

**Zur Rolle der Hämolympth-Inhaltsstoffe bei der Feindabwehr von Zikaden  
(Cicadomorpha et Fulgoromorpha) unter besonderer Berücksichtigung der  
Blutzikade *Cercopis vulnerata* ROSSI**

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

vorgelegt von  
Monika Körner  
aus Northeim

Bayreuth, November 2006



Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Tierökologie II der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. K. Dettner durchgeführt und entstand im Zeitraum von Mai 2001 bis November 2006.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Biologie/Chemie/Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Tag der Einreichung: 29.11.2006

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 21.03.2007

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Dettner

2. Gutachter: Prof. Dr. K. H. Hoffmann

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. K. Seifert (Vorsitz)

Prof. Dr. K. Dettner

Prof. Dr. K. H. Hoffmann

Prof. Dr. G. Rambold

Prof. Dr. I. Steffan-Dewenter

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1</b>	<b>Untersuchungstiere</b> .....	<b>6</b>
2.1.1	Fulgoromorpha EVANS, 1946 .....	6
2.1.2	Cicadomorpha EVANS, 1946 .....	6
2.1.3	Sammelmethoden und Herkunft der Tiere .....	12
<b>2.2</b>	<b>Bestimmungsliteratur</b> .....	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b>Untersuchung auf Reflexbluten</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4</b>	<b>Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung</b> .....	<b>14</b>
<b>2.5</b>	<b>Chemische Analyse</b> .....	<b>14</b>
2.5.1	Probenaufbereitung .....	14
2.5.2	Gaschromatographie und Massenspektrometrie .....	16
2.5.3	Quantifizierung der Alkylsulfide am Gaschromatographen .....	17
2.5.4	Referenzsubstanzen .....	17
2.5.5	Weitere Analysemethoden .....	18
<b>2.6</b>	<b>Antibiotikum-Behandlung</b> .....	<b>19</b>
<b>2.7</b>	<b>Vermessung der Mycetome (Bacteriome)</b> .....	<b>20</b>
<b>2.8</b>	<b>Molekularbiologische Charakterisierung der Endosymbionten</b> .....	<b>21</b>
<b>2.9</b>	<b>Cantharidin-Untersuchung</b> .....	<b>22</b>
<b>2.10</b>	<b>Auswertung und Statistik</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Reflexbluten bei Vertretern der Cercopoidea</b> .....	<b>25</b>
3.1.1	Reizversuche .....	25
3.1.2	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Tarsen .....	26
3.1.3	Chromatographischer Vergleich von Reflexblut und Hämolymphe bei <i>C. vulnerata</i> .....	26
<b>3.2</b>	<b>Hämolymphe-Analyse</b> .....	<b>28</b>
3.2.1	Inter- und intraspezifischer Vergleich der Hämolymphe .....	28
3.2.2	Vergleich der Totalionenstromchromatogramme (TICs) .....	32
3.2.3	Identifizierung einiger flüchtiger Inhaltsstoffe .....	34
<b>3.3</b>	<b>Antibiotikum-Behandlung</b> .....	<b>40</b>
3.3.1	Dimethyltrisulfid (DMTS) .....	41
3.3.2	Dimethyltetrasulfid (DMTetS) .....	43
3.3.3	DMTS vs. DMTetS .....	46
3.3.4	Vermessung der Mycetome .....	46
<b>3.4</b>	<b>Charakterisierung der Endosymbionten von <i>C. vulnerata</i></b> .....	<b>53</b>

<b>3.5</b>	<b>Cantharidin-Analyse</b> .....	<b>54</b>
3.5.1	Systematisches Screening .....	54
3.5.2	Gefriertrocknungs-Experiment .....	55
3.5.3	Individueller Ansatz .....	58
<b>3.6</b>	<b>Weitere Analysemethoden</b> .....	<b>58</b>
<b>3.7</b>	<b>Nematodenfunde</b> .....	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Cantharidin bei Zikaden</b> .....	<b>61</b>
<b>4.2</b>	<b>Reflexbluten bei Schaumzikaden (Cercopoidea)</b> .....	<b>63</b>
<b>4.3</b>	<b>Inter- und intraspezifischer Vergleich der Hämolymphe</b> .....	<b>66</b>
<b>4.4</b>	<b>Chemische Analyse der Hämolymp-Inhaltsstoffe</b> .....	<b>68</b>
<b>4.5</b>	<b>Bedeutung der Endosymbionten und Herkunft der Alkylsulfide</b> .....	<b>74</b>
<b>4.6</b>	<b>Schwarz-rote Färbung bei <i>Cercopis</i>: Täuschung oder Warnung?</b> .....	<b>77</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung / Summary</b> .....	<b>83</b>
<b>5.1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>83</b>
<b>5.2</b>	<b>Summary</b> .....	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>87</b>
<b>Danksagung</b>	.....	<b>98</b>
<b>Anhang</b>	.....	<b>99</b>
<b>Erklärung</b>	.....	<b>104</b>

## Abkürzungsverzeichnis

DMDS	Dimehtlydisulfid
DMTetS	Dimethyltetrasulfid
DMTS	Dimethyltrisulfid
FID	Flammen-Ionisierungs-Detektor
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
m/z	Masse / Ladung
ME	arithmetisches Mittel
N	Anzahl
NIST	National Institute of Standards and Technology
RT	Retentionszeit
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
sl.	sensu lato
ss.	sensu stricto
TIC	Totalionenstromchromatogramm
vs.	versus

# 1 Einleitung

Für Insekten spielen chemische Substanzen zur Abwehr von Feinden eine bedeutsame Rolle. Die hierbei eingesetzten Toxine können über Nährpflanzen bzw. Beutetiere aufgenommen werden oder aber vom Tier selbst (bzw. dessen Endosymbionten) synthetisiert werden. Viele Veröffentlichungen zur chemischen Feindabwehr sind v. a. über Wanzen (Heteroptera), Käfer (Coleoptera), Schmetterlinge (Lepidoptera) und Hautflügler (Hymenoptera) erschienen (ALDRICH, 1988; DETTNER, 1987; EISNER et al., 2005). Die Zikaden (Cicadomorpha et Fulgoromorpha, beide vormals Auchenorrhyncha) wurden bisher kaum berücksichtigt. Wenige Arbeiten beschäftigen sich mit Wachsausscheidungen von *Ormenaria rufifascia* (Fulgoromorpha: Flatidae), der Zusammensetzung des Schaums der Schaumzikadennymphen (Cicadomorpha: Cercopoidea), oder dem Alarmpheromon myrmecophiler Vertreter der Membracidae (Cicadomorpha) (LAMUNYON & EISNER, 1990; MELLO et al., 1987, 1996; NAULT et al., 1974). Dabei fehlt gerade dieser Phytophagengruppe weitestgehend die Wehrhaftigkeit durch mechanische Strukturen, zudem sind die Zikaden durch ihre enorme Häufigkeit in v. a. von Gras dominierten Lebensräumen (Individuendichten von 2000 Ind./m<sup>2</sup> sind keine Seltenheit, KÖRNER et al., 2001) beliebte Beuteorganismen diverser Prädatoren (z. B. Spinnen, Wanzen, Ameisen und Vögel). Die chemische Feindabwehr von Zikaden steht im Focus der vorliegenden Untersuchung.

Zur Feindabwehr sind bei Zikaden verschiedene Strategien bekannt. Sprungvermögen bzw. Flucht ist weit verbreitet bei Zikaden, dies gilt insbesondere für die Vertreter der Schaumzikaden, welche die schnellsten Springer im Tierreich sind (BURROWS, 2003). Bei einigen Arten wird das Nymphenstadium im Boden verbracht (Cicadidae, Cixiidae, Cercopidae), die am stärksten von Prädation bedrohten Nymphen entgehen auf diese versteckte Weise vielen potenziellen Feinden. Die Nymphen der Cercopidae umgeben sich mit selbst produziertem Schaum, in dem sie wie in einer Wasserblase sitzen und welcher sie vor manchen Feinden schützt (HENDERSON et al., 1990; WHITTAKER, 1970). Des Weiteren spielt bei manchen Arten Tarnung durch kryptische Färbung eine Rolle. Auch durch geschicktes Verhalten können sie sich dem Auge des Feindes entziehen: die Tiere laufen blitzschnell um den Stängel oder das Blatt ihrer Nährpflanze herum auf die vom Beutesucher abgewandt liegende Seite (siehe auch DIETRICH, 2003). Inwieweit auch eine Verständigung der Tiere untereinander durch Gesang oder durch Vibration über das Pflanzensubstrat zur Warnung vor Feinden eingesetzt wird, ist unklar.

## 1 Einleitung

---

Bemerkenswert ist der Cantharidin-Nachweis in der chinesischen Zikade *Lycorma delicatula* (Fulgoromorpha: Fulgoridae) von FENG et al. (1988). Das Cantharidin, welches als Giftstoff der Ölkäfer (Coleoptera: Meloidae) bekannt ist, ist ein Monoterpenanhydrid und besitzt auf die meisten Tierarten eine hochtoxische Wirkung (LD50 Mensch ca. 0,5 mg/kg Körpergewicht) (MCCORMICK & CARREL, 1987). Schon seit dem Altertum ist die Wirkung des Ölkäfers, auch „Spanische Fliege“ genannt, bekannt; sein Gift wurde zur Tötung oder in geringeren Dosen als Aphrodisiakum eingesetzt. Cantharidin hemmt die Proteinphosphatase 2A (PP2A), ein Enzym das im Cytoplasma von Zellen vieler Eucaryota verschiedenste Stoffwechselprozesse reguliert (LI & CASIDA, 1992). Außer bei Säugetieren wurde die PP2A auch in Arthropoden und zahlreichen Vertebraten, Hefen und höheren Pflanzen nachgewiesen (COHEN, 1989). Das Cantharidin ist somit ein guter Schutz vor Freßfeinden, zumal es auf die meisten räuberischen Insekten außerdem als Repellent und Fraßdeterrent wirkt (CARREL & EISNER, 1974). Nur Ölkäfer und Schenkelböcke (Coleoptera: Oedemeridae) sind nach bisherigem Kenntnisstand in der Lage, Cantharidin zu produzieren. Das Vorkommen dieses Stoffes ist aber nicht auf die Mitglieder dieser beiden Käferfamilien beschränkt, eine Vielzahl anderer Insekten enthält ebenfalls Cantharidin. Diese cantharidinhaltigen Insekten, die nicht zu den Ölkäfern oder Schenkelböcken gehören, können das Cantharidin selbst nicht synthetisieren, sie nehmen diesen Stoff auf, indem sie Ölkäfer bzw. Schenkelböcke oder deren cantharidinhaltige Ausscheidungen fressen. Auf diese Insekten wirkt das Cantharidin nicht nur nicht toxisch, sondern hat sogar eine anlockende Wirkung, sie sind regelrecht cantharidinsüchtig. Zu diesen canthariphilen Insekten gehören Vertreter mehrerer Käferfamilien (Coleoptera: Anthicidae, Pyrochroidae, Endomychidae, Chrysomelidae, Staphylinidae), verschiedener Zweiflüglerfamilien (Diptera: Ceratopogonidae, Anthomyiidae, Cecidomyiidae, Sciaridae), einiger Hautflüglerfamilien (Hymenoptera: Braconidae, Diapriidae, Chloropidae), sowie einige Weichwanzen (Heteroptera: Miridae) (DETTNER, 1997). Erstaunlich erscheint der Nachweis von Cantharidin in einer Zikade, da ausgeschlossen werden kann, dass ein Vertreter dieser rein phytophagen Gruppe an cantharidinhaltigen Insekten oder deren Ausscheidungen saugt und der Saugrüssel von Zikaden von seiner Morphologie her nicht für eine räuberische Lebensweise geeignet ist. Einen vorherigen Befund von Cantharidin bei der in China verbreiteten aposematisch gefärbten Art *Huechys sanguinea* (Cicadomorpha: Cicadidae) konnten FENG et al. (1988) hingegen widerlegen. Einen weiteren Hinweis für das Vorkommen von Cantharidin in Zikaden liefert DETTNER (1997 und pers. Mitt.), welcher in der europäisch verbreiteten cicadomorphen Kleinzikade *Ulopa reticulata* geringe Konzentrationen von Cantharidin nachweisen konnte. In der

---

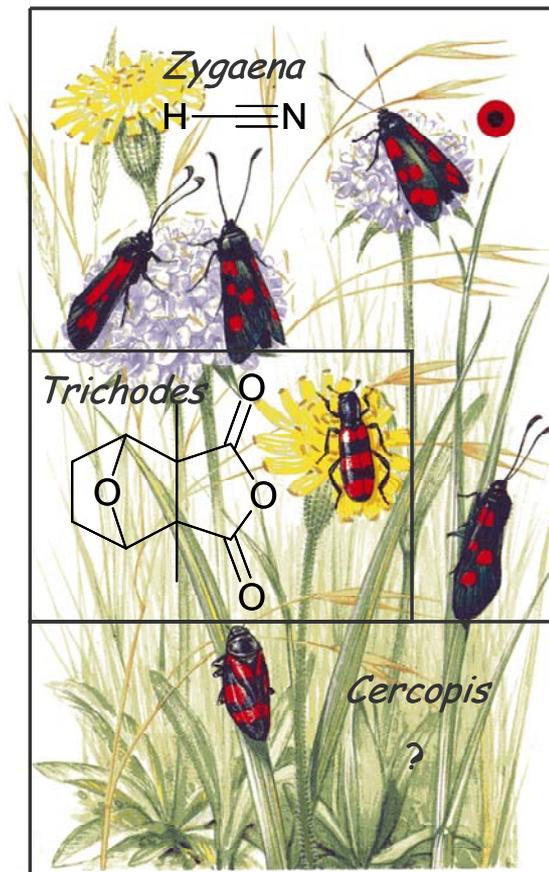
vorliegenden Arbeit wird das Cantharidin-Vorkommen bei *U. reticulata* überprüft, wobei Geschlechts- und Entwicklungsunterschiede sowie jahreszeitliche und standörtliche Unterschiede berücksichtigt werden sollen. Darüber hinaus werden weitere Arten verschiedener Zikadenfamilien auf das Vorkommen von Cantharidin überprüft, um somit mögliche Vorkommen im stammesgeschichtlichen Zusammenhang beurteilen zu können. Ferner sollte versucht werden, die Herkunft des Vorkommens von Cantharidin bei Zikaden aufzuklären.

Darüber hinaus stehen weitere chemische Verbindungen aus Zikaden im Mittelpunkt, die eine mögliche Abwehrfunktion auf Feinde besitzen. Hierfür soll die heimische Blutzikade (*Cercopis vulnerata*; Cicadomorpha: Cercopidae) einer genaueren Untersuchung unterzogen werden. Außer den vorkommenden Methylalkylpyrazinen (MOORE et al., 1990) sind bei dieser Art bisher keine Wirkstoffe mit möglicher Abwehrfunktion bekannt. Pyrazine sind als Düfte mit hohem Wiedererkennungswert für Vögel beschrieben, sie treten meist bei auffällig gefärbten und durch chemische Stoffe geschützten Tieren auf, wobei der Pyrazingeruch zusätzlich zur aposematischen Färbung bei Prädatoren ein Alarmsignal hervorrufen soll (AVERY & NELMS, 1990; GUILFORD et al., 1987; LINDSTRÖM et al., 2001; ROTHSCHILD & MOORE, 1987; ROWE & GUILFORD, 1999, 1996). Bei *C. vulnerata* ist aufgrund der auffälligen schwarz-roten Färbung und der Fähigkeit zum Reflexbluten ein Schutz vor Räubern wahrscheinlich. Schon 1911 wurde von HOLLANDE das Reflexbluten bei *C. vulnerata* beschrieben. Fast 90 Jahre später beschäftigte sich PECK (2000) als erster wieder mit diesem Phänomen bei Schaumzikaden, er untersuchte 53 mittelamerikanische Arten der Cercopoidea auf ihre Fähigkeit zum Reflexbluten. Die Arten, die PECK untersuchte, entstammen drei Familien der Cercopoidea (Aphrophoridae, Clastopteridae, Cercopidae), von diesen hatten nur die getesteten 42 Arten der Cercopidae die Fähigkeit zum Reflexbluten. Der Autor konnte zeigen, dass die untersuchten Vertreter der Cercopidae teils an einzelnen, teils an allen sechs Beinen gleichzeitig bluteten, der abgegebene Tropfen hatte dabei die gleiche gelbliche Färbung wie die Hämolymphe der Tiere; daher vermutete PECK, dass es sich bei der abgegebenen Flüssigkeit während des Reflexblutens um Hämolymphe handelte und nicht um ein Produkt einer exokrinen Drüse. Um eine mögliche Deterrent-Wirkung des Reflexblutes zu ermitteln, machte PECK (2000) auch Biotests; die Schaumzikaden zeigten das Reflexbluten-Verhalten auch bei Angriffen durch Prädatoren, wobei ein Tropfen am Prätarsus des attackierten Beines abgegeben wurde. Einen Hinweis für eine mechanische Deterrent-Wirkung des Reflexblutes konnte er nicht erbringen: Die Prädatoren konnten sich, nachdem

## 1 Einleitung

sie mit der Hämolymphe der Schaumzikaden in Kontakt gekommen waren, durch Reiben der Mundwerkzeuge am Substrat schnell davon säubern; auch war die Hämolymphe nicht klebrig oder gerann schnell. Da PECK (2000) bei nur zwei von sechs getesteten Prädatoren (Ameise: *Eciton bruchellii*, Feuerameise: *Solnopsis geminata*; Kurzflügelkäfer: *Paederus* sp.; Tunnelspinne: Agelenidae; Haushuhn: *Gallus gallus gallus*; Anolis-Leguan: *Anolis* sp.) eine Hemmwirkung feststellen konnte – *E. bruchellii* lehnte die Zikade in vier von vier Fällen ab und das Haushuhn in einem von zwei Versuchen – vermutete er keine Deterrent-Wirkung durch chemische Substanzen. Er postuliert stattdessen, dass die Kombination von Warnzeichnung, Reflexbluten und Warngeruch einen Schreckmoment beim angreifenden Prädatoren auslöst, welchen die Schaumzikade nutzt, um mit Hilfe ihrer enormen Sprungfähigkeit in Sicherheit zu fliehen (PECK, 2000). Hingegen fanden EVANS et al. (1987), dass Wachteln (*Coturnix coturnix*) gegenüber der westpaläarktisch verbreiteten Blutzikadenart *Cercopis intermedia* eine deutliche Ablehnung zeigten.

Die auffällige schwarz-rote Färbung der Blutzikaden ist nicht auf die Cercopiden beschränkt, sondern im Insektenreich weit verbreitet. Insbesondere schlecht schmeckende oder giftige Tiere besitzen eine auffällige Zeichnung mit hohem Wiedererkennungswert für visuell jagende Prädatoren wie Vögel. Kommen mehrere ungenießbare und ähnlich aussehende Arten sympatrisch vor, spricht man von einem Müllerschen Mimikry-Ring. Diese „Warngemeinschaft“ ist für die beteiligten Arten von Vorteil: Die Prädatoren lernen Tiere mit einem bestimmtem Farbmuster zu meiden, die Zahl der insgesamt pro Räuber zu opfernden Individuen verteilt sich auf die beteiligten Arten (MÜLLER, 1879). Ein solcher Müllerscher Mimikry-Ring wird von SBORDONI et al. (1985) für verschiedene schwarz-rot gefärbte Widderchenarten



**Bild 1: Mimikry bei Vertretern der Gattung *Zygaena*, *Trichodes* und *Cercopis*. (Modifiziert nach SBORDONI et al., 1985).**

---

(Lepidoptera: *Zygaena punctum*, *Z. lonicerae*, *Z. filipendulae*), den Immenkäfer (Coleoptera: *Trichodes apiarius*) und die Binden-Blutzikade (*Cercopis sanguinolenta*) vermutet (Bild 1). Allerdings ist nicht geklärt, ob es sich hierbei tatsächlich um einen Fall der Normierung von Signalen mit gleicher Bedeutung handelt: Die Widderchen besitzen durch Blausäure HCN (bzw. cyanogene Glykoside, DAVIS & NAHRSTEDT, 1982), der Immenkäfer durch Cantharidin einen chemischen Schutz (FIETZ et al., 2002), aber ob die Blutzikade ebenfalls geschützt ist, ist unbekannt.

Für die vorliegende Dissertationsschrift wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- In welchen Arten der heimischen Zikadenfauna findet sich Cantharidin? Kann das Cantharidin-Vorkommen bei der Kleinzikade *Ulopa reticulata* bestätigt werden?
- Lässt sich aus dem Verwandtschaftsgrad der Zikadenarten ein Zusammenhang mit dem Cantharidin-Vorkommen erkennen und unterscheidet sich der Cantharidin-Gehalt der Zikaden in Abhängigkeit von der Jahreszeit und/oder dem Standort? Finden sich intraspezifische Unterschiede im Cantharidin-Gehalt bei verschiedenen Entwicklungsstadien?
- Spielen weitere Wirkstoffe in der chemischen Abwehr gegen Prädatoren bei ausgewählten Zikadenarten eine Rolle?
- Besitzt die Blutzikade (*Cercopis vulnerata*) abgesehen von dem Methylalkylpyrazin einen chemischen Schutz?
- Handelt es sich bei dem Reflexblut der Blutzikade tatsächlich um Hämolymphe? Sind weitere heimische Arten der Cercopidae und vielleicht auch der Aphrophoridae zum Reflexbluten befähigt?
- Existieren eventuell Unterschiede in der Zusammensetzung der Hämolymphe bei den Arten der Cercopidae und Aphrophoridae?
- Lassen sich intraspezifische Unterschiede zwischen den Geschlechtern in der Zusammensetzung der Hämolymphe finden?
- Ist das Auftreten von Hämolymphe-Wirkstoffen eventuell mit der Präsenz von Endosymbionten korreliert?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Untersuchungstiere

Bei den in der vorliegenden Arbeit besprochenen Tieren handelt es sich ausschließlich um phytophage Insekten, für die im deutschen Sprachraum der Name Zikaden verwendet wird, womit die Gesamtheit des wissenschaftlichen Taxons „Auchenorrhyncha“ gemeint ist. Auf der Basis jüngster Ergebnisse der molekularen Forschung und neuerer aus fossilen Funden erhaltener Erkenntnisse wird die Monophylie der Auchenorrhyncha kontrovers diskutiert (CAMPBELL et al., 1995; SORENSEN et al., 1995; YOSHIZAWA & SAIGUSA, 2001). In der vorliegenden Arbeit wird diese Gruppenbezeichnung nicht mehr verwendet und stattdessen, wie von BOURGOIN & CAMPBELL (2002) vorgeschlagen, von Fulgoromorpha und Cicadomorpha gesprochen, über deren Monophylie Konsens besteht. In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich Vertreter der Cicadomorpha untersucht.

Im Folgenden werden die einzelnen in dieser Untersuchung behandelten Familien bzw. Arten näher besprochen. Hierbei wird die Majorität der Arten, die für die Untersuchung auf Cantharidin-Vorkommen gescreent wurde, nur auf Familienniveau abgehandelt.

#### 2.1.1 Fulgoromorpha EVANS, 1946

##### 2.1.1.1 Delphacidae Leach, 1815

Die Gruppe der Spornzikaden ist die artenreichste Familie der Fulgoromorpha; ihren deutschen Namen verdanken sie einem großen, oft blattartigen, beweglichen Sporn an den Hintertibien. Alle Vertreter dieser Familie leben in der Krautschicht und ernähren sich von Phloemsaft. Drei Arten dieser Familie wurden auf Vorkommen von Cantharidin untersucht (Tab. 2).

#### 2.1.2 Cicadomorpha EVANS, 1946

##### 2.1.2.1 Cercopoidea EVANS, 1946

Ob es sich bei den Cercopidae ss. und Aphrophoridae um eigene Familien handelt, oder ob beide als Unterfamilien einer Familie Cercopidae sl. aufzufassen sind, darüber herrscht Uneinigkeit. In der vorliegenden Arbeit werden sie in Anlehnung an HOLZINGER et al. (2003) als eigene Familien behandelt.

---

Die Überfamilie der Cercopoidea bildet innerhalb der phytophagen Insekten die größte Xylem-saugende Gruppe (CARVALHO & WEBB, 2005). Ungefähr 2650 Arten in vier Familien gehören dieser Gruppe weltweit an (STRÜMPPEL, 2003). In Deutschland kommen zwei Familien mit sechs Gattungen und 17 Arten vor (NICKEL, 2003). Die Nymphen leben in von ihnen selbst gebildeten Schaumballen, was ihnen den deutschen Namen Schaumzikaden eingebracht hat. Zur Erzeugung des Schaums spritzen die Tiere ihren zuckerfreien, flüssigen Kot nicht ab, sondern lassen ihn am Abdomen hinunterlaufen. Durch die Stigmen, die in einen Luftkanal münden, wird Luft ausgeblasen und so der stark wasserhaltige Kot zum Schäumen gebracht (STRÜMPPEL, 2003). Vermutlich wird der Kot durch sekretorische Produkte aus den Malpighischen Gefäßen (Mucopolysaccharide) zum schäumen gebracht und gefestigt; die im Kot vorhandenen Proteine erhöhen wahrscheinlich noch zusätzlich die Kohäsion und die Oberflächenviskosität des Schaumballens (MARSHALL, 1966). Die Tiere penetrieren das Xylemsystem ihrer Futterpflanzen und nutzen diese reichlich vorhandene Nahrungsquelle, die allerdings sehr arm an stickstoffhaltigen Nährstoffen (Aminosäuren) und Zucker ist, wodurch ein Xylem-Fresser gezwungen ist, ein Vielfaches des eigenen Körpergewichts an Nahrungssaft aufzunehmen; *Philaenus spumarius* z. B. inkorporiert in 24 h bis zum 300fachen des eigenen Körpergewichts an Xylemsaft (WHITE, 1993). Vertreter der Cercopidae standen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit, aber auch die Schwesterfamilie, die Aphrophoridae, wurde artenreich in die Untersuchung miteinbezogen.

#### **2.1.2.2 Cercopidae Leach, 1815**

Vertreter dieser Familie gehören mit ihrer Schwarz-Rot-Färbung zu den auffälligsten Tieren der deutschen Zikadenfauna. Für Deutschland sind zwei Gattungen mit insgesamt vier Arten nachgewiesen, weltweit sind es ca. 1500 Arten, wobei sie v. a. in den Tropen besonders häufig sind (STRÜMPPEL, 2003). Die Nymphen dieser Familie leben in selbst gemachten Schaumballen im Boden, wo sie an den Wurzeln ihrer Futterpflanzen saugen, nach der Adulthäutung leben die Tiere oberirdisch; diese besitzen begrenzte Flugfähigkeit, aber ein sehr gutes Sprungvermögen. Die Entwicklung ist univoltin und die Überwinterung findet als Nymphe im Boden statt. Einige Arten haben als Schadinsekten v. a. in der Neotropis auch wirtschaftliche Bedeutung, z. B. verursacht *Prosapia simulans* durch Fraß an Zuckerrohr erheblichen Schaden (PECK et al., 2001).

Die in Deutschland am häufigsten vorkommende Art dieser Familie ist die Blutzikade *Cercopis vulnerata* ROSSI, 1807. Ihre Grundfarbe ist schwarz und sie besitzt auf ihren

## 2 Material und Methoden

---

Deckflügeln drei charakteristische blutrote Flecken (Name! Bild 2). Wie schon HOLLANDE (1911) beschrieb, sind Vertreter dieser Art zum Reflexbluten fähig, das heißt sie können bei Reizung an ihren Tarsen einen Flüssigkeitstropfen abgeben. Die Adulti findet man von Anfang Mai bis Mitte Juli auf mäßig feuchten bis mäßig trockenen Brachen, Wegrändern, extensiven Wiesen und Waldungen. Mit einer Länge von ca. 10 mm gehören sie zu den größten heimischen Zikadenarten. Die Männchen sind in der Lage zu singen (Bild 2). Dieser Gesang ist scheinbar auf Werbegesang beschränkt. Da er im niedrigen Frequenzbereich liegt (40-300 Hz), ist er für das menschliche Ohr nicht wahrnehmbar, aber als Sonogramm aufnehmbar und dadurch, dass die Männchen während des Singens ihre Vorderflügel vibrieren lassen, sogar „sichtbar“ (KEHLMAYER, 2000). Als Futterpflanzen werden verschiedene Gräser und Kräuter genutzt (*Arrhenatherum elatius*, *Dactylis glomerata*, *Urtica* sp., *Aegopodium* sp., *Solidago canadensis* und weitere). Gerne sitzen die Tiere im oberen Drittel von Stängeln hochwüchsiger Gräser und auf den Blättern von krautigen Pflanzen, leicht sind sie hier zu entdecken und mit ein wenig Geschick allein mit einem Exhaustor abzusammeln; dieser Umstand ist in sofern bemerkenswert, da es sich hierbei, abgesehen von *C. sanguinolenta*, um die einzige Zikadenart handelt, die von mir ohne den Einsatz eines Keschers gefangen werden konnte. Die Tiere wurden v. a. auf einer Brache bei Haag (Ldk. Bayreuth) gefangen, einige Nymphen wurden mit Hilfe eines Spatens in 10-30 cm Tiefe an den Wurzeln von *A. elatius* abgesammelt.



**Bild 2:** Ein Männchen von *Cercopis vulnerata* auf einem *Arrhenatherum elatius* Halm. Links: in Ruhestellung; rechts: beim Singen

---

Der vorherigen Art in Habitus und Zeichnung sehr ähnlich ist *Cercopis sanguinolenta* (SCOPOLI, 1763), allerdings sind die roten Flecken auf den Vorderflügeln weniger stark ausgedehnt. Die Verbreitung dieser Art ist in Deutschland inselartig auf wärmebegünstigte Regionen beschränkt. Ihre Vertreter leben ebenfalls an verschiedenen Gräsern und Kräutern (*Arrhenatherum elatius*, *Clematis vitalba*, *Achillea* sp., *Salvia pratensis* und weitere) trocken-warmer Habitats (NICKEL, 2003). Die Adulti sind von Anfang Mai bis Ende Juli zu finden. Im Bayreuther Umland kommt *C. sanguinolenta* nicht vor, die Versuchstiere wurden von mir bei Schloßböckelheim (Nahe) und bei Halle (Saale) gefangen.

*Cercopis intermedia* KIRSCHBAUM, 1868 ist eine südeuropäisch verbreitete Art, die nicht in Deutschland vorkommt, mir aber von J. Sloggett (Bayreuth) aus Südfrankreich (Lyon) lebend mitgebracht wurde. Sie ist in Gestalt und Lebensweise *C. vulnerata* sehr ähnlich, aber von dieser durch einen roten Fleck an den Beinen (am Übergang von Tibia zum Tarsus) gut zu unterscheiden.

Die in Deutschland nur in den Alpen und im Alpenvorland nachgewiesene *C. arcuata* Fieber, 1844 konnte von mir trotz intensiver Suche in ihrem Verbreitungsgebiet nicht gefunden werden.

Eine etwas kleinere Art (ca. 7mm) dieser Familie ist *Haematoloma dorsatum* (AHRENS, 1812). Ihre Vorderflügel besitzen ebenfalls eine Schwarz-Rot-Färbung, wobei sich der vorderste rote Fleck im Gegensatz zu den vorherigen Arten um die gesamte Vorderkante des Flügels herumzieht. Die Nymphen saugen an den Wurzeln von *Deschampsia flexuosa* und möglicherweise auch *Brachypodium pinnatum* (NICKEL, 2003), die Adulti leben von Ende April bis Ende Juli an Kiefern (*Pinus sylvestris*, *Pinus nigra*). In der Mittelmeerregion und in den Niederlanden verursachen die adulten Tiere Schäden in Kiefernforsten. Die von der Zikade durch die stechend-saugenden Mundwerkzeuge penetrierten Nadeln bilden an den Einstichstellen gelbe bis braune Ringe aus, später verfärben sich die Nadeln komplett braun und fallen schließlich im Juni oder Juli ab (MORAAL, 1996). Trotz des Vorkommens von ausgedehnten Kiefernforsten in der Bayreuther Umgebung konnte diese Art von mir dort nicht gefunden werden. Die untersuchten Tiere stammen aus einem Kiefernforst bei Berkhof (nördlich Hannover) und wurden mir von M. Sayer (Göttingen) lebend überbracht, außerdem bekam ich tote Nymphen von R. Biedermann (Oldenburg) geschickt.

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1.2.3 Aphrophoridae Amyot & Serville, 1843

Weltweit ist diese Familie mit ca. 850 Arten vertreten (STRÜMPEL, 2003), wovon 13 in Deutschland heimisch sind und als univoltine Eiüberwinterer gelten (NICKEL, 2003). Bei allen in Deutschland verbreiteten Arten handelt es sich um von dunkelbraun bis beige gefärbte Tiere. Sie sind somit im Gegensatz zu den Vertretern der Cercopidae eher unauffällig gefärbt. Bei mehreren Arten der Aphrophoridae wurde ebenfalls die Zusammensetzung der Hämolymphe untersucht, um die Ergebnisse mit denen der Schwesterfamilie Cercopidae vergleichen zu können.

Von Ende Mai bis Anfang Oktober findet man Adulti von *Neophilaenus campestris* (FALLÉN, 1805) auf ruderalisierten oder beweideten, meist mäßig trockenen und besonnten Standorten verschiedenster Substrate. Die Adulti erreichen eine Körperlänge von 3,5-6,0 mm und besitzen eine Dunkelzeichnung, die in Anlage und Ausprägung sehr variieren kann (HOLZINGER et al., 2003; REMANE & WACHMANN, 1993). Die Vertreter dieser Art saugen an verschiedensten Gräsern. Die für diese Untersuchung verwendeten Tiere stammen von einem Sandtrockenrasen in den Rheinauen bei Philippsburg und von Sanddünen des ehemaligen Truppenübungsplatzes Tennenlohe bei Erlangen.

*Neophilaenus lineatus* (LINNAEUS, 1758) ist eine eurytope Art, in meist höherwüchsigen Beständen von Süß- und Sauergräsern (Poaceae, Cyperaceae, Juncaceae und andere). Die Adulti sind von Mitte Juni bis Anfang November im Freiland anzutreffen (HOLZINGER et al., 2003). Die hier verwendeten Tiere wurden bei Neubau im Fichtelgebirge (Lkr. Bayreuth) gefangen.

In feuchtkühlen Biotopen (Gewässerufer, Wiesen, Waldlichtungen) kommt *Aphrophora pectoralis* MATSUMURA, 1903 vor. Adulti findet man von Anfang Juni bis Anfang Oktober an verschiedenen Weidenarten (HOLZINGER et al., 2003). Die hier verwendeten Exemplare wurden bei Wolfsbach (Lkr. Bayreuth) von Weiden am Bachufer gekeschert.

*Aphrophora alni* (FALLÉN, 1805) kommt an verschiedenen sommergrünen Baum- und Straucharten vor. Diese eurytope Art ist in Deutschland weit verbreitet und häufig, adulte Tiere findet man ab Anfang Juni und bis Ende Oktober (NICKEL, 2003). Vertreter dieser Art wurden von mir bei Wasserkraut (Lkr. Bayreuth) gefangen.

---

Eine der häufigsten und am weitesten verbreiteten Zikadenarten in Deutschland ist *Philaenus spumarius* (LINNAEUS, 1758). Diese Art wurde 2003 als bester Springer im Tierreich ausgezeichnet (BBC-News: <http://news.bbc.co.uk/1/hi/sci/tech/3110719.stm>; Stand: 17.5.2006). Auffällig ist sie aber nicht nur durch ihr ausgezeichnetes Sprungvermögen, sondern auch durch ihren auffälligen Farbpolymorphismus. Von einfarbig hellen Tieren bis hin zu einheitlich dunkel gefärbten Tieren kommen viele verschiedene Hell-Dunkel-Zeichnungen vor. Das Nährpflanzenspektrum dieser eurytopen Art ist extrem breit, es handelt sich um einen der polyphagsten Phytophagen überhaupt. Auch an Kulturpflanzen kommt *P. spumarius* vor und ist hier als Schadinsekt von wirtschaftlicher Bedeutung (ZAJAC & WILSON, 1985). Adulti kommen ab Ende Mai bis Anfang November vor (NICKEL, 2003). Die verwendeten Tiere stammen von verschiedenen Standorten im Landkreis Bayreuth.

#### **2.1.2.4 Membracidae Rafinesque, 1815**

Die Familie der Buckelzikaden ist in Mitteleuropa mit nur drei Arten vertreten, weltweit aber mit ca. 3000 Arten. Vor allem in den Tropen und Subtropen der Alten und Neuen Welt sind sie häufig und durch die z. T. sehr auffälligen Pronotumfortsätze bekannt (STRÜMPEL, 2003). In den Tropen leben Arten, die durch bizarre Fortsätze, welche den Körper an Größe übertreffen, sehr auffällig sind. Zwei der drei in Deutschland vorkommenden Arten wurden in die Cantharidin-Analyse miteinbezogen. Alle drei Arten nutzen als Nahrungsquelle den Phloemsaft von Pflanzen.

#### **2.1.2.5 Cicadellidae Latreille, 1825**

In Deutschland ist die Familie der Cicadellidae mit ca. 450 Arten (weltweit: 21300) vertreten, damit ist sie die größte Familie innerhalb der Cicadomorpha (STRÜMPEL, 2003). Ebenso divers ist auch ihre Biologie: die Mehrzahl der Arten überwintert im Eistadium, aber auch Adult- und Larvalüberwinterung kommt vor; als Nahrungsquelle dient v. a. Phloemsaft und Mesophyll, vereinzelt auch Xylemsaft; es finden sich Kraut-, Strauch- und Baumbesiedler. Einige Arten sind als Kulturpflanzenschädlinge bekannt, wobei sie v. a. als Vektoren von phytopathogenen Organismen eine wirtschaftliche Rolle spielen. Z. B. überträgt *Neoliturus fenestratus* Phytoplasmen, die Krankheiten bei Wein hervorrufen (ORENSTEIN et al., 2003), oder ermöglicht *Graphocephala fennahi* durch Verletzung des Pflanzengewebes bei der Eiablage einem Ascomyceten (*Pycnostysanus azaleae*), in das Pflanzengewebe einzudringen; die Pilzinfektion verursacht das „*Rhododendron*-Knospensterben“ (ROSE & ZUNKE, 1998). Für die Cantharidin-Analyse wurden 19 Arten dieser Familie untersucht.

### 2.1.3 Sammelmethoden und Herkunft der Tiere

Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiere wurden im Freiland gefangen. Abhängig von den Zikadenarten wurden verschiedene Sammelmethoden benutzt. Der weitaus größte Teil der Tiere wurde mittels Kescher gefangen und anschließend selektiv mit dem Exhaustor aus diesem entnommen, so dass keine Beifänge angefallen sind. Für die Beschaffung bodennah lebender Arten (z. B. *Ulopa reticulata*) wurde ein Saugapparat eingesetzt. Dabei handelte es sich um einen modifizierten handelsüblichen Saughäcksler der Firma Stihl (SH 85). Der Apparat besteht aus einem per Zweitaktmotor angetriebenen Gebläse mit Handhalterung, ferner einem Saugrohr, in dem ein Netzbeutel befestigt wurde. Für die Probenahme wurde das Saugrohr bei voller Saugleistung auf die Vegetation gesetzt und die eingesaugten Tiere konnten anschließend bei ausgeschaltetem Motor dem Netzbeutel entnommen werden.

Bis auf *Cercopis intermedia* handelt es sich bei allen untersuchten Arten um in Deutschland verbreitete. Das Gros der Arten wurde in Bayreuth und Umgebung gefangen. Die für die Analysen verwendeten Tiere wurden lebend eingefroren und bis zur Bearbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

## 2.2 Bestimmungsliteratur

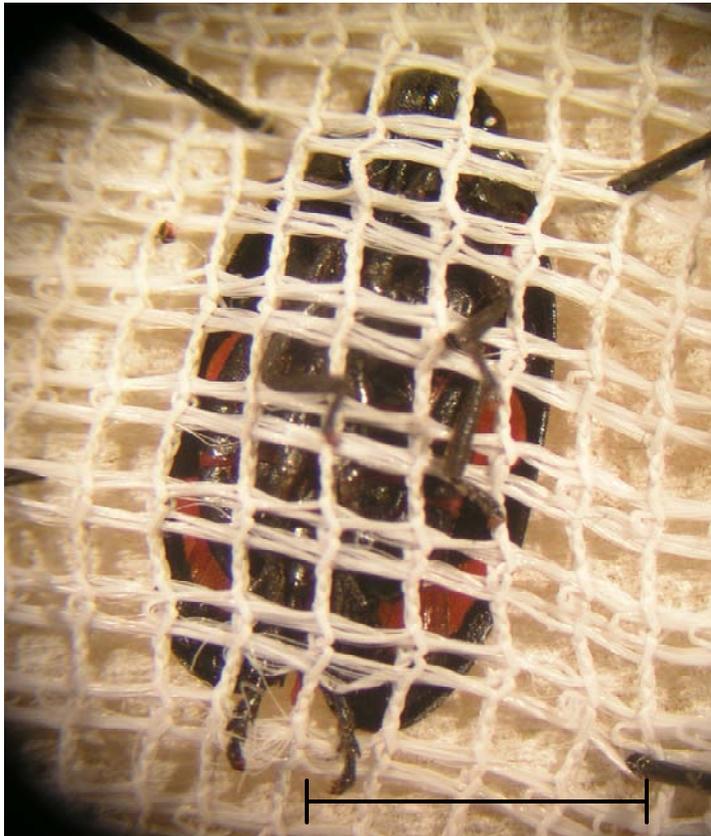
Für die Determination der Zikaden wurde auf mehrere Werke zurückgegriffen. Vor allem in den ersten zwei Untersuchungsjahren dienten die drei Bände von OSSIANNILSSON (1978, 1981, 1983) und die zwei Bände von RIBAUT (1936, 1952) zur Bestimmung der Arten. Ab 2003 konnte außerdem der erste Band von HOLZINGER et al. (2003) verwendet werden und im folgenden Jahr zusätzlich das Bestimmungsbuch für die Zikaden Deutschlands von BIEDERMANN & NIEDRINGHAUS (2004).

## 2.3 Untersuchung auf Reflexbluten

Auf die Fähigkeit, bei Reizung spontan einen Flüssigkeitstropfen an den Tarsen abzugeben, wurden verschiedene Arten der Überfamilie der Cercopoidea getestet. Hierfür wurde das lebende Tier auf eine grobmaschige Gaze gesetzt, diese dann sogleich kopfüber auf eine Schaumstoffunterlage gelegt, so dass das Tier mit seiner Rückenseite auf dem Schaumstoff zu liegen kam. Die Gaze wurde sofort gespannt und mit Stecknadeln an der Schaumstoffunterlage befestigt. Dem so fixierten Tier wurden Vorder- und Mittelbeine durch

---

die Maschen der Gaze nach außen gezogen (Bild 3). Die Beine konnten oberhalb der Gaze in der Luft rudern und waren während des Reizversuches gut einsehbar. Die Reizung erfolgte mittels einer heißen Stecknadel, die dem Tier nah an den Kopf gehalten wurde, dabei wurde darauf geachtet, das Tier nicht mit der Stecknadel zu berühren, um eine bleibende Verletzung zu vermeiden.



**Bild 3: Auf einer Schaumstoffunterlage mit Gaze und Stecknadeln fixiertes Weibchen von *Cercopis vulnerata*. (Maßstab = 5mm).**

Die folgenden Arten wurden untersucht:

*Cercopis intermedia* (12 ♂♂, 7 ♀♀), *C. sanguinolenta* (10 ♂♂, 17 ♀♀), *C. vulnerata* (15 ♂♂, 13 ♀♀), *Haematoloma dorsatum* (4 ♂♂, 5 ♀♀), *Aphrophora alni* (3 ♂♂, 7 ♀♀).  
Des Weiteren wurden einzelne Individuen der Arten *Neophilaenus campestris*, *N. lineatus* und *Philaenus spumarius* untersucht.

### 2.4 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

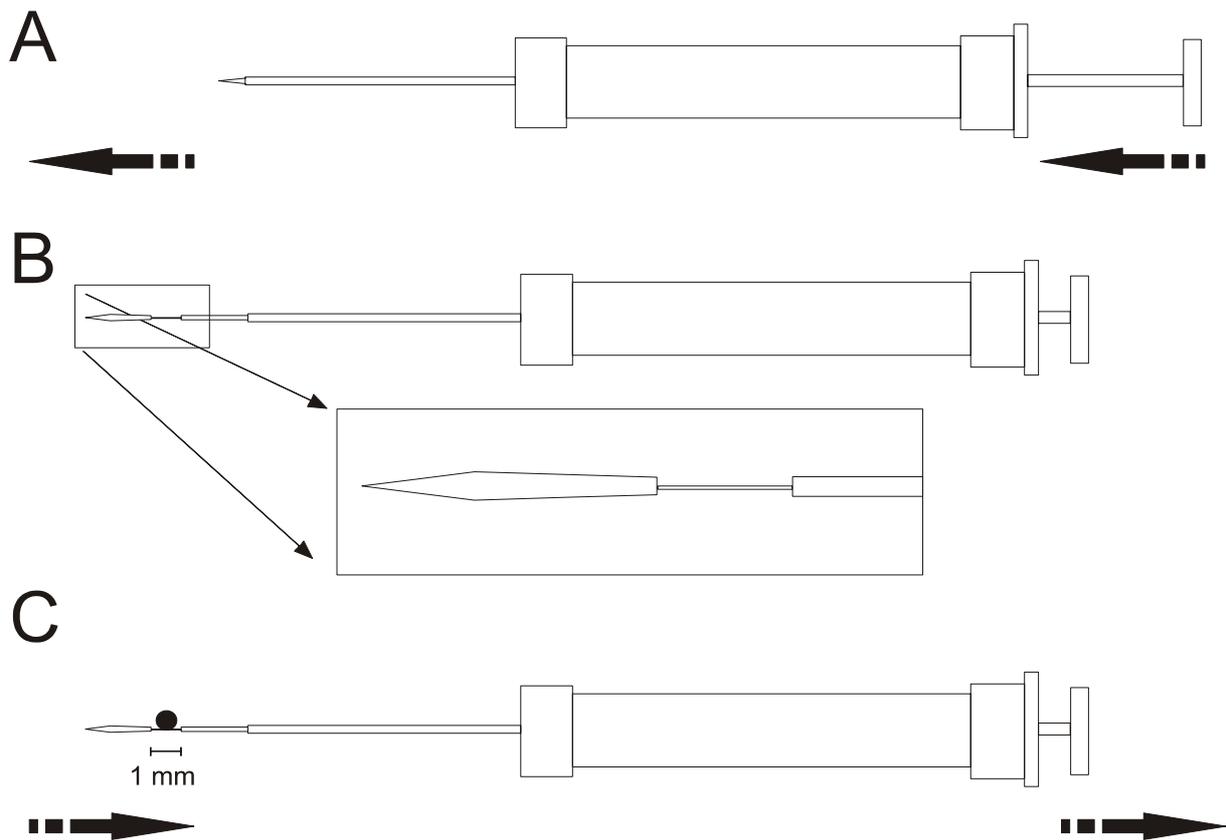
Die Tarsen der Blutzikaden *Cercopis vulnerata* und *C. sanguinolenta* wurden rasterelektronenmikroskopisch auf ein mögliches Vorkommen von Drüsen abgesucht. Dafür wurden die Tiere zunächst in 70%igem Ethanol fixiert und anschließend in einer aufsteigenden Aceton-Reihe schonend entwässert und mit Metall-Klebefolie auf einen Probenteller aufgeklebt. Hiernach wurden die Tiere für 2 min im Vakuum mit Gold bedampft (Sputter-Coater, Fa. Edwards S150B). Die so präparierten Tiere konnten unter dem Rasterelektronenmikroskop (Cambridge Instruments, Stereoscan 90) untersucht und photographiert werden. Die Bilder wurden im institutseigenen Labor entwickelt.

### 2.5 Chemische Analyse

#### 2.5.1 Probenaufbereitung

##### 2.5.1.1 Hämolymphe-Analyse

Die Untersuchung flüchtiger Inhaltsstoffe erfolgte an der Hämolymphe frisch aufgetauter Tiere. Den Zikaden wurde ein Hinterbein nahe der Coxa mit einer sterilen Mikroschere abgetrennt und der austretende Hämolymphtropfen abgenommen. Nicht immer trat ein Tropfen an der Schnittstelle aus, in diesen Fällen konnte durch sehr leichten Druck mittels der flachen Seite der Schere auf das Abdomen des Tieres ein Tropfen gewonnen werden. Der Tropfen wurde mit einer speziellen Spritze (Precision Analytical Syringe, Fa. VICI, Baton Rouge, USA; Bild 4) aufgenommen. Bei dieser so genannten Feststoffspritze handelt es sich nicht um eine Spritze im herkömmlichen Sinn, da mit ihr durch Unterdruck keine Flüssigkeit aufgezogen wird. Statt eines inneren Volumens besitzt die Spritze in ihrer Kanüle einen feinen ausfahrbaren Draht, auf diesem Draht befindet sich eine Einkerbung, in welche Flüssigkeit oder auch feste Strukturen (z. B. Insektendrüsen) eingelagert werden können; die Hämolymphe wird also in der Einkerbung des feinen Drahtes aufgenommen (Bild 4C), anschließend wird der Draht in die Kanüle zurückgezogen und die Kanüle unmittelbar in den Injektor des GCs gestoßen, hier verblieb sie nachdem der Draht ausgefahren war für den Zeitraum einer Minute, während welcher die Hämolymphe im Injektor verdampfte. Vor und nach jeder Benutzung wurde die Feststoffspritze im ausgefahrenen Zustand (Bild 4B) über dem Bunsenbrenner dreimal für je ca. 1 sec lang ausgeglüht, dadurch wurde vermieden, dass Reste einer vorherigen Probe noch in der Spritze hätten anhaften und die neue Probe hätten verunreinigen können.



**Bild 4: Feststoffspritze (Precision Analytical Syringe, Fa. VICI, Baton Rouge, USA). A: Spritze im eingefahrenen Zustand. B: Draht aus der Kanüle ausgefahren und Detailzeichnung vom Draht mit Kerbe. C: wie B aber mit Hämolymphtröpfchen in der Kerbe des Drahtes.**

### 2.5.1.2 Cantharidin-Analyse

Für die Untersuchung auf den Gehalt an gebundenem Cantharidin wurde zuerst das individuelle Trockengewicht der Tiere bestimmt. Hierfür wurden die Tiere für mindestens 12 h in der Gefriertrocknungsanlage (Lyovac GT 2 von Finn-Aqua) bei  $-50\text{ °C}$  und einem Druck von  $p = 2,5 \times 10^{-2}$  mbar getrocknet. Nach der Bestimmung des Trockengewichts wurden die Tiere mit jeweils  $100\ \mu\text{l}$  Salzsäure (6N HCl) im Trockenschrank für vier Stunden bei  $120\text{ °C}$  unter Rückfluss gekocht (Hydrolyse), die organische Substanz wurde anschließend in  $100\ \mu\text{l}$  Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ , SupraSolv) aufgenommen. Jede Hydrolysereihe beinhaltete zwölf Tierproben und vier Leerproben als Kontrolle (Blindproben), insgesamt wurden zwölf Reihen durchgeführt. Die Chloroformphase wurde am GC-MS (Finnigan Mat GCQ) auf einer unpolaren HT-5-Kapillarsäule von SGE (Länge 25 m, Innen- $\varnothing$  0,32 mm, Filmdicke  $0,1\ \mu\text{m}$ ) analysiert. Der GC-Lauf startete mit  $60\text{ °C}$  und die Temperatur stieg mit  $10\text{ °C}/\text{min}$  kontinuierlich auf die Endtemperatur von  $300\text{ °C}$  an. Die Detektion der Massen 50 bis 350 startete mit einer Verzögerung von 9,20 min. Für die quantitative Bestimmung des gebundenen Cantharidins wurde zuvor am GC-MS eine Eichkurve mit der Referenzsubstanz erstellt. Falls die Analyse der Proben nicht unmittelbar erfolgen konnte, wurden die Proben

## 2 Material und Methoden

---

mit Wasser überschichtet und bis zur Untersuchung in einem fest verschlossenen Gefäß im Kühlschrank aufbewahrt.

### 2.5.1.3 Gefriertrocknungsexperiment

Um die Gefriertrocknung als mögliche Quelle für eine Verunreinigung mit Cantharidin zu überprüfen, wurde ein Gefriertrocknungsexperiment durchgeführt. Dafür wurde ein Ölkäfer (*Mylabris impressa*, Meloidae) in Kompartimente zerlegt und diese auf drei Probengläschen verteilt. Weitere neun leere Probengläschen wurden zusammen mit den Ölkäferproben für unterschiedlich lange Zeiträume in der Gefriertrocknung belassen (Bedingungen siehe Kap. 2.5.1.1). Je drei Probengläschen wurden nach zwei, siebzehn bzw. neunzehn Stunden aus der Gefriertrocknung herausgenommen, drei weitere Probengläschen wurden nicht in die Gefriertrocknung gestellt und dienten als Kontrolle. Die zwölf leeren Probengläschen (9 Proben + 3 Kontrollen) wurden nach dem Gefriertrocknen mit 50 µl Salzsäure hydrolysiert (wie in Kap. 2.5.1.1 beschrieben) und anschließend in 50 µl Chloroform aufgenommen. Die Chloroformphase wurde am GC-MS (Finnigan Mat GCQ) unter den gleichen Bedingungen wie in Kap. 2.5.1.1 analysiert.

### 2.5.2 Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Die chemische Analyse der Hämolymphe-Inhaltsstoffe wurde an einem Gaschromatographen (Vega Series 2, GC 6000, Fa. Carlo Erba Instruments), der mit einer Transferline an ein Massenspektrometer (Ion Trap Detector ITD 800, Fa. Finnigan Mat) gekoppelt war, durchgeführt. Die Hämolymphe wurde mittels der oben beschriebenen Feststoffspritze (Bild 4) in einen split/splitless-Injektor (Injektortemperatur 230 °C) mit für 1 min geschlossenem Splitventil verdampft und über eine relativ unpolare HT-8-Kapillarsäule von SGE (Länge 25 m, Innen-Ø 0,32 mm, Filmdicke 0,25 µm) in ihre Komponenten aufgetrennt. Als Trägergas wurde Helium verwendet, welches auf einen Druck von 40 kPa eingestellt war, woraus eine Durchflussgeschwindigkeit von etwa 20 cm/s resultiert. In der ersten Untersuchungsphase der Hämolymphe-Inhaltsstoffe wurde ein Temperaturprogramm gewählt, mit welchem ein breites Spektrum an Inhaltsstoffen nachgewiesen werden konnte, hierbei startete der GC-Lauf mit 60 °C, diese Temperatur wurde für 5 min gehalten und stieg danach mit 10 °C/min kontinuierlich auf die Endtemperatur von 275 °C an. Nachdem mehrere leichtflüchtige Inhaltsstoffe als viel versprechende Substanzen identifiziert werden konnten, wurde ein hierfür speziell angepasstes Temperaturprogramm entwickelt. Der GC-Lauf startete mit 40 °C und die Temperatur stieg mit 5 °C/min kontinuierlich auf die Endtemperatur von

---

280 °C an. Die Massenspektren wurden mittels Elektronenstoßionisation und einer Ionisierungsenergie von 70 eV gewonnen. Die Auswertung der Chromatogramme und Massenspektren erfolgte nach der Konvertierung der Originaldateien (MassTransit) mit der Software Xcalibur (Version 1.0; Fa. Axel Semrau GmbH) und der Massenspektrendatenbank NIST (Version 2.0). Darüber hinaus wurden zur Interpretation der Massenspektren BUDZIKIEWICZ (1998), BUDZIKIEWICZ et al. (1967), LEE (1998) und McLAFFERTY (1995) herangezogen.

### **2.5.3 Quantifizierung der Alkylsulfide am Gaschromatographen**

Die Gehaltsbestimmung der Alkylsulfide wurde am Gaschromatographen (Fisons Instruments, GC 8000 series) mit einem Flammen-Ionisierungs-Detektor (FID) durchgeführt, dieses Gerät zeigt im Vergleich zum GC-MS gegenüber den Alkylsulfiden eine höhere Empfindlichkeit. Die Bedingungen am GC waren entsprechend denen für die oben beschriebenen GC-MS Analysen (2.5.2), als Brenngas für den FID wurde Wasserstoff verwendet. Für die drei Alkylsulfide (Dimethyldisulfid, Dimethyltrisulfid, Dimethyltetrasulfid) wurden Eichkurven mit den Referenzsubstanzen am GC-FID angelegt. Für die Quantifizierung der Alkylsulfide in der Hämolymphe der Tiere des Antibiotikum-Experiments wurde die Feststoffspritzentechnik (2.5.1) benutzt. Um die jeweilige Menge der für die einzelnen Analysen verwendeten Hämolymphe zu bestimmen, wurde eine Tropfeneichkurve angelegt. Der Hämolymphtropfen wurde wie in 2.5.1 beschrieben gewonnen und noch an der Coxa sitzend mit einem Messokular vermessen, anschließend wurde der Tropfen mit einer 1µl-Kapillare aufgenommen und sein Volumen bestimmt. Auf diese Weise wurden für elf Tropfen Ausdehnungen und Volumina gemessen und hieraus eine Eichkurve ermittelt. So konnte für die Proben der Hämolymphtropfen nur vermessen und das zugehörige Volumen aus der Eichkurve abgelesen werden.

### **2.5.4 Referenzsubstanzen**

Zur sicheren Identifizierung der Hämolymphe-Inhaltsstoffe wurden die authentischen Referenzsubstanzen im Anschluss an die Probe in das GC-MS eingespritzt und Retentionszeit und Massenspektrum mit der zu bestimmenden Substanz verglichen. Als Referenzsubstanzen wurden hierfür erfolgreich verwendet:

Dimethyldisulfid 99% ( $C_2H_6S_2$ , Aldrich), Dimethyltrisulfid 98% ( $C_2H_6S_3$ , Aldrich), Dimethyltetrasulfid ( $C_2H_6S_4$ , Oxford Chemicals), Niacinamid ( $C_6H_6N_2O$ , Merck), Indol 99%

(C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N, Fluka), 3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin (C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>, im Pyrazin Mix hergestellt von Herrn W. Francke, Hamburg)

### 2.5.5 Weitere Analysemethoden

Neben den bereits beschriebenen wurden noch weitere Methoden für die Analyse der Hämolymphe-Inhaltsstoffe ausprobiert, auf die hier nur kurz eingegangen werden soll, da sie kaum verwertbare Ergebnisse lieferten. Hauptsächlich wurden zahlreiche Versuche zur Anreicherung flüchtiger Inhaltsstoffe (v. a. der Alkylsulfide) von lebenden und toten Individuen von *Cercopis vulnerata* durchgeführt.

Für diese **Headspace-GC-Analysen** (Dampfraum-GC-Analyse) wurden Solid Phase Microextraction (SPME, Fa. Supelco, Pennsylvania, USA) und Gerstel Twister (Fa. Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Deutschland) eingesetzt. Diese beiden Methoden sind geeignet, um flüchtige Substanzen aus dem Dampfraum über einer Probe zu sammeln.

Bei der **SPME**-Methode wird eine SiO<sub>2</sub>-Faser (fused-silica), welche mit verschiedenen polymeren Phasen beschichtet ist, im geschlossenen Behälter über die Probe gehalten, die Analyten reichern sich auf der Faser an und können dann direkt durch Thermodesorption im Injektor vom GC wieder von der Faser gelöst werden. Für den Nachweis der Alkylsulfide wurden verschiedene Beschichtungen ausprobiert (Polyacrylat 85 µm, Polydimethylsiloxan 100 µm, Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen 65 µm). Die Versuche wurden auf einer Heizplatte bei Temperaturen zwischen 30 und 60 °C für 10 bis 90 min durchgeführt. Für die SPME-Analysen lebender Tiere wurden die Tiere in ein Probengefäß (Volumen: 4 ml) gesetzt und mittels Hitze oder durch Zugabe eines Magnetrührers gereizt, für die Analyse toter Tiere wurden die Zikaden in mehrere Teile zerschnitten; in beiden Fällen wurde der SPME-Halter durch die durch ein Septum gebildete Abdeckung gestoßen und die Faser im Gasraum über der Probe ausgefahren. Ebenfalls wurden Versuche mit authentischen Alkylsulfiden und auch mit Methionin durchgeführt. Bei Methionin handelt es sich um eine schwefelhaltige Aminosäure. Da Aminosäuren nicht thermostabil und sehr schwer flüchtig sind, ist ein direkter Nachweis mit einem GC nicht möglich, dennoch könnten sich im Injektor Zerfallsprodukte bilden, die GC-gängig sind. Als solche könnten Alkylsulfide in Frage kommen. Um die Möglichkeit zu überprüfen, ob der Nachweis von Alkylsulfiden in der Hämolymphe der Blutzikade ein Methodenartefakt sein könnte, wurde das Methionin-Experiment durchgeführt.

Beim **Gerstel Twister** handelt es sich um ein mit Polydimethylsiloxan beschichtetes

---

Rührstäbchen. Er arbeitet nach dem gleichen Prinzip wie die SPME, wobei der Gerstel Twister eine deutlich höhere Empfindlichkeit besitzt. In ein Schraubdeckelgläschen wurden 10 lebendige *C. vulnerata* (5 ♂♂, 5 ♀♀) eingesetzt und der Twister in ein Stück Mullbinde eingenäht und im Gläschen aufgehängt, um zu vermeiden, dass die Tiere in direkten Kontakt mit dem Twister kommen. Das Gläschen wurde mit einem Deckel verschlossen und stand für zweieinhalb Stunden bei Zimmertemperatur. Danach wurde der Gerstel Twister im Thermodesorptionsverfahren (ChromatoProbe) an einem GC-MS analysiert, diese Untersuchung fand am Lehrstuhl für Pflanzensystematik der Universität Bayreuth mit freundlicher Unterstützung von S. Dötterl statt.

Um eine mögliche antimikrobielle Wirkung der Hämolymphe zu testen, wurde ein **Hemmhoftest** durchgeführt. Hierfür wurden bevorzugt entomophage Mikroorganismen eingesetzt. Caso-Nährböden wurden mit verschiedene Bakterienarten beimpft (je 0,1 ml Flüssigkultur von *Escherichia coli*, *Bacillus sphaericus* und *Serratia entomophila*), und anschließend wurden 4 µl Hämolympflösung (2 µl Hämolymphe und 2 µl Ringerlösung) aufgebracht. Die beimpften Platten wurden bei 30 °C bebrütet. Für die Kontrolle wurden die antibiotischen Wirkstoffe Ampicillin und Tetracyclin eingesetzt. Die Ergebnisse wurden nach 24 Stunden abgelesen.

## 2.6 Antibiotikum-Behandlung

Um herauszufinden, ob die Endosymbionten der Blutzikade an der Produktion der Alkylsulfide beteiligt sind, wurde versucht, die Tiere mit einem Antibiotikum experimentell symbiontenfrei zu bekommen. Hierfür wurden 120 *Cercopis vulnerata* auf einer Brache im Ldkr. Bayreuth gefangen. Davon wurden 60 Tiere mit einem Breitband-Antibiotikum (Tetracyclin) behandelt, der Rest der Tiere blieb unbehandelt und diente als Kontrolle. Das Tetracyclin wurde in Ringerlösung aufgenommen (0,2 µg Tetracyclin, Ringerlösung ad 1 µl). Da sich auch die feinste Spritzenkanüle mit einem Durchmesser von 0,4 mm als überdimensioniert für die ca. 1 cm großen Tiere erwies, wurden Kapillaren auf feine Spitze ausgezogen. Dies erfolgte mit einem Glaskapillaren-Ziehgerät (Pul-1, World Precision Instruments), hiermit wurden 1µl-Glaskapillaren auf Spitzen mit einem Durchmesser von ca. 0,15 mm ausgezogen. Nachdem diese Kapillaren sterilisiert waren, wurde mit ihnen 0,5 µl der Antibiotikum-Lösung (entspricht 0,1 µg Tetracyclin) appliziert; dies erfolgte in den Thorax an der Basis des rechten Vorderflügels. Nach der Behandlung wurden die Tiere an Weizenpflanzen in der Klimakammer gehalten (20 °C, Licht : Dunkelheit = 16 h : 8 h). Die Weizenpflanzen wurden 8 Wochen zuvor auf sterilisiertem Quarzsand unter Zugabe

## 2 Material und Methoden

---

definierter Düngermenge (1,5 g PlantoSan, NKD Langzeitdünger) im Gewächshaus angezogen. Vom Tag 5 bis zum Tag 10 nach der Behandlung sollten je 6 behandelte und 6 Kontrolltiere von den Pflanzen abgenommen und bei – 80 °C eingefroren werden. Da einige Tiere aber nicht bis zum Ende des Experimentes überlebten, konnte dies nicht immer eingehalten werden. Die Behandlung der Tiere erwies sich als eine zeitaufwendige Angelegenheit, es war unmöglich alle 60 Tiere an einem Tag mit der Antibiotikum-Lösung zu spritzen, so dass das Experiment in zwei aufeinander folgenden Telexperimenten durchgeführt werden musste. Die Ergebnisse dieser Telexperimente wurden zusammengefasst, die Auswertung beruhte auf den zusammengefassten Ergebnissen beider Telexperimente. Die chemische Analyse der Hämolymphe erfolgte wie in 2.5.3 beschrieben.

### 2.7 Vermessung der Mycetome (Bacteriome)

Um abschätzen zu können, ob die Antibiotikum-Behandlung einen messbaren Effekt auf die Symbionten der behandelten Tiere hatte, wurden die Symbiontenorgane (Mycetome/Bacteriome) vermessen. Zur Lokalisation der Mycetome wurden zuvor mehrere Tiere dorsal aufpräpariert und mit einer alkoholischen Sudanrotlösung angefärbt. Bei ungefärbten Tieren sind die Mycetome nur sehr schwer vom Fettkörper zu unterscheiden, da sie sich in Gestalt und Färbung kaum voneinander trennen lassen. Mit Hilfe dieser Färbemethode kann eindeutig zwischen fetthaltigem und fettfreiem Gewebe differenziert werden. Für die Mycetom-Ausmessung der Experimenttiere musste aber auf diese Anfärbung verzichtet werden, da das Färbemittel in Alkohol gelöst war und die Organe unter Alkoholeinwirkung in ihrer Größe schrumpfen. Es wurde in einem Vorversuch das Auge des Betrachters für die Identifizierung der Mycetome geschult, so dass es nach einiger Übung auch möglich war, ohne Färbung sicher zwischen Mycetom und Fettkörper zu unterscheiden. Den Tieren des Antibiotikum-Experiments wurden dorsal die Abdomina aufpräpariert und die geöffneten Tiere mit isotonischer Kochsalzlösung beschichtet. Die inneren Organe (Darmtrakt, Gonaden, Fettkörper, Tracheen) wurden entfernt, und mit großer Sorgfalt wurden die Mycetome von umgebenden Resten des Fettkörpers und anhängenden Tracheen befreit. Die freigelegten Mycetome wurden unter dem Binokular mit einer digitalen Kamera (Olympus C 5060) photographiert. Um anschließend am Bildschirm die Größe der Mycetome bestimmen zu können, wurde für die Photographie in die aufpräparierten Tiere ein Maßstab hineingelegt (Metallplättchen 2,8 mm x 1 mm). Die Ausmessung der Mycetomfläche erfolgte mit der Software ImageJ (Version 1.34s, Freeware).

## 2.8 Molekularbiologische Charakterisierung der Endosymbionten

Die Isolation der DNA erfolgte aus einem kompletten Individuum der Art *Cercopis vulnerata*. Für die Isolierung der DNA wurde das DNeasy tissue Kit der Firma QIAGEN verwendet. Der weitere Vorgang folgte dem Protokoll: „Purification of total DNA from animal tissues“ (DNeasy Tissue Handbook 03/2004), das in dem Kit enthalten war. Für die Amplifizierung der 16S rRNA wurden Standard Primer (Tab. 1) verwendet, die für einen Großteil der bekannten Eubacteria geeignet sind. PCR- und Sequenzier-Bedingungen siehe PERŠOH & RAMBOLD (2002). Die Sequenzierung erfolgte in zwei Teilstücken mit jeweils zwei unterschiedlichen Forward und Reverse Primern (Tab. 1). Die Sequenzen des Gelbildes wurden automatisch mit dem Programm e-seq 2.0 (LI-COR) ausgewertet und manuell überarbeitet und ergänzt. Die einzelnen Teilstücke wurden nach Auswertung mit dem Programm „Staden Package“ zu einer Konsensussequenz zusammengefügt. Die Identifizierung der Bakterien erfolgte mit einem „Nukleotid Blast search“ auf der NCBI-Hompage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und wurde durch die Angabe der besten Treffer dokumentiert.

**Tab. 1: Verwendete universelle Eubacteria Primer für die 16S rRNA**

Richtung	Alias	Sequenz 5' zu 3'	Referenz
<b>PCR-Primer:</b>			
Forward	SSUB7F	AGA GTT TGA TC(AC) TGG CTC AG	LANE (1991)
Reverse	SSUB1507R	TAC CTT GTT ACG ACT TCA C	modifiziert nach LANE (1991)
<b>Sequenzierprimer:</b>			
Forward	SSUB7F	AGA GTT TGA TC(A/C) TGG CTC AG	LANE (1991)
Forward	04F	GTG TAG C(AG)G TGA AAT GC G(CT)A GA	PERŠOH (in lit. 2003)
Reverse	907R	CCG TCA ATTcmT TTG AGT TT	MUYZER et al. (1996)
Reverse	SSUB1507R	TAC CTT GTT ACG ACT TCA C	modifiziert nach LANE (1991)

### 2.9 Cantharidin-Untersuchung

Bei der Untersuchung auf Vorkommen von Protein-gebundenem Cantharidin in Zikaden wurden zwei Ansätze verfolgt: ein systematisches Screening und ein individueller Ansatz.

**Systematisches Screening:** Um einen Überblick über das Vorhandensein von Cantharidin bei den in Deutschland verbreiteten Zikaden (Fulgoromorpha et Cicadomorpha) zu bekommen, wurden für diese Gruppen repräsentative Arten untersucht. Einen Überblick über die beprobten Arten gibt Tab. 2, insgesamt wurden 30 Arten aus 5 Familien überprüft. Die Tiere wurden wie in 2.5.1 beschrieben aufbereitet.

**Individueller Ansatz:** Aufgrund der positiven Cantharidin-Funde bei der Kleinzikade *Ulopa reticulata*, die am Bayreuther Lehrstuhl gemacht wurden (DETTNER pers. Mit.), unterzog ich an ebenselber Stelle diese Art einer intensiven Überprüfung. Dafür wurden Individuen aus vier verschiedenen Habitaten verwendet, die Tiere entstammen alle Fängen, die im Zeitraum zwischen Ende September und Anfang November 2001 gemacht wurden. Insgesamt wurden 10 ♂♂, 9 ♀♀ und 15 Nymphen auf das Vorkommen von Cantharidin getestet. Die Tiere wurden ebenfalls wie in 2.5.1 beschrieben aufbereitet.

### 2.10 Auswertung und Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde bis auf die CNESS Berechnungen mit Statistika für Windows Version 5.5 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA, 1999) durchgeführt. Für die Verwendung von parametrischen Tests wurde der Datensatz auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk Test) und Varianzhomogenität (Levene Test) getestet, nicht normalverteilte Datensätze wurden transformiert. Durchgängig werden Mittelwerte mit Standardabweichung (Säulen und Linien) und Mediane mit 25 und 75%-Perzentile (Quartile) und Minima/Maxima (Box-Whisker Plots) angegeben. Für die Korrelationen von verhältnisskalierten, normalverteilten Proben wurde die Maßkorrelation nach Pearson und für verhältnisskalierte, nicht normalverteilte Datenreihen die Rangkorrelation nach Spearman verwendet. Der Pearson's Maßkorrelationskoeffizient  $r$  kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen, diese werden dabei wie folgt interpretiert: -1 = perfekte negative Korrelation; 0 = keine Korrelation; 1 = perfekte positive Korrelation (DYTHAM, 1999). Der Rangkorrelationskoeffizient  $R_s$  nach Spearman kann entsprechend dem Maßkorrelationskoeffizienten  $r$  interpretiert werden (KÖHLER et al., 1995).

Tab. 2: Liste der auf gebundenes Cantharidin untersuchten Tiere.

	♂♂	♀♀	Nymphen
<b>Fulgoromorpha EVANS, 1946</b>			
<b>Delphacidae LEACH, 1815</b>			
<b>Delphacinae LEACH, 1815</b>			
<i>Conomelus anceps</i> (GERMAR, 1821)	5	4	-
<i>Megadelphax sordidulus</i> (STAL, 1853)	5	4	-
Delphacidae sp.	-	-	4
<b>Cicadomorpha EVANS, 1946</b>			
<b>Cercopoidea EVANS, 1946</b>			
<b>Cercopidae LEACH, 1815</b>			
<i>Cercopis sanguinolenta</i> (SCOPOLI, 1763)	1	1	-
<i>Cercopis vulnerata</i> ROSSI, 1807	1	1	-
<b>Aphrophoridae AMYOT &amp; SERVILLE, 1843</b>			
<i>Neophilaenus campestris</i> (FALLÉN, 1805)	4	5	-
<i>Neophilaenus lineatus</i> (LINNAEUS, 1758)	2	2	-
<i>Aphrophora pectoralis</i> MATSUMURA, 1903	1	1	-
<i>Philaenus spumarius</i> (LINNAEUS, 1758)	1	1	-
<b>Membracidae RAFINESQUE, 1815</b>			
<i>Gargara genistae</i> (FABRICIUS, 1775)	1	1	1
<i>Centrotus cornutus</i> (LINNAEUS, 1758)	1	1	-
<b>Cicadellidae LATREILLE, 1825</b>			
<b>Ulopiniae Le Peletier &amp; Serville, 1825</b>			
<i>Ulopa reticulata</i> (FABRICIUS, 1794)	10	9	15
<b>Agalliinae KIRKALDY, 1901</b>			
<i>Anaceratagallia venosa</i> (GEOFFROY, 1785)	1	2	1
<b>Idiocerinae BAKER, 1915</b>			
<i>Populicerus populi</i> (LINNAEUS, 1761)	1	1	1
<b>Cicadellinae LATREILLE, 1825</b>			
<i>Evacanthus interruptus</i> (LINNAEUS, 1758)	1	1	-
<i>Cicadella viridis</i> (LINNAEUS, 1758)	1	1	-
<i>Graphocephala fennahi</i> YOUNG, 1977	4	2	-
<b>Typhlocybinae KIRSCHBAUM, 1868</b>			
<i>Emelyanoviana mollicula</i> (BOHEMAN, 1845)	1	1	-
<i>Kybos butleri</i> (EDWARDS, 1908)	1	1	1
<i>Eupteryx collina</i> (FLOR, 1861)	1	2	-
<i>Wagneripteryx germari</i> (ZETTERSTEDT, 1840)	2	2	1
<i>Zygina hyperici</i> (HERRICH-SCHÄFFER, 1836)	1	1	-
<b>Deltocephalinae FIEBER, 1869</b>			
<i>Nealiturus fenestratus</i> (HERRICH-SCHÄFFER, 1834)	1	1	1
<i>Macrosteles frontalis</i> (SCOTT, 1875)	1	1	-
<i>Doratura stylata</i> (BOHEMAN, 1847)	1	1	1
<i>Cicadula persimilis</i> (EDWARDS, 1920)	2	2	-
<i>Cicadula quadrinotata</i> (FABRICIUS, 1794)	1	1	-
<i>Sotanus thenii</i> (P. LÖW, 1885)	3	2	-
<i>Errastunus ocellaris</i> (FALLÉN, 1806)	3	4	-
<i>Turrutus socialis</i> (FLOR, 1861)	3	3	-

## 2 Material und Methoden

---

Die Totalionenstromchromatogramme (TIC) der Hämolymp-*Proben* wurden in Zahlentabellen umgewandelt (Retentionszeit und Intensität) und die Ähnlichkeit mittels des chord-normalized expected species shared Index berechnet (Gallagher's CNESS Index: TRUEBLOOD et al., 1994). Der CNESS Index ist ein Maß für die Unähnlichkeit zweier Proben und ist eine metrische Weiterentwicklung des NESS Index, welcher ursprünglich von GRASSLE & SMITH (1976) entwickelt wurde. Der CNESS ist ein metrisches Abstandsmaß und erstreckt sich von 0 (= völlige Ähnlichkeit der Proben) bis  $\sqrt{2}$  (= völlige Unähnlichkeit der Proben). Durch die Wahl des Stichprobengrößen-Parameters *m* kann man den CNESS gewichten. Bei *m* = 1 (Minimum) werden dominante Arten (bzw. Hauptkomponenten) und bei maximalen *m*-Wert seltene Arten (Spurenkomponenten) stärker hervorgehoben. Der CNESS wurde mit dem Programm Compah96 (BOESCH, 1977) berechnet, welches bei Gallagher (Massachusetts, Boston) frei herunterzuladen ist (<http://alpha.es.umb.edu/faculty/edg/files/edgwebp.htm>, Stand: 8.3.2006). Für die Ordination der Werte wurde eine nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) mit Statistika (StatSoft Inc., 1999) durchgeführt. Als Maß wie gut (oder wie schlecht) die Rangfolge der Matrix mit der Anordnung der Proben in der NMDS wiedergegeben werden kann, wurde der Stress-Faktor angegeben: Je kleiner der Wert ist, umso besser ist die Passung der Proben in der Ordination. Nach CLARKE (1993) liefert ein Stress-Faktor von < 0,05 ein exzellentes, ein Stress von < 0,1 ein gutes und ein Stress von < 0,2 ein brauchbares Ergebnis der Skalierung.

Ob sich die Hämolymp-Analysen der verschiedenen Gruppen (Arten, Geschlechter bzw. Familien) hinsichtlich ihrer TICs voneinander signifikant unterscheiden, wurde mit Hilfe einer Ähnlichkeitsanalyse (ANOSIM, „One-way Analysis of Similarity“) überprüft. Bei der ANOSIM handelt es sich um einen nicht-parametrischen Permutationstest, der als multivariates Analogon zur ANOVA betrachtet werden kann (CLARKE & WARWICK, 1994). Die ANOSIM basiert auf den Rängen der Unähnlichkeitsmatrizen (CNESS-Index) und wurde mit dem Programm PRIMER-E (5) berechnet. Berechnet wird zunächst die mittlere Rangähnlichkeit innerhalb der Gruppen und dann zwischen den Gruppen. Darauf werden nach einer Zufallsmischung der Labels die Ähnlichkeiten erneut berechnet; in der vorliegenden Arbeit geschah das mit 1000 Wiederholungen. Das Ergebnis ist eine R-Statistik, die Werte zwischen -1 und 1 annehmen kann, wobei 1 für völlige Unähnlichkeit zwischen den Gruppen steht und 0 für völlige Übereinstimmung. Der  $\alpha$ -Wert von 0,05 wurde für diese multivariaten Signifikanztests mit der False Discovery Rate (FDR) korrigiert, hierfür wurde die von BENJAMINI & HOCHBERG (1995) vorgeschlagene step-up-Prozedur angewendet.

---

Ob Unterschiede zwischen den Gruppen (Behandlung \* Sex) der Antibiotikum-Behandlung bestehen, wurde mit einer Varianzanalyse (zweifaktorielle ANOVA, „Analysis of Variance“) überprüft. Bei dieser statistischen Datenanalyse wird versucht, die Varianz einer metrischen Variablen durch zwei Variable zu erklären; untersucht wird, ob und wie sich die Erwartungswerte der metrischen Zufallsvariablen in verschiedenen Gruppen unterscheiden. Durch die Prüfung der Varianzen innerhalb und zwischen den Gruppen kann ermittelt werden, ob sich die Gruppen signifikant voneinander unterscheiden. Die unabhängigen metrischen Variablen waren im vorliegenden Fall die Konzentrationen an Alkylsulfiden, deren Varianz wurde durch die Gruppen ‚Behandlung‘ und ‚Sex‘ zu erklären versucht. Da die Probanden unterschiedlich lange im Experiment verweilten, wurde, um diese zeitliche Störgröße herauszurechnen, eine zweifaktorielle Kovarianzanalyse (ANCOVA, „Analysis of Covariance“) durchgeführt. Der zeitliche Faktor (Faktor ‚Tag‘) wurde als weitere metrische unabhängige Variable (Kovariablen) im Modell spezifiziert.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Reflexbluten bei Vertretern der Cercopoidea**

##### **3.1.1 Reizversuche**

Die getesteten Arten der Cercopidae gaben allesamt bei Reizung mit einer heißen Stecknadel einen Tropfen Flüssigkeit an ihrem Prätarsus ab (Bild 5). Dabei bluteten die Tiere je nach Grad der Reizung an einem oder mehreren Beinen. Es konnte an jedem Bein eine Tropfenbildung beobachtet werden.

Bei den untersuchten Aphrophoriden konnten einzelne Individuen von *Neophilaenus campestris*, *Philaenus spumarius* und *Aphrophora alni* ebenfalls zur Abgabe eines Flüssigkeitstropfens gebracht werden (Tab. 3). Unter diesen konnte *P. spumarius* am leichtesten zur Abgabe eines Tropfens gebracht werden, die Fähigkeit zum Reflexbluten war bei Vertretern dieser Art fast genauso gut wie bei den getesteten Cercopiden.

### 3 Ergebnisse

---

**Tab. 3: Auf Reflexbluten untersuchte Arten. Abgabe eines Flüssigkeitstropfens nach Reizung mit einer heißen Stecknadel: bei fast allen getesteten Tieren (> 85%): ++ ; bei einigen der getesteten Tiere (> 49%): + ; bei wenigen Tieren (< 30%): (+). Pro Art wurden zwischen 10 und 20 Individuen getestet.**

	Flüssigkeitsabgabe am Prätarsus
<i>Cercopis intermedia</i>	++
<i>Cercopis sanguinolenta</i>	++
<i>Cercopis vulnerata</i>	++
<i>Haematoloma dorsatum</i>	+
<i>Aphrophora alni</i>	(+)
<i>Neophilaenus campestris</i>	+
<i>Philaenus spumarius</i>	+

#### 3.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Tarsen

Die Tarsen von *Cercopis vulnerata* und *C. sanguinolenta* wurden unter Zuhilfenahme des Rasterelektronenmikroskops (REM) auf das Vorkommen von Drüsen untersucht. Dabei wurde die Oberfläche aller sechs Tarsen sowohl von männlichen und weiblichen Adulti als auch von Nymphen aufs Genaueste betrachtet. Strukturen, die auf Drüsen im Innern der Tarsen schließen lassen, konnten in keinem Fall gefunden werden. In der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme des Tarsus (Bild 6) ist auf der ventralen Seite in der Medianen des Prätarsus eine Rille zu sehen (Pfeil), wahrscheinlich tritt an dieser Stelle am lebenden Tier bei Reizung der Flüssigkeitstropfen aus.

#### 3.1.3 Chromatographischer Vergleich von Reflexblut und Hämolymphe bei *C. vulnerata*

Um einen weiteren Hinweis zu bekommen, ob es sich bei dem abgegebenen Tropfen am Prätarsus tatsächlich um Hämolymphe handelt, wurde durch Reizung ein Tropfen Reflexblut von *C. vulnerata*-Individuen gewonnen und am GC-FID analysiert. Dieser chromatographische Lauf wurde anschließend mit dem einer Hämolymphe-Probe verglichen. Die Läufe zeigten eine sehr gute Übereinstimmung.

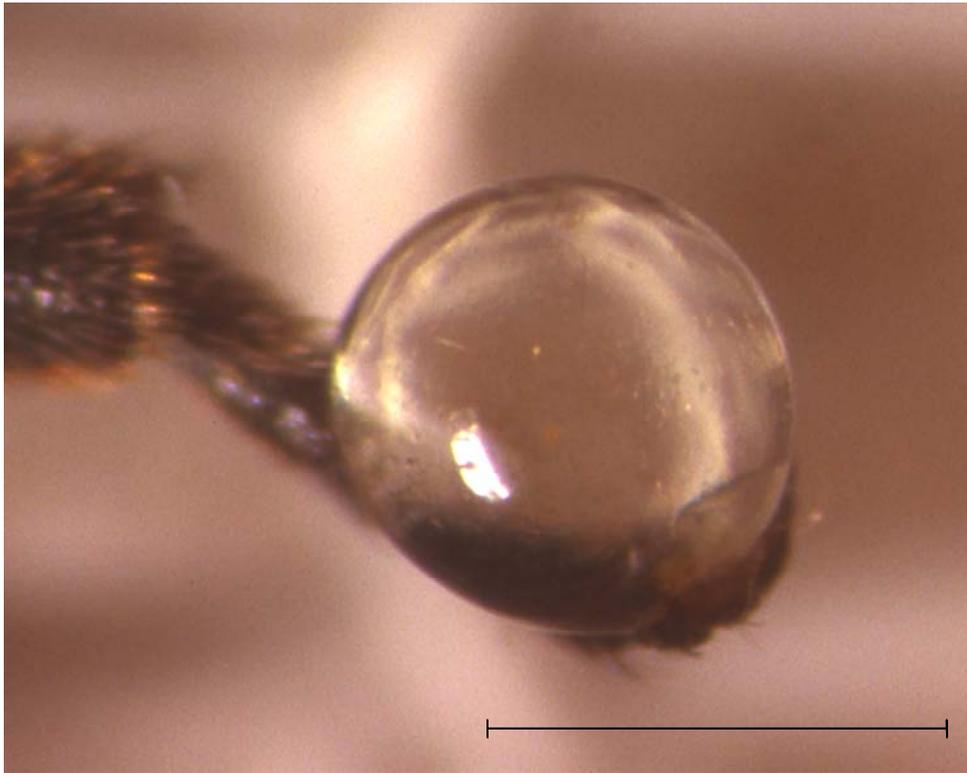


Bild 5: Prothorakaler Tarsus von *Cercopis vulnerata* mit abgegebenem Flüssigkeitstropfen nach Reizung im Labor. (Maßstab = 0,8 mm).

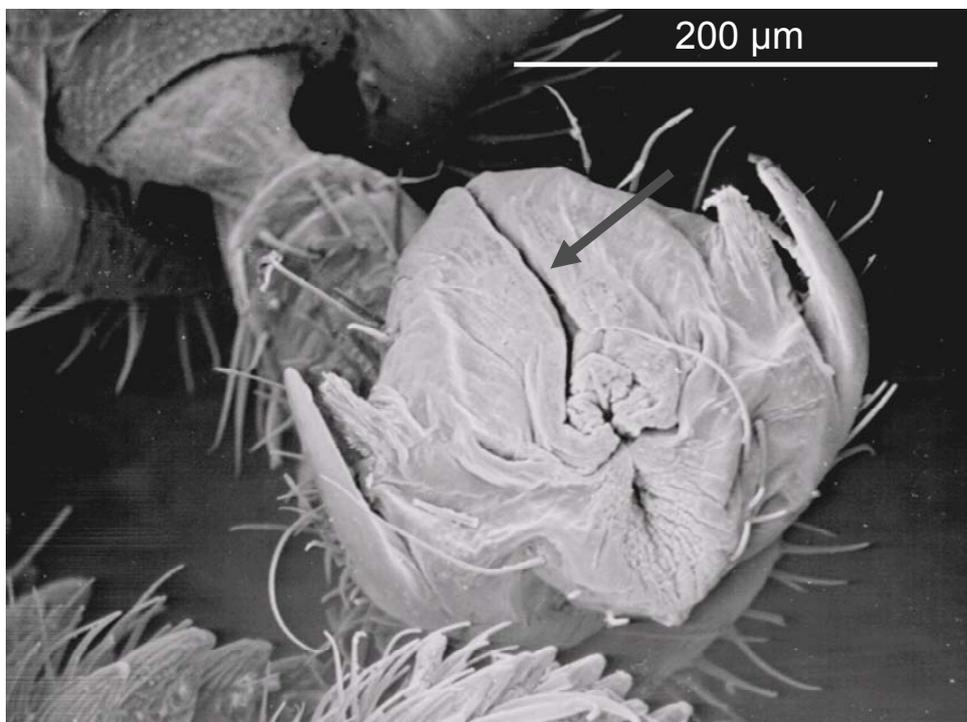


Bild 6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Tarsus (Unterseite) von *Cercopis vulnerata*.

## 3.2 Hämolymp-Analyse

### 3.2.1 Inter- und intraspezifischer Vergleich der Hämolymphe

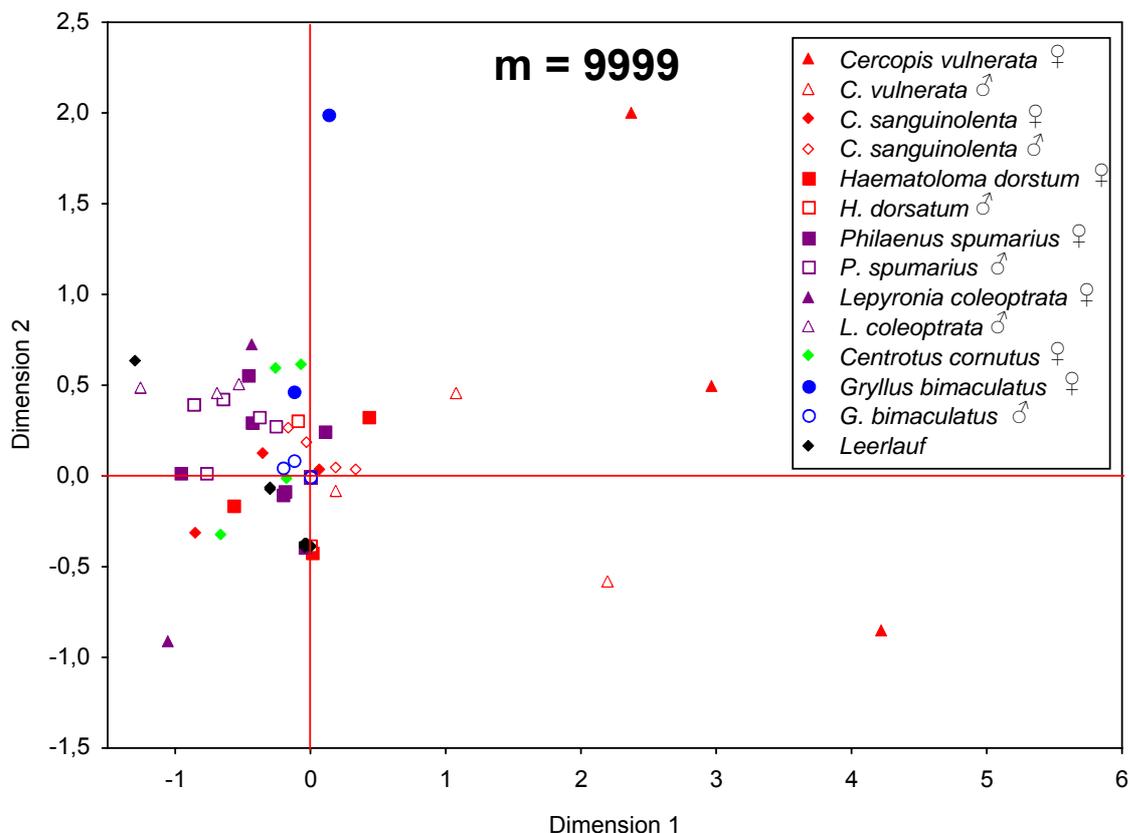
Die TICs der Hämolymp-Proben unterschiedlicher Arten wurden hinsichtlich ihrer Übereinstimmung verglichen. Dabei wurden schwarz-rot gefärbte Arten der Cercopidae (*Cercopis vulnerata*, *C. sanguinolenta*, *Haematoloma dorsatum*) mit denen der nahe verwandten Aphrophoridae (*Philaenus spumarius*, *Lepyronia coleoptrata*) und einer entfernter verwandten Zikadenart der Membracidae (*Centrotus cornutus*), sowie mit *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae) als eine Kontrolle, verglichen. Der Unähnlichkeits-Index CNESS wurde aus den in Zahlen umgewandelten TICs der Proben berechnet. Eine Ordination der Proben basierend auf CNESS<sub>m1</sub> ist in Bild 8 dargestellt. Die Cercopiden sind von allen anderen Arten und Leerläufen gut abgetrennt (ANOSIM: Globales R = 0,413; P = 0,001): Alle drei Arten der Cercopidae werden rechts der roten Linie angeordnet. Des Weiteren trennen sich Männchen und Weibchen der beiden *Cercopis*-Arten in separate Gruppen (ANOSIM: Globales R = 0,83; P = 0,001): Weibchen unterhalb (bis auf einen Ausreißer) und Männchen oberhalb der Linie. Die ANOSIM (Tab. 4) bestätigte diese aus der Ordination visuell gewonnen Erkenntnisse und ergab signifikante Unterschiede für beide Geschlechter der *Cercopis*-Arten und keine signifikanten Unterschiede innerhalb eines Geschlechts. Bei *Haematoloma dorsatum*, der dritten untersuchten Art der Cercopidae, zeigt sich diese Männchen-Weibchen-Auftrennung nicht, sie werden gemeinsam unterhalb der Linie angeordnet. Bis auf ein Weibchen von *Centrotus cornutus* werden alle übrigen Proben links der Linie angeordnet. Bemerkenswert ist, dass sich das Phänomen der Männchen-Weibchen-Trennung auch bei den Proben der Feldgrille (*Gryllus bimaculatus*), die als Vergleich durchgeführt wurden, wiederholt. Die Weibchen der Feldgrille werden oberhalb und die Männchen unterhalb der Linie gruppiert, allerdings ergab die ANOSIM, dass dieser Unterschied im Gegensatz zu den beiden *Cercopis*-Arten statistisch nicht signifikant ist. Es sei noch darauf hingewiesen, dass sich die vor den Proben durchgeführten Spritzenleerläufe alle zu einer Gruppe nahe Null beider Dimensionen zusammenfügen. Diese Leerläufe unterscheiden sich von allen anderen Probenanalysen signifikant (Tab. 4). Die Ähnlichkeitsanalyse wurde mit mehreren verschiedenen Stichprobengrößen ( $m$ ) durchgeführt, die Werte wurden zwischen  $m = 1$  und  $m = 11396$  (Minimum Probensumme) ausgewählt. Bei einer Stichprobengröße von  $m = 2858$  wird ein äquivalenter Wert für Kendall's  $\tau$  zwischen CNESS ( $m = 1$ ) und CNESS ( $m = 11396$ ) erreicht: Kendall's  $\tau$  zwischen CNESS ( $m = 1$ ) und CNESS ( $m = 2858$ ) ist 0,644, und zwischen CNESS ( $m = 11396$ ) und CNESS ( $m = 2858$ ) ist  $\tau$

Tab. 4: ANOSIM (mit 1000 Zufallswiederholungen) verschiedener Hämolymp-Proben von Zikadenarten und *Gryllus bimaculatus*, basierend auf dem CNESS-Unähnlichkeitsindex der TICs mit  $m = 1$ ,  $m = 2858$  ( $m_{\text{optimal}}$ ) und  $m = 9999$  ( $m_{\text{max-1397}}$ ; maximal berechenbares  $m$  mit Compah96). Signifikante Ergebnisse nach FDR-Korrektur von  $p < 0,05$  sind fett dargestellt.

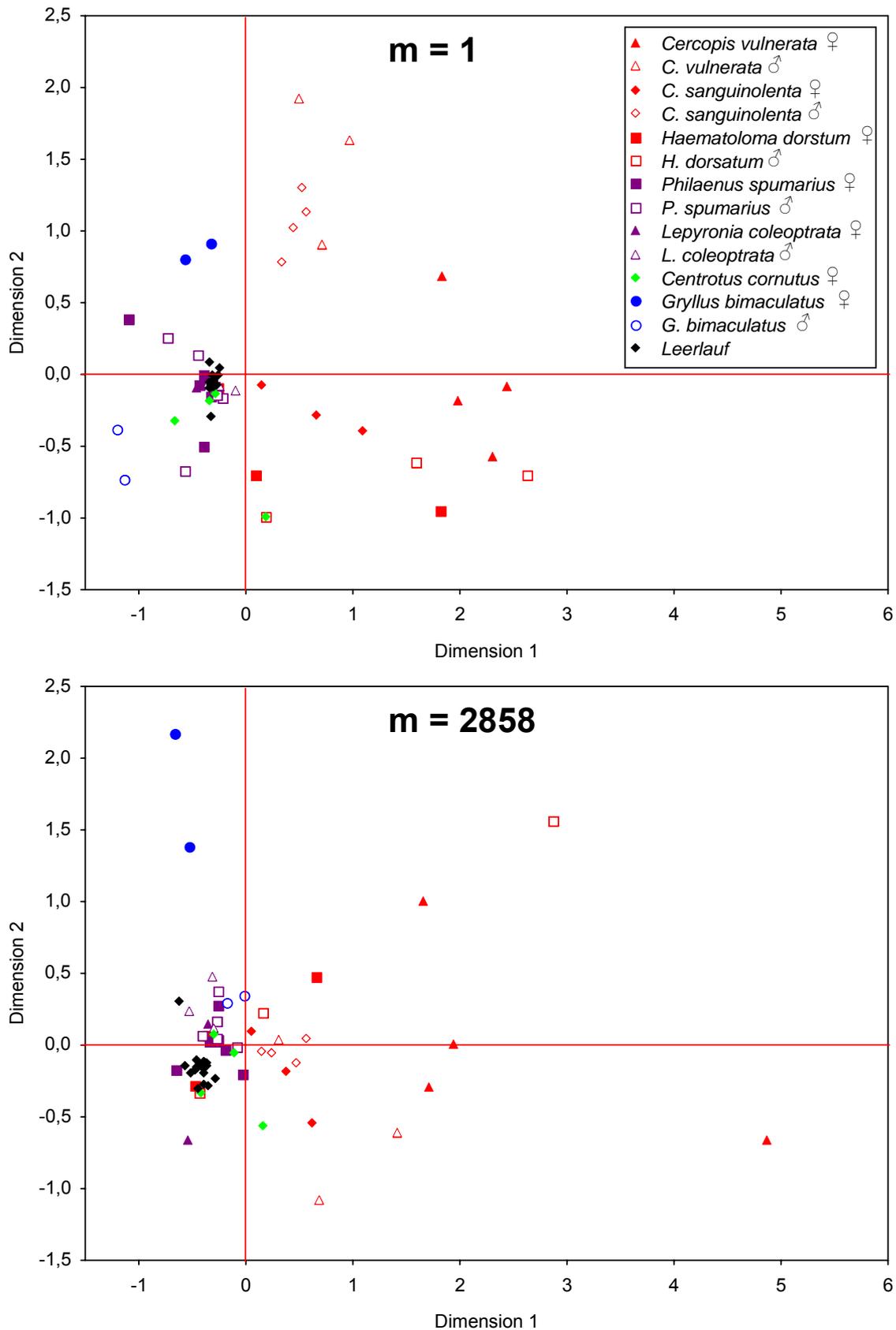
Gruppen	$m$ Wert	R	P	korr. $\alpha$
Cercopiden vs. alle übrigen beprobten Zikadenarten	1	0,53	<b>0,001</b>	<b>0,033</b>
	2858	0,305	<b>0,001</b>	<b>0,033</b>
	9999	0,17	<b>0,001</b>	<b>0,033</b>
<i>C. vulnerata</i> ♂ vs. ♀	1	0,82	<b>0,029</b>	<b>0,036</b>
	2858	0,20	0,171	0,015
	9999	0,19	0,2	0,19
<i>C. sanguinolenta</i> ♂ vs. ♀	1	0,96	<b>0,029</b>	<b>0,034</b>
	2858	0,39	0,057	0,028
	9999	0,04	0,486	0,008
<i>C. vulnerata</i> ♂ vs. <i>C. sanguinolenta</i> ♂	1	0,09	0,257	0,012
	2858	0,42	<b>0,029</b>	<b>0,034</b>
	9999	0,36	0,09	0,029
<i>C. vulnerata</i> ♀ vs. <i>C. sanguinolenta</i> ♀	1	0,56	0,057	0,029
	2858	0,43	0,054	0,029
	9999	0,37	0,086	0,029
<i>Haematoloma dorsatum</i> ♂ vs. ♀	1	- 0,22	0,9	0,001
	2858	- 0,167	0,9	0,0005
	9999	-0,185	1	0,0008
<i>G. bimaculatus</i> ♂ vs. ♀	1	1	0,333	0,008
	2858	1	0,333	0,006
	9999	0,5	0,333	0,012
Spritzenleerläufe vs. jeden Probenlauf	1	> 0,78	< <b>0,003</b>	< <b>0,049</b>
	2858	> 0,78	< <b>0,003</b>	< <b>0,049</b>
	9999	> 0,7	< <b>0,012</b>	< <b>0,049</b>

### 3 Ergebnisse

ebenfalls 0,644. In Bild 8 (unten) ist die Ordination von CNESS ( $m = 2858$ ) zu sehen, die *Cercopis*-Arten trennen sich noch immer sehr gut von den übrigen Proben (ANOSIM: Globales  $R = 0,389$ ;  $P < 0,001$ ; Cercopiden vs. restliche Arten mit FDR-Korrektur:  $R = 0,53$ ;  $P < 0,033$ ), aber Unterschiede zwischen den Geschlechtern sind nicht mehr festzustellen (Tab. 4). Ab einer Stichprobengröße von  $m = 3000$  (nicht abgebildet) separieren sich die *Cercopis*-Arten nicht mehr so stark von den restlichen Proben (ANOSIM: Globales  $R = 0,376$ ;  $P < 0,001$ ; Cercopiden vs. restliche Arten mit FDR-Korrektur:  $R = 0,303$ ;  $P < 0,033$ ). Bei einer Probengröße von  $m = 9999$  (Bild 7) liegen fast alle Proben eng beieinander, es kommt nicht mehr zur Gruppierung von Proben einer Art, Unterschiede zwischen Arten sind nicht mehr so deutlich zu erkennen, aber die *Cercopis*-Arten unterscheiden sich noch immer signifikant von den restlichen Arten (ANOSIM: Globales  $R = 0,339$ ;  $P < 0,001$  Cercopiden vs. restliche Arten mit FDR-Korrektur:  $R = 0,17$ ;  $P < 0,033$ ). Mit dem Programm Compah96 konnte der CNESS für die minimale Probensumme ( $m = 11396$ ,  $m_{\max}$ ) nicht berechnet werden, da das Programm (Compah96) den CNESS nur bis zu einem maximalen  $m$ -Wert von 9999 berechnet; CNESS $m9999$  wurde stellvertretend für  $m_{\max}$  verwendet.



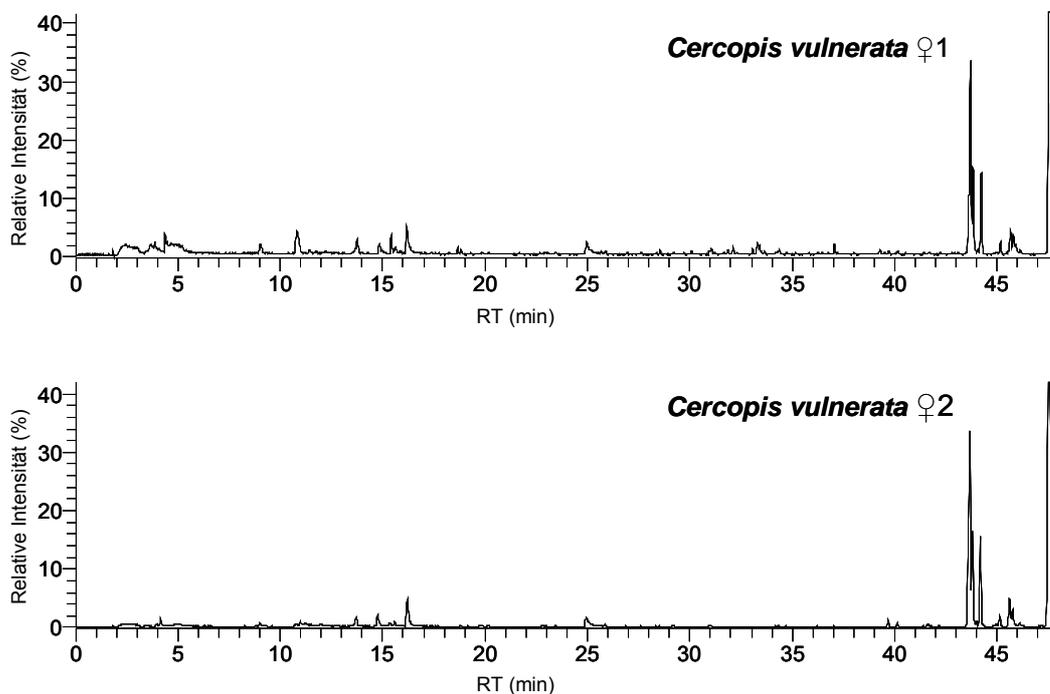
**Bild 7: Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) der 46 Hämolymp-Probenn von verschiedenen Zikadenarten und *Gryllus bimaculatus*, sowie 24 Spritzenleerläufe basierend auf CNESS $m9999$ -Unähnlichkeiten zwischen TICs; Stress = 0,09.**



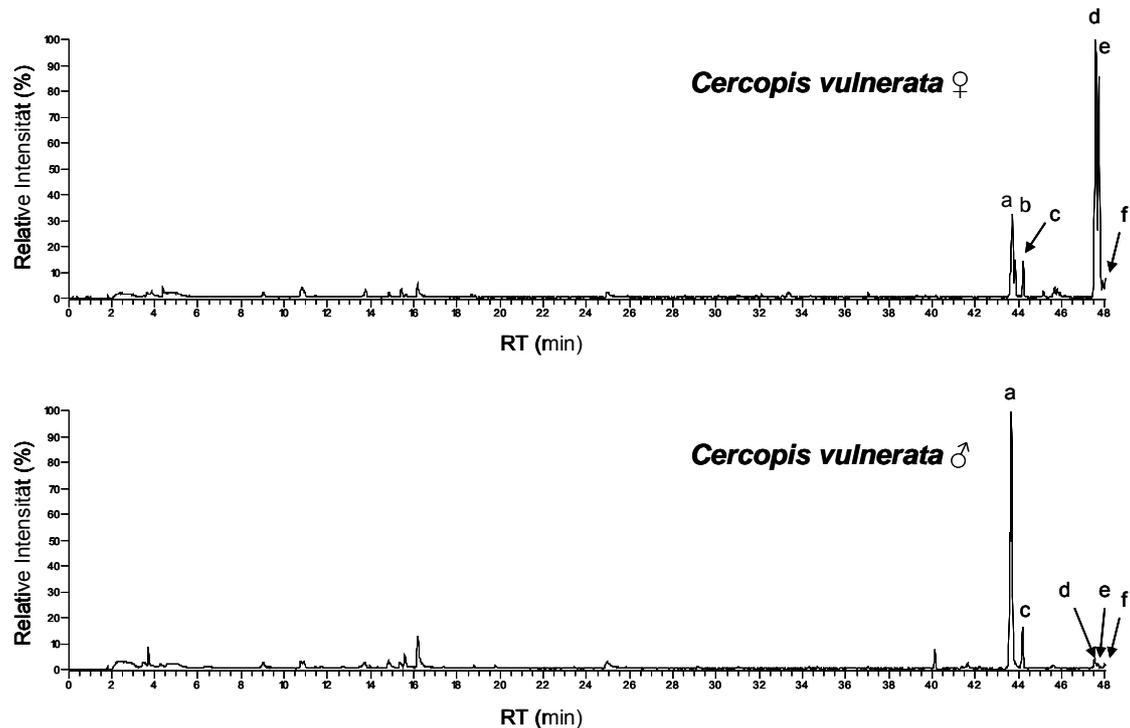
**Bild 8:** Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) der 46 Hämolymp-Proben von verschiedenen Zikadenarten und *Gryllus bimaculatus*, sowie 24 Spritzenleerläufe basierend auf CNESS $m_1$  (oben; Stress = 0,12) bzw. CNESS $m_{2858}$  (unten; Stress = 0,07)-Unähnlichkeiten zwischen TICs.

#### 3.2.2 Vergleich der Totalionenstromchromatogramme (TICs)

Die TICs der Hämolymp-Probenn zeigen eine hohe Übereinstimmung bei Proben derselben Art und desselben Geschlechts. Dieses ist beispielhaft für zwei Weibchen der Art *Cercopis vulnerata* in Bild 9 dargestellt. Proben unterschiedlicher Arten unterschieden sich hingegen deutlich in ihren Chromatogrammen. Von drei unterschiedlichen Arten sind in Bild 11 die Chromatogramme zu sehen. Intraspezifisch sind Unterschiede zwischen den Geschlechtern festzustellen. Wie in Bild 10 ersichtlich unterscheiden sich die TICs beider Geschlechter derselben Art. Bei dieser Art (*C. vulnerata*) beruhen die Unterschiede überwiegend auf den Hauptkomponenten des TICs, die am Ende der Chromatogramme zu sehen sind (RT > 43 min). Dabei handelt es sich um langkettige Kohlenwasserstoffe. Diese konnten durch Hydrierung als Alkene bestimmt werden (Anhang 3). In den Hämolymp-Probenn der Weibchen dominierten zwei Alkene mit einer Kettenlänge von 25 C-Atomen, die bei den Männchen nur in geringen Mengen vorhanden waren. In Tab. 5 sind die Hämolymp-Kohlenwasserstoffe von *C. vulnerata* mit zugehörigem Kovats-Index und dem relativen Anteil, bezogen auf den höchsten Peak, aufgelistet.



**Bild 9: TICs zweier Individuen von *Cercopis vulnerata*-Weibchen.**



**Bild 10:** TICs von Weibchen und Männchen von *Cercopis vulnerata*. Kohlenwasserstoffe-Peaks sind von "a" bis "f" markiert, die Buchstaben bezeichnen die in Tab. 5 angegebenen Substanzen.

**Tab. 5:** Ungesättigte und gesättigte Kohlenwasserstoffe in den Hämolymp-Analysen von *Cercopis vulnerata*. RT: Retentionszeit; RI: Kovats-Retentions-Index; Relative Intensität der Substanz, bezogen auf den höchsten Peak im Chromatogramm.

Substanz	RT	RI	Relative Intensität [%]	
			Weibchen	Männchen
<b>a:</b> unbekanntes Trikosen (C <sub>23</sub> )	43,70	2267	33	100
<b>b:</b> unbekanntes Trikosen (C <sub>23</sub> )	43,82	2273	15	0
<b>c:</b> Trikosan (C <sub>23</sub> )	44,20	2292	14	20
<b>d:</b> unbekanntes Pentakosen (C <sub>25</sub> )	47,57	2471	100	5
<b>e:</b> unbekanntes Pentakosen (C <sub>25</sub> )	47,72	2480	85	3
<b>f:</b> Pentakosan (C <sub>25</sub> )	48,00	2497	10	2

### 3 Ergebnisse

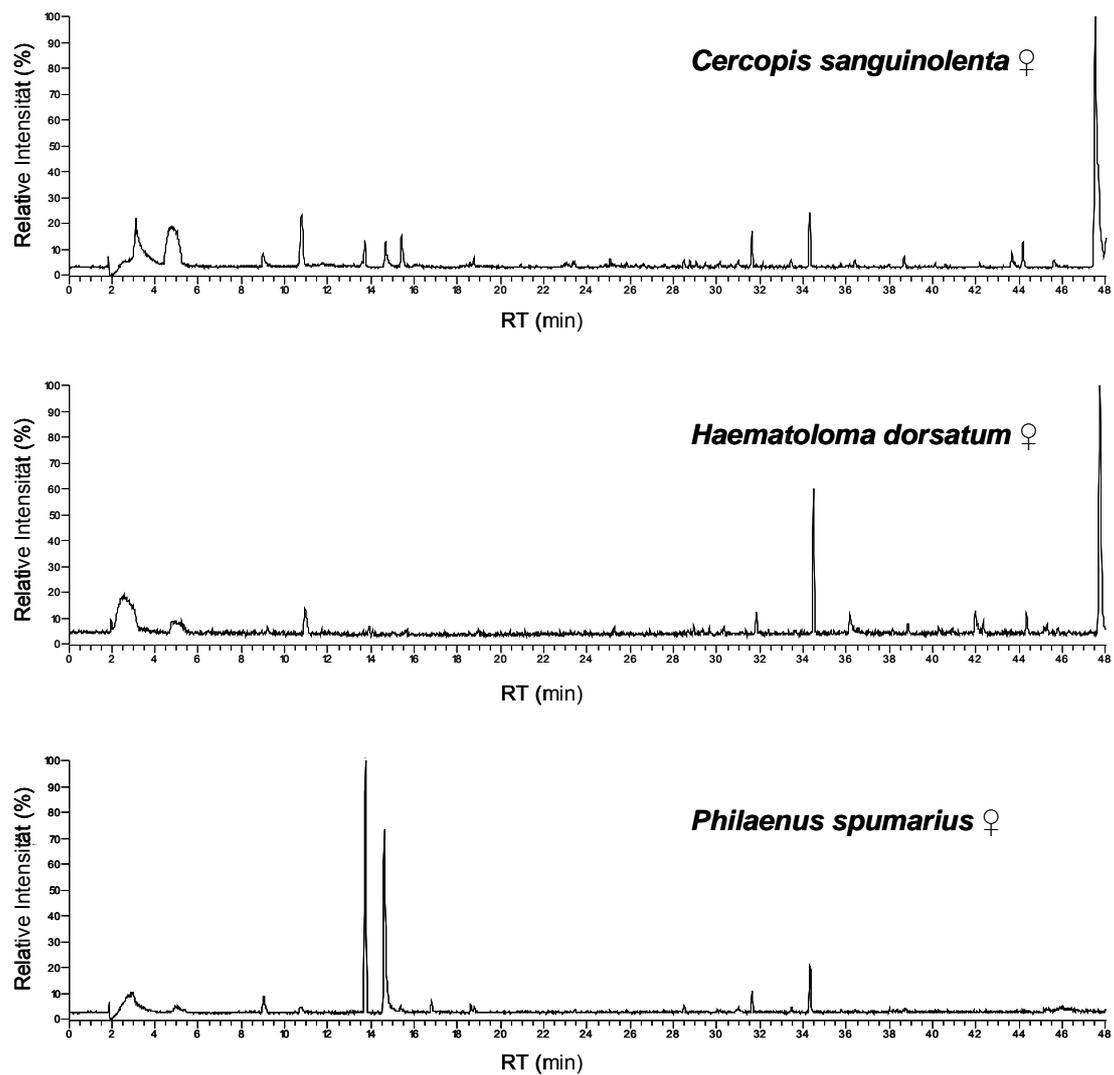
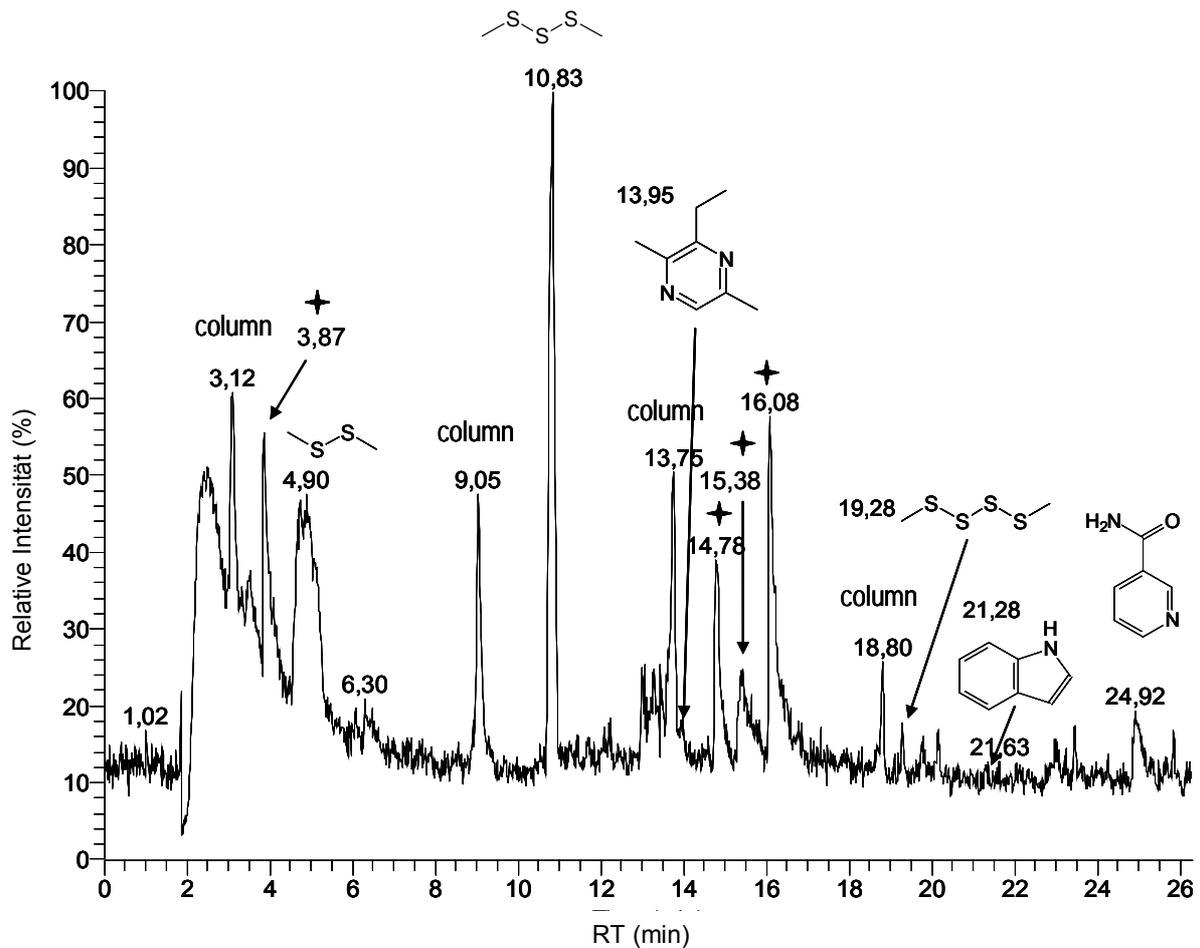


Bild 11: TICs dreier unterschiedlicher Zikadenarten.

#### 3.2.3 Identifizierung einiger flüchtiger Inhaltsstoffe

In der Hämolymphe von *C. vulnerata* konnten fünf mehr oder weniger leichtflüchtige biologisch interessante Substanzen nachgewiesen werden. In Bild 12 ist das Chromatogramm einer solchen Hämolymphe-Probe von RT 0-26 min zu sehen. Eine Reihe von Peaks dieses TICs ging auf abgelöste GC-Säulenbeschichtung zurück, welche eine Folge des Wassereintrags mit der Probe war (Säulenpeak: column). Die Substanzen, die in diesem Bereich zweifelsfrei durch Vergleich mit der authentischen Substanz (Retentionszeit und Massenspektrum) identifiziert werden konnten, sind in der Grafik über dem Peak mit ihren Strukturformeln abgebildet und werden im Folgenden in Reihenfolge der Eluierung von der Säule besprochen. Mehrere Alkylsulfide konnten nachgewiesen werden, wobei es sich um Dimethyldisulfid, Dimethyltrisulfid und Dimethyltetrasulfid handelte. Das **Dimethyldisulfid**



**Bild 12:** TIC einer Hämolymp-Probe von *Cercopis vulnerata* ♀ mit Strukturformeln der identifizierten Verbindungen über dem jeweiligen Peak (s. a. Bild 15, Bild 17, Bild 18, Bild 13, Bild 14 und Bild 16). Mit "column" wurden jene Peaks bezeichnet, bei denen es sich um Verbindungen der GC-Säulenbeschichtung handelte. Die mit einem Kreuz markierten Peaks konnten nicht identifiziert werden.

(2,3 Dithiobutan, **DMDS**,  $C_2H_6S_2$ , MW 94; Bild 13) ist dabei mit einer RT von 4,90 min das flüchtigste dieser Sulfide, es eluierte bei einer Temperatur von 63 °C von der GC-Säule. Zu dieser sehr frühen RT kam bei den Analysen allerdings zeitgleich ein hoher und breiter Säulenpeak, was eine saubere chromatographische Darstellung des DMDS verhinderte. Der höchste Peak innerhalb der flüchtigen Komponenten aus den Hämolymp-Proben bis zu einer RT von 43 min war meist **Dimethyltrisulfid** (2,3,4 Trithiopentan, **DMTS**,  $C_2H_6S_3$ , MW 126; Bild 14), es hatte beim verwendeten Temperaturprogramm eine RT von 10,83 min, was einer Säulentemperatur von 94 °C entspricht. Dieses Sulfid ließ sich mit dem verwendeten Temperaturprogramm im Gegensatz zu dem DMDS sauber chromatographisch darstellen. Das **3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin** ( $C_8H_{12}N_2$ , MW 136; Bild 15) hat bei dem gewählten Temperaturprogramm (40/5/280) eine Retentionszeit von 13,95 min, was einer Säulentemperatur von 110 °C entspricht. Das **Dimethyltetrasulfid** (2,3,4,5 Tetrathiohexan,

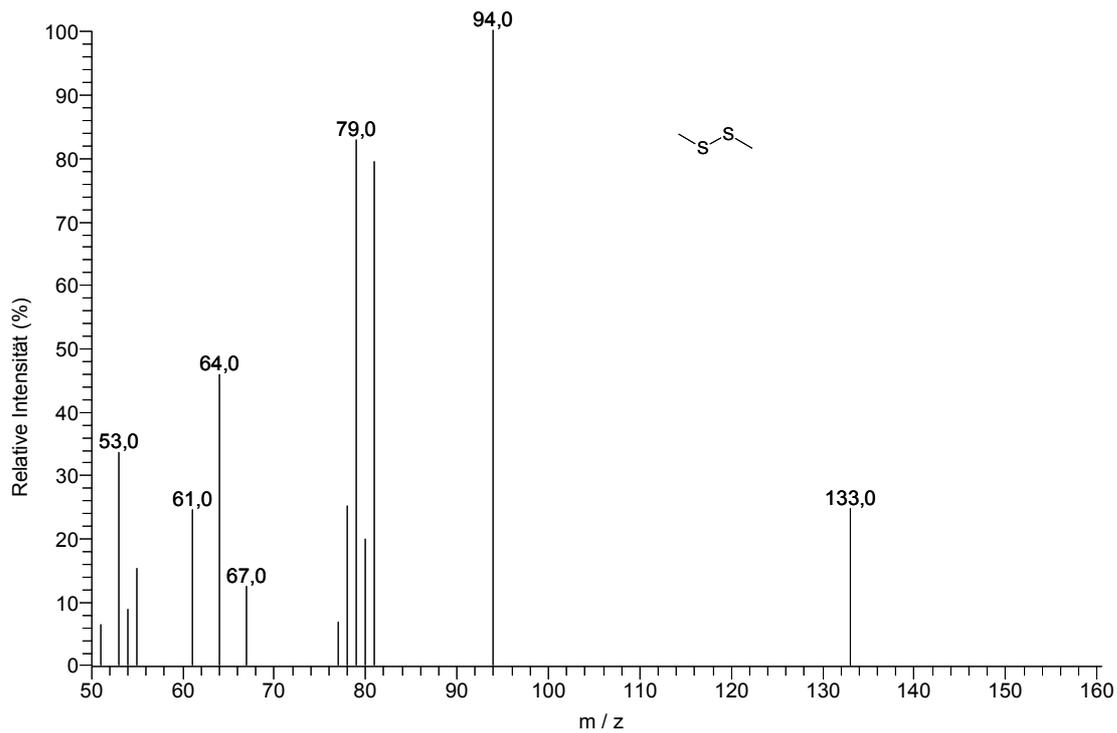
### 3 Ergebnisse

---

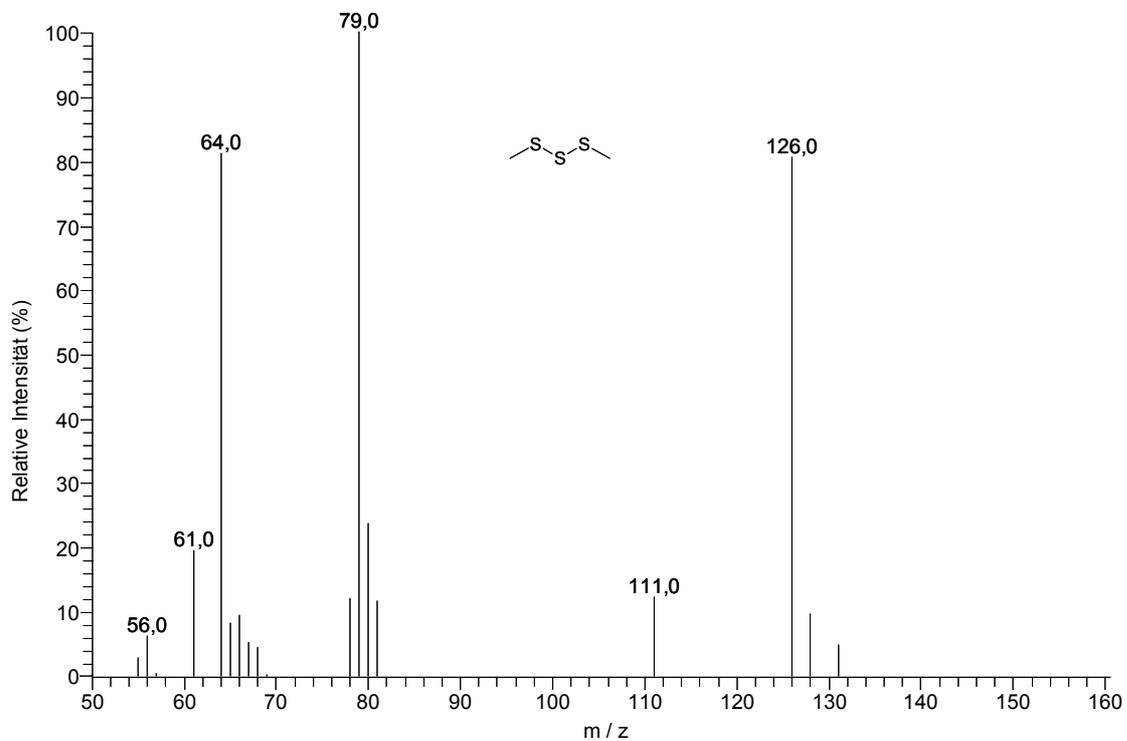
**DMTetS**,  $C_2H_6S_4$ , MW 158; Bild 16) ist mit einer RT von 19,28 min das am wenigsten flüchtige innerhalb dieser leichtflüchtigen Sulfide, es eluierte bei einer Temperatur von 136 °C von der GC-Säule. Das EI-Massenspektrum, welches das verwendete GC-MS von dieser Substanz lieferte, unterscheidet sich von dem in der NIST angegebenen dadurch, dass die charakteristische Masse 158 fehlte. Auch bei dem authentischen DMTetS lieferte das MS diese Masse nicht (Anhang 1). Ein weiterer leichtflüchtiger in der Hämolymphe identifizierter Stoff ist das **Indol** ( $C_8H_7N$ , MW 117, Bild 17). Es hat eine RT von 21,28 min, was einer Säulentemperatur von 146 °C entspricht. Eine weitere identifizierte Substanz ist das **Niacinamid** ( $C_6H_6N_2O$ , MW 122; Bild 18), das Vitamin B3, welches bei einer RT von 24,92 min oder 165 °C von der GC-Säule kommt.

Einige Peaks konnten nicht identifiziert werden, da deren EI-Massenspektren wenige Massen aufwiesen und zudem wenig charakteristisch waren, oder es handelte sich um Substanzen, die einmalig in einem Lauf auftraten. In Bild 12 sind diese Peaks mit einem Kreuz markiert, die Spektren sind im Anhang 2 abgebildet.

Die eben besprochenen Inhaltsstoffe von *C. vulnerata* konnten teilweise auch bei den anderen untersuchten Arten festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefasst.

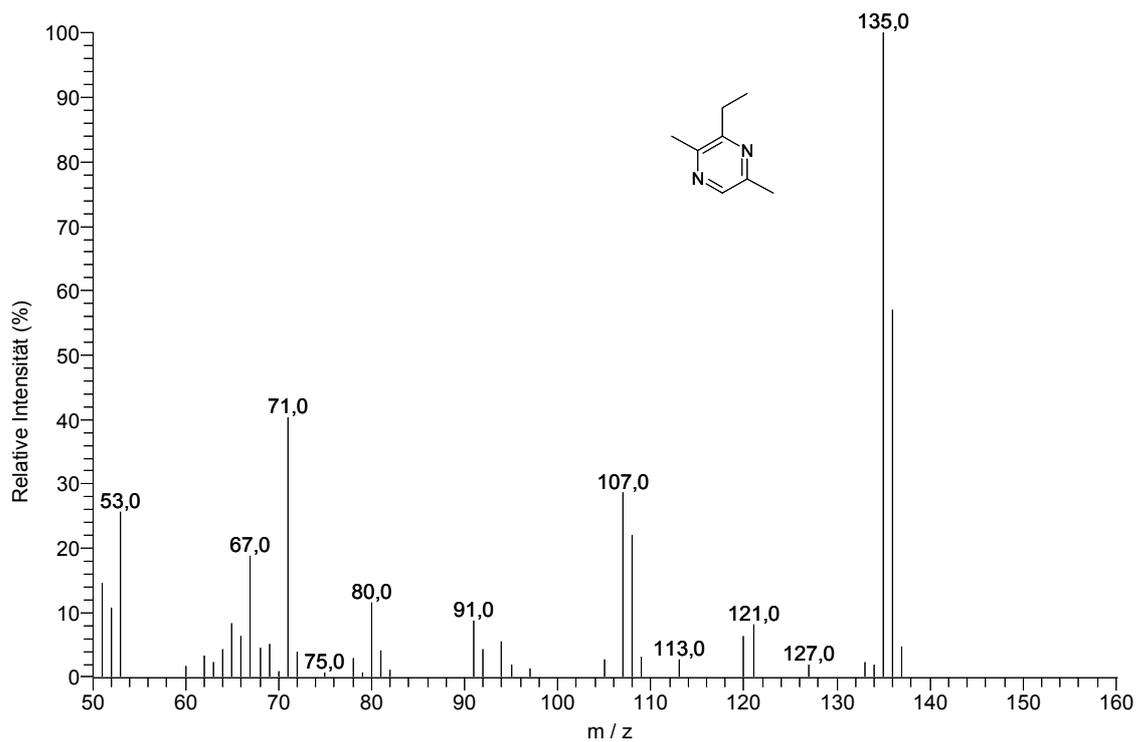


**Bild 13:** EI-Massenspektrum von Dimethyldisulfid (DMS) aus *Cercopis vulnerata*. Das Spektrum stammt aus dem TIC in Bild 12, RT: 4,90 min.

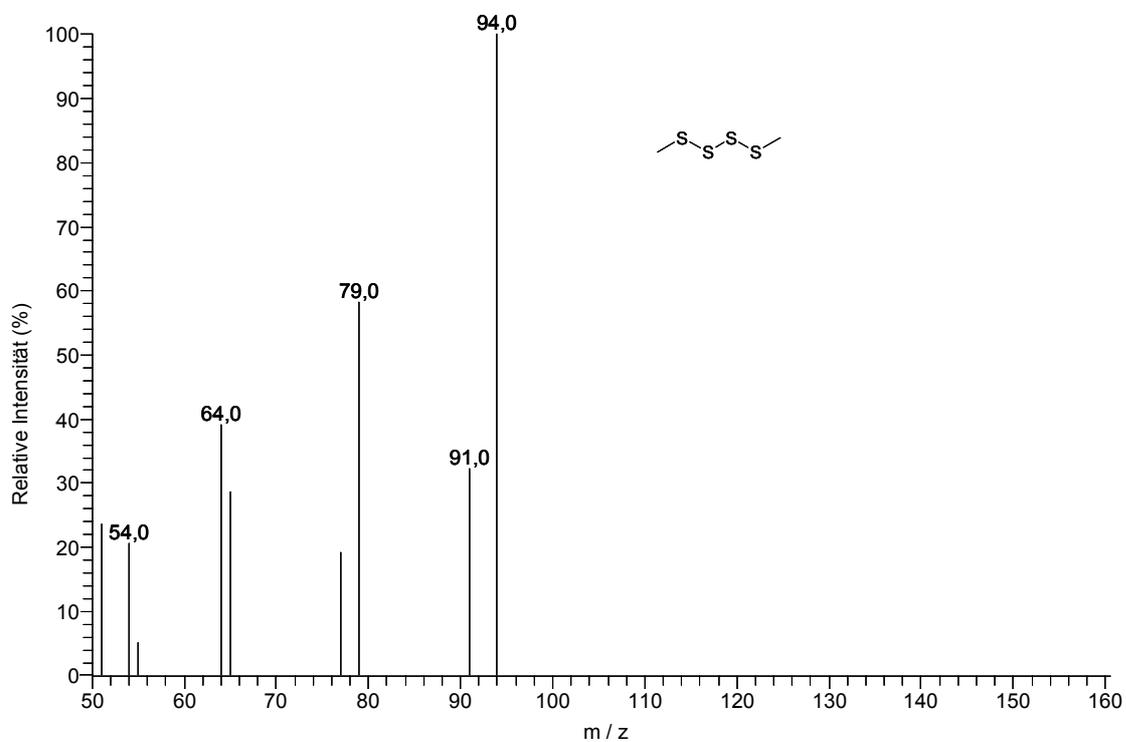


**Bild 14:** EI-Massenspektrum von Dimethyltrisulfid (DMTS) aus *Cercopis vulnerata*. Das Spektrum stammt aus dem TIC in Bild 12, RT: 10,83 min.

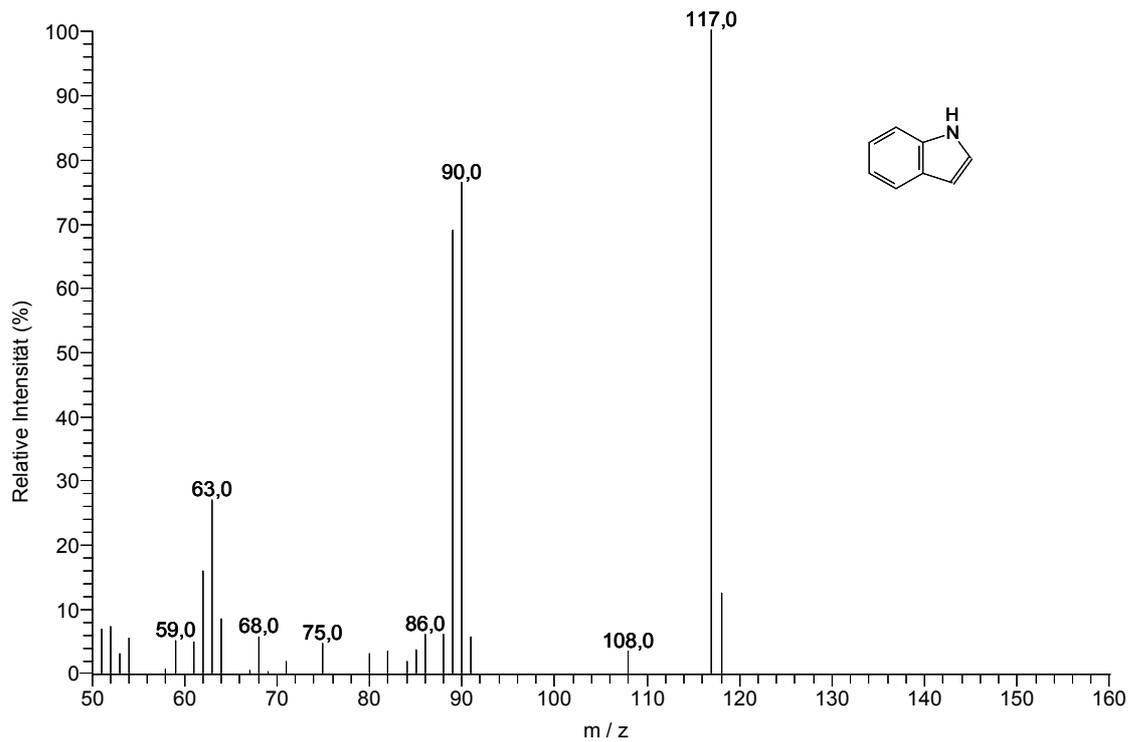
### 3 Ergebnisse



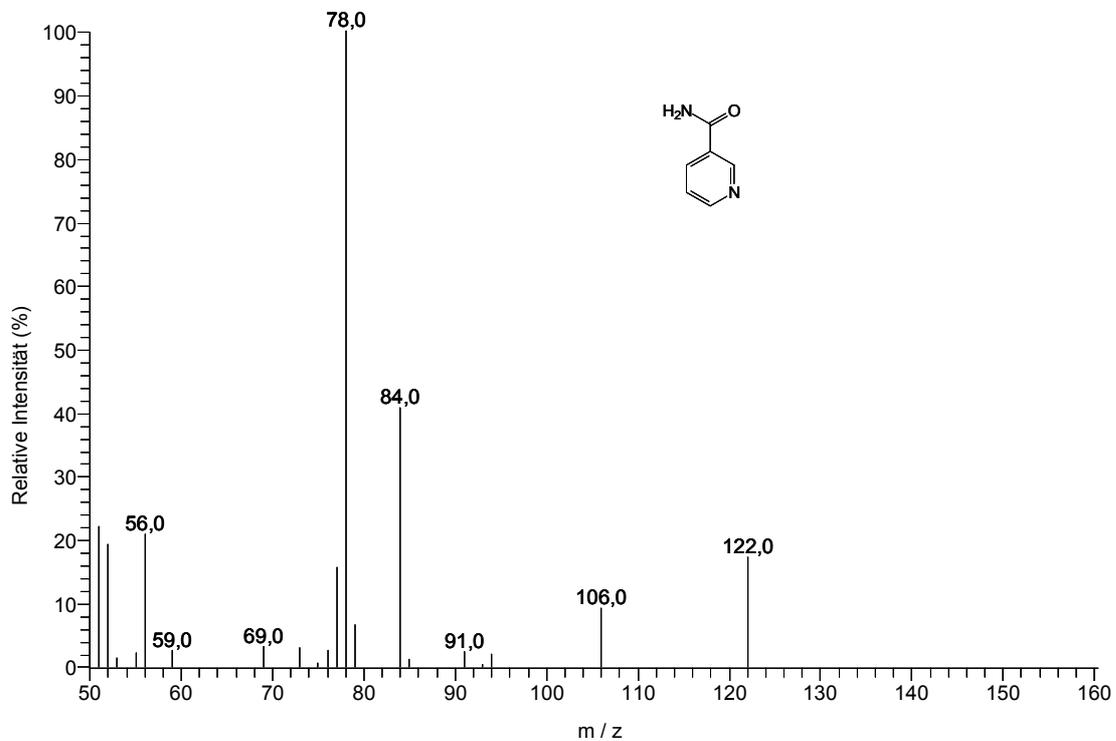
**Bild 15:** EI-Massenspektrum von 3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin aus *Cercopis vulnerata*. Das Spektrum stammt aus dem TIC in Bild 12, RT: 13,95 min.



**Bild 16:** EI-Massenspektrum von Dimethyltetrasulfid (DMTetS) aus *Cercopis vulnerata*. Das Spektrum stammt aus dem TIC in Bild 12, RT: 19,28 min.



**Bild 17:** EI-Massenspektrum von Indol aus *Cercopis vulnerata*. Das Spektrum stammt aus dem TIC in Bild 12, RT: 21,28 min.



**Bild 18:** EI-Massenspektrum von Niacinamid aus *Cercopis vulnerata*. Das Spektrum stammt aus dem TIC in Bild 12, RT: 24,92 min.

### 3 Ergebnisse

Tab. 6: Identifizierte Hämolymp-Inhaltsstoffe bei den untersuchten Arten der Cercopidae (*Cercopis vulnerata*, *C. sanguinolenta*, *Haematoloma dorsatum*), der Aphrophoridae (*Philaenus spumarius*, *Lepyronia coleoptrata*), einer Art der Membracidae (*Centrotus cornutus*) und einer Art der Ensifera (Gryllidae: *Gryllus bimaculatus*). Die Befunde sind folgendermaßen dargestellt: Anzahl der Individuen mit positivem Nachweis / beprobte Individuenanzahl (N); "+":  $x \geq 0,75$ ; "(+)":  $x \leq 0,75$ ; "-":  $x = 0$ .

Hämolymp Inhaltsstoffe	<i>Cercopis vulnerata</i>		<i>Cercopis sanguinolenta</i>		<i>Haematoloma dorsatum</i>		<i>Philaenus spumarius</i>		<i>Lepyronia coleoptrata</i>		<i>Centrotus cornutus</i>	<i>Gryllus bimaculatus</i>	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♀	♂	♀
N:	3	4	4	3	3	3	5	6	3	2	4	2	2
Pyrazin <sup>1</sup>	+	+	-	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-	(+)	-	-
Indol	+	+	(+)	+	+	(+)	(+)	(+)	-	-	(+)	-	-
Niacinamid	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)
DMDS	+	+	+	(+)	+	+	(+)	(+)	-	-	-	-	-
DMTS	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	-	(+)	(+)	-	-
DMTetS	(+)	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>:3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin

### 3.3 Antibiotikum-Behandlung

Insgesamt haben 40 behandelte und 57 unbehandelte Individuen von *Cercopis vulnerata* bis zum Ende des Experiments überlebt. Bei allen mit Antibiotikum behandelten Tieren wurde deren Gehalt an DMDS, DMTS und DMTetS bestimmt; eine Probe konnte aufgrund eines Defekts am GC nicht weiter verwendet werden und ging nicht in die folgende Auswertung mit ein. Von den Kontrolltieren wurden 43 analysiert. Die direkte Eingabe der Hämolymphe in

den Injektor des GCs bedingte einen breiten Peak zur Retentionszeit von DMDS, auch durch Veränderung des Temperatur-Programms ließ sich keine saubere chromatographische Trennung erreichen. Hierdurch sind die gemessenen Konzentrationen an DMDS mit einem sehr hohen Fehler behaftet und sollen deswegen nicht weiter berücksichtigt werden. Die beiden anderen Alkylsulfide werden im Folgenden einzeln besprochen.

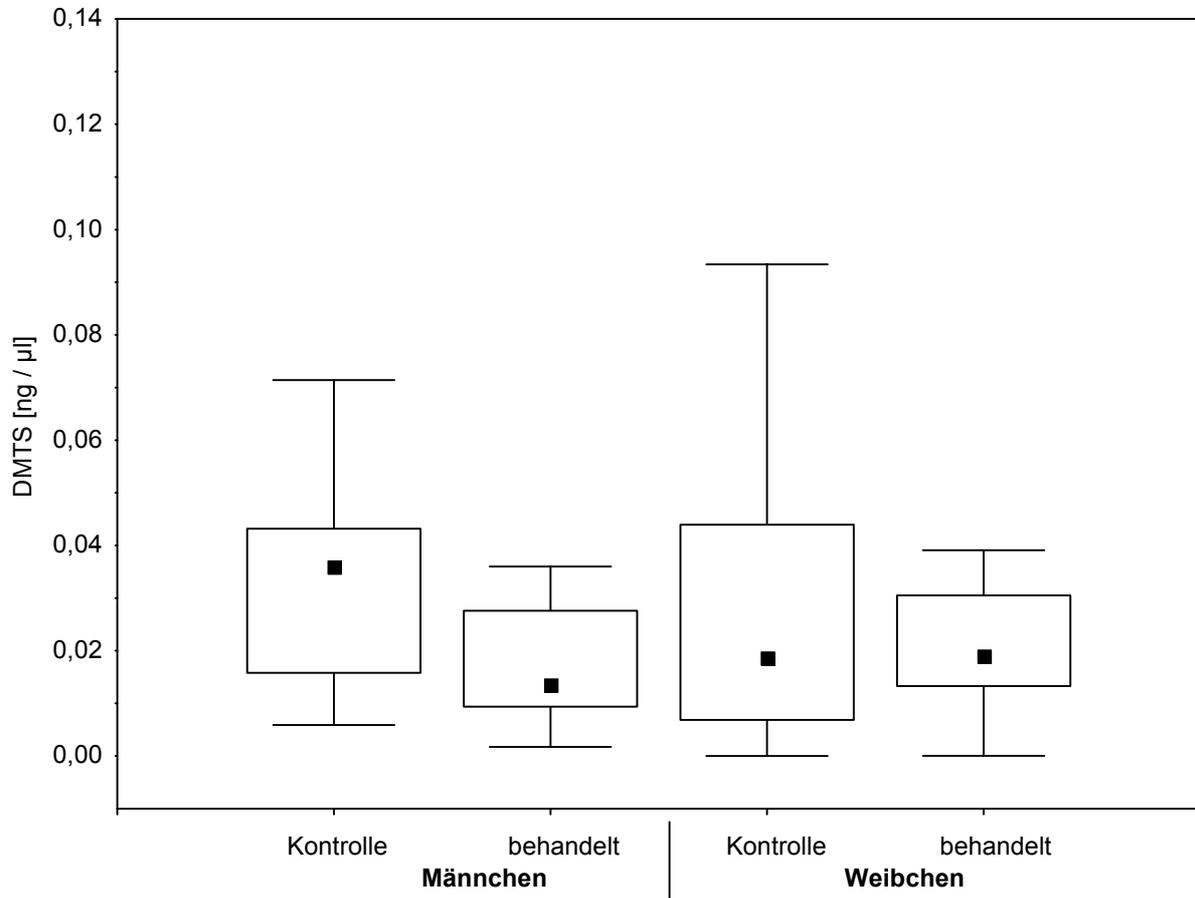
#### 3.3.1 Dimethyltrisulfid (DMTS)

Der Median der Konzentration an DMTS in Kontroll- und behandelten Tieren betrug 0,020 (Quartile: 0,010 - 0,040) ng/µl Hämolymphe. Da es sich bei den gemessenen Konzentrationen nicht um normalverteilte Werte handelte, wurden sie für die weitere statistische Auswertung transformiert ( $\sqrt{x}$ ). Um aus den Bildern die Konzentrationen direkt ablesen zu können, wurden hier die Originaldaten verwendet. In Bild 19 sind die Ergebnisse für die vier Gruppen (unbehandelt/behandelt \* Männchen/Weibchen) in einer Box-Whisker-Grafik dargestellt. Für die Hämolymphe-Proben der Männchen ist bei den behandelten Tieren ein niedrigerer Median der DMTS-Konzentration als bei den Kontrolltieren festzustellen: Männliche Kontrolltiere enthielten durchschnittlich 0,036 (Quartile: 0,016 – 0,043) ng DMTS/µl Hämolymphe und behandelte Männchen 0,013 (Quartile: 0,009 – 0,028) ng DMTS/µl Hämolymphe. Für die Weibchen lassen sich keine Unterschiede der Mediane feststellen: Beide Gruppen enthielten 0,019 (Quartile: 0,008 – 0,039) ng DMTS/µl Hämolymphe. Die durchgeführte zweifaktorielle ANCOVA (Tab. 7) ergab keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der DMTS-Konzentration zwischen behandelten und unbehandelten Tieren und auch nicht zwischen Männchen und Weibchen. Also sind die Unterschiede der Mediane bei den Männchen zwischen Kontroll- und behandelten Tieren ebenfalls nicht signifikant. Da die Versuchstiere unterschiedlich lange nach der Antibiotikum-Behandlung am Leben gelassen wurden (fünf bis zehn Tage) wurde dieser Effekt bei der ANCOVA mit der Kovariable ‚Tag‘ herausgerechnet. Hierbei zeigte sich ein hochsignifikanter Einfluss des Faktors ‚Tag‘ auf die DMTS-Werte (Tab. 7). Die mit verschiedenen Zwischeneffekten modellierte ANCOVA erbrachte ebenfalls keinerlei Signifikanz für die Faktoren ‚Behandlung‘ oder ‚Sex‘. Die Ergebnisse der ANCOVA rechtfertigten es, die Gruppen ‚Behandlung‘ und ‚Sex‘ zu poolen und gegen den signifikanten Faktor ‚Tag‘ aufzutragen.

Bild 20 zeigt die Korrelation der DMTS-Konzentration gegen die Zeitdauer (Faktor ‚Tag‘) des Experimentes. Es ist eine schwache negative Korrelation der DMTS-Konzentration mit der Zeit zu erkennen. Diese Korrelation ist mit einem  $P < 0,001$  hochsignifikant, was

### 3 Ergebnisse

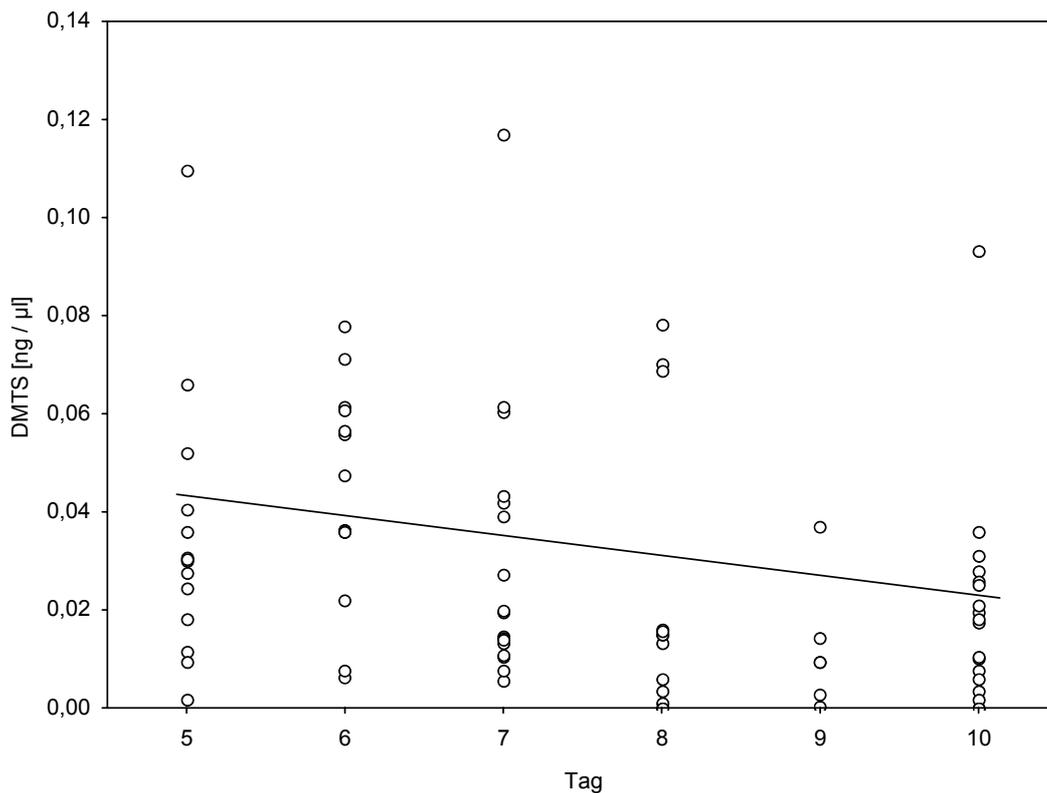
bedeutet, dass ein Zusammenhang zwischen den beiden Faktoren besteht, über die mögliche Größe des Zusammenhangs wird hierdurch aber nichts ausgesagt. Aus dem  $R_s^2$  ergibt sich, dass die DMTS-Konzentration zu 13% mit dem Faktor ‚Tag‘ erklärt werden kann.



**Bild 19:** Median, 25 % und 75 %-Perzentil (Säule) und Minimum / Maximum (Linien) der DMTS-Konzentration. Männchen: Kontrolle N = 15, behandelt N = 17; Weibchen: Kontrolle N = 28, behandelt N = 22.

**Tab. 7:** Ergebnisse der ANCOVA für die DMTS-Konzentration bei Tetracyclin-Behandlung. ‚Behandlung‘ als erster und ‚Sex‘ als zweiter Faktor; der ‚Tag‘, an dem die Tiere nach der Behandlung abgetötet wurden, ist Kovariable.

<b>Faktor</b>	<b>F</b>	<b>df</b>	<b>P</b>
Behandlung	1,817	1	0,182
Sex	0,317	1	0,575
Tag	11,441	1	<b>0,001</b>
Fehler		77	

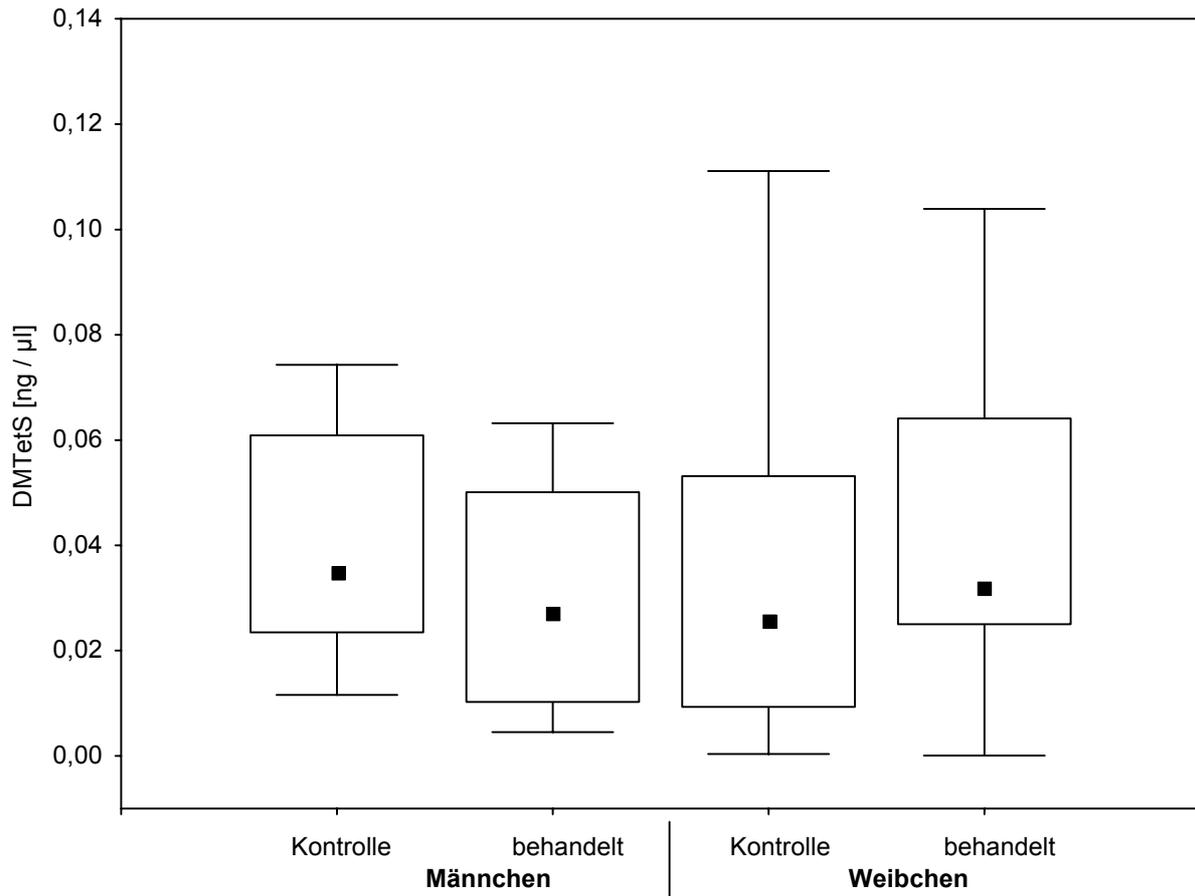


**Bild 20.** DMTS-Konzentration in Abhängigkeit vom Zeitpunkt (‚Tag‘), an welchem die Tiere (gesamt) aus dem Experiment herausgenommen und abgetötet wurden. Spearmans  $R_s = -0,364$ ;  $R_s^2 = 0,132$ ;  $P < 0,001$ ;  $N = 82$ .

### 3.3.2 Dimethyltetrasulfid (DMTetS)

Die Konzentration an DMTetS lag bei 0,030 (Median; Quartile: 0,013 – 0,059) ng/μl Hämolymphe. Die Darstellung der Ergebnisse in Bild 21 zeigt keine nennenswerten Unterschiede zwischen behandelten oder unbehandelten Tieren und auch nicht zwischen Männchen und Weibchen. Auch die nach  $\sqrt{x}$ -Transformation durchgeführte ANCOVA (Tab. 8) ergab keine Unterschiede für ‚Behandlung‘ oder ‚Sex‘, aber auch hier wirkte sich die Kovariable ‚Tag‘ hochsignifikant aus. Nach Zusammenlegung der Gruppen und einer Auftragung gegen den Faktor ‚Tag‘ zeigte sich, wie schon für die DMTS-Konzentration, auch hier eine schwache negative Korrelation der DMTetS-Konzentration mit der Zeit; dieser Zusammenhang war hochsignifikant (Bild 22). Die DMTetS-Konzentration ist zu 18% durch den Faktor ‚Tag‘ erklärbar.

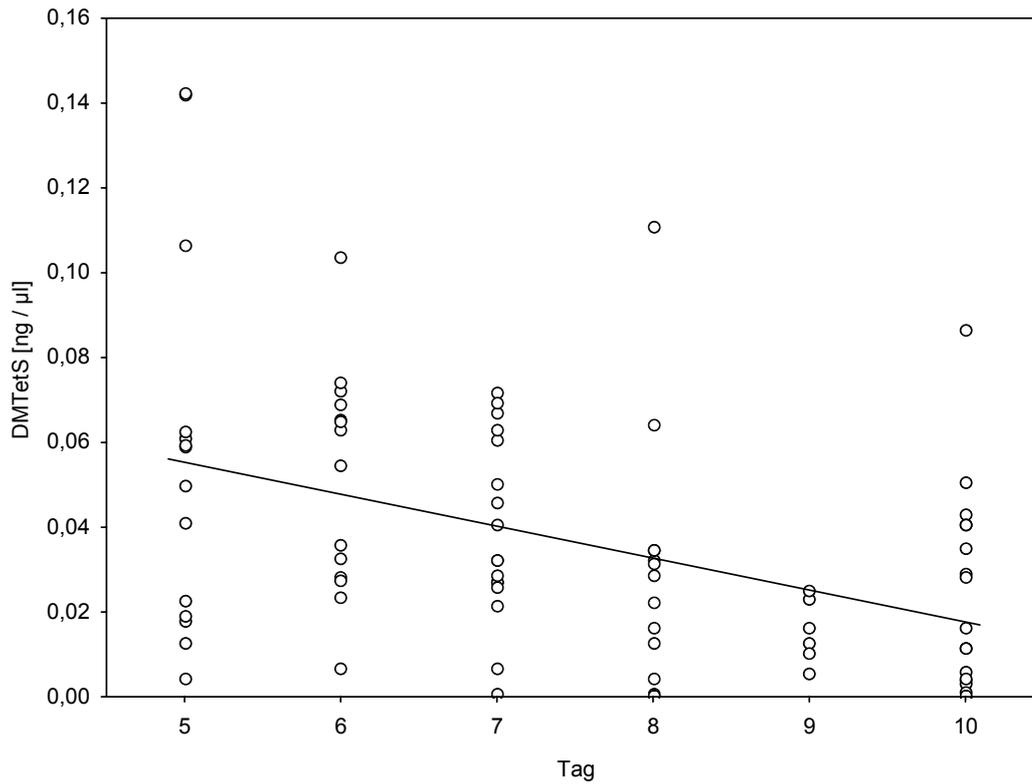
### 3 Ergebnisse



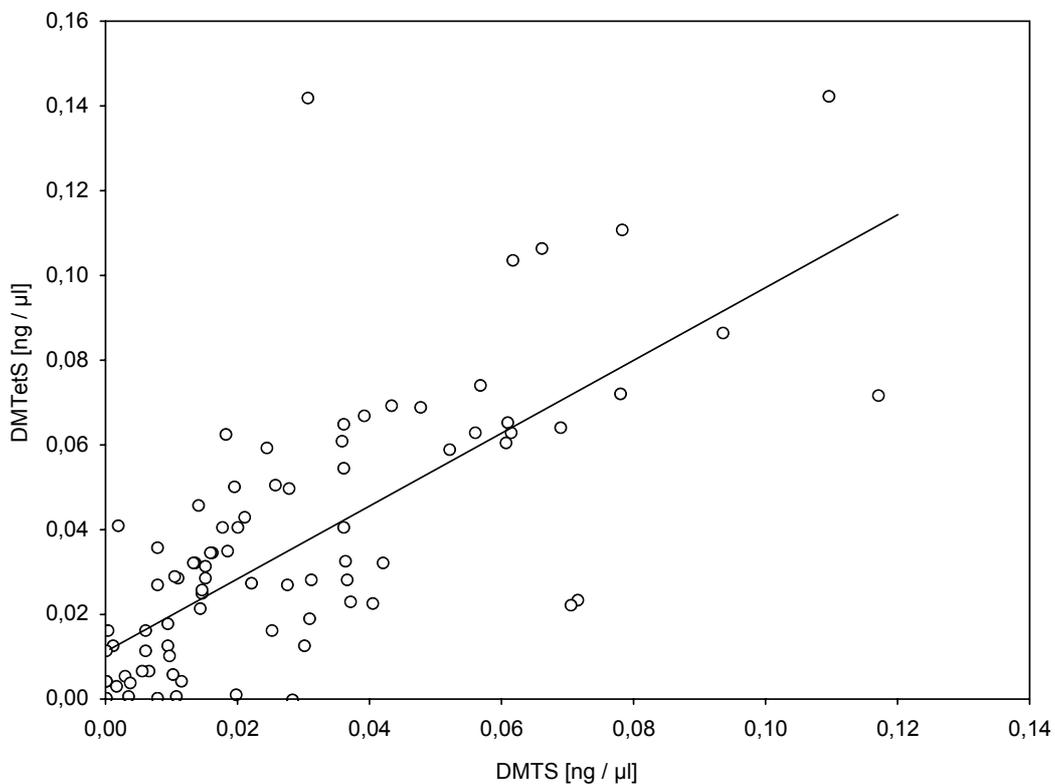
**Bild 21:** Median, 25 % und 75 %-Perzentil (Säule) und Minimum / Maximum (Linien) der DM TetS-Konzentration. Männchen: Kontrolle N = 15, behandelt N = 17; Weibchen: Kontrolle N = 28, behandelt N = 22.

**Tab. 8:** Ergebnisse der ANCOVA für die DM TetS-Konzentration bei Tetracyclin-Behandlung. ‚Behandlung‘ als erster und ‚Sex‘ als zweiter Faktor; der ‚Tag‘, an dem die Tiere nach der Behandlung abgetötet wurden ist Kovariable.

<b>Faktor</b>	<b>F</b>	<b>df</b>	<b>P</b>
Behandlung	0,137	1	0,711
Sex	2,129	1	0,149
Tag	21,014	1	<b>&lt; 0,001</b>
Fehler		77	



**Bild 22: Dimethyltetrasulfid (DM TetS)-Konzentration in Abhängigkeit vom Zeitpunkt (,Tag'), an welchem die Tiere (gesamt) aus dem Experiment herausgenommen und abgetötet wurden. Spearmans  $R_s = -0,424$ ;  $R_s^2 = 0,180$ ;  $P < 0,001$ ;  $N = 82$ .**



**Bild 23: Auftragung von DM TS- gegen DM TetS-Konzentration. Spearmans  $R_s = 0,725$ ;  $R_s^2 = 0,525$ ;  $P < 0,001$ ;  $N = 82$ .**

#### 3.3.3 DMTS vs. DMTetS

Zwischen den Mengen beider Alkylsulfide DMTS und DMTetS besteht ein positiver Zusammenhang (Bild 23). Mit steigender DMTS-Konzentration steigt auch die Konzentration an DMTetS, dieser Zusammenhang ist hochsignifikant. Die DMTetS-Konzentration kann zu 72% mit der Konzentration an DMTS erklärt werden und vice versa.

#### 3.3.4 Vermessung der Mycetome

Durch die Färbung mit Sudan-Rot konnten bei *Cercopis vulnerata* die paarig vorhandenen Mycetome lateral im Abdomen der Tiere identifiziert werden (Bild 24). Ohne diese Färbemethode kann nur das geübte Auge die Mycetome vom Fettkörper unterscheiden, da sich beide Organe in Färbung und Struktur äußerst ähnlich sind. Die Mycetome erstreckten sich in ihrer Länge maximal vom vierten bis hin zum achten Abdominalsegment.

Für die Varianzanalyse der Mycetomfläche war es nicht nötig, die Daten zu transformieren, da es sich um normalverteilte Werte handelte (Shapiro-Wilk, alle Gruppen  $P > 0,1$ ), die Varianzhomogenität wurde eingehalten (Levene's Test). Die Kovarianzanalyse (Tab. 9) der mit Antibiotikum behandelten Tiere und der Kontrolltiere erbrachte keinen Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen hinsichtlich ihrer Mycetomfläche. Auch die Einbeziehung des Faktors ‚Sex‘ ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Interessanterweise gab es einen hoch signifikanten Unterschied zwischen Männchen und Weibchen im Hinblick auf ihrer Mycetomfläche.

In Bild 25 sind die Ergebnisse für die Gruppen ‚Behandlung‘ und ‚Sex‘ in einem Säulendiagramm dargestellt. Deutlich ist zu sehen, dass sich die Behandlungsgruppen innerhalb der Geschlechter nicht stark voneinander unterscheiden, die Unterschiede der Mittelwerte liegen im Bereich der Standardabweichung des Mittelwertes des dazugehörigen Pendantes der Gruppe ‚Behandlung‘. Die mittlere Mycetomfläche der Männchen liegt mit  $0,017 \pm 0,003\text{cm}^2$  (MW  $\pm$  SD) unter dem der Weibchen mit  $0,023 \pm 0,004\text{cm}^2$  (MW  $\pm$  SD).

Die ANCOVA (Tab. 9) erbrachte einen hochsignifikanten Einfluss des Faktor ‚Sex‘ und der Kovariable ‚Tag‘ auf die Mycetomfläche. Das signifikante Ergebnis für den Faktor ‚Sex‘ rechtfertigte, eine für beide Geschlechter separate ANCOVA durchzuführen. So konnte gezeigt werden, dass auch hier die Behandlung keinen signifikanten Einfluss auf die Myce-

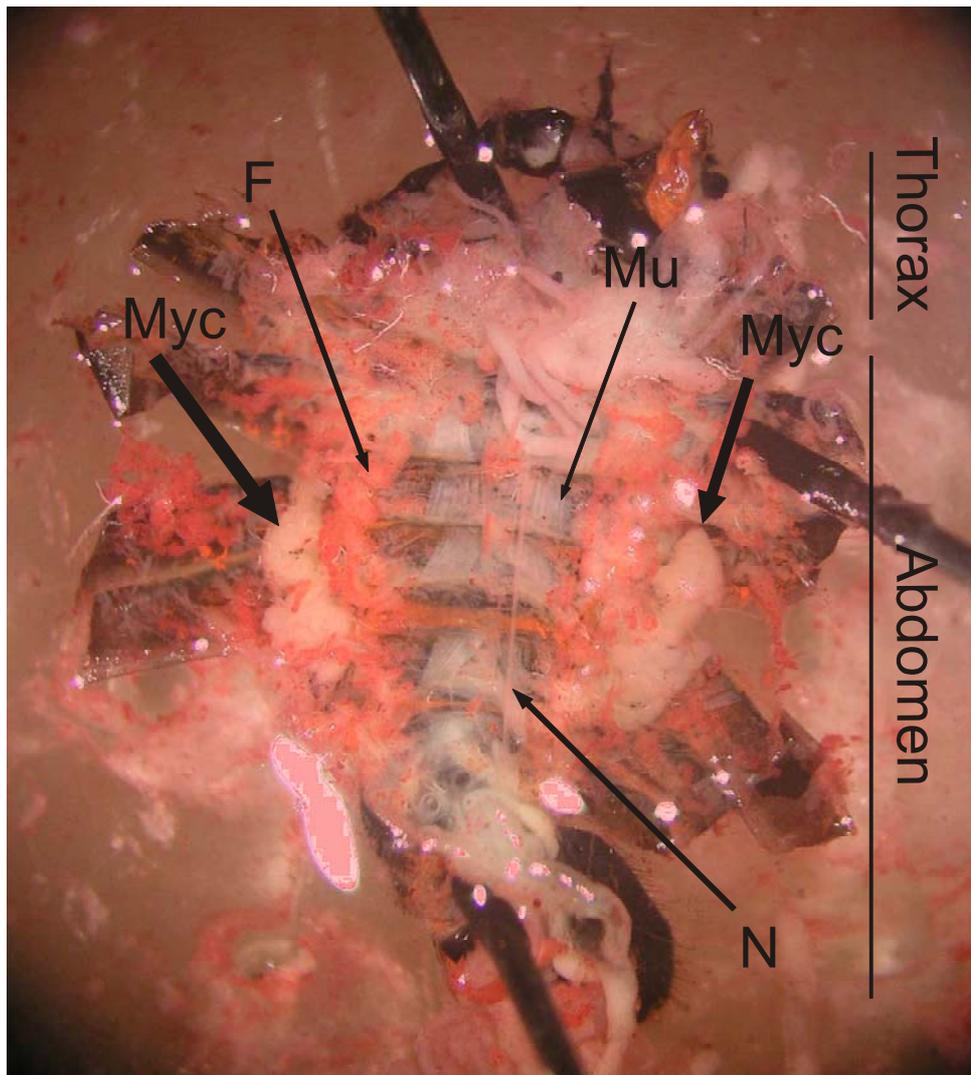
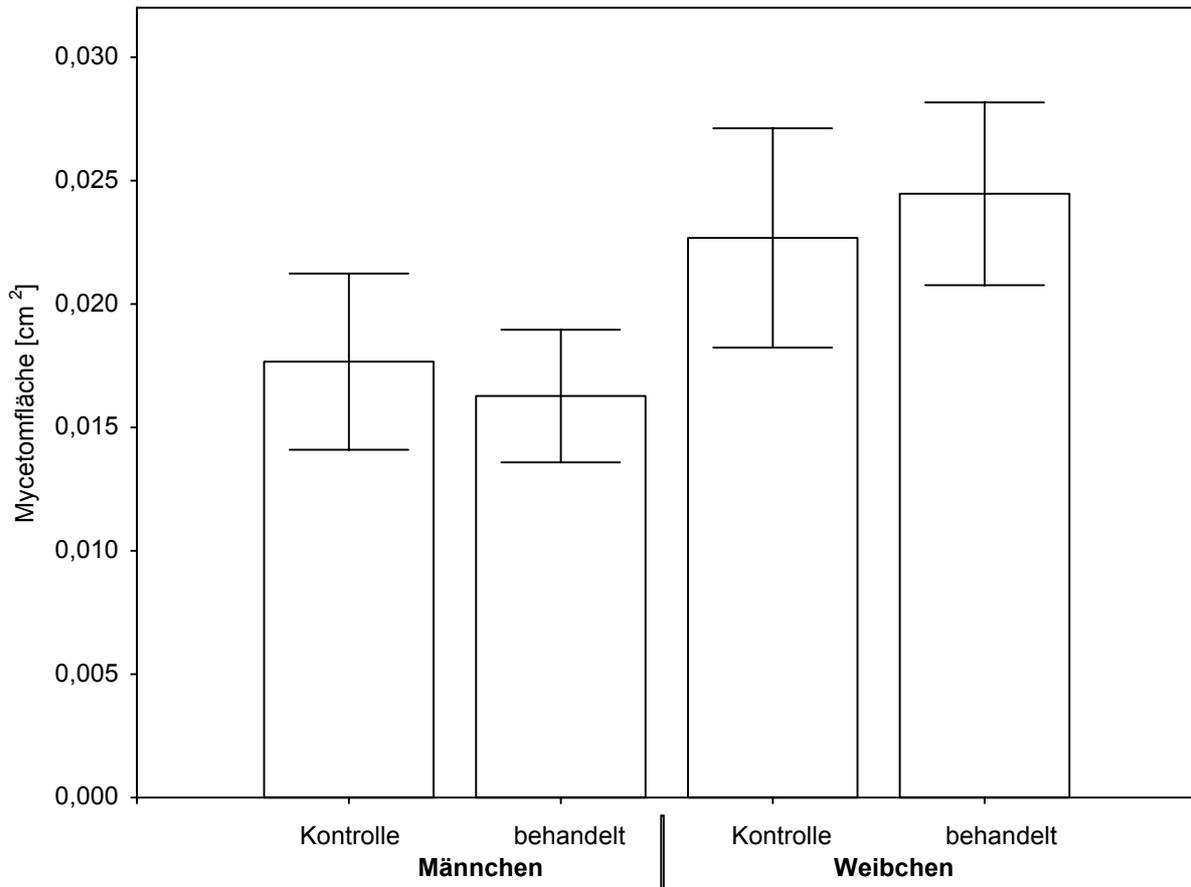


Bild 24: Ein dorsal aufpräpariertes Männchen von *Cercopis vulnerata*. Verdauungsorgane, Tracheen und Hoden wurden entfernt. Das Fettgewebe wurde mit Sudan-Rot-Lösung angefärbt. (Myc: Mycetom; F: Fettkörper; Mu: Muskulatur; N: Nervenstrang)

Tab. 9: Ergebnisse der ANCOVA für die Mycetomfläche mit ‚Behandlung‘ als erstem und ‚Sex‘ als zweitem Faktor. Der ‚Tag‘ an dem die Tiere nach der Behandlung abgetötet wurden, ist Kovariable.

Faktor	F	df	P
Behandlung	0,220	1	0,641
Sex	62,167	1	< 0,001
Tag	16,994	1	< 0,001
Behandlung * Sex	1,009	1	0,320
Fehler		52	

### 3 Ergebnisse



**Bild 25: Mittelwert mit Standardabweichung (Linien) der Mycetomfläche für die beiden Geschlechter von *Cercopis vulnerata*, mit Antibiotikum behandelte Tiere und Kontrolltiere (Männchen: Kontrolle N = 9, behandelt N = 11; Weibchen: Kontrolle N = 22, behandelt N = 15).**

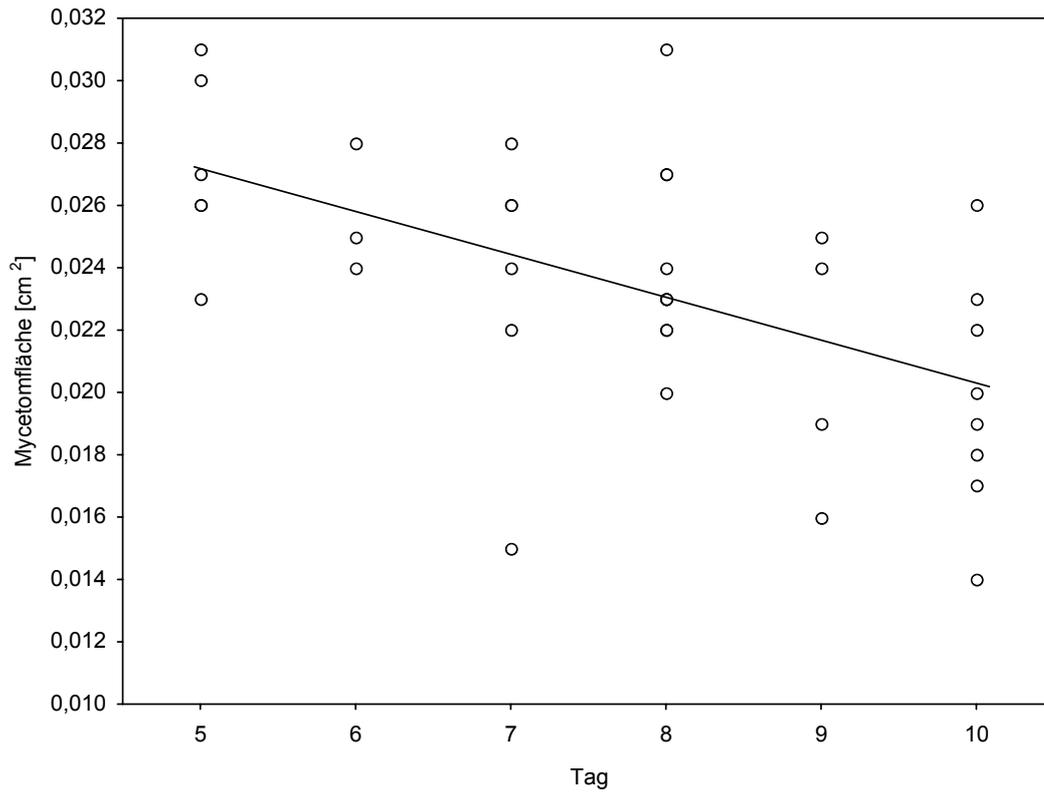
**Tab. 10: Ergebnisse der ANCOVAs für die Mycetomfläche von *Cercopis vulnerata* nach beiden Geschlechtergruppen getrennt; mit ‚Behandlung‘ als Faktor und ‚Tag‘ als Kovariable.**

Faktor		F	df	P
Weibchen	Behandlung	1,298	1	0,263
	Tag	16,131	1	<b>&lt; 0,001</b>
	Fehler		34	
Männchen	Behandlung	0,433	1	0,519
	Tag	1,477	1	0,241
	Fehler		17	

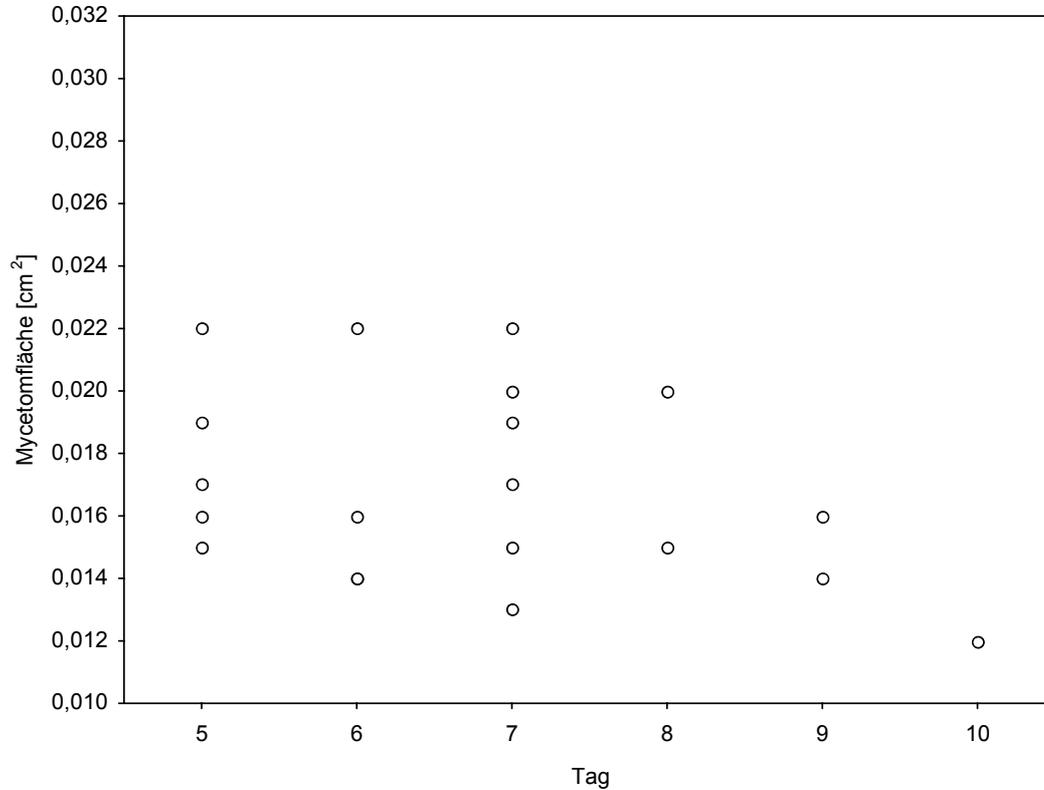
tomfläche bei den Männchen bzw. den Weibchen hatte. Außerdem zeigte sich, dass sich die Kovariable ‚Tag‘ nur für die Weibchen signifikant auswirkte (Tab. 10). Die Auftragung der Mycetomfläche der Weibchen gegen den Faktor ‚Tag‘ ergab dagegen eine signifikante negative Korrelation (Bild 26): Die Mycetomfläche nahm mit steigender Experimentdauer ab. In Bild 27 ist die Mycetomfläche der Männchen gegen den Faktor ‚Tag‘ aufgetragen, die Grafik visualisiert das Ergebnis der ANCOVA: Bei den Männchen gibt es einen schwach negativen Zusammenhang zwischen der Mycetomfläche und der Zeitdauer des Experiments, diese Korrelation ist allerdings nicht signifikant, deshalb wurde in der Grafik auch auf eine Regressionsgerade verzichtet.

Ob zwischen den Mycetomflächen und der Konzentration der Alkylsulfide in der Hämolymphe der Tiere ein Zusammenhang besteht und somit die Endosymbionten als mögliche Produzenten für die Sulfide in Frage kommen, stand im Mittelpunkt der folgenden Auswertung. Es wurden Korrelationen der Mycetomfläche mit der Konzentration an DMTS bzw. DMTetS durchgeführt. Weil die Werte für die Sulfid-Konzentrationen von einer Normalverteilung abwichen, wurde eine Rangkorrelation nach Spearman durchgeführt. Für die Weibchen war eine positive Korrelation der Mycetomfläche mit der DMTS-Konzentration in der Hämolymphe festzustellen. In Bild 28 ist zu sehen, dass bei Vorhandensein größerer Mycetome eine höhere Konzentration an DMTS vorlag, hier bestand ein signifikanter Zusammenhang ( $P < 0,001$ ), der, wie schon gezeigt werden konnte, zusätzlich noch vom Faktor ‚Tag‘ beeinflusst war. Die unterschiedlichen Symbole in der Grafik stehen für die unterschiedlichen Tage (in drei Gruppen gepoolt) und veranschaulichen zusätzlich, wie sich dieser Faktor auf die Korrelation auswirkte. Ältere Weibchen hatten überwiegend kleinere Mycetome und geringere DMTS-Konzentrationen in der Hämolymphe. Im Gegensatz dazu besaßen die jüngeren Weibchen größere Mycetome und höhere DMTS-Konzentrationen, solche mittleren Alters wiesen weitgehend eine mittlere Mycetomgröße und im Durchschnitt eine mittlere Konzentration an DMTS auf. Für die DMTetS-Konzentration im Verhältnis zur Mycetomgröße zeigte sich ein sehr ähnliches Bild wie für DMTS (Bild 29). Auch hier bestand ein positiver Zusammenhang zwischen der Mycetomgröße und der Konzentration an DMTetS, ebenfalls ist hier die Mycetomgröße und die DMTetS-Konzentration negativ mit der Verweildauer im Experiment korreliert. Bei den Männchen ließen sich keine Zusammenhänge zwischen der Mycetomfläche und der Konzentration an DMTS (Bild 30) oder DMTetS (Bild 31) nachweisen. Auch die Experimentdauer ist hier ohne Einfluss auf die Messwerte.

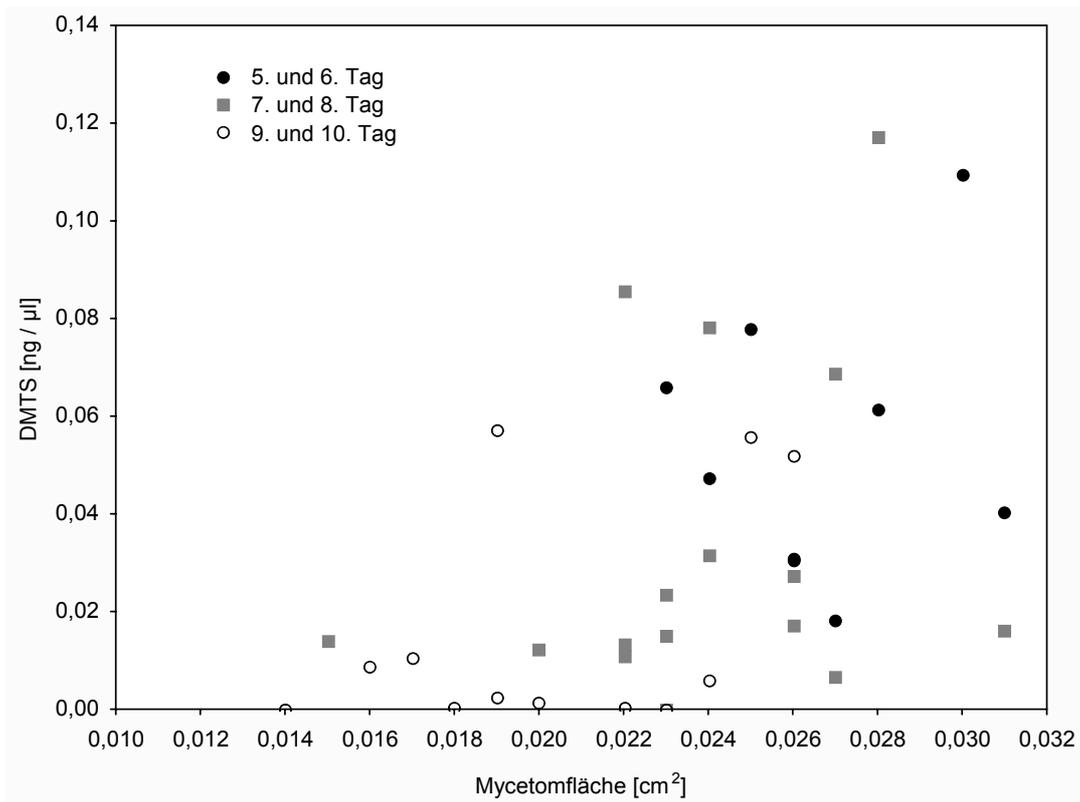
### 3 Ergebnisse



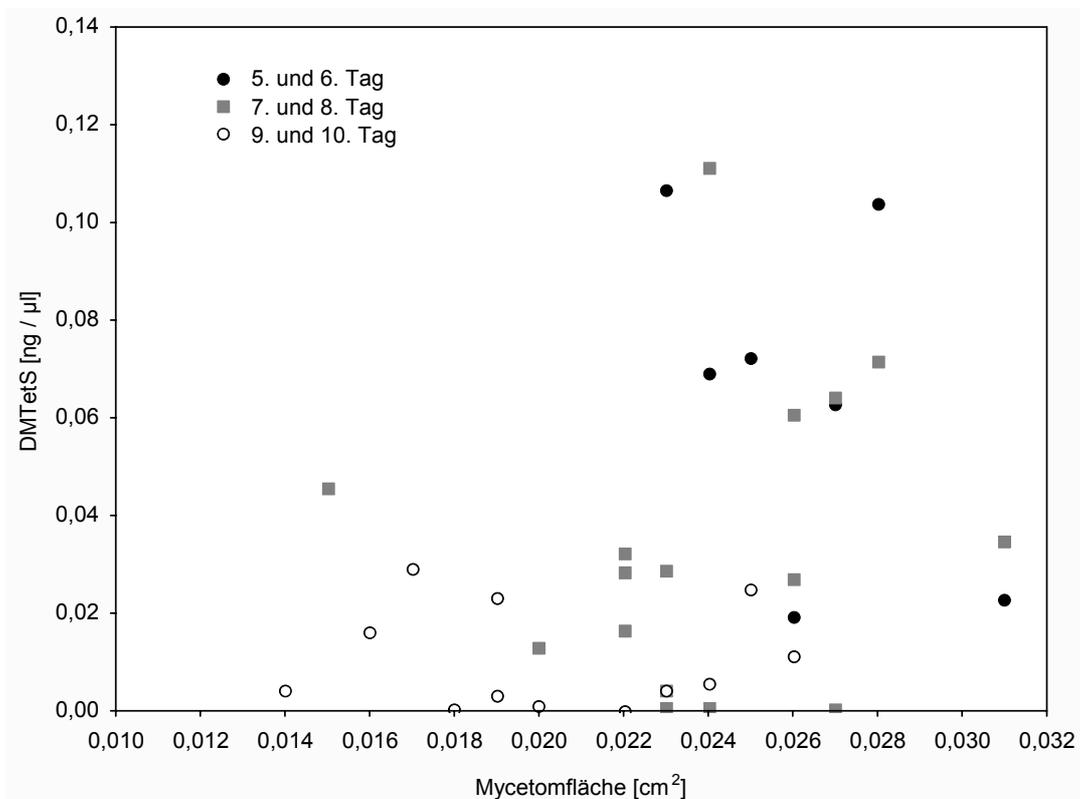
**Bild 26: Mycetomfläche der Weibchen von *Cercopis vulnerata* in Abhängigkeit vom Faktor ‚Tag‘. Pearsons  $r = -0,572$ ;  $r^2 = 0,327$ ;  $P < 0,001$ ;  $N = 37$ .**



**Bild 27: Mycetomfläche der Männchen von *Cercopis vulnerata* in Abhängigkeit vom Faktor ‚Tag‘. Pearsons  $r = -0,325$ ;  $r^2 = 0,106$ ;  $P = 0,161$ ;  $N = 20$ .**

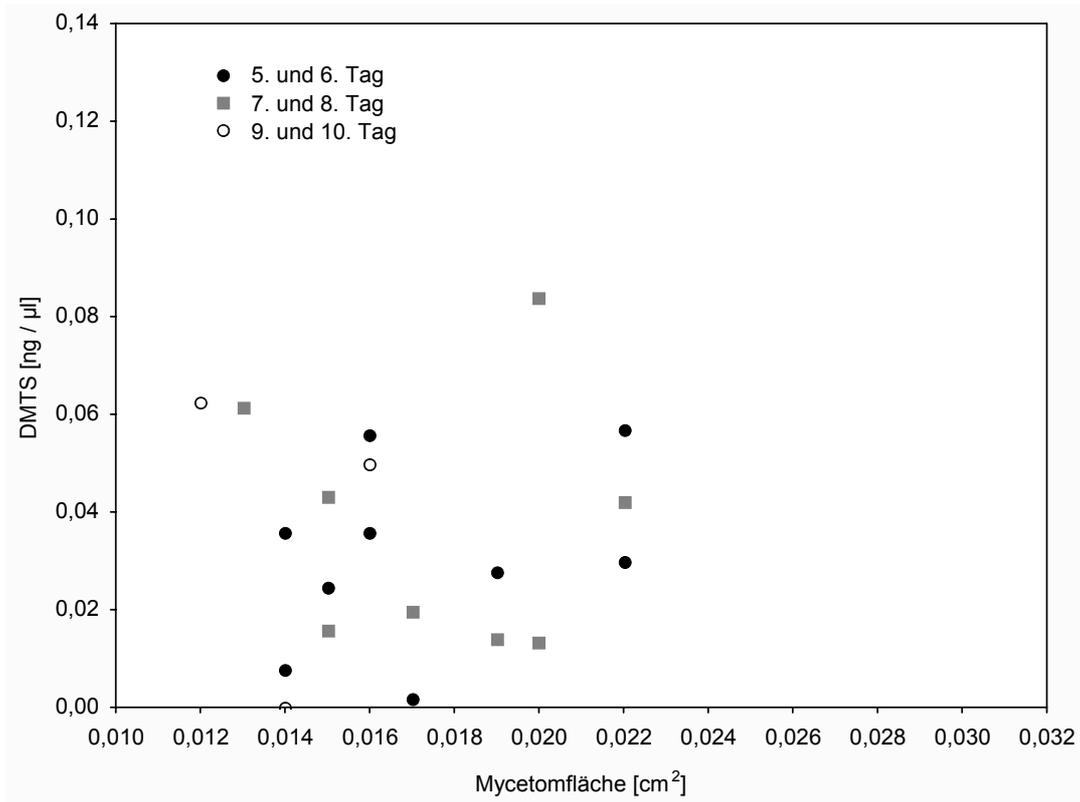


**Bild 28: Korrelation der DMTS-Konzentration bei den Weibchen von *Cercopis vulnerata* mit deren Mycetomfläche. Spearmans  $R_s = 0,540$ ;  $R_s^2 = 0,291$ ;  $P < 0,001$ ;  $N = 37$ .**

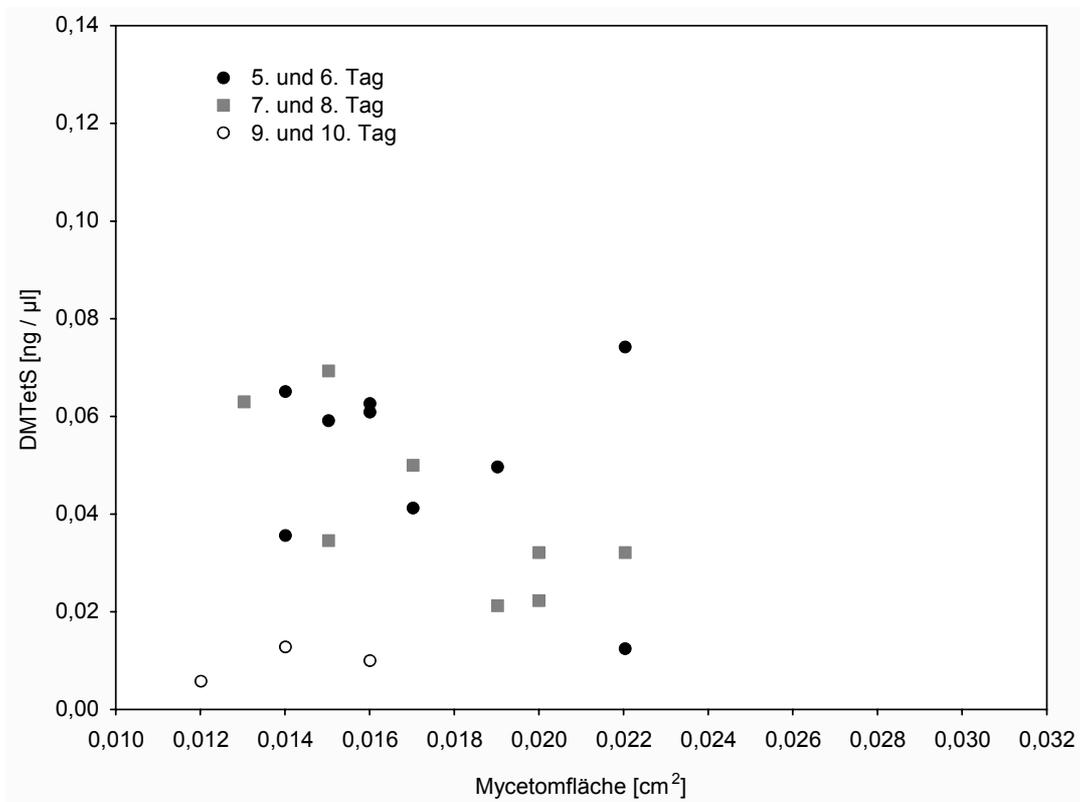


**Bild 29: Korrelation der DMTetS-Konzentration bei den Weibchen von *Cercopis vulnerata* mit deren Mycetomfläche. Spearmans  $R_s = 0,428$ ;  $R_s^2 = 0,183$ ;  $P = 0,008$ ;  $N = 37$ .**

### 3 Ergebnisse



**Bild 30: Korrelation der DMITS-Konzentration bei den Männchen von *Cercopis vulnerata* mit deren Mycetomfläche. Spearmans  $R_s = 0,002$ ;  $R_s^2 = 0,000005$ ;  $P = 0,992$ ;  $N = 20$ .**



**Bild 31: Korrelation der DMITetS-Konzentration bei den Männchen von *Cercopis vulnerata* mit deren Mycetomfläche. Spearmans  $R_s = -0,105$ ;  $R_s^2 = 0,011$ ;  $P = 0,660$ ;  $N = 20$ .**

### 3.4 Charakterisierung der Endosymbionten von *C. vulnerata*

Aus dem *C. vulnerata*- Individuum konnte, mit für Eubakterien spezifischen Primern, ein doppelsträngiges abgeglichenes 1133 Basen langes Teilstück der 16S rRNA sequenziert werden (siehe Anhang 4). Diese Sequenz ergab bei der „Nukleotid Blast search“ keine besonders gute Übereinstimmung mit einer bekannten Bakterienart (Tab. 11). Die beste Trefferquote, mit einer geringen Übereinstimmung von 86% Gleichheit, bestand mit einem Endosymbionten von *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psylloidea) (SUBANDIYAH et al., 2000). Bei diesem Endosymbionten handelt es sich um einen Vertreter der Betaproteobacteria. Zu dieser Bakterienklasse gehören auch die nachfolgenden Treffer, dabei handelt es sich um wurzelkolonisierende *Herbaspirillum*-Arten, die von der Wurzeloberfläche von Weizenpflanzen isoliert wurden (ROTHBALLER et al., 2006)

**Tab. 11: Angabe der fünf besten Treffer der aus *Cercopis vulnerata* sequenzierten bakteriellen 16S rRNA bei einer Blast search (megablast) auf der NCBI-Homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Zu den Treffern sind die GenBank Accession number, der Prozentsatz der Übereinstimmung (Identity %), die Länge der gebildeten Alignment (Alignment length), die Anzahl an nicht übereinstimmenden Basen (Mismatches) und die Anzahl der Gaps angegeben.**

Quelle	Organismus	Accession number	Identity %	Alignment length	Mis-matches	Gap opens
<i>Diaphorina citri</i>	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria	AB038368	86.53	1158	105	37
<i>Herbaspirillum</i> sp. BA17	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Oxalobacteraceae; <i>Herbaspirillum</i>	AF364861	85.84	1144	131	26
<i>Herbaspirillum</i> sp. BA16	<i>Herbaspirillum</i>	AF164054	85.84	1144	131	26
<i>Herbaspirillum</i> sp. BA11	<i>Herbaspirillum</i>	AF164050	85.84	1144	131	26
<i>Herbaspirillum</i> sp. BA10	<i>Herbaspirillum</i>	AF164049	85.84	1144	130	27

## 3.5 Cantharidin-Analyse

### 3.5.1 Systematisches Screening

Bei zwei von 146 untersuchten Zikaden und in einer Kontrollprobe (Leerprobe) konnten geringste Spuren von gebundenem Cantharidin ( $C_{10}H_{12}O_4$ ) nachgewiesen werden (Tab. 12). Die Signale, die das GC-MS in diesen beiden Fällen lieferte, waren erst nach einer gezielten Suche nach den Hauptionen (mit den Massen 128, 96, 67) nachweisbar. Die Cantharidin-Mengen waren dabei so gering, dass sie unter der Grenze lagen, die mit dem benutzten GC-MS quantifizierbar war.

Bei dem ersten positiven Befund handelte es sich um eine Probe eines Weibchens der Art *Neophilaenus campestris*, in den Proben von weiteren untersuchten Individuen dieser Art (4 ♂♂ und 4 ♀♀) konnte kein Cantharidin nachgewiesen werden.

Die Probe eines brachypteren Männchens der Art *Megadelphax sordidulus* wies ebenfalls Spuren von Cantharidin auf, acht weitere untersuchte Individuen dieser Art lieferten keine weiteren positiven Nachweise.

Merkwürdigerweise konnte in sieben Zikadenproben einer einzelnen Hydrolysereihe Cantharidin nachgewiesen werden. Als Besonderheit zu dieser Hydrolysereihe ist zu erwähnen, dass sich die Tiere für ca. eine halbe Stunde mit Proben eines Ölkäfers (Coleoptera: Meloidae) zusammen in der Gefriertrocknung befanden. Aufgrund Glasbruchs während der Hydrolyse im Trockenschrank (eine Tierprobe und eine Leerprobe) standen mir statt sechzehn nur vierzehn Proben (elf Tierproben und drei Blindproben) zur Verfügung. In zehn dieser vierzehn Proben konnten geringe Konzentrationen von Cantharidin nachgewiesen werden, wobei es sich um sieben Tierproben und alle drei Blindproben handelte. Die gemessenen Mengen waren höher als bei den zuvor besprochenen beiden Funden und ließen sich mit Hilfe der Eichkurve quantifizieren; sie beliefen sich auf ungefähr zwischen 10 ng/mg Trockengewicht und 20 ng/mg Trockengewicht. Bei diesen positiven Nachweisen handelte es sich um Proben verschiedener Individuen von *Turrutus socialis* (1 ♂, 2 ♀♀), *Errastunus ocellaris* (1 ♂, 1 ♀) und *Cicadula persimilis* (1 ♂, 1 ♀), bei diesem Vorkommen von Cantharidin handelt es sich aber offensichtlich um eine Verunreinigung (siehe 4.1).

Tab. 12: Nachweis von gebundenem Cantharidin bei den untersuchten Arten.

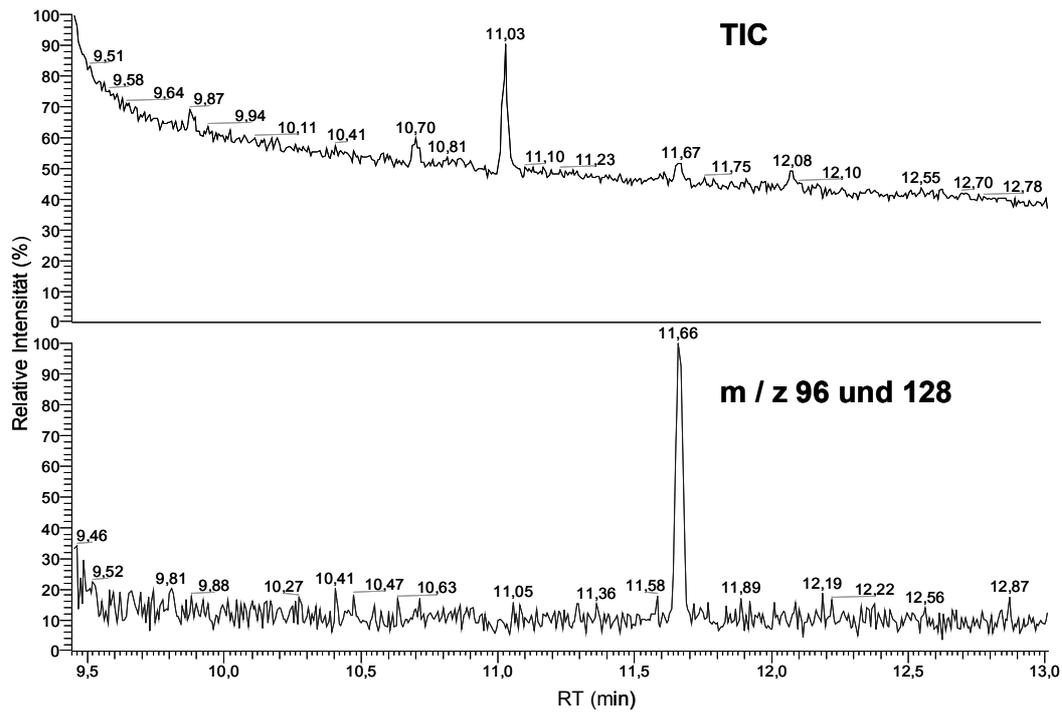
Arten	Cantharidin-Nachweis	Anzahl der untersuchten Individuen
<i>Conomelus anceps</i>	—	9
<i>Megadelphax sordidulus</i>	Spuren bei einem ♂ <sup>1</sup>	9
<i>Delphacinae</i> sp.	—	4
<i>Cercopis sanguinolenta</i>	—	2
<i>Cercopis vulnerata</i>	—	2
<i>Neophilaenus campestris</i>	Spuren bei einem ♀ <sup>1</sup>	9
<i>Neophilaenus lineatus</i>	—	4
<i>Aphrophora pectoralis</i>	—	2
<i>Philaenus spumarius</i>	—	2
<i>Gargara genistae</i>	—	3
<i>Centrotus cornutus</i>	—	2
<i>Ulopa reticulata</i>	—	34
<i>Anaceratagallia venosa</i>	—	4
<i>Populicerus populi</i>	—	3
<i>Evacanthus interruptus</i>	—	2
<i>Cicadella viridis</i>	—	2
<i>Graphocephala fennahi</i>	—	6
<i>Emelyanoviana mollicula</i>	—	2
<i>Kybos butleri</i>	—	3
<i>Eupteryx collina</i>	—	3
<i>Wagneripteryx germari</i>	—	5
<i>Zygina hyperici</i>	—	2
<i>Neoliturus fenestratus</i>	—	3
<i>Macrosteles frontalis</i>	—	2
<i>Doratura stylata</i>	—	3
<i>Cicadula persimilis</i>	1 ♂, 1 ♀ <sup>1</sup>	4
<i>Cicadula quadrinotata</i>	—	2
<i>Sotanus thenii</i>	—	5
<i>Errastunus ocellaris</i>	1 ♂, 1 ♀ <sup>1</sup>	7
<i>Turrutus socialis</i>	1 ♂, 2 ♀♀ <sup>1</sup>	6

- <sup>1</sup>: siehe Diskussion (4.1)

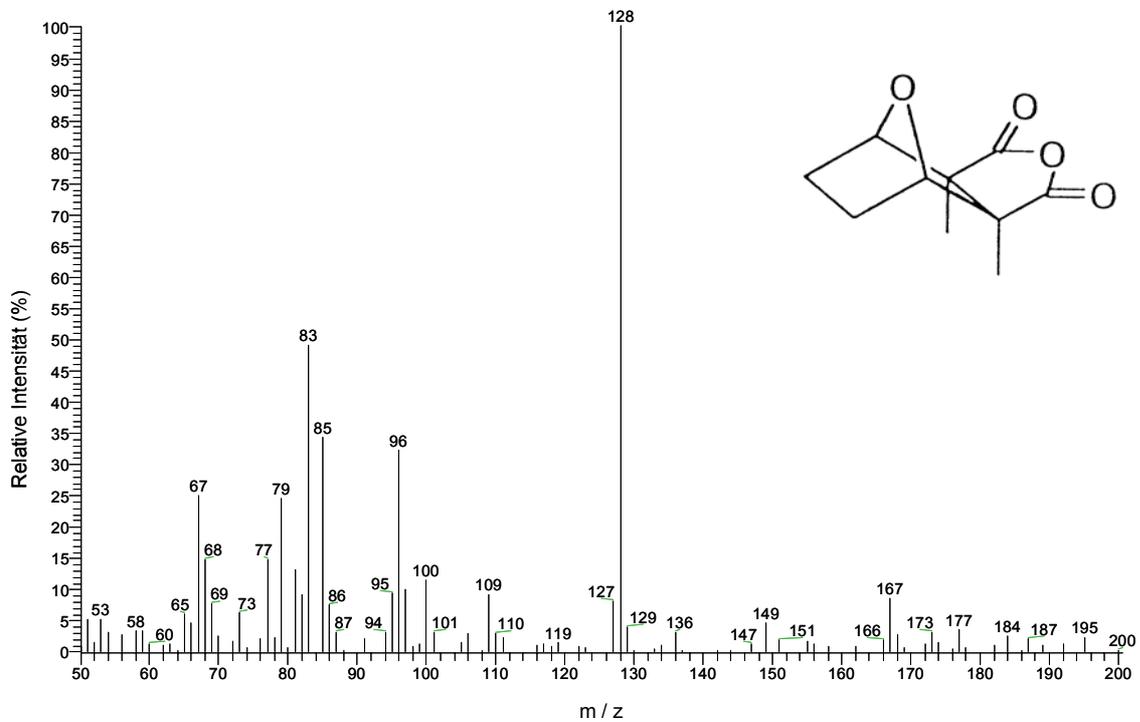
### 3.5.2 Gefriertrocknungs-Experiment

Die leeren Probengläschen die sich für das Gefriertrocknungs-Experiment gemeinsam mit den Ölkäferkompartimenten in der Gefriertrocknung befanden, wiesen ebenfalls Verunreinigungen mit Cantharidin auf. Im Totalionenstromchromatogramm (TIC) findet sich zur Retentionszeit von Cantharidin (bei 11,66 min) ein kleiner Peak, welcher in der Ionenspur der charakteristischen Massen für Cantharidin (m/z 96 und 128) deutlich hervortritt (Bild 32). Anhand der Retentionszeit und des Massenspektrums (Bild 33) ließ sich die Substanz einwandfrei als Cantharidin identifizieren. Die Mengen an Cantharidin in den Proben waren

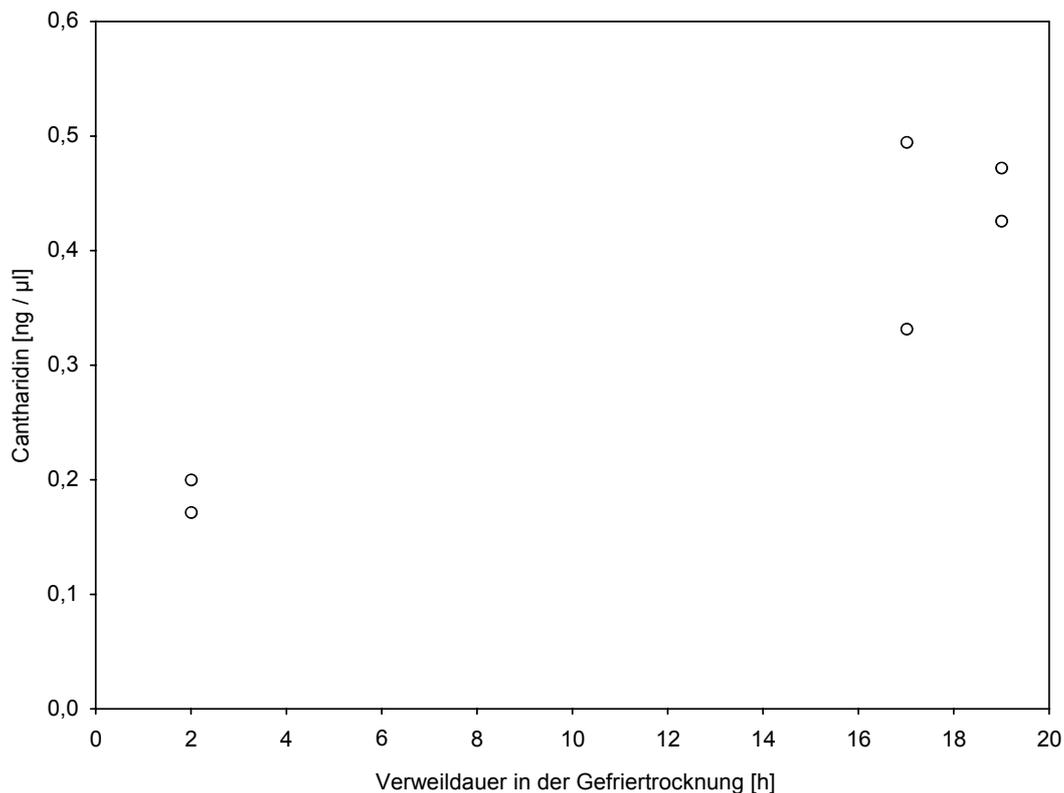
### 3 Ergebnisse



**Bild 32:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) und Ionenspur (Massen 96, 128) der Probe, welche 19 h gemeinsam mit einer Ölkäferprobe in der Gefriertrocknung stand.



**Bild 33:** Das untergrundbereinigte Massenspektrum (RT: 11,67 – 12,47 min) der Retentionszeit 11,66 min aus Bild 32 und Strukturformel des Cantharidins.



**Bild 34:** Korrelation zwischen der Verweildauer der Proben in der Gefriertrocknung und der gemessenen Peakfläche der Cantharidin-Verunreinigung. Spearman's  $R_s = 0,717$ ;  $R_s^2 = 0,514$ ;  $P = 0,109$ ;  $N = 6$ .

**Tab. 13:** Ergebnisse des Gefriertrocknungs-Experiments

Zeit nach der die Probengläschen aus der Gefriertrocknung entnommen wurden	Fläche der gemessenen Peaks (pro 0,5 µl)	ungefähre Menge an Cantharidin	
		ng/µl	ng/Probe
2 h	25419	~ 0,19	~ 9,3
17 h	55564	~ 0,41	~ 20,5
19 h	60365	~ 0,45	~ 22,5

stark positiv mit der Verweildauer in der Gefriertrocknung korreliert (Bild 34). Da keine aktuelle Cantharidin-Standard-Eichkurve für diese Fehlerquellen-Überprüfung angefertigt wurde, ist eine exakte Angabe der durch die Verunreinigung bedingten Mengen während der Gefriertrocknung nicht möglich. Nimmt man die vorher an diesem Gerät angefertigten Eichkurven als Grundlage für eine Schätzung heran und berücksichtigt hierfür die steilsten Eichkurven, also solche, die die geringste Cantharidinmenge pro Volumeneinheit haben, und

### 3 Ergebnisse

---

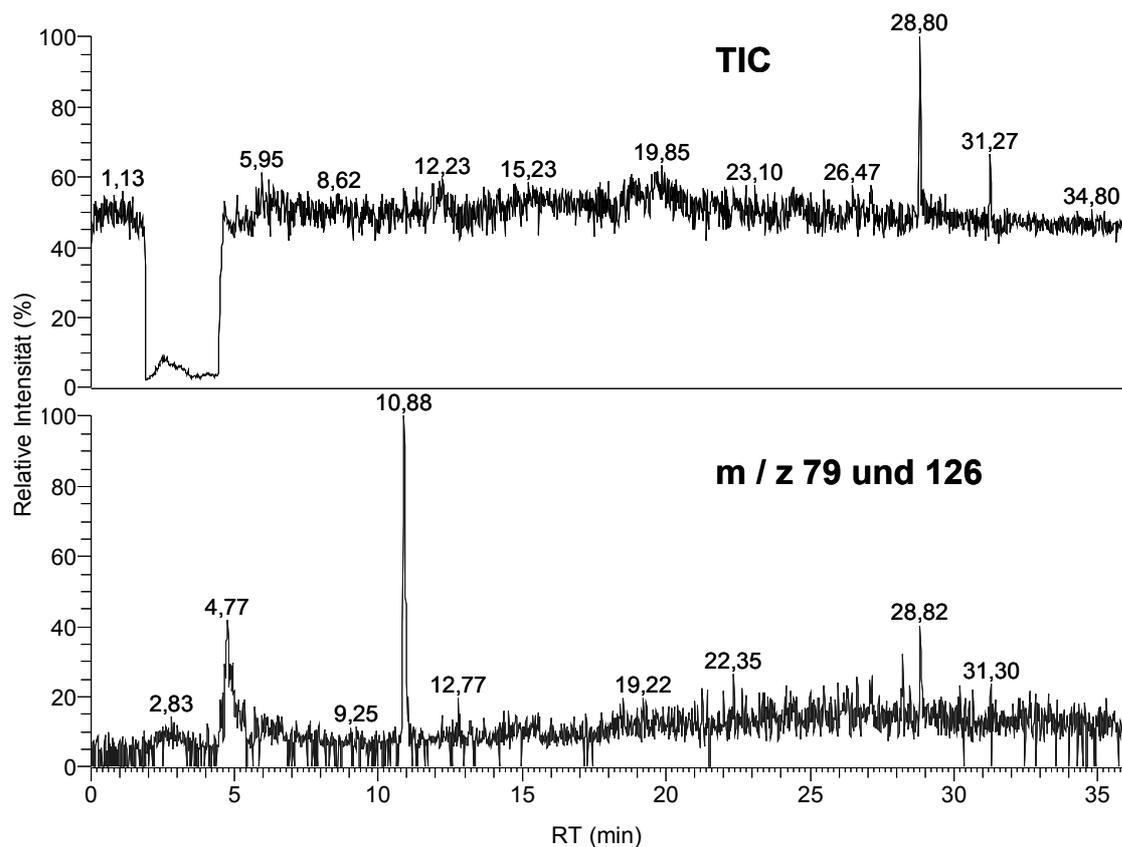
berücksichtigt zudem noch die relativen Massenanteile des Massenspektrums, kann man eine vorsichtige Angabe wagen. Es ergab sich eine Menge von 0,19 ng Cantharidin/ $\mu$ l Chloroform nach zwei Stunden Verweildauer in der Gefriertrocknung (Tab. 13). Wenn man nun berücksichtigt, dass 50  $\mu$ l Chloroform je Probe eingesetzt wurden, kommt man auf eine Menge von über 9 ng Cantharidin, die sich während der zwei Stunden in einem Probengläschen niedergeschlagen haben. Nach neunzehn Stunden in der Gefriertrocknung haben sich ca. 23 ng Cantharidin im Probengefäß angesammelt (Tab. 13), wobei es sich hierbei wohlgerne um eine Schätzung handelt. Die durchgeführten Kontrollen wiesen keine Spuren an Cantharidin auf. Da die Kontrollen sich nicht in der Gefriertrocknung befanden, ansonsten aber gleich den Proben behandelt wurden, konnten die verwendeten Glaspipetten, Probenbehältnisse und Chemikalien als Verunreinigungsquelle ausgeschlossen werden.

#### 3.5.3 Individueller Ansatz

Bei den insgesamt 34 untersuchten Tieren von *Ulopa reticulata* konnte trotz Ionenspursuche kein einziger positiver Nachweis für das Vorhandensein von gebundenem Cantharidin geführt werden.

### 3.6 Weitere Analysemethoden

Die Headspace-Analysen der lebenden und toten *C. vulnerata*-Individuen mittels SPME-Technik lieferten keine brauchbaren Ergebnisse. Bei diesen GC-Analysen hatten solche Substanzen die höchste Intensität, die sich als Produkte der SiO<sub>2</sub>-Faser (und deren Beschichtung) identifizieren ließen. Alkylsulfide konnte ich in diesen Headspace-Analysen der Blutzikade nicht nachweisen. Die authentischen Alkylsulfide konnten allerdings mit dieser Technik aufgefunden werden. Bei den durchgeführten Headspace-Analysen der Aminosäure Methionin konnte erwartungsgemäß das Methionin nicht nachgewiesen werden, aber in einem Fall Spuren von DMTS. Wie in Bild 35 dargestellt, erbrachte die Ionenspursuche nach den Hauptmassen von DMTS einen Peak zur RT von 10,88 min, das Massenspektrum war mit dem in Bild 14 dargestellten identisch. Bei der mit dem Gerstel Twister durchgeführten Headspace-Analyse der Blutzikade (*C. vulnerata*) konnte in Spuren DMTS nachgewiesen werden.



**Bild 35:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) und Ionenspur (Massen 79, 126) der SPME-Probe von Methionin. SPME-Bedingungen: 1 h Headspace bei 60 °C.

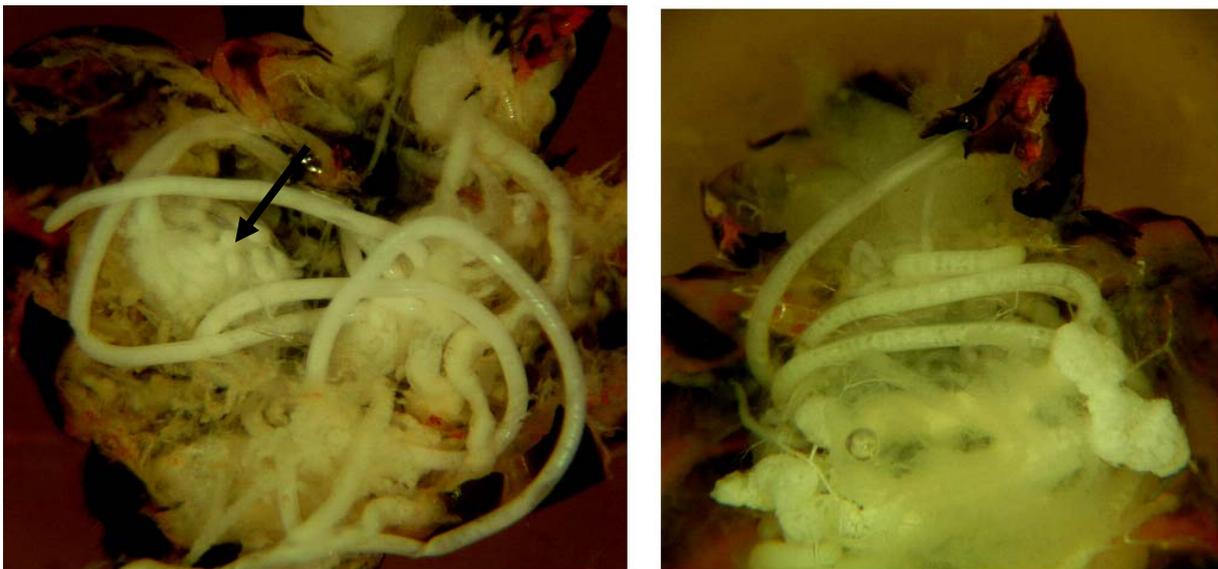
Die Ergebnisse des Hemmhoftests zur Überprüfung einer möglichen antibiotischen Wirkung der Hämolymphe von *C. vulnerata* sind in Tab. 14 zusammengefasst.

**Tab. 14:** Ergebnisse des Hemmhoftests (24 h nach Versuchsbeginn). Hämolymphe bzw. Antibiotika vs. Mikroorganismen. Angabe des Hemmhofs in mm; –: kein Hemmhof.

Mikroorg.	Wirkstoffe Hämolympheg. von <i>C. vulnerata</i>		
	Hämolympheg.	Ampicillin	Tetracyclin
<i>Escherichia coli</i>	–	–	10
<i>Bacillus sphaericus</i>	–	8	10
<i>Serratia entomophila</i>	3	–	–

#### 3.7 Nematodenfunde

Bei der Untersuchung der Mycetome der *C. vulnerata*-Individuen, die für die Erfolgskontrolle der Antibiotikum-Behandlung seziiert wurden, gelang eine überraschende Entdeckung eines Endoparasiten. In zwei Fällen, bei einem weiblichen und einem männlichen Exemplar, war das Innere des Abdomens fast vollständig von einem Wurm ausgefüllt (Bild 36). Der Wurm war ca. 4 cm lang und lag in Schlingen um den Darm herum. Von außen waren die parasitierten Zikaden von unbefallenen nicht auffällig unterschiedlich. Die inneren Organe der befallenen Tiere waren stark reduziert. Im Unterschied zu unbefallenen Weibchen, deren Abdomen prall mit Eiern gefüllt war, waren bei dem parasitierten Weibchen die Gonaden weit in ihrer Entwicklung zurück. Die Würmer wurden zur Bestimmung Herrn Prof. H. Kaiser (Graz) geschickt, der sie als juvenile Vertreter der Familie der Mermithidae (Nematoda) einordnete, vermutlich handelte es sich um die Gattung *Hexamermis*, eine eindeutige Bestimmung sei allerdings nur an Adulti möglich.



**Bild 36:** Nematoda, Mermithidae, cf. *Hexamermis* im geöffneten Abdomen zweier *Cercopis vulnerata*-Individuen (dorsale Ansicht). In dem geöffneten Weibchen (links, Pfeil) sind die verkümmerten Eierstöcke zu sehen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Cantharidin bei Zikaden

Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten systematischen Screening (3.1.1) wurden in zwei Proben bzw. einer Kontrollprobe geringste Spuren von Cantharidin nachgewiesen. Diese positiven Nachweise von Cantharidin bei einem Weibchen der Art *Neophilaenus campestris* (Cicadomorpha: Aphrophoridae) und einem Männchen der Art *Megadelphax sordidulus* (Fulgoromorpha: Delphacidae) sind angesichts der Tatsache, dass sie in weiteren Proben derselben Art sowie desselben Fundortes nicht reproduzierbar waren, kritisch zu sehen. Einen Hinweis darauf, woher das Cantharidin aus diesen Proben stammen könnte, lieferte der zufällige Umstand, dass die Proben einer Hydrolysereihe für eine halbe Stunde zusammen mit cantharidinhaltigem Material in der Gefriertrocknungsanlage standen. In 10 Proben ließ sich Cantharidin nachweisen, da aber auch die Leerproben dieser Hydrolysereihe gleich hohe Mengen an Cantharidin aufwiesen, handelt es sich bei den Positiv-Proben der Individuen von *Turrutus socialis*, *Errastunus ocellaris* und *Cicadula persimilis* offensichtlich um Verunreinigungen. Der Verdacht lag nahe, dass die Proben während der halben Stunde, in der sie zusammen mit cantharidinhaltigem Material in der Gefriertrocknungsanlage standen, mit Cantharidin verunreinigt wurden. Das Gefriertrocknungs-Experiment (3.1.2) bestätigte das. Die Blindproben wurden in der Gefriertrocknungsanlage verunreinigt. Mit zunehmender Verweildauer in der Apparatur stieg der Cantharidingehalt an: von ca. 9,3 ng/µl nach zwei Stunden auf ca. 22,5 ng/µl nach 19 Stunden.

Wenn man exemplarisch die 22,5 ng Cantharidin/µl auf eine Probe hochrechnet, z. B. auf eine Nymphe im ersten Entwicklungsstadium der Kleinzikade *U. reticulata* mit einem Trockengewicht von ca. 0,1 mg, würde so der Wert von 225 ng/mg Trockengewicht herauskommen, der allein auf eine Verunreinigung zurückzuführen wäre. Vor allem für Probenmaterial mit geringem Gewicht liegt hier ein hohes Fehlerpotential.

Cantharidin hat mit  $1,17 \times 10^{-4}$  Pa Dampfdruck (20 °C) eine geringe Flüchtigkeit (DETTNER, 1997), ein Verdampfen dieser Substanz scheint unter den Bedingungen während der Gefriertrocknung ( $T = -50$  °C,  $p = 2,5$  Pa) nicht möglich. Wahrscheinlich haben sich kleinste Partikel der Ölkäferkompartimente in der Apparatur verteilt: Beim Öffnen des Vakuums könnte durch die in die Apparatur einströmende Luft cantharidinhaltiges Material aufgewirbelt worden sein, welches sich dann im Innenraum der Apparatur verteilt hat.

#### 4 Diskussion

---

Obwohl darauf geachtet wurde, dass die Luft beim Öffnen des Vakuums behutsam in die Apparatur einströmt, kann ein Aufwirbeln des Probenmaterials nicht ausgeschlossen werden. Auch eine Kontamination der Apparatur ist möglich, daher sollten Proben, die auf geringste Konzentrationen von Cantharidin untersucht werden, nicht in einer Apparatur gefriergetrocknet werden, in der auch Proben mit hohem Cantharidgehalt getrocknet werden. Zumindest sollte nach Benutzung für solche Proben der Innenraum der Gefriertrocknungsanlage mit Lösungsmittel gereinigt werden. Da bei der Probenaufbereitung für die Cantharidin-Untersuchung dieser Arbeit eine Gefriertrocknungsanlage verwendet wurde, die auch für Untersuchungen von cantharidinhaltigem Material benutzt wurde, sind die positiven Nachweise von Cantharidin bei den Arten *Neophilaenus campestris* und *Megadelphax sordidulus* sehr wahrscheinlich auf Verunreinigung zurückzuführen.

Der Cantharidin-Nachweis den DETTNER (pers. Mitt.) am selben Lehrstuhl für Individuen der Kleinzikade *U. reticulata* machte, konnte anhand des Materials der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden. Möglicherweise handelt es sich bei den von DETTNER durchgeführten Analysen ebenfalls um Verunreinigungen, die während der Probenaufbereitung in der Gefriertrocknung stattgefunden haben. Während des Zeitraums, in welchem diese Analysen durchgeführt wurden, fanden ebenfalls Untersuchungen mit cantharidinhaltigem Material am Lehrstuhl statt, wobei regelmäßig auch Proben mit höheren Cantharidintitern analysiert wurden.

Falls es sich bei den vorgenannten Befunden nicht um Verunreinigungen handelt, stellt sich die Frage: Ist das Vorkommen von Cantharidin bei *Ulopa reticulata* stark abhängig von der Herkunft der Probestiere, der Jahreszeit oder dem Individuum? Da es sich bei *U. reticulata* um eine Art handelt, die monophag an Besenheide (*Calluna vulgaris*) lebt, kann die Art der Nährpflanze keinen Einfluss auf ein Cantharidin-Vorkommen haben, höchstens die Qualität der genutzten Pflanzenindividuen könnte von Einfluss sein. Die Möglichkeit, dass das Cantharidin-Vorkommen bei *U. reticulata*-Individuen stark von deren Biotop (Fundort) abhängt, kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da die verwendeten Exemplare von verschiedenen Fundorten stammten und auch Tiere von jenen Fundorten untersucht wurden, von denen DETTNER positive Nachweise für Cantharidin erbringen konnte. Dass das Cantharidin-Vorkommen auf einzelne Individuen von *U. reticulata* beschränkt ist, ist ebenfalls nicht sehr wahrscheinlich: DETTNER hatte in einem hohen Prozentsatz positive Cantharidin-Befunde bei dieser Art; in der vorliegenden Untersuchung wies hingegen nicht

eines der 34 untersuchten *U. reticulata*-Individuen ein Vorkommen des Terpenanhydrids auf. Da alle Entwicklungsstadien bis auf die Eier, sowie beide Geschlechter untersucht wurden, ist ein intraspezifischer Unterschied im Cantharidin-Gehalt nicht plausibel. Bleibt noch die Möglichkeit, dass das Cantharidin-Vorkommen bei *U. reticulata* jahreszeitlich unterschiedlich ist. Die untersuchten Individuen stammten alle von Aufsammlungen, welche in dem Zeitraum von Mitte September bis Anfang November vorgenommen wurden. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass diese Tiere im Winter, Frühjahr oder Frühsommer ein nachweisbares Cantharidin-Vorkommen besitzen. Beim systematischen Screening wurden Tiere anderer Arten der Cicadomorpha verwendet, die von Aufsammlungen von Frühjahr, Sommer und Herbst stammten; diese Proben lieferten alle negative Befunde.

Die Präsenz von Cantharidin in Zikaden muss nach wie vor unklar bleiben, auch wenn in dieser Arbeit kein positiver Nachweis des Terpenanhydrids in Zikaden erbracht werden konnte. Generell besteht bei der Spurenanalytik von Cantharidin die Gefahr der Kontamination von Proben, die kein oder wenig Cantharidin enthalten, durch stark cantharidinreiche Proben. Dennoch ist keine Deutung für den positiven Befund von FENG et al. (1988) bei der chinesischen fulgoromorphen Zikade *Lycorma delicatula* möglich. Von den Familien Achilidae und Derbidae (beide Fulgoromorpha) ist bekannt, dass die Nymphen an Pilzmyzel saugen (WILSON et al., 1994). Ein Beweis ob Cantharidin oder ähnliche Metabolite aus endo- oder ektophytischen Pilzen durch solche Herbivoren aufgenommen werden können, muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

## 4.2 Reflexbluten bei Schaumzikaden (Cercopoidea)

Einige Insektenarten setzen ihre Hämolymphe zur Verteidigung gegen Feinde ein. In der Hämolymphe dieser Tiere sind meist deterrente Substanzen vorhanden. Bei einem Angriff durch einen Prädator wird die Hämolymphe an der Körperoberfläche abgegeben, und der Angreifer wird mit den Deterrentien in Kontakt gebracht (BLUM, 1981). Die Hämolymphe tritt dabei an einer oder mehreren Stellen der Cuticula aus, dies geschieht artabhängig an den Intersegmentalhäuten, dem Gelenk zwischen Tibia und Femur, den Seitenrändern der Elytren oder an der Basis der Antennen oder Mandibeln. Gut untersucht ist dieses Verhalten beispielsweise bei den aposematisch gefärbten Marienkäferarten (Coleoptera: Coccinellidae), die in ihrer Hämolymphe Alkaloide besitzen, welche aversiv auf Ameisen wirken (EISNER et al., 1986; GRILL & MOORE, 1998; HAPP & EISNER, 1961; KENDALL, 1971; MARPLES, 1993).

#### 4 Diskussion

---

Innerhalb der Coleoptera kommt dieses Verhalten auch noch bei einigen Blattkäferarten (Chrysomelidae) vor, deren hervortretende Hämolymphe die Mundwerkzeuge von Ameisen verklebt (BÜNNIGE & HILKER, 2005; MATSUDA, 1982; WALLACE & BLUM, 1971). Auch Ölkäfer (Meloidae) geben mit ihrem Blut das hochpotente Toxin Cantharidin ab (CARELL & EISNER, 1974; DETTNER, 1997; SMEDLEY et al., 1995/96). Darüber hinaus lassen sich weitere Beispiele innerhalb der Coleoptera finden, z. B. bei den Glühwürmchen (Lampyridae) (BLUM & SANNASI, 1974). Auch bei Arten anderer Insektenordnungen (Plecoptera [DETTNER pers. Mit.], Orthoptera, Hemiptera, Diptera, Lepidoptera und Hymenoptera) kommt Reflexbluten vor, einen Überblick hierüber gibt HOLLANDE (1911).

Fast ein Jahrhundert ist es her, dass HOLLANDE (1911) erstmalig von der Fähigkeit der Blutzikade zum Reflexbluten berichtete. HOLLANDE beobachtete, dass das Reflexblut durch Platzen des Aroliums am Prätarsus hervortritt: „*Cercopis vulnerata* Germ. (par éclatement de la ventouse des griffes)“. Neunzig Jahre später wurden von PECK (2000) verschiedene Arten der Überfamilie Cercopoidea aus Costa Rica auf Reflexbluten hin untersucht. Die Tiere wurden hierfür im Labor mittels einer Zange oder einer heißen Nadel gereizt. Bei allen der 42 getesteten Arten der Familie der Cercopidae konnte PECK die Fähigkeit zum Reflexbluten feststellen. An allen sechs Prätarsen gaben die Tiere eine gelb-orange Flüssigkeit ab. PECK beobachtete zudem, dass der Prätarsus in seinem membranösen Bereich entlang einer definierten Linie aufreißt und bedingt durch hydrostatischen Druck, erzeugt durch Kontraktionen des Abdomens, Flüssigkeit austritt. Bei den von mir gemachten Beobachtungen und den eigenen rasterelektronen-mikroskopischen Untersuchungen des Prätarsus von *C. vulnerata*-Individuen (3.2.1) konnte ebenfalls kein Hinweis auf Drüsen gefunden werden. Die Drüsen am Prätarsus sollten aber, aufgrund der abgegebenen Menge an Reflexblut (ca. 0,1 µl), verhältnismäßig groß sein und somit nicht leicht zu übersehen sein. Da weder Drüsen gefunden wurden, noch sich die Chromatogramme der Reflexblut- und Hämolymphe-Proben deutlich unterschieden, ist es gut begründet, dass es sich bei dem Reflexblut tatsächlich um Hämolymphe handelt, wie es PECK vermutete. Die Farbe des Reflexblutes war allerdings, ebenso wie die Hämolymphe, die aus den Coxen abgeschnittener Beine austrat, durchsichtig und nicht gelb-orange, wie bei jenen Arten, die PECK untersuchte. Die Abgabe eines Hämolymphtropfens nach Reizung im Labor konnte von mir ebenfalls an allen sechs Beinen beobachtet werden, wobei häufiger an Vorder- und Mittelbeinen ein Tropfen abgegeben wurde. Ein gereiztes Tier war, wenn es die Möglichkeit hatte an einer Weizenpflanze Xylemsaft aufzunehmen, nach einiger Zeit erneut zum Reflexbluten fähig.

## 4.2 Reflexbluten bei Schaumzikaden (Cercopoidea)

PECK (2000) untersuchte nicht nur aposematisch gefärbte Vertreter der Cercopidae, sondern auch elf eher unauffällig gefärbte Arten der Familie Clastopteridae und Aphrophoridae (beide Cercopoidea). Bei diesen Arten konnte er keine Fähigkeit zum Reflexbluten nachweisen. Dies steht im Widerspruch zu den vorliegenden Befunden, da ich Vertreter der Aphrophoridae durchaus zur Abgabe eines Hämolymphtropfens reizen konnte. Die Tropfen traten hierbei ebenfalls an den Prätarsen aus und die Tropfengröße war mit jener bei den Arten der Cercopidae vergleichbar. Allerdings zeigten, prozentual betrachtet, weniger getestete Tiere der Aphrophoriden (*Aphrophora alni*, *Neophilaenus campestris*, *Philaenus spumarius*) im Vergleich zu den Cercopiden dieses Verhalten, bei Individuen der Art *A. alni* gelang die Stimulation zum Reflexbluten nur in Einzelfällen. Hierbei handelt es sich meines Erachtens um die erste Beobachtung von Reflexbluten bei Vertretern der Aphrophoridae; die Fähigkeit zum Reflexbluten scheint bei diesen allerdings weniger gut entwickelt zu sein als bei den Vertretern der Cercopidae. Die getesteten Individuen der beiden *Cercopis*-Arten (*C. vulnerata*, *C. sanguinolenta*) ließen sich von allen getesteten Tieren der Cercopoidea am leichtesten zum Reflexbluten reizen. Bei den Individuen der zweiten Gattung der Cercopidae (*Haematoloma dorsatum*) konnte ebenfalls die Abgabe eines Hämolymphtropfen am Prätarsus beobachtet werden; auch diese Beobachtung konnte prozentual bei weniger Individuen als bei den untersuchten *Cercopis*-Arten gemacht werden.

Möglicherweise haben die beiden Schwesterfamilien Cercopidae und Aphrophoridae die Fähigkeit zum Reflexbluten von einem gemeinsamen Vorfahren geerbt und die Cercopiden haben die Fähigkeit im vollen Umfang erhalten oder aber weiter entwickelt. Interessant wäre es daher, Vertreter der Schwestergruppe Cicadoidea und einer den Cercopoidea nicht näher verwandten Gruppe (Membracoidea) ebenfalls auf diese Fähigkeit zu überprüfen, um die evolutionäre Herkunft dieses Phänomens zu klären. Die Phylogenese der Cicadomorpha ist umstritten, aber die Struktur und Funktion der Malpighischen Gefäße sowie molekularbiologische Untersuchungen der Cicadomorpha sprechen dafür, dass die Cercopoidea und die Cicadoidea gemeinsamen Ursprungs sind und zusammen den Membracoidea gegenüber gestellt werden können (CRYAN, 2005; RAKITOV, 2002). Zukünftige Untersuchungen sollten Arten dieser Gruppen auf ihre Fähigkeit zum Reflexbluten testen, um so Hinweise auf den evolutionären Ursprung dieses Phänomens innerhalb der Überfamilie Cercopoidea zu bekommen.

Allerdings könnte auch ein methodischer Aspekt dafür verantwortlich sein, dass manche Tiere leichter zur Abgabe eines Hämolymphtropfens gereizt werden konnten als andere: Alle getesteten Tiere wurden im Freiland gefangen und, bevor sie für Reizversuche verwendet wurden, an Weizenpflanzen in der Klimakammer gehalten, oder aber, wie im Fall der *H. dorsatum*-Individuen, an einer getopften Waldkiefer auf der Institutsterrasse. Die beiden *Cercopis*-Arten konnten über Wochen so gehalten werden. Für die anderen Arten liegen keine langzeitlichen Vergleiche vor, da die Tiere nur für wenige Tage, nämlich für die Dauer der Reizversuche gehalten wurden. Möglich ist, dass die verwendeten Futterpflanzen nicht für alle Arten gleich gut geeignet waren, weil es sich entweder nicht um die richtige Art der Futterpflanze handelte oder im Falle der getopften Waldkiefer nicht die notwendige Qualität der Nahrung geboten war. Gestützt wird diese Hypothese durch den Umstand, dass es sich bei dem Vertreter der Aphrophoridae mit der höchsten Bereitschaft zum Reflexbluten (*Philaenus spumarius*) um eine extrem polyphage Zikadenart handelt.

### 4.3 Inter- und intraspezifischer Vergleich der Hämolymphe

Die Leerläufe der GC-MS-Analysen unterschieden sich von allen anderen Proben signifikant (3.2.1), was bedeutet, dass keine Verunreinigung von vorherigen Probeläufen stattgefunden hat. Hieraus ließ sich ferner auf eine stabile Gerätefunktion schließen, die wiederum weitgehend sichere Ergebnisse beim Vergleich der Proben gewährleistete.

Insgesamt zeigte die nicht-metrische multidimensionale Skalierung basierend auf dem CNESS-Index bei  $m = 1$  eine starke Streuung der Proben verschiedener Individuen derselben Art und desselben Geschlechts (Bild 8 oben). Es scheint somit starke individuelle Unterschiede in der Hämolympf-Zusammensetzung zu geben, was durch den unterschiedlichen physiologischen Zustand der dem Freiland entnommenen Tiere bedingt sein könnte. Mit höheren Werten für den Faktor  $m$  ( $m = 2858$  und  $m = 9999$ ) lagern sich die Proben aller untersuchten Arten noch stärker zusammen, dies ist durch eine höhere Gewichtung von Spurenkomponenten erklärbar (Bild 7 und 8). Ein hoher  $m$ -Wert berücksichtigt vergleichsweise stärker das Untergrundrauschen des Massenspektrometers sowie Säulenpeaks. Folglich handelt es sich hierbei um Komponenten, die in allen Analysen vorkommen und nicht auf die im Injektor verdampfte Hämolymphe zurückzuführen sind.

### 4.3 Inter- und intraspezifischer Vergleich der Hämolymphe

Nur die Hämolymphe der drei untersuchten Arten der Familie der Cercopidae unterschied sich deutlich in ihrer Zusammensetzung von jener der übrigen analysierten Arten. Hierfür sind sowohl die Hauptkomponenten als auch weniger stark vorhandene Komponenten in der Hämolymphe verantwortlich, da der Unterschied sowohl bei einem  $m$ -Wert von 1 als auch bei einem  $m$ -Wert von 9999 signifikant war (Tab. 4). Die gefundenen Geschlechts-Unterschiede bei den beiden *Cercopis*-Arten beruhen hingegen auf den Hauptkomponenten in der Hämolymphe. Es zeigte sich, dass mit zunehmendem Wert für den Faktor  $m$  der Unterschied zwischen den Geschlechtern schwächer wurde; nur bei einem  $m$  von 1 waren die Geschlechtsunterschiede signifikant. Bei den Hauptkomponenten handelt es sich um die identifizierten Alkene (Tricosen und Pentacosen). Diese Alkene konnten auch bei einer durchgeführten Oberflächen-Extraktion von *C. vulnerata* (Ergebnisse nicht dargestellt) gefunden werden. Es handelt sich somit um Substanzen, die sich sowohl in der Hämolymphe als auch auf der Cuticula der Tiere befinden. Cuticuläre Kohlenwasserstoffe sind als Semiochemikalien bei Insekten gut bekannt, sie dienen den Tieren in erster Linie der Erkennung von Art-, Geschlechts- oder Kastenzugehörigkeit. Einen guten Überblick über dieses Thema geben HOWARD & BLOMQUIST (1982, 2005). Bei einigen Insektenarten finden sich zwischen den Geschlechtern qualitative Unterschiede in der Zusammensetzung der cuticulären Kohlenwasserstoffe wie z. B. bei Vertretern von *Glossina* sp. (Diptera: Glossinidae, [SUTTON & CARLSON, 1997]), *Xylotrechus colonus* (Coleoptera: Cerambycidae, [GINZEL et al., 2003]); bei Vertretern anderer Arten finden sich hingegen quantitative Unterschiede, z. B. *Drosophila virilis* (Diptera: Drosophilidae, [JACKSON & BARTELT, 1986]), *Aleochara curtula* (Coleoptera: Staphylinidae, [PESCHKE, 1986]). Produziert werden die Kohlenwasserstoffe in den Oenocyten, welche entweder dem Fettkörper oder der Epidermis zugehörig sind. Gebunden an Lipophorine werden die Kohlenwasserstoffe durch die Hämolymphe von den Oenocyten zur Cuticula, dem Zielgewebe, transportiert. Beide Geschlechter der hier untersuchten *C. vulnerata*-Individuen unterschieden sich deutlich in ihrer Zusammensetzung dieser langkettigen Kohlenwasserstoffe. Die Unterschiede waren sowohl quantitativer als auch qualitativer Art: Hauptsächlich lagen die Unterschiede in den Mengenverhältnissen der vorkommenden Alkene, zusätzlich ließ sich eines der Alkene (Tricosen) nur bei den Weibchen nachweisen.

Die anderen untersuchten Arten (*Philaenus spumarius* ♀/♂, *Lepyronia coleoptrata* ♀/♂, *Centrotus cornutus* ♀, *Gryllus bimaculatus* ♀/♂) zeigten keine deutlichen inter- bzw. intraspezifischen Unterschiede in ihren Hämolymphe-Analysen. Obwohl die Ordination für die

## 4 Diskussion

---

Hämolymp-Analysen der Individuen von *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae) eine Trennung von Männchen und Weibchen visualisiert, beruht dieser Eindruck nicht auf einem signifikanten Unterschied.

Es konnte somit gezeigt werden, dass durch die Analyse der Hämolymphe dieser Arten mittels des verwendeten GC-MS keine Artabgrenzung aufgrund des TICs möglich ist. Nur die Hämolymp-Analysen der *Cercopis*-Arten unterschieden sich stark von den restlichen Proben, allerdings waren die Proben der beiden *Cercopis*-Arten nicht auseinander zu halten, da sich Proben desselben Geschlechts verschiedener Arten stärker ähnelten als Proben unterschiedlichen Geschlechts derselben Art.

### 4.4 Hämolymp-Inhaltsstoffe

Zu den Bestandteilen der Hämolymphe von Insekten gehören neben anorganischen Verbindungen vor allem organische Komponenten wie Proteine (v. a. Globuline und Albumine), Aminosäuren, Zucker (Glukose, Trehalose), organische Säuren und Lipide (gebunden an Proteine, sog. Lipophorine) (CHAPMAN, 1998; GULLAN & CRANSTON, 2000; WASSERTHAL, 2003). Die Zusammensetzung schwankt mit dem Ernährungs-, Gesundheits- und Entwicklungsstand der Tiere. Des Weiteren sind von Insekten auch Abwehrstoffe bekannt, die in der Hämolymphe vorkommen können; dabei handelt es sich um Terpene, aromatische Verbindungen, Alkaloide und verschiedene andere Verbindungen.

Intention der vorliegenden Arbeit war nicht, alle Inhaltsstoffe der untersuchten Hämolymphe zu identifizieren, was gaschromatographisch allein nicht möglich wäre. Vielmehr sollte speziell nach leichtflüchtigen biologisch aktiven Substanzen gesucht werden, die mit dem Reflexblut abgegeben werden könnten. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen leichtflüchtigen Substanzen (3.3.3) werden im Folgenden näher besprochen.

#### 3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin

Bei Pyrazinen handelt es sich um Heteroaromaten mit zwei Stickstoffatomen in gegenüberliegender Stellung. In der Natur kommen Pyrazine mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen vor und finden sich in vielen nicht miteinander verwandten, aber gut fraßgeschützten Pflanzen, wie z. B. Mohn (*Papaver*), Jakobs-Greiskraut (*Senecio jacobaea*), Seidenpflanze (*Asclepias*), Brennnessel (*Urtica dioica*) oder Mariendistel (*Silybum*) sowie in

ungenießbaren aposematisch gefärbten Insekten wie Monarchfalter (*Danaus plexippus*), Bärenspinner (Arctiidae), Widderchen (*Zygaena*), Marienkäfer (*Coccinella*), Rotdeckenkäfer (*Metriorrhynchus*) und Springschwänzen der Gattung *Tetrodontophora* (DETTNER et al., 1996; ROTHSCHILD & MOORE, 1987). Dabei sind die Pyrazine nicht für die toxische Wirkung verantwortlich, vielmehr handelt es sich nach GUILFORD et al. (1987) z. B. bei den Methoxyalkylpyrazinen um Substanzen, die einen Geruch mit sehr guter Wahrnehmbarkeit und hohem Wiedererkennungswert für Vögel aufweisen, wobei Vögel als Prädatoren von Insekten eine große Bedeutung haben. Vögel gelten zwar gemeinhin als Mikrosmaten, aber zumindest die Pyrazine können von diesen Tieren gut wahrgenommen werden; bei anderen Vertebraten (Ratten, Rinder) konnten spezielle Pyrazin-Rezeptoren gefunden werden (PEVSNER et al., 1986). Es ist wahrscheinlich, dass auch bei Vögeln solche Pyrazinrezeptoren vorhanden sind. So sind beispielsweise Rotschulterstärlinge (*Agelaius phoeniceus*) in der Lage, Reis, der zuvor mit 2-Methoxy-3-methylpyrazin benetzt wurde, von unbenetztem Reis zu unterscheiden (AVERY & NELMS, 1990). Pyrazine kommen häufig in Kombination mit toxischen Substanzen und Warnfärbung bei Insekten vor, bei diesem so genannten Mehrkomponenten-Warnsystem sind Methoxyalkylpyrazine oder Methylalkylpyrazine für den Warngeruch verantwortlich (MOORE & BROWN, 1981; ROTHSCHILD & MOORE, 1987; ROWE & GUILFORD, 1999, 1996). Die in Insekten vorkommenden Pyrazine werden entweder von den Tieren über die Nahrungspflanze aufgenommen, wie es beispielsweise bei dem Monarchfalter (*Danaus plexippus*) der Fall ist, oder aber vom Insekt selbst synthetisiert, wie beim Karminbären (*Tyrea jacobaeae*) (ROTHSCHILD et al., 1984; ROTHSCHILD & MOORE, 1987). MOORE et al. (1990) konnten bei ihren Analysen auf Methoxyalkylpyrazine bei 26 von 45 untersuchten aposematisch gefärbten Insekten einen positiven Befund liefern, darunter war auch der Spurennachweis von 2-Methoxy-3-isobutylpyrazin und 2-Methoxy-3-isopropylpyrazin bei der *C. vulnerata*. In der vorliegenden Arbeit konnte keines dieser beiden Methoxyalkylpyrazine in der Hämolymphe der Blutzikade nachgewiesen werden, stattdessen konnte ein für *C. vulnerata* bisher nicht beschriebenes Methylalkylpyrazin (3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin) gefunden werden (3.3.3).

Seinen Ursprung hat der Pyrazinring in der Kondensationsreaktion zwischen verschiedenen carbonylhaltigen Substanzen oder Polyhydroxy-Verbindungen (z. B. reduzierende Zucker) mit Ammoniak oder Aminosäuren (BARLIN, 1982). Methylalkylpyrazine bilden sich auch nicht-enzymatisch bei der Wärmebehandlung von Lebensmitteln (z. B. bei der Herstellung von Kartoffelchips), wobei das Auftreten dieser Pyrazine mit der Höhe der Temperatur und

## 4 Diskussion

---

Dauer der Erhitzung ansteigt (MAGA & SIZER, 1973, 1978). Diese Art der Entstehung von Substanzen ist auch als Maillard-Reaktion bekannt. Der Nachweis des Methylalkylpyrazins bei *C. vulnerata* in der vorliegenden Arbeit könnte ebenfalls auf diese Maillard-Reaktion, durch Erhitzen der Hämolymphe im Injektor des GC auf 230 °C, zurückzuführen sein, zumal in der Hämolymphe von Insekten Aminosäuren und reduzierende Zucker enthalten sind. Bei dem in der vorliegenden Arbeit gefundenen Methylalkylpyrazin muss es sich somit nicht um einen Inhaltsstoff der Hämolymphe von *C. vulnerata* in vivo handeln. Bedauerlicherweise erbrachten die durchgeführten Analysen (Headspace-Analysen: SPME, Gerstel-Twister; HPLC-MS) keine Klärung dieser Unsicherheit.

### Indol

Indol ist ein aromatisches heterocyclisches Amin, bestehend aus einem Benzolring (Cyclohexan) und einem Heterocyclopentan, welches statt eines C-Atoms ein N-Atom mit gebundenem H-Atom besitzt. Indol ist leicht flüchtig und besitzt in höheren Konzentrationen einen intensiven an Fäkalien erinnernden Geruch. Gebildet wird Indol beim Abbau der Aminosäure Tryptophan. In Fäkalien ist es neben Skatol für den typischen Geruch verantwortlich. Es kommt aber auch in ätherischen Ölen vieler Blütenpflanzen vor (z. B. Jasminblütenöl, Neroliöl, Goldlackblütenöl) und wirkt bei der induzierten Abwehr von Pflanzen mit. Maispflanzen geben das Indol beispielsweise zusammen mit verschiedenen Aldehyden [(Z)-3-Hexenal, (E)-2-Hexenal], Alkoholen und Terpenoiden bei Fraß durch die Schmetterlingsraupe *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) ab, dieser Duft wirkt auf die Weibchen des Parasitoiden *Cotesia marginiventris*, welche ihre Eier in die Raupen des Eulenfalters legen, anlockend (TURLINGS et al., 1991). Auch in Insekten konnte das Indol nachgewiesen werden. Es wurde bei der Identifikation des Pheromons von *Holotrichia reynaudi* (Coleoptera: Scarabaeidae) gefunden; die Hauptkomponente war dabei allerdings das Anisol. Daneben fanden sich weitere Substanzen (Phenol, DMTS) deren Einfluss, ebenso wie der von Indol, auf die Geschlechteranlockung bei *H. reynaudi* unklar ist (LEAL et al., 1996; WARD et al., 2002). In dem Sekret der abdominalen exokrinen Drüsen des Schnellkäfers *Agrypnus murinus* (Coleoptera: Elateridae) konnte von DETTNER & BERAN (2000) ebenfalls das Indol neben dem Dimethyldi-, dem Dimethyltri- und dem Dimethyltetrasulfid nachgewiesen werden; die Autoren vermuten eine chemische Abwehr mittels dieser Substanzen. DUFFIELD et al. (1977) konnten ebenfalls eine von Indol ausgehende Abwehrwirkung zeigen: das Sekret der Köcherfliege *Pycnopsyche scabripennis*

(Trichoptera: Limnephilidae) wirkt auf die Arbeiterinnen von *Formica subsericea* (Hymenoptera: Formicidae) abstoßend. Indole sind auch bei Zikaden bereits nachgewiesen. Im Schaum der südamerikanischen Cercopide *Deois* sp. wurde Indol identifiziert (LISON, 1960 zit. nach MELLO et al., 1987) und im Körper der chinesischen Fulgoride *Lycorma delicatula* kommen zwei Indolalkaloide ( $\beta$ -Yohimbin und Ajmalicin) vor (XUE & YUAN, 1996).

#### **Niacinamid (Pyridin-3-carbamid, Nicotinsäureamid, Nicotinamid, Vitamin B<sub>3</sub>)**

Bei Niacinamid handelt es sich um eine Substanz, die an vielen Abläufen im Körper beteiligt ist. Ausgehend von der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan wird Niacinamid im Körper selbst gebildet. Es ist in Wasser, Alkohol und Glycerin leicht löslich. Das Niacinamid ist ein Bestandteil des Nicotinamid-Adenin-Dinucleotids (NAD<sup>+</sup>), welches dem Organismus meist als Oxidationsmittel dient, wobei es maximal zwei Elektronen aufnehmen kann und zu NADH + H<sup>+</sup> reduziert wird. Es wirkt im Citratzyklus und beim Fettabbau (BERG et al., 2003).

#### **Alkylsulfide (Thioalkane, Thioether)**

Die methylierten Sulfide sind niedermolekulare, leicht flüchtige Substanzen mit einem stechenden, widerlichen Geruch, der an Knoblauch und überreifen Käse erinnert. Alkylsulfide sind weit verbreitete Substanzen, die bei Mikroorganismen (Bakterien, Hefen, Phytoplankton), höheren Pilzen (*Phallus impudicus*), Schwämmen (Gattung *Ircinia*) und Pflanzen (verschiedene *Allium*- und *Brassica*-Arten, *Sauromatum guttatum*) nachgewiesen wurden (BONNARME et al., 2001; BORG-KARLSON et al., 1994; GEERVLIET et al., 1997; JONES et al., 1989; KAMEOKA et al., 1984; NEVITT, 2000; PAWLIK et al., 2002; RICHMOND, 1973). Aus dem Tierreich sind bisher wenige Vorkommen von Sulfiden bekannt: geringste Mengen wurden bei der spurenanalytischen Untersuchung der Wehr/Giftdrüse von *Polybia occidentalis* (Hymenoptera: Vespidae, [DANI et al., 2000]) nachgewiesen, im Alarmpheromon der afrikanischen Stinkameise (Hymenoptera: Formicidae: *Paltothyreus tarsatus*, [CREWE & FLETCHER, 1974]) und auch bei sozialen Wespen der Gattung *Ropalidia* (Hymenoptera: Vespidae, [FORTUNATO et al., 2004]), im Sekret der Kopfdrüsen eumenider Wespen (Hymenoptera: Eumenidae, [HEFETZ & BATRA, 1980]) und im Wehrsekret von Schnellkäfern (Coleoptera: Elateridae, [DETTNER & BERAN, 2000]). Alkylsulfide kommen auch in vielen Lebensmitteln vor (reifender Käse, Wein, Joghurt). Verschiedenen Käsesorten wie Cheddar, Limburger und Camembert verleihen Alkylsulfide ihr typisches Duftbouquet.

#### 4 Diskussion

---

Mikroorganismen (Hefen und Bakterien), die am Käseerigungsprozeß beteiligt sind, produzieren Alkylsulfide bei der enzymatischen Zersetzung der schwefelhaltigen Aminosäure L-Methionin (BONNARME et al., 2001; DEMARIGNY et al., 2000; DIAS & WEIMER, 1999). In den Headspace-Analysen von Hühnerexkrementen konnten CHAVEZ et al. (2004) nach der Fütterung mit D- und L-Methionin einen signifikanten Anstieg von DMTS feststellen. Waren die Hühner zuvor mit einer wässrigen Natrium-Methioninat Lösung gefüttert worden, so ließ sich mehr DMDS nachweisen. Dass Alkylsulfide aus Methionin synthetisiert werden können, zeigten CREWE & ROSS schon 1975. Sie fütterten afrikanische Stinkameisen mit markiertem Methionin und fanden, dass sich in den von der Ameise produzierten DMDS und DMTS die markierten Atome des Methionins nachweisen ließen. Nur das DMDS-Molekül wurde hierbei komplett aus Methionin gebildet, beim DMTS-Molekül blieb die Herkunft des mittleren S-Atoms unbekannt. DMDS und DMTS entstehen auch ohne die Hilfe von Enzymen bei der durch Ascorbinsäure und Übergangsmetalle vermittelten Oxidation von Methanthiol (CHIN & LINDSAY, 1994). Schwefelhaltige Verbindungen entstehen auch beim Erhitzen von Cystein und Xylose auf 180-200 °C (LEDL & SEVERIN, 1974). Als mögliche Quellen für S-Atome in Organismen kommen außer Methionin und Cystein z. B. noch Cystin, Taurin und Glutathion in Frage.

Bei Zikaden wurde nach meinem Kenntnisstand erstmals von S. Schulz, TU Braunschweig (in Lit. 2003) auf das Vorkommen dieser leicht flüchtigen schwefelhaltigen Substanzen hingewiesen. In der von mir überbrachten Hämolymphe-Probe von *C. vulnerata* konnte er mittels GC-MS Analyse die in der vorliegenden Arbeit ebenfalls gefundenen Alkylsulfide (3.2.1) nachweisen. Bei den von mir untersuchten Arten der Cercopidae konnte das DMTS in allen Individuen-Proben gefunden werden und war innerhalb der identifizierten leicht flüchtigen Hämolymphe-Inhaltsstoffe die Hauptkomponente. Die Konzentrationen, die mit dem GC-FID in der Hämolymphe ermittelt wurden, lagen in einem Bereich, der für die menschliche Nase noch gut wahrnehmbar sein sollte. Für das DMDS liegt der geruchliche Schwellenwert im Pikogramm Bereich (MOLIMARD & SPINNLER, 1996). Durch Riechen an einem Exhaustorglas mit dem zuvor über 20 *C. vulnerata*-Individuen eingesammelt wurden, konnte ein intensiver, unangenehmer Geruch wahrgenommen werden (eigene Beobachtung). Es erscheint plausibel, dass der Geruch von Alkylsulfiden von potenziellen Feinden ebenfalls wahrgenommen wird, möglicherweise noch deutlich besser als vom Menschen. So ist z. B. von antarktischen Röhrennasen-Seevögeln (Procellariiformes) bekannt, dass sie selbst über große Distanzen durch Phytoplankton (v. a. *Phaeocystis pouchetii*) emittiertes Dimethylsulfid

(DMS) wahrnehmen können, welches bei der metabolischen Zersetzung von Dimethylsulfoniopropionaten als Nebenprodukt anfällt. Das Phytoplankton gibt bei Fraß durch Zooplankton stark erhöhte Mengen an DMS ab. Die Röhrennasen, die sich von Zooplankton ernähren, werden von dem DMS-Geruch angelockt (NEVITT et al., 1995; NEVITT, 2000; DALY & DiTULLIO, 1996). Eine Anlockung von Vögeln durch den Geruch von Alkylsulfiden in der Hämolymphe von *C. vulnerata* ist jedoch unwahrscheinlich, da die Tiere nur beim Reflexbluten Hämolymphe abgeben und die gefundene Menge an Alkylsulfiden für eine Fernlokalisierung als zu gering erscheint. Möglich ist aber, dass auch andere Vogelarten als Röhrennasen den Geruch wahrnehmen und sich gut an diesen erinnern, wie es für Pyrazine bereits gezeigt wurde (s. o.).

Auch in weiteren untersuchten Zikadenarten konnte gelegentlich DMTS nachgewiesen werden, wengleich nicht alle Individuen-Proben dieser Arten DMTS aufwiesen. Interessant ist das sporadische Vorkommen von DMTS in der Hämolymphe von *P. spumarius* (in 4 von 11 Individuen-Proben), da es sich hierbei im Gegensatz zu den weiteren positiven Befunden anderer Arten um Mengen handelte, die ähnlich hoch waren wie die bei den Arten der Cercopidae.

Da die Entstehung schwefelhaltiger Verbindungen auch unter Hitzeeinwirkung möglich ist, kann letztlich nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die Nachweise der Alkylsulfide in der Hämolymphe der untersuchten Zikaden zum Teil auch auf ein methodisches Artefakt zurückzuführen sein könnten. Die Hämolymphe wurde im Injektor des GC auf 230 °C erhitzt, und es ist durchaus möglich, dass sich die Alkylsulfide hierbei aus Zerfallsprodukten der in der Hämolymphe vorhandenen Aminosäuren bilden. Bei den Headspace-Analysen mit dem Gerstel-Twister konnte aber DMTS nachgewiesen werden, was bedeutet, dass dieses Alkylsulfid in kalter Hämolymphe von *C. vulnerata* vorgelegen haben muss: Die Ansammlung von Aminosäuren auf der Faser des Gerstel-Twisters kann für die bei Raumtemperatur durchgeführte Analyse aufgrund der schweren Flüchtigkeit von Aminosäuren ausgeschlossen werden. Für die durchgeführten GC-MS Analysen der Hämolymphe lässt sich hingegen nicht belegen, dass die gesamte Menge an Alkylsulfiden schon vor dem Erhitzen in der Hämolymphe vorgelegen hat. Ein undefinierter Teil der Alkylsulfide kann methodisch bedingt sein. Dass die gesamte Menge der Alkylsulfide aus den Cercopiden auf einen methodischen Fehler zurückgeht, ist unwahrscheinlich, zumal die als Kontrolle dienenden Analysen der Mittelmeerfeldgrille (*Gryllus bimaculatus*) keine

Alkylsulfide aufwiesen. Des Weiteren sei darauf hingewiesen, dass bei anderen Untersuchungen, die am selben GC-MS durchgeführt wurden, keine Alkylsulfide gefunden werden konnten. Auch erscheinen die gefundenen Mengen des DMTS in den Hämolympf-Proben der *C. vulnerata*-Individuen als zu groß, als dass sie allein durch einen methodischen Fehler bedingt wären.

### 4.5 Bedeutung der Endosymbionten und Herkunft der Alkylsulfide

Woher stammen die Alkylsulfide in der Hämolymphe bei *C. vulnerata*? Da in ihren Nährpflanzen bisher keine Alkylsulfide nachgewiesen wurden, ist anzunehmen, dass die Alkylsulfide im Körper der Blutzikaden gebildet werden. Bei der Entstehung von Sulfiden bzw. deren Ausgangsprodukten sind häufig Mikroorganismen beteiligt (BONNARME et al., 2001; DEMARIGNY et al., 2000; DIAS & WEIMER, 1999; MOLIMARD & SPINLER, 1996; SCHWIMMER & FRIEDMAN, 1972). Verschiedenste Prokaryoten (Bacteria und Archaea) sowie Eukaryoten kommen als Endosymbionten in Insekten vor. Die meisten Endosymbionten lassen sich allerdings unter Laborbedingungen nicht kultivieren (BAUMANN & MORAN, 1997).

Alle Vertreter der Homoptera, die sich von Phloem- bzw. Xylemsaft ernähren, sind auf das Zusammenleben mit Endosymbionten angewiesen, um die nährstoffarme und unausgewogene Nahrung zu komplettieren. Zikaden sind ausnahmslos Pflanzensaftsauger und besitzen – abgesehen von den Vertretern der Unterfamilie Typhlocybinæ (Cicadellidae), welche die Mesophyllzellen von Pflanzenblättern aussaugen – Endosymbionten. Die intrazellulär lebenden Symbionten der Zikaden sind in speziellen Wirtszellen (Bakteriocyten) untergebracht, wobei einige Zikadenarten bis zu sechs verschiedene Symbiontenarten gleichzeitig beherbergen können (BUCHNER, 1953). Die Bakteriocyten sind meist in gemeinsamen Symbiontenorganen, den Mycetomen (oder Bakteriomen), geordnet (KÖRNER, 1969). Durch intraovariolen Infektion werden die Symbionten an die nächste Zikadengeneration weitergegeben (KÖRNER, 1972, 1974; SCHWEMMLER, 1973). Im Vergleich mit den Phloemsaugern, denen mit den Assimilaten immerhin eine Reihe organischer Verbindungen zur Verfügung steht, nutzen Xylemsaftsauger eine noch nährstoffärmere Nahrung. Die Xylemsaftsauger müssen zudem aktiv gegen den im Xylem herrschenden Unterdruck ansaugen. Aus diesem Grund besitzen die Vertreter der Cercopidae eine starke muskulöse Saugpumpe (BACKUS, 1985). Der Xylemsaft besteht hauptsächlich aus Wasser (ca. 98%), anorganischen Verbindungen und Mineralstoffen; organische Verbindungen kommen

nur in geringen Mengen und in unausgewogenen Mischungsverhältnissen vor, wobei die Zusammensetzung des Xylemsaftes von der Pflanzenart, deren physiologischem Zustand, der Phänologie sowie der Jahres- und Tageszeit abhängt (ANDERSEN & BRODBECK, 1989; BRODBECK et al., 1990, 1993; MALAGUTI et al., 2001; MATTSON, 1980; WHITE, 1993). Bei den wenigen vorhandenen Aminosäuren im Xylemsaft handelt es sich hauptsächlich um nicht-essentielle AS; essentielle AS und Vitamine werden von den Symbionten produziert (DOUGLAS, 1998; WU et al., 2006). In den paarigen lateral im Abdomen liegenden Mycetomen der Cercopidae kommen zwei verschiedene Symbiontenarten vor (BUCHNER, 1925). Von Buchners Schüler (MÜLLER, 1962) wurden sie später als Hauptsymbiont *a* und als Nebensymbiont *Bc* benannt. Neuere molekularbiologische Untersuchungen zeigten, dass es sich bei den Hauptsymbionten *a* um ein Bakterium des Phylums *Bacteroidetes* (Candidatus *Sulcia muelleri*) handelt sowie dass der Nebensymbiont meist den Betaproteobacteria angehört (MORAN et al., 2005). Die molekularbiologischen Untersuchungen der Mycetome von *C. vulnerata* in dieser Arbeit lieferten die DNA-Sequenz von mindestens einem bakteriellen Mikroorganismus. Die Bakterienart konnte nicht identifiziert werden. Interessanterweise wies die bakterielle Sequenz aus der Blutzikade (*C. vulnerata*) beim Vergleich mit der Datenbank (Blast search, siehe Kap. 3.7) eine hohe Ähnlichkeit mit dem Syncytium-Endosymbionten der Psyllide *Diaphorina citri* auf (SUBANDIYAH et al., 2000). Auch alle weiteren Treffer gehörten den Betaproteobakterien an, so dass angenommen werden darf, dass die bakterielle DNA aus den Mycetomen der Blutzikade isoliert wurde und einem Symbionten zuzuordnen ist, bei dem es sich ebenfalls um einen Vertreter der Betaproteobacteria handelt (Bacteria; Proteobacteria). [Anmerkung: Im Deutschen ist der Begriff Mycetom gebräuchlicher als der Begriff Bakteriom und wird deswegen hier verwendet, obwohl der Begriff Bakteriom in diesem Fall wissenschaftlich exakter wäre, da es sich bei den Endosymbionten um Bakterien handelt.]

Für die Aphide *Neomyzus circumflexus* konnte mittels Tracerversuchen gezeigt werden, dass Sulfat in Cystein, Methionin, Taurin, Glutathion sowie weitere Verbindungen umgewandelt wird (EHRHARDT, 1969). Für diesen Schwefelstoffwechsel sind die Endosymbionten der Aphide verantwortlich, wie EHRHARDT durch symbiontenfreie Aphiden (nach Antibiotikum-Behandlung) zeigen konnte. Bei diesen Tieren wies er ausschließlich das radioaktiv markierte ( $^{35}\text{SO}_4$ )<sup>2-</sup> nach. Über den Beitrag von Endosymbionten zur Ernährungsphysiologie ist bei Aphiden viel gearbeitet worden. Einen guten Überblick gibt der Reviewartikel von WILKINSON (1998). Für die Zikaden existiert, meines Wissenstandes nach, nur eine kürzlich

#### 4 Diskussion

---

erschienene vergleichbare Untersuchung von WU et al. (2006). Die Autoren untersuchten die beiden Endosymbiontenarten, das Gammaproteobakterium Candidatus *Baumannia cicadellinicola* und die Bacteroidetes-Art Candidatus *Sulcia muelleri*, der xylemsaftsaugenden Schmuckzikade *Homalodisca coagulata* (Cicadomorpha, Cicadellidae) auf ihre Funktion hin. Die Autoren dieser molekularbiologischen Studie postulieren, dass *B. cicadellinicola* hauptsächlich B-Vitamine und einige AS, darunter Histidin und Methionin, und *S. muelleri* essentielle AS für ihren Wirt herstellen.

Nach der Antibiotikum-Behandlung der *C. vulnerata*-Individuen in dieser Arbeit konnte kein verminderter Gehalt des Alkylsulfids DMTS gemessen werden. Anhand dieses Ergebnisses kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass DMTS beim Schwefelstoffwechsel des Endosymbionten entstanden ist. Ein Vergleich der Größe der Mycetome von mit Tetracyclin behandelten und unbehandelten Tiere erbrachte nämlich ebenfalls keinen Unterschied. Es ist somit wahrscheinlich, dass die Antibiotikum-Behandlungen ohne nennenswerte Auswirkung auf die Symbionten geblieben waren. Mit Tetracyclin wurde ein Antibiotikum eingesetzt, welches sich durch eine Breitbandwirkung auszeichnet und bereits in vielen Untersuchungen mit Blattläusen erfolgreich zur Abtötung der Symbionten eingesetzt wurde (EHRHARDT & SCHMUTTERER, 1966; EHRHARDT et al., 1966; HOUK & GRIFFITHS, 1980; WILKINSON, 1998). Die Wahl des Antibiotikums Tetracyclin war somit gut begründet; ein zweites Experiment (Ergebnisse nicht dargestellt), in dem das Antibiotikum Rifampicin eingesetzt wurde (12 behandelte, 6 Kontrolltiere), erbrachte ebenfalls keinen messbaren Unterschied in der DMTS-Konzentration der Hämolymphe behandelter und unbehauelter Tiere. Es darf angenommen werden, dass auch die Rifampicin-Behandlungen ohne messbare Auswirkung auf die Endosymbionten von *C. vulnerata* geblieben sind. Als Grund hierfür sind mehrere Fehlerquellen denkbar: (1) Die Einwirkzeit des Antibiotikums war nicht ausreichend; (2) Trotz der Blattlausbefunde handelt es sich um ein ungeeignetes Antibiotikum für diese Zikade; (3) Beim Spritzen ist möglicherweise ein großer Teil des Antibiotikums wieder herausgedrückt worden oder von der Einstichstelle im Thorax nicht zu den Mycetomen im Abdomen transportiert worden. Inwieweit die Endosymbionten von *C. vulnerata* an deren Schwefelstoffwechsel beteiligt sind, und ob Alkylsulfide hierbei als Sekundärmetabolite anfallen, muss somit offen bleiben.

Bei der Ausmessung der Mycetome ergab sich zwar kein Unterschied zwischen behandelten und unbehauelten Tieren, aber die beiden Geschlechter unterschieden sich in der Größe ihrer

Mycetome signifikant. Im männlichen Geschlecht war die Größe deutlich geringer, dieser Befund deckt sich mit der Angabe von BUCHNER (1925), der Vertreter der Art *Cercopis sanguinolenta* untersuchte. BUCHNER fand bei den Männchen sowohl die Binnen- als auch Rindenzone schwächtiger ausgebildet und die Mycetomgröße im Vergleich zu den Weibchen deutlich herabgesetzt.

#### 4.6 Schwarz-rote Färbung bei *Cercopis*: Täuschung oder Warnung?

Die schwarz-rote Färbung der Cercopidae macht sie zu auffälligen Objekten, die aus dem grünen Hintergrund ihres Graslandhabitats herausstechen. Eine solche Färbung wird als Warnfärbung oder Aposematismus bezeichnet, wenn deren Träger durch chemische Stoffe geschützt oder anderweitig wehrhaft ist. Ist der Träger hingegen ungeschützt, spricht man von Scheinwartracht oder auch Bates'scher Mimikry (BATES, 1862 zitiert nach WICKLER, 1971). Der letztere Fall ist von Vorteil, wenn diese Färbung der Färbung eines wirklich geschützten Tieres gleicht. Es muss also ein „Vorbild“ existieren, von dem ein potentieller gemeinsamer und optisch jagender Prädator (Signalempfänger) gelernt haben kann, derart gefärbte Tiere zu meiden. Nach dem Wallace'schen Häufigkeitskriterium sollte der zu Täuschende seltener auf den „Nachahmer“ als auf das Vorbild treffen (POULTON, 1890). Je häufiger das Vorbild im Verhältnis zu seinem Nachahmer vorkommt und je ungenießbarer (aber nicht tödlich giftig) das Vorbild ist, umso besser ist der Schutz für beide (LINDSTRÖM et al., 1997). Dass dieses Häufigkeitskriterium allerdings nicht immer zutrifft, lässt sich anhand des Beispiels der schwarz-gelb gestreiften Schwebfliegen (Diptera: Syrphidae) und deren Vorbildern, den schwarz-gelb gestreiften wehrhaften sozialen Wespen (Hymenoptera: Vespinae) zeigen: Die Schwebfliegen sind im Frühjahr und Frühsommer deutlich häufiger als ihre Vorbilder (WALDBAUER et al., 1977). WALDBAUER (1988) vermutet hierbei eine zeitlich versetzte Abfolge von Nachahmer und Vorbild. Die Schwebfliegen haben eine hohe Abundanz, wenn erst wenige Wespen-Arbeiterinnen fliegen, aber auch noch keine flügge gewordenen Jungvögel als mögliche Prädatoren anzutreffen sind. Im Hochsommer, wenn die insektivoren Jungvögel am häufigsten sind, sind die Wespen-Arbeiterinnen deutlich häufiger als die Schwebfliegen. Auf diese Weise, vermutet WALDBAUER, verringern die Nachahmer das Risiko, mit Prädatoren zusammenzutreffen, die noch keine schlechten Erfahrungen mit dem Farbmuster gemacht haben.

#### 4 Diskussion

Als Prädatoren der Schaumzikaden kommen einige Tiergruppen in Betracht. Prädatorische Insekten, wie z. B. Sichelwanzen (Hemiptera: Nabidae), Libellen (Odonata), Raubfliegen (Diptera: Asilidae) oder Laubheuschrecken (Ensifera) könnten dazu gehören. Ameisen kommen direkt und indirekt (durch die Nutzung des Schaums zum Errichten von Blattlausbehausungen) als Prädatoren von Schaumzikadennymphen vor, wie HENDERSON et al. (1990) bei einer Studie in Nordamerika an der Ameisenart *Formica montana* und der Wiesenschaumzikade (*Philaenus spumarius*) zeigen konnten. Die Größe der Population der Schaumzikadennymphen betrug in Plots, zu denen die Ameisen Zutritt hatten, im Monat Juni



**Bild 37: *Cercopis vulnerata* als Beute von *Xysticus* sp. (Fränkische Schweiz, Mai 2001).**

(1987 und 1988) nur 5% im Vergleich zur Anzahl der Schaumzikadennymphen in Plots, in denen Ameisen künstlich ausgeschlossen wurden. Spinnen kommen ebenfalls als Prädatoren von Zikaden in Frage; wie in Bild 37 zu sehen, gehören Blutzikaden auch zum Nahrungsspektrum von Krabbenspinnen (Thomisidae). Zikaden könnten einen hohen Anteil an der Nahrung von Vögeln zu haben, leider existieren hier nur wenige Daten. Zwar sind zahlreiche Untersuchungen zur Nestlingsnahrung von Vögeln im deutschen Raum vorgenommen worden, nur wurde dabei kaum auf niedrigere Taxa von Nahrungsobjekten eingegangen, sondern die Objekte wurden pauschal nach Familien oder Ordnungen zusammengefasst. Allerdings geben die Zahlen in der von EMMRICH (in lit. 2003) durchgeführten Untersuchung in den Jahren 1965-67 auf der Insel Hiddensee zum Nahrungsspektrum der Dorngrasmücke (*Sylvia communis*) einen guten Hinweis darauf, welche Bedeutung insektivore Vögel als Prädatoren der Blutzikaden haben. Im Durchschnitt der drei Jahre machte der Anteil der Adulti von *Philaenus spumarius* 0,6-1,6% und von *Aphrophora alni* 1,1-1,8% und der Nymphen beider Arten 3,6-7,2% der Stückzahl der Beutetiere aus (*C. vulnerata* fehlte im Gebiet!). Durch die Untersuchung des Mageninhalts einzelner weniger Vögel konnte EMMRICH auch für die Altvögel die Aufnahme von adulten Vertretern dieser beiden Cercopoidea zeigen. Die Nymphen der Cercopoidea werden aufgrund ihrer wenig chitinösen Strukturen schnell verdaut und sind deshalb im Magen schwer

#### 4.6 Schwarz-rote Färbung bei *Cercopis*: Täuschung oder Warnung?

nachzuweisen. Beim Hausrotschwanz (*Phoenicurus ochruros*) konnten 15 *C. vulnerata*-Individuen von MAY (1974 zit. nach BLOTZHEIM, 1988) in der Nahrung nachgewiesen werden. Eine Studie von WIEGERT (1964) befasste sich mit nistenden Sperlingsvögeln (Passeriformes: *Spizella pusilla*, *S. passerina*, *Poecetes gramineus*). Diese Vögelarten gehörten zu einer wichtigen Räubergruppe von adulten *P. spumarius*-Individuen in Nordamerika (Michigan); die Sperlingsvögel konnten ca. 10% der Mortalität der Schaumzikaden verursachen. Die Adulte der *Cercopis*-Arten könnten somit potentiell als Beuteobjekte von Singvögeln in Frage kommen, die Nymphen sind aufgrund ihres Aufenthalts im Boden für diese allerdings nicht erreichbar.

In Deutschland tritt weder *C. vulnerata* noch *C. sanguinolenta* in Habitaten auf, in denen zeitgleich in ausreichender Anzahl eine alleinige Art als Vorbild für ihre Färbung zu finden ist. Die Rotwidderchen (Lepidoptera: Zygaenidae, Zygaeninae) zeigen für das menschliche Auge eine hohe Ähnlichkeit mit den *Cercopis*-Arten; dass es sich hierbei um eine Mimikry handeln könnte, wurde von SBORDONI et al. (1985) postuliert. Allerdings konnten EVANS et al. (1985) mittels Biotest zeigen, dass dies für die eingesetzte Vogelart (*Coturnix coturnix*) nicht der Fall ist. Das Rotwidderchen *Zygaena filipendulae* wurde von allen Wachteln attackiert, obwohl diese Vögel zuvor schlechte Erfahrungen mit der schwarz-roten Färbung gemacht hatten, als sie versuchten, Vertreter von *Cercopis intermedia*, *Caenocoris nerii* (Hemiptera: Lygaeidae) und *Eurydema decoratum* (Hemiptera: Pentatomidae) zu fressen. Für einen Lernerfolg scheint bei der Wachtel nicht nur die Färbung der Beute wichtig zu sein, sondern auch deren Gestalt. Dass *C. intermedia* und die beiden Wanzenarten von der Signalnormung (gleiche Gestalt und Farbe, aber nicht Musterung) profitieren, konnten EVANS et al. (1987) bei Versuchen mit Wachteln ebenfalls zeigen. Die Autoren vermuten, dass diese drei schwarz-rot gefärbten Arten gleichermaßen unschmackhaft sind.

Die schwarz-rote Färbung kommt auch bei einer Reihe anderer chemisch geschützter Insekten, z. B. bei Vertretern der Coccinellidae, Arctiidae (*Tyria jacobaeae*), Pyrrhocoridae, Pentatomidae (*Graphosoma lineatum*), Cleridae (*Trichodes* spp.), Staphylinidae (*Paederus* spp.) usw., vor. Die Farben per se (hauptsächlich Rot und Gelb) scheinen auf optisch orientierte Tiere eine Signalwirkung zu besitzen. Bei naiven Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*) löste die Farbe Rot einen effektiven Reiz aus: so gefärbte Beute wurde deutlich weniger attackiert (SILLÉN-TULLBERG, 1985). Ebenso konnte ROPER (1990) mit braun bzw. rot eingefärbten Mehlwürmern (*Tenebrio molitor*-Larven) als Beuteobjekte für Hühner

#### 4 Diskussion

---

zeigen, dass braune Beute häufiger als rot gefärbte Beute attackiert oder als erstes gefressen wurde, wobei es keine Rolle spielte, ob der Autor die Beuteobjekte auf rotem oder braunem Untergrund anbot. Fasanenküken (*Phasianus colchicus*) gingen rote Beuteinsekten vorsichtig an oder lehnten sie vollständig ab (WRAZIDLO, 1991). Bei diesen Untersuchungen wurden Vögel eingesetzt, die zuvor keinerlei Erfahrung mit gefärbter Beute hatten, die Ablehnung dieser Vögel gegenüber Warnfarben ist somit nicht mit vorausgegangenen Erfahrungen erklärbar. Die Reaktion, die von einer Farbe ausgelöst wird, kann artspezifisch unterschiedlich sein: Fasane zeigten die größte Ablehnung gegenüber rot gefärbter Beute, wohingegen Hühner die größte Ablehnung gegenüber schwarzer Beute zeigten (SCHULER & ROPER, 1992). Zusätzlich zur Farberkennung besteht bei Hühnern ein hervorragendes Erinnerungsvermögen für bestimmte Farben (OSORIO et al., 1999). Die Reaktion der Vögel gegenüber warnfarbiger Beute beruht also auf einem angeborenem Verhalten, welches durch schlechte Erfahrungen noch verstärkt werden kann. Auch die Libelle *Aeshna grandis* (Odonata) reagierte auf bestimmte Farben (schwarz-gelb gestreift) mit Ablehnung (KAUPPINEN & MAPPES, 2003). Bei den Blutzikaden sind die roten Flecken zusätzlich mit Schwarz kontrastiert, was die Signalwirkung von Rot noch verstärkt. Es scheint plausibel, dass das Erscheinungsbild der Blutzikade als Warnsignal für optisch orientierte Prädatoren fungiert. Anzuführen bleibt allerdings, dass die signalrote Färbung der Blutzikaden, wie sie dem menschlichen Auge erscheint, von Tieren anders wahrgenommen werden könnte.

Die Auffälligkeit hat den Nachteil, dass das Risiko, überhaupt von einem potentiellen Feind gesehen zu werden, höher ist als bei kryptisch gefärbten Arten. Solange bis Prädatoren gelernt haben so gefärbte Tiere zu meiden, sollte die Auffälligkeit einen erhöhten Feinddruck mit sich bringen. Erst mit unangenehmer Erfahrung der Prädatoren, bewirkt durch einen chemischen Schutz oder sonstige Wehrhaftigkeit, profitieren die aposematischen Arten. Bei ungeschützten Arten ist Auffälligkeit sicherlich ungleich stärker nachteilig, wenn kein Vorbild für diese Färbung existiert. Die Evolution von Aposematismus ist seit DARWIN (1871) ein Paradoxon, womit sich die Biologie bis heute eingehend auseinandersetzt (GAMBARALE & TULLBERG, 1996; GUILFORD, 1990; HÄRLIN & HÄRLIN, 2003; LINDSTRÖM et al., 1999; MALLET & JORON, 1999; MARPLES et al., 2005; THOMAS et al., 2004).

Für die Abwehrstrategie der Blutzikaden lässt sich folgende Hypothese formulieren: Möglicherweise handelt es sich bei der schwarz-roten Färbung sowohl um eine Warnfärbung als auch um eine Scheinwarnfärbung. Niedermolekulare und flüchtige toxische Substanzen

#### 4.6 Schwarz-rote Färbung bei Cercopis: Täuschung oder Warnung?

konnten nicht gefunden werden, weshalb man davon ausgehen kann, dass diese Tiere durchaus genießbar sind, auch wenn möglicherweise mit anderen Methoden doch eine toxische Substanz nachgewiesen werden könnte. Somit handelt es sich wahrscheinlich um eine genießbare Art, die durch die schwarz-rote Färbung als Nachahmer einer weit verbreiteten und häufig echten Warnfärbung gelten kann. Obwohl kein Vorbild zeitgleich im selben Gebiet (sympatrisch) vorkommt, könnte die Blutzikade davon profitieren, dass sich Vögel Farben lange merken können und vielleicht bereits im Vorjahr oder im Winterquartier schlechte Erfahrungen mit farblichen Vorbildern gemacht haben. Auch von der angeborenen Skepsis der Vögel gegenüber der Farbe Rot könnte die Blutzikade profitieren. Von Vögeln ist außerdem bekannt, dass sie mit aposematisch gefärbten Beutetieren vorsichtig umgehen: die Sperlingsvögel (Passeriformes) berührten potentielle Beuteobjekte mit Warntracht erst leicht mit dem Schnabel, während nicht-apsematische gefärbte Beuteobjekte mehrmals gepickt und meist verschlungen wurde (EXNEROVA et al., 2003). Bei schwarz-gelb gefärbten Beuteobjekten ist im Vergleich zu olivfarbener Kontrollbeute die Wahrscheinlichkeit deutlich höher, dass mit fortschreitender Angriffsphase (Reaktion, Anpicken, Bearbeiten, Fressen) junge Fasanen- und Hühnerküken den Angriff abbrechen (WRAZIDLO, 1991; SCHULER & HESSE, 1985). Zusätzlich lässt sich anführen, dass die Arten der Cercopidae höchstens am Ende ihrer Adultphase mit naiven insektivoren Vögeln konfrontiert werden. Ab Mitte Juli findet man im Bayreuther Umland kaum noch adulte Vertreter der Cercopidae; bemerkenswert ist, dass Vertreter der unauffällig gefärbten Schwesterfamilie (Aphrophoridae) hingegen den ganzen Sommer hindurch bis in den November hinein vorkommen. Theoretisch ist denkbar, dass die Blutzikade mit ihrer Auffälligkeit im Sommer einem deutlich höheren Feinddruck ausgesetzt wäre. Für die unauffälliger gefärbten Arten der Aphrophoridae gilt dieses wahrscheinlich nicht im selben Maße, weshalb sie v.a. im Sommer zu finden sind; natürlich könnte es hierfür auch eine andere Erklärung geben, wie z. B. phänologische Unterschiede bei den heimischen Vertretern beider Familien (Eiüberwinterung vs. Larvalüberwinterung).

Zusätzlich zur Scheinwarnfärbung könnte auch noch ein Scheinwarngeruch als Feindabwehr eingesetzt werden. Bei einem Angriff durch einen Prädator würden mit der Abgabe des Reflexblutes die in dieser Arbeit identifizierten leicht flüchtigen übel riechenden Substanzen aus der Hämolymphe entweichen und somit den Scheinwarngeruch verursachen. Der Geruch könnte dem Angreifer bedeuten, dass er es mit einem übel schmeckenden Insekt zu tun hat. Bei dem hierdurch irritierten Angreifer könnte dies zu einem Loslassen der Beute führen,

woraufhin sich die Blutzikade mit einem schnellen Sprung in Sicherheit bringen könnte. Der Angreifer hat somit keine Gelegenheit, sich die Beute genauer zu betrachten und zu probieren, um sie dann möglicherweise doch als schmackhaft anzunehmen. Die eigentliche Abwehr der Blutzikaden wäre somit die Flucht, wie es auch PECK (2000) für die auffällig gefärbten Vertreter der südamerikanischen Cercopidae postulierte. Wenn Angriffe von Prädatoren aus diesen Gründen meist erfolglos bleiben, ist die Blutzikade kein lohnenswertes Beuteobjekt, und somit handelt es sich bei ihrer Färbung doch auch um eine wirkliche Warnfärbung. Bei der polymorphen Wiesenschaumzikade (*Philaenus spumarius*) vermutet THOMPSON (1973) eine ebensolche Warnfärbung für die *marginella*-Morphe. Deren auffällige Hell-Dunkel-Färbung ist leicht für Prädatoren wiederzuerkennen und mit vorangegangenen frustrierenden Erlebnissen mit dieser schnell flüchtenden Beute in Verbindung zu bringen. Über die interspezifische Bedeutung der Färbung für Prädatoren hinaus könnte von der Färbung auch ein intraspezifisches Signal ausgehen. Es ist durchaus möglich, dass die auffällige Färbung hilft, dass zwei Individuen sich finden und ihr somit eine Bedeutung bei der Partnerfindung zukommt. Ebenso ist es denkbar, dass die Färbung die Männchen der Blutzikade zum Werbegesang stimuliert. Obwohl sich die Geschlechter in ihrer Färbung nicht unterscheiden, kann die Auffälligkeit den Zikaden dennoch dienlich sein, überhaupt einen Artgenossen zu finden. Beim Kontakt zweier Tiere kommen dann vermutlich chemische Signale zum Einsatz, zumal die Männchen, bevor es zur Kopula kommt, die Weibchen mit den Vorderbeinen betriellern, wie KEHLMAIER (2000) beobachten konnte. Möglicherweise dienen die in dieser Arbeit gefundenen geschlechtsspezifischen cuticulären Kohlenwasserstoffe hierbei als Sexualpheromone. Die auffällige Färbung der Blutzikade wäre dann nicht nur als Warnfärbung und Scheinwarnfärbung zu interpretieren, sondern auch als Lockfärbung. Der Nachteil dieser Färbung, eben die erhöhte Auffälligkeit auch für Prädatoren, könnte damit kompensiert sein, dass ihr auch eine gelernte und angeborene Abschreckung zukommt, zumindest für manche insektivore Vögel. Auf andere Prädatoren könnten die Färbung und der von dem Reflexblut ausgehende Geruch ohne Wirkung bleiben, wie z. B. meine Beobachtung eines durch eine Krabbenspinne (Thomisidae) erbeuteten *C. vulnerata*-Individuums zeigt (Bild 37). Selbst die Gruppe der insektivoren Vögel muss man differenziert betrachten, da zwei Arten völlig unterschiedliches Nahrungswahlverhalten haben können (EXNEROVA et al., 2003). Ein durch Warnwirkung erreichter Schutz kann niemals absolut, sondern nur relativ sein. Doch dieser relative Schutz bedeutet einen Selektionsvorteil, wenn die Wahrscheinlichkeit, einem Prädatator zum Opfer zu fallen, geringer ist, als bei vergleichbaren anderen Beutetieren ohne Warnwirkung.

Zusammenfassend scheint es plausibel, dass sich die Blutzikade mit einer Mehrkomponenten-Abwehr vor Feinden schützt. Die Art profitiert von (i) ihrer verborgenen Lebensweise im Nymphenstadium (Feindmeidung), (ii) ihrer auffälligen Färbung als Alarmsignal für Vögel, (iii) ihrer Fähigkeit zum Reflexbluten und dem damit emittierten Geruch (Feindirritierung) sowie (iv) ihrem sehr gutem Fluchtvermögen. In der vorliegenden Arbeit wurden keine Indizien gefunden, welche diese Hypothese widerlegen. Allerdings wäre die Durchführung von Biotests unbedingt erforderlich: Hierfür wäre es wünschenswert, Prädatoren in Fraßwahlversuchen lebende und tote Blutzikaden als Beuteobjekte anzubieten. Diese könnten weitere Hinweise zur Schmackhaftigkeit, zum Reflexblutverhalten und zum Fluchtvermögen der Blutzikade bei Prädator-Angriff liefern. Als Prädatoren wären insektivore Vogelarten gut geeignet, in deren Nahrungsspektrum adulte Schaumzikaden bereits nachgewiesen sind. Tests im Vergleich mit naiven und erfahrenen Vögeln sowie Untersuchungen an Vögeln zur Wahrnehmbarkeit von Alkylsulfiden wären ebenfalls hilfreich. Des Weiteren wären Biotests wünschenswert, welche sowohl die Bedeutung der auffälligen Färbung für die Partnerfindung als auch die biologische Bedeutung der Oberflächenalkene bei *C. vulnerata* untersuchen.

## 5 Zusammenfassung / Summary

### 5.1 Zusammenfassung

Während chemische Abwehr bei vielen Insektengruppen intensiv untersucht wurde, ist bei Zikaden (Cicadomorpha, Fulgoromorpha) wenig darüber bekannt, inwieweit diese Abwehrstoffe einsetzen. Lediglich das Vorkommen von Cantharidin und Indolalkaloiden in *Lycorma delicatula* (Fulgoromorpha: Fulgoridae) ist bislang beschrieben. Ein weiterer Wirkstoff mit Bedeutung für die Feindabwehr ist das nicht giftige Methoxy-pyrazin, welches in der Blutzikade *Cercopis vulnerata* (Cicadomorpha: Cercopidae) vorkommt. Diese auffällig schwarz-rot gefärbte Blutzikade mit der Fähigkeit zum Reflexbluten – einem bei vielen anderen chemisch geschützten Insekten bekannten Verhalten – stand im Mittelpunkt der Untersuchung. Alle weiteren in Deutschland vorkommenden Arten der Cercopidae und einige Arten der Schwesterfamilie Aphrophoridae konnten durch mechanische Reizung erfolgreich auf Reflexbluten getestet werden. Es wird gezeigt, dass es sich bei dem von *C. vulnerata* am Prätarsus abgegebenen Flüssigkeitstropfen tatsächlich um Hämolymphe handelt. Mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) wurden die Hämolymphe-Inhaltsstoffe von Weibchen und Männchen sowie von verschiedenen Zikadenarten

miteinander verglichen und potenzielle Abwehrstoffe in *C. vulnerata* und weiteren Zikaden gesucht. Außerdem wurde versucht, die Herkunft dieser Wirkstoffe zu klären; deren Bedeutung für die Feindabwehr wird diskutiert.

Die Totalionenstromchromatogramme (TICs) der Hämolymp-Probenn von Weibchen und Männchen der schwarz-rot gefärbten Cercopiden (*Cercopis vulnerata*, *C. sanguinolenta*, *Haematoloma dorsatum*), der unscheinbar gefärbten Aphrophoridae (*Philaenus spumarius*, *Lepyronia coleoptrata*) und einer unauffällig gefärbten Membracide (*Centrotus cornutus*), sowie von *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae) als Kontrolle, wurden in einer Ähnlichkeitsanalyse miteinander verglichen. Die Ordination zeigt eine signifikante Abtrennung der Cercopide von den restlichen untersuchten Arten inklusive Kontrolle. In den GC-MS-Analysen der Hämolymphe von *C. vulnerata* dominierten als Hauptkomponenten C<sub>23</sub>- und C<sub>25</sub>-Alkene, die sich qualitativ und insbesondere quantitativ zwischen den Geschlechtern unterschieden. Diese langkettigen Kohlenwasserstoffe wurden auch in Oberflächenextrakten gefunden und dienen möglicherweise als cuticuläre Abzeichen; deren potenzielle Funktion bei der Partnerwahl wird diskutiert. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen gelang kein Nachweis von Cantharidin bei diesen und weiteren 24 Zikadenarten. Jedoch wurden in den untersuchten Individuen von *C. vulnerata* leicht flüchtige Substanzen gefunden, denen eine mögliche Funktion bei der Feindabwehr zukommen könnte (Warngeruch): Dimethyldisulfid (DMDS), Dimethyltrisulfid (DMTS), 3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin, Dimethyltetrasulfid (DMTetS) und Indol wurden anhand von Referenzsubstanzen identifiziert. Innerhalb dieser leicht flüchtigen Substanzen war das DMTS die Hauptkomponente. Auch in *C. sanguinolenta* bzw. *H. dorsatum* konnten diese Substanzen, abgesehen von 3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin bzw. DMTetS, detektiert werden. Vereinzelt ließen sich diese Volatile ebenfalls in den restlichen Zikadenarten spurenanalytisch nachweisen. Bei *G. bimaculatus* hingegen wurde keine dieser Verbindungen gefunden. Da Sulfide oft von Bakterien produziert werden, sollte geklärt werden, ob das Auftreten dieser Hämolymp-Wirkstoffe mit der Präsenz von Endosymbionten zusammenhängt. Nach Behandlung von *C. vulnerata*-Individuen mit dem Antibiotikum Tetracyclin konnte allerdings anhand der gemessenen DMTS- und DMTetS-Konzentrationen in der Hämolymphe kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Versuchstieren festgestellt werden. Auch die Größe der Symbiontenorgane (Mycetome), als Indiz für die Wirksamkeit der Antibiotikum-Behandlung, unterschied sich zwischen behandelten und unbehandelten Tieren nicht. Dagegen wurde gezeigt, dass die Weibchen im Durchschnitt größere Mycetome

besitzen als die Männchen. Eine Mehrkomponenten-Abwehr von *C. vulnerata* zum Schutz vor Prädatoren wird diskutiert: Wahrscheinlich profitieren die Adulti von (i) ihrer auffälligen Färbung als Alarmsignal für insektivore Vögel, (ii) beim Reflexbluten emittierten unangenehmen Geruch als Feindirritierung – hervorgerufen durch die flüchtigen Verbindungen in der Hämolymphe –, und (iii) ihrem sehr guten Sprungvermögen als Fluchtmechanismus.

## 5.2 Summary

Chemical defence mechanisms are well studied in many insect groups, but almost nothing is known about the occurrence of substances with a possible defence function within planthoppers and leafhoppers (Cicadomorpha, Fulgoromorpha). Only the appearance of cantharidin and indole alkaloids is reported for *Lycorma delicatula* (Fulgoromorpha: Fulgoridae). Methoxypyrazine as warning odour components were identified in the *Cercopis vulnerata* (Cicadomorpha: Cercopoidae). This black and red coloured frog hopper has the ability to reflex bleed, which is a widespread mechanism that is known among chemical protected insects. All examined species of the Cercopidae could be stimulated mechanically to reflex bleeding at the praetarsus. This behaviour could also be observed in some specimens of the largely cryptic Aphrophoridae. It is shown that the liquid droplet, which appears at the praetarsus of *Cercopis vulnerata* specimens while stimulated mechanically, is definitely haemolymph. Therefore, in this study the haemolymph composition of female and male specimens of several species were compared and investigated for chemical compounds by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

The total ion chromatograms (TICs) of haemolymph samples of conspicuous black and red coloured species of Cercopidae (*Cercopis vulnerata*, *C. sanguinolenta*, *Haematoloma dorsatum*) and of the more inconspicuous species belonging to the adolphotaxon Aphrophoridae (*Philaenus spumarius*, *Lepyronia coleoptrata*) and to the Membracidae (*Centrotus cornutus*), as well as a control species *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae) were compared for similarities. The ordination shows a significant separation of the Cercopidae-species from the other species examined including the control species. In the GC-MS analysis of the haemolymph of *C. vulnerata* C<sub>23</sub>- and C<sub>25</sub>-alkenes were the main compounds that differ in amount and occurrence between the sexes. The long chain hydrocarbons could also be found on the body's surface, thus it is discussed if they might be

cuticular hydrocarbons that function as sexual attractants. In contrast to former investigations it was not possible to find any evidence for the presence of cantharidin in any of this and further examined species. However, within the studied individuals of *C. vulnerata* high volatile substances with a possible function as defence agents against predators were found (warning odour): dimethyl disulphide (DMDS), dimethyl trisulphide (DMTS), 3-ethyl-2,5-dimethyl pyrazine, dimethyl tetrasulphide (DMTetS) and indole could be determined by reference substances. Among these high volatile substances, DMTS is the main component. Within *C. sanguinolenta* and *H. dorsatum* the presence of these compounds, with the exception of 3-ethyl-2,5-dimethyl pyrazine and DMTetS respectively, could be verified. In addition, within some specimens of the remaining species these substances occur in trace quantities. None of these compounds could be found in *G. bimaculatus*. Sulphides are often produced by bacteria; therefore, it was investigated whether the presence of the sulphides within the haemolymph is associated with endosymbionts. No differences could be determined for DMTS and DMTetS concentration in the haemolymph between *C. vulnerata* specimens that were treated with antibiotic tetracycline and untreated specimens. Also the size of the bacteriome as an indication of the effectiveness of the antibiotic treatment didn't differ between treated and untreated specimens. However, it could be shown that females have greater bacteriomes on average than males. Therefore, a multi-model defence strategy for *C. vulnerata* is discussed: the frog hopper probably profits by (i) the conspicuous colouration as a warning signal against insectivore birds, (ii) the unpleasant odour – due to the volatile substances in the haemolymph – emitted by reflex bleeding as a distraction for predators, and (iii) its excellent jumping ability as an escape mechanism.

---

## 6 Literatur

- ALDRICH, J. R. (1988): Chemical ecology of the Heteroptera. *Annual Review of Entomology* 33: 211-238.
- ANDERSEN, P. C.; BRODBECK, B. V. (1989): Diurnal and temporal changes in the chemical profile of xylem exudate from *Vitis rotundifolia*. *Physiologia Plantarum* 75 (1): 63-70.
- ARMITAGE, D. A.; CLARK, M. J. (1971): The sulphur(II) nitrogen bond. Part I.: reaction of alkanesulphenyl chlorides with secondary amines. *Journal of the Chemical Society (C)*: 2840-2842.
- AVERY, M. L.; NELMS, C. O. (1990): Food avoidance by red-winged blackbirds conditioned with a pyrazine odor. *Auk* 107 (3): 544-549.
- BACKUS, E. A. (1985): Anatomical and sensory mechanisms of leafhopper and planthopper feeding behavior. In: Nault, L. R.; Rodriguez, J. G. (Hrsg.): *The leafhopper and planthopper*. John Wiley & Sons, New York, S. 163-194.
- BARLIN, G. B. (1982): *The pyrazines*. John Wiley & Sons, New York, 687 S.
- BATES, H. W. (1862): Contributions to an insect fauna of the Amazon valley (Lepidoptera: Heliconidae). *Transactions of the Linnean Society of London* 23: 495-556.
- BAUMANN, P.; MORAN, N. A. (1997): Non-cultivable microorganisms from symbiotic associations of insects and other hosts. *Antonie van Leeuwenhoek* 72 (1): 39-48.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. (1995): Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B, Methodological* 57 (1): 289-300.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. (2003): *Biochemie*. 5. Aufl., Spektrum, Heidelberg, 1153 S.
- BIEDERMANN, R.; NIEDRINGHAUS, R. (2004): *Die Zikaden Deutschlands: Bestimmungstabellen für alle Arten*. WABV-Fründ, Scheeßel, 409 S.
- VON BLOTZHEIM, G. U. N. (1988): *Handbuch der Vögel Mitteleuropas*. Band 11/I. Akademische Verlags-Gesellschaft u.a., Wiesbaden, 727 S.
- BLUM, M. S. (1981): *Chemical defenses of arthropods*. Academic Press, London, 562 S.
- BLUM, M. S.; SANNASI, A. (1974): Reflex bleeding in the lampyrid *Photinus pyralis*: defensive function. *Journal of Insect Physiology* 20 (3): 451-460.
- BOESCH, D. F. (1977): Application of numerical classification in ecological investigations of water pollution. Report prepared for US EPA Ecological Research Series (EPA-600/3-77-033). Available as PB269 604 from: National Technical Information Service. U.S. Dept. of Commerce, Springfield, Virginia, USA.
- BONNARME, P.; LAPADATESCU, C.; YVON, M.; SPINNLER, H.-E. (2001): L-methionine degradation potentialities of cheese-ripening microorganisms. *Journal of Dairy Research* 68: 663-674.
- BORG-KARLSON, A.-K.; ENGLUND, F. O.; UNELIUS, C. R. (1994): Dimethyl oligosulphides, major volatiles released from *Sauromatum guttatum* and *Phallus impudicus*. *Phytochemistry* 35 (2): 321-323.

- BOURGOIN, T.; CAMPBELL, B. C. (2002): Inferring a phylogeny for Hemiptera: Falling into the 'autapomorphic trap'. *Denisia* 4: 67-82.
- BRODBECK, B. V.; MIZELL, R. F. III.; ANDERSEN, P. C. (1993): Physiological and behavioral adaptations of three species of leafhoppers in response to the dilute nutrient content of xylem fluid. *Journal of Insect Physiology* 39 (1): 73-81.
- BRODBECK, B. V.; MIZELL, R. F.; FRENCH, W. J.; ANDERSEN, P. C.; ALDRICH, J. H. (1990): Amino acids as determinants of host preference for the xylem feeding leafhopper, *Homalodisca coagulata* (Homoptera: Cicadellidae). *Oecologia* 83 (3): 338-345.
- BUCHNER, P. (1925): Studien an intracellularen Symbionten V.: Die symbiontischen Einrichtungen der Zikaden. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere* 4: 89-121.
- BUCHNER, P. (1953): Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen. Birkhäuser, Basel, 771 S.
- BUDZIKIEWICZ, H. (1998): Massenspektrometrie: Eine Einführung. Wiley-VCH, Weinheim, 192 S.
- BUDZIKIEWICZ, H.; DJERASSI, C.; DUDLEY, H. W. (1967): Mass spectrometry of organic compounds. Holden-Day Inc, San Francisco, 690 S.
- BÜNNIGE, M.; HILKER, M. (2005): Do glanduliferous larvae of Galerucinae (Coleoptera: Chrysomelidae) possess defensive glands? A scanning electron microscopic study. *Zoomorphology* 124 (3): 111-119.
- BURROWS, M. (2003): Biomechanics: frog hopper insects leap to new heights. *Nature* 424: 509.
- CAMPBELL, B. C.; STEFFEN-CAMPBELL, J. D.; SORENSEN, J. T.; GILL, R. J. (1995): Paraphyly of Homoptera and Auchenorrhyncha inferred from 18S rDNA nucleotide sequences. *Systematic Entomology* 20 (3): 175-194.
- CARREL, J. E.; EISNER, T. (1974): Cantharidin: potent feeding deterrent to insects. *Science* 183: 755-757.
- CARVALHO, C.; WEBB, M. (2005): Cercopid spittle bugs of the New World (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cercopidae). Pensoft, Sofia, 271 S.
- CHAPMAN, R. F. (1998): The insects: structure and function. 4. Aufl., Cambridge University Press, Cambridge, 770 S.
- CHAVEZ, C.; COUFAL, C. D.; CAREY, J. B.; LACEY, R. E.; BEIER, R. C.; ZAHN, J. A. (2004): The impact of supplemental dietary methionine sources on volatile compound concentrations in broiler excreta. *Poultry Science* 83 (6): 901-910.
- CHIN, H.-W.; LINDSAY, R. C. (1994): Ascorbate and transition-metal mediation of methanethiol oxidation to dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide. *Food Chemistry* 49: 387-392.
- CLARKE, K. R. (1993): Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18 (1): 117-143.
- CLARKE, K. R.; WARWICK, R. M. (1994): Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. Plymouth Marine Laboratory, Plymouth.
- COHEN, P. (1989): The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Review of Biochemistry* 58: 453-508.

- 
- CREWE, R. M.; FLETCHER, D. J. C. (1974): Ponerine ant secretions: the mandibular gland secretion of *Paltothyreus tarsatus* Fabr. *Journal of the Entomological Society of Southern Africa* 37 (2): 291-298.
- CREWE, R. M.; ROSS, F. P. (1975): Pheromone biosynthesis: the formation of sulphides by the ant *Paltothyreus tarsatus*. *Insect Biochemistry* 5 (6): 839-843.
- CRYAN, J. R. (2005): Molecular phylogeny of Cicadomorpha (Insecta: Hemiptera: Cicadoidea, Cercopoidea and Membracoidea): adding evidence to the controversy. *Systematic Entomology* 30 (4): 563-574.
- DALY, K. L.; DiTULLIO, G. R. (1996): Particulate dimethylsulfoniopropionate removal and dimethylsulfide production by zooplankton in the southern ocean. In: Kiene, R. P.; Visscher, P. T.; Keller, M. D.; Kirst, G. O. (Hrsg.): *Biological and environmental chemistry of DMSP and related sulfonium compounds*. Plenum Press, New York, S. 223-238.
- DANI, F. R.; JEANNE, R. L.; CLARKE, S. R.; JONES, G.R.; MORGAN, E. D.; FRANCKE, W.; TURILLAZZI, S. (2000): Chemical characterization of the alarm pheromone in the venom of *Polybia occidentalis* and of volatiles from the venom of *P. sericea*. *Physiological Entomology* 25: 363-369.
- DARWIN, C. (1871): *The descent of man, and selection in relation to sex*. In: Barrett, P. H.; Freeman, R. B. (1989): *The works of Charles Darwin, Volume 21 und 22*. Pickering & Chatto, London, 727 S.
- DAVIS, R. H.; NAHRSTEDT, A. (1982): Occurrence and variation of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin in species of the *Zygaenidae* (Insecta: Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 71 (2): 329-332.
- DEMARIGNY, Y.; BERGER, C.; DESMASURES, N.; GUEGUEN, M.; SPINNLER, H. E. (2000): Flavour sulphides are produced from methionine by two different pathways by *Geotrichum candidum*. *Journal of Dairy Research* 67(3): 371-380.
- DETTNER, K. (1987): Chemosystematics and evolution of beetle chemical defenses. *Annual Review of Entomology* 32: 17-48.
- DETTNER, K. (1997): Inter- and intraspecific transfer of toxic insect compound cantharidin. In: Dettner, K.; Bauer, G.; Voelkl, W. (Hrsg.): *Ecological studies: Vertical food web interactions*, Vol. 130, Springer-Verlag, Berlin, S. 115-145.
- DETTNER, K.; BERAN, A. (2000): Chemical defense of the fetid smelling click beetle *Agrypnus murinus* (Coleoptera: Elateridae). *Entomologia Generalis* 25 (1): 27-32.
- DETTNER, K.; SCHURERLEIN, A.; FABIAN, P.; SCHULZ, S.; FRANCKE, W. (1996): Chemical defense of giant springtail *Tetrodontophora bielanensis* (WAGA) (Insecta: Collembola). *Journal of Chemical Ecology* 22 (5):1051-1074.
- DIAS, B.; WEIMER, B. (1999): Production of volatile sulfur compounds in Cheddar cheese slurries. *International Dairy Journal* 9: 605-611.
- DIETRICH, C. H. (2003): Auchenorrhyncha (Cicadas, Spittlebugs, Leafhoppers, Treehoppers, and Planthoppers). In: Resh, V. H.; Cardé, R. T. (Hrsg.): *Encyclopedia of Insects*, Academic Press, San Diego, S. 66-75.
- DOUGLAS, A. E. (1998): Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology* 43: 17-37.

- DUFFIELD, R. M.; BLUM, M. S.; WALLACE, J. B.; LLOYD, H. A.; REGNIER, F. E. (1977): Chemistry of the defensive secretion of the caddisfly *Pycnopsyche scabripennis* (Trichoptera: Limnephilidae). *Journal of Chemical Ecology* 3 (6): 649-656.
- DYTHAM, C. (1999): *Choosing and using statistics: a biologist's guide*. Blackwell Science, Oxford, 218 S.
- EHRHARDT, P. (1969): Die Rolle von Methionin, Cystein, Cystin und Sulfat bei der künstlichen Ernährung von *Neomyzus* (Aulacorthum) *circumflexus* BUCKT. (Aphideae, Homoptera, Insecta). *Biologisches Zentralblatt* 88 (3): 335-348.
- EHRHARDT, P.; JAYARAJ, S.; SCHMUTTERER, H. (1966): Die Wirkung verschiedener, über die Pflanze zugeführter Antibiotica auf Entwicklung und Fertilität der Schwarzen Bohnenlaus. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 9 (3): 332-342.
- EHRHARDT, P.; SCHMUTTERER, H. (1966): Die Wirkung verschiedener Antibiotica auf Entwicklung und Symbionten künstlich ernährter Bohnenblattläuse (*Aphis fabae* Scop.). *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere* 56 (1): 1-20.
- EISNER, T.; EISNER, M.; SIEGLER, M. (2005): *Secret Weapons*. Belknap Press, Cambridge, 372 S.
- EISNER, T.; GOETZ, M.; ANESHANSLEY, D.; FERSTANDIG-ARNOLD, G.; MEINWALD, J. (1986): Defensive alkaloid in blood of Mexican bean beetle (*Epilachna varivestis*). *Experientia* 42 (2): 204-207.
- EVANS, D. L.; CASTORIADES, N.; BADRUDDINE, H. (1987): The degree of mutual resemblance and its effect on predation in young birds. *Ethology* 74: 335-345.
- EVANS, D. L.; CASTORIADES, N.; MUHTASIB, H. (1985): Is the six-spotted burnet moth *Zygaena filipendulae*, a part of *Cercopis intermedia* müllerian mimicry complex? *Lebanese Science Bulletin* 1 (1): 65 -71.
- EXNEROVÁ, A.; LANDOVÁ, E.; STYS, P.; FUCHS, R.; PROKOPOVÁ, M.; CEHLÁRIKOVÁ, P. (2003): Reactions of passerine birds to aposematic and nonaposematic firebugs (*Pyrrohocoris apterus*; Heteroptera). *Biological Journal of Linnean Society* 78: 517-525.
- FENG, Y.; JIANQI, M.; ZHONGREN, L.; TIANPENG, G. (1988): A preliminary investigation of the cantharidin resources of Shaanxi province. *Acta Univ Septentrionali Occident Agric* 16 (8): 28.
- FIETZ, O.; DETTNER, K.; GÖRLS, H.; KLEMM, K.; BOLAND, W. (2002): (R)-(+)-Palasonin, a cantharidin-related plant toxin, also occurs in insect haemolymph and tissues. *Journal of Chemical Ecology* 28 (7): 1315-1327.
- FORTUNATO, A.; DANI, F. R.; SLEDGE, M. F.; FONDELLI, L.; TURILLAZZI, S. (2004): Alarm communication in *Ropalidia* social wasps. *Insectes Sociaux* 51 (3): 299-305.
- GAMBERALE, G.; TULLBERG, B. S. (1996): Evidence for a peak-shift in predator generalization among aposematic prey. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 263: 1329-1334.
- GEERVLIET, J. B. F.; POSTHUMUS, M. A.; VET, L. E. M.; DICKE, M. (1997): Comparative analysis of headspace volatiles from different caterpillar-infested or uninfested food plants of *Pieris* species. *Journal of Chemical Ecology* 23 (12): 2935-2954.
- GINZEL, M. D.; BLOMQUIST, G. J.; MILLAR, J. G.; HANKS, L. M. (2003): Role of contact pheromones in mate recognition in *Xylotrechus colonus*. *Journal of Chemical Ecology* 29 (3): 533-545.

- 
- GRASSLE, J. F.; SMITH, W. (1976): A similarity measure sensitive to the contribution of rare species and its use in investigation of variation in marine benthic communities. *Oecologia* 25 (1): 13-22.
- GRILL, C. P.; MOORE, A. J. (1998): Effects of a larval antipredator response and larval diet on adult phenotype in an aposematic ladybird beetle. *Oecologia* 114 (2): 274-282.
- GUILFORD, T. (1990): Evolutionary pathways to aposematism. *Acta Oecologica* 11 (6): 835-841.
- GUILFORD, T.; NICOL, C.; ROTHSCHILD, M.; MOORE, B. P. (1987): The biological roles of pyrazines: evidence for a warning odour function. *Biological Journal of the Linnean Society* 31: 113-128.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. (2000): *The Insects: an Outline of Entomology*, 2. Auflage. Blackwell Science, Tokyo, 470 S.
- HAPP, G. M.; EISNER, T. (1961): Hemorrhage in a coccinellid beetle and its repellent effect on ants. *Science* 134: 329-331.
- HÄRLIN, C.; HÄRLIN, M. (2003): Towards a historization of aposematism. *Evolutionary Ecology* 17 (2): 197-212.
- HEFETZ, A.; BATRA, S. W. T. (1980): Chemistry of the cephalic secretions of eumenid wasps. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 65 (2): 455-456.
- HENDERSON, G.; HOFFMAN, G. D.; JEANNE, R. L. (1990): Predation on Cercopids and material use of the spittle in aphid-tent construction by Prairie Ants. *Psyche* 97 (43): 43-53.
- HOLLANDE, C. (1911): L'autohémorrhée: ou le rejet du sang chez les insectes (toxicologie du sang). *Archives d'anatomie microscopique* 13: 171-318.
- HOLZINGER, W. E.; KAMMERLANDER, I.; NICKEL, H. (2003): *Die Zikaden Mitteleuropas*, Volume 1: Fulgoromorpha, Cicadomorpha excl. Cicadellidae. Brill, Leiden, 673 S.
- HOUK, E. J.; GRIFFITHS, G. W. (1980): Intracellular symbiotes of the Homoptera. *Annual Review of Entomology* 25: 161-187.
- HOWARD, R. W.; BLOMQUIST, G. J. (1982): Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology* 27: 149-172.
- HOWARD, R. W.; BLOMQUIST, G. J. (2005): Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology* 50: 371-393.
- JACKSON, L. L.; BARTELT, R. J. (1986): Cuticular hydrocarbons of *Drosophila virilis*: Comparison by age and sex. *Insect Biochemistry* 16 (2): 433-439.
- JONES, C. G.; WHITMAN, D. W.; COMPTON, S. J.; SILK, P. J.; BLUM, M. S. (1989): Reduction in diet breadth results in sequestration of plant chemicals and increases efficacy of chemical defense in a generalist grasshopper. *Journal of Chemical Ecology* 15 (6): 1811-1822.
- KAMEOKA, H.; IIDA, H.; HASHIMOTO, S.; MIYAZAWA, M. (1984): Sulphides and furanones from steam volatile oils of *Allium fistulosum* and *Allium chinense*. *Phytochemistry* 23 (1): 155-158.
- KAUPPINEN, J.; MAPPE, J. (2003): Why are wasps so intimidating: field experiments on hunting dragonflies (Odonata: *Aeshna grandis*). *Animal Behaviour* 66 (3): 505-511.
- KEHLMAIER, C. (2000): Zu Verbreitung, Lebenszyklus und Gesang der Blutzikade *Cercopis vulnerata* Rossi, 1807 (Auchenorrhyncha: Cercopidae) am Lüneburger Schildstein (Niedersachsen). *Braunschweiger Naturkundliche Schriften* 6 (1): 69-84.

- KENDALL, D. A. (1971): A note on reflex bleeding in the larvae of the beetle *Exochomus quadripustulatus* (L.) (Col.: Coccinellidae). *The Entomologist* 104 (1300-1): 232-235.
- KÖHLER, W.; SCHACHTEL, G.; VOLESKE, P. (1995): *Biostatistik. Einführung in die Biometrie für Biologen und Agrarwissenschaftler*, 2. Aufl. Springer, Berlin, 285 S.
- KÖRNER, H. K. (1969): Entwicklung der Symbiontenorgane einer Kleinzikade (*Euscelis plebejus* Fall.) nach Ausschaltung der Symbionten. *Experientia* 25 (7): 767-768.
- KÖRNER, H. K. (1972): Elektronenmikroskopische Untersuchungen am embryonalen Mycetom der Kleinzikade *Euscelis plebejus* Fall. (Homoptera, Cicadina). *Zeitschrift für Parasitenkunde* 40: 203-226.
- KÖRNER, H. K. (1974): Elektronenmikroskopische Untersuchungen am embryonalen Mycetom der Kleinzikade *Euscelis plebejus* Fall. (Homoptera, Cicadina). II. Die Feinstruktur der t-Symbionten. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 44: 149-164.
- KÖRNER, M.; NICKEL, H.; SAYER, M. (2001): Zikaden an Gräsern eines norddeutschen Kiefernforstes - Abundanz, Phänologie und ein Vergleich der Fangmethoden (Hemiptera: Auchenorrhyncha). *Beiträge zur Zikadenkunde* 4: 33-43.
- LAMUNYON, C.; EISNER, T. (1990): Effect of mite infestation of the anti-predator defenses of an insect. *Psyche* 97: 31-41
- LANE, D. J. (1991): 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackenbrandt, E.; Goodfellow, M., (Hrsg.): *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, S. 115-175.
- LEAL, W. S.; YADAVA, C. P. S.; VIJAYVERGIA, J. N. (1996): Aggregation of the scrub beetle *Holotrichia consanguinea* in response to the female-released pheromone suggests secondary function hypothesis for semiochemicals. *Journal of Chemical Ecology* 22 (8): 1557-1566.
- LEDL, F.; SEVERIN, T. (1974): Schwefelhaltige Verbindungen aus Cystein und Xylose. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 154: 29-31.
- LEE, T. (1998): *A beginner's guide to mass spectral interpretation*. Wiley, Chichester, 186 S.
- LI, Y. M.; CASIDA, J. E. (1992): Cantharidin-binding protein: identification as protein phosphatase 2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 89 (24): 11871-11875.
- LINDSTRÖM, L.; ALATALO, R. V.; MAPPES, J. (1997): Imperfect batesian mimicry - the effects of the frequency and the distastefulness of the model. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 264: 149-153.
- LINDSTRÖM, L.; ALATALO, R. V.; MAPPES, J.; RIIPI, M.; VERTAINEN, L. (1999): Can aposematic signals evolve by gradual change? *Nature* 397: 249-251.
- LINDSTRÖM, L.; ROWE, C.; GUILFORD, T. (2001): Pyrazine odour makes visually conspicuous prey aversive. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268: 159-162.
- MAGA, J. A.; SIZER, C. E. (1978): Flavour preferences for potato chips as influenced by time and temperature of chipping and total pyrazine concentration. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 11 (4): 181-182.
- MAGA, J. A.; SIZER, C. E. (1973): Pyrazines in food: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 21 (1): 22-30.

- 
- MALAGUTI, D.; MILLARD, P.; WENDLER, R.; HEPBURN, A.; TAGLIAVINI, M. (2001): Translocation of amino acids in the xylem of apple (*Malus domestica* Borkh.) trees in spring as a consequence of both N remobilization and root uptake. *Journal of Experimental Botany* 52 (361): 1665-1671.
- MALLET, J.; JORON, M. (1999): Evolution of diversity in warning color and mimicry: polymorphisms, shifting balance, and speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30: 201-233.
- MARPLES, N. M. (1993): Is the alkaloid in 2spot ladybirds (*Adalia bipunctata*) a defence against ant predation? *Chemoecology* 4 (1): 29-32.
- MARPLES, N. M.; KELLY, D. J.; THOMAS, R. J. (2005): Perspective: The evolution of warning coloration is not paradoxical. *Evolution* 59 (5): 933-940.
- MARSHALL, A. T. (1966): Spittle-production and tube-building by cercopid larvae (Homoptera) IV: mucopolysaccharide associated with spittle-production. *Journal of Insect Physiology* 12 (6): 635-644.
- MATSUDA, K. (1982): Reflex bleeding in *Gallerucida nigromaculata* BALY (Coleoptera: Chrysomelidae). *Applied Entomology and Zoology* 17 (2): 277-278.
- MATTSON, W. J. JR. (1980): Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11: 119-161.
- MCCORMICK, J. P.; CARREL, J. E. (1987): Cantharidin biosynthesis and function in meloid beetles. In: Prestwich, G. D.; Blomquist, G. J. (Hrsg.): *Pheromone biochemistry*. Academic Press, Orlando, S. 307-350.
- MELLO, M. L. S.; PIMENTEL, E. R.; YAMADA, A. T.; STOROPOLI-NETO, A. (1987): Composition and structure of the froth of the spittlebug, *Deois* sp. *Insect Biochemistry* 17 (3): 493-502.
- MELLO, M. L. S.; DE CARVALHO, H. F.; DE SÁ, L. A. N (1996): Topochemistry and structure of the froth of different spittlebug species. *Revista Brasileira de Biologia* 56 (1): 177-181.
- MOLIMARD, P.; SPINLER, H. E. (1996): Review: compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science* 79 (2): 169-184.
- MOORE, B. P.; BROWN, W. V. (1981): Identification of warning odour components, bitter principles and antifeedants in an aposematic beetle: *Metriorrhynchus rhipidius* (Coleoptera: Lycidae). *Insect Biochemistry* 11 (5): 493-499.
- MOORE, B. P.; BROWN, W. V.; ROTHSCHILD, M. (1990): Methylalkylpyrazines in aposematic insects, their hostplants and mimics. *Chemoecology* 1 (2): 43-51.
- MORAAL, L. G. (1996): Bionomics of *Haematoloma dorsatum* (Hom., Cercopidae) in relation to needle damage in pine forests. *Anzeiger für Schädlingskunde* 69 (5): 114-118.
- MORAN, N. A.; TRAN, P.; GERARDO, N. M. (2005): Symbiosis and insect diversification: An ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum Bacteroidetes. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12): 8802-8810.
- MÜLLER, F. (1879): *Ituna* and *Thyridia*; a remarkable case of mimicry in butterflies. *Transactions of the Entomological Society of London* 1879: xx-xxix.
- MÜLLER, H. J. (1962): Neuere Vorstellungen über Verbreitung und Phylogenie der Endosymbiosen der Zikaden. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere* 51: 190-210.

- MUYZER, G.; HOTTENTRÄGER, S.; TESKE, A.; WAWER, C. (1996): Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: Akkermans, A. D. L.; Van Elsas, J. D.; De Bruijn, F. (Hrsg.): Molecular microbial ecology manual. Kluwer Academic, Dordrecht, S. 1-23.
- NAULT, L. R.; WOOD, T. K.; GOFF, A. M. (1974): Treehopper (Membracidae) alarm pheromones. *Nature* 249: 387-388.
- NEVITT, G. A. (2000): Olfactory foraging by antarctic procellariiform seabirds: life at high reynolds numbers. *Biological Bulletin* 198 (2): 245-253.
- NEVITT, G. A.; VEIT, R. R.; KAREIVA, P. (1995): Dimethyl sulphide as a foraging cue for Antarctic procellariiform seabirds. *Nature* 376: 680-682.
- NICKEL, H. (2003): The leafhoppers and planthoppers of Germany (Hemiptera, Auchenorrhyncha): patterns and strategies in a highly diverse group of phytophagous insects. Pensoft Publisher, Sofia, 460 S.
- ORENSTEIN, S.; ZAHAVI, T.; NESTEL, D.; SHARON, R.; BARKALIFA, M.; WEINTRAUB, P. G. (2003): Spatial dispersion patterns of potential leafhopper and planthopper (Homoptera) vectors of phytoplasma in wine vineyards. *Annals of Applied Biology* 142: 341-348.
- OSORIO, D.; JONES, C. D.; VOROBYEV, M. (1999): Accurate memory for colour but not pattern contrast in chicks. *Current Biology* 9 (4): 199-202.
- OSSIANNILSSON, F. (1978): The Auchenorrhyncha (Homoptera) of Fennoscandia and Denmark. Part 1: Introduction, infraorder Fulgoromorpha. Scandinavian Science Press, Kopenhagen, 222 S.
- OSSIANNILSSON, F. (1981): The Auchenorrhyncha (Homoptera) of Fennoscandia and Denmark. Part 2: The Families Cicadidae, Cercopidae, Membracidae, and Cicadellidae (excl. Deltocephalinae). Scandinavian Science Press, Kopenhagen, S. 223-593.
- OSSIANNILSSON, F. (1983): The Auchenorrhyncha (Homoptera) of Fennoscandia and Denmark. Part 3: The Family Cicadellidae: Deltocephalinae, Catalogue, Literature and Index. Scandinavian Science Press, Kopenhagen, S. 594-979.
- PAWLIK, J. R.; MCFALL, G.; ZEA, S. (2002): Does the odor from sponges of the genus *Ircinia* protect them from fish predators? *Journal of Chemical Ecology* 28 (6): 1103-1115.
- PECK, D. C. (2000): Reflex bleeding in froghoppers (Homoptera: Cercopidae): variation in behavior and taxonomic distribution. *Annals of the Entomological Society of America* 93 (5): 1186-1194.
- PECK, D.; CASTRO, U.; LÓPEZ, F.; MORALES, A.; RODRÍGUEZ, J. (2001): First records of the sugar cane and forage grass pest, *Prosapia simulans* (Homoptera: Cercopidae), from South America. *Florida Entomologist* 84 (3): 402-409.
- PERŠOH, D.; RAMBOLD, G. (2002): Phacopsis - a lichenicolous genus of the family Parmeliaceae. *Mycological Progress* 1 (1): 43-55.
- PESCHKE, K. (1986): Development, sex specificity, and site of production of aphrodisiac pheromones in *Aleochara curtula*. *Journal of Insect Physiology* 32 (8): 687-693.
- PEVSNER, J.; SKLAR, P. B.; SNYDER, S. H. (1986): Odorant-binding protein: localization to nasal glands and secretions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 83 (13): 4942-4946.

- 
- POULTON, E. B. (1890): The colours of animals, their meaning and use. Paul, Trench, Trübner, London, 360 S.
- RAKITOV, R. A. (2002): Structure and function of the Malpighian tubules, and related behaviors in juvenile cicadas: evidence of homology with spittlebugs (Hemiptera: Cicadoidea and Cercopoidea). *Zoologischer Anzeiger* 241 (2): 117-130.
- REMANE, R.; WACHMANN, E. (1993): Zikaden: kennenlernen - beobachten. Naturbuch Verlag, Augsburg, 288 S.
- RIBAUT, H. (1936): Homoptères Auchenorhynques (I. Typhlocybidae). *Faune de France* 31, Paris, 231 S.
- RIBAUT, H. (1952): Homoptères Auchenorhynques II (Jassidae). *Faune de France* 57, Paris, 474 S.
- RICHMOND, D. V. (1973): Sulfur compounds. In: Miller, L. P. (Hrsg.): *Phytochemistry*, Vol. 3. Van Nostrand Reinhold Company, New York, S. 41-73.
- ROPER, T. J. (1990): Responses of domestic chicks to artificially coloured insect prey: effects of previous experience and background colour. *Animal Behaviour* 39 (3): 466-473.
- ROSE, A.; ZUNKE, U. (1998): Zur Verbreitung und Pathogenität der Rhododendronzikade *Graphocephala fennahi* YOUNG an ausgewählten Rhododendronbeständen im Hamburger Raum unter Berücksichtigung ihrer Rolle als Vektor für die Übertragung des Pilzes *Pycnostysanus azaleae* (PECK) MASON. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 357: 309-310.
- ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. (2006): *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1341-1348.
- ROTHSCHILD, M.; MOORE, B. (1987): Pyrazines as alerting signals in toxic plants and insects. In: Labeyrie, V.; Fabres, G.; Lachaise, D. (Hrsg.): *Insects – plants*. Dr W. Junk Publishers, Dordrecht, S. 97-101.
- ROTHSCHILD, M.; MOORE, B. P.; BROWN, W. V. (1984): Pyrazines as warning odour components in the monarch butterfly, *Danaus plexippus*, and in moths of the genera *Zygaena* and *Amata* (Lepidoptera). *Biological Journal of the Linnean Society* 23 (4): 375-380.
- ROWE, C.; GUILFORD, T. (1996): Hidden colour aversions in domestic chicks triggered by pyrazine odours of insect warning displays. *Nature* 383: 520-522.
- ROWE, C.; GUILFORD, T. (1999): Novelty effects in a multimodal warning signal. *Animal Behaviour* 57 (2): 341-346.
- SBORDONI, V.; FORESTIERO, S.; WÜRMLI, M. (1985): *Weltencyklopädie der Schmetterlinge*. Südwest-Verlag, München, 311 S.
- SCHULER, W.; ROPER, T. J. (1992): Responses to warning coloration in avian predators. *Advances in the Study of Behavior* 21: 111-146.
- SCHULER, W.; HESSE, E. (1985): On the function of warning coloration: a black and yellow pattern inhibits prey-attack by naive domestic chicks. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 16: 249-255.
- SCHWEMMLER, W. (1973): Beitrag zur Analyse des Endosymbiosezyklus von *Euscelis plebejus* F. (Hemip., Homop., Cicad.) mittels In-vitro-Beobachtung. *Biologisches Zentralblatt* 92 (6): 749-772.

- SCHWIMMER, S.; FRIEDMAN, M. (1972): Genesis of volatile sulphur-containing food flavours. *The Flavour Industry* 3: 137-144.
- SILLÉN-TULLBERG, B. (1985): The significance of coloration per se, independent of background, for predator avoidance of aposematic prey. *Animal Behaviour* 33 (4): 1382-1384.
- SMEDLEY, S. R.; BLANKESPOOR, C. L.; YUANG, Y.; CARREL, J. E.; EISNER, T. (1995/96): Predatory response of spiders to blister beetles (family Meloidae). *Zoology* 99: 211-217.
- SORENSEN, J. T.; CAMPBELL, B. C.; GILL, R. J.; STEFFEN-CAMPBELL, J. D. (1995): Non-monophyly of Auchenorrhyncha ("Homoptera"), based upon 18S rDNA phylogeny: eco-evolutionary and cladistic implications within Pre-Heteropteroidea Hemiptera (s.l.) and a proposal for new monophyletic suborders. *Pan-Pacific Entomologist* 7 (11): 31-60.
- STRÜMPPEL, H. (2003): Hemiptera (Rhynchota), Schnabelkerfe. In: Dathe, H. H.; Kaestner, A. (Hrsg.): *Lehrbuch der Speziellen Zoologie, Band 1: Wirbellose Tiere, 5. Teil: Insecta. 2. Aufl., Spektrum, Heidelberg*, S. 343-365.
- SUBANDIYAH, S.; NIKOH, N.; TSUYUMU, S. (2000): Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). *Zoological Science* 17 (7): 983-989.
- SUTTON, B. D.; CARLSON, D. A. (1997): Cuticular Hydrocarbons of *Glossina*, III: Subgenera *Glossina* and *Nemorhina*. *Journal of Chemical Ecology* 23 (5): 1291-1320.
- THOMAS, R. J.; BARTLETT, L. A.; MARPLES, N. M.; KELLY, D. J.; CUTHILL, I. C. (2004): Prey selection by wild birds can allow novel and conspicuous colour morphs to spread in prey populations. *Oikos* 106: 285-294.
- THOMPSON, V. (1973): Spittlebug polymorphic for warning coloration. *Nature* 242: 126-128.
- TRUEBLOOD, D. D.; GALLAGHER, E. D.; GOULD, D. M. (1994): Three stages of seasonal succession on the savin hill cove mudflat, Boston Harbor. *Limnology and Oceanography* 39 (6): 1440-1454.
- TURLINGS, T. C. J.; TUMLINSON, J. H.; HEATH, R. R.; PROVEAUX, A. T.; DOOLITTLE, R. E. (1991): Isolation and identification of allochemicals that attract the larval parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Cresson), to the microhabitat of one of its host. *Journal of Chemical Ecology* 17 (11): 2235-2252.
- WALDBAUER, G. P. (1988): Asynchrony between batesian mimics and their models. *The American Naturalist* 131: S103-S121.
- WALDBAUER, G. P.; STERNBURG, J. G.; MAIER, C. T. (1977): Phenological relationships of wasps, bumblebees, their mimics, and insectivorous birds in an Illinois sand area. *Ecology* 58 (3): 583-591.
- WALLACE, J. B.; BLUM, M. S. (1971): Reflex bleeding a highly refined defensive mechanism in *Diabrotica* larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America* 64 (5): 1021-1024.
- WARD, A.; MOORE, C.; ANITHA, V.; WIGHTMAN, J.; ROGERS, D. J. (2002): Identification of the sex pheromone of *Holotrichia reynaudi*. *Journal of Chemical Ecology* 28 (3): 515-522.
- WASSERTHAL, L. T. (2003): Hämolymphe und Hämolymphetransport. In: Dettner, K.; Peters, W. (Hrsg.): *Lehrbuch der Entomologie, 2. Aufl., Gustav Fischer, Heidelberg*, S. 185-203.
- WHITE, T. C. R. (1993): *The inadequate environment: nitrogen and the abundance of animals*. Springer, Berlin, 425 S.

- 
- WHITTAKER, J. B. (1970): Cercopid spittle as a microhabitat. *Oikos* 21 (1): 59-64.
- WICKLER, W. (1971): *Mimikry: Nachahmung und Täuschung in der Natur*. Kindler, München, 250 S.
- WIEGERT, R. G. (1964): Population energetics of meadow spittlebugs (*Philaenus spumarius* L.) as affected by migration and Habitat. *Ecological Monographs* 34 (3): 217-241.
- WILKINSON, T. L. (1998): The elimination of intracellular microorganisms from insects: An analysis of antibiotic-treatment in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 119 (4): 871-881.
- WILSON, S. W.; MITTER, C.; DENNO, R. F.; WILSON, M. R. (1994) Evolutionary patterns of host plant use by delphacid planthoppers and their relatives. In: Denno, R. H.; Perfect, T. J. (Hrsg.): *Planthoppers: Their Ecology and Management*. Chapman and Hall, New York, S. 7-113.
- WRAZIDLO, I. (1991): *Analyse der Wirksamkeit unterschiedlicher Warnfärbungen von Beuteinsekten auf Fasanenküken (Phasianus olchius L.)*. Dissertation Göttingen, 199 S.
- WU, D.; DAUGHERTY, S. C.; VAN AKEN, S. E.; PAI, G. H.; WATKINS, K. L.; Khouri, H.; Tallon, L. J.; Zaborsky, J. M.; Dunbar, H. E.; Tran, P. L.; Moran, N. A.; Eisen, J. A. (2006): Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooter. *PLOS Biology* 4 (6): 1079-1092.
- XUE, G.; YUAN, S. (1996): Separation and preparation of indole alkaloids in *Lycorma delicatula* White by HPLC. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 21 (9): 554-555, 576.
- YOSHIZAWA, K.; SAIGUSA, T. (2001): Phylogenetic analysis of paraneopteran orders (Insecta: Neoptera) based on forewing base structure, with comments on monophyly of Auchenorrhyncha (Hemiptera). *Systematic Entomology* 26 (1): 1-13.
- ZAJAC, M. A.; WILSON, M. C. (1984): The effects of nymphal feeding by the meadow spittlebug, *Philaenus spumarius* (L.) on strawberry yield and quality. *Crop Protection* 3 (2): 167-175.

### Danksagung

Prof. Dr. Konrad Dettner danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die zahlreichen wertvollen Anregungen. Prof. Dr. Stefan Schulz (Braunschweig) danke ich für das Analysieren einer Hämolymphe-Probe der Blutzikade, er lieferte damit wertvolle Information in der Anfangsphase der Arbeit. Durch zahlreiche Anregungen sowie die Unterstützung bei der Zikadenaufsammlung im Freiland war Dr. Herbert Nickel (Göttingen) sehr hilfreich, ihm sei hierfür recht herzlich gedankt. Dr. Robert Biedermann (Oldenburg) und Dr. Michael Sayer (Göttingen) danke ich für das Überlassen lebender und toter *Haematoloma dorastum*-Individuen. Weitere Anregungen und tatkräftige Unterstützung bei der Zikadensuche erfuhr ich von Ingrid und Dr. Werner Holzinger (Graz). Georg Petschenka (Hamburg) möchte ich für die Hilfe bei methodischen Problemen, sowie für seine anregende Kritik danken. Zur Bedeutung der Schaumzikaden in der Nahrung von insektivoren Vögeln lieferte Dr. Rainer Emmrich (Dresden) wertvolle Informationen. Prof. Dr. Werner Schuler (Niedermurach) möchte ich herzlich für seine Hilfsbereitschaft bei der Klärung meiner Fragen zur Verhaltensbiologie und dem Futtererwerb von Vögeln danken. Die Bestimmung der endoparasitischen Nematoden führte Prof. Dr. Helmut Kaiser (Graz) durch.

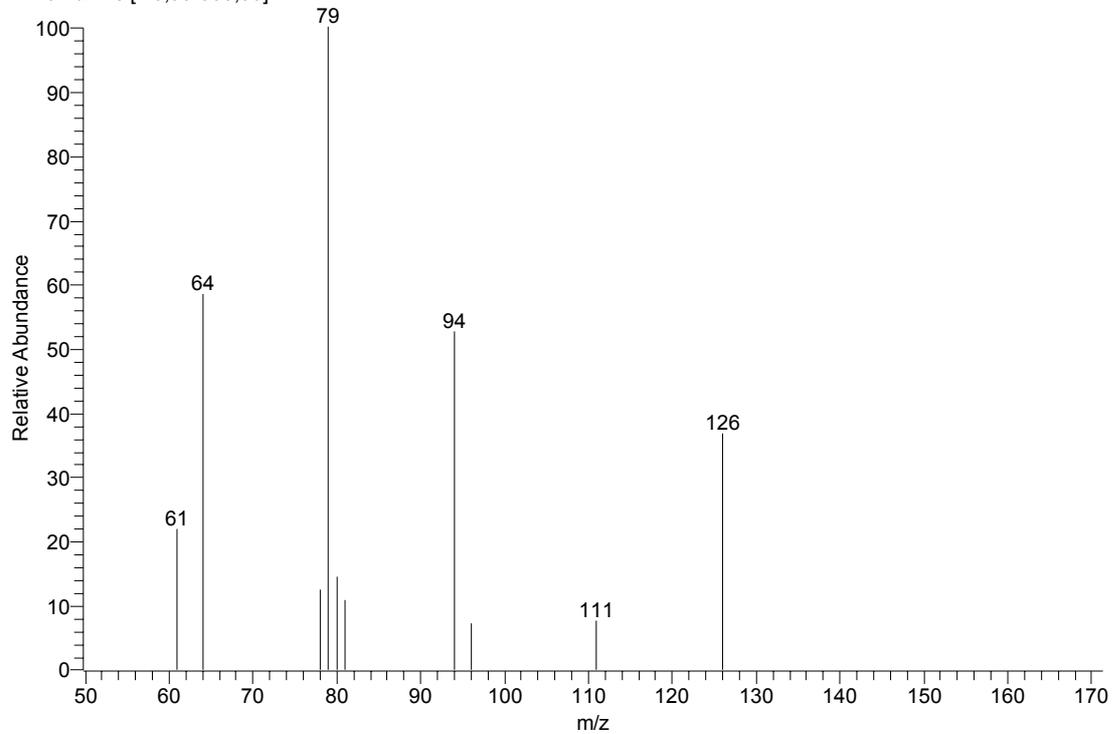
Andrea Liehr hat mich am GC-MS unterstützt und war bei zahlreichen methodischen Problemen hilfreich, speziell bei der Durchführung der Hydrolyse. Dr. Stefan Dötterl danke ich sowohl für seine Hilfsbereitschaft bei den Headspace-Analysen und der statistischen Auswertung, als auch für seine kritischen Anmerkungen. Dr. Heiko Rödel stand für statistische Fragen stets zu Verfügung und gab hilfreiche Anregungen. Elisabeth Helldörfer führte mich in die Benutzung des REM und die Entwicklung der Photofilme ein. Andrea Kirpal und Prof. Dr. Gerhard Rambold danke ich für die Unterstützung bei den molekularen Untersuchungen. Elke Rummel danke ich für die logistische Hilfe. Kai Drilling, Dr. Jürgen Frank, Dr. Nadine Hilt, Paul Kaetzke und Dr. Siegfried Kehl, sowie alle derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhl für Tierökologie II standen stets für weitere Diskussionen zur Verfügung und unterstützten mich mit der Durchsicht von Manuskriptteilen. Zu guter letzt gilt mein Danke meinen Eltern, hierbei insbesondere meinem Vater für das Lesen von Teilen dieser Arbeit.

---

## Anhang 1

Massenspektrum des authentischen DMTetS. GC: Vega Series 2, GC 6000, Fa. Carlo Erba Instruments; MS: Ion Trap Detector ITD 800, Fa. Finnigan Mat.

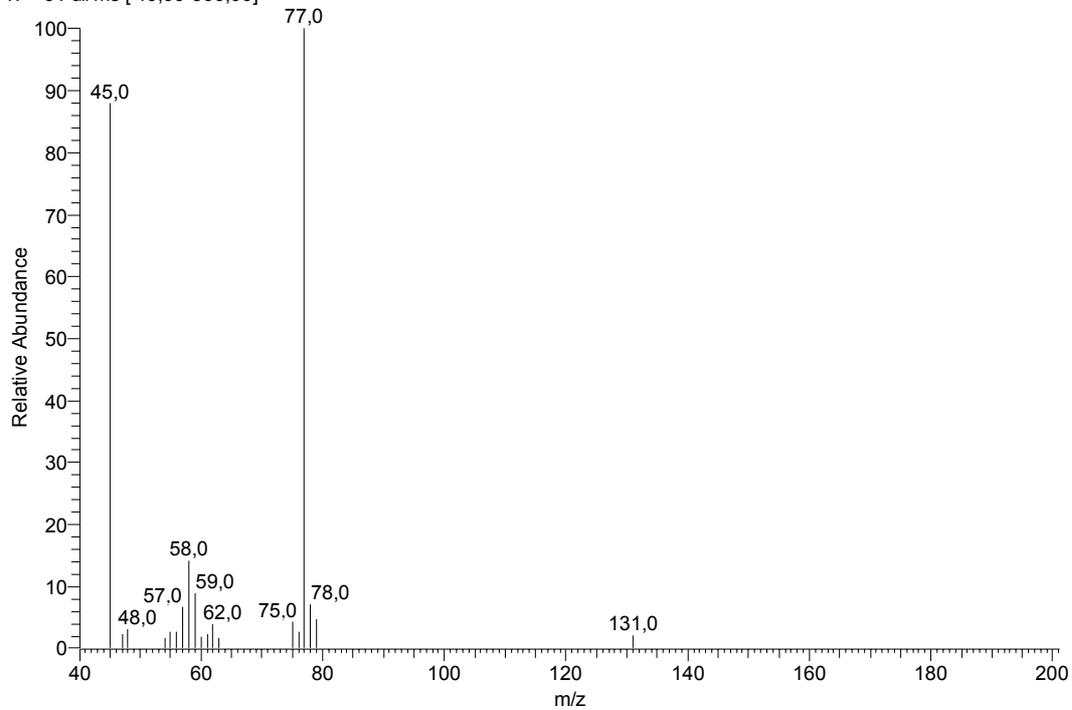
MK0123 #850 RT: 19,18 AV: 1 SB: 677 14,47-18,58, 20,40-27,53 NL: 4,26E2  
T: + c Full ms [40,00-350,00]



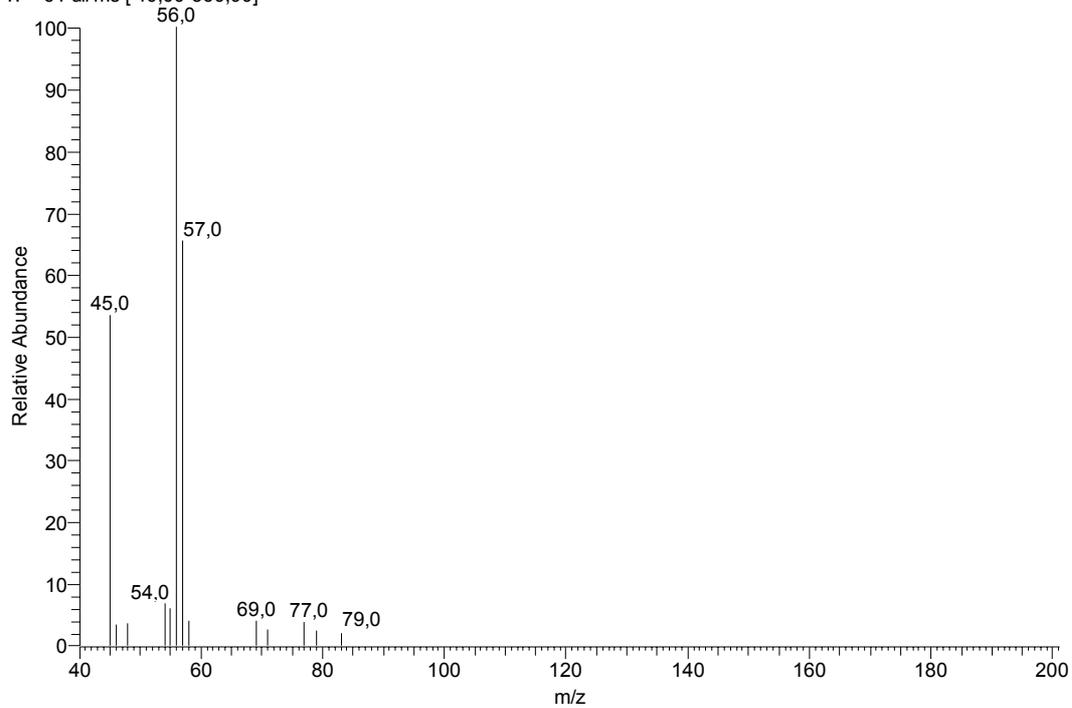
Anhang 2

Nicht identifizierte Substanzen aus dem TIC der Hämolymphe-Probe von *C. vulnerata* (Bild 12, Kreuz-Markierung).

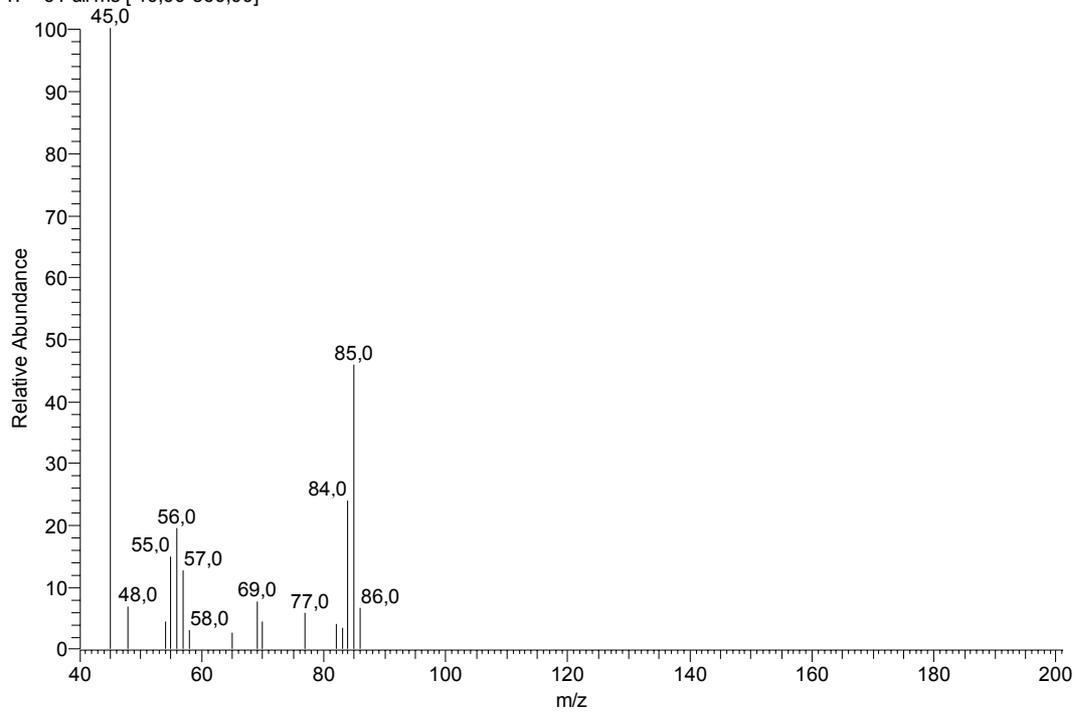
MK0101 #231 RT: 3,87 AV: 1 NL: 1,47E3  
T: + c Full ms [ 40,00-360,00]



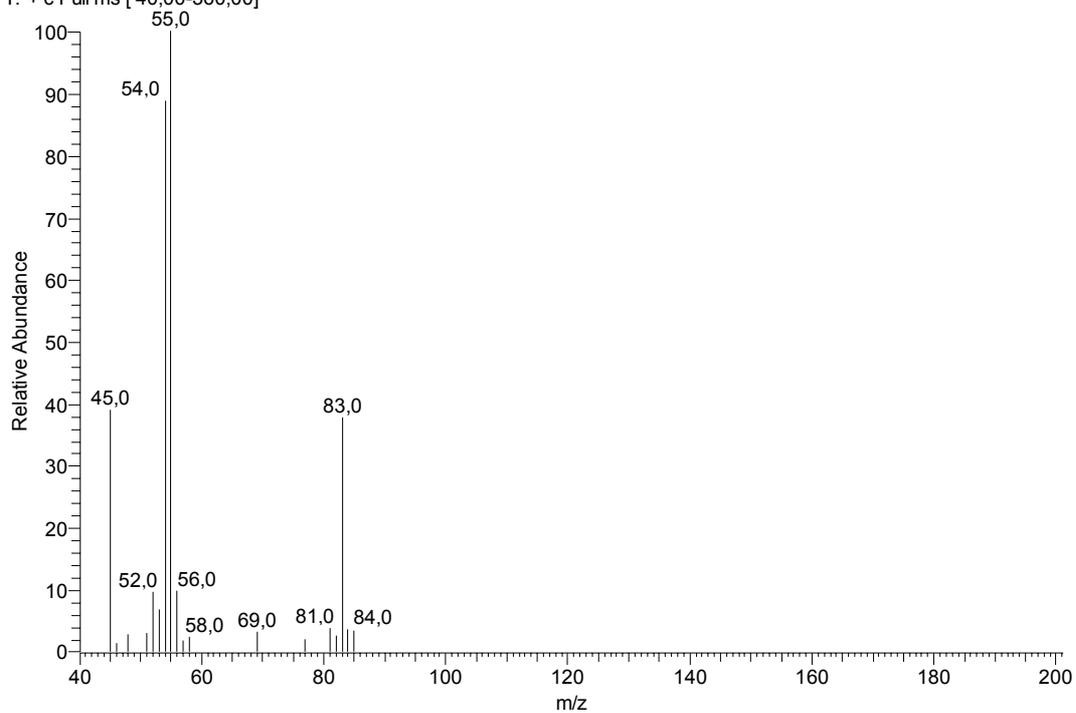
MK0101 #886 RT: 14,78 AV: 1 NL: 1,03E3  
T: + c Full ms [ 40,00-360,00]



MK0101 #922 RT: 15,38 AV: 1 NL: 6,34E2  
T: + c Full ms [ 40,00-360,00]

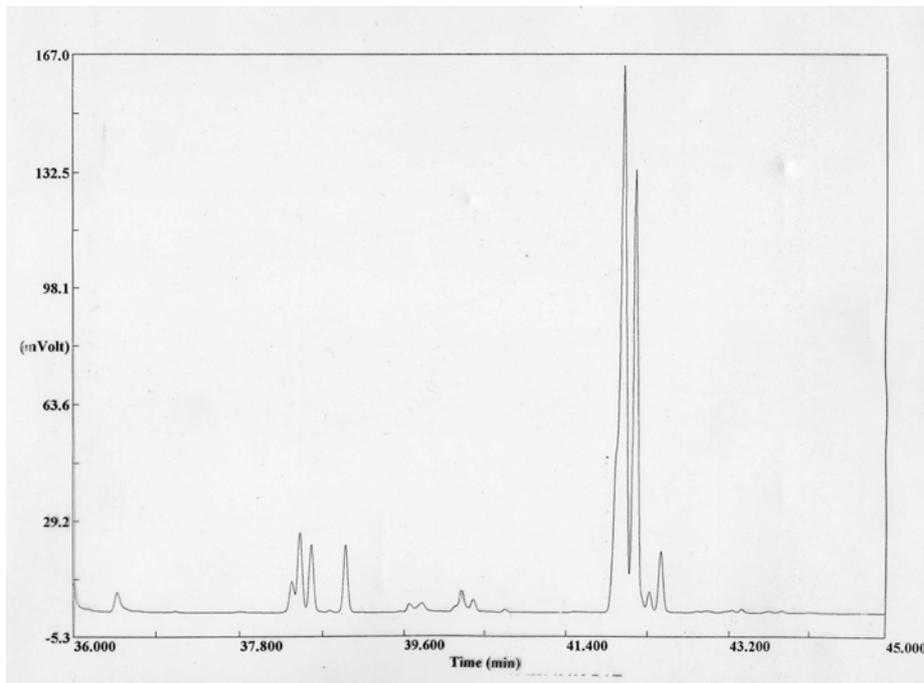


MK0101 #964 RT: 16,08 AV: 1 NL: 1,23E3  
T: + c Full ms [ 40,00-360,00]

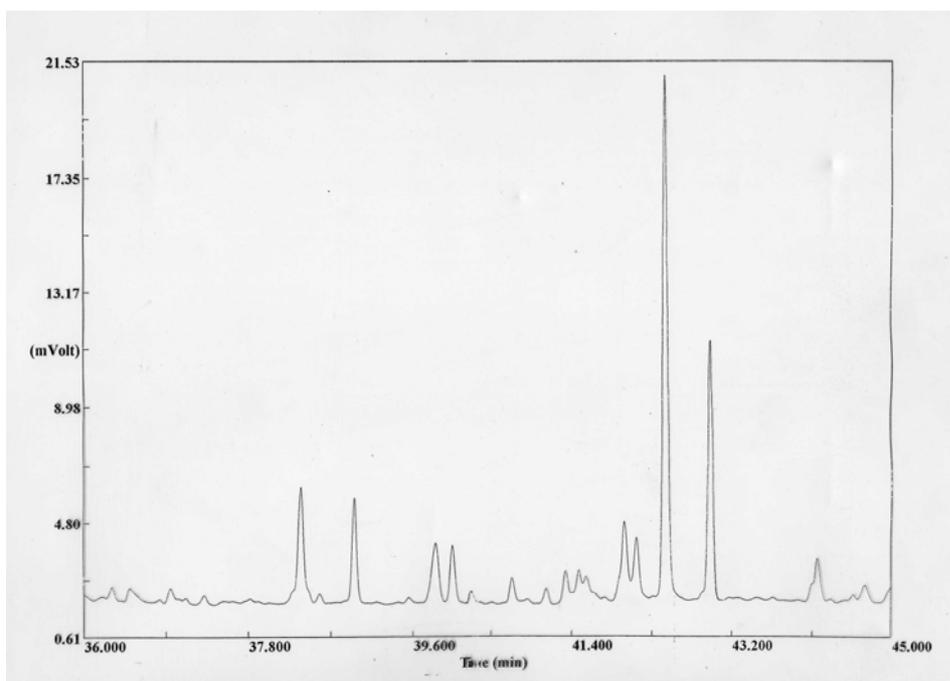


### Anhang 3

Ausschnitt aus dem Chromatogramm einer unbehandelten Hämolymphe Probe von *C. vulnerata* ♀ aufgenommen an einem GC-FID 8000 series (Fa. Fisons Instruments), HT-8-Kapillarsäule von SGE, Temp.prog.: 40/5/280(2).



Dieselbe Probe nach der Hydrierung:



---

## Anhang 4

1133 Basen langes Teilstück der 16S rRNA sequenziert aus den Mycetomen von *C. vulnerata*.

```
caagtcgaacggcaacataagagttattctcttgatggcaagtggcgtacgggtgagta
atataatggaacgtgccttaagtgggggataactagttgaaaaatagctaagtaccgc
ataatatcatattcattatgattaaaatgggattgcatactcatgcttttagatcggc
caatatctgattagcttgttggtagggtaaaggcctaccaaggtttgatcagtagctgt
tctgagaggatgatcagccacactggaactgagacacgggtccagacttctacggaaggca
gcagtggggaatcttgacaatggggggaaccctgatccggcaatccgcgtgagtgaag
aaggcttfcgagttgtaaactctttgttagggaagaaaaattttagttaatacctaa
aataaatgacgggtacctaaagaataagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggtaa
tacgtagggtgcaagcgttaatcggattattgggcgtaaagagtgcgcagggcgttata
taagacaattgtgaaatccctaagcttaacttaggaactgcaattgttactgtataacta
gagttatcagggagaagtagaattttatgtagcagtgaaatgcgtagatatatagag
gaataccaatagcgaaggcagcttctgggataaactgacgctcatgcacgaaagcgtg
gggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgccctaacgatgttactagttat
tggattttaataaatttagtaacgtagctaacgcattaagtagaccgctggggagtac
ggtcgcaagattaaaactcaaaggaattgacggggacctgcacaagcgggtggatgatgtg
gattaatcgatgcaacacgaaaaacctactcttgacatgttttaactttgaaa
gagattgaaaagggttgcataaacattaaaacacaggtgctgcatggctgtcgtcagct
cgtgtcgtgagatgtgggttaagtcccgaacgagcgaaccctattattagttgcta
cgaaaggcactctaataaaaactgccaatgataagttggaggaaggcgaggatg
```

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit weder einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt noch anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, im November 2006

---

(Monika Körner)