oder hell gekennzeichnet. Bei unklarer Körperfärbung, insbesondere bei Larven und im höheren Alter, oder wenn nicht genügend Blattläuse einer Farbe vorhanden waren, wurden die Proben für die Auswertung nicht verwendet. Weil die Färbung nicht kontrolliert werden konnte, war die Stichprobengröße teilweise sehr klein.

2.6 Lipid- und Glykogensynthese in Blattläusen

2.6.1 Messung des Acetateinbaus in Lipide

Die Blattläuse wurden in Ringerlösung dekapitiert und anschließend der Darm und die Embryonen vorsichtig entfernt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, kein Fettkörpergewebe aus dem Tier zu entnehmen. Der Anteil des in Lipid eingebauten radioaktiv markierten Acetats wurde bestimmt, wie unter 2.3.3 beschrieben. Das Inkubationsmedium für Blattläuse bestand aus Medium TC199 mit 10 mM Na-Acetat, 15 mM Glucose, 330 mM Trehalose, 3 mM Ca^{2+} , 25 mM HEPES und 1% Ficoll 400 bei einem pH von 7,20-7,25. Pro Probe wurden zehn präparierte Blattläuse in 80 μl radioaktivem Medium TC199 (45,14-51,06 kBq) in Eppendorfgefäßen bei 27°C für 120 min inkubiert. Von der oberen organische Phase wurde ein Aliquot von 200 μl in Szintillationscocktail (Rotiszint eco) pipettiert und der Anteil des in Lipid eingebauten radioaktiv markierten Acetats mittels LSC gemessen. Die Referenz enthielt keine Blattläuse und wurde wie die Proben behandelt.

2.6.2 Lipidauftrennung mittels Dünnschichtchromatographie

Für die Extraktion der Lipide wurde die gleiche Methode wie unter 2.6.1 verwendet, mit folgenden Änderungen. Die Blattläuse wurden in radioaktivem Medium TC199 mit einer endgültigen spezifischen Aktivität von 82,51-89,91 kBq pro Probe inkubiert. Von der oberen organische Phase wurde ein 100 μl -Aliquot in Szintillationscocktail (Rotiszint eco) pipettiert und der Anteil des in Lipid eingebauten radioaktiv markierten Acetats mittels LSC gemessen. Die Lipidauftrennung durch Dünnschichtchromatographie erfolgte wie bei LORENZ (2001) beschrieben, mit einigen Modifikationen. Ein Aliquot von 100 μl wurde gemeinsam mit den

Standards auf eine 20 × 20 cm Dünnschichtchromatographie-Platte (Kieselgel 60 F₂₅₄) gegeben, die in acht Spalten unterteilt worden war. Je 10 µg der Standards aus Phosphatidylethanolamin, Monopalmitin, Palmitinsäure, Cholesterin, 1,2-Distearoyl-rac-Glycerin, 1,3-Distearin und Tristearin wurde auf die erste und die letzte Spalte aufgetragen. So konnten pro Platte 6 Proben gemessen werden. Die Platte wurde in einem Laufmittel aus 1,2-Dichlorethan: Methanol:Essigsäure (93,5:6,5:0,4; v:v:v) für ca. 50 min entwickelt. Um die Lipide sichtbar zu machen, wurde die Platte mit 10% Phosphomolybdänsäure in Ethanol besprüht und für ca. 5 min bei 200°C erhitzt. Die Probenspalten wurden entsprechend den Standards in Abschnitte unterteilt, ausgekratzt und in 3,5 ml Szintillationscocktail (Lumasafe Plus) gegeben. Nach starkem Vortexen wurden sie über Nacht stehen lassen und anschließend mittels LSC gemessen. Für die Auswertung wurden die erhaltenen Werte mit Referenzen von unbehandelten Abschnitten der Platte korrigiert und die Summe aller Werte auf 100% gesetzt.

2.6.3 Messung des Glucoseeinbaus in Glykogen

Als Inkubationsmedium für die Blattläuse wurde das unter 2.6.1 beschriebene Medium verwendet, nur ohne Zusatz von Na-Acetat. Die Blattläuse wurden wie unter 2.6.1 beschrieben in Ringerlösung dekapitiert und anschließend der Darm und die Embryonen vorsichtig entfernt. Zur Messung des Anteils der in Glykogen eingebauten radioaktiv markierten Glucose wurden die präparierten Blattläuse (10 pro Probe) in 90 µl radioaktivem Medium TC199 (124,9-127,5 kBq) in 96-well Mikrotiterplatten bei 27°C für eine Stunde inkubiert. Dann wurden die Blattläuse nach kurzem Abtupfen auf Filterpapier in 2 ml Eppendorfgefäße mit 200 µl 50% KOH gegeben und dadurch die Inkubation gestoppt. Danach wurden die Proben im Thermoblock für 30 min bei 95°C inkubiert und alle 10 min gevortext. Nach der Zugabe von 150 µl H₂O, 50 µl gesättigter Na₂SO₄-Lösung und 700 µl Ethanol_{abs.} bei 95°C, wurden die Proben, nach kurzem Vortexen, bei 4°C und 20.000 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet auf dem Thermoblock vollständig getrocknet. Das Pellet wurde bei 95°C mit 500 µl H₂O gelöst und durch Zugabe von 700 µl Ethanol_{abs.} erneut ausgefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation, Abnahme des Überstands und Trocknung des Pellets, erfolgte die Aufreinigung des Pellets im nächsten Schritt mit 350 µl H₂O und 500 µl Ethanol_{abs.}. Dieser Schritt wurde insgesamt 5mal wiederholt. Nach der letzten Trocknung wurde das Pellet in 200 µl H₂O vollständig gelöst, 1,5 ml eines Szintillationscocktails (LumaSafe plus) zugegeben, gut geschüttelt und mittels

LSC gemessen. Die Referenz enthielt 50 μl Medium und 100 μl Wasser und wurde wie die Proben behandelt.

Um sicher zu gehen, dass der Glykogenanteil gut aufgereinigt worden war und dass es sich bei der gemessenen Radioaktivität nicht um radioaktiv markierte freie Kohlenhydrate handelte, wurde das gereinigte Pellet dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt. Ein Aliquot von 100 μl wurde auf eine 20×20 cm, mit 0,1 M NaHSO_3 imprägnierte Dünnschichtchromatographie-Platte (Kieselgel G) gegeben. Als Standard dienten je 1 mg von Glykogen, Glucose und Trehalose in der ersten, der mittleren und der letzten Spalte der Platte. Die Platte wurde mit einem Laufmittelgemisch aus 1-Propanol:Wasser (85:15, v:v) entwickelt. Um die Kohlenhydrate sichtbar zu machen, wurde die Platte mit 3% PSR (Phenol-Schwefelsäure-Reagenz: 3 g Phenol und 5 ml H_2SO_4 konz. in 95 ml EtOH) (ADACHI, 1965) besprüht und bei 120°C getrocknet. Die Probenspalten wurden in, den Standards entsprechende, Abschnitte unterteilt, ausgekratzt und in 3,5 ml Szintillationscocktail (Lumasafe Plus) gegeben. Nach starkem Vortexen wurden sie über Nacht stehen lassen und anschließend mittels LSC gemessen. $62,3 \pm 3,3\%$ der Gesamtradioaktivität in den Plattenfraktionen wurde in der Glykogenfraktion gefunden.

2.6.4 Messung des Trehaloseeinbaus in Glykogen

Für die Messung des Trehaloseeinbaus in Glykogen wurde die gleiche Methode verwendet, wie unter 2.6.3 beschrieben, mit einigen wenigen Änderungen. Das Inkubationsmedium für die Blattläuse bestand aus Medium TC199 mit 330 mM bzw. 30 mM Trehalose, 3 mM Ca^{2+} , 25 mM HEPES und 1% Ficoll 400 bei einem pH von 7,20-7,25. Die Inkubation fand in 90 μl radioaktivem Medium TC199 (75,8-83,3 kBq) statt. Als Referenz wurden zehn präparierte Blattläuse für 1 min in 40 μl Medium inkubiert, nach kurzem Abtupfen auf Filterpapier in Eppendorfgefäße gegeben und weiter wie die Proben behandelt.

2.6.5 Protease-Inhibitor

Sowohl bei der Messung des Acetateinbaus in Lipid (2.6.1), als auch bei der Messung des Glucoseeinbaus in Glykogen (2.6.3) wurde getestet, ob die Zugabe eines Protease-Inhibitor-Cocktails in das Inkubationsmedium die Einbaurate verändert. Dafür wurden 1,5 μl des Protease-Inhibitor-Cocktails P2714 (Sigma, Steinheim) pro Probe zugegeben. Der

Protease-Inhibitor wurde für die Versuche mit AKH verwendet, um zu verhindern, dass das Hormon während der Inkubation durch Proteasen abgebaut wird.

2.6.6 Grybi-AKH und Methopren

Das AKH-Peptid von *Gryllus bimaculatus* (Grybi-AKH) wurde in das radioaktiv markierte Inkubationsmedium gegeben und zusammen mit der Kontrolle weiter behandelt wie unter 2.6.1 und 2.6.2 für den Einbau von Acetat in Lipid, bzw. wie unter 2.6.3 für den Einbau von Glucose in Glykogen beschrieben.

Die topikale Applikation von Methopren wurde zunächst mit einer 10 µl Hamilton-Spritze mit PB-600 Adapter durchgeführt. Gegen Ende des vierten Larvenstadiums wurde pro Blattlaus 1 µg Methopren in 0,2 µl Aceton appliziert. Wurde der Acetateinbau an Tag drei des Adultstadiums gemessen, so wurden die Tiere an Tag eins des Adultstadiums mit der gleichen Menge nochmals behandelt. Diese Methode wird im Folgenden Methode 1 genannt.

Um den durch das Lösungsmittel Aceton verursachten chemischen Stress und damit Veränderungen in der Lipidsynthese zu verringern, wurde eine weitere Methode der Behandlung mit Methopren gewählt. Eine Glas-Petrischale (Durchmesser 3,5 cm) wurde mit 2 µl Isooctan, bzw. mit in Isooctan gelöstem Methopren (22 µg in 2 µl Isooctan) ausgestrichen. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wurden die Tiere hineingegeben und die Petrischale mehrmals gewendet. Diese Behandlung wurde gegen Ende des vierten Larvenstadiums und an Tag eins des Adultstadiums durchgeführt. Die Messung der Einbaurate erfolgte an Tag drei. Bei dieser Methode (im Folgenden Methode 2 genannt) konnte zwar die Konzentration von Methopren pro Blattlaus nicht genau festgelegt werden, dafür war die Sterblichkeit erheblich geringer.

2.7 Bestimmung der Zuckerkonzentration in der Hämolymphe

2.7.1 Hämolymphentnahme

Die Abnahme der Hämolymphe erfolgte unter dem Binokular unter 40facher Vergrößerung. Die Blattlaus wurde mit einer Federstahlpinzette festgehalten, während ein Prothorakalbein an der Tibia abgeschnitten wurde. Die austretenden Hämolymphtropfen wurden mit einer 0,5 µl Einmalkapillarpipette aufgesogen. Von einer Blattlaus konnte bis zu

40 nl Hämolymphe gewonnen werden. Die Menge der aufgenommenen Hämolymphe wurde über den Füllstand der Kapillare berechnet und die Hämolymphe anschließend mit einem Exhaustor in die entsprechende Menge Milli-Q-Wasser (5 nl Hämolymphe in 10 µl Milli-Q-H₂O) ausgeblasen um immer die gleiche Konzentration zu erhalten. Pro Probe wurden 1 bis 4 Blattläuse verwendet. Die Probe wurde sofort bei -70°C eingefroren, um potenzielle enzymatische Umbauprozesse zu verhindern.

2.7.2 Messung der Zuckerkonzentrationen mittels HPAE-PAD

Die hochauflösende Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (High Performance Anion Exchange Chromatographie with Pulsed Amperometric Detection, HPAE-PAD) ist eine flüssigchromatographische Technik des Anionenaustausches. Kohlenhydrate werden im alkalischen Medium in die anionische Form überführt und an einem speziellen Latex-Anionenaustauscher getrennt (DIONEX, 1993). Die Detektionsart ist eine gepulste Amperometrie. Dabei werden die Kohlenhydrate an einer Goldelektrode oxidiert. Durch einen Wechsel von hohem und niedrigem Potential wird die Goldelektrodenoberfläche nach jedem Oxidationsschritt auf elektrochemischem Wege gereinigt. Die Laufmittel wurden vor Versuchsbeginn 20 min unter Helium entgast. Um die Bildung störender Carbonate zu verhindern, wurde während der ganzen Versuchzeit eine Heliumatmosphäre beibehalten. Die Methode wurde durchgeführt wie bei FISCHER (2001) beschrieben.

Gradient (KH 21):

Potential/Zeit-Kurve (ED-40-Detektor):

Zeit [min]	%A	%B	Schritt	Zeit [sec]	Potential [V]	Integration
00,00	97	3	0	0.00	+0,05	
10,00	80	20	1	0.20	+0,05	Start
13,00	60	40	2	0.40	+0,05	Ende
15,00	58	42	3	0.41	+0,75	
25,00	30	70	4	0.60	+0,75	
28,00	30	70	5	0.61	-0,15	
30,00	97	3	6	1.00	-0,15	

Für alle Analysen wurden wurde 10 µl Lösung eingespritzt. Für alle Proben galt eine Ausgangsverdünnung von 5 nl Hämolymphe in 10 µl Milli-Q-H₂O. Pro Probe wurde die

Hämolymphe von 1 bis 3 Blattläusen verwendet. Die Identifizierung der Zucker konnte durch den Vergleich der Retentionszeiten mit einem Standardzuckergemisch erhalten werden. Die Standardzucker Trehalose und Glucose wurden sechsmal in unterschiedlichen Konzentrationen injiziert. Über den Vergleich der Peakflächen konnte die Konzentration der Proben berechnet werden. Zu Beginn der Messung und nach jedem zweiten Probenlauf wurde ein Standardzuckergemisch aus Trehalose und Glucose injiziert.

2.7.3 Grybi-AKH

Um den Effekt von Grybi-AKH-Peptiden auf die Zuckerkonzentration in der Hämolymphe zu messen, wurden mit einer 10 µl Hamilton-Spritze mit PB-600 Adapter pro Blattlaus 100 pmol Grybi-AKH (gelöst in 0,2 µl 20% DMSO), bzw. für die Kontrolle 0,2 µl 20% DMSO, topikal appliziert. Nach zwei, vier, sechs oder zwölf Stunden in einer Petrischale mit angefeuchtetem Filterpapier wurde die Hämolymphe abgenommen und bis zur Messung eingefroren.

2.8 Graphische Darstellung und Statistik

In den Graphiken sind die Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Die zugrunde liegende Anzahl (n) an Einzelmesswerten ist in der jeweiligen Legende angegeben. Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurden mit Statistica 6.0 (Statsoft Inc., 2003) und SigmaStat 3.10 (Systat Software Inc., 2004) durchgeführt. Für den Vergleich zweier Stichproben wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet, gegebenenfalls mit Bonferroni-Korrektur. Für den Vergleich von mehr als zwei Stichproben wurde die Kruskal-Wallis-ANOVA mit dem Dunn`s Posthoc Test bei unterschiedlicher Stichprobengröße, bzw. mit dem Tukey Posthoc Test bei gleicher Stichprobengröße verwendet. Um die Altersabhängigkeit zu testen wurde die Spearman Rangkorrelation benutzt. Die Messwerte unterscheiden sich signifikant ab einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Aufreinigung von Blattlausmaterial und *in vitro*-Bioassay

Für die Aufreinigung des Blattlausmaterials wurden 62000 Blattlausäquivalente verwendet. Das Peptidmaterial der 10-60% Acetonitril-Fraktion aus der Festphasen-Extraktion wurde in insgesamt acht 1. HPLC-Läufen weiter aufgereinigt, indem ½-min-Fractionen abgesammelt und auf ihre Wirkung im *in vitro*-Bioassay getestet wurden.

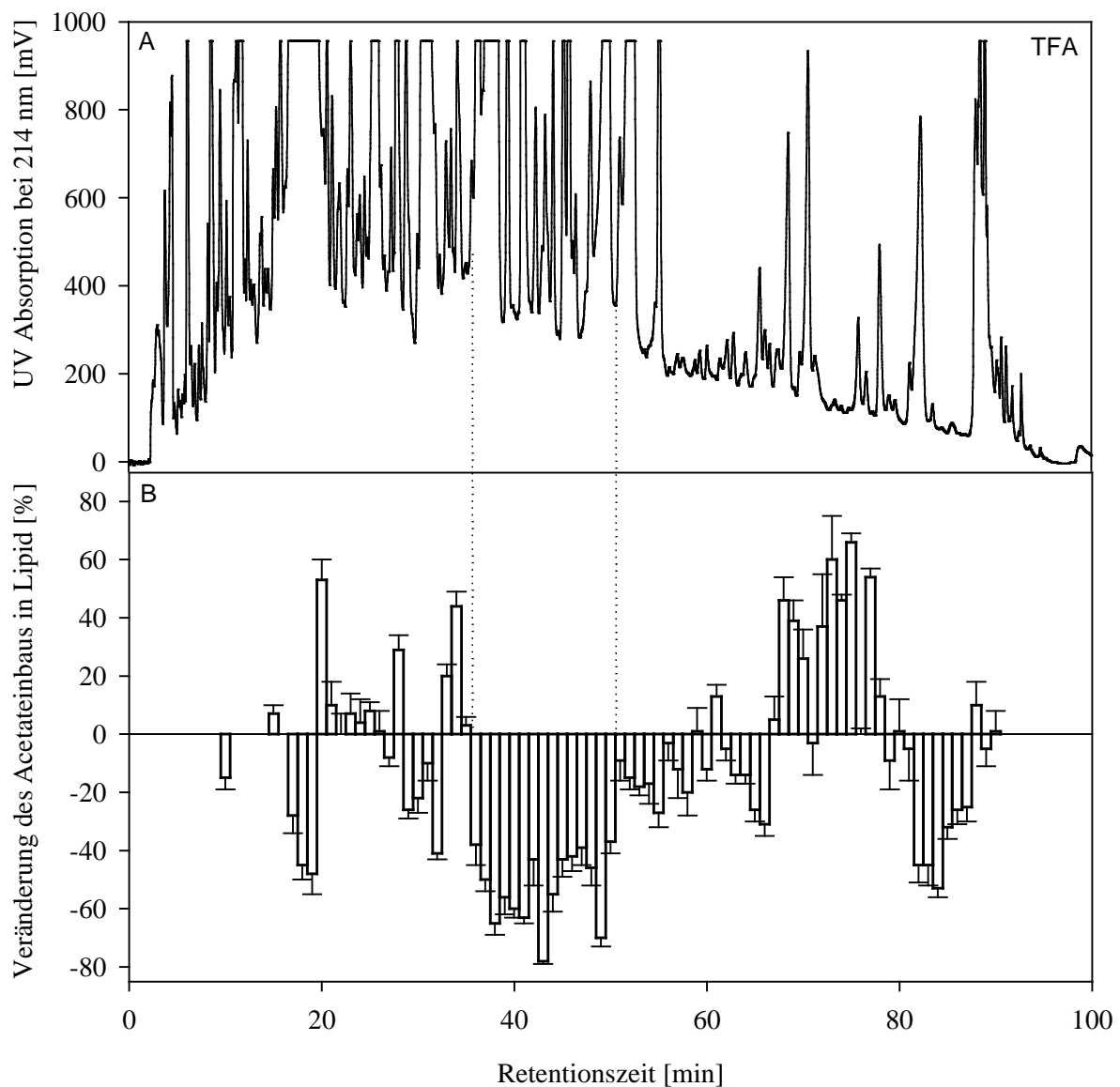


Abb. 2: Einer der 1. HPLC-Läufe von 8000 Blattlausäquivalenten, Laufbedingungen siehe 2.3.2. (A). ½-min-Fractionen wurden abgesammelt und im Biotest auf ihre Lipidsynthese-hemmende Wirkung untersucht. (B) Acetateinbau in Lipid unter Zugabe von je zwei ½-min-Fractionen; % Abweichung von der Kontrolle (Mittelwerte \pm S.E., n=10).

Die Abbildung 2 zeigt das Chromatogramm (A) und die Ergebnisse des Bioassays (B) eines der 1. HPLC-Läufe. Die Fraktionen 36-50 verursachten im Biotest eine Hemmung des Einbaus von Acetat in Lipid von 37-78% (durch die gepunkteten Linien markiert). Daher wurden aus allen 1. Läufen die Fraktionen 36-50 vereinigt und in den 2. HPLC-Läufen weiter aufgereinigt. Ein Chromatogramm der zwei 2. HPLC-Läufe mit insgesamt 54000 Blattlausäquivalenten ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Fraktionen 49₁ und 49₂ verursachten mit 50% und 49% die stärkste Hemmung des Acetateinbaus in Lipid und wurden daher aus beiden Läufen vereinigt und im 3. HPLC-Lauf (Abb. 4) weiter aufgereinigt.

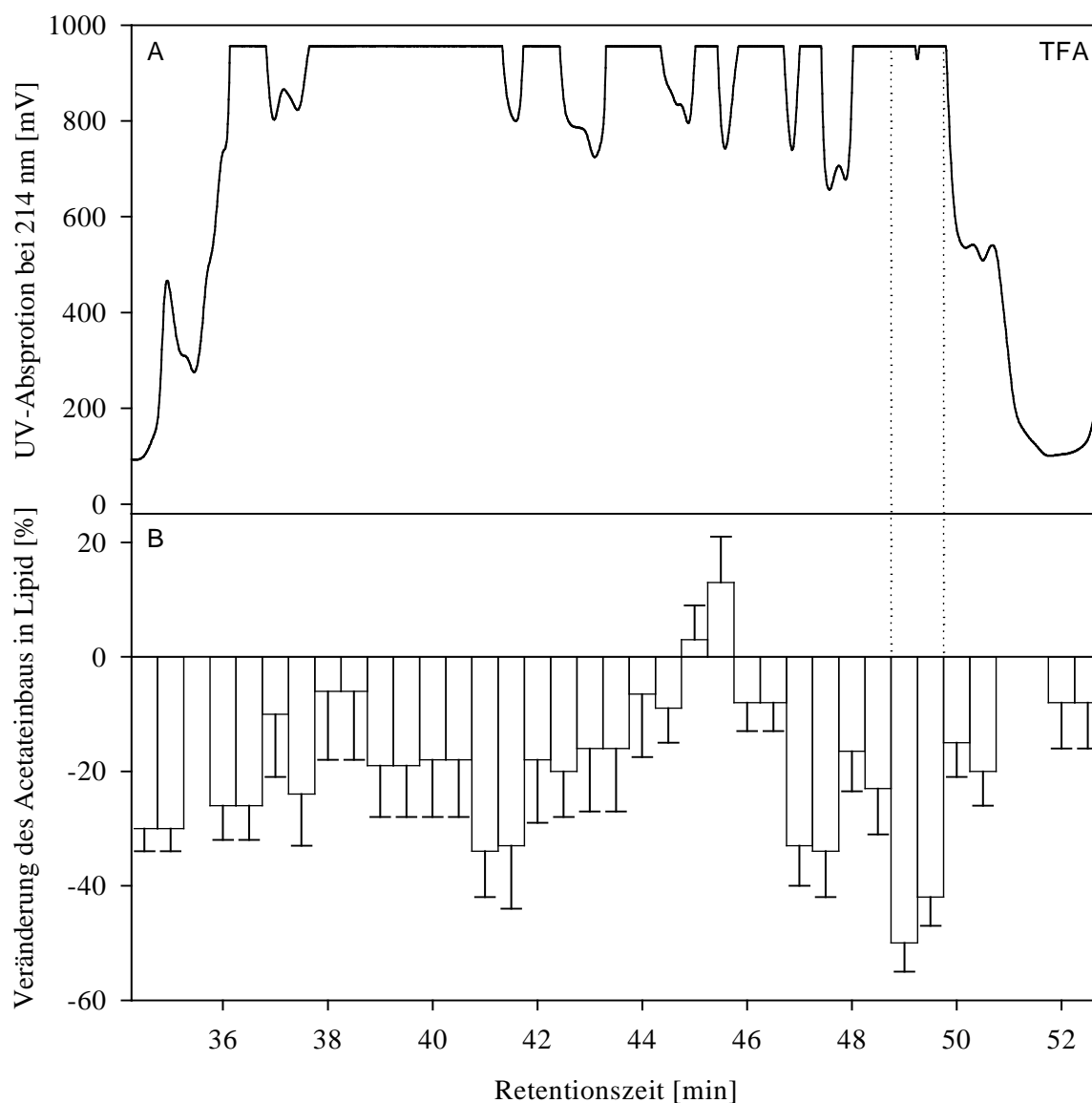


Abb. 3: 2. HPLC-Lauf von 27000 Blattlausäquivalenten, Laufbedingungen siehe 2.3.2. (A). ½-min-Fraktionen wurden abgesammelt und im Biotest auf ihre Lipidsynthese-hemmende Wirkung untersucht. (B) Acetateinbau in Lipid unter Zugabe von je einer ½-min-Fraktion; % Abweichung von der Kontrolle (Mittelwerte ± S.E., n=10).

Beim 3. Lauf mit 52500 Blattlausäquivalenten wurden wiederum ½-min-Fractionen abgesammelt und auf ihre Wirkung getestet. Die Fraktionen 48₂ und 49₁ hemmten mit 64% bzw. 47% den Einbau von Acetat in Lipid am stärksten und wurden für eine weitere Aufreinigung im 4. HPLC-Lauf (Abb. 5) ausgewählt.

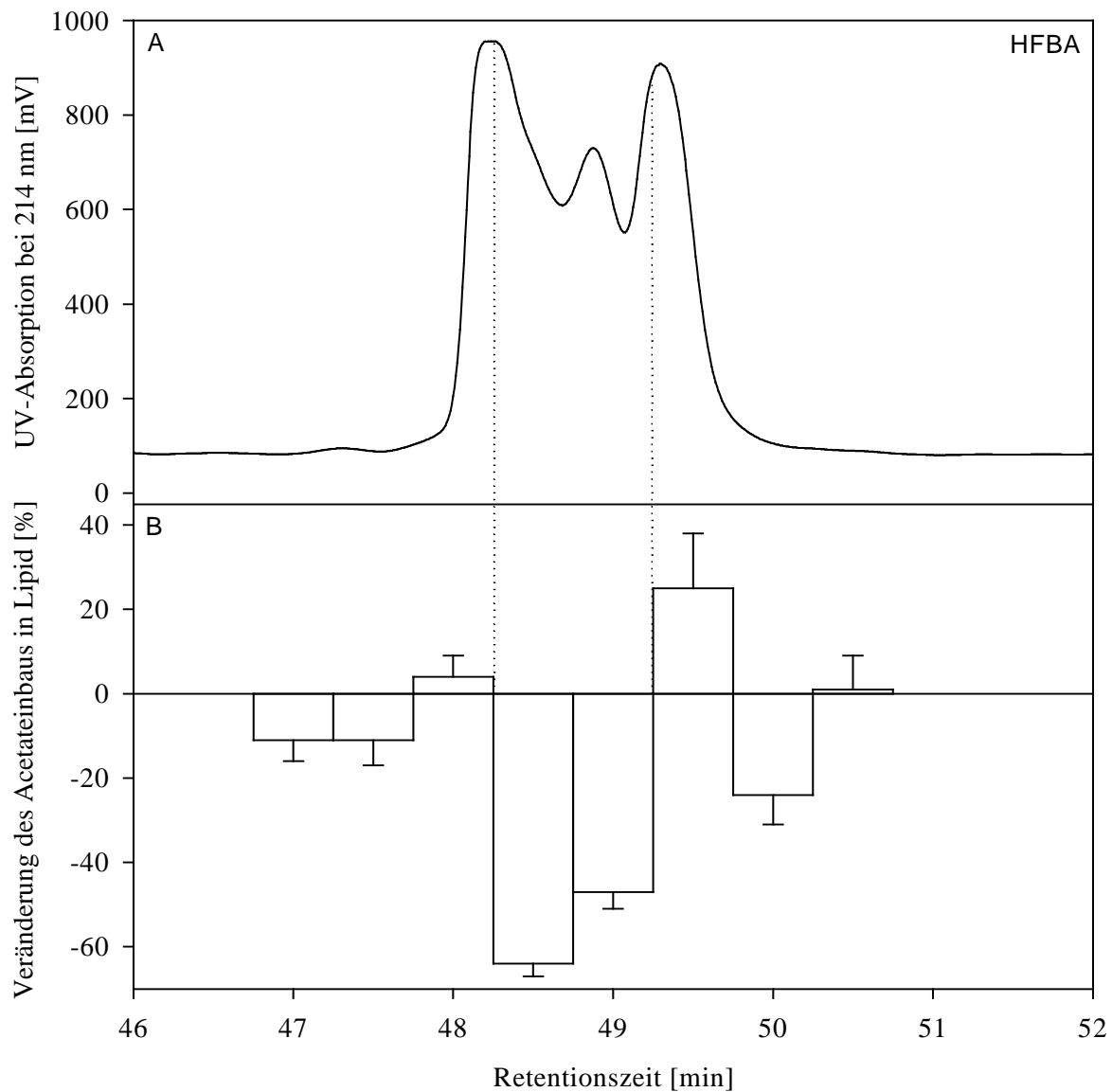


Abb. 4: 3. HPLC-Lauf von 52500 Blattlausäquivalenten, Laufbedingungen siehe 2.3.2. (A). ½-min-Fractionen wurden abgesammelt und im Biotest auf ihre Lipidsynthese-hemmende Wirkung untersucht. (B) Acetateinbau in Lipid unter Zugabe von je einer ½-min-Fraktion; % Abweichung von der Kontrolle (Mittelwerte ± S.E., n=10).

Der Peak wurde abgesammelt und, um Material zu sparen, ohne weitere Tests in einem 5. HPLC-Lauf weiter aufgereinigt (Abb. 6). Beim 5. HPLC-Lauf mit 19312,5 Blattlausäquivalenten wurden ebenfalls die Peaks abgesammelt und mittels Bioassay getestet. Peak 45 mit einer Hemmung der Einbaurrate von 82% wurde zur weiteren Aufreinigung einem 6. HPLC-Lauf unterzogen (Abb. 7). Die Peptide der Peakfraktion des 6. HPLC-Laufs wurden deblockiert und in einem 7. HPLC-Lauf gereinigt (Abb. 8), um die mutmaßlich deblockierten Peptide von den nativen Peptiden zu trennen. Der Peak mit den deblockierten Peptiden hatte eine kürzere Retentionszeit und wurde zusammen mit dem zweiten Peak (nicht-deblockierte Peptide) von Dr. R. Kellner mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. Der erste Peak mit den mutmaßlich deblockierten Peptiden enthielt eine Hauptkomponente mit einem Molekulargewicht von 950 Da und zwei Komponenten mit einem Molekulargewicht von 890 und 927 Da. Der zweite Peak enthielt keine zum ersten Peak korrespondierende Komponente. Durch die Analyse der Substanz des ersten Peaks mittels Edman-Abbau konnte leider nur die Teilsequenz -NFST- erhalten werden. Diese entspricht einem Teil des Grybi-AKHs: pQVNFSTGWamid.

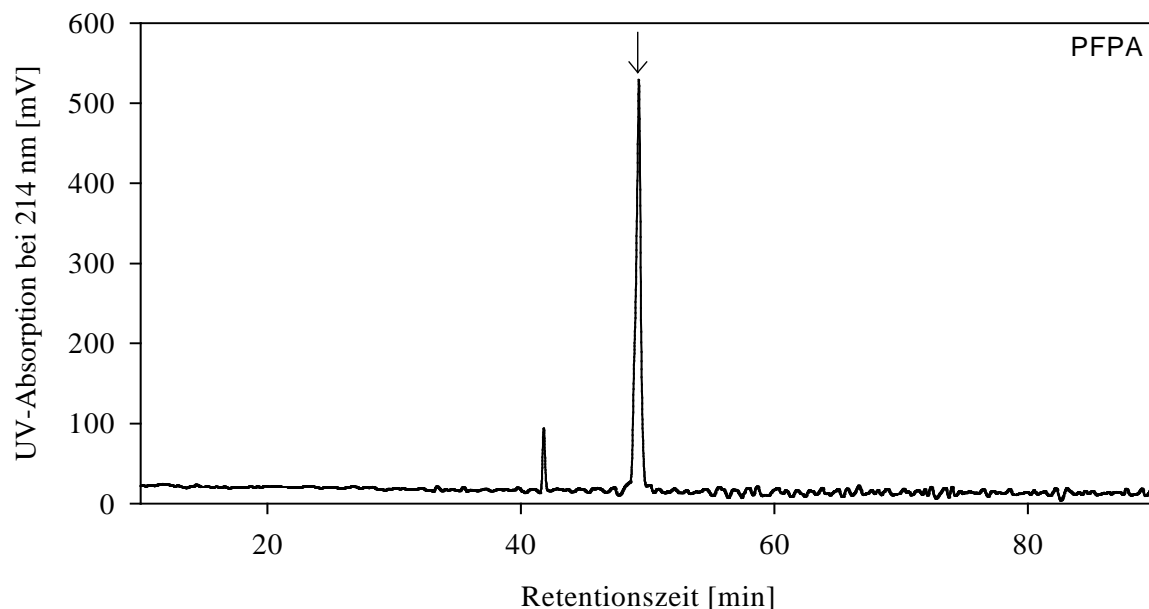


Abb. 5: 4. HPLC-Lauf von 51500 Blattlausäquivalenten, Laufbedingungen siehe 2.3.2. Peaks wurden abgesammelt. Der Peak, der weiter aufgereinigt wurde, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

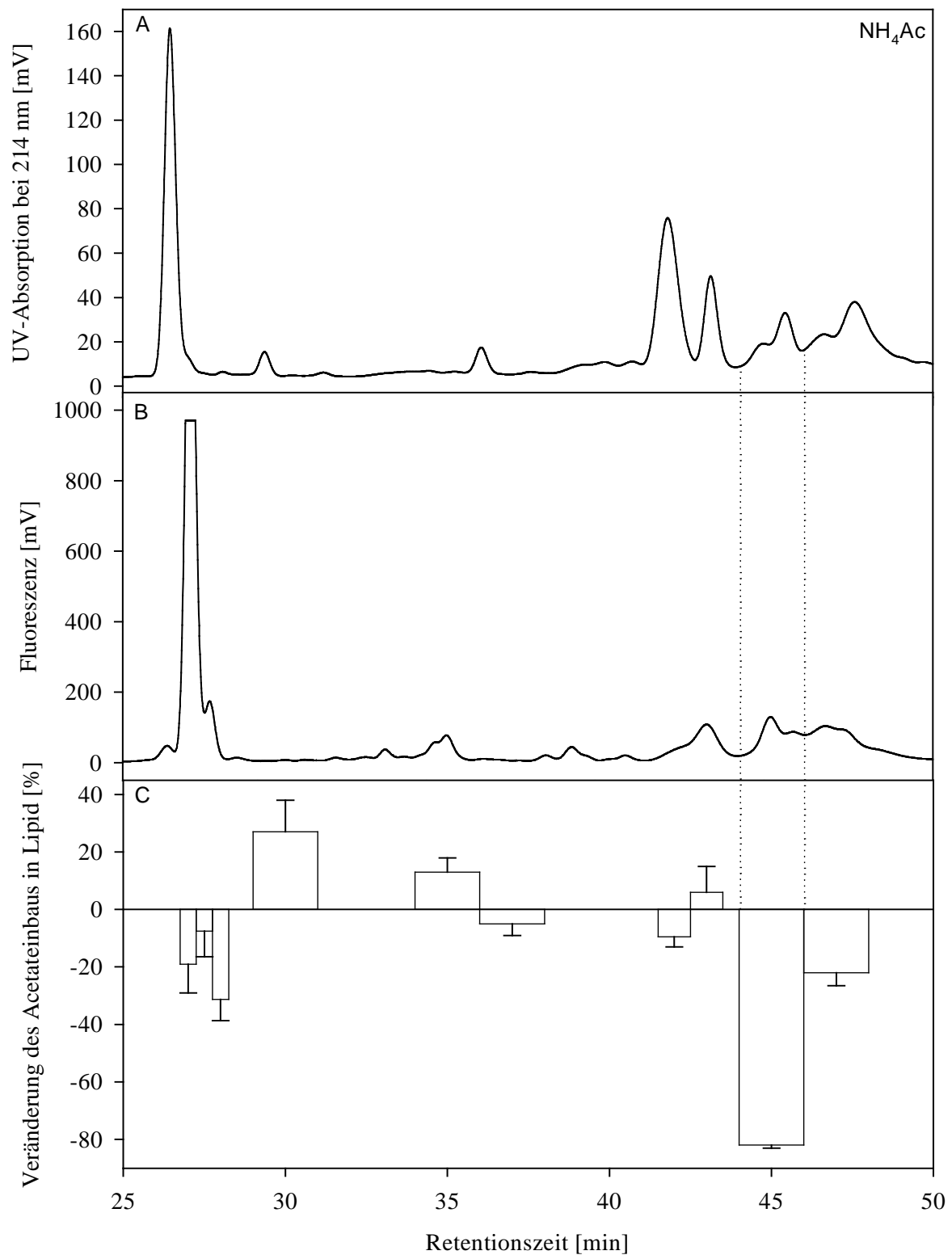


Abb. 6: 5. HPLC-Lauf von 19312,5 Blattläusäquivalenten, Laufbedingungen siehe 2.3.2 (A: UV-Detektion und B: FL-Detektion). Peaks wurden abgesammelt und im Biotest auf ihre adipokinetische Wirkung hin untersucht. (C) Acetateinbau in Lipid unter Zugabe von Peakfraktionen in % Abweichung von der Kontrolle (Mittelwerte \pm S.E., n=10).

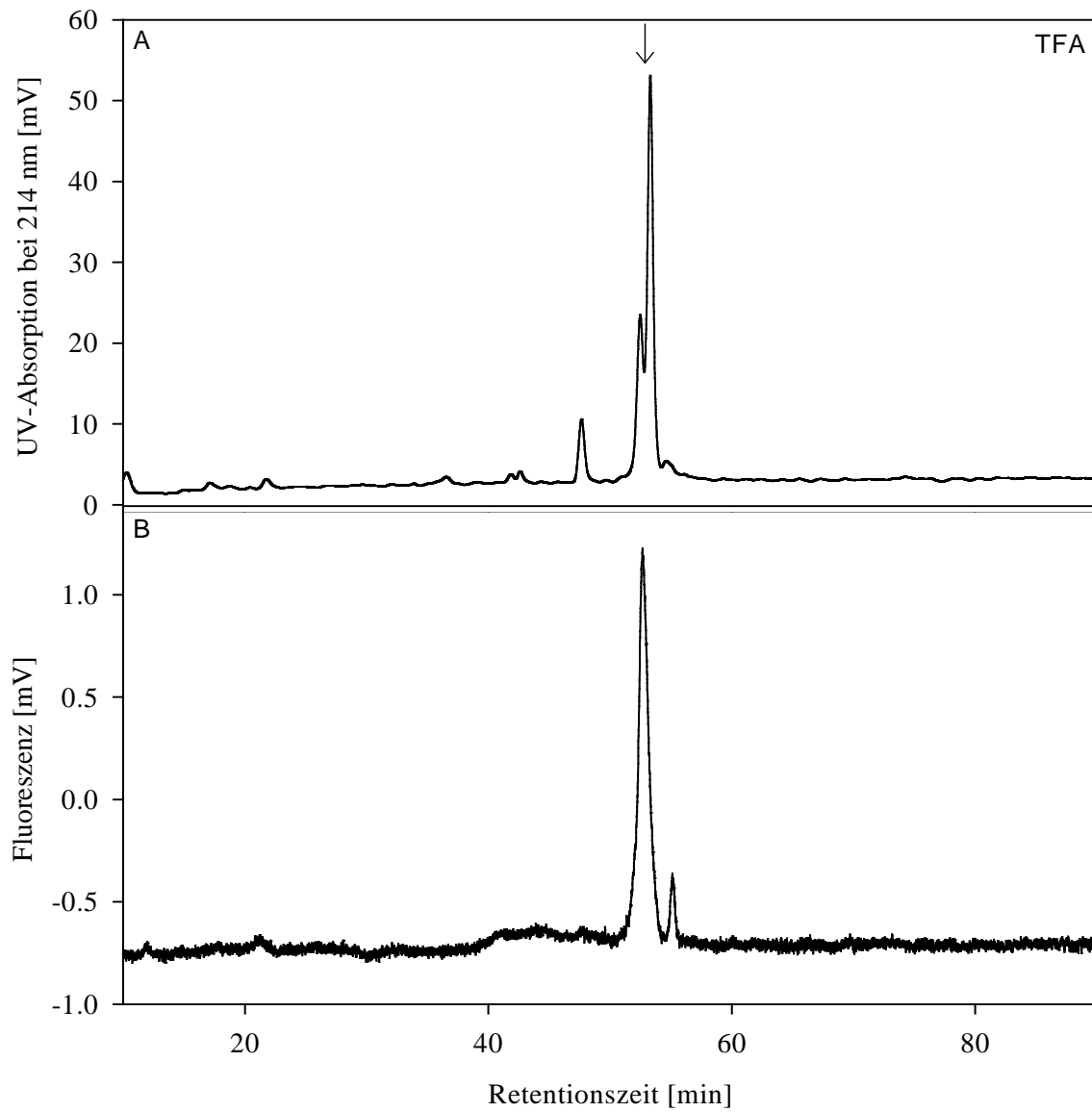


Abb. 7: 6. HPLC-Lauf von 50500 Blattlausäquivalenten, Laufbedingungen siehe 2.3.2 (A: UV-Detektion und B: FL-Detektion). Die Peaks wurden abgesammelt. Der Peak, der weiter aufgereinigt wurde, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

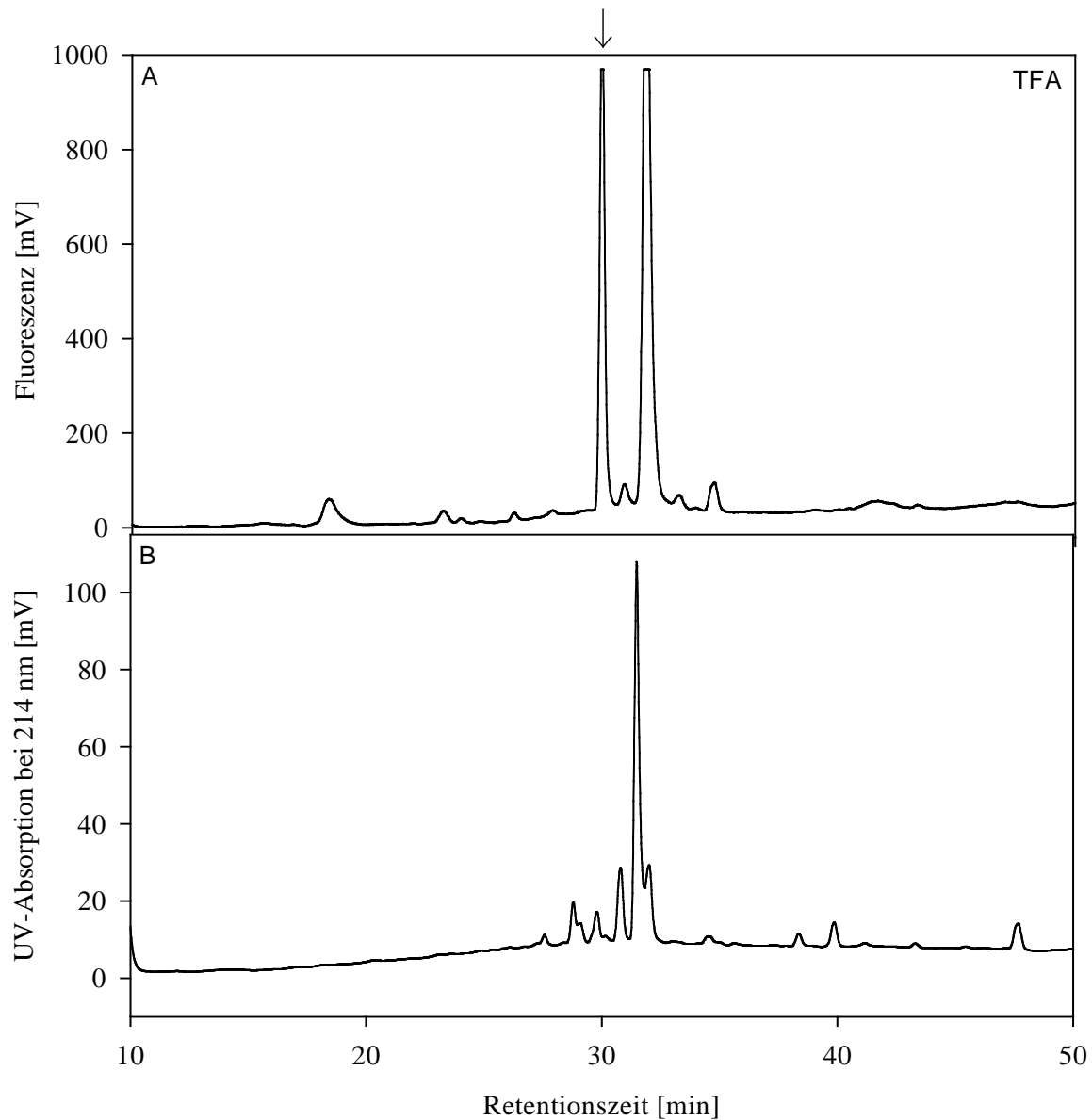


Abb. 8: 7. HPLC-Lauf, Laufbedingungen siehe 2.3.2 (A: FL-Detektion und B: UV-Detektion). Die Peaks wurden abgesammelt. Der Peak mit den mutmaßlich deblockierten Peptiden ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

3.2 Suche nach AKH im *A. pisum* Genom

Die Suche nach einem möglichen AKH im Genom von *A. pisum* führte zur Identifizierung von zwei Klonen (1556086257 und 1555717513). Beide Klone enthalten in ihren Aminosäuresequenzen die Peptidsequenz QVNFTPTWGQ-amid (Abb. 9 und 10).

```

5'-ccctctgcagtagttcatcattcgacaccgcacgagtcaccaacgaagctgaacaaacg 60
  ggatatcgatttcgaatccgctcagatctttcgcgtctaagtccaaaacttcgtccacgac 120
  cgtttgcaaatcgctcgacggtcactgcaaataataattttcatactcttaaactccgctc 180
  tccacgacttccatcaccaccatgcgccaccctggtggtggtggccggtggtcatggtgtgc 240
      M R T L L L L A V F M L C 13
  gcggtgcattgccgctcggtcagggtgaacttcacgccaacgtggggccagggcaagaggaac 300
  A C I A V G ↓ Q V N F T P T W G Q G K R N 33
  gcgcccgcacgcgacgagtgcaagtccatggacacgctcatctacatctacaagctggtc 360
  A P A S D E C K S M D T L I Y I Y K L V 53
  caggtaaaatacgtttttcgtggtttttcgttattaatttcgtaattttctccgcaatta 420
  Q V K Y V F R V F S L L I S * 67
  gattatataatattatataatctctatataggtttatataattatataactgtttgatggtc 480
  actcgggtgtaataatatgggtatgtcgtatgcggccgggcccgtgggtacctacacacaac 540
  gatttaatatagaaaaaatgtcgtaaacacaaaagggtatttgggtccttttagtacatatag 600
  gtctataacttacatcatcatagaatattataatacctaatacatattttataacgtgggt 660
  ctttactacatacgaatcgaatgacttctttattttccctcgctaataagtaataataaat 720
  attattattctaaagttggccggttaataccatagtgattatataattataataacagtccc 780
  gtctgcagcttaaacactttacataaataaccgaaaacgagcgcacgcgcatcataataaa 840
  tcagacttggaggtgcattatataattattataaattataatatttgtgtatattcgagag 900
  atcgcacttttttcccgaacaaggaacaaatatttttattttttcaattgataatggaca 960
  acgtacatgggtcattttttatttcggc-3' 985
  
```

Abb. 9: Nukleotidsequenz des Klons 1556086257 des *A. pisum* Genoms. Das mutmaßliche AKH-Peptid ist fett geschrieben, die KR cleavage site ist durch einen Kasten gekennzeichnet und das Glycin für die Amidierung ist unterstrichen. Das Ende des Signalpeptids ist durch einen abwärts gerichteten Pfeil markiert. Das Polyadenylierungssignal ist fett und kursiv dargestellt und * zeigt das Stopp-Codon an.

```

5'-tttgtccttggcccgttggcaaatacgctgggcccggacaataataataataatagataatt 60
      M I I 3
  ttaaagtcctgatccaggacttccatcaccaccatgcgccaccctggtggtggtggccggtg 120
  L K S V S R T S I T T M R T L L L L A V 23
  ttcatggtgtgcgcgctgcattgccgctcggtcagggtgaacttcacgccaacgtggggccag 180
  F M L C A C I A V G ↓ Q V N F T P T W G Q 43
  ggcaagaggaacgcgcccgcacgcgacgagtgcaagtccatggacacgctcatctacatc 240
  G K R N A P A S D E C K S M D T L I Y I 63
  tacaagctgggtccaggtaaaatacgtttttcgtggtttttcgttattaatttacgtaatt 300
  Y K L V Q V K Y V F R V F S L L I Y V I 83
  ttctccgcaattagattatataatattatataatctctatatatgatgaacttacttacgc 360
  F S A I R L Y N I I Y L Y I * 97
  attat-3' 365
  
```

Abb. 10: Nukleotidsequenz des Klons 1555717513 des *A. pisum* Genoms. Das mutmaßliche AKH-Peptid ist fett geschrieben, die KR cleavage site ist durch einen Kasten gekennzeichnet und das Glycin für die Amidierung ist unterstrichen. Das Ende des Signalpeptids ist durch einen abwärts gerichteten Pfeil markiert und * zeigt das Stopp-Codon an.

Das mutmaßliche AKH-Peptid besteht aus zehn Aminosäuren. Es enthält die Aminosäure Glutamin (Q) an Position eins, Phenylalanin (F) an Position vier, Tryptophan (W) an Position acht und am C-Terminus ein Glycin (G) für die Amidierung.

```

Acypi-AKHI(1556086257): -----MRTL L L L L L A V F M L C A C I A V G Q V N F T P T W G Q G K R N A P A S D E C K 37
Acypi-AKHII(1555717513): M I I L K S V S R T S I T T M R T L L L L A V F M L C A C I A V G Q V N F T P T W G Q G K R N A P A S D E C K 51
                        * * * * *
Acypi-AKHI(1556086257): S M D T L I Y I Y K L V Q V K Y V F R V F S L L I S ----- 67
Acypi-AKHII(1555717513): S M D T L I Y I Y K L V Q V K Y V F R V F S L L I Y V I F S A I R L Y N I I Y L Y I 97
                        * * * * *
    
```

Abb. 11: Alignment zwischen den Aminosäuresequenzen der Klone 1556086257 (Acypi-AKH I) und 1555717513 (Acypi-AKH II) des *A. pisum* Genoms. Das Alignment wurde mit CLUSTALW <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> durchgeführt (JEANMOUGIN et al., 1998). Das AKH-Peptid ist fett geschrieben. * zeigt eine 100% Homologie zwischen den Aminosäuresequenzen an. Das Ende des Signalpeptids ist durch einen abwärts gerichteten Pfeil markiert.

Das Alignment auf der Aminosäureebene zwischen den beiden Klonen zeigte, dass beide dasselbe AKH-Peptid enthalten, die 5' und die 3' Enden jedoch unterschiedlich lang sind und sich in einer Aminosäure unterscheiden (Abb. 11). Daher wurden die Klone Acypi-AKH II und Acypi-AKH II genannt.

Das Alignment zwischen Acypi-AKH I, Acypi-AKH II und den bereits bekanten AKH Präprohormonen von *Manduca sexta*, *Periplaneta americana*, *Blaberus discoidalis*, *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Schistocerca nitens*, *Schistocerca gregaria* und *Locusta migratoria*, sowie den RPCH (red pigment concentrating hormone) Präprohormonen von *Carcinus maenas* und *Callinectes sapidus* (siehe 8.1) zeigte, dass alle Precursor in ihren Sequenzen ein AKH/RPCH-Peptid enthalten, das mit der Aminosäure Glutamin (Q) an Position eins beginnt, ein Phenylalanin (F) an Position vier und ein Tryptophan (W) an Position acht enthält (Abb. 12).

Die Abbildung 13 stellt die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse der mutmaßlichen *A. pisum* AKH Precursor mit Blattlaus-verwandten Arten, wie Schaben und Heuschrecken, sowie mit zwei Arten der Dipteren und einer Lepidopterenart dar. Die AKH Precursor können in drei Gruppen eingeteilt werden: Die erste Gruppe ist die Gruppe der Heuschrecken mit den AKH Precursor von *S. nitens*, *S. gregaria* und *L. migratoria*. Die zweite Gruppe enthält die mutmaßlichen *A. pisum* AKH Precursor, zusammen mit den AKH Precursor der Lepidopterenart *M. sexta*, der Schaben *P. americana* und *B. discoidalis*, sowie dem *A. gambiae* AKH II Precursor. Die letzte Gruppe ist die Dipteregruppe mit dem *D. melanogaster* AKH und dem *A. gambiae* AKH I Precursor. Die verwendeten cDNA-Sequenzen sind unter 8.1 angegeben.

Acypi-AKH I (1556086257)	-----MRTL LLLAVFMLCACIAVGQVNFPTPWGQ-----	29
Acypi-AKH II (1555717513)	MIILKSVSRSTSITMRTL LLLAVFMLCACIAVGQVNFPTPWGQ-----	43
Manse-AKH	-----MYKLTVFLMFIAFVIAEAQLTFTSSWG-----G	29
Peram-AKH	-----MG-WVLKALVVIAALIAVMCEAQLTFTPNWG-----	30
Bladi-AKH	-----MN-HLVKVLIVVVAIALVLCEAQVNFSPGWGT-----	31
Drome-AKH	-----MNPKSEVLIAAVLFMLLACVQCQLTFTSPDWG-----	31
Anoga-AKH I	-----MDTVKLFVLLICASLMLITEAQLTFTPAWG-----	31
Schni-AKH I	-----MVQRCLVVALLVVVVAAALCSAQLNFTPNWGT-----	32
Schgr-AKH I	-----MVQRCLVVALLVVVVAAALCSAQLNFTPNWGT-----	32
Locmi-AKH I	-----MVQRCALVVLLVVAVAAALCSAQLNFTPNWGT-----	32
Schni-AKH II	-----MRQGCALTLMLLVVCAALSAALNFTSTGWG-----	31
Schgr-AKH II	-----MRQSCALTLMLVVAVCAALSAALNFTSTGWG-----	31
Locmi-AKH II	-----MTQSCTLTLVLLVAVLAALATAQLNFTSAGWG-----	31
Locmi-AKH III	-----MQVRAVLVLAVALVAVATSRAQLNFTPNWGT-----	31
Anoga-AKH II	--MNSISSSRHLAAKFLFLLVALCAVLLPVPSAGQVTFSRDWNAG-----	42
Calsa-RPCH	-----MVRRSVGTLLVVALLVVTLMSVSAQLNFTSPGWGKRAAGASG	42
Carma-RPCH	-----MVRRTGVTLVVALVVVALVSSVSAQLNFTSPGWGKRAAAGSG	42
	* * *	
Acypi-AKH I (1556086257)	-----GKR NAPASD-----ECKSM DTLIYIYKL	52
Acypi-AKH II (1555717513)	-----GKR NAPASD-----ECKSM DTLIYIYKL	66
Manse-AKH	KR-----AMTNSIS-----CR--NDEAIAAIYKA	51
Peram-AKH	-----KRSGLQDG-----PCKL-STEVL MHIYKL	53
Bladi-AKH	-----GKR SAVQDS-----PCKG-SAESLMYIYKL	55
Drome-AKH	-----KRSVGGAGPGTFFETQ-QG--NCKT-SNEM LLEIFRF	64
Anoga-AKH I	-----KRSQGAMGINPLGSTFGQD--ACKT-PVDSLLVIYRM	65
Schni-AKH I	-----GKR DAGD-----YGD PYSFLYRL--	50
Schgr-AKH I	-----GKR DAAD-----FGDPYSFLYRL--	50
Locmi-AKH I	-----GKR DAAD-----FAD PYSFLYRL--	50
Schni-AKH II	-----RRYADP-----NAD PMAFLYKL--	48
Schgr-AKH II	-----RRYADP-----NAD PMAFLYKL--	48
Locmi-AKH II	-----RRYADP-----NAD PMAFLYRL--	48
Locmi-AKH III	-----KRALGAPAAG-----DCVSASPQALLSILNA	57
Anoga-AKH II	-----KRAMPDSPVSG-----VAECSAIWRPVNNLCAA	70
Calsa-RPCH	SNGGVGEAVSGLHPSVGGAPGGVPPGSSSP-GDSCGPIPVSAVMHIYRL	91
Carma-RPCH	SNGGVGEAVSALHHSVGGAPGGVPPGSSSSSGDSCGPIPVSAVMHIYRL	92
Acypi-AKH I (1556086257)	VQVKYVFRVFSLLIS-----	67
Acypi-AKH II (1555717513)	VQVKYVFRVFSLLIYVIFSAIRLYNIIYLYI-----	97
Manse-AKH	IQNEAERFIMCQKN-----	65
Peram-AKH	VETEAQKLVCEGKFGGN-----	70
Bladi-AKH	VQNEAQKILECEKFSSN-----	72
Drome-AKH	VQSQAQLFLDCKHRE-----	79
Anoga-AKH I	IQAEAQKIVDCSQK-----	79
Schni-AKH I	IQAEARKMSGCSN-----	63
Schgr-AKH I	IQAEARKMSGCSN-----	63
Locmi-AKH I	IQAEARKMSGCSN-----	63
Schni-AKH II	IQIEARKLAGCSN-----	61
Schgr-AKH II	IQIEARKL SGCSN-----	61
Locmi-AKH II	IQIEARKLAGCSN-----	61
Locmi-AKH III	AQAEVQKLI DCSRFTSEANS-----	77
Anoga-AKH II	VTKNIQH LTL CETRSLKSLQTDEASMESNSGNNLPMF SNNHI	113
Calsa-RPCH	IRSEAVRLVQCQDEEYLG-----	109
Carma-RPCH	IRNEAVRLVQCQDEEYLG-----	110

Abb. 12: Alignment zwischen den AKH Präprohormonen. Die Gensequenzen sind aus der Genbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (siehe 8.1). Das Alignment wurde mit CLUSTALW <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> durchgeführt (JEANMOUGIN et al., 1998). Links sind die Namen der Precursor angegeben. Die Aminosäuresequenzen, die in allen Precursor identisch sind, sind mit einem Stern gekennzeichnet.

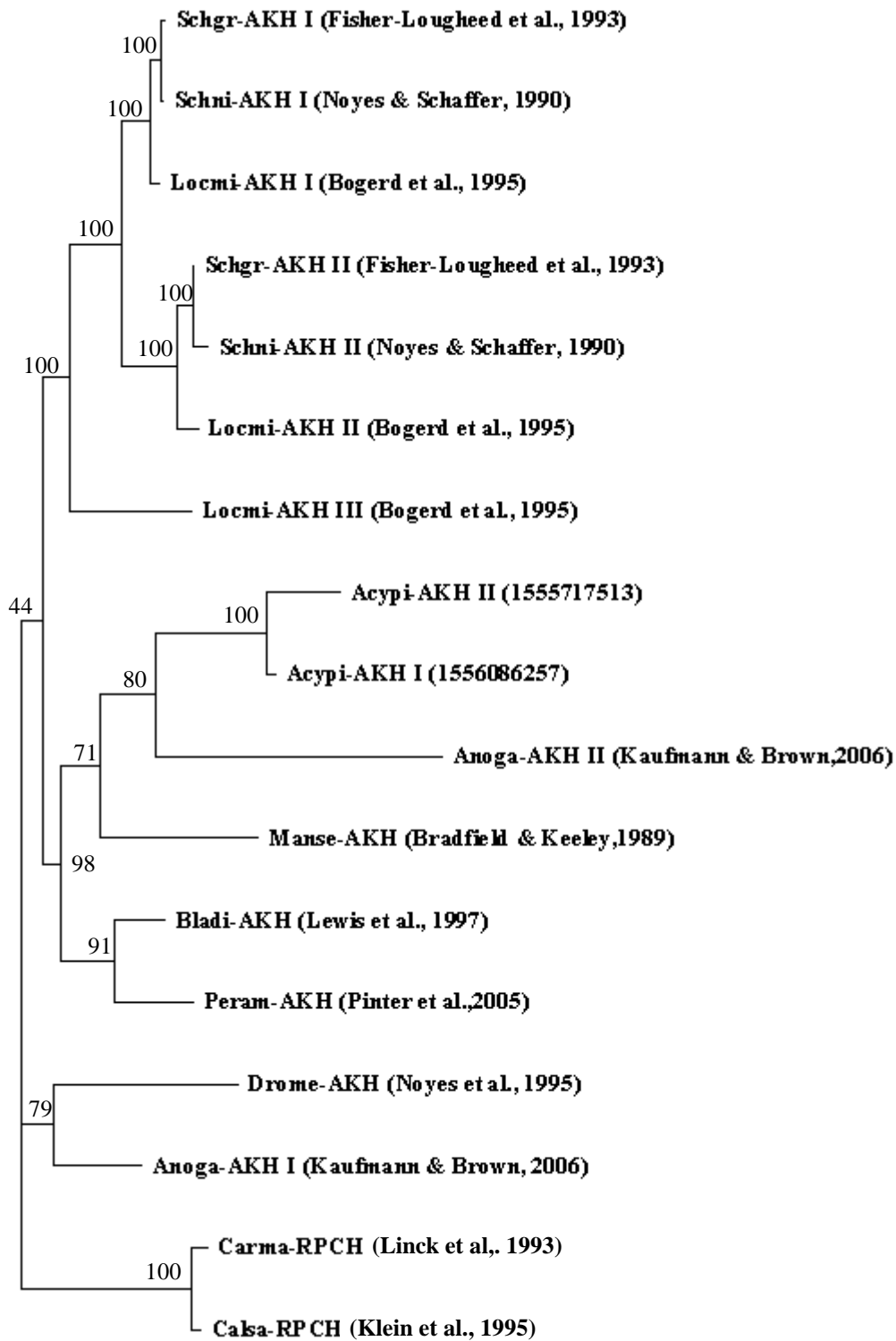


Abb. 13: Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse zwischen AKH/RPCH Präprohormonen. Als Außengruppe wurden die RCPH Präprohormone von *C. maenas* und *C. sapidus* verwendet, wie zuvor bei MARTÍNEZ-PÉREZ et al. (2002) beschrieben. Die Zahlen über den Astgabeln geben den Prozentsatz von 1000 Neighbor-joining Bootstraps an. Äste mit einer > 70 %igen Bootstrap Unterstützung werden als sicher angesehen.

3.3 Stoffbestand

3.3.1 Frischgewicht

Das Frischgewicht der ungeflügelten und der geflügelten Blattläuse stieg vom vierten Larvenstadium zum Adultstadium an. Die Apteræ nahmen von Beginn des vierten Larvenstadiums bis zu Tag drei des Adultstadiums an Gewicht zu (Spearman Rangkorrelation: $R = 0,872$; $p = 0$) und behielten dann ihr Gewicht bis zum Alter von 20 Tagen bei (Spearman Rangkorrelation: $R = 0,034$; $p = 0,786$) (Abb. 14). Bei der geflügelten Morphe hingegen stieg das Gewicht vom Beginn zum Ende des vierten Larvenstadiums an (Spearman Rangkorrelation: $R = 0,739$; $p = 0$), fiel zum Adultstadium leicht ab (Spearman Rangkorrelation: $R = -0,472$; $p = 2,1 \times 10^{-4}$) und stieg dann wieder bis zum hohen Alter kontinuierlich an (Spearman Rangkorrelation: $R = 0,781$; $p = 0$). Das Gewicht der Apteræ war immer signifikant höher als das der Alatae. Die einzige Ausnahme bildete Tag 20 des Adultstadiums, an dem die geflügelte Morphe nur tendenziell schwerer war als die ungeflügelte.

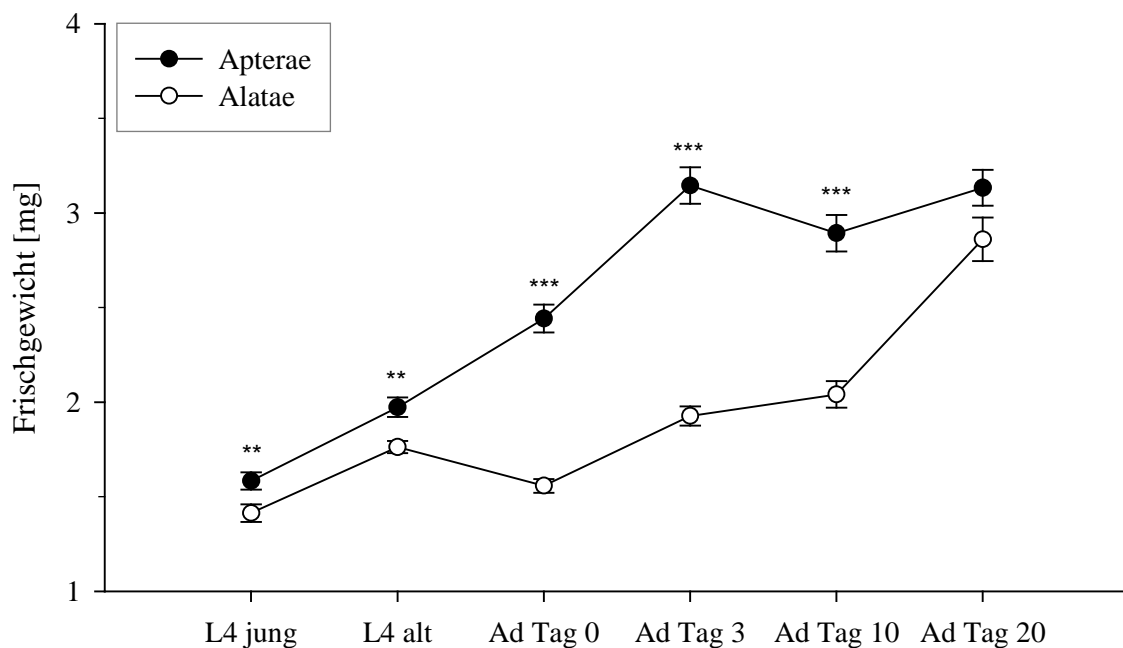


Abb. 14: Frischgewichte geflügelter und ungeflügelter Blattläuse im vierten Larvenstadium (L4) und im Adultstadium (Ad) unterschiedlichen Alters. Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 20-35 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

3.3.2 Trockengewicht

Der Anteil des Trockengewichts am Frischgewicht lag bei den beiden Morphen zwischen 16,8 und 23,7% (Abb. 15). Das Trockengewicht der geflügelten Morphe nahm vom Larvenstadium zum Adultstadium zu (Spearman Rangkorrelation: $R = 0,649$; $p = 0,042$) und dann mit steigendem Alter wieder ab (Spearman Rangkorrelation: $R = -0,970$; $p = 1,4 \times 10^{-5}$). Bei der ungeflügelten Morphe stieg der Anteil des Trockengewichts vom Beginn zum Ende des vierten Larvenstadiums an (Spearman Rangkorrelation: $R = 0,866$; $p = 5,67 \times 10^{-4}$), fiel dann zum ersten Tag des Adultstadiums ab (Spearman Rangkorrelation: $R = -0,772$; $p = 0,003$), um zu Tag drei des Adultstadiums wieder anzusteigen (Spearman Rangkorrelation: $R = 0,869$; $p = 2,42 \times 10^{-4}$) und schließlich zum Ende der Messperiode wieder abzufallen (Spearman Rangkorrelation: $R = -0,892$; $p = 2,25 \times 10^{-4}$). Im letzten Larvenstadium war das Trockengewicht der Alatae tendenziell, am ersten Tag ihres Adultstadiums signifikant höher als das der Apterae. Im späteren Adultstadium war kein Unterschied mehr zwischen den beiden Morphen zu erkennen.

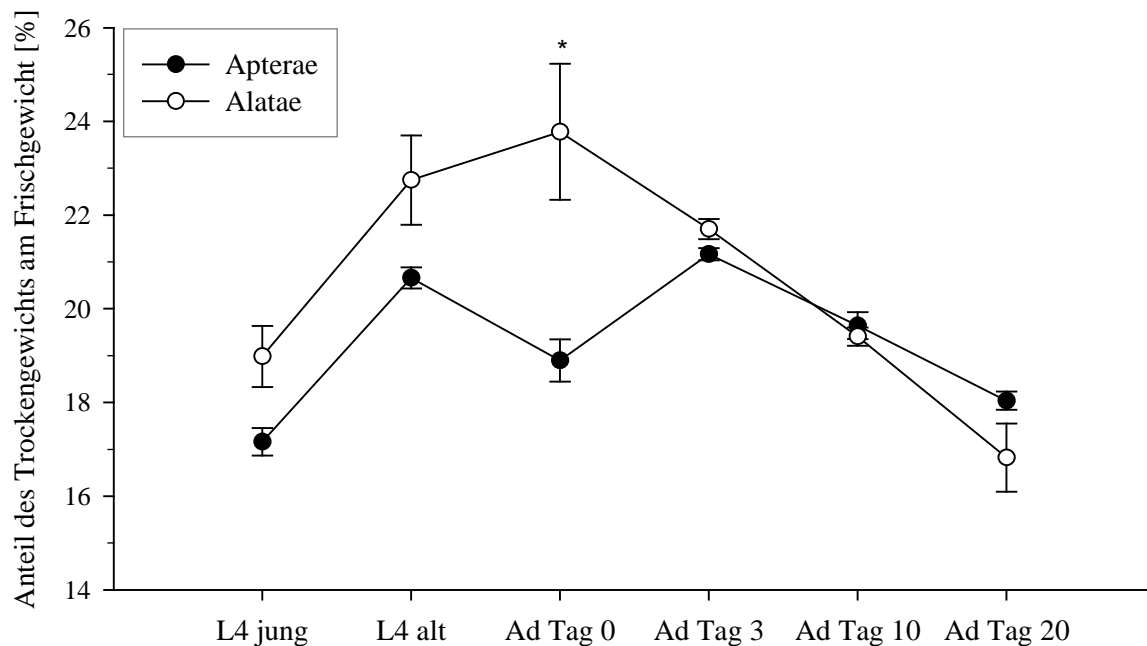


Abb. 15: Anteil Trockengewicht am Frischgewicht geflügelter und ungeflügelter Blattläuse im Larvenstadium (L4) und im Adultstadium (Ad) unterschiedlichen Alters. Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 5 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

3.3.3 Protein

Der Proteingehalt änderte sich bei der ungeflügelten Morphe vom Larven- zum Adultstadium (Spearman Rangkorrelation: $R = 0,186$; $p = 0,145$) und von Tag drei des Adultstadiums bis zum hohen Alter (Spearman Rangkorrelation: $R = -0,103$; $p = 0,424$) nicht signifikant, nahm aber von nulltägigen zu dreitägigen Adulttieren ab (Spearman Rangkorrelation: $R = -0,384$; $p = 0,013$) (Abb. 16). Von Beginn des vierten Larvenstadiums bis zum ersten Tag des Adultstadiums nahm der Proteingehalt der geflügelten Morphe zu (Spearman Rangkorrelation: $R = 0,396$; $p = 0,003$) und dann mit steigendem Alter wieder ab (Spearman Rangkorrelation: $R = -0,339$; $p = 0,004$). Die geflügelten Blattläuse hatten, abgesehen von Tag zehn des Adultstadiums, immer einen signifikant höheren Gehalt an Protein als die ungeflügelten.

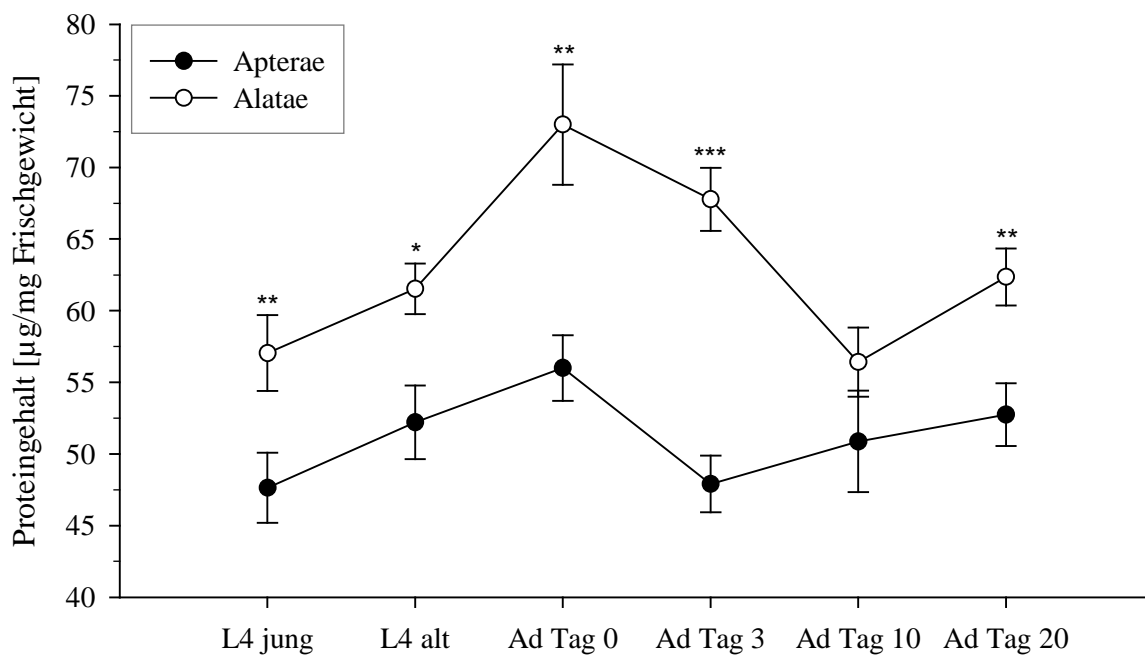


Abb. 16: Proteingehalt im vierten Larvenstadium (L4) und im Adultstadium (Ad) unterschiedlichen Alters. Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 16-23 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

3.3.4 Glykogen

Der Gehalt an Glykogen stieg bei beiden Morphphen vom Anfang zum Ende des letzten Larvenstadiums stark an (Mann-Whitney-U Test: Apterae: $p = 0$; Alatae: $p = 0$) und nahm

dann mit zunehmendem Alter wieder ab (Spearman Rangkorrelation: Apteræ: $R = -0,718$; $p = 0$; Alatae: $R = -0,620$; $p = 0$) (Abb. 17). Die geflügelten Larven hatten am Ende des vierten Larvenstadiums einen höheren Glykogengehalt als die ungeflügelten, in den anderen Altersstadien war der Glykogengehalt beider Morphen nicht signifikant verschieden.

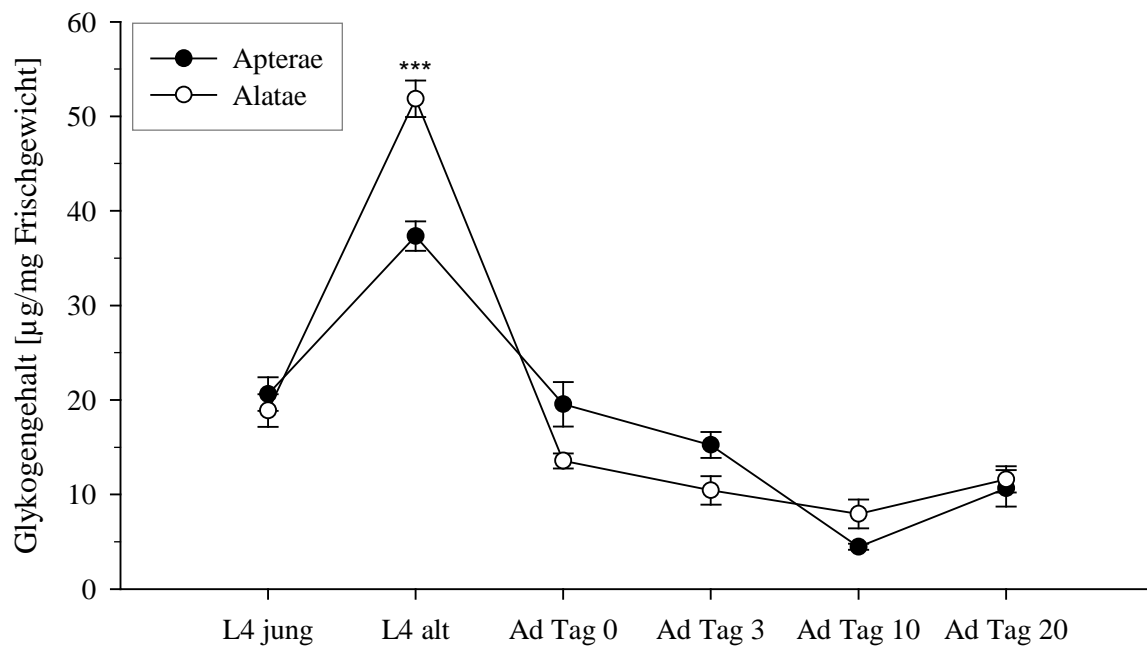


Abb. 17: Glykogengehalt im vierten Larvenstadium (L4) und im Adultstadium (Ad) unterschiedlichen Alters. Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 17-25 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

3.3.5 Freie Kohlenhydrate

Der Gehalt an freien Kohlenhydraten blieb bei der ungeflügelten Morphe während der verschiedenen Altersstadien konstant (Spearman Rangkorrelation: $R = -0,048$; $p = 0,580$), nur an Tag drei des Adultstadiums war der Kohlenhydratgehalt signifikant höher als an den Tagen zuvor und danach (Mann-Whitney-U Test mit Bonferroni-Korrektur: in Bezug auf Tag null: $p = 1,28 \times 10^{-4}$; in Bezug auf Tag zehn: $p = 9,82 \times 10^{-4}$) (Abb. 18). Bei den Alatae nahm der Gehalt an freien Kohlenhydraten vom Beginn zum Ende des letzten Larvenstadiums zu (Mann-Whitney-U Test: $p = 2,45 \times 10^{-4}$). Im Adultstadium blieb der Kohlenhydratgehalt konstant (Spearman Rangkorrelation: $R = 0,035$; $p = 0,728$). Die geflügelte Morphe hatte am Ende des vierten Larvenstadiums und während des Adultstadiums, außer an Tag drei, einen höheren Gehalt an freien Kohlenhydraten als die ungeflügelte Morphe.

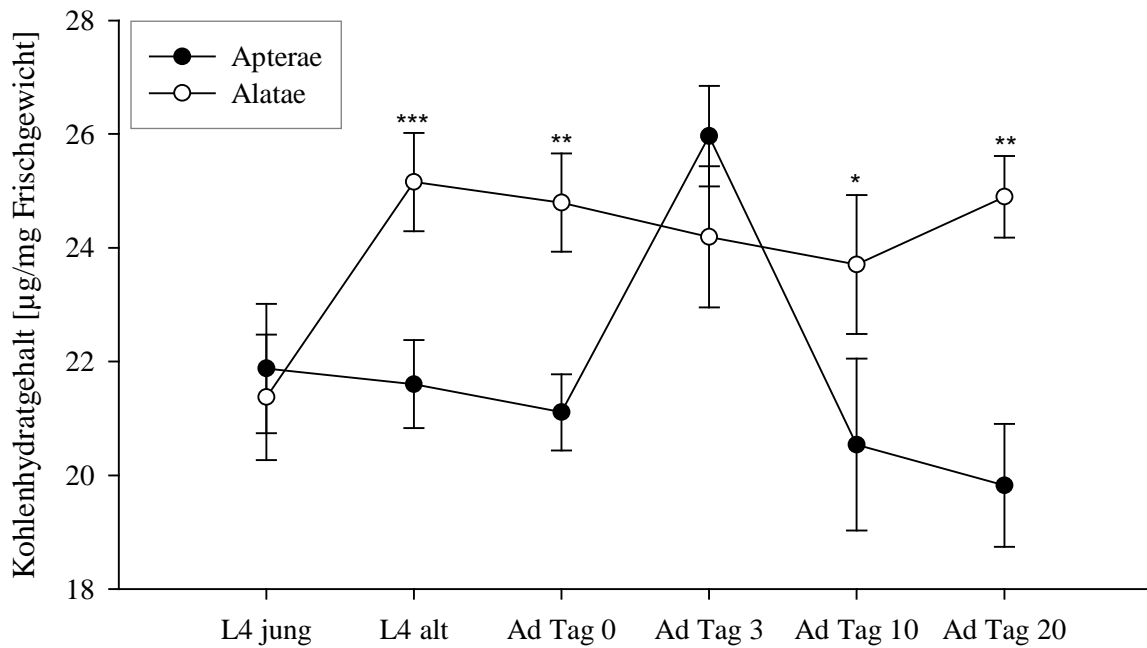


Abb. 18: Kohlenhydratgehalt im vierten Larvenstadium (L4) und im Adultstadium (Ad) unterschiedlichen Alters. Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 19-24 Kohorten, n=10 pro Kohorte.

3.3.6 Lipid

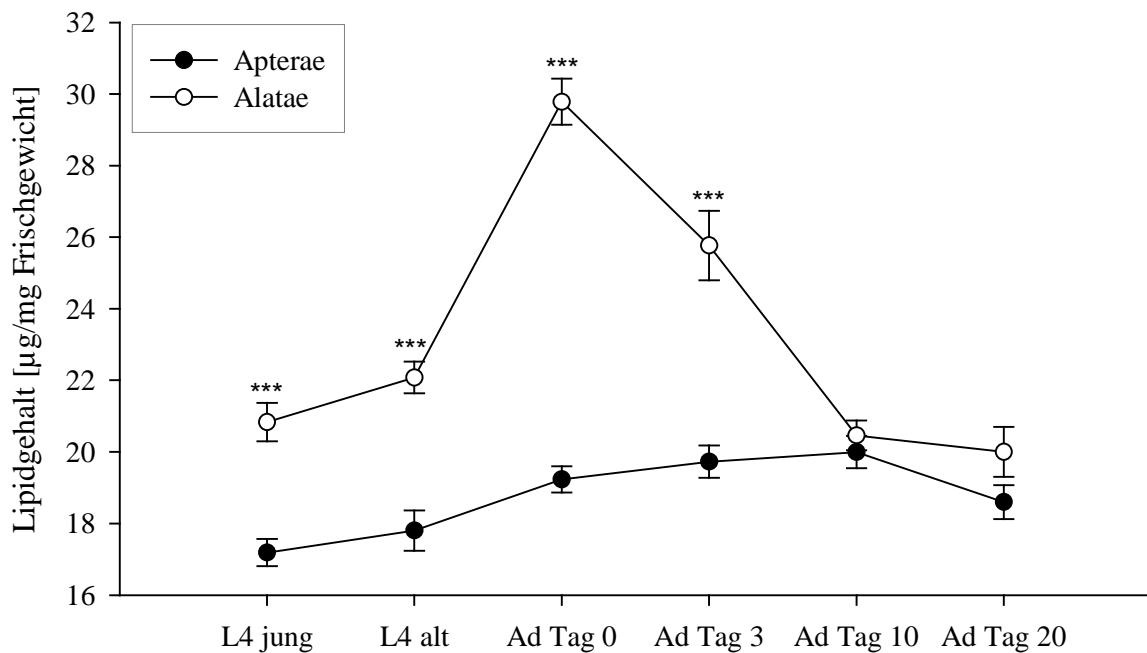


Abb. 19: Lipidgehalt im vierten Larvenstadium (L4) und im Adultstadium (Ad) unterschiedlichen Alters. Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 18-25 Kohorten, n=10 pro Kohorte.

Bei der ungeflügelten Morphe stieg der Lipidgehalt mit zunehmendem Alter an (Spearman Rangkorrelation: $R = 0,285$; $p = 9,59 \times 10^{-4}$) (Abb. 19). Bei der geflügelten Morphe dagegen nahm der Gehalt an Lipid nur bis zum ersten Tag des Adultstadiums stark zu (Spearman Rangkorrelation: $R = 0,776$; $p = 0$) und danach mit steigendem Alter wieder ab (Spearman Rangkorrelation: $R = 0,754$; $p = 0$). Der Lipidgehalt war bei den Alatae während des letzten Larvenstadiums und bis zu Tag drei des Adultstadiums höher als bei den Apteræ.

3.3.7 Stoffbestand gesamt

Vergleicht man alle gemessenen Komponenten der Stoffbestandsuntersuchungen, so war bei beiden Morphen und in allen Altersstadien Protein der Bestandteil, der in der größten Menge enthalten war (Abb. 20 und Abb. 21). Nur am Ende des vierten Larvenstadiums erreichte Glykogen ähnlich hohe Werte wie Protein. Glykogen war in diesem Lebensstadium bei beiden Morphen auch in größerer Menge vorhanden als freie Kohlenhydrate und Lipid. Im weiteren Altersverlauf, bei der geflügelten Morphe schon ab Tag null, bei der ungeflügelten erst ab Tag zehn, war Glykogen der Bestandteil, der in der geringsten Menge vorlag.

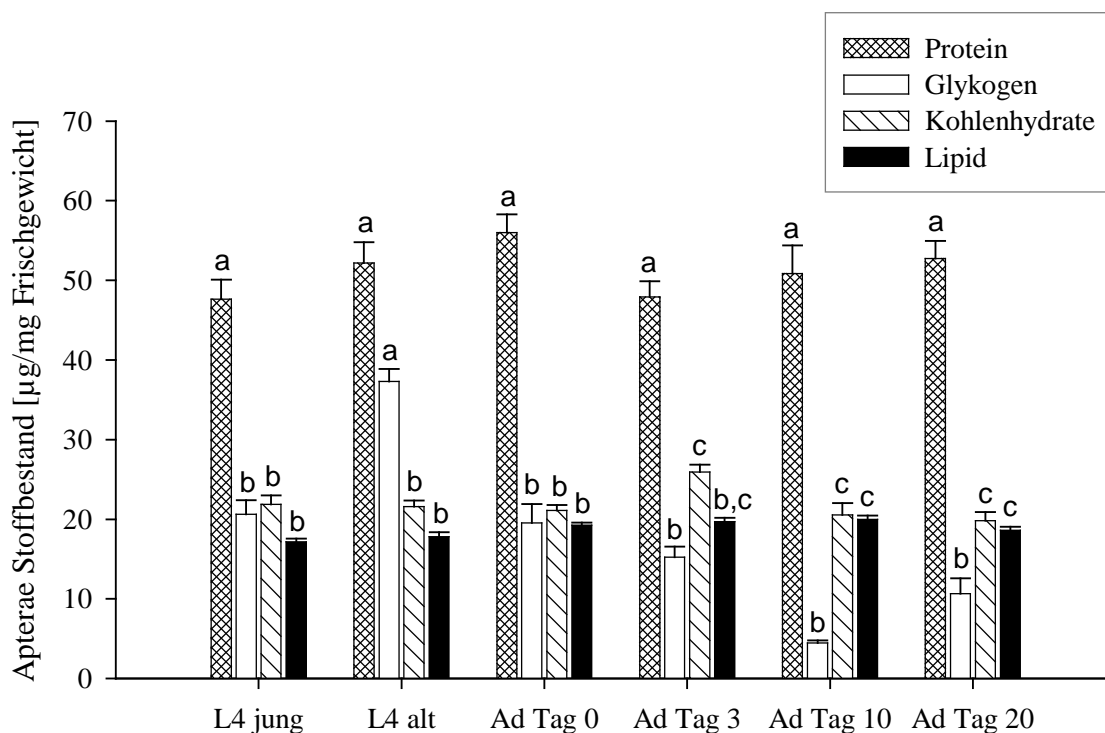


Abb. 20: Stoffbestand im vierten Larvenstadium (L4) und im Adultstadium (Ad) von Apteræ unterschiedlichen Alters. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant bei $p \leq 0,05$. Kruskal-Wallis-ANOVA, Mittelwerte \pm S.E., 16-25 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

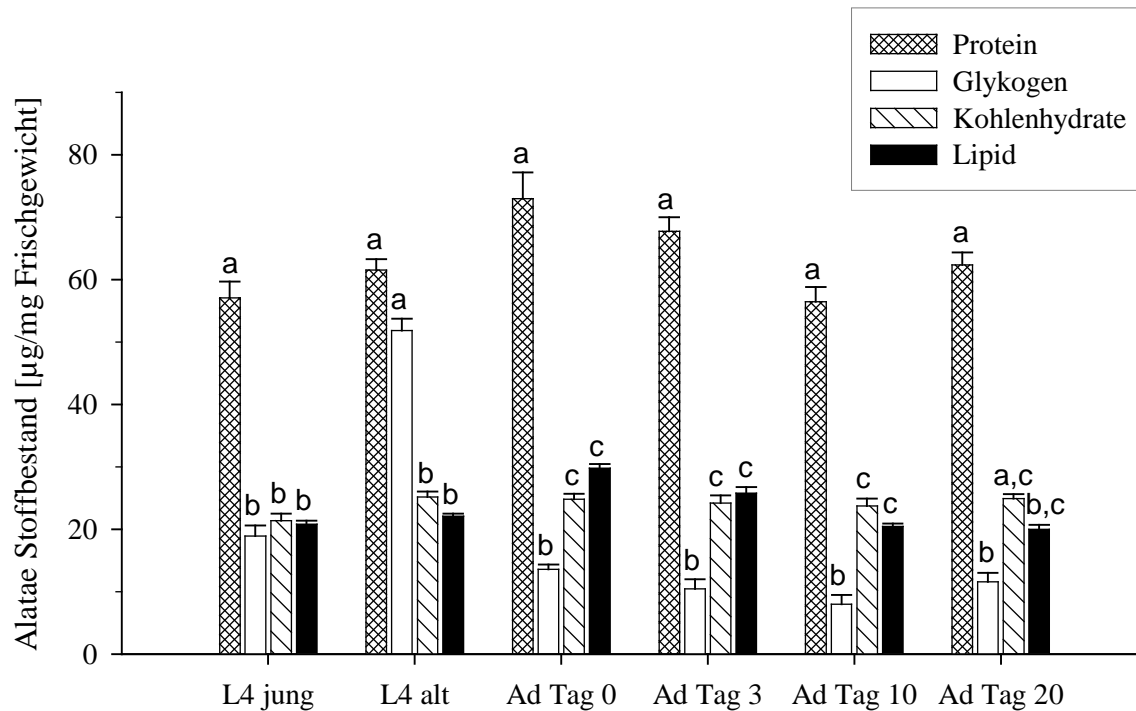


Abb. 21: Stoffbestand im vierten Larvenstadium (L4) und im Adultstadium (Ad) von Alatae unterschiedlichen Alters Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant bei $p \leq 0,05$. Kruskal-Wallis-ANOVA, Mittelwerte \pm S.E., 16-25 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

Bei der ungeflügelten Morphe war der Gehalt an Glykogen erst ab Tag zehn des Adultstadiums signifikant geringer als der Kohlenhydrat- und Lipidgehalt. Lipid und freie Kohlenhydrate waren in allen gemessenen Altersstadien in vergleichbarer Menge vorhanden.

3.4 Einfluss der Färbung der Blattläuse auf Gewicht und stoffliche Zusammensetzung

3.4.1 Frischgewicht

Rosa gefärbte Larven im letzten Larvenstadium hatten ein signifikant höheres Frischgewicht als Larven mit einer hellen Färbung (Abb. 22 und Abb. 23). Bei den Apterae an Tag null des Adultstadiums kann man ein ähnliches Bild erkennen: Blattläuse mit rosa und hellrosa Färbung erreichten ein höheres Gewicht als hell gefärbte Tiere. Auch an Tag drei des Adultstadiums hatten hellrosa gefärbte Apterae ein höheres Gewicht als helle.

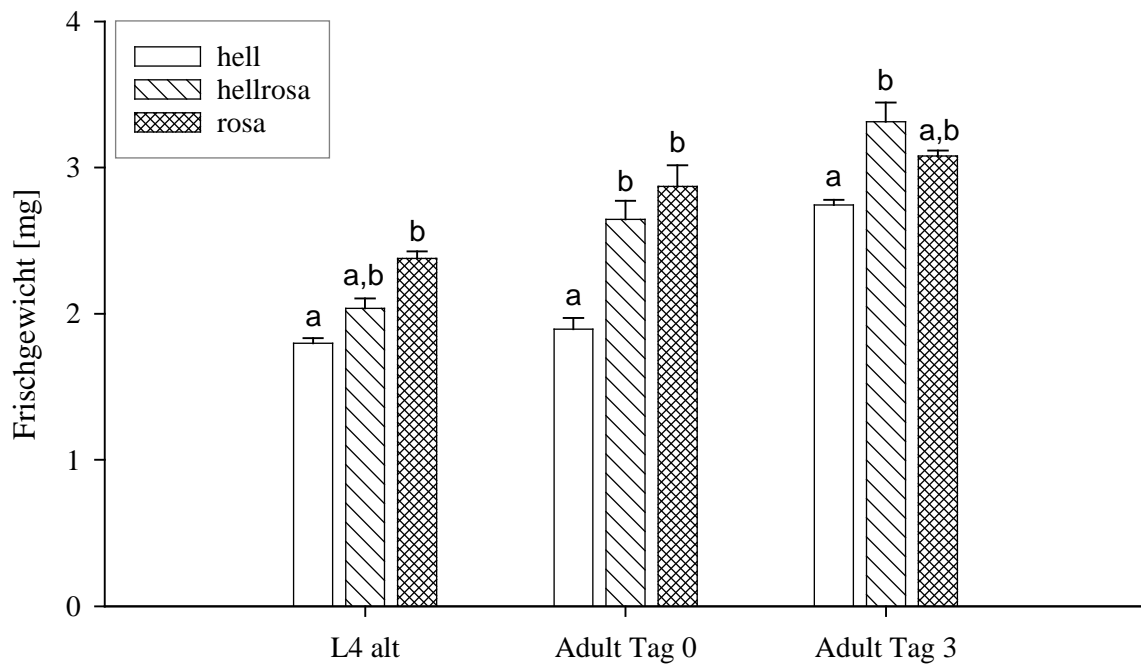


Abb. 22: Frischgewicht im vierten Larvenstadium (L4) und im Adultstadium (Adult) von hellen, hellrosa und rosa Apterae unterschiedlichen Alters. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant bei $p \leq 0,05$. Kruskal-Wallis-ANOVA, Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 3-16 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

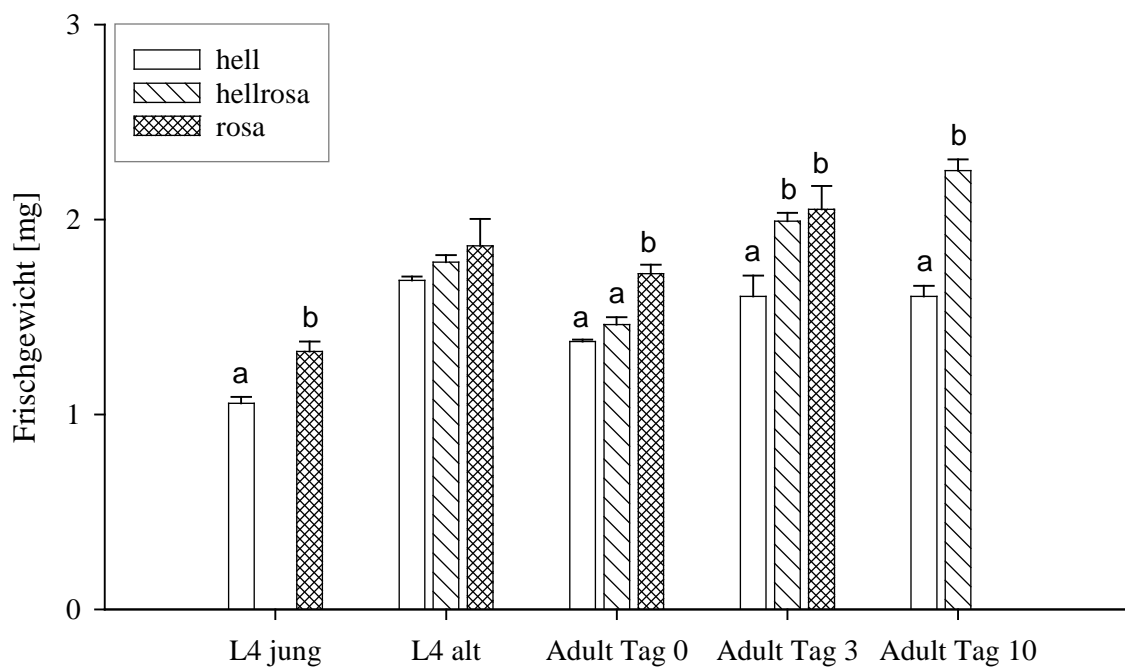


Abb. 23: Frischgewicht im vierten Larvenstadium (L4) und im Adultstadium (Adult) von hellen, hellrosa und rosa Alatae unterschiedlichen Alters. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant bei $p \leq 0,05$. Kruskal-Wallis-ANOVA, Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 2-18 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

Bei der geflügelten Morphe waren, abgesehen von den alten Larven des vierten Larvenstadiums, alle Blattläuse mit rosa bzw. hellrosa Farbe schwerer als hell gefärbte. Sowohl bei jungen Larven des letzten Larvenstadiums, als auch bei nulltägigen, dreitägigen und zehntägigen Adulttieren war das Gewicht der rosa gefärbten Blattläuse höher als das der hell gefärbten.

3.4.2 Stoffbestand

Bei adulten Apteræ konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen rosa, hellrosa und hell gefärbten Tieren in Bezug auf den Protein-, Glykogen- und Lipidgehalt gefunden werden (Abb. 24 und 25). Der Kohlenhydratgehalt war jedoch bei Tieren mit rosa Färbung an Tag drei des Adultstadiums signifikant höher als bei den hell gefärbten (Abb. 25).

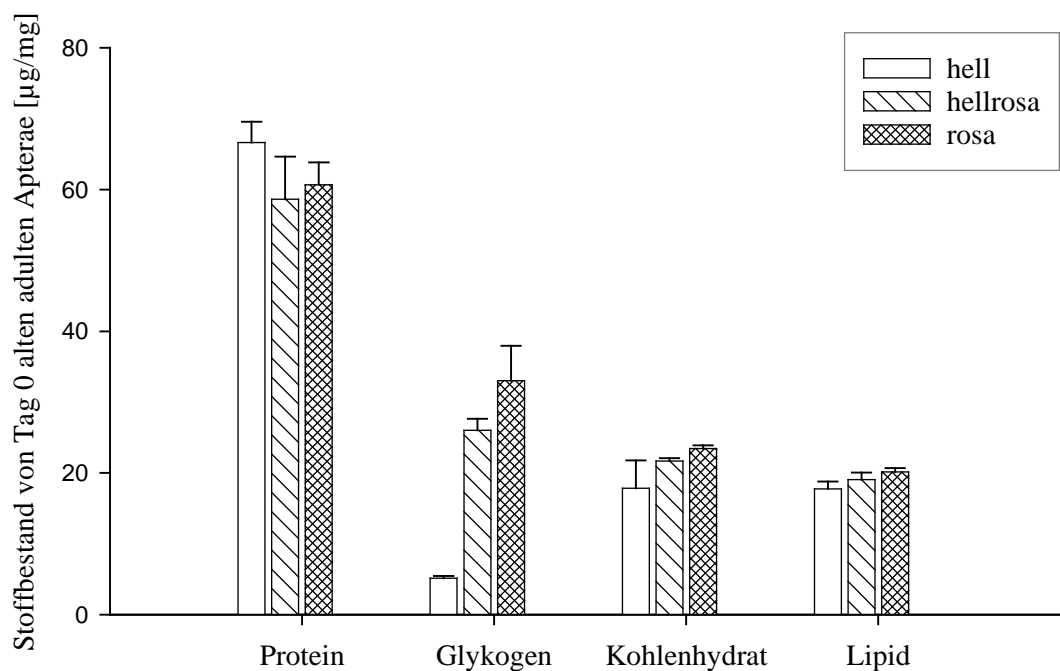


Abb. 24: Stoffbestand am Tag 0 des Adultstadiums von hellen, hellrosa und rosa Apteræ. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant bei $p \leq 0,05$. Kruskal-Wallis-ANOVA, Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 2-5 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

Adulte Alatae der unterschiedlichen Färbungen unterschieden sich ebenfalls nur an Tag drei des Adultstadiums signifikant: Der Proteingehalt war bei Blattläusen mit einer rosa Färbung höher als bei hell gefärbten und der Glykogengehalt war bei hellrosa gefärbten Tieren höher als bei hell gefärbten (Abb. 26 und 27).

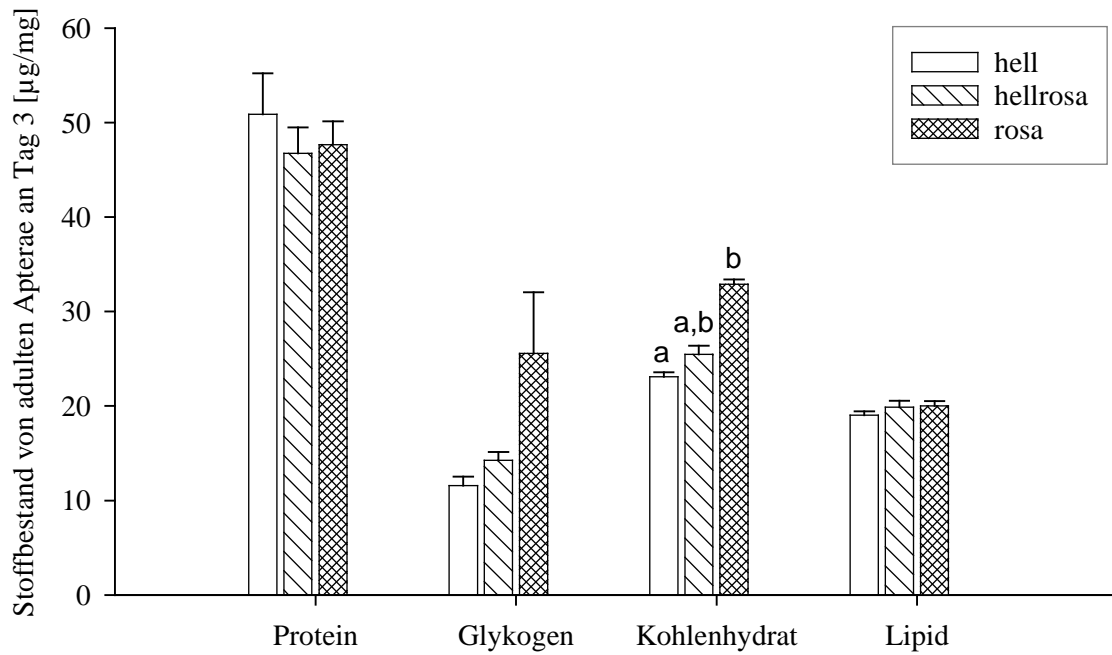


Abb. 25: Stoffbestand am Tag 3 des Adultstadiums von hellen, hellrosa und rosa Apteræe. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant bei $p \leq 0,05$. Kruskal-Wallis-ANOVA, Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 3-13 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

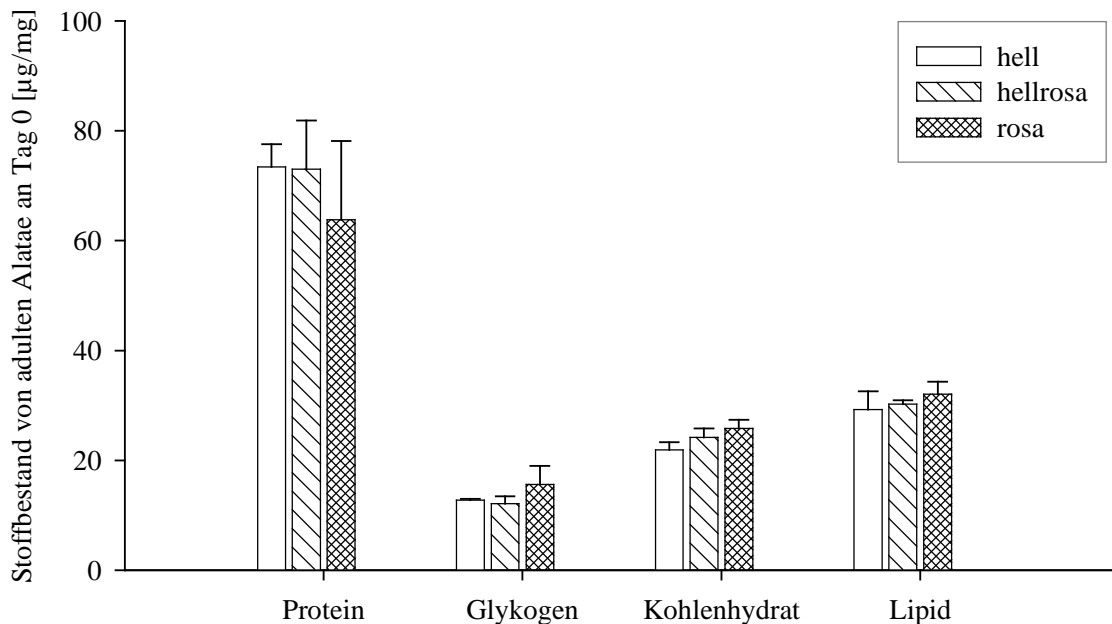


Abb. 26: Stoffbestand am Tag 0 des Adultstadiums von hellen, hellrosa und rosa Alatae. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant bei $p \leq 0,05$. Kruskal-Wallis-ANOVA, Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 2-10 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

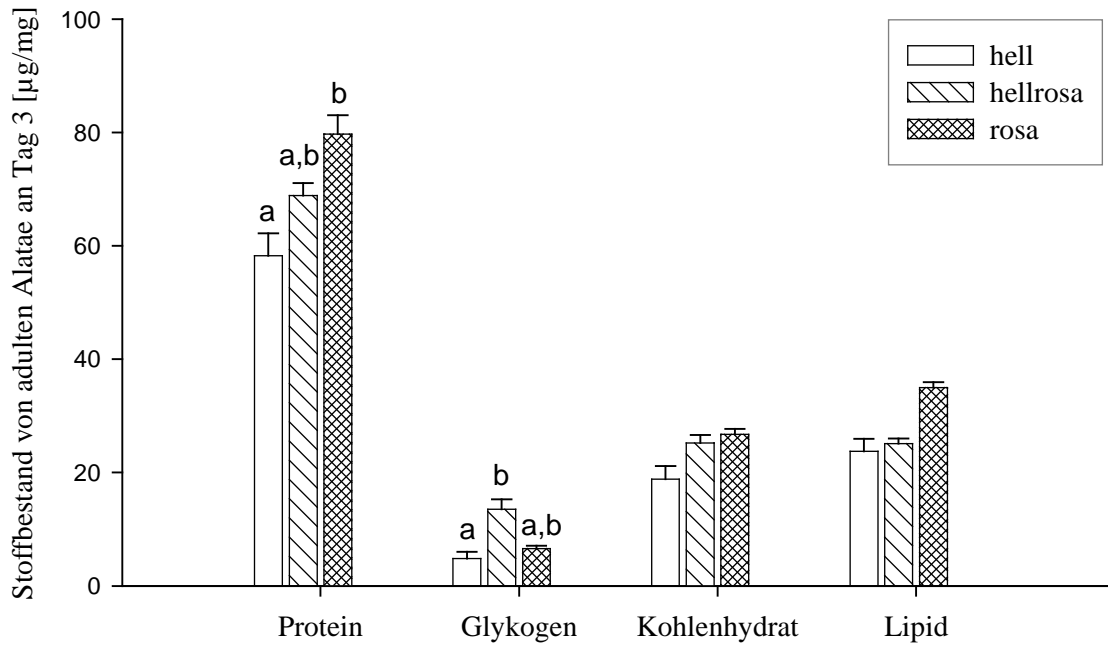


Abb. 27: Stoffbestand am Tag 3 des Adultstadiums von hellen, hellrosa und rosa Alatae. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant bei $p \leq 0,05$. Kruskal-Wallis-ANOVA, Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 4-18 Kohorten, n=10 pro Kohorte.

3.5 Glykogensynthese

3.5.1 Protease-Inhibitor

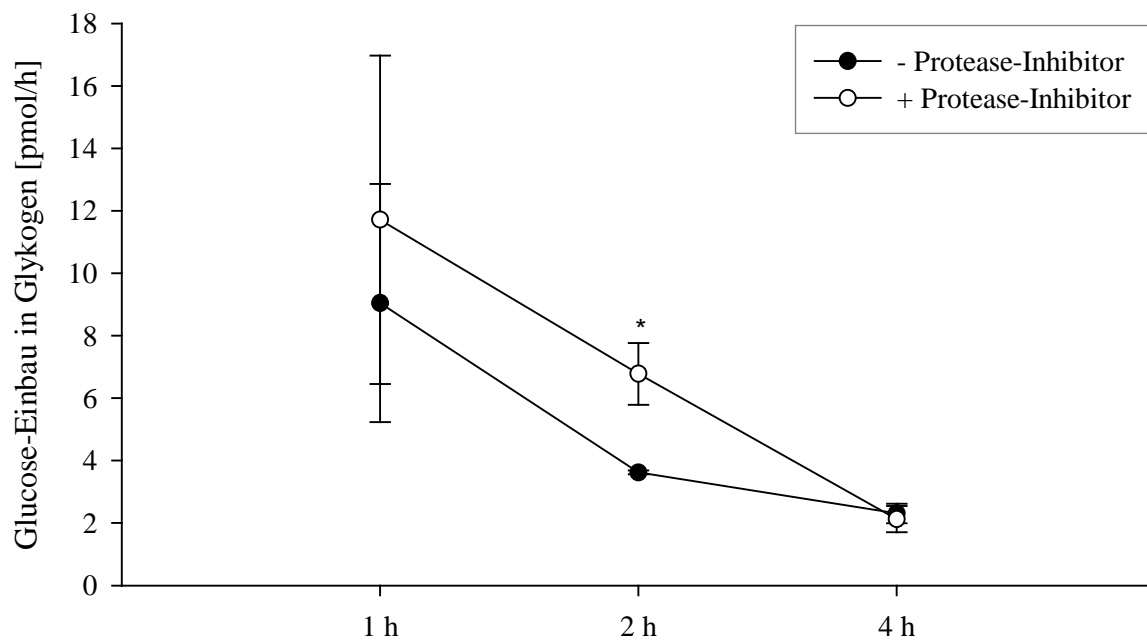


Abb. 28: Einbau von Glucose in Glykogen bei adulten Apterae bei unterschiedlicher Inkubationsdauer von 1, 2 und 4 h, mit und ohne Protease-Inhibitor in pmol/h. Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 3 Kohorten, n=10 pro Kohorte.

Die Zugabe von Protease-Inhibitor veränderte weder nach einer Stunde, noch nach vier Stunden Inkubationszeit den Glucoseeinbau in Glykogen signifikant (Abb. 28). Allerdings konnte nach zwei Stunden Inkubationszeit durch die Zugabe des Protease-Inhibitor-Cocktails eine höhere Einbaurrate von Glucose in Glykogen festgestellt werden. Bei Messungen ohne Protease-Inhibitor wurde nach einer Stunde Inkubation verhältnismäßig mehr Glucose in Glykogen eingebaut als nach vier Stunden (Kruskal-Wallis-ANOVA: $H_{2df} = 7,2$; $p = 0,004$). Wenn Protease-Inhibitor zugegeben worden war, gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Inkubationszeiten (Kruskal-Wallis-ANOVA: $H_{2df} = 4,356$; $p = 0,132$). In den folgenden Versuchen wurden die Proben für eine Stunde inkubiert und nur bei den Experimenten mit AKH wurde der Protease-Inhibitor-Cocktail zugegeben.

3.5.2 Einbau von Glucose in Glykogen

Der Einbau von Glucose in Glykogen war bei den Adulttieren der geflügelten Morphe höher als bei den ungeflügelten Tieren. Im letzten Larvenstadium war die Glykogensynthese der geflügelten Blattläuse jedoch nicht signifikant höher. Beide Morphphen veränderten ihre Glykogensyntheserate vom letzten Larvenstadium zum Adultstadium nicht signifikant (Abb. 29).

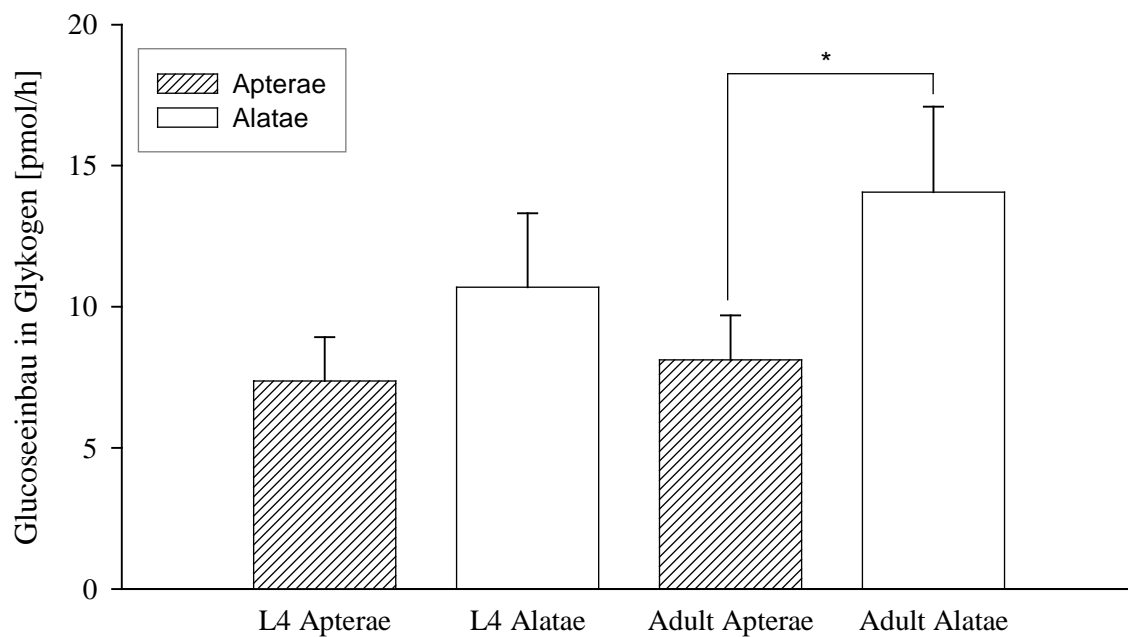


Abb. 29: Einbau von Glucose in Glykogen im vierten Larvenstadium (L4) und im Adultstadium (Adult) von Alatae und Apterae unterschiedlichen Alters in pmol/h. Mann-Whitney-U Test mit Bonferroni-Korrektur, Mittelwerte \pm S.E., 10-15 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

Der Einbau von Glucose in Glykogen wurde durch Zugabe von 10^{-3} M Grybi-AKH zwar um 21,5% verringert, aber nicht signifikant gehemmt (Mann-Whitney-U Test: $p = 0,529$; 10 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte). Die angegebenen Einbauraten gelten für die Annahme, dass nur die Glucose im Medium als Substrat fungiert und keine weitere Glucose aus Trehalose entsteht.

3.5.3 Einbau von Trehalose in Glykogen

Der Einbau von Trehalose in Glykogen wurde unter der Annahme berechnet, dass die gesamte vorhandene Trehalose in je zwei Glucose-Moleküle gespalten und in Glykogen eingebaut werden kann. Der Einbau von Trehalose in Glykogen war bei der adulten geflügelten Morphe viel höher als bei der ungeflügelten (Abb. 30), wenn die Trehalosekonzentration im Inkubationsmedium der natürlichen Trehalosekonzentration in der Hämolymphe (330 mM, siehe 3.7.2) angepasst wurde. Wurde der Trehalosegehalt im Inkubationsmedium auf 30 mM verringert, so war kein Unterschied mehr zwischen den Morphhen nachzuweisen.

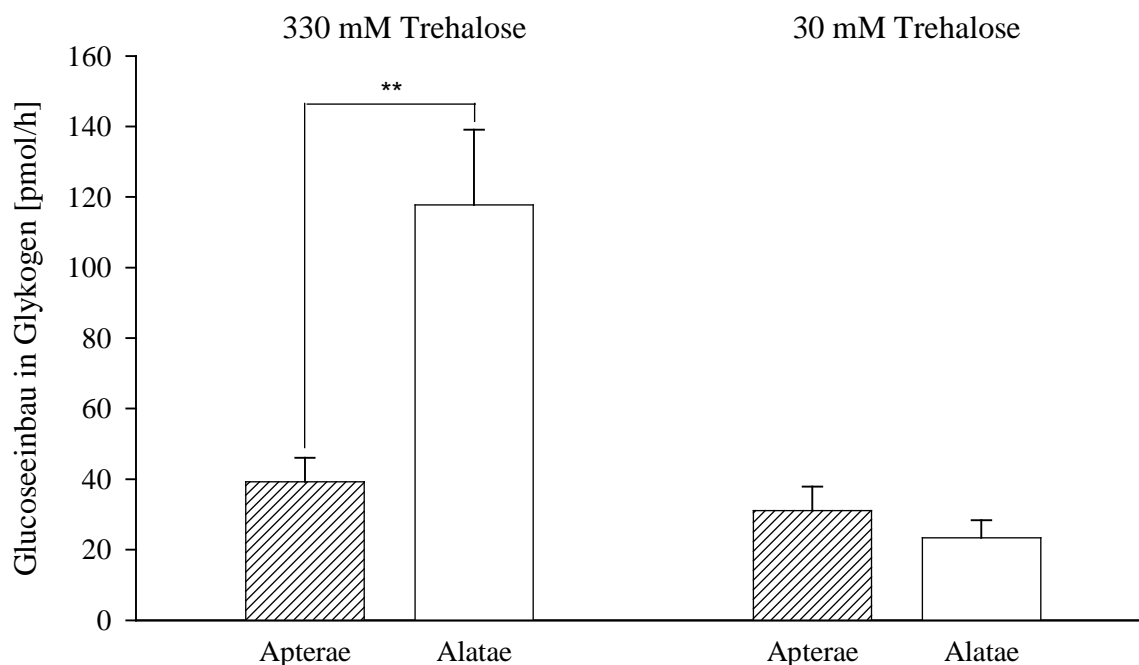


Abb. 30: Einbau von aus Trehalose entstandener Glucose in Glykogen im Adultstadium von Alatae und Apteræ unterschiedlichen Alters bei 330 mM und 30 mM Trehalose im Inkubationsmedium in pmol/h. Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 5 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

3.6 Lipidsynthese

3.6.1 Protease-Inhibitor

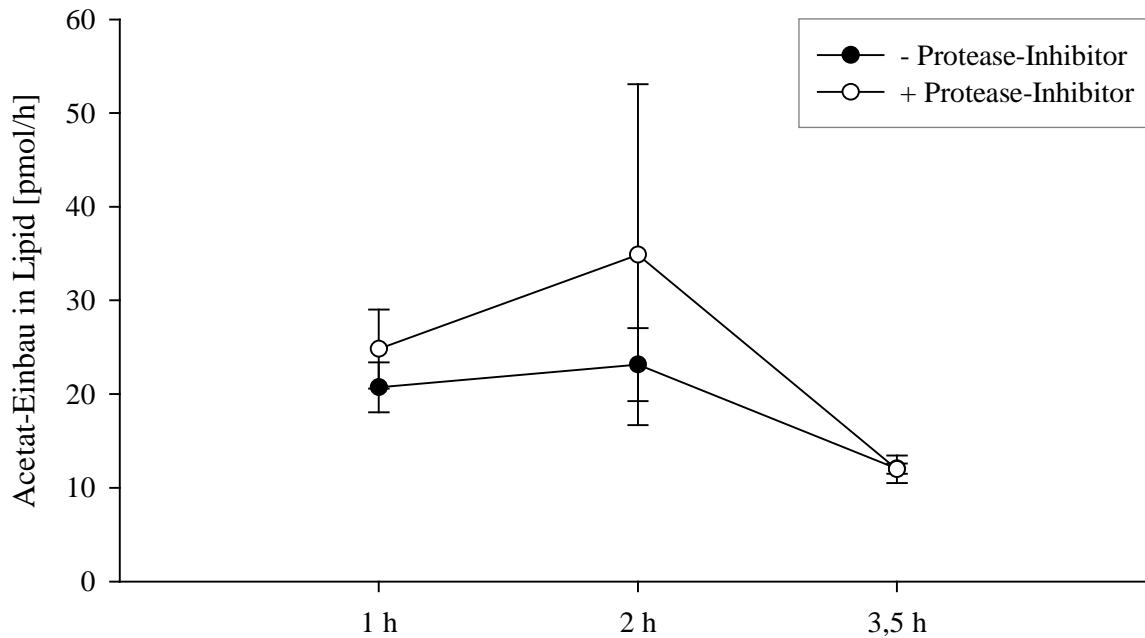


Abb. 31: Einbau von Acetat in Lipid bei adulten Apterae bei unterschiedlicher Inkubationsdauer von 1, 2 und 3,5 h, mit und ohne Protease-Inhibitor in pmol/h. Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 4 Kohorten, n=10 pro Kohorte.

Die Zugabe des Protease-Inhibitor-Cocktails veränderte den Einbau von Acetat in Lipid nicht signifikant (Abb. 31). Die Inkubationszeit hatte jedoch Auswirkungen auf die Einbaurrate. Ohne Protease-Inhibitor war der Acetateinbau bei einer Inkubationszeit von zwei Stunden verhältnismäßig höher als bei dreieinhalb Stunden (Kruskal-Wallis-ANOVA: $H_{2df} = 7,423$; $p = 0,013$). Für die nachfolgenden Versuche wurde deshalb stets zwei Stunden lang inkubiert. Wenn Protease-Inhibitor zugegeben wurde, änderte sich die Einbaurrate bei unterschiedlichen Inkubationszeiten nicht signifikant (Kruskal-Wallis-ANOVA: $H_{2df} = 5,115$; $p = 0,074$). Abgesehen von den Experimenten mit AKH, wurden alle Versuche ohne Protease-Inhibitor durchgeführt.

3.6.2 Einbau von Acetat in Gesamtlipide

Im Adultstadium baute die geflügelte Morphe mehr Acetat in Lipid ein als die ungeflügelte Morphe (Abb. 32). Im letzten Larvenstadium hatten die beiden Morphen vergleichbare Synthesewerte. Bei der ungeflügelten Morphe sank die Lipidsynthese vom

Larven- zum Adultstadium ab. Die Einbauraten der ungeflügelten Morphe waren dagegen in beiden Stadien ähnlich hoch.

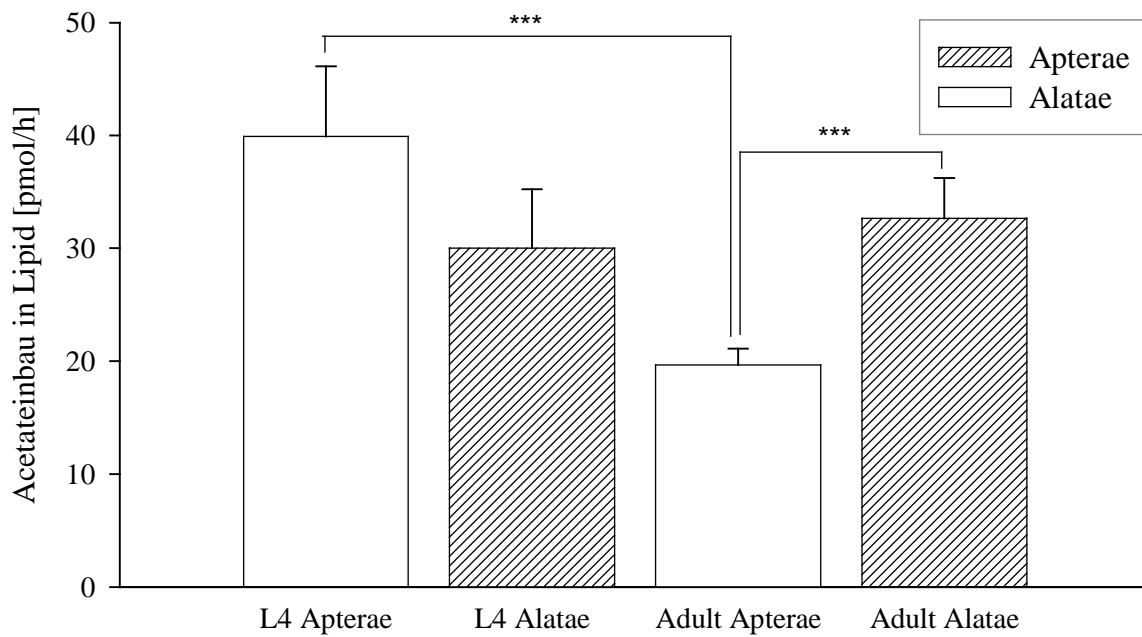


Abb. 32: Einbau von Acetat in Lipid im vierten Larvenstadium (L4) und im Adultstadium (Adult) von Alatae und Apteræ unterschiedlichen Alters in pmol/h. Mann-Whitney-U Test mit Bonferroni-Korrektur, Mittelwerte \pm S.E., 10-30 Kohorten, n=10 pro Kohorte.

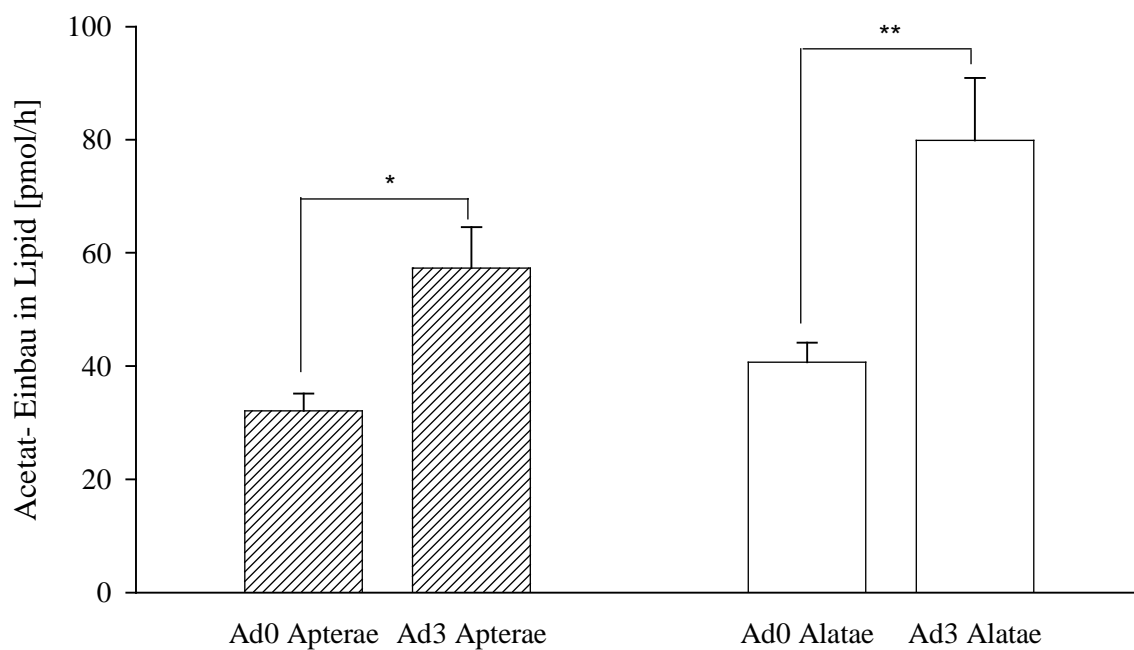


Abb. 33: Acetateinbau in Lipid bei 0 (Ad0) und 3 (Ad3) Tage alten adulten Apteræ und Alatae. Mann-Whitney-U Test mit Bonferroni-Korrektur, Mittelwerte \pm S.E., 9-14 Kohorten, n=10 pro Kohorte.

Die Lipidsyntheserate stieg bei beiden Morphen von Tag null zu Tag drei des Adultstadiums stark an (Abb. 33). Weder an Tag null noch an Tag drei konnten signifikante Unterschiede in der Acetateinbau in Lipid zwischen den beiden Morphen nachgewiesen werden.

3.6.3 Einbau von Acetat in unterschiedliche Lipidklassen

Auch der Einbau von Acetat in die unterschiedlichen Lipidklassen Phospholipid, freie Fettsäuren, DAG und TAG konnte untersucht. Die ungeflügelte Morphe baute sowohl an Tag null als auch an Tag drei des Adultstadiums signifikant mehr Acetat in Phospholipide ein als die geflügelte (Abb. 34 und 35). Die geflügelte Morphe baute dagegen einen signifikant höheren Anteil von Acetat in TAG ein. An Tag null des Adultstadiums synthetisierten die Alatae außerdem auch mehr DAG als die Apterae, nicht jedoch an Tag drei. Die ungeflügelte Morphe baute indessen an Tag drei eine größere Menge an Acetat in freie Fettsäuren ein. Wenn man den Einbau in die verschiedenen Lipidklassen einer Morphe von Tag null zu Tag drei vergleicht, so kann man bei der ungeflügelten Morphe keine Veränderungen feststellen. Bei der geflügelten Morphe jedoch war an Tag drei die Synthese von DAG geringer und die von TAG höher als zuvor an Tag null (Abb. 36).

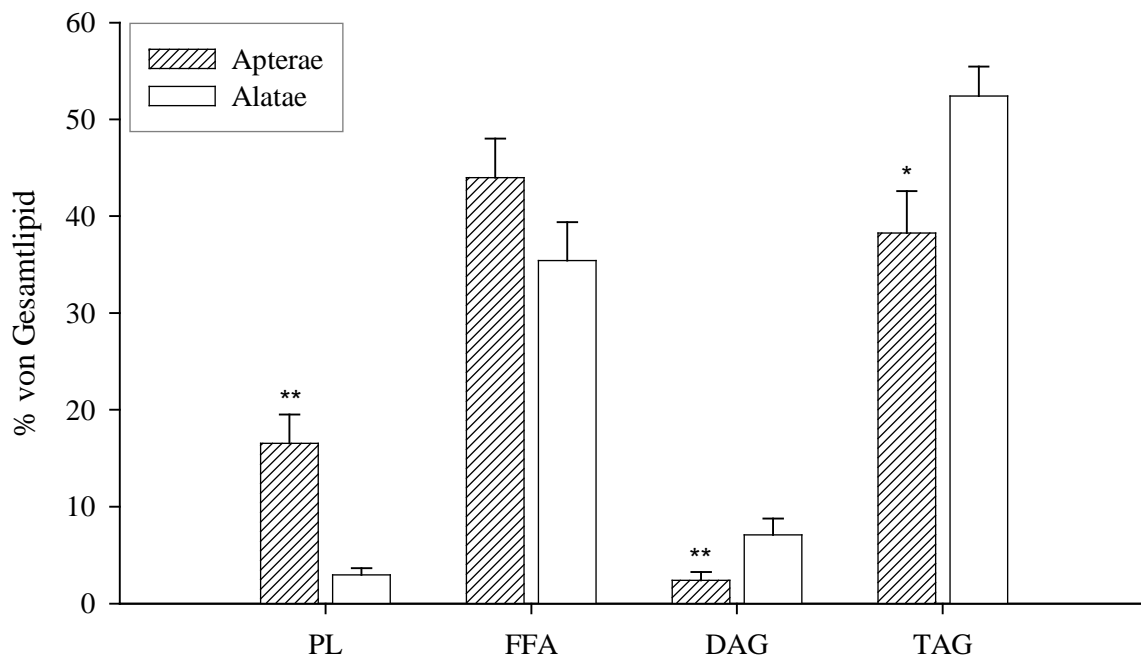


Abb. 34: Acetateinbau in Phospholipide (PL), Freie Fettsäuren (FFA), Diacylglyceride (DAG) und Triacylglyceride (TAG) bei Tag 0 alten adulten Apterae und Alatae. Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 10 Kohorten, n=10 pro Kohorte.

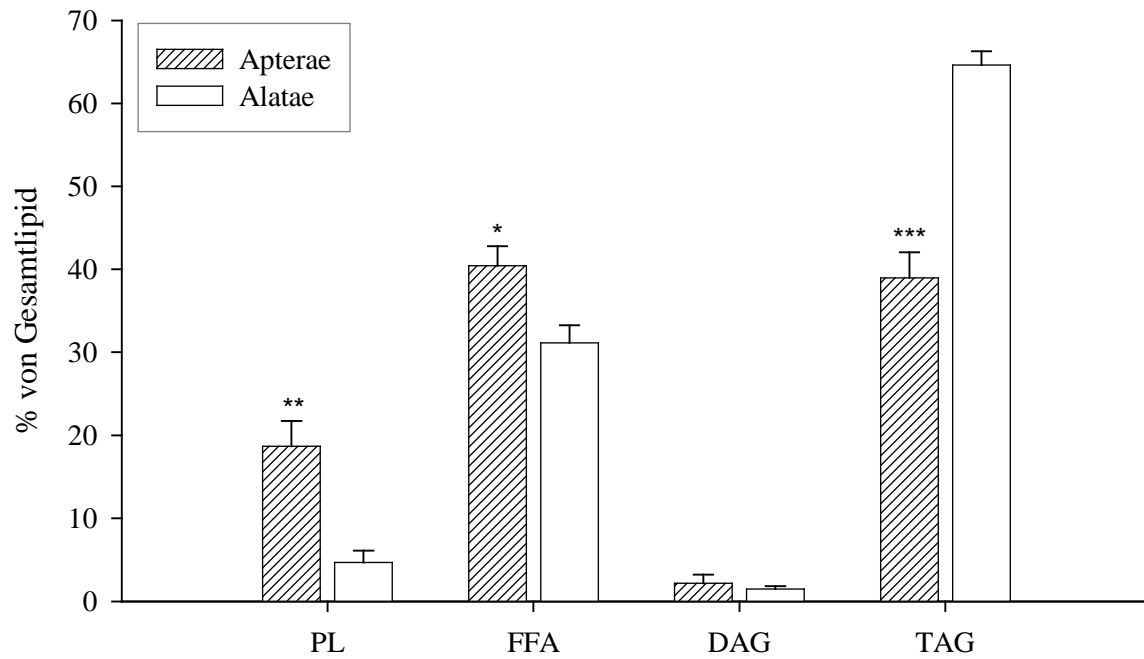


Abb. 35: Acetateinbau in Phospholipide (PL), Freie Fettsäuren (FFA), Diglacylglyceride (DAG) und Triacylglyceride (TAG) bei Tag 3 alten adulten Apterae und Alatae. Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 10 Kohorten, n=10 pro Kohorte.

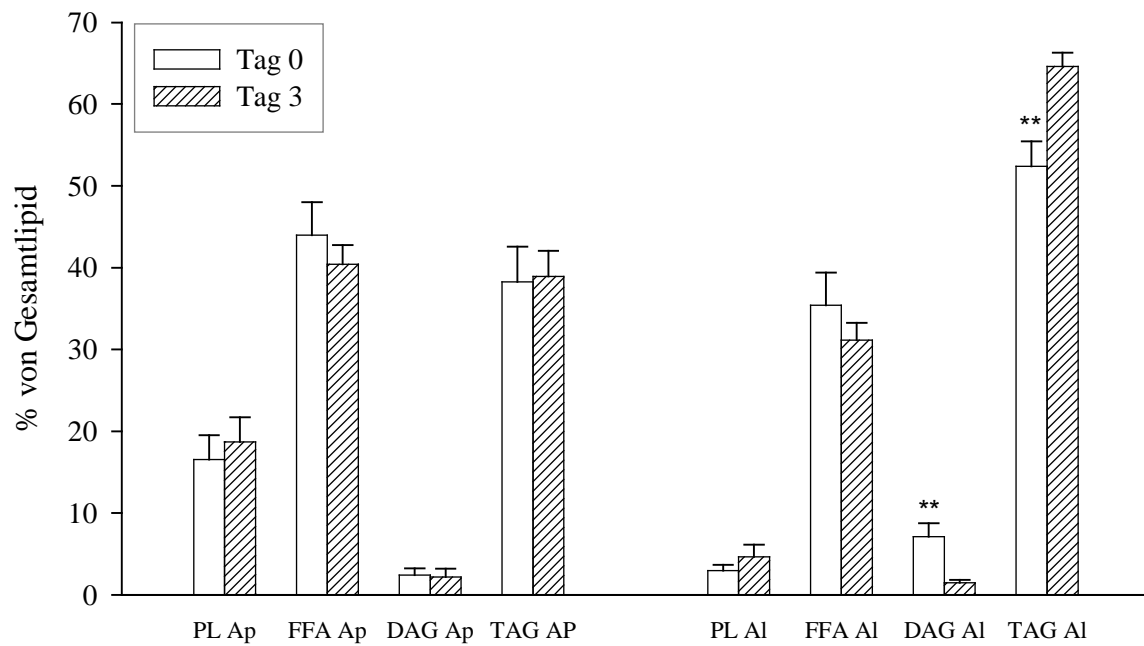


Abb. 36: Acetateinbau in Phospholipide (PL), Freie Fettsäuren (FFA), Diglacylglyceride (DAG) und Triacylglyceride (TAG) bei Apterae und Alatae an Tag 0 und Tag 3 des Adultstadiums. Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 10 Kohorten, n=10 pro Kohorte.

3.6.4 Einfluss von Grybi-AKH auf den Einbau von Acetat in Gesamtlipide

Die Zugabe von Grybi-AKH verursachte nur bei hohen Konzentrationen von 5×10^{-4} M eine tendenzielle Hemmung des Acetateinbaus in Gesamtlipid (Mann-Whitney-U Test: $p = 0,065$) (Tab. 1).

Tabelle 1: Hemmung des Acetateinbaus in Gesamtlipid durch verschiedenen Konzentrationen von Grybi-AKH bei adulten Apterae. Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 6 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

Acetateinbau in Lipid [pmol/h]			
Grybi-AKH [M]	Kontrolle	Test	Hemmung [%]
10^{-6}	$18,9 \pm 1,1$	$17,8 \pm 2,5$	6,2
10^{-5}	$22,3 \pm 4,7$	$18,7 \pm 1,9$	15,9
5×10^{-4}	$26,6 \pm 3,4$	$18,8 \pm 0,9$	29,2

3.6.5 Einfluss von Methopren auf den Einbau von Acetat in einzelne Lipidklassen

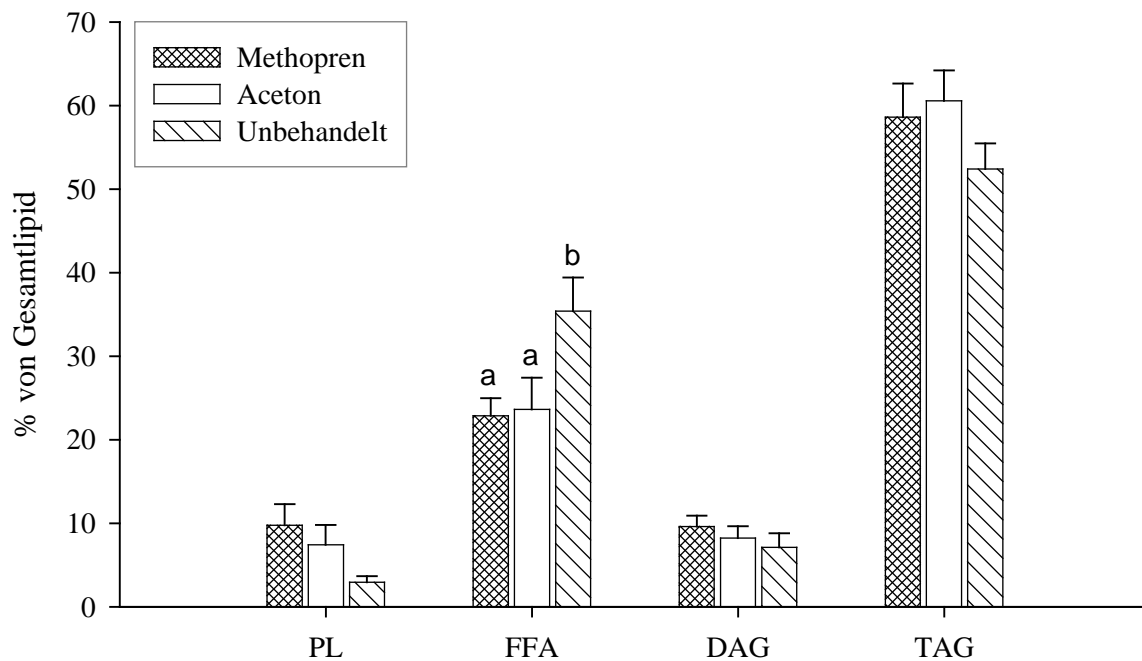


Abb. 37: Acetateinbau in Phospholipide (PL), Freie Fettsäuren (FFA), Diglacylglyceride (DAG) und Triacylglyceride (TAG) bei Alatae an Tag 0 des Adultstadiums nach Behandlung mit Methopren bzw. Aceton oder ohne Behandlung. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant bei $p \leq 0,05$. Kruskal-Wallis-ANOVA, Mittelwerte \pm S.E., 7-13 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

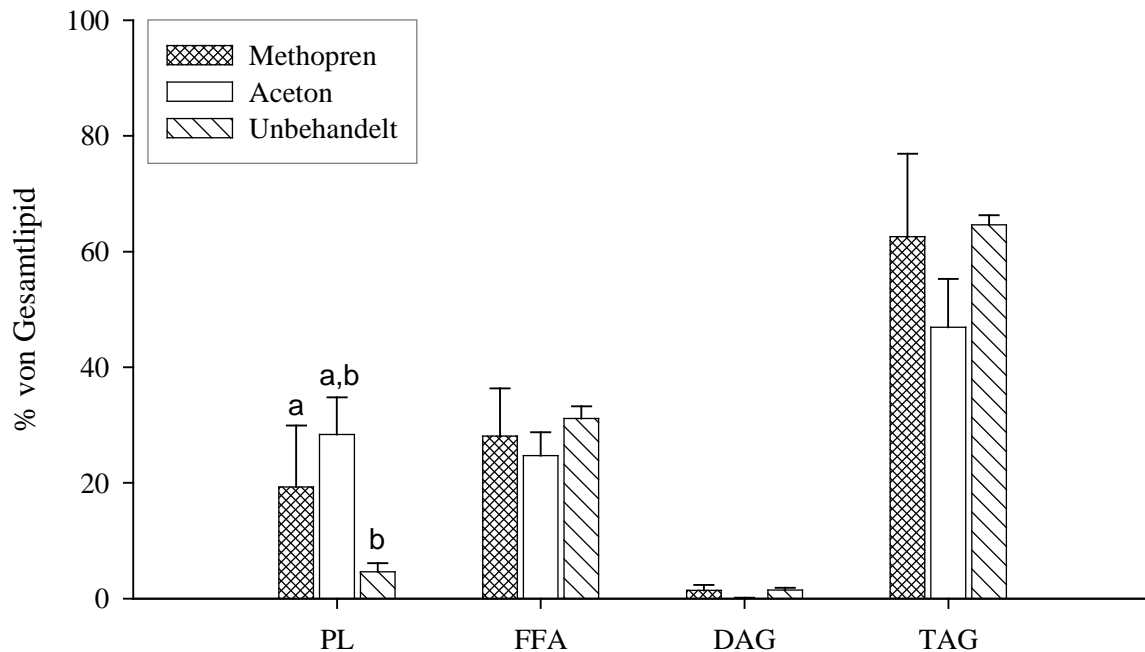


Abb. 38: Acetateinbau in Phospholipide (PL), Freie Fettsäuren (FFA), Diglacylglyceride (DAG) und Triacylglyceride (TAG) bei Alatae an Tag 3 des Adultstadiums nach zweimaliger Behandlung mit Methopren bzw. Aceton oder ohne Behandlung. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant bei $p \leq 0,05$. Kruskal-Wallis-ANOVA, Mittelwerte \pm S.E., 6-14 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

Die nach Methode 1 (siehe 2.6.6) mit Methopren behandelten Tiere unterschieden sich weder an Tag null noch an Tag drei des Adultstadiums signifikant von den Aceton-behandelten Tieren. Allerdings gab es signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Tieren. Bei Messungen an Tag null unterschieden sich unbehandelte und behandelte Tiere in der Synthese von freien Fettsäuren und an Tag drei in der Synthese von Phospholipid (Abb. 37 und 38).

Um den durch das Lösungsmittel Aceton verursachten chemischen Stress zu verringern, wurde in einem weiteren Versuchsansatz die Methode 2 (siehe 2.6.6) für die Behandlung mit Methopren gewählt. Die Alatae bauten mehr Acetat in TAG und weniger Acetat in freie Fettsäuren ein als die Kontrolltiere, die nur mit Isooctan behandelt worden waren (Abb. 39). Die topikale Applikation von Methopren hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Einbaurrate in Phospholipide und in DAG.

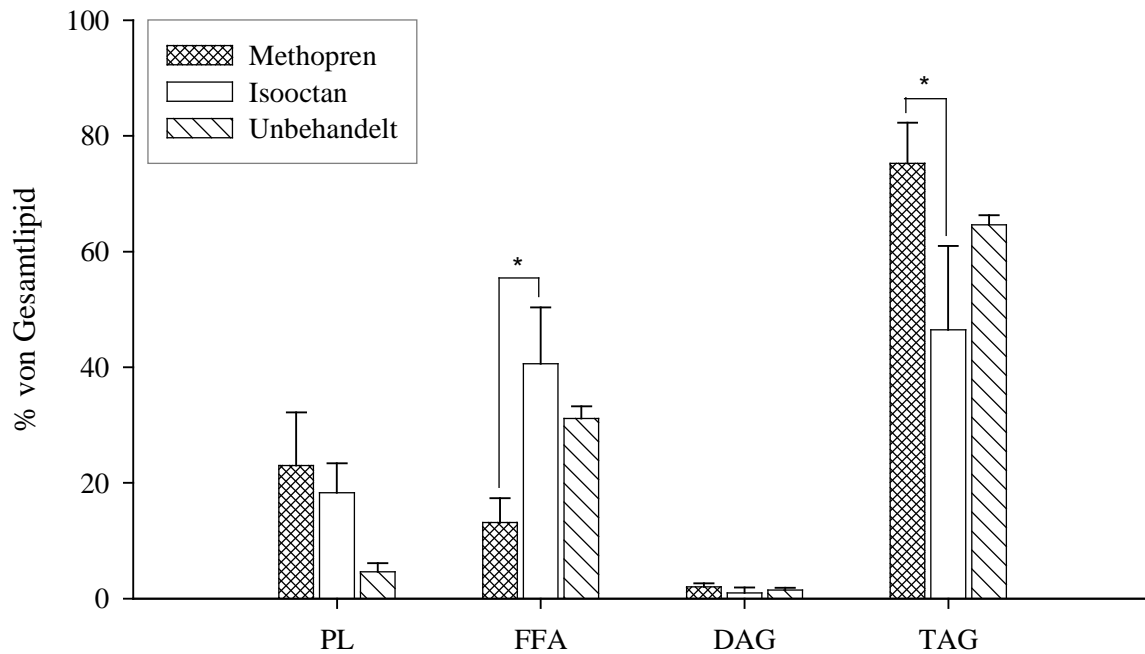


Abb. 39: Acetateinbau in Phospholipide (PL), freie Fettsäuren (FFA), Diglacylglyceride (DAG) und Triacylglyceride (TAG) bei *Alatae* an Tag 3 des Adultstadiums nach zweimaliger Behandlung mit Methopren bzw. Isooctan oder ohne Behandlung. Kruskal-Wallis-ANOVA, Mittelwerte \pm S.E., 6 Kohorten, $n=10$ pro Kohorte.

3.7 Zuckergehalt in der Hämolymphe

3.7.1 Veränderung der Zuckerzusammensetzung einer Hämolympheprobe bei Raumtemperatur

Wurde eine Hämolympheprobe (12,5 nl Hämolymphe in 25 μ l H₂O) bei Raumtemperatur gelagert, nahm der Anteil von Trehalose am Gesamtzucker mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,977$ ab ($y = -0,375 x + 71,249$), während der Anteil von Glucose zunahm ($y = 0,375 x + 28,751$) (Abb. 40). Um Veränderungen der Zuckerzusammensetzung aufgrund der Raumtemperatur zu verringern, wurden die Hämolympheproben für die folgenden Versuche sofort nach der Abnahme bei -70°C eingefroren und direkt nach dem Auftauen gemessen.

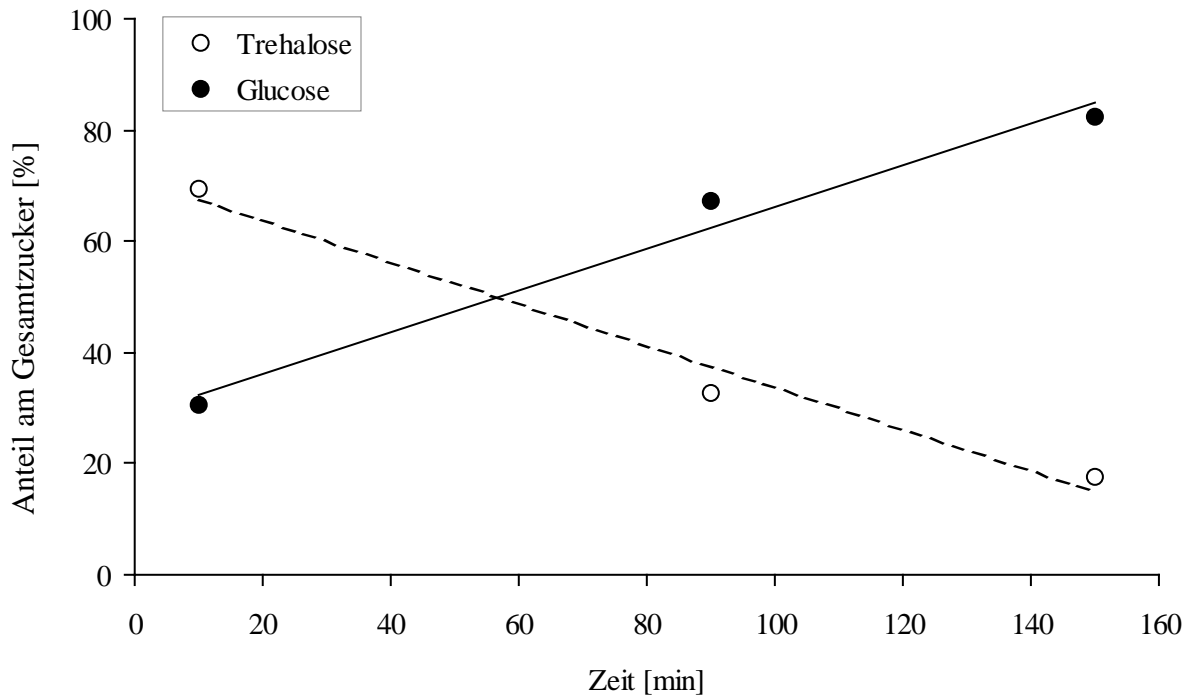


Abb. 40: Anteil von Trehalose und Glucose am Gesamtzucker in der Hämolympheprobe nach ca. 10, 90 und 150 min bei Raumtemperatur.

3.7.2 Zuckergehalt in der Hämolymphe von Apteræ und Alatae

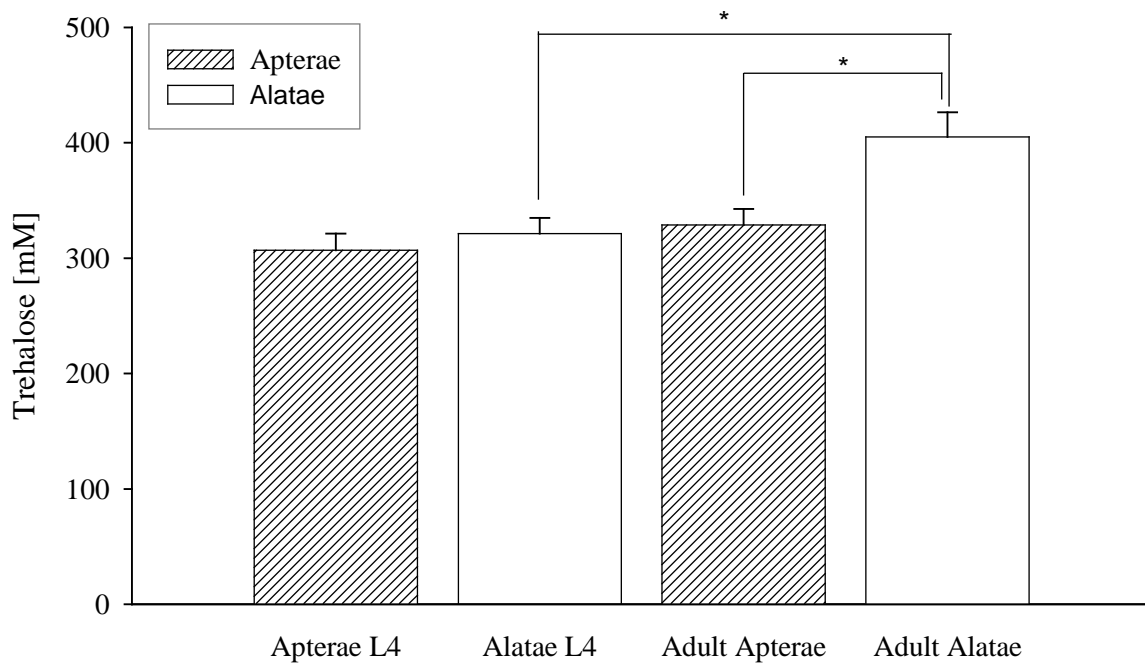


Abb. 41: Trehalosegehalt der Hämolymphe im vierten Larvenstadium (L4) und im Adultstadium (Adult) bei Apteræ und Alatae unterschiedlichen Alters. Mann-Whitney-U Test mit Bonferroni-Korrektur, Mittelwerte \pm S.E., 16-20 Kohorten, n=1-4 pro Kohorte.

In der Hämolymphe der Blattläuse konnten die Zucker Trehalose und Glucose nachgewiesen werden. Bei adulten ungeflügelten Blattläusen betrug die Konzentration von Trehalose durchschnittlich 328,5 mM und die von Glucose 15,7 mM. Der Glucosegehalt machte also im Durchschnitt nur 4,56% des Zuckergehalts aus. Da sich der Anteil von Glucose und Trehalose abhängig von der Lagerung bei Raumtemperatur veränderte (siehe 3.7.1) und Glucose möglicherweise nur ein Artefakt ist (siehe 4.4), wurde der Glucosegehalt für die folgenden Versuche vernachlässigt. Die adulte geflügelte Morphie hatte mit $404,8 \pm 21,4$ mM einen höheren Trehalosegehalt in der Hämolymphe als die ungeflügelte (Abb. 41). Im letzten Larvenstadium hatten die beiden Morphien vergleichbare Trehalosekonzentrationen. Der Trehalosegehalt nahm bei den Alatae vom Larvenstadium zum Adultstadium zu, während es bei den Apteræ zwischen den Altersstadien keine Unterschiede gab.

3.7.3 Zuckergehalt in der Hämolymphe von Adulttieren (Tag 0-4)

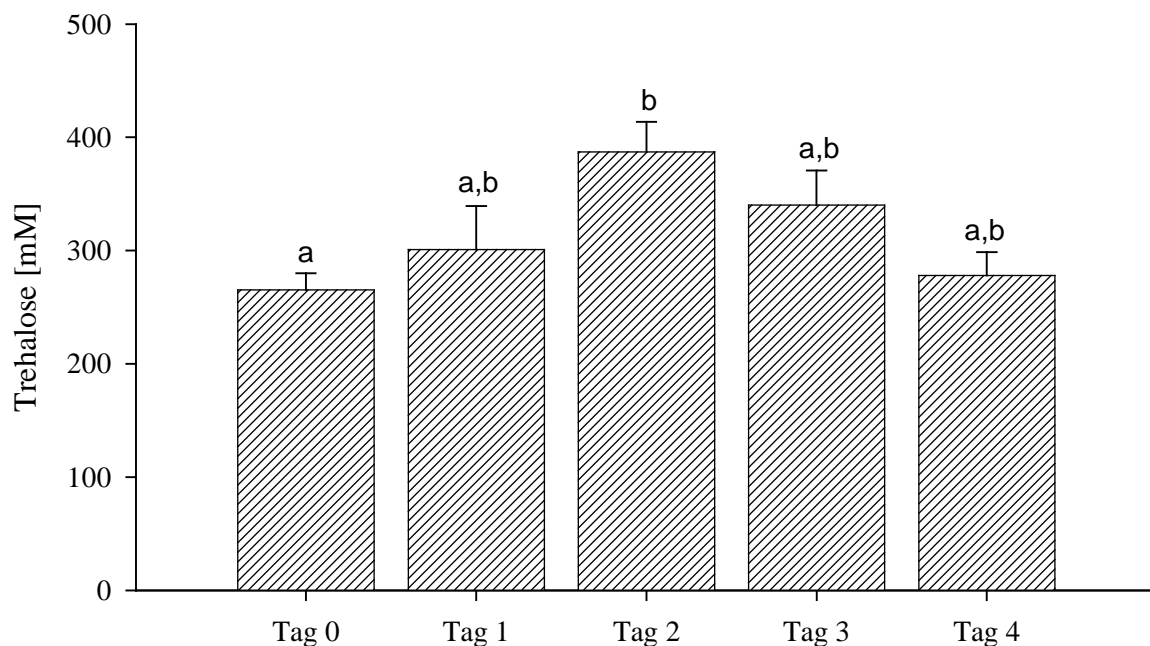


Abb. 42: Trehalosegehalt der Hämolymphe von Apteræ im Adultstadium von Tag 0 bis Tag 4. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant bei $p \leq 0,05$. Kruskal-Wallis- ANOVA, Mittelwerte \pm S.E., 8 Kohorten, $n=1-4$ pro Kohorte.

Die Trehalosekonzentration nahm im Adultstadium von Tag null zu Tag zwei zu (Spearman Rangkorrelation: $R=0,605$; $p=0,002$) und sank dann von Tag zwei zu Tag vier wieder ab (Spearman Rangkorrelation: $R=-0,498$; $p=0,036$) (Abb. 42). An Tag zwei des Adultstadiums war der Trehalosegehalt signifikant höher als an Tag 0.

3.7.4 Einfluss von Grybi-AKH auf den Zuckergehalt in der Hämolymphe

Durch die topikale Applikation von 100 pmol Grybi-AKH pro Blattlaus wurde keine signifikante Veränderung der Trehalosekonzentration in der Hämolymphe hervorgerufen (Abb. 43). Auch nach vier, sechs und zwölf Stunden Hungern konnten keine AKH-spezifischen Auswirkung beobachtet werden. Nur nach zwei Stunden war eine tendenzielle Abnahme des Trehalosegehalts bei den mit Grybi-AKH-behandelten Tieren zu erkennen.

Auch bei geflügelten adulten Blattläusen machte die Behandlung mit Grybi-AKH nach sechs Stunden Hungern keinen Unterschied (Mann-Whitney-U Test: $p = 0,827$; 3 Kohorten, $n=1-4$ pro Kohorte).

Bei den apteren Kontrolltieren veränderte das Fasten von zwei bis zwölf Stunden den Trehalosegehalt in der Hämolymphe nicht (Spearman Rangkorrelation: $R = 0,075$; $p = 0,760$). Zwischen den verschiedenen Fastenzeiten der Kontrolltiere gab es keine signifikanten Unterschiede im Trehalosegehalt (Kruskal-Wallis-ANOVA: $H_{3df} = 2,338$; $p = 0,505$). Auch die geflügelte Morphe zeigte zwischen zwei und sechs Stunden Hungern keine Veränderung in der Trehalosekonzentration (Mann-Whitney-U Test: $p = 0,857$; 3-4 Kohorten, $n=1-4$ pro Kohorte).

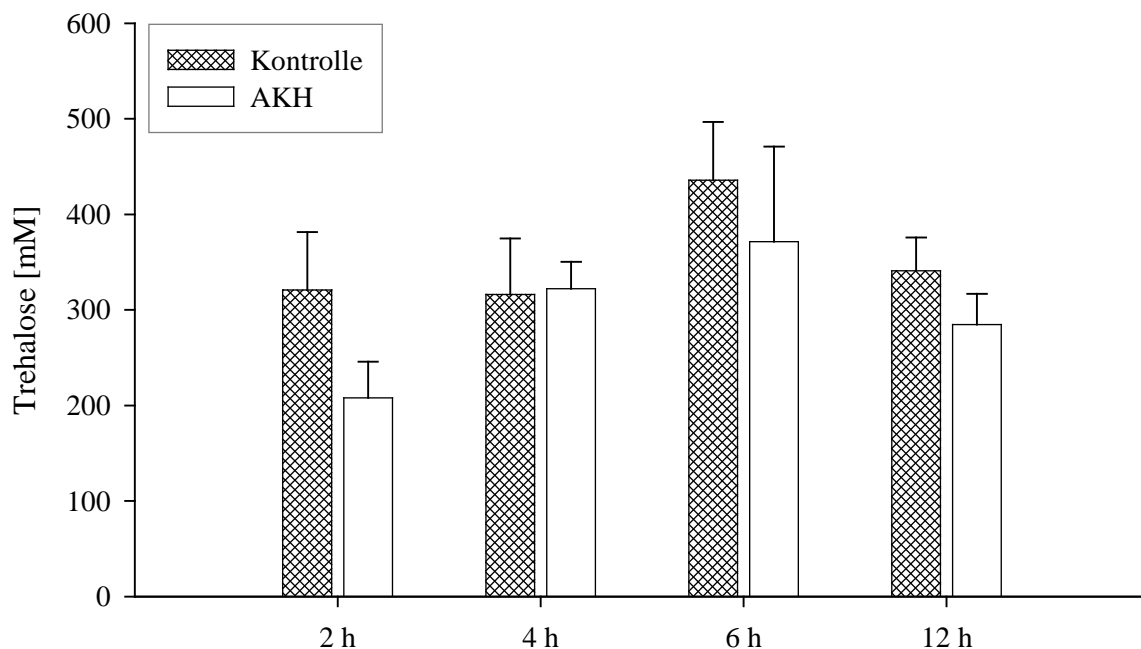


Abb. 43: Trehalosegehalt der Hämolymphe von adulten Apteræ nach Applikation von Grybi-AKH nach 2, 4, 6 und 12 h. Mann-Whitney-U Test, Mittelwerte \pm S.E., 4-7 Kohorten, $n=1-4$ pro Kohorte.

4 Diskussion

4.1 Versuch der Identifizierung des *A. pisum* AKHs

In fast allen Insektenordnungen konnten bisher AKH-Peptide nachgewiesen werden; dabei wurden bis zu vier verschiedene Isoformen in einer Insektenart gefunden. Die Peptidsequenz besteht meist aus acht bis zehn Aminosäuren, die am N-Terminus mit einem Pyroglutamarest und am C-Terminus mit einer Amidgruppe blockiert sind. Außerdem ist ein Tryptophan an Position acht und mindestens eine aromatische Aminosäure, Phenylalanin oder Tyrosin, an Position vier enthalten (GÄDE et al., 1997; VAN DER HORST, 2003; GÄDE, 2004). Eine Ausnahme stellt das Vanca-AKH dar, das aus dem Distelfalter *Vanessa cardui* isoliert wurde. Es ist nicht amidiert und besteht aus elf Aminosäuren (KÖLLISCH et al., 2000). Auch die Gensequenz von einigen AKH-Peptiden ist bereits bekannt. Der AKH-Precursor beginnt mit einem Signalpeptid, gefolgt von dem AKH-Peptid, Amidierungs- und Processing-Sites und einem Precursor-Related-Peptid (APRP) (GÄDE, 2004). APRP, dessen biologische Funktion bisher noch nicht aufgeklärt werden konnte, zeigt eine Sequenz-Homologie mit dem humanen GRF (growth hormone-releasing factor). Eine Zugehörigkeit von AKH und APRP zu einer GRF-Superfamilie scheint daher möglich (CLYNEN et al., 2004).

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Teilsequenz -NFST- (siehe 3.1) entspricht einem Teil des AKHs von *Gryllus bimaculatus* (Grybi-AKH: pQVNFSTGWamid). Es wurde angenommen, dass das isolierte Peptid mit dem bereits bekannten Grybi-AKH übereinstimmt. Daher wurde das Grybi-AKH für einige Versuche verwendet, nämlich für die Messung des Einflusses von AKH auf den Zuckergehalt der Hämolymphe, den Acetateinbau in Gesamtlipid und den Glucoseeinbau in Glykogen (siehe 5.3.1 und 5.4.1). Leider konnte auch nach nochmaligem Aufreinigen und Testen keine vollständige Sequenz erhalten werden. Aus diesem Grund wurde auf einem anderen Weg nach dem AKH gesucht. Die Recherche in den ersten bisher veröffentlichten Sequenzen des Genoms von *A. pisum* ergab ein mutmaßliches *A. pisum*-AKH (QVNFTPTWGWamid), das aus zehn Aminosäuren besteht, am N-Terminus ein Glutamin enthält, am C-Terminus amidiert ist, an Position vier die aromatische Aminosäure Phenylalanin und an Position acht ein Tryptophan enthält (siehe 3.2). Das Alignment zeigte die große Homologie dieses Peptides zu anderen Insekten-AKHs (Abb. 12). TILLEY et al. (2000) versuchten bereits AKH-ähnliche Peptide bei der Blattlaus *Megoura viciae* zu finden. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen auf eine strukturelle Analogie der AKH-ähnlichen Peptide in *M. viciae* zu einem AKH von *Locusta migratoria* (Lom-AKH1). Tatsächlich entspricht die Aminosäuresequenz von Lom-AKH1

(pQLNFTP~~NWGT~~amid) bis auf drei Aminosäuren der des mutmaßlichen *A. pisum*-AKHs. Die mutmaßlichen *A. pisum*-AKH Precursor wurden nicht kloniert, somit handelt es sich bei dem hier gezeigten Stammbaum (Abb. 13) um einen hypothetischen Vergleich der mutmaßlichen Blattlaus-AKHs mit Blattlaus-verwandten Arten, wie den Schaben und Heuschrecken, sowie mit Dipteren und Lepidopteren und ist daher als Prognose für zukünftige Untersuchungen zu verstehen. Die Veröffentlichung des *A. pisum* Genoms erfolgte leider erst in der Ausarbeitungsphase dieser Dissertationsschrift und somit zu spät, um Tests mit dem mutmaßlichen *A. pisum*-AKH durchzuführen.

4.2 Stoffbestand

Bei vielen flügelpolymorphen Insektenarten wurde schon ein Trade-off zwischen Flugfähigkeit und Reproduktion bestätigt (PENER, 1985; ZERA & DENNO, 1997). Physiologische Untersuchungen an *Gryllus firmus* unterstützen die Annahme eines intern gesteuerten Trade-offs. Bei diesen Tieren gibt es zwei Morphen: die flugfähige (macroptere) Morphe mit vollständig entwickelten Flügeln und die flugunfähige (brachyptere) Morphe mit reduzierten Flügeln. Zwischen den beiden Morphen wurde eine negative Korrelation zwischen Flugmuskelmasse und Ovarienmasse gefunden (ZERA & DENNO, 1997). Untersuchungen zeigen, dass flugfähige Grillen im Vergleich zu flugunfähigen, einen erhöhten Atmungsstoffwechsel haben, der die hohen Kosten der Flugfähigkeit deckt. Das Ausmaß, in dem die Flugfähigkeit die Reproduktion vermindert hängt bei diesen Tieren vom Energiebudget ab und damit auch von der Nahrung, die ein Tier aufnimmt. Eine erhöhte Nahrungsaufnahme kann also unter Umständen die Kosten für das Fliegen ausgleichen (ZERA & DENNO, 1997). Nicht nur von flügelpolymorphen Tieren ist ein Trade-off zwischen Flugfähigkeit und Reproduktion bekannt. Bei einer anderen Grillenart, *Gryllus bimaculatus*, werden die Energiespeicher im Fettkörper zu Beginn des Adultstadiums gefüllt, während sich zur gleichen Zeit das Flugmuskel-Wachstum erhöht. Später werden die Energiespeicher zugunsten des Oocytenwachstums geleert. Wenn die Energiespeicher des Fettkörpers beinahe völlig aufgebraucht sind, nimmt auch die Flugmuskelmasse ab, was auf einen Verbrauch der Flugmuskelsubstrate zugunsten der Oocytenproduktion schließen lässt (LORENZ, 2007).

Das Frischgewicht war während der ersten drei Larvenstadien bei beiden Morphen von *A. pisum* ähnlich groß (TSUMUKI et al., 1990). Ab dem vierten Larvenstadium bis ins hohe Alter allerdings waren ungeflügelte Blattläuse schwerer als geflügelte (Abb. 14). Zu einem

ähnlichen Ergebnis kamen auch schon TSUMUKI et al. (1990), die Blattläuse, die dem sogenannten „crowding“ unterzogen worden waren (und somit wohl hauptsächlich geflügelt waren) mit isoliert aufgezogenen Blattläusen (ungeflügelt) verglichen. Ungeflügelte *A. pisum* haben also ein größeres Frischgewicht als geflügelte. Der Grund könnte in der höheren Reproduktionsrate der Apteræ liegen, denn aptere *A. pisum* können pro Weibchen durchschnittlich 98,9 Nachkommen haben, während Alatae nur 70 Larven produzieren (TSUJI & KAWADA, 1987). Adulte, im Freiland gesammelte Apteræ, waren mit einem Durchschnittsgewicht von 2,278 mg (MORIWAKI et al., 2003) nur geringfügig leichter als die in dieser Arbeit im Labor aufgezogenen Blattläuse mit einem durchschnittlichen Frischgewicht von 2,44 mg (Abb. 14). Das Gewicht der Apteræ nahm im Zeitraum vom letzten Larvenstadium bis zu Tag drei des Adultstadiums stark zu und blieb dann bis ins hohe Alter konstant. Die Ursache könnte die höhere Reproduktionsrate im frühen Adultalter sein. Von Grillen beispielsweise weiß man, dass am Anfang des Adultstadiums die meisten Eier produziert werden. So findet bereits ein Drittel bis ein Viertel der gesamten Eiproduktion in den ersten fünf Tagen des Adultstadiums statt (LORENZ & ANAND, 2004; LORENZ, 2007). Bei der geflügelten Morphe von *A. pisum* nahm das Gewicht während des letzten Larvenstadiums zu, fiel zum Adultstadium leicht ab und stieg dann wieder bis ins hohe Alter an (Abb. 14). Der Gewichtsanstieg von Tag drei bis ins hohe Alter hängt wohl ebenfalls mit der Reproduktion zusammen, da bei der geflügelte Morphe erst am Tag zwei bis drei des Adultstadiums das Abdomen aufgrund des Wachstums der Embryonen anschwillt und erste Larven abgesetzt werden (eigene Beobachtungen). Zum Ende der Reproduktionsperiode, am Tag 20 des Adultstadiums, glichen sich die beiden Morphen in Bezug auf das Frischgewicht an (Abb. 14). Bei beiden Morphen wurde ein Absetzen der Larven bis zum Ende der Messperiode beobachtet.

Der Wassergehalt von adulten Apteræ am Tag null des Adultstadiums lag bei 81,1% (Abb. 15) gleichauf mit den gemessenen 80% von SPECTY et al. (2003) bei jungen adulten Apteræ. Adulte Alatae hatten am ersten Tag ihres Adultstadiums ein höheres Trockengewicht als Apteræ und auch im letzten Larvenstadium war das Trockengewicht tendenziell höher. Gründe dafür können die Flügel, bzw. die in den Larven bereits vorhandenen Flügelanlagen der Alatae sein. Auf der anderen Seite ist bei den Alatae auch die Flugmuskulatur stärker ausgebildet, was wiederum zu einer Erhöhung des Gesamtwassergehaltes führen könnte. Bei beiden Morphen stieg der Anteil des Trockengewichts während des letzten Larvenstadiums an. Während bei der geflügelten Morphe das Trockengewicht auch am ersten Tag des

Adultstadiums weiter zunimmt, sinkt bei der ungeflügelten Morphe der Anteil des Trockengewichts am ersten Tag und steigt dann am Tag drei des Adultstadiums wieder an. Die unterschiedliche Reproduktionsleistung in diesem Altersabschnitt könnte eine mögliche Erklärung dafür sein. Der höhere Gehalt an Stoffkomponenten der Alatae im Vergleich zu den Apterae kann zu einem kleinen Teil (4,88%) auch auf den niedrigeren Wassergehalt der geflügelten Morphe am ersten Tag des Adultstadiums zurückzuführen sein, da die Stoffkomponenten pro mg Frischgewicht angegeben wurden. Im Larvenstadium und höheren Adultalter unterschied sich das Trockengewicht der geflügelten Morphe nicht signifikant von dem der ungeflügelten.

Die geflügelte Morphe hatte während des ganzen Untersuchungszeitraums, abgesehen von Tag zehn des Adultstadiums, immer einen höheren Proteingehalt als die ungeflügelte Morphe (Abb. 16). Während bei der ungeflügelten Morphe von Tag null zu Tag drei des Adultstadiums eine starke Abnahme des Proteingehalts festgestellt werden konnte, nahm bei der geflügelten Morphe die Menge an Protein im Zeitraum von Tag null zu Tag zehn ab. Die Ursache für diesen Unterschied dürfte in der früheren und höheren Reproduktion der ungeflügelten Morphe liegen, bei der vermutlich große Mengen an Protein für das Wachstum der Embryonen benötigt werden. Durch die längere prä-reproduktive Periode fingen die Alatae erst ab drei Tagen mit dem Absetzen der Jungen an, während die Apterae sofort nach dem Schlupf zum Adultstadium damit begannen (eigene Beobachtungen). Den Proteingehalt von 5,6% des Frischgewichts von adulten Apterae am Tag null bestätigen die Untersuchungen von SPECTY et al. (2003), die einen Proteingehalt von 5,7% bei jungen adulten Apterae fanden.

Der Glykogengehalt war bei der geflügelten Morphe zum Ende des letzten Larvenstadiums 2,7mal höher als zu Beginn. Bei der ungeflügelten Morphe stieg der Gehalt an Glykogen in dieser Zeit 1,8fach an (Abb. 17). Das bestätigt die Ergebnisse von SRIVASTAVA (1965) und TSUMUKI et al. (1990), die ebenfalls eine Zunahme des Glykogengehalts im Larvenstadium und eine Abnahme während der Häutung zum Adulttier bei apteren *A. pisum* feststellen konnten. Auch bei den Alatae wurde bereits in einer anderen Untersuchung (TSUMUKI et al., 1990), eine starke Abnahme bei der Häutung zum Adultstadium festgestellt. In der vorliegenden Arbeit konnte, im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, der Unterschied zwischen den beiden Morphphen auch statistisch nachgewiesen werden. Die starke Abnahme der Glykogenspeicher vom Larven- zum

Adultstadium könnte mit der Chitinsynthese für die Häutung und bei den Alatae zusätzlich für den Aufbau von Flügeln zusammenhängen. Auch im letzten Larvenstadium von *Manduca sexta* verändert sich der Kohlenhydrat-Metabolismus stark. Der Glykogengehalt im Fettkörper sinkt ab und die Autoren sehen den Grund in der Chitinsynthese (SIEGERT, 1987). Allerdings ist *Manduca sexta* ein holometaboles Insekt, so dass diese Ergebnisse nicht ohne weiteres auf ein hemimetaboles Insekt, wie *A. pisum* übertragen werden können. Vergleicht man die Werte der vorliegenden Untersuchungen, so stehen bei jungen adulten apteren *A. pisum* ein Glykogengehalt von 38,37 µg/mg (SRIVASTAVA, 1965) und 24,4 µg/mg (SPECTY et al., 2003) einem Wert von 19,54 µg/mg in der vorliegenden Arbeit gegenüber (Abb. 17). Bei SRIVASTAVA (1965) allerdings ist das Alter in Tagen angegeben, und nicht, wann der Schlupf zum Adultstadium stattfand, was abhängig von abiotischen Faktoren, wie z.B. Temperatur sein kann. COCKBAIN (1961) gibt für junge adulte (ungeflogene) Alatae von *Aphis fabae* einen Glykogengehalt von 0,5 bis 1% des Frischgewichts an, was mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen von 1,36% für *A. pisum* vergleichbar ist. Bei *Aphis fabae* nimmt während des Fliegens der Glykogengehalt mit 0,0028 mg in der ersten und 0,0006 mg in der zweiten Stunde ab (COCKBAIN, 1961). In der vorliegenden Arbeit konnte während der potentiellen Flugphase von *A. pisum* (Tag null bis Tag drei des Adultstadiums) zwar eine leichte Abnahme des Glykogengehalts festgestellt werden, diese war jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 17).

Der Trehalosegehalt des Chinesischen Tussaspinner *Antheraea pernyi* steigt vom Ei zu Puppe an und nimmt dann in der weiteren Entwicklung wieder ab (WYATT, 1967). Bei *Spodoptera littoralis* wurde ein kontinuierlicher Anstieg der Trehalosekonzentration während der Entwicklung gemessen (BOCTOR, 1974). Der Gehalt an freien Kohlenhydraten stieg bei der ungeflügelten Morphe von *A. pisum* an Tag drei des Adultstadiums stark an und fiel dann zu Tag zehn wieder ab (Abb. 18). Um dies näher zu untersuchen, wurde der Trehalosegehalt in der Hämolymphe von Tag null bis vier des Adultstadiums gemessen. Von Tag null zu Tag zwei stieg der Trehalosegehalt auch in der Hämolymphe an und nahm dann wieder auf Tag vier ab (Abb. 42). Erhöhte Titer an freien Kohlenhydraten könnten entweder ein Hinweis auf eine gesteigerte Energiemobilisierung oder auf eine gesteigerte Nahrungsaufnahme sein. Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch nicht klar, warum zwei bis vier Tage alte Apterae mehr Nahrung aufnehmen oder mehr Energie mobilisieren. Die geflügelte Morphe hatte am Ende des letzten Larvenstadiums und während des Adultstadiums, abgesehen von Tag drei, einen höheren Gehalt an freien Kohlenhydraten als die ungeflügelte Morphe. Das könnte, genau wie der

höhere Trehalosegehalt in der Hämolymphe (siehe 4.4), ein Tribut an die höhere Stoffwechsellistung der Alatae sein. Die alaten Larven der Grünen Pfirsichblattlaus *Myzus persicae* beispielsweise zeigen eine höhere Stoffwechselintensität als die apteren Larven (KUNKEL & HERTEL, 1975).

Bei Insekten kann Lipid 1 bis 50% des Frischgewichts ausmachen (BEENAKKERS et al., 1985). Mit einem Lipidgehalt von 1,92% des Frischgewichts hatte die ungeflügelte Morphe von *A. pisum* am ersten Tag ihres Adultstadiums einen im Vergleich zu anderen Insekten geringen Gehalt an Lipid (Abb. 19). Aufgrund der ständig vorhandenen Nahrungsquelle ist ein großer Energiespeicher für diese Tiere wohl auch nicht notwendig. Die geflügelte Morphe hat mit 2,98% des Frischgewichts einen höheren Lipidvorrat als die ungeflügelte, der sowohl als Energiequelle für den Flug, als auch als Energiespeicher dienen kann. Geflügelte *A. pisum* können ohne Wirtspflanze länger überleben als ungeflügelte (TSUJI & KAWADA, 1987; HAZELL et al., 2005). Auch bei anderen Blattläusen gibt eine Wechselbeziehung zwischen Überlebensfähigkeit, Reproduktion und Lipidreserven. Eine größere Widerstandsfähigkeit gegen Hungern ist negativ mit der Gonadengröße, bzw. der Anzahl der Ovariolen, und gleichzeitig positiv mit den Lipidreserven korreliert (DIXON, 1995; WALTERS & DIXON, 1983). Bei apteren *A. pisum* ist eine negative Korrelation zwischen Überlebenszeit ohne Wirtspflanze und Fruchtbarkeit bekannt (GWYNN et al., 2005).

FEBVAY et al. (1992) verglichen die Lipidzusammensetzung von adulten Apteræ im Alter von null bis drei Tagen mit adulten Alatae unbekanntes Alters. Sie fanden einen Fettsäuregehalt von 27,6 µg/mg für die ungeflügelte und von 39,3 µg/mg für die geflügelte Morphe. Bei dieser Untersuchung wurde also bei der geflügelten Morphe ebenfalls ein höherer Lipidgehalt gemessen. Doch die Werte überschreiten den in der vorliegenden Arbeit gemessenen Lipidgehalt (Abb. 19). Dafür kann es verschiedene Gründe geben. Der Lipidgehalt ist abhängig von der Nahrung. Ob eine Blattlaus auf einem Keimling oder einem Nebenblatt einer Pflanze aufgezogen wird, hat Auswirkungen auf den Lipidgehalt und auf die Zusammensetzung der Lipidklassen (ITOYAMA et al., 2000). Ebenso kann das Alter der Wirtspflanze eine Rolle spielen (BERGMAN et al., 1991). Bei anderen Blattlausarten wurde bei adulten Tieren noch ein weit höherer Lipidgehalt von 6,2% bis zu 12% des Frischgewichts gefunden (GILBERT, 1967).

Geflügelte Blattläuse wurden in der Vergangenheit selten im Hinblick auf den Lipidgehalt erforscht, einzig COCKBAIN (1961) untersuchte den Fettgehalt von geflügelten *A. fabae* vor und nach dem Flug. Der Fettgehalt der ungeflogenen Tiere lag bei 3 bis 12% des

Frischgewichts, abhängig von der Wirtspflanze und der Aufzuchtart (Labor oder Freiland) und nahm während des Fliegens mit 0,005 mg Lipid pro Stunde ab. Lipid ist mit 70 bis 90% vor allem in der späteren Flugphase der wichtigste Brennstoff bei dieser Blattlausart. Wenn man *A. fabae* mit *A. pisum* vergleicht, muss berücksichtigt werden, dass die geflügelten *A. fabae* zu ihrem Sekundärwirt wandern und somit der Flug eine größere Rolle im Lebenszyklus der Blattläuse spielt, als bei den geflügelten *A. pisum*, die nur fakultativ einen Wirtswechsel vollziehen. Die Abnahme des Lipidgehalts von Tag null bis ins hohe Alter (Abb. 19) kann dennoch durch den Verbrauch von Energie für das Fliegen erklärt werden. Bei geflügelten Blattläusen schwillt ab Tag zwei bis drei des Adultstadiums aufgrund des Wachstums der Embryonen das Abdomen an (eigene Beobachtungen). Während des Untersuchungszeitraums konnten nie Alatae beobachtet werden, die trotz ihres dicken, mit Embryonen gefüllten Hinterleibs, geflogen wären. Daher liegt die Vermutung nahe, dass geflügelte Blattläuse ausschließlich als junge Adulttiere bis zum Alter von drei Tagen fliegen und sich nach dem Absetzen der ersten Jungtiere, wie die ungeflügelten Tiere, nur noch auf der Wirtspflanze aufhalten. Die starke Abnahme des Lipidgehalts vom ersten Tag zu Tag drei des Adultstadiums weist daher auf die Funktion von Lipid als Flugs substrat hin.

Bei der geflügelten Morphe der Maisblattlaus *Rhopalosiphum maidis* nahm, wie auch in der vorliegenden Arbeit bei *A. pisum*, der Lipidgehalt vom Larvenstadium zur Häutung zum Adultstadium zu und dann mit fortschreitendem Alter wieder ab (LIQUIDO & IRWIN, 1985). Der Lipidgehalt ist bei den Alatae von *A. pisum* während des letzten Larvenstadiums und bis zu Tag drei des Adultstadiums höher als bei den Apteræ (Abb. 19). Keine Unterschiede zwischen den Morphén scheint es dagegen bei der Zusammensetzung der Fettsäuren zu geben. Bei der Zierlaus *Therioaphis maculata* unterscheidet sich die Fettsäurezusammensetzung von geflügelten und ungeflügelten Larven und Adulttieren nicht (BERGMAN et al., 1991), und auch GREENWAY et al. (1974) fanden in Bezug auf die Zusammensetzung von TAG gleich Mengen an Myristin- und Palmitinsäure bei geflügelten und ungeflügelten Blattläusen. Einzig die Lipidmenge scheint den Unterschied zwischen den beiden Morphén auszumachen (Abb. 19). Auch bei *P. apterus* ist der Lipidgehalt in der Hämolymphe von geflügelten Tieren im Alter von 7 bis 10 Tagen höher als bei ungeflügelten, ebenso ist die Lipidmobilisierung und auch die Konzentration an AKH in der Hämolymphe und im zentralen Nervensystem erhöht (SOCHA et al., 2005). Von Grillen (*Gryllus firmus*) ist bekannt, dass die flugfähige Morphe während der ersten Tage des Adultstadiums, wenn das Ovarienwachstum bei dieser Morphe verzögert ist, mehr Gesamtlipid besitzt (ZERA & LARSEN, 2001).

Da der Phloemsaft von Pflanzen viele Kohlenhydrate, aber nur sehr wenig Lipid enthält, müssen Blattläuse den Großteil der Fettsäuren, die sie brauchen, selbst synthetisieren (DILLWITH et al., 1993). Kohlenhydrate, Acetat und einige Aminosäuren können bei Insekten, ähnlich wie bei Säugern und anderen Tieren, zu Fettsäuren umgebaut oder oxidiert werden (BEENAKKERS et al., 1985). Saccharose ist die dominante Komponente im Phloemsaft. FEBVAY et al. (1999) untersuchten das Schicksal von aufgenommener Saccharose in *A. pisum*. 25 bis 30% der Saccharose werden veratmet, während 50% ins Gewebe eingebaut werden. Der größte Teil davon wird in Lipid eingebaut und zwar hauptsächlich in TAG und Phospholipide. Bei der Grille *G. firmus* baut die flugfähige (macroptere) Morphe, die im Vergleich zur flugunfähigen (brachypteren) eine verzögerte Reproduktion hat, einen größeren Anteil an Glycin in Lipid (vor allem in TAG) ein als die flugunfähige. Die brachyptere Morphe dagegen baut mehr Glycin in Ovarproteine ein. Auch in Bezug auf ihre bevorzugten Oxidationsstoffe unterscheiden sich die beiden Morphen. Während die flugunfähigen Tiere die Oxidation von Fettsäuren bevorzugen, oxidieren die flugfähigen Tiere mehr Aminosäuren, um die Fettsäuren als Energiequelle für den Flug aufzusparen. Für die flugunfähige Morphe dagegen sind Aminosäuren offenbar wichtiger für die Biosynthese von Ovarproteinen (ZERA & ZHAO, 2003b, 2006). Die flugfähige Morphe hat außerdem höhere Aktivitäten von lipogenen Enzymen und eine höhere Aminotransferase-Aktivität (ZHAO & ZERA, 2001; ZERA & ZHAO, 2003a). Diese, je nach Morphe, verschiedenen Metabolismuswege könnten auch bei Blattläusen existieren. So nimmt bei der geflügelten Morphe von *A. pisum* der Gehalt an Glykogen vom Ende des letzten Larvenstadiums zum Adultstadium stark ab, während der Lipidgehalt stark zunimmt. Möglich wäre ein Abbau von Glykogen hin zu Acetyl-CoA für die Lipidsynthese. Der Proteingehalt ist in seinem Verlauf, wenn auch bei der geflügelten auf einer höheren Ebene, bei beiden Morphen gleich. Man kann spekulieren, dass die Aminosäuren, je nach Morphe, wie bei *G. firmus* in die Energieproduktion oder die Biosynthese gesteckt werden. Geflügelte Larven der Blattlaus *M. persicae* haben eine höhere Isocitrat-Dehydrogenase Aktivität als ungeflügelte (ZHAHAVI & TAHORI, 1972). Allerdings hat ein anderes Enzym des Citratcyclus, die Malat-Dehydrogenase eine ähnlich hohe Aktivität bei beiden Morphen. Die alaten Larven dieser Blattlausart haben eine höhere Stoffwechselintensität als die apteren Larven. Außerdem nutzen die alaten Larven, im Vergleich zur ungeflügelten Morphe, weniger Aminosäuren, aber mehr Glucose aus ihrer Nahrung. Der höhere Glucoseverbrauch entspricht dem erhöhten Lipidgehalt der geflügelten Morphe, während der größere Aminosäurenverbrauch der apteren Tiere durch die höhere Reproduktionsrate begründet wird (KUNKEL & HERTEL, 1975).

Die intraklonale Variation der Körperfarbe von Blattläusen kann intermorph oder intramorph sein. Während die intermorphie Modifikation zwischen verschiedenen Morphen vorkommt, kann die intramorphe Farbänderung innerhalb des Lebens eines Individuums stattfinden. Sie kann durch Umweltfaktoren ausgelöst werden und ist teilweise reversibel (MIYAZAKI, 1987). Bei einer hohen Temperatur von 30 bis 35°C und unter „crowding“-Bedingungen verändert sich die Körperfarbe von *A. pisum* (MÜLLER, 1961; FRÖHLICH, 1962). *M. persicae* verändert ihre Körperfarbe bei „crowding“ und schlechter Qualität der Wirtspflanze von gelb zu weißlich-gelb, von grün zu schwach gelb und von rot zu grünlich. Bei besseren Nahrungsbedingungen kann die Originalfarbe wieder hergestellt werden (UEDA & TAKADA, 1977). Lässt man *A. pisum* hungern, so verblassen die Tiere und ihre rosa Körperfärbung wird heller (gelb-grünlich) (eigene Beobachtung). Rosa gefärbte *A. pisum* sind schwerer als hell gefärbte (Abb. 22 und 23). Außerdem ist an Tag drei des Adultstadiums bei rosa gefärbten Apteræ der Kohlenhydratgehalt und bei Alatae der Protein- und Glykogengehalt signifikant höher als bei hell gefärbten (Abb. 25 und 27). Auch bei den anderen Stoffkomponenten scheinen die rosa gefärbten Tiere vorne zu liegen, was jedoch nicht statistisch nachzuweisen war, da die Stichprobengröße zu klein war. Dreitägige rosa gefärbte Alatae haben beispielsweise tendenziell einen höheren Kohlenhydrat- und Lipidgehalt als hell gefärbte und auch null- und dreitägige Apteræ mit einer rosa Färbung haben einen tendenziell höheren Glykogengehalt als hell gefärbte Tiere. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Färbung der Blattläuse mit der stofflichen Zusammensetzung bzw. dem Ernährungszustand der Tiere zusammenhängt.

4.3 Glykogen- und Lipidsynthese

Der Protease-Inhibitor wurde für die Experimente mit AKH verwendet, um zu verhindern, dass das AKH-Peptid während der Inkubation durch Proteasen abgebaut wird. Zwar wurde der Darm entfernt, es konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass sich noch Proteasen im Inkubationsmedium befanden. Proteasen, außerdem noch Invertasen und wenige Amylasen, sind hauptsächlich im Darm von *A. pisum* zu finden (SRIVASTAVA & AUCLAIR, 1963).

Der Glykogengehalt nahm gegen Ende des Larvenstadiums zum Adultstadium bei beiden Morphen ab, der Einbau von Glucose in Glykogen dagegen ändert sich vom letzten Larven- zum Adultstadium nicht. Die Abnahme des Glykogengehalts könnte somit auf einen verstärkten Glykogenabbau zurück zu führen sein. Die Glykogensynthese war bei den

geflügelten Blattläusen im Adultstadium höher als bei den ungeflügelten. In Bezug auf den Glykogengehalt unterscheiden sich die beiden Morphen jedoch nicht (Abb. 17). Das lässt auf einen erhöhten Glykogenabbau der geflügelten Morphe schließen. Die angegebenen Einbauraten der Glykogensynthese aus Glucose (Abb. 29) galten für die Annahme, dass nur die Glucose im Medium als Substrat fungiert und keine weitere Glucose aus Trehalose entsteht. Allerdings wurde in einem weiteren Versuch die Glykogensynthese aus Trehalose untersucht, mit dem Ergebnis, dass auch Trehalose als Substrat für die Glykogensynthese verwendet werden kann. Unter der hypothetischen Annahme, dass alle vorhandene Trehalose in zwei Glucose-Moleküle gespalten und in Glykogen eingebaut werden kann, wurde die Einbaurate der Glykogensynthese aus Trehalose berechnet (Abb. 30). Zusätzlich wurde angenommen, dass die vorhandene Trehalase bei einer Trehalosekonzentration von 330 mM tatsächlich 11-mal so viel Trehalose umsetzt wie bei einer Konzentration von 30 mM. Der Einbau von Trehalose in Glykogen war bei der geflügelten Morphe in einem Inkubationsmedium mit 330 mM Trehalose ebenfalls weit höher als bei der ungeflügelten. Eine Trehalosekonzentration von 330 mM entspricht der Konzentration, wie sie auch in der Hämolymphe vorkommt (siehe 3.7.2). Senkte man den Trehalosegehalt im Inkubationsmedium auf 30 mM ab, so verschwand der Unterschied zwischen den Morphen. Die Ursache dafür könnte sein, dass die Glykogensynthese aus Trehalose bei einem niedrigeren Trehalosespiegel, besonders bei der geflügelten Morphe, unterdrückt wird. Bei einer niedrigen Trehalosekonzentration in der Hämolymphe, einer Unterzuckerung gewissermaßen, werden die zur Verfügung stehenden freien Kohlenhydrate wohl nicht für die Synthese von Speicherkohlenhydraten verwendet, sondern für die Aufrechterhaltung des normalen Kohlenhydratspiegels. Bei *Gryllus bimaculatus* wurde eine ähnliche Reaktion beobachtet. Ist der Trehalosegehalt im Inkubationsmedium geringer als unter natürlichen Bedingungen in der Hämolymphe, so vermindern diese Tiere den Einbau von Glucose in Glykogen (M.W. Lorenz, persönliche Mitteilung). Um genauere Aussagen machen zu können sind jedoch weitere Untersuchungen an Blattläusen notwendig.

Adulte alate *A. pisum* bauten mehr Acetat in Lipid ein als adulte aptere Tiere. Der höhere Lipidgehalt der Alatae kann also auch auf eine erhöhte Lipidbiosynthese zurückzuführen sein. Die Grille *G. firmus* hat als junge adulte flugfähige Morphe ebenfalls eine höhere Lipidbiosynthese als die flugunfähige im gleichen Alter (ZHAO & ZERA, 2001, 2002). Die Autoren argumentieren, dass eine erhöhte Biosynthese für die Aufrechterhaltung von Energiequellen für den Flug notwendig ist. Auch Blattläuse benutzen Lipid als

Flugbrennstoff (COCKBAIN, 1961) und so kann man hier zu dem gleichen Schluss kommen. ZHAO und ZERA (2001), sowie ZERA & ZHAO (2006), halten es für wahrscheinlich, dass die Nährstoffe bei der flugunfähigen Morphe statt für die Lipidakkumulation, für die Eiproduktion verwendet werden. Bei *G. firmus* steigt die Einbaurrate von Acetat in Lipid vom ersten Tag des Adultstadiums zu Tag fünf 1,7 bis 2,8fach an (ZHAO & ZERA, 2001). An Tag fünf besteht bei diesen Tieren der größte Trade-off zwischen Ovarienwachstum und Akkumulation der Lipidreserven bei flugfähiger und flugunfähiger Morphe. Dieser Zeitraum entspricht Tag null bis drei bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Blattläusen. Während dieses Zeitabschnitts fängt die geflügelte Morphe an zu fliegen, während die ungeflügelte ihre ersten Larven absetzt. Der Acetateinbau in Lipid erhöhte sich bei der geflügelten Morphe 1,9fach von Tag null zu Tag drei des Adultstadiums. Der Lipidgehalt nahm in dieser Zeit jedoch stark ab. Die Ursache dafür könnte ein hoher Lipidumsatz, z.B. für Flugaktivität, sein. Bei der ungeflügelten Morphe war die Lipidbiosynthese an Tag drei des Adultstadiums 1,8mal höher als an Tag null, der Lipidgehalt veränderte sich während dieses Zeitabschnittes nicht. Auch hier könnte das die Folge eines höheren Lipidabbaus sein, z.B. für die Reproduktion, allerdings in einem geringeren Ausmaß als bei den Alatae.

Auch bei der Wüstenheuschrecke liegt das Maximum der Lipidbiosynthese am Anfang des Adultstadiums (WALKER & BAILEY, 1970). DE RENOBALLES et al. (1990) konnten zeigen, dass ein Tag alte adulte *A. pisum* eine um ein Vielfaches höhere Lipidbiosynthese haben als 20 bis 24 Tage alte und dass die Lipidsynthese besonders gegen Ende des Lebens stark abnimmt.

Bei Untersuchungen von DE RENOBALLES et al. (1990) an adulten ungeflügelten *A. pisum* waren polare Lipide und TAG die am häufigsten synthetisierte Lipidklassen. Zusätzlich wurden noch Kohlenwasserstoffe synthetisiert. DAG und Cholesterol wurden nur in verschwindend geringen Mengen gemessen. In der vorliegenden Arbeit waren bei der ungeflügelten Morphe die am häufigsten synthetisierten Lipidklassen freie Fettsäuren mit 43,9 bzw. 40,4% und TAG mit 38,3 bzw. 38,9% an Tag null bzw. Tag drei des Adultstadiums. Phospholipide waren mit 16,5 bzw. 18,7% vertreten. DAG machte nur einen kleinen Teil des neu synthetisierten Gesamtlipids aus (2,4 bzw. 2,2%). Cholesterol konnte nicht nachgewiesen werden. Bei der geflügelten Morphe dagegen wurde TAG mit 52,4 bzw. 64,6% an Tag null bzw. Tag drei am häufigsten synthetisiert. An zweiter Stelle standen freie Fettsäuren mit 35,4 und 31,1%. Phospholipide wurden zu 2,9 bzw. 4,7% und DAG zu 7,1 und 1,5% synthetisiert. Die Unterschiede zwischen den Untersuchungen können durch die verschiedenen Methoden

und den unterschiedlichen Messzeitraum zustande gekommen sein. Während DE RENOBALLES et al. (1990) die Lipidbiosynthese *in vivo* durch Injektion einer im Verhältnis zum Hämolyphvolumen großen Menge radioaktiv markiertem Acetats (0,4 µl auf schätzungsweise 500 bis 600 nl Hämolymphe [20% des Körpergewichts]) innerhalb von 48 Stunden gemessen haben, wurde in der vorliegenden Arbeit die Synthese *in vitro* in einer zweistündigen Inkubation gemessen. FEBVAY et al. (1992) verglichen die Lipidzusammensetzung von adulten Apteræ im Alter von null bis drei Tagen mit adulten Alatae unbekanntes Alters und fanden einen höheren Gehalt an Fettsäuren bei der geflügelten Morphe. Der Anteil von TAG lag dabei mit 3,8% des Frischgewichts höher als bei der ungeflügelten Morphe mit 2,5%. Der Gehalt an Phospholipiden war dagegen bei beiden Morphem mit 1,3% bzw. 1,4% ähnlich groß. Leider wurde in dieser Untersuchung das Alter der geflügelten Blattläuse nicht berücksichtigt. Mögliche Unterschiede im interessanten Alter von null bis drei Tagen, besonders in der Phospholipidfraktion, konnten so nicht festgestellt werden. In der vorliegenden Arbeit baute die geflügelte Morphe ebenfalls mehr Acetat in TAG ein, die ungeflügelte Morphe synthetisierte dafür mehr Phospholipide (Abb. 34 und 35). Phospholipid ist die Hauptkomponente in biologischen Membranen, eine Verringerung kann mit einer geringeren Fruchtbarkeit gekoppelt sein, also einer Reduktion von Embryonalgewebe (FEBVAY et al., 1999). TAG dagegen sind das wichtigste Speicherfett und bei vielen Insekten die wichtigste Energiequelle für den Flug (BEENAKKERS et al., 1985; DOWNER, 1985). Während bei Blattläusen hauptsächlich TAG und Phospholipide gefunden wurden, konnten nur geringe Mengen an Monoacylglyceriden (MAG), DAG und Sterolen detektiert werden (DILLWITH et al., 1993). Bei *G. firmus* wurden umfangreiche Untersuchungen über den Trade-off zwischen zwei Genotypen durchgeführt. Der flugfähige Genotyp von *G. firmus* synthetisiert mehr TAG als der flugunfähige Genotyp, welcher dagegen mehr Phospholipide synthetisiert (ZHAO & ZERA, 2002). Die flugfähige Morphe setzt bei dieser Grille eine proportional größere Menge an Fettsäuren und Aminosäuren für die Biosynthese von TAG (Flugbrennstoff) ein und einen proportional geringeren Anteil für die Biosynthese von Ovarproteinen als die flugunfähige Morphe.

Wenn man bei *A. pisum* den Einbau in die verschiedenen Lipidklassen einer Morphe von Tag null und Tag drei vergleicht, so kann man bei der ungeflügelten Morphe keine Veränderungen feststellen (Abb. 36). Die geflügelten Morphe dagegen synthetisierte am ersten Tag des Adultstadiums mehr DAG als am dritten Tag. DAG ist bei flugfähigen Insekten generell in größerer Menge vorhanden (SCHAL et al., 1998). Lipide werden hauptsächlich in Form von DAG über die Hämolymphe zu den Geweben, wo sie gebraucht

werden, z.B. zum Flugmuskel, transportiert (WHEELER, 1989). Eine erhöhte DAG-Synthese könnte also ein Hinweis auf einen erhöhten Bedarf von DAG als Energiesubstrat für den Flug sein. Besonders bemerkenswert ist, dass die Synthese von DAG bei der geflügelten Morphe nur an Tag null, aber nicht mehr an Tag drei höher als bei den ungeflügelten Tieren war. Die Hauptflugzeit geflügelter Blattläuse lag zwischen Tag null und zwei des Adultstadiums. Spätestens an Tag drei hatten die meisten Blattläuse einen dicken Hinterleib und flogen nicht mehr (eigene Beobachtungen). In vielen Untersuchungen über Blattläuse wurden keine oder nur sehr geringe Mengen an DAG gefunden. DILLWITH et al. (1993) haben eine Erklärung dafür: Bei den meisten Experimenten wird der Lipidgehalt mit Standards verglichen. Da aber die DAG der Blattläuse höchstwahrscheinlich aus den ungewöhnlichen TAG (an Position zwei kurzkettig) entstehen, koelulieren sie vielleicht nicht mit den verwendeten Lipidstandards, die lange Ketten tragen. Deshalb sind DAG möglicherweise vorhanden, können aber nicht solche erkannt werden, da sie einen niedrigeren Rf-Wert besitzen.

4.3.1 AKH

Die adipokinetischen / hypertrehalosämischen Hormone (AKHs) kontrollieren den intermediären Metabolismus (GÄDE et al., 1997). Diese pleiotropen Hormone wirken auf den Lipidmetabolismus über die Steigerung der Hydrolyse von TAG zu DAG und der Freisetzung von DAG in die Hämolymphe (ARRESE & WELLS, 1997). Bei der Feldheuschrecke *Melanoplus sanguinipes* ist die Lipidmobilisierung bei AKH-Gabe bei den Migranten größer als bei den Nicht-Migranten, obwohl bei den Migranten kein höherer AKH-Gehalt in den CC nachweisbar ist. Die Ursachen dieser Unterschiede könnten eine höhere Sensibilität oder mehr Rezeptoren in den Zielzellen sein (MIN et al., 2004). Auch bei Heuschrecken wirkt AKH auf den Lipidmetabolismus. Nach einer AKH-Injektion wird bei diesen Tieren vermehrt Glycerol in DAG eingebaut (CANDY et al., 1976; VAN DER HORST et al., 1983). Zusätzlich hemmt AKH die Lipidsynthese bei Grillen und Heuschrecken (GOKULDAS et al., 1988; LORENZ, 2001). Bei *A. pisum* konnte eine Tendenz zur Hemmung des Acetateinbaus in Lipid nur bei hohen Konzentrationen (5×10^{-4} M) von Grybi-AKH nachgewiesen werden (Tab. 1). AKH zeigte nicht die starke Hemmung der Lipidbiosynthese, die bei einer endokrin gesteuerten Reaktion zu erwarten gewesen wäre. Möglich ist, dass die hier verwendete Methode zur Messung der AKH-Aktivität nicht geeignet ist oder dass das Hormon bei diesen Tieren keine Wirkung auf die Lipidsynthese hat. CC-Extrakte der Honigbiene *Apis mellifera carnica* haben ebenfalls keinen adipokinetischen oder hypertrehalosämischen Effekt (LORENZ et al. 1999). Die

wahrscheinlichste Erklärung für die schlechte Wirkung des Grybi-AKHs auf die Lipidsynthese ist jedoch wohl, dass das Grybi-AKH (pQVNFSTGWamid) ein Octapeptid und kein Decapeptid wie das mutmaßliche Acypi-AKH (pQVNFTPTWQGamid) ist. Vermutlich reagiert der AKH-Rezeptor der Blattläuse auf das Octapeptid nicht so gut wie auf ein Decapeptid. LEE & GOLDSWORTHY (1996) testeten die Aktivität von modifizierten AKH-Peptiden und kürzten dabei das AKH von *Locusta migratoria*, ein Dekapeptid, auf ein Octapeptid. Das Ergebnis war eine verminderte Lipidmobilisierung.

Grybi-AKH inhibiert bei Grillen den Glucoseeinbau in Glykogen (LORENZ, 2005). Bei der Totenkopfschabe *Blaberus discoidalis* erniedrigt das hypertrehalosämische Hormon den Gehalt an Fructose-2,6-Bisphosphat und hemmt damit wahrscheinlich die Glykolyse, gleichzeitig wird die Freisetzung von Trehalose gesteigert (BECKER & WEGENER, 1998). Die Hemmung der Glykogensynthese durch Bladi-HrTH konnte auch im Fettkörper der Argentinischen Waldschabe *Blaptica dubia* beobachtet werden (M.W. Lorenz, persönliche Mitteilung). Der Einbau von Glucose in Glykogen wurde bei *A. pisum* durch Zugabe von 10^{-3} M Grybi-AKH nicht signifikant gehemmt (siehe 3.5.2). Eine Erklärung dafür, dass das Grybi-AKHs nicht auf die Glykogensynthese wirkt, kann der oben angegebene Unterschied in der Länge des verwendeten Grybi-AKH-Peptids und des mutmaßlichen Acypi-AKH-Peptids geben. Auf welche Weise AKH die Glykogensynthese hemmt, ist bisher noch nicht bekannt. Möglicherweise inhibiert AKH, wie das Glukagon von Vertebraten, die Glykogensynthese über die Glykogensynthase. Eine andere Möglichkeit ist die Hemmung der Glykogensynthese über Glucose-1-Phosphat. AKH aktiviert die Glykogen-Phosphorylase (STEELE, 1963), was zu einem erhöhten Glucose-1-Phosphat-Spiegel führt. Glucose-1-Phosphat wiederum inhibiert die Glykogensynthase (STOREY & STOREY, 1991) und führt so ebenfalls zur Hemmung der Glykogensynthese (LORENZ, 2005).

4.3.2 Methopren

Methopren ist ein stabiles und potentes JH-Analog, das schon in vielen Untersuchungen eingesetzt wurde (COTTON & ANSTEE, 1991; MCKENNEY & CELESTIAL, 1996; KOSTYUKOVSKY et al., 2000; SORGE et al., 2000; SOCHA et al., 2004). So bewirkt die topikale Applikation von Methopren bei der flugfähigen Morphe von *G. firmus* die Ausbildung typischer Merkmale der flugunfähigen Morphe: größere Ovarien, eine geringere Flugmuskelmasse, eine verminderte TAG-Biosynthese, eine höhere Phospholipidbiosynthese,

geringere Aktivitäten der lipogenen Enzyme und einer Transaminase und eine erhöhte Fettsäure-Oxidation (ZERA & ZHAO, 2004). Bei der Krabbe *Rhithropanopus harrisii* hat das JH-Analog Fenoxycarb die Abnahme von Gesamtlipid und TAG zur Folge. Der Phospholipidgehalt ändert sich jedoch nicht (NATES & MCKENNEY, 2000). NEESE (1995) zeigte, dass durch die Behandlung von *A. pisum* mit Methopren ein Anstieg des Myristinsäuregehalts erfolgt, der jedoch, so argumentieren die Autoren, nicht durch eine erhöhte Biosynthese, sondern durch einen verringerten Fettsäure-Umsatz zustande kommt. Methopren-behandelte geflügelte *A. pisum* zeigten in der vorliegenden Arbeit eine geringere Synthese an freien Fettsäuren und eine höhere TAG-Synthese als die Kontrolltiere, die nur mit Isooctan behandelt worden waren (Abb. 39). Die Untersuchungen von CHEN et al. (2005) deuten ebenfalls auf eine Erhöhung des TAG-Gehalts durch JH hin. Die Autoren benutzten Preconen II, um den Lipidmetabolismus von *A. pisum* zu untersuchen. Preconen II führt zu einer chemischen Allatektomie und verhindert so die JH-Produktion. Bei Temperaturstress konnte ein Anstieg des TAG-Gehalts beobachtet werden. Bei gleichzeitiger Preconen II-Gabe blieb dieser Anstieg aus. Offensichtlich blockiert Preconen II über die Hemmung der JH-Synthese die Anreicherung von Lipid. Es gibt aber auch gegenteilige Ergebnisse. In vielen Fällen wurde bei allatektomierten Tieren eine Anreicherung von Lipid (DOWNER, 1985) und ein erhöhter ¹⁴C-Acetateinbau, vor allem in TAG festgestellt (VROEMEN et al., 1965). Ein Grund dafür kann sein, dass in den Untersuchungen oft Weibchen verwendet werden. Weibchen produzieren nach Allatektomie keine Eier mehr (HOFFMANN & SORGE, 1996). Das gebildete Lipid wird dann nicht für Eiproduktion benötigt und bleibt im Fettkörper.

Es gibt Hinweise auf eine Akkumulation von TAG als Antwort auf Stress in Form von Temperatur, schlechter Qualität der Wirtspflanze oder Methopren-Behandlung bei Blattläusen (SUTHERLAND, 1968; BERGMAN et al., 1991; NEESE, 1995; CHEN et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte in den Vorversuchen bei der Behandlung durch topikale Applikation (Methode 1, siehe 2.6.6) eine hohe Sterblichkeit festgestellt werden. Die Methopren-behandelten Blattläuse unterschieden sich weder an Tag null noch an Tag drei des Adultstadiums von den Kontrolltieren, die nur mit Aceton behandelt worden waren (Abb. 37 und 38). Allerdings gab es Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Tieren. Um Stressreaktionen so gering wie möglich zu halten und möglichst unverfälschte Ergebnisse zu erhalten, wurde eine zweite Methode gewählt, die den chemischen Stress durch Aceton für die Versuchstiere verringern sollte (Methode 2, siehe 2.6.6). Tatsächlich war die Sterblichkeit bei dieser Methode sehr gering (eigene Beobachtungen). Bei Behandlung nach Methode 2 war die Phospholipidsynthese, wie auch schon in den Vorversuchen mit Methode 1, bei den

Methopren-behandelten Tieren tendenziell höher. Die geringere Synthese freier Fettsäuren bei Methopren-Behandlung scheint jedoch nicht stressbedingt zu sein und auch die erhöhte TAG-Synthese ist wohl, wenn man Methopren-behandelte Tiere mit Isooctan-behandelten vergleicht, keine Stressreaktion (Abb. 39).

Die Blattlaus *M. viciae* reagiert im dritten (vorletzten) Larvenstadium gegenüber Manipulationen mit JH am empfindlichsten, im Gegensatz zu vielen anderen Insekten, die erst im letzten Larvenstadium die stärksten Reaktionen zeigen (LEES, 1980). Eine Behandlung mit Methopren hätte auch bei *A. pisum* im dritten Larvenstadium effektiver sein können. Da aber erst im vierten Larvenstadium die geflügelte Morphe mit Sicherheit zu erkennen war, wurde die erste Behandlung erst in diesem Stadium durchgeführt.

4.4 Zuckergehalt in der Hämolymphe

In der Hämolymphe von *A. pisum* konnten in der vorliegenden Arbeit die Zucker Trehalose und Glucose nachgewiesen werden. Bei adulten ungeflügelten Blattläusen betrug die Konzentration von Trehalose $328,5 \pm 13,8$ mM und die von Glucose $15,7 \pm 1,3$ mM. Im Freiland gesammelte adulte aptere Blattläuse der gleichen Art hatten eine Trehalosekonzentration von $271,3 \pm 4,2$ mM und eine Glucosekonzentration von $17,7$ mM (MORIWAKI et al., 2003). Die Unterschiede können sowohl durch die verschiedenen Methoden, vor allem bei der Hämolymphentnahme, als auch durch Unterschiede zwischen Labor- und Freilandtieren zustande gekommen sein. RHODES et al. (1997) fanden bei *A. pisum* eine Trehalosekonzentration von 255 ± 5 mM und eine Fructosekonzentration von 129 ± 8 mM, allerdings bei Tieren, die auf einer künstlichen Diät aus 730 mM Saccharose aufgezogen worden waren. Bei anderen Blattlausarten wurde ebenfalls hauptsächlich Trehalose und Glucose gefunden, ansonsten nur Spuren von Rhamnose, Fructose oder Saccharose (ERHARDT, 1962; WIEDEMANN, 2005). Glucose könnte in der Hämolymphe von *A. pisum* allerdings ein Artefakt sein. MORIWAKI et al. (2003) fanden in Proben, denen Validoxylamin A, ein Trehalase-Inhibitor, zugesetzt worden war, keine Glucose, sondern nur einen höheren Gehalt an Trehalose. Insektenhämolymphe enthält Trehalase, die Trehalose zu Glucose umsetzt (WYATT, 1967). Es wird angenommen, dass Trehalase-Inhibitoren die Trehalase-Aktivität in der Insektenhämolymphe kontrollieren (HAYAKAWA et al., 1989; HIRAOKA et al., 1995). Wenn der Trehalase-Inhibitor sich von dem Enzym abtrennt, erhöht sich Trehalase-Aktivität, was einen verstärkten Abbau von Trehalose zu Glucose zur Folge hat (HIRAOKA et al., 1995). Bei der Verdünnung der Hämolymphe bei der Probenentnahme ist damit zu

rechnen, dass die hemmende Wirkung der Trehalose-Inhibitoren nachlässt, dadurch die Trehalase-Aktivität gesteigert wird und die vorhandene Trehalose relativ schnell zu Glucose abgebaut wird. In unverdünnter Hämolymphe dagegen scheinen die Trehalase-Inhibitoren in ausreichender Konzentration vorzuliegen, um einen konstanten Trehalosespiegel aufrechtzuerhalten (HIRAOKA et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte bei Proben, die bei Raumtemperatur aufbewahrt worden waren, ein Anstieg der Glucosekonzentration und eine Abnahme der Trehalosekonzentration festgestellt werden (Abb. 40). Darum wurden in dieser Arbeit die Proben sofort nach der Abnahme bei -70°C eingefroren und gleich nach dem Auftauen gemessen. Trotzdem könnte während der Hämolympfabnahme oder während der Einfrier- und Auftauphasen ein Teil der Trehalose abgebaut worden sein.

Blattläuse zeichnen sich, im Vergleich zu anderen Insekten, durch einen besonders hohen Zuckergehalt in der Hämolymphe aus (WYATT, 1967). Der Trehalosegehalt liegt normalerweise zwischen 10 und 50 mM (THOMPSON, 2003), bei Blattläusen jedoch meist höher, bis zu Werten von 925,5 mM bei *A. gossypii* (MORIWAKI et al., 2003). Adulte geflügelte *A. pisum* hatten mit einem Gehalt von $404,8 \pm 21,4$ mM mehr Trehalose in der Hämolymphe als ungeflügelte mit $328,5 \pm 13,8$ mM (Abb. 41). Bei Insekten nimmt die Trehalosekonzentration in der Hämolymphe während des Fluges stark ab (CLEGG & EVANS, 1961). Auch der Trehalosegehalt im Thoraxgewebe nimmt während des Fliegens, besonders in der Anfangsphase stark ab (SACKTOR & WORMSER-SHAVIT, 1966). Trehalosereserven in der Hämolymphe sind ein wichtiger Brennstoff für die Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels beim Flug. Sie werden meist in der Anfangsphase des Fluges benutzt, wenn andere Energiequellen, wie Glykogen oder Lipid, erst mobilisiert werden müssen (BEENAKKERS et al., 1985; CANDY et al., 1997). Die höhere Trehalosekonzentration in der Hämolymphe der geflügelten Tiere in der vorliegenden Arbeit kann als Ursache die Flugaktivität der Tiere oder einen allgemein höheren Stoffwechsel (KUNKEL & HERTEL, 1975) haben. Möglicherweise spielt Trehalose bei der geflügelten Morphe auch als Energiespeicher eine größere Rolle als bei der ungeflügelten. Zwar ist Glykogen eine bessere Speicherform für Kohlenhydrate als Trehalose (THOMPSON, 2003), aber höhere Konzentrationen von Trehalose in der Hämolymphe könnten als sofort zur Verfügung stehende Energiequelle für den Flug dienen.

4.4.1 AKH

STEELE zeigte 1961 erstmals, dass die Injektion von CC-Extrakten den Trehalosegehalt in der Hämolymphe erhöht. Hypertrehalosämische Hormone aktivieren die Glykogen-Phosphorylase im Fettkörper, was zu einer Abnahme des Fettkörper-Glykogens und zur Biosynthese von Hämolymphe-Kohlenhydraten, vornehmlich von Trehalose, führt (GÄDE et al., 1997). Bei *B. discoidalis* erhöht der CC-Extrakt und das hypertrehalosämische Hormon die Freisetzung von Trehalose aus dem Fettkörper (BECKER & WEGENER, 1998). Umgekehrt erniedrigt die Entfernung von AKH-produzierenden Zellen den Trehalosegehalt von *Drosophila melanogaster* (ISABEL et al., 2004; KIM & RULIFSON, 2004). Hohe Trehalosekonzentrationen in der Hämolymphe inhibieren die Freisetzung von AKH aus den CC. Nimmt der Trehalosegehalt während des Fluges ab, so wird AKH vermehrt freigesetzt und die Trehalosekonzentration erhöht sich wieder (PASSIER et al., 1997; VULLINGS et al., 1999). Glucose hat sogar einen noch stärker inhibierenden Effekt auf die AKH-Freisetzung aus den CC, was die Vermutung zulässt, dass Trehalose indirekt über ihre Umwandlung zu Glucose die Freisetzung von AKH beeinflusst (PASSIER et al., 1997; FLANIGAN & GÄDE, 1999; VULLINGS et al., 1999).

Die topikale Applikation von 100 pmol Grybi-AKH pro Blattlaus verursachte keine signifikante Veränderung der Trehalosekonzentration in der Hämolymphe (Abb. 43). In der vorliegenden Arbeit war nur nach zwei Stunden eine Tendenz zu einer Abnahme des Trehalosegehalts durch Grybi-AKH zu erkennen. Auch nach vier, sechs und zwölf Stunden Hungern konnte kein Effekt erzielt werden. Bei *B. discoidalis* verstärkt Hungern sowohl die Synthese und Sekretion des hypertrehalosämischen Hormons (SOWA et al., 1996), als auch den Anstieg von HrTH mRNA (LEWIS et al., 1998). Bei machen Insekten, der Honigbiene *Apis mellifera*, der Blattwespe *Tenthredo arcuata* und der Gartenhummel *Bombus hortorum*, hat AKH ebenfalls keinen Effekt auf die Kohlenhydrate in der Hämolymphe. Diesen Insekten fehlen Speicherstoffe in Form von Kohlenhydraten oder Lipid im Fettkörper (LORENZ et al. 1999, 2001). Die Autoren folgern daraus, dass das Speichern von Lipid oder Kohlenhydraten und die hormonelle Steuerung der Mobilisierung der Speicherstoffe vielleicht nicht nötig ist, da diese Insekten im Winter von gesammelten Zuckervorräten leben. Ungeflügelte Blattläuse leben die ganze Zeit auf ihrer Wirtspflanze, bewegen sich kaum und haben immer Zugriff auf Nahrung. Ein Mechanismus, der Reservestoffe mobilisiert, scheint hier ebenfalls nicht unbedingt notwendig. Geflügelte Blattläuse brauchen zwar für den Flug zur neuen Wirtspflanze einen gewissen Energievorrat, doch ist fraglich, ob dafür ein hormoneller Mechanismus zur Mobilisierung von Kohlenhydraten nötig ist. Trotzdem könnten AKH-

Peptide auch bei diesen Insekten in irgendeiner Form an der Regulation des Energiestoffwechsels beteiligt sein. AKHerge Neurone innervieren, abgesehen von anderen Organen, wahrscheinlich auch den Kropf von *D. melanogaster* (LEE & PARK, 2004). AKH könnte die Kropfmuskulatur stimulieren, was zu einer Abgabe von kohlenhydratreicher Flüssigkeit und damit zu einem höheren Kohlenhydratspiegel führen könnte (LEE & PARK, 2004). Auf der anderen Seite ist es durchaus möglich, dass die Methode der topikalen Applikation bei den Blattläusen nicht funktioniert hat. AKH wirkt bei *Pyrrhocoris apterus* und *Gryllus bimaculatus* sowohl über Injektion als auch über topikale Applikation lipids mobilisierend, wobei bei der topikalen Applikation höhere Dosen nötig sind (KODRÍK et al., 2002a, b; LORENZ et al., 2004). Obwohl AKH bei adulten *G. bimaculatus* nach topikaler Applikation Lipid mobilisiert, kann bei diesen Tieren im letzten Larvenstadium jedoch keine AKH-Wirkung beobachtet werden (M.W. Lorenz, persönliche Mitteilung). Unabhängig davon stellt sich auch hier wieder die Frage, ob nicht der oben angegebene Längenunterschied zwischen verwendetem Grybi-AKH-Peptid und mutmaßlichen Acypi-AKH-Peptid die Wirkung auf die Kohlenhydrate verhindert.

Bei den Larven des Maulbeerspinners *Bombyx mori* steigt der Trehalosegehalt in der Hämolymphe während des Fastens in den ersten sechs Stunden leicht an und nimmt nach zwölf Stunden wieder ab. Die Glykogen-Phosphorylase Aktivität im Fettkörper steigt in dieser Zeit ebenfalls stark an, während der Glykogengehalt im Fettkörper und Mitteldarm abnimmt. Daher ist anzunehmen, dass die Erhöhung des Trehalosegehalts durch den Abbau von Glykogen zustande kommt (SATAKE et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte nach sechs Stunden Hungern ebenfalls ein leicht, jedoch nicht signifikant erhöhter Trehalosegehalt der Kontrolltiere festgestellt werden. Nach zwölf Stunden nahm die Trehalosekonzentration wieder geringfügig, aber nicht signifikant, ab (Abb. 43).

Abhängig von den Umweltbedingungen werden entweder vermehrt ungeflügelte Blattläuse produziert, die eine hohe Reproduktionsrate haben, oder geflügelte Blattläuse, die sich ausbreiten und neue Wirtspflanzen besiedeln können (DIXON, 1998; BRAENDLE et al., 2006). Die physiologischen Grundlagen des Trade-off zwischen Reproduktionsfähigkeit und Energiereserven für den Flug wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Besonders in Hinblick auf den Zeitraum zwischen Tag null und drei des Adultstadiums wurde bei geflügelten Blattläusen wurde ein höherer Gehalt an Lipid, Kohlenhydraten und Protein nachgewiesen. Diese Reservestoffe sind wichtige Energiequellen für den Flug (BEENAKKERS

et al., 1985; GÄDE, et al., 1997). Geflügelte Blattläuse synthetisieren außerdem mehr Gesamtlipid, TAG, DAG und Glykogen. Eine erhöhte Biosynthese ist wahrscheinlich für die Aufrechterhaltung der Energiequellen für den Flug notwendig. Ungeflügelte Blattläuse dagegen synthetisieren mehr Phospholipide, die eine Rolle in der Reproduktion spielen. Entsprechend ihrer Lebensweise nutzen ungeflügelten Blattläuse somit wahrscheinlich ihre Nährstoffe für die Reproduktion, anstatt sie in die Akkumulation von Speicherstoffen zu stecken.

4.5 Ausblick

Blattläuse verursachen allein an Nutzpflanzen geschätzte Hundert Millionen Dollar Schäden pro Jahr (OERKE, 1994). Besonders in Hinblick auf die biologische Schädlingsbekämpfung ist die Forschung an diesen Insekten damit auch ökonomisch sehr interessant. Über den Metabolismus der Blattläuse ist, wahrscheinlich aufgrund der geringen Größe dieser Tiere, bisher nicht allzu viel bekannt. Doch es scheint bedeutende Unterschiede zu anderen Insekten zu geben (DILLWITH et al., 1993). Die Fraktionen des 1. HPLC-Laufs bilden einen großen Vorrat an Blattlaus-Komponenten. Durch Strukturaufklärung und Tests auf diverse physiologische Wirkungen könnten einige Blattlaus-Peptide identifiziert werden. Auch die Klonierung und molekulare Charakterisierung der Sequenz des mutmaßlichen *A. pisum*-AKHs wäre eine interessante Arbeit für die Zukunft. Mithilfe des wahrscheinlich in Kürze veröffentlichten *A. pisum* Genoms könnten so neue Werkzeuge für eine biologische Schädlingsbekämpfung gefunden werden.

5 Zusammenfassung

- Durch die Aufreinigung von Blattlausmaterial mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatographie) in Kombination mit einem *in vitro*-Bioassay wurde für ein mutmaßliches *Acyrtosiphon pisum*-AKH die Aminosäure-Teilsequenz -NFST- erhalten.
- Die Suche in den ersten bisher veröffentlichten Sequenzen des Genoms von *A. pisum* führte zu der Sequenz QVNFTPTWGQamid, die ein mutmaßliches adipokinetisches/hypertrehalosämisches Peptid darstellt.
- Der Stoffbestand der geflügelten (alaten) und der ungeflügelten (apteren) Morphe wurde im letzten Larven- und im Adultstadium analysiert.
 - Das Frischgewicht der ungeflügelten Morphe ist während des letzten Larvenstadiums und des Adultstadiums höher als das der geflügelten. Das Trockengewicht der Alatae ist nur am ersten Tag des Adultstadiums höher als das der Apteræe.
 - Die geflügelten Blattläuse haben, abgesehen von Tag 10 des Adultstadiums, immer einen höheren Gehalt an Protein als die ungeflügelten.
 - Der Gehalt an Glykogen steigt bei beiden Morphen zum Ende des letzten Larvenstadiums stark an und nimmt dann mit steigendem Alter wieder ab.
 - Die geflügelte Morphe hat am Ende des letzten Larvenstadiums und während des Adultstadiums, außer an Tag 3, einen höheren Gehalt an freien Kohlenhydraten als die ungeflügelte Morphe.
 - Der Lipidgehalt ist bei den Alatae während des letzten Larvenstadiums und bis zu Tag 3 des Adultstadiums höher als bei den Apteræe. Bei der geflügelten Morphe nimmt der Gehalt an Lipid bis zum 1. Tag des Adultstadiums zu und dann mit steigendem Alter wieder ab.
 - Protein ist in allen Altersstadien und bei beiden Morphen der vorherrschende Inhaltsstoff. Glykogen ist am Ende des letzten Larvenstadiums in größerer Menge vorhanden als freie Kohlenhydrate und Lipid, aber im späteren Adultstadium der quantitativ unbedeutendste Bestandteil.

- Rosa gefärbte *A. pisum* haben ein höheres Frischgewicht als heller gefärbte. An Tag drei des Adultstadiums haben rosa gefärbte ungeflügelte Blattläuse einen höheren Kohlenhydratgehalt und rosa gefärbte geflügelte Tiere einen höheren Protein- und Glykogengehalt als heller gefärbte.
- Der Einbau von Glucose und Trehalose in Glykogen ist bei den Adulttieren der geflügelten Morphe höher als bei den ungeflügelten Tieren.
- Im Adultstadium baut die geflügelte Morphe mehr Acetat in Lipid ein als die ungeflügelte Morphe. Die Lipidsyntheserate steigt bei beiden Morphen von Tag 0 zu Tag 3 des Adultstadiums stark an.
- Der Einbau von Acetat in die Lipidklassen Phospholipide, freie Fettsäuren, DAG und TAG konnte nachgewiesen werden. Die ungeflügelte Morphe baut einen höheren Anteil von Acetat in Phospholipide und weniger Acetat in TAG ein als die geflügelte. An Tag 3 des Adultstadiums synthetisieren die Apteræ zusätzlich mehr freie Fettsäuren als die Alatae. Die geflügelte Morphe baut indessen an Tag 0 eine größere Menge an Acetat in DAG ein als die ungeflügelte Morphe und synthetisiert an Tag 3 weniger DAG und mehr TAG als zuvor an Tag 0.
- Die Zugabe von 5×10^{-4} M Grybi-AKH führt zu einer tendenziellen Hemmung des Acetateinbaus in Gesamtlipid.
- Methopren-behandelte geflügelte Tiere bauen mehr Acetat in TAG und weniger Acetat in freie Fettsäuren ein als die Kontrolltiere.
- Aufgrund der Trehalase-Aktivität in der Hämolymphe wird in verdünnten Hämolympheproben, die bei Raumtemperatur gelagert werden, Trehalose zu Glucose abgebaut.
- Die Hämolymphe der adulten geflügelten Morphe hat einen höheren Trehalosegehalt als die der ungeflügelten. Der Gehalt an Trehalose nimmt bei den Alatae vom Larvenstadium zum Adultstadium zu. Die topikale Applikation von Grybi-AKH verändert die Trehalosekonzentration in der Hämolymphe nicht.

6 Summary

- Using Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatographie in combination with an *in vitro*-bioassay a partial amino acid sequence for a putative *Acyrtosiphon pisum*-AKH (-NFST-) was obtained.
- The search for AKH-like peptides in the previously published sequences of the genome of *A. pisum* revealed the sequence QVNFTPTWGQamid.
- The body contents of organic substances of winged (alate) and unwinged (apterous) morphs of the last larval and adult stage was analysed.
 - The fresh weight of the unwinged morph is higher than the fresh weight of the winged morph during the last larval and adult stage. In adult aphids, the dry weight of the alatae is higher only at the first day.
 - Winged aphids have a higher protein content than the unwinged ones, except for 10 d-old adults.
 - In both morphs, the glycogen content increases at the end of the last larval stage and decreases again with increasing adult age.
 - The winged morph has a higher free carbohydrate content at the end of the last larval stage and during the adult stage, except for 3 d-old adults, compared to the unwinged morph.
 - During the last larval stage until day 3 of the adult stage, the lipid content is higher in alatae than in apterae. In the winged morph the lipid content increases until the first day of the adult stage and decreases again with increasing age.
 - Protein constitutes the major portion of organic substances in all stages and in both morphs. In the last larval stage, more glycogen than free carbohydrate and lipid is present, but at the end of the adult stage the glycogen level drops below the levels of carbohydrate and lipid.
- Pink coloured *A. pisum* have a higher fresh weight than pale coloured ones. 3 d-old pink coloured unwinged adults have a higher carbohydrate content and pink coloured winged adults a higher protein and glycogen content than pale coloured ones.

- The incorporation of glucose and trehalose into glycogen is higher in winged aphids than in unwinged ones.
- The incorporation of acetate into lipid is higher in the winged than in the unwinged morph. In both morphs, the rate of lipid synthesis increases from day 0 to day 3 of the adult stage.
- The incorporation of acetate into the lipid classes phospholipids, free fatty acids, DAG, and TAG was demonstrated. The unwinged morph incorporates a greater proportion of acetate into phospholipid and a lower amount into TAG than the winged one. Additionally, on day 3 of the adult stage, the apterae synthesize more free fatty acids than the alatae. In contrast, on day 0 the winged morph incorporates a larger amount of acetate into DAG than the unwinged morph and on day 3 synthesises less DAG and more TAG than on day 0.
- Addition of 5×10^{-4} M Grybi-AKH tends to inhibit the acetate-incorporation into total lipid.
- Methoprene-treated winged aphids incorporate more acetate into TAG and less acetate into free fatty acids compared to the control animals.
- Due to trehalase-activity in the hemolymph, trehalose is degraded to glucose when diluted haemolymph samples are stored at room temperature.
- The adult winged morph has a higher haemolymph trehalose content than the unwinged one. The trehalose content increases in alatae from the larval to the adult stage. Topical application of Grybi-AKH does not alter the trehalose concentration in the haemolymph.

7 Literatur

- Abdel-latif, M. & Hoffmann, K.H. (2007). The adipokinetic hormones of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: cDNA cloning, quantitative real time RT-PCR analysis, and gene specific localization. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 37: 999-1014.
- Adachi, S. (1965) Thin-layer chromatography of carbohydrates in the presence of bisulfite. *J. Chromatogr.* 17: 295-299.
- Applebaum, S.W., Raccach, B. & Leiserowitz, R. (1975). Effect of juvenile hormone and β -Ecdysone on wing determination in the aphid *Myzus persicae*. *J. Insect Physiol.* 21: 1279-1281.
- Arrese, E.L. & Wells, M.A. (1997). Adipokinetic hormone-induced lipolysis in the fat body of an insect, *Manduca sexta*: synthesis on sn-1,2-diacylglycerols. *J. Lipid Res.* 38: 68-76.
- Becker, A. & Wegener, G. (1998). Hypertrehalosaemic neuropeptides decrease levels of the glycolytic signal fructose 2,6 biphosphate in crockroach fat body. *J. Exp. Biol.* 201: 1939-1946.
- Beenackers, A.M.T. (1969). The influence of corpus allatum and corpus cardiacum on lipid metabolism in *Locust migratoria*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 13: 492, abstract 12.
- Beenackers, A.M.T., Van der Horst, D.J. & Van Marrewijk, W.J.A. (1985). Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes. *Prog. Lip. Res.* 24: 19-67.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Von Heijne, G. & Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340: 783-795.
- Bergman, D.K., Dillwith, J.W. & Berberet, R.C. (1991). Spotted alfalfa aphid, *Therioaphis maculata*, fatty acids relative to the condition and susceptibility of its host. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 18: 1-12.
- Boctor, I.Z. (1974). Carbohydrates in the haemolymph of the cotton leaf-worm, *Spodoptera littoralis* Boisduval larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Comp. Biochem. Physiol. B* 49: 79-82.
- Bogerd, J., Kooiman, F.P., Pijnenburg, M.A., Hekking, L.H., Oudejans, R.C. & Van der Horst, D.J. (1995). Molecular cloning of three distinct cDNAs, each encoding a different adipokinetic hormone precursor, of the migratory locust, *Locusta migratoria*. Differential expression of the distinct adipokinetic hormone precursor genes during flight activity. *J. Biol. Chem.* 270: 23038-23043.
- Bradfield, J.Y. & Keeley, L.L., (1989). Adipokinetic hormone gene sequence from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 264: 12791-12793.
- Braendle, C., Davis, G.K., Brisson, J.A. & Stern, D.L. (2006). Wing dimorphism in aphids. *Heredity* 97: 192-199.

- Candy, D.J., Hall, L.J. & Spencer, I.M. (1976). The metabolism of glycerol in the locust *Schistocerca gregaria* during flight. *J. Insect Physiol.* 22: 583-587.
- Candy, D.J., Becker, A. & Wegener, G. (1997). Coordination and integration of metabolism in insect flight. *Comp. Biochem. Physiol. B* 117: 497-512.
- Chen, Z., Madden, R.D. & Dillwith, J.W. (2005). Effect of preconene II on fatty acid metabolism in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, under cold stress. *J. Insect Physiol.* 51: 411-416.
- Clegg, J.S. & Evans, D.R. (1961). The physiology of blood trehalose and its function during flight in the blowfly. *J. Exp. Biol.* 38: 771-792.
- Clynen, E., De Loof, A. & Schoofs, L. (2004). New insights into the evolution of the GRF superfamily based on sequence similarity between the locust APRPs and human GRF. *Gen. Comp. Endocrinol.* 139: 173-178.
- Cockbain, A.J. (1961). Fuel utilization and duration of tethered flight in *Aphis fabae* Scop. *J. Exp. Biol.* 38: 163-174.
- Cotton, G. & Anstee, J.H. (1991). A biochemical and structural study on the effects of methoprene on fat body development in *Locusta migratoria* L. *J. Insect Physiol.* 37: 525-539.
- De Renobales, M., Cripps, C., Kinsey, M. (1990). Lipid biosynthesis in adult *Acyrtosiphon pisum*: Effect of age and symbiont population. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 14: 85-92.
- Dillwith, J.W., Neese, P.A., Brigham, D.L. (1993). Lipid biochemistry in aphids. In: *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology*. Stanley-Samuelson, D.W. and Nelson, D.R. (eds.). University of Nebraska Press, Lincoln, Nebraska. 389-434.
- Dionex Corporation (1993). Analysis of carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatographie with pulsed Amperometric detection (HPAE-PAD). Technical Note 1-11.
- Dixon, A.F.G. (1995). Parthenogenesis in insects with particular reference to the ecological aspects of cyclical parthenogenesis in aphids. In: *Insect Reproduction*. Leather, S.R. & Hardie, J. (eds.). CRC Press. Inc. 131-142.
- Dixon, A.F.G. (1998). *Aphid Ecology*. 2nd edition. Chapman & Hall, London, UK.
- Downer, R.G.H. (1985). Lipid metabolism. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I. (eds). Pergamon, Oxford. Vol. 10: 77-114.
- Erhardt, P. (1962). Untersuchungen zur Stoffwechselphysiologie von *Megoura viciae* Buckt., einer phloemsaugenden Aphide. *Z. Vergl. Physiol.* 46: 169-211.

- Febvay, G., Pageaux, J.-F. & Bonnot, G. (1992). Lipid composition of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphididae), reared on host plant and on artificial media. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 21: 103-119.
- Febvay, G., Rahbé, Y., Rynkiewicz, M., Guillaud, J. & Bonnot, G. (1999). Fate of dietary sucrose and neosynthesis of amino acids in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, reared on different diets. *J. Exp. Biol.* 202: 2639-2652.
- Felsenstein, J. (2005). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.65. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, USA.
- Fischer, M.K. (2001). Die Zusammensetzung des Honigtaus bei verschiedenen Blattlausarten und die Konsequenzen für den Mutualismus Blattlaus-Ameise. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Fischer-Lougheed, J., O'Shea, M., Cornish, I., Losberger, C., Roluet, E. & Schulz-Allen, M.F. (1993). AKH biosynthesis: Transcriptional and translational control of two co-localized prohormones. *J. Exp. Biol.* 177: 223-241.
- Flanigan, J.E. & Gäde, G. (1999). On the release of the three locust (*Locusta migratoria*) adipokinetic hormones: Effect of crustacean cardioactive peptide and inhibition by sugars. *Z. Naturforsch.* 54c: 110-118.
- Fröhlich, G. (1962). Das Verhalten der grünen Erbsenblattlaus *Acyrtosiphon pisum* (Harris) gegenüber verschiedenen Wirtspflanzen und Temperaturveränderungen. *Z. Angewan. Entomol.* 51: 55-68.
- Gäde, G. (2004). Regulation of intermediary metabolism and water balance of insects by neuropeptides. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 93-113.
- Gäde, G., Hoffmann, K.H. & Spring, J.H. (1997). Hormonal regulation in insects: facts, gaps and future directions. *Physiol. Rev.* 77: 963-1032.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: *The Proteomics Protocols Handbook*. Walker, J.M. (ed.). Humana Press.
- Gilbert, L.I. (1967). Lipid metabolism and function in insects. *Adv. Insect Physiol.* 4: 69-208.
- Gokuldas, M., Hunt, P.A. & Candy, D.J. (1998). The inhibition of lipid synthesis in vitro in the locust, *Schistocerca gregaria*, by factors from the corpora cardiaca. *Physiol. Entomol.* 13: 43-48.
- Goldsworthy, G.J., Chandrakant, S. & Opoku-Ware, K. (2003). Adipokinetic hormone enhances nodule formation and phenoloxidase activation in adult locusts injected with bacterial lipopolysaccharide. *J. Insect Physiol.* 24: 795-803.
- Greenway, A.R., Griffiths, D.C., Furk, C. & Prior, N.B. (1974). Composition of triglycerides from aphids of six different families and from different seasonal forms of *Aphis evonymi*. *J. Insect Physiol.* 20: 2423-2431.

- Gwynn, D.M., Callaghan, A., Gorham, J., Walters, K.F.A. & Fellowes, M.D.E. (2005). Resistance is costly: trade-offs between immunity, fecundity and survival in the pea aphid. *Proc. R. Soc. B* 272: 1803-1808.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* 23: 403-405.
- Johnson, B. (1965). Wing polymorphism in aphids II. Interaction between aphids. *Entomol. Exp. Appl.* 8: 49-64.
- Johnson, B. & Birks, P.R. (1960). Studies on wing polymorphism in aphids. I. The developmental process involved in the production of the different forms. *Entomol. Exp. Appl.* 3: 327-339.
- Hardie, J. (1981). Juvenile hormone and photoperiodically controlled polymorphism in *Aphis fabae*: prenatal effects on presumptive oviparae. *J. Insect Physiol.* 27: 257-265.
- Hardie, J., Baker, F.C., Jamieson, G.C., Lees, A.D. & Schooley, D.A. (1985). The identification of an aphid juvenile hormone, and its titre in relation to photoperiod. *Physiol. Entomol.* 10: 297-302.
- Hardie, J. & Lees, A.D. (1985). The induction of normal and teratoid viviparae by a juvenile hormone and kinoprene in two species of aphids. *Physiol. Entomol.* 10: 65-74.
- Hardie, J., Honda, K.-I., Timar, T. & Varjas, L. (1995). Effects of 2,2-Dimethylchromene derivatives on wing determination and metamorphosis in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 30: 25-40.
- Harper, A.M., Miska, J.P., Manglitz, G.R., Irwin, B.J. & Armbrust E.J. (1978). The literature of arthropods associated with alfalfa. III. A bibliography of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphididae). Special Publication 50. Agricultural Exp. Station, University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Harrewijn, P. (1976). Role of monoamine metabolism in wing dimorphism of the aphid *Myzus persicae*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 55: 147-153.
- Hayakawa, Y., Jahagirdar, A.P., Yaguchi, M. & Downers, R.G.H. (1989). Purification and characterization of trehalase inhibitor from hemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Biol. Chem.* 264: 16165-16169.
- Hazell, S.P., Gwynn, D.M., Ceccarelli, S. & Fellowes, M.D.E. (2005). Competition and dispersal in the pea aphid: clonal variation and correlations across traits. *Eco. Entomol.* 30: 293-298.
- Hill, D.S. (1975). *Agricultural Insect Pests of Tropics and their Control*. Cambridge Press, London.
- Hiraoka, T., Hayakawa, Y., Downer R.G.H. (1995). Immunocytochemical localization of trehalase inhibitor in some insect species. *Cell Tissue Res.* 279: 465-468.

- Hoffmann, K.H. & Sorge, D. (1996). Vitellogenin levels in allatectomized female crickets, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Enisfera, Gryllidae). Arch. Insect Biochem. Physiol. 32: 549-558.
- Isabel, G., Martin, J.-R., Chidami, S. Veenstra, J.A. & Rosay, P. (2004). AKH-producing neuroendocrine cell ablation decreases trehalose and induces behavioural changes in *Drosophila*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 288: R531-R538.
- Itoyama, K., Tojo, S., Yanagita, T. & Hardie, J. (2000). Lipid composition in long-day and short-day forms of the black bean aphid, *Aphis fabae*. J. Insect Physiol. 46: 119-125.
- Kaufmann, C.H. & Brown, M.R. (2006). Adipokinetic hormones in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*: Identification and expression of genes for two peptides and a putative receptor. Insect Biochem. Molec. Biol. 36: 466-481.
- Kim, S.K. & Rulifson, E.J. (2004). Conserved mechanisms of glucose sensing regulation by *Drosophila* corpora cardiaca cells. Nature 431: 316-320.
- Klein, J.M., Mohrherr, C.J., Sleutels, F., Jaenecke, N., Riehm, J.P. & Rao, K.R. (1995). A highly conserved red pigment-concentrating hormone precursor in the blue crab *Callinectes sapidus* Biochem. Biophys. Res. Commun. 212: 151-158.
- Kleinjan, J.E. & Mittler, T.E. (1975). A chemical influence of ants on wing development in aphids. Entomol. Exp. Appl. 18: 348-388.
- Kodrík, D., Šimek, P., Lepša, L. & Socha, R. (2002a). Identification of the cockroach neuropeptide Pea-CAH-II as a second adipokinetic hormone in the firebug *Pyrrhocoris apterus*. Peptides 23: 583-585.
- Kodrík, D., Socha, R. & Zemek, R. (2002b). Topikal application of Pya-AKH stimulates lipid mobilization and locomotion in the flightless bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). Physiol. Entomol. 27 : 15-20.
- Köllisch, G.V., Lorenz, M.W., Verhaert, P., Kellner, R. & Hoffmann, K.H. (2000). Structure elucidation and biological activity of an unusual adipokinetic hormone from corpora cardiaca of the butterfly, *Vanessa cardui*. Eur. J. Biochem. 267: 5502-5508.
- Kostyukovsky, M., Chen, B., Atsmi, S. & Shaaya, E. (2000). Biological activity of two juvenoids and two ecdysteroids against three stored product insects. Insect Biochem. Molec. Biol. 30: 891-897.
- Kunert, G. & Weisser, W.W. (2003) The interplay between density- and trait-mediated effects in predator-prey interactions: a case study in aphid wing polymorphism. Oecologia 135: 304–312.
- Kunkel, H. & Hertel, R. (1975). Erstellung einer Stoffwechselbilanz für beide virginoparen Morphen von *Myzus persicae* (Sulz.) -Larven im dritten Stadium. Oecologia 18: 23-35.
- Lamb, R.J. & McKay, P.A. (1987). *Acyrtosiphon kondoi* influences alata production by the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. Entomol. Exp. Appl. 45: 195-204.

- Lampel, G. (1968). Die Biologie der Blattlaus-Generationswechsel, G. Fischer Verlag, Jena.
- Leather, S.R., Wellings, P.W. & Dixon, A.F.G. (1983). Habitat quality and the reproductive strategies of the migratory morphs of the bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) colonizing secondary host plants. *Oecologia* 59: 302-306.
- Lee, M.J. & Goldsworthy, G.J. (1996). Modified adipokinetic peptides containing two tryptophan residues and their biological activities *in vitro* and *in vivo* in *Locusta*. *J. Comp. Physiol. B* 166: 61-71.
- Lee, G. & Park, J.H. (2004). Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167: 311-323.
- Lees, A.D. (1966). The control of polymorphism in aphids. *Adv. Insect Physiol.* 3: 207-277.
- Lees, A.D. (1980). The development of juvenile hormone sensitivity in alatae of the aphid *Megoura viciae*. *J. Insect Physiol.* 26: 143-151.
- Lewis, D.K., Jezierski, M.K., Keeley, L.L. & Bradfield, J.Y. (1997). Hypertrehalosemic hormone in a cockroach: molecular cloning and expression. *Molec. Cell. Endocrinol.* 130: 101-108.
- Lewis, D.K., Bradfield, J.Y. & Keeley, L.L. (1998). Feeding effects on gene expression of the hypertrehalosemic hormone in the cockroach *Blaberus discoidalis*. *J. Insect Physiol.* 44: 967-972.
- Linck, B., Kelin, J.M., Mangerich, S., Keller, R. & Weidemann, W.M. (1993). Molecular cloning of crustacean red pigment concentrating hormone precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195: 807-813.
- Liquido, N.J. & Irwin, M.E. (1986). Longevity, fecundity, change in degree of gravidity and lipid utilization during tethered flight of alates of the corn leaf aphid *Rhopalosiphum maidis*. *Ann. Appl. Biol.* 108: 449-459.
- Lorenz, M.W. (2001). Synthesis of lipids in the fat body of *Gryllus bimaculatus*: age-dependency and regulation by adipokinetic hormone. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47: 198-214.
- Lorenz, M.W. (2003). Adipokinetic hormone inhibits the formation of energy stores and egg production in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 136: 197-206.
- Lorenz, M.W. (2005). Age-dependent lipid and glycogen synthesis in the cricket fat body and regulation by adipokinetic hormone. *Pesticides* 3: 109-116.
- Lorenz, M.W. (2007). Oogenesis-flight syndrome in crickets: Age-dependent egg production, flight performance, and biochemical composition of the flight muscles in adult female *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* 53: 819-832.

- Lorenz, M.W., Kellner, R., Woodring, J., Hoffmann, K.H. & Gäde, G. (1999). Hypertrehalosaemic peptides in the honeybee (*Apis mellifera*): purification, identification and function. *J. Insect Physiol.* 45: 647-653.
- Lorenz, M.W., Kellner, R., Völkl, W., Hoffmann, K.H. & Woodring, J. (2001). A comparative study on hypertrehalosaemic hormones in the Hymenoptera: sequence determination, physiological actions and biological significance. *J. Insect Physiol.* 47: 563-571.
- Lorenz, M.W. & Anand, A.N. (2004). Changes in the biochemical composition of fat body stores during adult development of female crickets, *Gryllus bimaculatus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 56: 110-119.
- Lorenz, M.W., Zemek, R., Kodrık, D. & Socha, R. (2004). Lipid mobilization and locomotor stimulation in *Gryllus bimaculatus* by topically applied adipokinetic hormone. *Physiol. Entomol.* 29: 146-151.
- Martínez-Pérez, F.M., Becerra, A., Valdes, J., Zinker, S. & Arechiga, H. (2002). A possible molecular ancestor for mollusk APGWamide, insect adipokinetic hormone, and crustacean red pigment concentrating hormone. *J. Mol. Evol.* 54: 703-714.
- Mayer, R.J. & Candy, D. J. (1969). Control of haemolymph lipid concentration during locust flight: an adipokinetic hormone from the corpora cardiaca. *J. Insect Physiol.* 15: 611-620.
- McKenney, C.L. & Celestial, D.M. (1996). Modified survival, growth and reproduction in an estuarine mysid (*Mysidopsis bahia*) exposed to a juvenile hormone analogue through a complete life cycle. *Aquatic Toxicology* 35: 11-20.
- Min, K.J., Taub-Montemayor, T.E., Linse, K.D., Kent, J.W. & Rankin, M.A. (2004). Relationship of adipokinetic hormone I and II to migratory propensity in the grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 55: 33-42.
- Miyazaki, M. (1987). Forms and morphs of aphids. In: *World Crop Pests. Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control*. Minks, A.K. & Harrewijn, P. (eds.) Elsevier, Amsterdam. 2A: 27-50.
- Mokrasch, L.C. (1954). Analysis of hexose phosphates and sugar mixtures with the anthrone reagent. *J. Biol.Chem.* 208: 55-59.
- Moriwaki, N., Matsushita, K., Nishina, M. & Kono, Y. (2003). High concentrations of trehalose in aphid hemolymph. *Appl. Entomol. Zool.* 38: 241-248.
- Müller, C.B., Williams, E.S., Hardie, J. (2001). The role of nutrition, crowding and interspecific interactions in the development of winged aphids. *Ecol. Entomol.* 26: 330-340.
- Müller, F.P. (1961). Stabilität und Veränderlichkeit der Färbung bei Blattläusen. *Archiv der Freunde der Naturgeschichte in Mecklenburg.* 7: 228-239.

- Nates, S.F. & McKenney, C.L. (2000). Growth, lipid class and fatty acid composition in juvenile mud crabs (*Rhithropanopeus harrisi*) following larval exposure to Fenoxycarb, insect juvenile hormone analog. *Comp. Biochem. Physiol. C* 127: 317-325.
- Neese, P.A. (1995). Regulation of fatty acid biosynthesis in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris). Ph. D. Dissertation, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma.
- Noyes, B.E. & Schaffer, M.H. (1990). The structurally similar neuropeptides adipokinetic hormone I and II are derived from similar, very small mRNAs. *J. Biol. Chem.* 265: 483- 489.
- Noyes, B.E., Katz, F.N. & Schaffer, M.H. (1995). Identification and expression of the *Drosophila* adipokinetic hormone gene. *Molec. Cell. Endocrinol.* 109: 133-141.
- Oerke, E.C. (1994). Estimated losses in major food and cash crops. In: *Crop Production and Crop Protection*. Oerke, E.C., Dehne, H.W., Schonbeck, F., Weber, A. (eds.). Elsevier, Amsterdam.
- Page, R.D.M. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Passier, P., Vullings, H.G.B., Diederren, J.H.B. & Van der Horst, D.J. (1997). Trehalose inhibits the release of adipokinetic hormones from the corpus cardiacum in the African migratory locust, *Locusta migratoria*, at the level of the adipokinetic cells. *J. Endocrinol.* 153: 299-305
- Pener, M.P. (1985). Hormonal effects on flight and migration. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I., (eds.). New York: Pergamon. 8: 491-550.
- Pintér, M., Lent, D.D. & Strausfeld, N.J. (2005). Memory consolidation and gene expression in *Periplaneta americana*. *Learn. Mem.* 12: 30-38.
- Rhodes, J.D., Croghan, P.C. & Dixon, A.F.G. (1997). Dietary sucrose and oligosaccharide synthesis in relation to osmoregulation in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Physiol. Entomol.* 22: 373-379.
- Sacktor, B. & Wormser-Shavit, E. (1966). Regulation of metabolism in working muscle in vivo. I. Concentration of some glycolytic, tricarboxylic acid cycle, and amino acid intermediates in insect flight muscle during flight. *J. Biol. Chem.* 241: 624-631.
- Satake, S., Kawabe, Y. & Mizogucji, A. (2000). Carbohydrate metabolism during starvation in the silkworm *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 44: 90-98.
- Schal, C., Sevala, V.L., Young, H.P. & Bachmann, J.A.S. (1998). Sites of synthesis and transport pathways of insect hydrocarbons: cuticle and ovary as target tissues. *Am. Zool.* 38: 382-393.

- Sharp-Baker, H.E., Diederer, J.H., Makel, K.M., Peute, J. & Van der Horst, D.J. (1995). The adipokinetic cells in the corpus cardiacum of *Locusta migratoria* preferentially release young secretory granules. *Eur. J. Cell Biol.* 68: 268-274.
- Sharp-Baker, H.E., Oudejans, R.C., Kooiman, F.P., Diederer, J.H., Peute, J. & Van der Horst, D.J. (1996). Preferential release of newly synthesized, exportable neuropeptides by insect neuroendocrine cells and the effect of ageing of secretory granules. *Eur. J. Cell Biol.* 71: 72-78.
- Shingleton, A.W., Sisk, G.C. & Stern, D.L. (2003). Diapause in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) is a slowing but not a cessation of development. *BMC Develop. Biol.* 3: 7-19.
- Siegert, K.J. (1987). Carbohydrate metabolism in *Manduca sexta* during late larval development. *J. Insect Physiol.* 33: 421-427.
- Sloggett, J.J. & Weisser, W.W. (2002). Parasitoids induce production of the dispersal morph in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Oikos* 98: 323-333.
- Socha, R., Šula, J. & Kodrík, D. (2004). Wing morph-related differences in developmental pattern of accessory gland proteins in adult males of *Pyrrhocoris apterus* (L.) and their endocrine control. *J. Insect Physiol.* 50: 893-901.
- Socha, R., Kodrík, D. & Šula, J. (2005). Wing morph-specific differences in the metabolism and endocrine control of reserve mobilization in adult males of a flightless bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.). (Heteroptera). *J. Comp. Physiol. B* 175: 557-565.
- Sorge, D., Nauen, R., Range & Hoffmann, K.H. (2000). Regulation of vitellogenesis in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Physiol.* 46: 969-976.
- Sowa, S.M., Lu, K.-H., Park, J.H., & Keeley, L.L. (1996). Physiological effectors of hyperglycemic neurohormone biosynthesis in an insect. *Molec. Cell. Endocrinol.* 123: 97-105.
- Specty, O., Febvay, G., Grenier, S., Delobel, B., Piotte, C., Pageaux, J.-F., Ferran, A. & Guillaud, J. (2003). Nutritional plasticity of the predatory ladybeetle *Armonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): Comparison between natural and substitution prey. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 52: 81-91
- Srivastava, P.N., Auclair, J.L. (1963). Characteristica and nature of proteases from the alimentary canal of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphididae). *J. Insect Physiol.* 9: 469-474.
- Steele, J.E. (1961). Occurrence of a hyperglycemic factor in the corpus cardiacum of an insect. *Nature* 192: 680-681.
- Steele, J.E. (1963). The site of action of insect hyperglycemic hormone. *Gen. Comp. Endocr.* 3: 46-52.

- Storey K.B., Storey J.M. (1991). Biochemistry of cryoprotectants. In: Insects at Low Temperature. Lee, R.E. & Denlinger, D.L. (eds.). Chapman and Hall, New York & London. 64-93.
- Sutherland, O.R.W. (1968). Dormancy and lipid storage in the pemphigine aphid *Thecabius affinis*. Entomol. Exp. Appl. 11: 348-354.
- Sutherland, O.R.W. (1969a). The role of crowding in the production of winged forms by two strains of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. J. Insect Physiol. 15: 1385-1410.
- Sutherland, O.R.W. (1969b). The role of the host plant in the production of winged forms by two strains of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. J. Insect Physiol. 15: 2179-2201.
- Tilley, S.B., Wever, R.J. & Isaac, R.E. (2000). Allatostatin-like and AKH/HrTH-like peptides in the aphid *Megoura viciae*. Gen. Comp. Endocrinol. 117: 355-365.
- Thompson, S.N. (2003). Trehalose- The insect 'blood' sugar. Adv. Insect Physiol. 31: 205-285.
- Tsuji, H. & Kawada, K. (1987). Effects of starvation on life span and embryo development of four morphs of pea aphid (*Acyrtosiphon pisum* [Harris]). Jap. J. Appl. Ent. Zool. 31: 36-40.
- Tsumuki, H., Nagatsuka, H., Kawada, K. & Kanehisa, K. (1990). Comparison of nutrient reservation in apterous and alate pea aphids, *Acyrtosiphon pisum* (Harris). 1. Developmental time and sugar content. Appl. Entomol. Zool. 25: 215-221.
- Ueda, N. & Takada, H. (1977). Differential relative abundance of green-yellow and red forms of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) according to host plant and season. Appl. Entomol. Zool. 12: 124-133.
- Van der Horst, D.J. (2003). Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. Comp. Biochem. Physiol. B 136: 217-226.
- Van der Horst, D.J., Abbink, J.H.M., Van Doorn, J.M., Van Marrewijk, W.J.A. & Beenackers, A.M.T. (1983). Glycerol dynamics and metabolism during flight of the locust, *Locusta migratoria*. Insect Biochem. 13: 45-55.
- Van der Horst, D.J., Weers, P.M.M., & Van Marrewijk, W.J.A. (1993). Lipoproteins and lipid transport. In: Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology. Stanley-Samuels, D.W. and Nelson, D.R. (eds.). University of Nebraska Press, Lincoln, Nebraska. 1-24.
- Vroemen, H.E., Kaplanis, J.N., Robbins, W.E. (1965). Effect of allatectomy on lipid biosynthesis and turnover in the female American cockroach *Periplaneta americana* L. J. Insect Physiol. 11: 897-904.
- Vullings, H.G.B., Diederer, J.H.B., Veelaert, D. & Van der Horst, D.J. (1999). Multifactorial control of the release of hormones from the locust retrocerebral complex. Micro. Res. Tech. 45: 142-153.

- Walker, P.R. & Bailley, E. (1970). Metabolism of glucose, trehalose, citrate, acetate, and palmitate by the male desert locust during adult development. *J. Insect Physiol.* 16: 499-509.
- Walters, K.F.A. & Dixon, A.F.G. (1983). Migratory urge and reproductive investment in aphids: variation within clones. *Oecologia* 58: 70-75.
- Walters, K.F.A., Brough, C. & Dixon, A.F.G. (1988). Habitat quality and reproductive investment in aphids. *Ecol. Entomol.* 13: 337-345.
- Weisser, W.W., Braendle, C., Minoretti, N. (1999) Predator-induced morphological shift in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Proc. R. Soc. B.* 266: 1175-1182.
- Wheeler, C.H. (1989). Mobilization and transport of fuels to the flight muscles. In: *Insect Flight*. Goldsworthy, G.J. & Wheeler, C.H. (eds.). CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. 273-303.
- Wiedemann, R. (2005). Physiologische Grundlagen der Honigtauproduktion bei Blattläusen am Rainfarn *Tanacetum vulgare*. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Wigglesworth, V.B. (1936). The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodinus prolixus* (Hemiptera). *Quart. J. Micr. Sci.* 79: 91-121.
- Wigglesworth, V.B. (1948). The functions of the corpus allatum in *Rhodinus prolixus* (Hemiptera). *J. Exp. Biol.* 25: 1-14.
- Wyatt, G.R. (1967). The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. *Adv. Insect Physiol.* 4: 287-360.
- Zahavi, M. & Tahori, A.S. (1972). Activity of mitochondrial NAD-linked isocitric dehydrogenase in alatform and apteriform larvae of *Myzus persicae*. *J. Insect Physiol.* 18: 609-614.
- Zera, A.J. & Denno, R.F. (1997). Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 207-230.
- Zera, A.J. & Larsen, A. (2001). The metabolic basis of life history variation: Genetic and phenotypic differences in lipid reserves among life history morphs of the wing-polymorphic cricket, *Gryllus firmus*. *J. Insect Physiol.* 47: 1147-1160.
- Zera, A.J. & Zhao, Z. (2003a). Life history evolution and the microevolution of intermediary metabolism: Activities of lipid metabolizing enzymes in life history morphs of a wing-dimorphic cricket. *Evolution* 57: 568-596.
- Zera, A.J. & Zhao, Z. (2003b). Morph-dependent fatty-acid oxidation in a wing-polymorphic cricket: Implications for morph specialization for dispersal vs. reproduction. *J. Insect Physiol.* 49: 933-943.
- Zera, A.J. & Zhao, Z. (2004). Effect of a juvenile hormone analogue on lipid metabolism in a wing-polymorphic cricket: Implications for the biochemical basis of the trade-off between reproduction and dispersal. *Biochem. Physiol. Zoo.* 77: 255-266.

- Zera, A.J. & Zhao, Z. (2006). Intermediary metabolism and life-history trade-offs: Differential metabolism of amino acids underlies the dispersal-reproduction trade-off in a wing-polymorphic cricket. *Am. Naturalist* 167: 889-900.
- Zhao, Z. & Zera, A.J. (2001). Enzymological and radiotracer studies of lipid metabolism in the flight-capable and flightless morphs of the wing-polymorphic cricket, *Gryllus firmus*. *J. Insect Physiol.* 47: 1337-1347.
- Zhao, Z. & Zera, A.J. (2002). Differential lipid biosynthesis underlies a trade-off between reproduction and flight capability in a wing-polymorphic cricket. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16829-16834.
- Zöllner, N., Kirsch, K. (1962). Über die quantitative Bestimmung von Lipiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipiden (allen bekannten Plasmalipiden) gemeinsamen Sulphosphovanillin-Reaktion. *Z. Ges. Exp. Med.* 135: 545-561.

8 Anhang

8.1 cDNA Sequenzen bekannter AKH/RPCHs

Schni-AKH I (NOYES & SCHAFFER, 1990)

MVQRCLVVALLVVVVAAALCSAQLNFTPWNWGTGKR DAGDY GDPYSFLYRLIQAEA
RKMSGCSN

Schni-AKH II (NOYES & SCHAFFER, 1990)

MRQGCALTLMLLVVCAALSAAQLNFSTGWGRRYADPNADPMAFLYKLIQIEARKL
AGCSN

Schgr-AKH II (FISHER-LOUGHEED et al., 1993)

MRQSCALTLMLVVAVCAALSAAQLNFSTGWGRRYADPNADPMAFLYKLIQIEARKL
SGCSN

Schgr-AKH I (FISHER-LOUGHEED et al., 1993)

MVQRCLVVALLVVVVAAALCSAQLNFTPWNWGTGKRDAADFGDPYSFLYRLIQAEA
RKMSGCSN

Locmi-AKH I (BOGERD et al., 1995)

MVQRCALVLLVVAVAAALCSAQLNFTPWNWGTGKRDAADFADPYSFLYRLIQAEA
RKMSGCSN

Locmi-AKH III (BOGERD et al., 1995)

MQVRAVLVLAVALVAVATSRAQLNFTPWWGKRALGAPAAAGDCVSASPQALLSIL
NAAQAEVQKLIDCSRFTSEANS

Locmi-AKH II (BOGERD et al., 1995)

MTQSCTLTLVLLVAVLAALATAQLNFSAGWGRRYADPNADPMAFLYRLIQIEARKL
AGCSD

Peram-AKH (PINTER et al., 2005)

MGWVLKALVVIAALIAVMCEAQLTFTPWNWGKRSGLDGPKLSTEVLMHIYKLVET
EAQKLVECGKFGGN

Manse-AKH (BRADFIELD & KEELEY, 1989)

MYKLTVFLMFIAFVIAEAQLTFTSSWGGKRAMTNSISCRNDEAIAAIYKAIQNEAERF
IMCQKN

Drome-AKH (NOYES et al., 1995)

MNPKSEVLIAAVLFMLLACVQCQLTFSPDWGKR SVGGAGPGTFFETQQGNCKTSNE
MLLEIFRFVQSQAQLFLDCKHRE

Anoga-AKH I (KAUFMANN & BROWN, 2006)

MDTVKLFTVLLICASLMLITEAQLTFTPAWGKR SQGAMGINPLGSTFGQDACKTPVD
SLLVIYRMIQAEAQKIVDCSQK

Anoga-AKH II (KAUFMANN & BROWN, 2006)

MNSISSSRHLAAKLFLLVALCAVLLPVPSAGQVTF SRDWNAGKRAMPDSPVSGVAEC
SAIWRPVNNLCAAVTKNIQHLLTCETRSLKSLQTDEASMESNSGNNLPMFSNNHI

Bladi-AKH (LEWIS et al., 1997)

MNHLVKVLIVVVAIALVLCEAQVNFSPGWGTGKRSAVQDSPCKGSAESLMYIYKLV
QNEAQKILECEKFSSN

Calsa-RPCH (KLEIN et al., 1995)

MVRRSGVTLLVVALLVVTLMSSVSAQLNFSPGWGKRAAGASGSNGGVGEAVSGLH
PSVGGAPGGVPPGSSSPGDSCGPIPVSAVMHIYRLIRSEAVRLVQCQDEEYLG

Carma-RPCH (LINCK et al., 1993)

MVRRTGVTLLVVALVVVALVSSVSAQLNFSPGWGKRAAAGSGSSGGVGEAVSALH
HSVGGAPGGVPPGSSSSSGDSCGPIPVSAVMHIYRLIRNEAVRL
VQCQDEEYLG

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Matthias W. Lorenz für die Überlassung des Themas, seine wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Klaus H. Hoffmann danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die gute Arbeitsatmosphäre.

Dank auch an Herrn Dr. Roland Kellner (Merck KGaA) für die Bemühungen um die Aufklärung der HPLC-Peaks.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls Tierökologie I danke ich für das angenehme Arbeitsklima und für die Hilfe bei Fragen und Problemen aller Art, vor allem Ursula Wilczek und Inge Dippold im Labor, meinen Zimmerkollegen Franziska Wende, Dr. Robert Wiedemann, Dr. Stephanie Westerlund und Dr. Anurag Anand, außerdem Jörg Hager bei Computerproblemen, Dr. John Sloggett für die Bereitstellung der Blattläuse und für die Hilfe bei Fragen zur Blattlauszucht, den Gärtnern der Universität Bayreuth für die Versorgung der Pflanzen im Gewächshaus und Prof. Joseph Woodring für die Einführung in HPAE-PAD.

Außerdem möchte ich dem Graduiertenkolleg 678 „Ökologische Bedeutung von Wirk- und Signalstoffen bei Insekten - von der Struktur zur Funktion“ für die finanzielle Förderung und den Kollegen des Graduiertenkollegs für den Erfahrungsaustausch herzlich danken.

Ein großer Dank auch an meine Familie und Freunde und vor allem an meinen Freund Mohatmed Abdel-latif, der durch seine fachliche und besonders durch seine psychische Unterstützung bei diversen Tiefs, viel dazu beigetragen hat diese Arbeit zu vollenden.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese oder eine gleichartige Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, den 13. Juli 2007