

**Bedeutung der Geschmacksrezeptoren der
Termite *Schedorhinotermes lamanianus*
bei der Wahrnehmung von Holzinhaltstoffen**

Diplomarbeit

Im Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

Lehrstuhl für Tierphysiologie
Prof. Dr. Dietrich von Holst

vorgelegt von

Gregor Hardieß
aus Erfurt

Bayreuth, im September 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	6
2.1	Die Fokusart <i>Schedorhinotermes lamanianus</i>	6
2.1.1	Lebensraum und Lebensweise.....	6
2.1.2	Laborhaltung der Termiten.....	6
2.1.3	Die antennalen Geschmackssensillen: Morphologie und Anatomie	7
2.2	Verwendete Reizlösungen.....	8
2.2.1	Nicht-Alkaloide	8
2.2.2	Securinega-Alkaloide	8
2.2.2.1	Securinin der Firma SIGMA.....	8
2.2.2.2	Securinega-Alkaloide aus <i>Margaritaria discoidea</i> (BAILL.) WEBSTER.....	9
2.2.3	Herstellung der Testlösungen und Lagerung.....	9
2.2.3.1	Wahl des Lösungsmittels	9
2.2.3.2	Lagerung der Reizlösungen	10
2.3	Verwendete Untersuchungsmethoden.....	10
2.3.1	Gaschromatographische Analysen.....	10
2.3.2	Biotest – Filterpapier-Wahltest.....	11
2.3.2.1	Aufbau des Filterpapier-Wahltests	11
2.3.2.2	Durchführung des Filterpapier-Wahltests.....	12
2.3.2.3	Auswertung des Filterpapier-Wahltests.....	12
2.3.3	Neurophysiologische Untersuchungen	13
2.3.3.1	Antennale Kontaktchemorezeptoren als Untersuchungsobjekte	13
2.3.3.2	Präparation der Termiten	14
2.3.3.3	Registrierung und Reizung	15
2.3.3.4	Archivierung und Auswertung der Ableitungen.....	16
2.4	Statistik.....	18
3	Ergebnisse	19
3.1	Verhaltensuntersuchungen	19
3.1.1	Wirkung der Securinega-Alkaloide im Biotest.....	19
3.2	Gaschromatographische Analysen	22
3.3	Neurophysiologische Untersuchungen.....	24
3.3.1	Reaktion der TP-Sensillen I – III auf die Securinega-Alkaloide	24
3.3.1.1	Reaktion des TP I-Sensillum auf die Securinega-Alkaloide	24
3.3.1.2	Identifizierung der Neurone 1/I und 2/I im TP I-Sensillum	29
3.3.1.3	Reaktion des TP III-Sensillum auf die Securinega-Alkaloide	31
3.3.1.4	Reaktion des TP II-Sensillum auf die Securinega-Alkaloide.....	32

3.3.1.5	Identifizierung des alkaloidsensitiven Neurons 3/II im TP II-Sensillum	38
3.3.2	Neuron 3/II – ein alkaloidsensitiver Rezeptor	40
3.3.2.1	Zeitlicher Erregungsverlauf des alkaloidsensitiven Neurons 3/II.....	40
3.3.2.2	Hemmung des alkaloidsensitiven Neurons 3/II durch die Securinega- Alkaloide.....	41
3.3.3	Unterschiedliche Erregungsfrequenzen der Neurone 3/II in Abhängigkeit mit der Position des Antennensegmentes	44
4	Diskussion.....	46
4.1	Wirkung der Securinega-Alkaloide auf das Nageverhalten	46
4.2	Alkaloid-Wirkung auf die Kontaktchemorezeptoren	50
4.2.1	Der alkaloid-sensitive „deterrent receptor“	51
4.2.2	Die hemmende Wirkung der Securinega-Alkaloide auf die wassersensitiven Neurone.....	54
4.2.3	Die hemmende Wirkung der Securinega-Alkaloide auf den „deterrent receptor“	55
4.2.4	Der zeitliche Erregungsverlauf des „deterrent receptor“	57
4.2.5	Erhöhte Erregungsfrequenzen des „deterrent receptor“ bei Sensillen der ersten distalen Antennensegmente	58
4.3	Vergleich der Alkaloidwirkung auf das Verhalten und auf den Alkaloid-Rezeptor	59
5	Zusammenfassung.....	62
6	Literaturverzeichnis.....	63
7	Anhang	I-VI

1 EINLEITUNG

Mit „Mass march of termites into the deadly trap“ war kürzlich ein Artikel in Nature erschienen, welcher über die fleischfressende Kannenpflanze (*Nepenthes albomarginata*) berichtet. Diese Pflanzen haben sich im Laufe der Evolution auf Termiten, insbesondere der Gattung *Hospitalitermes*, als Nahrungsquelle spezialisiert, die sie mit einen besonderen Trick anlocken. Ein schmaler Saum weißer Härchen (Trichome) umrandet die Öffnung ihres Fangbehälters und wird von den Termiten zu Futterkugeln verarbeitet. Dabei können diese jedoch leicht in den mit Verdauungsekreten gefüllten Blütenkelch fallen (MEHRBACH *et al.*, 2002).

Dieser Fall stellt interessanterweise die Ausnahme beim Zusammenleben zwischen Pflanzen und Termiten dar, in der normalerweise ausschließlich Pflanzen von den Termiten als Nahrungsquelle genutzt werden. Alle 2200 vorkommenden Termitenarten lassen sich, in bezug auf ihre Nahrungspräferenzen, in Gras-, Laub- bzw. Holzverwerter einteilen und ernähren sich damit ausschließlich von pflanzlichem Material, sind also phytophag. Dabei nutzen rund $\frac{1}{4}$ aller Termitenarten Holz als Nahrung (DETTNER, 1999). Schon die Römer erkannten die unter anderem holzliebende und damit zerstörerische Eigenschaft der Termiten, was ihnen den Namen „Thermes“ (→ *dem Holz ein Ende bereiten*) einbrachte.

Termiten produzieren selbst aber keine Enzyme, welche die Zellulose, Hemizellulose und das Lignin ihrer Nahrung abbauen könnten und mussten so, in Analogie zu anderen Insekten, entsprechende Strategien entwickeln. Einerseits besitzen Termiten, wie die ihnen nahe verwandten Schaben, im Darm lebende Endosymbionten. Diese Flagellaten können die Nährstoffe aus den Wirtspflanzen aufschließen. Durch sie aufbereitet, kann das pflanzliche Material dann von vielen Termitenarten verwertet werden (KÖNIG & BREUNIG, 1997). Hingegen bedienen sich Vertreter der *Macrotermitinae* – Unterfamilie einer anderen Strategie, um die Nährstoffe zu gewinnen. Sie leben in enger Symbiose mit Pilzen der Gattung *Termitomyces*. Diese Ektosymbionten werden auf einem Substratgemisch aus Exkrementen und Pflanzenteilen herangezüchtet und die Termiten nutzen nur die Fruchtkörper als Nahrungsquelle (Krishna & Weesner, 1969). Die Pilze sind in der Lage, den wenig vorhandenen Stickstoff anzureichern und bieten so den Termiten eine vitamin- und einweißreiche Nahrung.

Die strikt phytophage Lebensweise von Termiten bedingt spezielle Anpassungen an die Nahrungswahl. Während visuelle und physikalische Aspekte bei der Wahl der Wirtspflanze oder des Pflanzenorgans eine wichtige Funktion haben, kommt der chemischen Beurteilung eine Schlüsselrolle zu (MULLIN *et al.*, 1994). Der unter anderem für diese Beurteilung entwickelte chemische Sinn unterteilt sich in zwei weitere Modalitäten, dem Geruchssinn (olfaktorisch) und dem Geschmackssinn (gustatorisch).

Im gesamten Taxon der Insekten sind Geschmacksrezeptoren weit verbreitet. Diesen kommen unter anderem drei wichtige Aufgabenbereiche zu. Zum einen dienen sie der Beurteilung der Güte des Lebensraumes (Habitat), was zum Beispiel die Wahl des Eiablageortes mit einbezieht (Oviposition). Weiterhin besitzen gustatorisch sensitive Rezeptoren die wichtige Aufgabe, die Nahrungsressourcen zu prüfen und zu identifizieren. Als letztes dienen die Rezeptoren der chemischen Kommunikation, indem sie intraspezifische Signale (z. B. Pheromone) perzipieren.

Viele Arbeiten untersuch(t)en diese Bereiche der Geschmackssinnesphysiologie und dadurch konnten bei einigen Insekten die Schwellen für verschiedene gustatorische Reize bestimmt werden. Vergleiche dieser Schwellen zeigen drei Klassen auf, in die sich diese einordnen lassen. Dabei liegen die experimentell bestimmten Schwellenkonzentrationen vieler primärer pflanzlicher Geschmacksstoffe – vorwiegend Salze und Zucker – bei 10^{-4} bis 10^{-1} M. So fand MIKUS (2000) bei der Termitenart *Schedorhinotermes lamanianus* Schwellenkonzentrationen für den Reiz NaCl von $3 - 10 \times 10^{-4}$ M. Eine weitere Gruppe für die Schwellenkonzentrationen bilden Reize der energieliefernden Biomoleküle wie ATP und ADP. Diese für blutsaugende Insekten wichtigen Geschmacksstoffe werden bei Schwellenkonzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-5} M wahrgenommen. Stoffe, die schon bei geringsten Konzentrationen reizwirksam werden, sind die zur chemischen Kommunikation verwendeten Pheromone. Ein bekanntes Beispiel hierfür stellt das HMP (host marking pheromone) der Kirschfruchtfliege (*Rhagoletis cerasi*) dar. Das Pheromon wird während der Eiablage auf eine Kirsche appliziert, was diese für andere Fliegen als schon belegte, erscheinen lässt. Die Reizschwelle liegt für das HMP bei 10^{-10} M und charakterisiert damit die empfindlichsten bekannten Geschmacksrezeptoren (STÄDLER, 1994).

Den bisher besprochenen, vorwiegend positiv auf das Verhalten des Insekts, wirkenden Stoffen, stehen Substanzen gegenüber, die als negativ vom Nervensystem interpretiert werden. Das Insekt kann somit zum aktiven Meiden der Pflanze oder des Pflanzenteiles veranlasst werden. Diese Stoffe werden als Phytonzide oder Deterrentien bezeichnet. Es sind hauptsächlich Produkte des sekundären Stoffwechsels der pflanzlichen Biosynthese. Der von phytophagen Insekten auf die Pflanzen ausgeübte Druck hat in der Pflanzenevolution zur Ausbildung dieser Stoffe geführt. Diese Deterrentien helfen den Pflanzen sich gegen potentielle Fraßfeinde zu schützen, indem sie die Schädlinge abweisen oder sogar töten können (NORRIS, 1986). Zu diesen von den Pflanzen gebildeten Sekundärstoffen gehören Terpene, Flavonoide, Glucoside und Alkaloide als wichtigste Gruppen. Hierbei sind Alkaloide zahlenmäßig an erster Stelle zu nennen, da sie mit über 40 % den größten Anteil von all diesen bekannten Stoffen einnehmen (SCHOONHOVEN, 1982).

Bis heute wurden viele dieser Stoffe hinsichtlich ihrer hemmenden Wirkung auf die Pflanzennutzung untersucht. Dabei beschränkten sich die Forschungen auf nur wenige Taxa der Insekten, wie zum Beispiel den Schmetterlingen und ihren Raupen oder den Fliegen. Dies liegt unter anderem darin begründet, dass bei diesen Beispielorganismen nur wenige Geschmacksrezeptoren an der Wahrnehmung von Inhaltsstoffen beteiligt sind. Da viele von ihnen als Schadinsekten eingestuft werden, erregen sie zudem wirtschaftliches Interesse.

Obwohl auch den Termiten als Holzschädlingen eine große ökonomische Bedeutung zukommt (HARRIS, 1969) – in den USA werden durch sie entstandene Schäden an Holzstrukturen auf jährlich 3 Milliarden US\$ geschätzt (SU & SCHEFFRAHN, 1990) – gibt es bis heute nur wenige Untersuchungen zum Thema Fraßhemmung durch Sekundärmetaboliten. Bisher wurde nur ein kleiner Teil der für Termitenresistenz verantwortlichen Pflanzeninhaltsstoffe identifiziert. Dabei handelt es sich meist um schwerflüchtige und wasserlösliche organische Moleküle (z. B. KAWAGUCHI *et al.*, 1989; GUTIÉRREZ *et al.*, 1999). Neben physikalischen Faktoren wie z. B. Holzhärte werden diese Sekundärmetaboliten als Hauptursache für Termitenresistenz diskutiert, da Extrakte aus den Hölzern abschreckend bis toxisch auf Termiten wirkten (z. B. GRACE *et al.*, 1989; REYE-SCHILPA *et al.*, 1995).

Wie Freilanduntersuchungen im Shimba-Hills National Reserve (Kenia) belegten, weist auch die Baumart *Margaritaria discoidea* (BAILL.) WEBSTER deutliche termitenresistente Eigenschaften gegenüber der Feuchtholztermite *S. lamanianus* auf (MIKUS *et al.*, 1997). Die Autoren konnten belegen, dass *M. discoidea*, obwohl der zweithäufigste Baum im untersuchten Habitat, nicht von *S. lamanianus* als Wirtspflanze genutzt wurde. Indikator hierfür war das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von Galerien an den Bäumen. Diese Galerien dienen den Termiten als Schutzkanäle, die sie z. B. vor der UV-Strahlung oder vor Predatoren (Ameisen) sichern. Die Galerien führen von den Nestern (Kartonneststruktur) netzförmig zu anderen Nestern oder zu den Holzabbaugebieten in den höheren Bauebene. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Faktoren Stammdurchmesser der Bäume und Dichte des Holzes den Effekt der Baummeidung allein nicht beschreiben konnten (MIKUS *et al.*, 1997). So korrelierten die physikalischen Faktoren nicht mit dem Verhalten der Termiten. Es erschien wahrscheinlicher, den Grund für die Meidung des Baumes in den chemischen Inhaltsstoffen von *M. discoidea* zu suchen.

Im Labor wurden Biotests mit *S. lamanianus* durchgeführt und Extrakte von *M. discoidea* auf ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften hin untersucht. Diesen Extrakten konnte im Biotest eine eindeutig nagehemmende Wirkung zugesprochen werden. Weiterhin wurden die wirksamen Stoffe als polar, nicht flüchtig, hitzeresistent und kleiner als 1000 Dalton charakterisiert (MIKUS *et al.*, 1998a).

Damit waren zwar die nagehemmenden Eigenschaften der *M. discoidea*-Extrakte bekannt, jedoch nicht die Stoffe, auf welche diese Hemmung zurückgeführt werden konnte. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Extrakte ergab drei Fraktionen, von denen zwei im Biotest nagehemmend wirkten. Eine Gruppe von Chemikern in Hamburg, welche diese zwei Fraktionen auf die vorhandenen Inhaltsstoffe hin analysierte, fand große Mengen an Alkaloiden. Diese Alkaloide stammten aus der Familie der Securinega-Alkaloide. Als Securinega-Alkaloide werden alle tetracyclischen Indolizidin-Alkaloide, welche das Tetrahydro-securinan-11-on-Grundgerüst enthalten, zusammengefasst. Alkaloide dieser Gruppe wurden in vielen Gattungen der Familie der Euphorbiaceae, wie *Securidaca*, *Margaritaria* oder *Breynia* gefunden. 1956 isolierte MURAV'eva *et al.* das Alkaloid Securinin und später erfolgte der Nachweis weiterer Vertreter dieser Gruppe.

Wegen ihrer engen Verwandtschaft mit der Gattung *Phyllanthus* wurde *Margaritaria discoidea* (BAILL.) WEBSTER lange Zeit als *Phyllanthus discoideus* (BAILL.) MÜLL. ARG. bzw. *Phyllanthus discoides* (BAILL.) MÜLL. ARG. bezeichnet (WEBSTER, 1979; BEENTJE, 1994). In den Blättern und der Wurzel von *Phyllanthus discoide(u)s* wurden die Securinega-Alkaloide Securinin, Norsecurinin, Dihydrosecurinin, Viroallosecurinin, Dihydroallosecurininol, Phyllanthin und Phyllantidin nachgewiesen (MENSAH *et al.*, 1988). Chemische Untersuchungen zeigten, dass diese Alkaloide ebenfalls im Holz von *M. discoidea* enthalten waren (FEHLER, 2000). Durch diese Untersuchungen war weiterhin bekannt, dass Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin als vorwiegende Sekundärmetaboliten der Familie der Securinega-Alkaloide in der Rinde und im Holz von *M. discoidea* vorlagen. Diese drei Alkaloide wurden daher isoliert und aufgereinigt (FEHLER, 2000).

Bis heute gibt es an Termiten noch keine Untersuchungen, welche die Wahrnehmung spezieller Rezeptoren in bezug auf deterrente Stoffe neurophysiologisch bearbeitet hätte. Dagegen sollte in dieser Arbeit der sensorische Eingang und damit die Rezeptorzellen bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber den Securinega-Alkaloiden überprüft werden. Dazu muss zuerst geklärt werden, ob die Alkaloide Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin auch einzeln hemmend auf das Fraßverhalten der Termiten *S. lamanianus* wirken. Dadurch wäre gezeigt, dass die fraßhemmende Wirkung des Gesamtextrakts von *M. discoidea* unter anderem auf diese Alkaloide zurückzuführen ist und somit entsprechend alkaloidsensitive Rezeptoren voraussetzte.

- So sollen im ersten Teil dieser Arbeit, anhand von Biotests, die potentiell fraßhemmenden Securinega-Alkaloide einzeln auf das Nageverhalten der Termiten hin überprüft werden.
- Weiterhin sollte die Wirkung der Alkaloide neurophysiologisch auf der Ebene der Rezeptoren untersucht, und somit der sensorischen Eingang für diese Deterrentien aufgezeigt werden. Damit sollte es bei Termiten erstmals möglich sein, einen Rezeptor nachzuweisen, der sensitiv auf Deterrentien reagiert.
- Es sollte dann möglich sein, bei Termiten die Verhaltensebene mit der Wahrnehmungsebene in Verbindung zu bringen und die Termiten hinsichtlich dieser Parameter mit anderen Insekten zu vergleichen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Die Fokusart *Schedorhinotermes lamanianus*

2.1.1 Lebensraum und Lebensweise

Alle in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen und Ergebnisse wurden an der sich von Totholz ernährenden, afrikanischen Feuchtholztermite *Schedorhinotermes lamanianus* SJÖSTEDT (Isoptera: Rhinotermitidae) durchgeführt. *S. lamanianus* gehört zu den nicht Pilz züchtenden Termiten und lebt in den äquatorialen Wäldern Afrikas in individuenreichen Kolonien. Sie tritt dabei in lokal hohen Populationsdichten auf (HARRIS, 1968; BRANDL *et al.*, 1996). Die Kolonien leben in Kartonnestern, welche in Astgabeln und im bzw. am Stamm der Nutzbäume oder unterirdisch gelegen sind. Artspezifische Galerien führen netzartig von den Nestern zu den Furagierarealen oder verbinden Kolonien untereinander (HARRIS, 1968; RENOUX, 1976). Die Furagierareale befinden sich in der Regel auf lebenden Bäumen, in denen die Individuen der Arbeiterkaste (WASSERMANN, 1990) entstandenes Totholz abbauen. Diese Aktionen werden von der Kaste der kleinen Soldaten gesichert (KAIB, 1990).

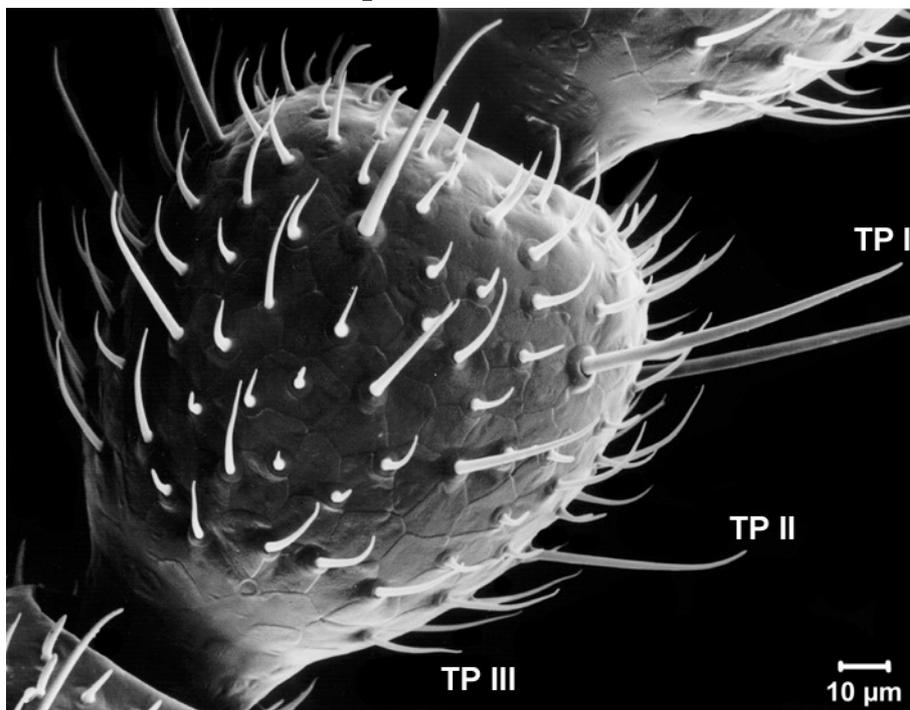
2.1.2 Laborhaltung der Termiten

Drei komplette Kartonnester von *S. lamanianus* wurden im Oktober und März (1995 und 1998) im Shimba-Hills National Reserve (Kenia) geborgen und anschließend nach Bayreuth transportiert. Dort werden sie unter konstanten Bedingungen (26°C, 70-80 % RH, 12/12 h Hell-Dunkel-Rhythmus) in runden abgedeckten Edelstahlbehältern (Ø 50 cm, Höhe 50 cm) gehalten. Über, an die Behälter angeschlossene, Silikon-schläuche haben die Termiten Zugang zu einem Trinkwasserreservoir sowie zu aus Plexiglas bestehenden Furagierarealen. Die Kolonien selber werden *ad libitum* mit feuchtem aschefreien Filterpapier (Schleicher & Schuell, 0860) versorgt, welches den Tieren als Cellulosequelle dient. Als weiteres cellulosehaltiges Substrat wird den Termiten Pappel- oder Birkenholz zum Abbau angeboten.

2.1.3 Die antennalen Geschmackssensillen: Morphologie und Anatomie

Typisch für die Geschmackssensillen von Insekten ist der namensgebende terminale Porus („TP“) an der Spitze der TP-Sensillen (ALTNER, 1977). Auf den Antennen von *S. lamanianus* differenziert man drei Morphotypen dieser TP-Sensillen (siehe Abb. 1). Es sind TP I, TP II und TP III beschrieben, die sich in der Länge des Haarschaftes, in ihrer Anzahl und Lage auf dem Antennensegment und in der Anzahl der Sinneszellen unterscheiden lassen (WOLFRUM & KAIB, 1988; KAIB, unveröffentlicht).

Abb. 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines distalen



Antennensegmentes von einem *S. lamanianus* Arbeiter.

Wie bei vielen anderen Insekten auch, befinden sich auf den Antennen von *S. lamanianus* verschiedene sensitive Einheiten zum Perzipieren von Reizen. So sind olfaktorische, thermo- und hygrosensitive Rezeptoren zu finden. Die gustatorischen Sensillen sind mit TP I bis TP III beschriftet und enthalten den namensgebenden Terminalporus.

Die morphologischen Parameter sind in Tabelle 1 aufgelistet. Wie bei einigen anderen Sensillentypen auch, steigen die Dendriten der Nervenzellen bei allen drei Morphotypen dieser TP-Sensillen unverzweigt bis zum terminalen Porus auf. Dieser stellt bei diesen Sensillen den einzigen Zugang für eindringende Moleküle dar. Weiterhin kann bei allen Morphotypen ein Tubularkörper an der Basis der Sensillen gefunden werden,

welcher zu dem mechanosensitiven Element gehört.

Tab. 1: Anatomische und morphologische Eigenschaften der drei antennalen Typen von Geschmackssensillen bei *S. lamanianus*.

TYP	Ø N pro Segment	Länge [µm]	Lage des Sensillum	N Neurone gustatorisch	N Neurone mechanisch
TP I	6	76 – 83	distal	5	1
TP II	7	45 – 49	median	4	1
TP III	ca. 27	24 - 30	proximal	1	1

2.2 Verwendete Reizlösungen

2.2.1 Nicht-Alkaloide

Zum Herstellen aller nichtalkaloiden Reizlösungen wurden nur Substanzen von „p.A.“- oder „reinst.“- Qualität verwendet. Als Lösungsmittel diente hierbei, sowie bei den Securinega-Alkaloiden (siehe Kapitel 2.2.2), doppelt quarzdestilliertes Wasser. Dieses Lösungsmittel soll im folgenden als Wasser bezeichnet werden. Die verwendeten Detergenzien wurden alle in diesem Lösungsmittel aufgenommen und über Verdünnungsreihen die entsprechenden Konzentrationen hergestellt. Die Lagerung erfolgte in Polyethylen-Flaschen bei Raumtemperatur oder gegebenenfalls im Kühlschrank bei 4 °C.

2.2.2 Securinega-Alkaloide

2.2.2.1 Securinin der Firma SIGMA

Das einzig kommerziell erhältliche Securinega-Alkaloid ist das (-) –Securinin der Firma SIGMA (CAS-Nr.: 5610-40-2, 99 % Reinheit). Dieses Alkaloid wird aus den Blättern und der Wurzel der Pflanze *Securinega suffruticosa* gewonnen und aufgereinigt angeboten. Im Folgenden wird dieses Securinin als SIGMA-Securinin bezeichnet.

2.2.2.2 Securinega-Alkaloide aus *Margaritaria discoidea* (BAILL.) WEBSTER

Die Baumart *Margaritaria discoidea* (BAILL.) WEBSTER gehört zur Familie der Wolfsmilchgewächse (Euphorbiaceae) und ist unter anderem im tropischen Afrika verbreitet. Wie die meisten Vertreter dieser Familie enthält *M. discoidea* sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. So zeigten aktuelle chemische Untersuchungen an Baumextrakten, dass sich die Securinega-Alkaloide Securinin, Phyllanthin, sowie Phyllantidin (siehe Abb. 2) in der Rinde und im Holz von *M. discoidea* befinden und in diesem Baum die alkaloiden Hauptkomponenten ausmachen (FEHLER, 2000). Für die vorliegende Arbeit standen somit, neben dem SIGMA-Securinin, diese drei Alkaloide aus *M. discoidea* isoliert und aufgereinigt zur Verfügung. Für die weiteren Ausführungen soll das Securinin aus *M. discoidea* als *M.d.*-Securinin bezeichnet werden. Die Alkaloide wurden nach Erhalt im Kühlschrank (4 °C) in trockener Form in Glaskolben aufbewahrt.

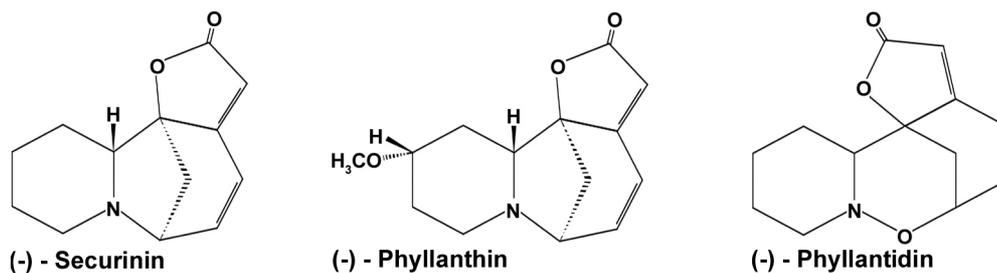


Abb. 2: Securinega-Alkaloide in *M. discoidea*

2.2.3 Herstellung der Testlösungen und Lagerung

2.2.3.1 Wahl des Lösungsmittels

a) für die Biotests

Die Securinega-Alkaloide wurden in Chloroform aufgenommen und konnten so restlos gelöst werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte gravimetrisch über die von der Hamburger Arbeitsgruppe angegebenen Alkaloid-Mengen.

b) für die elektrophysiologischen Ableitungen

Da es bei der, in dieser Arbeit verwendeten, Ableitmethode zum direktem Kontakt zwischen der Reizlösung und dem Tier kommt, musste ein

anderes, natürliches Lösungsmittel gewählt werden. Die Alkaloide wurden deshalb in Wasser aufgenommen. Da, aufgrund der physikochemischen Eigenschaften der Alkaloide, eine geringere Löslichkeit zu erwarten war, wurden diese bei vollkommener Trockenheit mit soviel Wasser versetzt, dass sie sich zu 100 % lösen konnten. Anschließend ließ sich die gesättigte Lösung mit einer Pipette abnehmen und aufbewahren. Phyllanthidin konnte, aufgrund zu geringer Mengen an Ausgangssubstanz, nicht bis zur Sättigung gelöst werden, da ansonsten zu wenig Reizlösung zum Ableiten der Erregungen vorhanden gewesen wäre.

Aufgrund der begrenzten Alkaloidmengen, die bei den elektrophysiologischen Untersuchungen zur Verfügung standen, erfolgte die Konzentrationsbestimmung nicht gravimetrisch. Deshalb wurden alle Alkaloidkonzentrationen für die neurophysiologischen Tests anhand gaschromatographischer Analysen quantifiziert.

2.2.3.2 Lagerung der Reizlösungen

Alle oben beschriebenen Lösungen wurden in konischen Glasflaschen, verschlossen mit teflonbeschichteten Deckeldichtungen, aufgenommen und für den kurzfristigen Gebrauch bei Raumtemperatur aufbewahrt. Längere Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

2.3 Verwendete Untersuchungsmethoden

2.3.1 Gaschromatographische Analysen

Zur Charakterisierung der Alkaloide im wässrigen *M. discoidea* Rinden-Extrakt und zur Bestimmung derer Konzentrationen wurden Proben der Größe 1 µl in einen Hewlett Packard 5890 Gaschromatographen der Serie II analysiert. Dieser Gaschromatograph verfügt über einen Splitt/Splittless Injektor und ist mit einem Flammen-Ionisations-Detektor (FID) ausgestattet. Die Proben wurden auf einer Säule der Firma J&W Scientific (Länge: 30 m, ID: 0,32 mm, Filmdicke: 0,1 µm) aufgetrennt. Als Trägergas kam hochreines Helium mit einer Flussrate von 1,5 ml/min zum Einsatz. Die Injektionstemperatur betrug 60 °C, danach wurde die Temperatur bei 5 °C/min auf 300 °C erhöht. Diese Endtemperatur wurde isotherm 10 min lang gehalten.

2.3.2 Biotest – Filterpapier-Wahltest

2.3.2.1 Aufbau des Filterpapier-Wahltests

Um die Auswirkung der Alkaloide auf das Verhalten von *S. lamanianus* hin zu untersuchen, wurde die Nagehemmung mit dem Filterpapier-Wahltest (nach: REINHARD & KAIB, 1995) überprüft. Der Test nutzt die Tatsache aus, dass die Termiten zellulosehaltiges Filterpapier (Schleicher & Schuell, 0860) ebenso als Nahrungsquelle annehmen wie Holz. So wur-

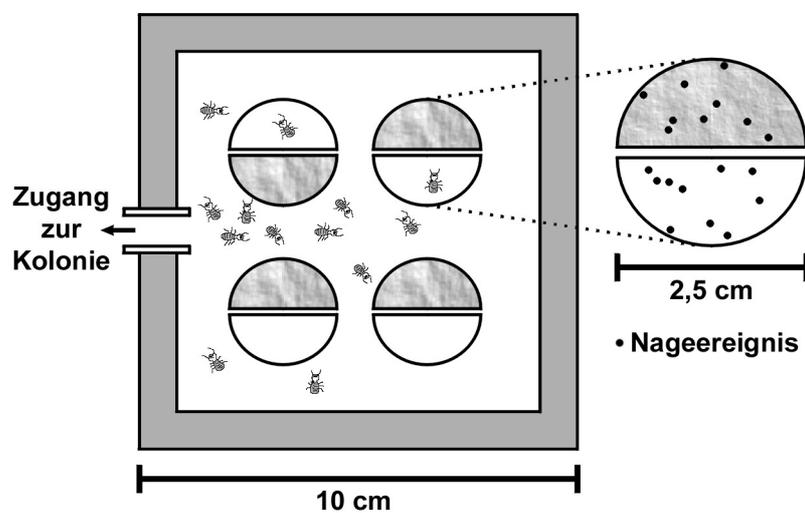


Abb. 3: Aufbau des Filterpapier-Wahltests

Dargestellt ist die Furagierarena mit den vier enthaltenen Tests. Die nicht ausgefüllten Flächen sollen die Kontrollhälfte darstellen und die grauen Hälften sind mit der Testsubstanz behandelt. Vergrößert ist ein Test, mit den ersten 19 Nageereignissen auf beiden Hälften verteilt, dargestellt.

den Filterpapier-Halbkreise ($\varnothing = 25$ mm, Gewicht ≈ 20 mg) in einer Testarena (= Furagierarena, 10 x 10 cm, Höhe: 2,5 cm) ausgelegt und stehen den Termiten zum Abbau zur Verfügung. Die Furagierarena besteht weiterhin aus einem sandgestrahlten Boden, der das Fortkommen der Termiten erleichtert. Pro Test wurden 2 Filterpapierhalbkreise benötigt (siehe Kapitel 2.3.2.2) und insgesamt konnten pro Versuchsansatz in einer Arena vier Tests gleichzeitig durchgeführt werden (siehe Abb. 3).

2.3.2.2 Durchführung des Filterpapier-Wahltests

Um die Auswertung statistisch abzusichern, wurden, für jede zu messende Konzentration der Alkaloide, 20 Tests (5 Arenen à 4 Tests) angefertigt. Jeder Test bestand aus einer Kontroll-Filterpapierhälfte und einer Hälfte mit der zu testenden Substanz¹. Die Verteilung der Kontroll- und Probenhälften je Test erfolgte zufällig und war für alle 20 Tests vorher festgelegt. Zum Anfertigen des Biotests wurden die Testhälften gleichmäßig mit 25 µl Alkaloidlösung versetzt. Da die Alkaloide in Chloroform gelöst vorlagen, musste die Auftragung mittels einer Mikroliterspritze (Hamilton-Glasspritze) erfolgen. Dies hatte im Vergleich zum Pipettieren zwei Vorteile. Erstens konnte somit bei der hohen Flüchtigkeit des Lösungsmittels das Verdunsten vermieden werden. Zweitens wurden durch das Chloroform keine Weichmacher aus den Pipettenspitzen gelöst, welche die Probe verunreinigen könnten. Nach dem Auftragen der Proben musste das Lösungsmittel verdampfen, was nach spätestens 5 min der Fall war. Nun wurden, sowohl die Kontrollhälften, als auch die Probenhälften mit je 25 µl Wasser behandelt, um in beiden Halbkreisen den gleichen Feuchtegrad zu gewährleisten. Dies ist dem Abbau der Filter durch die Termiten förderlich. Um das Verrutschen der Hälften auf dem Arenenboden, bedingt durch die Nageaktivität der Termiten, zu vermeiden, wurden alle Filterpapierhalbkreise zum Schluss noch mal auf der Unterseite mit 10 µl Wasser versetzt und auf den Arenenboden gelegt. So vorbereitet konnte die Arena mit einer Glasplatte abgedeckt und an die Kolonie angeschlossen werden. Die Termiten hatten ab diesem Zeitpunkt Zugang zur Arena. Zur anschließenden Auswertung erfolgte eine 45minütige Aufzeichnung der Nageaktivitäten mit Hilfe einer Infrarotkamera (Elbex EX220) unter Infrarot-Beleuchtung. Die Aufnahme wurde auf Videomagnetband gesichert.

2.3.2.3 Auswertung des Filterpapier-Wahltests

Für die Auswertung wurden für jeden Test die ersten 19 Nageereignisse mit Hilfe der Videoaufzeichnung ausgezählt. Anhand der Verteilung der Nageereignisse konnte je eine Hälfte des Tests in „bevorzugt“ oder „nicht bevorzugt“ eingeteilt werden. Dabei galt die Filterpapierhälfte mit den

¹ Im Folgenden soll die Filterpapierhälfte, welche als Kontrolle dient, als Kontrollhälfte benannt werden. Die andere Filterpapierhälfte, mit der zu testenden Substanz, wird als Probenhälfte bezeichnet.

meisten Nageereignissen als „bevorzugt“. Im Beispiel von Abbildung 3 wäre die Verteilung neun zu zehn und es würde in diesem Fall die Kontrollhälfte (weiß) als „bevorzugt“ gelten. Das Verhältnis aller 20 Wahltests mit Bevorzugung der Kontrollhälfte zu Bevorzugung der Probenhälfte wurde auf dem Ordinalniveau mit dem Vorzeichentest analysiert. Dabei wurde der Test auf einem Signifikanzniveau von $< 0,05$ angewandt. Daraus ergab sich eine Lage der Signifikanzgrenze zwischen fünf und sechs positiven Entscheidungen für die mit Alkaloid behandelte Probenhälfte, wobei die Nagehemmung bei fünf oder weniger positiven Entscheidungen signifikant war.

2.3.3 Neurophysiologische Untersuchungen

Alle neurophysiologischen Untersuchungen an den antennalen Sensillen von *S. lamanianus* wurden mit der „tip-recording-technique“, der von Hodgson *et al.* (1955) entwickelten Standardmethode zum Ableiten von Impulsen gustatorisch sensibler Sensillen bei Insekten, durchgeführt.

2.3.3.1 Antennale Kontaktchemorezeptoren als Untersuchungsobjekte

Wie erwähnt, sollte in dieser Arbeit die Wirkung von wasserlöslichen und schwerflüchtigen Alkaloiden auf die Wahrnehmung durch Termiten untersucht werden. Diese Art von Stoffen perzipieren bei Insekten Geschmacksrezeptoren, welche sich auf verschiedenen Körperteilen wie Mundwerkzeugen, Tarsen oder Antennen befinden können (SCHOONHOVEN *et al.*, 1998; KAIB, 1999). Bei Arbeitern von *S. lamanianus* beobachtet man spezielle Verhaltensweisen, die auf eine besondere Stellung der Antennen bei der Bewertung von Nahrungsquellen hindeuten. So werden die Anten-

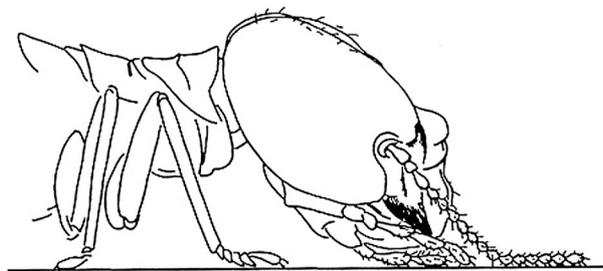


Abb. 4: Haltung der Antennen von *S. lamanianus* bei der Begutachtung von Nahrungsquellen („rubbing antennae“) nach REINHARD & KAIB (1995)

nen kurz vor Beginn des Nagens auf den Untergrund gepresst und darauf in charakteristischer Weise seitlich abgerollt (siehe Abb. 4). Dieser intensive Einsatz der Antennen wurde von Reinhard & Kaib (1995) beobachtet und als „rubbing antennae“ bezeichnet. Dieses Verhalten weist bei *S. lamanianus* auf eine besondere Bedeutung der antennalen Geschmacksrezeptoren bei der Bewertung von Nahrungsquellen hin.

2.3.3.2 Präparation der Termiten

Die neurophysiologischen Untersuchungen an *S. lamanianus* wurden am kompletten und lebenden Tier vorgenommen. Um die benötigten Ableitelektroden an den Antennen der Termitenarbeiter platzieren zu können, mussten diese fixiert werden. Zu diesem Zweck wurden Arbeiter aus der Furagierarena entnommen und, mit dem Kopf voran, in ein spitz zulaufendes Plastikröhrchen laufen gelassen. Die vordere enge Öffnung dieses Röhrchens war so geformt, dass nur die Mundwerkzeuge und die Antennen der Termiten hindurch passten. Die Antennen konnten so vorsichtig, mittels eines doppelseitigen Klebebandes, auf einer kleinen Plastiknase am Ende dieser Öffnung, befestigt werden. Nach der Fixierung waren die ventralen TP-Sensillen der sieben bis neun distalen Flagellarsegmente für neurophysiologische Ableitungen zugänglich (siehe Abb. 5).

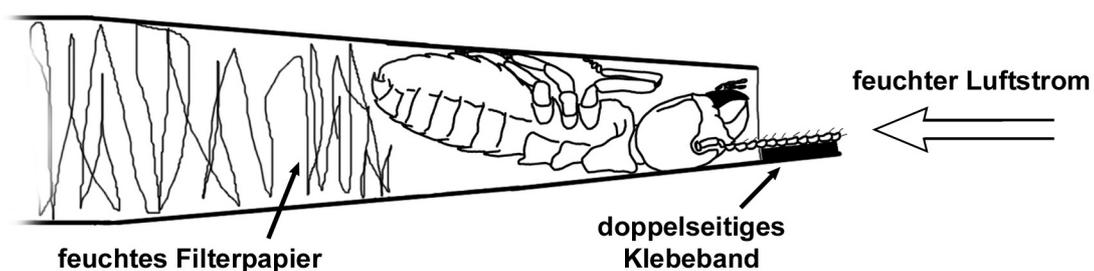


Abb. 5: Fixierung eines Termitenarbeiters während der neurophysiologischen Untersuchungen

Um die Arbeiter auch im Röhrchen zu fixieren, wurde der hintere Teil der Röhre mit feuchtem Filterpapier verschlossen. Dies verhinderte das Zurücklaufen und ebenso das Austrocknen des Präparates. Um auch das

Austrocknen der Antennen zu verhindern, wurde während des gesamten Versuches ein feuchter Luftstrom mit konstanter Temperatur (22 °C) und 70-85 % rel. Luftfeuchtigkeit über diese hinweggeblasen.

2.3.3.3 Registrierung und Reizung

Bei den Untersuchungen dienten zwei Glaskapillaren als Ableitelektroden. Diese Elektroden wurden durch Ausziehen von den Kapillaren mit Filament (Fa. Hilgenberg, Malsfeld) durch einen „Pipette-Puller“ (Mod. 700C, David Kopf Instruments, Tujunga, USA) hergestellt. Dabei erreichten die Kapillaren Spitzendurchmesser von ca. 1 μm . Diese Spitzendurchmesser wurden bei der indifferenten Elektrode benötigt, da diese in den Hämolympхраum zwischen den ersten beiden Antennensegmenten eingestochen werden musste. Die differente Elektrode wurde durch gezieltes Abschneiden der indifferenten Elektrode hergestellt und besaß einen Spitzendurchmesser von 10 - 20 μm .

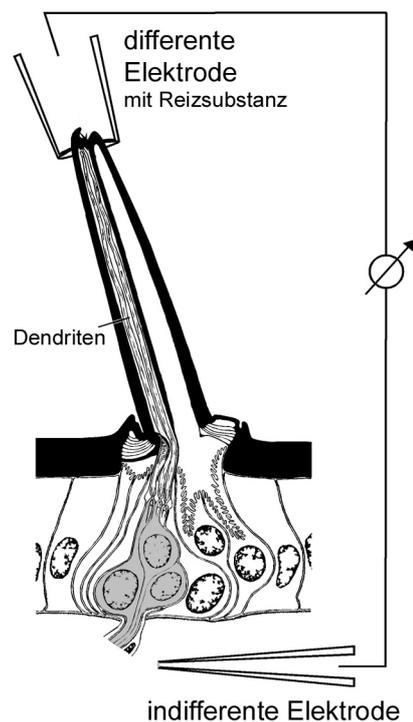


Abb. 6: Schematische Darstellung eines TP-Sensillum mit Anordnung der Elektroden bei der „tip-recording-technique“

Dargestellt ist ein TP-Sensillum mit den bei der „tip-recording-technique“ angebrachten differenten und indifferenten Elektroden. Die Neurone sind in dieser Abbildung grau gekennzeichnet, von ihnen steigen die Dendriten unverzweigt zum Porus auf.

Bei der Ableitetechnik wurden die von den gustatorischen Neuronen generierten Impulse als Potentialdifferenzen zwischen der indifferenten und der differentiellen Elektrode gemessen (siehe Abb. 6). Um dies zu gewährleisten, musste ein leitender Kontakt zwischen den Elektroden vorhanden sein. Dazu wurde die indifferente Elektrode mit Ringer (SCHLIEPER, 1965) als Elektrolyt gefüllt. Die differentielle Elektrode enthielt die Reizlösung und dient aus diesem Grund gleichzeitig als Registrierelektrode und als Reizgeber. Durch das gemeinsame Starten (und auch Beenden) der Reizung und Registrierung konnten Spontanaktivität der Neurone sowie Aktivität nach Reizende nicht registriert werden.

Um die Ableitung zu beginnen, wurde die differentielle Elektrode mittels eines Mikromanipulators (Fa. Leitz, Wetzlar) und unter optischer Kontrolle (Kombistereomikroskop M3C, Fa. Wild: 400-fache Vergrößerung) über die Spitze („tip“) des jeweiligen TP - Sensillum gestülpt. Die beiden Elektroden standen jeweils über Agar, gelöst in 3 M KCl-Lösung, mit einem Silber-Silberchloriddraht in Verbindung. Dieser Agarbrücke kommt die Aufgabe zu, bei guter elektrischer Leitfähigkeit Strömungen der Flüssigkeit, die zu schnellen und großen Konzentrationsänderungen an der Elektrode führen würden, auszuschalten. Da die hydratisierten Kalium- und Chloridionen annähernd die gleichen Durchmesser und Wanderungsgeschwindigkeiten im Lösungsmittel (Wasser oder Agar) besitzen, eignet sich KCl besonders gut als Elektrolyt, da eine Trennung positiver und negativer Ladungen entlang des KCl-Konzentrationsgefälles nicht erfolgt. So können Diffusionspotentiale nicht auftreten.

Der Ag-AgCl-Draht der differentiellen Elektrode war direkt mit einem Impedanzwandler mit Kapazitätsneutralisation und einem Vorverstärker verbunden. Über die indifferente Elektrode wurde das transepitheliale Potential und das „Junctionpotential“ gemessen und kompensiert. Dadurch sollte das elektrische Reizartefakt, zu Beginn der Ableitung, möglichst gering gehalten werden.

2.3.3.4 Archivierung und Auswertung der Ableitungen

Die abgeleiteten Potentialdifferenzen konnten einerseits anhand eines Oszilloskops visualisiert und andererseits mit Hilfe eines Personal Computers (AT 80486 DX2-66) aufgezeichnet und gespeichert werden. Zur Digitalisierung der Daten wurden die Signale über einen A/D-Wandler

(Auflösung: 12 bit; Abtastrate: 100 μ s) und über einen Transputer mit Zwischenspeicher in den Computer eingelesen. Die Digitalisierungsphase dauerte zwei Sekunden und wurde ca. eine halbe Sekunde vor Reizbeginn² manuell ausgelöst. Die anschließende Datenaufnahme erfolgte mit dem Programm SPIKE1 unter der GEM/3-Oberfläche (D. Piech, Rechenzentrum Universität Regensburg). Die dauerhafte Sicherung der Daten erfolgte auf Festplatte und CD-Rom.

Zur anschließenden Auswertung der Ableitungen wurden die digitalisierten Impulse mit dem Programm M1 (Dr. J. Gödde, Fa. Haag, Waldbrunn) ausgedruckt. Da bei der „tip-recording-technique“ keine Einzelzelleableitung möglich ist, werden immer alle auf den gegebenen Reiz reagierenden Neurone simultan abgeleitet. Das mechanosensitive Neuron in den TP - Sensillen wurde nicht erregt, da das Sensillum beim Überstülpen der Elektrode nicht ausgelenkt wurde.

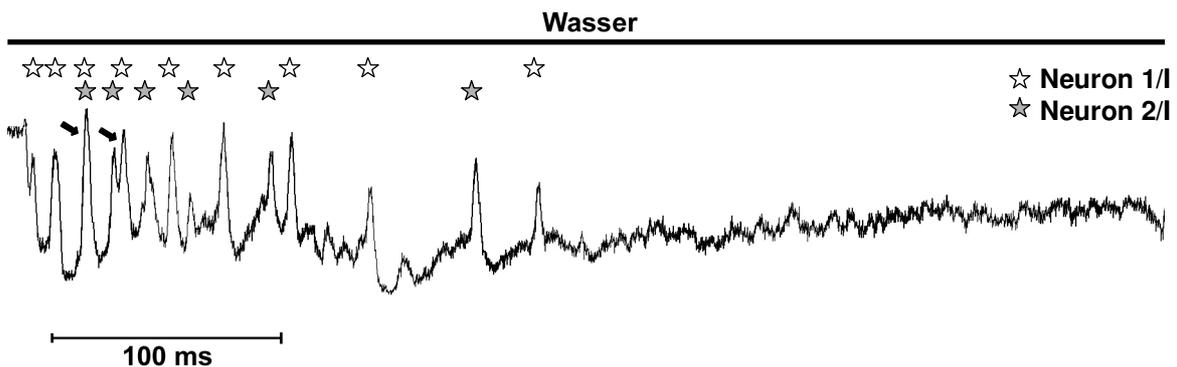


Abb. 7: Impulszuordnung anhand zeitlich verschiedener Muster

Das Registrierungsbeispiel stammt von der Ableitung eines TP I-Sensillums bei Reizung mit Wasser. Bei diesem Reiz antworten zwei Neurone mit je 9 Impulsen/200 ms (Neuron 1/I) und 6 Impulsen/200 ms (Neuron 2/I). Die Pfeile kennzeichnen zeitliche Überlagerung zweier Impulse.

Für die Zuordnung der so erhaltenen Ableitungen zu den verschiedenen Neuronen kann sich die veränderliche Form der Impulse oder deren variierende Amplitude zu nutze gemacht werden. Diese Unterschiede im Aussehen der Impulse haben ihre Ursache in den unterschiedlichen elektrischen Eigenschaften verschiedener Neurone. Jedoch können sich auch Impulsform und Impulsamplitude ein und des selben Neurons

² Die Reizdauer, bzw. die Länge des Überstülpens der indifferenten Elektrode über das Sensillum, betrug bei allen Ableitungen ca. 1000 ms.

verändern und diese Änderungen sind sogar innerhalb einer Registrierung möglich (FUJISHIRO *et al.*, 1984; HANSEN-DELKESKAMP & HANSEN, 1995). Aus diesem Grund wurde als einziger Zuordnungsparameter das zeitliche Auftreten der Impulse herangezogen. Da die Variabilität der zeitliche Abfolge für jedes Neuron konstant ist, konnten die Impulse verschiedener Neurone so anhand deren zeitlicher Abfolge unterschieden werden (siehe Abb. 7).

Die abgeleiteten und digitalisierten Impulse konnten anhand eines Ausdruckes oder mit dem Programm AWAVE32 (F. Marion-Poll, Fa. INRA Phytopharmaci) den Neuronen zugeordnet und ausgezählt werden. Über AWAVE32 wurden die vom Programm SPIKE1 erzeugten Dateien (*.spk), direkt eingelesen. Am Computer wurden die auszuwertenden Ausschnitte zusätzlich entsprechend vergrößert (MARION-POLL, 1996).

Zur Auswertung wurden nur die ersten 200 ms nach Reizbeginn betrachtet. Dies liegt darin begründet, dass die meisten Neurone der Geschmacksrezeptoren einen stark phasischen Erregungsverlauf haben (MIKUS, 2000). So wird in dieser Arbeit die Erregungsstärke der Neurone immer als die Anzahl der Impulse während den ersten 200 ms angegeben.

2.4 Statistik

Alle verwendeten statistischen Verfahren wurden an den entsprechenden Stellen im jeweiligen Kapitel angegeben. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Sigma-Plot 2000 bzw. SPSS 10.0 für Windows benutzt. Die berechneten Mittelwerte der Impulsfrequenzen wurden mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Dazu sind die Datenumfänge in x Neuronen von x Sensillen aufgeführt. Alle errechneten Werte wurden mit zwei geltenden Ziffern nach dem Komma angegeben.

3 ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Securinega-Alkaloide Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin auf das Verhalten der Termiten *Schedorinotermes lamanianus* bei der Nahrungsaufnahme zu untersuchen. Weiterführend sollte die Reaktion der antennalen Geschmacksrezeptoren dieser Termiten in bezug auf diese Securinega-Alkaloide aufgezeigt werden.

3.1 Verhaltensuntersuchungen

3.1.1 Wirkung der Securinega-Alkaloide im Biotest

Da in *Margaritaria discoidea* die Securinega-Alkaloide Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin die alkaloiden Hauptbestandteile sind (FEHLER, 2000), wurden diese aufgereinigten Alkaloide in Bezug auf das Nageverhalten der Termiten getestet. Das Verhalten wurde, in Analogie zu dem von MIKUS (2000) angewendeten Biotest, mit dem Filterpapier-Wahltest untersucht. Hierbei wurde überprüft, wie sich die Akzeptanz von mit Alkaloid behandeltem Filterpapier (Probenhälften) gegenüber unbehandeltem Filterpapier (Kontrollhälften) hinsichtlich des Nageverhaltens der Termiten verhält. Dadurch konnte überprüft werden, ob und ab welcher Menge³ die Alkaloide nagehemmend wirkten.

Es zeigte sich deutlich, dass alle getesteten Securinega-Alkaloide im Biotest nagehemmend wirkten (siehe Abb. 8 A-D). Die Attraktivität der mit Alkaloid behandelten Probenhälften änderte sich dabei in Abhängigkeit mit der aufgetragenen Alkaloidmenge. So besteht bei allen Alkaloiden ein negativer Zusammenhang zwischen aufgetragener Menge und Anzahl der positiven Entscheidungen für die Probenhälften. Dies zeigt, dass mit steigender Menge von Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin die nagehemmende Wirkung auf die Termiten zunahm.

³ Die Angabe einer Alkaloidmenge, welche sich während des Biotests auf dem Filterpapier befand, ist im Gegensatz zur Konzentrationsangabe genau. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Löslichkeiten der Alkaloide in Chloroform und Wasser gleich sind. Somit war die letztendlich, nachdem Evaporieren des Chloroforms, in Wasser gelöste Menge Alkaloid nicht vorhersagbar. Deshalb konnte keine Konzentration in diesem Lösungsmittel Wasser angegeben werden.

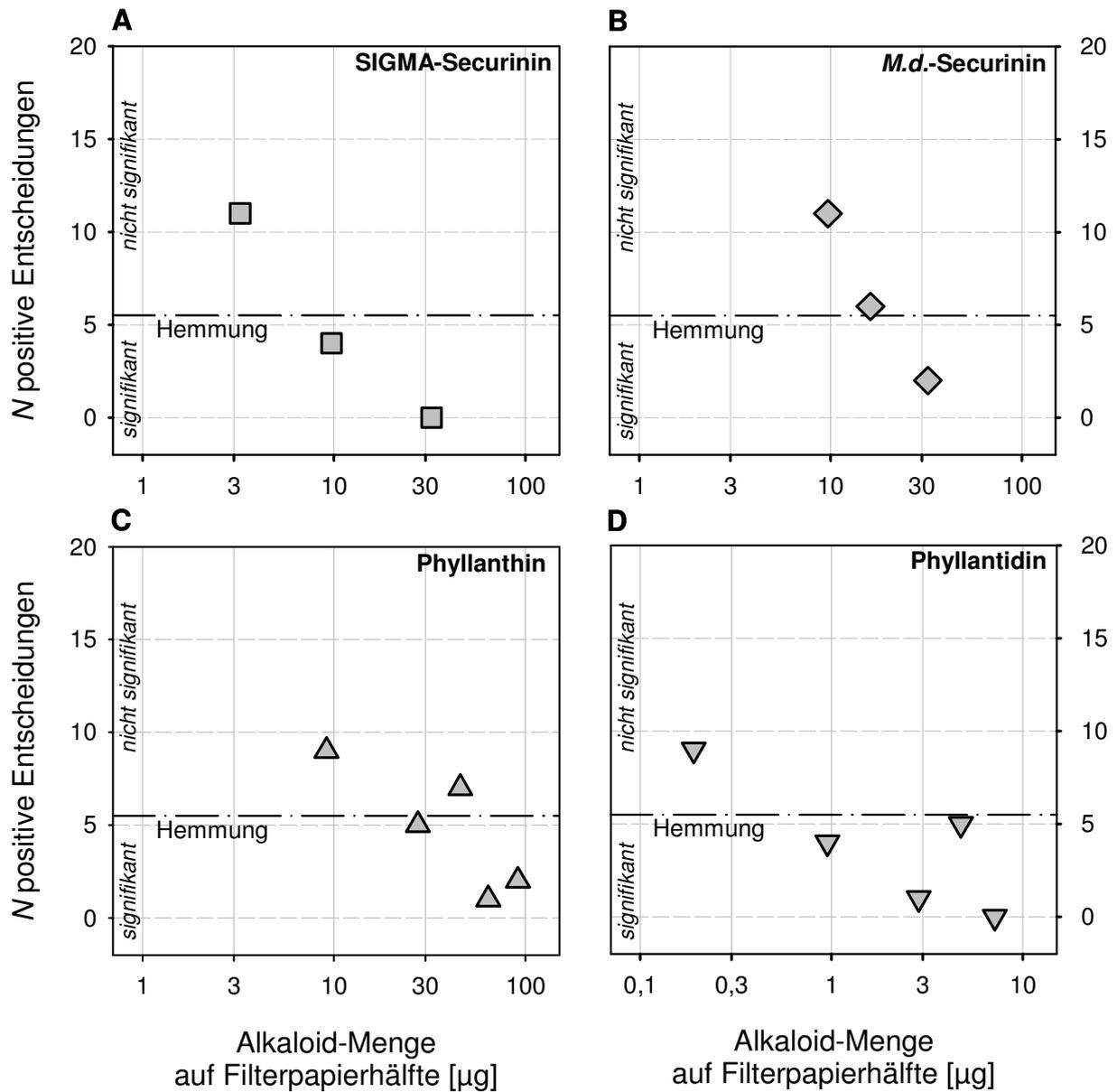


Abb. 8: Hemmende Wirkung der Securinega-Alkaloide auf das Nageverhalten von *S. lamanianus*.

Dargestellt ist die Anzahl der positiven Entscheidungen für die behandelte Probenhälfte im Wahltest bei verschiedenen Alkaloid-Mengen. A) SIGMA-Securinin (■), B) *M.d.*-Securinin (◆), C) Phyllanthin (▲), D) Phyllantidin (▼). Die Punkt-Strich-Linie stellt die Signifikanzgrenze für den zur Auswertung verwendeten Vorzeichentest dar ($p < 0,05$). Dabei ist die Nagehemmung für Werte unterhalb der Linie signifikant.

Die in Tabelle 2 angegebenen Schwellenbereiche der einzelnen Alkaloide beziehen sich auf den Alkaloidmengenbereich, innerhalb welchem die signifikante Nagehemmung eintrat (siehe Abb. 8). Dabei besaß Phyllantidin im Biotest den geringsten Schwellenbereich. Weiterhin sind die Schwellenbereiche auf ein Gramm Filterpapier bezogen, in Tabelle 2 aufgeführt .

Tab. 2: Im Biotest ermittelte Schwellenbereiche der für die Securinega-Alkaloide

Securinega-Alkaloid	Schwellenbereich [μg]^a	Schwellenbereich bezogen auf 1 g Filterpapier [μg]^b
(-) - SIGMA – Securinin	5 bis 15	250 bis 750
(-) - <i>M. d.</i> – Securinin	5 bis 15	250 bis 750
(-) - Phyllanthin	10 bis 30	500 bis 1500
(-) - Phyllantidin	0,3 bis 1	15 bis 50

a) aus Abbildung 8 ermittelte Schwellenbereiche

b) auf ein Gramm Filterpapier hochgerechnete Schwellenbereiche

3.2 Gaschromatographische Analysen

Für die folgenden neurophysiologischen Untersuchungen standen teilweise nur geringe Mengen Alkaloid zur Verfügung. Deshalb erfolgte die Konzentrationseinstellungen und damit Quantifizierung gaschromatographisch. Da davon ausgegangen werden konnte, dass die in dieser Arbeit verwendeten Alkaloide vergleichbare FID-Signale im Gaschromatographen auslösten, wurden die Alkaloidkonzentrationen anhand einer Securinin-Eichgeraden (hergestellt mit SIGMA-Securinin) bestimmt.

Da die Retentionszeiten der drei aufgereinigten Alkaloide durch deren gaschromatographische Einzelmessungen bekannt waren, war es möglich, diese Alkaloide im Gesamt-Wasser-Extrakt frischer *M. discoidea*-Rinde zu identifizieren. Somit konnten in diesem Rindenextrakt die relativen Mengen der Alkaloide und damit deren Verhältnisse zueinander bestimmt werden. (siehe Abb. 9).

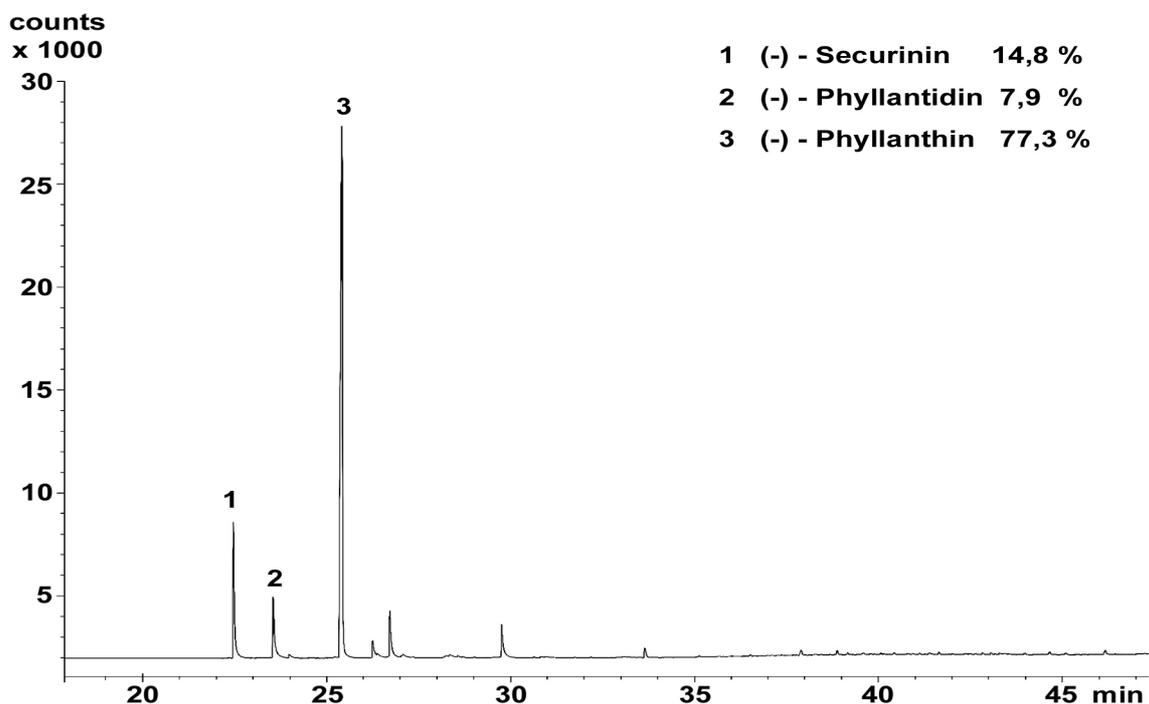


Abb. 9: Gaschromatogramm des wässrigen *M. discoidea*-Rindenextrakts

Aus dem Chromatogramm (siehe Abb. 9) geht hervor, dass *M.d.*-Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin die alkaloiden Hauptkomponenten des wässrigen *M. discoidea* Rinden-Extraktes darstellen. Dabei besitzt Phyllanthin mit 77,3 % den höchsten Anteil von den drei Alkaloiden.

Wie angesprochen, erfolgte die Aufnahme der Securinega-Alkaloide im Lösungsmittel Wasser, da die Reizlösung mit der differentiellen Elektrode über das TP-Sensillum übergestülpt werden musste (siehe Kapitel 2.3.3.3). Dabei kommt nicht nur die Reizsubstanz, sondern auch das Lösungsmittel in Kontakt mit dem Sensillum. Um eine mögliche Beeinträchtigung der Gewebe zu vermeiden, wurde Wasser als biologisch neutrales Lösungsmittel verwendet.

Tabelle 3 zeigt die Löslichkeiten von Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin in Wasser nach 12 h. Daraus geht hervor, dass Phyllanthin in Wasser die höchste Löslichkeit besaß. Für Phyllantidin konnte, aufgrund mangelnder Stoffmenge, die maximale Löslichkeit nicht bestimmt werden. Mit Securinin vergleichbare physikochemische Eigenschaften ließen jedoch für Phyllantidin in Wasser ähnliche Löslichkeiten erwarten.

Tab. 3: Maximale Löslichkeiten der Securinega-Alkaloide in Wasser nach 12 h

Securinega-Alkaloid	maximale Löslichkeit in Wasser [mM]
(-) - Securinin	ca. 2,3
(-) - Phyllanthin	ca. 5,0
(-) - Phyllantidin	über 0,9

3.3 Neurophysiologische Untersuchungen

Wie im Kapitel 3.1.1 gezeigt wurde, wirkten die untersuchten Securinega-Alkaloide nagehemmend auf *S. lamanianus*. Um eine solche Verhaltensänderung hervorzurufen, müssen die Alkaloid-Signale von entsprechend sensitiven Empfängern der Termiten perzipiert werden. Da die Securinega-Alkaloide zu den Geschmacksstoffen zählen, stellen diese Empfänger gustatorische Rezeptoren dar. Geschmackssensitive Rezeptoren befinden sich unter anderem auf den Antennensegmenten der Termiten (KAIB, 1999) und sind dort charakteristisches Merkmal von drei TP-Sensillen (TP I, TP II und TP III).

Um die Auswirkung von Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin auf neurophysiologischer Ebene zu untersuchen, wurden diese antennalen TP-Sensillen hinsichtlich des sensorischen Eingangskanals überprüft und bei Vorhandensein eines alkaloidsensitiven Rezeptors charakterisiert. Weiterhin werden im Folgenden die in den Sensillen befindlichen Neurone in kurzer Symbolik beschrieben (z. B. Neuron 3/II). Dabei steht die erste Ziffer für das entsprechende Neuron und die römische Zahl für das entsprechende TP-Sensillum (TP I, TP II oder TP III), in welchem sich dieses Neuron befindet.

3.3.1 Reaktion der TP-Sensillen I – III auf die Securinega-Alkaloide

3.3.1.1 Reaktion des TP I-Sensillums auf die Securinega-Alkaloide

Es war bekannt, dass das TP I-Sensillum durch fünf gustatorisch sensitive und ein mechanosensitives Neuron charakterisiert ist (siehe Kapitel 2.1.3). In den folgenden Untersuchungen sollte daher geklärt werden, wie diese 5 gustatorischen Neurone auf Reizung durch Securinega-Alkaloide reagieren. Dazu wurden die TP I-Sensillen mit Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin in verschiedenen Konzentrationen gereizt und auftretende Impulsfrequenzen erfasst.

In Abbildung 10 sind die Reaktionen zweier Neurone bei Reizung mit Wasser und SIGMA-Securinin gezeigt. Diese Neurone wurden in nachfolgenden Tests als Neurone 1/I und 2/I identifiziert (siehe Kapitel 3.3.1.2.). Aus Abbildung 10 geht hervor, dass die Erregungsfrequenzen nach

Reizung mit SIGMA-Securinin dem jeweiligen Erregungsniveau für den Reiz Wasser entsprach. MIKUS (2000) beschrieb die Neurone 1/I und 2/I bereits als wassersensitiv, wobei Neuron 2/I einen charakteristischen Wasserrezeptor darstellt. Ein Wasserrezeptor ist eine Nervenzelle, die mit konstantem Erregungsniveau auf den Reiz Wasser reagiert. Dieses Niveau kann durch dissoziationsfähige Elektrolyte (z. B. Salze) erniedrigt werden.

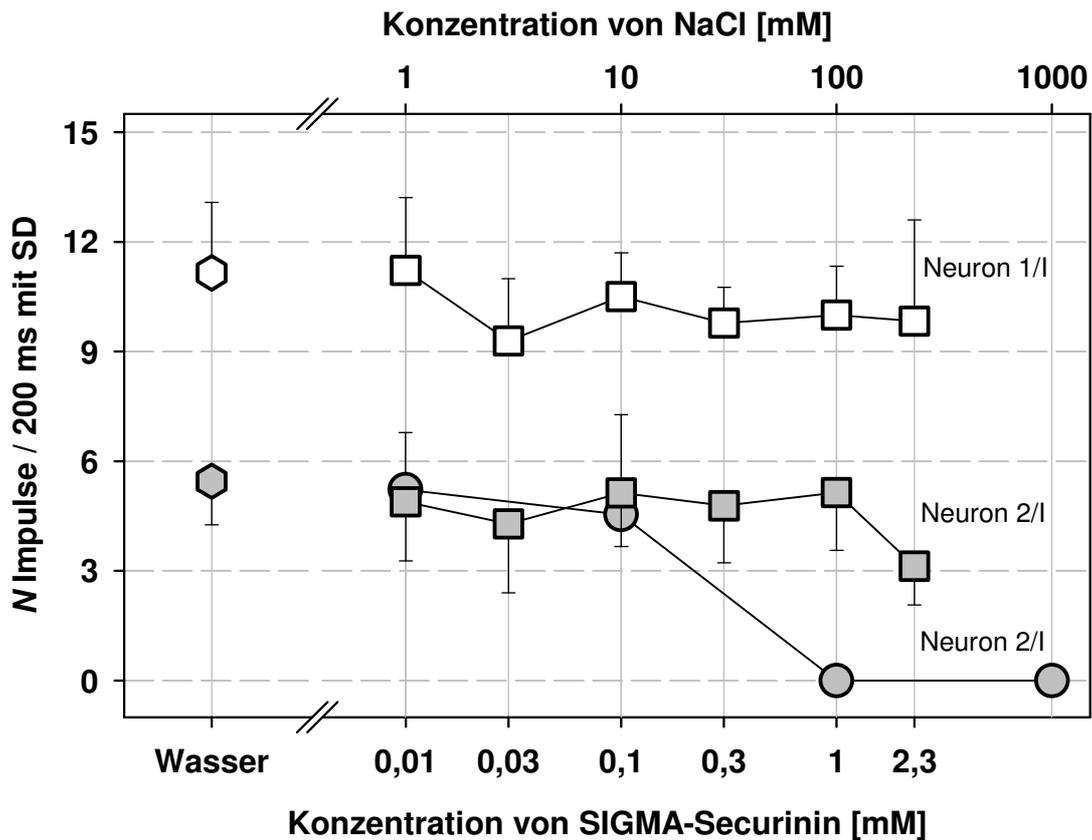


Abb. 10: Reaktion der Neurone 1/I und 2/I auf SIGMA-Securinin und Wasser bzw. des Neurons 2/I auf NaCl

Dargestellt sind die mittleren Impulsfrequenzen in den ersten 200 ms nach Reizbeginn des Neuron 1/I bei Reizung mit SIGMA-Securinin (\square) und Wasser (\diamond) bzw. des Neuron 2/I bei Reizung mit SIGMA-Securinin (\blacksquare), Wasser (\blacklozenge) und NaCl (\bullet) (Mittelwerte \pm SD, Anzahl der untersuchten Sensillen/Termiten pro Konzentration: zwischen 9/2 und 18/2). Ableitungsbeispiele im Anhang (Abb. A1)

Die Impulsfrequenzen des Neurons 1/I blieben bei Reizung mit SIGMA-Securinin trotz steigender Alkaloid-Konzentration auf der Höhe des Erregungsniveaus, welches durch Reizung mit Wasser resultiert. Ein vergleichbares Ergebnis trat bei der Reaktion vom Neuron 2/I auf SIGMA-Securinin auf. Die Impulsfrequenzen dieses Neurons lagen dabei bis zu

einer Konzentration von 1 mM auf dem Erregungsniveau des Wasser-Reizes. Da sich die Erregungsniveaus der Reize SIGMA-Securinin und Wasser nicht voneinander unterschieden, reagierten die Neurone 1/I und 2/I nicht auf das Alkaloid selbst, sondern auf das Lösungsmittel Wasser.

Die Erregungsfrequenz von Neuron 2/I wurde jedoch ab einer SIGMA-Securinin Konzentration größer als 1 mM deutlich erniedrigt und wies bei 2,3 mM nur noch 3,13 Impulse/200 ms auf (siehe Abb. 10). Ein vergleichbarer Effekt trat auch bei Reizung mit NaCl auf. Dieses Salz hemmte die Erregung des Neurons 2/I ab einer Konzentration von 10 mM. Diese Hemmung durch SIGMA-Securinin und NaCl war auf die Wirkung als dissoziationsfähiger Elektrolyt zurückzuführen, die für einen Wasserrezeptor kennzeichnend ist.

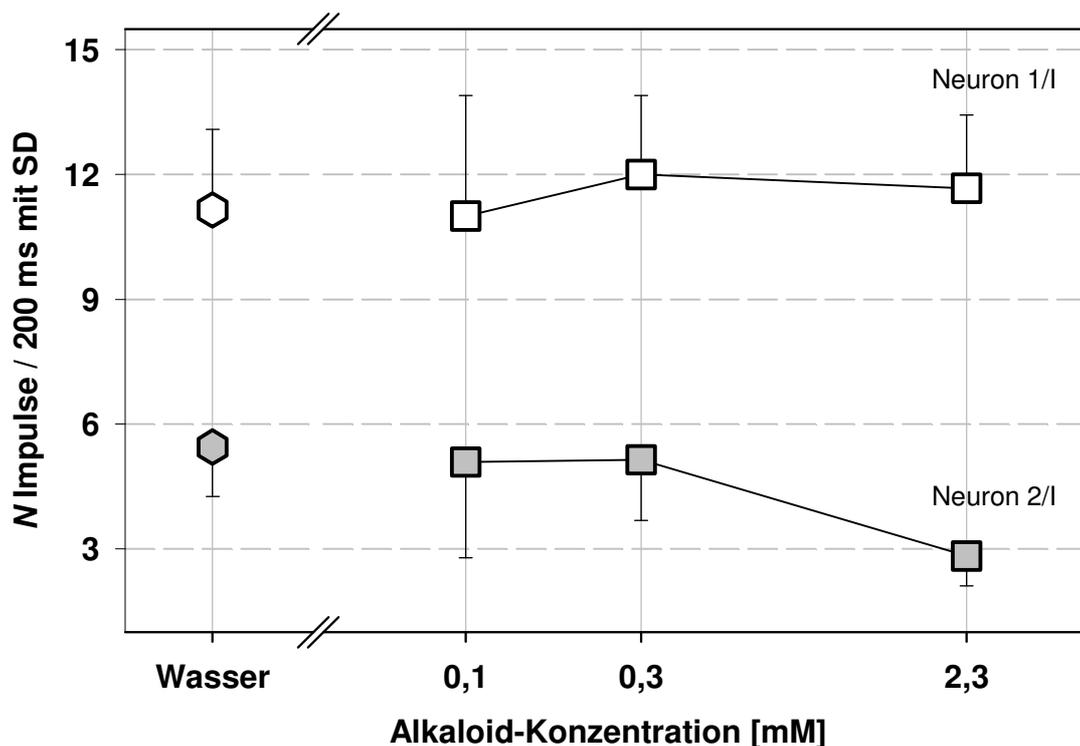


Abb. 11: Reaktion der Neurone 1/I und 2/I auf Securinin und Wasser

Dargestellt sind die mittleren Impulsfrequenzen in den ersten 200 ms nach Reizbeginn des Neurons 1/I bei Reizung mit *M.d.*-Securinin (□) und Wasser (◇) bzw. des Neurons 2/I bei Reizung mit *M.d.*-Securinin (■) und Wasser (◆) (Mittelwerte ± SD, Anzahl der untersuchten Sensillen/Termiten pro Konzentration: zwischen 7/1 und 14/2).

Das aus *M. discoidea* gewonnene *M.d.*-Securinin ist chemisch mit dem SIGMA-Securinin identisch und sollte daher die gleichen Auswirkungen

auf die Neurone 1/I und 2/I aufzeigen. So wurden für *M.d.*-Securinin exemplarisch nur die drei Konzentrationen 0,1, 0,3 und 2,3 mM getestet (siehe Abb. 11).

Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass die Impulsfrequenzen der Neurone 1/I und 2/I nach Reizung mit *M.d.*-Securinin, wie auch mit SIGMA-Securinin, dem Erregungsniveau des Wassers entsprachen. Beim Neuron 2/I führte *M.d.*-Securinin bei einer Konzentration von 2,3 mM, ebenso wie bei SIGMA-Securinin, zu einer Verringerung des durch den Reiz Wasser hervorgerufenen Erregungsniveaus. Diese Hemmung war mit 2,83 Impulsen/200 ms mit der Hemmung durch SIGMA-Securinin (3,13 Impulse/200 ms) vergleichbar.

Die Untersuchungen am TP I-Sensillum zeigten deutlich, dass kein Neuron durch Reizung mit SIGMA-Securinin oder *M.d.*-Securinin erregt wurde. Die abgeleiteten Impulsfrequenzen waren ausschließlich auf das Lösungsmittel Wasser zurückzuführen. Wie andere Elektrolyte senkten auch SIGMA-Securinin und *M.d.*-Securinin ab einer definierten Schwellenkonzentration die Erregungsfrequenz des Neurons 2/I, welche durch den Reiz Wasser hervorgerufen wurde.

Bei Reizung des TP I-Sensillums mit Phyllanthin und Phyllantidin rief keines der beiden Alkaloide Erregungen des Neurons 1/I hervor (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 12 wurde nur die Wirkung dieser beiden Alkaloide auf das Neuron 2/I dargestellt. Es zeigte sich, dass die bei Reizung des Neurons 2/I mit Phyllanthin bzw. Phyllantidin abgeleiteten Impulsfrequenzen auf dem Erregungsniveau des Wassers liegen. Damit reagierte keines der beiden Neurone 1/I und 2/I auf die Alkaloidreize, sondern nur auf das Lösungsmittel Wasser. Des weiteren verringerte sich mit steigender Phyllanthin Konzentration das durch Wasser verursachte Erregungsniveau des Neuron 2/I. So wirkte dieses Alkaloid ab 1 mM Reizkonzentration hemmend. Dabei war die Impulsfrequenz des Neurons bei einer Phyllanthin Konzentration von 5 mM auf 1,16 Impulse/200 ms verringert.

Die Antwort vom Neuron 2/I auf Phyllantidin belegte, dass sich das Erregungsniveau des Neurons, durch den Reiz Wasser hervorgerufen, bei Alkaloidkonzentrationen bis zu 0,9 mM nicht veränderte. Damit zeigte Phyllantidin keinen Einfluss auf das Neuron 2/I (siehe Abb. 12).

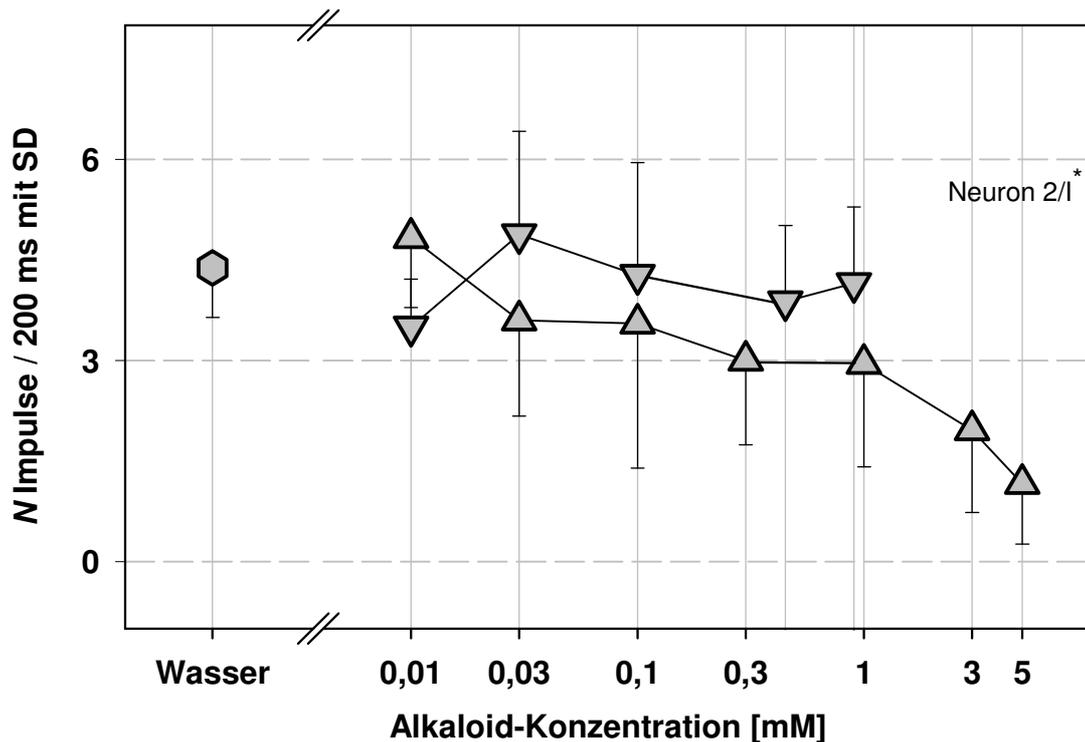


Abb. 12: Reaktion des Neurons 2/I* auf Phyllanthin, Phyllantidin und Wasser

Dargestellt sind die mittleren Impulsfrequenzen in den ersten 200 ms nach Reizbeginn bei Reizung mit Phyllanthin (▲), Phyllantidin (▼) und Wasser (⬡) (Mittelwerte \pm SD, Anzahl der untersuchten Sensillen/Termiten pro Konzentration: zwischen 11/2 und 30/2). Das * - Symbol am Neuron 2/I weist darauf hin, dass bei Phyllanthin und Phyllantidin die Identität des Neurons nicht überprüft wurde.

Zusammenfassend konnte über die neurophysiologischen Untersuchungen an den antennalen TP I-Sensillen von *S. lamanianus* gezeigt werden, dass keines der getesteten Securinega-Alkaloide erregend auf eines der fünf gustatorischen Neurone wirkte. Somit ist kein alkaloid-sensitiver Rezeptor in diesem Sensillum vorhanden. Bei Reizung mit den Securinega-Alkaloiden am TP I-Sensillum ließen sich die Impulse zweier Neurone ableiten. Dabei handelte es sich um die Neurone 1/I und 2/I, welche MIKUS (2000) als wassersensitiv beschrieb. Securinin und Phyllanthin führten ab einer bestimmten Schwellenkonzentration zur Hemmung des durch Wasser hervorgerufenen Erregungsniveaus des Neurons 2/I. Diese Hemmwirkung war auf ihre Eigenschaft als dissoziationsfähige Elektrolyte zurückzuführen.

3.3.1.2 Identifizierung der Neurone 1/I und 2/I im TP I-Sensillum

Um eindeutig zu klären, welche der fünf gustatorischen Neurone des TP I-Sensillums bei Reizung mit den Securinega-Alkaloiden abgeleitet wurden, erfolgten weitere Tests anhand von Mischreizen. Dabei war bekannt, dass Neuron 1/I durch Reizung mit 0,1 mM CaCl_2 vollständig gehemmt wird und dass das Erregungsniveau des Neurons 2/I, infolge der Reaktion auf den Reiz Wasser, unbeeinflusst bleibt. Umgekehrt sind die Verhältnisse bei der Reizung mit 300 mM KCl. Bei dieser Konzentration hemmt das Salz Neuron 2/I vollständig, wobei die Erregung vom Neuron 1/I, hervorgerufen durch den Reiz Wasser, ca. um die Hälfte erniedrigt wird (MIKUS, 2000). Diese Sachverhalte werden jeweils durch das zweite Säulenpaar der Abbildung 13 A und B dargestellt.

In Abbildung 13 A ist anhand des letzten Säulenpaares die Erregung eines Neurons auf den Mischreiz 0,1 mM CaCl_2 + 1 mM SIGMA-Securinin dargestellt. Beim Vergleich der Reaktion des TP I-Sensillums auf diesen Mischreiz mit der Reaktion bei Reizung mit 0,1 mM CaCl_2 , zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Beim Mischreiz reagierte nur ein Neuron, wobei Neuron 1/I durch CaCl_2 gehemmt wurde (siehe Abb. 13 A). Die Impulsfrequenz des reagierenden Neurons auf den Mischreiz entsprach der Frequenz des Neurons 2/I auf 0,1 mM CaCl_2 , hervorgerufen durch den Reiz Wasser (siehe Abb. 13 A, Vergleich Säulenpaar 2 und 3).

Um zu überprüfen, ob es sich bei diesem reagierenden Neuron tatsächlich um Neuron 2/I handelt, wurde ein weiterer Mischreiz an diesem Sensillum getestet. Dieser bestand aus 300 mM KCl + 1 mM SIGMA-Securinin. Das letzte Säulenpaar der Abbildung 13 B zeigt die abgeleiteten Impulsfrequenzen der Neurone des TP I-Sensillums auf diesen Mischreiz. Dabei ist zu erkennen, dass ein Neuron in der selben Impulsfrequenz reagiert, wie Neuron 1/I auf 300 mM KCl. Neuron 2/I bleibt durch KCl gehemmt.

Beim Vergleich der Reaktionen auf beide Mischreize geht hervor, dass die bei Reizung mit SIGMA-Securinin abgeleiteten Impulsfrequenzen von den Neuronen 1/I und 2/I stammten. Diese Impulsfrequenzen sind jedoch nicht auf das Alkaloid, sondern, wie bereits beschrieben, auf das Lösungsmittel Wasser zurückzuführen (siehe Kapitel 3.3.1.1).

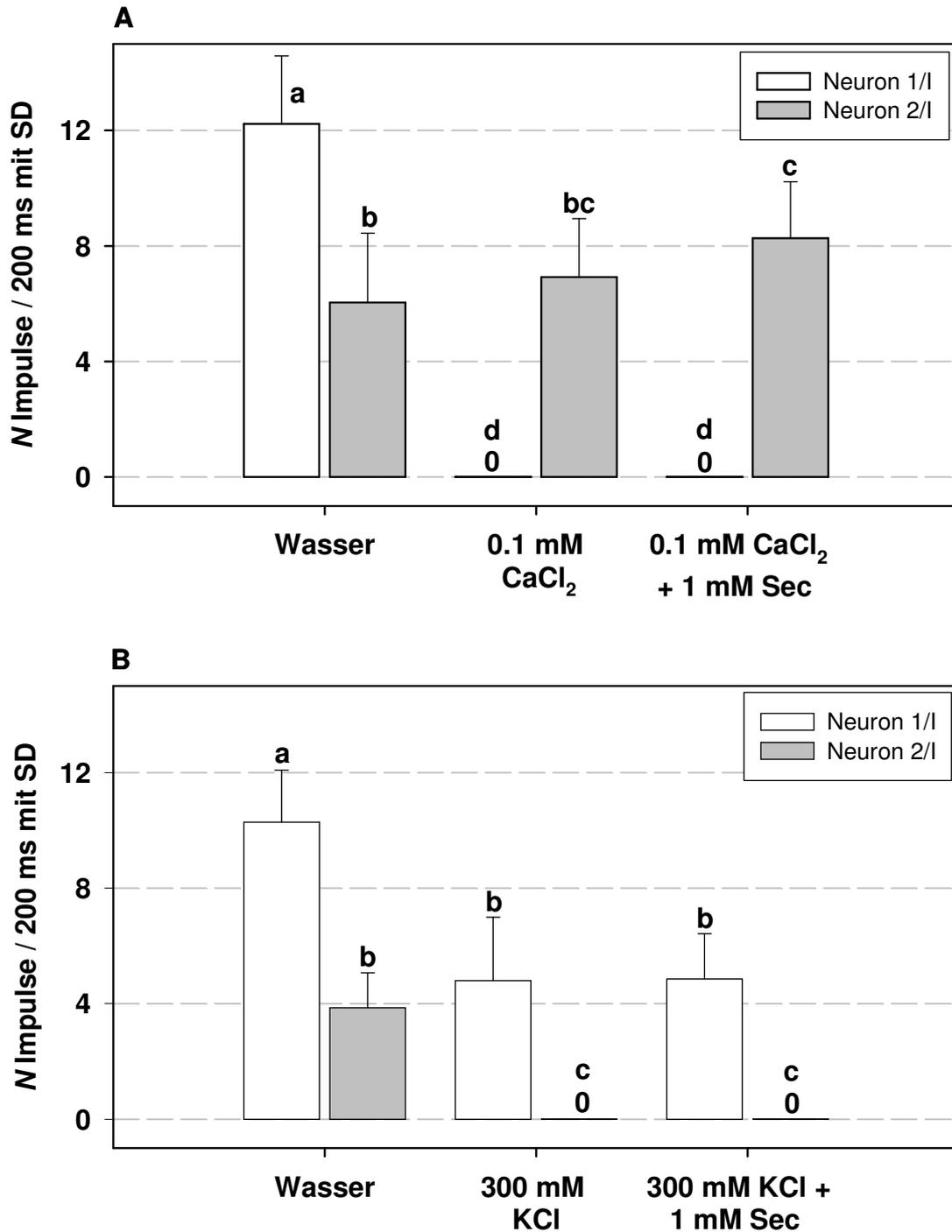


Abb. 13: Identifizierung der Neurone 1/I und 2/I im TPI-Sensillum anhand von Kombi-nationstests

Dargestellt sind die mittleren Impulsfrequenzen in den ersten 200 ms nach Reizbeginn (Mittelwerte \pm SD, Anzahl der untersuchten Sensillen/Termiten pro Konzentration: zwischen 12/1 und 16/1). A) Reaktion der Neurone 1/I und 2/I auf Wasser, 0,1 mM CaCl₂ und auf den Mischreiz 0,1 mM CaCl₂ + 1 mM SIGMA-Securin (Sec). B) Reaktion der Neurone 1/I und 2/I auf Wasser, 300 mM KCl und auf den Mischreiz 300 mM KCl + 1 mM SIGMA-Securin (Sec). Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen stehen für signifikante Unterschiede (t-Test, zweiseitig, $p \leq 0,05$).

3.3.1.3 Reaktion des TP III-Sensillums auf die Securinega-Alkaloide

Das TP III-Sensillum ist das kürzeste gustatorische Sensillum auf den Antennen von *S. lamanianus* und enthält nur ein geschmackssensitives Neuron (siehe Tab. 1). MIKUS (2000) bezeichnete dieses Neuron, der Nomenklatur folgend, als 1/III und konnte bei Reizung mit Wasser, NaCl oder Glycin nur geringe Erregungsniveaus von ca. 4 Impulsen/200 ms ableiten. Dies deutet darauf hin, dass keiner dieser Stoffe einen adäquaten Reiz für dieses Neuron darstellt. Neuron 1/III wurde hinsichtlich der Wahrnehmung von Securinega-Alkaloiden getestet.

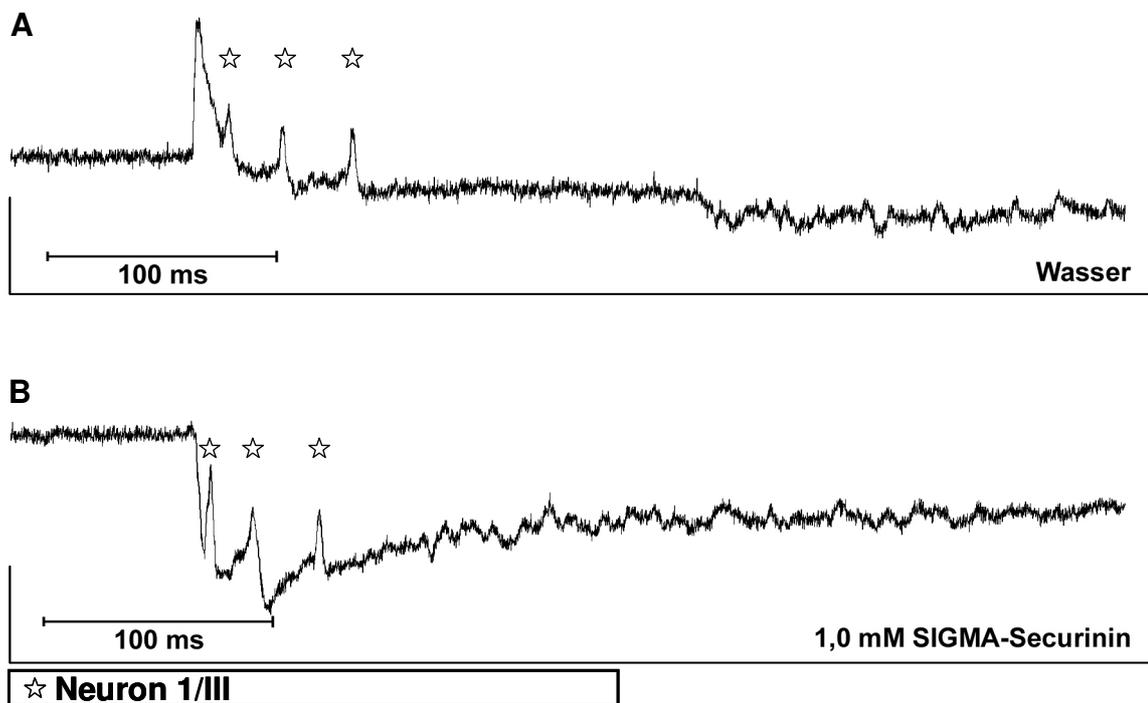


Abb. 14: Registrierbeispiel des Neurons 1/III bei Reizung mit Wasser und SIGMA-Securinin

Es sind die abgeleiteten Impulse innerhalb der ersten 500 ms nach Reizung mit A) Wasser und B) 1 mM SIGMA-Securinin dargestellt.

Durch Reizung mit 1,0 mM SIGMA-Securinin und 1,0 mM bzw. 5,0 mM Phyllanthin wurden am TP III-Sensillum Impulsfrequenzen von 3 – 4 Impulsen/200 ms abgeleitet. Dies ist exemplarisch durch 1,0 mM SIGMA-Securinin dargestellt (siehe Abb. 14 B). Die Registrierbeispiele für Phyllanthin sind im Anhang aufgeführt (siehe Abb. A2). Diese Impulsfrequenzen waren mit denen bei Reizung mit Wasser identisch

(siehe Abb. 14 A). Diese Ergebnisse zeigen, dass das gustatorische Neuron 1/III im TP III-Sensillum nicht sensitiv für die Wahrnehmung von Securinega-Alkaloiden war.

3.3.1.4 Reaktion des TP II-Sensillums auf die Securinega-Alkaloide

Das TP II-Sensillum ist das zweitlängste Sensillum und enthält vier geschmackssensitive Neurone (siehe Tab. 1). Diese vier Neurone wurden bezüglich ihrer Reaktion auf die Reizung mit Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin untersucht.

Es war bereits bekannt, dass bei diesem Sensillum das Neuron 1/II für Glycin sensitiv ist (MIKUS, 2000). Der Autor beschrieb jedoch keine Reaktion dieses Neurons auf *M. discoidea*-Extrakte, weshalb von Neuron 1/II keine Reaktion auf die Alkaloide zu erwarten war. Das Neuron 2/II wurde von MIKUS (2000) als Wasserrezeptor charakterisiert, der mit einer Impulsfrequenz von 5 – 6 Impulsen/200 ms auf den Reiz Wasser reagierte.

Nach Reizung des TP II-Sensillums mit SIGMA-Securinin, konnten Erregungen zweier Neurone abgeleitet werden. Dabei reagierte ein Neuron bei einer SIGMA-Securinin Konzentration von 0,01 mM mit der gleichen Impulsfrequenz wie bei Reizung mit Wasser (siehe Abb. 15). Wie in Kapitel 3.3.1.5 gezeigt wird, handelt es sich dabei um Neuron 2/II, dem Wasserrezeptor. Wurde die Konzentration von SIGMA-Securinin auf 2,3 mM erhöht, fiel diese Impulsfrequenz von 7,37 auf 3,00 Impulsen/200 ms (siehe Abb. 15). Die einsetzende Erniedrigung der Impulsfrequenz ab einer bestimmten Alkaloid-Konzentration ist auf die Wirkung als Elektrolyt zurückzuführen. Auch der Elektrolyt NaCl zeigte auf diesen Wasserrezeptor ab einer Schwellenkonzentration von 10 mM einen vergleichbar hemmenden Effekt (siehe Abb. 15). Die Schwellenkonzentration für SIGMA-Securinin lag bei 0,03 mM.

Bei Reizung mit *M.d.*-Securinin wurden vergleichbare Impulsfrequenzen, wie für SIGMA-Securinin, an Neuron 2/II abgeleitet (Daten nicht gezeigt). Bei Korrelation dieser beiden Datensätze nach Pearson ergab sich ein Korrelationskoeffizient r von 0,941. Dieser Koeffizient wurde zweiseitig getestet, und ist auf dem 0,01 Niveau signifikant. Dies zeigt, dass Neuron 2/II auf Reizung mit SIGMA-Securinin und *M.d.*-Securinin identisch reagierte.

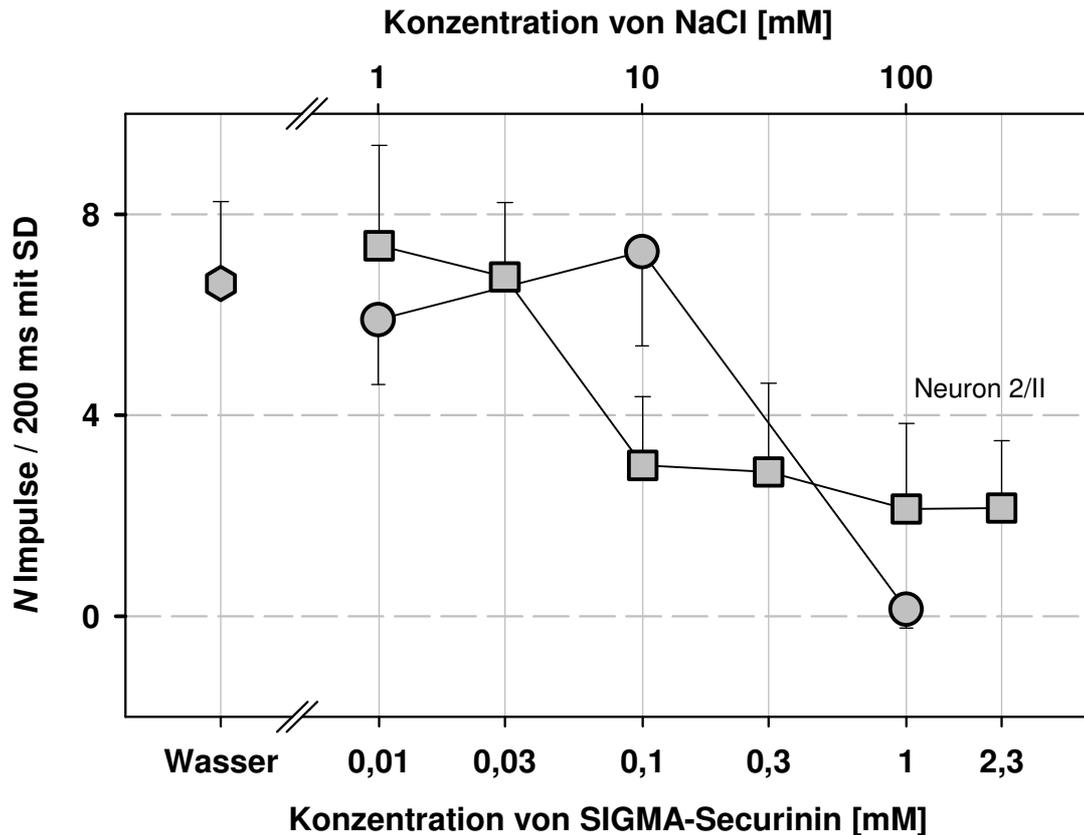


Abb. 15: Reaktion des Neurons 2/II auf SIGMA-Securinin, NaCl und Wasser

Dargestellt sind die mittleren Impulsfrequenzen in den ersten 200 ms nach Reizbeginn bei Reizung mit SIGMA-Securinin (■), NaCl (●) und Wasser (◈) (Mittelwerte \pm SD, Anzahl der untersuchten Sensillen/Termiten pro Konzentration: zwischen 8/1 und 27/2). Ableitungsbeispiele im Anhang (Abb. A3 und A4).

Die Ergebnisse zeigen, dass Securinin nicht erregend auf Neuron 2/II wirkte. Das Alkaloid bewirkte jedoch als Elektrolyt das Abfallen der durch den Reiz Wasser hervorgerufenen Erregungsfrequenz. Die Schwellenkonzentration war bei diesem Alkaloid mit 0,03 mM niedriger als beim Elektrolyt NaCl.

Bei Reizung des TP II-Sensillum mit SIGMA-Securinin ließen sich weiterhin die Impulse eines zweiten Neurons ableiten. Dieses Neuron, welches später als Neuron 3/II identifiziert wird (siehe Kapitel 3.3.1.5), reagierte im Gegensatz zu den anderen Neuronen, mit Erregung auf dieses Alkaloid. Abbildung 16 zeigt den Reiz-Erregungsverlauf für Neuron 3/II bei Reizung mit SIGMA-Securinin. Daraus geht hervor, dass bereits bei einer Konzentration von 0,01 mM 1,96 Impulse/200 ms gemessen wurden. Ab einer Konzentration von 0,1 mM SIGMA-Securinin stieg das Erregungsniveau stark an. Bei Reizung mit Wasser konnte für Neuron 3/II

hingegen keine Erregung abgeleitet werden (siehe Abb. 16). Dieses Neuron ist daher nicht sensitiv für den Reiz Wasser.

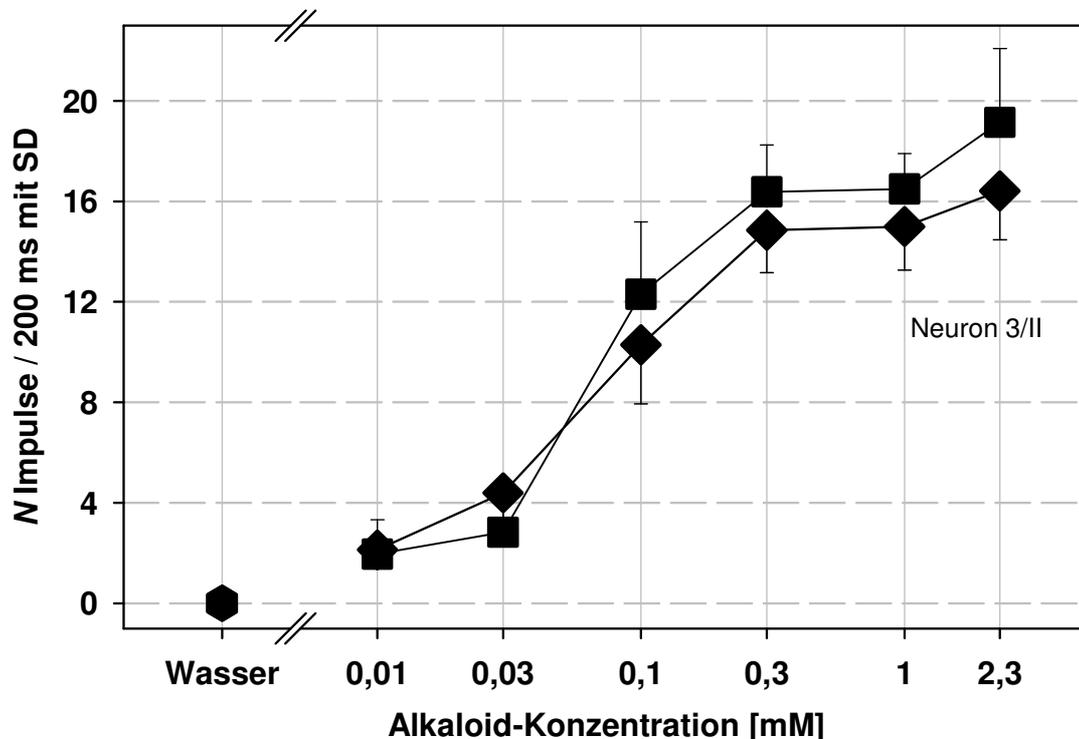


Abb. 16: Reaktion des Neurons 3/II auf SIGMA-Securinin, *M.d.*-Securinin und Wasser

Dargestellt sind die mittleren Impulsfrequenzen in den ersten 200 ms nach Reizbeginn bei Reizung mit SIGMA-Securinin (■), *M.d.*-Securinin (◆) und Wasser (●) (Mittelwerte \pm SD, Anzahl der untersuchten Sensillen/Termiten pro Konzentration: zwischen 12/2 und 34/3). Ableitungsbeispiele im Anhang (Abb. A4).

Die Reiz-Erregungs-Beziehung⁴ für SIGMA-Securinin zeigte einen sigmoiden Verlauf. Der Verlauf der Reiz-Erregungskurve für *M.d.*-Securinin ist vergleichbar mit dem für SIGMA-Securinin (siehe Abb. 16). Die Erregungsfrequenzen von SIGMA-Securinin und *M.d.*-Securinin wurden miteinander korreliert (Korrelation nach Pearson), wodurch sich ein Korrelationskoeffizient r von 0,993 ergab. Dieser wurde zweiseitig getestet und war auf dem Niveau von 0,01 signifikant. Neuron 3/II reagierte somit auf Reizung durch SIGMA-Securinin und *M.d.*-Securinin mit identischer Erregung und zeigte dabei einen sigmoiden Verlauf zwischen Reizkonzentration und Erregungsfrequenz.

⁴ Die Reiz-Erregungs-Beziehung stellt die Abhängigkeit zwischen der Reizkonzentration und der Erregungsfrequenz einer Sinneszelle bei der Reaktion auf einen Stimulus dar.

Weiterhin wurde untersucht, ob Phyllanthin und Phyllantidin ebenfalls eine Erregung des Neurons 3/II am TP II-Sensillum hervorrufen. So sind in Abbildung 17 die Erregungsverläufe des Neurons 3/II dargestellt, die bei Reizung mit Phyllanthin und Phyllantidin auftraten. Daraus geht hervor, dass beide Alkaloide ab einer Konzentration von 0,03 mM erregend auf Neuron 3/II wirkten. Da die Alkaloide in Wasser nicht in so hohen Konzentrationen lösbar waren, ließ sich eine Sättigung des Erregungsniveaus nicht messen. Deswegen konnte ein möglicher sigmoider Verlauf nicht vollständig nachgewiesen werden.

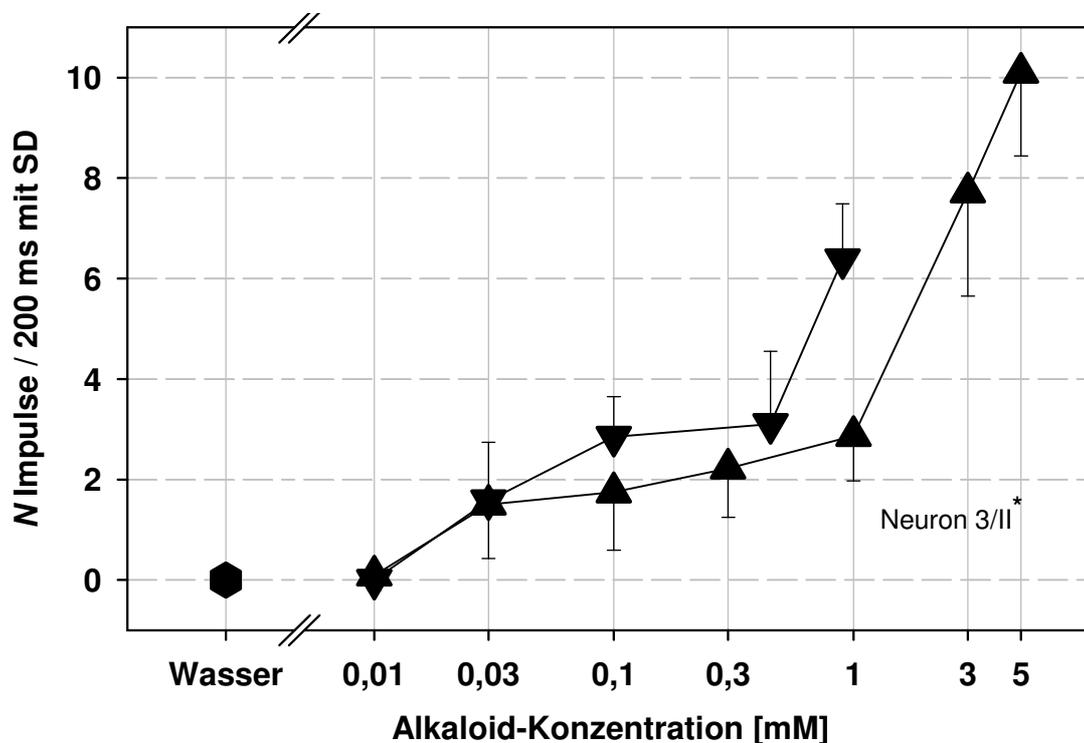


Abb. 17: Reaktion des Neurons 3/II* auf Phyllanthin, Phyllantidin und Wasser

Dargestellt sind die mittleren Impulsfrequenzen in den ersten 200 ms nach Reizbeginn bei Reizung mit Phyllanthin (▲), Phyllantidin (▼) und Wasser (●). (Mittelwerte \pm SD, Anzahl der untersuchten Sensillen/Termiten pro Konzentration: zwischen 10/2 und 23/2). Das * - Symbol am Neuron 3/II weist darauf hin, dass bei Ptn und Pdn die Identität der Neurone nicht überprüft wurde.

Um die Reaktion des alkaloidsensitiven Neurons 3/II auf Securinin und Phyllanthin miteinander vergleichen zu können, wurden auf Basis einer sigmoiden Funktion Regressionen der Datensätze berechnet (siehe Tab. 4). Die Kurvenverläufe der Regression für beide Alkaloide sind in Abbildung 18 dargestellt.

Tab. 4: Berechnungsparameter der sigmoiden Regression für die Reiz-Erregungskurven von Securinin und Phyllanthin

	Regression für Securinin	Regression für Phyllanthin
Formel	$f(x) = y_0 + \frac{a}{1 + e^{-\left(\frac{x-x_0}{b}\right)}}$	
a	58,8216	13,2872
b	0,0844	1,3933
x₀	-0,0945	1,5760
y₀	-43,1997	-2,1174
R²	0,9934	0,978

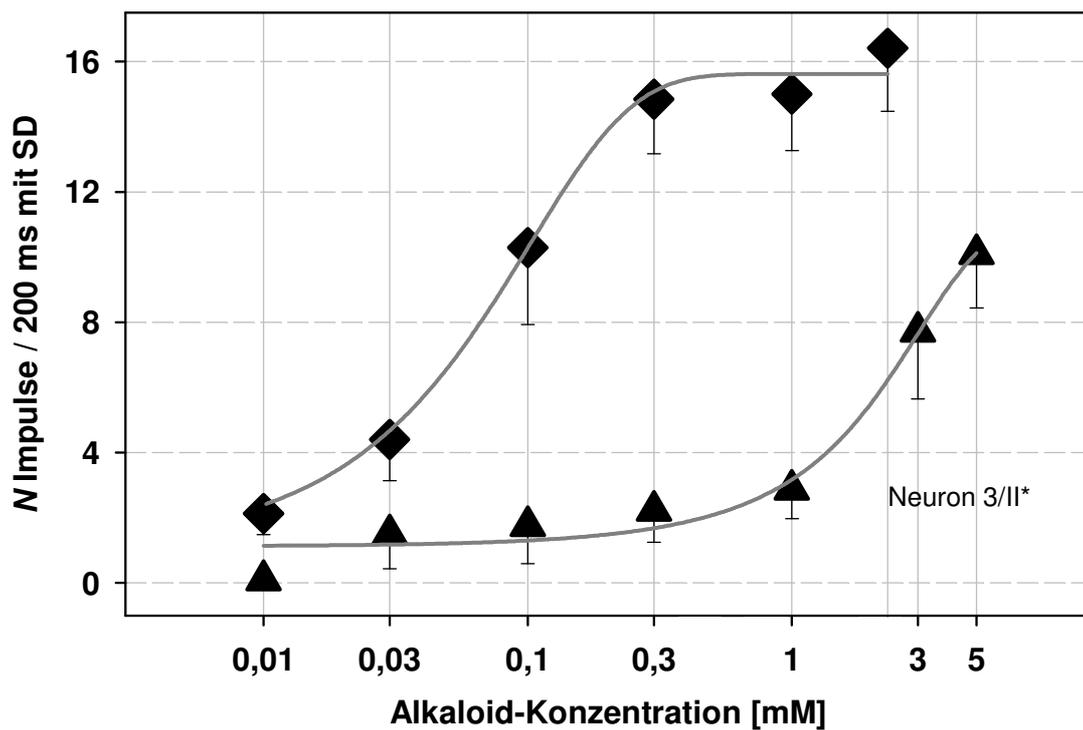


Abb. 18: Regression der Reiz-Erregungskurven für Securinin und Phyllanthin

Dargestellt sind die zwei Reiz-Erregungsbeziehungen für Securinin (◆) und Phyllanthin (▲) mit den durch sigmoide Regression ermittelten Kurvenverläufen. Die Berechnungsparameter für die Regressionen sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Anhand der berechneten Regressionen der Reiz-Erregungsdaten konnten die Halbmaximalerregungs-Konzentrationen (ED_{50}) ermittelt werden. Diese ED_{50} -Werte dienen unter anderem der Beschreibung sigmoider Kurvenverläufe und benennen die Reizkonzentration bei 50 %iger Maximalerregung. Der ED_{50} -Wert berechnete sich für Securinin mit einer Konzentration von 0,05 mM. Für Phyllanthin wurde der ED_{50} -Wert bei 1,5 mM festgelegt, da er wegen fehlender Datenpunkte nicht berechnet werden konnte. Damit ergab sich ein Verhältnis zwischen diesen beiden ED_{50} -Werten von 1 : 30. Die Anstiege in den Punkten der ED_{50} -Konzentrationen wurden anhand der Regressionsfunktionen berechnet. Dabei ergab sich für Securinin im Punkt 0,05 mM ein Anstieg von 90 und für Phyllanthin im Punkt 1,5 mM ein Anstieg von 2,4 Impulsen/1 mM. Hierbei ergab sich ein vergleichbarer Faktor wie für die beiden ED_{50} -Werte von 37. Aus dem Vergleich der beiden Schwellenkonzentrationen für Securinin und Phyllanthin ließ sich ebenfalls ein Verhältnis berechnen. Somit kann aus Abbildung 18 für Securinin ein Schwellenbereich von 0,01 – 0,03 mM und für Phyllanthin von 0,3 – 1 mM abgelesen werden. Dies entspricht einem Verhältnisbereich von 1:30 – 1:33.

Zusammenfassend zeigten alle diese vergleichbaren Verhältnisse für die sigmoiden Regressionskurven von Securinin und Phyllanthin den gleichen Verlauf der Reiz-Erregungs-Beziehungen. Phyllantidin wurde in diese Betrachtungen nicht mit einbezogen, da der bis zu 0,9 mM gemessene Reiz-Erregungskurvenverlauf keine weiteren Schlüsse zuließ.

Wie bei Reizung mit Securinin ließen sich bei Reizung des TP II-Sensillums mit Phyllanthin und Phyllantidin noch die Impulse eines zweiten Neurons ableiten. Dieses Neuron war das Neuron 2/II und stellte den Wasserrezeptor dar (siehe Kapitel 3.3.1.5). Das durch Wasser hervorgerufene Erregungsniveau dieses Wasserrezeptors wurde durch die beiden Alkaloide Phyllanthin und Phyllantidin bis zu einer Konzentration von 0,1 mM nicht beeinflusst (siehe Abb. 19). Beide Alkaloide wirkten jedoch als dissoziationsfähige Elektrolyte und hemmten bei höheren Konzentrationen das durch Wasser hervorgerufene Erregungsniveau.

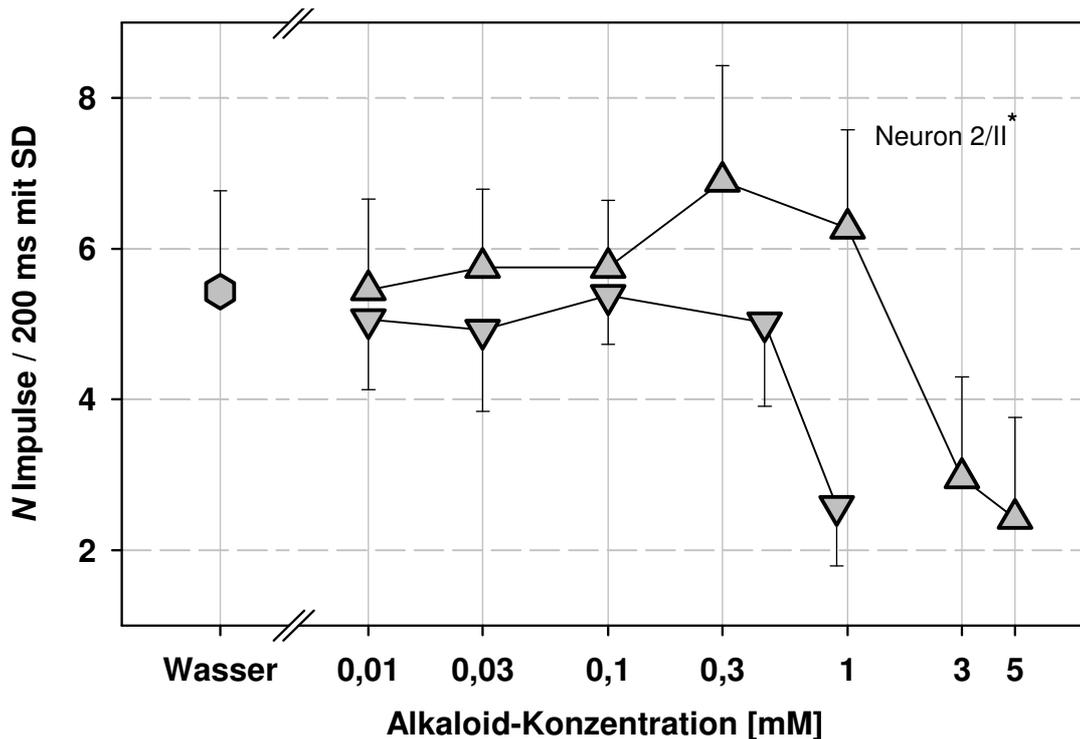


Abb. 19: Reaktion des Neurons 2/II auf Phyllanthin, Phyllantidin und Wasser

Dargestellt sind die mittleren Impulsfrequenzen in den ersten 200 ms nach Reizbeginn bei Reizung mit Phyllanthin (▲), Phyllantidin (▼) und Wasser (◈) (Mittelwerte \pm SD, Anzahl der untersuchten Sensillen/Termiten pro Konzentration: zwischen 10/2 und 23/2). Das * - Symbol am Neuron 2/II weist darauf hin, dass bei Ptn und Pdn die Identität des Neurons nicht überprüft wurde.

Die Ergebnisse der Untersuchungen am TP II-Sensillum zeigten zusammengefasst, dass es in diesem Sensillum einen alkaloidspezifischen Rezeptor gibt, der auf alle drei getesteten Securinega-Alkaloide mit Erregung reagierte. Dieser Rezeptor wurde als Neuron 3/II ausgewiesen und reagierte am sensitivsten auf Securinin.

3.3.1.5 Identifizierung des alkaloidsensitiven Neurons 3/II im TP II-Sensillum

Im TP II-Sensillum ließen sich, bei Reizung mit in Wasser gelösten Securinega-Alkaloiden, die Impulse von zwei der vier gustatorisch sensitiven Neurone ableiten. Um die Identität des Securinega-Alkaloid sensitiven Neurons zu testen, wurden Kombinationstests durchgeführt. Es war bekannt, dass Neuron 2/II als Wasserrezeptor auf den Reiz Wasser mit Erregung reagiert, welche durch steigende Salzkonzentrationen zunehmend gehemmt wird (MIKUS, 2000). Des weiteren zeigte dieser Autor, dass das Neuron 1/II durch 100 mM Glycin erregt wird.

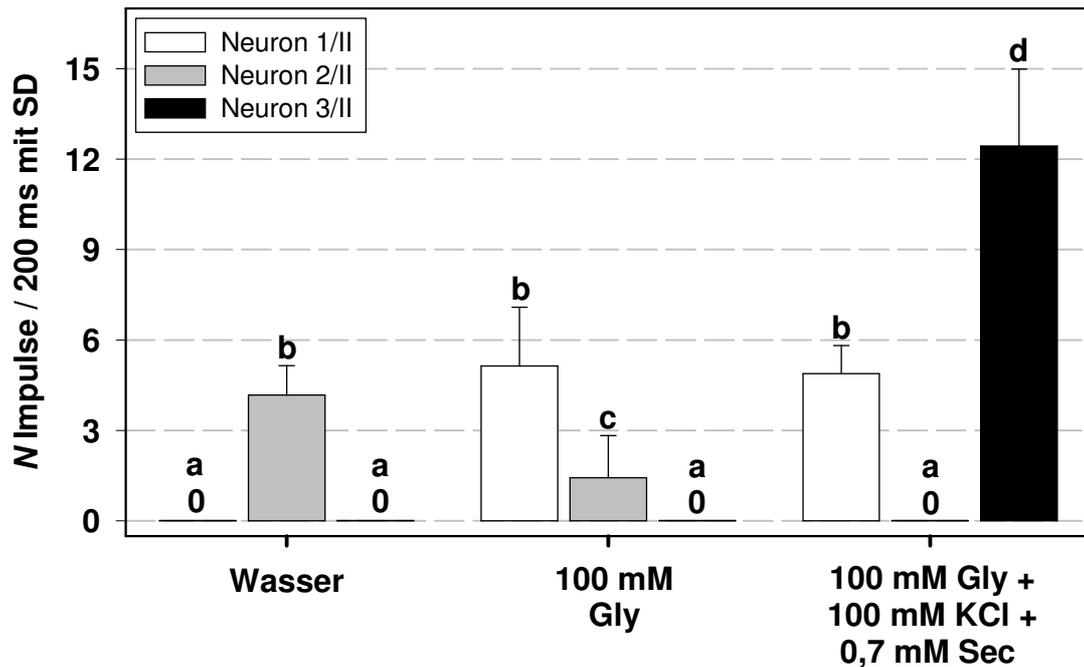


Abb. 20: Identifizierung des alkaloidsensitiven Neurons im TP II-Sensillum anhand von Kombinationstests

Dargestellt sind die mittleren Impulsfrequenzen in den ersten 200 ms nach Reizbeginn bei Reizung mit Wasser, 100 mM Glycin (Gly) und dem Mischreiz 100 mM Glycin + 100 mM KCl + 0,7 mM SIGMA-Securin (Sec) (Mittelwerte \pm SD, Anzahl der untersuchten Sensillen/Termiten pro Konzentration: zwischen 7/1 und 12/1). Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen stehen für signifikante Unterschiede (t-Test, zweiseitig, $p \leq 0,05$).

Weiterhin wurde gezeigt, dass das Erregungsniveau des Neurons 2/II durch Glycin nur leicht erniedrigt und durch 100 mM KCl vollständig gehemmt wird (siehe Abb. 20). Mit Hilfe eines Mischreizes aus 100 mM Glycin + 100 mM KCl + 0,7 mM SIGMA-Securin wurde die Identität des alkaloidsensitiven Neurons getestet. Bei diesem Mischreiz konnten die Erregungen von zwei Neuronen abgeleitet werden (siehe Abb. 20, letzte Säulengruppe). Da Neuron 2/II durch 100 mM KCl gehemmt wurde, konnte dieses für die weiteren Betrachtungen ausgeschlossen werden. Von einem der zwei reagierenden Neurone wurde eine Erregungsfrequenz abgeleitet, die dem Erregungsniveau des Neuron 1/II auf den Reiz 100 mM Glycin entspricht. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Erregung des anderen Neurons auf den Reiz SIGMA-Securin zurückzuführen war. Zudem lag die hohe Erregungsfrequenz dieses Neurons mit ca. 13 Impulsen/200 ms im Bereich der Reiz-Erregungs-Kurve vom SIGMA-Securin (siehe Abb. 16), während die anderen Neuronen deutlich geringere Erregungsfrequenzen zeigten.

Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass die Neurone 1/II und 2/II nicht auf SIGMA-Securinin reagieren. Das alkaloidsensitive Neuron musste daher eines der beiden verbleibenden gustatorischen im TP II-Sensillum sein. Keines dieser beiden Neurone konnte von MIKUS (2000) charakterisiert werden. Daher wurde das durch SIGMA-Securinin erregte Neuron, der Nomenklatur folgend, als Neuron 3/II bezeichnet.

3.3.2 Neuron 3/II – ein alkaloidsensitiver Rezeptor

3.3.2.1 Zeitlicher Erregungsverlauf des alkaloidsensitiven Neurons 3/II

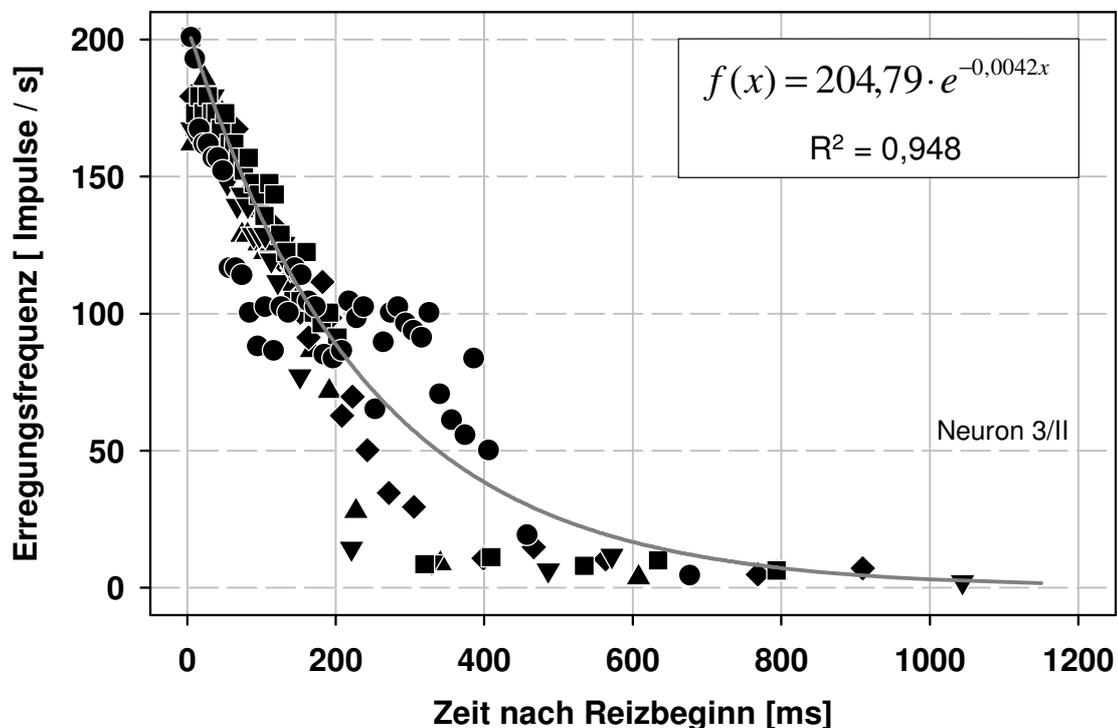


Abb. 21: Zeitlicher Erregungsverlauf des Neurons 3/II bei Reizung mit 1 mM SIGMA-Securinin

Dargestellt ist die Überlagerung der Erregungsverläufe von fünf verschiedenen Neuronen 3/II (verschiedene Symbole stellen verschiedene Neurone dar) bei Reizung mit 1 mM SIGMA-Securinin. Bei diesem Erregungsverlauf wurde die Reizdauer auf 1200 ms ausgedehnt, um alle auftretenden Impulse zu erfassen. Die Frequenz wurde aus der Zeitdifferenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Impulsen ermittelt und zum Zeitpunkt des späteren Impulses aufgetragen. Weiterhin wurde über alle fünf Datensätze eine exponentiale Regression gerechnet, deren Formel und Bestimmtheitsmaß in der Abbildung angegeben sind.

Bei den bisher dargestellten Auswertungen wurde stets das gemittelte Erregungsniveau der ersten 200 ms nach Reizbeginn angegeben. Um das Erregungsmaximum und den gesamten zeitlichen Verlauf der Erregungsfrequenz darzustellen, wurden die zeitlichen Erregungsverläufe von fünf Neuronen des Typs 3/II über 1200 ms hinweg aufgenommen. Die Reizung erfolgte dabei mit 1 mM SIGMA-Securinin.

Abbildung 21 zeigt die Erregungsverläufe von fünf verschiedenen 3/II-Neuronen mit der berechneten exponentialen Regression. Daraus ergab sich, dass das Neuron 3/II auf Reizung mit 1 mM SIGMA-Securinin mit einer Maximalerregungsfrequenz von 200 Impulsen/s reagierte. Nach ca. 600 ms fiel diese phasisch auf ca. 10 Impulse/s ab. Anschließend sank sie phasisch auf 0 Impulse/s. Der gesamte Erregungsverlauf war daher rein phasisch.

3.3.2.2 Hemmung des alkaloidsensitiven Neurons 3/II durch die Securinega-Alkaloide

MIKUS (2000) fand einen hemmenden Effekt der *M. discoidea*-Extrakte am TP II-Sensillum. Durch Reizung des selben Sensillums mit dem Extrakt (Erstreiz) und darauf mit 10 mM NaCl als Folgereiz, wurde gefunden, dass Neuron 2/II nicht mehr auf den Folgereiz reagierte. MIKUS (2000) schloss auf eine hemmende Wirkung der Extrakte auf das Neuron 2/II.

Um diesen Effekt ebenfalls für die einzelnen Securinega-Alkaloide zu überprüfen, wurde ein TP II-Sensillum mit 1 mM SIGMA-Securinin gereizt und nach 5 min nochmals ein Folgereiz von 1 mM SIGMA-Securinin gegeben. (siehe Abb. 22). Aus diesen Ableitungen ging hervor, dass das Neuron 2/II (★) auf den Reiz Wasser, bei Erst- und Folgereiz, mit der gleichen Erregungsfrequenz von 6 Impulsen/200 ms reagierte (siehe Abb. 22 A, B). Dieses Ergebnis zeigt, dass das Alkaloid, entgegen der Annahme von MIKUS (2000), Neuron 2/II nicht hemmt.

Das alkaloidsensitive Neuron 3/II (★) reagierte bei Erstreizung mit SIGMA-Securinin mit einer hohen Erregungsfrequenz (siehe Abb. 22 A). Bei Folgereizung des selben Sensillums konnte jedoch festgestellt werden, dass dieses Neuron 3/II gehemmt war (siehe Abb. 22 B). So zeigte sich, dass nachfolgend nur noch 3 Impulse des Neurons 3/II abzuleiten waren. Daraus geht hervor, dass SIGMA-Securinin das Neurons 3/II ab 1 mM hemmte.

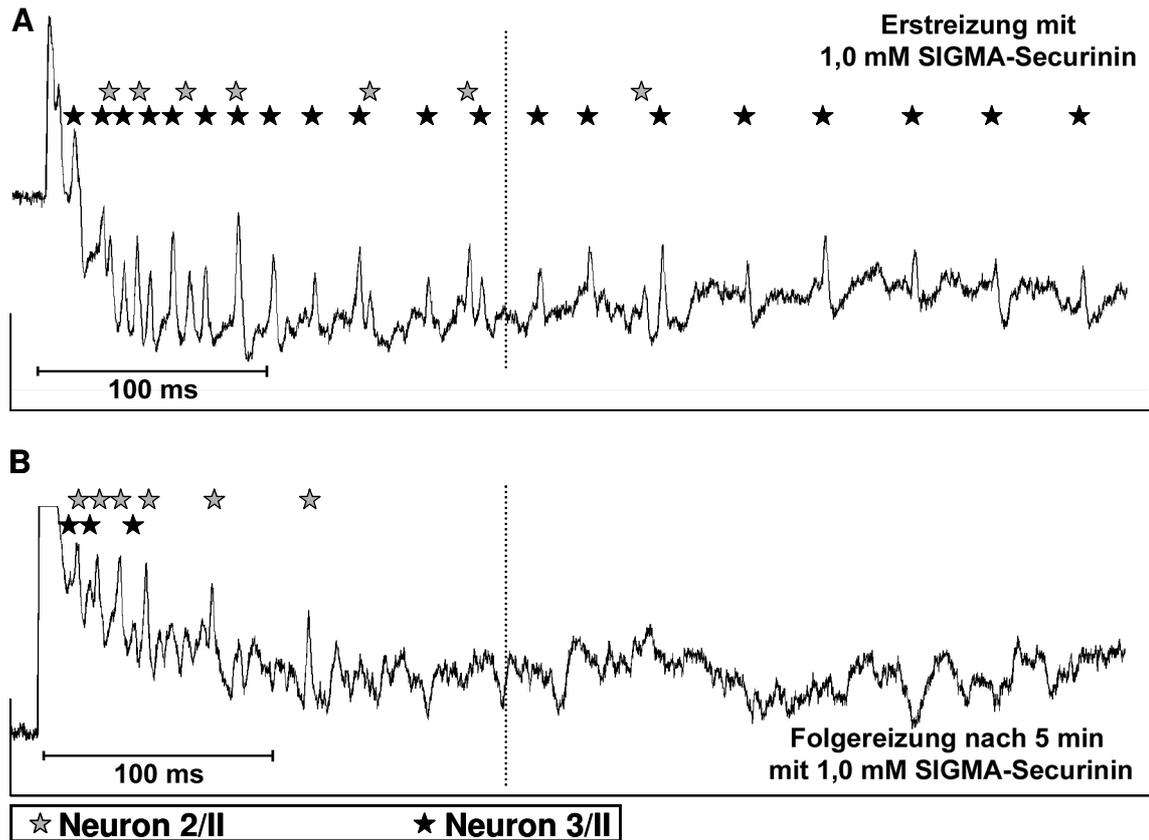


Abb. 22: Hemmtest: Keine Hemmung des Neuron 2/II durch SIGMA-Securinin

Dargestellt sind zwei Ableitungen des selben TP II-Sensillum bei A) Erstreizung mit 1 mM SIGMA-Securinin und B) Folgereizung nach 5 min mit 1 mM SIGMA-Securinin. Die senkrechten unterbrochenen Linien stellen die Grenze des zeitlichen Auswertbereiches von 200 ms dar.

Dieser hemmende Effekt des SIGMA-Securinins auf das Neuron 3/II konnte auch bei den *M. discoidea*-Alkaloiden Phyllanthin und Phyllantidin nachgewiesen werden. Dabei wirkten diese Alkaloide erst ab einer definierten Konzentration hemmend. Hemmung durch Phyllanthin trat ab 5 mM und durch Phyllantidin ab 0,9 mM auf. Die entsprechenden Ableitungsbeispiele sind im Anhang A6 und A7 aufgeführt.

Die bisherigen Ableitungsbeispiele zeigten den hemmenden Effekt der Alkaloide auf das alkaloidsensitive Neuron 3/II nach einer Zeitspanne zwischen Erst- und Folgereiz von 5 min. Um herauszufinden, wie lange diese Hemmung anhält, wurde anhand vom SIGMA-Securinin ein, in seiner zeitlichen Ausdehnung erweiterter, Hemmtest durchgeführt. Dabei wurde die Hemmwirkung bei verschiedenen Zeitspannen zwischen Erst- und Folgereiz erfasst (siehe Abb. 23). Bei einer Spanne von 5 min sank die Erregungsfrequenz des Neurons 3/II auf ca. 3 Impulse/200 ms ab. Je

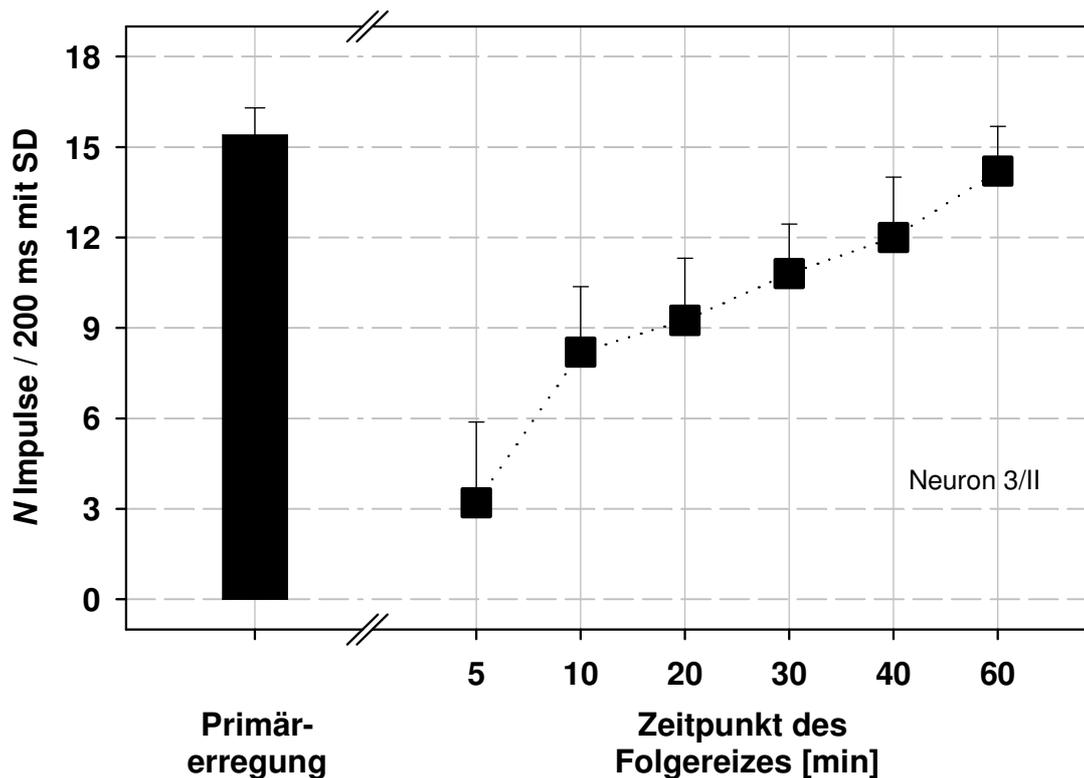


Abb. 23: Hemmtest: Zeitlicher Zusammenhang der Hemmung der Primärerregung des Neurons 3/II durch Reizung mit SIGMA-Securinin

Dargestellt sind die mittleren Impulsfrequenzen in den ersten 200 ms nach Reizbeginn bei Reizung mit SIGMA-Securinin (■) zu verschiedenen Zeitpunkten des Folgereizes (Mittelwerte \pm SD). Dieser Test wurde an fünf TP II-Sensillen einer Termiten durchgeföhrt. Ableitungsbeispiele im Anhang (Abb. A5).

mehr Zeit jedoch zwischen dem Erst- und Folgereiz verging, desto geringer war das Absinken der Erregungsfrequenz. So wurde bei einer Zeitspanne von 60 min fast das Niveau der Primärerregung von ca. 15 Impulsen/200 ms erreicht (siehe Abb. 23).

Aus den Untersuchungen zu der Hemmwirkung der Securinega-Alkaloide kann zusammenfassend gesagt werden, dass alle hemmend auf das alkaloidsensitive Neuron 3/II wirkten. Die beim SIGMA-Securinin gemessene zeitliche Abhängigkeit dieser Hemmung zeigte, dass erst nach 60 min die Erregung des Neurons 3/II wieder auf dem Niveau der Primärerregung lag.

3.3.3 Unterschiedliche Erregungsfrequenzen der Neurone 3/II in Abhängigkeit mit der Position des Antennensegmentes

Insgesamt wurden in den TP II-Sensillen während der neurophysiologischen Untersuchungen die Erregung nach Reizung mit Securinin von 143 3/II-Neuronen erfasst. Dabei verteilten sich die vermessenen Sensillen auf mehrere Flagellarsegmente ($N = 9$ bis 11) im distalen Antennenabschnitt. Bei den Untersuchungen fielen Unterschiede in den Erregungsfrequenzen des Neurons 3/II bei gleichen Securinin-Konzentrationen auf, die mit der unterschiedlichen Lage der entsprechenden Sensillen auf der Antenne zu korrelieren schienen. So zeigten die Neurone der Sensillen des ersten distalen Antennensegmentes, verglichen mit allen anderen, immer erhöhte Erregungsfrequenzen.

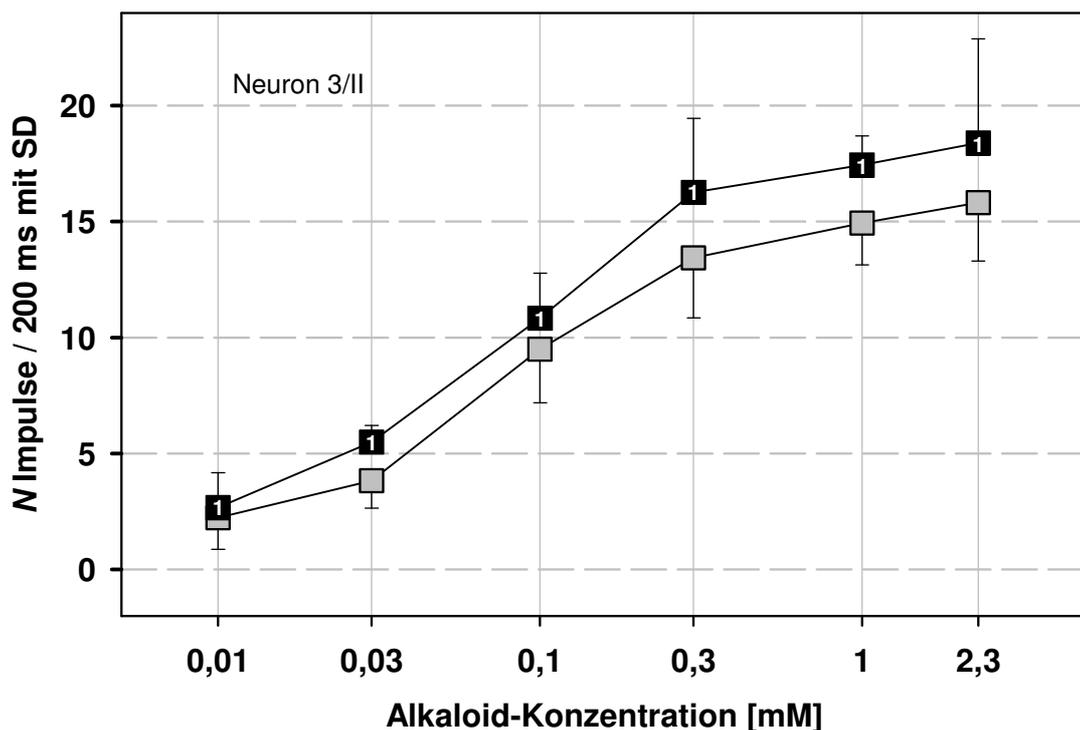


Abb. 24: Erhöhte Erregungsfrequenzen der Neurone 3/II in den Sensillen der ersten distalen Antennensegmente bei Reizung mit Securin

Dargestellt sind die mittleren Impulsfrequenzen (in den ersten 200 ms nach Reizbeginn \pm SD) der Neurone 3/II in den Sensillen der ersten distalen Flagellarsegmente (■) getrennt von den Neuronen 3/II in den Sensillen der anderen Segmente (□) auf den Reiz Securin in verschiedenen Konzentrationen.

Um diesen Effekt zu analysieren, wurden die Erregungen der Neurone von den Sensillen der ersten distalen Antennensegmente getrennt von denen der anderen Neurone ausgewertet. Diese gemittelten Erregungsfrequenzen wurden abhängig von der Reizkonzentration aufgetragen (siehe Abb. 24).

Bei allen Securinin Konzentrationen ab 0,03 mM waren die Erregungsfrequenzen der Neurone von den Sensillen der ersten distalen Antennensegmente deutlich um durchschnittlich 2 Impulse/200 ms höher als die der anderen Neurone 3/II.

4 DISKUSSION

Zu den von den Pflanzen gebildeten Sekundärstoffen gehören Terpene, Flavonoide, Glucoside und Alkaloide als wichtigste Gruppen. Dabei nehmen die Alkaloide mit über 40 % den größten Anteil von all diesen bekannten Stoffen ein (SCHOONHOVEN, 1982). In Pflanzen der Baumart *Margaritaria discoidea* konnten ebenfalls Alkaloide in der Rinde und im Kernholz nachgewiesen werden. Diese Alkaloide gehören der Familie der Securinega-Alkaloide an (MURAV'eva *et al.*, 1956, MENSAH *et al.*, 1988 und FEHLER, 2000). Es ist unter anderem von Alkaloiden bekannt, dass sie eine deterrente Wirkung auf Termiten und andere Holzschadinsekten besitzen und es konnte gezeigt werden, dass *M. discoidea* nicht von der Termitenart *Schedorhinotermes lamanianus* als Nahrungsquelle genutzt wird (MIKUS *et al.*, 1997). Somit wurden in dieser Arbeit die drei Securinega-Alkaloide Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin einerseits auf das Nageverhalten und andererseits auf ihre Wahrnehmung durch die antennalen Geschmacksrezeptoren von *S. lamanianus* hin überprüft.

4.1 Wirkung der Securinega-Alkaloide auf das Nageverhalten

Termiten leben ausschließlich phytophag und ca. $\frac{1}{4}$ aller Termitenarten nutzen Holz als Nahrungsquelle (DETTNER, 1999). Bäume entwickelten daher vereinzelt sekundäre Inhaltsstoffe um sich vor Fraßfeinden, wie Termiten, zu schützen. Dabei können sich diese Deterrentien in den Wurzeln, der Rinde, dem Kernholz und/oder den Blättern ansammeln und fraßhemmend bis toxisch auf die Termiten wirken. Diese abschreckende Wirkung von Baumteilen, von Baumextrakten oder von einzelnen Deterrentien auf Termiten, wurde mit Hilfe von Biotests bereits in vielen Arbeiten nachgewiesen (z. B. REYE-SCHILPA *et al.*, 1995, OHTANI *et al.*, 1997, SOGABE *et al.*, 2000a,b und CHANG *et al.*, 2001). Dabei beschäftigten sich die meisten Untersuchungen mit ökonomisch relevanten Termitenarten, die unter anderem in Nordamerika große Schäden an Gebäuden verursachen können. So beschrieben beispielsweise GUTIÉRREZ *et al.* (1999) fraßhemmende Eigenschaften der drei Terpene Partheniol,

Argenton und Incanilin auf die Termiten *Reticulitermes flavipes*. GRACE *et al.* (1996) testeten verschiedene auf Hawaii vorkommende Baumarten positiv bezüglich ihrer fraßhemmenden Wirkung auf die Termiten *Coptotermes formosanus*. Weiterhin konnte Azadirachtin, ein Sekundärmetabolit des Neem-Baumes (*Azadirachta indica*), im Biotest als hemmend auf das Fraßverhalten von *C. formosanus* ausgewiesen werden (GRACE & YATES, 1992). CHANG & CHENG (2002) wiesen bei der selben Termitenart fraßhemmende Effekte gegenüber öligen Blattextrakten von *Cinnamomum osmophloeum* nach. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass es die chemischen Inhaltsstoffe der Bäume sind, die fraßhemmend auf die getesteten Termitenarten wirkten. Arbeiten, in denen Bäume auf Termitenresistenz hin untersucht wurden, beschränkten sich meist auf die Resistenzwirkung des Holzes, da diesem eine ökonomisch größere Bedeutung als z. B. der Rinde zukommt. Wenige Arbeiten zeigten die resistente Wirkung der Rinde. So wiesen KAWAGUCHI *et al.* (1989) in Methanolextrakten von frischer *Phellodendron amurese*-Rinde Terpene und in wässrigen Extrakten Alkaloide nach, die fraßhemmend auf die Termiten *R. sepeatus* wirken. GRACE (1997) konnte aus der Rinde von *Aesculus hippocastanum* und *Ailanthus altissima* Extrakte herstellen, die auf *R. flavipes* abschreckend wirkten.

MIKUS (2000) zeigte durch Wahl-Biotests ebenfalls, dass das Holz bzw. die Rinde des Baumes *M. discoidea* hemmend auf das Nageverhalten von *S. lamanianus* wirkt. Dabei ist bei *S. lamanianus* das Nageverhalten direkt mit der Nahrungsaufnahme gleich zu setzen, da sie das Holz nur auf diese Weise abbauen und aufnehmen können. Deshalb wurde in dieser Arbeit als Parameter für die Substratnutzung in den Biotests die Anzahl an nagenden Termiten herangezogen. So konnte MIKUS (2000) die Gewebe Kernholz und Rinde sowie deren Extrakte auf Nagehemmung untersuchen, jedoch nicht die einzelnen sekundären Inhaltsstoffe von *M. discoidea*. Auf diese Ergebnisse hin wurden durch FEHLER (2000) drei Securinega-Alkaloide aus der Rinde von *M. discoidea* isoliert. Dabei lagen Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin als die alkaloiden Hauptkomponenten des Baumes vor, wobei sie in der Rinde in wesentlich größeren Mengen als im Kernholz nachgewiesen wurden (siehe Tab. 5).

Die Rinde stellt am intakten Baum das erste von Termiten angegriffene Gewebe dar. Möglicherweise liegt der Sinn einer hohen Alkaloidkonzentration darin, eine chemische Barriere innerhalb dieses äußersten

Gewebes zu errichten, um den Baum vor Verletzungen durch holzabbauende Termiten zu schützen (MIKUS, 2000).

Tab. 5: Securinega-Alkaloid Mengen in der Rinde und im Kernholz von *M. discoidea*

Angegeben sind die berechneten Mengen der drei hauptsächlich in *M. discoidea* vorkommenden Securinega-Alkaloide (in μg Alkaloid pro g Rinde/Holz). Die Alkaloide wurden aus einer definierten Menge Rinde bzw. Kernholz durch Soxhlet-Extraktion gewonnen. Dabei kam als Lösungsmittel Dichlormethan zum Einsatz, da dies aufgrund der chemischen Eigenschaften der Alkaloide die höchste Extraktionsausbeute ergab. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Alkaloide. (FEHLER, 2000).

Securinega-Alkaloid	Alkaloidmenge [μg] pro Gramm Rinde	Alkaloidmenge [μg] pro Gramm Kernholz
(-) – Securinin	388	124
(-) – Phyllanthin	1096	199
(-) – Phyllantidin	114	15

Die Securinega-Alkaloide Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin wurden von FEHLER (2000) isoliert und aufgereinigt. Das dabei verwendete Dichlormethan stellt jedoch kein in der Natur vorkommendes Lösungsmittel dar und so mussten die Mengenverhältnisse der drei Alkaloide im biologisch relevanten Lösungsmittel Wasser nachgeprüft werden. Dabei ließ sich über gaschromatographische Analysen nachweisen, dass Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin auch im wässrigen Extrakt die alkaloiden Hauptbestandteile darstellten. Die Mengenverteilungen der drei Alkaloide des wässrigen Extraktes entsprachen dabei denen des Dichlormethanextraktes. Phyllanthin liegt, verglichen mit den beiden anderen Alkaloiden, nicht nur in der Rinde bzw. im Holz von *M. discoidea* in der größten Menge vor, sondern ist auch im wässrigen Extrakt mit der höchsten Konzentration nachweisbar. Weitere Stoffe, die im chromatographiertem Rindenextrakt neben den drei Alkaloiden auftraten (siehe Abb. 9), wurden in dieser Arbeit nicht eingehender analysiert. Ein Vergleich dieser Stoffpeaks mit den von FEHLER (2000) aus Dichlormethan extrahiertem *M. discoidea* Holz gefundenen, deutet jedoch darauf hin, dass es sich möglicherweise um Diastereomere der Securinega-Alkaloide handeln könnte.

In dieser Arbeit konnten erstmals die drei Alkaloide Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin von *M. discoidea* unabhängig von einander, in bezug auf das Fraß- bzw. Nageverhalten von *S. lamanianus*, getestet werden. Dabei

wurde den Termiten das kommerziell erhältliche SIGMA-Securinin (wird von der Firma SIGMA aus der Pflanze *Securinega suffruticosa* gewonnen) und die aus *M. discoidea* aufgereinigten Alkaloide *M.d.*-Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin im Biotest angeboten. Die Ergebnisse dieser Biotests zeigten deutlich, dass jedes der getesteten Alkaloide eine signifikante Hemmwirkung auf das Nageverhalten der Termiten besaß. Dabei bestand ein indirekter Zusammenhang zwischen Alkaloidmenge und resultierender Hemmwirkung, denn mit steigender aufgetragener Menge sank die Anzahl an Nageereignissen, auf den mit Alkaloid behandelten Filterpapierhälften. Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass die drei Alkaloide als deterrente Stoffe wirkten und unter anderem die Fraßresistenz von *M. discoidea* gegenüber der holzfressenden Termitenart *S. lamanianus* bewirkten.

Bei Betrachtung der Nagehemmung unterscheiden sich alle drei Alkaloide in ihren jeweiligen Schwellenbereichen, ab denen eine signifikante Nagehemmung eintritt (siehe Tab. 2). Dieser Bereich kann für jedes Alkaloid auf ein Gramm Filterpapier hochgerechnet und mit den von FEHLER (2000) in der Rinde gefundenen Mengen verglichen werden. Dabei liegen die in der Rinde gefundenen Mengen für Securinin und Phyllanthin innerhalb der hochgerechneten Schwellenbereiche. In der Literatur gibt es keine Untersuchungen zur Fraßhemmung von Insekten, welche die Schwellenbereiche der Deterrentien mit den tatsächlich in der Pflanze vorhandenen Konzentrationen an diesen Stoffen vergleicht. Überhaupt gibt es nur wenige Arbeiten, welche die natürlichen Konzentrationen an Deterrentien in der Pflanze untersuchen (FRAZIER, 1992). Jedoch erscheinen für Securinin und Phyllanthin die gleichen vorhandenen Mengen, die in der Rinde von *M. discoidea* vorlagen und Nagehemmung bei *S. lamanianus* hervorriefen, sinnvoll.

Beim Phyllantidin lag der Schwellenbereich im Biotest weit unter denen von Securinin und Phyllanthin. Da sich bei diesem Alkaloid auch die Ergebnisse der neurophysiologischen Untersuchungen nur schlecht biologisch erklären lassen, kann ein methodischer Fehler nicht ausgeschlossen werden. Zudem stand für diese Arbeit nur eine sehr begrenzte Menge an Phyllantidin zur Verfügung, sodass keine weiteren klärenden Untersuchungen durchgeführt werden konnten.

Bei der Darstellung der Biotest-Ergebnisse wurden Mengenangaben benutzt, obwohl beim Herstellen des Tests, nach dem Verdunsten des Chloroforms von den Filterpapierhälften, erneut das gleiche Volumen an

Wasser (25µl) auf die Alkaloide gegeben wurde. Dabei wurden die Alkaloide zwar wieder gelöst (siehe Kapitel 2.3.2.2), Mengenangaben sind aber sinnvoll, da sich die Löslichkeiten der Alkaloide in Chloroform und Wasser unterscheiden. Dies liegt wiederum in der unterschiedlichen Polarität der Lösungsmittel begründet. Deshalb konnten die letztendlich im Wasser vorhandenen Alkaloidkonzentrationen nicht eindeutig bestimmt werden. Die Angabe einer Alkaloidmenge, welche sich nach dem Evaporieren des Chloroforms auf den Filterpapieren befindet, ist hingegen exakt.

4.2 Alkaloid-Wirkung auf die Kontaktchemorezeptoren

Im Gegensatz zu anderen Insekten, wurden an Termiten nur wenige neurophysiologische Untersuchungen durchgeführt. So sind bei Termiten über die olfaktorische Wahrnehmung leicht flüchtiger Substanzen bislang nur fünf Arbeiten publiziert. Eine Arbeit zeigte dabei den Zusammenhang zwischen der Reizung mit pflanzlich ätherischen Ölen und der Amplitude von Elektroantennogrammen (EAG) bei *Zootermopsis angusticollis* (ABU-SHAMA, 1966). FLOYD *et al.* (1976) stellten bei *Reticulitermes lucifugus*, ebenfalls durch EAG-Untersuchungen, die abschreckende Wirkung von Chinonen und Monoterpenen fest. Die einzigen Untersuchungen zur Reaktion einzelner Neurone, welche auf olfaktorische Reize reagieren, stammten von einem Sensillentyp auf den Antennen von *S. lamanianus* (ZIESMANN *et al.*, 1992, KAIB *et al.*, 1993 und ZIESMANN, 1996).

Nur eine Arbeit untersuchte bisher neurophysiologisch die gustatorische Wahrnehmung bei Termiten. So analysierte MIKUS (2000) *S. lamanianus* hinsichtlich ihrer gustatorischen Rezeptoren und deren Reaktionsspektren bei Reizung mit Wasser, verschiedenen Salzen, Saccharose und Glycin. Weitere Arbeiten zur gustatorischen Wahrnehmung bei Termiten fehlen.

In dieser Arbeit wurden weiterführende neurophysiologische Untersuchungen an den antennalen Geschmacksrezeptoren von *S. lamanianus* durchgeführt. Dabei konnte erstmals bei einer Termitenart eine Rezeptorzelle nachgewiesen werden, die sensitiv auf Deterrentien reagierte.

4.2.1 Der alkaloid-sensitive „deterrent receptor“

Da die Verhaltensuntersuchungen deutlich herausstellten, dass alle drei getesteten Securinega-Alkaloide spezifisch und in Abhängigkeit von der Menge zu Fraßhemmung führten, war von alkaloidsensitiven Rezeptoren auf den Sinnesorganen von *S. lamanianus* auszugehen. Die drei getesteten TP-Sensillen (TP I – III) stellen die einzigen gustatorischen Sensillentypen auf den Antennen der Termiten dar (WOLFRUM & KAIB, 1988; KAIB, unveröffentlicht). In dieser Arbeit wurden nur die antennalen Geschmacksrezeptoren untersucht, da REINHARD & KAIB (1995) auf die besondere Stellung der Antennen bei der Nahrungssubstratprüfung durch *S. lamanianus* hinwiesen. Die Autoren beschrieben eine spezielle Verhaltensweise, die sie „rubbing antennae“ bezeichneten und welche den intensiven Einsatz der Antennen beschreibt.

Von den in dieser Arbeit untersuchten TP-Sensillen reagierte nur ein Neuron mit starker Erregung auf alle drei Securinega-Alkaloide. Dies war das Neuron 3/II im TP II-Sensillum, welches einen alkaloidsensitiven Rezeptor der Termiten darstellte. Dabei waren bei allen drei Alkaloiden die resultierenden Erregungsfrequenzen direkt von der Reizkonzentration abhängig. Die Reiz-Erregungs-Kurve dieses Chemorezeptors beschreibt für Securinin und Phyllanthin einen sigmoiden Verlauf, welcher für viele Rezeptor-Kennlinien charakterisierend ist (z. B. WIECZOREK, 1976, MITCHELL & GREGORY, 1979, PETERSON *et al.*, 1993, STÄDLER, 1994 und VAN LOON & SCHOONHOVEN, 1999). Beim Securinin lag die Maximalerregungsfrequenz des Neurons 3/II im Mittel bei bis zu 80 Impulsen/Sekunde. Erregungsfrequenzen unmittelbar nach Reizbeginn erreichten sogar bis zu 200 Impulsen/Sekunde. MIKUS (2000) konnte bei *S. lamanianus* solche hohen Erregungsfrequenzen nur vom Neuron 1/I bei Reizung mit hohen Kochsalz-Konzentrationen ableiten. Dies deutet beim Securinin auf einen starken Reiz hin.

SCHOONHOVEN (1982) beschrieb fünf verschiedene Wirkungsweisen, mit denen deterrente Pflanzeninhaltsstoffe auf die Chemorezeptoren wirken können. So wies der Autor darauf hin, dass Deterrentien 1) unregelmäßige Impulsabfolgen („Bursts“) mit oft hoher Frequenz auslösen können oder 2) spezielle Rezeptormoleküle in der Dendritenmembran stimulieren, die ansonsten nur auf andere Substanzen reagieren oder 3) komplexe Reaktionsmuster („across-fiber patterns“) verändern können oder 4) Neu-

ronen hemmen, die ansonsten nur auf fraßfördernde Substanzen reagieren oder 5) spezielle Neuronen („deterrent receptors“) stimulieren, welche ausschließlich auf deterrente Pflanzeninhaltsstoffe reagieren.

Da der durch diese Arbeit identifizierte alkaloidsensitive Rezeptor (Neuron 3/II), von allen durch MIKUS (2000) getesteten Stoffen, ausschließlich auf die drei Securinega-Alkaloide mit Erregung reagierte, kann dieser, in Anlehnung an SCHOONHOVEN (1982), als „deterrent receptor“⁵ bezeichnet werden. Die von diesem „deterrent receptor“ erzeugten Impulsfrequenzen, werden vom Fraßzentrum des ZNS gesondert verarbeitet (FRAZIER, 1992). Dies führt zu Verhaltensweisen, welche die Termiten von der Nahrungsaufnahme abhält und sie damit vor den potentiell toxischen Stoffen schützt.

Da für Termiten in der Literatur bisher keine Arbeiten über „deterrent receptors“ vorliegen, können die Ergebnisse dieser Arbeit nur mit Untersuchungen von anderen Insektengruppen verglichen werden. Dabei befasst sich ein Großteil mit Lepidopterenlarven oder mit Käfern, wie dem Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*), da diese landwirtschaftliche Schädlinge darstellen (z. B. BLANEY *et al.*, 1987, BLANEY & SIMMONDS, 1988ab, BLANEY & SIMMONDS, 1990, ROESSINGH *et al.*, 1992, MULLIN *et al.*, 1994, LINER *et al.*, 1995 und STÄDLER *et al.*, 1995). HOLLISTER *et al.* (2001) zeigten, dass das Alkaloid Leptin I aus Pflanzen der Familie der Solanaceae einen spezifischen „deterrent receptor“ des Käfers *L. decemlineata* bei einer Schwellenkonzentration von 3×10^{-5} M erregt. Für Sinigrin, ein Glucosinolat, konnte eine mit Leptin I vergleichbare Reizschwelle des Rezeptors von 1×10^{-5} M bei diesem Käfer festgestellt werden (MESSCHENDORP *et al.*, 1998). Eine entsprechende Schwelle dieser speziellen Rezeptoren wiesen VAN LOON & SCHOONHOVEN (1999) bei Schmetterlingen verschiedener *Pieris*-Arten nach. Dabei ergaben sich Konzentrationen für verschiedene Kardenolide (z. B. Erysimin) von 10^{-7} bis 10^{-5} M. Die bisherigen Untersuchungen an „deterrent receptors“ zeigten, dass die meisten deterrenten Substanzen durch diese Rezeptoren in einem Schwellenbereich von 10^{-8} und 10^{-5} M wahrgenommen werden.

Somit liegt deren Empfindlichkeit zwischen der von gustatorischen Salz- bzw. Zucker- und Pheromonrezeptoren. Wobei die primären Pflanzen-

⁵ Der Begriff „deterrent receptor“ oder auch „deterrent neuron“ wurde in der Literatur von SCHOONHOVEN (1982) eingeführt. Der deutschen Bedeutung würde am ehesten das Wort Fraßhemmstoff-Rezeptor entsprechen. Für die weitere Diskussion soll jedoch der englische Ausdruck weiter verwendet werden.

metabolite, welche oft Nährstoffe darstellen, bei Konzentrationsschwellen von 10^{-4} bis 10^{-1} M perzipiert werden (z. B. SHIMADA, 1994, HANSEN-DELKESKAMP & HANSEN, 1995, LISCIA *et al.*, 1997, MIKUS, 2000, GLENDINNING *et al.*, 2000 und LISCIDA & SOLARI, 2000) und bei gustatorischen Pheromonrezeptoren Schwellenkonzentrationen von 10^{-10} M erreicht werden (STÄDLER, 1994). Die hohen Schwellenkonzentrationen der primären Pflanzeninhaltsstoffe sind mit deren phagostimulanten Wirkungen zu erklären. So beinhaltet die Aufnahme dieser Nährstoffe auch bei hohen Konzentrationen keine negativen Folgen für das Insekt. Im Gegenteil, gerade Stoffe wie Zucker oder Fette stellen Energieträger dar, die in großen Mengen von den Tieren benötigt werden. Hingegen können die deterrenten Pflanzeninhaltsstoffe toxisch auf das Insekt wirken (z. B. GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 2002, HUMMELBRUNNER & ISMAN, 2001, SOULE *et al.*, 2000 und MULLIN *et al.*, 1997). Damit müssen diese potentiellen Gifte frühzeitig und schon in geringen Konzentrationen wahrgenommen werden.

Beim Vergleich der ermittelten Schwellenkonzentrationen für Securin, Phyllanthin und Phyllantidin wird deutlich, dass das Neuron 3/II am empfindlichsten auf Securin, mit einer Schwelle von $1 - 3 \times 10^{-5}$ M, reagierte. Dieser Konzentrationsbereich stimmt mit den Schwellen der beschriebenen deterrenten Substanzen anderer Insekten überein. Auch VAN LOON (1990) konnte verschiedene Flavonoide aus einer Pflanze (*Brassica oleracea*) hinsichtlich ihrer stimulierenden Wirkung auf den „deterrent receptor“ des L-Sensillum von *P. brassicae* testen. Dabei waren alle Stoffe unterschiedlich reizwirksam. Katechin rief beim „deterrent receptor“ die höchsten Erregungsfrequenzen hervor und es konnte eine Schwellenkonzentration von unter 2×10^{-4} M gemessen werden. Cyanin, ein weiteres Flavonoid, war weitaus weniger reizwirksam, genauso wie Oenin und Malvin.

Phyllanthin erregte den „deterrent receptor“ bei einer Schwellenkonzentration die ca. 30 mal höher lag als die für Securin. Es war also weniger reizwirksam als Securin. Die Konzentrationen bei halbmaximaler Erregung (ED_{50}) unterschieden sich für Securin und Phyllanthin ebenfalls um den Faktor 30. Nach Berechnung der Anstiege der Reiz-Erregungs-Kurven in den Punkten der ED_{50} -Konzentration unterschieden sich die beiden Alkaloide Securin und Phyllanthin um den selben Faktor (siehe Kapitel 3.3.1.4). Auch Phyllantidin erregte das Neuron 3/II, jedoch

konnte keine Maximalerregungsfrequenz bzw. kein ED₅₀-Wert erfasst werden, da die Reizkonzentration auf 0,9 mM beschränkt war. Nur die Reizschwelle, welche zwischen 1 und 3 x 10⁻⁴ M lag, konnte ermittelt werden und war somit etwa 10fach höher als die für Securinin. Die Gemeinsamkeiten der beiden Reiz-Erregungskurven deuten eventuell darauf hin, dass Securinin und Phyllanthin am Rezeptor den gleichen Wirkmechanismen und der gleichen Kinetik folgen. Somit wäre es möglich, dass der biochemische Rezeptor in der Dendritenmembran der Nervenzelle für beide Alkaloide identisch ist. Phyllanthin unterscheidet sich chemisch nur durch eine Methoxy-Gruppe (-OCH₃) vom Securinin. Es wäre denkbar, dass Securinin eine bessere Bindung mit dem Rezeptormolekül eingeht, wodurch mehr Alkaloid pro Zeiteinheit gebunden werden kann. Die zusätzliche Methoxy-Gruppe des Phyllanthins könnte daher dessen höhere Schwellenkonzentration bedingen. Außerdem erklärt sie die höhere Löslichkeit des Phyllanthins im polaren Lösungsmittel Wasser. Auch SCHOONHOVEN *et al.* (1992) und FRAZIER (1992) beschrieben die veränderten Auswirkungen auf die Reizstärke von Deterrentien, welche durch kleine Veränderungen in deren funktionellen Gruppen hervorgerufen werden.

4.2.2 Die hemmende Wirkung der Securinega-Alkaloide auf die wassersensitiven Neurone

MIKUS (2000) beschrieb auf den Antennen von *S. lamanianus* die Neurone 2/I und 2/II als wassersensitiv. Diese Neurone reagierten auf den Reiz Wasser mit Erregung und zunehmende NaCl- bzw. KCl-Konzentrationen hemmten das Neuron als dissoziationsfähige Elektrolyte. Diese Hemmung konnte in dieser Arbeit bei beiden Neuronen für NaCl bestätigt werden. Bei beiden Neuronen setzte die Hemmung, bezüglich der Reaktion auf Wasser, ab einer Reizkonzentration von 10 mM ein und war bei 100 mM vollständig. Die drei Securinega-Alkaloide zeigten ebenfalls diese Hemmwirkung auf die wassersensitiven Neuronen 2/I und 2/II, was auf deren Elektrolyt-Eigenschaften zurückgeführt werden kann. Jedoch war die Schwellenkonzentration, bei einsetzender Hemmung, bei allen Alkaloiden um den Faktor 10 geringer, als beim NaCl. Weiterhin konnte bei keinem Alkaloid eine vollständige Hemmung der wassersensitiven Neuronen gemessen werden. Vermutlich ist dies auf die begrenzten

maximalen Reizkonzentrationen der Alkaloide zurückzuführen, die im Wasser nur eine geringe Löslichkeit besitzen.

Neuron 1/I wurde durch MIKUS (2000) auch als wassersensitiv charakterisiert. Jedoch wurde dieses Neuron durch steigende NaCl-Konzentrationen nicht gehemmt, sondern konzentrationsabhängig stimuliert. Diese Erregung des Neurons folgt somit einem anderen Wirkmechanismus, als es für klassische wassersensitive Neurone beschrieben wurde (MIKUS & KAIB, 1998b). Neben dem biochemischen Wasserrezeptor in der Dendritenmembran befindet sich ein Natrium-Rezeptor, welcher für Natrium sensitiv ist. Dieser Rezeptor führt bei hohen Natriumkonzentrationen trotz inaktiviertem Wasserrezeptor zu einer Erregung des Neurons (MIKUS & KAIB, 1998b). Wie infolge des veränderten Wirkmechanismus zu erwarten war, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass keines der Securinega-Alkaloide das Neuron 1/I erregte.

4.2.3 Die hemmende Wirkung der Securinega-Alkaloide auf den „deterrent receptor“

Wie durch SCHOONHOVEN (1982) beschrieben, können deterrente Stoffe spezielle phagostimulierende Rezeptoren hemmen. Diese Wirkung tritt häufig simultan mit der Erregung eines „deterrent receptor“ auf. Fast immer werden dabei die zuckersensitiven Chemorezeptoren beeinträchtigt, indem deren Reaktion oder Erregungspotential durch die Deterrentien verändert oder gehemmt werden (z. B. MA, 1977, KENNEDY & HALPERN, 1980, SIMMONDS *et al.*, 1990, LAM & FRAZIER und FRAZIER 1992).

Solche auf phagostimulierende Rezeptoren wirkende Effekte, ausgelöst durch die Securinega-Alkaloide, konnten in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Dies könnte darin begründet liegen, dass auf den Antennen von *S. lamanianus* keine zuckersensitiven Rezeptorzellen nachgewiesen wurden (MIKUS, 2000). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Alkaloide mögliche Rezeptorzellen auf den Tarsen oder den Mundwerkzeugen blockieren bzw. beeinflussen könnten.

Interessanterweise wurde jedoch ein anderer Hemmeffekt bei Reizung mit allen drei Alkaloiden registriert. Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin blockierten den „deterrent receptor“, also das Neuron 3/II, selbst. Allerdings ist diese Hemmwirkung nicht mit derjenigen zu vergleichen, welche die Alkaloide in ihrer Eigenschaft als Elektrolyt auf die

wassersensitiven Rezeptoren zeigten. Denn die Hemmung des „deterrent receptor“ hatte eine andere zeitliche Ausdehnung. So konnte für Securinin festgestellt werden, dass sich das Erregungsniveau des Folgereizes erst nach einer Stunde Zeitdifferenz (zwischen Primär- und Folgereiz) wieder auf dem Niveau der Primärerregung befand. BLANEY *et al.* (1986) erkannten ebenfalls die Hemmwirkung eines Stoffes auf seinen eigenen Rezeptor. Dabei wurde das Verstellen der Reaktionsschwelle dieses Rezeptors, nach Kontakt mit dem Reizstoff, als Ursache der Hemmung beschrieben. Dies wäre ein Mechanismus, welcher auch für den Alkaloid-Rezeptor in der vorliegenden Arbeit zutreffen könnte. Aufschluss über einen solchen Mechanismus könnten weitere Experimente geben, bei welchen der Folgereiz eine höhere Konzentration an Alkaloid als der Primärreiz aufweisen müsste.

Für die beiden anderen Alkaloide, Phyllanthin und Phyllantidin, war die gleiche zeitliche Ausdehnung der Hemmwirkung auf den „deterrent receptor“ wie beim Securinin anzunehmen. Um vergleichbare Reaktionen des Neurons 3/II zu erhalten, wurde daher bei allen Untersuchungen mit den Securinega-Alkaloiden jedes Sensillum nur einmal abgeleitet. Da die Präparation einer Termiten für die „tip-recording-technique“ methodisch bedingt länger dauerte, war es im zeitlich begrenzten Arbeitsrahmen nicht möglich, mehr als durchschnittlich zwei Termiten pro Substanzkonzentration zu vermessen. Um trotz alledem eine genügend große Datenmenge zu erhalten, wurden immer beide Antennen einer Termiten und pro Antenne eine maximale Anzahl von Sensillen abgeleitet. Hierbei wurden nur die Sensillen der ersten distalen 9-10 Segmente vermessen. Die neurophysiologische Charakterisierung von den Sensillen der restlichen Segmente besaß keine biologische Relevanz, da bei diesen Sensillen, bedingt durch deren Lage, nur begrenzte oder gar keine Substratberührung auftrat.

Die durch die Alkaloide hervorgerufene Hemmung des einzigen antennalen alkaloidsensitiven Rezeptors widerspricht augenscheinlich dem Zweck der Substratprüfung durch die Termiten. Denn durch den blockierten Rezeptor sind diese nicht mehr in der Lage, Alkaloide wahrzunehmen, welche sich weiterhin im Substrat befinden. Dies könnte möglicherweise dazu führen, dass die Alkaloide von den Termiten aufgenommen werden. Vom Securinin ist bekannt, dass es eine Wirkung als GABA-Rezeptor Antagonist besitzt (BEUTLER *et al.*, 1985, SHEAD *et al.*, 1992 und Han *et al.*,

2000). So könnte der Stoff, nach Aufnahme und Verteilung im Organismus, wichtige zentralnervöse Prozesse beeinflussen und dem Tier schaden. Es wäre zudem denkbar, dass die im Darm lebenden Zooflagellaten negativ von den aufgenommenen Stoffen beeinflusst werden (MAISTRELLO *et al.*, 2001). Dies hätte zur Folge, dass die zellulosehaltige Nahrung nicht mehr aufgeschlossen werden könnte. Dies zeigt, dass es für die Termiten negative Auswirkungen haben könnte, würden die Alkaloide den „deterrent receptor“ hemmen und die Tiere das alkaloidhaltige Substrat aufnehmen.

Die Verhaltensuntersuchungen zeigten aber, dass auch hohe Alkaloidmengen im Biotest nagehemmend wirkten. Dies würde bedeuten, dass das eventuell blockierte Neuron 3/II die Nagehemmung der Termiten nicht beeinträchtigt. Eine mögliche Erklärung für diesen augenscheinlichen Widerspruch bezieht sich auf die hohen Alkaloidkonzentrationen, welche den „deterrent receptor“ hemmen. Securinin hemmte diesen erst ab 1 mM. Diese Konzentration liegt jedoch im Sättigungsbereich und damit weit oberhalb der Schwellenkonzentration. Ebenso wirkte Phyllanthin erst ab einer Konzentration von 5 mM hemmend auf das Neuron 3/II. Die lange Blockade des „deterrent receptors“ könnte auf einen unspezifischen Hemmeffekt hindeuten (SCHOONHOVEN *et al.*, 1992). Auch SCHOONHOVEN & YAN (1989) konnten zeigen, dass Warburganal und andere verwandte Verbindungen, bei langer Stimulation den „deterrent receptor“ über eine Stunde hemmten. Weiterhin wäre es auch denkbar, dass andere Mechanismen trotz gehemmten Neuron 3/II, die Termiten am Nagen hinderten. So wurde im Biotest bei hohen Alkaloidmengen starkes Abkoten der Termiten auf die mit Alkaloid behandelte Probenhälfte festgestellt. Termiten decken mit Hilfe von Kot toxisches oder pathogenes Material ab (CARTER & DE CARMAGO, 1983 und LOGAN & ABOOD, 1990), was für andere Termiten ein Signal zur Meidung dieser Flächen sein könnte.

4.2.4 Der zeitliche Erregungsverlauf des „deterrent receptor“

Weiterhin wurde vom Neuron 3/II, dem „deterrent receptor“, der zeitliche Erregungsverlauf bei Reizung mit dem Alkaloid Securinin aufgenommen. Dieser zeigt, einen rein phasischen Verlauf ohne tonische Elemente. Auch MIKUS (2000) erkannte, dass die meisten der gustatorischen Sensillen auf den Antennen von *S. lamanianus* nur phasisch reagieren. Hingegen ist bei

den gustatorisch sensitiven Neuronen von anderen Insekten, bis auf eine Ausnahme (NEWLAND, 1998), immer ein phasisch-tonischer Erregungsverlauf beschrieben wurden (z. B. SCHNUCH, 1996 und VAN DER GOES VAN NATERS & DEN OTTER, 1998). NEWLAND (1998) fand dagegen auf den Beinen der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* einen salzsensitiven Rezeptor, welcher eine rein phasische Reaktion zeigte. Doch geht der Autor nicht auf die Bedeutung dieses Reaktionsverlaufes ein.

Viele Beispiele zeigten jedoch, dass die Latenzzeit zwischen Reizaufnahme und dadurch hervorgerufener Verhaltensreaktion unter 100 ms liegt und damit sehr kurz ist (z. B. GETTING, 1971, VAN DER STARRE, 1972 und ROGERS & NEWLAND, 2000). Damit kann eine phasische Erregung der Geschmackssinneszellen ausreichen, um die Reizinformation zu kodieren. Da Insekten ihre Geschmacksrezeptoren in der Regel nur kurz aber wiederholt mit der Reizquelle (Substrat) in Verbindung bringen, führen die hohen Impulsfrequenzen des phasischen Teils des Erregungsverlaufes zu Salven, welche ins ZNS mit hoher Frequenz eingehen. Somit ist die Summe, der im Zentralnervensystem eingehenden Impulszahl, größer als bei Dauerstimulation (BLANEY & DUCKET, 1975). Bei *S. lamanianus* führt das Verhalten „Antennenabrollen“ ebenfalls dazu, dass die Sensillen nur kurz stimuliert werden (Reinhard & Kaib, 1995). Ein Fehlen des tonischen Teils der Erregung ist daher ohne Bedeutung auf die Reizkodierung bei Stimulation mit den Securinega-Alkaloiden.

4.2.5 Erhöhte Erregungsfrequenzen des „deterrent receptor“ bei Sensillen der ersten distalen Antennensegmente

Es zeigte sich, dass die „deterrent receptors“ der Sensillen des ersten distalen Antennensegmentes bei gleichen Reizkonzentrationen mit höheren Erregungsfrequenzen auf den Reiz Securinin reagierten als die der anderen Sensillen. In der Literatur sind Arbeiten, welche einen vergleichbaren Effekt behandelten, nicht bekannt.

Diese erhöhten Erregungsfrequenzen deuten nicht auf eine gesteigerte Empfindlichkeit des „deterrent receptor“ der Sensillen des ersten distalen Antennensegmentes gegenüber dem Reiz Securinin, im Vergleich zu dem der anderen Segmente, hin. Werden die maximalen Erregungsfrequenzen der beiden Reiz-Erregungs-Verläufe auf 100 % normiert, decken sich beide

Verläufe. Das bedeutet, dass nur die Impulsfrequenz der ersten antennal-distalen „deterrent receptors“ erhöht ist und nicht die Empfindlichkeit. Beim „Antennenabrollen“ (Reinhard & Kaib, 1995) während der Überprüfung der Nahrungsressourcen, kommen die Sensillen des ersten distalen Flagellarsegments mit höherer Wahrscheinlichkeit in Kontakt mit dem Untergrund als andere Sensillen. Damit sind diese Sensillen gut geeignet, um potentiell toxische Deterrentien zu perzipieren. Weiterhin besitzen sie, von allen anderen Sensillen auf den Antennen, den weitesten Abstand zur Mundöffnung der Termiten. Damit könnten Alkaloid-Konzentrationen kurz unterhalb der Schwelle nur bei den am weitesten vom Mund entfernten Neuronen Erregungsfrequenzen hervorrufen, welche die Termiten vom Fressen abhalten. Dies wäre sinnvoll, falls diese, kurz unterhalb der Schwelle liegenden Konzentrationen, bereits toxisch für die Termiten wären. Die mit höherer Erregungsfrequenz reagierenden Neurone würden so eine Art Sicherheitsabstand für die Termiten gewährleisten.

4.3 Vergleich der Alkaloidwirkung auf das Verhalten und auf den Alkaloid-Rezeptor

Durch diese Arbeit war es erstmals möglich, die Auswirkungen von deterrenten Stoffen auf das Fraßverhalten und auf einen speziellen „deterrent receptor“ miteinander zu vergleichen. Auf *S. lamanianus* wirkten die getesteten Securinega-Alkaloide konzentrationsabhängig nagehemmend. Dabei lag ein positiver Zusammenhang vor, da die resultierende Nagehemmung bei steigender aufgetragener Alkaloidmenge ebenfalls anstieg. Ebenso waren die abgeleiteten Erregungsfrequenzen direkt von der Reizkonzentration abhängig und auch hierbei zeigte sich eine positive Beziehung. Die daraus resultierende weiterführende positive Korrelation zwischen Nagehemmung und Erregungsfrequenz des „deterrent receptor“ lässt den Schluss zu, dass die Impulse des Neurons 3/II einen direkten hemmenden Effekt auf das Fraßzentrum im zentralen Nervensystem ausübten (MESSCHENDORP *et al.*, 1996). Dabei ist das Vorhandensein einer direkten Beziehung zwischen der afferenten Antwort der sensorischen Neurone und dem resultierenden Fraßverhalten des Insekts eine Grundaussage von allen Studien über chemosensorische Kodierung eines Reizes (SCHOONHOVEN *et al.*, 1992). Jedoch gibt es nur sehr wenige Untersuchungen über diese Kodierung, welche neurophysio-

logische Untersuchungen und Verhaltenstests gemeinsam behandelten (SCHOONHOVEN, *et al.*, 1992).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen Vergleiche zwischen der Nagehemmung und der Erregungsstärke des Neurons 3/II zwischen den einzelnen Alkaloiden zu. Dabei werden Unterschiede deutlich. So wirkten die beiden Alkaloide Securinin und Phyllanthin im Biotest in den gleichen Schwellenbereichen nagehemmend. Entgegengesetzt dazu lagen die Schwellenkonzentrationen der neurophysiologischen Untersuchungen um den Faktor 30 getrennt vor. Securinin wirkte auf den „deterrent receptor“ schon ab einer Schwellenkonzentration von $1 - 3 \times 10^{-5}$ M erregend während Phyllanthin diese Erregung erst ab $3 - 10 \times 10^{-4}$ M hervorrief. Weiterhin ist dieser Schwellenbereich für Phyllanthin, verglichen mit denen für deterrenten Stoffe bei anderen Insekten, zu gering. Diese Befunde deuten darauf hin, dass möglicherweise noch andere sensorische Mechanismen bei der Wahrnehmung von Phyllanthin eine Rolle spielen könnten (MESSCHENDORP *et al.*, 1996). Ähnliche differente Befunde zwischen den Verhaltensschwellen im Biotest und den Konzentrationsschwellen des „deterrent receptors“ bei verschiedenen getesteten Deterrentien konnten auch LISCIA & SOLARI (2000) aufzeigen. Diese Autoren testeten unter anderem die Deterrentien Quinin und Amilorid auf das Fraßverhalten und auf die Reaktion des „deterrent reseptors“ bei der Fliege *Protophormia terraenovae*. Dabei konnte Quinin die gleiche Erregungsfrequenz erst bei 10facher Konzentration wie Amilorid hervorrufen. Umgekehrt waren die Verhältnisse bei den Verhaltensuntersuchungen, bei denen Amilorid erst bei 10facher Konzentration im Vergleich zum Quinin gleich wirkte. Die Autoren erklärten diese Ergebnisse damit, dass Quinin zusätzlich die zuckersensitive Zelle hemmte. Die daraus resultierende Aufsummierung erhöhte das fraßhemmende Signal, welches in das ZNS eingeht, im Vergleich zum Amilorid, welches nur den „deterren receptor“ erregte. Auch MESSCHENDORP *et al.* (1998) fanden diese Unterschiede in den Schwellen, als sie die Wirkung von Sinigrin (Glucosinolat) und Driman (Terpen) bei *Leptinotarsa decemlineata* untersuchten. So war für Sinigrin die Reizschwelle beim „deterrent receptor“ kleiner und im Verhaltenstest größer als die für Driman. Die Autoren diskutierten jedoch keine mögliche Erklärung für diese Unterschiede.

In Anbetracht der Ergebnisse für andere Insekten könnte auch bei *S. lamanianus* das Vorhandensein weiterer alkaloidsensitiver Rezeptoren auf andern Körperteilen möglich sein. Jedoch kommen die Alkaloide in *M. discoidea* zusammen vor und sind deshalb auch gemeinsam reizwirksam. Da in dieser Arbeit nur einzelne Deterrentien untersucht wurden, ist über die Kombinationswirkung der Stoffe nichts bekannt. Es wäre denkbar, dass Securinin und Phyllanthin möglicherweise mit dem selben Rezeptormolekül interagieren. Dann sollte sich die Gesamtwirkung beider Alkaloide im Vergleich zur Einzelwirkung verstärken. Es könnte somit durch den einzigen antennalen „deterrent receptor“, dem Neuron 3/II, bei der Termiten Nagehemmung hervorgerufen werden.

Die vergleichenden Untersuchungen von Verhaltensänderung und Erregung des „deterrent receptors“ zeigten deutlich, dass es der Termiten *S. lamanianus* möglich ist, die Fraßhemmstoffe aus *M. discoidea* wahrzunehmen und mit nagehemmenden Verhaltensweisen zu reagieren. Damit kann die bisher bekannte Liste der Insektengruppen, welche spezielle „deterrent receptors“ ausgebildet haben, von Schmetterlingen, Fliegen und Käfern auf die Termiten erweitert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die drei Securinega-Alkaloide Securinin, Phyllanthin und Phyllantidin, welche im Baum *Margaritaria discoidea* vorkommen, hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Nageverhalten und auf die antennalen Geschmackssensillen der Termiten *Schedorhinotermes lamanianus* untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle Alkaloide konzentrationsabhängig zur Nagehemmung führten. Bei Securinin und Phyllanthin wurden Schwellen ermittelt, die in dem Mengenbereich lagen, in welchem diese Alkaloide in der Rinde des Baumes vorkamen. Die weiterführenden neurophysiologischen Untersuchungen wurden an den antennalen gustatorischen Sensillen durchgeführt, da der spezielle und intensive Antenneneinsatz, als „rubbing antennae“ bezeichnet, auf die besondere Bedeutung der Antennen bei der Überprüfung einer Nahrungsressource hinweist. Die Ergebnisse zeigten, dass alle drei Alkaloide konzentrationsabhängig das Neuron 3/II erregten. Von diesem Neuron konnten durch vorangegangene Analysen, bei Reizung mit Zucker, Salzen, Glycin und Wasser, noch keine Impulsfrequenzen abgeleitet werden. Das Neuron 3/II stellt einen „deterrent receptor“ dar. Somit konnte durch diese Arbeit erstmalig bei Termiten ein solcher Hemmstoffrezeptor gefunden und charakterisiert werden.

Dieser „deterrent receptor“ reagierte auf Securinin am sensitivsten. Dabei wurden Schwellenkonzentrationen ermittelt, die mit denen vergleichbar waren, welche bei anderen Insekten gefunden wurden. Die Reizkonzentration vom Phyllanthin musste 30 mal höher als die vom Securinin sein, um die selben Erregungsfrequenzen hervorzurufen. Aus dem Vergleich mit dem Biotest geht dem zufolge hervor, dass es für Phyllanthin möglicherweise noch einen anderen Rezeptor geben könnte.

Weitere Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass alle Alkaloide ab einer gewissen Konzentration den „deterrent receptor“ hemmten. Dabei wurde eine zeitliche Ausdehnung dieser Hemmung beim Securinin von einer Stunde ermittelt.

Durch diese Arbeit kann die bisherige Liste von Insekten, welche „deterrent receptors“ entwickelt haben auf die Gruppe der Termiten erweitert werden. Dabei konnten sowohl Verhaltensuntersuchungen sowie neurophysiologische Analysen dazu beitragen, dass die Termiten, in bezug auf die beeinflusste Nahrungswahl durch deterrente Pflanzeninhaltsstoffe, besser mit anderen Insektengruppen verglichen werden können.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- ABUSHAMA, F. T. (1966). Electrophysiological investigations of the antennal olfactory receptors of the damp-wood termite *Zootermopsis angusticollis*. *Entomologia experimentalis et applicata* 9: 343-348.
- ALTNER, H. (1977). Insect sensillum specificity and structure: An approach to a new typology. In: *Olfaction and Taste VI*, (Hrsg.: MAGNEN LE, J. und MAC LEOD, P.), Vol. 6: S. 295-303.
- BEENTJE, H. J. (1994). *Kenya trees, shrubs and lianas.*, 2. Aufl., National Museum of Kenya, Nairobi.
- BEUTLER, J. A., KARBON, E. W., BRUBAKER, A. N., MALIK, R., CURTIS, D. R. und ENNA, S. J. (1985). Securinine Alkaloids - a new class of GABA-receptor antagonist. *Brain Research* 330(1): 135-140.
- BLANEY, W. M. und DUCKETT, A. M. (1975). The significance of palpation by the maxillary palps of *Locusta migratoria* (L): An electrophysiological and behavioural study. *Journal of Experimental Biology* 63: 701-712.
- BLANEY, W. M., SCHOONHOVEN, L. M. und SIMMONDS, M. S. J. (1986). Sensitivity variations in insect chemoreceptors - a review. *Experientia* 42(1): 13-19.
- BLANEY, W. M. und SIMMONDS, M. S. J. (1988a). Food selection in adults and larvae of 3 species of lepidoptera - a behavioral and electrophysiological study. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 49(1-2): 111-121.
- BLANEY, W. M. und SIMMONDS, M. S. J. (1990). A behavioral and electrophysiological study of the role of tarsal chemoreceptors in feeding by adults of *Spodoptera*, *Heliothis virescens* and *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology* 36(10): 743-756.
- BLANEY, W. M., SIMMONDS, M. S. J., LEY, S. V. und JONES, P. S. (1988b). Insect antifeedants - a behavioral and electrophysiological investigation of natural and synthetically derived clerodane Diterpenoids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 46(3): 267-274.
- BLANEY, W. M., SIMMONDS, M. S. J., LEY, S. V. und KATZ, R. B. (1987). An electrophysiological and behavioral-study of insect antifeedant properties of natural and synthetic Drimane-related compounds. *Physiological Entomology* 12(3): 281-291.
- BRANDL, R., BAGINE, R. N. K. und KAIB, M. (1996). The distribution of *Schedorhinotermes lamanianus* (Isoptera: Rhinotermitidae) and its termitophile *Paraclystis* (Lepidoptera: Tineidae) in Kenya: Its importance for understanding east African biogeography. *Global Ecology and Biogeography Letters*. 5: 143-148.

- CARTER, F. L. und DE CAMARGO, C. R. R. (1983). Testing antitermitic properties of Brazilian woods and their extracts. *Wood and Fiber Science* 15: 350-357.
- CHANG, S. T. und CHENG, S. S. (2002). Antitermitic activity of leaf essential oils and components from *Cinnamomum osmophleum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(6): 1389-1392.
- CHANG, S. T., CHENG, S. S. und WANG, S. Y. (2001). Antitermitic activity of essential oils and components from *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides*). *Journal of Chemical Ecology* 27(4): 717-724.
- DETTNER, K. (1999). Insekten und Mikroorganismen. In: Lehrbuch der Entomologie, (Hrsg.: DETTNER, K. und PETERS, W.), 1. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: S. 625-638.
- FEHLER, K. (2000). Isolierung und Identifizierung von Alkaloiden aus der Euphorbiaceae *Margaritaria discoidea*: Fraßhemmer gegen die Termiten *Schedorhinotermes lamanianus*. Diplomarbeit. Institut für Organische Chemie; Prof. Dr. Dr. h.c. W. Francke, Universität Hamburg.
- FLOYD, M. A., EVANS, D. A. und HOWSE, P. E. (1976). Electrophysiological and behavioural studies on naturally occurring repellents to *Reticulitermes lucifugus*. *Journal of Insect Physiology* 22: 697-701.
- FRAZIER, J. L. (1992). How animals perceive secondary plant compounds. In: Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites, (Hrsg.: ROSENTHAL, G. A. und BERENBAUM, M. R.), Vol. 2, Academic Press, San Diego: S. 89-134.
- FUJISHIRO, N., KIJIMA, H. und MORITA, H. (1984). Impulse frequency and action potential amplitude in labellar chemosensory neurones of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 30: 317-325.
- GETTING, P. A. (1971). The sensory control of motor output in fly proboscis extension. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 74: 103-120.
- GLENDINNING, J. I., NELSON, N. M. und BERNAYS, E. A. (2000). How do inositol and glucose modulate feeding in *Manduca sexta* caterpillars? *Journal of Experimental Biology* 203(8): 1299-1315.
- GONZALEZ-COLOMA, A., VALENCIA, F., MARTIN, N., HOFFMANN, J. J., HUTTER, L., MARCO, J. A. und REINA, M. (2002). Silphinene sesquiterpenes as model insect antifeedants. *Journal of Chemical Ecology* 28(1): 117-129.
- GRACE, J. K. (1997). Influence of tree extractives on foraging preference of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology* 30(1): 35-42.
- GRACE, J. K., EWART, D. M. und TOME, C. H. M. (1996). Termite resistance of wood species grown in Hawaii. *Forest Products Journal* 46(10): 57-60.

- GRACE, J. K., WOOD, D. L. und FRANKIE, G. W. (1989). Behavior and survival of *Reticulitermes hesperus* Banks (Isoptera: Rhinotermitidae) on selected sawdust and wood extracts. *Journal of Chemical Ecology* 15: 129-139.
- GRACE, J. K. und YATES, J. R. (1992). Behavioral effects of a Neem insecticide on *Coptotermes formosanus* (Isoptera, Rhinotermitidae). *Tropical Pest Management* 38(2): 176-180.
- GUTIÉRREZ, C., GONZALEZ-COLOMA, A. und HOFFMANN, J. J. (1999). Antifeedant properties of natural products from *Parthenium argentatum*, *P. argentatum* x *P. tomentosum* (Asteraceae) and *Castela emoryi* (Simaroubeaceae) against *Reticulitermes flavipes*. *Industrial Crops & Products* 10(1): 35-40.
- HAN, G., LAPORTE, M. G., FOLMER, J. J., WERNER, K. M. und WEINREB, S. M. (2000). Total syntheses of the Securinega alkaloids (+)-14,15-dihydronorsecurinine, (-)-norsecurinine, and phyllanthine. *Journal of Organic Chemistry* 65(20): 6293-6306.
- HANSEN-DELKESKAMP, E. und HANSEN, K. (1995). Responses and spike generation in largest antennal taste hairs of *Periplaneta brunnea* Burm. *Journal of Insect Physiology* 41: 773-781.
- HARRIS, W. V. (1968). African termites of the genus *Schedorhinotermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) and associated termitophiles (Lepidoptera: Tineidae). *Proc R Ent Soc Lond* 37(7-8): 103-113.
- HARRIS, W. V. (1969). Termites as pests of crops and trees. London, Commonwealth Institute of Entomology.
- HODGSON, E. S., LETTVIN, J. Y. und ROEDER, K. D. (1955). Physiology of a primary chemoreceptor unit. *Science* 122(3166): 417-418.
- HOLLISTER, B., DICKENS, J. C., PEREZ, F. und DEAHL, K. L. (2001). Differential neurosensory responses of adult Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, to glycoalkaloids. *Journal of Chemical Ecology* 27(6): 1105-1118.
- HUMMELBRUNNER, L. A. und ISMAN, M. B. (2001). Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(2): 715-720.
- KAIB, M. (1990). Multiple functions of exocrine secretions in termite communication: Exemplified by *Schedorhinotermes lamanianus*. In: *Social Insects and the Environment (Proceedings)*, (Hrsg.: VEERESH, G. K., MALLIK, B. und VIRAKTAMATH, C. A.) S. 37-38.
- KAIB, M. (1999). Chemorezeption. In: *Lehrbuch der Entomologie*, (Hrsg.: DETTNER, K. und PETERS, W.), 1. Aufl., Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: S. 302-320.

- KAIB, M., ZIESMANN, J. und WOLFRUM, U. (1993). Modulation of odour-sensitivity by carbon dioxide in a termite sensillum: A possible mechanism for signal interpretation. In: Sensory Systems of Arthropods, (Hrsg.: WIESE, K., GRIBAKIN, F. G., POPOV, A. V. und RENNINGER, G.): S. 481-488.
- KAWAGUCHI, H., KIM, M., ISHIDA, M., AHN, Y. J., YAMAMOTO, T., YAMAOKA, R., KOZUKA, M., GOTO, K. und TAKAHASHI, S. (1989). Several antifeedants from *Phellodendron amurense* against *Reticulitermes speratus*. Agricultural and biological chemistry 53(10): 2635-2640.
- KENNEDY, L. M. und HALPERN, B. P. (1980). Fly chemoreceptors - model system for the taste modifier Ziziphin. Physiology & Behavior 24(1): 135-143.
- KÖNIG, H. und BREUNING, A. (1997). Ökosystem Termitendarm. Spektrum der Wissenschaft 4: 69-76.
- KRISHNA, K. und WEESNER, F. M. (1969). Biology of termites. New York, London, Academic Press.
- LAM, P. Y. S. und FRAZIER, J. L. (1991). Rational approach to Glucose taste chemoreceptor inhibitors as novel insect antifeedants. Acs Symposium Series 443: 400-412.
- LINER, L., VANLOON, J. J. A. und SCHOONHOVEN, L. M. (1995). Behavioral and sensory responses to some Neem compounds by *Pieris brassicae* larvae. Physiological Entomology 20(2): 134-140.
- LISCIA, A. und SOLARI, P. (2000). Bitter taste recognition in the blowfly: Electrophysiological and behavioral evidence. Physiology & Behavior 70(1-2): 61-65.
- LISCIA, A., SOLARI, P., MAJONE, R., TOMASSINI BARBAROSSA, I. und CRNJAR, R. (1997). Taste reception mechanism in the blowfly: Evidence of Amiloride-sensitive and insensitive receptor sites. Physiology & Behaviour 62(4): 875-879.
- LOGAN, J. W. M. und ABOOD, F. (1990). Laboratory trials on the toxicity of Hydramethylnon (Amdro; AC 217,300) to *Reticulitermes santonensis* Feytaud (Isoptera: Rhinotermitidae) and *Microtermes lepidus* Sjöstedt (Isoptera: Termitidae). Bulletin of Entomological Research 80: 19-26.
- MA, W. C. (1977). Alterations of chemoreceptor function in Armyworm larvae (*Spodoptera exempta*) by a plant-derived Sesquiterpenoid and by Sulfhydryl-Reagents. Physiological Entomology 2(3): 199-207.
- MAISTRELLO, L., HENDERSON, G. und LAINE, R. A. (2001). Effects of nootkatone and a borate compound on *Formosan subterranean* termite (Isoptera : Rhinotermitidae) and its symbiont protozoa. Journal of Entomological Science 36(3): 229-236.
- MARION-POLL, F. (1996). Display and analysis of electrophysiological data under Windows(TM). Entomologia experimentalis et applicata 80: 116-119.

- MENSAH, J. L., GLEYE, J., MOULIS, C. und FOURASTE, I. (1988). Alkaloids from the leaves of *Phyllanthus discoideus*. *Journal of Natural Products* 51(6): 1113-1115.
- MERBACH, M. A., MASCHWITZ, U. und BOOTH, W. E. (2002). Carnivorous plants: Mass march of termites into the deadly trap. *Nature* 415: 36 - 37.
- MESSCHENDORP, L., SMID, H. M. und VAN LOON, J. J. A. (1998). The role of an epipharyngeal sensillum in the perception of feeding deterrents by *Leptinotarsa decemlineata* larvae. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 183(2): 255-264.
- MESSCHENDORP, L., VAN LOON, J. J. A. und GOLS, G. J. Z. (1996). Behavioural and sensory responses to drimane antifeedants in *Pieris brassicae* larvae. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 79(2): 195-202.
- MIKUS, S. (2000). Nahrungswahl der Termiten *Schedorhinotermes lamanianus*: Nahrungspräferenz, Pflanzeninhaltsstoffe und Geschmacksrezeptoren. Inaugural-Dissertation. Lehrstuhl für Tierphysiologie, Prof. Dr. D. von Holst, Universität Bayreuth.
- MIKUS, S., BRANDL, R. und KAIB, M. (1997). Tree-use by *Schedorhinotermes lamanianus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Mitt Dtsch Ges allg angew Ent* 11: 193-197.
- MIKUS, S., HAFENECKER, T. und KAIB, M. (1998a). Food choice in a termite: Characterisation of a deterrent signal. In: *Social Insects at the turn of the Millennium*, (Hrsg.: SCHWARZ, M. P. und HOGENDOORN, K.) XIII International Congress of IUSI, Flinders University Press, Adelaide: S. 313.
- MIKUS, S. und KAIB, M. (1997). Die Bedeutung von Pflanzeninhaltsstoffen für die Nahrungswahl durch die Termiten *Schedorhinotermes lamanianus*: ethologische und neurophysiologische Untersuchungen. In: *Soziale Insekten, IUSI Tagung Graz 1997*, (Hrsg.: CRAILSHEIM, K. und STABENTHEINER, A.) IUSI Internationale Union zum Studium der Sozialen Insekten, Graz: S. 63.
- MIKUS, S. und KAIB, M. (1998b). Neurophysiology of a taste receptor in a termite: Evidence for two distinct receptor sites - water and sodium. In: *Social Insects at the turn of the Millennium*, (Hrsg.: SCHWARZ, M. P. und HOGENDOORN, K.) XIII International Congress of IUSI, Flinders University Press, Adelaide: S. 314.
- MITCHELL, B. K. (1987). Interactions of Alkaloids with galeal chemosensory cells of colorado potato beetle. *Journal of Chemical Ecology* 13(10): 2009-2022.
- MITCHELL, B. K. und GREGORY, P. (1979). Physiology of the maxillary sugar sensitive cell in the red turnip beetle, *Entomoscelis americana*. *Journal of Comparative Physiology* 132: 167-178.
- MULLIN, C. A., CHYB, S., EICHENSEER, H., HOLLISTER, B. und FRAZIER, J. L. (1994). Neuroreceptor mechanisms in insect gustation: a

- pharmacological approach. *Journal of Insect Physiology* 40(11): 913-931.
- MULLIN, C. A., GONZALEZCOLOMA, A., GUTIERREZ, C., REINA, M., EICHENSEER, H., HOLLISTER, B. und CHYB, S. (1997). Antifeedant effects of some novel terpenoids on chrysomelidae beetles: Comparisons with alkaloids on an alkaloid-adapted and nonadapted species. *Journal of Chemical Ecology* 23(7): 1851-1866.
- MURAV'eva, V. I. und BAN'kovsky, A. I. (1956). A chemical study of Alkaloids from *Securinea suffruticosa* (Pall) Rehd. *Doklady Akademii Nauk Sssr* 110(6): 998-1000.
- NEWLAND, P. L. (1998). Avoidance reflexes mediated by contact chemoreceptors on the legs of locusts. *Journal of Comparative Physiology* 183: 313-324.
- NORRIS, D. M. (1986). Anti-feeding compounds. In: *Chemistry of plant protection*. Berlin, Springer.
- OHTANI, Y., HAZAMA, M. und SAMESHIMA, K. (1997). Crucial chemical factors of the termiticidal activity of Hinoki wood (*Chamaecyparis obtusa*) III. Contribution of alpha-terpinyl acetate to the termiticidal activity of hinoki wood. *Mokuzai Gakkaishi* 43(12): 1022-1029.
- PETERSON, S. C., HANSON, F. E. und WARTHEN, J. D. (1993). Deterrence coding by a larval *Manduca* chemosensory neuron mediating rejection of a nonhost plant, *Canna generalis* L. *Physiological Entomology* 18(3): 285-295.
- RAFFAUF, R. F. (1996). *Plant Alkaloids - a guide to their discovery and distribution*. New York, London, Food Products Press - An Imprint of The Haworth Press, Inc.
- REINHARD, J. und KAIB, M. (1995). Interaction of pheromones during food exploitation by the termite *Schedorhinotermes lamanianus*. *Physiological Entomology* 20: 266-272.
- RENOUX, J. (1976). Le polymorphisme de *Schedorhinotermes lamanianus* (Sjöstedt) (Isoptera - Rhinotermitidae) Essai d'interpretation. *Insectes Sociaux* 23: 279-494.
- REYE-SCHILPA, R., VIVEROS-RODRIGUEZ, B., GOMEZ-GARIBAY, F. und ALAVEZ-SOLANO, D. (1995). Antitermitic Activity of *Lonchocarpus castilloi* Flavonoids and Heartwood Extracts. *J Chem Ecol* 21: 455-463.
- ROESSINGH, P., STÄDLER, E., HURTER, J. und RAMP, T. (1992). Oviposition stimulant for the cabbage root fly: important new cabbage leaf surface compound and specific tarsal receptors. In: *Proc 8th Int Symp Insect-Plant Relationships*, (Hrsg.: MENKEN, S. B. J., VISSER, J. H. und HARREWIJN, P.) Kluwer Acad. Publ., Dordrecht: S. 141-142.
- ROGERS, S. M. und NEWLAND, P. L. (2000). Local movements evoked by chemical stimulation of the hind leg in the locust *Schistocerca gregaria*. *Journal of Experimental Biology* 203(3): 423-433.
- SCHEFFRAHN, R. H. (1991). Allelochemical resistance of wood to termites. *Sociobiology* 19(1): 257-281.

- SCHLIEPER, C. (1965). Praktikum der Zoophysiology. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- SCHNUCH, M. (1996). Receptor responses in labellar taste hairs of the housefly *Musca domestica* to aqueous solutions of KCl and CaCl₂. *Journal of Insect Physiology* 42: 1095-1101.
- SCHNUCH, M. und SEEBAUER, H. (1998). Sugar cell responses to lactose and sucrose in labellar and tarsal taste hairs of *Musca domestica*. *Journal of Comparative Physiology A-Sensory Neural & Behavioral Physiology* 182(6): 767-775.
- SCHOONHOVEN, L. M. (1982). Biological aspects of antifeedants. *Entomologia experimentalis et applicata* 31: 57-69.
- SCHOONHOVEN, L. M., BLANEY, W. M. und SIMMONDS, M. S. J. (1992). Sensory coding of feeding deterrents in phytophagous insects. In: *Insect-plant interactions*, (Hrsg.: BERNAYS, E.), Vol. 4, CRC Press, Boca Raton: S. 59-79.
- SCHOONHOVEN, L. M., JERMY, T. und VAN LOON, J. J. A. (1998). *Insect-plant biology: From physiology to behaviour*. London, Chapman & Hall.
- SCHOONHOVEN, L. M. und YAN, F. S. (1989). Interference with normal chemoreceptor activity by some sesquiterpenoid antifeedants in an herbivorous insect *Pieris brassicae*. *Journal of Insect Physiology* 35(9): 725-728.
- SHEAD, A., VICKERY, K., PAJKOS, A., MEDHURST, R., FREIMAN, J., DIXON, R. und COSSART, Y. (1992). Effects of *Phyllanthus* Plant-Extracts on Duck Hepatitis-B Virus in vitro and in vivo. *Antiviral Research* 18(2): 127-138.
- SHIMADA, I. (1994). Multiple receptor sites of insect taste cells. In: *Olfaction and Taste*, (Hrsg.: KURIHARA, K., SUZUKI, N. und OGAWA, H.), 11, Springer, Tokyo: S. 801-803.
- SIMMONDS, M. S. J., BLANEY, W. M., DELLEMONACHE, F. und BETTOLO, G. B. M. (1990). Insect antifeedant activity associated with compounds isolated from species of *Lonchocarpus* and *Tephrosia*. *Journal of Chemical Ecology* 16(2): 365-380.
- SOGABE, A., KINJO, K., ABE, F., YAMAUCHI, T. und YAGA, S. (2000). Termiticidal substances from the heartwood of *Cryptomeria japonica* D. Don. *Mokuzai Gakkaishi* 46(2): 124-131.
- SOGABE, A., KINJO, K., ABE, F., YAMAUCHI, T. und YAGA, S. (2000). Termiticidal substances from the wood and bark of *Wikstroemia retusa* A. Gray. *Mokuzai Gakkaishi* 46(1): 47-53.
- SOULE, S., GUNTNER, C., VAZQUEZ, A., ARGANDONA, V., MOYNA, P. und FERREIRA, F. (2000). An aphid repellent glycoside from *Solanum laxum*. *Phytochemistry* 55(3): 217-222.
- STÄDLER, E., ERNST, B., HURTER, J. und BOLLER, E. (1994). Tarsal contact chemoreceptor for the host marking pheromone of the cherry fruit

- fly, *Rhagoletis cerasi*: responses to natural and synthetic compounds. *Physiological Entomology* 19: 139-151.
- STÄDLER, E., RENWICK, J. A. A., RADKE, C. D. und SACHDEV-GUPTA, K. (1995). Tarsal contact chemoreceptor response to glucosinolates and cardenolides mediating oviposition in *Pieris raptae*. *Physiological Entomology* 20: 175-187.
- SU, N. Y. und SCHEFFRAHN, R. H. (1990). Economically important termites in the United States and their control. *Sociobiology* 17: 77-94.
- VAN DER GOES VAN NATERS, W. M. V. und DEN OTTER, C. J. (1998). Amino acids as taste stimuli for tsetse flies. *Physiological Entomology* 23(3): 278-284.
- VAN DER MOLEN, J. N., NEDERSTIGT, L. J. A. und VEENMAN, C. L. (1985). Variability in blowfly taste responses. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 157(2): 211-221.
- VAN DER STARRE, H. (1972). Tarsal taste discrimination in the blowfly, *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy. *Netherlands Journal of Zoology* 22(3): 227-282.
- VAN LOON, J. J. A. (1990). Chemoreception of phenolic-acids and Flavonoids in larvae of 2 species of *Pieris*. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 166(6): 889-899.
- VAN LOON, J. J. A. und SCHOONHOVEN, L. M. (1999). Specialist deterrent chemoreceptors enable *Pieris* caterpillars to discriminate between chemically different deterrents. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 91(1): 29-35.
- VISSER, J. H. (1983). Differential sensory perceptions of plant-compounds by insects. *Acs Symposium Series* 208: 215-230.
- WASSERMANN, K. (1990). Die soziale Organisation der Termiten *Schedorhinotermes lamanianus* Sjöstedt - Die Dynamik der Arbeitsteilung beim Furagieren. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
- WEBSTER, G. L. (1979). A Revision of *Margaritaria* (Euphorbiaceae). *Journal of the Arnold Arboretum* 60(4): 403-438.
- WIECZOREK, H. (1976). Glycoside receptor of larvae of *Mamestra brassicae* L (Lepidoptera, Noctuidae). *Journal of Comparative Physiology* 106(2): 153-176.
- WOLFRUM, U. und KAIB, M. (1988). Kastenspezifisches Verhalten der Termiten *Schedorhinotermes lamanianus* und dessen Beziehung zu Unterschieden in Ultrastruktur, Häufigkeit und Topographie antennaler Sensillen. *Mitt Dtsch Ges Allg Angew Ent* 6: 86-90.
- ZIESMANN, J. (1996). The physiology of an olfactory sensillum of the termite *Schedorhinotermes lamanianus*: Carbon dioxide as a modulator of

olfactory sensitivity. *Journal of Comparative Physiology A* 179: 123-133.

ZIESMANN, J., KAIB, M. und WOLFRUM, U. (1992). CO₂-dependent response of an olfactory sensillum in the termite *Schedorhinotermes lamanianus*. *Chemical Senses* 17: 894.

7 ANHANG

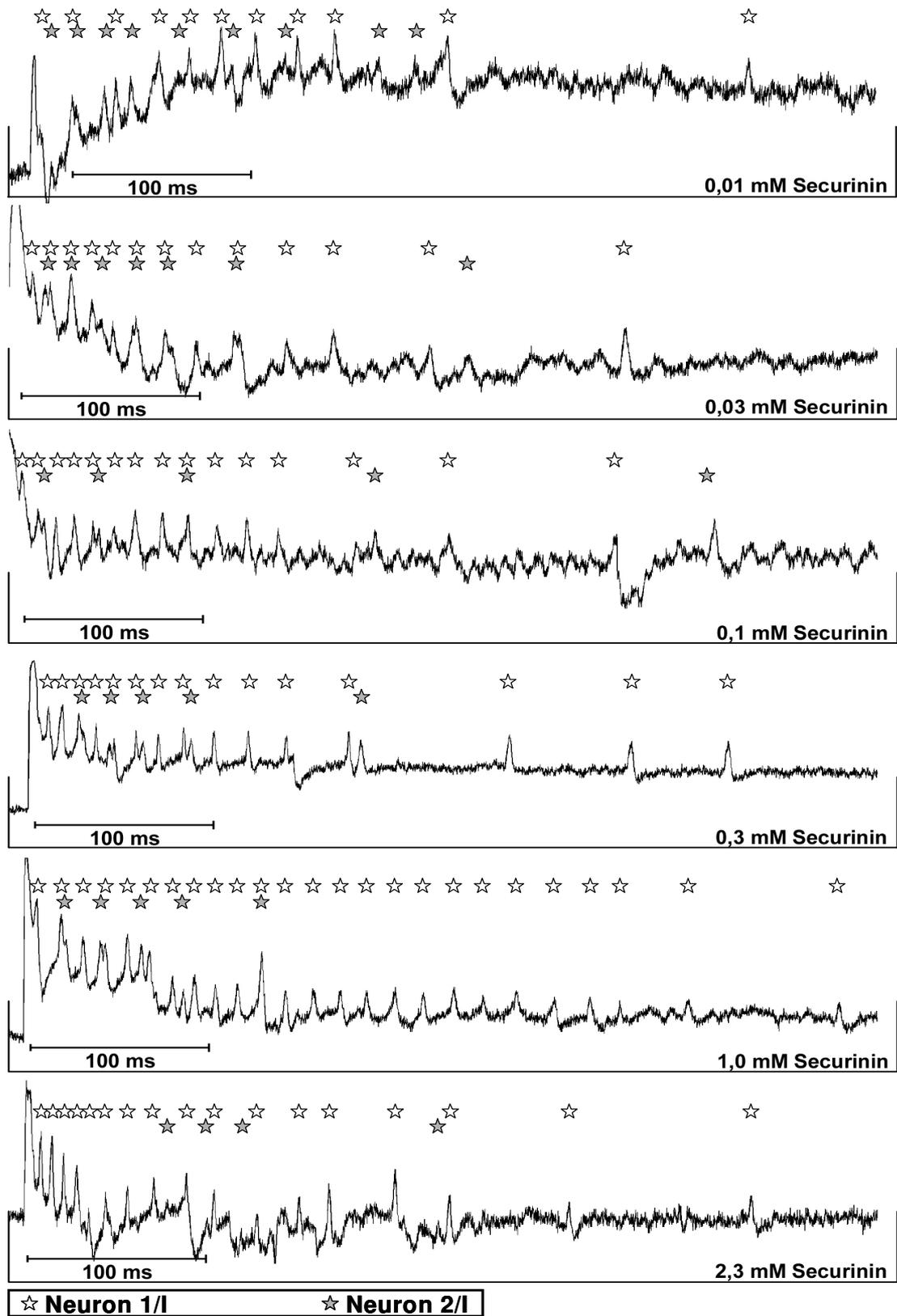


Abb. A1: Registrierbeispiele vom TP I-Sensillum bei Reizung mit Securin

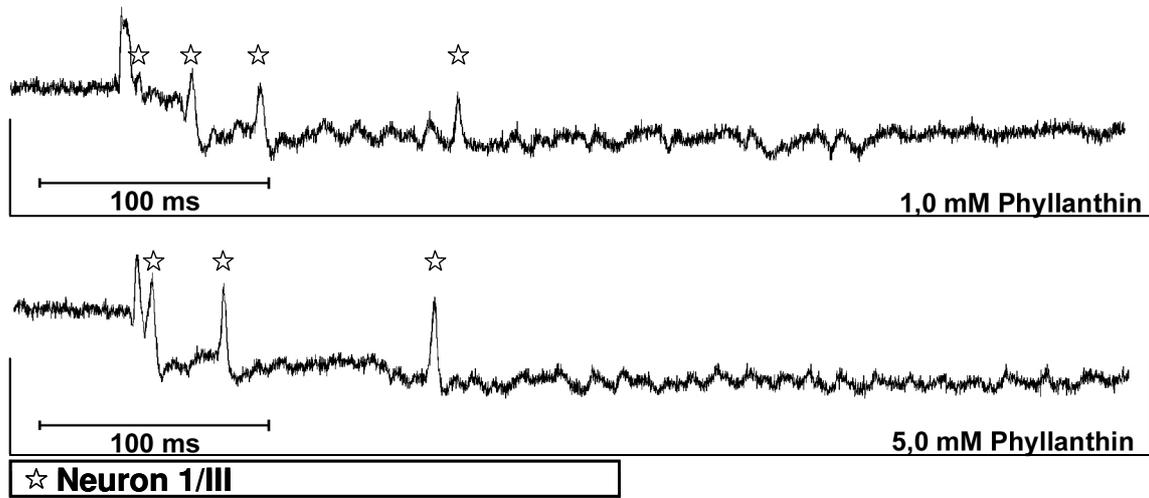


Abb. A2: Registrierbeispiele vom TP III-Sensillum bei Reizung mit Phyllanthin

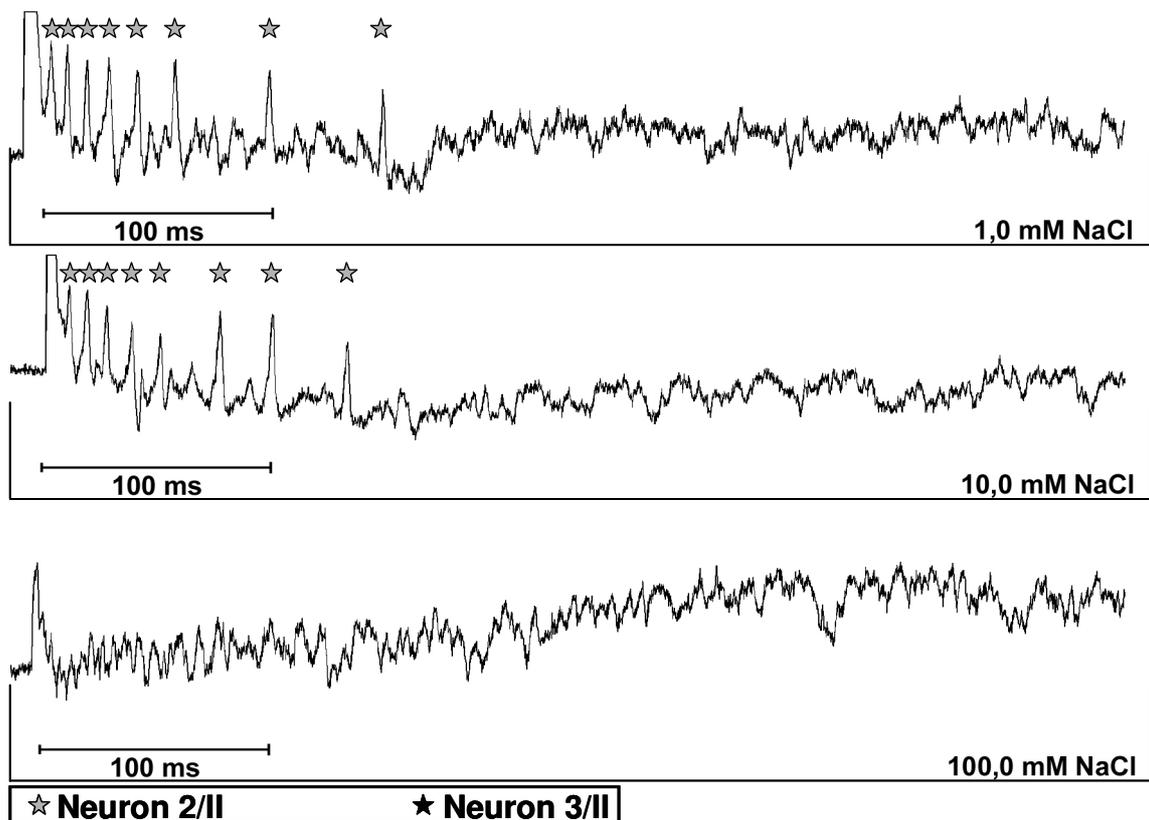


Abb. A3: Registrierbeispiele vom TP II-Sensillum bei Reizung mit NaCl

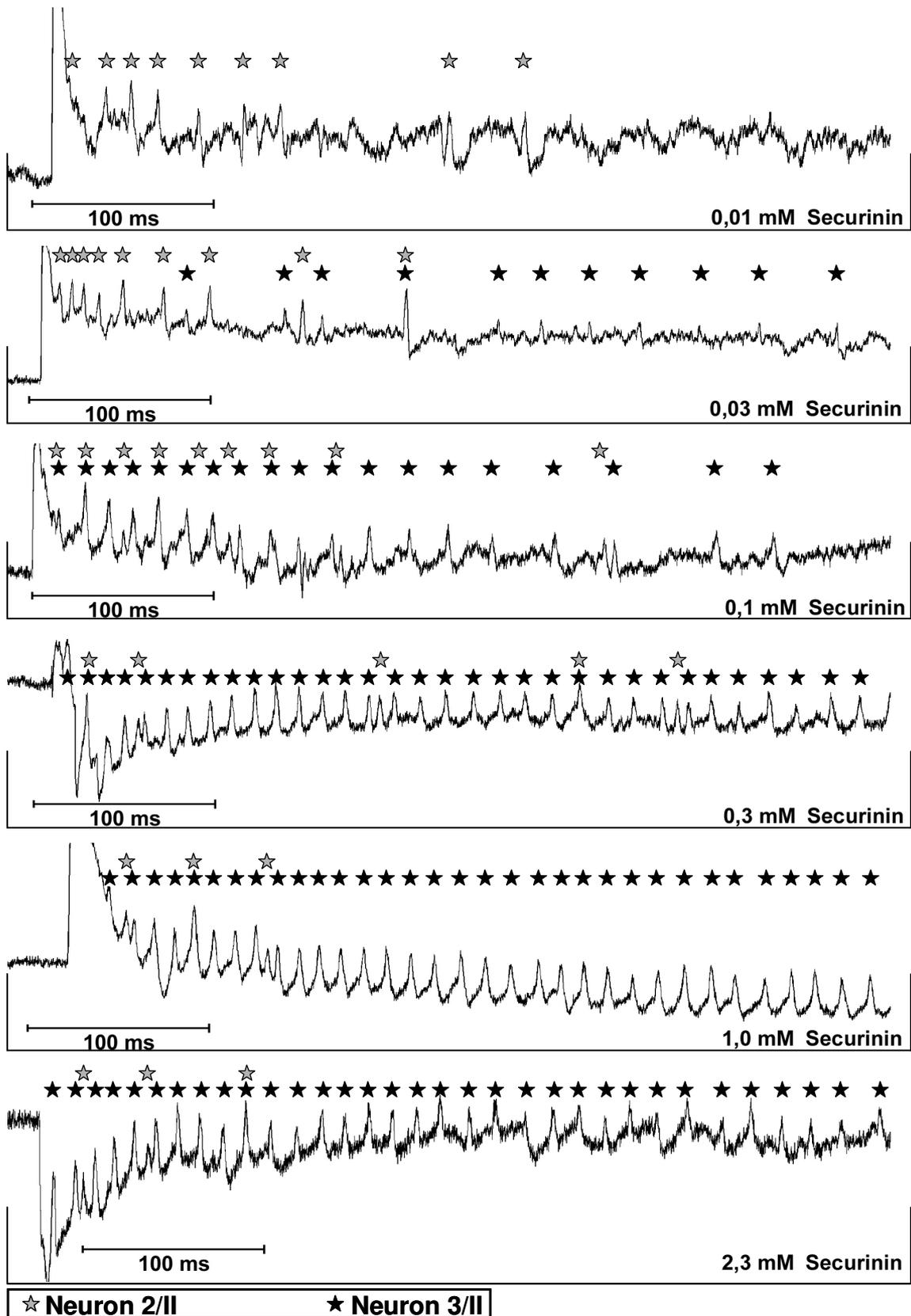


Abb. A4: Registrierbeispiele vom TP II-Sensillum bei Reizung mit Securinin

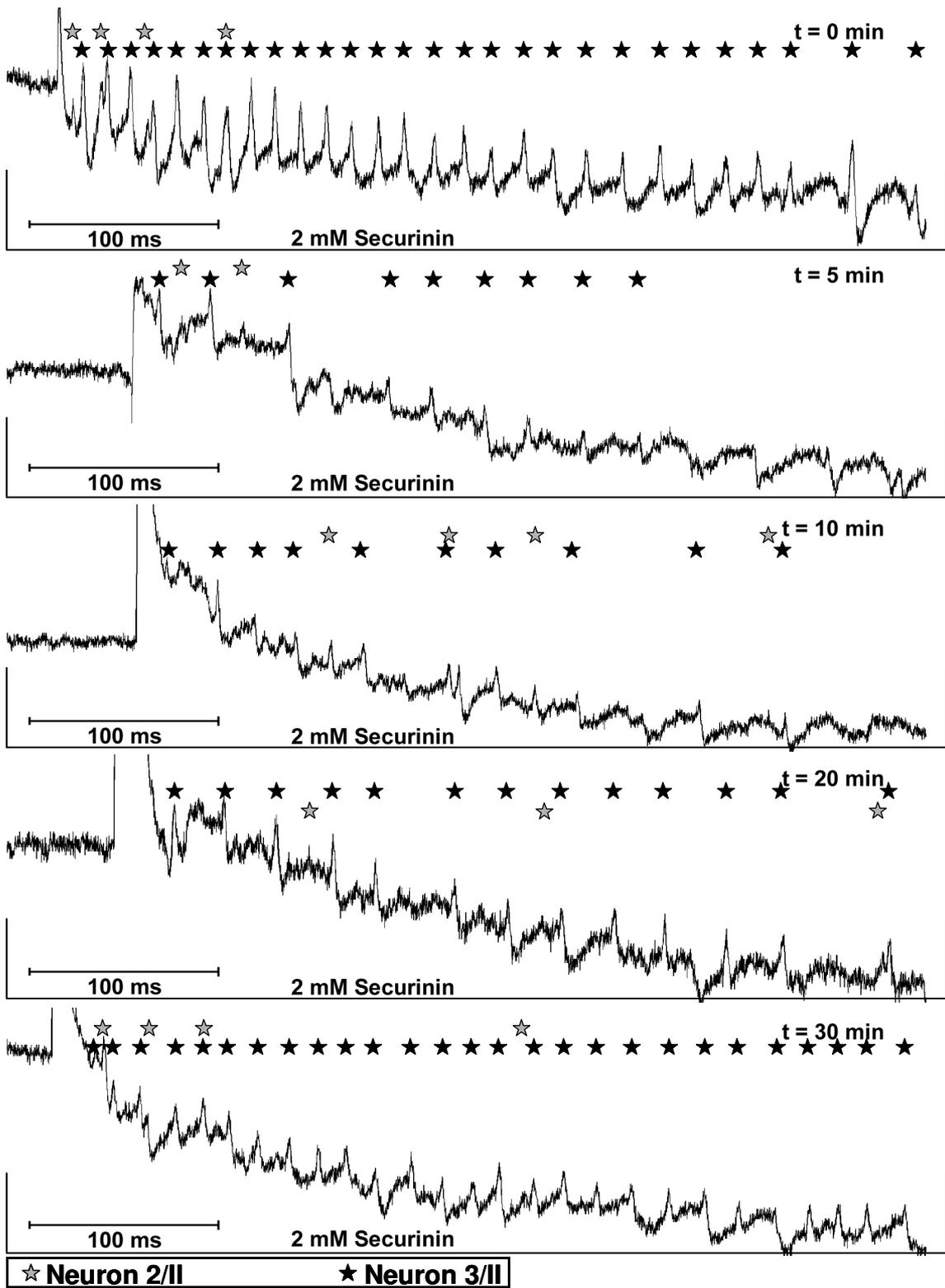


Abb. A5: Registrierbeispiele des Hemmtests am TP II-Sensillum bei Reizung mit Securinin

Fortsetzung von Abb. A5:

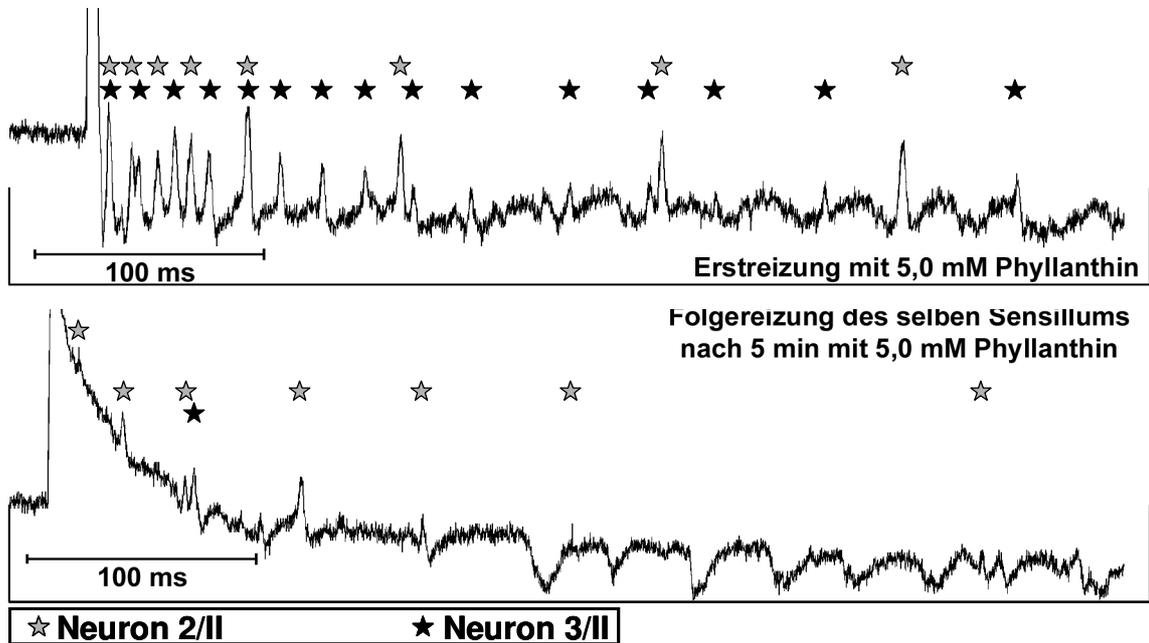
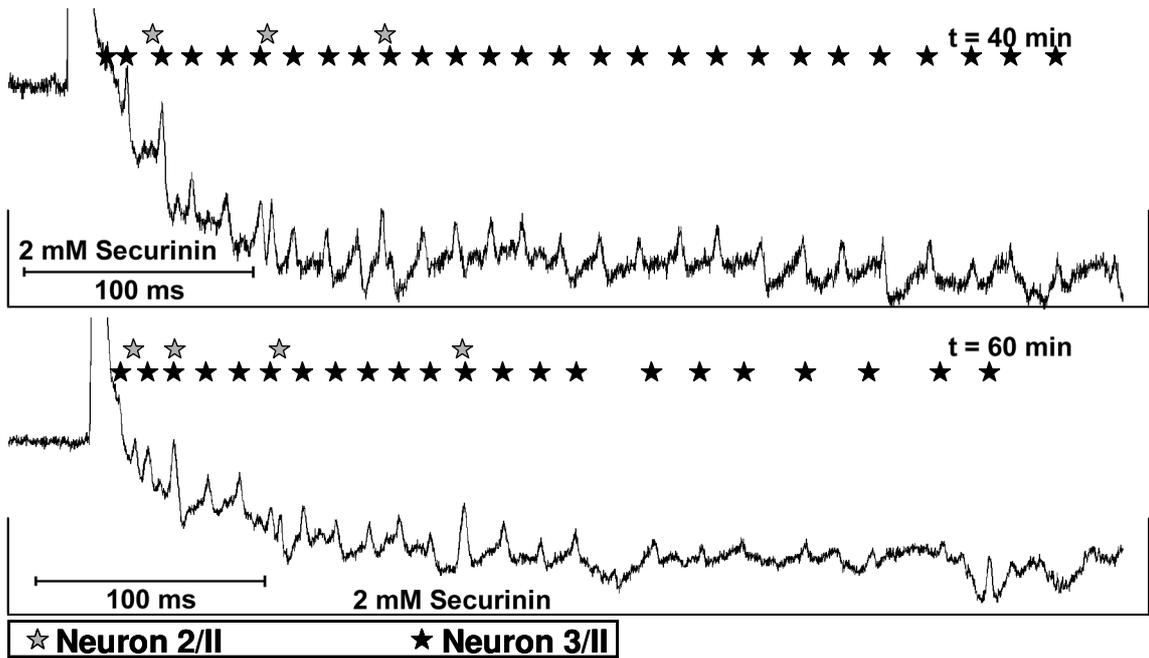


Abb. A6: Registrierbeispiele des Hemmtests am TP II-Sensillum bei Reizung mit Phyllanthin

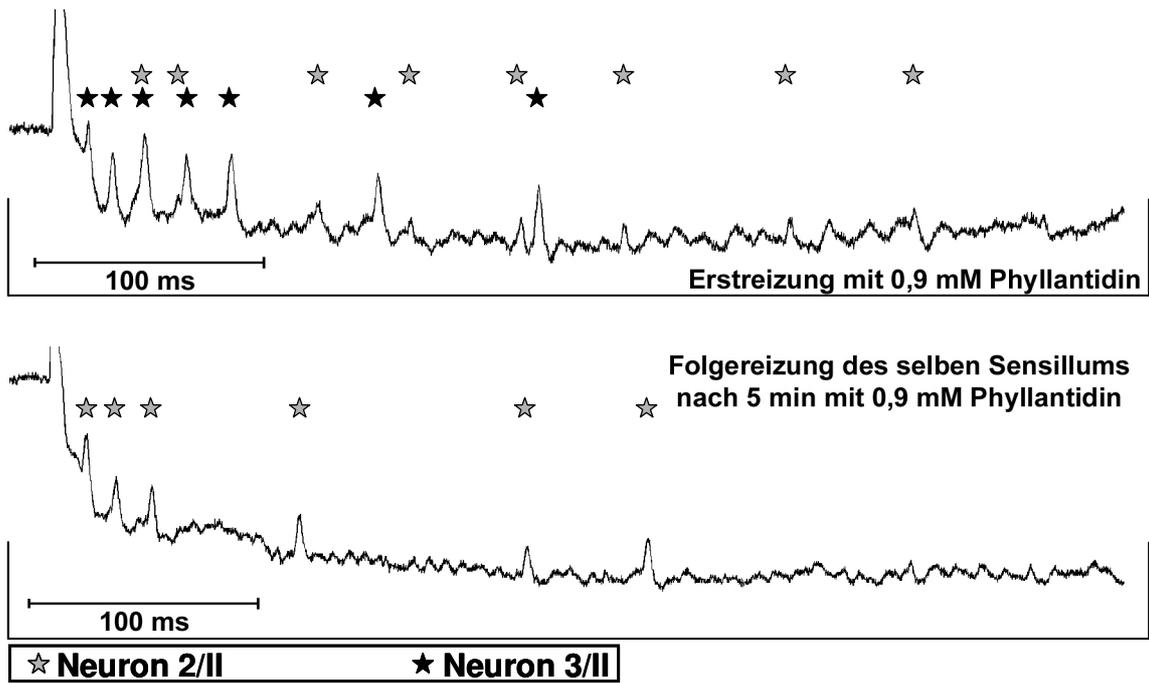


Abb. A7: Registrierbeispiele des Hemmtests am TP II-Sensillum bei Reizung mit Phyllantidin

DANKSAGUNG

Ich möchte mich herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich bei dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank an:

Herrn Prof. Dr. D. von Holst für die Überlassung des sehr interessanten Themas und für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Herrn Dr. Manfred Kaib für die stets bereitwillige und intensive Betreuung dieser Arbeit. Mit seiner Hilfe und seiner regen Diskussionsbereitschaft trug er großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Herrn Stefan Mikus für seine bereitwilligen Erklärungen zur Methodik dieser Arbeit und für die gute Übergabe des Arbeitsplatzes.

Frau Antje Halwas für ihren moralischen Beistand in unseren gelegentlichen „blauen“ Pausen und die überaus großzügige Versorgung mit Energieträgern während der ganzen Zeit.

Lena Wilfert für ihre stete Diskussionsbereitschaft und freundschaftlichen Ratschläge.

Florian Lengyel für sein Verständnis und des guten Arbeitsklimas im Labor.

Alle meine Freunde, die mir immer wieder ihre Hilfe anboten und mich auch nach der Arbeit mit auf ein Glas Bier mitnahmen.

Meine liebe Susi, ohne ihre aufbauenden Worte und der vielen Hilfe beim Korrigieren und gedanklichen Organisieren würde diese Arbeit nicht so vorliegen. Vielen Dank !

Meinen lieben und verständnisvollen Eltern, die mich nicht nur finanziell sondern auch moralisch stärkten und immer für mich da waren.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und dabei nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendete.

Bayreuth, den 09. September 2002

Gregor Hardieß