

***In-vitro*-Verfahren zur Prüfung von verhaltensbeeinflussenden Substanzen mittels EPG**

Oleg Kryvynets & Claus P. W. Zebitz

Institut für Phytomedizin, Universität Hohenheim

Abstract: *In-vitro*-method using EPG for testing behaviour-modifying substances

In this work the behaviour of *Phorodon humuli* (SCHRANK) during feeding on artificial, semi-solid diets was examined by Electrical Penetration Graph in order to test the biological effects of secondary plant substances. Components of hop (*Humulus lupulus* L.) assumed to affect host selection (a mixture of the bitter substances humulone and lupulone) were added to the diet in different concentrations (0; 100; 300; 625; 1250; 2500; 5000; 7500 µl/ml deion. H₂O). For comparison additional recordings were taken with the aphids being offered the non-hop component resveratrol, in concentrations of 0; 0,4; 0,75; 1,5; 3; 6; 12 µl/ml deionized water.

The results clearly show an influence of the bitter substances on the hop aphid's feeding behaviour. Depending on concentrations, the animals reacted to bitter substances with differences in probing frequency and -time, sucking activity and other parameters. The probing activity was positively correlated with the resveratrol, a substance foreign to hop, whereas the sucking activity was notably negatively correlated. So the resveratrol distinctively plays the role of an allomone, the bitter substances from hop, however, more that of kairomones. The combination of artificial diets with the EPG-method is a suitable technique for examining the specific gustatory effects of substances on aphids.

Key Words: bitter acid, resveratrol, diet, EPG, *Humulus lupulus*, *Phorodon humuli*

Dipl.-Agrarwiss. O. Kryvynets, Prof. Dr. C.P.W. Zebitz,
Institut für Phytomedizin, Universität Hohenheim, 70593 Stuttgart, Deutschland.
E-mail: kryvynetz@uni-hohenheim.de, zebitz@uni-hohenheim.de

Problemstellung

Das Wirtswahlverhalten von Blattläusen wird neben primären Nahrungskomponenten auch durch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe gesteuert (KLINGAUF & al. 1978; SINGH 1980; POWELL & al. 1999; CAMPO & al. 2003). Häufig entziehen sich diese jedoch einer gezielten Untersuchung ihrer Wirkung auf die Aphiden, da sie als Substanzgemisch vorliegen. Beziehungen zwischen Substanzkonzentration und Verhaltensmustern aus Electrical Penetration Graphs (EPG) sind nur mit mäßigem Erfolg über statistische Verfahren darzustellen.

Eine Versuchsanordnung zur gezielten Prüfung verhaltensbeeinflussender Substanzen mittels EPG wäre in diesem Falle hilfreich. Ein geeignetes einfaches Testsystem müsste mindestens folgende Komponenten beinhalten:

- eine von den Aphiden akzeptierte Oberfläche, welche die Kutikula/Epidermis eines natürlichen Systems nachbildet
- diese Oberfläche sollte evtl. durch den Versuchsansteller manipulierbar sein
- eine dem Parenchym entsprechende Schicht, in welche die Testsubstanzen einzubringen wären
- eine flüssige Phase, die dem Phloem entspricht und ebenfalls in ihrer Zusammensetzung variiert werden kann.

Material und Methoden

Die von uns verwendete Anordnung (Abb.1) bestand aus

- einem dünn ausgezogenen Stück Parafilm als künstliche Kutikula/Epidermis
- Agar mit 30% Saccharose zur Darstellung des Parenchyms
- 30%-iger Saccharoselösung zur Darstellung des Phloemsaftes

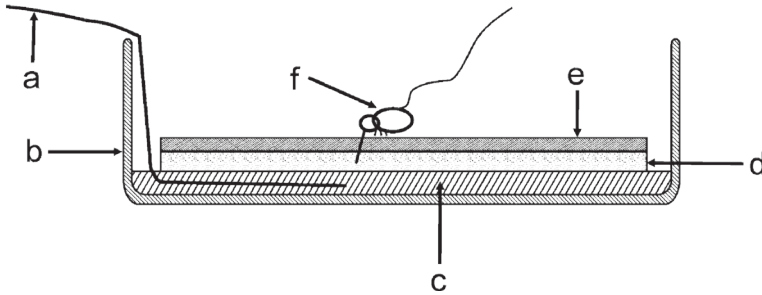


Abb. 1: Schematische Skizze der Anordnung, in welcher die halb feste Diät dargeboten wird
 (a) Kupferelektrode, (b) Petrischale, (c) Saccharoselösung, (d) Agar, (e) Parafilm,
 (f) Blattlaus an Goldfaden

Die Agarschicht wird dabei in gewünschter Dicke auf dem Parafilm ausgegossen, nach Erkalten in Stücke der gewünschten Größe ausgeschnitten oder ausgestanzt und mit der Agarschicht nach unten auf die vorbereitete und in die Versuchsgefäße (Petrischalen, Durchmesser 3 cm) gegebene Saccharoselösung gelegt. Zuvor ist die normalerweise bei EPG-Aufnahmen mit dem Substrat verbundene Elektrode (TJALLINGH 1978, 1988, 2006) in die Saccharoselösung zu bringen.

Zur EPG-Aufnahme werden die Blattläuse in der üblichen Weise an einem Golddraht befestigt, mit der EPG-Apparatur verbunden und auf den Parafilm aufgesetzt. Beim Durchstich der Mundwerkzeuge durch den Parafilm in den Agar wird der Stromkreis geschlossen. Der für die einzelnen Phasen des Einstiches charakteristische Verlauf der Potentialänderungen wird aufgezeichnet, und die erhaltenen Kurven anschließend qualitativ und quantitativ ausgewertet.

Zur Prüfung dieses Testsystems wurde die biologische Wirkung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe auf das Saugverhalten von *Phorodon humuli* (SCHRANK) untersucht. Dabei wurden die vermuteten wirtswahlbestimmenden Inhaltsstoffe des Hopfens (*Humulus lupulus* L.) (Mischung der Bitterstoffe von Humulon und Lupulon) in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Zusätzlich wurden zum Vergleich Aufnahmen durchgeführt, in welchen den Blattläusen die für sie fremde Nahrungskomponente Resveratrol angeboten wurde.

Ergebnisse und Zusammenfassung

Die Nahrungsaufnahme der Hopfenblattlaus wird durch die Bitterstoffe deutlich beeinflusst. Die Tiere reagierten konzentrationsabhängig auf die Bitterstoffe mit ihrer Probing-Häufigkeit (Abb.2A) und der Verweildauer des Rüssels im Medium (Abb.2B). Noch deutlicher wird der Einfluß des Resveratrols auf die Blattläuse. Es wirkt offensichtlich als Allomon, da mit der Resveratrol-Konzentration die Probing-Häufigkeit zunimmt und die Verweildauer abnimmt, wie es für Wirtspflanzen mit xenobiotisch bedingter Resistenz gegen Blattläuse beschrieben wird (CHEN & al. 1997; KLINGLER & al. 2005) (Abb.3A, B). Die Hopfenbitterstoffe besitzen dagegen eher kairomonalen Charakter. Die gute Korrelation der EPG-Parameter mit der Konzentration der angebotenen Substanzen belegt die Eignung dieses *in-vitro*-Systems zur gezielten Untersuchung gustatorisch perzipierter Substanzen. Es ist einfach zu installieren und über die Standardverfahren des EPG auszuwerten.

Danksagung

Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung des Landes Baden-Württemberg nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz (LGFG)

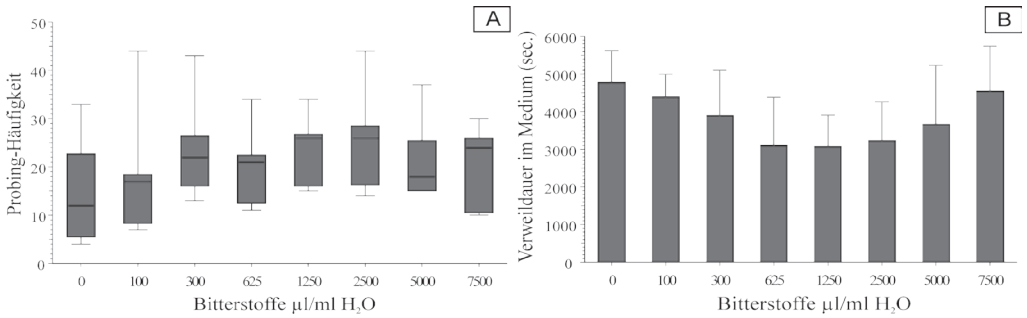


Abb.2: Erfassung der Verhaltensparameter von Aphiden (A: Probung-Häufigkeit; B: Verweildauer im Medium) auf Diäten mit unterschiedlichen Bittersäuregehalten mittels EPG

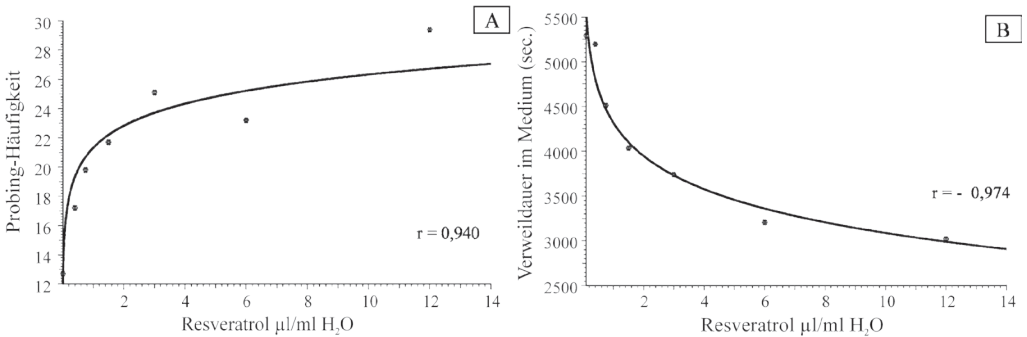


Abb.3: Korrelation zwischen EPG-Parametern (A: Probung-Häufigkeit; B: Verweildauer im Medium) und Resveratrol-Gehalten in Diäten

Literatur

CHEN, J.Q., RAHBÉ, Y., DELOBEL, B., SAUVION, N., GUILLAUD, J., FEBVAY, G. (1997): Melon resistance to the aphid *Aphis gossypii*: behavioral analysis and chemical correlations with nitrogenous compounds. – Entomol. Exp. Appl. **85**: 33-44.

DEL CAMPO, M. L., VIA, S., CAILLAUD, C.M. (2003): Recognition of host-specific chemical stimulants in two sympatric host races of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. – Ecolog. Entomol. **28**: 405-412.

KLINGAUF, F., NOECKER-WENZEL, K., ROETTGER, U. (1978): Die Rolle peripherer Pflanzenwache für den Befall durch phytophage Insekten. – Z. Pflanzenkrankh. und Pflanzenschutz **85**: 228-237.

KLINGLER, J., CREASY, R., GAO, L., NAIR, R.M., CALIX, A.S., JACOB, H.S., EDWARDS O.R., SINGH, K.B. (2005): Aphid resistance in *Medicago truncatula* involves antixenosis and phloem-specific, inducible antibiosis, and maps to a single locus flanked by NBS-LRR resistance gene analogs. – Plant Physiology **137**: 1445-1455.

POWELL, G., MANIAR, S.P., PICKETT, J.A., HARDIE, J. (1999): Aphid responses to non-host epicuticular lipids. – Entomol. Exp. Appl. **91**: 115-123.

SINGH, S.R. (1980): Environmental factors influencing the magnitude and expression of resistance. – in: MAXWELL, F.G. & P.R. JENNINGS: Breeding plants resistant to insects. – John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto. 87-113.

TJALLINGII, W. F. (1978): Electronic recording of penetration behaviour by aphids. – Entomol. Exp. Appl. **24**: 721-730.

TJALLINGII, W.F. (1988): Electrical recording of stylet penetration activities. – in: MINKS, A.K. & P. HARREWIJN: Aphids their biology, natural enemies and control. Elsevier Amsterdam. Vol. B: 95-108.

TJALLINGII, W. F. (2006): Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. – J. Exper. Botany **57**: 739-745.

