

Regulations-Mechanismen der Pheromon-Abgabe bei Männchen der Wüstenheuschrecke, *Schistocerca gregaria*

Anke Kießling, Karsten Seidelmann

Institut für Zoologie, M.-Luther-Universität Halle (Saale)

Abstract: Regulation mechanisms of pheromone release in males of the desert locust, *Schistocerca gregaria*.

Male desert locusts in the gregarious phase release phenylacetone nitrile (PAN) when becoming sexually mature and turning yellow. The pheromone has repellent characteristics toward conspecifics. PAN is used by males in dense populations as a courtship inhibiting pheromone to chemically enhance mate guarding. Desert locust males produce PAN only when being grouped with other mature males. After physical isolation from sexual competitors PAN release drops to zero within a few days. Synthesis and release of PAN are under neurohormonal control by a PAN Biosynthesis Activating Neuropeptide (PAN-BAN). Here we report that PAN-BAN is produced in the oesophageal and suboesophageal ganglia and transported via the haemolymph to the epidermal pheromone gland cells. The release of PAN-BAN requires the perception of visual (complex eyes) or olfactory (antenna) stimuli from other mature males. Synchronism of sexual maturation and gland cell competence to produce PAN does not depend on a factor released by the testis or accessory glands. Instead Juvenile Hormone (JH) was found to be directly or indirectly involved in the regulation of PAN biosynthesis. Increasing the JH titre by transplanting corpora allata into juvenile gregarious males triggered the pheromone release within a couple of days. Whether JH stimulates directly the PAN-BAN receptor presence or the pheromone biosynthesis enzyme apparatus of the gland cells or indirectly by a still unknown factor remains to be investigated.

Key words: endocrinological control, neuropeptide, juvenile hormone, pheromone, phenylacetone nitrile

Anke Kießling, Karsten Seidelmann, M.-Luther-Universität Halle, Institut für Zoologie, Abteilung Tierphysiologie, Domplatz 4, D-06099 Halle, E-mail: karsten.seidelmann@zoologie.uni-halle.de

Die Wüstenheuschrecke, *Schistocerca gregaria*, kommt in zwei Phasen vor, die sich morphologisch, physiologisch und ethologisch unterscheiden (UVAROV 1966, PENER & YERUSHALMI 1998). Während in der solitären Phase die Individuendichte sehr gering ist, bilden die Tiere in der gregären Phase riesige Schwärme mit mehreren Millionen Individuen. Unter den Bedingungen der stark erhöhten sexuellen Konkurrenz in der gregären Phase nutzen die Männchen zur chemischen Unterstützung der postkopulatorischen Partnerbewachung Phenylacetone nitril (PAN, syn. Benzylcyanid) als Courtship Inhibiting Pheromone und zur Eigenmarkierung als Abstinon (SEIDELMANN & FERENZ 2002). PAN wird von Epidermis-Drüsenzellen hauptsächlich der Flügel und Sprungbeine produziert und nicht gespeichert (SEIDELMANN et al. 2003). Das Pheromon wird nur von geschlechtsreifen, gregären Männchen proportional zur Abundanz sexueller Konkurrenten abgegeben (DENG et al. 1996, SEIDELMANN et al. 2000). Als sensorische Eingänge zur Detektion einer Konkurrenz-Situation könnten neben optischen und olfaktorischen Kanälen auch die Chemorezeptoren der basiconischen Sensillen an den Sprungbein-Femoris dienen. Diese sind mit Mechanorezeptoren kombiniert (CHAPMAN 1982), welche den Wechsel von solitärem zu gregärem Verhalten induzieren (SIMPSON et al. 2001) und zur Wahrnehmung der Populationsdichte dienen.

Die Bindung des Pheromons an die Geschlechtsreife (ca. 2 Wochen nach Adultschlupf) und die Anwesenheit von Paarungs-Konkurrenten deuten in Verbindung mit der fehlenden Speicherung des Pheromons auf eine Regulation der Biosynthese hin. In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Synthese von PAN einer neurohormonalen Kontrolle durch ein PAN-Biosynthese-Aktivierendes-Neuropeptid (PAN-BAN) unterliegt (SEIDELMANN & FERENZ 2003). Die Struktur des Neuropeptids konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden.

Daher sollte durch die Verwendung von Rohextrakten folgenden Fragestellungen nachgegangen werden: (a) Welche sensorischen Eingänge induzieren eine PAN-BAN-Abgabe? (b) Wo wird PAN-BAN gebildet? (c) Wird die Kompetenz zur PAN-Abgabe durch die Reifung der Geschlechtsorgane oder durch den Titer des Reifungshormons der Insekten, Juvenilhormon (JH), gesteuert?

Material und Methoden

Die für die Versuche verwendeten Wüstenheuschrecken, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera, Acrididae), stammen von Tieren ab, die 1991 in Niger gesammelt wurden. Die Heuschrecken werden in Gruppen (gregär) unter standardisierten Laborbedingungen gehalten (vgl. SEIDELMANN et al. 2000).

Der sensorische Eingang der Konkurrenten-Erkennung wurde durch gezieltes Entfernen bestimmter Sinnesorgane bzw. Sinnesfelder untersucht. Antennen (olfaktorische Rezeptoren), Palpen (Chemorezeptoren) und Sensorfelder auf den Beinen (Mechano- und Chemorezeptoren) wurden durch Ektomie ausgeschaltet. Der optische Sinn konnte durch das Abdecken der Komplexaugen mit schwarzem Lack eliminiert werden. Die behandelten Männchen wurden individuell markiert und in die Zuchtkäfige zu gregären, geschlechtsreifen Männchen zurückgesetzt. Die Bestimmung der PAN-Abgabe erfolgte nach 7 Tagen gaschromatographisch durch SPME (vgl. SEIDELMANN et al. 2003).

Für die Lokalisierung der PAN-BAN produzierenden Gewebe wurden das Oberschlundganglion (OSL) mit den optischen Loben, die Hirnanhangsdrüsen Corpora allata (CA) und Corpora cardiaca (CC), das Unterschlundganglion (USG) sowie das Bauchmark von geschlechtsreifen Männchen (15 - 20 Tage nach dem Adultschlupf) entnommen und die enthaltenen Peptide methanolisch extrahiert und durch SPE (3 ml Strata C18-Kartusche, Phenomenex) gereinigt. Die Wirksamkeit der Extrakte wurde durch Injektion in Testmännchen überprüft: Gregäre, geschlechtsreife Männchen wurden für 7 Tage zum Ausschalten der Pheromonabgabe isoliert (vgl. SEIDELMANN et al. 2000). Am 8. und 9. Tag erhielten die weiterhin isoliert gehaltenen Männchen Injektionen von je 4 Gehirnäquivalente in 10 µl Ringer. Kontrollen erhielten jeweils nur 10 µl Ringer. Am 10. Tag wurde die PAN-Abgabe mit der SPME-Methode bestimmt.

Der Einfluss der Geschlechtsorgane an der Regulation der PAN-Biosynthese wurde durch Ektomie von Hoden und/oder Anhangsdrüsen bei 4 - 5 Tage alten, unreifen Männchen geprüft. Die Wunden wurden mit Bienenwachs verschlossen und die Tiere nach individueller Markierung in die Zuchtkäfige zurückgesetzt. Die Auswertung bezog nur Tiere ein, bei denen die Ektomie der vollständigen Organe nach Abschluss des Versuches durch Obduktion nachgewiesen war.

Ein möglicher Einfluss von Juvenilhormon konnte durch Implantation von CA aus *Locusta-migratoria*-Weibchen geprüft werden. Je 4 Paar CA wurden in 200 µl Insektenringer in das Abdomen juveniler, gruppierter Tiere eingespült. Die fortlaufende JH-Synthese der implantierten *L. migratoria*-CA sollte zu einem ca. 30fach erhöhten Titer des Hormons in der Hämolymphe juveniler Tiere führen (vgl. PENER 1975). Versuchstiere wurden 2 Tage nach dem Adultschlupf wie folgt behandelt: (a) Implantation von CA, (b) Implantation von CA und tägliche Injektion von Peptid-Extrakten aus reifen Männchen (5 Gehirnäquivalente je Tier und Tag in 10 µl Ringer), (c) tägliche Injektion von Peptidextrakten, (d) Kontrolltiere, die einer Scheinoperation unterzogen wurden. Alle Versuchsgruppen wurden individuell markiert und zusammen mit älteren, geschlechtsreifen Männchen gehalten. Die Stimulation der PAN-Abgabe wurde mit der SPME-Methode nach 3 - 4 und 5 - 7 Tagen erfasst. Die Daten verschiedener Versuchsreihen wurden auf die Mittelwerte der Kontrollen normiert.

Ergebnisse und Diskussion

Die Abgabe von PAN durch geschlechtsreife, gregäre *S. gregaria*-Männchen ist von der sensorischen Stimulation durch sexuelle Konkurrenten abhängig. Das Ausschalten des optischen oder olfaktorischen Sinnes allein beeinträchtigte die PAN-Abgabe nicht (Abb. 1). Eine deutliche Abnahme der Pheromonabgabe konnte erst verzeichnet werden, nachdem die optische und olfaktorische Reizaufnahme verhindert wurde (Mann-Whitney U-Test: $U = 0,0$, $p = 0,004$). Eine Ektomie der Sprungbeine und der Palpen zeigte keinen Effekt.

PAN-BAN konnte im OSG und USG nachgewiesen werden. Das USG enthielt mit 68% den Hauptteil der Aktivität. Ob sich die neurosekretorischen Zellen entsprechend der gefundenen Neuropeptidmengen auf beide Nervenzentren verteilen, oder in einem von beiden nur eine Speicherung erfolgt, konnte bislang nicht geklärt werden. In den CC und CA wurde kein PAN-BAN nachgewiesen, ebenso nicht in den Ganglien und Konnektiven des Bauchmarks. Der letzte Befund spricht dafür, dass PAN-BAN direkt an die Hämolymphe abgegeben und nicht über das Nervensystem transportiert wird.

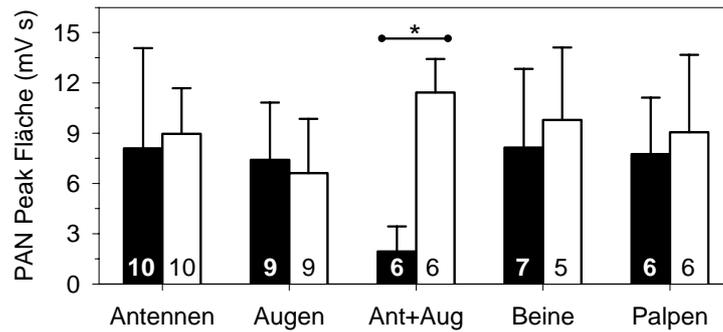


Abb. 1: Einfluss der Ektomie von Sinnesorganen oder Beinen reifer, gregärer *S. gregaria*-Männchen auf die PAN-Abgabe in Gegenwart von reifen Männchen. Messung jeweils am 7. Tag nach der Behandlung. Schwarze Balken: ektomierte Tiere, weiße Balken: unbehandelte Kontrollen, Ziffern in Balken: Wiederholungen, signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu den Kontrollen sind durch (*) markiert.

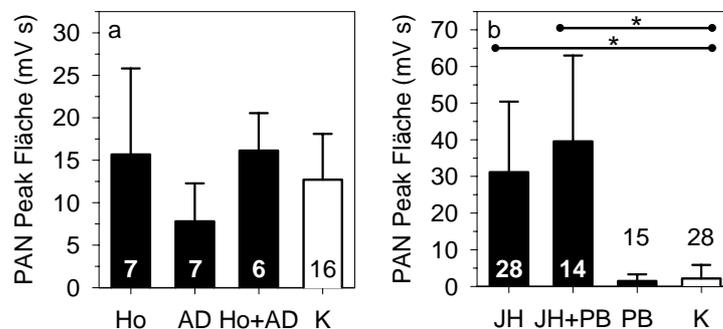


Abb. 2: Steuerung der Kompetenz zur PAN-Biosynthese durch die Geschlechtsreife. (a) Beteiligung der Geschlechtsorgane: Ektomie von Hoden (Ho) und/oder Anhangsdrüsen (AD) nach dem Adultschlupf; PAN-Messung an den reifen Männchen 2 Wochen später. (b) Beteiligung von JH: Implantation von CA (JH) und/oder tägliche Injektion von PAN-BAN (PB) in junge, unreife Männchen; PAN-Messungen 5 - 7 Tage nach Gruppierung mit älteren, geschlechtsreifen Männchen. Schwarze Balken: Behandlung, weiße Balken: Kontrollen, Ziffern in Balken: Wiederholungen, signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu den Kontrollen sind durch (*) markiert.

PAN-BAN ist bereits in den Gehirnen juveniler, gregärer Männchen vorhanden (unveröff. Ergebnisse). Diese Männchen geben jedoch noch kein PAN ab (SEIDELMANN et al. 2000). Auch durch die Injektion von PAN-BAN in die Hämolymphe kann die PAN-Biosynthese nicht stimuliert werden (Abb. 2b; univariate Varianz-Analyse: $F = 34,626$, $p < 0,001$; Scheffé-Test: $p = 0,999$). Daraus folgt, dass ein zu geringer Titer von PAN-BAN in der Hämolymphe für die fehlende Pheromon-Abgabe nicht allein verantwortlich ist. Es muss einen Faktor geben, der die Drüsenzellen zur Pheromonbildung kompetent macht oder als Co-Faktor am PAN-BAN-Rezeptor wirkt. Männchen, denen nach dem Adultschlupf Hoden- und/oder Anhangsdrüsen ektomiert wurden, gaben jedoch später im Alter geschlechtsreifer Tiere PAN in vergleichbaren Mengen wie die Kontrolltiere ab (Abb. 2a; univariate Varianz-Analyse: $F = 2,519$, $p = 0,076$; Scheffé-Test: alle $p \geq 0,409$). Ein die PAN-Biosynthese stimulierender Faktor aus den Sexualorganen kann somit ausgeschlossen werden.

Die Geschlechtsreife wird bei Insektenmännchen durch JH gesteuert (NIJHOUT 1994). Die Erhöhung der abgegebenen Menge PAN reifender gruppiertes *S. gregaria*-Männchen korreliert mit einem ansteigenden JH-Titer (TAWFIK et al. 2000). Durch die drastische Erhöhung des JH-Titers wurde daher geprüft, ob sich in juvenilen Männchen die PAN-Abgabe durch das Reifungshormon anschalten lässt. Keine Versuchsgruppe wies 3 - 4 Tage nach der Implantation eine Erhöhung der abgegebenen PAN-Menge auf (univariate Varianz-Analyse: $F = 1,452$, $p = 0,239$; Scheffé-Test: alle $p \geq 0,552$). Nach 5 - 6 Tagen zeigten die Testtiere mit CA-Implantaten eine höhere

PAN-Abgabe als die scheinoperierten Kontrolltiere (Abb. 2b; Scheffé-Test: $p < 0,001$). Eine gleichzeitige Injektion von PAN-BAN konnte die abgegebene Pheromon-Menge noch etwas steigern, führte jedoch nicht zu einer signifikanten Erhöhung (Scheffé-Test: $p = 0,386$). Korrelierend mit der gesteigerten PAN-Abgabe wurde in den beiden JH-behandelten Versuchsgruppen das Einsetzen der für reife Männchen typischen Gelbfärbung beobachtet. Eine alleinige Co-Faktor-Funktion von JH am PAN-BAN-Rezeptor oder bei der PAN-Biosynthese kann aufgrund der verhältnismäßig langen Zeitdauer bis zum Start der PAN-Abgabe nicht belegt werden. RAFAELI et al. (2003) wiesen bei *Helicoverpa armigera* eine wesentlich schnellere Reaktion (1 - 2 Tage) auf JH-Gaben nach und zeigten eine Beteiligung von JH bei der Synthese des Rezeptor-Proteins für PBAN (pheromone biosynthesis activating neuropeptide) in den Drüsenzellen. Eine Steuerung der Kompetenz zur Pheromon-Bildung ist bei *S. gregaria* auch durch eine JH-abhängige Regulation der Enzyme für die Biosynthese oder eine indirekte Wirkung von JH über einen noch unbekanntem Releasing-Faktor denkbar. Die vorliegenden Befunde lassen ebenfalls keine Aussage über eine JH-abhängige Regulation der PAN-BAN-Ausschüttung aus den neurosekretorischen Zellen zu. Es ist noch unklar, ob bereits juvenile Tiere einen erhöhten PAN-BAN-Titer bei Anwesenheit von geschlechtsreifen Männchen aufweisen. Genauere Untersuchungen zur Rolle von JH bei der PAN-Biosynthese werden erst durch Bestimmung des PAN-BAN-Titers in der Hämolymphe nach der Strukturaufklärung des Neuropeptids möglich sein.

Dank

Wir möchten Frau S. HERTEL für die technische Unterstützung der Arbeiten, Herrn Prof. H.-J. FERENZ für anregende Diskussionen und Herrn A. REINECKE für konstruktive Kritik am Manuskript danken. Das Projekt wurde durch die DFG (SE 1043/1-2) gefördert.

Literatur

- CHAPMAN, R.F., (1982): Chemoreception: The significance of receptor numbers. – Adv. Ins. Physiol. 16: 247-333.
- DENG, A.L., TORTO, B., HASSANALI, A. & ALI, E.E. (1996): Effects of shifting to crowded or solitary conditions on pheromone release and morphometrics of the desert locust *Schistocerca gregaria*. – J. Insect Physiol. 42: 771-776.
- NIJHOUT, H.F. (1994): Insect hormones. - Princeton University Press, Princeton, New Jersey: 267 pp.
- PENER, M.P. (1975): The differential effect of the corpora allata on male sexual behaviour in crowded and isolated adults of *Locusta migratoria migratorioides*. - Acrida 5: 189-206.
- PENER, M.P. & YERUSHALMI, Y. (1998): The physiology of locust phase polymorphism: an update. – J. Insect Physiol. 44: 365-377.
- RAFAELI, A., ZAKHAROVA, T., LAPSKER, Z. & JURENKA, R.A. (2003): The identification of an age- and female-specific putative PBAN membrane-receptor protein in pheromone glands of *Helicoverpa armigera*: Possible up-regulation by Juvenile Hormone. - Insect Bioch. Molec. Biol. 33(3): 371-380.
- SIMPSON, S.J., DESPLAND, E., HÄGELE, B.F. & DODGSON, T. (2001): Gregarious behavior in desert locusts is evoked by touching their back legs. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 3895-3897.
- SEIDELMANN, K., LUBER, K. & FERENZ, H.-J. (2000): Analysis of release and role of benzyl cyanide in male desert locusts, *Schistocerca gregaria*. - J. Chem. Ecol. 26(8): 1897-1910.
- SEIDELMANN, K. & FERENZ, H.-J. (2002): Courtship inhibition pheromone in desert locusts, *Schistocerca gregaria*. - J. Insect Physiol. 48: 991-996.
- SEIDELMANN, K. & FERENZ, H.-J. (2003): Neurohormonal control of the courtship inhibition pheromone in desert locusts, *Schistocerca gregaria*. - Entomologentagung Halle (DGaE), Abstracts: 304.
- SEIDELMANN, K., WEINERT, H. & FERENZ, H.-J. (2003): Wings and legs are production sites for the desert locust courtship-inhibition pheromone, phenylacetone nitrile. - J. Insect Physiol. 49: 1125-1133.
- TAWFIK, A.I., TREIBLMAYR, K., HASSANALI, A. & OSIR, E.O. (2000): Time-course haemolymph juvenile hormone titres in solitary and gregarious adults of *Schistocerca gregaria*, and their relation to pheromone emission, CA volumetric changes and oocyte growth. – J. Insect Physiol. 46: 1143-1150.
- UVAROV, B.P. (1966): Grasshoppers and Locusts, Vol. 1. – Cambridge University Press, London.