

Die chemische Ökologie der Steninae  
(Coleoptera: Staphylinidae) mit einem Beitrag  
zur molekularen Phylogenie

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der  
Universität Bayreuth  
Lehrstuhl für Tierökologie II  
Prof. Dr. K. Dettner

Vorgelegt von  
Carolin Maria Lang  
aus Stegaurach (bei Bamberg)

28. Oktober 2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom November 2010 bis Mitte Oktober 2014 am Lehrstuhl Tierökologie II der Universität Bayreuth unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Dettner angefertigt.

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

**Dissertation eingereicht am:** 29.10.2014

**Zulassung durch die Promotionskommission:** 05.11.2014

**Wissenschaftliches Kolloquium:** 13.02.2015

**Amtierender Dekan:** Prof. Dr. Rhett Kempe

**Prüfungsausschuss:**

Prof. Dr. Konrad Dettner (Erstgutachter)

Prof. Dr. Klaus H. Hoffmann (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Gerhard Rambold (Vorsitz)

Prof. Dr. Karlheinz Seifert

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Allgemeine Aspekte zur chemischen Ökologie der Insekten . . . . .	2
1.2	Die chemische Ökologie der Steninae . . . . .	3
1.3	Das Spreitungsvermögen der Steninae . . . . .	6
1.4	Die Phylogenie der Steninae . . . . .	9
1.5	Fragestellungen der Arbeit . . . . .	14
2	Material und Methoden	17
2.1	Verbrauchsmaterialien und Glasgeräte . . . . .	17
2.2	Geräte . . . . .	18
2.3	Chemikalien, Kits und Primer . . . . .	21
2.4	Sammelstellen der Käfer . . . . .	23
2.5	Bestimmung und Haltung der Käfer . . . . .	24
2.6	Zucht der Steninae . . . . .	25
2.7	Mikroskopie der Larvalbehaarung . . . . .	25
2.8	Sektionsmethodik . . . . .	27
2.9	GC-MS . . . . .	28
2.9.1	Spurenanalytische Untersuchungen an <i>Stenus</i> -Larven . . . . .	28
2.9.2	Spurenanalytische Untersuchungen der Pygidialdrüsen der Imagines von <i>Stenus</i> und <i>Dianous</i> , sowie an Ameisen der Gattung <i>Formica</i> . . . . .	29
2.10	Die Spreitung der Steninae . . . . .	30
2.10.1	Ethologische Untersuchungen zum Spreitungsverhalten der Steninae . . . . .	30
2.10.2	Messungen der Spreitungsdrücke am Tensiometer . . . . .	31
2.11	Biotests . . . . .	32
2.11.1	Spinnenbiotests . . . . .	32
2.11.2	Biotests zur topikalen Wirkung . . . . .	34
2.12	Molekulare Analysen . . . . .	34
2.12.1	PCR, Primer und Sequenzierung . . . . .	34
2.12.2	Stammbaumberechnung . . . . .	36
2.13	Verwendete Hard- und Software . . . . .	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Die Larven der Steninae . . . . .	41
3.1.1	Die Larvalentwicklung und physiologische Eigenschaften der Larven . . . . .	41

3.1.2	Mikroskopie der Larvalbehaarung . . . . .	44
3.1.3	Spurenanalytische Untersuchung der Larven . . . . .	47
3.2	Spurenanalytische Untersuchung adulter Steninae . . . . .	50
3.2.1	Spurenanalyse noch nicht untersuchter <i>Stenus</i> -Arten . . . . .	50
3.2.2	Spurenanalytische Untersuchung der myrmecophilen <i>Stenus</i> - Art <i>S. aterrimus</i> . . . . .	58
3.3	Die Spreitung der Steninae . . . . .	60
3.3.1	Das Spreitungsvermögen verschiedener <i>Stenus</i> -Arten . . . . .	60
3.3.2	Das Spreitungsverhalten und die Spreitungsgeschwindigkeiten der untersuchten Steninae . . . . .	62
3.3.3	Die Spreitungsdrücke der Drüsenverbindungen . . . . .	66
3.4	Biotests . . . . .	68
3.4.1	Spinnenbiotests . . . . .	68
3.4.2	Biotests zur topikalen Wirkung der Drüsenverbindungen . . . . .	69
3.5	Teilprojekte mit eindeutigen Negativergebnissen . . . . .	70
3.5.1	Nahrungsanalysen . . . . .	70
3.5.2	Endosymbionten in <i>Stenus</i> . . . . .	70
3.6	Phylogenetische Analysen der Steninae . . . . .	70
3.6.1	Sequenzcharakteristika und Statistik . . . . .	70
3.6.2	Phylogenetische Analysen . . . . .	71
4	Diskussion . . . . .	75
4.1	Die Larven der Steninae . . . . .	75
4.1.1	Die Entwicklung der Steninae . . . . .	75
4.1.2	Die Klebehaare der Larven . . . . .	76
4.1.3	Spurenanalytische Untersuchung der Entwicklungsstadien . . . . .	78
4.2	Spurenanalytische Untersuchungen weiterer Steninae . . . . .	79
4.2.1	Spurenanalytische Untersuchungen weiterer <i>Stenus</i> - und <i>Dia-</i> <i>nous</i> -Arten . . . . .	79
4.2.2	Spurenanalytische Untersuchung der myrmecophilen <i>Stenus</i> - Art <i>S. aterrimus</i> . . . . .	80
4.3	Biotests . . . . .	82
4.3.1	Spinnenbiotests . . . . .	82
4.3.2	Biotests mit Fliegenmaden zur topikalen Wirkung . . . . .	82
4.4	Die Spreitung der Steninae . . . . .	83
4.4.1	Beeinflussung des Spreitungsverhaltens durch verschiedene Ha- bitatansprüche . . . . .	83
4.4.2	Sekretsparmechanismen als ein Grund für variierendes Sprei- tungsverhalten . . . . .	84

---

4.4.3	Spreitungsverhalten ist abhängig von physiologischen Eigenschaften . . . . .	86
4.4.4	Physikochemisches Spreitungspotential des Sekretes und evolutionäre Aspekte . . . . .	86
4.5	Teilprojekte mit Negativergebnissen . . . . .	89
4.5.1	Nahrungsanalysen . . . . .	89
4.5.2	Endosymbionten bei <i>Stenus</i> . . . . .	89
4.6	Die Phylogenie der Steninae . . . . .	89
4.6.1	Genauswahl . . . . .	89
4.6.2	Partielle Unterstützung morphologischer monophyletischer Gruppen . . . . .	90
4.6.3	Bestätigung des Ursprunges von <i>Dianous</i> innerhalb <i>Stenus</i> . . . . .	91
4.6.4	Vergleich mit dem chemotaxonomischen Ansatz . . . . .	92
5	Zusammenfassung . . . . .	95
6	Summary . . . . .	97
A	Anhang . . . . .	i
A.1	Herstellungsanleitung der 4%igen PFA-Lösung . . . . .	i
A.2	Herstellungsanleitung des 1x TBE-Puffers . . . . .	ii
A.3	Herstellungsanleitung des 6x DNA-Loading Dye . . . . .	ii
A.4	Herstellungsanleitung des PCR-Markers $\lambda$ PST 1 . . . . .	ii
A.5	TICs und MS der authentischen Drüsenverbindungen . . . . .	iii
A.6	p-Werte-Tabelle zu Abb. 19 . . . . .	viii
B	Literaturverzeichnis . . . . .	ix

## Abbildungsverzeichnis

1	Das paarige Pygidialdrüsensystem von <i>S. comma</i> . . . . .	4
2	Ausgewählte Drüsenverbindungen der Steninae . . . . .	5
3	Der Spreitungsvorgang von <i>S. comma</i> im Detail . . . . .	8
4	Die Chemotaxonomie der Steninae nach SCHIERLING et al., 2013 . . . . .	13
5	Die Entwicklungsstadien von <i>Stenus junco</i> fotografisch dokumentiert . . . . .	43
6	REM-Gesamt- und Detailaufnahme des Abdominalbereiches einer L3-Larve von <i>S. latifrons</i> . . . . .	45
7	Verschiedene Haartypen von <i>S. latifrons</i> . . . . .	46
8	TEM-Aufnahmen vermeintlicher Haare von <i>S. latifrons</i> . . . . .	47
9	TIC und MS eines Larvalextraktes von <i>S. clavicornis</i> . . . . .	49
10	TIC und MS des Pygidialdrüsensekretes von <i>S. guttula</i> . . . . .	51
11	TIC und MS des Pygidialdrüsensekretes von <i>S. longipes</i> . . . . .	52
12	TIC und MS des Pygidialdrüsensekretes des italienischen Vertreters von <i>S. biguttatus</i> . . . . .	53
13	TIC des Pygidialdrüsensekretes von <i>S. argus</i> . . . . .	54
14	TIC des Pygidialdrüsensekretes von <i>D. betzi</i> aus Thailand . . . . .	55
15	TIC des Pygidialdrüsensekretes von <i>D. obliquenotatus</i> aus Thailand . . . . .	56
16	TIC des Pygidialdrüsensekretes von <i>D. karen</i> aus Thailand . . . . .	57
17	TIC des Pygidialdrüsensekretes von <i>S. aterrimus</i> aus einem Nest von <i>F. truncorum</i> . . . . .	59
18	TIC des Pygidialdrüsensekretes von <i>S. aterrimus</i> aus einem Nest von <i>F. pratensis</i> . . . . .	60
19	Graphische Darstellung der Spreitungsgeschwindigkeiten untersuchter Steninae . . . . .	65
20	Stammbaum der Steninae auf BA basierend . . . . .	73
21	TIC und MS von authentischem Stenusin . . . . .	iii
22	TIC und MS von authentischem Norstenusin . . . . .	iv
23	TIC und MS von authentischem $\alpha$ -Pinen . . . . .	v
24	TIC und MS von authentischem 1,8-Cineol . . . . .	vi
25	TIC und MS von authentischem 6-Methyl-5-hepten-2-on . . . . .	vii

## Tabellenverzeichnis

1	Für die phylogenetischen Analysen verwendete <i>Stenus</i> -, <i>Dianous</i> - und <i>Euaesthetus</i> -Arten . . . . .	10
2	Daten der Sammelstellen . . . . .	23
3	Zusammensetzung der Testlösungen für die Spinnenbiotests . . . . .	33
4	Verwendete Primerpaare . . . . .	36
5	Sequenzevolutionsmodellparameter . . . . .	37
6	Im Labor gezüchtete <i>Stenus</i> -Arten und Lebensdaten der gewonnenen Larven . . . . .	41
7	Sekretzusammensetzung der noch nicht spurenanalytisch untersuchten Sekrete neuer Steninae . . . . .	50
8	Das Spreitungsvermögen der untersuchten Steninae . . . . .	61
9	Ethologische Charakteristika des Spreitungsverhaltens der untersuchten Steninae . . . . .	64
10	Spreitungsdrücke der am Tensiometer gemessenen Drüsenverbindungen 1-7 . . . . .	66
11	Quantitative Komposition [%] der Pygidialdrüsensekrete der vier ausgewählten <i>Stenus</i> -Arten . . . . .	67
12	Spreitungsdrücke der künstlich hergestellten naturidentischen Sekretkompositionen der vier ausgewählten <i>Stenus</i> -Arten . . . . .	68
13	Für verschiedene Sequenzgruppierungen berechnete unkorrigierte p-Distanzwerte . . . . .	71
14	P-Werte multipler Vergleiche zwischen <i>D. coerulescens</i> und neun <i>Stenus</i> -Arten . . . . .	viii

## Abkürzungsverzeichnis

$\mu\text{g}$	.....	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	.....	Mikroliter
$\mu\text{m}$	.....	Mikrometer
$\text{MgCl}_2$	.....	Magnesiumchlorid
$\text{OsO}_4$	.....	Osmiumtetraoxid
D. (z. B. Artnamen <i>coerulescens</i> )		<i>Dianous coerulescens</i>
E. (z. B. Artnamen <i>ruficapillus</i> )		<i>Euaesthetus ruficapillus</i>
s. str.	.....	<i>sensu stricto</i> ; im engeren Sinne
S. (z. B. Artnamen <i>comma</i> )		<i>Stenus comma</i>
A. bidest.	.....	Aqua bidestillata
Abb.	.....	Abbildung
AIC	.....	<u>A</u> ik <u>a</u> ike <u>I</u> nformation <u>C</u> riterion
BA	.....	<u>B</u> ayesian <u>A</u> nalysis
bp	.....	basepairs (Basenpaare)
BPP	.....	<u>B</u> ayesian <u>P</u> osterior <u>P</u> robability
bzgl.	.....	bezüglich
bzw.	.....	beziehungsweise
ca.	.....	zirka
cm/s	.....	Zentimeter pro Sekunde
COI	.....	<u>C</u> ytochrom <u>O</u> xidase <u>I</u>
DMSO	.....	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid
DNA	.....	Desoxyribonukleinsäure ( <u>D</u> esoxyribonucleinacid)
dNTP	.....	Desoxynucleosidtriphosphat ( <u>d</u> esoxy <u>N</u> ucleosid <u>t</u> riphosphat)
EDTA	.....	<u>E</u> thylend <u>a</u> min <u>t</u> etra <u>a</u> acetat
ERG	.....	<u>E</u> ppendor <u>f</u> reaktionsgefäß
et al.	.....	et alii/et alae (und Andere)
fwd	.....	forward (Primer für eine Amplifizierung strangaufwärts)
g	.....	Gramm
GC-MS	.....	<u>G</u> aschromatographie- <u>M</u> assenspektrometrie
GTR	.....	<u>G</u> eneral <u>T</u> ime <u>R</u> eversible
kg	.....	Kilogramm
kV	.....	Kilovolt
M	.....	Molar
m	.....	Meter
mA	.....	Milliampère
mg	.....	Milligramm
min	.....	Minute

ML .....	<u>M</u> aximum <u>L</u> ikelihood
ml .....	Milliliter
mM .....	Millimolar
mm .....	Millimeter
mN/m .....	Millinewton pro Meter
MS .....	<u>M</u> assens <u>s</u> pektrum
ng .....	Nanogramm
NIST-Datenbank ...	<u>N</u> ational <u>I</u> nstitute of <u>S</u> tandards and <u>T</u> echnology-Datenbank
NJ .....	<u>N</u> eighbour <u>J</u> oining
p. a. ....	per analysi
PCR .....	Polymerasekettenreaktion ( <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
pers. com. ....	Personal communication
PFA .....	<u>P</u> ara <u>f</u> ormal <u>a</u> ldehyd
pmol .....	Pikomol
Propox .....	Propylenoxid
REM .....	<u>R</u> asterelektronen <u>m</u> ikroskop
rev .....	reverse (Primer für eine Amplifizierung strangabwärts)
rRNA .....	ribosomale Nukleinsäure ( <u>r</u> ibosomal <u>R</u> ibonuclein <u>a</u> cid)
RT .....	Retentionszeit; <u>R</u> etention <u>T</u> ime
s .....	Sekunde
sog. ....	sogenannt
spec. ....	Spezies
Tab. ....	Tabelle
TBE-Puffer .....	<u>T</u> ris <u>B</u> orat <u>E</u> DTA-Puffer
TBR .....	<u>T</u> ree <u>B</u> isection <u>R</u> econnection
TEM .....	<u>T</u> ransmissionselektronen <u>m</u> ikroskop
TIC .....	<u>T</u> otalionenstrom <u>c</u> hromatogramm
Tris .....	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
unpubl. ....	unpublished (unveröffentlicht)
v. a. ....	vor allem
v/v/v .....	Volumeneinheiten
VE-Wasser .....	<u>v</u> ollentsalztes Wasser
vgl. ....	vergleiche
z. B. ....	zum Beispiel
°C .....	Grad Celsius

## Publikationen

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sind zwei Veröffentlichungen entstanden:

- Lang C., Seifert K., Dettner K. (2012): Skimming behaviour and spreading potential of *Stenus* species and *Dianous coerulescens* (Coleoptera: Staphylinidae). *Naturwissenschaften* 99:937–947
- Lang C., Koerner L., Betz O., Puthz V., Dettner K. (2014): Phylogenetic relationships and chemical evolution of the genera *Stenus* and *Dianous* (Coleoptera: Staphylinidae). *Chemoecology* DOI:10.1007/s00049-014-0171-4

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeine Aspekte zur chemischen Ökologie der Insekten

Vielerlei chemische Verbindungen dienen speziell bei Insekten sowohl als Kommunikations- als auch als Feindabwehrmedium (DETTNER, 2003; EISNER, 1970; EISNER, 2003; EISNER et al., 2005). Grundsätzlich können bei diesen interspezifisch wirkenden Verbindungen, die auch Allelochemikalien genannt werden, drei Gruppen unterschieden werden: Allomone sind ausschließlich für den Sender von Vorteil, Kairomone sind dagegen nur für den Empfänger von Vorteil und Synomone bieten Vorteile für beide beteiligte Partner der Kommunikation oder Interaktion (SCHAEFER, 2003). Folglich sind also Allomone chemische Verbindungen, die unter anderem bei der effektiven Prädatorenvermeidung eingesetzt werden, um das Überleben des Senders zu gewährleisten (DETTNER, 2003; EISNER, 1970; EISNER, 2003; EISNER et al., 2005). Generell sind wirksame Abwehrmechanismen unerlässlich für das Überleben des einzelnen Individuums innerhalb eines komplexen Ökosystems. Bei Insekten haben sich hierbei verschiedene Mechanismen zur primären, sekundären und tertiären Abwehr etabliert (DETTNER, 2003). Primäre oder auch passive Abwehrmechanismen sind schon vor der Konfrontation des potentiellen Beutetieres mit dem Prädator oder Parasitoiden wirksam. In diese Kategorie gehören die Tarnung (Krypsis oder Mimese), das Tragen von Warnfarben (Aposematismus) und gregäres Verhalten der Warnfarben-tragenden Organismen und die Mimikry (Scheinwartracht; WICKLER, 1973; LUNAU, 2002). Ist die Begegnung mit dem Fressfeind bereits erfolgt, treten sekundäre oder aktive Abwehrmechanismen in Form von Angriff, Kampf, Flucht und tot stellen (Thanatose) in Erscheinung (SCHMIDT, 1990). Des Weiteren fallen in diese zweite Kategorie mechanische (Besitz von Dornen auf der Körperoberfläche, Einrollen/Einkugeln, das Abschießen von Haaren, festes Haften auf glatten Oberflächen und Hämolymp Austritt bei Reizung), optische (plötzliche Präsentation einer Schrecktracht zur Abschreckung/Verwirrung des Angreifers und Autotomie) und akustische Verteidigungsmechanismen (Stridulation bei Feindkontakt; EVANS & SCHMIDT, 1990; STORCH et al., 2001; DETTNER, 2003). Sind Insekten bereits von Insektenpathogenen wie Bakterien, Pilzen, Protozoen, Nematoden oder Parasitoiden befallen, besteht in einem gewissen Rahmen die Möglichkeit der endogenen oder tertiären Abwehr dieser Schadorganismen beispielsweise in Form einer primitiven Immunantwort auf die eingedrungenen Mikroorganismen. Endoparasitoide werden bisweilen durch Einkapselung unschädlich gemacht; die eingekapselten Parasitoide werden bei der nächsten Häutung entsorgt (TRENKZEK, 1998). Die Verteidigung gegen Prädatoren durch besondere chemische Verbindungen ist den bereits erklärten sekundären Abwehrstrategien zuzuordnen. Neben der aktiven Abwehr durch einen Kampf mit feindlichen Antagonisten und der kryptischen Färbung stellt die Abwehr

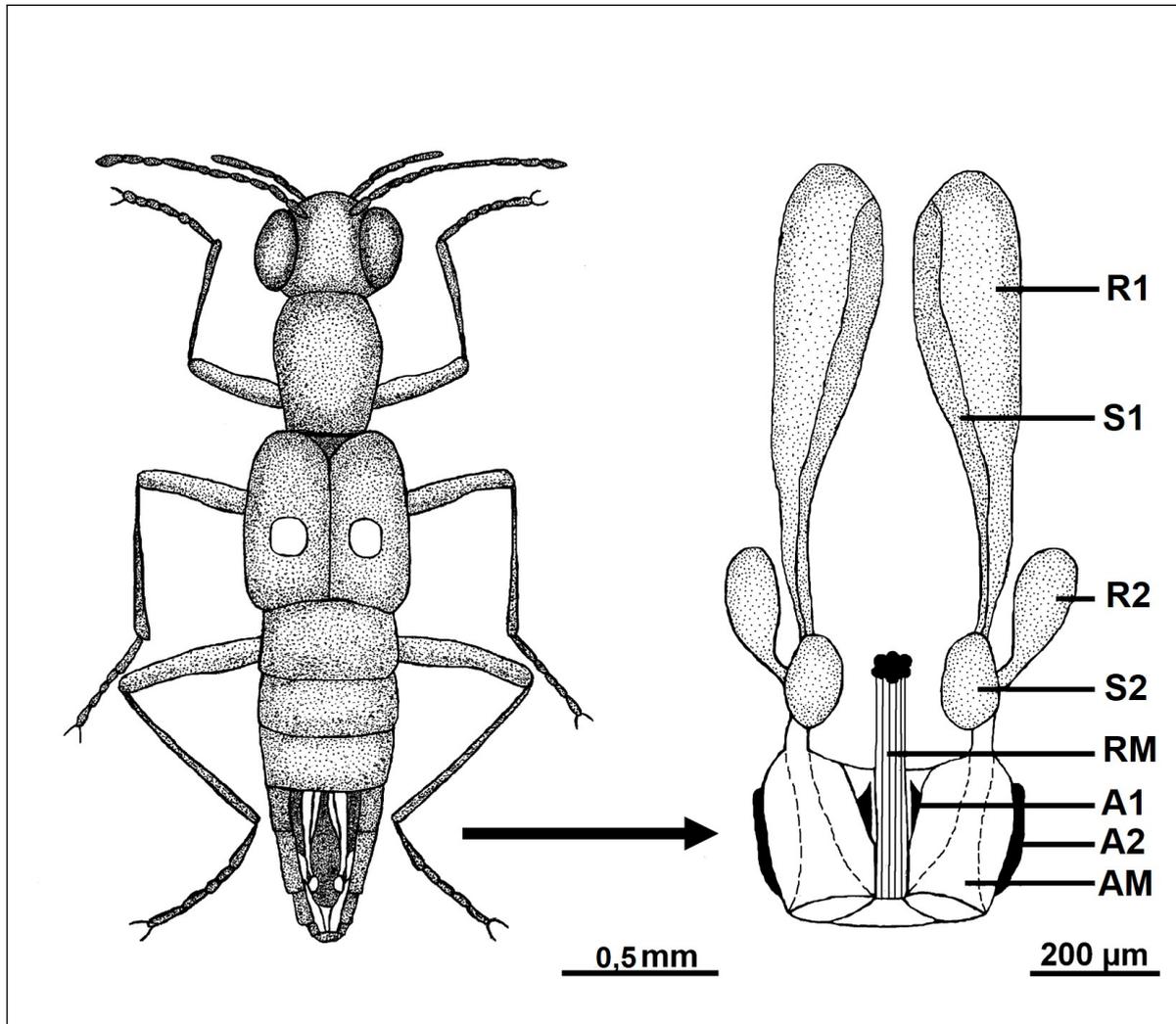
durch chemische Verbindungen die mit Abstand am häufigsten genutzte Verteidigungsstrategie bei Insekten dar (BLUM, 1981; WITZ, 1990; DETTNER, 2003; EISNER, 1970; EISNER, 2003; EISNER et al., 2005). Die Allomone, die bei der chemischen Verteidigung eingesetzt werden, können in folgende Gruppen unterteilt werden: handelt es sich um vom Sender abgegebene flüchtige Verbindungen, die der Empfänger (Prädatör) olfaktorisch wahrnimmt und sich sodann von der Duftquelle entfernt, so spricht man von so genannten Repellentien; werden die Allomone in unmittelbarer Nähe des Senders durch den Empfänger mittels des Geschmackssinnes erkannt, so handelt es sich um Deterrentien (DETTNER, 2003; SCHAEFER, 2003). Zumeist werden Allomone in Reservoirien exokriner Wehrdrüsen gespeichert und bei Bedarf abgegeben (STEIDLE & DETTNER, 1993; DETTNER, 1993). Vielerlei chemische Verbindungen werden hierbei als Abwehrstoffe eingesetzt, die folgendermaßen in Stoffgruppen unterteilt werden können: Terpene, Fettsäurederivate, aromatische Verbindungen, Alkaloide und diverse andere Gruppen (BLUM, 1981; DETTNER, 1987; 2003).

## 1.2 Die chemische Ökologie der Steninae

Vertreter der Käferfamilie der Staphylinidae (Kurzflügler) weisen einen für Coleopteren ungewöhnlichen und besonderen Habitus auf: die sonst das Abdomen bedeckenden Elytren sind reduziert und ermöglichen somit den Tieren eine weitaus höhere Bewegungsfreiheit im abdominalen Bereich verglichen mit anderen Käfern (DETTNER, 1985; 1991a; 1993). Zusätzlich erscheint der Körperbau der Tiere sehr schlank, so dass Staphylinidae vielerlei Habitate in Lückensystemen besiedeln können, die anderen Vertretern der Coleopteren vorenthalten bleiben (DETTNER, 1991a; 1993). Jedoch ergibt sich durch die Reduktion der Elytren auch ein entscheidender Nachteil für die Tiere: die Flügeldecken schützen üblicherweise das empfindliche Abdomen vor Prädatoren und anderen schädlichen Einflüssen; bei Staphyliniden entfällt diese Schutzfunktion. Deshalb sind Vertreter der Staphylinidae mit zumeist hoch entwickelten Abwehrdrüsen zur chemischen Verteidigung ausgestattet (DETTNER, 1991a; 1993).

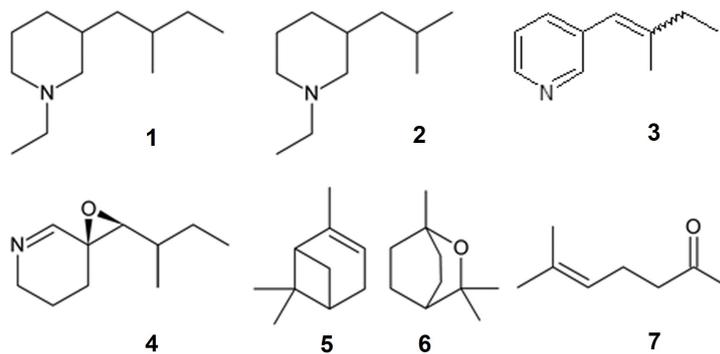
Auch Vertreter der Staphyliniden-Unterfamilie der Steninae, die die beiden Gattungen *Stenus* LATREILLE 1797 und *Dianous* LEACH 1819 umfasst, besitzen an der Spitze des Abdominalbereiches ein komplexes, paariges Pygidialwehrdrüsensystem (JENKINS, 1957). Das Drüsensystem besteht aus zwei kleinen und zwei großen Reservoirien mit den jeweils dazugehörigen, aufgelagerten sekretorischen Drüsengeweben, wo die Synthese der zur Abwehr benötigten chemischen Verbindungen stattfindet (siehe Abb. 1; LANG et al., 2012; SCHIERLING & DETTNER, 2013).

Die Reservoirien dieses Pygidialdrüsensystems beinhalten ein aus mehreren chemischen Verbindungen bestehendes, multifunktionales Sekret, das primär der Prädatorenvermeidung dient, jedoch auch einige weitere Aufgaben erfüllt (DETTNER, 1987;



**Abbildung 1:** Das paarig angelegte Pygidialdrüsen system von *S. comma*; Auf der linken Seite ist die Lage des Drüsen systems in der Abdominalspitze des Käfers dargestellt. Die rechte Seite zeigt eine schematische Darstellung des Pygidialdrüsen systemes im Detail. R1=großes Reservoir; S1=Sekretorisches Drüsen gewebe, das mit dem großen Reservoir assoziiert ist und die Alkaloidverbindungen synthetisiert; R2=Kleines Reservoir, welches die Terpenverbindungen beinhaltet; S2=Sekretorisches Drüsen gewebe zum kleinen Reservoir gehörend; RM=Retraktormuskel, der für den Rückzug der ausstülpbaren Membranteile der Drüsen verantwortlich ist; A1 und A2=Apodemen, die als Befestigung des Retraktormuskels dienen; AM=Ausstülpbare Membranteile der basalen Ausführgänge der Drüsen (verändert nach SZUJECKI, 1961; WHITMAN et al., 1990; LANG et al., 2012; SCHIERLING & DETTNER, 2013).

SCHIERLING et al., 2013; SCHIERLING & DETTNER, 2013). Das Drüsensekret ist art-spezifisch (LUSEBRINK, 2007; SCHIERLING et al., 2013) und besteht aus den Alkaloiden Stenusin (1), Norstenusin (2), 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin (3) und Cicindeloin (4; SCHILDKNECHT et al., 1975; KOHLER, 1979; LUSEBRINK et al., 2009; MÜLLER et al., 2012). Die Alkaloidverbindungen werden in den großen Reservoirs der Pygidialdrüsen gespeichert. Daneben bilden in den kleinen Pygidialdrüsenreservoirs gelagerte Terpenverbindungen wie z. B.  $\alpha$ -Pinen (5), 1,8-Cineol (6) und 6-Methyl-5-hepten-2-on (7; SCHILDKNECHT, 1970; NEUMANN, 1993) weitere Komponenten des multifunktionalen Drüsensekrets (siehe Abb. 2).



**Abbildung 2:** Für diese Arbeit relevante Drüsenverbindungen der Steninae (SCHILDKNECHT, 1970; SCHILDKNECHT et al., 1975; KOHLER, 1979; NEUMANN, 1993; LUSEBRINK et al., 2009; MÜLLER et al., 2012): Stenusin (1), Norstenusin (2), 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin (3), Cicindeloin (4),  $\alpha$ -Pinen (5), 1,8-Cineol (6) und 6-Methyl-5-hepten-2-on (7).

Neben diesen Hauptkomponenten sind auch Variationen einiger Alkaloidverbindungen wie teilweise dehydrierte Stenusin- und Norstenusinderivate oder die Pyridinverbindungen 3-(2-Methyl-1-propenyl)-pyridin und 3-(2-Methylbutyl)-pyridin in geringen Mengen bei einigen Spezies bekannt (LUSEBRINK, 2007; LUSEBRINK et al., 2009; SCHIERLING, 2013; SCHIERLING, unpubl.), sowie das Terpen Isopiperitenol (SCHILDKNECHT, 1970; SCHILDKNECHT et al., 1975).

Das multifunktionale Pygidialdrüsensekret ist durch eine starke biologische Aktivität ausgezeichnet und dient verschiedener Zwecke. Einige Drüsenverbindungen weisen ein hohes Potential als sog. „Feeding Deterrent“ auf, so dass das Sekret überaus effektiv zur aktiven chemischen Verteidigung gegen Prädatoren eingesetzt werden kann (CONNERT, 1974; NEUMANN, 1993; LUSEBRINK et al., 2009; SCHIERLING, 2013). Hierbei werden die Ausführgänge der Pygidialdrüsen ausgestülpt und das Sekret mittels Krümmung des Abdomens in Richtung des Angreifers abgegeben (JENKINS, 1957; NEUMANN, 1993). Darüber hinaus wird durch Verteilen des antimikrobiellen und fungiziden Sekretes auf der gesamten Körperoberfläche des Käfers durch sog. Sekretputzen („Secretion Grooming“; KOVAC & MASCHWITZ, 1990) eine Besiedelung

oder Infektion der Tiere durch schädliche Mikroorganismen vermieden (BETZ, 1999; LUSEBRINK, 2007; LUSEBRINK et al., 2008b; SCHIERLING et al., 2013). Das wohl herausragendste Charakteristikum des Drüsensekretes der Steninae ist dessen Spreitungsvermögen auf der Wasseroberfläche, welches die Käfer zu einer effektiven und überaus schnellen Fortbewegungsweise befähigt (LINSENMAIR, 1963; LINSENMAIR & JANDER, 1963; SCHILDKNECHT, 1970). Da die Spreitung der Steninae ein zentraler Aspekt dieser Arbeit ist, wird im folgenden Kapitel näher darauf eingegangen (siehe 1.3).

Durch die mannigfaltigen Funktionen ihres Pygidialdrüsensekretes sind die Vertreter der Steninae bestens an vielerlei Lebensräume angepasst, so dass die Käfer verschiedene feuchte Biotope wie z. B. Gewässerufer, Feuchtwiesen, Genist, Sümpfe und Moore, sowie trockene Standorte und sogar Ameisennester der Gattung *Formica*, wie im Falle von *S. aterrimus*, besiedeln können (HORION, 1963; KOCH, 1989; BETZ, 1998b; PUTHZ, 2012). Diese breitgefächerte Habitatwahl resultiert in hohen Artenzahlen innerhalb der Steninae. Bisher sind innerhalb der Gattung *Stenus* 2612 Arten weltweit bekannt, innerhalb der vor allem im asiatischen Raum vorkommenden Gattung *Dianous* belaufen sich die Artenzahlen auf über 223 (PUTHZ, unpubl.).

### 1.3 Das Spreitungsvermögen der Steninae

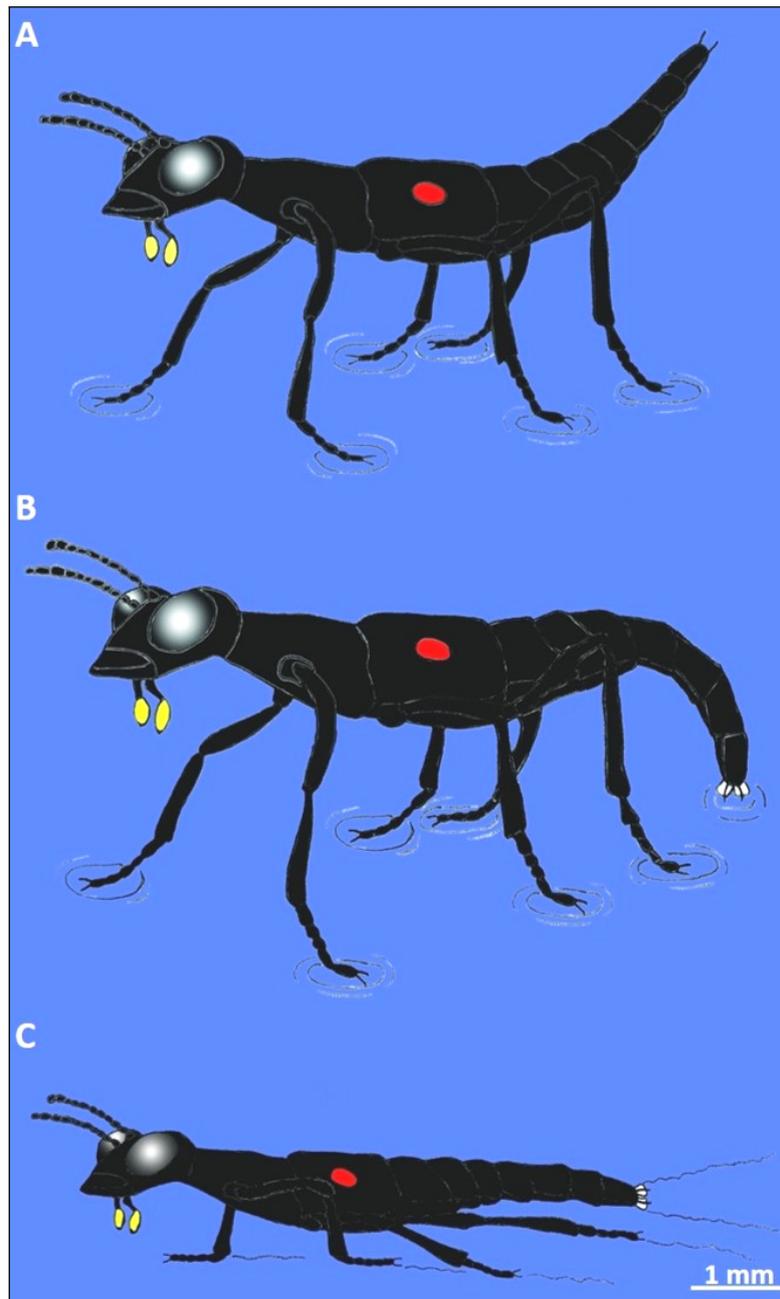
Im Jahr 1774 entdeckte FRANKLIN (in GAINES, 1966) erstmals das Phänomen der Spreitung, als er einen Teelöffel Pflanzenöl auf die Wasseroberfläche eines Teiches aufbrachte. Die Fähigkeit des Öls, sich über die Wasserfläche unter Bildung eines dünnen Filmes auszubreiten, nannte er schließlich „Spreitung“. Mit Hilfe der für diesen Test eingesetzten Ölmenge und der Öl-bedeckten Fläche des Teiches, kam Franklin zum dem Schluss, dass der Ölfilm aus nur einer Moleküllage besteht, also monomolekular ist.

Heutzutage wird der Terminus „Spreitung“ generell wie folgt definiert: Spreitung ist die Expansion einer flüssigen oder festen Phase auf einer flüssigen Phase unter Bildung einer Monolage (DÖRFLER, 1994). Jedoch existiert das Phänomen des Spreitens nicht nur in Laboratorien der physikalischen Chemie, sondern auch in freier Natur. Vertreter der Steninae, also die beiden Gattungen *Stenus* und *Dianous*, nutzen die Spreitung als effektive und außergewöhnliche Fortbewegungsweise auf der Wasseroberfläche. Wie bereits in Kapitel 1.2 der Einleitung erwähnt, besiedeln Steninae überwiegend feuchte Habitate und Gewässerufer (HORION, 1963; DETTNER, 1987). Aber die direkte Nachbarschaft offener Gewässer im Lebensraum der Steninae birgt auch Gefahr für die Käfer: während die Tiere Kleininsekten, wie z. B. Collembolen jagen, besteht unweigerlich die Möglichkeit, dass die Kurzflügler versehentlich ins Wasser fallen. Um einem Tod durch Ertrinken zu entgehen oder um Prädatoren wie Wasserläufer zu entkommen, haben die Kurzflügler das überaus ungewöhnliche Verhalten des

Spreitens evolutionär etabliert (LINSENMAIR, 1963; SCHILDKNECHT et al., 1975). Im Jahr 1901 entdeckte PIFFARD, dass manche *Stenus*-Arten die Fähigkeit besitzen, sich schnell und in einer unvergleichbaren Art und Weise über die Wasseroberfläche zu bewegen. Hierbei gleiten die Käfer mit hoher Geschwindigkeit ohne Einsatz ihrer Beine. Ein paar Jahre später untersuchten die französischen Wissenschaftler BILLARD und BRUYANT (1905) die beiden *Stenus*-Arten *S. tarsalis* LJUNGH und *S. cicindeloides* SCHALLER bezüglich ihres Spreitvermögens. BILLARD und BRUYANT (1905) stellten hierbei die Abgabe besonderer chemischer Verbindungen fest, die mit einem Detergens vergleichbar mit der Wasseroberfläche interagieren und die Käfer wie ein „Seifenboot“ voranschleichen. Diese Bewegung wird vom sog. Marangoni-Antrieb ausgelöst (SCRIVEN & STERNLING, 1960). Marangoni-Kräfte beruhen generell auf Oberflächenspannungsgradienten. Detergentien und die von den Käfern abgegebenen Substanzen stellen Moleküle dar, die aufgrund eines günstigen energetischen Zustandes an der freien Oberfläche verbleiben und somit die lokale Oberflächenspannung verringern (BUSH & HU, 2006). JENKINS (1960) untersuchte das Spreitverhalten von *Stenus* und *Dianous*. Infolgedessen beobachtete JENKINS (1960) eine negative Phototaxis der Tiere auf der Wasseroberfläche in Richtung des dunkler erscheinenden Ufers. Die Käfer verlieren beim Spreiten keinerlei Zeit und nehmen keine Umwege zum rettenden Ufer in Kauf. SCHILDKNECHT et al. (1975) machten ein Sekret, welches aus den Pygidialdrüsen an der Abdominalspitze emittiert wird, für die Spreitbewegung verantwortlich (siehe Abb. 1). Das Sekret wird von den ausgestülpten Drüsen abgegeben, sobald der Käfer die Wasseroberfläche berührt, so dass eine unmittelbare Spreitbewegung durch das Sekret erfolgen kann. Die Drüsenverbindungen bilden einen monomolekularen Film, dessen Front die Käfer vorantreibt (siehe Abb. 3; DETTNER, 1991a).

Mittels dieser Fortbewegung kann beispielsweise *S. comma* eine Spitzengeschwindigkeit von 75 cm/s erreichen und eine Gesamtstrecke von bis zu 15 m zurücklegen, wenn die Sekretabgabe kontinuierlich verläuft (LINSENMAIR & JANDER, 1963). Abgesehen von den Vertretern der Steninae ist das Spreiten nur noch von der Wasserwanze *Velia caprai* TAMANINI bekannt, die ihren Rüssel und spreitaktiven Speichel für die elegante Fortbewegung auf der Wasseroberfläche nutzt (LINSENMAIR & JANDER, 1963). Bislang ist diese außergewöhnliche Fortbewegungsweise von keinem anderen Tier bekannt.

Die treibende Kraft der Spreitung ist das Spreitungspotential der Drüsenverbindungen. Dabei ist es essentiell, dass die Verbindungen kaum wasserlöslich sind; andernfalls besteht nicht die Möglichkeit der Bildung einer Monolage auf der Wasseroberfläche. Zusätzlich muss die Spreitungssubstanz eine niedrigere Oberflächenspannung als die Film-tragende Substanz (in Falle der Steninae ist diese Wasser) aufweisen (ADAMSON & GAST, 1997). Nach SCHILDKNECHT (1976) besteht das Sekret der Steninae aus verschiedenen chemischen Komponenten. Hierbei ist Stenusin (1; siehe Abb. 2) haupt-



**Abbildung 3:** Der Spreitungsvorgang von *S. comma* im Detail; **A:** Der Käfer ist soeben auf die Wasseroberfläche gefallen; das Tier wird von der Oberflächenspannung des Wassers aufgrund seiner hydrophoben Tarsen und des geringen Körpergewichts getragen. **B:** Der Käfer krümmt sein Abdomen und gibt eine geringe Menge seines Drüsensekretes auf die Wasseroberfläche ab; an der Spitze des Abdomens sind die ausgestülpten Pygidialdrüsen sichtbar. **C:** Die Oberflächenspannung des Wassers wurde durch das Sekret verringert, so dass das Tier beim Spreiten flach auf der Wasseroberfläche liegt; der Käfer wird von den spreitungsaktiven Substanzen in seinem Sekret schnell vorangetrieben. Die Beine bewegen sich beim Spreiten nicht und werden an den Körper gepresst. Die Richtung der Spreitungsbewegung kann durch Krümmung des Abdomens geändert werden.

sächlich für das Spreiten verantwortlich, da es den höchsten Spreitungsdruck aufweist und deshalb die Oberflächenspannung von Wasser am meisten erniedrigt, verglichen mit den Terpenen 1,8-Cineol (6) und 6-Methyl-5-hepten-2-on (7; SCHILDKNECHT et al., 1976). Darüber hinaus stellt **1** die Hauptkomponente des Sekretes der meisten *Stenus*-Arten dar. Die Spreitungsdrücke der Drüsenverbindungen können mit Hilfe eines Grenzflächentensiometers ermittelt werden (SCHILDKNECHT et al., 1976). Nach der Messung der Oberflächenspannung  $\sigma$  der Drüsenverbindungen gegen die Luft und Messung der Grenzflächenspannung  $\gamma$  gegen Wasser, kann der Spreitungsdruck  $P$  mit Hilfe der Gleichung 1 berechnet werden.

$$P = \sigma_{\text{Wasser}} - (\sigma_{\text{Substanz}} + \gamma_{\text{Substanz/Wasser}}) \quad (1)$$

Die Spreitung findet nur dann statt, wenn die Differenz von  $\sigma_{\text{Wasser}}$  und  $\sigma_{\text{Substanz}} + \gamma_{\text{Substanz/Wasser}}$  positiv ist, also Arbeit gewonnen wird (WOLF, 1957). Andernfalls verbleibt der auf die Wasseroberfläche applizierte Tropfen in Form einer Linse an Ort und Stelle.

Obwohl fast alle Steninae (*Dianous* und *Stenus*) das Spreitungsalkaloid **1** in ihren Pygidialdrüsen besitzen, zeigt paradoxerweise nicht jede Art Spreitungsverhalten (JENKINS, 1960; LINSENMAYER, 1963; DETTNER, 1991a). Es wird vermutet, dass das Spreitungsvermögen mit der Fähigkeit der Tiere, Drüsensekret unter bestimmten Bedingungen abzugeben in Zusammenhang gebracht werden kann. Darüber hinaus dürften auch verschiedene Habitatbeschaffenheiten der von den Käfern besiedelten Biotope von Bedeutung sein (JENKINS, 1960).

#### 1.4 Die Phylogenie der Steninae

Schon in der Vergangenheit war die Phylogenie der überaus großen Gattung *Stenus* Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten. Dieser Umstand schlug sich auch in Bestimmungsschlüsseln wieder, die einen weiteren Versuch darstellten, sich einen Überblick über eine der artenreichsten Gattungen des Tierreichs zu verschaffen. So wurde die Gattung *Stenus* einst auf Basis verschiedener morphologischer Eigenschaften von einer Reihe von Staphylinidenspezialisten in sechs Untergattungen eingeteilt (REY, CASEY, MOTSCHULSKY in HERMAN, 2001; in LUSEBRINK, 2007; PUTHZ, 2008). Diese Unterteilung, überwiegend basierend auf morphologischen Charakteristiken der Käfer, resultierte in folgende sechs Untergattungen: *Stenus*, *Nestus*, *Tesnus*, *Hemistenus*, *Hypostenus* und *Parastenus* (siehe auch LOHSE (1964) worin diese heute überholte Untergattungsaufteilung noch Verwendung findet). Die zur Einteilung herangezogenen morphologischen Eigenschaften waren beispielsweise die Ausprägung

des vierten Segments der Metatarsen (einfach oder zweilappig), die relative Länge des ersten und fünften Segments der Metatarsen, bzw. Metatibien und das Vorhandensein oder Fehlen abdominaler Paratergite (CAMERON, 1930; LOHSE, 1964; ZHAO & ZHOU, 2004; KOERNER et al., 2013). Später wurden die Untergattungen taxonomisch geprüft und überarbeitet, so dass noch fünf der ehemals sechs Untergattungen ihre Gültigkeit behielten: *Stenus s. str.*, *Hemistenus* MOTSCHULSKY 1860, *Hypostenus* REY 1884, *Metatesnus* ADAM 1987 und *Tesnus* REY 1884 (PUTHZ, 2001; 2008). Im Zuge dieser Revision gehört nun die eingezogene Untergattung *Nestus* zu *Stenus s. str.*, *Hemistenus* wird neu als *Metatesnus* definiert und *Parastenus* wurde umbenannt in *Hemistenus*. Neueste Untersuchungsergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass diese Klassifizierung künstlich erscheint und möglicherweise keine authentischen phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen widerspiegelt. Zur Zeit wird die gesamte Gattung *Stenus* in eine große Zahl von monophyletischen Artengruppen mit Hilfe einer Vielzahl morphologischer Charakteristika aufgespalten (siehe Tab. 1; PUTHZ, 2008).

**Tabelle 1:** Für die phylogenetischen Analysen verwendete *Stenus*-, *Dianous*- und *Euaesthetus*-Arten

Gattung	Untergattung	Artengruppe/ Artenkomplex	Art	Sammelort	GenBank-Accession Number		
					COI	Histon H3	16S rRNA
Innengruppe <i>Stenus</i>	<i>Stenus s. str.</i>	<i>ater</i>	<i>junio</i> (PAYKULL, 1789)	D, Schleswig-Holstein, Kiel	JQ085760 <sup>d</sup>	KJ127165	KJ144853
			Canada, Alberta	JQ085761 <sup>d</sup>	KJ127166	KJ144854	
		<i>clavicornis</i>	<i>clavicornis</i> (SCOPOLI, 1763)	D, Baden-Württemberg, Tübingen	JQ085764 <sup>d</sup>	KJ127156	KJ144844
			D, Schleswig-Holstein, Kiel	JQ085765 <sup>d</sup>	KJ127157	KJ144845	
		<i>comma</i>	<i>comma</i> (LECONTE, 1863)	D, Baden-Württemberg, Tübingen	JQ085769 <sup>d</sup>	KJ127158	KJ144846
				Canada, Alberta	JQ085771 <sup>d</sup>	KJ127159	KJ144847
		<i>biguttatus</i>	<i>biguttatus</i> (LINNAEUS, 1758)	D, Schleswig-Holstein, Strande	JQ085772 <sup>d</sup>	KJ127146	KJ144834
				D, Schleswig-Holstein, Strande	JQ085773 <sup>d</sup>	KJ127147	KJ144835
		<i>boops</i>	<i>boops</i> (LJUNGH, 1804)	D, Baden-Württemberg, Tübingen	JQ085778 <sup>d</sup>	KJ127150	KJ144838
				D, Baden-Württemberg, Tübingen	JQ085779 <sup>d</sup>	KJ127151	KJ144839
		<i>canaliculatus</i>	<i>canaliculatus</i> (GYLLENHAL, 1827)	D, Baden-Württemberg, Tübingen	JQ085780 <sup>d</sup>	KJ127154	KJ144842
				D, Baden-Württemberg, Tübingen	JQ085781 <sup>d</sup>	KJ127155	KJ144843
		<i>nitens</i>	<i>nitens</i> (STEPHENS, 1833)	D, Baden-Württemberg, Tübingen	JQ085782 <sup>d</sup>	KJ127169	KJ144857
				<i>humilis</i>	<i>humilis</i> (ERICHSON, 1839)	D, Baden-Württemberg, Tübingen	JQ085783 <sup>d</sup>
		D, Baden-Württemberg, Tübingen	JQ085784 <sup>d</sup>			KJ127161	KJ144849
<i>Tesnus</i>	<i>brunnipes</i>	<i>brunnipes</i> (STEPHENS, 1833)	D, Bayern, Fichtelgebirge, Gemös	KJ509590	KJ127152	KJ144840	
			D, Bayern, Fichtelgebirge, Gemös	KJ509591	KJ127153	KJ144841	
	<i>crassus</i>	<i>intermedius</i> <sup>d</sup> (REY, 1884)	D, Mecklenburg-Vorpommern, Insel Poel	KJ509592	KJ127163	KJ144851	
			D, Mecklenburg-Vorpommern, Insel Poel	KJ509593	KJ127164	KJ144852	

Tabelle 1 – Fortsetzung der Tabelle der vorherigen Seite

Gattung	Untergattung	Artengruppe/ Artenkomplex	Art	Sammelort	GenBank-Accession Number		
					COI	Histon H3	16S rRNA
	<i>Hypostenus</i>	<i>similis</i>	<i>similis</i> (HERBST, 1784)	D, Bayern, Creußen	JQ085787 <sup>a</sup>	KJ127170	KJ144858
			<i>solutus</i> (ERICHTSON, 1840)	D, Schleswig- Holstein, Strande	JQ085789 <sup>a</sup>	KJ127171	KJ144859
				D, Schleswig- Holstein, Strande	JQ085790 <sup>a</sup>	KJ127172	KJ144860
		<i>tarsalis</i>	<i>tarsalis</i> (LJUNGH, 1804)	D, Schleswig- Holstein, Flintbek	JQ085794 <sup>a</sup>	KJ127173	KJ144861
				D, Bayern, Limmers- dorfer Forst	JQ085795 <sup>a</sup>	KJ127174	KJ144862
	<i>Metatesmus</i>	<i>bifoveolatus</i>	<i>bifoveolatus</i> (GYLLENHAL, 1827)	D, Schleswig- Holstein, Kiel	JQ085796 <sup>a</sup>	KJ127145	KJ144833
		<i>binotatus</i>	<i>binotatus</i> (LJUNGH, 1804)	D, Schleswig- Holstein, Flintbek	JQ085798 <sup>a</sup>	KJ127148	KJ144836
				D, Brandenburg, Glienicke	JQ085799 <sup>a</sup>	KJ127149	KJ144837
		noch nicht definiert	<i>latifrons</i> (ERICHTSON, 1839)	D, Schleswig- Holstein, Flintbek	JQ085792 <sup>a</sup>	KJ127167	KJ144855
				D, Schleswig- Holstein, Flintbek	JQ085791 <sup>a</sup>	KJ127168	KJ144856
	<i>Hemistenus</i>	<i>impressus</i>	<i>impressus</i> (GERMAR, 1824)	D, Schleswig- Holstein, Kiel	JQ085804 <sup>a</sup>	KJ127162	KJ144850
<i>Dianous</i>	Gruppe I		<i>pentingae</i> sp. n.	China, Hainan Prov., Ledong County, Jian- fengling	KJ509585	KJ127140	KJ144828
	Gruppe II	<i>Coerulescens</i>	<i>coerulescens</i> (GYLLENHAL, 1810)	D, Bayern, Rös lau Egerfälle	JQ085805 <sup>a</sup>	KJ127138	KJ144826
		<i>Aereus- andrewesi</i>	<i>vietnamensis</i> (PUTHZ, 1980)	China, Hainan Prov., Ledong County, Jian- fengling	KJ509586	KJ127141	KJ144829
		<i>Ocellatus</i>	<i>fellowsi</i> (PUTHZ, 2005)	China, Hainan Prov., Wuzhishan City, Mt. Wuzhishan	KJ509584	KJ127139	KJ144827
Außengruppe <i>Euaesthetus</i> ( <i>Euaesthetinae</i> )			<i>ruficapillus</i> (LACORDAIRE, 1835)	D, Bayern, Lichtenfels, Mainüberschwemmungs- geniste	KJ509587	KJ127142	KJ144830
				D, Bayern, Lichtenfels, Mainüberschwemmungs- geniste	KJ509588	KJ127143	KJ144831
				D, Bayern, Lichtenfels, Mainüberschwemmungs- geniste	KJ509589	KJ127144	KJ144832

Die Arten sind nach Gattung, Artenkomplex (*Dianous*; PUTHZ, 1981; 2000; 2005; SHI & ZHOU, 2011; TANG et al., 2011), bzw. Artengruppen (*Stenus*; PUTHZ, 2006; 2008) und Untergattungen unterteilt (vgl. KOERNER et al., 2013). Gruppenmitglieder der chemotaxonomischen Gruppierungen nach SCHIERLING et al., 2013 sind farbig markiert; rot: Piperidin-Gruppe, gelb: Pyridin-Gruppe, blau: Epoxypiperidein-Gruppe; Arten der *Dianous*-Komplexe I und II (PUTHZ, 1981; 2000; 2005; SHI & ZHOU, 2011; TANG et al., 2011) sind grün hervorgehoben.

D=Deutschland

<sup>a</sup> Sequenzen aus GenBank

<sup>b</sup> von Dr. A. Kleeberg, Berlin zur Verfügung gestellte Käfer

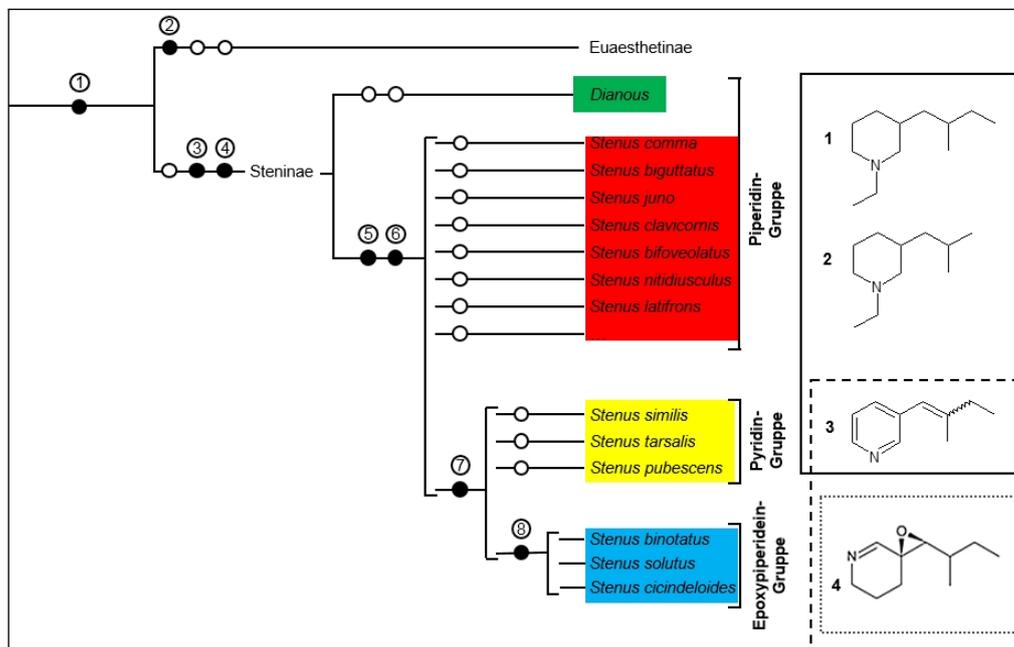
Alle *Stenus*-Arten aus Deutschland außer *S. brunripes* wurden von O. Betz oder L. Koerner gesammelt; *S. brunripes* und *E. ruficapillus* wurden von C. Lang gesammelt; kanadische *Stenus*-Arten, sowie *D. coerulescens*, wurden von I. Lusebrink gesammelt; chinesische *Dianous*-Arten wurden von L. Tang gesammelt;

Die Gattung *Dianous*, früher als die Schwestergattung zu *Stenus* angesehen, wird derzeit basierend auf der Morphologie des Frons in die zwei Artengruppen I und II

unterteilt (PUTHZ, 1981; 2000; 2005; SHI & ZHOU, 2011; TANG et al., 2011). Mitglieder der *Dianous*-Artengruppe I besitzen große Facettenaugen, welche mit den Augen der Gattung *Stenus* vergleichbar sind (PUTHZ, 2008). Deshalb wurde die Gattung *Dianous* ursprünglich zu *Stenus* gezählt, bis festgestellt wurde, dass diese Käfer den für *Stenus* typischen Klebfangapparat zum Beuteerwerb nicht besitzen (PUTHZ, 1981).

Jedoch können nicht nur morphologische Merkmale zur Klärung komplexer phylogenetischer Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der großen Unterfamilie der Steninae herangezogen werden. Wie bereits in Kapitel 1.2 erklärt, zeichnen sich Vertreter der Steninae durch ein artspezifisches und multifunktionales Pygidialdrüsensekret aus (LUSEBRINK, 2007; SCHIERLING et al., 2013). Da die Sekretkomposition streng artspezifisch ist, kann diese für eine sog. Chemotaxonomie, basierend auf der Verteilung der Alkaloide und der Terpene (1-7; siehe Abb. 2) in den Drüsen der Käfer eingesetzt werden (siehe Abb. 4).

Nach SCHIERLING et al. (2013) lassen sich so fast alle mitteleuropäischen Steninae nach ihrem Alkaloidgehalt in den Drüsen in drei Hauptgruppen einteilen. Die meisten Vertreter der Steninae gehören zur basalen oder primitiven Piperidin-Gruppe (SCHIERLING et al., 2013). Das Sekret dieser Gruppenmitglieder besteht hauptsächlich aus den Alkaloiden 1 als Haupt- und 2 als Sekundärkomponente. Zusätzlich sind die Terpene 5, 6 und 7 in geringer Menge oder als Spurenkomponente im Sekret enthalten. Darüber hinaus ist das Pygidialdrüsensystem primitiver oder basaler Steninae durch den Besitz gut ausgeprägter kleiner Reservoirs neben den großen Drüsenreservoirs gekennzeichnet, die die Terpene beinhalten. Dies gilt im Besonderen für die Arten *S. comma* und *S. biguttatus*. Bezüglich der Sekretkomposition bestehend aus den Verbindungen 1, 2, 5 und 6 gehört auch die einzige mitteleuropäische *Dianous*-Art, *D. coerulea*, zur Piperidin-Gruppe. Die nächst höher evolvierte Taxonomiestufe stellt die sog. Pyridin-Gruppe dar. Vertreter dieser Gruppe besitzen eine auf den Alkaloiden 1 und 3 basierende Sekretkomposition; 2 erscheint hierbei nur als Sekundärkomponente. Der Anteil der Terpene am Gesamtsekret ist deutlich reduziert, ebenso verhält es sich mit der Größe der kleinen Reservoirs und den zugehörigen sekretorischen Geweben des kleinen Drüsensystems (SCHIERLING et al., 2013). Typische Vertreter der Pyridin-Gruppe sind *S. similis* und *S. tarsalis*. Die Epoxy-piperidein-Gruppe stellt das am höchsten chemotaxonomisch evolvierte Niveau der Steninae dar. Nur wenige Vertreter sind dieser Gruppe zuzuschreiben, wie beispielsweise *S. binotatus*, *S. solutus* und *S. cicindeloides*. Das Sekretkompositionsrepertoire dieser Tiere ist um Alkaloid 4 als Hauptkomponente erweitert, während 3 als Sekundärkomponente mit hoher Konzentration dient. Die Alkaloide 1 und 2 sind in dieser Komposition nur als Spurenkomponenten unterrepräsentiert, wohingegen keinerlei Terpene im Sekret zu finden sind; analog fehlen bei Vertretern dieser Gruppe gänzlich kleine Reservoirs mit ihren Drüsengeweben im Pygidialdrüsensystem (SCHIERLING et al., 2013).



**Abbildung 4:** Die Chemotaxonomie der Steninae verändert nach SCHIERLING et al. (2013); Die Piperidin-Gruppe ist die artenreichste Gruppe; die gelisteten Arten stellen deshalb nur Beispiele dar. Chemotaxonomische Gruppen sind farbig markiert: rot=primitive Piperidin-Gruppe; gelb=abgeleitete Pyridin-Gruppe; blau=am höchsten evolvierte Epoxypiperidein-Gruppe;

Klade durch folgende Merkmale unterstützt:

- 1 • molekulare Daten (18S rDNA; GREBENNIKOV & NEWTON, 2009)
- 2 • 18S rDNA, Bootstrapping-Ergebnisse 79-97 % (GREBENNIKOV & NEWTON, 2009)
- 3 • 18S rDNA, Bootstrapping-Ergebnisse 99-100 % (GREBENNIKOV & NEWTON, 2009)
- 4 • Invagination der Pleuralmembran zwischen dem 9. and 10. Abdominalsegment, welche paarige Komplexdrüsen bildet (NAOMI, 1985);  
Biosynthese der Abwehralkaloide Stenusin (1) und Norstenusin (2)
  - Komplexdrüsen fehlen an den Abdominalsegmenten 9 und 10
- 5 • Langes, ausstülpbares Labium mit distalem adhäsiven Beutefangapparat (Klebfangapparat; PUTHZ, 1981; LESCHEN & NEWTON, 2003)
  - Kurzes, kaum ausstülpbares Labium ohne Klebfangapparat
- 6 • Nur die Spitze der inneren Parameren ist beborstet (PUTHZ, 1981)
  - Gesamte innere Paramerenoberfläche ist beborstet
- 7 • Erweiterung des Alkaloidrepertoires um 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin (3), Menge von Norstenusin (2) und Terpenen (5-7) nimmt ab
  - Nur Stenusin (1) und Norstenusin (2) vorhanden, Terpene (5-7) generell signifikant präsent
- 8 • Erweiterung des Alkaloidrepertoires um Cicindeloin (4); Stenusin (1) und Norstenusin (2) nur in minimalen Spuren vorhanden
  - Nur 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin (3), Stenusin (1) und Spuren von Norstenusin (2) vorhanden; 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin (3) und Stenusin (1) als Hauptkomponenten.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass bisher verschiedene Ansätze angestrebt worden sind, phylogenetische Beziehungen innerhalb der Gattung *Stenus* und zwischen den Gattungen *Stenus* und *Dianous* aufzuklären. Einige Untersuchungen beschäftigten sich mit der phylogenetischen Position der Steninae innerhalb der Staphylinidae, wie z. B. PUTHZ (1981), HANSEN (1997), LESCHEN & NEWTON, (2003), THAYER, (2005), GREBENNIKOV & NEWTON, (2009) und CLARKE & GREBENNIKOV, (2009). Nach GREBENNIKOV & NEWTON (2009) ist die Monophylie der Steninae durch viele larvale und adulte Autapomorphien und auch durch molekular-genetische Analysen bestätigt. Jedoch existieren bisher nur sehr wenige molekular-genetische Untersuchungen phylogenetischer Beziehungen innerhalb der artenreichen Gattung *Stenus*. Lediglich eine Arbeit beschäftigt sich näher mit dieser Thematik und diskutiert auch Vermutungen bezüglich der Stellung der Gattung *Dianous* (KOERNER et al., 2013). KOERNER et al. (2013) stellten fest, dass die ehemalige Schwestergattung *Dianous* ihren Platz jetzt innerhalb der nun paraphyletischen Gattung *Stenus* einnimmt. Diese Ergebnisse implizieren einen sekundären Verlust des Klebfangapparates bei *Dianous*. Die Untersuchungen von KOERNER et al. (2013) stützen sich auf molekular-genetische Analysen basierend auf Gensequenzabschnitte der Cytochrom I Oxidase (COI).

## 1.5 Fragestellungen der Arbeit

Die vorliegende Dissertationsschrift beschäftigt sich hauptsächlich mit der chemischen Ökologie der Steninae, die Gattungen *Dianous* und *Stenus* umfassend. Erstmals werden *Stenus*-Larven mittels unterschiedlicher Methoden bezüglich verschiedener Gesichtspunkte eingehend untersucht. Neben der spurenanalytischen Untersuchung einiger, noch nicht untersuchter thailändischer *Dianous*-Arten, ist auch die Integration der myrmecophilen *Stenus*-Art *S. aterrimus* in die entsprechenden Wirtsameisennester ein wichtiger Aspekt. Weitere Untersuchungen die Multifunktionalität des *Stenus*-Sekretes betreffend sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Größtes Augenmerk liegt hierbei auf den physikochemischen Eigenschaften des Sekretes, das die Tiere zur einmaligen Fortbewegung auf der Wasseroberfläche, dem Spreiten, befähigt. Des Weiteren wird die Chemotaxonomie der Steninae mit einem molekularphylogenetischen Ansatz in Zusammenhang gebracht.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit werden nun folgende Fragestellungen aufgegriffen:

- Welche besonderen physiologischen Charakteristika besitzen die Larven verschiedener *Stenus*-Arten? Sind bei den Larven Drüsen, vergleichbar mit den Pygidialdrüsen der Adulten, vorhanden? Was lässt sich über die Lebensweise und Entwicklungsdauer der Larven feststellen? Welche Aussagen lassen sich

zum Beuteerwerb treffen?

⇒ Einige *Stenus*-Arten sind im Labor vermehrt und licht- und elektronenmikroskopisch untersucht worden. Hierbei wurde besondere Aufmerksamkeit der eigentümlichen Körperbehaarung der Larven zum Beutefang gewidmet. Ebenso erfolgte eine spurenanalytische Untersuchung der Larven.

- Welche Naturstoffe befinden sich im Sekret noch nicht spurenanalytisch untersuchter Steninae? Lassen sich gar eventuelle neue Verbindungen oder Biosynthesewegzwischenstufen feststellen?  
⇒ Mittels GC-MS sind weitere, noch nicht untersuchte *Dianous*- und *Stenus*-Arten analysiert worden.
- Auf welche Art und Weise integriert sich die obligat myrmecophile *Stenus*-Art *S. aterrimus* in die Nester ihrer Wirtsameisen und inwiefern sind hier Pygidialdrüsensekrete beteiligt?  
⇒ Individuen von *S. aterrimus* sind spurenanalytisch unter Berücksichtigung verschiedener Integrationsstrategien anderer myrmecophiler Coleopteren untersucht worden.
- Welche Steninae sind zur Spreitung befähigt? Wie unterscheidet sich das Spreitungsverhalten zwischen einzelnen Arten? Durch welche physikochemischen Eigenschaften sind die einzelnen Naturstoffe der Steninae ausgezeichnet? Gibt es im Sekret synergistische Effekte zwischen den einzelnen Verbindungen bezüglich des Spreitungspotentials?  
⇒ Ethologische Untersuchungen des Spreitungsverhaltens verschiedener *Stenus*-Arten sind durchgeführt worden. Spreitungsgeschwindigkeiten wurden ermittelt und statistisch ausgewertet. Spreitungsdrücke der einzelnen Naturstoffe (Alkaloide und Terpene) und naturidentischer Sekretkompositionen wurden am Tensiometer gemessen.
- Besitzen die *Stenus*-Naturstoffe potentielle topikale Wirkung oder könnten diese als Spinnendeterrent fungieren?  
⇒ Es wurden Spinnenbiotests mit Vertretern der Lycosidae und Salticidae durchgeführt, sowie Biotests zur topikalen Wirkung mit Maden von *Calliphora vomitoria*.
- Lassen sich Aussagen über das Nahrungsspektrum der Steninae treffen? Besteht die Hauptnahrung der Käfer nur aus Collembolen oder werden auch andere Kleinorganismen erbeutet?  
⇒ Es wurden Analysen des Kropfinhaltes der Käfer durchgeführt, um Aufschluss über das Beutespektrum der Tiere zu erhalten.

- Beherbergen Steninae die bei Insekten häufigen Endosymbionten der Gattungen *Rickettsia* und *Wolbachia*?  
⇒ Mittels PCR wurde versucht, bei Vertretern der Steninae das Vorhandensein der Endosymbionten der oben genannten Gattungen nachzuweisen.
- Lässt sich die auf niedermolekularen Wirkstoffen basierende Chemotaxonomie der Steninae nach SCHIERLING et al., 2013 mit molekulargenetischen Untersuchungen in Einklang bringen?  
⇒ Auf der Basis dreier Gensequenzen der COI, 16S rRNA und des Histon H3-Genes wurden Stammbäume, die Vertreter der drei chemotaxonomischen Gruppen nach SCHIERLING et al. (2013) enthielten, erstellt und mit dem Ansatz von SCHIERLING et al. (2013) verglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verbrauchsmaterialien und Glasgeräte

- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland:
  - Mikroliterpipettenspitzen in verschiedenen Größen
  - Zentrifugenröhrchen 50 ml
  - Zellstoff
  - Sterilspritzenfilter 0,22  $\mu\text{m}$  Porendurchmesser
  - Sterilspritzen 50 ml
  
- Brand GmbH, Wertheim, Deutschland:
  - Pasteurpipetten
  - Messzylinder in verschiedenen Größen
  - Schraubdeckelgläser in verschiedenen Größen
  - Bechergläser in verschiedenen Größen
  - Glaspipetten in verschiedenen Größen
  - Kristallisationsschale  $\varnothing 24,1$  cm
  
- Sonstige Hersteller:
  - Eppendorfreaktionsgefäße 1,5 ml (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
  - Eppendorfreaktionsgefäße 2 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
  - PCR-Eppendorfreaktionsgefäße 0,2 ml (Biozym Biotech Trading GmbH, Wien, Österreich)
  - Petrischalen aus Plastik 85 mm/15 mm (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland)
  - Gewebekulturschalen aus Plastik 35 mm/10 mm (Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
  - Schnappdeckelgläser in verschiedenen Größen (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
  - Objektträger (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland)
  - Deckgläser 18 x 18 mm (Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland)

- Kurzflügelige Mutante von *Drosophila melanogaster* (am Institut gezüchtet)
- *Folsomia candida* ([www.interaquaristik.de](http://www.interaquaristik.de))
- Larven von *Tenebrio molitor* (am Institut gezüchtet)
- Larven von *Calliphora vomitoria* ([www.terrariumshop.net](http://www.terrariumshop.net))
- H-Milch (ALDI SÜD, Mülheim an der Ruhr, Deutschland) mit den Inhaltsstoffen: 3,5 g Fett, 4,8 g Kohlenhydrate, 3,3 g Eiweiß und 0,13 g Calcium pro 100 ml
- Rundbodenvials 1,1 ml N8 mit Deckel (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland)
- Spitzbodenvials 4 ml N13 mit Deckel (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland)
- Parafilm (Bemis, Neenah, Wisconsin, USA)

## 2.2 Geräte

- Binokular mit den Vergrößerungsstufen 0,8 x 10, 2 x 10, 4 x 10, 8 x 10; (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)
- Kaltlichtquelle KL 1500 (Schott AG, Mainz, Deutschland)
- Rasterelektronenmikroskop Zeiss Leo 1530 FESEM (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland)
- Kritisch-Punkt-Trocknungsanlage mit dem Übergangsgas: CO<sub>2</sub>, CPD 020 Balzers Union (Baltec, Witten/Ruhr, Deutschland)
- Platinbeschichtungsanlage Sputter Coater 208HR (EO-Elektronen-Optik-Service GmbH, Dortmund, Deutschland)
- Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM 902 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland)
- Trimmer für TEM-Proben Leica EM Trim (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Mikrotom Leica Ultracut UCT (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Diamantmesser MicroStar (Huntsville, Texas, USA)

- Ultraschallbad Sonorex Super RK 102 H (Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland)
- Stickstoffeindampfung Pierce Reacti Therm Heating/Stirring Module (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, USA)
- Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland)
- Gasdichte GC-MS-Spritze (SGE, Melbourne, Australien)
- GC-MS Finnigan MAT GCQ ion trap GC-MS Kopplungsgerät (Finnigan Corporation, San José, California, USA)
- GC-Säule BPX-5;  $\varnothing$ 25 m x 0,22 mm (SGE, Melbourne, Australien)
- GC-MS zentrale Analytik: GC Hewlett Packard 5890 Series II (GMI Inc., Ramsey, Minnesota, USA) und MS Thermo Finnigan MAT 95 (Finnigan Corporation, San José, California, USA)
- GC-Säule zentrale Analytik HP-5;  $\varnothing$ 30 m x 0,32 mm; 25  $\mu$ m Filmdicke (Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG; Life Sciences & Chemical Analysis, Waldbronn, Deutschland)
- PCR-Maschine Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- Gelelektrophoresegerät Bio-Rad Power Pac Basic (Bio - Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Betrachtung und Fotografie der PCR-Gele: Image Master VDS (Pharmacia Biotech GmbH, Waldkirch, Deutschland)
- Videokamera JVC Professional CCD (JVC Professional Europe, Bad Vilbel/Dortelweil, Deutschland)
- Code Timer RTV-920 HiFi (Blaupunkt, Hildesheim, Deutschland)
- Tropfen-Volumen-Tensiometer TVT 1 Lauda (Dr. R. Wobser GmbH + CoKG, Lauda-Königshofen, Deutschland)
- Fotobinokular SZH-ILLK (Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan)
- Kaltlichtquelle des Fotobinokulars Kaiser-Reprobeleuchtung RB-5000 DL 5556 (Kaiser Fototechnik GmbH & Co.KG, Buchen, Deutschland)

- Fluoreszenzmikroskop C-35-AD-4 (auch für normale Lichtmikroskopie; Olympus, Tokyo, Japan)
- Kameras:
  - Kamera 1: Olympus E-3 mit Balkengerät (Shinjuku, Tokio, Japan)
  - Kamera 2: Digitalkamera Traveler DC-XZ6, 10,1 Megapixel (Supra Foto, Kaiserslautern, Deutschland)
  - Kamera 3: Olympus SC 30 (Shinjuku, Tokio, Japan)
- Magnetrührer mit integrierter Kochplatte IKAmag Ret-G (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik GmbH, Staufen, Deutschland)
- Waage Kern 510 (Kern & Sohn GmbH, Albstadt, Deutschland)
- Vortex-Mixer Vortex Genie 2 (Scientific Industries, New York, New York, USA)
- Automatische Mikroliterpipetten: Eppendorf Reference (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und Gilson Pipetman (Omnilab AG, Mettmnenstetten, Deutschland)
- Laubsauger (Stihl, Dieburg, Deutschland)
- Dumont-Pinzette INOX 5 Spitzendurchmesser 0,025 mm x 0,005 mm (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Insektennadeln Stärke 5 Spitzendurchmesser 0,6 mm (Ehlert & Partner, Niederkassel-Rheidt, Deutschland)
- Dünne Insektennadeln im Nadelhalter (Haff) zum Präparieren (bioform Dr. J. Schmidl e.K., Nürnberg, Deutschland)
- Federstahlpinzette rund 100 mm (Ehlert & Partner, Deutschland)
- Exhaustor (Eigenbau)
- Kempson-Apparat (vereinfacht; Eigenbau)
- Ameisenbeobachtungsstation mit integriertem Nährgel (HCM Kinzel GmbH, Zaberfeld, Deutschland)

## 2.3 Chemikalien, Kits und Primer

- Mikroskopie
  - VE-Wasser
  - 0,1 M Cacodylatpuffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
  - 2,5%iges Glutaraldehyd (SERVA GmbH, Heidelberg, Deutschland)
  - 2%iges  $\text{OsO}_4$  (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
  - A. bidest.
  - 2%iges Uranylacetat (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland)
  - Ethanol p. a. (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)
  - Propylenoxid (SERVA GmbH, Heidelberg, Deutschland)
  - Epon (SERVA GmbH, Heidelberg, Deutschland)
  - Gesättigtes Uranylacetat und Bleicitrat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- GC-MS und Tensiometermessung
  - Ethylacetat (Suprasolv; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
  - Hexan (Suprasolv; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
  - Stenusin (**1**; synthetisiert am Lehrstuhl Organische Chemie von Prof. Dr. K. Seifert, Universität Bayreuth)
  - Norstenusin (**2**; synthetisiert am Lehrstuhl Organische Chemie von Prof. Dr. K. Seifert, Universität Bayreuth)
  - 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin (**3**; synthetisiert am Lehrstuhl Organische Chemie von Prof. Dr. K. Seifert, Universität Bayreuth)
  - Cicindeloin (**4**; synthetisiert am Lehrstuhl Organische Chemie von Prof. Dr. K. Seifert, Universität Bayreuth)
  - $\alpha$ -Pinen (**5**; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
  - 1,8-Cineol (**6**; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
  - 6-Methyl-5-hepten-2-on (**7**; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
  - Octanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
  - D-Limonen (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)

- Methanol (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)
- 3-(2-Methylbutyl)-pyridin (synthetisiert am Lehrstuhl Organische Chemie von Prof. Dr. K. Seifert, Universität Bayreuth)
- Molekulare Analysen der Käfer-DNA
  - High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland)
  - GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, USA)
  - PCR-Wasser (autoklaviertes, sterilfiltriertes Millipore-Wasser)
  - Neue *Stenus*-Primer 16S\_*Stenus* (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)
  - Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit (Thermoscientific, Schwerte, Deutschland)
  - Sequenzierung (GATC Biotech, Köln, Deutschland)
  - Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit (Thermoscientific, Schwerte, Deutschland)
  - Agarose NEEO Ultra Qualität (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
  - 1x TBE-Puffer (Herstellungsanleitung siehe Anhang [A.2](#); Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)
  - Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
  - 6x DNA-Loading Dye (Herstellungsanleitung siehe Anhang [A.3](#); Fermentas/Thermoscientific, Schwerte, Deutschland)
  - PCR-Marker  $\lambda$  PST 1 50-5000 bp (Herstellungsanleitung siehe Anhang [A.4](#); Fermentas/Thermoscientific, Schwerte, Deutschland)
- Sonstige Chemikalien
  - Aktivkohle (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
  - Aceton p. a. (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)
  - 4%-ige Paraformaldehydlösung (PFA; genaue Herstellung der Lösung siehe Anhang [A.1](#); Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)
  - Dimethylsulfoxid DMSO (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

## 2.4 Sammelstellen und -methodik der Kurzflügler

Die für diese Arbeit benötigten Käfer der Gattungen *Stenus*, *Dianous* und der Art *Euaesthetus ruficapillus* wurden aus verschiedenen passenden Habitaten im Freiland gesammelt. Die Mehrzahl der untersuchten Käfer stammte aus Oberfranken, jedoch wurden auch Tiere in der Lausitz und Brandenburg, sowie im Schwarzwald, Norditalien und Thailand gesammelt. Die Koordinaten sowie die relevanten Sammeldaten mehrfach besuchter oder außerordentlicher Sammelstellen sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Daten der Sammelstellen

Käferart	Bezeichnung der Sammelstelle	Koordinaten	Sammler
Sämtliche Arten der Gattung <i>Stenus</i>	Creußen	49°50'57,72"N/ 11°35'45,06"O	C. Lang
<i>S. comma</i>	Bindlacher Baggersee	49°97'44,86"N/ 11°62'21,30"O	C. Lang
<i>S. comma</i>	Sandgrube Mistelbach	49°55'03,30"N/ 11°32'37,60"O	C. Lang
<i>S. brunnipes</i>	Gemös/ Fichtelgebirge	50°08'02,50"N/ 11°52'33,80"O	C. Lang
<i>S. comma</i>	Försdorf	49°48'47,20"N/ 10°45'11,50"O	C. Lang
Überwiegend <i>S. comma</i>	Baggersee Pfister	49°56'20,80"N/ 10°44'35,60"O	C. Lang
<i>Euaesthetus ruficapillus</i>	Unterbrunn am Main/ Ebensfeld	50°02'53,00"N/ 10°56'17,00"O	C. Lang
<i>D. coerulescens</i> <i>S. guttula</i>	Baiersbronn/ Schwarzwald	48°51'00"N/ 8°31'41,00"O	S. Kehl
<i>S. aterrimus</i>	Kottmar/Lausitz	51°00'37,00"N/ 14°39'38,50"O	C. Lang und L. Zerche
<i>S. aterrimus</i>	Trampe/Eberswalde/ Brandenburg	52°46'40,00"N/ 13°47'56,00"O	L. Zerche
<i>S. intermedius</i>	Insel Poel/ Mecklenburg-Vorpommern	53°58'00,50"N/ 11°27'26,50"O	A. Kleeberg
<i>S. longipes</i> ital. <i>S. biguttatus</i>	Tagliamento/Canussio/ Norditalien	45°50'27,50"N/ 12°58'35,60"O	S. Kehl
<i>D. betzi</i> <i>D. obliquenotatus</i> <i>D. karen</i>	Doi Inthanon-Nationalpark/ Thailand	18°32'24,30"N/ 98°31'24,80"O	O. Betz

Je nach besuchtem Sammelbiotop variierte die Sammelmethode der Kurzflügler. In Habitaten mit dichter Vegetation (wie z. B. am Fundort Creußen) kam ein modifi-

zierter Laubsauger zum Einsatz, um die Käfer schonend und zuverlässig aus dem Bewuchs zu entnehmen. Das Ansaugrohr des Saugers wurde mit einem Stück Gaze verschlossen. So konnten die Käfer mühelos kraftvoll angesaugt werden, gelangten jedoch nicht in den Sauger und wurden ebenso wenig verletzt. Danach wurden die Käfer durch Abschalten des Saugers in eine große Fotoschale überführt und mit einem Exhaustor aufgenommen. In Biotopen mit spärlicher Vegetation (wie z. B. am Ufer von Baggerseen und Flüssen) konnten die Kurzflügler bequem mit einem Exhaustor aufgesaugt und in ein Sammelgefäß überführt werden. Im Fall von *Euaesthetus ruficapillus* wurde Überschwemmungsgenistmaterial vom Mainufer in mit Wasser gefüllte Kempson-Apparate (KEMPSON et al., 1963) überführt und mehrere Tage unter Rotlicht (450 Watt) gestellt, um die kleinen Käfer aus dem Material auszutreiben. Die Käfer konnten dann lebend von der Wasseroberfläche abgesammelt werden. Die myrmecophile *Stenus*-Art *S. aterrimus* wurde aus Nestern der Waldameisengattung *Formica* gesammelt. Die Käfer wurden bei den Ameisenarten *F. pratensis* und *F. truncorum* mit Nestmaterial entnommen. Dieses wurde in ein Käfersieb überführt und portionsweise auf einem weißen Laken ausgebreitet, wodurch die Staphyliniden zwischen den Ameisen identifiziert und mit Federstahlpinzetten abgesammelt werden konnten. Diese Sammelmethode wurde von ZERCHE entwickelt (unpubl.). Nach dem Entnehmen der Kurzflügler, sowie einiger weniger Referenzameisen wurde das Nestmaterial vom Laken zurück auf den Ameisenhaufen geschüttet. Es wurde darauf geachtet, möglichst wenig Schaden am Ameisenhaufen zu hinterlassen. Die Käfer und Referenzameisen wurden getrennt in Schnappdeckelgläser überführt und ins Labor gebracht. Überaus wichtig war es, die Myrmecophilen mit den korrespondierenden Ameisen einzufangen und nicht zu verwechseln.

## 2.5 Bestimmung und Haltung der Käfer im Labor

Nach dem Sammeln wurden alle Staphyliniden mit dem Bestimmungsschlüssel von LOHSE (1964), den Ergänzungen von LOHSE (1989) und dem neuen Bestimmungsschlüssel von PUTHZ (2001, 2008) bestimmt und nach Art sortiert in große Petrischalen ( $\varnothing 85$  mm) gesetzt, die mit einem Gips-Aktivkohlegemisch als Bodenbelag ausgestattet waren. Durch Besprühen des Gipses mit Leitungswasser konnte eine konstante Feuchtigkeit gewährleistet werden und die Aktivkohle verhinderte unerwünschte Schimmelbildung. Der Gipsbelag in den Haltungsgefäßen war mit Rillen versehen, in denen sich die Tiere verstecken konnten. Darüber hinaus wurde den Käfern Moos und Holzstückchen als Unterschlupf oder Eiablageort angeboten. Die Käfer wurden dreimal wöchentlich ad libitum mit einer stummelflügeligen Mutante von *Drosophila melanogaster* gefüttert. Kleinere Staphylinidae wurden ebenfalls dreimal pro Woche mit den Springschwänzen *Folsomia candida* versorgt. Die Tiere wurden kontinuierlich unter kontrollierten Bedingungen in einer Klimakammer bei 20 °C und mit 16 Stunden

Licht und 8 Stunden Dunkelheit gehalten.

## 2.6 Zucht der *Steninae*

Da auch eingehende Untersuchungen an *Stenus*-Larven Gegenstand dieser Arbeit waren, wurden Jugendstadien einiger *Stenus*-Arten im Labor gezüchtet. Hierzu wurden etwaige Eier, die die Imagines in den Gipsrillen oder unter Holzstückchen abgelegt hatten, aus den Haltungsgefäßen mit einem feinen Haarpinsel ohne Verletzung der Eierschale entnommen und in kleine Gewebekulturschalen ( $\varnothing 35$  mm) überführt, die als Brutgefäße dienten. Die Schälchen waren wie die Haltungsgefäße der Imagines ebenfalls mit einem Gips-Aktivkohlegemisch als Bodenbelag ausgestattet, jedoch ohne Rillen oder anderem Inventar. Nach dem Schlupf der L1-Larven wurden die Tiere mit dem Haarpinsel vorsichtig vereinzelt und in Zuchtgefäße gesetzt (ebenfalls kleine Gewebekulturschalen mit  $\varnothing 35$  mm; mit Gips-Aktivkohlegemisch). Jedoch erforderte eine erfolgreiche Zucht der Larven eine Besonderheit des Gipsbodens: dieser musste ein rundes Loch ( $\varnothing 0,5-1$  cm) aufweisen, in dem sich die Larven verstecken und zur Häutung ins nächste Larvenstadium, sowie zur Verpuppung zur Imago einspinnen konnten (BETZ & FUHRMANN, 2001). Die Jugendstadien von *Stenus spp.* und *Dianous coerulescens* wurden ad libitum täglich mit lebenden *Folsomia candida* gefüttert. Das Wohlbefinden der Larven wurde jeden Tag geprüft, sowie der Gipsboden befeuchtet und die Zuchtgefäße in der gleichen Klimakammer wie die Haltungsgefäße der Adulten aufbewahrt.

## 2.7 Mikroskopie der Larvalbehaarung

Um die Larvalbehaarung der Jugendstadien zu untersuchen, kamen verschiedene Mikroskoptypen zum Einsatz. Für eine erste oberflächliche Untersuchung wurde die Physiologie der lebendigen Kurzflüglerlarven mit dem Binokular und einer Kaltlichtquelle betrachtet. Hier musste auf eine möglichst geringe Beleuchtung der Tiere geachtet werden, da die kaum pigmentierten Larven sehr lichtempfindlich waren. Zusätzlich wurde speziell die prominente Behaarung der Larven mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) des Bayreuther Institut für Makromolekülforschung (BIMF) mit der Hilfe von Frau Dr. Beate Förster untersucht. Bevor eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der *Stenus*-Larven möglich war, mussten die Tiere durch Einfrieren auf  $-24$  °C für 30 min abgetötet und die Proben danach entsprechend vorbereitet werden. Zuerst wurden die abgetöteten Larven je in ein Eppendorfreaktionsgefäß (ERG) überführt und  $800 \mu\text{l}$  4%-ige Paraformaldehydlösung (PFA) über Nacht in das ERG hinzugegeben. Am nächsten Tag konnte mit der Entwässerung der Proben über eine Acetonreihe (30%, 50%, 70%, 90% und 2x 100% für je vier Stunden;  $800 \mu\text{l}$  pro ERG) begonnen werden. Nachdem die Proben dehydriert worden waren,

wurden sie bis zum kritischen Punkt getrocknet. Im Anschluss an diese Prozedur wurden die Proben am BIMF mit Platin überzogen und waren bereit, mit dem REM betrachtet zu werden. Um auch unter der Kutikula mögliche assoziierte Gewebsstrukturen der Larvalbehaarung zu untersuchen, kam neben dem REM auch ein Transmissionselektronenmikroskop (TEM) des Lehrstuhls Genetik der Universität Bayreuth zum Einsatz. Hierfür war es essentiell, die Larven mit Ethylacetat und nicht durch Einfrieren abzutöten, da dies Gewebeschäden zur Folge haben kann. Die frischtoten Larven wurden je in ein ERG überführt und durch Hinzugabe eines 1:9-Gemisches von 0,1 M Cacodylatpuffer ( $C_2H_7AsO_2$ ; pH 7,3) und 2,5%-igem Glutaraldehyd ( $C_5H_8O_2$ ) über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Proben dreimal mit 0,1 M Cacodylatpuffer (siehe oben) für je 20 min bei Raumtemperatur gewaschen und danach für zwei Stunden bei 4 °C mit 2%-igem  $OsO_4$  in A. bidest. kontrastiert. Hierauf folgte wieder ein dreimaliger Waschschrift mit A. bidest. für 20 min bei Raumtemperatur. Über Nacht wurden die Proben in 2%-igem Uranylacetat ( $C_4H_6O_6U$ ) bei 4 °C im Kühlschrank zum Anfärben gelagert. Für den nächsten Tag wurde eine Ethanolreihe in A. bidest. mit den Abstufungen 30%, 50%, 70%, 90% und 3x 100% angesetzt. Zum Beginn der Entwässerung mittels Ethanol erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit A. bidest. für je 20 min bei Raumtemperatur, sodann wurde mit dem ersten Schritt der oben beschriebenen Ethanolreihe begonnen (30% bei 4 °C für 15 min). Ab der 70%-igen Ethanolstufe lagerten die Proben für 15 min bei -20 °C. Währenddessen wurden die Propylenoxid/Ethanol- und Propylenoxid/Epon-Lösungen für die letztendliche Epon einbettung angesetzt (Propox;  $C_3H_6O$ ). Alle Proben-ERGs wurden nun mit der Propox/Ethanollösung (1:1) befüllt und für 15 min bei -20 °C gelagert. Darauf folgend wurden die Proben je zweimal für 15 min bei -20 °C in reinem Propox aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Überführung in eine Propox/Eponlösung (2:1) für vier Stunden bei -20 °C. Während dieser Wartezeit wurde die Epon/Propox-Lösung (1:1) für den nächsten Einbettungsschritt vorbereitet und tiefgekühlt bis zur Benutzung gelagert. Über Nacht wurde nun die vorbereitete gleichwertige Epon/Propox-Mischung (1:1) zu den Proben gegeben und diese bei -20 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde eine Epon/Propox-Lösung (2:1) gemischt und für drei bis vier Stunden bei Raumtemperatur zu den Proben gegeben. Daraufhin folgte ein Einbettungsschritt mit reinem Epon, welches jeweils drei bis vier Stunden bei den Proben verblieb und zwei bis dreimal erneuert wurde. Währenddessen wurden die Eponbetten gegossen. Am fünften Tag der Einbettungsprozedur erfolgte die Polymerisierung der Proben in Epon im Polymerisierungsöfen für ein bis zwei Tage bei 60 °C. Somit war die Kunstharzeinbettung der TEM-Proben abgeschlossen und diese konnten nun zugeschnitten (getrimmt) werden, woraufhin das Schneiden in ultradünne Schnitte (50 nm) mit dem Mikrotom, das mit einem Diamantmesser ausgestattet war, erfolgte. Zum Schluss wurden die Schnitte an Polioform-ummantelte Kupfer-Objekträger angeheftet und mit gesättigtem Uranylacetat und Bleicitrat ( $Pb(NO_3)_2 + Na_3(C_6H_5O_7)$ ; 1:1) gefärbt. Danach konnten die

Schnitte am TEM bei 80 kV betrachtet werden.

## 2.8 Sektionsmethodik

Um spurenanalytische Untersuchungen mittels GC-MS (Gaschromatographie-Massenspektrometrie) des Pygidialdrüsensekretes der Kurzflügler durchzuführen, war es nötig, die Pygidialdrüsen unversehrt aus dem Abdomen der Imagines von *Stenus* und *Dianous* herauszupräparieren. Um möglichst wenig Verlust des Wehrsekretes zu riskieren, wurden die Käfer schonend und schnell mit Ethylacetat abgetötet ohne vorherige Berührung der Tiere. Deshalb wurden die Käfer mit Hilfe eines Exhaustors in ein mit einem Ethylacetat durchtränkten Stück Zellstoff gefülltes Schnappdeckelglas gesetzt. Danach konnte mit der Präparation begonnen werden. Hierzu wurden ein paar Tropfen VE-Wasser auf einen Objektträger gegeben und der zu präparierende Käfer ins Wasser unter das Binokular gelegt. Dann wurde das zu sezierende Tier mit VE-Wasser überschichtet<sup>1</sup>. Mit einer Dumontpinzette und Insektennadeln wurde zuerst das Abdomen des Käfers abgetrennt und danach äußerst vorsichtig die Abdominalspitze mit den letzten beiden Segmenten. Dann wurden die mit Sekret gefüllten Pygidialdrüsen sichtbar. Die Abdominalspitze wurde sogleich mit der Insektennadel in ein mit 30  $\mu$ l Ethylacetat gefülltes Spitzbodenvial zur weiteren Aufbereitung für die GC-MS-Analyse überführt.

Um die Drüsenmorphologie noch nicht spurenanalytisch untersuchter *Stenus*- und *Dianous*-Arten zu untersuchen, wurden zusätzlich zur oben geschilderten Sektionsmethodik die Tergite und Sternite der abgetrennten Abdominalspitze sorgfältig entfernt, um die Pygidialdrüsen komplett freizulegen. Um den gesamten Verdauungsapparat der Käfer zu entfernen (für weitere Aufarbeitung für die PCR oder für Analysen des Nahrungsspektrums mittels Kropfinhalt) wurde die Kopfkapsel zwischen Kopf und Thorax durch vorsichtiges Zerreißen der Intersegmentalhaut abgetrennt und der am Kopf hängende Verdauungstrakt aus dem restlichen Körper herausgezogen ohne ihn zu zertrennen. Für Nahrungsanalysen konnte nun der Kropf weiter zerlegt und der Inhalt unter dem Binokular oder Mikroskop betrachtet werden. Für molekulare Analysen der DNA der Tiere mittels PCR war es essentiell nur käfereigene DNA zu verwenden. Da *Steninae* carnivor sind, könnte sich immer Fremd-DNA der Beutetiere oder auch von Parasiten im Verdauungstrakt befinden, die das Ergebnis der PCR beeinflussen könnte. Deshalb wurden für die PCR nur Abdomina der Käfer ohne Verdauungstrakt, bzw. Darminhalt verwendet und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert (MAUS et al., 2001).

---

1 Zum Waschen; somit konnten störende, gelöste Rückstände aus dem Fettkörper mit einer Pasteurpipette weggespült werden; außerdem wird das Zusammenfallen der inneren Organe beim Öffnen des Tieres durch eine „schwimmende Sektion“ verhindert.

Auch *Stenus*-Larven wurden zur physiologischen und spurenanalytischen Untersuchung wie die Imagines unter dem Binokular präpariert. Jedoch war im Falle der Larven eine ganzheitliche Untersuchung des Insektenkörpers nötig, weswegen die fragilen Tiere vorsichtig komplett zerlegt wurden. Für spurenanalytische Untersuchungen wurden Ganzkörperextrakte der abgetöteten Larven in Ethylacetat hergestellt (30  $\mu$ l Ethylacetat pro Spitzbodenvial; siehe auch Kapitel 2.9.1).

## 2.9 GC-MS

### 2.9.1 Spurenanalytische Untersuchungen an *Stenus*-Larven

Neben einer mikroskopischen Betrachtung der *Stenus*-Larven bezüglich ihrer Physiologie wurden die Jugendstadien der Tiere (und deren Eier) auch spurenanalytisch auf Beinhaltung der Drüsenverbindungen mittels GC-MS untersucht. Hierzu wurden ein Oberflächen-, sowie ein Ganzkörperextrakt der Larven bzw. Eier angefertigt. Für den Oberflächenextrakt wurden etwa fünf Larven (oder bis zu zehn Eier) des selben Larvenstadiums einer *Stenus*-Art mit dem Haarpinsel vorsichtig in ein Spitzbodenvial überführt und durch Einfrieren auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgetötet. Danach wurden 30  $\mu$ l Ethylacetat zu den Larven/Eiern gegeben und deren Oberfläche für 30 s extrahiert. Nach Ablauf der Zeit wurde der Extrakt mit einer Mikroliterpipette abgenommen, in ein neues Spitzbodenvial überführt und bis auf ca. 5  $\mu$ l mit Stickstoff eingengt. Bis zum Einspritzen in den GC wurde die gewonnene Probe bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und der Deckel des Vials mit Parafilm verschlossen. Für den Ganzkörperextrakt wurden ebenfalls etwa fünf Larven (oder bis zu zehn Eier) in ein Spitzbodenvial gesetzt/überführt und im Gefrierschrank abgetötet. Nach Zugabe von 30  $\mu$ l Ethylacetat wurden die Tiere/Eier mit einem Stößel, der genau in das Vial passte, zerstoßen und zum weiteren Aufschließen (Homogenisieren) der Körperstrukturen bzw. Eierschale 10 min ins Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurden die festen Bestandteile abzentrifugiert und der klare Überstand in ein neues Vial pipettiert. Nach dem Eindampfen mit Stickstoff auf etwa 5  $\mu$ l wurde der Ganzkörperextrakt wie der Oberflächenextrakt gelagert.

Für die GC-MS-Analyse wurde 1  $\mu$ l des jeweiligen Extraktes mit einer gasdichten Spritze in den GC eingespritzt. Um die Probe exakt aufzutrennen, wurde das folgende Temperaturprogramm benutzt, welches sich an den Eigenschaften der *Stenus*-Drüsenverbindungen orientierte: der GC-Ofen wurde zu Beginn auf  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Diese Temperatur wurde für 2 min gehalten, bevor sich der Ofen bis auf  $280\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  erhitzte. Das Programm dauerte ohne Abkühlung des Ofens 25 min. Damit konnte eine optimale Auftrennung der Probe auf der Säule im Massenbereich 50-500 erzielt werden. Als Trägergas fungierte hochreines Helium mit einer Durchflussrate von (1 ml/min). Darüber hinaus war auch das Heizprogramm des Injektors wichtig, welches bei  $69\text{ }^{\circ}\text{C}$  startete (splitless) und mit einer Heizrate von  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{s}$  bis  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$

heizte.

### 2.9.2 Spurenanalytische Untersuchungen der Pygidialdrüsen der Imagines von *Stenus* und *Dianous*, sowie an Ameisen der Gattung *Formica*

Bei der spurenanalytischen Untersuchung der Imagines von *Stenus* und *Dianous* stand das Sekret der Pygidialdrüsen im Vordergrund. Die Drüsen der Käfer wurden wie in Kapitel 2.8 beschrieben aus dem Insektenleib präpariert. Die Weiterverarbeitung der Proben erfolgte wie in Kapitel 2.9.1 zum Ganzkörperextrakt der Larven beschrieben. Da auch hier nach Alkaloiden, Terpenen und möglichen neuen Naturstoffen im Sekret der Steninae gesucht wurde, war das Temperaturprogramm des GC-MS mit dem in Kapitel 2.9.1 verwendeten identisch.

Für mögliche Referenzlösungen wurden 0,1  $\mu\text{l}$  der reinen Substanz mit 200  $\mu\text{l}$  Ethylacetat in einem Vial gemischt und 0,5  $\mu\text{l}$  in den GC eingespritzt. So wurde ein Überladen der Säule verhindert. Die Messung erfolgte mit dem bereits oben erwähnten Programm des GC und Injektor betreffend.

Bei der myrmecophilen *Stenus*-Art *Stenus aterrimus* interessierten neben der Analyse des Sekretes (siehe obige Angaben bzgl. Sektion und Messung) auch mögliche kohlenwasserstoffhaltige Verbindungen auf der Körperoberfläche der Imagines. Hierzu wurde ein Oberflächenextrakt einer oder mehrerer Imagines von *Stenus aterrimus* wie in Kapitel 2.9.1 bereits beschrieben angefertigt. Jedoch wurde in diesem Fall als Lösungsmittel Hexan verwendet, da sich Kohlenwasserstoffe in Alkanen besser lösen. Auch von korrespondierenden Ameisen wurde ebenso ein Oberflächenextrakt hergestellt. Da der Fokus dieser Messungen auf Kohlenwasserstoffe gerichtet war, wurde das in Kapitel 2.9.1 erwähnte GC-MS-Programm leicht modifiziert. Weil Kohlenwasserstoffe erst bei höheren Retentionszeiten im Totalionenstromchromatogramm (TIC) erscheinen, wurde das Temperaturprogramm mit der gleichen Heizrate von 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  auf eine Maximaltemperatur von 320  $^{\circ}\text{C}$  verlängert. Das obige Injektorprogramm wurde nicht verändert, das Trägergas war ebenfalls Helium.

Aus technischen Gründen wurden die in dieser Arbeit gezeigten TICs und MS, die Analyse der Myrmecophilen betreffend, am GC-MS der Zentralen Analytik von Frau Dr. Lacher gemessen. Folgendes Temperaturprogramm wurde am GC verwendet: zu Beginn wurde der GC-Ofen auf 50  $^{\circ}\text{C}$  erhitzt; diese Temperatur wurde für vier min gehalten, bevor sich der Ofen bis auf 100  $^{\circ}\text{C}$  mit 30  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  erhitzte. Nach diesem Schritt heizte der Ofen mit 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  bis auf die finale Temperatur von 270  $^{\circ}\text{C}$  für 20 min. Die Temperatur am Injektor und in der Transferline war konstant bei 270  $^{\circ}\text{C}$ .

## 2.10 Die Spreitung der Steninae

### 2.10.1 Ethologische Untersuchungen zum Spreitungsverhalten der Steninae

Neben Analysen den Drüseninhalt der Steninae betreffend, waren auch Untersuchungen des Spreitungsverhaltens der Käfer ein essentieller Bestandteil dieser Arbeit. Für eine ethologische Untersuchung des Spreitungsverhaltens wurden viele verschiedene Arten von *Stenus* im Freiland gesammelt (siehe auch Kapitel 2.4) und lebend ins Labor überführt. Nach der Artbestimmung (siehe Kapitel 2.5) wurden die Tiere einem kurzen „Spreittest“ in einer mit Wasser gefüllten Glasschale unterzogen. So wurde schnell festgestellt, welche Arten für die verhaltensbiologischen Untersuchungen in Frage kamen. Für eine genaue Analyse des Spreitungsverhaltens sowie für die Ermittlung der Spreitungsgeschwindigkeiten wurden die Tiere während des Spreitens mit einer Videokamera gefilmt. Bevor mit den Tests begonnen werden konnte, wurde eine gläserne Kristallisationsschale ( $\varnothing 24,1$  cm) als Spreitungstestgefäß umfunktioniert und so präpariert, dass eine Standardisierung der Tests gewährleistet war. Hierzu wurde in der Mitte der Schale ein kleiner Schwimmer aus Kork befestigt, der über ein Glasrohrsystem mit Hilfe einer Schnur manuell versenkt werden konnte. Dieser Schwimmer diente als Startpunkt der Spreitungsstrecke zum Rand der Schale. An einer Seite der Schale wurde außen ein Stück schwarzer Tonkarton befestigt, um eine grobe Spreitungsrichtung festzulegen (JENKINS, 1960). Die mit Leitungswasser gefüllte Schale wurde nun unter die senkrecht ausgerichtete Videokamera gestellt und der Abstand zwischen Schale und Kamera so gewählt, dass die ganze Schale auf dem Bildschirm des angeschlossenen Fernsehers sichtbar war. Mit dem Fernseher war ein Code Timer verbunden, der es ermöglichte, die Testfilme zu beschriften und eine Uhr mit einem Zeitintervall von 200stel Sekunden einzublenden. Drei Stunden bevor mit den Tests begonnen wurde, wurden die Tiere vorsichtig einzeln in kleine Schnappdeckelgläser überführt, um sie zu beruhigen und unnötigen Verlust des Wehrsekretes vorzubeugen. Zum Start der Videoaufzeichnung wurden die Käfer einzeln aus den Schnappdeckelgläsern über einen mit Teflon beschichteten Glastrichter ohne Berührung der Tiere auf den Schwimmer geschüttelt. Nur wenn die Käfer nicht freiwillig spreiteten, wurde der Schwimmer versenkt, was die Käfer zum Spreiten zwang. Nach jedem Test wurde das Leitungswasser in der Schale gewechselt, um zurückverbliebenes Sekret zu entfernen, was den anschließenden Test beeinflusst hätte. Die aufgenommenen Filme wurden in Zeitlupe in 200stel Sekunden-Schritten ausgewertet und die Spreitungsstrecke am Fernseh Bildschirm abgemessen. Hierbei wurden nur Spreitungsstrecken berücksichtigt, die die Käfer ohne Schwimmen mit Beinarbeit zurücklegten. Anschließend wurden die Spreitungsgeschwindigkeiten mit Hilfe der Formel 2 berechnet. Die statistische Auswertung der Spreitungsgeschwindigkeiten der untersuchten Arten wurde mit dem Programm Statistica 8 durchgeführt.

Hier wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-H-Test und die entsprechende post-hoc-Prozedur in Form des Tukey-Kramer-Tests (SIEGEL & CASTELLAN, 1988) benutzt.

$$v = s * \frac{D_{real}}{D_{Bildschirm} * (t_{start} - t_{end})} \quad (2)$$

$v$ =Geschwindigkeit (cm/s)

$s$ =Strecke (cm)

$D_{real}$ =Durchmesser der Schale (cm)

$D_{Bildschirm}$ =Durchmesser der Schale auf dem Fernsehbildschirm (cm)

$t_{start}$ =Beginn des Spreitungsverhaltens (s)

$t_{end}$ =Ende des Spreitungsverhaltens (s)

### 2.10.2 Messungen der Spreitungsdrücke am Tensiometer

Nicht nur eine ethologische Untersuchung der Spreitung war zentrale Fragestellung dieser Arbeit, sondern auch die Untersuchung physikochemischer Eigenschaften der Drüsenverbindungen, die die Käfer zu dieser einzigartigen Fortbewegung auf der Wasseroberfläche befähigen. Für die Messung der Spreitungsdrücke aller Drüsenverbindungen wurde ein Tropfen-Volumen-Tensiometer benutzt, das freundlicherweise von Prof. Dr. H. Hoffmann vom Bayreuther Zentrum für Kolloide und Grenzflächen (BZKG) zu Verfügung gestellt wurde. Die Messungen der Spreitungsdrücke basierten auf der Ermittlung der Oberflächenspannung von übersättigten wässrigen Lösungen jeder Drüsenverbindung (1-7) mit Hilfe der sog. „Hängenden-Tropfen-Methode“. Bevor mit den Messungen der wässrigen Testlösungen begonnen werden konnte, wurde die adäquate Konzentration der übersättigten Lösung von Stenusin (1) empirisch mit einer Verdünnungsreihe ermittelt. Nur bei einer passenden Konzentration der Testlösung lieferte das Tensiometer korrekte Mittelwerte der Oberflächenspannung. Alle anderen Testlösungen wurden mit der gleichen Konzentration angesetzt und gemessen, um vergleichbare Mittelwerte zu erhalten. Zu Beginn und nach jeder Messung war es essentiell, die bekannte Oberflächenspannung von Wasser zu messen, um ein einwandfreie Messergebnisse am Tensiometer zu gewährleisten. Die Spreitungsdrücke der Verbindungen 1-7 wurden mit Hilfe der Formel 3 aus der Oberflächenspannung von Wasser und der der übersättigten Lösungen berechnet. Da die Oberflächenspannung von übersättigten, wässrigen Lösungen berechnet wurde, kann die Grenzflächenspannung  $\gamma$  vernachlässigt werden. Der Spreitungsdruck  $P$  ergibt sich nun aus der Differenz der Oberflächenspannung reinen Wassers und der Oberflächenspannung der übersättigten Testlösung.

$$P = \sigma_{Wasser} - \sigma_{\text{ÜbersättigteLösung}} \geq 0 \quad (3)$$

Diese Annahme wurde mit einer dreimaligen Testmessung mit ebenfalls oberflächenaktivem Octanol geprüft. Zuerst wurde der Spreitungsdruck  $P$  mit der Formel 1 aus Kapitel 1.3 der Einleitung berechnet, danach wurde  $P$  mit Formel 3 ermittelt. Die Ergebnisse dieser Testmessung zeigten kaum Unterschiede die Berechnungsmethodik betreffend. Die letztere Berechnungsformel bot den Vorteil, dass nur sehr wenig authentisches Material im Milligrammbereich zur Ermittlung der Oberflächenspannung der Verbindungen 1-7 benötigt wurde. Neben den Spreitungsdrücken der einzelnen Drüsenverbindungen interessierten auch die Spreitungsdrücke naturidentischer Sekrete. Hierzu wurden vier Vertreter verschiedener *Stenus*-Gruppen ausgewählt. Die Pygidialdrüsen systeme von jeweils zehn Individuen von *Stenus clavicornis*, *Stenus comma*, *Stenus similis* und *Stenus solutus* wurden wie in Kapitel 2.8 beschrieben präpariert. Danach wurden zur Quantifizierung der Einzelverbindungsanteile im artspezifischen Gesamtsekret der Käfer Messlösungen für das GC-MS wie in Kapitel 2.9 beschrieben hergestellt. Jedoch wurde zu allen vorbereiteten Messlösungen ein Quantifizierungsstandard hinzugefügt und 0,5  $\mu$ l des Extraktes in das GC-MS-System injiziert. Das Injektor- und Temperaturprogramm war identisch mit dem in Kapitel 2.9 erwähnten. Zur Quantifizierung der Einzelverbindungen im Sekret der Tiere wurden die erhaltenen TICs elektronisch integriert und mit vorher erstellten Kalibrierungsdaten der GC-MS-Software abgeglichen. So konnte der prozentuale Anteil der Einzelverbindungen am Gesamtsekret ermittelt werden. Anschließend wurden übersättigte, wässrige Lösungen mit einer naturidentischen Sekretkomposition und mit gleicher Konzentration wie die Lösungen der Einzelverbindungen gemischt. Die Messung und Berechnung der Oberflächenspannung, bzw. der Spreitungsdrücke erfolgte wie in Kapitel 2.10.2 erklärt.

## 2.11 Biotests

### 2.11.1 Spinnenbiotests

Die Deterrentwirkung des Pygidialdrüsensekrets der Steninae ist bereits mit Modellorganismen wie Ameisen und Fischen getestet worden (SCHIERLING et al., 2013). In dieser Arbeit wurde ergänzend die mögliche Deterrentwirkung der Drüsenverbindungen auf Spinnen als Prädatoren untersucht. Für die Untersuchungen wurden frei jagende Spinnen wie Wolf- oder Springspinnen ausgewählt. Die für die Biotests benötigten Spinnen wurden in Creußen (siehe Tab. 2) mit dem bereits beschriebenen Laubsauger (siehe Kapitel 2.4) gesammelt. Neben dem Laubsauger kam im Falle der Springspinnen auch ein größerer Kescher zum Einsatz, der mit horizontalen, achterförmigen Bewegungen durch das hohe Gras gestreift wurde. Die so gesammelten Spinnen

(27 Wolfsspinnen und 9 Springspinnen) wurden ins Labor überführt und einzeln in Plastischachteln (Maße: 9,5 x 9,5 x 6 cm) mit befeuchtetem Gips-Aktivkohleboden gesetzt. Die Schachteln wurden während der gesamten Versuchszeit in der in Kapitel 2.5 beschriebenen Klimakammer aufbewahrt. Zur Bestimmung wurde der Kosmos Atlas Spinnentiere Europas von BELLMANN und der detailliertere Spinnenbestimmungsschlüssel der Homepage <http://www.araneae.unibe.ch> herangezogen. Als Futter zur Eingewöhnung in die spätere Biotestsituation wurden den Spinnen einmal täglich ad libitum Imagines von *Drosophila melanogaster* und das erste Larvenstadium von *Tenebrio molitor* angeboten. Bevor mit den Biotests begonnen wurde, hungerten die Spinnen für drei Tage. Der Vorversuch vor der eigentlichen Biotestreihe bestand darin, je einen adulten, lebendigen *Stenus comma* in die Spinnenterrarien zu setzen. Ebenso wurde mit dem L3-Larvenstadium von *S. comma* verfahren. Beide Testtiertypen verblieben einen Tag in den Spinnenterrarien. Die eigentlichen Biotests wurden mit *Drosophila melanogaster* und dem ersten Larvenstadium von *Tenebrio molitor* durchgeführt, die vor dem Anbieten an die Spinnen in Testlösungen getaucht wurden. Die Testlösungen wurden sowohl in Milch, als auch in DMSO angefertigt, was eine Lösung der Verbindungen 1-7 und ein Überleben der Futtertiere gewährleistete. In Tab. 3 ist die Zusammensetzung der Testlösungen zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Zusammensetzung der Testlösungen für die Spinnenbiotests

Drüsenverbindung	Lösungsmittelvolumen (Milch)	Lösungsmittelvolumen (DMSO)	Testsubstanzvolumen
Stenusin (1)	150 $\mu$ l	100 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Norstenusin (2)	150 $\mu$ l	100 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
3-(2-methyl-1-butenyl) Pyridin (3)	150 $\mu$ l	100 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Cicindeloin (4)	nicht getestet	100 $\mu$ l	5 $\mu$ l (gelöst in Methanol)
$\alpha$ -Pinen (5)	150 $\mu$ l	100 $\mu$ l	5 $\mu$ l
1,8-Cineol (6)	150 $\mu$ l	100 $\mu$ l	5 $\mu$ l
6-Methyl-5-hepten-2-on (7)	150 $\mu$ l	100 $\mu$ l	5 $\mu$ l

Da von den authentischen Drüsenverbindungen 2 und 3 keine größere Menge dem Institut zur Verfügung stand, konnte nur eine geringer konzentrierte Emulsion bzw. Lösung gemischt und getestet werden. Die Testemulsionen, bzw. Testlösungen zusammengefasst in Tab. 3 dienten zur ersten Durchführung und Erreichung der Reproduzierbarkeit der Biotests. In den eigentlichen Biotestreihen wären nur identische Konzentrationen der Drüsenverbindungen in den jeweiligen Lösungsmitteln verwendet worden. Drüsenverbindung 4 besitzt eine harzige Konsistenz, weswegen ein genaues Dosieren dieser nur im gelösten Zustand (z. B. in Methanol) möglich ist.

Nach dem Ansetzen der Emulsionen und Lösungen wurden die Testtiere (*Drosophila melanogaster* oder *Tenebrio molitor*) mit einer feinen Federstahlpinzette jeweils genau drei Sekunden in die Emulsion bzw. Lösung getaucht und dann jeder Spinne einzeln für je zehn Minuten im Terrarium präsentiert. Die Zeit bis zum Zupacken der Spinnen wurde gestoppt und notiert. Als Kontrolle dienten Testorganismen, die nur drei Sekunden in Milch, bzw. DMSO getaucht wurden.

#### 2.11.2 Biotests zur topikalen Wirkung

Da das Pygidialdrüsensekret der Steninae in erster Linie ein Wehrsekret darstellt, wurde auch eine mögliche topikale Wirkung des Sekretes auf Fliegenmaden der Art *Calliphora vomitoria* als Testorganismen untersucht. Um eine frühzeitige Verpuppung des letzten Larvenstadiums der Fliegenmaden zu verhindern, wurden die Tiere im Kühlschrank bei konstanten +1 °C gelagert. Die Testlösungen wurden wie bereits in Kapitel 2.11.1 erwähnt mit ungiftigem DMSO angesetzt. Vorher wurde die Verträglichkeit und Eignung von DMSO als Lösungsmittel für die Biotests mit Fliegenmaden geprüft. Auf die Maden aufgebracht, reines DMSO rief keine Reaktion der Tiere in Form einer Krümmung des Körpers hervor. Für die Glaubwürdigkeit der Biotests war es von zentraler Bedeutung, die mögliche Höchstmenge von Stenusin (maximal 8,3 µg pro Käfer (*S. comma*); LUSEBRINK, 2007) pro auf die Made appliziertem Testtropfen nicht zu überschreiten. Diesem Grundsatz folgend, wurden niedrigere Konzentrationen der Drüsenverbindungen 1-7 in DMSO gewählt. In jedem appliziertem Tropfen von 5 µl waren 5 µg der jeweiligen Drüsenverbindung gelöst. Für den Biotest wurden die Maden einzeln auf Papierhandtücher gesetzt, auf denen sie sich gut und mit natürlichen Körperbewegungen fortbewegen konnten. Der Test begann unmittelbar nachdem der Testtropfen mit einer Mikroliterpipette auf das Tier appliziert wurde, ohne dieses zu berühren oder anderweitig mechanisch zu reizen; die Reaktion der Tiere wurde 30 Sekunden beobachtet und mögliche abnormale Körperbewegungen mit Krümmungen notiert. Zusätzlich wurde für die statistische Auswertung der genaue Zeitpunkt des abnormalen Verhaltens erfasst. Als Kontrolle diente reines DMSO. Pro Testverbindung wurden 30 Tests durchgeführt.

## 2.12 Molekulare Analysen

### 2.12.1 PCR, Primer und Sequenzierung

Sowohl für die Erstellung von Stammbäumen zur Aufklärung der Phylogenie der Stenine, als auch für die Suche nach möglichen Endosymbionten in *Stenus*-Imagines, war eine PCR mit entsprechenden Primern unabdingbar. Bevor jedoch mit der PCR begonnen werden konnte, musste zunächst die gesamte genomische DNA aus den präparierten Abdomina der Imagines (siehe Kapitel 2.8) extrahiert werden. Dafür

wurde das High Pure PCR Template Preparation Kit benutzt. Die Extraktion folgte strikt nach den Angaben des Herstellers. Die PCR wurde mit Hilfe der GoTaq® Hot Start Polymerase durchgeführt.

Für die Amplifizierung der stammbaumberechnungsrelevanten DNA-Abschnitte waren die PCR-Bedingungen wie folgt: das gesamte Reaktionsvolumen von 25  $\mu\text{l}$  beinhaltete 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM pro jeweiligem dNTP, 0,5 mM pro jeweiligem Primer und 1,25 Einheiten der Polymerase. Die entsprechenden PCR-Bedingungen werden im Folgenden angegeben: das Programm begann mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C (2 min), gefolgt von neun Zyklen Denaturierung bei 90° C (30 s). Danach folgte ein Anlagerungsschritt (Annealing) bei 46° C (1 min) und Extension der Nucleotidkette bei 45 °C (45 s). Gleich darauf folgten 34 Zyklen Denaturierung bei 95 °C (30 s), Anlagerung bei 51 °C (1 min) und Extension bei 72 °C (45 s). Die PCR wurde bei 72 °C nach der finalen Extension abgebrochen (Programm von KOERNER et al., 2013).

Für die Amplifizierung von DNA-Abschnitten möglicher Endosymbionten waren die PCR-Bedingungen wie folgt: der Mastermix mit 1000 Einheiten GoTaq® Hot Start Polymerase (Ansatz für 25  $\mu\text{l}$ ) enthielt 9,40  $\mu\text{l}$  A. bidest., 5,00  $\mu\text{l}$  Q-Solution, 2,50  $\mu\text{l}$  PCR-Buffer (10x mit 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 2,50  $\mu\text{l}$  vom jeweiligen dNTP (2 mM), 1,25  $\mu\text{l}$  (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) pro jeweiligem Primer, 0,10  $\mu\text{l}$  Taq (5 Einheiten/ $\mu\text{l}$ ) und 3,00  $\mu\text{l}$  DNA-Template. Die entsprechenden PCR-Bedingungen werden im Folgenden angegeben: das Programm startete mit einem Denaturierungsschritt bei 95 °C (3 min); hierauf folgten 34 Zyklen Denaturierung bei 94 °C (30 s), Anlagerung der dNTPs bei 53 °C (2 min) und Extension bei 72 °C (1 min); zum Abschluss fand bei 72 °C (10 min) der finale Extensionsschritt stand.

Nach der PCR konnte das Gel zur Überprüfung und Auftrennung der amplifizierten PCR-Produkte beladen werden. Hierzu wurde zuerst die 1%ige Agarose im 1xTBE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt und verflüssigt. Im Agarosegel befanden sich je nach dessen Größe entweder 2  $\mu\text{l}$  oder 4  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid zum Anfärben der Banden. Nach Aushärtung des Gels in der Elektrophoreseform wurde dieses mit 1xTBE-Puffer überschichtet und konnte nun beladen werden. Dafür wurden die Proben (2  $\mu\text{l}$  pro Probe) mit je 3  $\mu\text{l}$  Loading Dye vermischt und in die vom Kamm vorgeformten Kammern des Gels pipettiert. Darüber hinaus wurden noch 2  $\mu\text{l}$  der Markers  $\lambda$  PST 1 für die Identifizierung von PCR-Produkten von 50-5000 bp hinzupipettiert. Die Gelelektrophorese lief eine Stunde bei 80 Volt und 400 mA. Nach Beenden der Elektrophorese wurde das Gel betrachtet und das Ergebnis fotografiert.

Anschließend wurden die erhaltenen PCR-Produkte mit dem Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit aufgereinigt. Die Prozedur folgte strikt den Angaben des Herstellers. In Tab. 4 sind die verwendeten Primer zusammengefasst. Für die phylogenetischen Analysen wurde die Cytochrom Oxidase I (COI), die 16S rRNA und das Histon H3-Gen amplifiziert, die Prüfung auf Vorhandensein bestimmter häufiger

Endosymbionten erfolgte mit den Primerpaaren für Rickettsien und Wolbachien (Ri1, bzw. W2). Da es leider nicht immer möglich war, von allen untersuchten Vertretern der Steninae das COI-Fragment mit 1200 bp Länge (mtD4-Pat) mittels PCR zu erhalten, musste ein weiteres Primerpaar hinzugezogen werden, welches ein Fragment mit 800 bp Länge lieferte (Jerry-Pat; siehe Tab. 4). Nach der Aufreinigung wurden die PCR-Produkte zur Sequenzierung in beide Richtungen an GATC Biotech geschickt. Die so gewonnenen Sequenzen konnten nun geprüft und bei GenBank hochgeladen werden ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), um Accession Numbers zu erhalten.

**Tabelle 4:** Verwendete Primerpaare

Gensequenz	Primersequenz	Zitat	Fragmentlänge (bp)
COI	<b>Jerry_F fwd</b> 5'-CAA CAT TTA TTT TGA TTT TTT GG-3'	SIMON et al., 1994 (Jerry/Pat) SPERLING & HICKEY, 1994 (mtD4/Pat)	800
	<b>mtD4 fwd</b> 5'-TAC AAT TTA TCG CCT AAA CTT CAG CC-3'		1200
16S rRNA	<b>Pat_R rev</b> 5'-TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A-3'	KOCHER et al., 1989	650
	<b>16S_Fneu fwd</b> 5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'		
	<b>16S_Rneu rev</b> 5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC A-3'	LANG et al., 2014	600
	<b>16S_Stenus_F fwd</b> 5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'		
Histon H3	<b>16S_Stenus_R rev</b> 5'-TTA ATC CAA CAT CGA GGT C-3'	COLGAN et al., 1998	300
	<b>H3_F fwd</b> 5'-ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACG GC-3'		
H3_R rev	<b>H3_R rev</b> 5'-TCC TTG GGC ATG ATG GTG AC-3'	KÜCHLER et al., 2009	1500
	<b>Ri_170_F fwd</b> 5'-GGG CTT GCT CTA AAT TAG TTA GT-3'		
16S rRNA (Ri1) Rickettsien	<b>Ri_1500_R rev</b> 5'-ACG TTA GCT CAC CAC CTT CAG G-3'	ZHOU et al., 1998	600
Wolbachia Surface Proteine (W2) Wolbachien	<b>wsp81F fwd</b> 5'-TGG TCC AAT AAG TGA TGAA GAA AC-3'		
	<b>wsp691R rev</b> 5'-AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA-3'		

### 2.12.2 Stammbaumberechnung

Die Grundlage der Berechnung von Stammbäumen stellen Alignments der Gensequenzen dar. Nachdem die Sequenzen von GATC erhalten worden waren, konnte mit der Alinierung begonnen werden. Zum Erstellen der Alignments wurde der ClustalW-Algorithmus (THOMPSON et al., 1994) implementiert in BioEdit (HALL,

1999) und der Muscle-Algorithmus (EDGAR, 2004) implementiert in MEGA (TAMURA et al., 2011) benutzt. Darüber hinaus wurden die Alignments manuell optimiert und uneindeutige Positionen entfernt. Für jede der drei amplifizierten Gensequenzen wurde ein Einzelalignment erstellt. Anschließend wurden die am besten geeigneten Sequenzevolutionsmodelle für die drei alinierten Matrizen mittels des AIC (Aikake Information Criterion) und Maximum Likelihood (ML)-optimierten Parametern, welche in jModelTest2 (POSADA, 2008; GUINDON & GASCUEL, 2003; DARRIBA et al., 2012) implementiert sind, abgeschätzt. Die aus dieser Abschätzung resultierenden Modelle und dazugehörigen Parameter können Tab. 5 entnommen werden. Für alle drei Alignments wurde das sog. GTR-Modell (General Time Reversible) mit verschiedenen Optionen gewählt.

**Tabelle 5:** Sequenzevolutionsmodellparameter

Gensequenz-alignment	Sequenz-evolutionsmodell	Basenfrequenzen	Substitutionsraten	Anteil der invariablen Stellen	$\alpha$ -Formparameter	Anzahl der austauschtypen	Anzahl der Ratenkategorien
COI	GTR+G+I	A=0,3144 C=0,1126 G=0,1302 T=0,4428	A-C=1,0000 A-G=10,4582 A-T=7,4249 C-G=3,5269 G-T=34,4309	0,4520	0,8040	6	4
16S rRNA	GTR+G	A=0,3310 C=0,1276 G=0,1632 T=0,3782	A-C=3,4472 A-G=17,2541 A-T=65,1478 C-G=1,0000 G-T=65,1478	0	0,2330	6	4
Histon H3	GTR+G+I	A=0,2340 C=0,2913 G=0,2674 T=0,2073	A-C=1,0000 A-G=4,9433 A-T=0,4152 C-G=3,0862 G-T=4,9433	0,1790	0,2300	6	4

Die Parameter wurden von jModelTest2 (POSADA, 2008; GUINDON & GASCUEL, 2003; DARRIBA et al., 2012) auf der Basis des AIC ermittelt

Für phylogenetische Analysen auf Basis des Maximum Likelihood-Algorithmus wurde das Programm PAUP\* 4.0 b10 (SWOFFORD, 1998) benutzt. Die Analysen mittels PAUP\* basierten auf einem Initialbaum, der aus schrittweiser Addition und hundert Replikaten von zufälliger Reihenfolge erhalten wurde. Für die heuristische Suche nach dem passendsten Baum wurde der sog. Tree Bisection Reconnection-Algorithmus (TBR) für den Astaustausch gewählt, der die am besten unterstützten Klagen lieferte. Die Verlässlichkeit der Knoten für ML wurde mit 100 Bootstrap-Replikationen aufgrund vom ML-Parametern und mit Hilfe des Neighbour Joining-Algorithmus zur Baumrekonstruktion abgesichert. Darüber hinaus wurden die Astlängen gespeichert. Diese Prozedur wurde mit allen Einzelgenalignments von COI, 16S rRNA und Histon H3 durchgeführt. Für den Konsensus-Baum (KOERNER et al., 2013) basierend auf

den Sequenzen von COI, 16S rRNA und Histon H3 wurde ein kombiniertes Datenset benutzt, welches nach den entsprechenden Genabschnitten und kodierenden und nicht-kodierenden Bereichen partitioniert wurde (HEMP et al., 2010). Es galten für das kombinierte Datenset sowohl die Parameter der verschiedenen Sequenzevolutionsmodelle, als auch heuristische Suchstrategien und die gleiche Bootstrapping Prozedur wie für die bereits oben erwähnten Einzelgenalignments.

Neben phylogenetischen Analysen mit Hilfe von PAUP\*, wurde auch die Bayesische Phylogenieanalyse (Bayesian Analysis; BA) mit Hilfe des Programmes MrBayes 3.2.2 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003) durchgeführt. Zuerst wurden die drei Einzelgenalignments unter Berücksichtigung der Sequenzevolutionsmodellparameter analysiert. Für die alinierten Sequenzmatrizen von Histon H3 und der 16S rRNA wurden zwei Läufe mit vier simultanen Markov-Ketten für drei Millionen Generationen angesetzt, bis die Standardabweichung der Teilungshäufigkeit („Split frequency“) unter 0,01 gesunken war; für die alinierte Matrix der COI-Gensequenzen waren zwei Läufe mit zwei Millionen Generation für eine Standardabweichung von unter 0,01 ausreichend. Bei allen Analysen wurde jeder Baum der tausendsten berechneten Generation (samplefreq=1000) gespeichert und der sog. Burn-in entsprechend festgelegt, indem die aus den Analysen resultierenden Likelihood-Werte pro Alignment in eine Excel-Tabelle transferriert und in einem Koordinatensystem gegeneinander aufgetragen wurden (Likelihoodwert gegen Anzahl der zugehörigen Generationen; Test of Equilibrium). Nur die Bäume ab einer Generation mit konstanten Likelihoodwerten wurden in die Berechnung des fertigen Baumes miteinbezogen. Der Burn-in lag für die COI bei den ersten 70 Bäumen, für die 16S rRNA bei den ersten 65 Bäumen und für das Histon H3-Gen bei den ersten 200 Bäumen, welche nicht mit in die Berechnung des Ergebnisbaumes einfließen. Für den Ergebnisbaum, der alle drei Gensequenzabschnitte beinhaltet, wurde wiederum das bereits erwähnte kombinierte Datenset bestehend aus den Sequenzfragmenten der COI, der 16S rRNA und des Histon H3-Gens benutzt. Dieses wurde ebenfalls partitioniert und die entsprechenden Sequenzevolutionsmodellparameter angewendet. Die Bayesische Analyse erfolgte durch drei Läufe mit vier simultanen Markov-Ketten in einer Million Generationen. Nach drei Millionen Generationen fiel die Standardabweichung der Teilungshäufigkeit auf einen Wert unter 0,01. Die ersten 50 Bäume wurden als Burn-in deklariert und verworfen. Alle durchgeführten Bayesischen Analysen wurden mit der Default-Einstellung für die Zufallsbaumoption initiiert und die Astlängen wurden gespeichert. Letztendlich wurden die Bayesischen Posteriorwahrscheinlichkeiten (BPP) für alle Analysen (COI, 16S rRNA, Histon H3, kombiniertes Datenset) abgeschätzt und die Bäume wurden zu Konsensusbäumen mittels des 50%-Mehrheitsprinzipes zusammengefasst.

## 2.13 Verwendete Hard- und Software

Diese Doktorarbeit wurde im Textsatzprogramm  $\text{\LaTeX}$ (Version: MiKTeX 2.9) mit dem TeXnicCenter 2.0 Beta 2 (64 Bit) verfasst.

- Betriebssystem: Windows 7 Ultimate 64 Bit (Microsoft, Redmond, Washington, USA)
- Digitale Bildbearbeitung: Microsoft PowerPoint 2010 (Microsoft, Redmond, Washington, USA) und Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems, San José, Kalifornien, USA)
- Scannen von Abbildungen: Scanner Hewlett Packard Scan Jet IIC/ADF mit der zugehörigen Software Desk Scan II (Palo Alto, Kalifornien, USA)
- Kamerasoftware für die Erstellung tiefscharfer Bilder: CombineZP Image Stacking Software (zu beziehen bei: alan@micropics.org.uk)
- Grafiken: Sigma Plot 10.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland)
- Statistik:
  - SPSS PASW Statistics 18 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland)
  - Statistica 8 (StatSoft Inc. 1984–2004, Tulsa, Oklahoma, USA)
- GC-MS-Software:
  - Aufnahme der TICs und MS: GCQ-Steuerungsprogramm Finnigan MAT (lehrstuhleigenes GC-MS)
  - Aufnahme der TICs und MS: Xcalibur (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) (GC-MS der zentralen Analytik)
  - Kalibrierungsdaten zur Quantifizierung: GCQ Data Processing 2.31 (Finnigan Corporation, San José, Kalifornien, USA)
  - Auswertung der Spektren:
    - \* XConvert von Xcalibur (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA)
    - \* ACD/SpecManager (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Ontario, Kanada)
    - \* NIST MS Search 2.0 (The NIST Mass Spectrometry Data Center, Gaithersburg, Maryland, USA)

- Alinierung und Stammbaumberechnung:
  - BioEdit 7.1.3.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)
  - MEGA 5.5.2 (<http://www.megasoftware.net/>)
  - jModelTest 2.1.4 (<https://code.google.com/p/jmodeltest2/>)
  - MrBayes 3.2.2 (<http://mrbayes.sourceforge.net/download.php>)
  - PAUP\* 4.0 b10 (Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA)
  - TreeView 1.6.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>)
  - FigTree v1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Larven der Steninae

#### 3.1.1 Die Larvalentwicklung und physiologische Eigenschaften der Larven

Einige Imagines der gesammelten *Stenus*-Spezies konnten im Labor nach der Methode von BETZ & FUHRMANN (2001) zur Kopula gebracht und erfolgreich vermehrt werden. Auch *Dianous coerulescens* legte zahlreiche Eier in Laborhaltung, aus denen L1-Larven schlüpften. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit mit der von BETZ & FUHRMANN (2001) etablierten Zuchtmethode nicht möglich, die L1-Larven ins nächste und übernächste Larvenstadium und anschließend zur Verpuppung zu bringen. Alle *Dianous coerulescens*-Larven starben in der L1-Phase. In der folgenden Tabelle 6 sind die *Stenus*-Arten, die sich unter Laborbedingungen vermehren ließen und die Lebensdaten der gezüchteten Larven zusammengefasst.

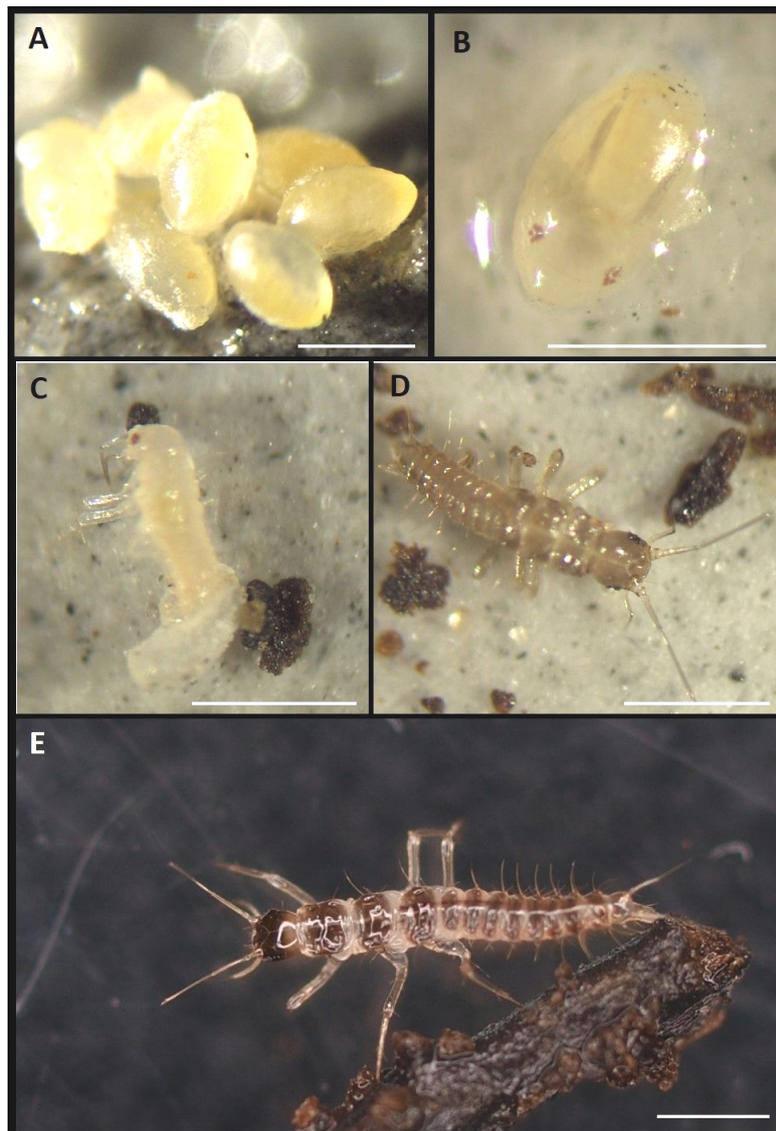
**Tabelle 6:** Im Labor gezüchtete *Stenus*-Arten und Lebensdaten der gewonnenen Larven

<i>Stenus</i> -Art	Eiphase	L1	L2	L3	Verpuppung	Schlupf der Imago
<i>S. comma</i>	6-7 Tage	2-3 Tage	2-3 Tage	2-3 Tage	5-6 Tage	nach maximal 21 Tagen
<i>S. bimaculatus</i>	5-6 Tage	2-3 Tage	2-3 Tage	2-3 Tage	7 Tage	nach maximal 22 Tagen
<i>S. clavicornis</i>	5-6 Tage	2-3 Tage	2-3 Tage	2-3 Tage	6 Tage	nach maximal 21 Tagen
<i>S. junco</i>	6-7 Tage	2-3 Tage	2-3 Tage	2-3 Tage	5-6 Tage	nach maximal 21 Tagen
<i>S. guttula</i>	5-6 Tage	2-3 Tage	2-3 Tage	2-3 Tage	6 Tage	nach maximal 21 Tagen
<i>S. fulvicornis</i>	5 Tage	2-3 Tage	2-3 Tage	2-3 Tage	7 Tage	nach maximal 21 Tagen
<i>S. latifrons</i>	5-6 Tage	2-3 Tage	2-3 Tage	2-3 Tage	7 Tage	nach maximal 22 Tagen

Wie aus Tabelle 6 zu entnehmen ist, durchläuft *Stenus* die Entwicklung vom Ei zum adulten Käfer in etwa drei Wochen bei 20 °C unter Laborbedingungen. Bei allen anderen gesammelten *Stenus*-Spezies konnte zwar hin und wieder eine Kopula beobachtet werden, jedoch keine Eiablage. Dies traf auf folgende Arten zu: *S. similis*, *S. solutus*, *S. tarsalis*, *S. flavipes*, *S. cicindeloides*, *S. binotatus*, *S. bifoveolatus*, *S. boops*, *S. melanarius*, *S. biguttatus*, *S. argus*, *S. falvipalpis* und *S. impressus* (diese Angaben beziehen sich auf Arten, die in größerer Anzahl im Freiland gesammelt werden konnten; Einzeltiere

anderer Arten konnten für die Zucht nicht eingesetzt werden). Bei zuchtfähigen Arten war der Sammelzeitpunkt oftmals ausschlaggebend für eine erfolgreiche Vermehrung im Labor. *Stenus*-Spezies wie z. B. die *Stenus sensu stricto*-Arten *S. bimaculatus*, *S. juno* und *S. clavicornis* konnten auch an mildereren Wintertagen ohne Schneelage aus dem Sammelbiotop „Creußen“ (siehe Tab. 2) mit dem Laubsauger entnommen werden. Die darauf folgende Haltung der Tiere in der Klimakammer bei 20 °C bei 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit induzierte verlässlich die Kopula und Eiablage. *S. comma* erwies sich als wärmeliebende Pionierart, die an spärlich bewachsenen Seeufern auf sandigem Boden nur bei sonnigem, warmen Sommerwetter in größerer Anzahl gesammelt werden konnte (siehe Tab. 2). Die Eiablage konnte bei dieser Art nur während der Sommermonate (Juni-August) im Labor beobachtet werden. Bei den untersuchten Vertretern der Steninae wurden zwei Paarungspositionen festgestellt: *S. latifrons* beispielsweise paart sich hintereinander mit den Abdominalspitzen einander zugewandt, während *S. comma* die Kopula übereinander sitzend vollzieht (Männchen hierbei über dem Weibchen) mit Blick in die selbe Richtung. Auch die Art der Eiablage unterschied sich zwischen den Arten: *S. latifrons* legte seine Eier einzeln in die Rillen des Gipsbodens oder unter die Rindenstückchen, wohingegen *S. comma* und *S. juno* bisweilen Eierhaufen von bis zu zehn Eiern bildeten, die dann unter Substrat versteckt wurden. In Abbildung 5 sind die einzelnen Entwicklungsstadien von *S. juno* fotografisch dokumentiert.

Nach dem Schlupf der L1-Larve aus der Eihülle konnte die Pigmentierung und Aushärtung der Kutikula beobachtet werden (siehe Abb. 5). Sofort nach dem Schlüpfen liefen die Tiere umher, um Nahrung zu suchen, die in Form von Springschwänzen der Art *Folsomia candida* in den Aufzuchtsschalen angeboten wurde. Da *Stenus*-Larven nicht über den Klebfangapparat der Imagines verfügen um die flinken Springschwänze zu fangen, greifen die Larven auf eine andere, passive Fangmethodik zurück. Der Körper aller Larvenstadien ist mit einer Behaarung versehen, die sich aus Haaren verschiedener Länge und Dicke zusammensetzt. Des Öfteren konnten an den Haaren feine Tröpfchen beobachtet werden, die eine klebrige Konsistenz aufweisen. An den Tröpfchen der Haare blieben die Springschwänze kleben, so dass die Larven diese nur mit Hilfe der Beine von ihrem Körper klaben mussten, um sie dann mit ihren kräftigen Mandibeln zu packen und zu fressen. Auch Substratpartikel wie z. B. kleinere Erdkrümel hafteten an den Haaren der Larven. Alle Larvenstadien der gezüchteten Steninae besitzen außer der interessanten Körperbehaarung noch eine Art „Nachschieber“ an der Abdominalspitze. Dieser hat eine trompetenförmige Gestalt und fungiert augenscheinlich als Saugnapf, der eine Haftung des Tieres z. B. an der Wand der Zuchtsschale ermöglicht. Auch bei der bisweilen beobachteten spannerartigen Fortbewegung der Larven spielte diese Struktur ebenfalls eine wichtige Rolle. Kurz vor der Häutung in das jeweils nächste Larvenstadium spinnen sich die Larven mit feinen Fäden, deren Ursprung wohl ebenfalls mit dem „Nachschieber“ assoziiert ist,



**Abbildung 5:** Montage der einzelnen Entwicklungsstadien von *S. juno* fotografisch dokumentiert; Bild **A** zeigt einen auf dem Gipsboden der Zuchtschale abgelegten Eierhaufen, der typisch für diese *Stenus*-Art ist. Bild **B** stellt eine Detailaufnahme eines reifen Eies dar, worin sich eine schlupffreie L1-Larve befindet; durch die Eierschale sind bereits die roten Ocellen und die Antennen der Larve durchscheinend zu erkennen. Bild **C** zeigt eine frisch geschlüpfte L1-Larve; im unteren Bereich des Bildes ist die leere Eierschale zu sehen, derer sich die Larve gerade entledigt. Kurz nach dem Schlupf ist die Kutikula der Larve noch völlig unpigmentiert und noch nicht ausgehärtet. In Bild **D** ist ein junges Tier des zweiten Larvenstadiums zu sehen; die Kutikula der Larve ist einige Zeit nach der Häutung zur L2 nun völlig pigmentiert und ausgehärtet und erscheint nicht mehr transparent. In Bild **E** ist das dritte und letzte Larvenstadium zu sehen; die L3-Larve ist nun völlig ausgewachsen und die Intersegmentalhäute erscheinen ausgedehnt. Das Tier steht kurz vor der Verpuppung zur finalen Häutung zur Imago. Weiterhin ist die Behaarung der Larve, die den ganzen Körper überzieht, erkennbar, sowie der Nachschieber an der Abdominalspitze. Der Messbalken in den Abbildungen entspricht 1 mm. Bilder A-D wurden mit Kamera 2 durch das Okular des Binokulars erstellt, während Bild E mit Kamera 1 im Makromodus aufgenommen wurde.

in der dafür vorgesehenen Vertiefung im Gipsboden der Zuchtschale ein. In diesem „Kokon“ vollzog sich die Häutung und auch die Puppenruhe anschließend an das dritte und letzte Larvenstadium.

Trotz größter Bemühungen gelang es während dieser Arbeit nicht, *Stenus*-Larven im Freiland zu sammeln, um Aufschluss über deren Lebensweise in der Natur zu erhalten. Mehrmals wurde aus Habitaten mit großer Dichte adulter Steninae entweder Substrat und pflanzliches Material oder ganze Bülte entnommen und das so gewonnene Substrat in Kempson-Apparate überführt (KEMPSON et al., 1963). Leider konnten aus dem Freilandmaterial niemals *Stenus*-Larven ausgetrieben werden. Auffallend war jedoch, dass die im Labor geschlüpften Larven auch nach der Aushärtung der Kutikula noch immer sehr transparent erschienen und extrem lichtempfindlich waren, was die fotografische Dokumentation der Larven äußerst schwierig gestaltete.

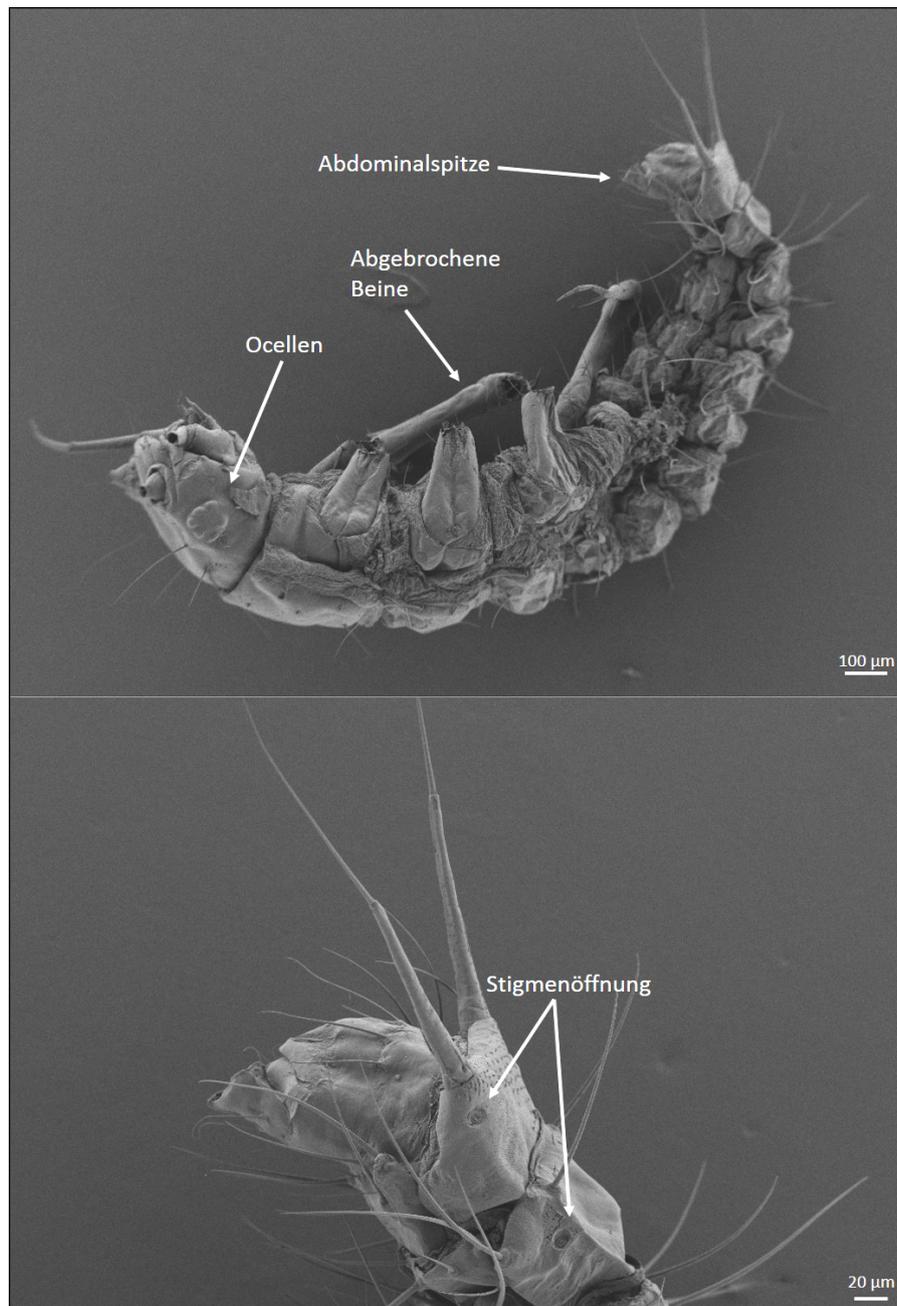
Wie bereits erwähnt, besitzen die Larven der Steninae keinen ausgeprägten Klebfangapparat wie die Imagines. Darüber hinaus sind bei den Larven ebenfalls keine Pygidialdrüsen zu finden, die das für *Stenus* typische multifunktionale Sekret enthalten. Die Larven können aufgrund dessen nicht spreiten und sind weiterhin nicht hydrophob; wenn eine Larve ins Wasser fällt, kann sie sich nicht auf der Wasseroberfläche halten und versinkt.

### 3.1.2 Mikroskopie der Larvalbehaarung

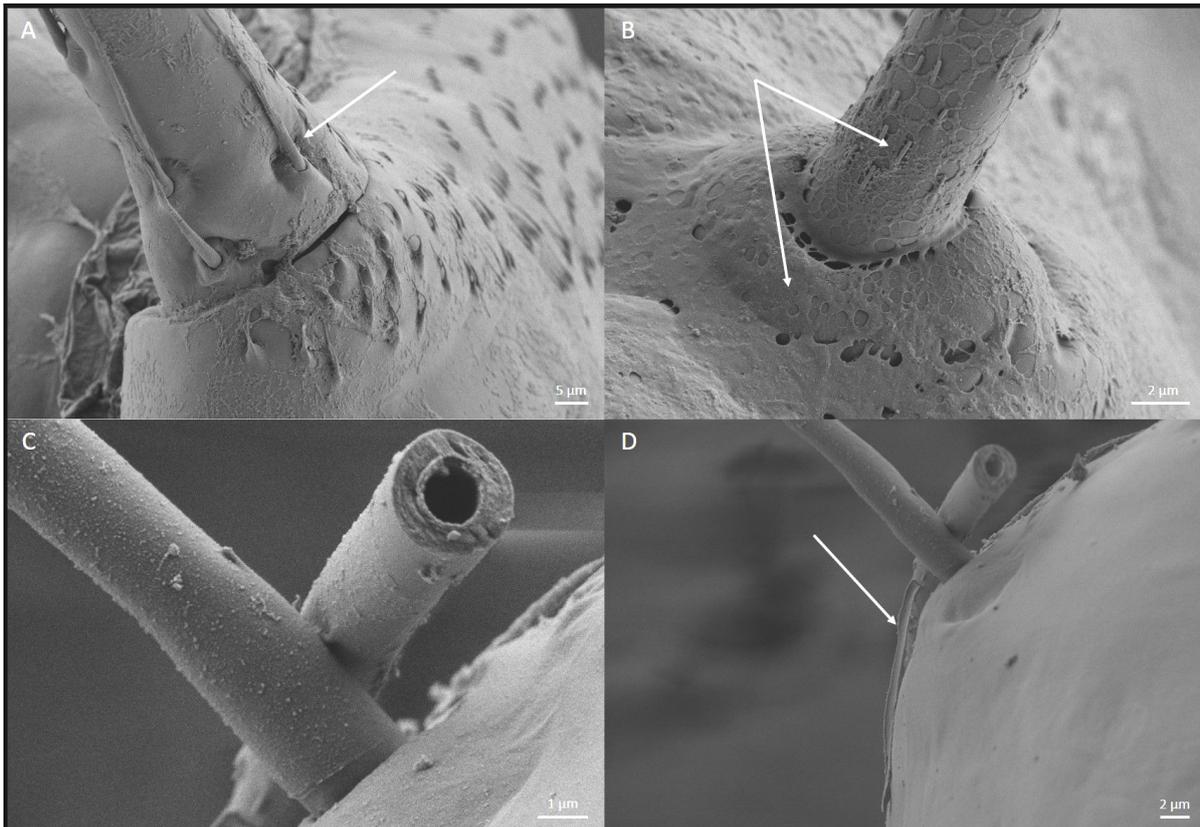
Um die interessante Larvalbehaarung der Steninae neben lichtmikroskopischen Methoden noch eingehender zu untersuchen, kamen REM und TEM zum Einsatz. Zuerst wurde eine L3-Larve von *S. latifrons* am REM betrachtet. Unglücklicherweise überstand der filigrane Larvenkörper die Prozedur der Kritisch-Punkt-Trocknung nur zum größten Teil versehrt. Jedoch barg diese Problematik auch gewisse Vorteile: durch die mechanische Beanspruchung des Larvenkörpers brachen einzelne Haare ab, so dass auch das Innere des Haares betrachtet werden konnte. So lieferte das suboptimale Ausgangsmaterial der REM-Aufnahmen Aufschluss darüber, ob einzelne Haare hohl sind und somit als sog. Sekrethaare fungieren könnten. In Abbildung 6 ist eine REM-Gesamtaufnahme der L3-Larve von *S. latifrons* dargestellt mit einem vergrößerten Ausschnitt der Abdominalspitze des selben Tieres.

Mit Hilfe der REM-Aufnahmen konnte festgestellt werden, dass die *Stenus*-Larve über verschiedenartige Haare verfügt. Neben Haaren, deren Oberfläche glatt erschien, waren auch Haare zu finden, die wiederum mit kleineren haarartigen Strukturen besetzt waren. Einige Haare waren abgebrochen und gaben den Blick in einen Hohlraum innerhalb des Haares frei. Die Spitze der hohlen Haare formte oftmals eine kanülenartige Einkerbung. In der folgenden Montage mehrerer REM-Aufnahmen ist die Mannigfaltigkeit der Larvalbehaarung dargestellt (siehe Abb. 7).

Zur weiteren Untersuchung der hohlen Haare und zur Klärung der Frage, ob diese

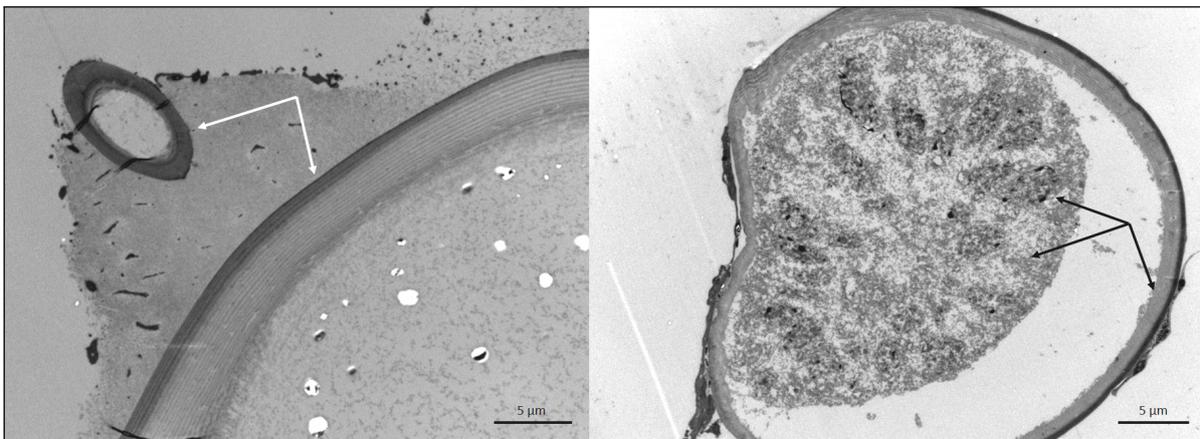


**Abbildung 6:** REM-Gesamt- und Detailaufnahme des Abdominalbereiches einer L3-Larve von *S. latifrons*; das obere Bild zeigt eine Ganzkörperaufnahme der Larve, wobei die Morphologie des Tieres gut zu erkennen ist (siehe Pfeile und deren Beschriftung). Das untere Bild zeigt eine Detailaufnahme des Abdomens; hier sind die Atemöffnungen der Larve sichtbar, sowie die verschiedenen Haartypen der Larvalbehaarung auf der Körperoberfläche. Alle nachfolgenden Bilder zeigen weitere Detailaufnahmen aus dem Abdominalbereich dieser Larve. Die Bilder wurden bei 1,50 kV aufgenommen.



**Abbildung 7:** Verschiedenartige Behaarung im Abdominalbereich der L3-Larve von *S. latifrons*; Bild **A** zeigt die Basis eines Haares, das mit kleineren, sich von der Haaroberfläche deutlich abhebenden Härchen besetzt ist (siehe Pfeil). In Bild **B** ist ein Haar zu sehen, das wiederum haarartige Strukturen aufweist, die sich jedoch nicht so sehr von der Oberfläche abheben, wie die Härchen in Bild **A** (siehe Pfeil). Daneben ist auffallend, dass die Körperoberfläche der Larve mit einer Art Biofilm bedeckt zu sein scheint (siehe Pfeil); dieser Film bedeckt die gesamte Larve. Bild **C** zeigt ein abgebrochenes, hohles Haar. Die Oberfläche dieses Haares ist glatt. In Bild **D** ist das selbe Haar wie in Bild **C** dargestellt. An der Spitze des hohlen Haares ist die kanülenartige Einkerbung gut zu erkennen (siehe Pfeil). Die Frage, ob diese Einkerbung eine Öffnung besitzt, die mit dem Hohlraum innerhalb des Haares in Verbindung steht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Die Bilder wurden bei 1,50 kV aufgenommen.

als Sekrethaare in Erscheinung treten, wurden zusätzlich zu den REM- auch TEM-Aufnahmen angefertigt. Die Schwierigkeit bestand hierbei darin, beim Herstellen der Schnitte am Mikrotom mit der Schnittfläche genau die Basis eines solchen Haares zu treffen. Dies gelang leider nur bedingt. Die angefertigten Schnitte stammten ebenfalls aus dem Abdominalbereich einer L3-Larve von *S. latifrons*. Da die Proben trotz sorgfältigster Vorbereitung unglücklicherweise nicht vollständig mit Epon durchzogen waren und extrem wenig Tiermaterial zur Verfügung stand, können für die korrekte Zuordnung von Zellorganellen nur vorläufige Annahmen angestellt werden. Im Folgenden werden zwei TEM-Aufnahmen gezeigt, die die Spitze und die mögliche Basis eines vermeintlichen Haares darstellen (siehe Abb. 8).

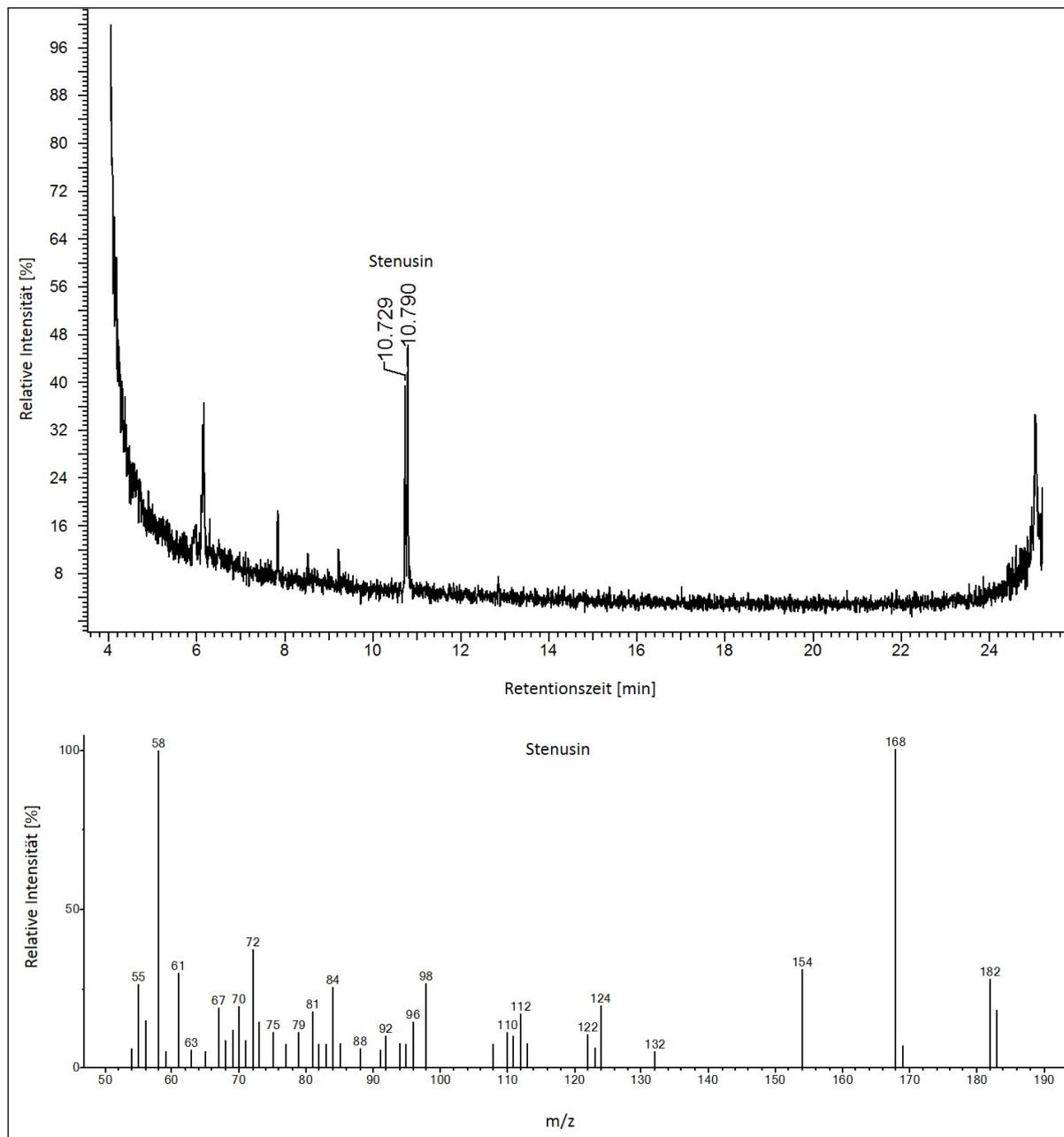


**Abbildung 8:** Querschnitts-Aufnahmen (TEM) von Haaren einer L3-Larve von *S. latifrons* erlauben folgende Annahmen: das linke Bild zeigt einen Teil des Larvenkörpers (rechts unten) mit der vielschichtigen Kutikula (siehe Pfeil auf ca. sechs Uhr). Der zweite Pfeil (ca. neun Uhr) verweist auf die Spitze eines vermeintlichen hohlen Haares. Das rechte Bild dürfte die Basis eines dickeren Haares darstellen. Am rechten Bildrand ist die Kutikula der Larve gut zu erkennen (siehe Pfeil auf fünf Uhr), während für die Interpretation der restlichen Strukturen leider nur auf Vermutungen verwiesen werden kann. Innerhalb des „Haares“ befindet sich eine zelluläre Masse, in der sich augenscheinlich Mitochondrien (siehe Pfeil auf zehn Uhr) und raues endoplasmatisches Retikulum (siehe Pfeil auf acht Uhr) befinden könnten. Dies könnte auf die Basis eines Sekrethaares hinweisen, da diese Organelle maßgeblich an der Proteinbiosynthese beteiligt ist. Hier könnte sich die Herstellung eines Klebstoffes vollziehen, der die Larven zum Beutefang befähigt.

### 3.1.3 Spurenanalytische Untersuchung der Larven

Neben der mikroskopischen Untersuchung der Larvalbehaarung wurden die Entwicklungsstadien der Steninae auch einer spurenanalytischen Untersuchung unterzogen. Da das multifunktionale Sekret der Imagines zuverlässig vor Fraß durch Prädatoren und Kolonisation schädlicher Mikroorganismen schützt, wäre es auch von Vorteil, wenn die Entwicklungsstadien aufgrund der Abwesenheit von Pygidialwehldrüsen

beispielsweise durch das Muttertier mit den Drüsenverbindungen versorgt werden würden. Hierzu wurden wie in Kapitel 2.9.1 beschrieben Oberflächen- und Ganzkörperextrakte für die Analyse mittels GC-MS hergestellt und gemessen. Es wurden alle Entwicklungsstadien (Eier, L1-, L2- und L3-Larven, sowie Puppen) mehrerer *Stenus*-Arten untersucht (*S. juno*, *S. clavicornis*, *S. comma*, *S. latifrons*, *S. guttula* und *S. bimaculatus*). Nur in einem Ganzkörperextrakt aus L1-Larven von *S. clavicornis* konnte eine vermeintliche Spur Stenusin (**1**) nachgewiesen werden (Abb. 9). Alle anderen analysierten Extrakte beinhalten keine der Drüsenverbindungen der Imagines.



**Abbildung 9:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) und zugehöriges Massenspektrum (MS) der GC-MS-Messung des Extraktes aus mehreren L1-Larven von *S. clavicornis*; im oberen Bild ist das TIC des gesamten GC-Laufes dargestellt. Es sind mehrere Peaks zu erkennen, jedoch ist nur der Doppelpeak, der mit den zugehörigen Retentionszeiten gekennzeichnet ist, von Interesse. Alle anderen Peaks konnten Verunreinigungen durch abgelöstes Säulenmaterial zugeordnet werden. Der gekennzeichnete Doppelpeak stellt wahrscheinlich den Stenusin-Doppelpeak mit geringer Intensität dar (belegt durch eine Referenzmessung des authentischen Naturstoffes). Das untere Bild zeigt das MS des Stenusindoppelpeaks mit den typischen Massen von Stenusin. Offenbar scheinen die untersuchten Larven eine geringe Menge der Drüsenverbindung **1** im Körperinneren zu beinhalten.

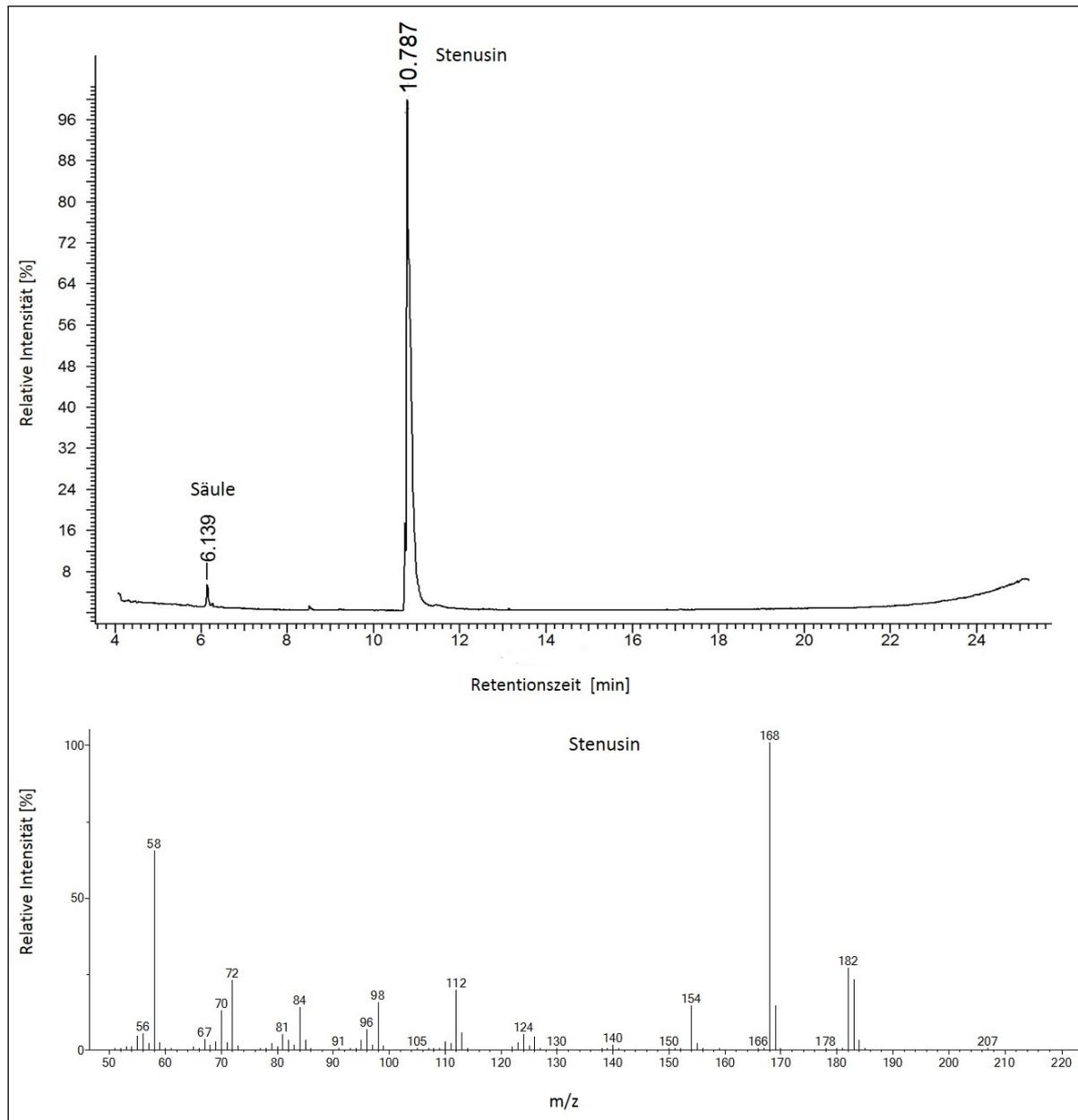
## 3.2 Spurenanalytische Untersuchung von Pygidialdrüsensekreten adulter Steninae

### 3.2.1 Spurenanalyse noch nicht untersuchter *Stenus*-Arten

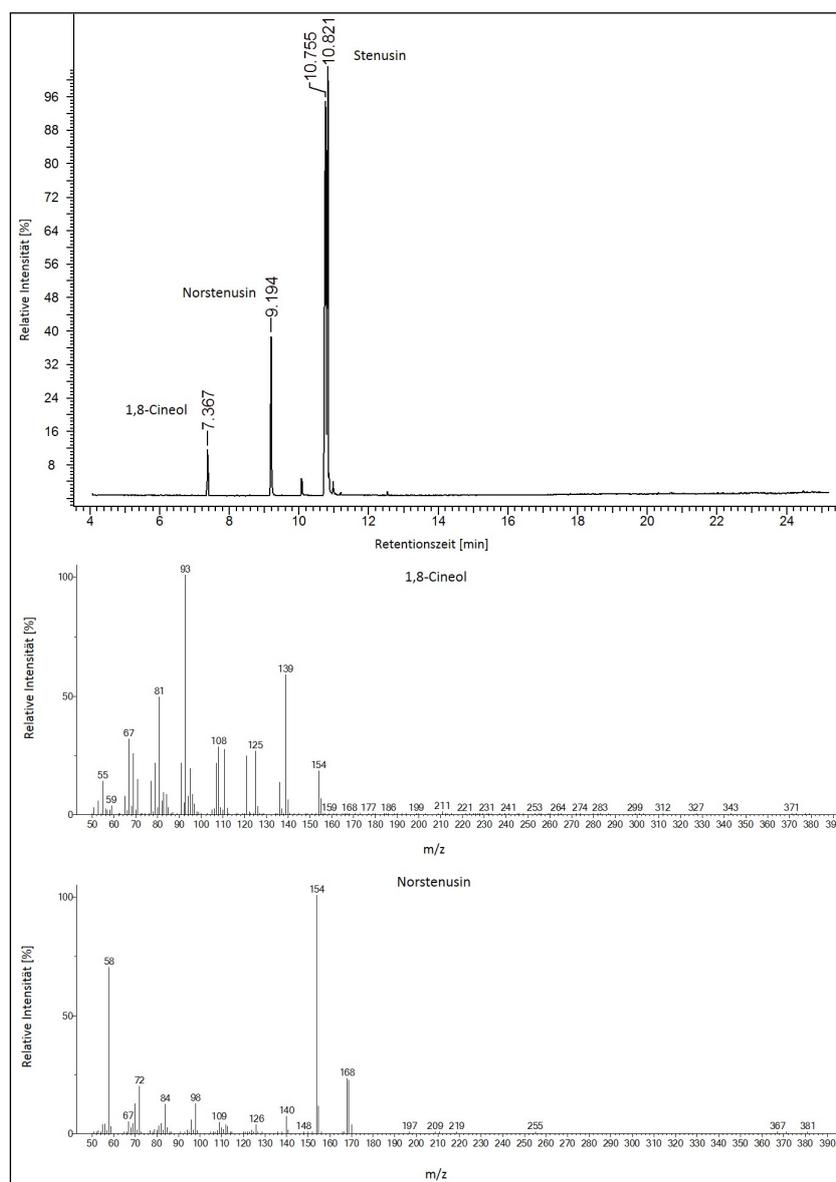
Neben der Spurenanalyse der Entwicklungsstadien der Steninae war auch die Untersuchung des Pygidialdrüsensekretes weiterer, noch nicht näher untersuchter *Stenus*-Arten Gegenstand dieser Arbeit. Diese Untersuchungen dienten auch dazu, die betreffenden *Stenus*-Arten chemotaxonomisch im Sinne von SCHIERLING et al. (2013) einzuordnen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der GC-MS-Analyse des Drüsensekretes von *S. guttula*, *S. longipes*, *S. biguttatus* aus Italien und *S. argus*, sowie der *Dianous*-Arten *D. betzi*, *D. obliquenotatus* und *D. karen* aus Thailand präsentiert. Kein untersuchtes Drüsensekret beinhaltete neue Naturstoffe oder noch unbekannte Biosynthesestufen. In den nachfolgenden Bildmontagen (Abb. 10-16) sind stets das Totalionenstromchromatogramm (TIC) des gesamten gemessenen Pygidialdrüsensekretes und eine Auswahl der erhaltenen Massenspektren (MS) der Drüsenverbindungspeaks aus den TICs dargestellt. Zur Determination und Zuordnung der gemessenen Massenspektren wurden authentische Drüsenverbindungen unter gleichen Bedingungen am GC-MS als Referenzen gemessen. Diese TICs und MS der Referenzen sind im Anhang A.5 aufgeführt. Die Interpretation der Spektren sowie Besonderheiten werden im Detail in den entsprechenden Bildunterschriften präsentiert. Darüber hinaus sind die Ergebnisse der spurenanalytischen Untersuchung der Sekrete der neuen *Stenus*- und *Dianous*-Arten in Tabelle 7 zusammengefasst.

**Tabelle 7:** Sekretzusammensetzung der noch nicht spurenanalytisch untersuchten Sekrete neuer Steninae

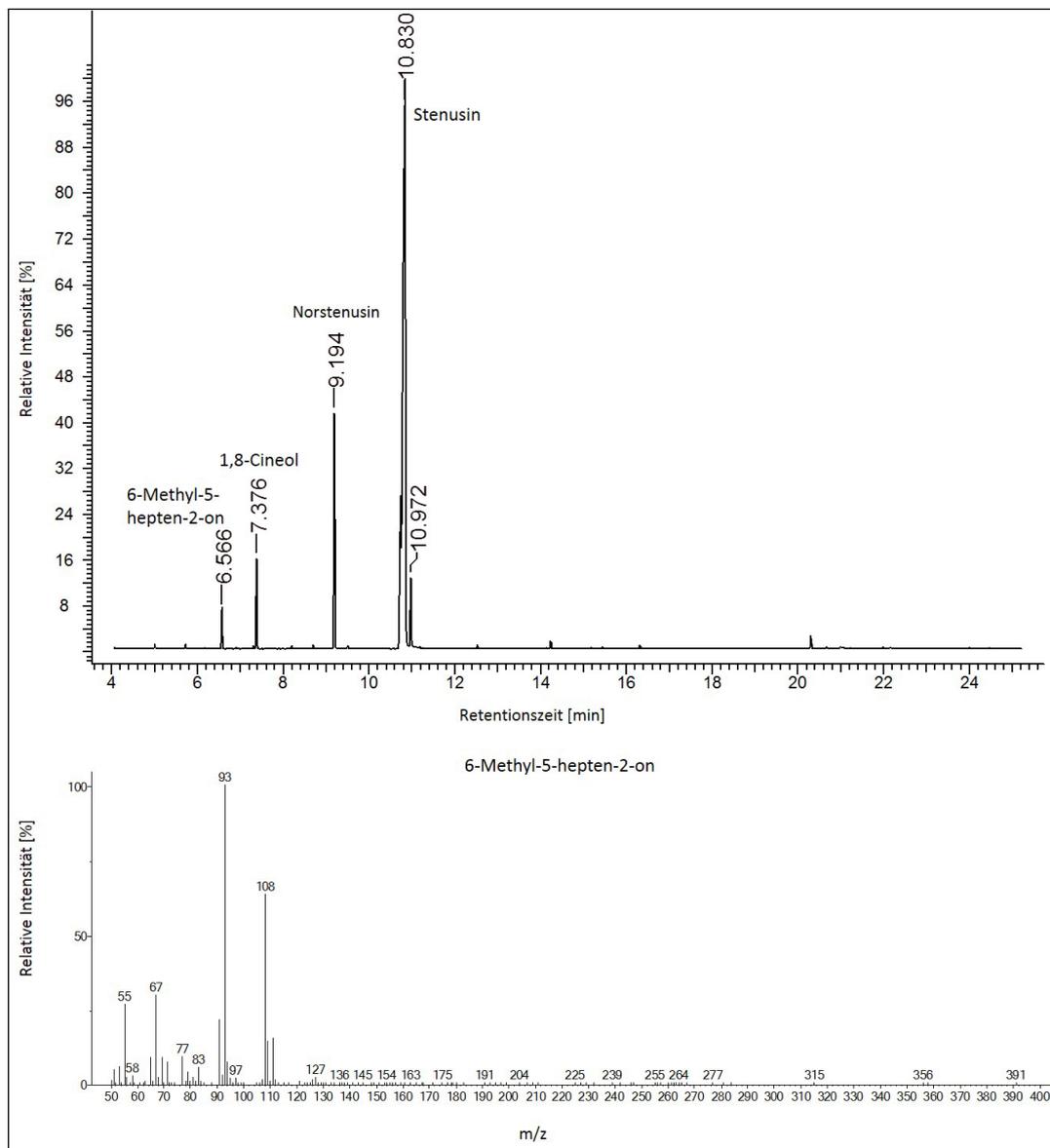
<i>Käferart</i>	<b>Gefundene Drüsenverbindungen</b>
<i>S. guttula</i>	Stenusin (1)
<i>S. longipes</i>	Stenusin (1) Norstenusin (2) 1,8-Cineol (6)
<i>S. biguttatus</i>	Stenusin (1) Norstenusin (2) 1,8-Cineol (6) 6-Methyl-5-hepten-2-on (7)
<i>S. argus</i>	Stenusin (1) Norstenusin (2)
<i>D. betzi</i>	Stenusin (1) Norstenusin (2)
<i>D. obliquenotatus</i>	Stenusin (1) Norstenusin (2)
<i>D. karen</i>	Stenusin (1) Norstenusin (2)



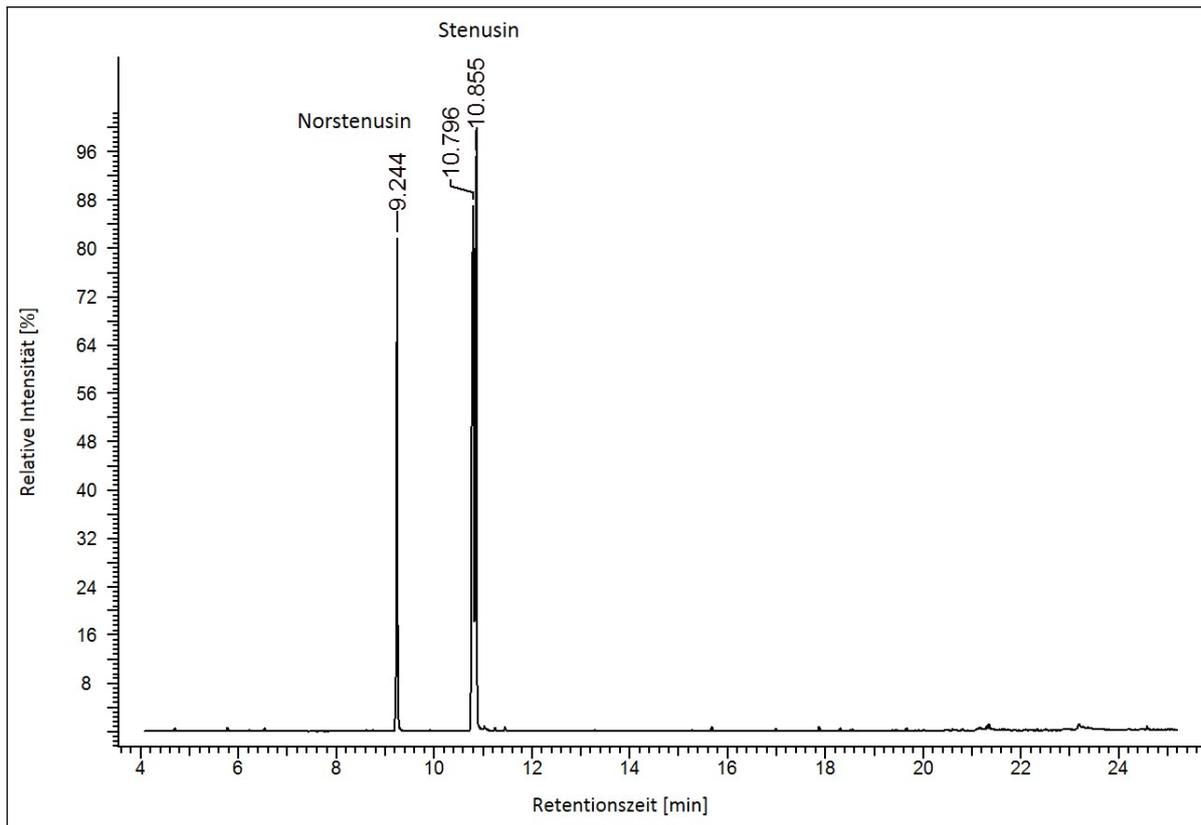
**Abbildung 10:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) und zugehöriges Massenspektrum (MS) der GC-MS-Messung des Pygidialdrüsensekretes von *S. guttula*; im oberen Bild ist das TIC des gesamten GC-Laufes dargestellt. Neben einer Verunreinigung durch Säulenbluten (siehe Markierung „Säule“) konnte noch ein Peak gefunden werden, der durch Referenzmessung eindeutig der Drüsenverbindung 1 zuzuordnen war. Das untere Bild zeigt das MS des Stenusinpeaks.



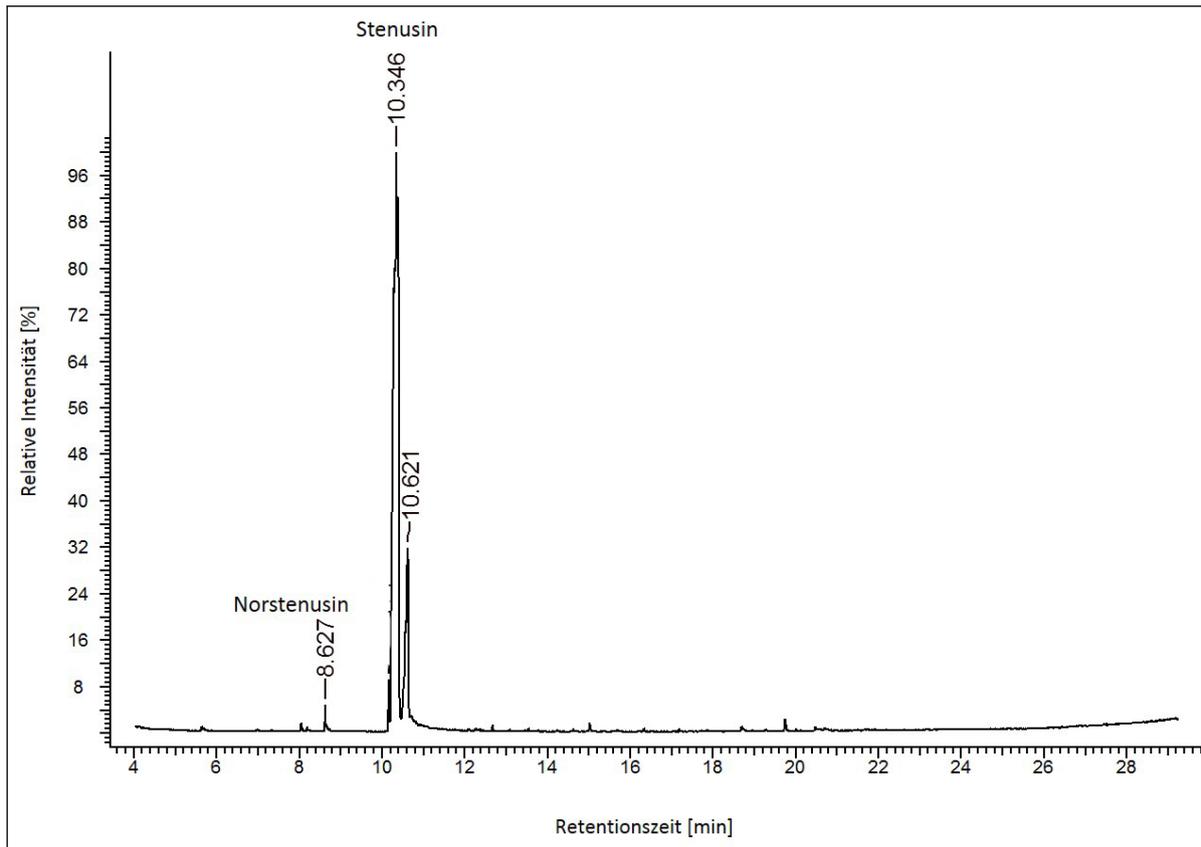
**Abbildung 11:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) und zugehörige Massenspektren (MS) der GC-MS-Messung des Pygidialdrüsensekretes von *S. longipes*; das obere Bild zeigt das TIC des gesamten GC-Laufes mit den gemessenen Peaks von 1,8-Cineol (6), Norstenusin (2) und Stenusin (1; siehe Beschriftung). Im mittleren Bild ist das gemessene MS der Verbindung 6 dargestellt und das untere Bild zeigt das gemessene MS von 2. Bei der Verbindung 6 ergaben sich beim Vergleich mit dem Referenzspektrum leichte Abweichungen bezüglich der Intensitäten der nominellen Massen und der Größe der Fragmente. Mit Hilfe der NIST-Datenbank und einer Referenzmessung der authentischen Verbindung in der zentralen Analytik bei Frau Dr. Lacher konnte jedoch die Verbindung 6 eindeutig identifiziert werden. Daher ist im Anhang unter [A.5](#) das TIC und MS der Messung von Frau Lacher dargestellt, woraus sich logischerweise leichte Abweichungen bzgl. der RT ergeben. Verbindung 2 konnte anhand einer Referenzmessung zweifelsfrei der authentischen Substanz zugeordnet werden. Da das MS von Verbindung 1 schon gezeigt wurde, wird in dieser und den folgenden Bildmontagen auf nochmaliges Aufführen der MS bereits besprochener Verbindungen verzichtet.



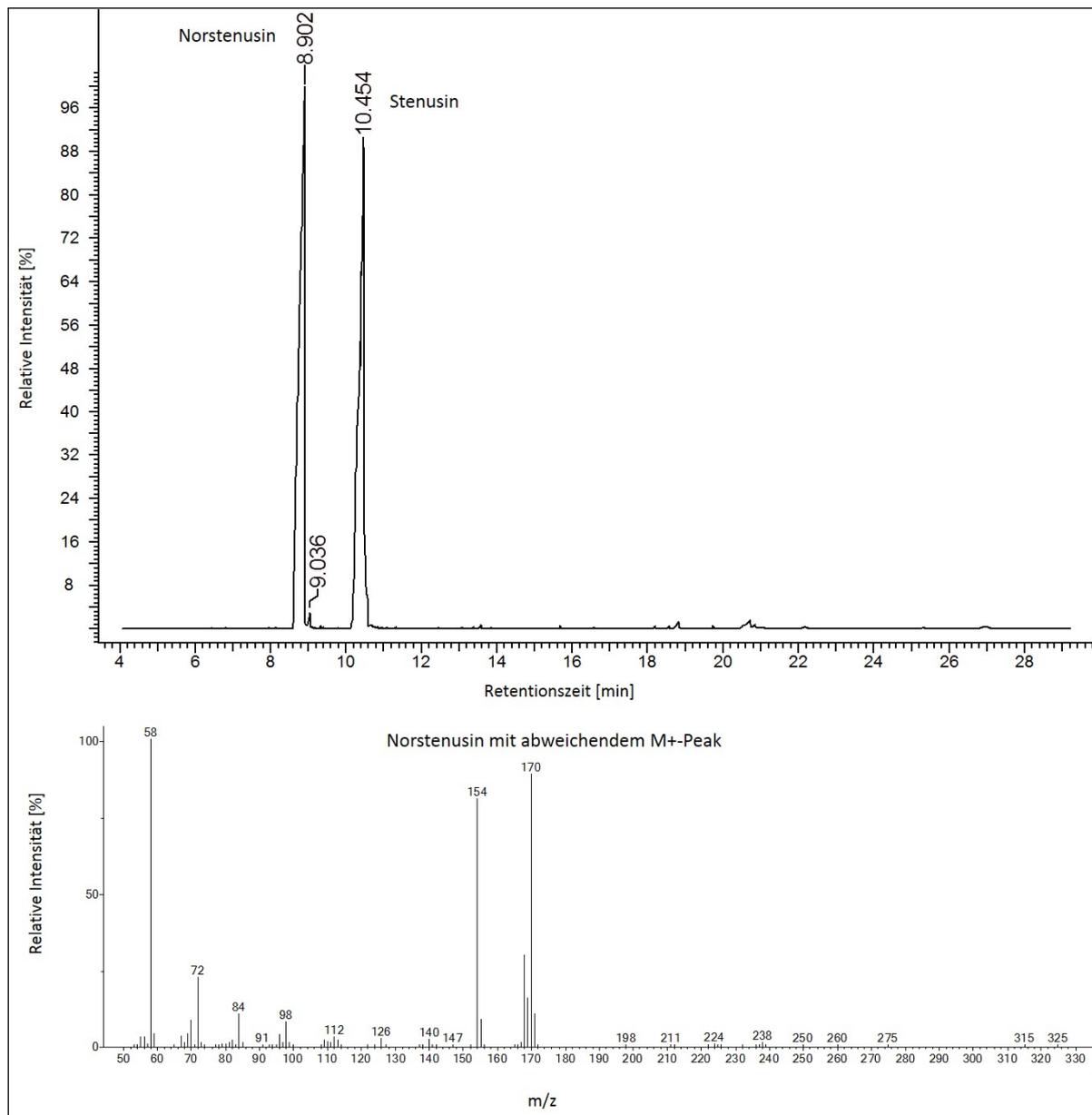
**Abbildung 12:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) und das zugehörige Massenspektrum (MS) der GC-MS-Messung des Pygidialdrüsensekretes des italienischen Vertreters von *S. bi-guttatus*; das obere Bild zeigt das TIC des gesamten GC-Laufes mit den gemessenen Peaks von 6-Methyl-5-hepten-2-on (7), 1,8-Cineol (6), Norstenusin (2) und Stenusin (1; siehe Beschriftung; eindeutig nachgewiesen). Im unteren Bild ist das gemessene MS von Verbindung 7 dargestellt. Der Vergleich mit der Referenzmessung von Verbindung 7 (siehe A.5) ergab für die gefundene Sekretverbindung leichte Unterschiede die Intensitäten und Massen betreffend (vgl. Abb. 11).



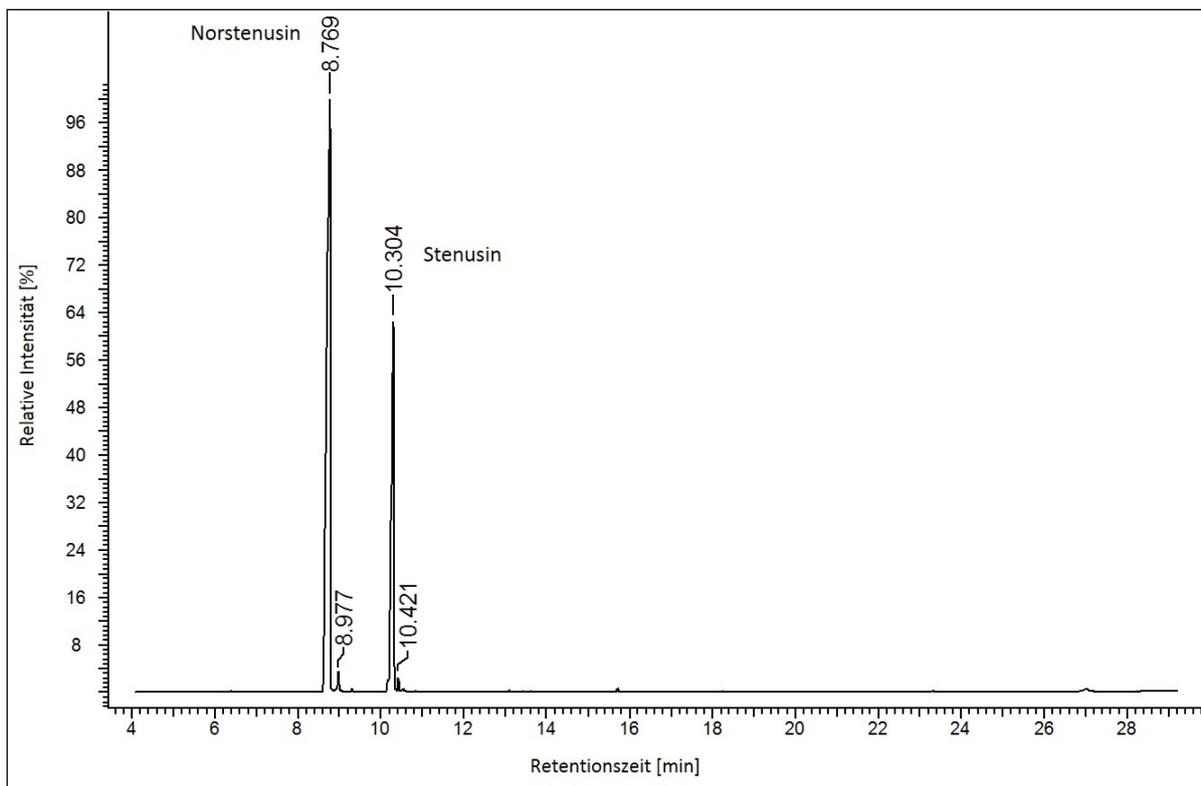
**Abbildung 13:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) der GC-MS-Messung des Pygidialdrüsensekretes von *S. argus*; das Bild zeigt das TIC des gesamten GC-Laufes mit den gemessenen Peaks der Verbindungen 1 und 2. Es handelt sich hierbei im Sekret eindeutig um diese bekannten *Stenus*-Verbindungen, was die Referenzmessungen belegten. Da die MS von 1 und 2 bereits gezeigt wurden, wird auf ein weiteres Aufführen dieser verzichtet.



**Abbildung 14:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) der GC-MS-Messung des Pygidialdrüsensekretes von *D. betzi* aus Thailand; das Bild zeigt das TIC des gesamten GC-Laufes mit den gemessenen Peaks der Verbindungen 1 und 2. Die Referenzmessungen ergaben, dass diese asiatische *Dianous*-Art ohne Zweifel diese beiden Drüsenverbindungen im Sekret besitzt. Von Verbindung 2 konnte nur eine geringe Menge im Sekret nachgewiesen werden.



**Abbildung 15:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) und zugehöriges Massenspektrum (MS) der GC-MS-Messung des Pygidialdrüsensekretes von *D. obliquenotatus* aus Thailand; im oberen Bild ist das TIC des gesamten GC-Laufes mit den Peaks der gemessenen Verbindungen 1 (eindeutig) und 2 zu sehen. Das untere Bild zeigt das gemessene MS von Verbindung 2. Bezüglich der Referenzmessung von Verbindung 2 konnten minimale Abweichungen festgestellt werden. Die nominellen Massen von Verbindung 2 betreffend weicht nur der  $M^+$ -Peak um eine Einheit im Vergleich mit der authentischen Referenz ab. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich höchstwahrscheinlich um Verbindung 2 im Sekret handelt. Aufgrund dieser geringfügigen Abweichung ist das MS von 2 nochmals dargestellt. Der Peak mit der Retentionszeit von 9,036 min stellt eine Verunreinigung dar. Der Peak von Verbindung 2 erscheint intensiver als derjenige der Drüsenverbindung 1.

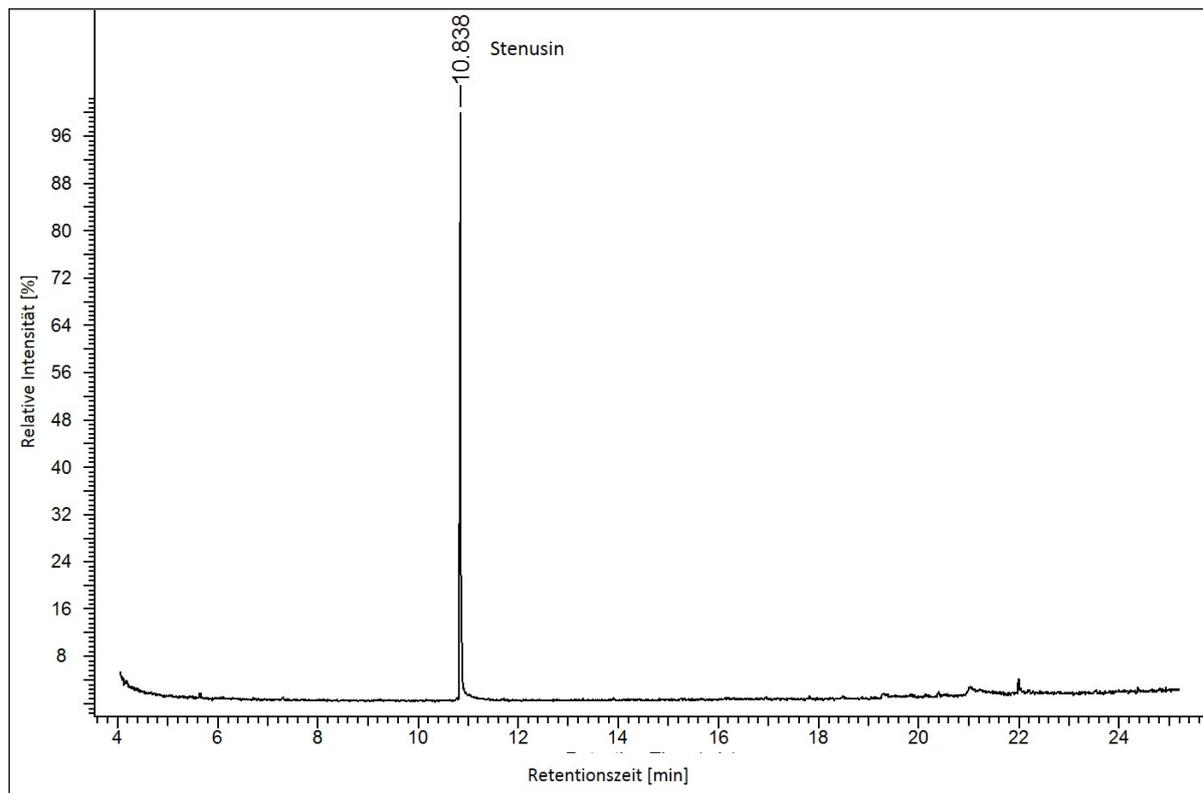


**Abbildung 16:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) der GC-MS-Messung des Pygidialdrüsensekretes von *D. karen* aus Thailand; das Bild zeigt das TIC des gesamten GC-Laufes mit den Peaks der gemessenen Verbindungen 1 und 2 (zweifelsfrei durch Referenzmessungen bestätigt). Wie in Abb. 15 erscheint der Peak von 2 intensiver als der Peak von 1.

3.2.2 Spurenanalytische Untersuchung der myrmecophilen *Stenus*-Art *S. aterrimus*

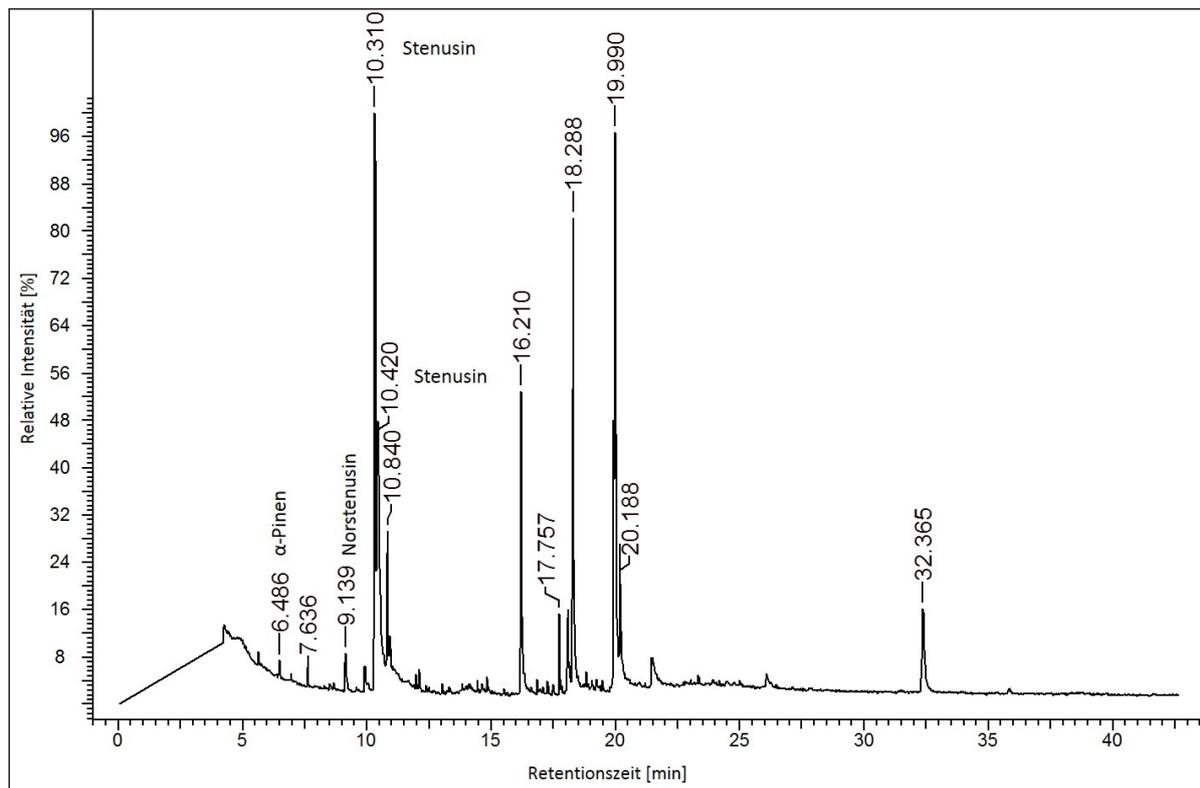
Nicht nur die Analyse des Pygidialdrüsensekretes noch nicht untersuchter Steninae war von Interesse für diese Arbeit, sondern auch die nähere Untersuchung ausgewählter *Stenus*-Arten, die spezielle ökologische Bedürfnisse aufweisen. Beispielsweise ist es außerordentlich spannend, wie sich die obligat myrmecophile *Stenus*-Art *S. aterrimus* in die Nester der Ameisengattung *Formica* integriert. Dabei war es wichtig, die verschiedenen Möglichkeiten der Anpassung von Myrmecophilen an das Leben im Wirtsameisennest in Erwägung zu ziehen. Die GC-MS-Messungen der Oberflächenextrakte der untersuchten Ameisenarten *F. pratensis* und *F. truncorum* lieferten ein typisches Kohlenwasserstoffprofil, der den nestspezifischen „Geruch“ von Ameisen darstellt. Auf der Oberfläche von *S. aterrimus* konnten jedoch keinerlei „ameisentypische“ Kohlenwasserstoffe nachgewiesen werden, mittels derer sich der Kurzflügler in die Ameisennester integrieren könnte. Allerdings ergaben die Messungen des Oberflächenprofils der Käfer eindeutige Secretion grooming-Aktivitäten, da Drüsensekretverbindungen wie z. B. Stenusin (1) nachgewiesen werden konnten. Da sich die Kurzflügler allem Anschein nach nicht durch Kopie des Nestgeruches in die Ameisenhaufen integrieren, wurde auch die Zusammensetzung des Pygidialdrüsensekretes von *S. aterrimus* spurenanalytisch untersucht. Dabei ergaben sich generell keine Unterschiede zwischen den qualitativen Sekretzusammensetzungen von Käfern aus Nestern von *F. pratensis* und *F. truncorum*. In den meisten untersuchten Sekreten konnte jeweils nur der Naturstoff 1 eindeutig nachgewiesen werden (siehe Abb. 17). Lediglich in einem Sekret eines *S. aterrimus*-Exemplares aus einem *F. pratensis*-Nest vom Truppenübungsplatz Trampe (siehe Tab. 2) wurden weitere Verbindungen entdeckt. Die *Stenus*-Naturstoffe Stenusin (1) und Norstenusin (2) wurden in diesem Sekret eindeutig detektiert, sowie die Terpenverbindung  $\alpha$ -Pinen (5). Alle weiteren gezeigten Peaks (siehe Abb. 18) lassen Spielraum für Spekulationen und Vermutungen. Der Verdacht, das Sekret dieses Tieres enthalte ein weiteres Terpen, nämlich D-Limonen (RT: 7,636 min), konnte durch Referenzmessungen nicht bestätigt werden. Ebenso verhielt es sich mit der bereits bei *S. similis* nachgewiesenen neuen Pyridin-Verbindung 3-(2-Methylbutyl)-pyridin (RT: 10,840 min; SCHIERLING, unpubl.).

Des Weiteren wurde *S. aterrimus* auch auf mögliche physiologische Besonderheiten untersucht, die bei der Integration in Ameisennester eine Rolle spielen könnten. Hierzu wurden die Käfer unter dem Binokular betrachtet. Die Kurzflügler besitzen einen für Steninae typischen und völlig normal ausgeprägten Klebfangapparat, sowie auch sonst einen unauffälligen Körperbau. Die Pygidialdrüsen sind durch ein gut ausgeprägtes und relativ großes kleines Reservoir charakterisiert, in dem generell die Terpenverbindungen (5-7; siehe Abb. 2) zu finden sind. Einige Steninae zeigen bei Störung oder Gefahr Thanatose (wie z. B. *S. clavicornis*), so auch *S. aterrimus*. Auffallend ist jedoch, dass diese Art das Totstellen nahezu meisterhaft beherrscht, so



**Abbildung 17:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) der GC-MS-Messung des Pygidialdrüsensekretes von *S. aterrimus* aus einem Nest von *F. truncorum*; im Sekret konnte nur die Präsenz des Naturstoffes Stenusin (1) eindeutig bestätigt werden (siehe Beschriftung) und sonst keine weitere *Stenus*-Verbindung.

dass sich beim Absammeln der Käfer aus dem chaotischen Gewirr der aufgeschreckten Ameisen enorme Schwierigkeiten ergaben. Neben der Analyse physiologischer Charakteristika wurden die myrmecophilen Steninae auch einer ethologischen Untersuchung unterzogen und dafür ein Käfer mit einigen Arbeiterinnen (*F. pratensis*) des entsprechenden Wirtsameisennests in die Ameisenbeobachtungsstation gesetzt. Der Käfer wurde die meiste Zeit von den Ameisen ignoriert; gelegentlich kam es jedoch zu Interaktionen zwischen einer Ameise und dem Käfer, bei dieser die Ameise den *Stenus* mit den Antennen heftig betrillerte und dieser sogleich das Abdomen in Richtung des Ameisenkopfes streckte. Daraufhin ließ die Ameise sofort vom Käfer ab, der sodann Secretion grooming zeigte. Jedoch konnte der Käfer diese vermeintlichen Attacken der Ameisen nicht sehr lange abwehren. Nach etwa einer Stunde wurde der Käfer von einer größeren Arbeiterin mit den Mandibeln am Thorax gepackt und sogleich in zwei Teile zerbissen. Der Versuch konnte nur einmal durchgeführt werden, da nur ein Exemplar von *Stenus* dafür zur Verfügung stand.



**Abbildung 18:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) der GC-MS-Messung des Pygidialdrüsensekretes von *S. aterrimus* aus einem Nest von *F. pratensis* aus Trampe; im Sekret konnten die Naturstoffe Stenusin (1; RT=10,310 min und 10,420 min) und Norstenusin (2) und das Terpen  $\alpha$ -Pinen (5) eindeutig bestätigt werden (siehe Beschriftung); die Peaks mit den Retentionszeiten von 7,636 min und 10,840 min stellen die Peaks der vermuteten Substanzen D-Limonen bzw. 3-(2-Methylbutyl)-pyridin dar. Leider konnte nicht ermittelt werden, um welche Verbindungen es sich hierbei wirklich handelt. Alle anderen mit RTs beschrifteten Peaks bezeichnen wahrscheinlich langkettige Kohlenwasserstoffe, die jedoch in keinem Verhältnis mit dem Kohlenwasserstoffprofil der Wirtsameisen stehen. Es gibt aktuell keine Erklärung für die Anwesenheit dieser Verbindungen im Sekret dieses Tieres.

### 3.3 Die Spreitung der Steninae

#### 3.3.1 Das Spreitungsvermögen verschiedener *Stenus*-Arten

Wie bereits in Kapitel 2.10.1 erklärt, wurde nach dem Sammeln der Steninae zuerst die Spreitungsfähigkeit der Tiere getestet. In der folgenden Tab. 8 sind die Ergebnisse dieser Vorversuche mit Aspekten des Drüseninventars zusammengefasst. Daneben sind die Tiere zur besseren Übersicht in die entsprechenden „Untergattungen“ nach

PUTHZ (2001, 2008) unterteilt. <sup>1</sup>

**Tabelle 8:** Das Spreitungsvermögen der untersuchten Steninae

Art	Untergattung	1	2	3	4	5	6	7	Spreitfähigkeit
<i>S. bifoveolatus</i> Gyllenhal 1827 <sup>a</sup>	<i>Metatesnus</i>	++	++	-	-	-	+	-	bestätigt
<i>S. biguttatus</i> Linnaeus 1758 <sup>a</sup>	<i>Stenus</i>	++	++	-	-	+	+	+	bestätigt
<i>S. bimaculatus</i> Gyllenhal 1810 <sup>a</sup>	<i>Stenus</i>	++	+	-	-	+	+	-	bestätigt <sup>c</sup>
<i>S. binotatus</i> Ljungh 1804 <sup>a</sup>	<i>Metatesnus</i>	+	+	++	+	-	-	-	bestätigt
<i>S. boops</i> Ljungh 1804 <sup>b</sup>	<i>Stenus</i>	++	+	-	-	+	+	-	nicht bestätigt
<i>S. cicindeloides</i> Schaller 1783 <sup>b</sup>	<i>Hypostenus</i>	+	+	+	+	-	-	-	bestätigt
<i>S. circularis</i> Gravenhorst 1806 <sup>b</sup>	<i>Stenus</i>	++	++	-	-	+	+	-	nicht bestätigt
<i>S. clavicornis</i> Scopoli 1763	<i>Stenus</i>	++	+	-	-	+	+	-	nicht bestätigt
<i>S. comma</i> LeConte 1863 <sup>a</sup>	<i>Stenus</i>	++	+	-	-	+	++	+	bestätigt
<i>S. flavipalpis</i> Thomas 1860 <sup>a</sup>	<i>Hemistenus</i>	++	+	-	-	+	-	-	nicht bestätigt
<i>S. flavipes</i> Stephens 1833 <sup>a</sup>	<i>Metatesnus</i>	++	-	-	-	-	-	-	bestätigt
<i>S. fossulatus</i> Erichson 1840 <sup>b</sup>	<i>Stenus</i>	++	+	-	-	+	+	-	bestätigt <sup>c</sup>
<i>S. fulvicornis</i> Stephens 1833 <sup>a</sup>	<i>Hypostenus</i>	++	+	-	-	-	+	-	bestätigt
<i>S. guttula</i> Müller 1821	<i>Stenus</i>	++	+	-	-	-	-	-	bestätigt
<i>S. humilis</i> Erichson 1839 <sup>a</sup>	<i>Stenus</i>	++	+	-	-	+	-	-	nicht bestätigt
<i>S. impressus</i> Germar 1824 <sup>b</sup>	<i>Hemistenus</i>	++	+	-	-	+	+	-	nicht bestätigt

<sup>1</sup> Anmerkung zur Publikation von LANG et al. (2012): in der Publikation ist die Rede von *S. stigmula*; nach der Veröffentlichung stellte sich heraus, dass es sich hierbei um den sehr ähnlich erscheinenden *S. guttula* handelt und ein Bestimmungsfehler unterlaufen ist.

Tabelle 8 – Fortsetzung der Tabelle der vorherigen Seite

Art	Untergattung	1	2	3	4	5	6	7	Spreitfähigkeit
<i>S. juno</i> Paykull 1800 <sup>a</sup>	<i>Stenus</i>	++	+	-	-	-	+	-	nicht bestätigt
<i>S. latifrons</i> Erichson 1839 <sup>a</sup>	<i>Hypostenus</i>	++	+	-	-	-	+	-	bestätigt
<i>S. melanarius</i> Stephens 1833 <sup>b</sup>	<i>Stenus</i>	++	+	-	-	-	-	-	nicht bestätigt
<i>S. nitidiusculus</i> Stephens 1833 <sup>a</sup>	<i>Metatesnus</i>	++	+	-	-	-	+	-	bestätigt <sup>c</sup>
<i>S. picipes</i> Stephens 1833 <sup>b</sup>	<i>Metatesnus</i>	++	+	-	-	+	+	-	bestätigt
<i>S. providus</i> Erichson 1839 <sup>b</sup>	<i>Stenus</i>	++	+	-	-	+	+	-	nicht bestätigt
<i>S. pubescens</i> Stephens 1833 <sup>a</sup>	<i>Metatesnus</i>	++	+	+	-	-	-	-	bestätigt <sup>c</sup>
<i>S. similis</i> Herbst 1784 <sup>a</sup>	<i>Hypostenus</i>	++	+	++	-	+	+	-	bestätigt
<i>S. solutus</i> Erichson 1840 <sup>a</sup>	<i>Hypostenus</i>	++	+	++	+	+	+	-	bestätigt
<i>S. tarsalis</i> Ljungh 1804 <sup>a</sup>	<i>Hypostenus</i>	++	+	++	-	-	-	-	bestätigt
<i>D. coerulescens</i> Gyllenhal 1810 <sup>a</sup>	Gattung <i>Dianous</i>	++	+	-	-	+	+	-	bestätigt

Legende: ++ große Menge der Substanz im Sekret vorhanden; + Substanz vorhanden; - Substanz nicht vorhanden; 1=Stenusin; 2=Norstenusin; 3=3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin; 4=Cicindeloïn; 5= $\alpha$ -Pinen; 6=1,8-Cineol, 7=6-Methyl-5-hepten-2-on;

<sup>a</sup>Untersucht von SCHIERLING et al. (2013)

<sup>b</sup>Untersucht von LUSEBRINK (2007)

<sup>c</sup>Spreitvermögen von BETZ (1999) bestätigt

### 3.3.2 Das Spreitungsverhalten und die Spreitungsgeschwindigkeiten der untersuchten Steninae

Zehn der in Tabelle 8 aufgelisteten *Stenus*-Arten wurden zur statistischen Auswertung der Spreitungsgeschwindigkeiten und näherer ethologischer Untersuchung des Verhaltens während des Spreitens herangezogen. Um eine möglichst hohe Stichprobengröße zu erhalten, konnten nur diejenigen Arten getestet werden, die in größerer

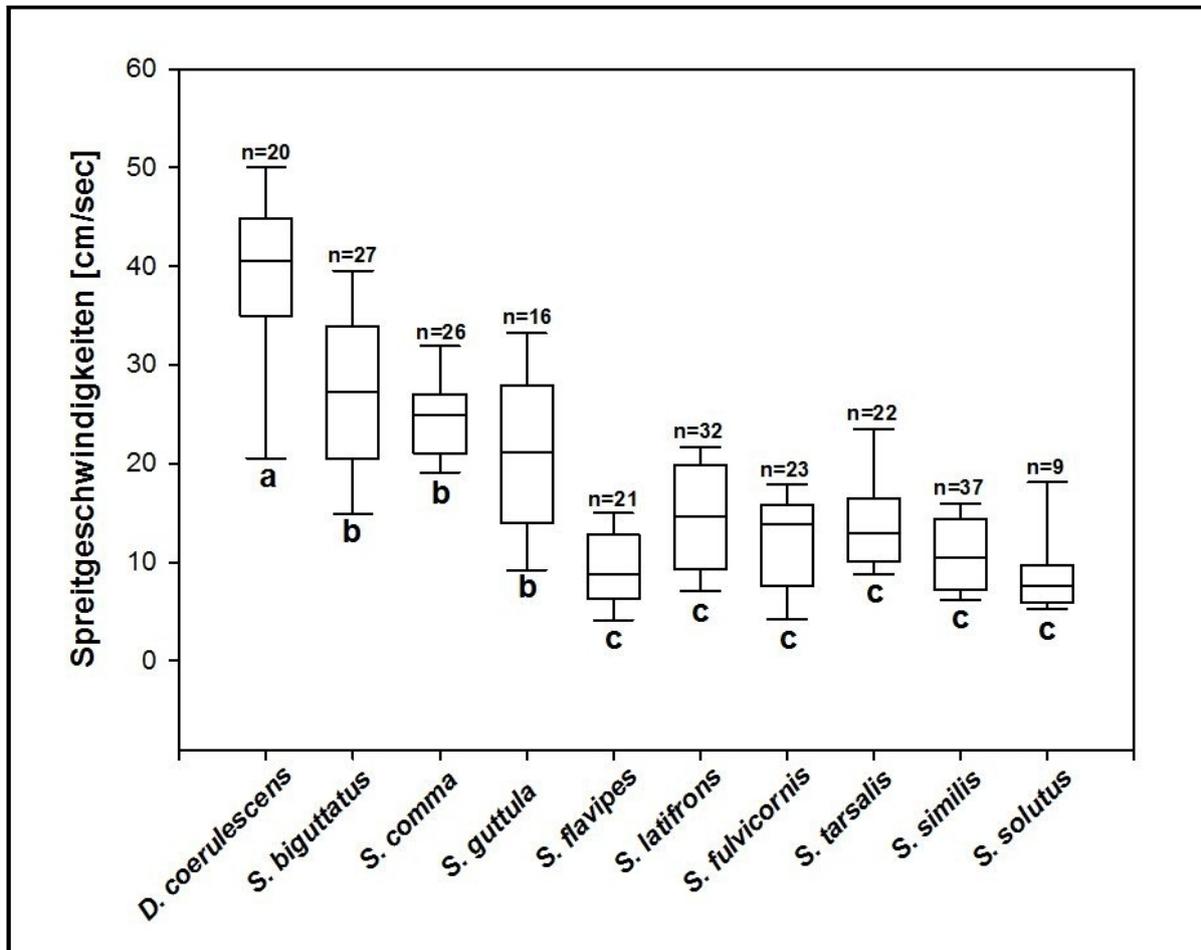
Zahl aus dem Freiland beschaffbar waren oder sich sehr effektiv im Labor durch Zucht vermehren ließen. Letzteres traf v. a. auf den aus dem Schwarzwald stammenden *S. guttula* zu. Während der Spreittests stellte sich heraus, dass das Spreitverhalten artspezifisch und durch verschiedene Charakteristika unterscheidbar ist. Manche Arten spreiteten stets freiwillig und mit kontinuierlich hoher Geschwindigkeit zielstrebig zum sicheren Rand der Wasserschale, wohingegen sich andere Arten eher schrittweise in Sicherheit brachten, wohl aufgrund diskontinuierlicher Sekretabgabe. Einige Arten mussten durch Versenken des Korkschwimmers zum Spreiten gezwungen werden, um aussagekräftige Geschwindigkeitswerte zu erhalten. In der folgenden Tabelle 9 sind die ethologischen Beobachtungen der Spreittests bei diversen Vertretern der Steninae zusammengefasst.

**Tabelle 9:** Ethologische Charakteristika des Spreitungsverhaltens der untersuchten Steninae

<b>Käferart</b>	<b>Spreitungsverhalten</b>
<i>D. coerulea</i>	spreitete stets freiwillig mit höchsten Geschwindigkeiten; spreitete immer geradeaus („lineares Spreiten“) mit kontinuierlicher Sekretabgabe;
<i>S. biguttatus</i> <i>S. comma</i> <i>S. guttula</i>	spreiteten stets freiwillig mit hohen Geschwindigkeiten; lineares Spreiten mit kontinuierlicher Sekretabgabe;
<i>S. flavipes</i>	spreitete nicht immer freiwillig und nicht linear; diskontinuierliche Sekretmission und daher ruckartiges Spreitverhalten; häufig schnelle Drehungen um die eigene Achse beobachtet („zirkuläres Spreiten“);
<i>S. latifrons</i>	spreitete oftmals freiwillig und meistens linear; zwar kontinuierliche Sekretabgabe, dennoch variierten die Geschwindigkeiten zwischen den getesteten Individuen sehr stark;
<i>S. fulvicornis</i>	spreitete nicht immer freiwillig und nicht immer linear; diskontinuierliche Sekretmission und daher ruckartiges Spreitverhalten;
<i>S. tarsalis</i> <i>S. similis</i>	spreiteten stets unfreiwillig, aber linear und vergleichsweise langsam; diskontinuierliche Sekretmission und häufig ein laterales Driften beobachtet;
<i>S. solutus</i>	echtes Spreiten nur selten beobachtet; Käfer spreiteten nie freiwillig und stets sehr langsam; Käfer bevorzugten Schwimmen mit Beinbewegung zum Rand der Schale;

Doch nicht nur das Spreitungsverhalten der Steninae ließ sich eindeutig unterscheiden, sondern auch die gemessenen Spreitungsgeschwindigkeiten der einzelnen Arten (siehe Abb. 19). Generell erreichten Arten, deren Sekretabgabe kontinuierlich war (z. B. bei *D. coerulea*, *S. biguttatus*, *S. comma* und *S. guttula*), höhere Geschwindigkeiten während des Spreitens als jene, deren Sekretmission diskontinuierlich ablief (z. B. bei *S. flavipes*, *S. fulvicornis* und *S. tarsalis*). Daneben wurden die gemessenen

Spreitungsgeschwindigkeiten statistisch untersucht. Zwischen den zehn getesteten Arten konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden (Kruskal-Wallis-H-Test; H (Freiheitsgrade=9; n=233)=144,67;  $p < 0,001$ ). Auch die post-hoc-Berechnungen (Tukey-Kramer-Test) lieferten oftmals hochsignifikante Unterschiede zwischen einigen Arten (siehe Kleinbuchstaben in Abb. 19).



**Abbildung 19:** Spreitungsgeschwindigkeiten der neun untersuchten *Stenus*-Arten und *D. coerulea*; die Boxplots sind mit dem Median und entsprechenden Standardabweichungsbalken dargestellt. *D. coerulea* zeigte die höchste Spreitungsgeschwindigkeit, gefolgt von *S. biguttatus*, *S. comma* und *S. guttula*. Das Spreitungsverhalten der restlichen analysierten Arten kann nicht statistisch signifikant unterschieden werden. Die Kleinbuchstaben a, b und c verweisen auf signifikante Unterschiede basierend auf errechneten p-Werten. In Tabelle 14 im Anhang sind die einzelnen p-Werte aufgelistet.

## 3.3.3 Die Spreitungsdrücke der Drüsenverbindungen

Neben ethologischen Untersuchungen spreitender *Stenus*-Arten interessierten auch physikochemische Eigenschaften der einzelnen Drüsenverbindungen, die die Käfer überhaupt erst zu dieser außergewöhnlichen Fortbewegung auf dem Wasser befähigen. Zur Messung der Spreitungsdrücke am Tensiometer wurde pro Drüsenverbindung (1-7), wie in Kapitel 2.10.2 beschrieben, eine wässrige, übersättigte Lösung hergestellt. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Messungen zusammengefasst. Es sind deutliche Unterschiede, die Drücke der einzelnen Lösungen betreffend, zu erkennen. Die meisten Substanzen zeigten eine hohe Oberflächenaktivität. Die Terpenverbindung  $\alpha$ -Pinen (5) ist nach 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin (3), Norstenusin (2), Stenusin (1) und 6-Methyl-5-hepten-2-on (7) durch den höchsten Spreitungsdruck charakterisiert, während Cicindeloin (4) und 1,8-Cineol (6) am wenigsten oberflächenaktiv sind.

**Tabelle 10:** Spreitungsdrücke der am Tensiometer gemessenen Drüsenverbindungen 1-7

Substanznummer	Spreitungsdruck (30° C)[mN/m]	Spreitungsdruck (19° C)[dyn/cm]
1	15,89	36,3
2	17,90	-
3	22,22	-
4	4,27 <sup>a</sup>	-
5	24,17	-
6	9,88	29,2
7	15,63	32,4

Die gezeigten Werte stellen Mittelwerte einer dreimaligen Messung dar; die Einheit dyn/cm entspricht der Einheit mN/m; 1=Stenusin; 2=Norstenusin; 3=3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin; 4=Cicindeloin; 5= $\alpha$ -Pinen; 6=1,8-Cineol, 7=6-Methyl-5-hepten-2-on; - nicht von SCHILD-KNECHT et al. (1975) gemessen;

<sup>a</sup> unter Vorbehalt aufgrund der harzigen Konsistenz und der geringen Wasserlöslichkeit von 4 zu betrachten

Nicht nur die Spreitungsdrücke der Einzelverbindungen des *Stenus*-Sekretes wurden am Tensiometer ermittelt, sondern auch die Spreitungsdrücke naturidentischer Sekretkompositionen. Hierzu wurden vier verschiedene *Stenus*-Arten aufgrund ihres Drüseninventars ausgewählt, die als Vertreter unterschiedlicher Gruppen fungierten. Die folgenden qualitativen und quantitativen spurenanalytischen Ergebnisse wurden per GC-MS erhalten (n=10 Tiere pro *Stenus*-Art). *S. clavicornis* repräsentiert die Gruppe der sog. „Nicht-Spreiter“, die zwar oberflächenaktive Substanzen in ihren Pygidialdrüsen besitzen, jedoch kein Spreitungsverhalten zeigten. Darüber hinaus gehört *S. clavicornis* zur sog. Piperidin-Gruppe (SCHIERLING et al., 2013), deren Vertreter eine Sekretkomposition auf der Basis von Verbindung 1 besitzen. Daneben findet sich eine

geringe Menge der Verbindungen **2** und **6**. Die Terpenverbindung **5** erscheint lediglich als nicht-quantifizierbare Spurenkomponente. *S. comma* ist ebenfalls der Piperidin-Gruppe zuzuordnen. Diese Art spreitete im Rahmen der Test stets freiwillig und mit hoher Geschwindigkeit (siehe Tab. 9). Auch diese Art besitzt eine Sekretkomposition auf Substanz **1** basierend, während die numerische Menge von **2** und **6** höher ist als im Sekret von *S. clavicornis*. Die Substanzen **5** und **7** sind ebenfalls nicht quantifizierbar. *S. similis* repräsentiert die sog. Pyridin-Gruppe (SCHIERLING et al., 2013) und war durch moderates Spreiten charakterisiert. Vertreter dieser Gruppe besitzen ebenfalls **1** als Hauptkomponente im Sekret. Darüber hinaus konnten geringe Mengen von **2** und **6** festgestellt werden. Neben **1** nimmt die von Pyridin abgeleitete Verbindung **3** den zweitgrößten Anteil des Gesamtsekretes ein. Die vierte ausgewählte *Stenus*-Art, *S. solutus*, zeigte nur selten richtiges Spreitungsverhalten (vgl. Tab. 9). Die Substanz **1** taucht bei dieser Käferart in so geringer Menge auf, dass diese Verbindung nicht quantifizierbar war. Das Sekret von *S. solutus* setzt sich hauptsächlich aus den Verbindungen **3** und **4** zusammen. *S. solutus* gehört zur sog. Epoxy-piperidein-Gruppe (SCHIERLING et al., 2013). Die Ergebnisse der spurenanalytischen Quantifizierung sind in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11:** Quantitative Komposition [%] der Pygidialdrüsensekrete der vier ausgewählten *Stenus*-Arten

<i>Stenus</i> -Art	1	2	3	4	5	6	7
<i>S. clavicornis</i>	95,9	3,6	-	-	n	0,5	-
<i>S. comma</i> <sup>a</sup>	82,3	12,2	-	-	n	5,5	n
<i>S. similis</i> <sup>a</sup>	73,8	0,8	23,6	-	n	1,8	n
<i>S. solutus</i> <sup>a</sup>	n	-	24,5	75,5	-	-	-

Diese Werte wurden mit Hilfe einer Kalibrierungskurve und anschließender Peakflächenintegration am GC-MS ermittelt

1=Stenusin; 2=Norstenusin; 3=3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin; 4=Cicindeloin; 5= $\alpha$ -Pinen; 6=1,8-Cineol, 7=6-Methyl-5-hepten-2-on; n=Menge nicht quantifizierbar; -=Verbindung nicht in den Drüsen vorhanden;

<sup>a</sup>ermittelt von SCHIERLING et al. (2013)

n=10 Tiere pro *Stenus*-Art

Basierend auf den Resultaten aus Tabelle 11 wurden die naturidentischen Sekrete auf wässriger Basis entsprechend zusammengemischt und deren Spreitungsdrücke am Tensiometer gemessen (Ergebnisse siehe Tab. 12). Die Messungen der Spreitungsdrücke ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den naturidentischen Sekretgemischen der Arten *S. clavicornis*, *S. comma* und *S. similis*. Lediglich die Sekretkomposition von *S. solutus* zeigte die geringste Oberflächenaktivität und damit den geringsten Spreitungsdruck.

**Tabelle 12:** Spreitungsdrücke der künstlich hergestellten naturidentischen Sekretkompositionen der vier ausgewählten *Stenus*-Arten

<i>Stenus</i> -Art	Spreitungsdruck (30° C)[mN/m]
<i>S. clavicornis</i>	20,67
<i>S. comma</i>	19,71
<i>S. similis</i>	20,97
<i>S. solutus</i>	11,19 <sup>a</sup>

Die gezeigten Werte stellen Mittelwerte einer dreimaligen Messung dar;

<sup>a</sup> unter Vorbehalt aufgrund der harzigen Konsistenz und der geringen Wasserlöslichkeit von 4 zu betrachten

### 3.4 Biotests

#### 3.4.1 Spinnenbiotests

Wie bereits in Kapitel 2.11.1 im Material- und Methodenteil ausführlich beschrieben, wurden qualitative Biotests zur möglichen Deterrentwirkung der *Stenus*-Drüsenverbindungen gegenüber Spinnen durchgeführt. Nach dem Sammeln der Spinnen im Freiland wurden diese, wenn möglich, bis zur Art bestimmt. Bei den 27 gefangenen Wolfspinnen handelte es sich ausnahmslos um *Pardosa amenata*, während die 9 Springspinnen der Art *Evarcha arcuata* zuzuordnen waren. Die Vorversuche, bei denen jeweils ein Exemplar eines lebenden *S. comma* in die Spinnenterrarien gesetzt wurde, lieferten bezüglich der Wolfspinnen durchweg positive Ergebnisse. Wenn die ausgehungerten Wolfspinnen das präsentierte Exemplar eines adulten *Stenus* angriffen und gepackt hatten, ließen sie augenblicklich von dem Käfer ab und zeigten ausgiebiges, intensives Putzverhalten ihrer Cheliceren, das mitunter eine halbe Stunde dauern konnte. Der Käfer überstand in allen Fällen diese oftmals wiederholten Attacken völlig unbeschadet. Niemals gelang es einer der Wolfspinnen, einen Käfer zu fressen oder zu verletzen. Die Springspinnen erwiesen sich schon während der Vorversuche nicht als besonders „kooperativ“ und waren wegen ihrer ausgeprägten Sprungaktivität eher schlecht zu „handeln“. Zwar wurden die adulten Steninae auch niemals ein Opfer dieser Spinnen, jedoch konnten auch keine Angriffe auf die potentiellen Beutetiere beobachtet werden. Die Deterrentwirkung des Gesamtsekretes auf der Körperoberfläche des Käfers konnte zweifelsfrei zumindest gegenüber Wolfspinnen der Art *P. amenata* nachgewiesen werden. Eine Negativkontrolle mit in Ethylacetat abgewaschenen Käfern ohne Sekretrückstände auf der Kutikula war nicht möglich, da die Käfer die Prozedur nicht überlebt hätten und somit nicht mehr als Beute für die Spinnen, die nur lebendige Nahrung aufnehmen, in Betracht gekommen wären.

Anders verhielt es sich mit den den Spinnen angebotenen L3-Larven von *S. comma*.

Kaum waren die umherlaufenden Larven von den Wolfspinnen im Terrarium wahrgenommen worden, packten die Spinnen diese mit ihren Cheliceren und begannen sofort, sie zu fressen. Das Verhalten der Springspinnen in diesem Versuch war vergleichbar mit dem innerhalb des Vorversuches mit adulten Vertretern der Steninae. Es konnte keine Aufnahme der Larven durch die Spinnen festgestellt werden.

Nach den Vorversuchen folgten die eigentlichen Biotests mit den vorbereiteten Lösungen, bzw. Emulsionen. Zuerst wurden Testreihen mit in die Testlösungen und -emulsionen getauchten Individuen von *Drosophila melanogaster* wie in Kapitel 2.11.1 beschrieben, durchgeführt. Egal, welche der Testsubstanzen sich auf den Fruchtfliegen befand, die Wolfspinnen ergriffen diese und verzehrten sie augenblicklich. Ebenso verfuhrten die Spinnen mit den Kontrolltieren. Aufgrund dessen wurden die Biotests darüber hinaus auch mit Exemplaren des ersten Larvenstadiums des Schwarzkäfers *Tenebrio molitor* (Mehlwürmer) durchgeführt, welches eine dickere Kutikula besitzt als Fruchtfliegen. Die Vermutung diesbezüglich war, dass die Spinnen, wenn sie größere Mühe hätten, die Kutikula des Testtieres mit ihren Cheliceren zu durchdringen, die Testsubstanzen besser wahrnehmen könnten. Einige der Biotests mit den Schwarzkäferlarven verliefen bei den Wolfspinnen der Erwartung entsprechend; die Spinnen ließen innerhalb von wenigen Sekunden von den umherkriechenden Larven ab, egal welche der sieben Testsubstanzen sich auf den Testtieren befand. Jedoch packten auch einige Exemplare der Wolfspinnen die mit Testlösungen/Testemulsionen bedeckten Schwarzkäferlarven und fraßen diese völlig ungehemmt. Eine statistische Auswertung war aufgrund dieser vielen Ausreißer nicht mehr möglich. Die Springspinnen konnten nicht an die Mehlwürmer als Nahrung gewöhnt werden und wurden deshalb nicht getestet.

#### 3.4.2 Biotests zur topikalen Wirkung der Drüsenverbindungen

Ähnlich wie die Biotests mit den beiden Spinnenarten lieferten auch die Tests zur topikalen Wirkung der sieben authentischen Drüsenverbindungen auf Fliegenmaden von *Calliphora vomitoria* keine statistisch aussagekräftigen Resultate. Zwar war die angewendete Methode mit Chinonverbindungen gut etabliert worden (DETTNER, 1991b), jedoch konnten keine zweifelsfrei eindeutigen Reaktionen der getesteten Maden in Form einer heftigen Krümmung des Körpers unmittelbar nach dem Aufbringen der in DMSO gelösten *Stenus*-Testlösungen erreicht werden. Teilweise kam es innerhalb des Testintervalls von 30 s zu einer leichten Krümmung des Larvenkörpers oder einer Drehung um die eigene Achse; dieses Verhalten stellte aber keine eindeutige Reaktion der Maden auf die Testlösungen dar. Wenn analog zu DETTNER (1991b) Lösungen von Toluchinon in verschiedenen Lösungsmittelgemischen auf die Maden aufgebracht wurden, erfolgte stets eine heftige Krümmungsreaktion der Tiere. Eine mögliche topikale Wirkung der Drüsenverbindungen 1-7 konnte im Rahmen der in

dieser Arbeit durchgeführten Tests nicht bestätigt werden.

### 3.5 Teilprojekte mit eindeutigen Negativergebnissen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden auch Themenbereiche aufgegriffen, deren Bearbeitung und Untersuchung eindeutig negative Ergebnisse lieferten. Der Vollständigkeit halber sollen diese beiden Aspekte an dieser Stelle kurz erwähnt werden.

#### 3.5.1 Nahrungsanalysen

Ein Teilaspekt der vorliegenden Arbeit waren Nahrungsanalysen bei Imagines verschiedener *Stenus*-Arten. Hierzu wurden wie in Kapitel 2.8 erklärt, die Kröpfe von im Freiland gefangenen Tieren vorsichtig aus dem Körper präpariert und deren Inhalt unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Leider konnten im Kropfinhalt keine chitinösen Bestandteile potentieller Beutetiere nachgewiesen werden, aufgrund derer man die Beuteorganismen eindeutig hätte bestimmen können.

#### 3.5.2 Endosymbionten in *Stenus*

Neben den Nahrungsanalysen lieferte auch die Suche nach potentiellen Endosymbionten wie die bei Insekten fast ubiquitär vorkommenden Wolbachien und Rickettsien (WERREN, 1995; COWDRY, 1922) für Steninae ein negatives Ergebnis. Die durchgeführte PCR mit ausgewählten Endosymbionten-spezifischen Primern ergab beispielsweise kein positives Signal für das Vorhandensein von *Rickettsia*- und *Wolbachia*-DNA.

### 3.6 Phylogenetische Analysen der Steninae

#### 3.6.1 Sequenzcharakteristika und Statistik

Die Einzelgensequenzalignments der COI, der 16S rRNA und des Histon H3-Gens bestehend aus jeweils 37 Sequenzen beinhalteten 22 verschiedene Käferarten, welche differenzierte Gruppen bildeten: eine Außengruppe zur Wurzelung der Stammbäume (dargestellt vom Kurzflügler *Euaesthetus ruficapillus*), eine Gruppe mit *Dianous*-Gruppe I-Mitgliedern, eine Gruppe mit *Dianous*-Gruppe II-Mitgliedern, sowie 17 *Stenus*-Arten. Die alinierte Matrix der COI-Sequenzen setzte sich aus 1203 Basenpositionen zusammen, von denen sich 391 als Parsimonie-informativ und 812 als variabel erwiesen. Die alinierte Matrix der 16S rRNA-Sequenzen setzte sich aus 613 Basenpositionen zusammen, von denen sich 232 als Parsimonie-informativ und 381 als variabel erwiesen. Ferner bestand die alinierte Matrix der Histon H3-Sequenzen aus 316 Basenpositionen, von denen sich 96 als Parsimonie-informativ und 220 als variabel erwiesen. Zusätzlich wurden unkorrigierte p-Distanzwerte für verschiedene Gruppierungen berechnet, wie

z.B. für *Stenus*, *Dianous* und chemotaxonomische Gruppen nach SCHIERLING et al. (2013). Bezüglich der alinierten COI-Sequenzmatrix wurde die höchste unkorrigierte p-Distanz innerhalb der Innengruppe (Steninae) mit 16,5 % zwischen *S. tarsalis* und *S. latifrons* festgestellt. Die alinierte 16S rRNA-Sequenzmatrix betreffend, wurde die höchste unkorrigierte p-Distanz innerhalb der Innengruppe (Steninae) mit 40,1 % zwischen *S. similis* und *S. intermedius* festgestellt. Darüber hinaus wurde die höchste unkorrigierte p-Distanz innerhalb der Innengruppe (Steninae) mit 20,2 % zwischen dem kanadischen *S. comma* und *S. canaliculatus* für die alinierte Histon H3-Sequenzmatrix ermittelt. Weitere statistische Ergebnisse und zusätzliche getestete Gruppierungen können Tabelle 13 entnommen werden.

**Tabelle 13:** Für verschiedene Sequenzgruppierungen berechnete unkorrigierte p-Distanzwerte

	Gruppierungen	Gensequenzalignments		
		COI	16S rRNA	Histon H3
Unkorrigierte p-Distanzen [%]	Innerhalb <i>Stenus</i>	12,4	15,0	12,7
	Innerhalb <i>Dianous</i>	10,9	8,2	8,8
	Zwischen <i>Stenus</i> und <i>Dianous</i>	13,3	13,0	14,0
	Innerhalb der Piperidin-Gruppe	12,7	15,5	13,2
	Innerhalb der Pyridin-Gruppe	9,6	7,0	9,6
	Innerhalb der Epoxy-piperidein-Gruppe	8,7	6,5	10,9
	Zwischen Piperidin- und Pyridin-Gruppe	13,8	14,0	12,9
	Zwischen Piperidin- und Epoxy-piperidein-Gruppe	13,1	14,1	12,7
	Zwischen Pyridin- und Epoxy-piperidein-Gruppe	12,9	9,0	9,0

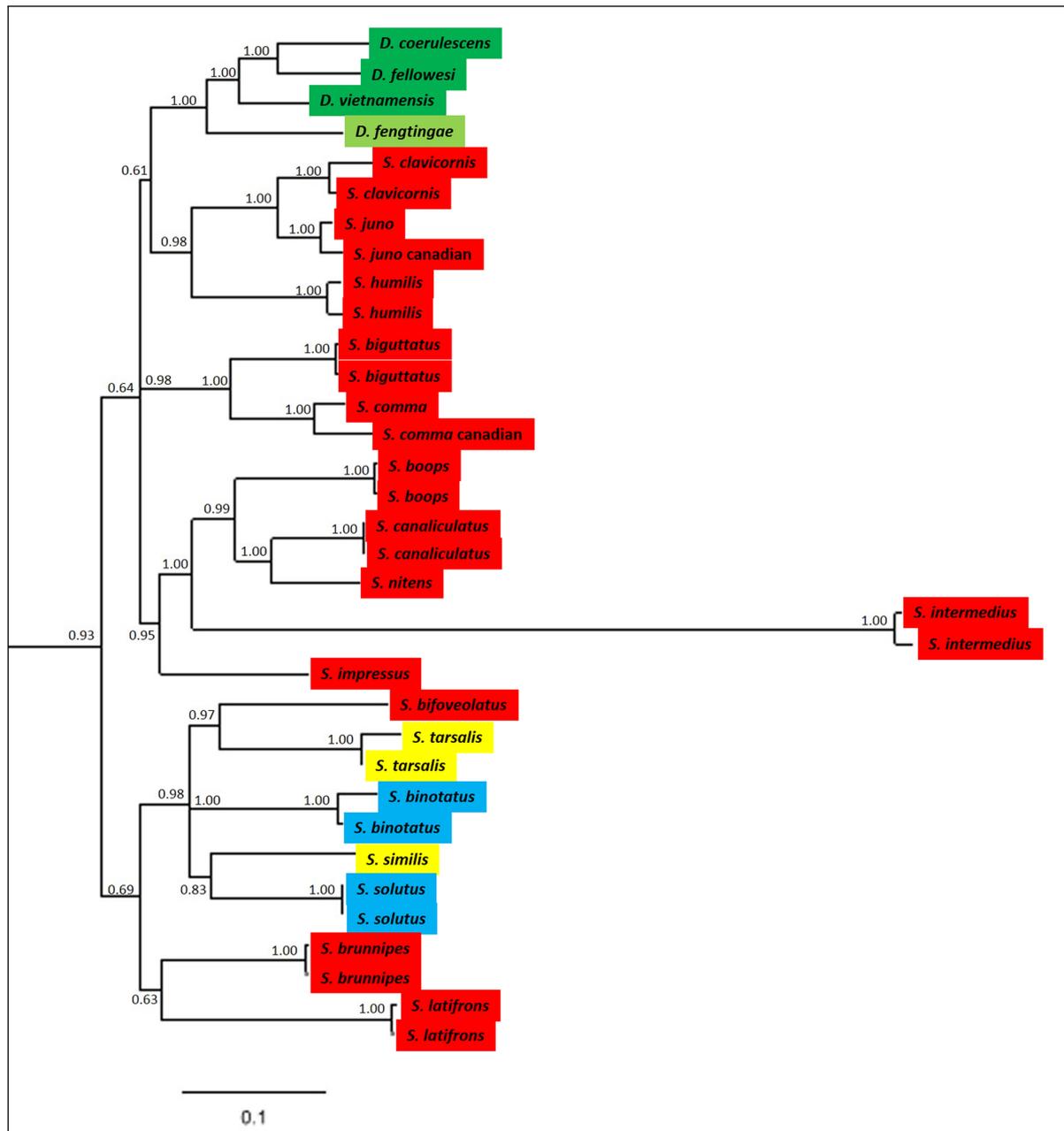
### 3.6.2 Phylogenetische Analysen

Um die Position der Mitglieder chemotaxonomischer Gruppen nach SCHIERLING et al. (2013; Abb. 4) innerhalb phylogenetischer Bäume zu evaluieren, bediente man sich zweier verschiedener Berechnungsalgorithmen, um phylogenetische Verwandtschafts-

beziehungen innerhalb der Gattung *Stenus* und zwischen den Gattungen *Stenus* und *Dianous* zu beurteilen und zu beschreiben. Bäume auf Grundlage des ML-Algorithmus und Bayesianischer Analysen sind konstruiert und miteinander verglichen worden, welche ausschließlich entweder Gensequenzabschnitte der COI, der 16S rRNA oder des Histon H3-Gens enthielten (siehe auch Kapitel 2.12.2). Da sich bezüglich der Position der Mitglieder einzelner chemotaxonomischer Gruppen starke Inkonsistenzen innerhalb der Bäume ergaben, wurden zusätzlich zur Einzelgenanalyse zwei Konsensusbäume je Berechnungsalgorithmus erstellt. Lediglich alle *Dianous*-Arten bildeten Cluster innerhalb der Gattung *Stenus* in allen Einzelgenbäumen. Im Ergebnisteil wird nur der BA-Konsensusbaum gezeigt (siehe Abb. 20), da beide erstellten Konsensusbäume fast exakt die gleiche Topologie, gleiche oder sehr ähnliche Kladenunterstützungswerte und keinerlei Inkonsistenzen bezüglich chemotaxonomischer Aspekte aufwiesen. Innerhalb beider Bäume konnten konsistente Topologien mit hohen BPP- (Bayesian Posterior Probability; BA) und Bootstrapwerten (ML) festgestellt werden.

Alle untersuchten *Dianous*-Arten (sowohl aus Komplex I als auch aus Komplex II) bildeten ein konsistentes Cluster, wobei *Dianous*-Komplex I-Mitglied *D. fengtingae* eine Nachbarposition zu den Komplex II-Mitgliedern *D. coerulescens*, *D. fellowesi* und *D. vietnamensis* einnimmt. Bisher ist *D. coerulescens* die einzige von den oben genannten *Dianous*-Arten, welche bereits spurenanalytisch mittels GC-MS untersucht wurde. *D. coerulescens* besitzt eine auf Stenusin (**1**) basierende Sekretkomposition mit einem beträchtlichen Anteil der Terpene **5** und **6** ( $\alpha$ -Pinen und 1,8-Cineol) in den kleinen Pygidialdrüsenreservoirs (SCHIERLING et al., 2013) und gehört somit zur basalen Piperidin-Gruppe. Alle *Dianous*-Arten nehmen eine phylogenetische Position in direkter Nachbarschaft zu anderen Piperidin-Gruppenmitgliedern der Gattung *Stenus* ein (z.B. *S. clavicornis*, *S. juno* und *S. humilis*). Die meisten Piperidin-Gruppenvertreter bilden Cluster. Folgende Gruppenvertreter bilden Cluster mit hoher BPP-Unterstützung innerhalb des BA-Baumes, z.B. *S. clavicornis*, *S. juno* und *S. humilis* (BPP=0.98), *S. biguttatus* und *S. comma* (BPP=1.00), *S. boops*, *S. canaliculatus*, *S. nitens*, *S. intermedius* und *S. impressus* (BPP=0.95) und schlussendlich *S. brunnipes* und *S. latifrons* (BPP=0.63). Darüber hinaus zeigt *S. intermedius* die höchste Anzahl evolutionärer Veränderungen, welche in langen Astlängen resultieren (siehe Abb. 20).

Bezüglich chemotaxonomischer Aspekte und Pygidialdrüsenmorphologie bilden die beiden Arten mit gut ausgeprägten kleinen Drüsenreservoirs und einem hohen Terpenanteil im Sekret (SCHIERLING et al., 2013), *S. comma* und *S. biguttatus* ein Cluster. Das Untergattungs-Konzept (siehe Kapitel 1.4) wird durch Piperidin-Gruppenmitglieder nicht aufrecht erhalten, da z.B. die *Tesnus*-Art *S. brunnipes* ein Cluster mit der *Hypostenus*-Art *S. latifrons* bildet. Daneben befindet sich *S. impressus* (*Hemistenus*) in einem Cluster mit *S. intermedius* (*Tesnus*, *S. nitens*, *S. canaliculatus* und *S. boops* (Arten der ehemaligen Untergattung *Nestus*, jetzt zu *Stenus* s. str. gehörend;



**Abbildung 20:** BA-Stammbaum auf der Maximum-a-posteriori-Methode basierend (RON-QUIST & HUELSENBECK, 2003); die Zahlen an den Verzweigungen bzw. Ästen des Baumes stellen Bayesische Posteriorwahrscheinlichkeiten (BPP)  $\geq 0.50$  dar. Mitglieder der chemotaxonomischen Gruppen nach SCHIERLING et al. (2013) sind farbig markiert; rot: Piperidin-Gruppe, gelb: Pyridin-Gruppe, blau: Epoxypiperidein-Gruppe; Mitglieder der *Dianous*-Komplexe I und II (PUTHZ, 1981, 2000, 2005; SHI & ZHOU, 2011; TANG et al., 2011) sind grün markiert; die Wurzel des Baumes bestehend aus *E. ruficapillus* ist nicht abgebildet.

PUTHZ, 2008). Nur wenige von PUTHZ (2008) definierte Artengruppen (siehe Tab. 1) werden phylogenetisch unterstützt und bilden jeweils ein Cluster innerhalb des Stammbaumes (BPP=1.00 für beide Cluster), wie z.B. die *S. canaliculatus*-Gruppe, die aus *S. canaliculatus* und *S. nitens* besteht, und die *S. comma*-Gruppe, die die Arten *S. comma* und *S. biguttatus* umfasst.

Die nächst höher evolvierte chemotaxonomische Stufe wird innerhalb des Baumes durch die beiden Arten *S. similis* und *S. tarsalis* verkörpert, welche die chemotaxonomisch abgeleitete Drüsenverbindung 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin (**3**) in ihren Drüsen besitzen (SCHIERLING et al., 2013). Obwohl diese beiden Arten nicht in der selben Klade angesiedelt sind, sind sie doch ein Teil eines größeren Clusters, welches die Arten *S. bifoveolatus*, *S. binotatus* und *S. solutus* umfasst (BPP=0.98). Interessanterweise gehört auch das Piperidin-Gruppenmitglied *S. bifoveolatus* (*Metatesnus*) zu diesem Cluster - bestehend aus Arten, die chemotaxonomisch abgeleitete Verbindungen besitzen. In diesem Fall wird wiederum das bislang praktizierte Untergattungs-Konzept nicht erfüllt: *Hypostenus*-Arten (*S. similis*, *S. tarsalis* und *S. solutus*) formen ein Cluster mit *Metatesnus*-Arten (*S. bifoveolatus* and *S. binotatus*).

Die am höchsten evolvierte chemotaxonomische Stufe wird durch die Epoxy-piperidein-Gruppe repräsentiert, welche innerhalb des konstruierten Baumes durch die Arten *S. binotatus* und *S. solutus* vertreten wird. Wie bereits erwähnt, haben diese Arten das Pygidialdrüsenverbindungsrepertoire durch das neue Alkaloid Cicindeloin (**4**) als Hauptkomponente erweitert (SCHIERLING et al., 2013). Die Alkaloide **1** und **2** werden vollständig durch die Verbindungen **3** und **4** ersetzt (siehe Abb. 2). Im erstellten Baum ist *S. solutus* in direkter Nachbarschaft zum Pyridin-Gruppenmitglied *S. similis* positioniert, welches zwar auch die chemotaxonomisch abgeleitete Verbindung **3** aufweist, dem jedoch die am höchsten evolvierte Verbindung **4** in den Drüsen völlig fehlt. Die Artengruppen von PUTHZ (2008) betreffend, wird nur die *S. similis*-Gruppe bestehend aus *S. similis* und *S. solutus* unterstützt (BPP=0.83). Das weitere Epoxy-piperidein-Gruppenmitglied *S. binotatus* nimmt eine isolierte Position bezüglich *S. solutus* innerhalb eines größeren Clusters mit sowohl chemotaxonomisch abgeleiteten als auch am höchsten evolvierten Arten ein. Jedoch zeigen alle *Stenus*-Arten, die chemotaxonomisch evolvierte Drüsenverbindungen besitzen, eine enge Verwandtschaft innerhalb des erstellten Baumes (siehe Abb. 20).

## 4 Diskussion

Dieses Kapitel dient der Interpretation und Diskussion der im Ergebnisteil präsentierten Daten und Ergebnisse. Hier wird auf Übereinstimmungen der gefundenen Resultate mit der Literatur und etwaige aufgetretene Probleme eingegangen, die von den Literaturangaben abweichende Ergebnisse lieferten.

### 4.1 Die Larven der Steninae

#### 4.1.1 Die Entwicklung der Steninae

Um weitere Erkenntnisse über die Lebensweise und Physiologie von *Stenus*-Larven zu erhalten, wurden einige *Stenus*-Arten unter Laborbedingungen gezielt vermehrt (siehe Kapitel 3.1.1). Bisher haben sich nur einige wenige Untersuchungen mit der Reproduktion und den daraus resultierenden Larven der Steninae befasst (LARSEN, 1959; 1963; WEINREICH, 1968; BETZ & FUHRMANN, 2001). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zur Vermehrung und Entwicklung verschiedener *Stenus*-Arten unter Laborbedingungen sind im Einklang mit den hierzu erfassten Daten von BETZ & FUHRMANN (2001). Es konnten wie von BETZ (1999) beschrieben, ebenfalls zwei Kopulationspositionen beobachtet werden: die *Metatesnus*-Art *S. latifrons* beispielsweise vollzieht die Kopula hintereinander mit den Abdominalspitzen einander zugewandt, während *S. comma* *Stenus s. str.* bei der Kopulation übereinander sitzt (BETZ, 1999; siehe Kapitel 3.1.1). Ebenfalls konnten zwei verschiedene Eiablagestrategien von im Labor gehaltenen Imagines festgestellt werden (BETZ & FUHRMANN, 2001); die Eier wurden entweder in kleinen Häufchen (*S. juno*, *S. comma*, *S. bimaculatus*; „Cluster“; BETZ & FUHRMANN, 2001) in Verstecken (beispielsweise unter Rindenstückchen) abgelegt oder einzeln in Rillen des Gipsbodens (*S. latifrons*). Binnen drei Wochen war die Entwicklung der Steninae unter Laborbedingungen abgeschlossen. BETZ & FUHRMANN (2001) berichteten von einer etwa vierwöchigen Entwicklungsphase bei *S. comma*, *S. juno* und *S. pubescens*; diese Abweichung könnte durch die konstant höhere Temperatur, die bei der vorliegenden Arbeit in der Klimakammer herrschte, erklärt werden (durchgehend bei 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit 20 °C; bei BETZ & FUHRMANN (2001): 18 °C während des simulierten Tages, 10 °C während der simulierten Nacht). Die meisten mitteleuropäischen Steninae reproduzieren während der Vegetationsperiode, wohingegen einige wenige Arten in den Wintermonaten zur Fortpflanzung schreiten (wie z. B. *S. impressus*, eine Spezies, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erfolgreich vermehrt werden konnte; LARSEN, 1959). Aufgrund dessen wäre es möglich, dass einige *Stenus*-Arten nicht unter den gegebenen Laborbedingungen vermehrt werden konnten. Vielleicht spielen hierbei aber auch

andere Faktoren oder Parameter wie z. B. die Ausstattung der Haltungsgefäße der Imagines oder der Sammelzeitpunkt im Freiland eine Rolle. Im Zusammenhang von Eiablagestrategie und Lebensweise der Imagines, bzw. ihrer Larven und den von den verschiedenen *Stenus*-Arten besiedelten Biotoptypen ergibt sich nach BETZ & FUHRMANN (2001) ein weiterer interessanter Aspekt: wie schon in anderen Untersuchungen, beispielsweise das Spreitungsverhalten betreffend (LANG et al., 2012), gezeigt, besteht auch bei der Reproduktion und der Lebensweise der Larven eine Korrelation mit dem gewählten Habitattyp der entsprechenden Imagines. Laut BETZ (1998a; b; 1999) ergeben sich für *Stenus* drei Lebensformtypen: Tiere, die Pionierstätten mit wenig Pflanzenbewuchs bewohnen und sich schnell im offenen Gelände fortbewegen, Tiere, die Detritus bewohnen und Tiere, die in der dichten Vegetation herumklettern. Die Larven der Pionierarten wie beispielsweise *S. comma* bewegten sich ebenfalls behände in der Zuchtschale umher und jagten aktiv den angebotenen Springschwänzen hinterher. Die Larven der beiden anderen Lebensformtypen wie z. B. *S. latifrons* verweilten nahezu lethargisch in ihren Verstecken und verließen sich beim Beutefang ganz auf ihre klebrige Körperbehaarung. Diese Beobachtungen decken sich mit den von BETZ & FUHRMANN (2001) berichteten und geben weitere Hinweise auf die immense Anpassungsfähigkeit der Steninae resultierend in von den Käfern überaus mannigfaltigen bewohnten Biotoptypen.

#### 4.1.2 Die Klebehaare der Larven

Neben den Lebensdaten der Larven war auch die prominente Larvalbehaarung der *Stenus*-Larven Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Mittels REM- und TEM-Aufnahmen wurde die Morphologie der Larvenhaare eingehend untersucht. Es konnten verschiedene Haartypen festgestellt werden: Haare, auf deren Oberfläche kleinere Härchen aufgelagert waren, die sich deutlich von der Haaroberfläche abheben; Haare, die von sich wenig von der Oberfläche abhebenden kleinsten Härchen besetzt sind und glatte große Haare, die mitunter einen inneren Hohlraum aufweisen und bisweilen an der Spitze eine kanülenartige Einkerbung besitzen (siehe Abb. 7). Verschiedenste Arten von Haaren auf der Körperoberfläche sind bei Insekten und deren Larven weit verbreitet, wie z. B. bei den Larven der Lepidopteren, die unterschiedliche Haartypen zur Abwehr aufweisen: Spiegelhaare, Giftdornen, Ballonhaare und Bürstenhaare (WEIDNER, 1936; KAWAMOTO & KUMADA, 1984; DETTNER, 2003). Diese Haartypen werden je nach Morphologie zur Abwehr von Prädatoren durch gezieltes Abschießen der Haare (Bürsten- oder Spiegelhaare) oder der Freisetzung von Gift bei Berührung der Raupe (Giftdornen und Ballonhaare) eingesetzt; oftmals sind auch die abgeschossenen Spiegelhaare mit giftigen Verbindungen gefüllt (DETTNER, 2003). Neben diesen überwiegend mit Giften assoziierten Haaren gibt es auch sog. Sekrethaare, welche klebrige und bisweilen giftige Verbindungen absondern und somit ebenfalls der Abwehr

potentieller Prädatoren dienen. Diese speziellen Haare treten bei Larven/Nymphen der Tingidae, Berytidae und Reduviidae auf (DETTNER, 2003; WEIRAUCH, 2006). Da die Larvalbehaarung der Steninae eine andere Morphologie als die zur Abwehr entwickelten Haare beispielsweise der Lepidopteren aufweist, scheidet der Einsatz der Larvalhaare zur Verteidigung wohl eher aus. Wie bereits erwähnt (siehe Kapitel 3.1.1), unterstützen die verschieden ausgestalteten Haare die *Stenus*-Larven beim Beutefang, da die Entwicklungsstadien der Steninae (L1-L3) keinen Klebfangapparat wie die Imagines besitzen. Die den Larven in der Aufzuchtsschale angebotenen Springschwänze (*Folsomia candida*) hafteten an den Klebhaaren der Larven und standen unmittelbar zur Nahrungsaufnahme bereit. Auch bei der Heteropteren-Art *Zelus luridus* (Heteroptera, Reduviidae, Harpactorinae) haben sich Klebhaare zum Beutefang entwickelt, welche an den Tibien lokalisiert sind (WEIRAUCH, 2006). Bei einigen Harpactorini werden die klebrigen Substanzen vom Insekt selbst synthetisiert (BARTH, 1952; EDWARDS, 1966), das erste Larvenstadium von *Zelus luridus* gewinnt die für den Beutefang essentiellen Klebesubstanzen über die Eierschale vom Muttertier bereitgestellt durch Absammeln derer (WEIRAUCH, 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte für *Stenus*-Larven kein Hinweis auf dieses Szenario gefunden werden; sobald die L1-Larve die Eierschale verlassen hatte, war diese für das Tier bedeutungslos. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die Klebstoffverbindungen von der Larve *de novo* selbst synthetisiert werden könnten. Die Nymphen von *Zelus luridus* zeichnen sich durch den Besitz verschiedener Haartypen aus: zumeist sind sog. sonnentauartige Setae mit Klebstoff assoziiert; es treten aber auch dübelartige und einfache Setae, sowie Invaginationen der Kutikula auf (WEIRAUCH, 2006). Im Vergleich der Haartypen von *Zelus luridus*-Nymphen mit denen der *Stenus*-Larven ergeben sich jedoch auffällige Unterschiede. Lediglich die einfachen Setae der Wanzennymphen zeigen Ähnlichkeiten zu den Haaren der *Stenus*-Larven. Abgesehen vom Beutefang könnte die Larvalbehaarung des Steninae auch der Tarnung der lichtempfindlichen und sonst ungeschützten Larven dienen. Während der Aufzucht der Larven konnte bisweilen festgestellt werden, dass kleine Erdkrümel, die sich in den Aufzuchtsschalen befanden, an den Körperhaaren der Larven hafteten. Dieser Umstand könnte einen Hinweis auf sog. „aktive Tarnung“ durch an Leim am Insektenkörper haftende Substratstückchen, wie z. B. bei den Larven des Ameisenlöwen, geben (DETTNER, 2003). Neben dem bereits erwähnten Beutefang könnte der mannigfaltigen Körperbehaarung eine weitere Aufgabe zukommen: da die Larven an der dorsalen Seite der Abdominalspitze ein paar sehr langer Haare besitzen (siehe Abb. 6), könnten diese und andere längere Haare auf der Körperoberfläche der Larven als Mechanorezeptoren zur Orientierung im interstitiellen Raum oder zum Aufspüren potentieller Beutetiere dienen (BAUER, 1982). Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass *Stenus*-Larven lediglich primitive Ocellen anstatt der hoch entwickelten Komplexaugen der Imagines besitzen und somit der optische Sinn für den Beutefang nicht relevant sein kann. Ähnlich wie die von BAUER (1982) unter-

suchten Laufkäferlarven *Notiophilus biguttatus* (Coleoptera: Carabidae) leben auch die Larven der Steninae höchstwahrscheinlich im Genist oder Interstitium im selben Lebensraum wie ihre Hauptbeute, die Collembolen. Da die Larven von *Notiophilus biguttatus* und *Stenus*-Larven einen ähnlichen Körperbau, sowie andere ähnliche physiologische Charakteristika wie schwache Augen und sehr gut ausgeprägte, kräftige Mandibeln zum aktiven Packen der Springschwänze aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass auch die Larven der Steninae eine vergleichbare Lebensweise wie die Larven von *Notiophilus biguttatus* mit einer aktiven Beutesuche im Genist bevorzugen und sich beim Beutefang nicht nur auf ihre effektiven Klebehaare verlassen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte leider nicht eindeutig geklärt werden, ob sekretorische Zellen unterhalb der Kutikula mit den vermeintlichen Sekrethaaren assoziiert sind und aus welcher/-n chemische(n) Verbindung(en) die klebrige Substanz bei *Stenus*-Larven besteht.

#### 4.1.3 Spurenanalytische Untersuchung der Entwicklungsstadien

Neben der Untersuchung physiologischer Charakteristika der im Labor gezüchteten *Stenus*-Larven mittels verschiedener Mikroskopietechniken waren auch spurenanalytische Untersuchungen der Larven verschiedener *Stenus*-Arten mit Hilfe des GC-MS von Bedeutung für die vorliegende Arbeit. Hierzu wurden sowohl Oberflächen- also auch Ganzkörperextrakte aller Entwicklungsstadien angefertigt. Wie bereits in Kapitel 3.1.3 erwähnt, beinhaltete nur ein Ganzkörperextrakt mehrerer L1-Larven von *S. clavicornis* eine vermeintliche Spur von Stenusin (**1**). Da Verbindung **1** eine wesentliche Komponente des Wehrsekretes vieler adulter Steninae darstellt (SCHIERLING et al., 2013) und die Larven definitiv keine Pygidial- oder vergleichbare Drüsensysteme zur Synthese der Abwehrverbindungen wie die Imagines besitzen, wäre es sinnvoll, dass das Muttertier das multifunktionale Wehrsekret auf die Nachkommen überträgt, um diese von verschiedenen Bedrohungen, wie z. B. Besiedelung durch Mikroorganismen oder Prädation zu schützen (DETTNER, 1987; SCHIERLING et al., 2013; SCHIERLING & DETTNER, 2013; BETZ, 1999; LUSEBRINK, 2007; LUSEBRINK et al., 2008b). Hierbei wäre ein ähnliches Szenario wie z. B. bei den canthariphilen Käfern der Familien der Pyrochroidae und Anthicidae möglich, wobei das Gift Cantharidin vom Weibchen schon in die Eier eingebaut wird, um diese vor Fraß durch Prädatoren zu schützen (EISNER et al., 1996). Jedoch beinhalteten die Komplettextrakte der Eier verschiedener *Stenus*-Arten keine Wehrsekretverbindungen der Imagines. Da Verbindung **1** nur in einem einzigen Extrakt von *Stenus*-Larven nachgewiesen werden konnte, scheint das oben geschilderte Szenario wohl auszuschließen. Es liegt die Vermutung nahe, dass trotz sauberem Arbeitens möglicherweise bereits der gewonnene Extrakt durch Spuren von **1** „verunreinigt“ war und somit im Extrakt in geringen Mengen nachgewiesen werden konnte. Wie bereits mehrmals in der vorliegenden Arbeit angemerkt, scheinen

*Stenus*-Larven aufgrund ihrer extremen Lichtempfindlichkeit Interstitien als Lebensraum zu bevorzugen; es erscheint daher plausibel, dass sich die Larven eher durch ihre kryptische Lebensweise als durch flüchtige chemische Verbindungen vor potentiellen Prädatoren schützen.

## 4.2 Spurenanalytische Untersuchungen weiterer *Steninae*

### 4.2.1 Spurenanalytische Untersuchungen weiterer *Stenus*- und *Dianous*-Arten

Die Pygidialdrüsensekrete weiterer *Stenus*- und einiger *Dianous*-Arten, die bisher noch nicht spurenanalytischen Untersuchungen unterzogen wurden, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls mittels GC-MS analysiert. Es konnten in den Sekretextrakten der Arten *S. guttula*, *S. longipes*, *S. biguttatus* aus Italien und *S. argus*, sowie der *Dianous*-Arten *D. betzi*, *D. obliquenotatus* und *D. karen* aus Thailand weder noch unbekannte Naturstoffe noch neue Biosynthesestufen festgestellt werden. Die meisten Käfersekrete beinhalten die Alkaloide Stenusin (1) und Norstenusin (2) (*S. longipes*, *S. biguttatus* aus Italien, *S. argus*, *D. betzi*, *D. obliquenotatus* und *D. karen*), sowie das Terpen 1,8-Cineol (6; *S. longipes*). Bei *S. guttula* konnte nur die Verbindung 1 nachgewiesen werden. Lediglich das Sekret des italienischen Vertreters von *S. biguttatus* schien eine vom von *Stenus biguttatus* bekannten Terpen 6-Methyl-5-hepten-2-on (7) geringfügig abweichende Verbindung zu enthalten. Hierbei könnte es sich um das gleiche Terpen mit anderer Doppelbindungsposition handeln (SEIFERT, pers. com.; siehe Abb. 12). Es ist nicht ungewöhnlich, dass die gleiche *Stenus*-Art je nach geographischer Herkunft Abweichungen bezüglich des Sekretes aufweisen kann. So hat LUSEBRINK (2007) festgestellt, dass kanadische Vertreter von *S. comma* durchweg ein anderes artspezifisches Enantiomerenverhältnis der Verbindung 1 aufweisen als deutsche Exemplare derselben Art. Ähnlich könnte es sich mit der andersartigen Terpenverbindung des italienischen Vertreters von *S. biguttatus* verhalten. Aufgrund der Pygidialdrüsensekretkomposition der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Steninae* und *Dianous*-Arten können diese eindeutig der chemotaxonomisch basalen Piperidin-Gruppe nach SCHIERLING et al. (2013) zugeordnet werden (siehe Kapitel 1.4). Neben der besonderen Terpenverbindung beim italienischen *S. biguttatus* waren auch die abweichenden Retentionszeiten der Sekretextrakt- und Referenzmessungen der weiteren *Stenus*-Arten auffallend. Diese Abweichungen ergeben sich wahrscheinlich aus dem großen Zeitintervall, das zwischen Sekret- und Referenzmessungen lag. Innerhalb dieses Zeitraumes wurde die GC-Säule verkürzt. Jedoch waren die Messparameter beispielsweise bezüglich Ionisierungsenergie immer exakt gleich. Da die Referenz- und Extraktmessungen der thailändischen *Dianous*-Arten zeitlich näher beieinander lagen, ergaben sich hierbei keine Abweichungen der Retentionszeiten betreffend. Zusätzlich zu diesen Besonderheiten traten auch bei der Messung des

Sekretextraktes von *D. obliquenotatus* Veränderungen bezüglich der nominellen Masse des  $M^+$ -Peaks im MS auf. Ein möglicher Grund hierfür könnte die selten auftretende Spontanprotonierung sein (LACHER, pers. com.), wobei der  $M^+$ -Peak um eine Einheit zunimmt.

#### 4.2.2 Spurenanalytische Untersuchung der myrmecophilen *Stenus*-Art *S. aterrimus*

Für myrmecophile Organismen bestehen verschiedene Möglichkeiten, sich in ihr Wirtsameisennest zu integrieren. Oftmals spielt dabei der sog. „Nestgeruch“ der Wirtsameisenart, also das Kohlenwasserstoffprofil auf der Körperoberfläche aller zur Kolonie gehörenden Ameisen, welches der Erkennung der Nestgenossinnen dient (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; YAMAOKA, 1990; HOWARD, 1993; VANDER MEER & MOREL, 1998), eine wichtige Rolle (DETTNER & LIEPERT, 1994). Auch unter den Staphylinidaen gibt es myrmecophile Arten, wie z. B. *Zyras comes* (AKINO, 2002), die das kutikuläre Kohlenwasserstoffprofil ihrer Wirtsameisen imitieren („Chemical mimicry“; HOWARD et al., 1990), um sich in das Nest zu integrieren. Die Integration kann aber auch über chemische Mimikry von Alarmpheromonen der Wirtsameisen erfolgen: Vertreter der Gattung *Pella* wehren Angriffe der Ameisen durch Undecan und 6-Methyl-5-hepten-2-on (7) ab (STOEFFLER et al., 2007). Diese beiden Verbindungen finden sich ebenfalls in den Pheromondrüsen der Wirtsameisen *Lasius fuliginosus* (STOEFFLER et al., 2007). Eine weitere Integrationsmöglichkeit in ein Ameisennest stellt die sog. chemische Camouflage dar, wobei der myrmecophile Organismus bestimmte chemische Verbindungen seines Ameisenwirtes aufnimmt und sich damit tarnt (HOWARD et al., 1990). Die Ergebnisse bezüglich der spurenanalytischen Untersuchungen der myrmecophilen *Stenus*-Art *S. aterrimus* schließen die beiden Integrationsstrategien chemische Mimikry und chemische Camouflage aus, da bei keinem der untersuchten Käfer Kohlenwasserstoffe, die mit dem Nestgeruch der Ameisenarten *F. pratensis* und *F. truncorum* assoziiert sein könnten, gefunden wurden (siehe Kapitel 3.2.2). Es liegt nun die Vermutung nahe, dass die Integration mittels des Pygidialdrüsensekretes erfolgen muss. Im Sekret der untersuchten myrmecophilen *Steninae* konnte meist nur die Verbindung Stenusin (1) spurenanalytisch eindeutig nachgewiesen werden. Lediglich ein *S. aterrimus*-Sekret enthielt neben 1 den weiteren Naturstoff 2 und das Terpen 5. Alle drei Verbindungen wurden in Ameisenbiotests mit *Lasius flavus* positiv als Ameisendeterrent getestet, wobei die Alkaloide drastischeres Putzverhalten nach Kontakt bei den Ameisen hervorriefen (SCHIERLING et al., 2013). Das Terpen 5 wird auch von Larven der Papilionidae (Lepidoptera) als Ameisendeterrent eingesetzt (HONDA, 1983). Anscheinend spielt der Einsatz des Pygidialdrüsensekretes als Ameisendeterrent auch für die Integration oder Duldung von *S. aterrimus* im Wirtsnest eine bedeutende Rolle. Verhaltensbeobachtungen in der Ameisenstation scheinen diese Vermutung zu bestätigen, da der Käfer sein Sekret

für Staphylinidae typisch durch gezielte Krümmung des Abdomens in Richtung des Angreifers abgab (HUTH & DETTNER, 1990). Auch ZERCHE (unpubl.) führte ethologische Beobachtungen in einer baugleichen Ameisenstation mit *S. aterrimus* bei der zugehörigen Wirtsameisenart *F. pratensis* durch. ZERCHE konnte ähnliche Verhaltensweisen sowohl bei den Käfern als auch bei den Ameisen wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben feststellen. Auch hier wurden die Käfer (drei Individuen bei etwa zwanzig Ameisen pro Versuch in der Station) meist von den Ameisen ignoriert; vermeintliche Attacken der Ameisen wurden wie oben beschrieben durch Krümmung des Abdomens durch den Käfer abgewehrt, woraufhin die angreifende Ameise zurückschreckte. Die Käfer suchten bisweilen sogar aktiv den Kontakt zu den Ameisen. Während des Versuchsverlaufes verharrten die Steninae oftmals völlig bewegungslos in Spalten des Nährgels, wo sie nicht mit den Ameisen in Berührung kamen. Mindestens bis zu elf Tagen konnten die Steninae in der Station unbehelligt bei den Ameisen leben. ZERCHE führte diese Beobachtungsversuche auch mit wirtsfremden Ameisen durch (z. B. mit *S. aterrimus* bei *F. rufa*); schon nach kurzer Zeit wurden die Steninae trotz Einsatz ihres Wehrsekretes von den Ameisen gepackt und mit den Mandibeln zu Tode gebissen. Die Käfer suchten bei diesem Versuch nicht aktiv die Nähe der Ameisen auf, sondern zeigten Fluchtreaktionen. Interessanterweise konnte ZERCHE nur bei den wirtsfremden Ameisen ein extremes Putzverhalten der Mundwerkzeuge nach Käferkontakt feststellen, wohingegen die zugehörigen Wirtsameisen der Steninae nie solches Verhalten nach Käferkontakt an den Tag legten. Zusammenfassend lässt sich nun festhalten, dass *S. aterrimus* sich wohl mittels seines Wehrsekretes die Ameisen vom Leib hält, obwohl diese Strategie nicht sehr ressourcenschonend und kostspielig für den Käfer zu sein scheint. Diese Hypothese wird durch die Tatsache untermauert, dass *S. aterrimus* ausgeprägte Pygidialwehrdrüsen besitzt und diese nicht, wie bei myrmecophilen Staphylinidaen üblich, reduziert sind (DETTNER, 1993). Auch bestimmte Verhaltensweisen, wie z. B. Verstecken und Thanatose scheinen bei der Integration ins Wirtsameisennest eine entscheidende Rolle zu spielen. Leider konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vollständig geklärt werden, mit welcher Strategie sich *S. aterrimus* in sein Wirtsameisennest integriert und warum der Versuch in der Beobachtungsstation misslang. Vielleicht handelte es sich bei der großen Arbeiterin, die das im Experiment präsentierte *Stenus*-Exemplar angriff um ein Individuum von der Peripherie des Nestes, das bisher noch keinen Kontakt mit den Myrmecophilen hatte. Jedoch geben die hier gewonnenen Ergebnisse umfassende erste Einblicke in das myrmecophile Leben von *S. aterrimus*.

### 4.3 Biotests

#### 4.3.1 Spinnenbiotests

Vorherige Untersuchungen zeigten, dass das multifunktionale Pygidialdrüsensekret der Steninae als Fraßdeterrent gegenüber Insekten (getestet mit der Ameisenart *Lasius flavus*; SCHIERLING et al., 2013), Fischen (getestet mit *Xiphophorus hellerii*; SCHIERLING et al., 2013) und Wirbeltieren (getestet mit dem Sonnenvogel *Leiothrix lutea*; CONNERT, 1974) fungiert. Um dieses Gesamtbild des Wehrsekretes zu vervollständigen, wurden in der vorliegenden Arbeit auch Biotests mit freijagenden Wolf- und Springspinnen durchgeführt (*Pardosa amenata* und *Evarcha arcuata*). Wie bereits in Kapitel 3.4.1 angemerkt konnte nicht verifiziert werden, welche der Drüsenverbindungen statistisch am signifikantesten als Spinnendeterrent wirkt, da es Schwierigkeiten bei der Versuchsdurchführung gab. Es konnte aber eindeutig belegt werden, dass Imagines von *S. comma* durch ihr mittels Secretion grooming auf die Körperoberfläche aufgebrachtes Sekret vor Fraß durch Wolfspinnen geschützt sind. Die Reaktion der Vertreter der Lycosidae war vergleichbar mit der gegenüber den chemisch durch das Polyketid Pederin geschützten Kurzflüglerlarven der Gattung *Paederus* (PAVAN & BO, 1953), was die Deterrentwirkung gegenüber Wolfspinnen laut KELLNER & DETTNER (1996) eindeutig nachwies. Nach Kontakt mit einer Pederin enthaltenden *Paederus*-Larve ließen die Spinnen augenblicklich von dieser ab und zeigten intensives Putzverhalten, ähnlich wie die getesteten Individuen der Lycosidae in der vorliegenden Arbeit. Anders verhielt es sich mit den den Spinnen vorgesetzten *Stenus*-Larven, die nachweislich weder die Terpenverbindungen (5-7) noch die Alkaloide (1-4) beinhalten; sie wurden sofort nach der Präsentation von den Wolfspinnen ergriffen und verspeist. Auch in diesem Fall scheint wohl eher die kryptische Lebensweise der *Stenus*-Larven zu deren Überleben beizutragen als chemischer Fraßschutz.

#### 4.3.2 Biotests mit Fliegenmaden zur topikalen Wirkung

Neben Spinnenbiotests zum Nachweis der Deterrentwirkung der Drüsenverbindungen wurden die Substanzen auch einem Test zur topikalen Wirkung gegenüber Fliegenmaden (*Calliphora vomitoria*) unterzogen. Jedoch konnte eine eindeutige topikale Wirkung auf Fliegenmaden nicht nachgewiesen werden, obwohl der Versuchsaufbau von DETTNER (1991b) bereits gut etabliert worden war. In dieser Arbeit handelte es sich aber um ein völlig anderes chemisches System: Die Formulierung der toxischen und kristallinen Chinonverbindungen bei Vertretern der Oxytelinae in verschiedenen Lösemitteln spielte hier eine große Rolle für die topikale Wirkung und Effektivität im Fliegenmaden-Krümmungstest. Bei *Stenus* liegen die flüssigen und zumeist aktiven Drüsenverbindungen nicht formuliert vor und für die Biotests musste ein gänzlich künstliches System mit DMSO als formulierendem Lösemittel geschaffen werden.

Darüber hinaus sind die Alkaloide und Terpene der Steninae offenbar nicht so toxisch wie die Chinonverbindungen der Oxytelinae (SEIFERT, pers. com.) und riefen wahrscheinlich daher keine so starke Reaktion der Fliegenmaden hervor.

#### 4.4 Die Spreitung der Steninae

##### 4.4.1 Beeinflussung des Spreitungsverhaltens durch verschiedene Habitatansprüche

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl das Spreitungsvermögen als auch das Spreitungsverhalten verschiedener *Stenus*-Arten unter Laborbedingungen untersucht. Nicht alle Steninae zeigten das einzigartige Spreitungsverhalten, um sich schnell und außergewöhnlich über die Wasseroberfläche an den rettenden Rand der Spreitungsschale zu bewegen (siehe Tab. 8), wie dies bereits von JENKINS (1960), LINSENMAIR (1963) und DETTNER (1991a) berichtet wurde. Darüber hinaus ist das Spreitungsvermögen auf einige Untergattungen innerhalb der Steninae begrenzt. Während einige Vertreter der Gattung *Dianous*, der Untergattung *Stenus s. str.* wie z. B. *S. comma* (JENKINS, 1960; LINSENMAIR & JANDER, 1963) und Vertreter der Untergattung *Hypostenus* wie *S. cicindeloides* und *S. tarsalis* (BILLARD & BRUYANT, 1905) stets Spreitungsverhalten zeigen, tritt dieses bei Vertretern der mittlerweile eingezogenen Gattung *Nestus* (jetzt nach PUTHZ (2008) zu *Stenus* gehörend) und Mitgliedern der Untergattung *Hemistenus* niemals auf (LINSENMAIR, 1963). Dieses besondere Resultat das Spreitungsvermögen betreffend, konnte auch in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der *Stenus* (*Nestus*)-Arten *S. boops*, *S. circularis*, *S. humilis* und *S. melanarius* (siehe Tab. 8) bestätigt werden. Auch Vertreter der Untergattung *Metatesnus* sind zum Spreiten befähigt, was die untersuchten Arten *S. bifoveolatus*, *S. binotatus*, *S. flavipes*, *S. nitidiusculus*, *S. picipes* und *S. pubescens* bestätigten (siehe Tab. 8; BETZ, 1999). Paradoxerweise besitzen zwar alle Steninae spreitungsaktive Substanzen in ihren Pygidialdrüsen, jedoch zeigen nicht alle *Stenus*-Arten Spreitungsverhalten. Mitglieder der eingezogenen Untergattung *Nestus* und der Untergattung *Hemistenus* besitzen die oberflächenaktiven Substanzen 1, 2, 5 und 6 (siehe Tab. 8) in ihren Pygidialdrüsenreservoirs. Aufgrund ihrer Sekretkomposition müssten diese Käfer auch befähigt sein, das außergewöhnliche Spreitungsverhalten zu zeigen. Es ist offensichtlich, dass das Vorhandensein von Spreitungsfähigkeit bei einer *Stenus*-Art unabhängig von der Pygidialdrüsensekretkomposition der Käfer ist. Da Steninae Interstitien (HORION, 1963) ebenso wie die Ufer offener Gewässer (DETTNER, 1987) bewohnen, könnte die Disposition der Käfer Spreitungsverhalten zu zeigen in verschiedenen Habitatansprüchen der Tiere begründet liegen.

*D. coerulescens* weist in der vorliegenden Arbeit die signifikant höchste Spreitungsgeschwindigkeit auf (siehe Abb. 19); diese Tiere bewohnen die direkte Nachbarschaft von Wasserfällen, Wehren und schnell fließenden Gebirgsbächen mit Gefällen (HO-

RION, 1963). Deshalb ist es für das Überleben der Käfer überaus essentiell, in diesen Gewässern möglichst schnell spreiten zu können. Folglich zeigen diese Käfer äußerst ausgeprägtes Spreitungsverhalten mit hohen Geschwindigkeiten (siehe Tab. 9 und Abb. 19). Andere *Stenus*-Arten, welche ebenfalls stets Spreitungsverhalten mit hohen Geschwindigkeiten zeigen, wie z. B. *S. comma*, *S. biguttatus* und *S. guttula*, bewohnen Habitate nahe den Ufern von offenen, stehenden Gewässern (HORION, 1963). Auch diese Biotope erfordern freiwilliges und beständiges Spreitungsvermögen. Einige andere untersuchte *Stenus*-Arten, wie *S. flavipes* (*Metatesnus*) und Vertreter der Untergattung *Hypostenus* wie *S. latifrons*, *S. fulvicornis*, *S. tarsalis*, *S. similis* und *S. solutus* sind durch eine verhältnismäßig langsame Spreitungsgeschwindigkeit und weniger Vermögen charakterisiert. Diese Käferarten bewohnen überwiegend sumpfige Biotope und Feuchtstellen innerhalb von Wäldern, auf Weiden und in Mooren. Wenn diese Käfer in Feuchtstellen nahe offener Gewässer leben, verbleiben sie für gewöhnlich in verrottendem Laub und anderem Detritusmaterial oder an vegetationsreichen Stellen (HORION, 1963). Infolgedessen fallen die Käfer äußerst selten unfallartig in offene Gewässer und die Gelegenheit zur Spreitung erscheint ungewöhnlich. Dieser Umstand könnte ein Grund dafür sein, dass diese Käfer kein ausgeprägtes Spreitungsverhalten wie die überaus behände spreitenden untersuchten Arten *D. coerulea*, *S. comma* und *S. biguttatus* entwickelt haben. Dies trifft auch auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Stenus*-Arten *S. clavicornis* (*Stenus*), *S. boops*, *S. circularis*, *S. humilis* und *S. melanarius* (alle Vertreter der jetzt zu *Stenus* gehörenden, eingezogenen Untergattung *Nestus*) zu, welche niemals Spreitungsverhalten zeigten. Diese Arten bewohnen insbesondere mit Moos bewachsene Bereiche innerhalb von Mooren, verrottendes Laub und Detritus (HORION, 1963); solche Habitattypen ließen keine evolutionäre Selektion von Spreitungsverhalten zu.

#### 4.4.2 Sekretsparmechanismen als ein Grund für variiertes Spreitungsverhalten

Ein weiterer Grund, weshalb kein ausgeprägtes Spreitungsverhalten bei einigen *Stenus*-Arten etabliert wurde, könnte eine Art von Sekretsparmechanismus darstellen. Generell wurden die Pygidialdrüsen der Steninae ursprünglich als Wehrdrüsen konzipiert (DETTNER, 1991a; siehe auch Kapitel 1.2). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, besitzen fast alle Kurzflügler Wehrdrüsen (DETTNER, 1991a; THAYER, 2005). Da Staphylinidae und auch Vertreter der Steninae durch reduzierte Elytren gekennzeichnet sind, die dem Abdomen zwar eine größere Bewegungsfreiheit gewährleisten, aber auch dessen Verletzlichkeit gegenüber Prädatoren ohne den Schutz der gewöhnlich sklerotisierten Flügeldecken erhöhen, ist der Besitz von effektiven Wehrdrüsen überaus essentiell (DETTNER, 1993). Einerseits erlaubt das frei bewegliche Abdomen die Kolonisierung von interstitiellen Räumen im Boden, im Bodenstreu oder unter der Rinde von Pilzen (DETTNER, 1993), andererseits erhöhen diese überwiegend feuch-

ten Habitate auch die Gefahr der Besiedelung der Körperoberfläche der Käfer durch schädliche Mikroorganismen. Um diese Gefahr abzuwenden, zeigen *Steninae* das bereits in der Einleitung beschriebene Verhalten des „Secretion Groomings“ (KOVAC & MASCHWITZ, 1990; BETZ, 1999; siehe Kapitel 1.2). Es erscheint nun also plausibel, dass *Stenus*-Arten, welche Interstitien in Pflanzenmaterial oder Detritus bewohnen, ihr wertvolles Pygidialdrüsensekret eher für Sekretputzen nutzen als für die Spreitung. Darüber hinaus ist ein weiterer Sekretsparmechanismus neben Sekretputzen in Verbindung mit verschiedenen Habitatbeschaffenheiten denkbar. JENKINS berichtete 1960 im Kontext seiner ethologischen Studien mit *Dianous*- und *Stenus*-Arten von einem negativ-phototaktischen Spreitungsverhalten zum dunkel erscheinenden „Ufer“ eines Wasserbeckens. Sobald der Käfer auf die Wasseroberfläche gefallen ist, orientiert sich das Tier sofort in die richtige Richtung zum rettenden Ufer und verliert während des Spreitens keine Zeit, dieses zu erreichen. Dieses Ergebnis wird auch durch die Beobachtungen von LINSENMAIR (1963) gestützt. Da *Steninae* im Vergleich mit anderen Staphyliniden mit außergewöhnlich großen Komplexaugen in Bezug auf ihre Körpergröße ausgestattet sind, ist es offensichtlich, dass der optische Sinn essentiell für die räumliche Orientierung der Tiere ist. Zusätzlich ist es vorstellbar, dass die Käfer nicht nur in der Lage sind, sich beim Spreiten in die richtige Richtung zu orientieren, sondern auch die Distanz zum Ufer abzuschätzen. Die Tiere könnten auch die Fähigkeit besitzen, die Distanz zum Ufer in Relation zur Sekretmenge in ihren Drüsen zu setzen. Nur in Ausnahmefällen, wie z. B. totale physische Erschöpfung oder wiederholte Attacken durch Prädatoren wie Wasserläufer (LINSENMAIR, 1963), „entscheidet“ der Käfer die volle Menge seines wertvollen Sekretes auszunutzen. Dieser Umstand erklärt vermutlich auch weshalb Spreitungsgeschwindigkeiten von 40-75 cm/s und eine zurückgelegte Gesamtstrecke von bis zu 15 m (LINSENMAIR & JANDER, 1963 für *S. comma*) in der vorliegenden Arbeit nicht von den Käfern erreicht wurden. Die höchste Spreitungsgeschwindigkeit mit 39,98 cm/s zeigte *S. comma* (siehe Abb. 19). Dieses Ergebnis wird durch die Maximalgeschwindigkeit, welche NEUMANN (1993) für *Steninae* feststellte, unterstützt. Der experimentelle Aufbau zur Ermittlung der Spreitungsgeschwindigkeiten dieser Arbeit und derjenige von NEUMANN (1993) sind nahezu identisch und lassen technisch keine größere Spreitungsdistanz von 24,1 cm zu, was für die von LINSENMAIR & JANDER (1963) beobachtete Maximalgeschwindigkeit nicht ausreichte. Die Käfer konnten in der vorliegenden Arbeit den sicheren Rand der Spreitungsschale auch ohne Ausnutzen der vollen Kapazität ihrer Drüsen schnell erreichen. In diesem Zusammenhang spielen sowohl das Gesamtvolumen der Pygidialdrüsenreservoirs, als auch deren Größe eine entscheidende Rolle bezüglich der Variationen des Spreitungsverhaltens.

## 4.4.3 Spreitungsverhalten ist abhängig von physiologischen Eigenschaften

Das in der vorliegenden Arbeit beobachtete Spreitungsverhalten und der Bewegungsablauf dessen sind im Einklang mit den Ergebnissen von BETZ (1999). Auch das von *S. solutus* gezeigte Schwimmverhalten ist ebenfalls durch den von BETZ (1999) beschriebenen Bewegungsablauf gekennzeichnet. LINSENMAIR (1963) berichtete von den Vertretern *S. cicindeloides* und *S. tarsalis* der Untergattung *Hypostenus* eine Mischung aus Spreitungs- und Schwimmverhalten. Auch *S. solutus*, der eine *S. cicindeloides* ähnliche Drüsenkomposition besitzt, zeigte in der vorliegenden Arbeit eher Schwimm- als Spreitungsverhalten. Darüber hinaus ist *S. tarsalis* durch eine diskontinuierliche Sekretabgabe charakterisiert und ist deshalb freilich nicht in der Lage, hohe Spreitungsgeschwindigkeiten wie andere *Stenus*-Arten zu erreichen (LINSENMAIR, 1963). Daneben beeinflusst sowohl die Körpergröße und auch das -gewicht das Spreitungsverhalten der *Steninae*. Ausschließlich *S. flavipes*, die kleinste untersuchte *Stenus*-Art, zeigte „zirkuläres“ Spreitungsverhalten (siehe auch Tab. 9), bevor eine lineare Spreitung in die gewünschte Richtung erfolgte. Aufgrund des geringen Körpergewichts und der ebenso geringen Körpergröße dieser Käfer ist es möglich, dass die Tiere sich erst „physikalisch“ stabilisieren müssen, bevor lineares Spreitungsverhalten gezeigt werden kann. Neben der Augenmorphologie ist es auch denkbar, dass die Anzahl der Ommatidien und die daraus folgende visuelle Kapazität der Tiere das Spreitungsverhalten beeinflussen. Wie bereits erwähnt, bewohnen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Steninae* vielerlei verschieden beschaffene Habitate. Unterschiedliche Habitatansprüche erfordern verschiedene Augenadaptationen beispielsweise das Beutefangverhalten betreffend (BAUER, 1985; BAUER et al., 1998). *Stenus*-Arten, welche in Habitaten mit dichter Vegetation oder Detritus leben, sind durch kleinere Komplexaugen und eine geringere Dichte von Ommatidien gekennzeichnet, während *Stenus*-Arten, die offene Biotope mit spärlicher Vegetation bevorzugen, größere Komplexaugen mit einer hohen Anzahl von Ommatidien besitzen (BETZ, 2000). Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass untersuchte *Stenus*-Arten aus vegetationsreichen Habitaten ein weniger präzises Spreitungsverhalten im Vergleich zu Vertretern der *Steninae* aus offenen Habitaten möglicherweise aufgrund einer weniger ausgeprägten optischen Kapazität zeigen.

## 4.4.4 Physikochemisches Spreitungspotential des Sekretes und evolutionäre Aspekte

Neben ethologischen Beobachtungen (siehe Tab. 9) war auch das Spreitungspotential der Sekretkomponenten in Form der Messung der Spreitungsdrücke Gegenstand der vorliegenden Arbeit. SCHILDKNECHT et al. (1975) maßen bereits die Spreitungsdrücke der Substanzen 1, 6 und 7. Die dort gemessenen Werte der Spreitungsdrücke weichen von den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werten ab (siehe Tab. 10). Je-

doch unterschied sich die hier angewendete Messmethode und -temperatur völlig von den Messbedingungen bei SCHILDKNECHT et al. (1975). Erstens benutzten SCHILDKNECHT et al. (1975) ein Grenzflächen- und kein Tropfen-Volumen-Tensiometer und zweitens wurden die Spreitungsdrücke mit Hilfe der von WOLF (1957) entwickelten Gleichung 1 berechnet. Zusätzlich wurden die Werte der Spreitungsdrücke mit Hilfe einer von Hans Kuhn entwickelten Filmwaage (SCHILDKNECHT, 1977) abgeschätzt. Es erscheint nun offensichtlich, dass die früheren Messungen abweichende Ergebnisse in Bezug auf die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Spreitungsdruckwerte liefern. Jedoch sind deutliche Tendenzen zwischen den Werten von SCHILDKNECHT et al. (1975) und den hier gemessenen Werten erkennbar. Es ist erstaunlich, dass die Spreitungsdrücke von 3 und 5 wesentlich höher sind als der Spreitungsdruck von 1, denn Substanz 1 wurde als „Spreitungskaloid“ von SCHILDKNECHT et al. (1975) postuliert.

Wie bereits in Kapitel 1.4 der Einleitung erklärt, eignet sich der chemische Drüsengehalt der verschiedenen *Stenus*-Arten und ihre Verwandtschaft zur Erstellung eines chemosystematischen Arrangements (FRANCKE & DETTNER, 2005). Für die *Steninae* ergeben sich auf dieser Grundlage die drei bereits ausführlich erläuterten chemotaxonomischen Gruppen nach SCHIERLING et al. (2013; siehe Abb. 4). Auch das Spreitungsvermögen lässt sich mit den drei chemotaxonomischen Gruppen in Zusammenhang bringen. Vertreter der chemotaxonomisch basalen Piperidin-Gruppe (SCHIERLING et al., 2013; in der vorliegenden Arbeit durch *S. clavicornis* und *S. comma*, sowie durch *D. coerulea* repräsentiert) nutzen die Alkaloide 1 und 2 für optionales Spreitungsvermögen und zur Prädatorenvermeidung (CONNERT, 1974; DETTNER et al., 1996; HESSE, 2000). Daneben werden die Monoterpene 5, 6 und das Bisnor-monoterpene 7 als pharmakologisch aktive Substanzen für antimikrobiellen Schutz gegen Bakterien und Pilze (SCHILDKNECHT et al., 1976) und als Insektenrepellent eingesetzt (HONDA, 1983; BLUM, 1981). Vertreter der Pyridin-Gruppe (SCHIERLING et al., 2013; hier vertreten durch *S. similis*) nutzen wahrscheinlich eher das für diese Gruppe „neue“ Alkaloid 3 zur Spreitung, da dessen Spreitungsdruck höher ist, als jener des Alkaloides 1. Daneben ist der Anteil von 1 am Gesamtsekret von *S. similis* deutlich geringer als derjenige von 3 (siehe Tab. 11). Zusätzlich wirkt Alkaloid 3 auch deutlich effektiver antimikrobiell gegen *Bacillus sphaericus*, *Escherichia coli* und *Serratia entomophila* als Alkaloid 1 (LUSEBRINK et al., 2009). *S. solutus* fungiert in der vorliegenden Arbeit als Vertreter der dritten und am höchsten evolvierten chemotaxonomischen Epoxy-piperidein-Gruppe (SCHIERLING et al., 2013). Bei dieser *Stenus*-Art wird Verbindung 3 zur Erlangung eines geringen Spreitungspotentials genutzt und daneben ebenso als Bakterizid und Fungizid gegen *Verticillium lecanii* (SCHIERLING et al., 2013) eingesetzt. Das für diese chemotaxonomische Gruppe typische Alkaloid 4 spielt aufgrund seines geringen Spreitungsdruckes (siehe Tab. 10) wohl keine Rolle bezüglich des Spreitungsvermögens. Abschließend lässt sich also festhalten,

dass die Alkaloide **1** und **2**, sowie die Terpene **5**, **6** und **7**, welche bei der basalen Piperidin-Gruppe verbreitet sind (SCHIERLING et al., 2013), im Laufe der evolutiven Entwicklung der Steninae durch die Alkaloide **3** und **4** (Epoxy-piperidein-Gruppe; SCHIERLING et al., 2013) ersetzt wurden, um Spreitungsvermögen und Schutz gegen schädliche Umwelteinflüsse zu erhalten. Die artspezifische Sekretkomposition der Steninae unterliegt somit einer evolutionären Optimierung.

Es wurden jedoch nicht nur reine Drüsensubstanzen am Tropfen-Volumen-Tensiometer analysiert, sondern auch naturidentische Sekretkompositionen, welche aufgrund der Quantifizierungsergebnisse gemischt wurden. Am Tensiometer wurden die Spreitungsdrücke der naturidentischen Sekrete der Beispielarten *S. clavicornis*, *S. comma*, *S. similis* und *S. solutus* gemessen (siehe Tab. 12). Für die Arten *S. clavicornis*, *S. comma* und *S. similis* sind die Spreitungsdrücke der Kompositionen annähernd gleich. Lediglich der Spreitungsdruck der *S. solutus*-Sekretkomposition ist niedriger, weil Substanz **4** den Hauptteil des Sekretes ausmacht. Diese Drüsenverbindung ist durch den geringsten Spreitungsdruck charakterisiert (siehe Tab. 10), da sie faktisch kaum wasserlöslich ist. Sie besitzt eine harzige Konsistenz und zeigt keinerlei Oberflächenaktivität. Es ist daher denkbar, dass die harzige Substanz **4** in den Drüsen der Tiere durch **3** formuliert ist und die Käfer daher ein geringes Spreitungspotential erreichen.

Generell gibt es wohl keine synergistischen oder quasisynergistischen Effekte zwischen den Einzelverbindungen innerhalb des Sekretes, so wie es bei den Kurzflüglergattungen der *Oxytelinae* und *Aleocharinae* beobachtet wurde (FRANCKE & DETTNER, 2005). Auch SCHIERLING et al. (2013) berichteten keine synergistischen Effekte bezüglich der Deterrent- oder antimikrobiellen Wirkung der naturidentischen *Stenus*-Sekrete.

Abschließend lässt sich festhalten, dass das multifunktionale Sekret der Steninae viele verschiedene Ansprüche erfüllt. Das Spreitungspotential der Drüsenverbindungen ist nicht nur für die Lokomotion auf Gewässern und als Fluchtmechanismus von zentraler Bedeutung für die Tiere, sondern auch um eine Verteilung des antimikrobiellen und schützenden Sekretes auf der Körperoberfläche während des Sekretputzens zu ermöglichen. Auch die Wehrsekrete anderer Insekten fungieren als Lösungsmittel und besitzen die Fähigkeit zur Spreitung. Dies gilt beispielsweise für orale Sekrete, welche von *Spodoptera exigua* reurgitiert werden (Lepidoptera; ROSTÁS & BLASSMANN, 2009) und für die Sekrete der Taumelkäfer (Coleoptera; *Gyrinidae*; VULINEC, 1987). Jedoch hat kein anderes Insekt dieses herausragende Spreitungsverhalten entwickelt. Obwohl dieses ein sekundärer Effekt des multifunktionalen *Stenus*-Wehrsekretes ist, ist das Spreitungsverhalten essentiell für das Überleben der Käfer und trägt dazu bei, dass Steninae am besten unter allen Staphylinidaen an vielerlei Habitats und an die Herausforderungen des Lebens adaptiert sind.

## 4.5 Teilprojekte mit Negativergebnissen

### 4.5.1 Nahrungsanalysen

Steninae scheinen bei der Nahrungsaufnahme keine chitinösen Bestandteile ihrer Beutetiere aufzunehmen, da im Kropf keine Fragmente der Kutikula mit mikroskopischen Untersuchungen festzustellen waren. Diese Annahme wird von der Tatsache unterstützt, dass von den angebotenen Futtertieren (*D. melanogaster*) immer ein Häufchen der deformierten Kutikula im Hälterungsgefäß übrig blieb. Vielleicht liegt bei *Stenus* eine Art extraintestinaler Verdauung, wie z. B. bei Carabidaen vor (PETERS in DETTNER, 2003).

### 4.5.2 Endosymbionten bei *Stenus*

In den Körpergeweben der untersuchten Steninae konnten mittels PCR mit spezifischen Primern weder das Vorkommen von *Rickettsia* noch *Wolbachia* nachgewiesen werden. Somit konnten auch die Ergebnisse von DE MARZO (1994) bezüglich des lichtmikroskopischen Nachweises des Vorkommens vermeintlicher symbiotischer Bakterien in den weiblichen Anhangsdrüsen von *S. comma peroculatus* nicht bestätigt werden.

## 4.6 Die Phylogenie der Steninae

### 4.6.1 Genauswahl

Für die Analyse phylogenetischer Beziehungen der Steninae kamen drei verschiedene Gensequenzabschnitte zum Einsatz (COI, 16S rRNA, Histon H3). Die COI wird oftmals als taxonomischer Standard-Barcode sowohl für die Artidentifikation als auch für biogeographische Analysen herangezogen (FOLMER et al., 1994; HEBERT et al., 2003; RIBERA et al., 2003; 2004; PONS et al., 2006; HUNT et al., 2007; HEETHOFF et al., 2011). Einerseits sind die universellen Primer der COI sehr robust, andererseits besitzt dieser Genabschnitt eine weitaus größere Anzahl phylogenetischer Signale als jedes andere mitochondriale Gen (HEBERT et al., 2003). Zusätzlich zur COI wurde auch die Histon H3-Gensequenz, die für ein nucleosomales Kernprotein codiert, für die phylogenetischen Analysen der Steninae benutzt. Dieser Genabschnitt weist sich durch hochkonservierte Bereiche aus (BALDO et al., 1999; DINAPOLI et al., 2007; THATCHER & GOROVSKY, 1994) und eignet sich insbesondere für phylogenetische Analysen auf Gattungsebene (DINAPOLI et al., 2007). Die dritte verwendete Gensequenz ist die 16S rRNA; diese Sequenz wird nicht nur häufig für phylogenetische Analysen speziell von Bakterien eingesetzt („Housekeeping gene“; JANDA & ABOTT, 2007), sondern sie besitzt auch wichtige Charakteristika für die Studien von

Invertebraten - wie z. B. extreme Konservierung, das Vorhandensein in jeder Zelle mit der gleichen Funktion und eine hohe Zahl von Kopien pro Zelle (CILIA et al., 1996; DOOLITTLE, 1999). Da sich in beiden konstruierten Bäumen, basierend auf dem ML-, bzw. BA-Berechnungsverfahren konsistente Topologien feststellen ließen, scheinen die ausgewählten Gensequenzen geeignet für eine Auflösung phylogenetischer Verwandtschaftsbeziehungen der Steninae zu sein. Jedoch erscheint die basale phylogenetische Auflösung, ähnlich wie in der Arbeit von MAUS et al. (2001) zur Staphyliniden-Gattung *Aleochara*, unbefriedigend. Ein möglicher Grund für das Fehlen einer zufriedenstellenden basalen Auflösung könnten multiple Divergenzereignisse innerhalb eines kurzen Zeitraumes sein (MADDISON, 1989; KOERNER et al., 2013). Zusätzlich könnte die fehlende basale Auflösung von einer Phase mit rapider Evolution, während derer Aufzweigungsereignisse innerhalb kurzer Zeit stattfanden, herrühren (MAUS et al., 2001). Da die vorliegende Arbeit nur wenige Taxa und lediglich drei Gensequenzabschnitte beinhaltet, könnten weitere Untersuchungen mit zusätzlichen Taxa und mehr Gensequenzen für molekulare Analysen positiv zu einer exakteren basalen Auflösung innerhalb der Gattung *Stenus* beitragen.

#### 4.6.2 Partielle Unterstützung morphologischer monophyletischer Gruppen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt (siehe Kapitel 1.4), existieren verschiedene Ansätze, die artenreiche Gattung *Stenus* in übersichtlichere Gruppierungen aufzuteilen, wie z. B. die traditionelle Einteilung in Untergattungen (CAMERON, 1930; LOHSE, 1964; ZHAO & ZHOU, 2004). Diese Einteilung basierte auf speziellen morphologischen Charakteristika wie die Morphologie und Länge der Metatarsen und Metatibien, sowie der äußerlichen Erscheinung der abdominalen Paratergite. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Untergattungseinteilung nicht, da Arten mit zweilappigen und einfachen Metatarsen ein gemeinsames Cluster bilden, was in poly- oder paraphyletischen Gruppen in beiden konstruierten Bäumen resultiert (beispielsweise bildet *S. latifrons*, welcher zweilappige Tarsen besitzt eine Gruppe mit *S. brunripes*, welcher sich durch einfache Tarsen auszeichnet; siehe Abb. 20). Diese Resultate werden auch von KOERNER et al. (2013) unterstützt, deren Untersuchung sich mit auf COI-Gensequenz basierenden Analysen von *Stenus* beschäftigt.

Aufgrund der Problematik, die das traditionelle Untergattungs-Konzept aufwirft, führte PUTHZ (2001; 2008) eine große Zahl monophyletischer Gruppen ein, welche auf einer Reihe morphologischer Charakteristika, wie z. B. der Struktur des Aedeagus, basiert. Einige dieser monophyletischen Gruppen werden durch die vorliegende Arbeit unterstützt, wie die *S. similis*-, *S. canaliculatus*- und *S. comma*-Gruppe. Jedoch wurden jeweils nur zwei Vertreter der jeweiligen Gruppe bei der phylogenetischen Analyse berücksichtigt, während andere Gruppen keine Unterstützung fanden. Weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von *Stenus*-Arten sind künftig nötig, um diese

morphologischen Gruppen auf molekularphylogenetischer Basis zu identifizieren. Weitere Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entsprechen in den meisten Fällen PUTHZ' taxonomischer Meinung (PUTHZ, pers. com.). Die Arten *S. canaliculatus*, *S. nitens* und *S. intermedius* bilden ein gemeinsames Cluster zusammen mit *S. boops* (siehe Abb. 20). Bezüglich der drei erst genannten Arten erscheint dieses Ergebnis plausibel, da diese durch eine sklerotisierte Spermathek charakterisiert sind. Jedoch sollte *S. boops*, dem eine solche Spermathek fehlt, nicht in der direkten Nachbarschaft neben den oben genannten Arten im erstellten Baum platziert sein. Daneben formen *S. junco*, *S. clavicornis* und *S. humilis*, die eine ähnliche Gestalt des Aedeagus aufweisen, ein gemeinsames Cluster. Abschließend bleibt noch zu erwähnen, dass *D. fengtingae*, welcher zum *Dianous*-Komplex I gehört (PUTHZ, 1981; 2000; 2005; SHI & ZHOU, 2011; TANG et al., 2011), eine gegenüberliegende Position zu *Dianous*-Komplex II-Vertretern *D. coerluescens*, *D. fellowesi* und *D. vietnamensis* innerhalb des konstruierten Stammbaums bezieht (siehe Abb. 20). Es bleibt künftigen molekularphylogenetischen Untersuchungen mit mehreren Vertretern von *Dianous* überlassen, diese Nachbarposition von *D. fengtingae* gegenüber *Dianous*-Komplex II-Arten zu bestätigen und zu untermauern.

#### 4.6.3 Bestätigung des Ursprunges von *Dianous* innerhalb *Stenus*

Der Klebfangapparat wurde seit jeher als die prominenteste Autapomorphie der Gattung *Stenus* angesehen, die als Beweis für die Monophylie dieser Gattung gegenüber *Dianous* als sog. „Schwestergattung“ galt. Dieser einmalige Klebfangapparat der dazu dient behände Beute äußerst schnell und effektiv zu fangen, besteht aus einem weit herausstülpbaren Labium, welches mit modifizierten Paraglossen ausgestattet ist, die als Klebepolster fungieren (WEINREICH, 1968; PUTHZ, 1981; BETZ, 1996; 2006; KOERNER et al., 2013). *Dianous* fehlt dieses spezialisierte Labium; das Labium dieser Gattung ist wesentlich kürzer, nur geringfügig herausstülpbar und besitzt keinerlei Klebpolster (WEINREICH, 1968; PUTHZ, 1981). Die phylogenetische Verwandtschaftsbeziehung zwischen *Dianous* und *Stenus* ist bereits Gegenstand einiger Untersuchungen gewesen (PUTHZ, 1981; CLARKE & GREBENNIKOV, 2009). Im Jahr 2009 schlugen GREBENNIKOV & NEWTON drei Autapomorphien für die Gattung *Dianous* vor, jedoch basierte deren Untersuchung nur auf einer einzigen *Dianous*-Art. KOERNER et al. (2013) führten erstmals molekularphylogenetische Analysen auf der Grundlage von COI-Gensequenzen durch, die eine breite Auswahl von *Dianous* und *Stenus*-Arten beinhaltet. Diese Untersuchung indiziert ein Cluster der analysierten *Dianous*-Arten innerhalb einer paraphyletischen *Stenus*-Gattung. Aus der Konsequenz dessen schlugen KOERNER et al. (2013) eine sekundäre Reduktion des ausgeprägten Klebfangapparates bei *Dianous* vor und widerlegten die ursprüngliche Annahme, dass *Dianous* ein primitiver Vorläufer der Gattung *Stenus* gewesen sei. Die molekularphylogenetischen Analysen der vorliegenden Arbeit basierend auf den drei

Gensequenzabschnitten der COI, der 16S rRNA und des Histon H3-Gens erhärten den Verdacht und liefern weitere Beweise für den Ursprung von *Dianous* innerhalb einer paraphyletischen *Stenus*-Gattung (siehe Abb. 20).

#### 4.6.4 Vergleich mit dem chemotaxonomischen Ansatz

SCHIERLING et al. (2013) teilte die meisten mitteleuropäischen *Stenus*-Arten abhängig von ihrer Pygidialdrüsensekretzusammensetzung in drei chemotaxonomische Gruppen anhand niedermolekularer Wirkstoffe ein. Unter allen untersuchten Staphylinidae ist das Vorkommen verschiedener Alkaloide in den Pygidialdrüsen auf die Steninae beschränkt (SCHIERLING et al., 2013). *Dianous coeruleus* stellt die einzige europäische *Dianous*-Art dar; diese Kurzflüglerart besitzt die gleichen Piperidinalkaloidverbindungen wie *Stenus*: Stenusin (1) und Norstenusin (2) und gehört aufgrund dessen zur chemotaxonomisch basalen Piperidin-Gruppe (SCHIERLING et al., 2013). Da alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Dianous*-Arten ein gemeinsames Cluster innerhalb der Gattung *Stenus* in direkter Nachbarschaft zu anderen Piperidin-Gruppenmitgliedern bilden (siehe Abb. 20), sind diese Ergebnisse mit den Resultaten von SCHIERLING et al. (2013) in Einklang zu bringen. Kürzlich ist der Pygidialdrüsengehalt einiger asiatischer *Dianous*-Arten aus Thailand, *D. obliquenotatus*, *D. karen* (beide zum *Dianous*-Komplex II gehörend), sowie *D. betzi* (zum *Dianous*-Komplex I gehörend) spurenanalytisch mittels GC-MS untersucht worden. Die Pygidialdrüsen dieser drei Arten beinhalten wiederum nur die chemotaxonomisch basalen Alkaloide 1 und 2 (LANG, unpubl.; siehe auch Kapitel 3.2.1). Diese Ergebnisse liefern einen weiteren Anhaltspunkt dafür, dass *Dianous* zur chemotaxonomisch basalen Piperidin-Gruppe innerhalb der Gattung *Stenus* gehört.

Doch nicht nur Vertreter der chemotaxonomisch basalen Piperidin-Gruppe bilden Cluster in beiden konstruierten Bäumen (siehe Abb. 20). Darüber hinaus zeigen Mitglieder beider chemotaxonomisch abgeleiteter Gruppen auch ein spezielles Arrangement (siehe Abb. 20). Interessanterweise nimmt der Epoxy-piperidein-Gruppenvertreter *S. binotatus* eine isolierte Position innerhalb eines Clusters bestehend aus *Stenus*-Arten mit chemotaxonomisch abgeleitetem Alkaloiddrüsengehalt wie *S. similis*, *S. tarsalis* und *S. solutus* ein. Um dieses spezielle Arrangement von *S. binotatus* erklären zu können, ist es nötig der Stereochemie des Alkaloids Cicindeloin (4) Beachtung zu schenken. Die Pygidialdrüsen der Epoxy-piperidein-Gruppenmitglieder *S. solutus* und *S. cicindeloides* (der letztere war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit) beinhalten (2S,3S,1'S)-Cicindeloin, während *S. binotatus* das (2S,3S,1'R)-Isomer von Cicindeloin besitzt (SCHIERLING et al., 2012). Gegenwärtig ist noch nicht bekannt, welche Gensequenzabschnitte bei der Biosynthese von 4 involviert sind. Zwar sind die in der vorliegenden Arbeit für molekularphylogenetische Analysen verwendeten Gensequenzen sicherlich nicht an der Biosynthese der Drüsenverbindung 4 beteiligt, doch könnte

der Besitz von (2S,3S,1'R)-Cicindeloïn ein Hinweis auf generelle genetische Unterschiede von *S. binotatus* im Vergleich zu anderen Epoxy-piperidein-Gruppenmitgliedern sein.

Der chemotaxonomische Ansatz nach SCHIERLING et al. (2013) wird durch die vorliegenden phylogenetischen Analysen gut unterstützt. Lediglich die Position der Epoxy-piperidein-Gruppenvertreter *S. binotatus* und *S. solutus*, die sich nicht exakt die gleiche Klade teilen, erscheint problematisch. Diese Problematik gilt auch für die Pyridin-Gruppenvertreter *S. tarsalis* und *S. similis*. Jedoch kann eine nahe molekular-phylogenetische Verwandtschaft aller untersuchter chemotaxonomisch abgeleiteter *Stenus*-Arten angenommen werden, da diese Käfer ein gemeinsames größeres Cluster bilden und alle den Besitz der Übergangsverbindung 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin (**3**) in ihren Pygidialdrüsen gemein haben.

Jedoch kann die Position von *S. bifoveolatus*, welcher zur basalen Piperidin-Gruppe gehört, in direkter Nachbarschaft zu den chemotaxonomisch abgeleiteten Arten *S. similis*, *S. tarsalis*, *S. solutus* und *S. binotatus* (siehe Abb. 20) nicht mit dem chemotaxonomischen Ansatz erklärt werden. In diesem Fall sollten andere Attribute der untersuchten Käfer berücksichtigt werden.

Bezüglich der Alkaloidbiosynthese ist auch eine andere phylogenetische Hypothese, die chemotaxonomische Annäherung nach SCHIERLING et al. (2013) betreffend, möglich. Die Alkaloide der Steninae **1**, **2** und **4** werden auf Basis der Aminosäuren *L*-Lysin und *L*-Isoleucin synthetisiert (LUSEBRINK et al., 2008a; b; SCHIERLING et al., 2011; SCHIERLING et al., 2012). Die Aminosäure *L*-Lysin stellt hierbei den N-heterozyklischen Ring zur Verfügung, während *L*-Isoleucin die Seitenkette bildet. Die unterschiedlichen Alkaloide können nun basierend auf geringfügigen Modifikationen der gleichen Vorläufermoleküle erhalten werden (SCHIERLING et al., 2012). Aufgrund dieses mehr oder weniger simplen Biosyntheseweges und der ubiquitären Verfügbarkeit der erforderlichen Aminosäuren, erscheint es ziemlich einfach für die Käfer alle bei *Stenus* vorkommende Alkaloide zu synthetisieren. Warum aber beinhalten die Pygidialdrüsen mancher *Stenus*-Arten keine chemotaxonomisch abgeleiteten Verbindungen wie **3** oder **4** und nehmen daher definierte Positionen innerhalb der konstruierten Bäume ein? Frühere Untersuchungen, welche sich mit der Verbreitung der Drüsenalkaloide bei verschiedenen *Stenus*-Arten beschäftigten, stellten eine Korrelation zwischen Drüsenkompositionen und unterschiedlichen Anpassungen der Käfer an ihr Habitat und Bedrohungen wie Prädation und Befall durch schädliche Mikroorganismen fest (LUSEBRINK et al., 2008a; LUSEBRINK et al., 2009; LANG et al., 2012; SCHIERLING et al., 2013). Jede einzelne Drüsenverbindung besitzt klar definierte Funktionen und zeigt eine bestimmte Effektivität gegenüber vielerlei Faktoren. *S. comma* beispielsweise ist durch den Besitz der chemotaxonomisch basalen Alkaloide **1** und **2** charakterisiert (SCHIERLING et al., 2013) und lebt in direkter Nachbarschaft offener Gewässer (HORI-ON 1963; DETTNER, 1987). Deshalb ist es durchaus üblich, dass der Käfer bei der Jagd

nach Beutetieren unbeabsichtigt ins Wasser gerät und dort der Gefahr des Ertrinkens oder der Verfolgung durch potentielle Prädatoren wie etwa Wasserläufern unterliegt (LINSENMAIR, 1963). Um diese Bedrohungen abzuwenden, sind die Pygidialdrüsen von *S. comma* mit den spreitungsaktiven Drüsenverbindungen 1 und 2 ausgestattet (SCHILDKNECHT et al., 1975; LANG et al., 2012), die die Käfer zur schnellen Spreitung auf der Wasseroberfläche befähigen und somit zur Flucht vor den oben genannten Gefahren verhelfen (PIFFARD, 1901; BILLARD & BRUYANT, 1905; JENKINS, 1960; SCHILDKNECHT et al., 1975). Der Epoxy Piperidein-Gruppenvertreter *S. solutus* ist durch eine auf Cicindeloin basierende Sekretkomposition charakterisiert. In früheren Untersuchungen zeigte sich, dass sich Cicindeloin durch den geringsten Spreitungsdruck im Vergleich zu den anderen Alkaloiden 1, 2 und 3 auszeichnet (LANG et al., 2012). Deshalb ist *S. solutus* nicht in der Lage annähernd so schnell wie *S. comma* zu spreiten. Jedoch bewohnen *S. solutus* und *S. comma* auch nicht das selbe Biotop; während Spreiten essentiell für das Überleben von *S. comma* ist, der in offenen Biotopen in der Nähe von Gewässern lebt, ist das Vermeiden der Infektion durch Mikroorganismen essentiell für *S. solutus*, der in Sümpfen und feuchtem Detritus lebt (HORION, 1963), was das Wachstum schädlicher Mikroorganismen nur umso mehr fördert. Die bei *S. solutus* vorkommenden Drüsenverbindungen 3 und 4 gewährleisten einen effektiveren Schutz als die Alkaloide 1 und 2 gegen den Befall durch Mikroorganismen wenn das Sekret über die Körperoberfläche verteilt wird (KOVAC & MASCHWITZ, 1990; BETZ, 1999; LUSEBRINK, 2007; LUSEBRINK et al., 2008b; SCHIERLING et al., 2013). Es liegt also die Annahme nahe, dass die artspezifische Drüsenkomposition jeder *Stenus*-Art bezüglich der am besten an die Charakteristika der Habitate, die die Käfer bewohnen, angepassten Sekretkomposition optimiert worden ist. Deshalb erscheint eine sekundäre Reduktion chemotaxonomisch abgeleiteter Alkaloide bei Vertretern der basalen Piperidin-Gruppe plausibel im Prozess der chemischen Evolution. Jedoch deutet die Topologie der konstruierten Bäume bezüglich der Pyridin- und Epoxy Piperidein-Gruppe auf eine enge Verwandtschaft zwischen den Arten der chemotaxonomisch höher evolvierten Stufe aufgrund molekularer Analysen mit den Sequenzen der COI, 16S rRNA und des Histon H3-Gens hin.

## 5 Zusammenfassung

Die Staphylinidae-Unterfamilie der Steninae, bestehend aus den Gattungen *Stenus* und *Dianous*, besitzt - wie fast alle Kurzflügler - hoch komplexe paarige Abdominalwehrdrüsen. Diese Pygidialdrüsen beinhalten ein artspezifisches multifunktionales Sekret, das hauptsächlich aus den Alkaloiden Stenusin, Norstenusin, 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin und Cicindeloin, sowie den Terpenen  $\alpha$ -Pinen, 1,8-Cineol und 6-Methyl-5-hepten-2-on besteht. Das Sekret erfüllt zahlreiche essentielle Aufgaben für die Käfer: wenn es mittels Sekretputzen („Secretion Grooming“) auf der gesamten Körperoberfläche verteilt wird, schützt es zuverlässig vor Verpilzung und Besiedelung durch schädliche Mikroorganismen. Gleichzeitig fungiert das Sekret als Fraßdeterrent gegenüber Wirbeltieren (Fische und Vögel) und Insekten (Ameisen). Doch das wohl herausragendste Charakteristikum dieses Sekretes stellt dessen Oberflächenaktivität dar. Gelangt ein Vertreter der Steninae, die überwiegend feuchte Habitate bewohnen, in ein offenes Gewässer, wird eine geringe Menge des Pygidialdrüsensekretes auf die Wasseroberfläche abgegeben. Unmittelbar nach der Abgabe bildet sich ein monomolekularer Film, an dessen Front der Käfer mit teilweise hohen Geschwindigkeiten vorangetragen wird und sich so entweder vor potentiellen Prädatoren oder ans Ufer retten kann. Dieses Phänomen wird Spreitung genannt und ist einzigartig im Tierreich. Die vorliegende Dissertationsschrift befasst sich eingehend mit dieser besonderen Fortbewegungsart der Steninae und den physikochemischen Eigenschaften der oben erwähnten Drüsenverbindungen. Zahlreiche *Stenus*-Arten wurden auf ihr Spreitungsvermögen untersucht und deren Verhalten ethologisch ausgewertet. Darüber hinaus wurden erstmals sowohl die Spreitungsdrücke der bereits genannten Drüsenverbindungen als auch die Spreitungsdrücke naturidentischer Sekretkompositionen einiger Beispielarten am Tensiometer ermittelt. Aus diesen Messungen geht hervor, dass 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin durch den höchsten Spreitungsdruck charakterisiert ist. Ob überhaupt Spreitungsverhalten von den Käfern gezeigt wird und durch welche Eigenschaften sich dieses auszeichnet, hängt von der Habitatwahl der Käfer, von Sekretsparmechanismen und von physiologischen Charakteristika der einzelnen *Stenus*-Arten ab. Neben der Untersuchung des Spreitens beschäftigt sich die vorliegende Arbeit auch mit generellen Fragestellungen die chemische Ökologie der Steninae betreffend. Erstmals wurden *Stenus*-Larven bezüglich potentielltem Spreitungsvermögen, der Präsenz von für Steninae-Imagines typischen Drüsenverbindungen und allgemeinen physiologischen Eigenschaften analysiert. Der Pygidialdrüseninhalt von Imagines weiterer *Stenus*- und *Dianous*-Arten wurde spurenanalytisch untersucht; jedoch konnten keine noch unbekanntes Naturstoffe oder Biosynthesestufen in den Sekreten festgestellt werden. Besonderes Augenmerk lag bei diesem Teilprojekt auf der noch nicht analysierten myrmecophilen *Stenus*-Art *S. aterrimus*, deren Integra-

tion in ihre Wirtsameisennester erstmals Gegenstand näherer Untersuchungen war. Biotests zur möglichen Funktion des Pygidialdrüsensekretes als Spinnendeterrent oder als topikal wirkendes Wehrsekret runden die Analysen zur chemischen Ökologie der Steninae ab. Der zweite Hauptaspekt der vorliegenden Dissertationsschrift neben der Spreitung stellen molekularphylogenetische Analysen der Steninae basierend auf den Gensequenzen der Cytochrom I Oxidase (COI), der 16S rRNA und des Histon H3-Gens dar. Die erstellten Stammbäume (Maximum Likelihood-Verfahren und Bayesische Analyse) werden mit einem auf der Basis niedermolekularer Wirkstoffe beruhenden chemotaxonomischen Ansatz in Zusammenhang gebracht. Dieser Ansatz basiert hierbei auf der artspezifischen Verteilung und Biosynthese der vier Alkaloide bei Vertretern der Steninae, woraus drei chemotaxonomische Gruppen resultieren: Vertreter der basalen Piperidin-Gruppe besitzen Stenusin und Norstenusin in ihren Pygidialdrüsen; Vertreter mit der abgeleiteten Verbindung 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin im Sekret stellen die Pyridin-Gruppe dar und Steninae, deren Drüsen Cicindeloin beinhalten, repräsentieren die chemotaxonomisch am höchsten evolvierte Epoxy-piperidein-Gruppe. Diese Gruppierungen werden durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten molekularphylogenetischen Analysen unterstützt und die Annahme, dass der Ursprung der Gattung *Dianous* innerhalb der paraphyletischen Gattung *Stenus* liegt, wird hierbei weiter untermauert.

## 6 Summary

Like almost all staphylinid beetles, the subfamily of the Steninae comprising the genera *Stenus* and *Dianous* possesses highly evolved pairs of abdominal defensive glands. These pygidial glands contain a species-specific multifunctional secretion mainly consisting of the alkaloids stenusine, norstenusine, 3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine and cicindeloin, as well as the terpenes  $\alpha$ -pinene, 1,8-cineole and 6-methyl-5-hepten-2-one. The secretion performs several essential tasks: if it is spread over the entire body surface by secretion grooming activities, beetles are protected from infestation by fungi and other harmful microorganisms like bacteria. Furthermore, the secretion serves as a feeding deterrent against vertebrates (fish and birds) and insects (ants). But the most extraordinary characteristic of the secretion is its surface activity: if a representative of the Steninae inhabiting mostly wet biotopes attains into water accidentally, a small amount of pygidial gland secretion is emitted on the water surface. Immediately after emission a monomolecular film is built by the secretion constituents, whose front pushes the beetles away with high velocity in order to save themselves from drowning or predation. This phenomenon is called skimming; it is unique within the animal kingdom. This dissertation deals with this special movement of the Steninae on the water surface and also with physicochemical properties of the secretion compounds already mentioned. The skimming potential of many *Stenus*-species has been analyzed and the beetles' skimming activity was investigated also from an ethological point of view. For the first time spreading pressures of all secretion constituents mentioned before were measured at a tensiometer, additionally the spreading pressures of naturally identical secretion compositions of some species have been measured. These measurements show that 3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine is characterized by the highest spreading pressure. Skimming activity and characteristics of skimming behaviour depend on different habitat claims of the beetles, secretion saving mechanisms and physiological properties of every *Stenus*-species. Besides investigations of skimming this dissertation also deals with general questions concerning chemical ecology of the Steninae. For the first time *Stenus*-larvae were investigated regarding skimming ability, possession of the adults' secretion compounds and common physiological features. Furthermore, the pygidial gland content of other *Stenus*- and *Dianous*-species were investigated by trace analysis; neither unknown natural products nor new intermediate stages of biosynthesis could be found in these secretions. In this context, special attention was paid to not yet analyzed myrmecophilic *Stenus*-species *S. aterrimus*, whose integration in its host ant colonies was also investigated. Last but not least, it has been analyzed whether the secretion would work as a deterrent against spiders and could exhibit potential topical effects. The second most important issue of this dissertation besides skimming are molecular phylogenetic analyses of the Steninae based on gene sequences of Cyto-

chrom I Oxidase (COI), 16S rRNA and Histon H3-gene. The constructed phylogenetic trees (Maximum Likelihood and Bayesian Analysis) are discussed on the basis of a chemotaxonomic approach using low-molecular substances. This chemotaxonomy relies on the distribution and biosynthesis of the four alkaloids of the Steninae resulting in three chemotaxonomic groups: representatives of the basal piperidine-group possess stenusine and norstenusine in their glands; representatives featured by the derived gland compound 3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine form the pyridine-group and Steninae whose glands contain cicindeloline represent the chemotaxonomically most evolved epoxypiperidine-group. These groupings are supported by molecular phylogenetic analyses in this dissertation. Additionally, the assumption that genus *Dianous* originates within a paraphyletic *Stenus* is confirmed.

## A Anhang

### A.1 Herstellungsanleitung der 4%igen PFA-Lösung

- Natriumphosphat-Stammlösungen (Ausgangsstoffe: Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)
  - 1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 39,7 g auf 250 ml VE-Wasser
  - 1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 44,5 g auf 250 ml VE-Wasser
  - 0,1M Natriumphosphat-Puffer ( $\text{NaP}_i$ ), pH 7,4:
    - \* 22,6 ml 1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und
    - \* 77,4 ml 1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  auf 1 l mit VE-Wasser auffüllen
  - 0,1%-iges Natriumpyrophosphat ( $\text{Na}_4\text{PP}_i$ ): 0,1 g auf 100 ml VE-Wasser auffüllen und sterilfiltrieren (Porengröße: 0,22  $\mu\text{m}$ )
  - Alle Puffer werden autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert
- 3x Phosphat-gepufferte Saline (3x PBS; Ausgangsstoffe: Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)
  - NaCl: 22,8 g  $\rightarrow$  390 mM Endkonzentration
  - 0,1M Natriumphosphat-Puffer ( $\text{NaP}_i$ ), pH 7,4: 300 ml  $\rightarrow$  30 mM
  - VE-Wasser: 1000 ml
  - Autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern
  - 1x PBS (130 mM NaCl, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7,4): 3x PBS 1:3 verdünnen
- 4%-ige Paraformaldehydlösung (4%-iges PFA)
  - 1 g PFA (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) in 15 ml VE-Wasser unter Rühren auf 60°C erhitzen und mit einem Tropfen 2 M NaOH (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) lösen (Wichtig: Im Abzug arbeiten, Dämpfe nicht einatmen!)
  - 8,3 ml 3x PBS zugeben, pH mit einem Tropfen HCl (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) auf 7,2 einstellen
  - Mit VE-Wasser auf 25 ml auffüllen und sterilfiltrieren (0,22  $\mu\text{m}$  Porendurchmesser)
  - Im Dunkeln bei 4°C lagern und innerhalb eines Monats verbrauchen

A.2 Herstellungsanleitung des 1x TBE-Puffers

- Tris: 53,91 g (0,89 M)
- Borsäure: 27,50 g (0,89 M)
- EDTA (372,24): 3,72 g (0,02 M)
- A. bidest. ad 500,00 ml
- Gebrauchsfertig: 1:10 verdünnen

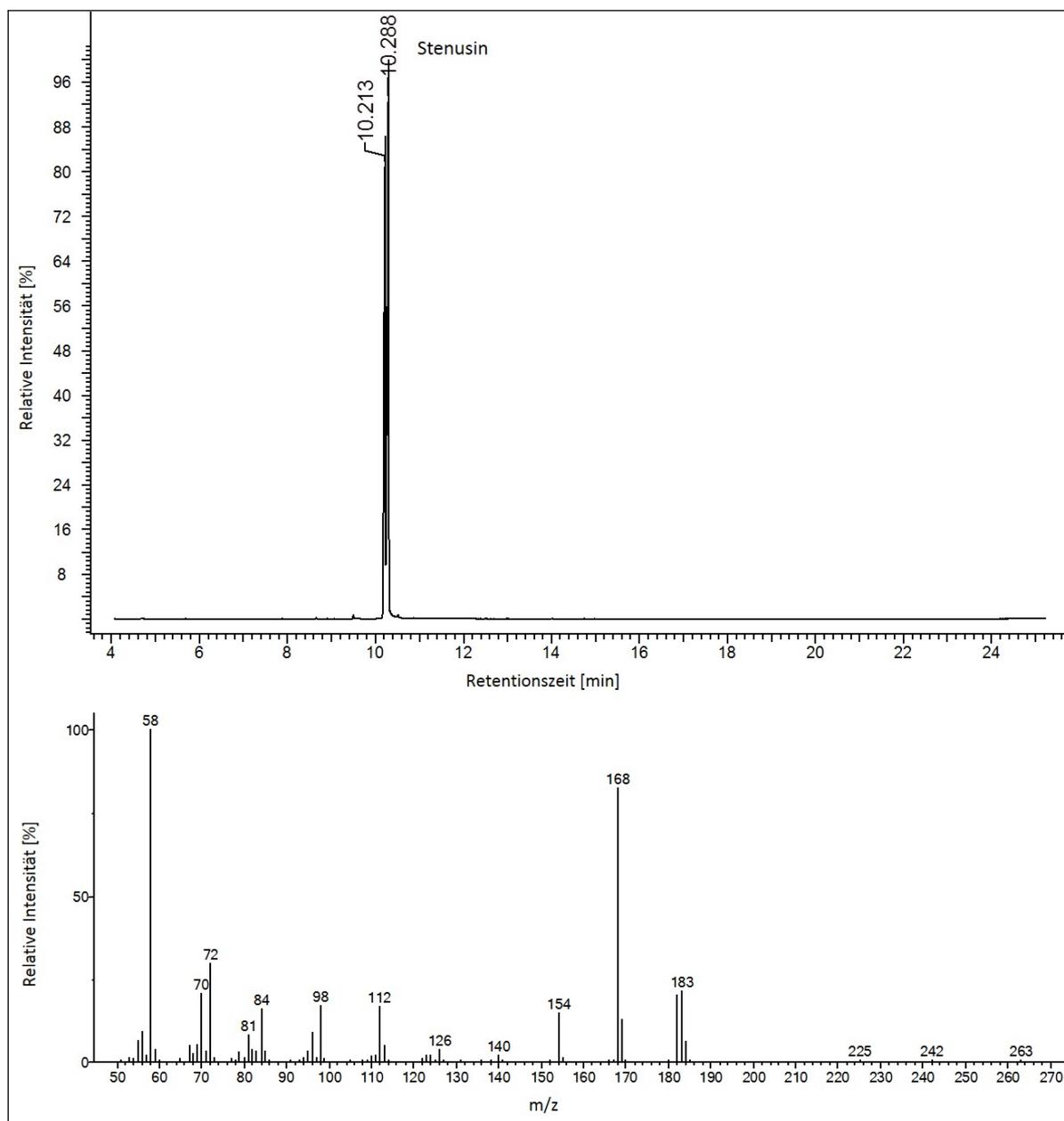
A.3 Herstellungsanleitung des 6x DNA-Loading Dye

- 4 M Harnstoff
- 50% Saccharose
- 0,5 M EDTA-Lösung
- 0,1% Bromphenolblaulösung
- A. bidest.

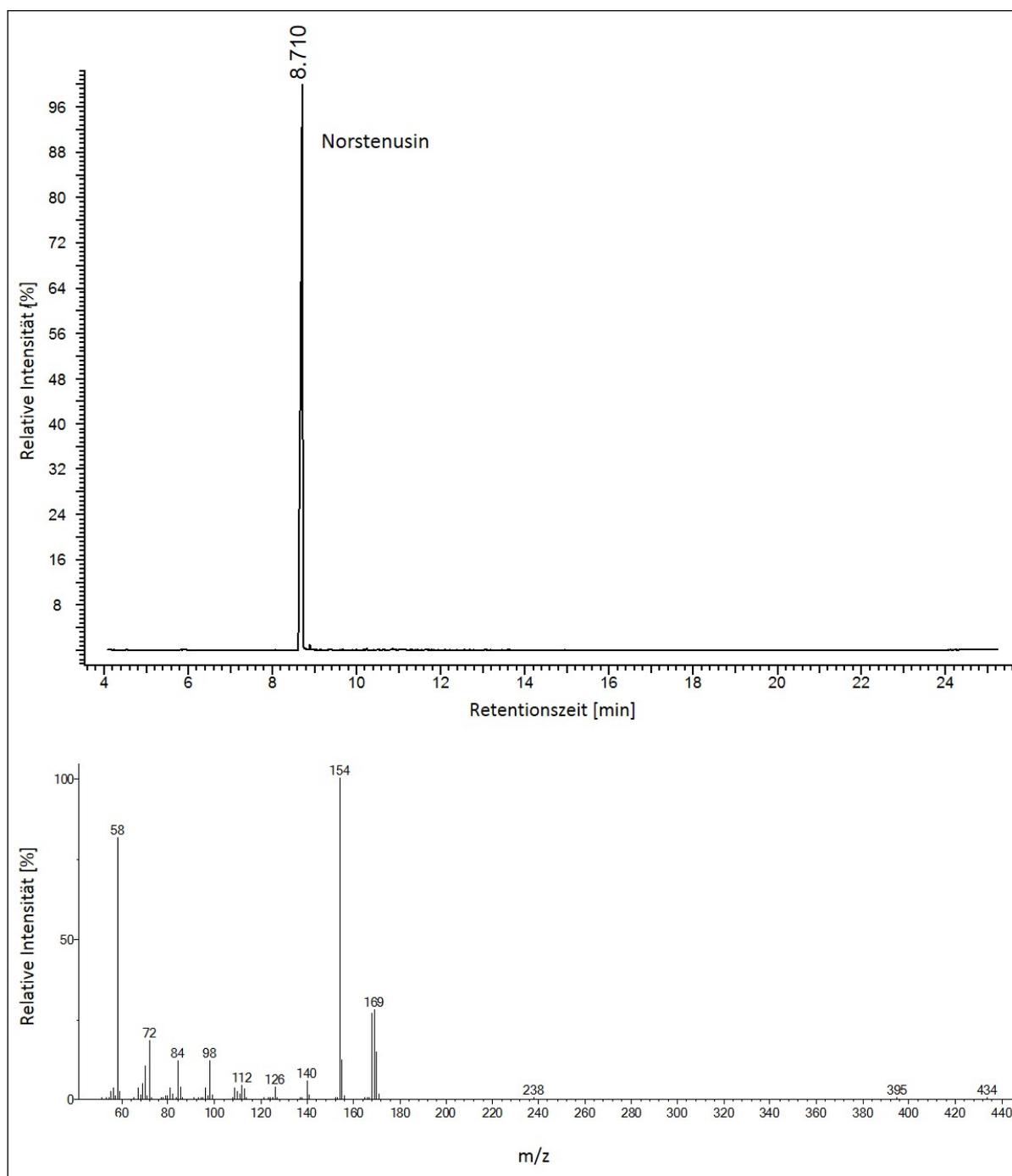
A.4 Herstellungsanleitung des PCR-Markers  $\lambda$  PST 1

- Bestandteile:
  - $\lambda$  DNA Conc.: (0,3 mg/ $\mu$ l)/ MBI Fermentas
  - Pst I Conc.: 10 units/ $\mu$ l/ MBI Fermentas
- Herstellung:
  - $\lambda$  DNA (50 ng): 167  $\mu$ l
  - Buffer O+ x1: 45  $\mu$ l
  - A. bidest.: 230  $\mu$ l
  - Pst I/80 Einheiten: 8  $\mu$ l
  - Über Nacht bei 37 °C
  - Zugabe von 50  $\mu$ l Loading Dye
  - 10 min bei 65 °C
  - Aliquotieren

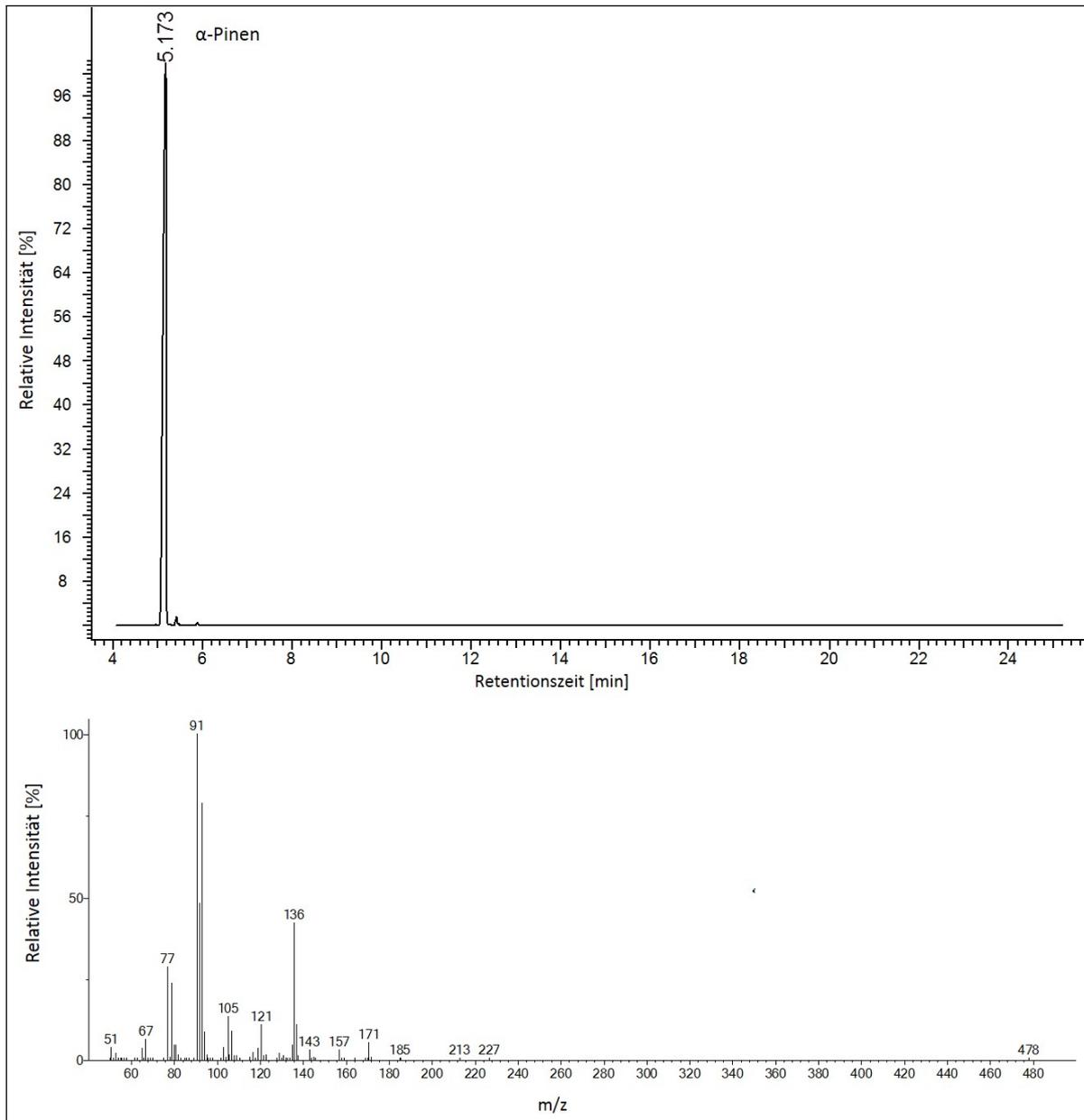
## A.5 TICs und MS der authentischen Drüsenverbindungen



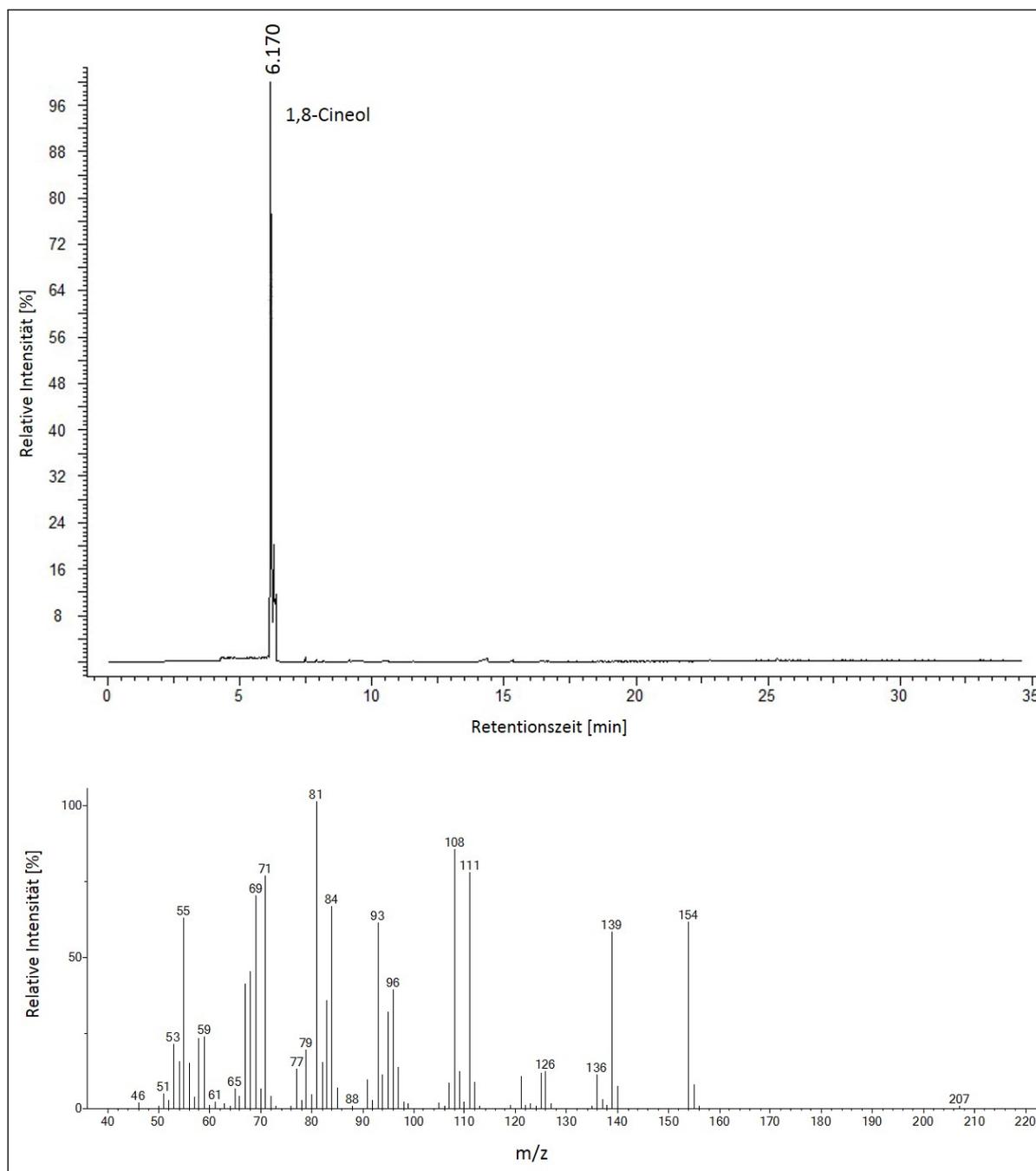
**Abbildung 21:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) und zugehöriges Massenspektrum (MS) der GC-MS-Messung von authentischem Stenusin. Im MS sind die typischen Fragmente mit den entsprechenden Intensitäten erkennbar.



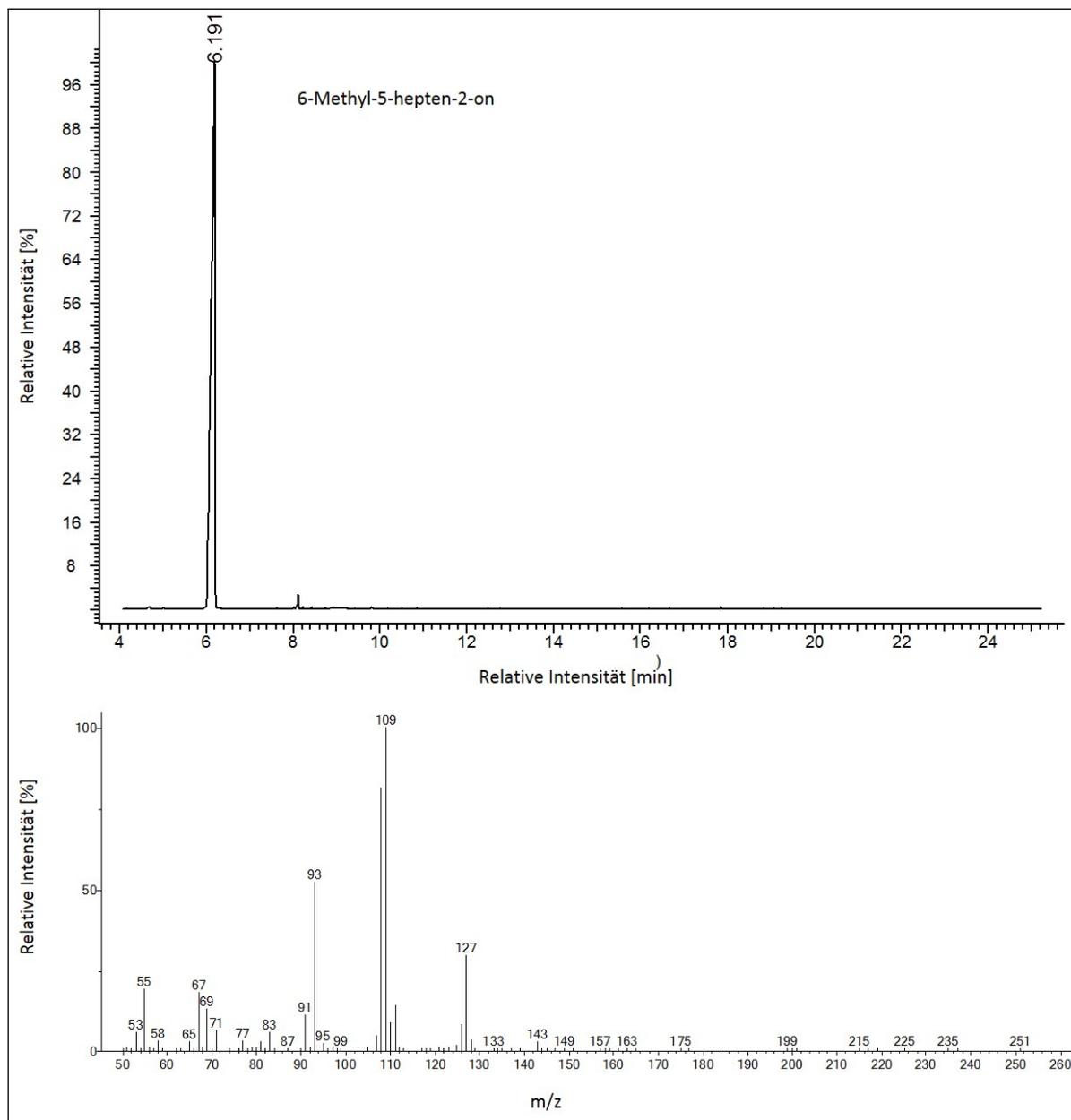
**Abbildung 22:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) und zugehöriges Massenspektrum (MS) der GC-MS-Messung von authentischem Norstenusin. Im MS sind die typischen Fragmente mit den entsprechenden Intensitäten erkennbar.



**Abbildung 23:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) und zugehöriges Massenspektrum (MS) der GC-MS-Messung von authentischem  $\alpha$ -Pinen. Im MS sind die typischen Fragmente mit den entsprechenden Intensitäten erkennbar.



**Abbildung 24:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) und zugehöriges Massenspektrum (MS) der GC-MS-Messung von authentischem 1,8-Cineol. Im MS sind die typischen Fragmente mit den entsprechenden Intensitäten erkennbar. Die Messung wurde in der zentralen Analytik durchgeführt, da sich Probleme am lehrstuhleigenen MS ergeben hatten. Daraus resultieren leichte Abweichungen bzgl. der RTs (RT des betreffenden Peaks im Sekret: 7,376 min; RT des Peaks der authentischen Verbindung: 6,170 min).



**Abbildung 25:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) und zugehöriges Massenspektrum (MS) der GC-MS-Messung von authentischem 6-Methyl-5-hepten-2-on. Im MS sind die typischen Fragmente mit den entsprechenden Intensitäten erkennbar.

## A.6 p-Werte-Tabelle zu Abb. 19

**Tabelle 14:** P-Werte multipler Vergleiche zwischen *D. coerulea* und neun *Stenus*-Arten

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A		n. s.	n. s.	n. s.	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001
B	n. s.		n. s.	n. s.	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	0,002	p<0.0001	p<0.0001
C	n. s.	n. s.		n. s.	p<0.0001	0,001	p<0.0001	0,003	p<0.0001	p<0.0001
D	n. s.	n. s.	n. s.		0,001	n. s.	n. s.	n. s.	0,002	0,012
E	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	0,001		n. s.				
F	p<0.0001	p<0.0001	0,001	n. s.	n. s.		n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
G	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	n. s.	n. s.	n. s.		n. s.	n. s.	n. s.
H	p<0.0001	0,002	0,003	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.		n. s.	n. s.
I	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	0,002	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.		n. s.
J	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	0,011	n. s.					

p-Werte zweiseitig; Kruskal-Wallis-H-Test; H (Freiheitsgrade=9; n=233)=144,67; p<0,001)/in Statistica 8 implementierte post-hoc-Prozedur; A=*D. coerulea*, B=*S. biguttatus*, C=*S. comma*, D=*S. guttula*, E=*S. flavipes*, F=*S. latifrons*, G=*S. fulvicornis*, H=*S. tarsalis*, I=*S. similis*, J=*S. solutus*; n. s.=nicht signifikant

## B Literaturverzeichnis

- ADAMSON, A. W., GAST, A. P. (1997). Physical chemistry of surfaces. Wiley VCH. New York.
- AKINO, T. (2002). Chemical camouflage by myrmecophilous beetles *Zyras comes* (Coleoptera: Staphylinidae) and *Diaritiger fossulatus* (Coleoptera: Pselaphidae) to be integrated into the nest of *Lasius fuliginosus* (Hymenoptera: Formicidae). Chemoecology 12:83–89.
- BALDO, A. M., DONALD, H. L., STRAUSBAUGH, L. D. (1999). Potentials and limitations of histone repeat sequences for phylogenetic reconstruction of *Sophophora*. Mol. Biol. Evol. 16:1511–1520.
- BARTH, R. (1952). Die Fangdrüsen an den Beinen von *Zelus (Diplocodus) leucogrammus* (PERTY 1834) (Heteroptera, Reduviidae). Zool. Jahrb. Anat. 73:325–336.
- BAUER, T. (1982). Prey-capture in a ground-beetle larva. Anim. Behav. 30:203–208.
- BAUER, T. (1985). Different adaptation to visual hunting in three ground beetle species of the same genus. Insect Physiol. 31(8):593–601.
- BAUER, T., DESENDER, K., MORWINSKY, T., BETZ, O. (1998). Eye morphology reflects habitat demands in three closely related ground beetle species (Coleoptera: Carabidae). J. Zool. Lond. 245:467–472.
- BELLMANN, H. (2006). Kosmos-Atlas Spinnentiere Europas, 3. Auflage, Franckh-Kosmos Verlag. Stuttgart.
- BETZ, O. (1996). Function and evolution of the adhesion-capture apparatus of *Stenus* species (Coleoptera: Staphylinidae). Zoomorphology 116:15–34.
- BETZ, O. (1998a). Comparative studies on the predatory behaviour of *Stenus* spp. (Coleoptera: Staphylinidae): the significance of its specialized labial apparatus. J. Zool. Lond. 244:527–544.
- BETZ, O. (1998b). Life forms and hunting behaviour of some Central European *Stenus* species (Coleoptera, Staphylinidae). Appl. Soil Ecol 9:69–74.
- BETZ, O. (1999). A behavioural inventory of adult *Stenus* species (Coleoptera: Staphylinidae). J. Nat. Hist. 33:1691–1712.

- BETZ, O. (2000). Beziehungen zwischen Morphologie, Verhalten und Ökologie bei Kurzflügelkäfern der Gattung *Stenus* (Coleoptera: Staphylinidae).. Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent. 12:429-433.
- BETZ, O. & FUHRMANN, S. (2001). Life history traits in different life forms of predaceous *Stenus* beetles (Coleoptera, Staphylinidae) living in waterside environments. Neth. J. Zool. 51:371-393.
- BETZ, O. (2006). Der Anpassungswert morphologischer Strukturen: Integration von Form, Funktion und Ökologie am Beispiel der Kurzflügelkäfergattung *Stenus* (Coleoptera: Staphylinidae). Entomologie heute 18:3-26.
- BILLARD, G. & BRUYANT, C. (1905). Sur une mode particulier de locomotion de certains *Stenus*. C. R. Soc. Biol. 59:102-103.
- BLUM, M. S. (1981). Chemical defenses of arthropods. Academic Press. New York.
- BUSH, J. W. M. & HU, D. L. (2006). Walking on water: biolocomotion at the interface. Annu. Rev. Fluid Mech. 38:339-369.
- CAMERON, M. (1930). The Fauna of British India including Ceylon and Burma. Coleoptera: Staphylinidae, Vol. 1 (Micropeplinae, Oxytelinae, Oxyporinae, Steninae and Euaesthetinae). Taylor & Francis. London.
- CILIA, V., LAFAY, B., CHRISTEN, R. (1996). Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences and their effect on phylogenetic analyses at the species level. Mol. Biol. Evol. 13:451-461.
- CLARKE, D. J. & GREBENNIKOV, V. V. (2009). Monophyly of Euaesthetinae (Coleoptera: Staphylinidae): phylogenetic evidence from adults and larvae, review of austral genera, and new larval descriptions. Syst. Entomol. 34:346-397.
- COLGAN, D. J., MCLAUCHLAN, A., WILSON, G. D. F., LIVINGSTON, S. P., EDGECOMBE, G. D., MACARANAS, J., CASSIS, G., GRAY, M. R. (1998). Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. Aust. J. Zool. 46:419-437.
- CONNERT, J. (1974). Zur Strukturaufklärung des *Stenus*ins. Doktorarbeit (Universität Heidelberg).
- COWDRY, E. V. (1922). The Distribution of *Rickettsia* in the tissues of insects and arachnids. Laboratories of The Rockefeller Institute for Medical Research.

- DARRIBA, D., TABOADA, G. L., DOALLO, R., POSADA, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9:772.
- DE MARZO, L. (1994). Simbiosi batterica in *Stenus comma peroculatus* Puthz (Coleoptera: Staphylinidae). *Atti XVII Congresso nazionale italiano di Entomologica Udine* 13-18:335-338.
- DETTNER, K. (1985). Ecological and phylogenetic significance of defensive glands from pygidial glands of Hydradephaga (Coleoptera). *P. Acad. Nat. Sci. Phil.* 137:156-171.
- DETTNER, K. (1987). Chemosystematics and evolution of beetle chemical defense. *Annu. Rev. Entomol.* 32:17-48.
- DETTNER, K. (1991a). Chemische Abwehrmechanismen bei Kurzflüglern (Coleoptera: Staphylinidae). *Jber. naturwiss. Ver. Wuppertal* 44:50-58.
- DETTNER, K. (1991b). Solvent-dependent variability of effectiveness of quinone-defensive systems of Oxytelinae beetles (Coleoptera: Staphylinidae). *Entomol. Gener.* 15:275-292.
- DETTNER, K. (1993). Defensive secretions and exocrine glands in free-living Staphylinid beetles - their bearing on phylogeny (Coleoptera: Staphylinidae). *Biochem. Syst. Ecol.* 21:143-162.
- DETTNER, K. & LIEPERT, C. (1994). Chemical mimicry and camouflage. *Annu. Rev. Entomol.* 39:129-154.
- DETTNER, K., SCHEUERLEIN, A., FABIAN, P., SCHULZ, S., FRANCKE, W. (1996). Chemical defense of giant springtail *Tetodontophora bielensis* (Waga) (Insecta: Collembola). *J. Chem. Ecol.* 22:1051-1074.
- DETTNER, K. (2003). Insekten als Nahrungsquelle, Abwehrmechanismen. In: DETTNER, K., PETERS., W. (Hrsg.) *Lehrbuch der Entomologie*, 2. Auflage:555-599, Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg/Berlin.
- DINAPOLI, A., TAMER, C., FRANSSSEN, S., NADUVILEZHATH, L., KLUSMANN-KOLB, A. (2007). Utility of H3-gene sequences for phylogenetic reconstruction — a case study of heterobranch Gastropoda. *Bonn. Zool. Beitr.* 55:191-202.
- DOOLITTLE, W. F. (1999). Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* 284:2124-2128.

- DÖRFLER, H. D. (1994). Grenzflächen- und Kolloidchemie. Wiley-VCH. Weinheim.
- EDGAR, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32:1792–1797.
- EDWARDS, J. S. (1966). Observations on the life history and predatory behaviour of *Zelus exsanguis* (STÅL) (Heteroptera: Reduviidae). *Proc. R. Entomol. Soc. Lond. (A)* 41:21-24.
- EISNER, T. (1970). Chemical defense against predation in arthropods. In: SONDEHEIMER, E., SIMEONE, J. B. (Hrsg.) *Chemical Ecology:157-217*, Academic Press. New York.
- EISNER, T. (2003). *For love of insects*. Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, MA.
- EISNER, T., EISNER, M., SIEGLER, M. (2005). *Secret weapons: defenses of insects, spiders, scorpions, and other many-legged creatures*. Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, MA.
- EISNER, T., SMEDLEY, S. R., YOUNG, D. K., EISNER, M., ROACHT, B., MEINWALD, J. (1996). Chemical basis of courtship in a beetle (*Neopyrochroa flabellata*): Cantharidin as precopulatory enticing agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6494-6498.
- EVANS, D. L., SCHMIDT, J. O. (1990). *Insect defenses - adaptive mechanisms and strategies of prey and predators*. State University of New York Press. New York.
- FRANCKE, W., DETTNER, K. (2005). Chemical signalling in beetles. In: SCHULZ, S. (Hrsg.) *Topics in current chemistry*, Vol. 240:85–166, Springer-Verlag. Heidelberg.
- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R., VRIJENHOEK, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3:294–297.
- GAINES, G. L. (1966). *Insoluble monolayers at liquid–gas interfaces*. Wiley-VCH. New York.
- GREBENNIKOV, V. V. & NEWTON, A. F. (2009). Good-bye Scymaenidae, or why the ant-like stone beetles should become megadiverse Staphylinidae sensu latissimo (Coleoptera). *Eur. J. Entomol.* 106:275–301.

- GUINDON, S. & GASCUEL, O. (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Syst. Biol.* 52:696–704.
- HALL, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95–98.
- HANSEN, M. (1997). Phylogeny and classification of the staphyliniform beetle families (Coleoptera). *Biol. Skr. Dan. Vid. Sel.* 48:1–339.
- HEBERT, P. D. N., CYWINSKA, A., BALL, S. L., DEWAARD, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B* 270:313–321.
- HEETHOFF, M., LAUMANN, M., WEIGMANN, G., RASPOTNIG, G. (2011). Integrative taxonomy: combining morphological, molecular and chemical data for species delineation in the parthenogenetic *Trhypochthonius tectorum* complex (Acari Oribatida, Trhypochthoniidae). *Front. Zool.* 8:2.
- HEMP, C., HELLER, K. G., KEHL, S., WARCHALOWSKA-SILWA, E., WÄGELE, J. W., HEMP, A. (2010). The *Phlesirtes* complex (Orthoptera, Tettigoniidae, Conocephalinae, Conocephalini) reviewed: integrating morphological, molecular, chromosomal and bioacoustic data. *Syst. Entomol.* 35:554–580.
- HERMAN, L. H. (2001). Catalog of the Staphylinidae (Insecta: Coleoptera). 1758 to the end of the second millennium. I. Introduction, History, Biographical sketches, and Omaliine group, *Bulletin of the American Museum of Natural History* 265:1-650, American Museum of Natural History. New York.
- HESSE, M. (2000). Alkaloide, Fluch oder Segen der Natur. Wiley-VCH. Weinheim.
- HONDA, K. (1983). Defensive potential of components of the larval osmeterial secretion of papilionid butterflies against ants. *Physiol. Entomol.* 8:173–179.
- HORION, A. (1963). Faunistik der mitteleuropäischen Käfer Vol. 9 Staphylinidae 1. Teil Micropeplinae bis Euaesthetinae. Kommissionsverlag Buchdruckerei August Feyel. Überlingen.
- HOWARD, R. W., STANELY-SAMUELSON, D. W., AKRE, R. D. (1990). Biosynthesis and chemical mimicry of cuticular hydrocarbons from the obligate predator *Microdon albicomatus* Novak (Diptera: Syrphidae) and its ant prey *Myrmica incompleta* Provancher (Hymenoptera: Formicidae). *J. Kans. Entomol. Soc.* 63:437–443.

- HOWARD, R. W. (1993). Cuticular hydrocarbons and chemical communication. In: STANELY-SAMUELSON, D. W., NELSON, D. R. (Hrsg.) *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology*. Lincoln/NE. University of Nebraska Press.
- HÖLLDOBLER, B., WILSON, E. O. (1990). *The Ants*:732 ff, Springer-Verlag. Berlin/Heidelberg/New York.
- Homepage des Spinnenbestimmungsschlüssels: <http://www.araneae.unibe.ch>
- HUNT, T., BERGSTEN, J., LEVKANICOVA, Z., PAPADOPOULOU, A., JOHN, O. S., WILD, R., HAMMOND, P. M., AHRENS, D., BALKE, M., CATERINO, M. S., GOMEZ-ZURITA, J., RIBERA, I., BARRACLOUGH, T. G., BOCAKOVA, M., BOCAK, L., VOGLER, A. P. (2007). A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science* 318:1913–1916.
- HUTH, A. & DETTNER, K. (1990). Defense chemicals from abdominal glands of 13 rove beetle species of subtribe Staphylinina (Coleoptera: Staphylinidae, Staphylininae). *J. Chem. Ecol.* 16:2691-2711.
- JANDA, J. M. & ABBOTT, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 9:2761–2764.
- JENKINS, M. F. (1957). The morphology and anatomy of the pygidial glands of *Dianous coerulescens* Gyllenhal (Coleoptera: Staphylinidae). *P. R. Entomol. Soc. Lond.* 32:159-169.
- JENKINS, M. F. (1960). On the method by which *Stenus* and *Dianous* (Coleoptera: Staphylinidae) return to the bank of a pool. *Trans. R. Ent. Soc. Lond.* 112:1–14.
- KAWAMOTO, F., KUMADA, M. (1984). Biology and venoms of Lepidoptera. In: TU, A. T. (Hrsg.) *Handbook of Natural Toxins, Vol. 2. Insect Poisons, Allergens, and Other Invertebrate Venoms*. Dekker. New York.
- KELLNER, R. L. L. & DETTNER, K. (1996). Differential efficacy of toxic pederin in deterring potential arthropod predators of *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae) offspring. *Oecologia* 107:293-300.
- KEMPSON, D., LLOYD, M., GHELARDI, R. (1963). A new extractor for woodland litter. *Pedobiologia* 3:1-21.
- KOCH, K. (1989). *Die Käfer Mitteleuropas: Ökologie*. Band 1. Goecke und Evers. Krefeld.

- KOCHER, T. D., THOMAS, W. K., MEYER, A., EDWARDS, S. V., PABO, S., VIL-LABLANCA, F. X., WILSON, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6196–6200.
- KOERNER, L., LAUMANN, M., BETZ, O., HEETHOFF, M. (2013). Loss of the sticky harpoon — COI sequences indicate paraphyly of *Stenus* with respect to *Dianous* (Staphylinidae, Steninae). *Zool. Anz.* 252:337–347.
- KOHLER, P. (1979). Die absolute Konfiguration des Stenusins und die Aufklärung weiterer Inhaltsstoffe des Spreitungsschwimmers *Stenus comma*. Doktorarbeit (Universität Heidelberg).
- KOVAC, D. & MASCHWITZ, U. (1990). Secretion-grooming in aquatic beetles (Hydradephaga): a chemical protection against contamination of the hydrofuge respiratory region. *Chemoecology* 1:31–138.
- KÜCHLER, S., KEHL, S., DETTNER, K. (2009). Characterization and localization of *Rickettsia* sp. in water beetles of genus *Deronectes*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68:201–211.
- LANG, C., SEIFERT, K., DETTNER, K. (2012). Skimming behaviour and spreading potential of *Stenus* species and *Dianous coerulescens* (Coleoptera: Staphylinidae). *Naturwissenschaften* 99:937–947.
- LANG, C., KOERNER, L., BETZ, O., PUTHZ, V., DETTNER, K. (2014). Phylogenetic relationships and chemical evolution of the genera *Stenus* and *Dianous* (Coleoptera: Staphylinidae). *Chemoecology* DOI:10.1007/s00049-014-0171-4.
- LARSEN, E.B. (1959). Traek af steninernes biologi. XI. *Not. Ent* 39:87–88.
- LARSEN, E.B. (1963). Bidrag til Steninernes biologi (Col.). *Ent. Medd.* 32:37–39.
- LESCHEN, R. A. B. & NEWTON, A. F. (2003). Larval description, adult feeding behaviour, and phylogenetic placement of *Megalopinus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Coleopt. Bull.* 57:469–493.
- LINSENMAIR, K. E. (1963). Eine bislang unbekannte Fortbewegungsart bei Insekten: das Entspannungsschwimmen. *Kosmos* 59:331–334.
- LINSENMAIR, K. E. & JANDER, R. (1963). Das Entspannungsschwimmen von *Velia* und *Stenus*. *Naturwissenschaften* 50:231.

- LOHSE, G. A. (1964). Staphylinidae I (Micropeplinae bis Tachyporinae). In: FREUDE, H., HARDE, K. W., LOHSE, G. A. (Hrsg.) Die Käfer Mitteleuropas. Vol. 4. Goecke & Evers. Krefeld.
- LOHSE, G. A. (1989). Ergänzungen und Berichtigungen zu Freude Harde Lohse „Die Käfer Mitteleuropas“. In: LOHSE G. A., LUCHT, W. (Hrsg.) Die Käfer Mitteleuropas, Vol. 12:121–184, Goecke & Evers. Krefeld.
- LUNAU, K. (2002). Warnen, Tarnen, Täuschen - Mimikry und andere Überlebensstrategien in der Natur. Wiss. Buchgesellschaft. Darmstadt.
- LUSEBRINK, I. (2007). Stereoisomerie, Biosynthese und biologische Wirkung des Stenusins sowie weitere Inhaltsstoffe der Pygidialdrüsen der Kurzflüglergattung *Stenus* (Staphylinidae, Coleoptera). Doktorarbeit am Lehrstuhl Lehrstuhl Tierökologie II (Universität Bayreuth).
- LUSEBRINK, I., DETTNER, K., SEIFERT, K. (2008a). Biosynthesis of stenusine. J. Nat. Prod. 71:743-745.
- LUSEBRINK, I., DETTNER, K., SEIFERT, K. (2008b). Stenusine, an antimicrobial agent in the rove beetle genus *Stenus* (Coleoptera, Staphylinidae). Naturwissenschaften 95:751-755.
- LUSEBRINK, I., DETTNER, K., SCHIERLING, A., MÜLLER, T., DAOLIO, C., SCHNEIDER, B., SCHMIDT, J., SEIFER, K. (2009). New pyridine alkaloids from rove beetles of the genus *Stenus* (Coleoptera: Staphylinidae). Z. Naturforsch. 64:271–278.
- MADDISON, W. P. (1989). Reconstructing character evolution on polytomous cladograms. Cladistics 5:365–377.
- MAUS, C., PESCHKE, K., DOBLER, S. (2001). Phylogeny of the genus *Aleochara* inferred from mitochondrial cytochrome oxidase sequence (Coleoptera: Staphylinidae). Mol. Phylogenet. Evol. 18:202–216.
- MÜLLER, T., GÖHL, M., LUSEBRINK, I., DETTNER, K., SEIFERT, K. (2012). Cicindeloline from *Stenus cicindeloides*—isolation, structure elucidation and total synthesis. Eur. J. Org. Chem. 2012:2323–2330.
- NAOMI, S-I (1985). The phylogeny and higher classification of the Staphylinidae and their allied groups (Coeloptera, Staphylinoidae). Esakia 23:1–27.

- NEUMANN, S. (1993). Die Analdrüsen der Spreitungsschwimmer (Coleoptera: Staphylinidae). Diplomarbeit am Lehrstuhl Tierökologie II (Universität Bayreuth).
- PAVAN, M. & BO, G. (1953). Pederin, toxic principle obtained in the crystalline state from the beetle *Paederus fuscipes*. Curt. Physiol. Comp. Oecol. 3:307-312.
- PETERS, W. (2003). Ernährung und Verdauung. In: DETTNER, K., PETERS., W. (Hrsg.) Lehrbuch der Entomologie, 2. Auflage:91-126, Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg/Berlin.
- PIFFARD, A. (1901). Steni gliding on the surface of water. Ent. Mo. Mag. 12:99.
- PONS, J., BARRACLOUGH, T. G., GOMEZ-ZURITA, J., CARDOSO, A., DURAN, D. P., HAZELL, S., KAMOUN, S., SUMLIN, W. D., VOGLER, A. P. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. Syst. Biol. 55:595–609.
- POSADA, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol. Biol. Evol. 25:1253–1256.
- PUTHZ, V. (1981). Was ist *Dianous* Leach, 1819, was ist *Stenus* Latreille, 1796? Oder: Die Aporie des Stenologen und ihre taxonomischen Konsequenzen (Coleoptera, Staphylinidae). Entomologische Abhandlungen, Staatliches Museum für Tierkunde, Dresden 44:87–132.
- PUTHZ, V. (2000). The genus *Dianous* Leach in China (Coleoptera: Staphylinidae) 261. Contribution to the knowledge of Steninae. Rev. Suisse Zool. 107:419–559.
- PUTHZ, V. (2001). Beiträge zur Kenntnis der Steninen CCLXIX. Zur Ordnung in der Gattung *Stenus* Latreille, 1796 (Staphylinidae, Coleoptera). Philippia 10:31–41.
- PUTHZ, V. (2005). Notes on Chinese *Dianous* Leach (Coleoptera: Staphylinidae). Entomol. Rev. Japan 60:137–152.
- PUTHZ, V. (2006). Revision der neotropischen *Stenus* (*Tesnus*) Arten (Coleoptera: Staphylinidae) 288. Beitrag zur Kenntnis der Steninen. Rev. Suisse Zool. 113:617–674.
- PUTHZ, V. (2008). *Stenus* Latreille und die segensreiche Himmelstochter (Coleoptera, Staphylinidae). Linzer biol. Beitr. 40:137–230.
- PUTHZ, V. (2012). Unterfamilie Steninae. In: ASSING, V., SCHÜLKE, M. (Hrsg.) Freude-Harde-Lohse-Klausnitzer - Die Käfer Mitteleuropas, Band 4: Staphylinidae 1 2:286-317, Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg.

- RIBERA, I., BILTON, D. T., VOGLER, A. P. (2003). Mitochondrial DNA phylogeography and population history of *Meladema* diving beetles on the Atlantic Islands and in the Mediterranean basin (Coleoptera, Dytiscidae). *Mol. Ecol.* 12:153–167.
- RIBERA, I., NILSSON, A. N., VOGLER, A. P. (2004). Phylogeny and historical biogeography of Agabinae diving beetles (Coleoptera) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 30:545–562.
- RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574.
- ROSTÁS, M. & BLASSMANN, K. (2009). Insects had it first: surfactants as a defence against predators. *Proc. R. Soc. B* 276:633–628.
- SCHAEFER, M. (2003). Wörterbuch der Ökologie, 4. Auflage:14, Spektrum Akademischer Verlag. Stuttgart.
- SCHIERLING, A., SCHOTT, M., DETTNER, K., SEIFERT, K. (2011). Biosynthesis of the defensive alkaloid (Z)-3-(2-methyl-1-butenyl)pyridine in *Stenus similis* beetles. *J. Nat. Prod.* 74:2231–2234.
- SCHIERLING, A., DETTNER, K., SCHMIDT, J., SEIFERT, K. (2012). Biosynthesis of the defensive alkaloid cicindeloine in *Stenus solutus* beetles. *Naturwissenschaften* 99:665–669.
- SCHIERLING, A. (2013). Die chemische Ökologie von Kurzflügelkäfern der Gattungen *Dianous* und *Stenus* (Coleoptera, Staphylinidae). Doktorarbeit am Lehrstuhl Lehrstuhl Tierökologie II (Universität Bayreuth).
- SCHIERLING, A. & DETTNER, K. (2013). The pygidial defense gland system of the Steninae (Coleoptera: Staphylinidae): Morphology, ultrastructure and evolution. *Arthropod Struct. Dev.* 42:197-208.
- SCHIERLING, A., SEIFERT, K., SINTERHAUF, S. R., RIESS, J. B., RUPPRECHT, J. C., DETTNER, K. (2013). The multifunctional pygidial gland secretion of the Steninae (Coleoptera: Staphylinidae): Ecological significance and evolution. *Chemoecology* 23:45-57.
- SCHILDKNECHT, H. (1970). The defensive chemistry of land and water beetles. *Angew. Chem. Internat. Edit. Engl.* 9:1–9.
- SCHILDKNECHT, H., KRAUSS, D., CONNERT, J., ESSENBREIS, H., ORFANIDES, N. (1975). The spreading alkaloid stenusine from the staphylinid *Stenus comma* (Coleoptera: Staphylinidae). *Angew. Chem. Internat. Edit. Engl.* 14:421–422.

- SCHILDKNECHT, H., BERGER, D., KRAUSS, D., CONNERT, J., GELHAUS, J., ESSENBREIS, H. (1976). Defense chemistry of *Stenus comma* (Coleoptera: Staphylinidae). J. Chem. Ecol. 2:1-11.
- SCHILDKNECHT, H. (1976). Chemische Ökologie — Ein Kapitel moderner Naturstoffchemie. Angew. Chem. 88:235–272.
- SCHILDKNECHT, H. (1977). Protective substances of arthropods and plants. Pont. Acad. Scient. Scripta Varia II 3:59–107.
- SCHMIDT, J. O. (1990). Predation prevention: chemical and behavioral counterattack. In: EVANS, D. L., SCHMIDT, J. O. (Hrsg.) Insect defenses. Adaptive mechanisms and strategies of prey and predators:227-228, State University of New York Press. New York.
- SCRIVEN, L. & STERNLING, C. (1960). The Marangoni effect. Nature 187:186–188.
- SHI, K. & ZHOU, H. Z. (2011). Taxonomy of the genus *Dianous* (Coleoptera: Staphylinidae: Steninae) in China and zoogeographic patterns of its distribution. Insect Sci. 18:363–378.
- SIEGEL, S., CASTELLAN, N. J. (1988). Nonparametric statistics for the behavioural sciences. McGraw-Hill. New York.
- SIMON, C., FRATI, F., BECKENBACH, A., CRESPI, B., LIU, H., FLOOK, P. (1994). Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Am. 87:651–701.
- SPERLING, F. A. H. & HICKEY, D. A. (1994). Mitochondrial DNA sequence variation in the spruce budworm species complex (Lepidoptera: Choristoneura). Mol. Biol. Evol. 11:656–665.
- STEIDLE, J. L. M. & DETTNER, K. (1993). Chemistry and morphology of the tergal gland of freelifving adult Aleocharinae (Coleoptera: Staphylinidae) and its phylogenetic significance. Syst. Entomol. 18:149-168.
- STOEFFLER, M., MAIER, T., TOLASCH, T., STEIDLE, J. L. M. (2007). Foreign-language skills in rove-beetles? Evidence for chemical mimicry of ant alarm pheromones in myrmecophilous *Pella* beetles (Coleoptera: Staphylinidae). J. Chem. Ecol. 33:1382–1392.
- STORCH, V., WELSCH, U., WINK, M. (2001). Evolutionsbiologie. Springer-Verlag. Berlin/Heidelberg/New York.

- SWOFFORD, D. L. (1998). PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- SZUJECKI, A. (1961). Klucze do Oznaczania Owadów Polski XIX, 24b. Państwowe Wydawnictwo Naukowe. Warszawa.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731–2739.
- TANG, L., LI, L. Z., CAO, G. H. (2011). On Chinese species of *Dianous* group I (Coleoptera, Staphylinidae Steninae). *ZooKeys* 111:67–85.
- THAYER, M. K. (2005). Staphylinidae. In: BEUTEL, R.G., LESCHEN, R. A. B. (Hrsg.) *Handbook of zoology, Coleoptera*, Vol. 1:296–344, De Gruyter. Berlin.
- THATCHER, T. H. & GOROVSKY, M. A. (1994). Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3 and H4. *Nucleic Acids Res.* 22:174–179.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequences alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.
- TRENCZEK, T. (1998). Endogenous defense mechanisms of insects. *Zoology* 101:298-315.
- VANDER MEER, R. K., MOREL L. (1998). Nestmate recognition in ants. In: VANDER MEER, R. K., BREED M. D., WINSTON M. L., ESPELIE K. E. (Hrsg.) *Pheromone Communication in Social Insects: Ants, Wasps, Bees, and Termites*:79-103, *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology*. Westview Press, Boulder, Colorado, USA.
- VULINEC, K. (1987). Swimming in whirligig beetles (Coleoptera: Staphylinidae): a possible role of the pygidial gland secretion. *Coleopt. Bull.* 41:151–153.
- WEIDNER, H. (1936). Beiträge zu einer Monographie der Raupen mit Gifthaaren. *Zeit. Angew. Entomol.* 23:432-484.
- WEINREICH, E. (1968). Über den Klebfangapparat der Imagines von *Stenus* Latr. (Coleopt., Staphylinidae) mit einem Beitrag zur Kenntnis der Jugendstadien dieser Gattung. *Z. Morph. Ökol. Tiere* 62:162–210.

- WEIRAUCH, C. (2006). Observations on the sticky trap predator *Zelus luridus* STÅL (Heteroptera, Reduviidae, Harpactorinae), with the description of a novel gland associated with the female genitalia. *Denisia*, zugleich Kataloge der OÖ. Landesmuseen Neue Serie 50 19:1169-1180.
- WERREN, J. H., ZHANG, W., GUO, L. R. (1995). Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 251:55-71.
- WICKLER, W. (1973). *Mimikry*. S. Fischer. Frankfurt.
- WHITMAN, D. W., BLUM, M. S., ALSOP, D. W. (1990). Allomonones: Chemicals for defense. In: EVANS, D. L., SCHMIDT, J. (Hrsg.) *Insect defenses: adaptive mechanisms and strategies of prey and predators*:289-351, State University of New York press. Albany.
- WITZ, B. W. (1990). Antipredator mechanisms in arthropods: A twenty year literature survey. *Fl. Entomol.* 73:71-99.
- WOLF, K. L. (1957). *Physik und Chemie der Grenzflächen*. Springer-Verlag. Berlin.
- YAMAOKA, R. (1990). Chemical approach to understanding interactions among organisms. *Physiol. Ecol. Japan* 27:31-52.
- ZHAO, C. Y. & ZHOU, H. Z. (2004). Five new species of the subgenus *Hemistenus* (Coleoptera: Staphylinidae, Steninae) from China. *Pan. Pac. Entomol.* 80:3-108.
- ZHOU, W., ROUSSET, F., O'NEILL, S. (1998). Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.* 265:509-515.

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung dieses Promotionsprojektes bedanken (DE 258/12-1 und SE 595/14-1). Weiterhin gilt mein herzlichster Dank vielen Personen, die diese Dissertation begleitet, betreut und überhaupt erst ermöglicht haben. Bei Herrn Prof. Dr. Dettner möchte ich mich für die Überlassung dieses interessanten Themas, für seine Betreuung und die zahlreichen hilfreichen Diskussionen herzlich bedanken. Auch Herrn Prof. Dr. Seifert (Lehrstuhl Organische Chemie) gilt größter Dank für seine interessanten Denkanstöße und Hilfestellungen bei chemischen Fragestellungen. Bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhles Tierökologie II möchte ich mich ebenfalls herzlichst für ihre Unterstützung während der gesamten Promotionszeit bedanken. Hierbei möchte ich besonders Dr. Andreas Schierling, Dr. Siegfried Kehl und Frau Andrea Kirpal erwähnen, die maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren und mich auch auf menschlicher Ebene sehr unterstützt haben.

Weiterhin bin ich Herrn Dr. Puthz für seine zahlreichen wertvollen Anmerkungen und sein großes Interesse an meiner Arbeit zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. Betz und Herrn Koerner (Universität Tübingen) möchte ich für ihre überaus wichtigen Ratschläge und ihre äußerst fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen der *Stenus*-Phylogenie danken.

Großer Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Hoffmann (BZKG) für die Bereitstellung des Tensiometers und an seine Mitarbeiter Dr. Lukas Wolf und Dr. Martin Reger für Hilfestellungen bei den Messungen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dr. Lacher (Lehrstuhl Organische Chemie) für die hervorragenden GC-MS-Messungen bedanken. Großer Dank gilt auch Frau Dr. Förster und Frau Heider (BIMF) für die REM-Aufnahmen, sowie Frau Grotjahn (Lehrstuhl Genetik) für die Mithilfe beim Erstellen der TEM-Aufnahmen.

Herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. Zerche für die Unterstützung bei der Behandlung myrmecophiler Fragestellungen.

Größter Dank gilt besonders meiner Familie und meinem Freund Markus Groß, die mich fortwährend durch diese manchmal nicht einfache Promotionszeit begleitet und unterstützt haben. Ebenso möchte ich an dieser Stelle meine Freunde, allen voran Silvia Krapp und Thomas Stahl erwähnen, die immer Halt boten, stets für mich da waren und so manche Situation zu entschärfen wussten.

## Eidesstattliche Versicherungen und Erklärungen

(§ 5 Nr. 4 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass keine Tatsachen vorliegen, die mich nach den gesetzlichen Bestimmungen über die Führung akademischer Grade zur Führung eines Doktorgrades unwürdig erscheinen lassen.

(§ 8 S. 2 Nr. 5 PromO)

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

(§ 8 S. 2 Nr. 7 PromO)

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

(§ 8 S. 2 Nr. 8 PromO)

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

(§ 8 S. 2 Nr. 9 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

Stegaurach, den 28.10.2014

Carolin Lang