

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Botanik

Ernährungsphysiologische Aspekte xylophager
Bockkäferlarven (*Coleoptera: Cerambycidae*)

Sebastian Grünwald

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Liebl

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Höll
2. Univ.-Prof. Dr. R. Schopf

Die Dissertation wurde am 08.06.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 18.08.2009 angenommen.

Felix, qui potuit rerum cognoscere causas...

VERGIL, Georgica 2: 490

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
I Einleitung	1
1. Holz: Ein Roh- und Werksstoff	1
1. Holz botanisch und chemisch	2
2. Holz als Nahrungsquelle für Insekten	3
3. Xylophage Insekten und ihre wirtschaftliche Bedeutung	5
4. Ernährungsstrategien xylophager Insekten: Symbiose	6
5. Die Myzeto-Symbiose der Bockkäfer	9
6. Mögliche Funktionen der Cerambyciden-Symbionten	10
7. Ziele der Arbeit	12
II Material und Methoden	13
1. Organismen	13
1.1. Auswahl der Bockkäferarten	13
1.2. Herkunft, Haltung und Behandlung der untersuchten Larven	13
2. Untersuchung der Darm-Mikroflora	14
2.1. PCR-basierte rRNA-Genbanken	14
2.1.1. Bakterienspezifische 16S-rRNA-Genbanken bei <i>R. inquisitor</i> , <i>L. rubra</i> , <i>T. castaneum</i> und <i>P. arcuatus</i>	14
2.1.2. 16S-rRNA-Genbanken bei <i>Hylotrupes bajulus</i>	16
2.1.3. Pilzspezifische 18S-rRNA-Genbanken bei <i>Hylotrupes bajulus</i>	17
2.2. Kultivierungsversuche	20
2.3. FISH - Fluoreszenz in situ Hybridisierung	21
2.3.1. Entwicklung und Evaluation pilzspezifischer Oligonucleotidsonden ..	21
2.3.2. Entwicklung und Evaluation stammspezifischer Oligonucleotid-Sonden	23
2.3.3. Präparation, Einbettung und Schneiden der Verdauungssysteme	24
2.3.4. Hybridisierung und Mikroskopie	25
2.4. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung des Darmes von Hausbocklarven	26
3. Untersuchungen zu Abbau und Verwertung von Kohlenhydraten	27

3.1.	In situ-Freisetzung löslicher Saccharide im Larvendarm.....	27
3.2.	In vitro-Verdau authentischer Kohlenhydrate.....	28
3.3.	In vitro-Spaltung chromogener Zucker-Analoga.....	31
III	Ergebnisse.....	33
1.	Morphologie des Cerambyciden-Darmsystems.....	33
1.1.	Grundlegender Aufbau.....	33
1.2.	Vorkommen und Morphologie von Myzetomen.....	35
2.	PCR-basierte rRNA-Genbanken.....	37
2.1.	Bakterielle Darmflora bei Larven von <i>R. inquisitor</i> , <i>L. rubra</i> , <i>T. castaneum</i> und <i>P. arcuatus</i>	37
2.2.	Bakterielle Darmflora bei Larven von <i>Hylotrupes bajulus</i>	39
2.2.1.	Serie 1.....	39
2.2.2.	Serie 2.....	41
2.3.	Pilze im Verdauungstrakt von <i>Hylotrupes bajulus</i>	42
3.	Kultivierungsversuche.....	43
3.1.	Kultivierungsversuche der Darminhalte von <i>R. inquisitor</i> , <i>L. rubra</i> und <i>T.</i> <i>castaneum</i>	43
3.2.	Kultivierungsversuche des Darminhaltes von <i>Hylotrupes bajulus</i> -Larven..	47
4.	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierungen (FISH).....	48
4.1.	Evaluation der pilzspezifischen Oligonucleotidsonden PF326 und PF1200	48
4.2.	Pilzliche Symbionten in Darmsystem und Myzetomen.....	53
4.2.1.	<i>Rhagium inquisitor</i>	53
4.2.2.	<i>Leptura rubra</i>	56
4.2.3.	<i>Tetropium castaneum</i>	58
4.2.4.	<i>Plagionotus arcuatus</i> und <i>Hylotrupes bajulus</i>	62
4.3.	Bakterien im Larvendarm von Cerambyciden.....	62
4.3.1.	<i>Rhagium inquisitor</i> und <i>Plagionotus arcuatus</i>	62
4.3.2.	<i>Tetropium castaneum</i>	63
4.3.3.	<i>Leptura rubra</i> und <i>Hylotrupes bajulus</i>	66
5.	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen am Darm von Hausbocklarven	67
6.	Spaltung von Kohlenhydraten im Larvendarm.....	69
6.1.	Lösliche Saccharide im Larvendarm.....	69
6.1.1.	<i>Leptura rubra</i>	70

6.1.2.	Hylotrupes bajulus	73
6.1.3.	Rhagium inquisitor und Tetropium castaneum.....	74
6.2.	In vitro-Verdau authentischer Kohlenhydrate.....	75
6.2.1.	Leptura rubra.....	75
6.2.2.	Rhagium inquisitor	80
6.2.3.	Tetropium castaneum.....	84
6.2.4.	Hylotrupes bajulus	88
6.3.	In vitro-Spaltung chromogener Zucker-Analoga	92
6.3.1.	Leptura rubra.....	92
6.3.2.	Rhagium inquisitor	93
6.3.3.	Tetropium castaneum.....	94
6.3.4.	Hylotrupes bajulus	95
IV	Diskussion	97
1.	Morphologie des Larvendarms und der Myzetome.....	97
2.	Transiente Mikroorganismen im Verdauungssystem der Cerambycidenlarven	101
3.	Carbohydrasen des larvalen Cerambycidendarms.....	109
	Zusammenfassung	120
	Literatur	123
	Danksagung	137

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung II.1: Struktur des eukaryontischen rRNA-Genes (Ausschnitt).....	19
Abbildung II.2: Anregungs- und Fluoreszenzspektren der verwendeten Fluorochrome.	22
Abbildung II.3: Einbettung des Larvendarms.	24
Abbildung III.1: Morphologie des Cerambycidendarms am Beispiel des Rothalsbocks <i>Leptura rubra</i>	34
Abbildung III.2: Morphologie des Darmtraktes weiterer Cerambyciden.	36
Abbildung III.3: Phylogenetische Position der Hefe-Isolate aus <i>Rhagium inquisitor</i> , <i>Leptura rubra</i> , <i>Tetropium castaneum</i> und <i>Plagionotus arcuatus</i>	46
Abbildung III.4: Mikrobewachstum in ausplattiertem Darminhalt.	47
Abbildung III.5: In silico-Analyse der 18S-rRNA-Oligonucleotidsonde PF326.	48
Abbildung III.6: In silico-Analyse der Oligonucleotidsonde PF1200.	50
Abbildung III.7: Spezifität der verwendeten 18S-Oligonucleotidsonden.	52
Abbildung III.8: Junge Myzetomgruppe am vorderen Mitteldarm einer <i>Rhagium</i> <i>inquisitor</i> -Larve.	53
Abbildung III.9: Voll entwickelte Myzetomgruppe am vorderen Mitteldarm einer <i>Rhagium inquisitor</i> -Larve.	54
Abbildung III.10: Längsschnitte durch das Verdauungssystem einer <i>Leptura rubra</i> - Larve.	57
Abbildung III.11: Mehrere mögliche Myzetomsymbionten in einer Larve von <i>Leptura</i> <i>rubra</i>	58
Abbildung III.12: Fluoreszenz in situ Hybridisierung eines Einzelmyzetoms am vorderen Mitteldarm einer <i>Tetropium castaneum</i> -Larve.	59
Abbildung III.13: Längsschnitte durch eine Myzetomgruppe einer <i>Tetropium</i> <i>castaneum</i> -Larve.	60
Abbildung III.14: Bakterien im Darminhalt zweier Cerambycidenlarven.	63
Abbildung III.15: Bakterien in Epithelzellen des vorderen Mitteldarms bei <i>Tetropium</i> <i>castaneum</i>	63
Abbildung III.16: Identifikation des bakteriellen <i>Tetropium castaneum</i> - Endocytobionten.	65
Abbildung III.17: Phylogenetische Position des bakteriellen Endocytobionten von <i>Tetropium castaneum</i>	66

Abbildung III.18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des larvalen Verdauungssystems von <i>Hylotrupes bajulus</i>	69
Abbildung III.19: Mono- und Oligosaccharide in Nahrung, verschiedenen Darmabschnitten und Kot der Larven von <i>Leptura rubra</i>	70
Abbildung III.20: Lösliche Saccharide in Epithel und Darminhalt des vorderen Mitteldarms von <i>Leptura rubra</i> -Larven.	72
Abbildung III.21: Mono- und Oligosaccharide in Nahrungsholz, verschiedenen Darmabschnitten und Kot von <i>Hylotrupes bajulus</i> -Larven.....	74
Abbildung III.22: <i>In vitro</i> -Verdau verschiedener Kohlenhydrate durch Darmextrakt aus <i>Leptura rubra</i> -Larven.	79
Abbildung III.23 <i>In vitro</i> -Verdau verschiedener Kohlenhydrate durch Darmextrakt aus <i>Rhagium inquisitor</i> -Larven.....	83
Abbildung III.24 <i>In vitro</i> -Verdau verschiedener Kohlenhydrate durch Darmextrakt aus <i>Tetropium castaneum</i> -Larven.....	87
Abbildung III.25 <i>In vitro</i> -Verdau verschiedener Kohlenhydrate durch Darmextrakt aus <i>Hylotrupes bajulus</i> -Larven.....	91
Abbildung III.26: Exo-Glucosidase-Aktivitäten des Darmextraktes dreier Larven des Rothalsbocks <i>Leptura rubra</i>	92
Abbildung III.27: Exo-Glucosidase-Aktivitäten des Darmextraktes dreier Larven des Zangenbocks <i>Rhagium inquisitor</i>	93
Abbildung III.28: Exo-Glucosidase-Aktivitäten des Darmextraktes dreier Larven des braunen Fichtensplintbocks <i>Tetropium castaneum</i>	95
Abbildung III.29: Exo-Glucosidase-Aktivitäten des Darmextraktes dreier Larven des Hausbocks <i>Hylotrupes bajulus</i>	96

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle II.1: PCR-Primer zur spezifischen Amplifikation pilzlicher rRNA-Gene.	18
Tabelle II.2: Sequenz und Zielorganismen der verwendeten Oligonucleotidsonden....	26
Tabelle II.3: Zusammensetzung und Nachbehandlung der verwendeten Sprühreagenzien	28
Tabelle II.4: Struktur und Herkunft authentischer Kohlenhydrate.	30
Tabelle III.1: Bakterielle Darmflora verschiedener Cerambyciden-Larven.	39
Tabelle III.2: Bakterielle Darmflora von <i>Hylotrupes bajulus</i> -Larven, Serie 1.....	40
Tabelle III.3: Bakterielle Darmflora von <i>Hylotrupes bajulus</i> -Larven, Serie 2.....	41
Tabelle III.4: PCR-basierte Suche nach Pilzen im Verdauungstrakt von <i>Hylotrupes bajulus</i> -Larven.....	42
Tabelle III.5: Kultivierbare Bakterien- und Pilzflora in verschiedenen Bockkäferlarven.	44

I EINLEITUNG

1. Holz: Ein Roh- und Werkstoff

Holz ist der älteste und zugleich wichtigste Roh- und Werkstoff der Menschheit. Der weltweite Einschlag an Rundholz betrug nach Angaben der FAO (*Food and agriculture organisation of the United Nations*) [<http://faostat.fao.org>] im Jahr 2006 rund 3,54 Mrd. m³. Davon dienten etwa 1,67 Mrd. m³ als Rohstoff für die industrielle Verarbeitung, während die übrigen rund 1,87 Mrd. m³ zur Energiegewinnung eingesetzt wurden. Nach wie vor übersteigt damit die globale Holzproduktion die Menge anderer Rohstoffe wie z.B. Stahl (1,13 Mrd. Tonnen). Angesichts der rasant fortschreitenden Verknappung fossiler Energieträger und des weltweit steigenden Bedarfs an nachwachsenden Rohstoffen kommt den Waldgebieten der Erde eine wachsende Bedeutung zu. Das von Bäumen produzierte Holz wird als der zukunftsfähigste Rohstoff des 21. Jahrhunderts betrachtet. Den Bestandteilen des Holzes wird ein hohes Potential eingeräumt, die fossilen Kohlenwasserstoffe auch als Rohstoff für die chemische Industrie in signifikanter Menge zu ergänzen. Die rasant gestiegene Nachfrage nach Holz läßt sich bereits jetzt nur auf Kosten tropischer und borealer Naturwälder sowie durch Intensivkulturen in den gemäßigten Zonen der Erde bedienen. Auch unter ökologischen Gesichtspunkten rücken Wälder verstärkt ins öffentliche Bewußtsein. Mehr denn je wird die unmittelbare Bedeutung der Wälder als *sink* für das Treibhausgas CO₂, als Quelle genetischer Ressourcen und damit auch als schützenswerte Biosphäre wahrgenommen. Eine der Herausforderungen des 21. Jahrhunderts wird daher sein, den Fortbestand der Waldgebiete trotz intensiver Nutzung zu gewährleisten. Als Naturstoff ist Holz einer Vielzahl abiotischer und biotischer Schadfaktoren ausgesetzt. Hierbei sind holzbrütende Insekten bedeutsam, die besonders in Monokulturen zu gravierenden wirtschaftlichen Einbußen führen können. Die momentane Erwärmung des Klimas, die ohnehin viele bestehende Wälder belastet, begünstigt zudem die Entwicklung vieler bekannter Schadinsekten, wie der Borken- und Bockkäfer [LOGAN&POWELL, 2001]. Während des 20. und 21. Jahrhunderts wurden darüber hinaus etliche Insektenarten in neue Areale verschleppt, wo sie sich ausgebreitet und erhebliche ökonomische Schäden verursacht haben [ALLISON et al., 2004]. Bekannte Beispiele hierfür sind der Waldgärtner *Tomicus piniperda* in den USA [HOEBEKE, 1994; HAACK&POLAND, 2001] und der asiatische Laubholzbock *Anoplophora glabripennis* [SCHMIDT&SCHMIDT,

1990; NOWAK et al., 2001]. Ein umfassendes Verständnis der Ökologie und Ernährungsphysiologie dieser Baumschädlinge ist eine notwendige Voraussetzung zu deren Kontrolle.

1. Holz botanisch und chemisch

Als Holz bezeichnet man das sekundäre Xylem, das im Zuge des sekundären Dickenwachstums vom Kambium der Samenpflanzen erzeugt wird. Das Kambium ist ein Folgeremistem. Es entwickelt sich zwischen dem Phloem- und Xylemanteil der primären Leitbündel und erzeugt nach innen hin Holzzellen, nach außen hin Bast (sekundäres Phloem). Kein Holz im botanischen Sinne ist der Stamm der Palmen, der seine endgültige Stärke bereits während des primären Dickenwachstums erreicht und nicht aus einem Kambium hervorgeht. Die wesentliche Funktion des Holzes besteht in der Festigung, der Wasserleitung und der Reservestoffspeicherung [HÖLL, 2000].

Holz besteht zum größten Teil (ca. 75 % Trockengewicht) aus Strukturkohlenhydraten (Cellulose und Hemicellulose) und nur einem geringen Anteil (1-4 % Trockengewicht) aus Speicherkohlenhydraten. Der Celluloseanteil verschiedener Hölzer liegt im Mittel bei ca. 43 %. Während Cellulose ein chemisch vergleichsweise einheitliches und stets unverzweigtes Homopolymer von β -1 \rightarrow 4-glycosidisch verbundener Glucose ist, kann die Zusammensetzung der Hemicellulosefraktion stark variieren. Sie ist abhängig von Pflanzenart und Gewebetyp. So können selbst innerhalb einer Pflanze verschiedenste Moleküle vorkommen, die sich in ihren Monomeren, der Art der Verknüpfung und in Art und Grad ihrer Verzweigungen unterscheiden. Hemicellulosen werden nach ihren Hauptbestandteilen eingeteilt in Glucane, Mannane, Xylane, Arabinane und Galactane. Die meisten natürlichen Hemicellulosen tragen typische Verzweigungen und Substituenten, die regelmäßig oder auch ohne feste Gesetzmäßigkeiten in den Polymeren auftreten. Man unterscheidet hier Xyloglucane, Arabino- und Methylglucuronoxylane, Glucomannane, Galactomannane und Arabinogalactane. Hemicellulosen können darüber hinaus sowohl an der Hauptkette wie auch an den Seitengruppen methyliert und/oder acetyliert sein [TIMELL, 1965; KATO, 1981].

Der Aufbau und die Zusammensetzung der Hemicellulosen ist typisch für verschiedene Pflanzengruppen und daher neben den Sekundärstoffen ein chemisches Charakteristikum für verschiedene Holzarten. So beinhaltet das Holz der Gymnospermen hauptsächlich Mannane und Glucomannane (20-25 % des

Trockengewichts), sowie Arabino- und Methylglucuronoxylan. Einen Spezialfall innerhalb der Nadelbäume stellen die Lärchen (*Larix spec.*) dar, deren Holz hohe Anteile (10-25 % Trockengewicht) eines komplex gebauten Arabinogalactans aufweist [TIMELL, 1965].

Angiospermenholz enthält dagegen hauptsächlich Methylglucuronoxylan (20-35 % Trockengewicht), das im Gegensatz zum Gymnospermenxylan in einem hohen Maß acetyliert ist. In wesentlich geringeren Anteilen (3-5 % Trockengewicht) findet sich Glucomannan. Das Holz sowohl der Gymnospermen wie auch der Angiospermen weist darüber hinaus verschiedene weitere Hemicellulosen in wechselnden quantitativ geringeren Anteilen auf, deren Vorkommen oft auf bestimmte Pflanzenteile (z.B. Reaktionsholz oder Wurzelholz) beschränkt ist.

Neben den Polysacchariden ist Lignin mit ca. 20-30 % TG ein wesentlicher und typischer Bestandteil verholzten Gewebes. Lignin ist ein dreidimensionales Polymer aus Phenylpropanen (Cumaryl-, Feruloyl- und Sinapylalkohol), das beim Verholungsprozess in die Zellwände einpolymerisiert wird. Die als Glucose-Konjugate in den Apoplasten transportierten Monomere werden dort freigesetzt und in einem radikalischen Prozeß kovalent verknüpft. Die vielfältigen Bindungen im resultierenden Ligninpolymer und die Energiearmut der aromatischen Bausteine machen das Lignin zu einem außerordentlich stabilen und gegen enzymatischen Abbau weitgehend widerstandsfähigen Bestandteil verholzter Zellen. Spezialisierte Vertreter der Höheren Pilze (*Ascomycota* und *Basidiomycota*) sind in der Lage diese Holzkomponente effektiv abzubauen.

2. Holz als Nahrungsquelle für Insekten

Bereits in den Farnwäldern des Karbons (300 Mio. Jahre) waren zahllose Insekten mit den überwiegend holzigen Landpflanzen vergesellschaftet. Holz dürfte daher bereits lange vor Blüten und Früchten eine Nahrungsquelle für Insekten gewesen sein. Trotz einer langen Coevolution haben jedoch nur wenige Taxa der Insekten die Fähigkeit erlangt, Holz direkt zu verwerten.

Gemessen an Blättern und krautigen Pflanzenteilen ist Holz ein vergleichsweise karges Substrat. Als weitgehend totes Gewebe enthält es anteilmäßig geringe Mengen an leicht verfügbaren Speicherstoffen. Diese Speicherstoffe (in erster Linie Stärke, lösliche Zucker und Fette) dienen dem Baum zu Zeiten des Bedarfs als Baumaterial z.B. für die

Bildung neuer Blätter im Frühjahr. Innerhalb verholzter Achsen enthält der periphere Teil, das so genannte Splintholz bis zu 10% lebendes Gewebe [HAACK & SLANSKY, 1987; HILLIS, 1987; HÖLL, 2000]. Hier findet sich auch der höchste Anteil an Reservesubstanzen im Holzkörper eines Baumes. Nadel- und Laubhölzer unterscheiden sich qualitativ und quantitativ in der Natur ihrer Reservesubstanzen. Einige Xylophage wie die Splintkäfer (*Lyctidae*), die sich auf die Verwertung von Stärke spezialisiert haben, sind infolgedessen auf Splintholz beschränkt und bevorzugen Laubhölzer, die einen tendenziell höheren Stärkegehalt aufweisen als Nadelhölzer. Im toten Kernholz sowie in natürlich abgetrocknetem Holz sind diese Komponenten dagegen praktisch verschwunden [HÖLL et al., 2002]. Die stark verholzten Sekundärwände der Holzzellen sind zwar reich an Kohlenhydraten, widerstehen jedoch weitgehend einem enzymatischen Angriff [SCHWARZ, 2001]. Der vollständige Abbau intakter, kristalliner Cellulose erfordert die synergistische Wirkung mehrerer spezialisierter Enzyme (Endo- β -1 \rightarrow 4-Glucanasen, Exo- β -1 \rightarrow 4-Glucanasen und Cellobiohydrolasen) [MARTIN, 1983] und ist darüber hinaus ein langsam verlaufender Prozeß. Einen vollständigen Satz cellulolytischer Enzyme weisen einige Prokaryonten (z.B. Clostridien) und Höhere Pilze (Braun- und Weißfäuleerreger) auf. Celluloseabbau wird auch xylophagen Insekten zugeschrieben [MANSOUR, 1934; MÜLLER, 1934; SCHLOTTKE & BECKER, 1942; SCHLOTTKE, 1945; CHARARAS et al., 1983; CAZEMIER, 1997].

Der geringe Anteil an verwertbaren Stickstoffverbindungen in der Holznahrung kann als limitierend für die Entwicklung xylophager Insekten angesehen werden. Bei einem C/N-Verhältnis von etwa 400/1 [POTRIKUS & BREZNAK, 1981] enthält Holz im Durchschnitt lediglich 0,03-0,1 % Gesamtstickstoff [ADELSBERGER, 1975; ADELSBERGER & PETROWITZ, 1976], der wiederum nur zum Teil als Proteinstickstoff vorliegt. So ist die Entwicklung der Larven des Hausbocks *Hylotrupes bajulus* an einen Minimalgehalt Protein-Stickstoffs gebunden. Mehrere Jahrzehnte lang gelagertes Holz ist weitgehend proteinfrei und wird vom Hausbock daher kaum noch befallen [ADELSBERGER & PETROWITZ, 1976]. Larven des Hausbocks bzw. der ebenfalls xylophagen Nagekäfer (*Anobiidae*) zeigen dagegen eine deutlich beschleunigte Entwicklung in Hölzern, die zuvor mit Pepton angereichert wurden [BECKER, 1938, BECKER, 1963].

Der Stickstoffgehalt zeigt einen Gradienten vom peripheren zum zentralen Teil eines Baumstammes. Der kambiumnahe Bereich des Splintholzes ist vergleichsweise stickstoffreich (1-5% TG) und daher eine der bevorzugten Fraßzonen vieler Arten,

gefolgt vom älteren Splintholz (0,05-0,3% TG) [HAACK&SLANSKY, 1987]. Totes Kernholz hingegen wird nur von wenigen Spezialisten wie dem großen Eichenbock *Cerambyx cerdo* angegangen. Kernholz enthält überdies mehr als alle anderen Teile des Holzkörpers meist hohe Mengen toxischer Sekundärstoffe (Tannine, Stilbene, Lignane, Tropolone und Alkaloide), die eine Verwertung des Holzes weiter erschweren [HILLIS, 1987].

3. Xylophage Insekten und ihre wirtschaftliche Bedeutung

Xylophage Vertreter finden sich bei den Ordnungen der Termiten (*Isoptera*), Hautflüglern (*Hymenoptera*), Schmetterlingen (*Lepidoptera*) und Käfern (*Coleoptera*), wobei letztere den größten Formenreichtum zeigen. Innerhalb der Käfer sind die Nagekäfer (*Anobiidae*), Bohrkäfer (*Bostrychidae*), Prachtkäfer (*Buprestidae*), Bockkäfer (*Cerambycidae*), Splintholzkäfer (*Lyctidae*), Kernholzkäfer (*Platypodidae*), Werftkäfer (*Lymexilidae*) und Borkenkäfer (*Scolytidae*) vollständig oder teilweise xylophag [HAACK&SLANSKY, 1987]. Käfer sind nach Termiten die ökologisch und wirtschaftlich wichtigste Gruppe xylophager Insekten [BECKER, 1977]. Als xylophag werden hierbei nicht nur reine Xylemfresser bezeichnet, sondern alle Insekten, die sich von Teilen eines Baumstammes ernähren. Auch die vornehmlich Rinde und Kambialgewebe fressenden Borkenkäfer und viele Vertreter der Bockkäfer gelten somit als xylophag, wenngleich ihre hauptsächliche Nahrung nicht das eigentliche Holz ist.

Ein Großteil der Arten besiedelt nur saftfrisches, stehendes oder frisch gefälltes Holz. Für diese Frischholzinsekten ist der Feuchtigkeitsgehalt des Holzes entwicklungslimitierend. Ihre Larven benötigen für ihre Entwicklung einen Wassergehalt, der in der Nähe des Sättigungswertes der Cellulose liegt (ca. 23%). Sie besiedeln Baumstämme daher in einem engen Zeitfenster unmittelbar nach dem Fällen oder stehende Stämme, die im Absterben begriffen sind. Viele Frischholzinsekten können bei massenhaftem Auftreten auch vitale Bäume befallen und sie entweder direkt, oder als Vektoren diverser Pathogene zum Absterben bringen [ALLISON et al, 2004; KIRISITS, 2004]; in dieser Gruppe finden sich daher einige der wirtschaftlich bedeutsamsten Schädlinge. Viele Arten minieren während ihrer Entwicklung zwar hauptsächlich in der Kambialregion, bohren sich zur Verpuppung jedoch mit einem so genannten Hakengang in den Holzkörper ein. Sie können auf diese Weise auch bereits gefällte Stämme zu Brennholz entwerten [LINSLEY, 1958; ALLISON et al, 2004].

Gelegentlich schlüpfen Frischholzinsekten aus bereits verarbeiteten Holzteilen und schwirren dann zum Schrecken der menschlichen Bewohner in den Wohnräumen herum. Dies ist besonders spektakulär, wenn es sich hierbei um weibliche Riesenholzwespen mit einer langen Legeröhre handelt.

Spezialisten wie die Nagekäfer (*Anobiidae*), Bohrkäfer (*Bostrychidae*), Splintholzkäfer (*Lyctidae*), und der Hausbock *Hylotrupes bajulus* vermögen aufgrund besonderer Anpassungen auch werktrockenes und in Innenräumen verbautes Holz zu verwerten. Diese so genannten Trockenholzinsekten können dasselbe Nahrungsholz wiederholt befallen, sodaß oftmals mehrere Generationen neben- und hintereinander ein Möbelstück, Parkettböden oder ganze Dachstühle regelrecht „verzehren“. Von den Hölzern bleiben bei anhaltendem Befall nur eine dünne Außenhülle und eine große Menge an Bohrmehl übrig. Vertreter dieser Gruppe sind daher bedeutende Schädlinge an verbautem Holz, Möbelstücken und Kunstgegenständen.

Totholzinsekten wie der Mulmbock *Ergates faber* ernähren sich im Gegensatz zu den vorgenannten Gruppen ausschließlich von abgestorbenem, oftmals vermodertem Holz und leisten einen ökologisch wichtigen Beitrag zum Abbau von Totholz. Sie erleichtern durch ihre Bohrtätigkeit den Eintritt von Mikroorganismen, von deren Anwesenheit sie selbst mehr oder weniger abhängig scheinen. Viele Totholzinsekten besiedeln ein Substrat nur, wenn es einen bestimmten Zersetzungsgrad erreicht hat. Sie sind meist auf bodennahe Stammteile oder liegendes Holz beschränkt, deren Feuchtigkeit durch das umgebende Erdreich sichergestellt ist. Schäden verursachen Totholzinsekten nur gelegentlich, wenn sie unzureichend imprägnierte Pfosten oder hölzerne Masten befallen.

4. Ernährungsstrategien xylophager Insekten: Symbiose

Viele xylophage Insekten leben in obligater Symbiose mit Mikroorganismen. Aufgrund der Nährstoffarmut, der Unausgewogenheit und der chemischen Beständigkeit der Holznahrung, sowie aufgrund der Lokalisation der Symbionten im oder am Verdauungssystem ist es naheliegend, daß diese Symbiosen vor allem ernährungsphysiologischen Zwecken dienen. Die Abhängigkeit des Wirts von den Leistungen der Symbionten ist oftmals derart ausgeprägt, daß aposymbiontische Tiere trotz fortwährender Fraßtätigkeit ihre Entwicklung nicht abschließen können [SCHOHMANN, 1937; JURITZA, 1962, 1969, 1974; BUCHNER, 1965]. Bei einigen

phytophagen Insekten ist es sogar weniger vom Wirt, als vielmehr von den Symbionten abhängig, ob eine Nahrungsquelle verwertet werden kann oder nicht [HOSOKAWA et al., 2007]. Niedere Termiten, die weltweit bedeutendsten Holzzerstörer, verdanken ihre Fähigkeit zum Celluloseabbau einer komplexen Gemeinschaft von Mikroorganismen in ihrem Hinterdarm [HONIGBERG, 1970; BREZNAK&BRUNE, 1994; INOUE et al., 1997]. Bei etlichen weiteren Insektenordnungen besteht die Vermutung, daß die Symbionten ebenfalls an der Verwertung der Holz-Polysaccharide beteiligt sind, obwohl einige der Symbionten in Kultur allerdings keine Cellulose zu spalten vermögen. Symbiosen finden sich darüber hinaus auch bei Frischholzinsekten, die ihren Bedarf an Kohlenhydraten nicht aus Cellulose, sondern aus Reservestoffen des Wirtsbaumes decken können. Die Funktion der Mikroorganismen könnte nicht primär in der Verwertung der Strukturkohlenhydrate zu suchen sein. So scheinen die Symbionten von Termiten (*Isoptera*) und Anobiiden in den Stickstoffhaushalt einzugreifen, indem sie Stickstoffverbindungen für ihren Wirt aufbereiten [POTRIKUS&BREZNAK, 1981; ISHIKAWA, 2003; JURZITZA, 1972]. *Dendroctonus frontalis*, ein Vertreter der Borkenkäfer, benötigt weniger Nahrung, wenn seine Gallerien mit *Ceratocystiopsis ranaculosus* und *Entomocorticium sp.* bewachsen sind, da diese Pilze den Stickstoffgehalt des Substrates anreichern [KLEPZIG&SIX, 2004]. Die Tiere besitzen auf ihrer Körperoberfläche spezielle Vertiefungen (so genannte Mycangien), in denen sie die Pilze nach dem Ausfliegen mit sich führen. Der Vorteil der Pilze liegt bei dieser Symbiose in einer verbesserten Propagation durch den Käfer. Eine direkte Fixierung von Luftstickstoff durch endosymbiontische Prokaryonten wird diskutiert [OHKUMA, 1999; BRUNE, 2003].

Die hefeartigen Symbionten einiger Anobiiden produzieren Enzyme, die die Nahrung der Käfer entgiften. [DOWD, 1989, 1992; SHEN&DOWD, 1991]. Auf diese Weise ist der mit den xylophagen Vertretern dieser Familie eng verwandte Tabakkäfer *Lasioderma serricornis* in der Lage, sich von fermentiertem Tabak (z. B. Zigarren) zu ernähren, obwohl das darin enthaltene Nikotin auch für Arthropoden ausgesprochen toxisch ist. Es wird angenommen, daß die Symbionten xylophager Insekten in vergleichbarer Weise Sekundärstoffe des Nahrungsholzes modifizieren und damit unschädlich machen [DOWD, 1992]. Eine häufig diskutierte Funktion der Symbionten betrifft die Bereitstellung von Vitaminen, Aminosäuren und Sterinen, die in der Holznahrung einen Mangelfaktor darstellen. Sterole sind wichtige Vorstufen verschiedener Hormone (inklusive des Häutungshormons Ecdyson) bei Insekten. Untersuchungen an

Borkenkäfern und Anobiiden belegen, daß eine ausreichende Zufuhr von Sterolen Voraussetzung für eine erfolgreiche Verpuppung und die Produktion entwicklungsfähiger Eier ist. Symbiontenfreie Tiere zeigen trotz erhöhter Nahrungsaufnahme und Fraßdauer keinen oder einen verminderten Entwicklungserfolg [JURZITZA, 1962, 1969, 1974; KLEPZIG&SIX, 2003; SIX, 2003; SCHOHMANN, 1937; BUCHNER, 1965].

Wenngleich unter den Symbionten verschiedene Prokaryonten (*Bacteria* und *Archaea*) und auch Flagellaten zu finden sind, scheinen xylophage Insekten besonders häufig mit Pilzen assoziiert zu sein. Die *Bostrychidae* und *Lyctidae* stellen insofern eine Ausnahme dar, als sie nach bisherigen Erkenntnissen hauptsächlich Prokaryonten beherbergen, die keine direkte Verbindung zum Verdauungstrakt der Tiere haben [MANSOUR, 1934; NARDON&GRENIER, 1989].

Allgemein bekannt für ihre Ectosymbiose sind Vertreter der Höheren Termiten (*Termitidae*), welche in unterirdischen Kammern ihres Baues Pilzgärten anlegen. Das gesamte Volk dieser staatenbildenden Insekten ernährt sich ausschließlich von der Biomasse eines spezifischen Pilzstammes, der an alle Nachfolgestaaten weitergegeben wird.

Auch die sogenannten Ambrosia-Käfer (Vertreter der *Scolytidae*, *Lymexilidae* und *Platypodidae*) und die Holzwespen (*Siricidae*) ernähren sich hauptsächlich von ectosymbiontischen Pilzen, deren Hyphen in den Bohrgängen der Tiere wachsen [GILMOURE, 1965; BUCHNER, 1965; HARRINGTON, 2005]. Bei vielen Holzwespen beherbergen die weiblichen Tiere einen symbiontischen Pilzstamm im Basalteil des Ovipositors. Bei der Eiablage wird die Umgebung des Eies gleichzeitig mit dem Symbionten beimpft, der für die Entwicklung der Larven essentiell ist. [BARBOSA&WAGNER, 1989; BUCHNER, 1965].

Aufgrund ihrer geringeren Abhängigkeit von Feuchtigkeit finden sich bei Trockenholzinsekten vorwiegend Endosymbiosen [BARBOSA&WAGNER, 1989]. So beherbergen die Larven der meisten Anobiiden während ihrer Fraßperiode hefeartige Pilze in Blindsäcken des Verdauungssystems, so genannten Myzetomen. Die Hefen vermehren sich dort intrazellulär in spezialisierten Mycetozyten, sind also Endocytobionten. Die Symbionten der Anobiiden werden durch einen hochentwickelten Mechanismus mütterlicherseits an die nächste Generation weitergegeben. Während der Metamorphose wandern die Hefen aus den teilweise degenerierenden Myzetomen in ein Reservoir am Legeapparat der Weibchen ein, wo sie sich erneut vermehren. Bei der

Passage des Reservoirs werden abgelegte Eier mit Symbionten versehen. Schlüpfende Larven infizieren sich anschließend durch die Aufnahme von Teilen der Eischale [JURZITZA, 1972].

5. Die Myzetom-Symbiose der Bockkäfer

Die weltweit verbreitete Familie der Bockkäfer (*Cerambycidae*) ist mit etwa 35 000 beschriebenen Arten die größte Gruppe xylophager Insekten [LAWRENCE, 1982]. Die Larven der Bockkäfer minieren als Frisch- Tot- oder Trockenholzinsekten in praktisch allen bekannten Holzarten und vielen Palmen. Ihre Substratspezifität ist dabei mehr oder weniger eng. Die Larvalentwicklung dauert je nach Spezies zwischen einigen Monaten und mehreren Jahren. Die Imagines nehmen aufgrund ihrer begrenzten Lebensdauer oft überhaupt keine Nahrung mehr auf oder ernähren von anderen Pflanzenteilen (Blätter, Pollen, Exsudate); sie sterben meist nach erfolgter Paarung bzw. Eiablage ab. [ALLISON et al., 2004; LINSLEY, 1959]

Im ersten Drittel des vorigen Jahrhunderts wurden erstmals hefeartige Symbionten auch im Verdauungstrakt einiger Larven von Bockkäfern beschrieben [HEITZ, 1927]. Eine umfassende Untersuchung an insgesamt 80 Bockkäferarten stammt von SCHOHMANN. [SCHOHMANN, 1937]. Hinsichtlich Morphologie und Organisation ist dies bis dato die gründlichste Studie der Cerambycidensymbiose. Die von SCHOHMANN dargestellten Verhältnisse bei Cerambyciden erinnern in vielen Gesichtspunkten an die Symbiose der Anobiiden. Auch bei den Bockkäferlarven sind die Symbionten intrazellulär in Ausstülpungen an verschiedenen Abschnitten des vorderen Mitteldarms, den bereits erwähnten Myzetomen lokalisiert, die in Anzahl und Form arttypisch sind. Die Myzetome bestehen aus einer Reihe von Myzetozyten (Wirtszellen), in denen sich die Mikroorganismen während der Fraßperiode der Larven intensiv vermehren. Bei etlichen lebend untersuchten Larven (*Leptura rubra*, *Tetropium castaneum*, *Rhagium inquisitor*, *Asemum spec.* und *Oxymirus cursor*) werden Myzetozyten oder Teile davon laufend ins Darmlumen ausgestoßen. Auch Heitz berichtet bereits über diesen Vorgang bei *Leptura rubra* [HEITZ, 1927]. Andere Autoren teilen diese Ansicht nicht [EKBLUM, 1931]. Die larvalen Myzetome der Cerambyciden degenerieren während der Metamorphose vollständig; die enthaltenen Mikroorganismen werden in den Darm abgegeben. Während sie bei männlichen Tieren mit dem Kot abgehen, vermehren sie sich bei den weiblichen erneut im Hinterdarm und wandern einige Tage nach dem Schlüpfen des

Vollkerfs in Teile des Legeapparates, die so genannten Intersegmentalschläuche bzw. Vaginaltaschen ein. Die Mikroorganismen gelangen von dort -wie bei Anobiiden- während der Eiablage auf die Eioberfläche und werden von den schlüpfenden Larven mit Teilen der Eischale ingestiert. Sie dringen schließlich aus dem Darmlumen erneut in Zellen des vorderen Mitteldarms ein, woraufhin die Ausbildung der typischen Myzetome erfolgt.

SCHOHMANN bewertet die Rolle der Hefen als mutualistisch. Er begründet dies mit der Beobachtung, daß bei *Tetropium castaneum* einerseits Eilarven noch vor der Infektion mit ihren Symbionten Anlagen eines Myzetomrings zeigen und andererseits Larven ohne Symbionten unter Laborbedingungen wesentlich schneller absterben als solche mit Hefen.

Die Aufzucht von Cerambycidenlarven unter Laborbedingungen ist aufgrund ihrer langsamen Entwicklung und der meist komplexen Nahrungsansprüche mit großen Schwierigkeiten verbunden [SCHOHMANN, 1937; JURZITZA, 1959; KUKOR&MARTIN, 1986b]. Eine erfolgreiche Zucht gelingt innerhalb der mitteleuropäischen Arten nur beim Hausbock *Hylotrupes bajulus* [BECKER, 1938; BECKER, 1963]. Es ist jedoch stattdessen möglich, die Symbionten einiger Cerambyciden in Kultur zu bringen [HEITZ, 1927; SCHIMITSCHEK, 1929; MÜLLER, 1934; BUCHNER, 1965]. Die Diskussion über potentielle Leistungen der Myzetom-Symbionten basiert auch heute noch weitgehend auf ihren Eigenschaften in Kultur.

6. Mögliche Funktionen der Cerambyciden-Symbionten

Nach heutigem Kenntnisstand besitzen im Gegensatz zu den Anobiiden nur wenige Cerambyciden eine stabile intrazelluläre Symbiose; von den 80 von Schohmann untersuchten Spezies erwiesen sich lediglich 26 als symbiontisch. Zudem sind die Symbionten stets auf das Larvenstadium beschränkt. Nicht-symbiontische Cerambycidenarten besitzen bei einem ansonsten vergleichbaren Aufbau des Verdauungssystems keine den Myzetomen homologen Blindsäcke. Der Besitz einer Myzetom-gebundenen Symbiose scheint innerhalb der Cerambycidae daher nicht von der Phylogenie des Wirts, sondern vielmehr von seiner Lebensweise abhängig zu sein. Auffallend ist, daß viele Arten eine Symbiose besitzen, deren Larven in Nadelholz und/oder Totholz leben. Arten, die lebendes Laubholz befallen, besitzen dagegen keine Myzetomsymbionten. Als Grund hierfür wird die unterschiedliche Nahrungsqualität

lebenden bzw. toten Holzes sowie Unterschiede zwischen Angiospermen- und Koniferenhölzern vermutet [SCHOHMANN, 1937].

Seit langem wird angenommen, daß die Symbionten an der Verwertung der Cellulose beteiligt sind. Die Symbionten von *Rhagium inquisitor* und *Leptura rubra* können jedoch in Kultur keine Cellulose abbauen [HEITZ, 1927; MÜLLER, 1934]. Die Vermutung, wonach die Symbionten atmosphärischen Stickstoff fixieren, konnte ebenfalls nicht bestätigt werden [MÜLLER, 1934; GRÄBNER, 1954]. Die meisten Autoren sehen die Myzetom-Symbionten der Cerambyciden daher als Lieferanten von Vitaminen und Sterolen an, da einige Symbionten in Kultur diese Komponenten produzieren. Eine entsprechende Funktion konnte für einige Symbionten der Anobiiden in Fütterungsversuchen gezeigt werden. Es ist allerdings fraglich, ob diese Befunde von Anobiiden auf Cerambyciden und innerhalb der Cerambyciden übertragbar sind. Einige Cerambycidensymbionten sind zudem selbst für einige Vitamine auxotroph [JURZITZA, 1959].

Es existieren Berichte, wonach Cerambyciden Cellulasen besitzen, die nicht von assoziierten Mikroorganismen stammen [MANSOUR, 1934; MÜLLER, 1934; SCHLOTTKE&BECKER, 1942; SCHLOTTKE, 1945; CHARARAS, 1976; MISHRA et al., 1978, 1985; CHARARAS et al., 1983;]. Die gemessenen Enzymaktivitäten variieren jedoch in weiten Grenzen und unterscheiden sich stark in Abhängigkeit von den jeweiligen Untersuchungsmethoden. Die Verwertung der Cellulose bei Cerambyciden wird daher bis heute kontrovers diskutiert. Holzwespen der Gattung *Sirex* [KUKOR&MARTIN, 1983] und mehrere Cerambycidenarten (*Monochamus marmorator* [KUKOR&MARTIN, 1986a] *Saperda calcarata* [KUKOR&MARTIN, 1986b], *Bellamira scalaris*, *Graphisurus fasciatus*, *Orthosoma brunneum*, *Parandra brunnea* [KUKOR et al., 1988] gewinnen die Fähigkeit zum Celluloseabbau über die mit der Nahrung aufgenommenen Pilze. Es wird daher diskutiert, ob womöglich der Celluloseabbau bei Cerambyciden gänzlich auf der intestinalen Mykoflora beruht [KUKOR et al., 1988; PRINS&KREULEN, 1991]. Von Belang ist in diesem Zusammenhang, die Anwesenheit spezifischer Hefestämme im Verdauungstrakt xylophager Käferlarven auch außerhalb von Myzetomen [SUH et al., 2003; SUH et al., 2005; ZHANG et al., 2003].

Generell wenig beachtet wurde bislang die Rolle von Bakterien im Verdauungsprozeß von Cerambyciden. Neuere Studien belegen, daß Larven des Lindenbocks *Saperda vestita* und des Moschusbocks *Aromia moschata* Bakterienstämme enthalten, die Cellulose abzubauen vermögen [ANDREONI et al., 1987; DELALIBERA et al., 2005]. Die

verrottende Holznahrung vieler Cerambyciden enthält zweifellos eine Fülle von Bakterien, deren Einfluß innerhalb des Larvendarms aber bislang völlig unbekannt ist. Bakterien könnten gerade bei den Bockkäfern ohne Myzetome als Darmbesiedler von Bedeutung sein.

7. Ziele der Arbeit

Die pilzliche Symbiose der Cerambyciden ist hinsichtlich der Morphologie der Wirtsorgane und der Übertragungseinrichtungen zur Weitergabe der Symbionten in ihren Grundzügen beschrieben. Weitgehend unbekannt ist der Beitrag der Symbionten im Kontext der Ernährungsphysiologie der Käferlarven. Die von verschiedenen Autoren propagierte Lieferung von Vitaminen ist sicherlich nur ein Teilaspekt der Symbiose, zumal etliche Arten auch ohne Symbiose existieren können. Ältere und neuere Untersuchungsergebnisse weisen wiederholt darauf hin, daß die Mikroben möglicherweise auch direkt an der Verwertung der Holznahrung beteiligt sind.

Die vorliegende Arbeit möchte einen Beitrag zur Klärung der Frage leisten, ob und in welcher Weise enzymatische Fähigkeiten an das Vorhandensein bestimmter Mikroorganismen geknüpft sind und/oder in wie weit die Lebensweise der Larven bestimmte Mikroorganismen erfordert. Hierzu sollen verschiedene Cerambycidenlarven mit bzw. ohne Myzetom-Symbionten auf ihre Fähigkeit zur Spaltung von Kohlenhydraten und hinsichtlich der Zusammensetzung, Dichte und Konstanz ihrer bakteriellen und pilzlichen Darm-Mikroflora untersucht werden. Mittels Kultur- und PCR-basierter rRNA-Genbanken sollen zunächst die in den Darmsystemen vorkommenden Bakterien- und Hefestämme ermittelt werden. Unter Verwendung allgemeiner und spezifischer Oligonucleotidsonden, Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie sollen Verteilung und Dichte der Mikroorganismen im Verdauungssystem dargestellt werden, um ihre Relevanz für die Verdauungsprozesse abschätzen zu können.

Bockkäferlarven eignen sich hierfür in besonderem Maße, da sie die Möglichkeit eröffnen, nah verwandte Vertreter in unterschiedlichen Ernährungssituationen vergleichend zu untersuchen.

II MATERIAL UND METHODEN

1. Organismen

1.1. Auswahl der Bockkäferarten

Im Sinne des Artenschutzes wurden für die Untersuchungen nur Cerambyciden ausgewählt, die in Zentraleuropa heimisch sind und deren Populationen nicht akut gefährdet sind.

Untersucht wurden Larven des Zangenbocks *Rhagium inquisitor*, des Rothalsbocks *Leptura rubra*, des braunen Fichtensplintbocks *Tetropium castaneum*, des Eichenwidderbocks *Plagionotus arcuatus*, sowie des Hausbocks *Hylotrupes bajulus*. Diese fünf Bockkäfer repräsentieren eine jeweils eigene ökologische Nische, insofern sie verschiedene oder -im Falle von gleichen Holzarten- verschieden stark zersetzte Hölzer besiedeln. *Rhagium*, *Tetropium* und *Plagionotus* ernähren sich von der Kambialzone und Rinde ihrer Wirtsbäume. *Tetropium*-Larven bevorzugen hierbei den noch saftfrischen Bast frisch gefällter oder im Absterben begriffener Nadelbäume (hauptsächlich Fichte und Kiefer). Larven von *Rhagium inquisitor* haben ähnliche Nahrungsansprüche und finden sich mitunter zusammen mit *Tetropium* am selben Stamm. Sie besiedeln das Substrat allerdings in der Regel deutlich später in einem stärker degradierten Zustand. *Plagionotus*-Larven befallen ausschließlich Laubbäume (hauptsächlich Eiche) im frisch gefällten oder absterbenden Zustand. Im Gegensatz dazu sind *Leptura rubra* und *Hylotrupes bajulus* reine Xylemfresser und besiedeln ausschließlich den Holzkörper von Nadelbäumen. Während *Leptura* hierbei stets feuchtes und anbrüchiges Holz aufsucht, entwickeln sich die Larven von *Hylotrupes bajulus* in werktrockenem und mitunter jahrzehntelang gelagertem Bauholz.

1.2. Herkunft, Haltung und Behandlung der untersuchten Larven

Die in dieser Arbeit untersuchten Larven von *Rhagium inquisitor*, *Tetropium castaneum* und *Leptura rubra* stammen aus verschiedenen Bereichen des Thalhauser Forsts, ca. 5 km nordwestlich von Freising-Weihenstephan. *Rhagium*- und *Tetropium*-Larven wurden unter sich ablösender Borke von Fichtenstümpfen gesammelt, *Leptura*-Larven wurden aus anbrüchigem Fichtenholz (*Picea abies*) gebrochen. Larven von *Plagionotus*

arcuatus stammen von frisch geschlagenen Eichenstämmen (*Quercus robur*) auf einem Lagerplatz im nördlichen Landkreis Freising (Gemeinde Wolfersdorf). Alle vorgenannten Arten wurden während ihrer aktiven Fraßperiode in den Monaten März bis einschließlich September gesammelt. Verpuppungsbereite Stadien, frisch gehäutete oder parasitierte Tiere, sowie Individuen mit einem leeren Verdauungssystem wurden aussortiert. Die Larven wurden während des Transports einzeln in perforierten 2ml-Reaktionsgefäßen auf Eis gelagert, um gegenseitige Verletzungen und ein streßbedingtes Entleeren des Darms zu vermeiden.

Hylotrupes bajulus-Larven wurden zum Teil aus der Zucht der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft in Hamburg bezogen, zum Teil aus natürlich befallenen Kiefern Brettern (*Pinus sylvestris*) aus dem Landkreis Freising herausgebrochen. Die Hausbocklarven wurden bei geeigneten Bedingungen (22-28 °C; 60-80 % rel. Luftfeuchte) in Klötzchen (4 x 5,5 x 6,5 cm) aus Kiefern splintholz vorrätig gehalten. Die unter Laborbedingungen ganzjährig aktiven Hausbocklarven wurden jederzeit verwendet, sofern sie normale Fraßtätigkeit zeigten.

Alle Larven wurden entweder umgehend zu Experimenten eingesetzt oder durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließende Gefriertrocknung konserviert. Gefriergetrocknete Larven wurden in Exsikkatoren über Blaugel gelagert.

2. Untersuchung der Darm-Mikroflora

2.1. PCR-basierte rRNA-Genbanken

2.1.1. Bakterienspezifische 16S-rRNA-Genbanken bei *R. inquisitor*, *L. rubra*, *T. castaneum* und *P. arcuatus*

Isolation bakterieller DNA aus Larvendarm: Jeweils drei Larven von *Rhagium inquisitor*, *Leptura rubra*, *Tetropium castaneum* und *Plagionotus arcuatus* wurden durch Tauchen in 70 % Ethanol abgetötet und gewaschen. Der Verdauungstrakt der Tiere wurde unter sterilen Bedingungen herauspräpariert, von anhaftendem Fettkörper und Malpighischen Gefäßen befreit und für 10min in 300 µl 50 mM Tris/HCl und 50 mM EDTA pH 8.0 gekocht, um endogene Nucleasen zu inaktivieren. Das Darmmaterial wurde anschließend zerstoßen und für 1 h bei 37 °C mit 5 mg/ml Lysozym verdaut, gefolgt von 2 mg/ml PCR-grade Proteinase K in 1 % SDS bei 65 °C. Der weitgehend klare Ansatz wurde schockgefroren, um noch intakte Zellen zu lysieren und nach dem

Auftauen mit 500 µl CTAB-Puffer (5 % CTAB und 350 mM NaCl in 120 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8.0) und 500 µl Phenol pH 8.0 extrahiert und für 15 min bei 4 °C und 10 000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert und in neue Reaktionsgefäße überführt. Nucleinsäuren wurden durch Zugabe von zwei Volumina Isopropanol und 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5.3 auf Eis gefällt und bei 10 000 g sedimentiert. Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in bidestilliertem Wasser (10 µg/ml RNase) zurückgelöst.

PCR-Primer und -Profil: Zur Amplifikation möglichst aller bakteriellen 16S-rRNA-Gene wurden die konservierten Primer 8f (5`-AGAGTTTGATYMGGGCTC-3`) und 1492r (5`-GGTACCTTGTTACGACTT-3`) [WILSON et al., 1990; WEISBURG et al., 1991] eingesetzt. Sie amplifizieren spezifisch ein 1,5kb-Fragment der 16S rRNA der meisten Bakterientaxa und werden daher standardmäßig für die Analyse von Bakteriengemeinschaften verwendet. PCR-Reaktionen wurden unmittelbar nach der DNA-Isolation angesetzt, da die DNA-Präparationen im Laufe etwa eines Tages degradierten. Aufgrund der wechselnden und unbekanntenen Konzentration bakterieller Ziel-DNA wurde 1 µl der DNA-Präparation in verschiedenen Verdünnungsstufen (1-, 10-, 100 und 1000-fach) als *template* eingesetzt. PCR-Ansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 25 µl jeweils 200 µM dATP, dTTP, dGTP und dCTP, 0.5 µM vorwärts- und rückwärts-Primer, 1,8 mM MgCl₂, 4 % DMSO und 1,25 U DNA-Polymerase (*Roche Fast Start High Fidelity Taq-Polymerase*). Nach einer primären Denaturierung für 5 min bei 95 °C folgten 28-36 Zyklen von 30 sec 94 °C, 90 sec 50 °C und 180 sec 72 °C, sowie eine finale Extension für 10 min bei 72°C.

Klonierung: PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Amplicons mit der zu erwartenden Länge wurden mit dem E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (PeqLab) aus dem Gel extrahiert und mit dem Qiagen PCR-Cloning Kit in *Escherichia coli* (DH5α) kloniert. Rekombinante Klone wurden mittels *blue/white-screening* identifiziert und über Plasmid-gerichtete PCR verifiziert. Plasmid-DNA positiv getesteter Klone wurde in zufälliger Auswahl bei MWG Biotech AG sequenziert. Die Sequenzen wurden vor einer weiteren Analyse mit dem BLAST alignment tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) auf ihre Identität geprüft und nicht-16S-Sequenzen ggf. ausgesondert.

Vergleichende Analysen der 16S-rRNA-Sequenzen wurden mit dem ARB-Programm-Paket [LUDWIG et al., 2004] und einer umfassenden 16S-Datenbank (Zur

Verfügung gestellt von Dr. Wolfgang Ludwig, Institut für Mikrobiologie der TU München, am Hochanger 4, 85354 Freising) vorgenommen. Die Sequenzen wurden mit ARB parsimony interactive in das zugehörige phylogenetische Dendrogramm eingerechnet. Hierbei wurden nur Positionen berücksichtigt, die in wenigstens 50 % der Fälle konserviert waren, um hypervariable Bereiche von der Berechnung auszuschließen.

Zur Bestimmung der phylogenetischen Position des *T. castaneum*-Symbionten wurden zunächst alle entsprechenden Sequenzen (N=55) miteinander *aligned*. In Einzelsequenzen auftretende Sequenzier- und polymeraseabhängige Fehler wurden auf Basis des *alignments* eliminiert. Die resultierende Consensus-Sequenz wurde unter Verwendung von *maximum likelihood*-, *maximum parsimony*-, und *neighbour joining*-Algorithmen und mit verschiedenen Filtern (0, 20 und 50 % konservierte Positionen) in ihr phylogenetisches Umfeld eingerechnet. Die so erhaltenen Dendrogramme wurden verglichen und zu einem Consensus-Baum zusammengefaßt.

2.1.2. 16S-rRNA-Genbanken bei *Hylotrupes bajulus*

Serie 1: Aus dem Darmtrakt von vier *Hylotrupes bajulus*-Larven (drei Wildtiere und eine Larve aus Laborzucht) wurde analog zu den Larven der übrigen Bockkäferarten DNA isoliert und einer PCR mit den Primern 8f/1492r unterzogen (siehe II.2.1.1). Die Zyklenzahl wurde bei allen *Hylotrupes-templates* von 28 auf 36 erhöht, um sichtbare und klonierbare PCR-Produkte zu erhalten. Da die Kontroll-Proben bei dieser erhöhten Anzahl ebenfalls sichtbare Banden ergaben, wurden diese gemeinsam mit den Darmproben kloniert und analysiert, um Verunreinigungen durch Quervergleiche ausschließen zu können.

Serie 2: Sechs weitere Larven von *Hylotrupes bajulus* (drei Wildtiere und drei im Labor gezüchtete) wurden in 70 % Ethanol abgetötet und gewaschen. Die Darmsysteme wurden steril herauspräpariert und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis gelagert. Als Kontrollprobe wurden Fettkörper der Larven verwendet. Aus dem Darm jeweils einer wildlebenden und einer gezüchteten Larve wurde mit der CTAB-Methode analog zu den übrigen Bockkäferarten bzw. mit dem PeqGOLD Tissue DNA Mini Kit und dem Qiagen DNEasy Tissue Kit genomische DNA extrahiert. Die gewonnene DNA wurde unter Verwendung des Primerpaares 8f/1492r zur PCR (36 Zyklen) eingesetzt; die PCR-

Produkte wurden wie bei den übrigen Larven gereinigt, kloniert, sequenziert und analysiert (siehe III.2.1.1.).

2.1.3. Pilzspezifische 18S-rRNA-Genbanken bei *Hylotrupes bajulus*

Isolation pilzlicher DNA aus Larvendarm: Larven von *Hylotrupes bajulus* wurden durch Tauchen in 70% Ethanol abgetötet und gewaschen. Der Darm der Tiere wurden unter sterilem PBS freigelegt, von anhängendem Fettkörper und Malpighischen Gefäßen befreit und für 10 min in 300 µl 50 mM Tris/HCl und 50 mM EDTA pH 8.0 gekocht, um endogene Nucleasen zu inaktivieren. Das Darmmaterial wurde anschließend zerstoßen und für 1 h bei 37 °C mit 10 mg/ml Lyticase¹ verdaut bzw. mit einem halben Volumen an Glaskugeln für 1 min bei 14000 rpm auf dem Vortex zermahlen. Anschließend wurde das Lysat mit 2 mg/ml *PCR-grade* Proteinase K in 1 % SDS bei 65 °C verdaut. Der weitgehend geklärte Ansatz wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach dem Auftauen mit 500 µl CTAB-Puffer und 500 µl Phenol pH 8.0 extrahiert und für 15 min bei 4 °C und 10 000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert und in neue Reaktionsgefäße überführt. Nucleinsäuren wurden durch Zugabe von zwei Volumina Isopropanol und 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5.3 auf Eis gefällt und bei 10 000 g sedimentiert. Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in bidestilliertem Wasser (10 µg/ml RNase) zurückgelöst.

¹ DNA-Verunreinigungen in den verfügbaren Lyticase-Präparaten führten bei einigen Primerpaaren zur Bildung von Artefakten. Der Lyticase-Verdau zum Aufbrechen der Pilzzellen wurde daher während der Versuchsreihe durch eine Behandlung mit Glaskugeln ersetzt.

→	5´- Sequenz - 3´	←	5´- Sequenz - 3´	Ziel	Referenz
EF4	GGAAGGGRTGTATTATTAG	EF3	TCCTCTAAATGACCAGTTTG	18S	[2][4][5]
EF4	GGAAGGGRTGTATTATTAG	Fung5r	GTAAAAGTCCTGGTTCCC	18S	[2][4][5]
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	EF3	TCCTCTAAATGACCAGTTTG	18S	[2][7][5]
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	FR1	AICCATCAATCGGTAIT	18S	[2][7][6]
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	FF390r	AGGTCTCGTTCGTTATCG	18S	[7][6]
ITS1f	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS/5.8S	[1][4][7]
ITS1f	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	NLB3	GGATTCTCACCTCTATGA	ITS/5.8S	[1][3]
NSI1	GATTGAATGGCTTAGTGAGG	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS/5.8S	[3][7]
NSI1	GATTGAATGGCTTAGTGAGG	NLB3	GGATTCTCACCTCTATGA	ITS/5.8S	[3]
FF390	CGATAACGAACGAGACCT	NLB3	GGATTCTCACCTCTATGA	ITS/5.8S	[2][3][6]
FF390	CGATAACGAACGAGACCT	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS/5.8S	[2][7][6]

Tabelle II.1: PCR-Primer zur spezifischen Amplifikation pilzlicher rRNA-Gene.

Referenzen: [1]: GARDES&BRUNS, 1993; [2]: HAGN et al., 2003; [3]: MARTIN&RYGIEWICZ, 2005 [4]: KOWALCHUK&SMIT, 2004; [5]: SMIT et al., 1999; [6]: VAINIO&HANTULA, 2000 [7]: WHITE et al., 1990

PCR-Primer und -Bedingungen: Zur Amplifikation pilzlicher rRNA-Sequenzen wurden verschiedene der Literatur entnommene Primerpaare verwendet. Diese sämtlich als pilzspezifisch publizierten Primer wurden zunächst in ihrer ursprünglichen Paarung, zum Teil auch in neuartigen Kombinationen eingesetzt (Tabelle II.1). Die Bindungsstelle der Vorwärtsprimer EF4 und NS1 befindet sich am Beginn der 18S rRNA. Paarungen dieser Primer mit den Rückwärtsprimern EF3, Fung5r, FR1 und FF390r amplifizieren daher ein mehr oder weniger großes Fragment der 18S-Untereinheit. 18S-Sequenzen erlauben aufgrund ihrer vergleichsweise starken Konservierung eine zuverlässige Identifikation von Großgruppen bis hin zu Familien und ggf. Gattungen. Für 18S-Bereiche sind darüber hinaus die meisten Referenzsequenzen bekannt. Die übrigen Vorwärtsprimer ITS1f, NSI1 und FF390 binden dagegen im hinteren Bereich der 18S-Untereinheit und amplifizieren in Kombination mit den Rückwärtsprimern ITS4 und NLB3 vor allem die ITS (*internal transcribed spacer*)-Bereiche und die dazwischenliegende 5.8S Untereinheit der rRNA. ITS-Sequenzen unterliegen als Introns einer beschleunigten Evolution und eignen sich zur Unterscheidung nah verwandter Taxa (Abbildung II.1).

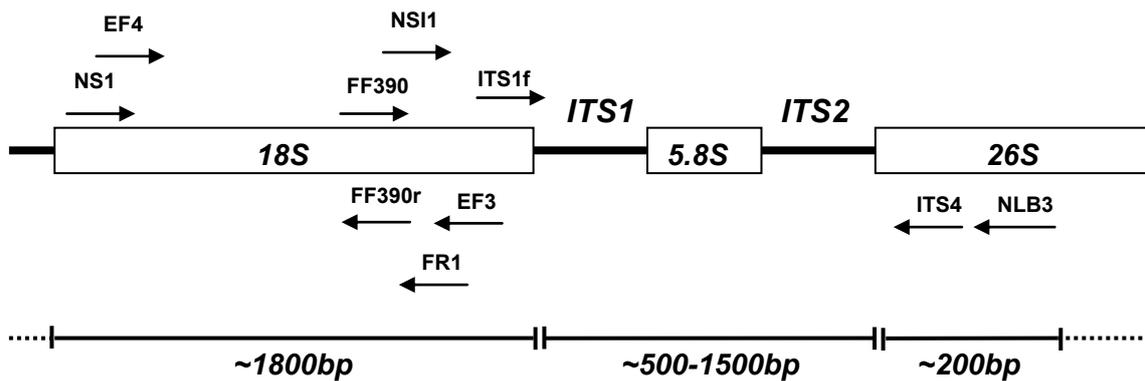


Abbildung II.1: Struktur des eukaryontischen rRNA-Genes (Ausschnitt).

Die 18S, 5.8S und 26S-Bereiche liefern die entsprechende rRNA der ribosomalen Untereinheiten. ITS1 und ITS2 (*internal transcribed spacer*) codieren als Introns für keine Strukturelemente, sind jedoch taxonomisch wertvoll. Pfeile markieren die ungefähre Bindungsposition der verwendeten Primer. Die Größe der zu erwartenden Amplicons (v. A. im Bereich der ITS) ist bei verschiedenen Pilzgruppen variabel

Jeweils 1 µl verschiedener Verdünnungsstufen (1-, 10-, 100 und 1000-fach) der DNA-Präparation wurde als Template zur PCR eingesetzt. PCR-Reaktionen enthielten in einem Gesamtvolumen von 25 µl außerdem jeweils 200 µM dATP, dTTP, dGTP und dCTP, 0,5 µM vorwärts- und revers-Primer (MWG Biotech AG), 1,8 mM MgCl₂, 4 % DMSO und 1,25 U DNA-Polymerase (*Roche Fast Start High Fidelity Taq-Polymerase*). Nach einer primären Denaturierung für 5 min bei 95 °C folgten 30-36 Zyklen von 30 sec 94 °C, 90 sec 50-60 °C und 180 sec 72 °C, sowie eine finale Extension für 10 min bei 72 °C. Die Annealingtemperatur wurde zu Beginn 2 °C tiefer als der errechnete Schmelzpunkt des Primerpaares angesetzt und ggf. optimiert. Eine standardmäßige Zyklenzahl von 33 wurde abhängig vom Ergebnis der PCR korrigiert, um ausreichend Amplifikat bei möglichst hoher Spezifität zu erzielen. PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und gereinigt.

Klonierung: Amplicons mit einer in etwa zu erwartenden Länge (vgl. Abbildung II.1) wurden mit dem E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (PeqLab) wiedergewonnen und mit dem Qiagen PCR-Cloning Kit in *Escherichia coli* (DH5α) kloniert. Beim Auftreten mehrerer potentieller rRNA-Amplicons wurden alle Banden separat extrahiert und weiterverwendet. Rekombinante Klone wurden mittels *blue/white-screening* identifiziert durch Plasmid-gerichtete PCR auf die korrekte Länge des Inserts getestet. Plasmid-DNA positiv getesteter Klone wurde in zufälliger Auswahl bei MWG Biotech AG sequenziert und die resultierenden 18S-rRNA-Sequenzen mit dem BLAST alignment tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) identifiziert.

2.2. *Kultivierungsversuche*

Wiederholt wurden Larven von *Rhagium inquisitor*, *Leptura rubra* und *Tetropium castaneum* an verschiedenen Fichtenstämmen/Stümpfen an verschiedenen Standorten gesammelt. Freilebende Larven von *Hylotrupes bajulus* wurden aus verschiedenen Kiefernholzern gebrochen. Untersucht wurde eine wechselnde Anzahl von Larven, stets jedoch mindestens drei Individuen. Die Larven wurden für 2 min in 70 % Ethanol abgetötet und gewaschen und unter sterilem PBS präpariert. Die kompletten Darmsysteme der Larven wurden freigelegt, in sterilen Reaktionsgefäßen zerstoßen und mit PBS auf 500 µl aufgefüllt. Jeweils 100 µl des Homogenats wurden unverdünnt, sowie in 1:10, 1:100 und 1:1000-Verdünnung auf LB-Agar (5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 10 g NaCl, 18 g Agar, H₂O ad 1000 ml, pH 7.0) und Malzextrakt (30 g Malzextrakt, 5 g Pepton, 15 g Agar, H₂O ad 1000 ml, pH 5.4) ausgestrichen. Die Nährböden wurden bei Raumtemperatur (22-25 °C) aufgestellt und das Wachstum von Mikroorganismen für maximal 14 Tage verfolgt. Von allen Individuen wurde ein Nährboden mit geeigneter Verdünnungsstufe ausgewählt und die darauf erkennbaren Kolonien wurden nach äußeren Merkmalen (Farbe, Größe, Oberfläche) und mikroskopisch (Zellgröße, Zellform, Verbandbildung) unterschieden und ausgezählt. Von allen unterscheidbaren Kolonietypen wurden wenigstens drei redundante Klone isoliert und auf neuen Nährböden vereinzelt. Zur Bestimmung der Mikroorganismen wurde jeweils ein Teilstück der kleinen rRNA-Untereinheit amplifiziert und sequenziert (vgl. II.2.1.1.) beschrieben. Hierzu wurden Aliquots der vereinzelt Kolonien als Template in PCR-Reaktionen eingesetzt. Für Bakterienisolate wurde das Bakterien-spezifische 16S-rRNA-Primerpaar 8F/1492r, für Hefeisolate die Eukaryonten-spezifischen 18S-rRNA-Primer NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') und NS4 (5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3') [WHITE et al., 1990] verwendet. Die resultierenden Sequenzen wurden mit dem BLAST alignment tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) und einer umfassenden 18S-ARB-Datenbank identifiziert (Zur Verfügung gestellt von Dr. Wolfgang Ludwig, Institut für Mikrobiologie der TU München, am Hochanger 4, 85354 Freising). Mittels ClustalW [THOMSON et al., 1994] wurde ein *neighbour-joining*-Dendrogramm von allen Isolaten und einer Auswahl ihrer phylogenetisch nächsten Verwandten erstellt.

Aufgrund des völligen Ausbleibens mikrobiellen Wachstums bei *Hylotrupes bajulus* wurden insgesamt weitere 10 Larven (davon 6 wildlebende und 4 im Labor gezüchtete)

dieser Spezies wie oben aufgearbeitet. Die Darmhomogenate wurden zusätzlich auf folgende Nährböden ausplattiert: Nutrient-Medium (10 g Fleischextrakt, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 15 g Agar, pH 7.0), Kartoffel/Dextrose-Agar (1000 ml Kartoffelextrakt, 20 g D-Glucose, 15 g Agar, pH 5.8), Hafermehl-Agar (1000 ml Extrakt aus 200 g Hafermehl, 15 g Agar, pH 6.5), Heu-Extrakt (70 g Heu und 15 g Agar in 1000 ml H₂O autoklavieren, pH 6.2), Holz-Extrakt (100 g Kiefernholzmehl und 15 g Agar in 1000 ml H₂O autoklavieren, pH 6,0) mit und ohne zusätzliche Nährstoffe (0,5 g/l Pepton und 0,5 g/l Hefeextrakt), sowie *Rhizobium*-Medium (200 ml Decocct von 70 g Humuserde und 0,2 g Na₂CO₃, 10 g Mannitol, 1 g Hefeextrakt, 15 g Agar, H₂O ad 1000 ml, pH 7.0). Die Nährböden wurden ebenfalls bei Raumtemperatur (22-25 °C) aufgestellt und für 14 Tage auf Mikrobewachstum hin überprüft.

2.3. FISH - Fluoreszenz in situ Hybridisierung

2.3.1. Entwicklung und Evaluation pilzspezifischer Oligonucleotidsonden

Entwicklung: Für das Reich der Prokaryonten hält die Literatur eine Fülle von Oligonucleotidsonden bereit. Bakterien können daher mehr oder weniger flächendeckend auf verschiedensten taxonomischen Stufen mit der FISH-Technik identifiziert und visualisiert werden. Bei den Pilzen ist man dagegen weit entfernt von einer vergleichbaren Abdeckung. Sonden existieren nur für ausgewählte, meist klinisch relevante Gruppen, und sind oftmals nur in einem engen Rahmen evaluiert. Bestehende Pilz-Sonden decken somit die potentielle Vielfalt symbiontischer Hefen nur spärlich ab und differenzieren zudem aufgrund der vergleichsweise engen Verwandtschaft von Pilzen und Invertebraten nicht notwendigerweise zwischen ihren Zielorganismen und dem Gewebe der Wirtsinsekten. Aus diesem Grund wurden zwei neuartige Oligonucleotidsonden entwickelt, mit dem Ziel, möglichst alle Pilze spezifisch vor dem Hintergrund von Insektengewebe zu detektieren. Hierzu wurden insgesamt 197 18S-rRNA-Sequenzen, verteilt über alle Großgruppen der Pilze (darunter 50 Hefeisolate aus Insekten), sowie 55 18S-rRNA-Sequenzen aus den größeren Ordnungen der Insekten von GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) akquiriert und mit ClustalW *aligned*. Das *Alignment* wurde von Hand nach Motiven untersucht, die eine möglichst flächendeckende Konservierung bei Pilzen mit einer möglichst hohen Diskrepanz zur entsprechenden Insektensequenz kombinieren. Zwei Zielmotive mit entsprechenden

Eigenschaften bei den Positionen 326 und 1200 (der 18S-rRNA von *Saccharomyces cerevisiae* - Accession-Nr. AY251636) wurden ausgewählt. Die entsprechenden Oligonucleotidsonden PF326 und PF1200 (Tabelle II.2) wurden bei MWG Biotech AG, 85560 Ebersberg synthetisiert und am 5'-Ende mit den Fluorochromen Cy3 bzw. Cy5 markiert.

Evaluation: Das Bindeverhalten und die Spezifität der Sonden wurde an fixierten Hefe- und Bakterienzellen, Mycel von *Beauveria bassiana* und Dünnschnitten von Darmgewebe überprüft. Zellen von *Cellulosimicrobium cellulans* (grampositive *Actinobacteria*) und *Escherichia coli* (gramnegative γ -*Proteobacteria*) wurden über Nacht in Luria-Bertani-Medium (10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, H₂O ad 1000 ml, pH 7.0) angezogen. Hefeisolate aus den Myzetomen von *Rhagium inquisitor* und *Leptura rubra*, sowie Mycel von *Beauveria bassiana* wurden für 48 h in Malzextrakt-Medium (10 g Malzextrakt, 5 g Hefeextrakt, H₂O ad 1000 ml, pH 6.0) angezogen. Zellen und Mycel wurden für 5 min bei 3000 U/min sedimentiert, mit PBS (3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, pH 7.0) gewaschen und für 1 h bei 4 °C in 4 % Paraformaldehyd (in PBS) fixiert. Anschließend wurden Zellen und Mycel erneut gewaschen, mit PBS resuspendiert und ad 50 % (v:v) mit Ethanol versetzt. Aliquote der Zell-/Mycel-Suspensionen wurden bei 45 °C auf haftungsbeschichteten Objektträgern (Erie-Science, Portsmouth, New Hampshire, USA) eingetrocknet und wie in Punkt II.2.3.4. hybridisiert. Zur Optimierung der Spezifität wurden die Sonden in einer Formamid-Konzentrationsreihe (in 5 %-Schritten) von 0 bis 40 % (v:v) getestet.

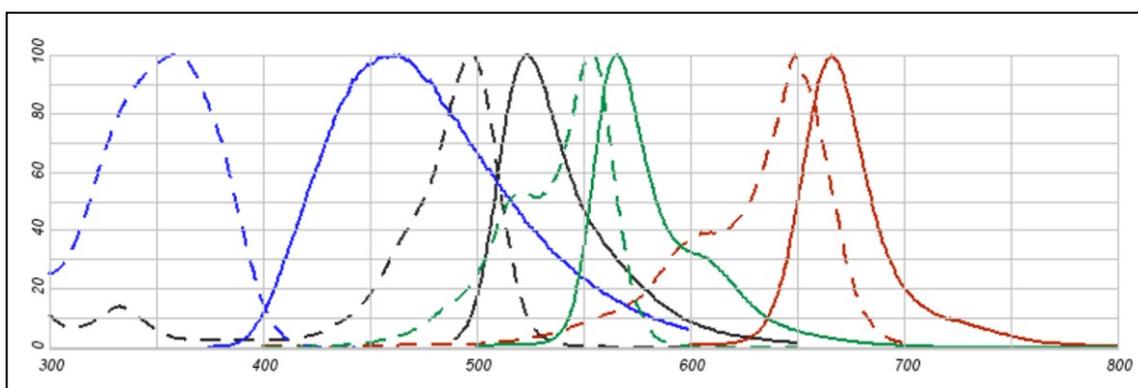


Abbildung II.2: Anregungs- und Fluoreszenzspektren der verwendeten Fluorochrome.

Blau: DAPI; Schwarz: Rhodamin-Grün; Grün: Cy3; Rot: Cy5.

Die Anregungsbereiche (gestrichelte Linien) verteilen sich über den gesamten Bereich des sichtbaren Lichts bis in den Infrarotbereich. Die Fluoreszenzsignale (durchgezogene Linien) lassen sich auch bei paralleler Detektion im selben Objekt zuverlässig isolieren.

Dabei stellte sich heraus, daß der zur Einbettung verwendete Technovit 8100®-Kunststoff sich bei Formamid-Konzentrationen oberhalb von 30 % verformt, wodurch die Dünnschnitte in Mitleidenschaft gezogen werden. Da sich die Sonden bei den beschriebenen Konditionen allerdings auch gänzlich ohne Formamid spezifisch verhielten, wurde bei allen folgenden Experimenten auf Formamid verzichtet.

2.3.2. Entwicklung und Evaluation stammspezifischer Oligonucleotid-Sonden

Um Identität und Lokalisation symbiotischer Bakterien und Hefestämme zu bestätigen, wurden weitere Oligonucleotidsonden entwickelt, die für die entsprechenden Organismen spezifisch sind.

Zur Detektion des bakteriellen *Tetropium castaneum*-Endocytobionten (mutmaßlich *Sodalis spec.*) wurden zunächst alle entsprechenden Sequenzen (N=55) aus den PCR-basierten 16S-rRNA-Genbanken (siehe II.2.1.1.) miteinander aligned. In Einzelsequenzen auftretende PCR- und sequenzierungsabhängige Fehler wurden auf Basis des *Alignments* manuell eliminiert. Die resultierende Consensus-Sequenz wurde gegen eine umfassende 16S-ARB-Datenbank mit 2462 *Enterobacteriaceae*-Sequenzen *aligned* (Zur Verfügung gestellt von Dr. Wolfgang Ludwig, Institut für Mikrobiologie der TU München, Am Hochanger 4, 85354 Freising). Mit dem in ARB implementierten ProbeDesign-Tool wurden Positionen mit möglichst hoher Diskrepanz zu allen anderen Bakterien gesucht. Die Position 445-460 (siehe Tabelle II.2) wurde ausgewählt und als 5'-Cy5- markiertes Oligonucleotid von MWG Biotech AG, 85560 Ebersberg bezogen. Die als SOD445 bezeichnete Sonde wurde in einer Formamid-Reihe von 0-30 % gegen die nahe verwandte Art *Escherichia coli* getestet, wie in II.3.2.1. beschrieben. *E. coli* bietet das Minimum von zwei zentralen Fehlpaarungen an der Bindeposition der Sonde; andere Bakterien besitzen diese beiden oder zusätzliche abweichende Basen und sollten demnach gleich gut oder besser diskriminiert werden.

Zur Detektion der Myzetomsymbionten von *Rhagium inquisitor* und *Leptura rubra* wurden die 18S rRNA-Sequenzen der mutmaßlichen Myzetomisolate zusammen mit den Sequenzen der Darmisolate (aus *Rhagium*, *Leptura* und *Tetropium*) *aligned*. Für das Myzetom-Isolat von *Rhagium inquisitor* wurden zwei (CRI174 und CRI670), für das Myzetomisolat aus *Leptura rubra* eine Position (CSH670) gefunden, die eine hinreichende Diskrepanz zu den übrigen Sequenzen aufwies. Tabelle 2 zeigt Position und Sequenz aller verwendeten Sonden. Die entsprechenden 5'-Cy5-markierten

Oligonucleotide wurden von MWG Biotech AG, 85560 Ebersberg bezogen und in einer Formamidreihe von 0 bis 30 % (in 5 % Schritten) getestet.

2.3.3. Präparation, Einbettung und Schneiden der Verdauungssysteme

Untersucht wurde die Darmflora (ggf. inklusive der Myzetom-Symbionten) der Larven von *Rhagium inquisitor*, *Leptura rubra*, *Tetropium castaneum*, *Plagionotus arcuatus* und *Hylotrupes bajulus*. Für die Untersuchungen wurden Larven zu Beginn der Fraßperiode (März/April) und nach längerer Fraßtätigkeit (Juli/August/September) herangezogen. Dabei wurden nach Verfügbarkeit stets Jung- und Altlarven, sowie Stadien in einem mittleren Entwicklungszustand verwendet, jedoch keine verpuppungsbereiten Tiere.



Abbildung II.3: Einbettung des Larvendarms.

Teflon-Mulde (hinten) und Kunststoffwanne mit eingebettetem *Leptura rubra*-Darm (vorne). Die Wanne wurde mit Stahlnägeln versteift, um den spröden Kunststoff beim Schneiden zu stabilisieren. Kantenlänge der Mulde 5x3x2 cm.

Präparation: Die Larven wurden in 70 % Ethanol abgetötet und sofort weiter verarbeitet, um jegliche Degradation zu vermeiden. Der Verdauungstrakt der Tiere wurde unter eiskaltem, sterilem PBS (3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, pH 7.0) freigelegt, von anhängendem Fettkörper und Malpighischen Gefäßen befreit und als Ganzes in eiskalte Fixierlösung (4 %

Paraformaldehyd in PBS) überführt. Die Proben wurden je nach Größe für 1-3 Tage bei 4 °C fixiert; die Fixierlösung wurde hierbei anfangs nach 1, 2 und 4 h, später ggf. einmal täglich ersetzt. Die fixierten Darmsysteme wurden für mindestens drei Tage in 100 % Aceton entwässert, das Aceton hierbei mehrfach erneuert. Für die Einbettung wurde ein gebrauchsfertiger Acrylsäure-Kunststoff (Kulzer-Heraeus Technovit 8100®) verwendet. Paraffin als Einbettungsmedium erwies sich in Vorversuchen als zu weich, da die harten Holzpartikel im Darm der Larven während des Schneidens laufend ausbrechen und die Objekte zerstören. Die Darmsysteme wurden in 4-5 Stücke zerteilt und für 7 Tage bei 4 °C in Technovit infiltriert. Die Polymerisation des Acrylats wurde schließlich durch Zugabe eines radikalischen Starters eingeleitet, die Darmsegmente in Teflon-Mulden plziert, mit einer Kunststoffolie bedeckt und mit der Acrylatlösung überschichtet. Nach 24 h wurden die Objekte entnommen und bis zum völligen Abtrocknen an der Raumluft aufgestellt. Mit einem LEITZ Rotationsmikrotom wurden Serienschnitte (5-10 µm) hergestellt, auf haftbeschichtete Objektträger gezogen und bei 45 °C getrocknet.

2.3.4. Hybridisierung und Mikroskopie

Die in Tabelle II.2 aufgelisteten Oligonucleotidsonden wurden in wechselnden Kombinationen eingesetzt. Alle Sonden wurden (unabhängig von ihrem jeweiligen Fluorochrom) in einer Endkonzentration von 3ng/µl in Hybridisierungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 900 mM NaCl, 0.1 mg/ml SDS) eingesetzt. Dünnschnitte und Zellpräparate wurden mit einem adäquaten Volumen dieser Mischung bedeckt und in Hybridisierungskammern eingeschlossen. Diese wurden über Nacht bei 46 °C im Wasserbad versenkt. Die Objektträger wurden anschließend für 30 min bei 48 °C in reinem Hybridisierungspuffer gewaschen, mit bidestilliertem Wasser gespült und mit Druckluft getrocknet. Alle Objekte wurden für ca. 5 min mit einem Tropfen 10 µg/ml 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in 10 mM Tris/HCl pH 8.0 bedeckt. Die DAPI-Lösung wurde anschließend durch reinen Trispuffer ersetzt und die Objekte mit einem konfokalen *laser-scanning*-Mikroskop (Olympus FluoView1000) analysiert. Die Objekte wurden mit Laserlicht der Wellenlängen 330 nm (DAPI), 488 nm (Rhodamingrün), 515/561 nm (Cy3) bzw. 633 nm (Cy5) angeregt. Der jeweils detektierte Wellenlängenbereich wurde manuell optimiert, um Interaktionen zwischen den Fluorochromen auszuschließen.

Sonde	5' - Sequenz - 3'	Zielorganismen	Referenz
EUB338 I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i> (~90 %)	Amann et al., 1990
EUB338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	<i>Planctomycetales</i>	Daims et al., 1999
EUB338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	<i>Verrucomicrobiales</i>	Daims et al., 1999
EUK516	ACCAGACTTGCCCTCC	<i>Eukarya</i>	Amann et al., 1990
UNIV1390	GACGGGCGGTGTGTACAA	Alle Organismen	Zheng et al., 1996
PF326	TGGTAGGCCWCTATCCTACC	<i>Eumycota</i>	
PF1200	CTGGACCTGGTGAGTTTCCC	<i>Fungi</i>	
SOD445	ACGCCATTGCCTTCCT	<i>Sodalis</i>	
CRI174	CAATGCTTCGGCTTCTTGATGA	<i>Candida rhagii</i>	
CRI670	TGGCTAGCCTTTTGGCGAACCAGG	<i>Candida rhagii</i>	
CSH670	ACCTTCTTCCTTTTGGGAGTTG	<i>Candida shehatae</i>	
Nonsens	GGGAAACTCACCAGGTCCAG	Negativkontrolle	

Tabelle II.2: Sequenz und Zielorganismen der verwendeten Oligonucleotidsonden.
Neue Sonden in Fettdruck

2.4. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung des Darmes von Hausbocklarven

Wildlebende und im Labor gezüchtete Larven von *Hylotrupes* wurden aus verschiedenen Kiefernholzklötzchen gebrochen und in 70 % Ethanol abgetötet. Der Darmtrakt der Larven wurde steril herauspräpariert und von Fettkörper und Malpighischen Gefäßen befreit. Die Darmsysteme wurden in die vier Abschnitte vorderer Mitteldarm, hinterer Mitteldarm 1. Bogen, hinterer Mitteldarm 2. Bogen und Hinterdarm zerlegt, um die Fixierung zu erleichtern. Die Darmteile wurden separat in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 24 h bei 4 °C in 1 ml 2.5 % Glutaraldehyd und 2.5 % Paraformaldehyd in 0.1 M Natriumcacodylat-Puffer pH 7.2 fixiert. Das Fixativ wurde dabei nach 1, 2 und 6 Stunden durch frisches ersetzt. Überschüssiges Aldehyd wurde durch mehrmaliges Waschen mit 0.1 M Natriumcacodylatpuffer entfernt. Fertig fixierte Darmstücke wurden unter Natriumcacodylatpuffer gelagert und versandt. Die weitere Vorbereitung und Mikroskopie der Proben wurde am Socolofsky Microscopy Center der Louisiana State University, Baton Rouge, LA 70803 durchgeführt.

3. Untersuchungen zu Abbau und Verwertung von Kohlenhydraten

3.1. *In situ*-Freisetzung löslicher Saccharide im Larvendarm

Extraktion der Saccharide: Der Darmtrakt gefriergetrockneter Larven von *Rhagium inquisitor*, *Leptura rubra*, *Tetropium castaneum* und *Hylotrupes bajulus* wurde unter dem Binokular freigelegt und in vier morphologisch abgegrenzte Abschnitte zerlegt: Vorderer Mitteldarm, Hinterer Mitteldarm/1. Schlinge, Hinterer Mitteldarm/2. Schlinge und Hinterdarm (vgl. Abbildung III.1). Die entsprechenden Abschnitte von 8-10 Larven einer Art wurden vereinigt, um ausreichend Material zu gewinnen. Als extraintestinales Kontrollgewebe dienten Teile der Fettkörper und Muskelgewebe der Larven. Darmteile und Kontrollgewebe wurden mit einem Spatel zerstoßen. Störende Lipide wurden erschöpfend mit eiskaltem Aceton extrahiert. Das an der Luft getrocknete Aceton-Pulver wurde anschließend dreimal mit 75 % Methanol extrahiert, um die enthaltenen löslichen Kohlenhydrate zu gewinnen. In 75 %igem Methanol sind neben Mono- und Oligosacchariden nur phenolische Komponenten aus der Nahrung der Larven und kleinere Peptide löslich. Die methanolischen Extrakte wurden vereinigt, unter dem Luftstrom eingetrocknet und die Rückstände unter Schütteln in 50 µl 75 % Methanol zurückgelöst. Im reduzierten Volumen von 50 µl unlösliche Komponenten (Proteinspuren, Salze) wurden abzentrifugiert, bis sich ein klarer Überstand zeigte.

Analog wurden identische Mengen (Trockengewicht) der Nahrung (frisch/im verzehrbereiten Zustand) und der Ausscheidungsprodukte der Larven aufgearbeitet.

Selbstverdau von Darminhalt: Gefriergetrocknete Darmsysteme von *Rhagium inquisitor* und *Leptura rubra* wurden im Bereich des vorderen Mitteldarms getrennt in Darminhalt und Darmepithel und mit Aceton, gefolgt von 75 % Methanol erschöpfend extrahiert. Die Fraktion des Darminhalts wurde anschließend mit 1 ml Extraktionspuffer (100mM MES-Puffer, 1mM β-Mercaptoethanol als Antioxidantium) versetzt und zu einem Brei angerührt. Dieser wurde bei RT (24 °C) für 15 min einem Selbstverdau überlassen, unter Vakuum eingetrocknet und erneut mit 75 % Methanol extrahiert, um etwaige Spaltprodukte zu gewinnen. Die methanolischen Extrakte aus Epithel und Selbstverdau des Darminhalts wurden unter Luftstrom eingetrocknet, in 50µl 75 % Methanol zurückgelöst und abzentrifugiert, bis sich ein klarer Überstand zeigte.

Dünnschichtchromatographie der Saccharide: Ein auf das extrahierte Trockengewicht der Darm-, Nahrungs- und Kotproben standardisiertes Aliquot des Überstandes wurde auf 20 x 20 cm Kieselgel 60 DC-Platten aufgetragen und mit einer Mischung von Eisessig/Chloroform/Wasser (7/6/1-v:v:v) aufgetrennt [DE STEFANIS&PONTE, 1968] . Zur Identifizierung der im Darm enthaltenen Saccharide wurden authentische Mono- und Oligosaccharide auf den Platten mitgeführt. Die Platten wurden nach dreimaligem Lauf mit Naphthoresorcin-Schwefelsäure-Reagens bzw. mit Diphenylamin-Anilin-Phosphorsäure-Reagens besprüht und im Heizschrank bei 105 °C bzw. 130 °C bis zur maximalen Farbintensität entwickelt (Tabelle II.3).

Reagenz	Naphthoresorcin-Schwefelsäure	Diphenylamin-Anilin-Phosphorsäure
Lösung a	0,2 % Naphthoresorcin in Ethanol	1 % Diphenylamin und 1 % Anilin
Lösung b	20 % Schwefelsäure	Phosphorsäure konz.
Mischung	1:1	10 Teile a zu 1 Teil b
Nachbehandlung	5-10 min bei 105 °C	3-10min bei 130°C

Tabelle II.3: Zusammensetzung und Nachbehandlung der verwendeten Sprühreagenzien

Nach: [STAHL, 1967].

3.2. *In vitro-Verdau authentischer Kohlenhydrate*

Herstellung der Substrate: Um die enzymatischen Fähigkeiten des Larvendarms zu testen, wurden verschiedene lösliche und unlösliche Poly- und Oligosaccharide aus der Reihe der Cellulose(-derivate), Hemicellulosen und Zucker zum Verdau angeboten (Tabelle II.4). Die verwendeten Kohlenhydrate wurden käuflich erworben mit Ausnahme von weißfauler Cellulose, die nach einem modifizierten Acetosolv-Verfahren selbst hergestellt wurde. Weißfaules Fichtenholz wurde hierzu geraspelt und in einer Mischung von Eisessig und konzentrierter Salzsäure (3,5:1/v:v) unter Rücklauf für 1h gekocht. Die gelösten Ligninbestandteile und Hemicellulosen wurden abgenutscht, der resultierende Zellstoff in Eisessig gewaschen und mit alkalischer Wasserstoffperoxidlösung (10 % NaOH, 30 % H₂O₂) unter Kochen gebleicht. Nach dem Trocknen wurde die Cellulose in einer Kugelmühle zu Pulver gemahlen. Die Eignung der so gewonnenen Cellulosefraktion als Substrat wurde mittels authentischer Cellulase aus *Trichoderma viride* überprüft. Alle Kohlenhydrate wurden in einer Konzentration von 2 % (w:v) in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 5,8 und 0,01 %

NaN₃ gelöst bzw. aufgeschwemmt. Das enthaltene NaN₃ wirkt keimtötend und vermeidet damit Artefakte durch mikrobiellen Befall der Kohlenhydrate. Galactomannan wurde nur 1 %ig angesetzt, da höhere Konzentrationen nicht mehr vollständig aufquellen.

Gewinnung eines zuckerfreien Darmproteinextrakts: Aus gefriergetrockneten Larven von *Rhagium inquisitor*, *Tetropium castaneum*, *Leptura rubra* und *Hylotrupes bajulus* wurde der vordere Mitteldarm präpariert. Um eine Degradation der Carbohydrasen durch endogene Proteasen zu vermeiden, wurden die gegen Kohlenhydrate ohnehin unwirksamen hinteren Darmteile abgetrennt. Darmmaterial von 8-10 Larven einer Art wurde vereinigt, um hinreichend Masse zu gewinnen. Das Darmmaterial wurde gemörsert und erschöpfend mit eiskalten Aceton und anschließend mit 75%igem Methanol extrahiert, um Lipide und endogene Zucker zu entfernen. Das unter Vakuum getrocknete Präparat wurde mit 2ml Extraktionspuffer (100 mM MES-Puffer, 1 mM β -Mercaptoethanol als Antioxidantium) unter leichtem Rühren für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 10 000 g abzentrifugiert. Der klare Überstand mit den gelösten Proteinen wurde als Enzympräparation für den Kohlenhydratverdau eingesetzt.

Kohlenhydrat	Herkunft	Enthaltene Monomere	Glycosidische Bindungstypen
Cellulose(-derivate) und weitere Glucosepolymere			
Native Cellulose: Baumwollinters	Baumwollhaare, entfettet, gemahlen	β -D-Glucopyranose	β -1 \rightarrow 4
Mikrokristalline Cellulose: Avicel	k.A.	β -D-Glucopyranose	β -1 \rightarrow 4
Weißfaule Cellulose	Fichtenholz	β -D-Glucopyranose	β -1 \rightarrow 4
Carboxymethylcellulose	k.A.	β -D-Glucopyranose β -D-Carboxy-Glucopyranose	β -1 \rightarrow 4 β -1 \rightarrow 4
Pachyman	<i>Poria cocos</i>	β -D-Glucopyranose	β -1 \rightarrow 3
Chitin	Crustaceen-Panzer	N-Acetyl-Glucosamin	β -1 \rightarrow 4
Stärke	Kartoffeln	α -D-Glucopyranose	α -1 \rightarrow 4
Hemicellulosen			
Xylan (unsubstituiert)	Birkenholz	β -D-Xylopyranose	β -1 \rightarrow 4
Arabinoxylan	Weizen	62% β -D-Xylopyranose 38% α -L-Arabinofuranose	β -1 \rightarrow 4 α -1 \rightarrow 2; α -1 \rightarrow 3
4-O-Methylglucuronoxylan	k.A.	β -D-Xylopyranose α -D-4-O-Methylglucuronsäurep.	β -1 \rightarrow 4 α -1 \rightarrow 2
Xyloglucan	Tamarindenfrüchte	45% β -D-Glucopyranose 35% α - β -D-Xylopyranose 16% β -D-Galactopyranose 4% α -L/D-Arabinofuranose	β -1 \rightarrow 4 α -1 \rightarrow 6 β -1 \rightarrow 2/4/5 α -1 \rightarrow 6
Glucomannan	<i>Amorphophallus konjac</i>	60% β -D-Glucopyranose 40% β -D-Mannopyranose	β -1 \rightarrow 4 β -1 \rightarrow 4
Galactomannan	Johannisbrotsamen	β -D-Mannopyranose β -D-Galactopyranose	β -1 \rightarrow 4 β -1 \rightarrow 6
Arabinogalactan	Lärchenholz	β -D-Galactopyranose β -L-Arabinofuranose β -L-Arabinopyranose α -L-Arabinofuranose	β -1 \rightarrow 3; β -1 \rightarrow 6 β -1 \rightarrow 3; β -1 \rightarrow 6 β -1 \rightarrow 3; β -1 \rightarrow 6 β -1 \rightarrow 3
Pectin	Apfelfrüchte	β -D-Galacturonsäurepyranose β -L-Rhamnopyranose	α -1 \rightarrow 4 β -1 \rightarrow 2
Zucker			
Cellobiose	k.A.	β -D-Glucopyranose D-Glucopyranose	β -1 \rightarrow 4
Gentibiose	k.A.	β -D-Glucopyranose D-Glucopyranose	β -1 \rightarrow 6
Maltose	k.A.	α -D-Glucopyranose D-Glucopyranose	α -1 \rightarrow 4
Trehalose	k.A.	α -D-Glucopyranose α -D-Glucopyranose	α -1 \rightarrow 1
Saccharose	k.A.	α -D-Glucopyranose β -D-Fructofuranose	α -1 \rightarrow 2
Raffinose	k.A.	α -D-Galactopyranose α -D-Glucopyranose β -D-Fructofuranose	α -1 \rightarrow 6 α -1 \rightarrow 2
Lactose	k.A.	β -D-Galactopyranose D-Glucopyranose	β -1 \rightarrow 4
Melibiose	k.A.	α -D-Glucopyranose D-Glucopyranose	α -1 \rightarrow 6

Tabelle II.4: Struktur und Herkunft authentischer Kohlenhydrate.

Reaktionsansatz und Nachweis von Spaltprodukten: Jeweils 100 µl Substratlösung wurden mit 100 µl Darmextrakt versetzt und bei 22-24 °C inkubiert. Die Ansätze wurden für 3 Tage mehrfach täglich invertiert bzw. gerührt und schließlich unter Vakuum eingetrocknet. Die Rückstände wurden unter Schütteln und bei 40 °C mit 50 µl 75 % Methanol extrahiert, um Spaltprodukte herauszulösen. In der nachfolgenden Chromatographie störende Puffersalze und Proteine werden dagegen in 75 % Methanol nicht gelöst und wurden anschließend bei 10 000 g abzentrifugiert. Ein (Zucker-substrate) bzw. drei (Cellulose, Hemicellulosen) Mikroliter des klaren Überstandes wurden auf 20x20 cm großen Kieselgel-60 Platten aufgetrennt (vgl. II.3.1). Eine entsprechende Menge des unverdauten Kohlenhydrats wurde jeweils zum Vergleich aufgetragen. Zur Identifizierung der Spaltprodukte wurden authentische Mono- und Oligosaccharide cochromatographiert. Die Platten wurden nach dreimaligem Lauf mit geeigneten Reagenzien (Tabelle III.3) besprüht und im Heizschrank bei 105 °C bzw. 130 °C bis zur maximalen Farbintensität (ca. 5 min) entwickelt [STAHL, 1968].

3.3. *In vitro*-Spaltung chromogener Zucker-Analoga

Die Spaltung chromogener Nitrophenol-Konjugate ist eine gängige Methode für die quantitative Messung enzymatischer Abbauprozesse. Die meisten Carbohydrasen zeigen nur moderate Substratspezifität und sind gegen eine gewisse Bandbreite von Molekülen aktiv. In der Regel akzeptieren Carbohydrasen auch Substrat-Analoga wie die 2- oder 4-Nitrophenyl-Konjugate von Zuckern (formal Disaccharide, die durch Kondensation des Zuckers mit Nitrophenol entstehen). Das bei der Spaltung freigesetzte Nitrophenol dissoziiert in alkalischer Lösung zum gelb gefärbten Phenolat-Anion, dessen Konzentration bei 405 nm photometrisch bestimmt werden kann.

Verwendete Substrate: Die folgenden p-Nitrophenol-Konjugate wurden ad 10 mM in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 5,8 gelöst: p-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranosid, p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid, p-Nitrophenyl- α -D-Galactopyranosid, p-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid, p-Nitrophenyl- β -D-Mannopyranosid, p-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranosid, p-Nitrophenyl- β -D-Glucuronid, p-Nitrophenyl- α -L-Arabinofuranosid. Den Substratlösungen wurde 0,01 % NaN₃ zugesetzt.

Präparation der Darmenzyme: Jeweils drei Larven von *Rhagium inquisitor*, *Leptura rubra*, *Tetropium castaneum* und *Hylotrupes bajulus* wurden in 70 % Ethanol abgetötet und unter eiskaltem PBS (3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM

NaCl, pH 7.0) seziiert. Der vordere Mitteldarm der Tiere wurde einzeln in 500µl PBS zerstoßen und unter leichtem Schwenken für 15 min auf Eis extrahiert. Darmgewebe und Nahrungspartikel wurden bei 10 000 g und 4 °C abzentrifugiert, der klare Überstand mit den gelösten Proteinen als Enzymlösung verwendet. Der Proteingehalt des Präparates wurde mit BIO-RAD Protein-Reagenz (BIO-RAD GmbH, D-80939 München) bestimmt. Hierzu wurde ein Aliquot des Extraktes ad 950 µl mit Wasser verdünnt und mit 50 µl Reagenz versetzt. Die Extinktion der Ansätze wurde nach 5 min Inkubationszeit bei 595 nm im Photometer bestimmt und anhand einer Eichgeraden in absolute Proteinmengen umgerechnet.

Reaktionsansatz und Berechnung der spezifischen Aktivität: Je 10 µl Substratlösung wurden mit 170 µl 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 5,8 und 20 µl Enzympräparat versetzt. Die Ansätze wurden rasch gemischt und bei 24 °C inkubiert, bis sich eine sichtbare Gelbfärbung einstellte. Die Reaktion wurde nach maximal 3 h durch Zugabe von 200 µl Isopropanol gestoppt und die Nitrophenolfärbung durch 600 µl 100 mM Zitronensäure/Phosphatpuffer pH 8,0 entwickelt. Die Extinktion der Ansätze wurde bei 405 nm photometrisch bestimmt und anhand einer Eichgeraden in freigesetztes p-Nitrophenol umgerechnet. Als Blindwert dienten Reaktionsansätze, denen das Enzym erst nach Zugabe des Isopropanols beigemischt wurde (Blank). Die spezifische Aktivität des Darmextraktes wurde als Nitrophenolfreisetzung (NP) pro mg Protein und Minute nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{nmol NP/mg Protein/min} = \frac{\{(OD_{405\text{nm}} - \text{Blank})/0,0148\}/\mu\text{g Protein}}{\text{Inkubationszeit [min]}} * 1000$$

III ERGEBNISSE

1. Morphologie des Cerambyciden-Darmsystems

1.1. Grundlegender Aufbau

Das für Bockkäfer typische Verdauungssystem soll am Beispiel von *Leptura rubra* (Abbildung III.1) betrachtet werden (vgl. auch SCHMIDT, 1965). Der Verdauungsapparat beginnt mit dem nur wenige Millimeter langen und schmalen Vorderdarm, der die Kopfkapsel durchzieht und unmittelbar dahinter in den Mitteldarm mündet. Der vordere Mitteldarm der Bockkäferlarven ist sackartig erweitert und kann bei fressenden Tieren zu beachtlichen Dimensionen anschwellen. Das Darmepithel ist in diesem Bereich stark gefaltet (besonders gut zu beobachten bei *Plagionotus arcuatus* in Abbildung III.2-C) und zeigt eine intensive Peristaltik. Der vordere Mitteldarm verjüngt sich in caudaler Richtung zunehmend und geht etwa auf Höhe des 7. Abdominalsegments in den hinteren Mitteldarm über. Dieser zieht mit dem ersten von insgesamt vier Darmbögen wieder nach cranial bis zum ersten Abdominalsegment und von dort als zweiter Darmbogen wieder nach caudal. Im Bereich der Kehre zwischen erstem und zweitem Bogen ist der hintere Mitteldarm von warzenartigen Strukturen, den Krypten besetzt, welche intensiv mit Tracheen versorgt werden (Abbildung III.1-E). Die Krypten sind bei *Rhagium inquisitor*, *Leptura rubra*, *Plagionotus arcuatus* und *Hylotrupes bajulus* bläschenförmig und über die komplette Darmsoberfläche verstreut, bei *Tetropium castaneum* dagegen als kurze Schläuche in zwei Leisten entlang des Darmes angeordnet. Der hintere Mitteldarm mündet im achten Abdominalsegment in den Hinterdarm, der wie der hintere Mitteldarm eine Schleife ausbildet, bestehend aus dem dritten und vierten Darmbogen. Innerhalb des Hinterdarms ist das Eindicken der unverdauten Nahrungsrestmasse anhand der Bildung der für Bockkäfer typischen zylinderförmigen Kotwalzen zu verfolgen (Abbildung III.2-B). *Hylotrupes*-Larven besitzen unter den untersuchten Arten den mit Abstand längsten Hinterdarm. Der Hinterdarm mündet schließlich mit dem Rectum nach außen (SCHMIDT, 1965).



Abbildung III.1: Morphologie des Cerambycidendarms am Beispiel des Rothalsbocks *Leptura rubra*. **C:** Larve in anbrüchigem Nadelholz. **B:** Imago. **A:** Darmtrakt einer Larve: vMD: vorderer Mitteldarm; hMd1: hinterer Mitteldarm - erste Schlinge; hMd2: hinterer Mitteldarm - zweite Schlinge; HD: Hinterdarm; M: Myzetome. **D:** Myzetomgruppe stark vergrößert. Die Myzetome sind mit Tracheen intensiv versorgt. **E:** Krypten am Übergang zwischen erster und zweiter Schlinge des hinteren Mitteldarmes, stark vergrößert. Zahlreiche Tracheen treten in Kontakt mit den bläschenförmigen Mitteldarmkrypten.

1.2. Vorkommen und Morphologie von Myzetomen

Der vordere Mitteldarm trägt bei *Leptura*, *Tetropium* und *Rhagium* spezielle Anhänge, die mit zahlreichen Tracheen in Kontakt stehen und Hefen beherbergen. Diese sogenannten Myzetome sitzen bei *Leptura rubra* in einer Vielzahl auf zwei transversal verlaufenden Leisten, die den Mitteldarm an seinem Vorderende ringförmig umlaufen. Lediglich dorsal und ventral befindet sich eine schmale Unterbrechung des Myzetomringes, sodaß sich ein linker und ein rechter Halbring ergeben (Abbildung III.1-A und D). Die Myzetome von *Tetropium castaneum* sind in der Relation größere, kugelige Gebilde, die in zwei dicht hintereinander befindlichen Ringen ebenfalls den Mitteldarm an seinem äußersten Vorderende umlaufen (Abbildung III.2-F). Ein zweiter Myzetomring kann mitunter fehlen. Bei *Rhagium inquisitor* sind die Myzetome dagegen traubenartig angeordnet (Abbildung III.2-E) und etwas nach caudal versetzt (Abbildung III.2-A). Sie sitzen in meist vier Gruppen im Bereich der stärksten Ausdehnung dem vorderen Mitteldarm auf. Myzetome fehlen bei *Hylotrupes bajulus* und *Plagionotus arcuatus* (Abbildung III.2-B bzw. C).

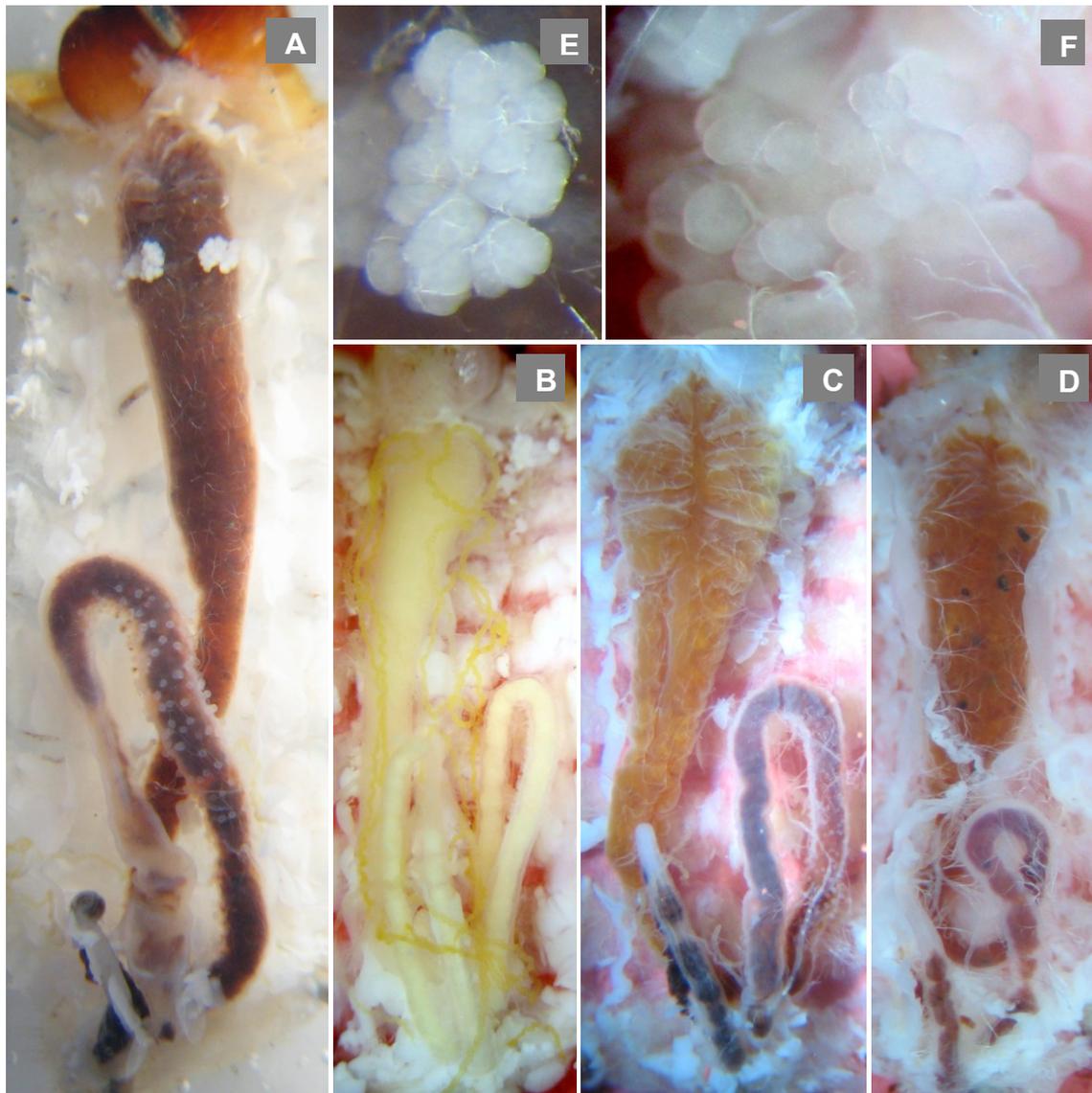


Abbildung III.2: Morphologie des Darmtraktes weiterer Cerambyciden.

A: *Rhagium inquisitor* ; **B:** *Hylotrupes bajulus* ; **C:** *Plagionotus arcuatus* ; **D:** *Tetropium castaneum* .

Die Hauptnahrung der einzelnen Arten zeichnet sich an der Färbung des Darminhalts ab. Das Epithel des vorderen Mitteldarms ist bei allen Arten stark gefaltet. Der vordere Mitteldarm von *R. inquisitor* und *T. castaneum* trägt Myzetome (vergrößerte Bildausschnitte **E** bzw. **F**), während derartige Strukturen bei *H. bajulus* und *P. arcuatus* fehlen.

2. PCR-basierte rRNA-Genbanken

2.1. Bakterielle Darmflora bei Larven von *R. inquisitor*, *L. rubra*, *T. castaneum* und *P. arcuatus*

Die Untersuchung jeweils dreier Larven von *Rhagium inquisitor*, *Leptura rubra* und *Tetropium castaneum*, sowie einer einzelnen Larve von *Plagionotus arcuatus* lieferte insgesamt 264 verwertbare 16S-rRNA-Sequenzen. Die Sequenzen wurden unter den folgenden Bezeichnungen (Accession numbers) in die EMBL Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/embl>) eingestellt: AM940349-AM940435 (*Rhagium inquisitor*), AM940275-AM940348 (*Tetropium castaneum*), AM992730-AM992798 (*Leptura rubra*) und AM940231-AM940274 (*Plagionotus arcuatus*).

Die phylogenetische Analyse der Sequenzen ergab Vertreter aus sechs verschiedenen Phyla der Bakterien: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* und *Bacteroidetes*. Die Sequenzen wurden 51 verschiedenen Bakteriengattungen zugeordnet. Tabelle III.1 zeigt Vorkommen und Häufigkeit der identifizierten Bakteriengattungen in den einzelnen Individuen. Verschiedene Klassen der *Proteobacteria* stellen (außer bei *Leptura rubra*) den größten Anteil der larvalen Darmfloren. Hierbei dominieren in den meisten Fällen γ -*Proteobacteria*; ein Individuum von *Rhagium* und die *Plagionotus*-Larve beherbergen ausschließlich γ -*Proteobacteria*. Während die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft bei den übrigen Larven mehr oder weniger heterogen ist, besteht die Darmflora aller drei *Tetropium*-Larven zum größten Teil aus einem einzigen Vertreter der *Enterobacteriaceae*. FISH-Untersuchungen zeigen, daß dieser Stamm das Darmgewebe der *Tetropium*-Larven besiedelt (Abbildung III.15). Aufgrund dieser speziellen Assoziation ist die *Tetropium*-Darmflora wohl nur bedingt mit der überwiegend frei im Darm lebenden Flora der übrigen Spezies vergleichbar.

α -*Proteobacteria* der Ordnung *Rhizobiales* bilden einen wesentlichen Teil der Darmflora bei jeweils zwei Individuen von *Rhagium* und *Leptura*. Bei dem jeweils dritten Individuum kommen sie dagegen nicht bzw. nur mit einem einzigen Klon vor; *Plagionotus* und *Tetropium* enthalten mit Ausnahme eines einzelnen Klons von *Rhodopseudomonas* (*Tetropium*) ebenfalls keine α -*Proteobacteria*.

Ergebnisse

Phylogenetische Plazierung der 16S- rRNA [Gattungen]	Verwandschaftskreis: Phylum* (Klasse)/Familie	<i>R. inquisitor</i>			<i>L. rubra</i>			<i>T. castaneum</i>			<i>P.a.</i>
		L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1
<i>Sodalis</i>	Enterobacteriaceae		1					14	21	20	
<i>Enterobacter</i>	Enterobacteriaceae	22	2								
<i>Rahnella</i>	Enterobacteriaceae	10		6						1	37
<i>Raoultella</i>	Enterobacteriaceae	1		2							
<i>Pantoea</i>	Enterobacteriaceae			5							6
<i>Klebsiella</i>	Enterobacteriaceae	1		4							
<i>Yersinia</i>	Enterobacteriaceae								1		
<i>Aranicola</i>	Enterobacteriaceae	1								1	1
<i>Serratia</i>	Enterobacteriaceae	1									
<i>Acinetobacter</i>	Moraxellaceae							1			
<i>Pseudomonas</i>	Pseudomonadaceae			1	1						
<i>Pseudoxanthomonas</i>	Xanthomonadaceae		1								
<i>Dyella</i>	Xanthomonadaceae				1		1				
<i>Rhodanobacter</i>	Xanthomonadaceae				1		1				
<i>Luteibacter</i>	Xanthomonadaceae				1						
<i>Xanthomonas</i>	Xanthomonadaceae		1								
<i>Acidisphaera</i>	Acetobacteraceae					2					
<i>Acidocella</i>	Acetobacteraceae					2	1				
<i>Beijerinckia</i>	Beijerinckiaceae					3					
<i>Methylocapsa</i>	Beijerinckiaceae				1	2					
<i>Methylocella</i>	Beijerinckiaceae					1					
<i>Rhodopseudomonas</i>	Bradyrhizobiaceae						1	1			
<i>Bradyrhizobium</i>	Bradyrhizobiaceae						3				
<i>Afipia</i>	Bradyrhizobiaceae		1								
<i>Ochrobactrum</i>	Brucellaceae			6							
<i>Brevundimonas</i>	Caulobacteraceae			1							
<i>Methylosinus</i>	Methylocystaceae						1				
<i>Rhizobium</i>	Rhizobiaceae		2	1							
<i>Agrobacterium</i>	Rhizobiaceae			1							
<i>Labrys</i>	Xanthobacteraceae		1								
<i>Leptothrix</i>	(Burkholderiales)						1				
<i>Pigmentiphaga</i>	Alcaligenaceae			1							
<i>Burkholderia</i>	Burkholderiaceae				6		7				
<i>Acidovorax</i>	Comamonadaceae						2				
<i>Massilia</i>	Oxalobacteraceae		1								
<i>Cellulomonas</i>	Cellulomonadaceae		1	1							
<i>unident. Frankiaceae</i>	Frankiaceae		1								
<i>Gordonia</i>	Gordoniaceae		1								
<i>Microbacterium</i>	Microbacteriaceae			3							
<i>Frigoribacterium</i>	Microbacteriaceae		1								
<i>Aeromicrobium</i>	Nocardioideae		1								
<i>Nocardioides</i>	Nocardioideae		1								
<i>Microlunatus</i>	Propionibacteriaceae		1								
<i>Streptomyces</i>	Streptomycetaceae		1								
<i>Enterococcus</i>	Enterococcaceae			1							
<i>Edaphobacter</i>	Acidobacteriaceae					4	2				
<i>Terriglobus</i>	Acidobacteriaceae					3	1				
<i>unid. Acidobacteria</i>	Acidobacteriaceae					3	4				
<i>unid. Verrucomicrobia</i>						1					
<i>Pedobacter</i>	Sphingobacteriaceae				2						
<i>Sphingoterrabacterium</i>	Sphingoterrabacteria.				10						
<i>Plastiden-16S-rRNA</i>	Zellorganell							2	1		
Anzahl sequenzierter Klone		36	18	33	23	21	25	16	24	23	44

Tabelle III.1: Bakterielle Darmflora verschiedener Cerambyciden-Larven.

PCR-basierte 16S rRNA-Genbanken auf Grundlage genomischer gesamt-DNA. Untersucht wurden jeweils drei Larven von *Rhagium inquisitor*, *Leptura rubra* und *Tetropium castaneum*, sowie eine Larve von *Plagionotus arcuatus* (P.a.). Die Kontrollen ergaben keine spezifischen PCR-Produkte und wurden folglich nicht weiter berücksichtigt. Die Tabelle zeigt die Anzahl sequenzierter Klone, die einer Bakteriengattung zugeordnet wurden.

Farbcode	Phylum*
	γ -Proteobacteria
	α -Proteobacteria
	β -Proteobacteria
	Actinobacteria
	Firmicutes
	Acidobacteria
	Verrucomicrobia
	Bacteroidetes
	Zellorganell

In zwei der drei *Leptura*-Larven finden sich mehrere Sequenzen der Gattung *Burkholderia*, während die dritte Larve überhaupt keinen Vertreter der β -Proteobacteria enthält. Bei *Rhagium* findet sich jeweils ein Einzelklon im Spektrum zweier Individuen. β -Proteobacteria fehlen in der Darmflora von *Tetropium castaneum*.

Actinobacteria kommen in hoher Diversität ausschließlich bei *Rhagium inquisitor* vor: Von insgesamt neun identifizierten Gattungen tritt nur eine einzige mehrfach auf. Das Phylum *Firmicutes* ist ebenfalls exklusiv bei *Rhagium* zu finden, beschränkt sich aber auf einen einzelnen Klon von *Enterococcus*.

Larven von *Leptura rubra* enthalten als einzige Spezies Vertreter der *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria* und *Bacteroidetes*. Während erstere nur durch einen Einzelklon repräsentiert sind, bilden *Acidobacteria* und *Bacteroidetes* einen wesentlichen Anteil der Darmflora, allerdings in getrennten Individuen. Vertreter der *Bacteroidetes* finden sich -wenngleich zahlreich- nur in einem der drei Individuen. Zwei der drei Individuen enthalten viele *Acidobacteria*-Sequenzen.

Von den insgesamt 63 Sequenzen aus *Tetropium castaneum*-Larven wurden drei als Plastiden-rRNA identifiziert.

Die Darmfloren der verschiedenen Bockkäferarten unterscheiden sich erheblich; bei *Rhagium* und *Leptura* bestehen auch innerartlich große Unterschiede.

2.2. Bakterielle Darmflora bei Larven von *Hylotrupes bajulus*

2.2.1. Serie 1

Vier Larven von *Hylotrupes*, davon drei Wildtiere und eine Larve aus Laborzucht, wurden zunächst mit derselben Methodik wie die übrigen Bockkäfer untersucht. Diese als Serie 1 bezeichneten Larven lieferten insgesamt 39 rRNA-Sequenzen aus den Phyla der *Proteobacteria*, *Actinobacteria* und *Firmicutes* (Tabelle III.2). Letztere sind als

einzigste Gruppe in allen vier Larven vertreten. Die Gattung *Bacillus* kommt als einzige in einem weiteren Individuum vor. Larve Nr. 3 liefert ausschließlich Klone von *Spiroplasma*. Die Klone der Gattungen *Acinetobacter* und *Stenotrophomonas* in zwei der Larven finden sich auch in der Negativkontrolle und stellen Verunreinigungen dar. Die bei den übrigen Bockkäferarten häufigen γ -Proteobacteria beschränken sich mit der Gattung *Rahnella* auf eine einzige Larve. β -Proteobacteria und Actinobacteria sind jeweils nur durch einen bzw. zwei Einzelklone repräsentiert. Ein wesentlicher Anteil (12 von 39) der Sequenzen besteht aus Nonsens-Sequenzen² und Plastiden-rRNA, die wie bei *Tetropium castaneum* (vgl. Tabelle III.1) aus der Holznahrung der Tiere amplifiziert wurde. Die Larven der Serie 1 bieten ein uneinheitliches und schwer interpretierbares Bild. Gesetzmäßigkeiten in der Verteilung der Bakterien sind nicht erkennbar. Ein offenkundiger Unterschied zwischen den freilebenden Larven und der Laborzucht besteht nicht.

Phylogenetische Platzierung der 16S rRNA [Gattungen]	Verwandtschaftskreis: Phylum* (Klasse)/Familie	Larve 1 (WF)	Larve 2 (WF)	Larve 3 (WF)	Larve 4 (LZ)	PCR-Kontr. (H ₂ O)
<i>Acinetobacter</i>	Moraxellaceae	1				8
<i>Marinobacter</i>	Alteromonadaceae					1
<i>Idiomarina</i>	Idiomarinaceae					3
<i>Escherichia</i>	Enterobacteriaceae					3
<i>Rahnella</i>	Enterobacteriaceae				2	
<i>Stenotrophomonas</i>	Xanthomonadaceae	2				1
<i>Acidovorax</i>	Comamonadaceae	1				
unident. Actinobacterium	Actinobacteria	1				
<i>Microbacterium</i>	Micrococcineae		1			
<i>Bacillus</i>	Bacillaceae		4		3	
<i>Spiroplasma</i>	Spiroplasmataceae			10		
<i>Streptococcus</i>	Streptococcaceae	2				
Plastiden-16S-rRNA	Zellorganell		3			
unidentifizierbare Sequenzen	Kein Alignment	3	1		5	

Farbcode	Phylum*
	γ -Proteobacteria
	β -Proteobacteria
	Actinobacteria
	Firmicutes
	Plastiden

Tabelle III.2: Bakterielle Darmflora von *Hylotrupes bajulus*-Larven, Serie 1.

PCR-basierte 16S rRNA-Genbanken aus 4 Einzeltieren, hiervon 3 Wildtiere (WF) und 1 aus Laborzucht (LZ) auf Grundlage genomischer gesamt-DNA.

² Nonsens-Sequenzen besitzen keinerlei Ähnlichkeit zu irgendwelchen Datenbankeinträgen und sind in der Regel PCR-Artefakte, die aufgrund unspezifischer Replikations- und/oder Rekombinationsereignisse entstehen.

2.2.2. Serie 2

Eine zweite und größere Serie von *Hylotrupes*-Larven, bestehend aus drei Wildtieren und drei im Labor gezüchteten Tieren, wurde unter Verwendung verschiedener DNA-Isolationsmethoden untersucht. Die bei anderen Bockkäfern bewährte CTAB-Methode wurde im Vergleich mit zwei auf Silica-Säulchen basierenden Kits namhafter Hersteller bei jeweils einer wildlebenden und einer gezüchteten Larve verwendet. Serie 2 ergab inklusive der Kontrollen 134 16s-rRNA-Sequenzen (Tabelle III.3). Das Gros der Sequenzen repräsentiert Vertreter der α - β -, und γ -*Proteobacteria*. Drei Sequenzen wurden als *Actinobacteria*, zwei weitere als Vertreter der *Bacteroidetes* identifiziert; die beiden letzteren Phyla treten nur in den Larven 1 und 2 auf, deren DNA mit dem PeqGOLD-Kit isoliert wurde.

Phylogenetische Platzierung der 16S rRNA [Gattungen]	Verwandtschaftskreis: Phylum* (Klasse)/Familie	L 1 (WF)	L 2 (LZ)	L 3 (WF)	L 4 (LZ)	L 5 (WF)	L 6 (LZ)	Int. Kon. (FK)	PCR-Kont. (H ₂ O)
<i>Acinetobacter</i>	Moraxellaceae					9			1
<i>Marinobacter</i>	Alteromonadaceae					1			3
<i>Idiomarina</i>	Idiomarinaceae					2			3
<i>Escherichia</i>	Enterobacteriaceae					3			1
<i>Pseudomonas</i>	Pseudomonadaceae	1							2
<i>Alkanivorax</i>	Alcanivoracaceae								1
<i>Delftia</i>	Comamonadaceae	1						1	
<i>Variovorax</i>	Comamonadaceae	2							
<i>Ralstonia</i>	Burkholderiaceae			2	3	1	1	7	
<i>Neisseria</i>	Neisseriaceae						1		
<i>Brevundimonas</i>	Caulobacteraceae		6	12	12	1	13	19	
<i>Ochrobactrum</i>	Brucellaceae			1			1		
<i>Bradyrhizobium</i>	Bradyrhizobiaceae	3	2			9	1	1	
<i>Mesorhizobium</i>	Phyllobacteriaceae	1	1						
<i>Rhodococcus</i>	Nocardiaceae	1	1						
<i>Leifsonia</i>	Microbacteriaceae		1						
<i>Flavobacterium</i>	Flavobacteriaceae	2							
unident. Sequenzen	Kein Alignment					1			
Anzahl sequenzierter Klone		11	11	15	15	27	17	28	11

Tabelle III.3: Bakterielle Darmflora von *Hylotrupes bajulus*-Larven, Serie 2.

PCR-basierte 16S rRNA-Genbanken auf Grundlage von genomischer gesamt-DNA aus dem kompletten Verdauungstrakt der Tiere. Im Vergleich verschiedene DNA-Isolationsmethoden: L1, L2: PeqGOLD-Kit; L3, L4: Qiagen DNeasy Tissue Kit; L5, L6: CTAB-Protokoll. Von insgesamt 6 Einzeltieren sind jeweils 3 Wildtiere (WF) und 3 aus Laborzucht (LZ). Als interne Kontrolle wurden Teile der Fettkörper (FK) der Larven verwendet.

Farbcode	Phylum*
	γ -Proteobacteria
	β -Proteobacteria
	α -Proteobacteria
	Actinobacteria
	Bacteroidetes

γ -*Proteobacteria* finden sich mit einer Ausnahme (ein *Pseudomonas*-Klon bei Larve 1) gehäuft und exklusiv bei Larve 5 (CTAB-Protokoll). Ein Vergleich mit der PCR-Kontrolle weist allerdings alle identifizierten Gattungen der γ -Proteobakterien als Kontaminanten aus.

Ähnlich verhält es sich mit Vertretern der α - und β -*Proteobacteria*: Wenngleich *Ralstonia*, *Bradyrhizobium* und *Brevundimonas* in fast allen Larven gefunden wurden, handelt es sich auch bei diesen Klonen um Kontamination (vgl. interne Kontrollprobe).

Die Aufarbeitung weiterer 6 Larven erbrachte keine zusätzlichen Erkenntnisse im Vergleich zu Serie 1. Die unterschiedlichen DNA-Isolationsmethoden haben keinen wesentlichen Einfluß auf das Spektrum der identifizierten Mikroorganismen.

2.3. Pilze im Verdauungstrakt von *Hylotrupes bajulus*

Primerpaar		Länge des Amplicons [kb]	PCR erfolgreich	Identifikation mittels BLAST - entsprechende accession-number
→	←			
EF4	EF3	(1,5)	nein	-
EF4	Fung5r	(0,6)	nein	-
NS1	EF3	1,8	ja	<i>Batyle suturalis</i> - AF267407
NS1	FR1	1,5	ja	<i>Cellulosimicrobium</i> spec. - AY665978
				<i>Batyle suturalis</i> - AF267407
NS1	EF390	1,2	ja	<i>Batyle suturalis</i> - AF267407
ITS1f	ITS4	1,5	ja	<i>Hylotrupes bajulus</i> ITS - EU057978
ITS1f	NLB3	(1,0)	nein	-
NSII	ITS4	0,73	ja	<i>Trichosporon</i> spec. - z.B. AF455425
		1,0		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - Z73326
		1,7		<i>Hylotrupes bajulus</i> ITS - EU057978
NSII	NLB3	-	nein	-
FF390	NLB3	(1,5)	nein	-
FF390	ITS4	(1,3)	nein	-

Tabelle III.4: PCR-basierte Suche nach Pilzen im Verdauungstrakt von *Hylotrupes bajulus*-Larven. Die wenigsten der publizierten Primer diskriminieren zwischen Pilzen und Invertebraten. Positive PCR-Ergebnisse erwiesen sich meist als Amplifikate der Wirtsgene und/oder Kontamination. In Klammern gesetzte Amplifikat-Größen beziehen sich auf mitgeführte Kontroll-Templates in Form von genomischer *Saccharomyces*-DNA.

Die PCR-basierte Suche nach Pilzen im Verdauungstrakt von *Hylotrupes bajulus* erwies sich als schwierig. Bei sechs von insgesamt zehn Primerpaarungen ergab bereits die PCR-Reaktion keine erkennbaren Produkte. Eine Erhöhung der Zyklenanzahl oder der MgCl₂-Konzentrationen bzw. eine Absenkung der Annealingtemperatur führten bei diesen Primerpaaren lediglich zum Anstieg unspezifischer PCR-Produkte. Die mit den

verbleibenden fünf Primerpaaren erzielten PCR-Produkte erwiesen sich nach ihrer Klonierung und Sequenzierung meist als rRNA-Sequenzen des Wirtskäfers *Hylotrupes bajulus*. Eine BLAST-Analyse ergab entweder *Hylotrupes* selbst oder mit *Batyle suturalis* einen nah verwandten Cerambyciden. Die Primerpaarung NSI1/ITS4 lieferte neben der Sequenz des Wirtskäfers pilzliche Sequenzen in Form von *Saccharomyces cerevisiae* und *Trichosporon spec.* Dieser Befund ließ sich allerdings in Wiederholungen nicht weiter erhärten. Viele der als pilzspezifisch publizierten PCR-Primer diskriminieren nicht zwischen Pilzen und Invertebraten und sind bei der Arbeit mit Insekten folglich ungeeignet. Primerpaarungen, bei denen bereits die PCR-Reaktion fehlschlug, sind demnach zwar hinreichend pilzspezifisch, erbrachten jedoch ebenfalls keine reproduzierbare Identifikation potentieller Pilzsymbionten bei *Hylotrupes bajulus*.

3. Kultivierungsversuche

3.1. Kultivierungsversuche der Darminhalte von *R. inquisitor*, *L. rubra* und *T. castaneum*

Tabelle III.5 zeigt die kultivierbaren Bakterien- und Pilzstämmen aus dem Verdauungssystem jeweils dreier Individuen der Arten *Rhagium inquisitor*, *Leptura rubra* und *Tetropium castaneum*. Die Myzetom-Symbionten von *Rhagium* (*Candida rhagii*) und *Leptura* (*Candida shehatae*) finden sich in jeder Larve und erreichen in Darmhomogenaten Zelldichten von 10^5 bis 10^7 CFU/ml (*colony forming units/ml*). Innerhalb des Myzetomgewebes ist die Zelldichte entsprechend höher (10^7 bis 10^9 CFU/ml). Sie stellen damit in der Regel das Gros der mikrobiellen Flora. Der Myzetom-Symbiont von *Tetropium castaneum* ließ sich nicht kultivieren; seine Dichte und Phylogenie sind daher unbekannt.

	<i>Rhagium inquisitor</i>			<i>Leptura rubra</i>			<i>Tetropium castaneum</i>		
Phylogenetische Plazierung der 16/18S rRNA [Gattungen]	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3
Bacteria									
<i>Pseudomonas</i>	3,1x10 ⁴	5,7x10 ⁵	3,0x10 ⁵						
<i>Rahnella</i>	2,5x10 ³						2,8x10 ⁴	1,2x10 ⁶	1,5x10 ⁵
<i>Raoultella</i>		6,8x10 ⁵							8,5x10 ⁴
<i>Enterobacter</i>		2,8x10 ⁵							
<i>Klebsiella</i>			4,0x10 ⁴						
<i>Stenotrophomonas</i>			1,2x10 ⁵						
<i>Pantoea</i>								1,3x10 ⁴	9,8x10 ⁴
<i>Bacillus</i>			2,5x10 ⁵						
<i>Lactococcus</i>							2,0x10 ⁶		
<i>Staphylococcus</i>					2,7x10 ⁶				
<i>Delftia</i>		1,9x10 ⁵							
<i>Burkholderia I</i>				2,5x10 ⁵		1,0x10 ⁵			
<i>Burkholderia II</i>				1,2x10 ⁴		4,5x10 ⁴			
<i>Chryseobacterium</i>		4,5x10 ⁵							
Fungi									
<i>Candida rhagii</i>	1,4x10 ⁷	4,0x10 ⁵	2,0x10 ⁶						
<i>Candida shehatae</i>				3,3x10 ⁷	1,2x10 ⁷	2,5x10 ⁷			
<i>Candida bertae</i>				2,5x10 ⁴					
<i>C. castrensis</i>					1,3x10 ⁶				
<i>C. lignicola</i>						4,0x10 ⁶			
<i>Pichia canadensis</i>							2,3x10 ⁵	2,8x10 ⁶	
<i>Pichia pinus</i>									3,1x10 ⁵
<i>C. tenuis</i>							2,5x10 ⁴		3,8x10 ⁵
<i>C. oregonensis</i>									1,8x10 ⁵

Tabelle III.5: Kultivierbare Bakterien- und Pilzflora in verschiedenen Bockkäferlarven. Untersucht wurden jeweils drei Larven von *Rhagium inquisitor*, *Leptura rubra* und *Tetropium castaneum*. Die Identität der verschiedenen Isolate basiert auf ihrer 16/18-S-rRNA-Sequenz. Die angegebenen Zelldichten beziehen sich auf das Volumen des kompletten Darmsystems in CFU/ml (*colony-forming units/ml*). Stämme unter 100 CFU/ml wurden nicht berücksichtigt.

Frei im Darminhalt lebende Bakterien und Hefen erreichen meist nur Zelldichten von 10³ bis maximal 10⁶ und zeigen wenig Konstanz in Zusammensetzung und Dichte. Eine in beinahe allen *Rhagium*-Larven anzutreffende Bakteriengattung ist *Pseudomonas*. Daneben ist *Rahnella* mit einiger Regelmäßigkeit der häufigste Vertreter der γ -Proteobakterien in Larven der Rindenfresser *Tetropium* und *Rhagium*. Weitere Gattungen wie *Raoultella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas* und *Pantoea* kommen nur bei einzelnen Larven vor. *Leptura*-Larven beinhalten praktisch keine Vertreter der γ -Proteobakterien. Gelegentlich tritt das Phylum *Firmicutes* mit den Gattungen *Bacillus*, *Lactococcus* und *Staphylococcus* auf. In den Kulturen zweier *Leptura*-Individuen liegen neben Hefen ausschließlich β -Proteobacteria vor. Ihre rRNA-Sequenzen wurden zwei verschiedenen Stämmen der Gattung *Burkholderia*

zugeordnet. Das Phylum *Bacteroidetes* wird repräsentiert durch einen Einzelfund der Gattung *Chryseobacterium* in einer Larve von *Rhagium*.

Neben Bakterien konnten aus dem Darminhalt von *Rhagium*, *Leptura*, *Tetropium* und *Plagionotus* Hefen isoliert werden, die in den meisten Fällen dem Formenkreis *Candida* anzuschließen sind. Abbildung III.3 zeigt die phylogenetische Position der Isolate sowie ihrer nächsten Verwandten auf Basis der 18S-rRNA-Sequenzen. In Tabelle III.5 wurden die Stämme der Einfachheit halber nach ihrem nächsten Verwandten benannt, da eine Zuordnung aufgrund der derzeit chaotischen Taxonomie innerhalb der künstlichen Gattung *Candida* ohnehin nur unter Vorbehalt möglich ist. Larven von *Leptura rubra* enthalten neben ihren Myzetom-Symbionten *Candida bertae*, *Candida castrensis* und *Candida lignicola* - oftmals in wechselnden Kombinationen. Ein *Candida lignicola* nahestehender Stamm wurde auch aus einer Einzellarve von *Rhagium inquisitor* isoliert (aufgrund vernachlässigbarer Zelldichte in Tabelle III.5 nicht berücksichtigt). In ähnlicher Weise finden sich zusätzliche Hefestämme in Form von *Pichia canadensis*, *Pichia pinus*, *Candida tenuis* und *Candida oregonensis* in den Larven von *Tetropium castaneum*. Ein nahezu identischer *Candida tenuis*-Stamm konnte aus einer Larve von *Plagionotus arcuatus* isoliert werden (aufgrund vernachlässigbarer Zelldichte in Tabelle III.5 nicht berücksichtigt).

Die folgenden Hefeisolate wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Inhoffenstraße 7 B, D-38124 Braunschweig) aufgenommen: *Candida lignicola* (DSM 19310) - FM163366, *Candida shehatae*³ (DSM 21437) - FM163369, *Candida tenuis* (DSM 19311 - FM163367, *Candida tenuis* (DSM 19312) - FM163368, *Candida lignicola* (DSM 19313) - FM163364, und *Candida castrensis* (DSM 19516)- FM163365.

³ Das Isolat mit der DSM-Nummer 21437 wird von der DSMZ als *Candida tenuis* geführt, da es in Kohlenstoff-Assimilationstests am ehesten diesem Referenz-Muster entspricht. Unter der früher beschriebenen Spezies *C. tenuis* werden vermutlich etliche physiologisch kaum unterscheidbare Hefearten vereinigt, die phylogenetisch jedoch nicht identisch sind.

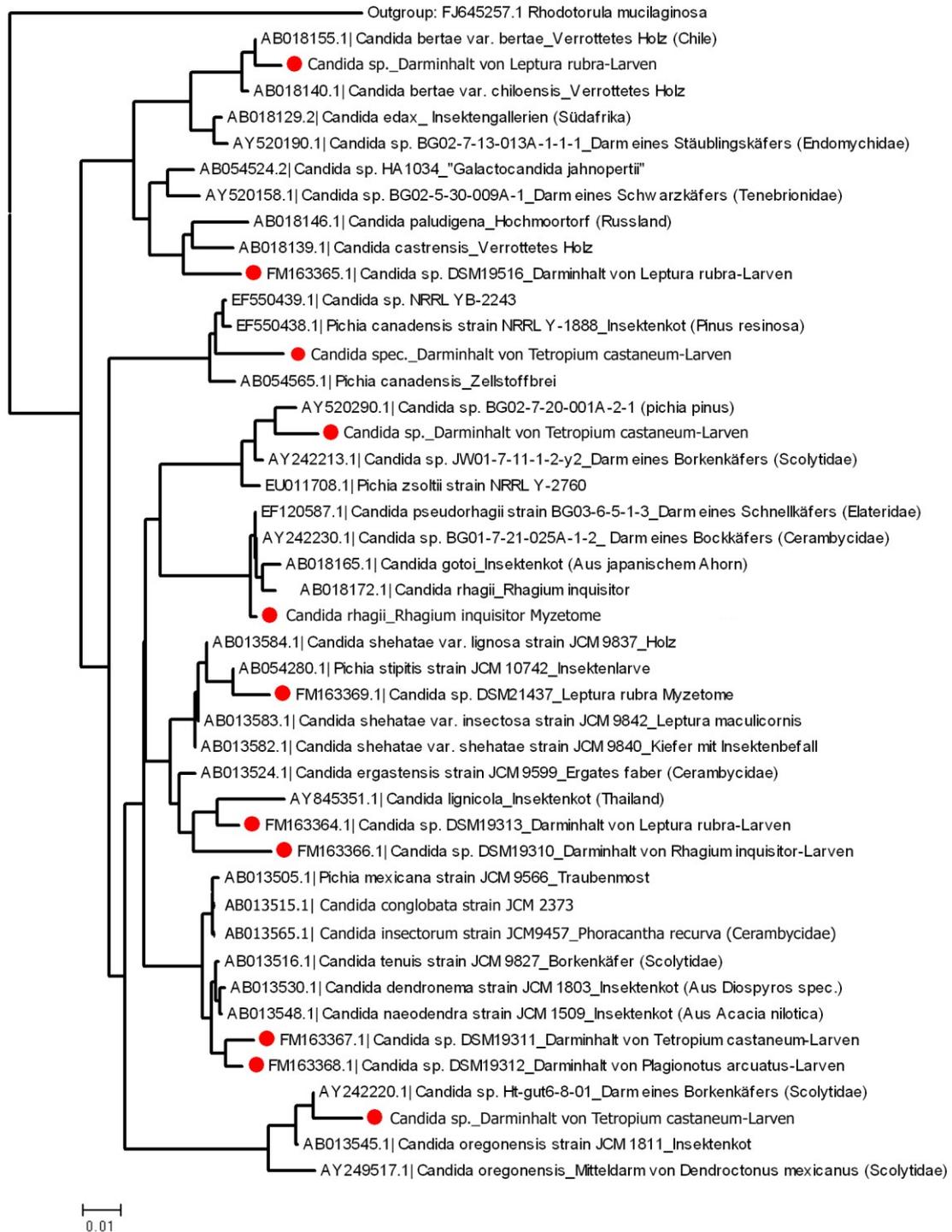


Abbildung III.3: Phylogenetische Position der Hefe-Isolate aus *Rhagium inquisitor*, *Leptura rubra*, *Tetropium castaneum* und *Plagionotus arcuatus*. Neighbour-joining-Baum auf Basis entsprechender 18S rRNA-Sequenzen, berechnet mit ClustalW. Maßstab entspricht 0,01% evolutionärer Distanz. Rote Punkte markieren die Position der Isolate.

3.2. Kultivierungsversuche des Darminhaltes von *Hylotrupes bajulus*-Larven

Trotz des erweiterten Spektrums an Kulturmedien konnten im Gegensatz zu allen anderen Bockkäferarten keinerlei Mikroorganismen aus dem Darm von insgesamt 12 *Hylotrupes*-Larven isoliert werden. Die Nährböden blieben auch nach 14 Tagen Inkubationszeit völlig frei von Bewuchs.

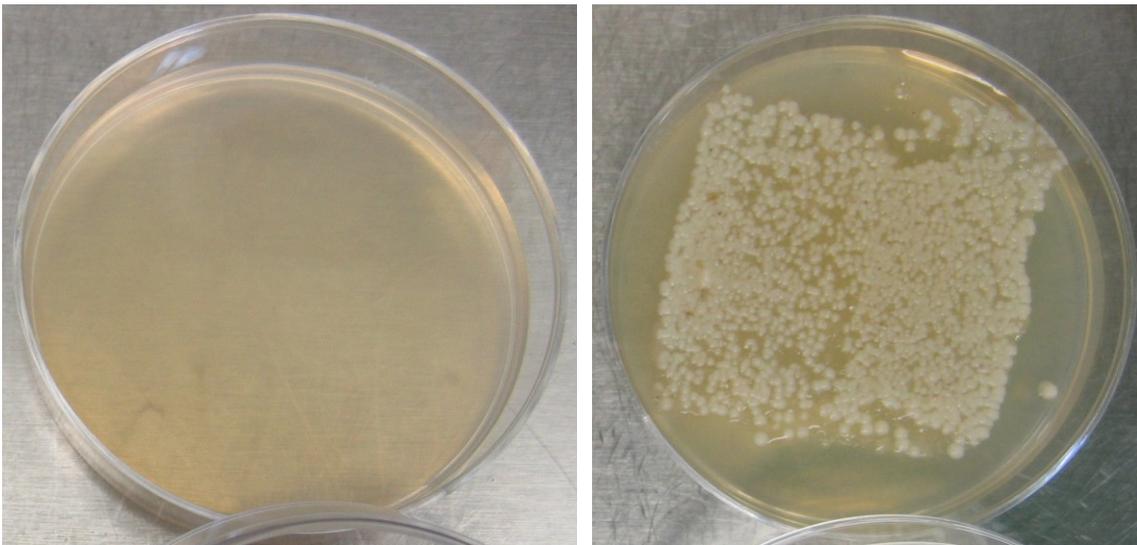


Abbildung III.4: Mikrobewuchs in ausplattiertem Darminhalt. Rechts: *Rhagium inquisitor*. Links: *Hylotrupes bajulus*. In beiden Fällen wurden 100 µl einer 1:100-Verdünnung des Darminhalts ausgestrichen. Während sich bei *Rhagium* bereits nach zwei Tagen Inkubation ein intensiver Bewuchs von Hefen und Bakterien entwickelt hat, sind bei *Hylotrupes* auch nach 14 Tagen keinerlei Mikroorganismen zu beobachten. Die kultivierbaren Stämme bei *Rhagium* wachsen bereitwillig auf verschiedensten Medien.

4. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH)

4.1. Evaluation der pilzspezifischen Oligonucleotidsonden PF326 und PF1200

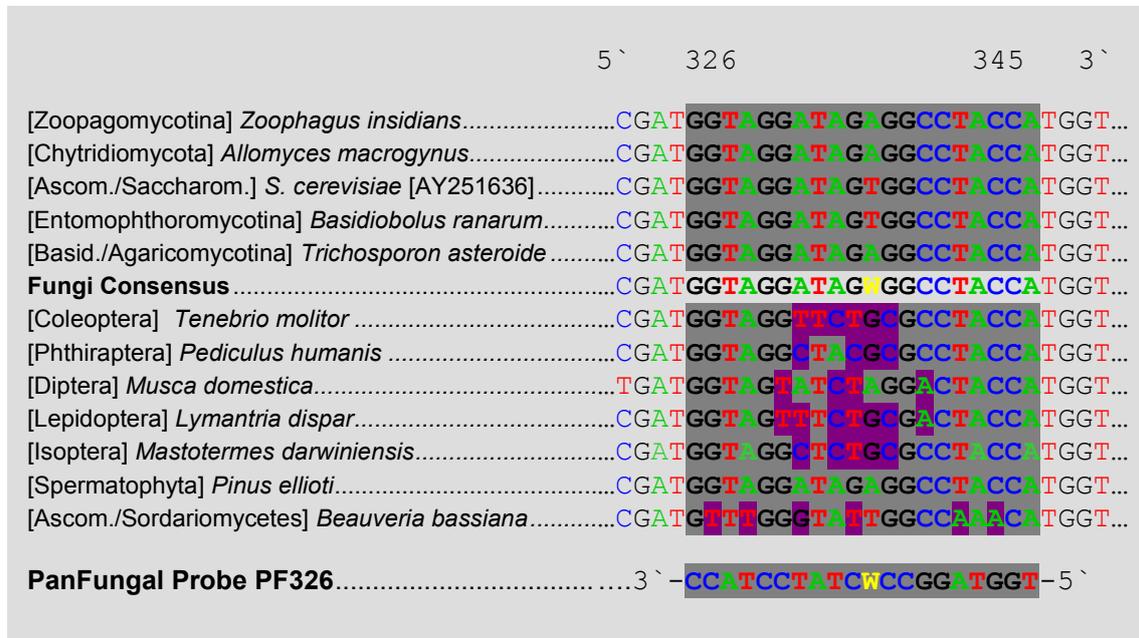


Abbildung III.5: In silico-Analyse der 18S-rRNA-Oligonucleotidsonde PF326.

Gezeigt ist die Bindungsstelle der Sonde von Position 326 bis 345 des *S. cerevisiae*-Gens auf der 18S rDNA bei ausgewählten Ziel- und Nichtziel-Organismen. Positionen, die nicht komplementär zur Sondensequenz sind, wurden violett hinterlegt. Das vollständige Alignment mit allen getesteten Ziel- und Nichtziel-Sequenzen ist im Anhang zu sehen.

In silico-Analyse PF326: Die Bindungsstelle der Sonde PF326 ist mit einer degenerierten Base (W=A/T) weitestgehend konserviert bei *Ascomycota* und *Basidiomycota*. Während bei den *Basidiomycota* nur in Einzelfällen abweichende Positionen auftreten, gibt es bei den *Ascomycota* mit den *Sordariomycetes* (vgl. *Beauveria bassiana*) und *Erysiphales* allerdings einige phylogenetisch zusammenhängende Bereiche, die von PF326 nicht abgedeckt werden. Mehrheitlich nicht erkannt werden außerdem die *Mucoromycotina* (die Kerngruppe der früheren *Zygomycota*). Die Bindungsstelle ist bei diesen Gruppen in der Regel stark verändert und weist 5 oder mehr Abweichungen auf, die eine Bindung der Sonde ausschließen. PF326 erkennt dagegen alle getesteten Vertreter der *Saccharomycetes*, die als bislang häufigste Symbiose-Partner bei Insekten von maßgeblicher Bedeutung sind. Dementsprechend erkennt die Sonde *in silico* insbesondere auch die meisten Hefeisolate aus Insekten, mit Ausnahme einiger Grashüpfer- und Aphiden-Symbionten, die den

Sordariomycetes nahestehen [FUKATSU&ISHIKAWA, 1996; SUH et al., 2001]. Darüber hinaus ist die Bindungsstelle von PF326 auch bei den meisten ursprünglichen Pilz-Gruppen erhalten (ausgenommen die bereits genannten *Mucoromycotina*). PF326 erkennt alle getesteten *Chytridiomycota* (ohne *Monoblepharidales*), *Blastocladiomycota* und *Zoopagomycotina*, sowie Teile der *Entomophthoromycotina*. Die entsprechende Position der rRNA ist dagegen durchgehend variabel bei allen getesteten Ordnungen der Insekten und zeigt stets mindestens 4, meistens 5 (bis zu 7 bei *Lepidoptera*) Basenabweichungen vom Consensus der meisten Pilze. Der beachtliche Anteil an veränderten Positionen und deren zentrale Lage in der Mitte des Oligonucleotids dürfte eine Fehlbindung der Sonde unmöglich machen und in der Praxis eine ausgezeichnete Diskriminierung von pilzlichen Symbionten und Insektengewebe erlauben.

Pflanzliche 18S-rRNA-Sequenzen unterscheiden sich an dieser Position nicht (vgl. *Pinus spec.*) oder kaum von denen bei Pilzen.

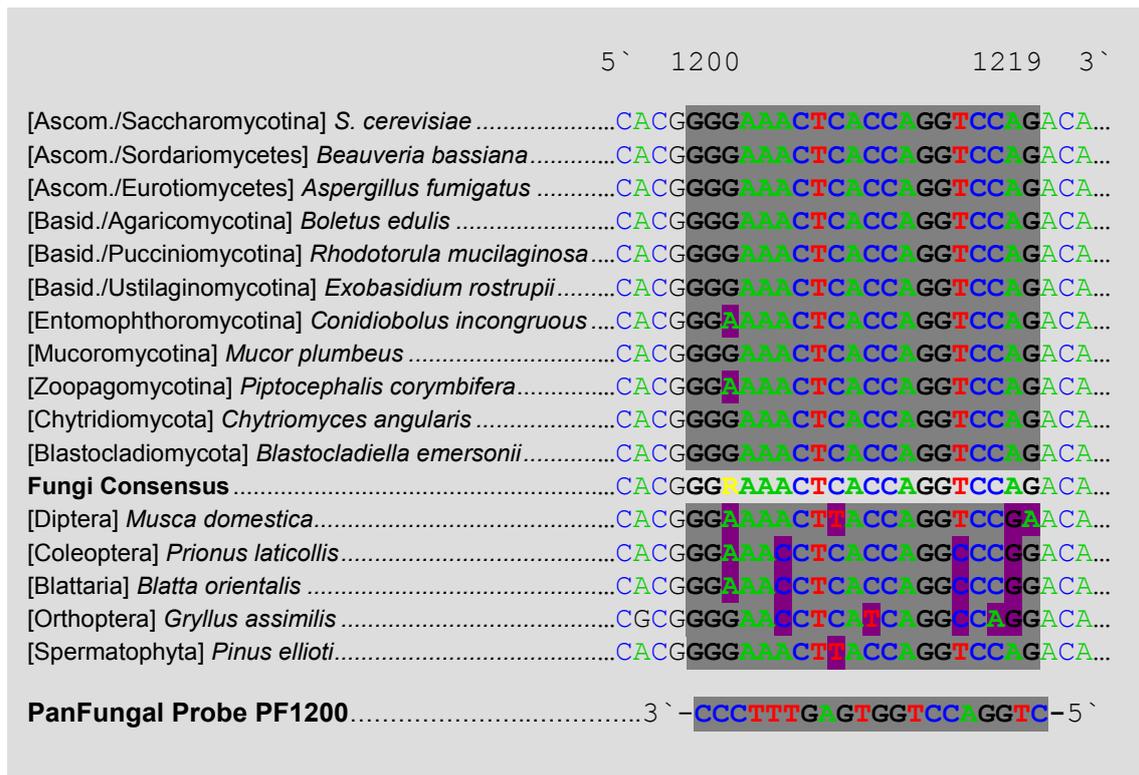


Abbildung III.6: *In silico*-Analyse der Oligonucleotidsonde PF1200.

Gezeigt ist die Bindungsstelle der Sonde von Position 1200 bis 1219 des *S. cerevisiae*-Gens auf der 18S-rRNA bei ausgewählten Ziel- und Nichtziel-Organismen (dunkel hinterlegter Sequenzbereich). Positionen, die nicht komplementär zur Sondensequenz sind, erscheinen violett hinterlegt. Das vollständige Alignment der 18S-rRNA-Sequenzen aller getesteten Organismen ist im Anhang zu sehen.

***In silico*-Analyse PF1200:** Die Bindungsstelle der Sonde PF1200 ist mit Ausnahme einiger *Ustilaginomycetes* bei fast allen niederen und höheren Pilzen unverändert. Abweichende Basen kommen in Einzelfällen hauptsächlich bei den ursprünglicheren Gruppen der Pilze (*Zoopagomycotina*, *Entomophthoromycotina*) vor, dann jedoch vereinzelt und meist an den Flanken des Oligonucleotids, so daß die Sonde bei geeigneten Bedingungen trotz einer Fehlpaarung an die Zielsequenz zu binden vermag (Abbildung III.6). Der zwar bei mehreren Vertretern zu beobachtende Basenaustausch an Position 1202 (A anstatt G) wurde in der Sequenz der Sonde nicht berücksichtigt, da er bei Pilzen insgesamt selten ist und zu vielen Insekten-Ordnungen eine zusätzliche Diskrepanz darstellt. Die Bindungsstelle von PF1200 ist bei den getesteten Insekten wesentlich variabler und zeigt meist 4, bei manchen Ordnungen auch 3 oder 5 abweichende Positionen, die über die ganze Länge des Oligonucleotids verteilt sind. Wenngleich einige Fehlpaarungen an den Flanken der Sonde liegen, dürfte deren Anzahl und Verteilung auch bei PF1200 eine zuverlässige Unterscheidung von Pilz- und Insektensequenz ermöglichen. PF1200 schließt die Lücken im Spektrum von PF326

(und umgekehrt), sodaß die beiden Sonden in Kombination nahezu alle niederen und höheren Pilze abdecken. Wie bei PF326 ermöglicht die Sequenz von PF1200 keine (In der Regel lediglich 1 Fehlpaarung) Unterscheidung von Pilzen und Pflanzen. Dadurch könnten pflanzliche Nahrungspartikel im Darm der Insekten markiert werden, sofern sie noch ausreichend intakte Ribosomen enthalten. Ein Vergleich der beiden Sonden mit der BLAST-Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) zeigt, daß sie außerhalb der Pilze auch Cryptomonaden, Myxozoen, Schwämme und Vertreter der *Alveolata* erkennen. Wenngleich irrelevant im Zusammenhang mit Insekten, schränkt dies die generelle Verwendbarkeit der Sonden freilich etwas ein.

PF326 und PF1200 markieren in der Praxis spezifisch die Zellen der pilzlichen Symbionten, ohne an das Wirtsgewebe zu binden (Abbildung III.7). Ein Einsatz von Formamid ist hierzu nicht erforderlich. PF326 bindet im Gegensatz zu PF1200 nicht an das Mycel des Sordariomyceten *Beauveria bassiana* und bestätigt damit die Vorhersage des Sequenzvergleichs. Die Zielposition der beiden Oligonucleotide am Ribosom zeichnet sich durch mittlere (PF326) bzw. sehr gute (PF1200) Zugänglichkeit aus [BEHRENS et al., 2003]. Eindeutig detektierbare Fluoreszenzsignale belegen die praktische Eignung beider Sonden.

CSH670 markiert die Mikroorganismen in den Myzetomen von *Leptura rubra*-Larven, nicht jedoch die bei *Rhagium* und *Tetropium*. CRI670 bindet an die Symbionten von *Rhagium* und *Tetropium*, selbst unter Einsatz der maximal möglichen Formamidkonzentration (30 %). In Unkenntnis der rRNA-Sequenz des *Tetropium*-Symbionten ist es nicht möglich, diese Kreuzreaktion auszuschließen. Die alternative Sonde CRI174 erzielt zwar ein schwächeres Fluoreszenzsignal, erlaubt bei einer Formamidkonzentration von 20 % aber eine eindeutige Identifizierung des *Rhagium*-Symbionten.

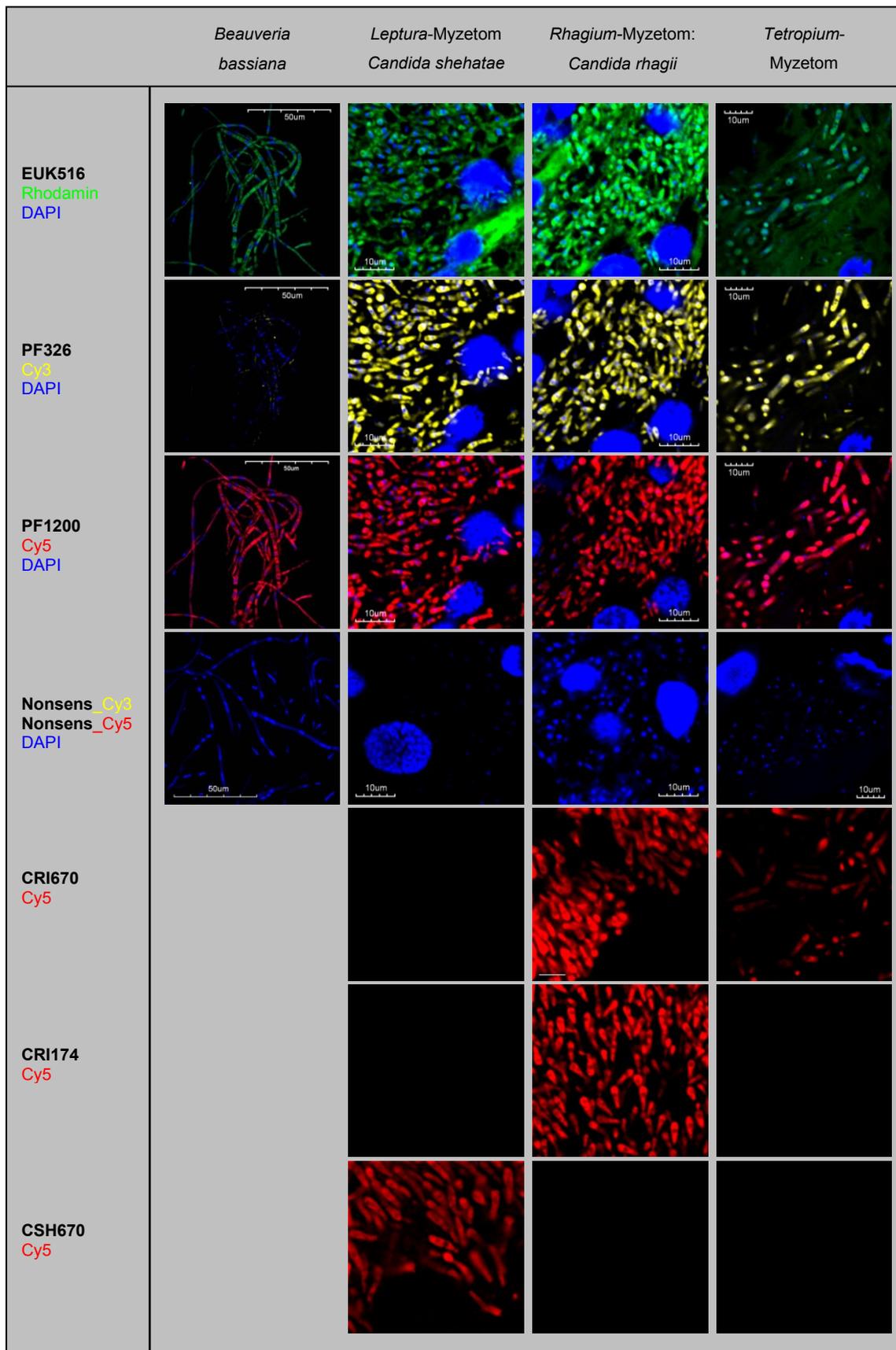


Abbildung III.7: Spezifität der verwendeten 18S-Oligonucleotidsonden.
In-situ-Hybridisierung von Dünnschnitten durch Myzetome der Larven von *Leptura rubra* (mit *Candida shehatae*), *Rhagium inquisitor* (mit *Candida rhagii*) und *Tetropium castaneum* (Phylogenie des Symbionten unbekannt) bzw. Myzel aus Flüssigkultur (*Beauveria bassiana*).

4.2. Pilzliche Symbionten in Darmsystem und Myzetomen

4.2.1. *Rhagium inquisitor*

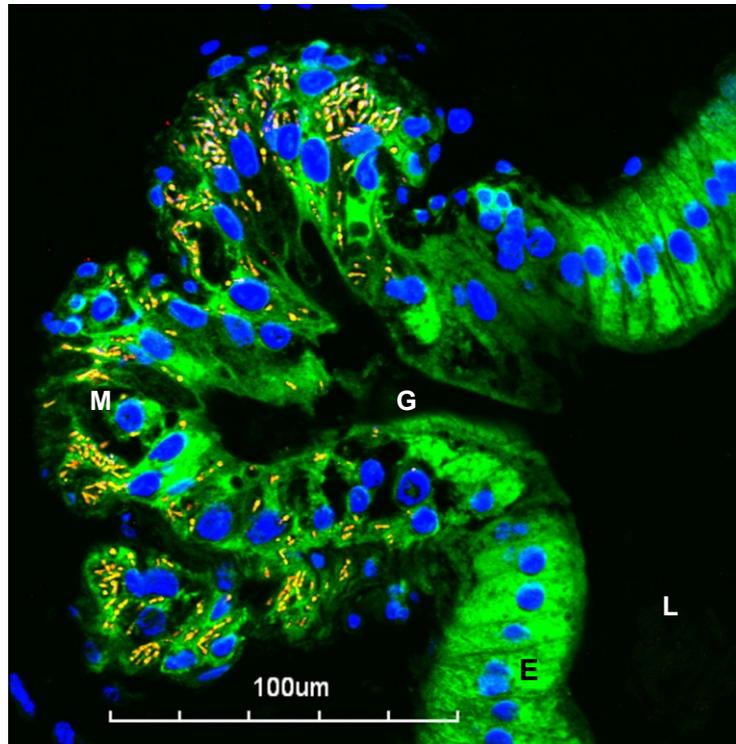


Abbildung III.8: Junge Myzetomgruppe am vorderen Mitteldarm einer *Rhagium inquisitor*-Larve. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Wirtszellen wurden in grün, symbiontische Hefezellen in rot dargestellt; Zellkerne erscheinen in blau. Durch die Überlagerung von grün und rot ergeben sich orange Farbtöne für die Symbionten.

Verwendete Sonden und Fluorochrome: Grün: EUK516_Rhodamin; Rot (Orange): PF326_Cy3; Blau: DAPI.

Die jungen Myzetome (M) entwickeln sich aus normalem Epithel (E) des vorderen Mitteldarmes und sind über einen gemeinsamen ausführenden Gang (G) mit dem Darmlumen (L) verbunden. Die noch kleinen Myzetozyten sind in diesem Stadium mit vergleichsweise wenigen Hefezellen infiziert.

Abbildung III.8 zeigt einen Schnitt durch eine junge Myzetomgruppe am vorderen Mitteldarm einer *Rhagium inquisitor*-Larve. Die betreffende Larve wurde zu Beginn der Fraßperiode fixiert. Die Myzetome bestehen in diesem Stadium aus vergleichsweise wenigen Zellen. Die noch wenig differenzierten Myzetozyten beinhalten eine relativ geringe Anzahl symbiontischer Hefezellen (orange Signale). Myzetozyten und Darmepithelzellen zeigen eine vergleichbare Fluoreszenz. Die palisadenartig aneinandergereihten Epithelzellen bilden einen kurzen Gang, der die Myzetome mit dem Darmlumen verbindet. Die Membranen der Epithelzellen stellen einen ribosomenfreien Raum dar und zeichnen sich als dunkle Begrenzung des Cytoplasmas ab. Während die Myzetozyten im Übergangsbereich zum normalen Darmepithel

lediglich von einzelnen Symbionten besiedelt sind, nimmt die Dichte der Hefezellen zur „Spitze“ der Myzetome hin deutlich zu.

Die Myzetome gewinnen bei *Rhagium inquisitor* im Laufe der Fraßtätigkeit ein Vielfaches an Größe und entwickeln sich zu traubenartigen Anhängen (vgl. Abbildung III.2-A, E), deren Durchmesser bei Altlarven mehrere Millimeter betragen kann.

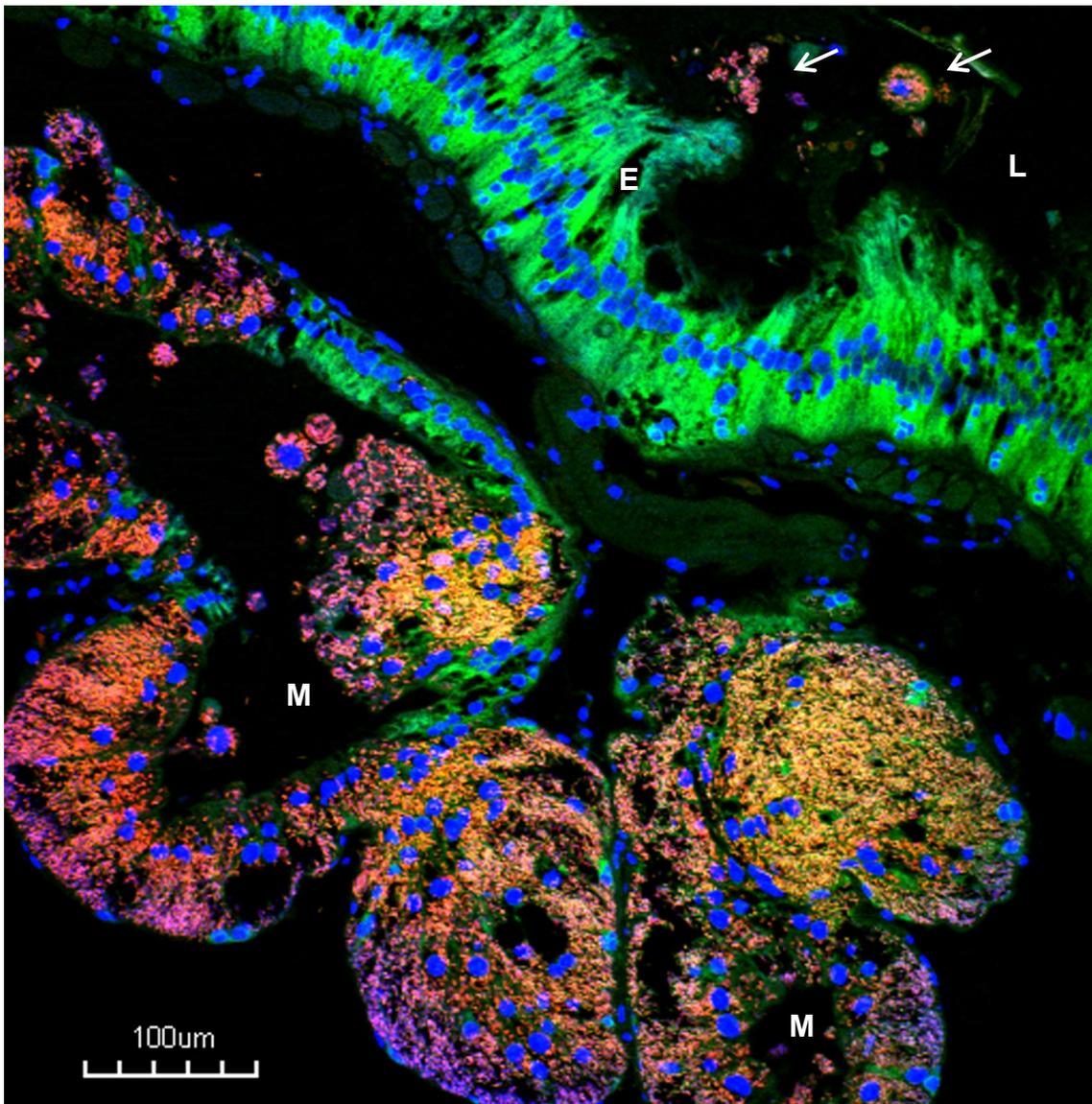


Abbildung III.9: Voll entwickelte Myzetomgruppe am vorderen Mitteldarm einer *Rhagium inquisitor*-Larve.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Wirtszellen wurden in grün, symbiontische Hefezellen in rot dargestellt; Zellkerne erscheinen in blau. Durch die Überlagerung von grün und rot ergeben sich in einigen Bereichen orange Farbtöne für Hefezellen.

Verwendete Sonden und Fluorochrome: Grün: EUK516_Rhodamin; Rot: PF326_Cy3; Blau: DAPI. Mehrere Myzetome (M) sind durch einen ausführenden Gang (vgl. Abb. III.3.8) aus Darmepithel (E) zu Verbänden zusammengefasst und mit dem Darmlumen (L) verbunden. Die Myzetome bestehen aus einer Vielzahl langgestreckter Myzetozyten, die mit symbiontischen Hefen (hier: *Candida rhagii*) dicht gefüllt sind. Unterhalb der Myzetomgruppe sind im Darmlumen (L) abgeschnürte Teile der Myzetozyten erkennbar (Pfeile), die sich auflösen und die Symbionten freigeben.

Abbildung III.9 zeigt einen Schnitt durch eine voll entwickelte *Rhagium*-Myzetomgruppe. Die bereits im jungen Zustand angelegte Gliederung in einzelne Loben ist deutlich erkennbar, wohingegen der Verbindungskanal hier im Schnitt nicht getroffen wurde. Ausdifferenzierte Myzetozyten sind wesentlich größer als Darmepithelzellen und mehr oder weniger vollständig gefüllt mit Hefe-Symbionten. Ihr Cytoplasma ist aufgrund einer stark abgeschwächten Fluoreszenz nur mehr undeutlich zu erkennen; Teile der Myzetome scheinen in Auflösung begriffen. Die Zellkerne der Mycetozyten unterschieden sich dagegen nicht von denen des Darmepithels und zeigen keine Degenerationserscheinungen. Im Darmlumen direkt unterhalb der Myzetome finden sich Symbionten-gefüllte Teile der Myzetozyten, die den Verband verlassen haben. Während die Hefen in einer der Abschnürungen noch erkennbar von grün fluoreszierendem Wirtszytoplasma eingeschlossen sind und einen Myzetozytenkern (blau) umgeben, hat sich eine zweite Abschnürung bereits aufgelöst. Die daraus freigesetzten Hefen finden sich überall im vorderen Mitteldarm.

4.2.2. *Leptura rubra*

Abbildung III.10-B zeigt einen Querschnitt durch den Myzetomring am vorderen Mitteldarm einer *Leptura rubra*-Larve (vgl. Abbildung III.1-A und D). Die Myzetome von *Leptura rubra* sind im Gegensatz zu *Rhagium inquisitor* wenig veränderlich in ihrer Form und Größe. Gut erkennbar ist der Ringwulst aus Darmepithel, dem die Myzetome aufsitzen und der die Verbindung zum Darmlumen bildet. Die im Querschnitt annähernd runden Myzetome (Abbildung III.10-A) bestehen aus einer Vielzahl langgestreckter Myzetozyten, die mit keulenförmigen Symbionten angefüllt sind. Die Form der Myzetome ähnelt einer englumigen Hohlkugel, die an der Basis zum Darmlumen hin offen ist. An der Basis des Myzetoms ist wie bei *Rhagium inquisitor* und *Tetropium castaneum* ein allmählicher Übergang von normalen Darmepithelzellen zu Myzetozyten erkennbar (Abbildung III.10-A), der mit der Abschwächung des Fluoreszenzsignals des Wirtszytoplasmas einhergeht. Der Zellkern ausdifferenzierter Myzetozyten erscheint gegenüber Epithelzellen vergrößert; Degenerationserscheinungen wie bei *Tetropium castaneum* (vgl. Abbildung III.11) treten dagegen nicht auf. Die Myzetozyten schnüren laufend mit Hefe gefüllte Teile ab, die sich häufig unterhalb der Myzetome wiederfinden (Abbildung III.10-B). Die Abschnürungen lösen sich zunehmend auf, während sie mit dem Darminhalt verfrachtet werden. Die zunächst noch von Teilen der Wirtszelle umgebenen Hefen werden somit frei und durchsetzen den Darminhalt des Mitteldarmes und aller folgenden Darmteile. Häufig ist eine Konzentration der Hefezellen an der Epitheloberfläche zu beobachten (Abbildung III.10-C). Gelegentlich in den Hinterdarmkrypten anzutreffende Hefen sind als Ausnahme zu verstehen, da diese Strukturen in der Regel keine Mikroorganismen enthalten.

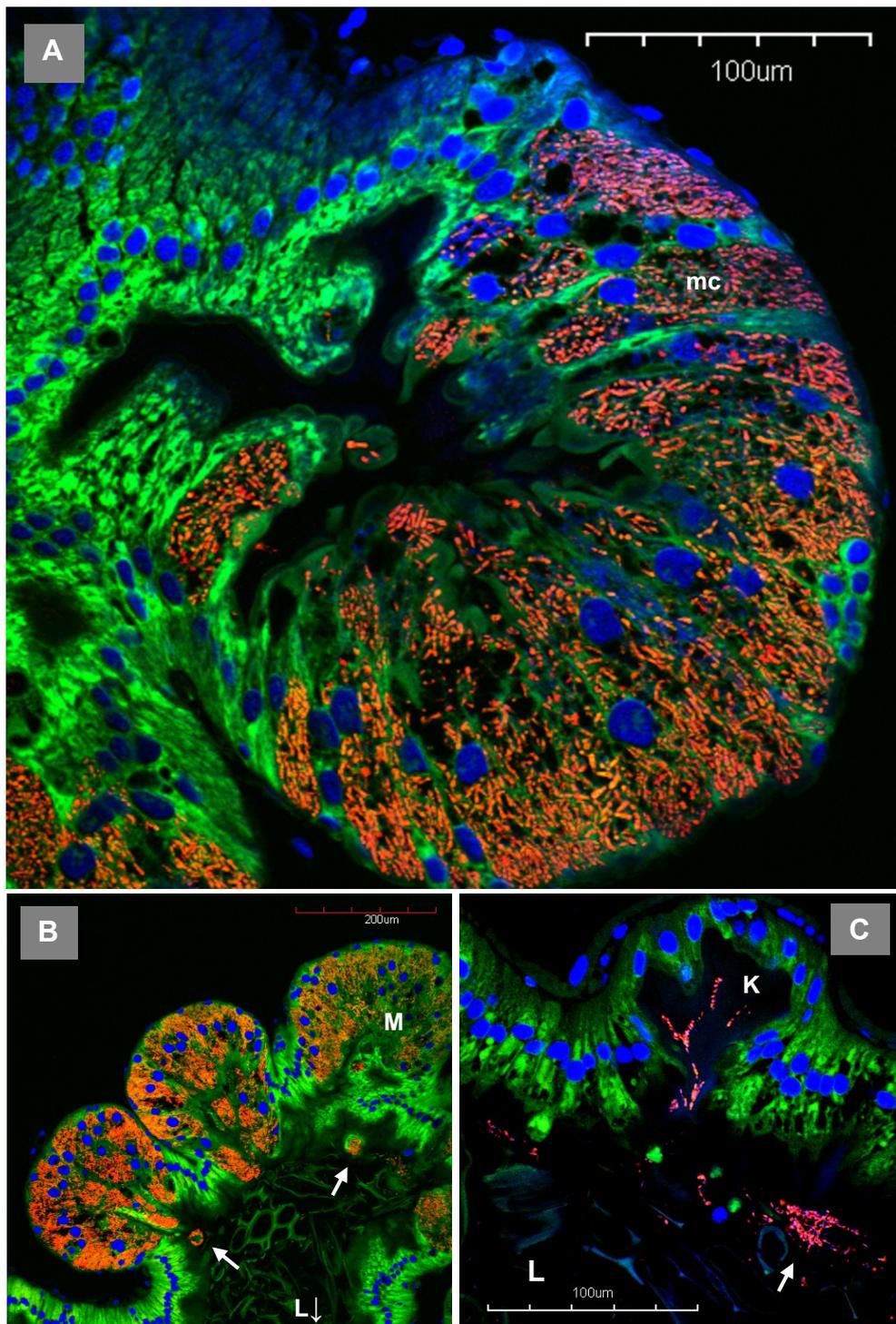


Abbildung III.10: Längsschnitte durch das Verdauungssystem einer *Leptura rubra*-Larve. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach *in-situ*-Hybridisierung. Wirtszellen wurden in grün, symbiotische Hefezellen in rot dargestellt; Zellkerne erscheinen in blau. Verwendete Sonden und Fluorochrome: **Grün:** EUK516_Rhodamin; **Rot:** PF326_Cy3; **Blau:** DAPI. **A:** Einzelmycetom am vorderen Mitteldarm. Das Cytoplasma der Mycetozysten (mc) ist angefüllt mit symbiotischen Hefen (hier: *Candida shehatae*). **B:** Zahlreiche Mycetome (M) gruppieren sich entlang eines ringförmigen Wulstes des Darmepithels, der den vorderen Mitteldarm umfaßt und die Verbindung zum Darmlumen (L) darstellt. Symbionten-gefüllte Teile der Mycetozysten (Pfeile) treten ins Darmlumen über. **C:** Symbiotische Hefen (Pfeile) durchsetzen vereinzelt oder in Gruppen die Nahrung in allen Darmteilen. Einige Hefen sind sekundär in eine Krypte (K) des hinteren Mitteldarmes gelangt.

Larven von *Leptura rubra* beherbergen mitunter wenigstens einen weiteren Hefe-Stamm in ihren Myzetomen, der neben dem eigentlichen Myzetomsymbionten *Candida shehatae* anzutreffen ist (Abbildung III.12). Dabei können die Symbionten ganzer Myzetome oder auch nur einzelner Myzetozyten ausgetauscht sein, sodaß die beiden Stämme in unmittelbarer Nachbarschaft existieren. Einzelne Myzetozyten sind indes immer nur mit einem der beiden Stämme besiedelt. Die betreffenden Larven zeigen keine äußerlich oder histologisch erkennbaren Besonderheiten und sind normal entwickelt.

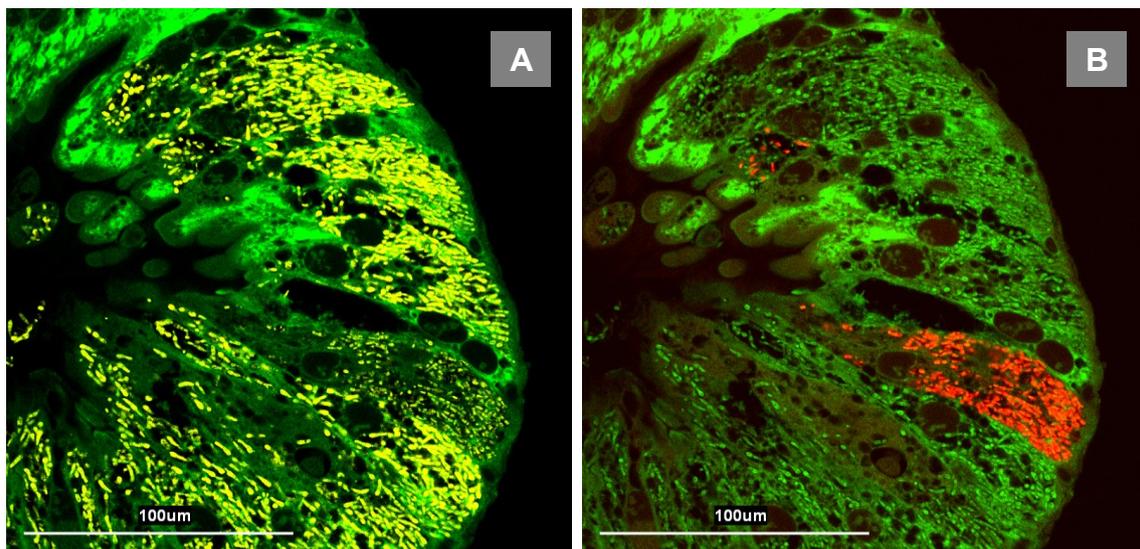


Abbildung III.11: Mehrere mögliche Myzetomsymbionten in einer Larve von *Leptura rubra*. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Myzetoms nach *in-situ*-Hybridisierung.
Verwendete Sonden und Fluorochrome: Grün: EUK516_Rhodamin; Gelb: PF326_Cy3; Rot: CSH670_Cy5.
 Mitunter beherbergen die Myzetome von *Leptura rubra* aus unbekanntem Gründen anstelle der eigentlichen Symbionten (*Candida shehatae*-rotes Signal) alternative Hefestämme. A zeigt ein scheinbar normales Myzetom, dicht gefüllt mit Hefen. Die gegen *Candida shehatae* spezifische Sonde CSH670 offenbart, daß der überwiegende Teil der Symbionten in diesem Myzetom nicht *Candida shehatae*, sondern einen anderen Stamm repräsentiert (B).

4.2.3. *Tetropium castaneum*

Im Vergleich mit *Rhagium* und *Leptura* bestehen die Myzetome der Larven von *Tetropium castaneum* aus deutlich weniger Zellen. Die in der Anzahl reduzierten Myzetozyten erreichen dafür im Einzelnen eine Größe von über 100µm im Durchmesser und sind mitunter bereits im Binokular zu erkennen (vgl. Abbildung III.2-F).

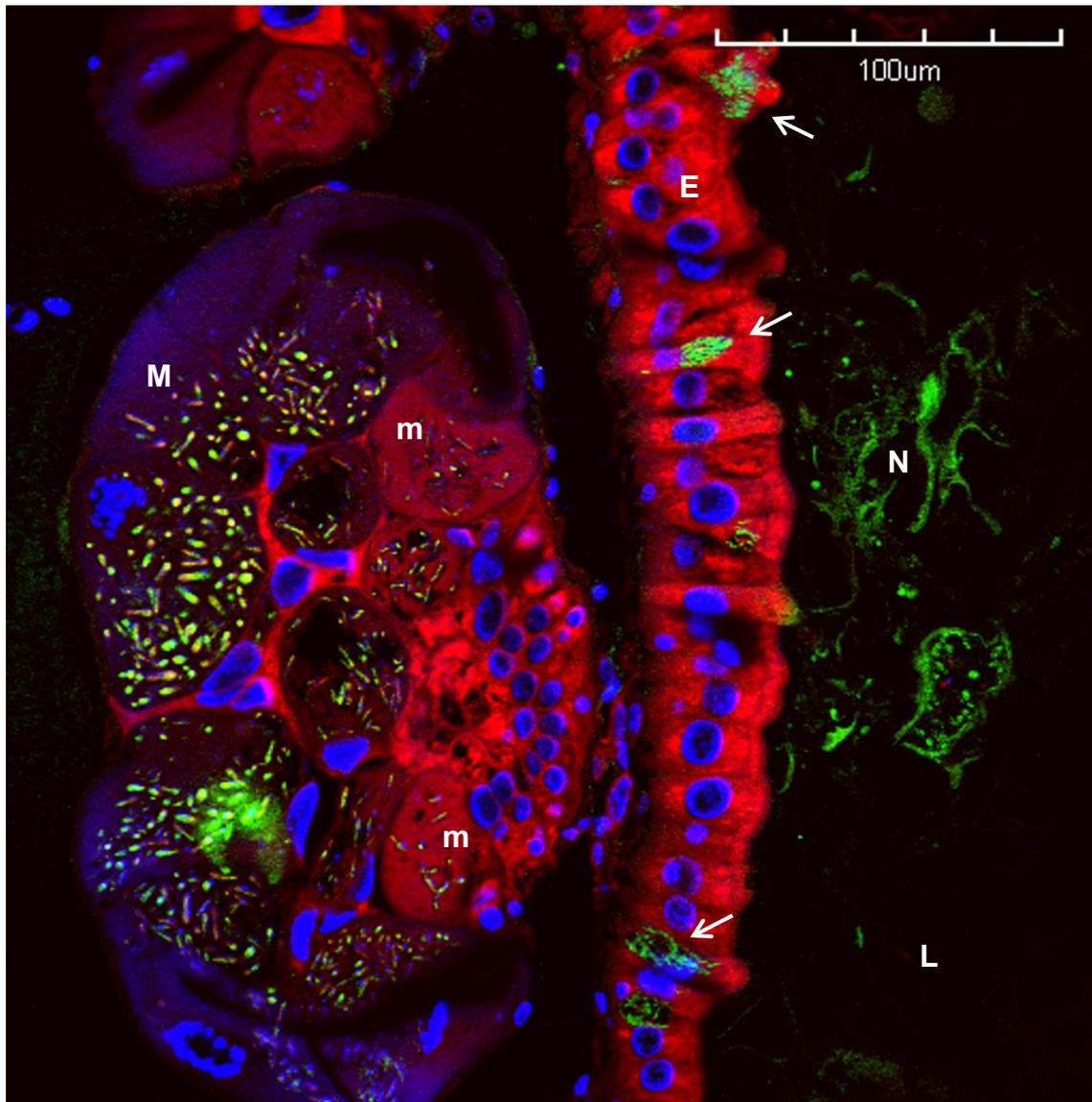


Abbildung III.12: Fluoreszenz in situ Hybridisierung eines Einzelmyzetoms am vorderen Mitteldarm einer *Tetropium castaneum*-Larve. Wirtszellen wurden in rot, symbiontische Mikroorganismen in grün dargestellt; Zellkerne erscheinen in blau. Der Übergang von Epithelzellen zu jungen (m) und schließlich reifen Myzetozyten (M) geht einher mit Größenzunahme, steigender Symbiontendichte und gipfelt in der Degradation der Wirtszellen (= Myzetozyten). E: Darmepithel; L: Darmlumen; m: Junge Myzetozyten, M: Reife Myzetozyten; N: Nahrungspartikel (Autofluoreszenz); Pfeile: Der Gattung *Sodalis* angehörende oder nahestehende Bakterien besiedeln das Darmepithel als Sekundärsymbionten.
Verwendete Sonden und Fluorochrome: Rot: EUK516_Cy5; Grün: PF326_Cy3, EUB338mix_Cy3; Blau: DAPI.

Abbildung III.12 zeigt einen Schnitt durch ein Myzetom einer Larve mittleren Entwicklungszustandes. Die Myzetozyten bilden eine runde oder bisweilen stumpfkegelförmige Hohlkugel (linke Bildhälfte), die mit dem Darmlumen (rechte Bildhälfte) über einen kurzen Gang in Verbindung steht (zu sehen in Abbildung III.12 und Abbildung III.13). Die Basis des Myzetoms besteht aus kleinen und stark

fluoreszierenden Zellen, die vom angrenzenden Darmepithel nur durch ihre abweichende Form zu unterscheiden sind. Die Zellen enthalten zunächst kleine und keulenförmige Hefezellen; das Cytoplasma läßt einen schmalen Saum um die eingebetteten Symbionten erkennen. Ausdifferenzierte Myzetozyten enthalten deutlich größere und hantelförmige Symbionten. Die Zellkerne ausdifferenzierter Myzetozyten sind auffallend vergrößert und zerklüftet, während das Cytoplasma nur noch geringfügig durch rRNA-gerichtete Sonden anfärbbar ist. Einige zwischen die Myzetozyten eingestreute Zellen enthalten keine Symbionten.

Anhand ihrer Autofluoreszenz im Cy3-Kanal sind Nahrungspartikel im Darm der Larve erkennbar (grünes Signal). Epithelzellen des vorderen Mitteldarms sind auch im Bereich der Myzetome mit Bakterien besiedelt, die der Gattung *Sodalis* angehören oder nahestehen (vgl. III.4.3.2). Abbildung III.13 zeigt einen Ausschnitt des vorderen Mitteldarms mit mehreren Myzetomen. Das stark gefaltet Darmepithel formt einen kurzen Gang zu den einzelnen Myzetomen, durch welchen ausgereifte Myzetozyten ins Darmlumen ausgestoßen werden. In A sind an zwei Stellen symbiontengefüllte Myzetozyten erkennbar, die das Myzetom verlassen haben. In B ist eine Myzetozyte unmittelbar im Austritt aus dem Myzetom begriffen. Die ausgestoßenen Wirtszellen degradieren bereits in der Nähe der Myzetome und entlassen die eingeschlossenen Symbionten (C). Während die Wirtszelle links in C bereits stark in Auflösung begriffen ist, gruppieren die Symbionten in der rechten Zelle sich noch um den Zellkern der Myzetozyte. Deutlich sind die typische Hantelform und der Zellkern der Hefezellen erkennbar.

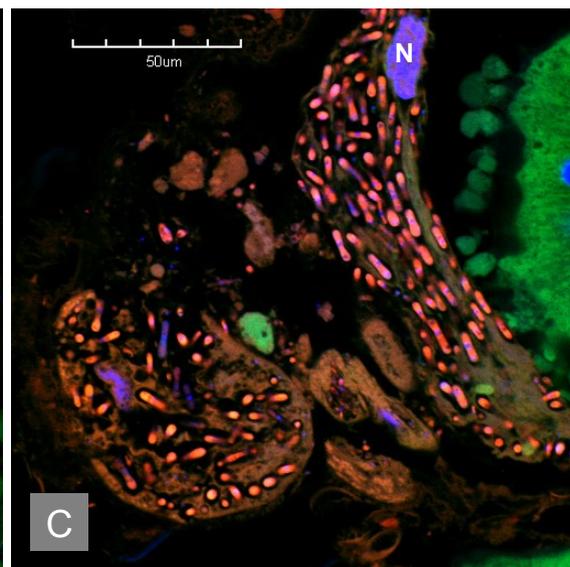
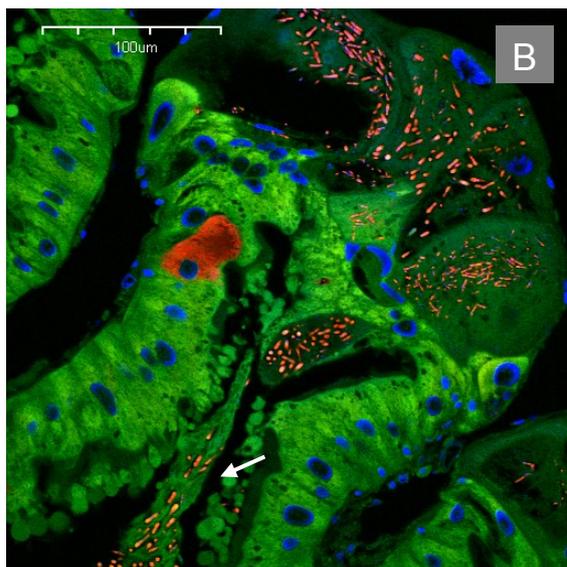
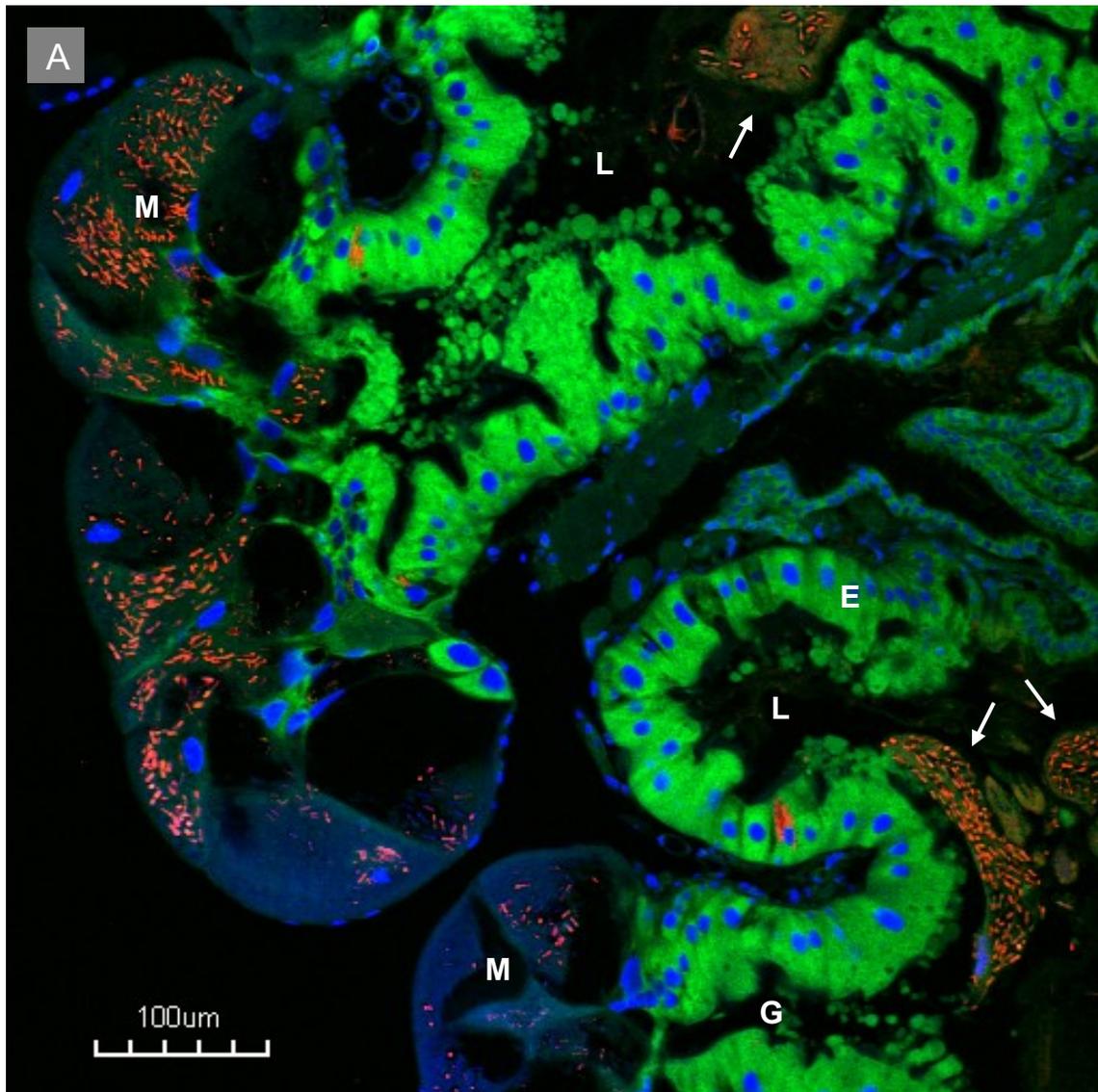
Abbildung III.13: Längsschnitte durch eine Myzetomgruppe einer *Tetropium castaneum*-Larve. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach *in-situ*-Hybridisierung. Wirtszellen wurden in grün, symbiontische Mikroorganismen in rot dargestellt; Zellkerne erscheinen in blau.

Verwendete Sonden und Fluorochrome: Rot: EUK516_Cy5; Grün: PF1200_Cy5, EUB338mix_Cy3; Blau: DAPI.

A: Ausschnitt aus dem Myzetomkranz am vorderen Mitteldarm einer *Tetropium castaneum*-Larve. Die in diesem Bereich stark gebuchtete Darmwand (E) trägt zahlreiche Myzetome (M), die in speziellen Myzetozyten symbiontische Hefen beherbergen und über einen schmalen Gang (G) mit dem Darmlumen (L) in Verbindung stehen. Symbionten-gefüllte Myzetozyten oder Teile davon treten laufend ins Darmlumen (L) über und durchsetzen die Nahrungsmasse (Pfeile).

B: Eine mit Hefen gefüllte Myzetozyte (Pfeil) „fließt“ aus dem Verband des Myzetoms.

C: Ausgestoßene Myzetozyten lösen sich im Darmlumen auf und entlassen ihre Hefe-Fracht. Rechts oben im Bild ist der Zellkern (N) einer ausgestoßenen Myzetozyte erkennbar.



4.2.4. Plagionotus arcuatus und Hylotrupes bajulus

Mittels der FISH-Technik ließen sich keine Eukaryonten im Verdauungssystem dieser Arten nachweisen.

4.3. Bakterien im Larvendarm von Cerambyciden

4.3.1. Rhagium inquisitor und Plagionotus arcuatus

Im Verdauungssystem von *Rhagium inquisitor* und *Plagionotus arcuatus* können mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verschiedene Bakterien sichtbar gemacht werden. Deutliche Mengen an Bakterienzellen durchsetzen die Nahrungsmasse beider Arten. Die weitaus häufigsten Bakterienformen sind kurze Stäbchen; daneben finden sich Kokken und Diplokokken. Die Zellen finden sich dabei „freilebend“ in der flüssigen Phase der Nahrung (Abbildung III.13-A) oder auch an bzw. eingeschlossen in Nahrungspartikeln (Abbildung III.14-B). Bakterien sind meist in allen Darmteilen sichtbar, wenngleich die Fluoreszenzsignale einzelner Zellen in den hinteren Darmteilen häufig durch die Autofluoreszenz der Nahrungspartikel überlagert werden. Die vielfach beschriebene Konzentration der Bakterien auf der so genannten Mucosa (innere Oberfläche des Darmepithels) ist bei keinem der Tiere zu beobachten; ebensowenig sind die Bakterien auf bestimmte Darmabschnitte beschränkt oder konzentriert. Das Darmgewebe beider Spezies ist frei von Bakterien.

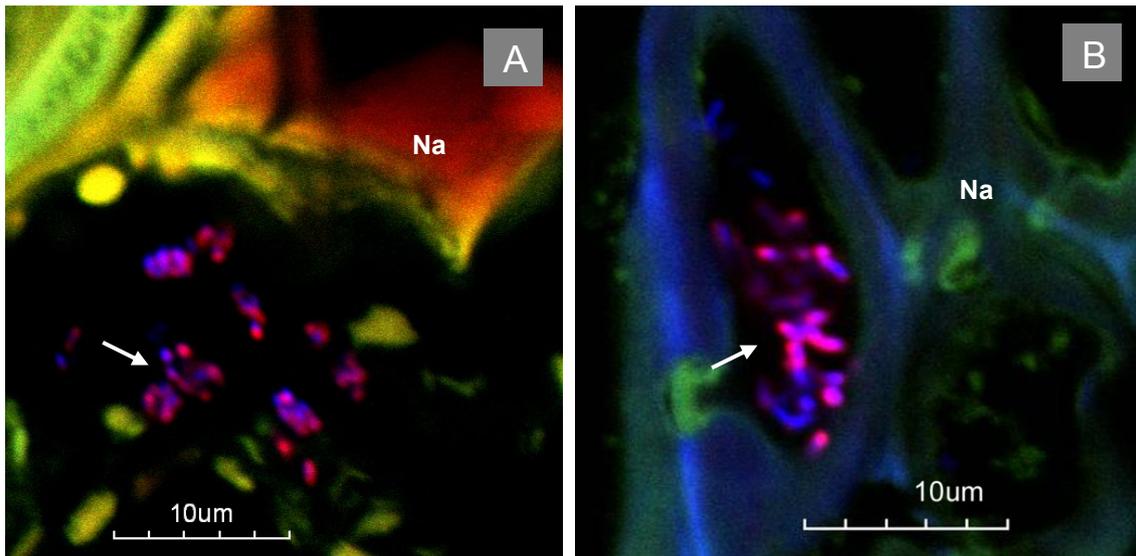


Abbildung III.14: Bakterien im Darminhalt zweier Cerambycidenlarven.

A: *Rhagium inquisitor*; **B:** *Plagionotus arcuatus*.

Der Darm beider Spezies ist mit Bakterien (Pfeile) besiedelt, die den Nahrungsbrei durchsetzen. In B befindet sich eine Bakteriengruppe im Inneren einer ingestierten Tracheide. Nahrungspartikel (Na) fluoreszieren bei allen detektierten Wellenlängen und erscheinen daher abwechselnd in rot grün und blau. Verwendete Sonden und Fluorochrome: **Rot:** EUBmix_Cy3; **Blau:** DAPI.

4.3.2. *Tetropium castaneum*

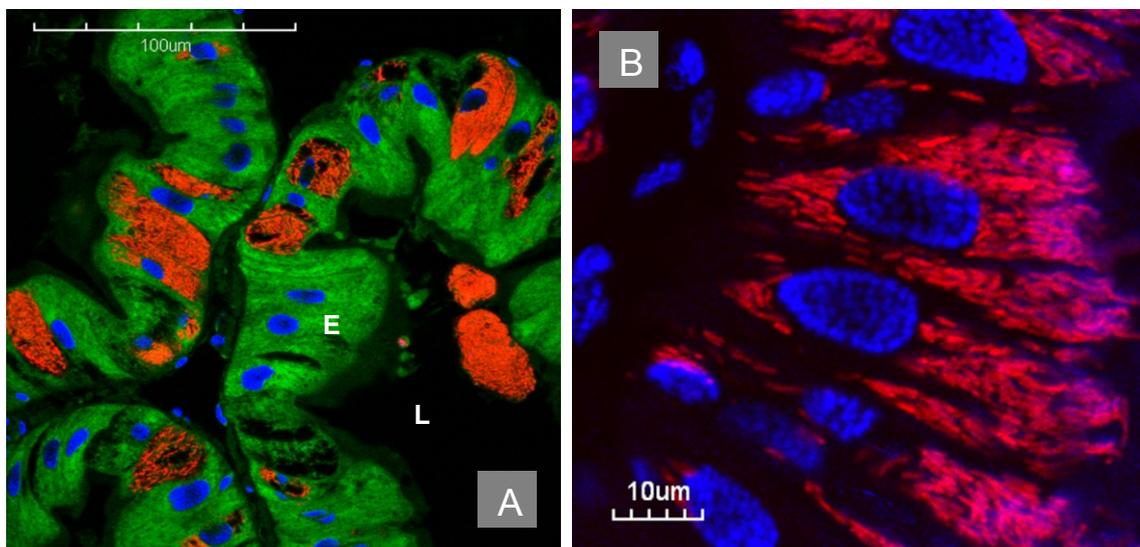


Abbildung III.15: Bakterien in Epithelzellen des vorderen Mitteldarms bei *Tetropium castaneum*.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach *in-situ*-Hybridisierung. Wirtszellen wurden in grün, symbiontische Mikroorganismen in rot dargestellt; Zellkerne erscheinen in blau.

A: Das stark gebuchtete Darmepithel (E) beherbergt in einem Teil der Epithelzellen Bakterien. Die Wirtszellen (Bakteriozyten) sind einzeln oder als Gruppen ins normale Darmepithel eingestreut. **L:** Darmlumen.

Verwendete Sonden und Fluorochrome: **Grün:** EUK516_Rhodamin; **Rot:** EUBmix_Cy5; **Blau:** DAPI

B: Stärkere Vergrößerung einer Gruppe von Wirtszellen. Das Cytoplasma der Wirtszellen (hier nicht angefärbt) ist in allen Bereichen angefüllt mit Bakterien der Gattung *Sodalis*. Die Wirtszellen und deren Nuclei unterscheiden sich äußerlich nicht von den übrigen Epithelzellen.

Verwendete Sonden und Fluorochrome: **Rot:** SOD445_Cy5; **Blau:** DAPI

Bereits das auffallend regelmäßige und gehäufte Auftreten eines einzelnen Bakterienstammes in den PCR-basierten rRNA-Genbanken aller *Tetropium*-Larven (vgl. Tabelle III.1) weist auf den besonderen Stellenwert dieser Mikroorganismen hin. *In-situ*-Hybridisierungen mit der eubakterienspezifischen Sondenkombination EUB338-I, II und III [AMANN et al., 1990; DAIMS et al., 1999] zeigen eine intensive Besiedelung des Darmepithels im Bereich des vorderen Mitteldarms bei allen untersuchten *Tetropium*-Larven (N=7). Das Cytoplasma vieler Epithelzellen ist mit stäbchenförmigen Bakterien gefüllt. Die einzeln oder in Gruppen angeordneten Bakteriozyten konzentrieren sich am Beginn und im voluminösen Mittelteil des vorderen Mitteldarmes; vereinzelt finden sie sich bis zum Übergang zum ersten Bogen des hinteren Mitteldarms. Die Bakteriozyten unterscheiden sich morphologisch kaum von den übrigen Epithelzellen und sind allenfalls leicht vergrößert.

Die Hybridisierung mit der Oligonucleotidsonde SOD445 (Abbildung III.15-B und Abbildung III.16) identifiziert den Endocytobionten als das in den rRNA-Genbanken prominente γ -Proteobakterium. Die phylogenetische Analyse seiner 16S-rRNA-Sequenz (Abbildung III.16) plaziert den *Tetropium castaneum*-Endosymbionten in einer monophyletischen Gruppe innerhalb der *Enterobacteriaceae*.

Die Symbionten der verschiedenen Insekten bilden in allen berechneten 16S-rRNA-Bäumen (*maximum likelihood*, *maximum parsimony* und *neighbour joining*) in der Regel stabile monophyletische Cluster, wie bei *Glossina/Sodalis*, *Columbicola columbae*, *Psyllidae* und *Buchnera*. Lediglich die Gruppe der *Sitophilus*-Symbionten erscheint nicht immer monophyletisch. Die Sequenz des *Craterina melbae*-Symbionten belegt meist keinen eigenen Zweig, sondern fällt mit in die *Sitophilus*-Gruppe. Bei der Strukturanalyse aller berechneten Bäume konnte keine stabile Verwandtschaft des *Tetropium*-Symbionten mit einer der genannten Gruppen festgestellt werden.

Während einige Bäume eine Position basal der *Psyllidae*-Symbionten unterstützen, plazieren andere den *Tetropium castaneum*-Symbionten an der Basis des gesamten Clusters. Nichtsdestotrotz fällt die Sequenz niemals in eine der bestehenden monophyletischen Gruppen. Die Leistungsfähigkeit der 16S-rRNA als phylogenetischer Marker reicht alleine nicht aus, um die Verwandtschaftsverhältnisse der verschiedenen Linien endgültig darzulegen. Vorbehaltlich einer endgültigen Klassifikation, wird der bakterielle *Tetropium*-Endocytobiont der Gattung *Sodalis* zugerechnet.

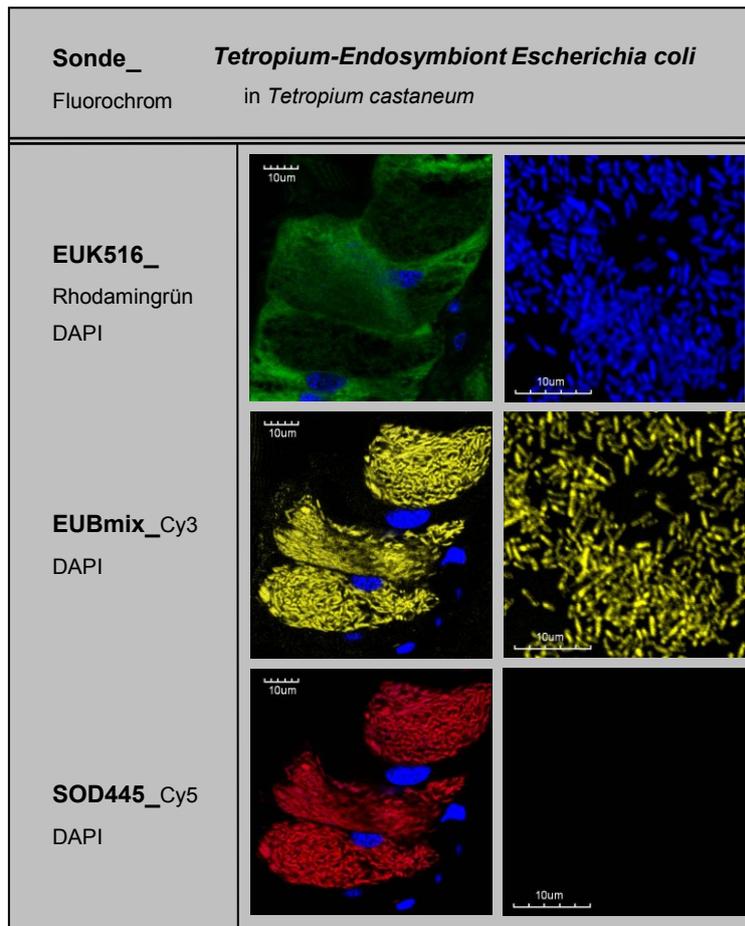


Abbildung III.16: Identifikation des bakteriellen *Tetropium castaneum*-Endocytobionten. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *Tetropium*-Darmepithel bzw. *E. coli*-Zellen nach *In-situ*-Hybridisierung. SOD445 markiert die intrazellulär im Darmepithel von *Tetropium*-Larven lebenden *Sodalis*-Zellen, nicht jedoch nahe verwandte *E. coli*.

4.3.3. *Leptura rubra* und *Hylotrupes bajulus*

Mit der FISH-Technik ließen sich weder im Darminhalt noch im Darmgewebe von *Leptura rubra*- und *Hylotrupes bajulus*-Larven Bakterien nachweisen.

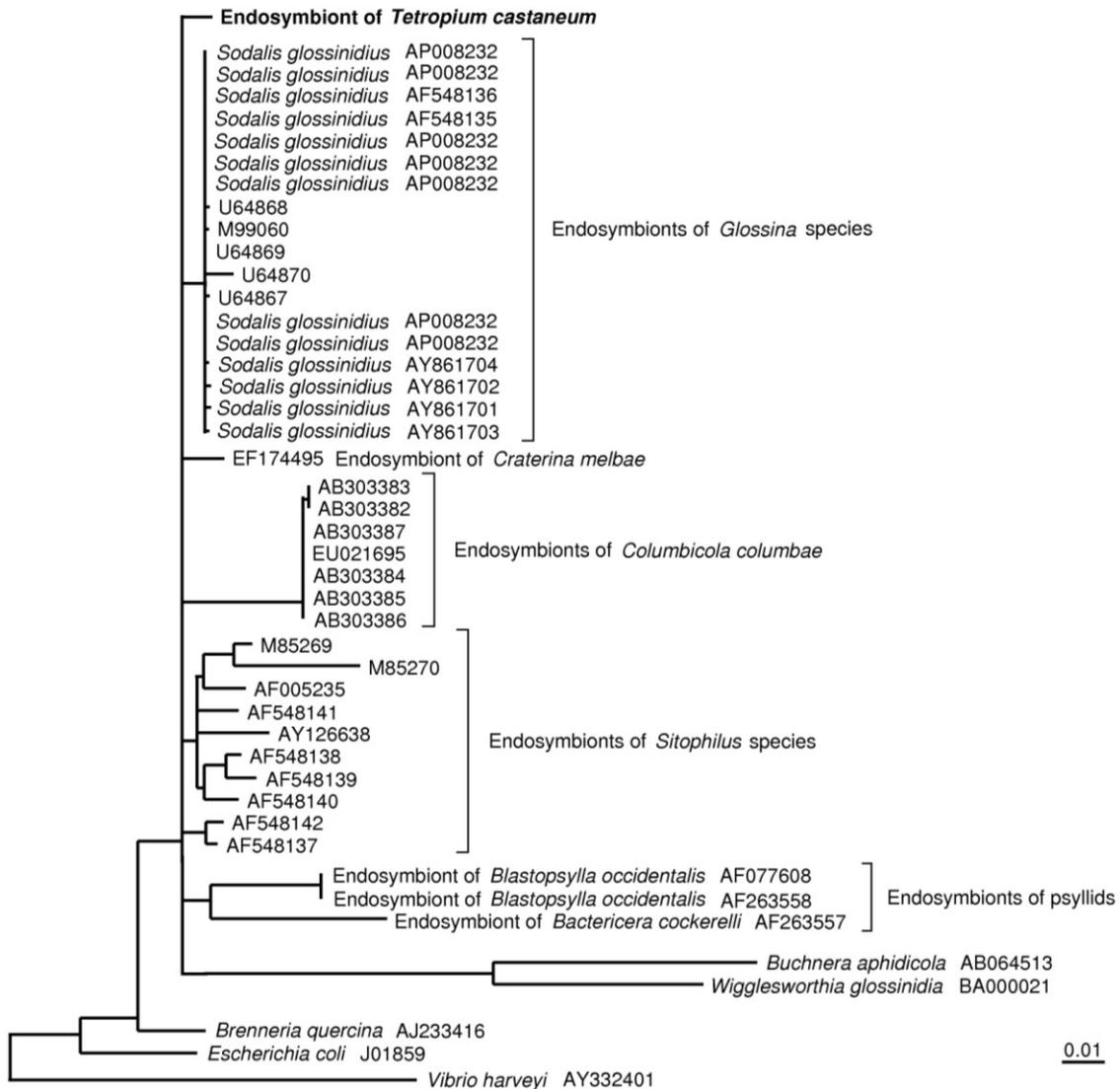


Abbildung III.17: Phylogenetische Position des bakteriellen Endocytobionten von *Tetropium castaneum*. Consensus-Baum auf der Grundlage mehrerer Einzelbäume, berechnet mit RaxML aus 2462 *Enterobacteriaceae*-16S-rRNA-Sequenzen. Die 16S rRNA-Sequenz des *T. castaneum*-Symbionten fällt stabil in eine monophyletische Gruppe Insekten-assoziiierter γ -Proteobakterien, deren prominenteste Vertreter *Sodalis glossinidius* und *Buchnera aphidicola* sind.

5. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen am Darm von Hausbocklarven

Abbildung III.18 zeigt die innere Oberfläche des *Hylotrupes*-Verdauungstraktes in verschiedenen Abschnitten. Der vordere Mitteldarm präsentiert sich eher unauffällig. Das stark gefaltete Epithel (Divertikel) am Vorderende des Mitteldarms (A) besitzt eine weitgehend glatte innere Oberfläche, während die Epithelzellen caudal davon, im Bereich der größten Ausdehnung des vorderen Mitteldarms (B), einen typischen Mikrovillisaum tragen. In beiden Regionen des vorderen Mitteldarmes sind keinerlei Mikroorganismen erkennbar. Die für die Cerambyciden charakteristischen Krypten am hinteren Mitteldarm (C, D) erweisen sich auch bei starker Vergrößerung als einfache Ausstülpungen des Darmepithels. Die Zellen tragen wie im übrigen Bereich des Darms Mikrovilli und zeigen darüber hinaus keine morphologischen Besonderheiten; auch hier fehlen jegliche Mikroorganismen. Im Bereich des hinteren Mitteldarms finden sich Bereiche (G), in denen das Epithel Spalten oder kurze Furchen aufweist. Darin finden sich mitunter stäbchenförmige, etwa 1 µm große Strukturen, bei denen es sich um Mikroorganismen handeln dürfte (H). In anderen Bereichen zeigt das Epithel eine auffällige Felderung des Mikrovillisaumes, anhand derer die darunter liegenden Epithelzellen zu erkennen sind (E). Die Epithelzellen scheinen häufig in Exocytose begriffen. Zahlreiche Vesikel treten durch die Mikrovilli ins Darmlumen aus (Pfeile). Bei starker Vergrößerung sind auch hier vereinzelt ca. 1 µm große Zellen erkennbar, die dem Mikrovillisaum aufsitzen (F). Der Bewuchs bleibt insgesamt gering, zumal er auf Teilbereiche beschränkt ist.

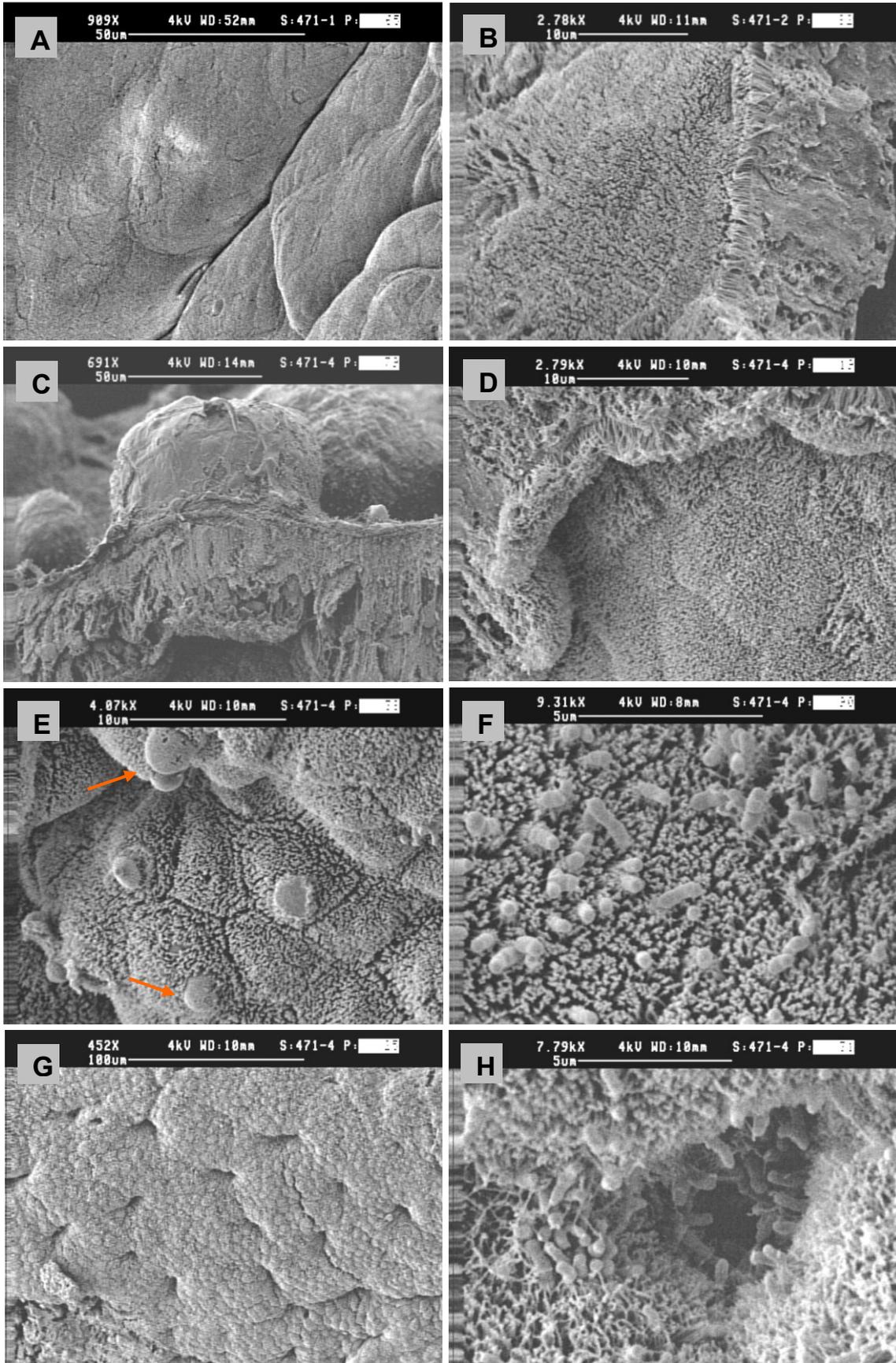


Abbildung III.18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des larvalen Verdauungssystems von *Hylotrupes bajulus*.

A: Vorderer Mitteldarm, Divertikel; **B:** Vorderer Mitteldarm, mittlere Region; **C:** Krypten des hinteren Mitteldarms, Seitenansicht einer Krypte am Rand eines Epithel-Querschnittes; **D:** Öffnung einer Krypte zum Darmlumen; **E:** Darmepithel des hinteren Mitteldarms; **F:** Wie E, stärker vergrößert, Bakterien besiedeln verstreut den Mikrovillisaum; **G:** Epithel des hinteren Mitteldarms, hier mit Spalten und Vertiefungen ausgestattet; **H:** wie G, stärker vergrößert, Blick in eine Epithelspalte des hinteren Mitteldarmes.

6. Spaltung von Kohlenhydraten im Larvendarm

6.1. Lösliche Saccharide im Larvendarm

Das extraintestinale Gewebe (Fettkörper, Muskelgewebe) der Larven von *Rhagium inquisitor*, *Leptura rubra*, *Tetropium castaneum*⁴ und *Hylotrupes bajulus* enthält Trehalose. Mit Ausnahme von *Hylotrupes bajulus* findet sich bei allen Larven außerdem eine Komponente, die mit C₆-Uronsäuren cochromatographiert (Im Folgenden als „U“ bezeichnet). *Hylotrupes*-Larven enthalten statt dessen ein Saccharid (im Folgenden „R“ genannt), das auf Höhe authentischer Raffinose läuft. „R“ ist im Fettkörper- und Muskelgewebe im Verhältnis zur Trehalose nur in geringen Mengen enthalten. In *Hylotrupes*-Kot und allen Darmteilen dagegen findet sich „R“ in deutlichen Mengen (Abbildung III.21).

⁴ Chromatogramme nicht gezeigt.

6.1.1. *Leptura rubra*

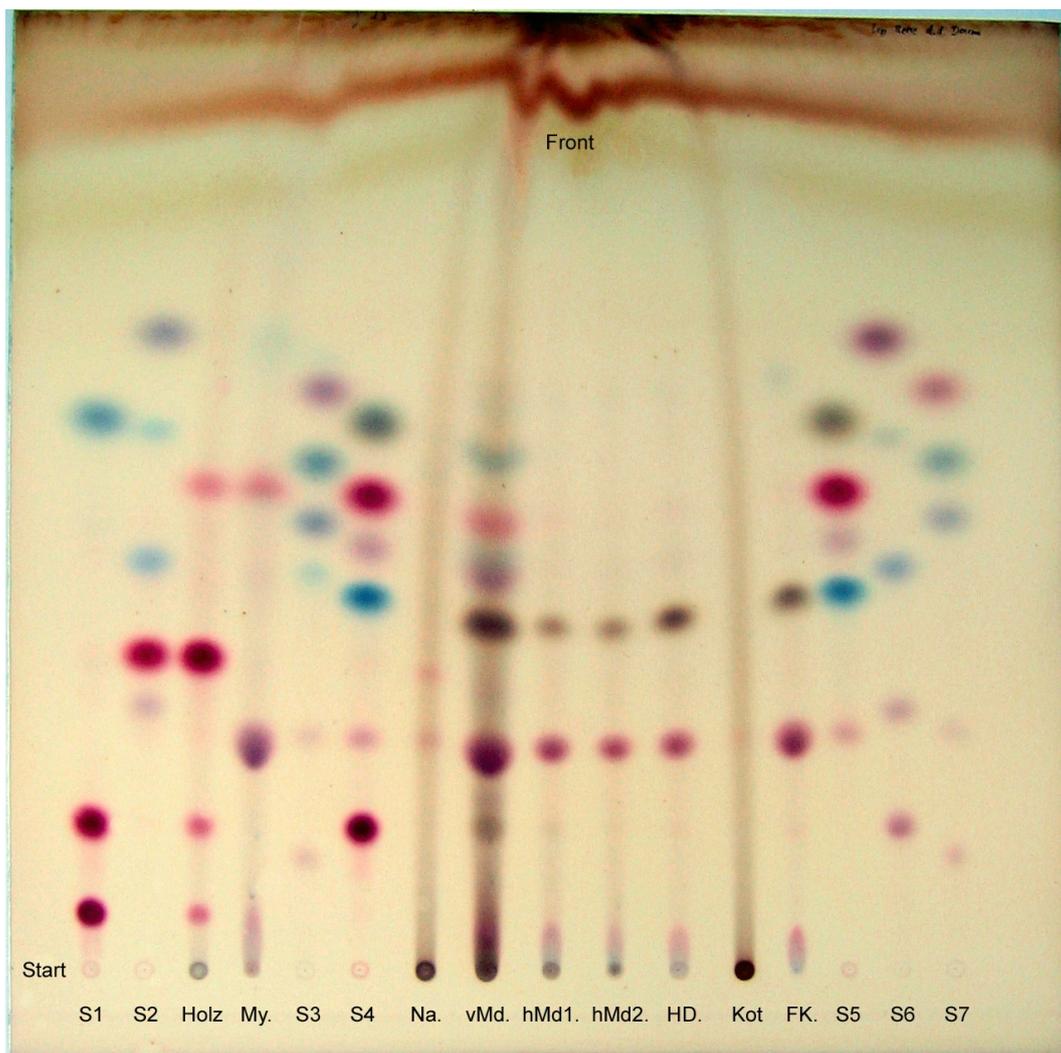


Abbildung III.19: Mono- und Oligosaccharide in Nahrung, verschiedenen Darmabschnitten und Kot der Larven von *Leptura rubra*.

Die Saccharide wurden aus gefriergetrocknetem Material extrahiert, mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und mit Naphthoresorcin-Schwefelsäure-Reagens entwickelt. Die Angabe der authentischen Zucker (S1-S7) innerhalb der Laufbahn erfolgt von oben nach unten, die Angabe der Laufbahnen von links nach rechts.

S1: Lyxose, Raffinose, Stachyose; **S2:** Rhamnose, Methylglucuronsäure, Galactose, Saccharose, Maltose; **Holz:** Fichtensplintholz, lebend; **My.:** Mycel/Fruchtkörper Weißfäulepilz; **S3:** Fucose, Arabinose, Mannose, Glucuronsäure, Cellobiose, Cellotriose; **S4:** Xylose, Fructose, Glucose, Galacturonsäure, Trehalose, Raffinose; **Na.:** Nahrungsholz (Fichtensplint, weißfaul); **vMd.:** vorderer Mitteldarm; **hMd1.:** hinterer Mitteldarm/1. Bogen; **hMd2.:** hinterer Mitteldarm/2. Bogen; **HD.:** Hinterdarm; **Kot:** Kotwalzen; **FK.:** Fettkörper; **S5:** Xylose, Fructose, Glucose, Galacturonsäure, Trehalose; **S6:** Rhamnose, Methylglucuronsäure, Galactose, Maltose, Maltotriose; **S7:** Fucose, Arabinose, Mannose, Cellobiose, Cellotriose.

Abbildung III.19: Im Splintholz stehender Fichten findet sich hauptsächlich Saccharose (dominierend), Fructose, Raffinose und Stachyose. Die Nahrung der *Leptura rubra*-Larven enthält dagegen nur noch Spuren von Saccharose. Trehalose ist auf die Anwesenheit von Pilzen im Nahrungsholz zurückzuführen. Verglichen mit dem geringen Zuckergehalt der Nahrung treten im vorderen Mitteldarm (vMd.) deutliche Mengen der Monosaccharide Xylose, Fructose, Mannose und Glucose auf. Ein einzelnes dunkelbraun färbendes Oligosaccharid läuft auf Höhe von Raffinose und gleicht damit der Komponente „R“ bei *Hylotrupes* (vgl. Abbildung III.21). In geringeren Anteilen vorliegende Zucker werden zum Teil durch Phenole aus der Holznahrung überdeckt, welche die Laufbahn verdunkeln, und sind daher nicht im Einzelnen erkennbar. Durch die hohe Fracht der (vMd.)-Laufbahn laufen die gleichen Komponenten hier gegenüber den übrigen Laufbahnen und den authentischen Zuckern etwas verlangsamt. Die dem vorderen Mitteldarm folgenden Darmabschnitte enthalten außer der gewebeeigenen Trehalose und „U“ keine erkennbaren Saccharide. Die Ausscheidungsprodukte von *Leptura rubra* sind ebenfalls praktisch frei von Zuckern und enthalten allenfalls Spuren von Trehalose.

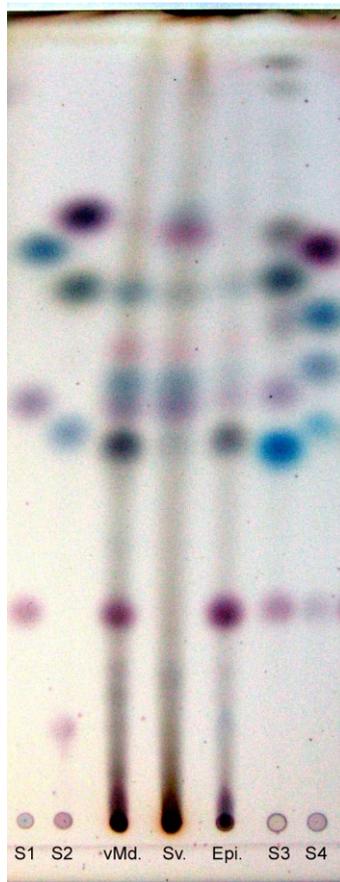


Abbildung III.20: Lösliche Saccharide in Epithel und Darminhalt des vorderen Mitteldarms von *Leptura rubra*-Larven.

Die Saccharide im Darminhalt wurden einmal nativ (Inh.) und nach einem Selbstverdau (Sv.) extrahiert. Dünnschichtchromatographie und Entwicklung mit Naphthoresorcin-Schwefelsäure-Reagens. Die Angabe der authentischen Zucker (S1-S4) erfolgt innerhalb einer Laufbahn von oben nach unten, die Angabe der einzelnen Laufbahnen von links nach rechts.

S1: Ribose, Glucose, Trehalose; **S2:** Rhamnose, Xylose, Galactose, Cellotriose; **vMd.:** Inhalt des vorderen Mitteldarms; **Sv.:** Darminhalt des vorderen Mitteldarms nach Selbstverdau; **Epi.:** Epithel des vorderen Mitteldarms; **S3:** Ribulose, Xylose, Glucose, Galacturonsäure, Trehalose; **S4:** Fucose, Arabinose, Mannose, Glucuronsäure, Cellobiose.

Abbildung III.20 zeigt eine zweite Aufarbeitung der Saccharide in *Leptura rubra*-Darm. Darminhalt und -epithel des vorderen Mitteldarms wurden hier (soweit möglich) getrennt und der Darminhalt einem Selbstverdau ausgesetzt. Zum Vergleich wurde eine nicht getrennte Probe aufgetragen. Trehalose und die Komponente „U“ kommen hauptsächlich in Darmepithel (Epi.) vor, fehlen aber weitgehend in der Fraktion des Darminhalts (Sv.). Etwaige zusätzliche Monosaccharide in der Epithelprobe gehen auf eine Verunreinigung der Epithelfraktion mit Darminhalt zurück, da sich der Inhalt nur unvollkommen vom stark gefalteten Epithel (vgl. Abbildung III.1) abtrennen läßt. Der vordere Mitteldarm von *Leptura rubra* (vMd.) enthält zu etwa gleichen Teilen die Monosaccharide Xylose, Fructose, Mannose und Glucose sowie Spuren von

Oligomeren unterhalb der Trehalose. Während des Selbstverdaus (Sv.) entsteht zusätzlich eine violett färbende Komponente, die zwischen Rhamnose und Fucose läuft, sowie eine blaue Komponente direkt oberhalb.

6.1.2. *Hylotrupes bajulus*

Trockener und gelagerter Kiefernspint -die Nahrung von *Hylotrupes bajulus*-Larven enthält geringe Mengen Arabinose und Fructose (Abbildung III.21). Beide Zucker finden sich in unveränderter Konzentration im vorderen Mitteldarm und im Kot der Larven wieder. Der vordere Mitteldarm enthält relativ große Mengen an Glucose und Mannose zu etwa gleichen Teilen. In der Nähe des Startpunktes befinden sich mehrere schwarz-braun färbende Oligomere, die sich aufgrund ihrer Kettenlänge zum Teil nicht mehr vollständig trennen. Das Aussehen der Flecken gleicht Xylose-Oligosacchariden, die beim Verdau von Xylanen entstehen (vgl. z. B. Abbildung III.22-B). Darüber hinaus sind in geringeren Mengen Xylose und Spuren weiterer Mono- und Oligosaccharide erkennbar. Ein ähnliches Spektrum an Sacchariden findet sich in Spuren auch in beiden Bögen des hinteren Mitteldarms, sowie -scheinbar verstärkt- im Hinterdarm. Der Kot der *Hylotrupes*-Larven enthält Arabinose und Fructose in etwa der gleichen Konzentration wie das Nahrungsholz, sowie Spuren von Glucose. Das prominenteste Oligosaccharid im Kot ist „R“, das nicht nur in allen Darmabschnitten, sondern auch im extraintestinalen Kontrollgewebe der Larven vorzuliegen scheint. Die Färbung von „R“ gleicht der von Xylose-Oligomeren, ähnlich einigen Oligosacchariden im vorderen Mitteldarm der *Hylotrupes*-Larven (s.o.). Unterschiedliche Anteile des Darmepithels am Trockengewicht der Gesamtprobe erschweren die Standardisierung der Auftragsmengen. So scheint der Hinterdarm von *Hylotrupes* mehr Zucker zu enthalten, als der davor liegende hintere Mitteldarm. In ähnlicher Weise enthält der Kot scheinbar mehr „R“ als der Hinterdarm. Freilich fehlt in der Trockenmasse des Kots gegenüber dem Hinterdarm jedoch der Anteil des Darmepithels, der „R“ in der Hinterdarm-Probe verdünnt. Proben ohne Darmepithel (Nahrungsholz, Kot) sind folglich streng genommen nur untereinander vergleichbar. Die Intensität der Trehalose kann als interner Standard genutzt werden, um diese Verzerrung nachzuvollziehen. Quantitative Aussagen sind freilich nur eingeschränkt möglich.

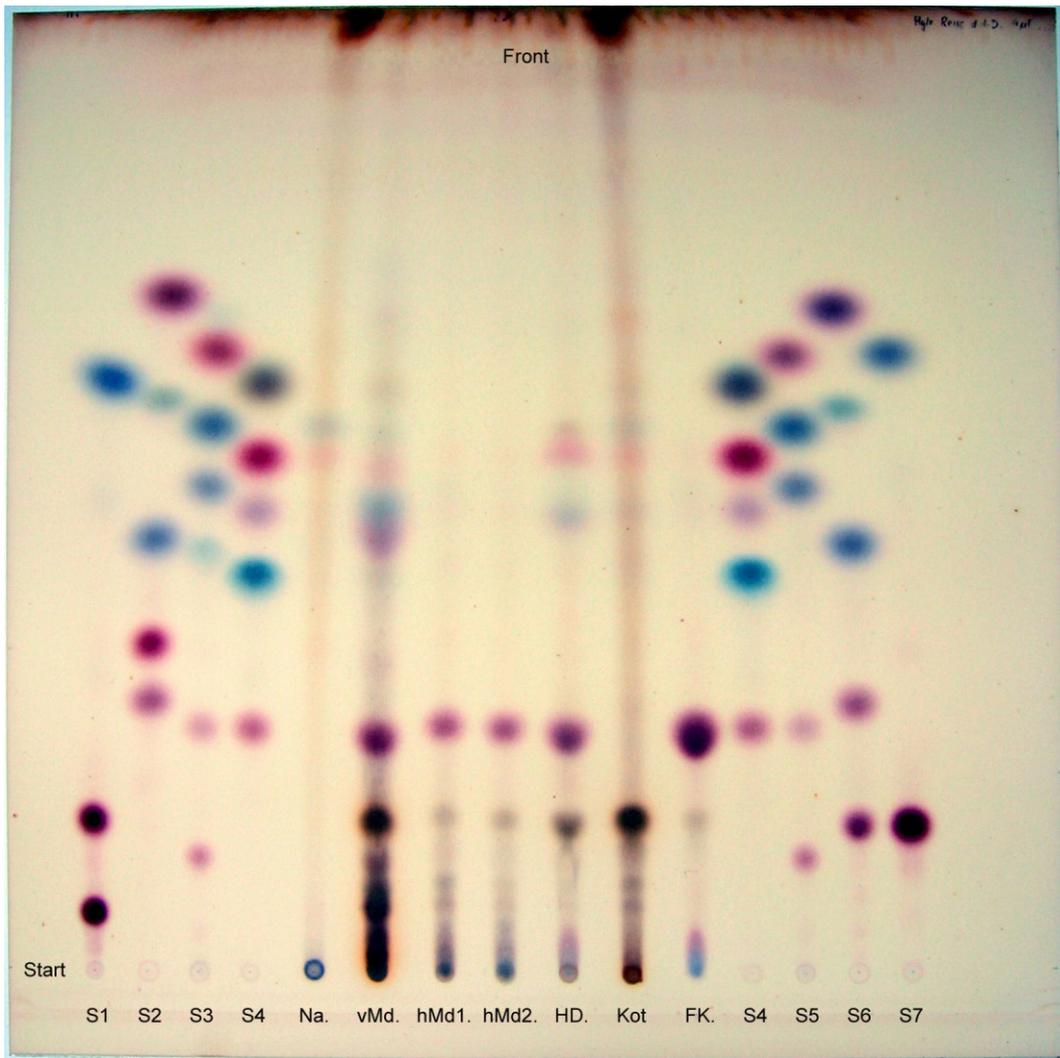


Abbildung III.21: Mono- und Oligosaccharide in Nahrungsholz, verschiedenen Darmabschnitten und Kot von *Hylotrupes bajulus*-Larven.
 Die Saccharide wurden aus gefriergetrocknetem Material extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Entwicklung mit Naphthoresorcin/Schwefelsäure-Reagens. Die Angabe der authentischen Zucker (S1-S7) innerhalb der Laufbahn erfolgt von oben nach unten.
 Laufbahnen von links nach rechts: S1: Lyxose, Raffinose, Stachyose; S2: Rhamnose, Methylglucuronsäure, Galactose, Saccharose, Maltose; S3: Fucose, Arabinose, Mannose, Glucuronsäure, Cellobiose, Cellotriose; S4: Xylose, Fructose, Glucose, Galacturonsäure, Trehalose; Na.: Nahrungsholz (gelagertes Kiefern-splintholz); vMd.: vorderer Mitteldarm; hMd1.: hinterer Mitteldarm/1. Bogen; hMd2.: hinterer Mitteldarm/2. Bogen; HD.: Hinterdarm; Kot: Kotwalzen; FK.: Fettkörper S5: Fucose, Arabinose, Mannose, Cellobiose, Cellotriose; S6: Rhamnose, Methyl-Glucuronsäure, Galactose, Maltose, Maltotriose; S7: Ribose, Raffinose.

6.1.3. Rhagium inquisitor und Tetropium castaneum

Als Rindenfresser ernähren sich die Larven von *Rhagium inquisitor* und *Tetropium castaneum* von einer Nahrungsquelle, die potentiell reich an löslichen Zuckern ist. Lebender Fichtenbast enthält in der Hauptsache Fructose, Glucose, Saccharose und Raffinose. Diese Zucker sind in der Nahrung der Larven allenfalls in Spuren vorhanden.

Die Nahrung enthält wie bei *Leptura* (Abbildung III.19) stattdessen Trehalose, die auf die Anwesenheit von Pilzen hinweist. Der vordere Mitteldarm beider Arten beinhaltet eine Fülle von Mono- und Oligosacchariden, die sich allerdings aufgrund der coextrahierten Rindenphenole nur unzureichend trennen und identifizieren lassen. Auf die Darstellung der entsprechenden Chromatogramme wurde daher verzichtet. Auch die folgenden Darmteile sind bis auf die gewebeeigene Trehalose und die Komponente „U“ frei von Sacchariden. Im Kot beider Spezies sind keine Zucker enthalten.

6.2. *In vitro-Verdau authentischer Kohlenhydrate*

6.2.1. *Leptura rubra*

Spaltung von Cellulose und anderen Glucose-Reinpolymeren (Abbildung III.22-A): Darmextrakt von *Leptura-rubra*-Larven setzt aus den Cellulosepräparaten Baumwollinters, Avicel und weißfauler Cellulose Spuren von Glucose frei, jedoch keine Oligomere. Baumwollinters wird vergleichsweise am schwächsten angegriffen; prozessierte Substrate wie mikrokristalline Cellulose (Avicel) und weißfaule Cellulose zeigen deutlicher erkennbare Glucoseflecken. Carboxymethylcellulose (CMC) wird als lösliches Derivat der Cellulose effektiver gespalten, als die drei vorgenannten Präparate und liefert erstmals sichtbare Mengen von Oligomeren. Die Flecken längerkettiger Oligomere überlagern sich in der Chromatographie, da sie vermutlich gemischt mit ihren Carboxy-Derivaten vorliegen, welche ein verändertes Laufverhalten zeigen. Der im Vergleich zur unverdauten Probe intensiv dunkel gefärbte Auftragspunkt der verdauten CMC deutet auf weitere Abbauprodukte hin, die aufgrund ihrer Größe nicht mehr lauffähig sind.

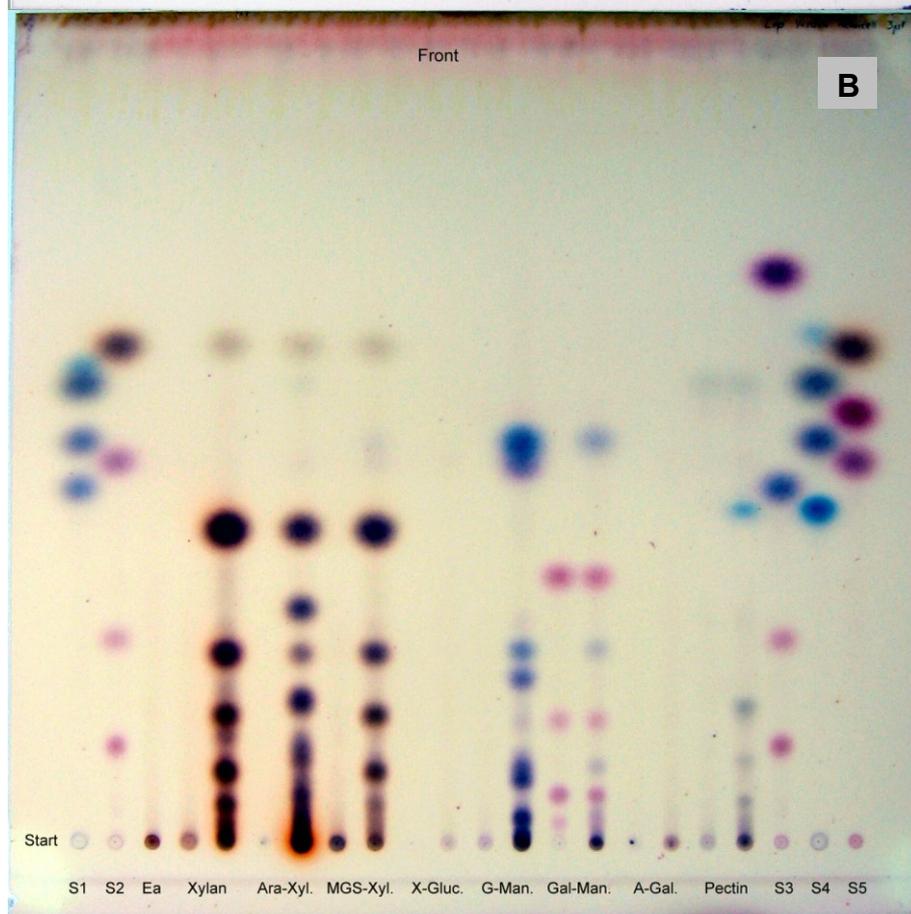
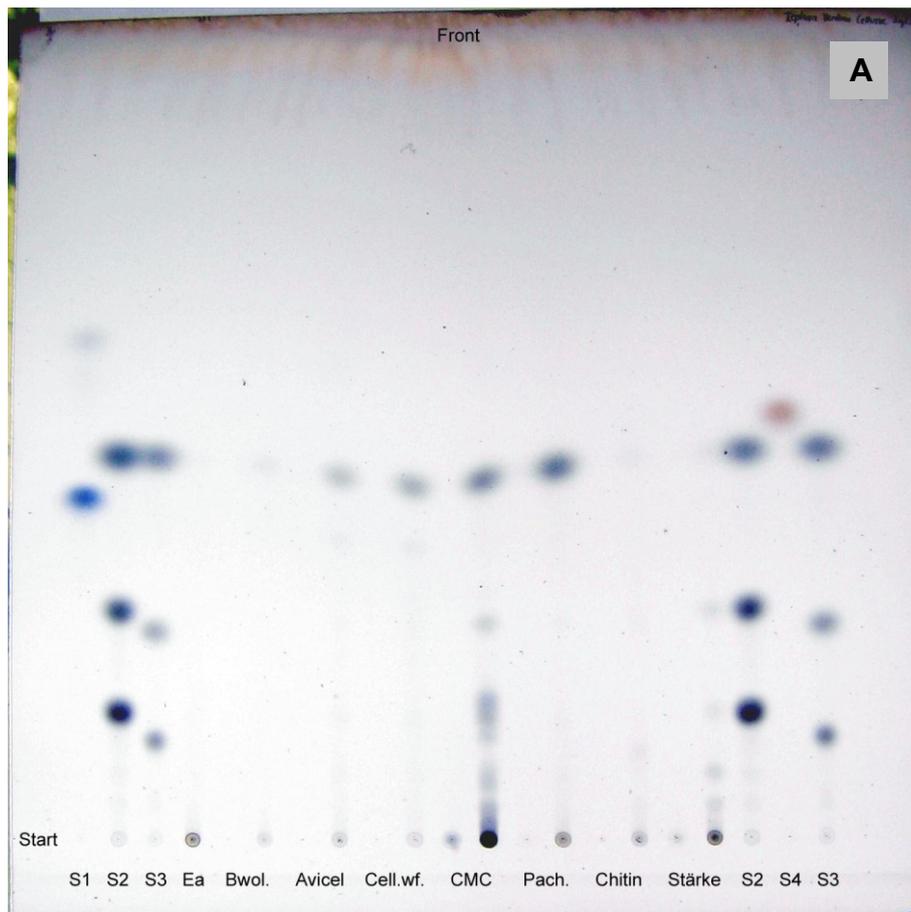
Aus Pachyman (β -1 \rightarrow 3-Poly-Glucose) setzt der Darmextrakt im Vergleich mit allen übrigen Glucosehomopolymeren die größte Menge an Glucose frei, allerdings wiederum ohne daß Oligomere auftreten. Chitin wird durch den Darmextrakt nicht angegriffen; Spuren von Glucose in der entsprechenden Laufbahn weisen auf eine Verunreinigung des Chitin-Präparates hin. Stärke wird zu Maltopentaose, Maltotetraose, Maltotriose, Maltose und Glucose hydrolysiert. Die Menge an Spaltprodukten bleibt jedoch geringer als bei der β -glycosidisch verbundenen CMC.

Spaltung von Hemicellulosen und Pektin (Abbildung III.22-B): Xylan-Präparate ergeben unter Einwirkung des Darmextraktes neben Xylose hauptsächlich Xylobiose. Daneben sind deutliche Mengen an Xylotriose, Xylotetraose, Xylopentaose und Xylohexaose zu erkennen. Höhermolekulare Bruchstücke der Xylane verlassen den Auftragspunkt nicht mehr und färben diesen ebenfalls kräftig schwarz-braun. Arabinoxylan liefert gegenüber unsubstituierten Xylan Spuren von Arabinose und einige zusätzliche Spaltprodukte mit abweichender (schwarz-bläulicher) Färbung. Diese mutmaßlichen Heterooligomere enthalten Arabinose (blau färbend!) und zeigen daher ein distinktes Lauf- und Färbeverhalten. Der Verdau von Methylglucuronoxylan hingegen liefert dasselbe Spektrum an Spaltprodukten wie unsubstituiertes Xylan. Glucomannan wird ähnlich effektiv gespalten wie die Xylane und ergibt überwiegend Mannose und Glucose. Die beiden Isomere trennen sich in der Chromatographie nur unvollständig, können jedoch anhand ihrer unterschiedlichen Färbung identifiziert werden. Die darunter „paarweise“ auftretenden Disaccharide enthalten ihrer blauen Färbung nach zumindest eine Mannose, da reine Glucosedimere (wie z.B. Cellobiose) pinkfarbene Flecken produzieren. Das obere Dimer dürfte demnach Mannobiose, der untere Fleck ein Heterodimer aus Mannose und Glucose (kein Trivialname) darstellen. Daneben treten weitere Oligomere auf, die sich jedoch nicht mehr hinreichend auftrennen bzw. aufgrund ihrer Molekülgröße den Auftragspunkt nicht mehr verlassen. Das verwendete Galactomannanpräparat enthält bereits im unverdauten Zustand eine Reihe von pink färbenden Zuckern, die folglich auch im verdauten Ansatz enthalten ist. Zusätzlich liefert der Verdau monomere Mannose und eine Reihe von wenigstens drei weiteren Spaltprodukten. Das Dimer dieser Reihe gleicht hinsichtlich Laufweite und Färbung dem mobileren Dimer, das auch bei der Spaltung von Glucomannan entsteht und ist demnach höchstwahrscheinlich Mannobiose. Darüber hinaus entstehen Mannotriose und Mannotetraose, jedoch keine Galactose. Pectin wird ebenfalls zu einer Reihe von Oligomeren und leuchtend blau färbender Galacturonsäure abgebaut. Weitere Zucker wie die in Apfelpectin enthaltene Rhamnose treten auch hier nicht auf. Spuren von Arabinose und Fructose finden sich auch im unverdauten Pectinansatz und sind demnach bereits Bestandteile des Substrates.

Im Gegensatz zu allen vorgenannten Substraten werden die komplex verzweigten Kohlenhydrate Xyloglucan und Arabinogalactan von *Leptura*-Darmextrakt praktisch nicht angegriffen. Da der „Enzymcocktail“ grundsätzlich wirksam ist, scheinen diese

Moleküle eine strukturell bedingte Resistenz gegen die *Leptura*-Verdauungsenzyme zu besitzen.

Spaltung von Zuckern (Abbildung III.22-C): Die β -glycosidisch verbundenen Disaccharide Cellobiose, Gentibiose und Lactose werden durch *Leptura*-Darmextrakt quantitativ gespalten. Unter den Zuckern mit α -Konformation wird Trehalose noch teilweise, Maltose, Melibiose, Saccharose und Raffinose jedoch überhaupt nicht umgesetzt.



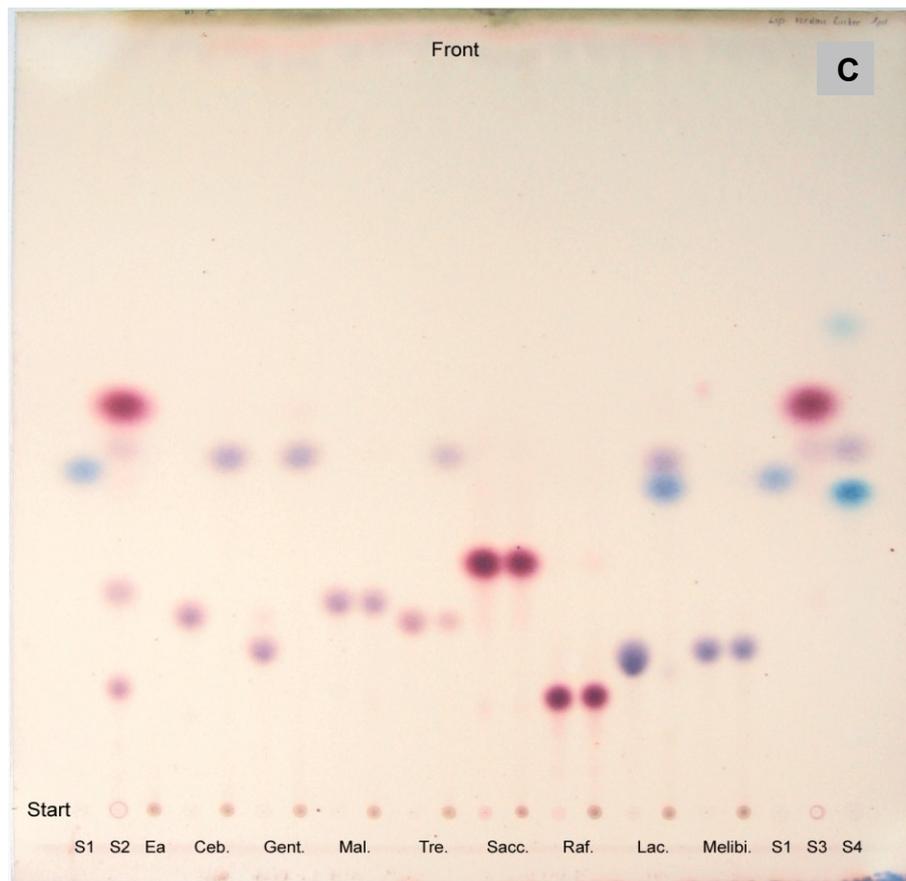


Abbildung III.22: *In vitro*-Verdau verschiedener Kohlenhydrate durch Darmextrakt aus *Leptura rubra*-Larven.

Verdau von Cellulose und -Derivaten (**A**), Hemicellulosen (**B**) sowie von Di- und Oligosacchariden (**C**) Dünnschichtchromatographie der Spaltprodukte und Entwicklung mit Anilin/Diphenylamin/Phosphorsäure-Reagens (A) bzw. Naphthoresorcin-Schwefelsäure-Reagens (B, C). Alle Kohlenhydrate wurden jeweils vor (linker Auftragspunkt) und nach dem Verdau aufgetragen (rechter Auftragspunkt). Die Angabe der authentischen Zucker (S1-S5) erfolgt innerhalb einer Laufbahn von oben nach unten, die Angabe der einzelnen Laufbahnen von links nach rechts.

A: **S1:** Galacturonsäure; **S2:** Glucose, Maltose, Maltotriose; **S3:** Glucose, Cellobiose, Cellotriose; **Ea:** Enzym (Darmextrakt) allein; **Bwol:** Baumwolllinters; **Avicel:** Mikrokristalline Cellulose; **Cell.wf.:** weißfaule Cellulose; **CMC:** Carboxymethylcellulose; **Pach.:** Pachyman; **Chitin:** Arthropoden-Chitin; **Stärke:** lösliche Kartoffelstärke; **S4:** N-Acetylglucosamin.

B: **S1:** Methyl-Glucuronsäure, Arabinose, Mannose, Galactose; **S2:** Xylose, Glucose, Cellobiose, Cellotriose; **Ea:** Enzym (Darmextrakt) allein; **Xylan:** Unsubstituiertes Xylan; **Ara-Xyl.:** Arabinoxylan; **MGS-Xyl.:** Methyl-Glucuronsäure-Xylan; **X-Gluc.:** Xyloglucan; **G-Man.:** Glucomannan; **Gal-Man.:** Galactomannan; **A-Gal.:** Arabinogalactan; **Pectin:** Polygalacturonsäure; **S3:** Rhamnose, Galactose, Cellobiose, Cellotriose; **S4:** Methylgalacturonsäure, Arabinose, Mannose, Galacturonsäure; **S5:** Xylose, Fructose, Glucose.

C: **S1:**Galactose; **S2:** Fructose, Glucose, Maltose, Maltotriose; **Ea:** Enzym (Darmextrakt) allein; **Ceb.:** Cellobiose; **Gent.:** Gentibiose; **Mal.:** Maltose; **Tre.:** Trehalose; **Sacc.:** Saccharose; **Raf.:** Raffinose; **Lac.:** Lactose; **Melibi.:** Melibiose; **S3:** Fructose, Glucose; **S4:** Glucose, Galacturonsäure

6.2.2. *Rhagium inquisitor*

Spaltung von Cellulose und anderen Glucose-Reinpolymeren (Abbildung III.23-A):

Darmextrakt aus *Rhagium inquisitor*-Larven setzt aus den angebotenen Cellulose-Varianten Glucose frei. Die freigesetzte Menge ist bei Baumwolllinters marginal, bei Avicel und weißfauler Cellulose jedoch etwas deutlicher erkennbar. Carboxymethylcellulose erweist sich als geeignetes Substrat. In den genannten Ansätzen treten neben Glucose auch Di- und Trisaccharide auf. Diese laufen allerdings auf Höhe der α -Glycoside Maltose bzw. Maltotriose und sind demnach keine direkten Abbauprodukte der Cellulose. Die authentischen β -Glycoside Cellobiose und Cellotriose laufen deutlich langsamer als die Isomeren Maltose und Maltotriose. Pachyman wird im Vergleich zu den Cellulose-Präparaten wesentlich stärker angegriffen. Entsprechende Mengen an Oligomeren treten dagegen auch hier nicht auf. Chitin wird - ähnlich wie Baumwolllinters - nur marginal angegriffen. Der Verdau liefert Spuren von N-Acetylglucosamin, Glucose und einigen oligomeren Abbauprodukten. Das Erscheinen von Glucose deutet auf eine Verunreinigung des Chitin-Substrates mit einem Glucan hin. Es ist folglich auch nicht auszuschließen, daß die in Spuren auftretenden Oligomere im Chitin-Ansatz ebenfalls auf diese Verunreinigung zurückgehen und das Chitin selbst (wie Cellulose) tatsächlich nur Monomere liefert.

Stärke wird geringfügig effizienter als Chitin zu Maltotriose, Maltose und Spuren von Glucose hydrolysiert.

Spaltung von Hemicellulosen und Pectin (Abbildung III.23-B):

Rhagium-Darmextrakt spaltet mit unterschiedlicher Effizienz alle zum Verdau eingesetzten Hemicellulosen. Xylane werden effizient zu Xylobiose, Xylotriase, Xyloetraose, Xylopentaose und Xylohexaose hydrolysiert; monomere Xylose entsteht dagegen auch hier nur in Spuren. Bei allen Xylanen treten zusätzliche Spaltprodukte auf, die sich von den Xylosehomooligomeren durch ein anderes Laufverhalten abheben. Im Falle von Arabinoxylan erscheint es naheliegend, daß es sich hierbei um Heterooligomere handelt, die Arabinose enthalten. Da einige zusätzliche Oligomere auch im Verdau von unsubstituiertem Xylan vorkommen, könnten es darüber hinaus auch Isoformen der entsprechenden Zucker sein, die aus nicht spaltbaren Kettenverzweigungen resultieren. Ein Vergleich mit den Abbauprodukten bei anderen Larven (vgl. Abbildung III.22-B, Abbildung III.24-B und Abbildung III.25-B) legt darüber hinaus nahe, daß das

unsubstituierte Xylan entgegen den Herstellerangaben weitere Zuckerarten enthält, die sich in den Oligomeren mit abweichender Laufweite wiederfinden.

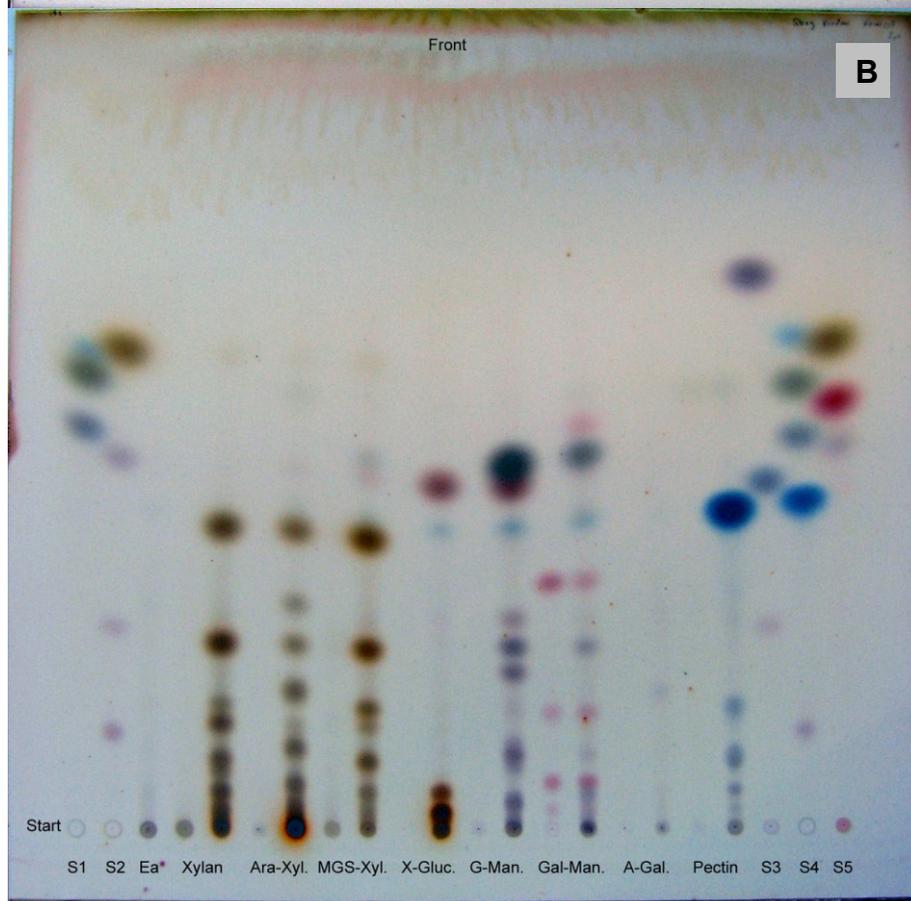
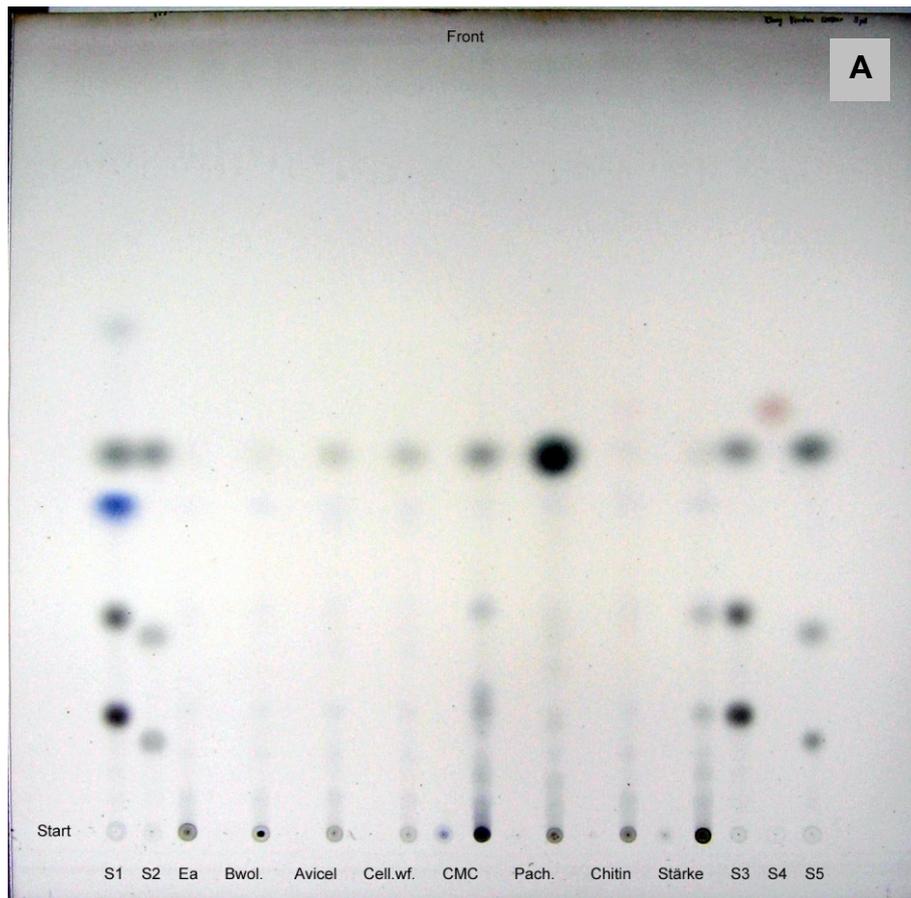
Xyloglucan liefert eine deutliche Menge Glucose und zwei gerade noch mobile Oligomere. Spaltprodukte einer mittleren Größe im Bereich zwischen den Oligomeren und der Glucose fehlen dagegen völlig.

Glucomannan wird überwiegend zu Glucose und Mannose hydrolysiert. Die Menge an Monosacchariden übersteigt die aller anderen zum Verdau angebotenen Substrate. Daneben entstehen etliche Oligomere, die sich in der Chromatographie in Dreier-Gruppen anordnen. Durch die zufällig alternierende Abfolge von Glucose- und Mannoseeinheiten im Glucomannanmolekül entstehen Homo- und Heterooligomere mit jeweils unterschiedlicher Laufweite. Die mobilste Gruppe besteht vermutlich aus Cellobiose, Mannobiose und einem Heterodimer aus Mannose und Glucose (kein Trivialname). Durch die vermehrten Kombinationsmöglichkeiten bei Tri- und Tetrasacchariden trennen sich diese Gruppen nicht mehr vollständig.

Der Verdau von Galactomannan führt zur Bildung von Monomeren und Oligomeren der Mannose, nicht jedoch zur Freisetzung von Galactose. Eine bereits im unverdauten Substrat enthaltene Reihe pink färbender Oligosaccharide wird von *Rhagium*-Darmextrakt ebenfalls gespalten. Das daraus freigesetzte Monosaccharid gleicht hinsichtlich Färbung und Laufweite der authentischen Fructose (siehe Laufbahn S5). Die pink färbenden Oligosaccharide könnten demnach Bruchstücke eines Fructans darstellen.

Arabinogalactan wird als einziges Hemicellulose-Präparat nur geringfügig angegriffen und liefert lediglich Spuren oligomerer Spaltprodukte. Pectin hingegen wird wie die übrigen Hemicellulosen bereitwillig in verhältnismäßig große Mengen von Galacturonsäure und etliche Oligomere gespalten.

Spaltung von Zuckern (Abbildung III.23-C): Die angebotenen β -Saccharide werden gänzlich (Cellobiose) oder teilweise (Gentibiose und Lactose) in ihre Monomere gespalten. Beim Verdau von Lactose und Maltose kommt es zur Bildung vorher nicht vorhandener Trisaccharide. Di- und Trisaccharide mit α -Konfiguration werden dagegen nicht (Melibiose, Saccharose, Raffinose) oder deutlich verhaltener (Maltose, Trehalose) umgesetzt.



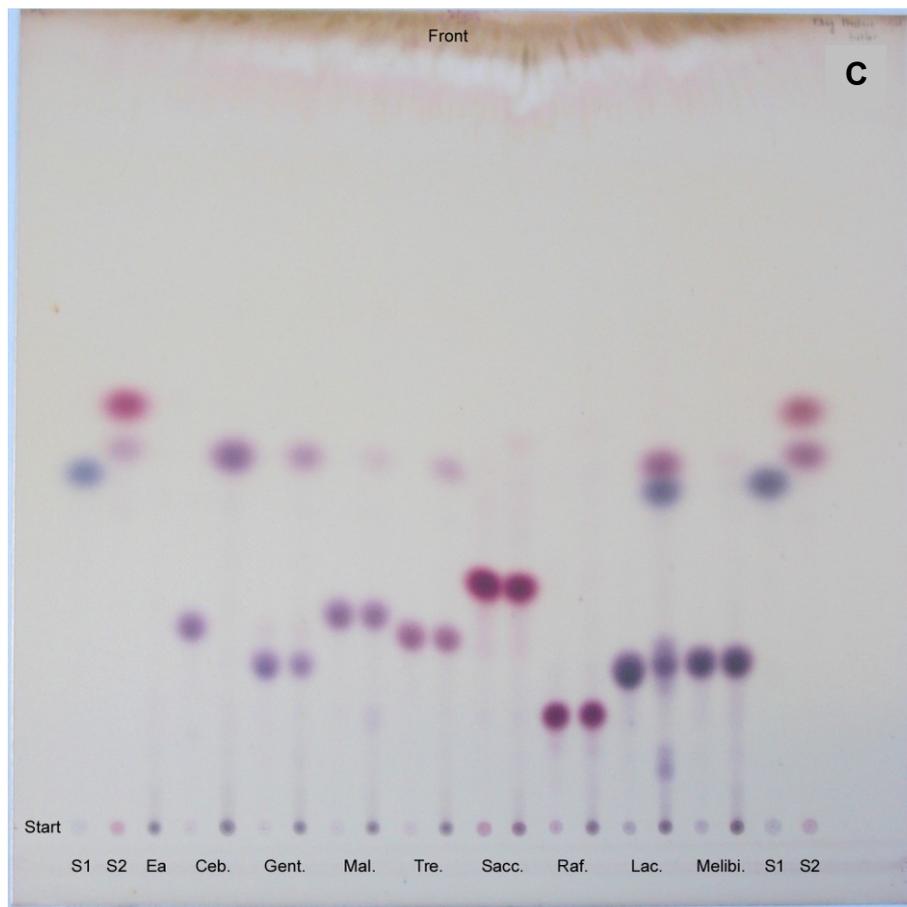


Abbildung III.23 *In vitro*-Verdau verschiedener Kohlenhydrate durch Darmextrakt aus *Rhagium inquisitor*-Larven.

Verdau von Cellulose und -Derivaten (A), Hemicellulosen (B) sowie von Di- und Oligosacchariden (C) Dünnschichtchromatographie der Spaltprodukte und Entwicklung mit Anilin/Diphenylamin/Phosphorsäure-Reagens (A) bzw. Naphthoresorcin-Schwefelsäure-Reagens (B, C). Alle Kohlenhydrate wurden jeweils vor (linker Auftragspunkt) und nach dem Verdau aufgetragen (rechter Auftragspunkt). Die Angabe der authentischen Zucker (S1-S5) erfolgt innerhalb einer Laufbahn von oben nach unten, die Angabe der einzelnen Laufbahnen von links nach rechts.

A: S1: Glucose, Galacturonsäure, Maltose, Maltotriose; S2: Glucose, Cellobiose, Cellotriose; Ea: Enzym (Darmextrakt) allein; Bwol: Baumwollinters; Avicel: Mikrokristalline Cellulose; Cell.wf.: weißfaule Cellulose; CMC: Carboxymethylcellulose; Pach.: Pachyman; Chitin: Arthropoden-Chitin; Stärke: lösliche Kartoffelstärke; S3: Glucose, Maltose, Maltotriose; S4: N-Acetylglucosamin; S5: Methyl-Glucuronsäure, Cellobiose, Cellotriose.

B: S1: Methyl-Glucuronsäure, Arabinose, Mannose; S2: Xylose, Glucose, Cellobiose, Cellotriose; Ea: Enzym (Darmextrakt) allein; Xylan: Unsubstituiertes Xylan; Ara-Xyl.: Arabinoxylan; MGS-Xyl.: Methyl-Glucuronsäure-Xylan; X-Gluc.: Xyloglucan; G-Man.: Glucomannan; Gal-Man.: Galactomannan; A-Gal.: Arabinogalactan; Pectin: Polygalacturonsäure S3: Rhamnose, Galactose, Cellobiose; S4: Methyl-Galacturonsäure, Arabinose, Mannose, Galacturonsäure, Cellotriose; S5: Xylose, Fructose, Glucose.

C: S1:Galactose; S2: Fructose, Glucose; Ea: Enzym (Darmextrakt) allein; Ceb.: Cellobiose; Gent.: Gentibiose; Mal.: Maltose; Tre.: Trehalose; Sacc.: Saccharose; Raf.: Raffinose; Lac.: Lactose; Melibi.: Melibiose.

6.2.3. *Tetropium castaneum*

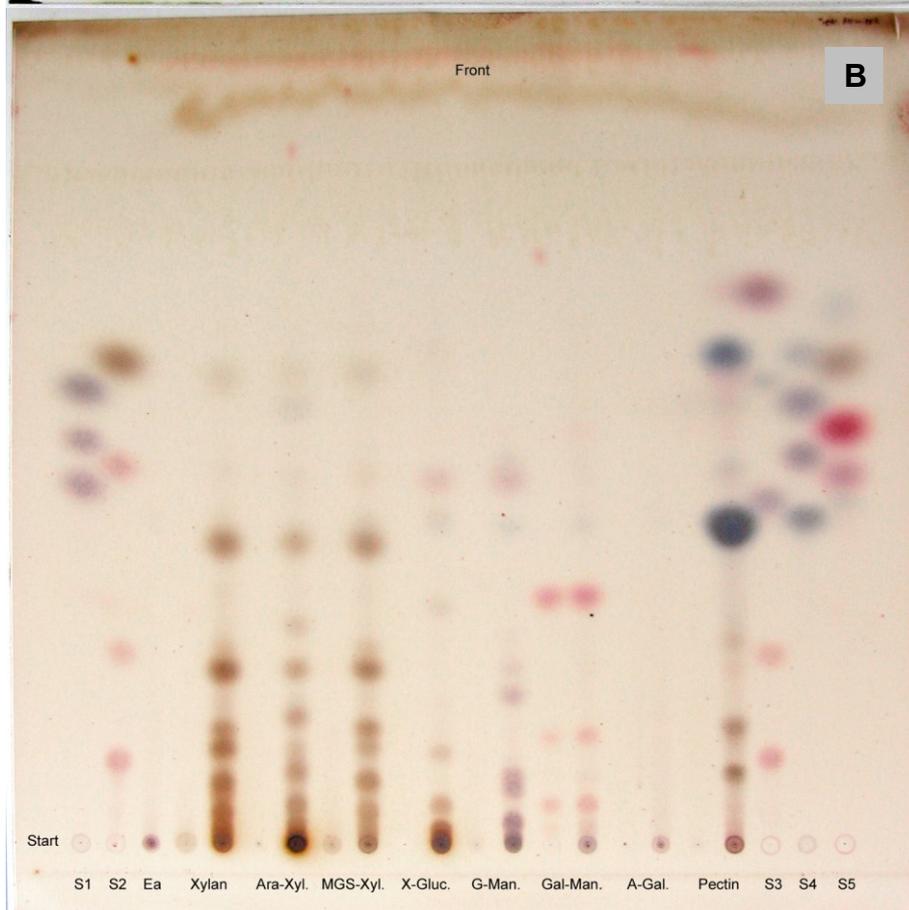
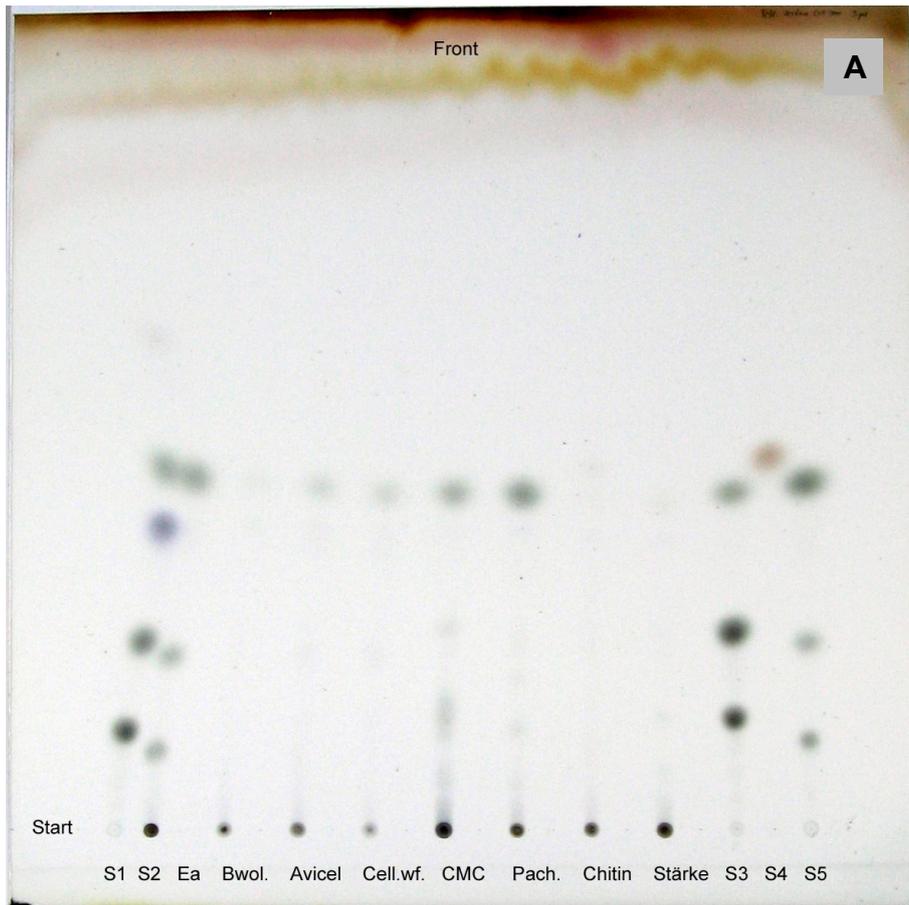
Spaltung von Cellulose und anderen Glucose-Reinpolymeren (Abbildung III.24-A): Glucosehomopolymere werden von *Tetropium*-Darmextrakt mit wechselnder Effizienz gespalten. Baumwollinters und Stärke liefern ausschließlich Glucose, deren Menge nahe der Nachweisgrenze ist. Avicel und weißfaule Cellulose ergeben eine deutlichere, aber immer noch vergleichsweise geringe Menge. Carboxymethylcellulose und Pachyman liefern im Vergleich dazu die größte Menge Glucose und darüber hinaus Spuren von Oligomeren. Chitin wird nicht erkennbar angegriffen.

Spaltung von Hemicellulosen und Pectin (Abbildung III.24-B): Xylane werden zu Xylose, Xylobi-, Xylotri-, Xyloetra-, Xylopenta- und Xylohexaose hydrolysiert. Höhermolekulare Spaltprodukte verlassen den Startpunkt nicht mehr. „Aus der Reihe fallende“ zusätzliche Oligosaccharide dürften Heterooligomere darstellen, die sich durch die Substituenten der Xylanmoleküle ergeben. Arabinoxylan liefert darüber hinaus Spuren von Arabinose. Xyloglucan ergibt unter Einfluß des Darmextrakts Glucose, Galactose und eine Reihe von Oligomeren, die in ihrer bräunlichen Färbung Xylose-Sacchariden gleichen. Aufgrund der ungewöhnlichen α -Konfiguration der Xylose innerhalb der Seitenketten des Xyloglucans ergeben sich beim Abbau entsprechend konfigurierte Bruchstücke, die ein anderes Laufverhalten zeigen als die Isomeren Saccharide, die beim Abbau der (β -)Xylane entstehen. Der Verdau von Glucomannan liefert hauptsächlich Glucose. Mannose findet sich nur in Form von Oligomeren, die sich anders färben und anders laufen als Glucosehomooligomere (vgl. Cellobiose und Cellotriose). Galactomannan wird nur geringfügig angegriffen. Allenfalls in der Nähe des Auftragspunktes finden sich geringe Mengen längererkettiger Bruchstücke. Ebenso wenig wird die im unverdauten Galactomannan enthaltene, pink färbende Zuckerreihe umgesetzt. Keinerlei Abbau ist bei Arabinogalactan zu erkennen. Dagegen wird Pectin ausnehmend effektiv zu Galacturonsäure und ihren Oligomeren hydrolysiert. Die ebenfalls in deutlicher Menge auftretende Methylgalacturonsäure ist allerdings ein Artefakt⁵.

Spaltung von Zuckern (Abbildung III.24-C): Die β -Saccharide Cellobiose, Lactose und Gentibiose werden durch *Tetropium*-Darmextrakt jeweils deutlich gespalten. Die

⁵ Methylierte Galacturonsäure kommt zwar in natürlichen Pectinen durchaus vor, hat sich in diesem Fall allerdings sekundär durch Veresterung eines Teils der freigesetzten Galacturonsäure mit dem Lösungsmittel Methanol ergeben. Frühere Chromatogramme desselben Ansatzes zeigten keine oder weniger Methylglucuronsäure.

Spaltung der Cellobiose erfolgt dabei mit Abstand am effektivsten. Unter den α -Sacchariden liefert Trehalose eine mit Gentibiose vergleichbare Menge, Maltose noch Spuren von Glucose. Die übrigen α -glycosidisch verbundenen Zucker Saccharose, Raffinose und Melibiose werden nicht erkennbar angegriffen.



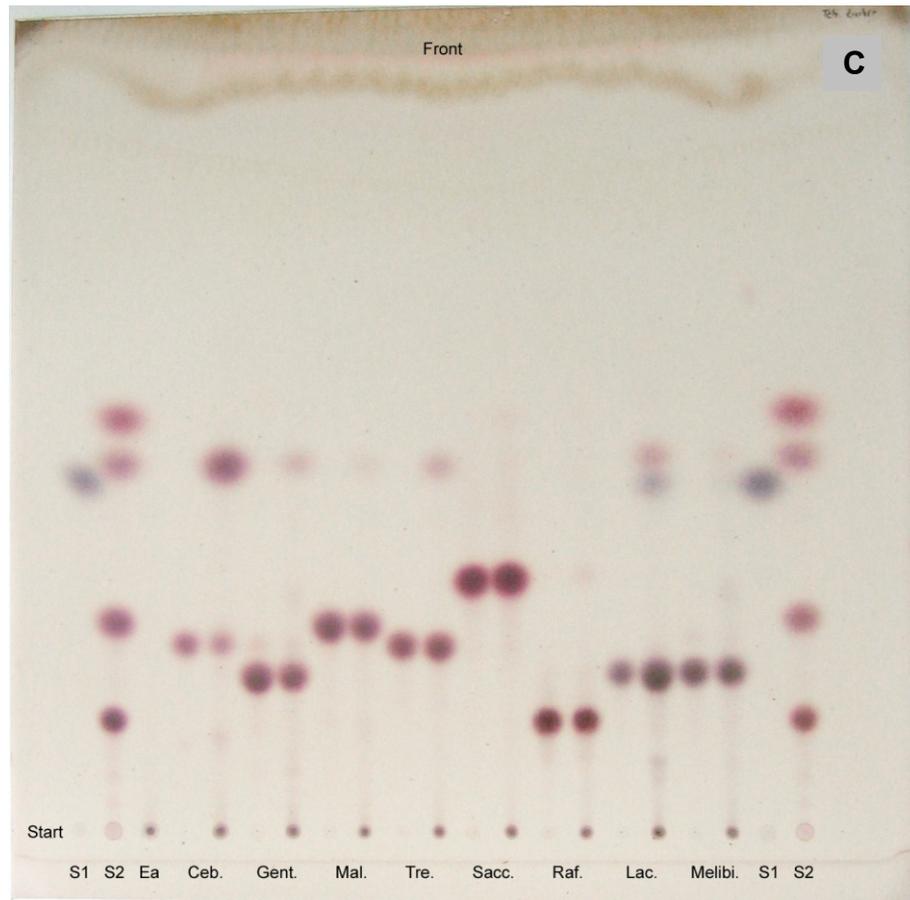


Abbildung III.24 *In vitro*-Verdau verschiedener Kohlenhydrate durch Darmextrakt aus *Tetrospium castaneum*-Larven.

Verdau von Cellulose und -Derivaten (**A**), Hemicellulosen (**B**) sowie von Di- und Oligosacchariden (**C**)
Dünnschichtchromatographie der Spaltprodukte und Entwicklung mit

Anilin/Diphenylamin/Phosphorsäure-Reagens (**A**) bzw. Naphthoresorcin-Schwefelsäure-Reagens (**B, C**).
Alle Kohlenhydrate wurden jeweils vor (linker Auftragspunkt) und nach dem Verdau aufgetragen (rechter
Auftragspunkt). Die Angabe der authentischen Zucker (**S1-S5**) erfolgt innerhalb einer Laufbahn von oben
nach unten, die Angabe der einzelnen Laufbahnen von links nach rechts.

A: Die **S1**: Galacturonsäure; **S2**: Glucose, Maltose, Maltotriose; **S3**: Glucose, Cellobiose, Cellotriose; **Ea**:
Enzym (Darmextrakt) allein; **Bwol**: Baumwolllinters; **Avicel**: Mikrokristalline Cellulose; **Cell.wf.**:
weißfaule Cellulose; **CMC**: Carboxymethylcellulose; **Pach.**: Pachyman; **Chitin**: Arthropoden-Chitin;
Stärke: lösliche Kartoffelstärke; **S4**: N-Acetylglucosamin; **S5**: Glucose, Cellobiose, Cellotriose.

B: **S1**: Arabinose, Mannose, Galactose; **S2**: Xylose, Glucose, Cellobiose, Cellotriose; **Ea**: Enzym
(Darmextrakt) allein; **Xylan**: Unsubstituiertes Xylan; **Ara-Xyl.**: Arabinoxylan; **MGS-Xyl.**: Methyl-
Glucuronsäure-Xylan; **X-Gluc.**: Xyloglucan; **G-Man.**: Glucomannan; **Gal-Man.**: Galactomannan; **A-
Gal.**: Arabinogalactan; **Pectin**: Polygalacturonsäure **S3**: Rhamnose, Galactose, Cellobiose, Cellotriose;
S4: Methyl-Galacturonsäure, Arabinose, Mannose, Galacturonsäure; **S5**: Methylglucuronsäure, Xylose,
Fructose, Glucose, Glucuronsäure.

C: **S1**: Galactose; **S2**: Fructose, Glucose, Maltose, Maltotriose; **Ea**: Enzym (Darmextrakt) allein; **Ceb.**:
Cellobiose; **Gent.**: Gentibiose; **Mal.**: Maltose; **Tre.**: Trehalose; **Sacc.**: Saccharose; **Raf.**: Raffinose; **Lac.**:
Lactose; **Melibi.**: Melibiose.

6.2.4. *Hylotrupes bajulus*

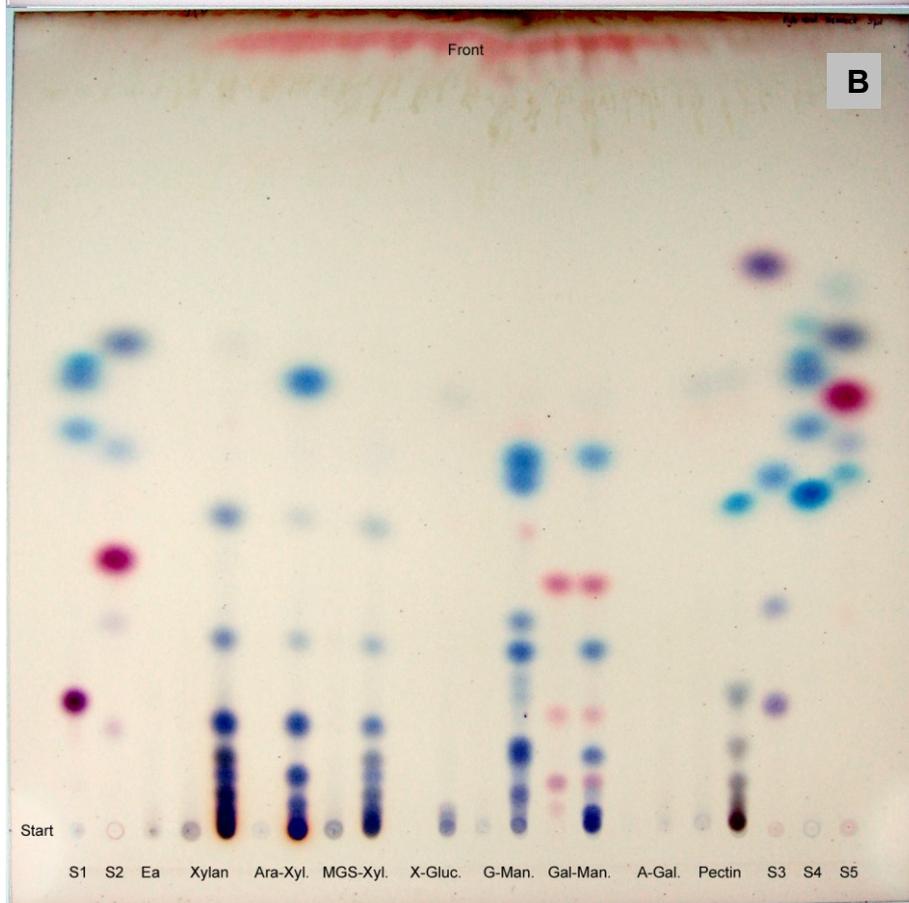
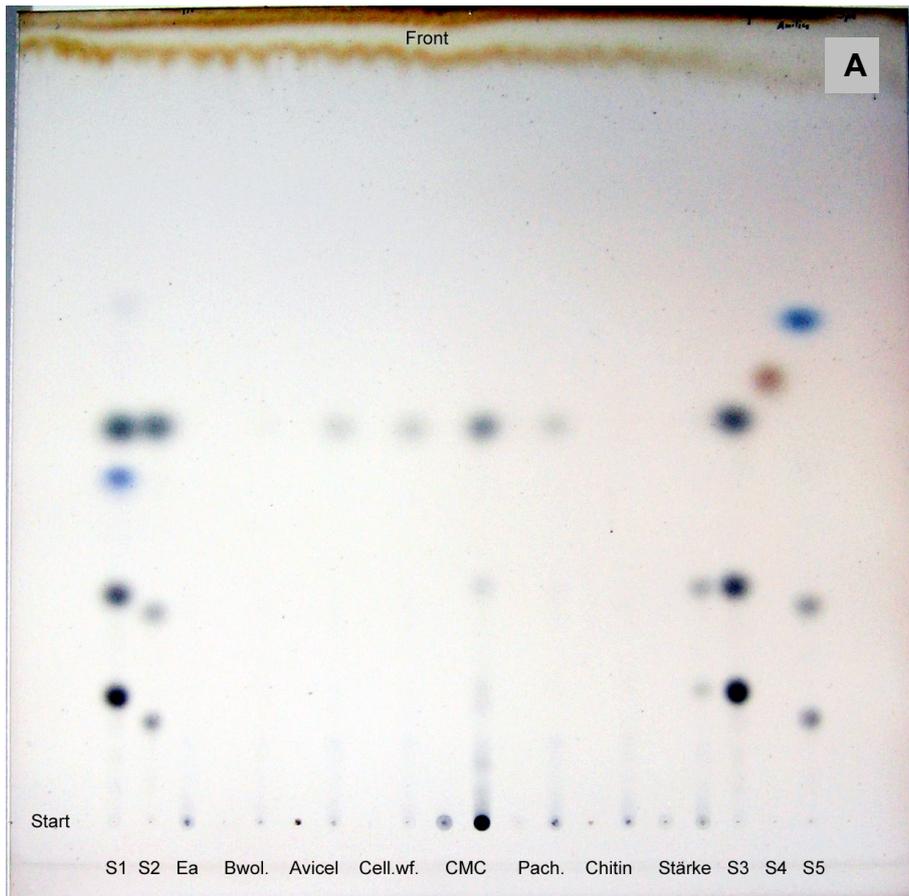
Spaltung von Cellulose und anderen Glucose-Reinpolymeren (Abbildung III.25-A): *Hylotrupes*-Darmextrakt zeigt gegenüber allen Glucosehomopolymeren eine vergleichsweise schwache Aktivität. Baumwollinters und Chitin lassen keinerlei Spaltung erkennen; Avicel, weißfaule Cellulose und Pachyman ergeben steigende, aber sehr geringe Mengen an Glucose. Carboxymethylcellulose liefert als einziges Substrat in dieser Gruppe Oligosaccharide und einen deutlichen Glucosefleck. Bei den Oligomeren handelt es sich allerdings um Maltose und Maltotriose und demnach nicht um primäre Abbauprodukte der Cellulose. Der Auftragspunkt des CMC-Verdaus ist im Gegensatz zu allen anderen Ansätzen des Chromatogramms kräftig gefärbt, was auf die Bildung immobiler Bruchstücke hinweist. Die Auftragspunkte der übrigen Ansätze zeigen nur die schwache Färbung der Enzym-Leerprobe, sodaß selbst ein ansatzweiser Abbau der Substratmoleküle und die damit verbundene Bildung noch langkettiger Bruchstücke hier ausgeschlossen werden kann. Der Abbau von Stärke liefert Maltose und Maltotriose, in Übereinstimmung mit dem Verdau authentischer Maltose (Abbildung III.25-C) jedoch keine Glucose.

Spaltung von Hemicellulosen und Pectin (Abbildung III.25-B): Alle Xylanpräparate werden von *Hylotrupes*-Darmextrakt bereitwillig gespalten zu Xylobi-, Xylotri-, Xylotetra-, Xylopenta-, und Xylohexaose. Höhermolekulare Oligomere in großer Menge färben den Auftragspunkt schwarz. Xylose hingegen ist in den Ansätzen wie bei den übrigen Larven nicht oder nur in Spuren vorhanden. Neben den hier eher blau⁶ färbenden reinen Xyloseoligomeren entstehen bei unsubstituiertem Xylan und Methylglucuronoxylan zusätzliche Oligomere, die sich zwischen den reinen Xylosesacchariden befinden und sich grau bis schwarz färben. Nach der distinkten Färbung zu urteilen, handelt es sich hierbei um verschiedene Heterooligomere. Diese fehlen beim Verdau von Arabinoxylan. Ein deutlicher Arabinose-Fleck zeigt entsprechend, daß die Arabinose-Substituenten effektiv abgespalten werden. Glucomannan liefert verhältnismäßig große Mengen Mannose und Glucose, sowie eine Reihe von Oligomeren. Der Aufbau des Glucomannans aus unregelmäßig alternierenden Glucose- und Mannoseeinheiten führt beim Abbau offenbar zu einem

⁶ Reine Xylose und ihre Oligomere färben sich mit dem Naphthoresorcinreagens in der Regel braun (vgl. Abbildungen III.22-B, III.23-B und III.24-B). Der Färbeprozess ist jedoch abhängig von einigen äußeren Faktoren wie Temperatur, Entwicklungsdauer, usw., was auf verschiedenen Platten zu variablen Farbtönen führen kann.

Gemisch von Homo- und Heterooligomeren. Die beiden prominenten Disaccharide stellen vermutlich Cellobiose und Mannobiose (vgl. Galactomannan) dar. Galactomannan hingegen liefert aufgrund seines reinen Mannoserückgrates eine homologe Reihe von Mannose und deren Oligomeren, darunter Mannobiose, Mannotriose und Mannotetraose; weitere Oligomere verbleiben am Startpunkt. Galactose tritt hingegen weder als Monomer, noch erkennbar in den Oligomeren auf. Eine bereits im unverdauten Galactomannan vorhandene Reihe pink färbender Zucker wird nicht angegriffen. Pectin wird zu Galacturonsäure und einer Reihe von Oligosacchariden abgebaut. Weitere Zucker wie die im Apfelpectin enthaltene Rhamnose treten nicht auf. Im Gegensatz zu den bereits genannten Hemicellulosen werden Arabinogalactan und Xyloglucan nicht bzw. nur marginal verdaut. Der *Hylotrupes*-Darmextrakt vermag lediglich Spuren von Arabinose (endständig an den Seitenketten des Xyloglucans) und einige langkettige Oligomere freizusetzen.

Spaltung von Zuckern (Abbildung III.25-C): Die β -Saccharide Cellobiose, Gentibiose und Lactose werden quantitativ oder partiell in ihre Monomere gespalten. Bei den angebotenen α -Sacchariden Maltose, Trehalose, Saccharose, Raffinose und Melibiose hingegen ist kein Umsatz erkennbar.



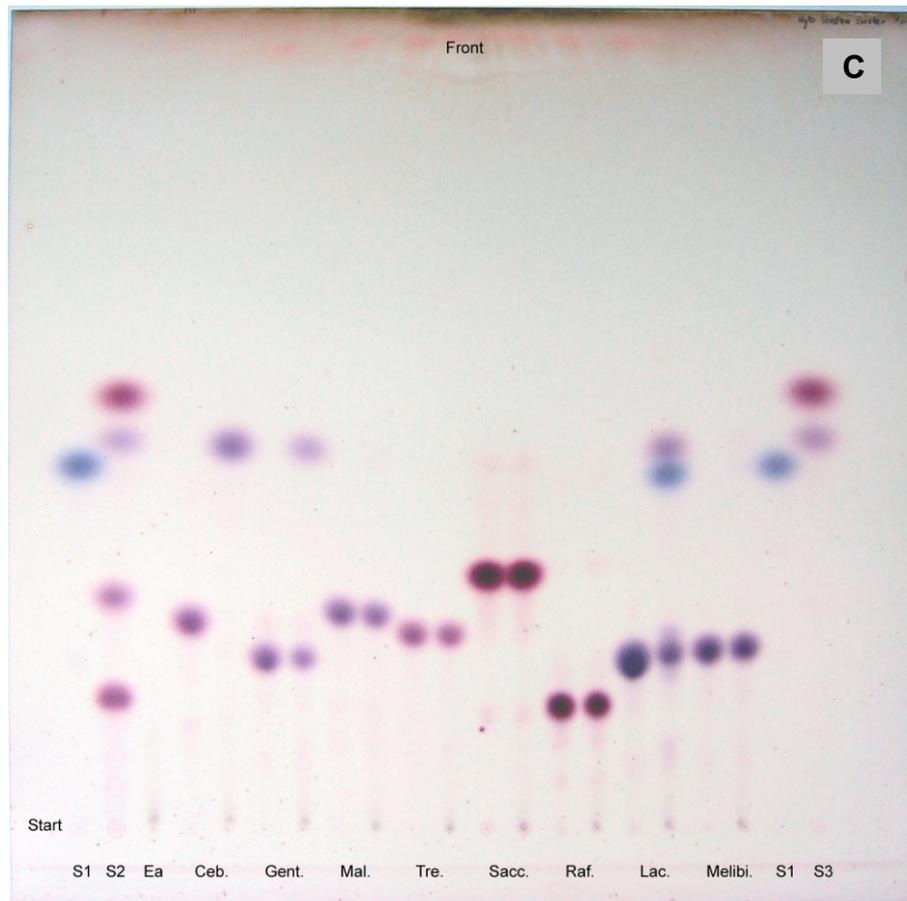


Abbildung III.25 *In vitro*-Verdau verschiedener Kohlenhydrate durch Darmextrakt aus *Hylotrypes bajulus*-Larven.

Verdau von Cellulose und -Derivaten (**A**), Hemicellulosen (**B**) sowie von Di- und Oligosacchariden (**C**) Dünnschichtchromatographie der Spaltprodukte und Entwicklung mit Anilin/Diphenylamin/Phosphorsäure-Reagens (**A**) bzw. Naphthoresorcin-Schwefelsäure-Reagens (**B, C**). Alle Kohlenhydrate wurden jeweils vor (linker Auftragspunkt) und nach dem Verdau aufgetragen (rechter Auftragspunkt). Die Angabe der authentischen Zucker (**S1-S5**) erfolgt innerhalb einer Laufbahn von oben nach unten, die Angabe der einzelnen Laufbahnen von links nach rechts.

A: **S1:** Glucose, Galacturonsäure, Maltose, Maltotriose; **S2:** Glucose, Cellobiose, Cellotriose; **Ea:** Enzym (Darmextrakt) allein; **Bwol:** Baumwollinters; **Avicel:** Mikrokristalline Cellulose; **Cell.wf.:** weißfaule Cellulose; **CMC:** Carboxymethylcellulose; **Pach.:** Pachyman; **Chitin:** Arthropoden-Chitin; **Stärke:** lösliche Kartoffelstärke; **S3:** Glucose, Maltose, Maltotriose; **S4:** N-Acetylglucosamin; **S5:** Methyl-Glucuronsäure, Cellobiose, Cellotriose.

B: **S1:** Methylglucuronsäure, Arabinose, Mannose, Raffinose; **S2:** Xylose, Glucose, Saccharose, Cellobiose, Cellotriose; **Ea:** Enzym (Darmextrakt) allein; **Xylan:** Unsubstituiertes Xylan; **Ara-Xyl.:** Arabinoxylan; **MGS-Xyl.:** Methyl-Glucuronsäure-Xylan; **X-Gluc.:** Xyloglucan; **G-Man.:** Glucomannan; **Gal-Man.:** Galactomannan; **A-Gal.:** Arabinogalactan; **Pectin:** Polygalacturonsäure **S3:** Rhamnose, Galactose, Maltose, Maltotriose; **S4:** Methyl-Glucuronsäure, Arabinose, Mannose, Galacturonsäure; **S5:** Xylose, Fructose, Glucose, Glucuronsäure.

C: **S1:** Galactose; **S2:** Fructose, Glucose, Maltose, Maltotriose; **Ea:** Enzym (Darmextrakt) allein; **Ceb.:** Cellobiose; **Gent.:** Gentibiose; **Mal.:** Maltose; **Tre.:** Trehalose; **Sacc.:** Saccharose; **Raf.:** Raffinose; **Lac.:** Lactose; **Melibi.:** Melibiose **S3:** Fructose, Glucose

6.3. *In vitro*-Spaltung chromogener Zucker-Analoga

6.3.1. *Leptura rubra*

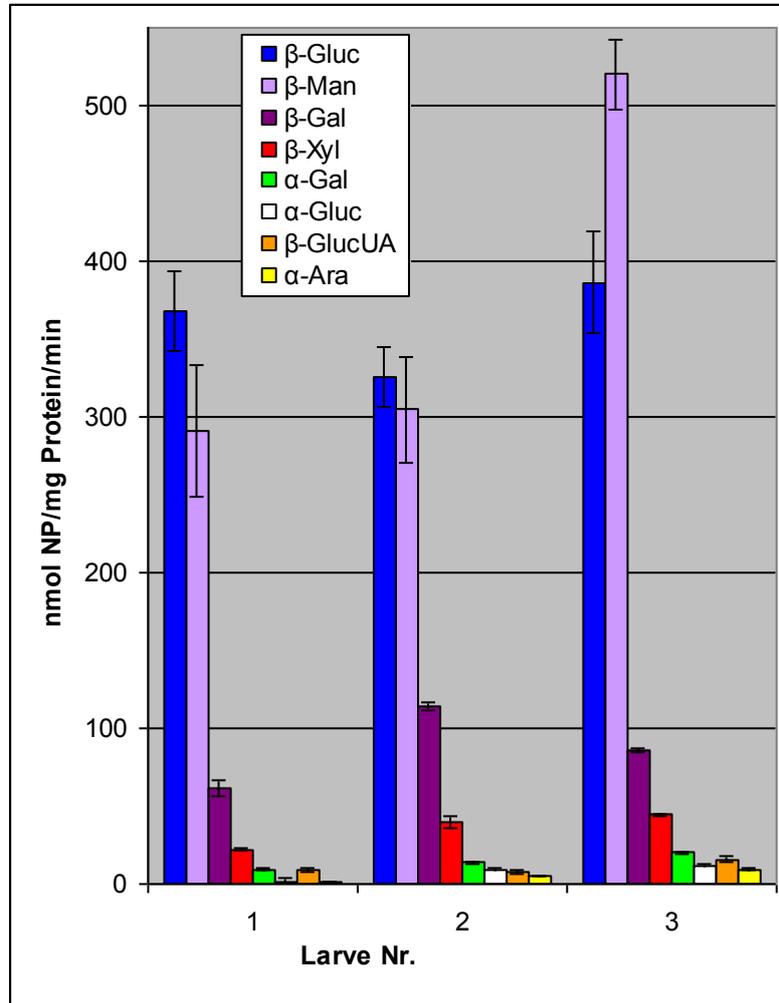


Abbildung III.26: Exo-Glucosidase-Aktivitäten des Darmextraktes dreier Larven des Rothalsbocks *Leptura rubra*.

Dargestellt ist die spezifische (Spaltungs-)Aktivität gegenüber chromogenen Konjugaten von p-Nitrophenol mit verschiedenen Monosacchariden.

β -Gluc: β -Glucosidase (Cellobiase), EC 3.2.1.21; **β -Man:** β -Mannosidase, EC 3.2.1.25; **β -Gal:** β -Galactosidase, EC 3.2.1.23; **β -Xyl:** β -Xylosidase (Xylobiase), EC 3.2.1.37; **α -Gal:** α -Galactosidase (Melibiase), EC 3.2.1.22; **α -Gluc:** α -Glucosidase (Maltase), EC 3.2.1.3 (20); **β -GlucUA:** β -Glucuronidase, EC 3.2.1.31; **α -Ara:** α -Arabinofuranosidase, EC 3.2.1.55.

Die Darmextrakte aus Larven des Rothalsbocks zeigen überwiegend β -Glucosidase- und β -Mannosidase-Aktivität, wobei β -Glucosid und β -Mannosid insgesamt mit vergleichbarer Effizienz abgebaut werden. Während bei Larve 1 die β -Mannosidase etwas hinter die β -Glucosidase zurücktritt, überwiegt bei Larve 3 die β -Mannosidase deutlich; Bei Larve 2 sind beide Aktivitäten im Rahmen der Messgenauigkeit praktisch gleich hoch. An dritter und vierter Stelle folgt jeweils mit deutlichem Abstand

die Spaltung des β -Galactopyranose- bzw. β -Xylopyranose-Konjugates. Gegen die übrigen Substrate zeigt der Darmextrakt der Larven nur marginale Aktivität: Während α -Galactosidase und β -Glucuronidase noch bei allen Larven meßbar sind, finden sich α -Glucosidase und α -Arabinofuranosidase lediglich bei den Individuen 2 und 3. Im Vergleich mit den übrigen Spezies zeichnet sich der *Leptura*-Darmextrakt durch seine hohe β -Mannosidase-Aktivität aus.

6.3.2. *Rhagium inquisitor*

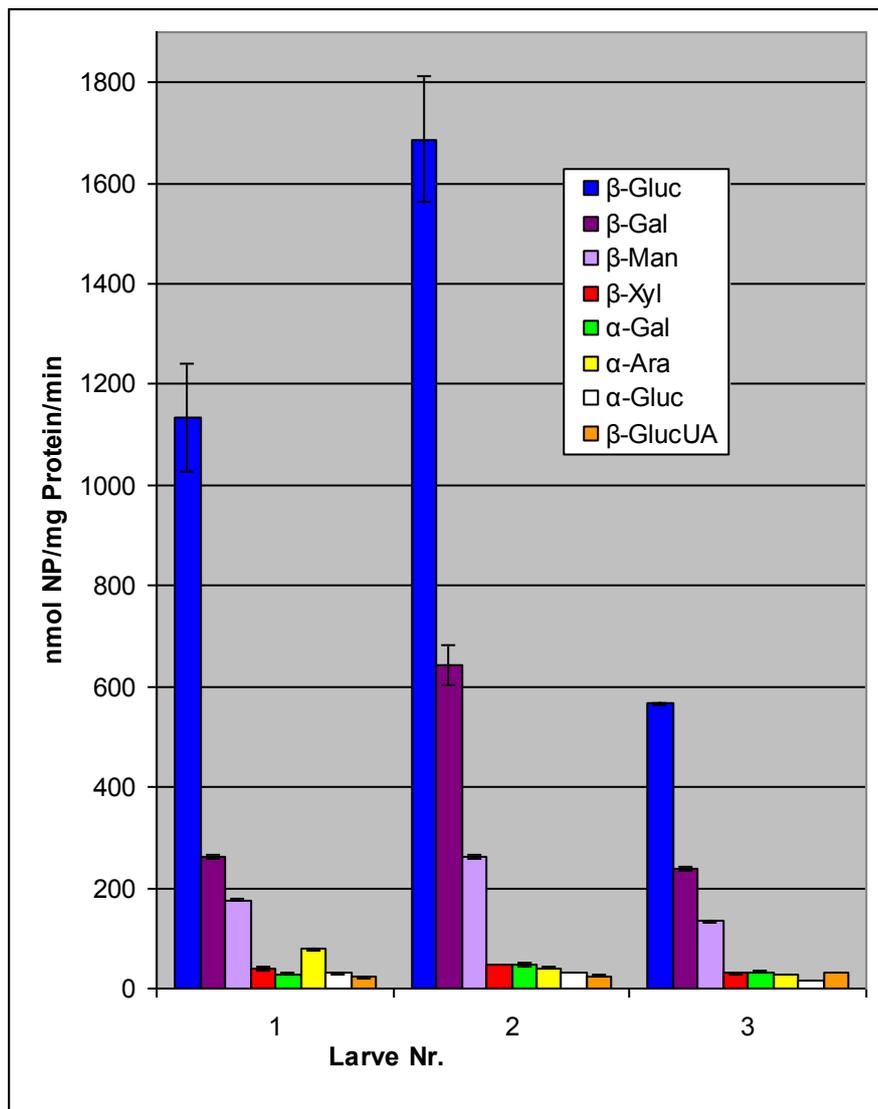


Abbildung III.27: Exo-Glucosidase-Aktivitäten des Darmextraktes dreier Larven des Zangenbocks *Rhagium inquisitor*.

Dargestellt ist die spezifische (Spaltungs-)Aktivität gegenüber chromogenen Konjugaten von p-Nitrophenol mit verschiedenen Monosacchariden.

β -Gluc: β -Glucosidase (Cellobiase), EC 3.2.1.21; **β -Gal:** β -Galactosidase, EC 3.2.1.23; **β -Man:** β -Mannosidase, EC 3.2.1.25; **β -Xyl:** β -Xylosidase (Xylobiase), EC 3.2.1.37; **α -Gal:** α -Galactosidase (Melibiase), EC 3.2.1.22; **α -Ara:** α -Arabinofuranosidase, EC 3.2.1.55; **α -Gluc:** α -Glucosidase (Maltase), EC 3.2.1.3 (20); **β -GlucUA:** β -Glucuronidase, EC 3.2.1.31.

Der Darmextrakt aller *Rhagium*-Larven besitzt übereinstimmend eine ausgeprägte β -Glucosidase-Aktivität. Das β -Glucosid wird bei Larve 1 um ein Vielfaches schneller gespalten als alle übrigen Substrate, bei den Larven 2 und 3 immer noch mehr als doppelt so schnell wie das an zweiter Stelle folgende β -Galactosid. An dritter Stelle besteht übereinstimmend eine noch deutliche Aktivität gegen das β -Mannose-Konjugat. Die übrigen Nitrophenol-Konjugate mit β -Xylopyranose, α -Galactopyranose, α -Arabinofuranose, α -Glucopyranose und β -Glucuronsäure werden zwar bei allen Larven meßbar gespalten, jedoch im Vergleich mit den Haupt-Aktivitäten nur sehr verhalten und ohne augenscheinliche Präferenz.

6.3.3. *Tetropium castaneum*

Im Darmextrakt aller *Tetropium*-Larven überwiegen die Aktivitäten von β -Glucosidase, β -Galactosidase und β -Mannosidase. Wie bei *Rhagium* ist die Aktivität der β -Glucosidase mit Abstand am höchsten. β -Galactosidase und β -Mannosidase zeigen jeweils etwa $\frac{1}{3}$ der Aktivität der β -Glucosidase. Die Spaltung der übrigen Substrate tritt weit hinter die erstgenannten zurück. Noch am deutlichsten ist die Spaltung des α -Galactose-Konjugats, gefolgt von den β -Xylose-, α -Glucose-, β -Glucuronsäure- und α -Arabinose-Konjugaten. Die Abfolge der einzelnen Aktivitäten ist zwar weiterhin bei allen Individuen die gleiche, jedoch erscheinen die meßbaren Unterschiede verglichen mit den Hauptaktivitäten vernachlässigbar. Es besteht eine weitgehende Ähnlichkeit zwischen den Aktivitätsprofilen von *Tetropium* und *Rhagium*, wemngleich die β -Mannosidase-Aktivität bei *Rhagium* relativ etwas geringer ausfällt.

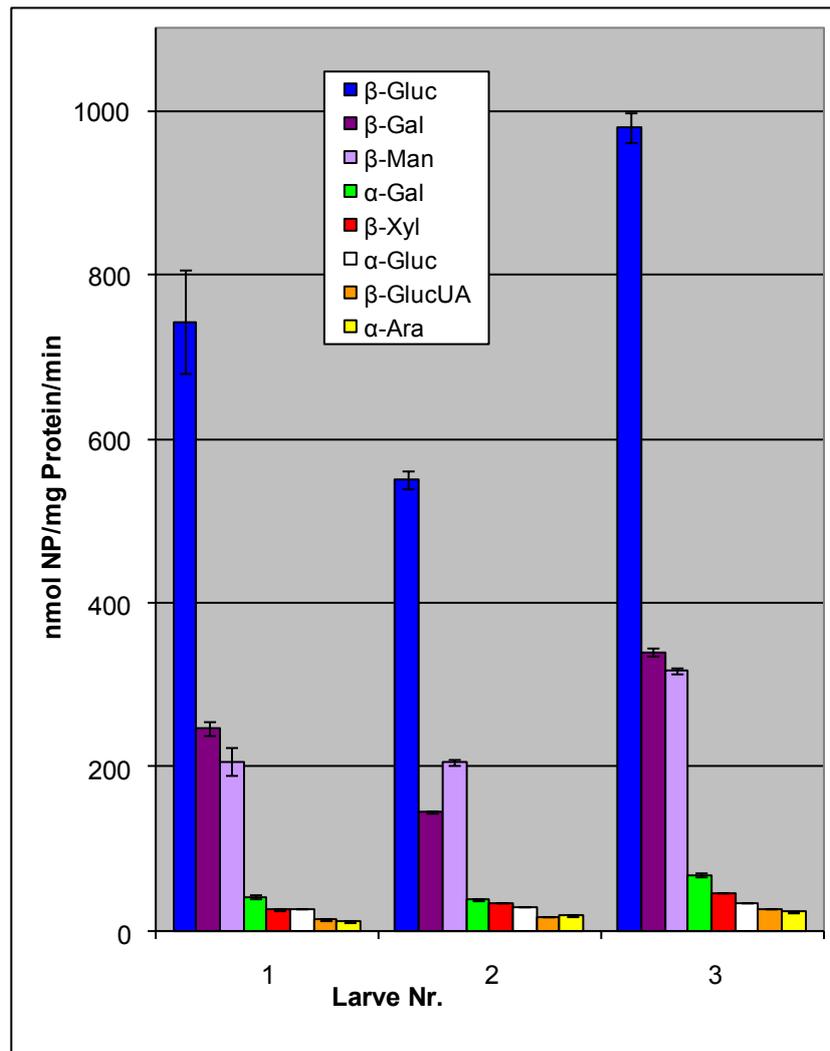


Abbildung III.28: Exo-Glucosidase-Aktivitäten des Darmextraktes dreier Larven des braunen Fichtensplintbocks *Tetropium castaneum*. Dargestellt ist die spezifische (Spaltungs-)Aktivität gegenüber chromogenen Konjugaten von p-Nitrophenol mit verschiedenen Monosacchariden. **β-Gluc:** β-Glucosidase (Cellobiase), EC 3.2.1.21; **β-Gal:** β-Galactosidase, EC 3.2.1.23; **β-Man:** β-Mannosidase, EC 3.2.1.25; **α-Gal:** α-Galactosidase (Melibiase), EC 3.2.1.22; **β-Xyl:** β-Xylosidase (Xylobiase), EC 3.2.1.37; **α-Gluc:** α-Glucosidase (Maltase), EC 3.2.1.3 (20); **β-GlucUA:** β-Glucuronidase, EC 3.2.1.31; **α-Ara:** α-Arabinofuranosidase, EC 3.2.1.55.

6.3.4. *Hylotrupes bajulus*

Der Darmextrakt der Hausbocklarven besitzt eine ausgeprägte α-Arabinofuranosidase-Aktivität, die bei allen Larven deutlich höher ausfällt als die an zweiter Position befindliche β-Glucosidase. Bei Individuum Nr. 3 ist die Aktivität der α-Arabinofuranosidase etwa dreimal höher als die β-Glucosidase. *Hylotrupes*-Larven unterscheiden sich hierin grundlegend von allen übrigen Spezies, bei denen die α-Arabinofuranosidase nur marginal meßbar ist und stattdessen die β-Glucosidase alle

übrigen Aktivitäten übertrifft. Die Aktivität der β -Mannosidase dagegen erreicht an dritter Stelle ein mit *Rhagium* und *Tetropium* vergleichbares Niveau. Ein meßbarer Abbau erfolgt darüber hinaus noch beim β -Galactose- und β -Xylose-Konjugat; die Aktivitäten gegen die übrigen Substrate liegen bereits im Bereich der Meßungenauigkeit und sind damit zu vernachlässigen.

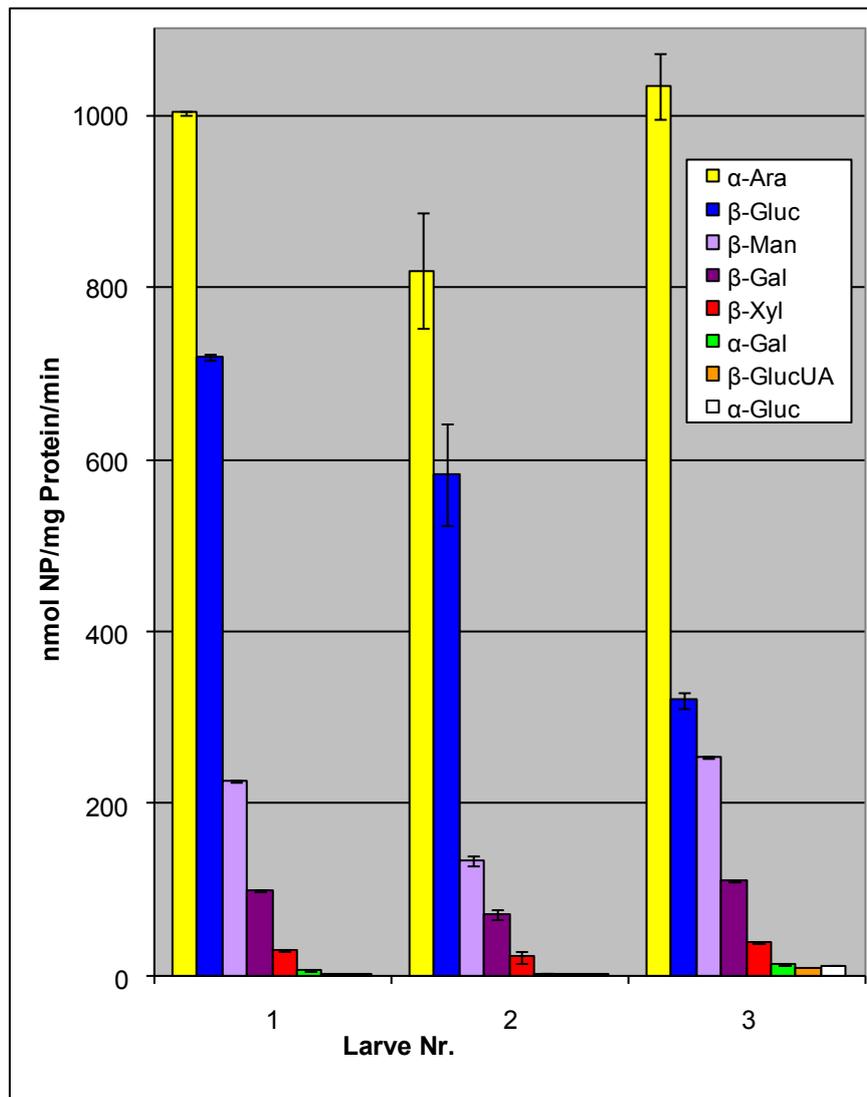


Abbildung III.29: Exo-Glucosidase-Aktivitäten des Darmextraktes dreier Larven des Hausbocks *Hylotrupes bajulus*.

Dargestellt ist die spezifische (Spaltungs-)Aktivität gegenüber chromogenen Konjugaten von p-Nitrophenol mit verschiedenen Monosacchariden.

α -Ara: α -Arabinofuranosidase, EC 3.2.1.55; **β -Gluc:** β -Glucosidase (Cellobiase), EC 3.2.1.21; **β -Man:** β -Mannosidase, EC 3.2.1.25; **β -Gal:** β -Galactosidase, EC 3.2.1.23; **β -Xyl:** β -Xylosidase (Xylobiase), EC 3.2.1.37; **α -Gal:** α -Galactosidase (Melibiase), EC 3.2.1.22; **β -GlucUA:** β -Glucuronidase, EC 3.2.1.31; **α -Gluc:** α -Glucosidase (Maltase), EC 3.2.1.3 (20).

IV DISKUSSION

1. Morphologie des Larvendarms und der Myzetome

Die larvalen Darmsysteme der untersuchten Cerambyciden unterscheiden sich anatomisch und histologisch nur geringfügig. *Hylotrupes*-Larven besitzen einen vergleichsweise langen Hinterdarm. Da in diesem Bereich die Rückresorption des Wassers aus der Nahrungsmasse erfolgt [SCHMIDT, 1965], kann dies als Anpassung an die trockene Holznahrung dieser Spezies gewertet werden. Die hauptsächlichen Unterschiede bestehen jedoch im Vorkommen und im Bau von Myzetomen am vorderen Mitteldarm. Die Myzetome aller Arten sind mit einem dichten Tracheen-Netzwerk umgeben, was möglicherweise nicht nur die Wirtszellen, sondern auch die Hefe-Symbionten mit Sauerstoff versorgt. Die Myzetome der verschiedenen Cerambycidenarten sind nach gängiger Auffassung unabhängig voneinander entstanden. Der unterschiedliche Bau (Abbildung III.8, III.9, III.10 und III.12) und die phylogenetisch verschiedenen Symbionten (Abbildung III.3) stützen diese Sichtweise [JONES et al., 1999]. Dennoch zeigen alle Cerambyciden in vergleichbarer Weise eine ständige Sukzession der Myzetozyten, die am Ende ihrer Entwicklung ganz oder in Teilen in das Darmlumen ausgestoßen werden. Die Myzetome entstehen offenbar als Ausstülpungen des Darmepithels, indem normale Epithelzellen an der Basis des Myzetoms von Symbionten infiziert werden und sich infolgedessen zu Myzetozyten differenzieren. Die Zellen im Übergangsbereich enthalten stets nur eine geringe Anzahl Symbionten; Die Dichte der Hefen wächst mit zunehmendem Abstand vom Darmepithel (Abbildung III.11). Anders als bislang angenommen [SCHOHMANN, 1937], werden auch bei *Rhagium inquisitor* die Myzetozyten durch Abgabe in das Darmlumen vollständig eliminiert. SCHOHMANN interpretiert diesen Vorgang als Folge einer Schädigung der Wirtszelle durch die Symbionten. Tatsächlich scheinen die Myzetozyten im Laufe der Zeit ihre Ribosomen zu verlieren, da ihr Cytoplasma mit fortschreitender Entwicklung immer weniger durch rRNA-gerichtete Oligonucleotidsonden anfärbbar ist (vgl. Abb. III.9, III.12 und III.13). Der Verlust der eigenen Proteinbiosynthese würde die begrenzte Lebensdauer der Myzetozyten erklären und warum sie laufend neu gebildet werden müssen. Der Ausstoß „alter“ Myzetozyten könnte demnach eine Notwendigkeit sein, um Platz für physiologisch aktivere Myzetozyten zu schaffen. Gleichzeitig bietet sich so die Möglichkeit eines *recyclings*

der in die Myzetozyten investierten Komponenten über den Darm. Die Larven sind andererseits durchaus in der Lage, die Entwicklung der Symbionten zu kontrollieren: *Rhagium*-Larven eliminieren im Herbst einen Großteil ihrer Symbionten und die Myzetome schrumpfen auf einen Bruchteil ihrer ursprünglichen Größe; auch die Myzetome von *Leptura rubra* enthalten in der kalten Jahreszeit eine deutlich reduzierte Anzahl von Symbionten. Stirbt die Wirtslarve, so wird die Entwicklung der Symbionten beider Arten mangels Kontrolle durch den Wirt vorübergehend beschleunigt [SCHOHMANN, 1937]. Sowohl die Position der Myzetome am vorderen Ende des Darmsystems als auch die mit der Fraßperiode der Larven gekoppelte Entwicklung der Hefesymbionten legen nahe, daß die Mikroorganismen in die Ernährung der Larven involviert sind. Unklar ist allerdings weiterhin, ob hierbei die Substanz der Hefezellen selbst genutzt wird, ob sie zu ihren Lebzeiten Nährstoffe absondern, oder ob ihre Präsenz im Darmlumen auf andere Weise nützlich ist. FISH-Untersuchungen zeigen, daß die Myzetomsymbionten den Nahrungsbrei in allen Darmteilen durchsetzen und sich oftmals im Bereich des Darmepithels konzentrieren (Abbildung III.10). Daß die Symbionten auch aus den hinteren Darmteilen lebend isoliert werden können, spricht gegen eine Verdauung der Zellen. Aufgrund des Fehlens von Blindsäcken im Verdauungssystem der Cerambycidenlarven und des hohen Durchsatzes an Nahrungsmasse besteht die Gefahr, daß mutualistische Mikroorganismen im Darmlumen schnell eliminiert werden. Dieser Vorgang läßt sich am Ende der Larvenentwicklung regelmäßig beobachten. Die intrazelluläre „Zucht“ und laufende Abgabe der Symbionten könnte auch eine Entwicklung darstellen, um trotz der ungünstigen Anatomie des Darms eine konstante Besiedelung des Darminhalts aufrecht zu erhalten.

Eine Eigenheit des Cerambycidendarms gegenüber anderen Xylophagen sind die Krypten des hinteren Mitteldarmes, die sich im Gegensatz zu Myzetomen bei bisher allen untersuchten Arten an dieser Stelle befinden (vgl. Abbildung III.1, III.2 und III.18). Während die Krypten von *Rhagium inquisitor*, *Hylotrupes bajulus*, *Plagionotus arcuatus* und *Leptura rubra* unregelmäßig verstreut und kugelig sind, haben die Krypten bei *Tetropium castaneum* die Form kurzer Schläuche und sind in zwei oder vier Längsreihen angeordnet. Histologische, fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Krypten ergaben, daß es sich in allen Fällen um englumige Evaginationen des Darmepithels handelt, das darüber hinaus keine Besonderheiten erkennen läßt. Wenngleich die Strukturen prädestiniert erscheinen, um

Mikroorganismen zu beherbergen, erwiesen sie sich in der Regel als gänzlich leer. Es wäre somit denkbar, daß die Krypten lediglich der Oberflächenvergrößerung dienen.

Phylogenie und mögliche Funktion der Myzetomsymbionten:

Die ursprünglich isolierten Myzetomsymbionten von *Rhagium inquisitor* (ehemals *Harpium inquisitor*) wurden zunächst als *Candida tropicalis* var. *rhagii* klassifiziert [MÜLLER, 1934]. Der mutmaßlich selbe Symbiont wurde in weiteren Studien mehrfach aus weiteren Larven und Imagines isoliert und unter anderem als *Mycoderma bispora* und *Candida guillermondi* identifiziert. Seit den Untersuchungen von JURZITZA wird der Myzetomsymbiont von *Rhagium inquisitor* als die eigenständige Spezies *Candida rhagii* geführt [JURZITZA et al., 1960]. Ursächlich für die widersprüchliche Klassifizierung des Symbionten waren einerseits zweifellos die begrenzten Unterscheidungsmöglichkeiten in früheren Studien, die sich auf rein physiologische Merkmale der Organismen in Kultur beschränkten, andererseits mögliche Probleme bei der Bestimmung der Wirtstiere. Seine 18S-rRNA-Sequenz separiert den *Rhagium inquisitor*-Myzetomsymbionten eindeutig von allen anderen bekannten Stämmen und bestätigt seinen Status als eigene Art. Alle in dieser Arbeit untersuchten Larven von *Rhagium inquisitor* enthalten in ihren Myzetomen ausschließlich Zellen von *Candida rhagii*. Obwohl *Candida rhagii* in Kultur auch außerhalb der Myzetome bereitwillig wächst, ist bis jetzt kurioserweise kein freilebendes Vorkommen dieser Art bekannt.

JURZITZA rechnet den kultivierbaren Myzetomsymbionten aus *Leptura rubra* zu *Candida tenuis*, obwohl er sich auch physiologisch geringfügig von dieser Art unterscheidet [JURZITZA et al., 1960]. Die Analyse seiner 18S-rRNA-Sequenz zeigt daß der *Leptura rubra*-Symbiont mit *Candida tenuis* deutlich weniger verwandt ist, als mit etlichen anderen bekannten Stämmen (Abbildung III.3). Der phylogenetisch nächste Verwandte des Myzetomsymbionten ist *Candida shehatae*, mit dessen 18S-rRNA-Sequenz annähernd 100 % Übereinstimmung besteht. Der Myzetomsymbiont von *Leptura rubra* ist damit auf Basis der 18S-rRNA mehr oder weniger identisch mit denen weiterer *Leptura*-Arten wie *Leptura maculicornis* und *Leptura cerambyciformis* [NARDON&GRENIER, 1989]. Es ist gleichwohl schwierig, auf Basis eines einzelnen Markergens zu entscheiden, ob es sich um Stämme derselben Spezies oder um zwei sehr nah verwandte Arten handelt. Der hohe Verwandtschaftsgrad der Myzetomsymbionten zweier *Leptura*-Arten spricht entgegen der gängigen Auffassung für einen gemeinsamen Ursprung der Symbiose bei dieser Cerambycidengattung. Die

Untersuchung weiterer *Leptura*-Spezies dürfte wertvolle Hinweise zur Klärung dieser grundlegenden Frage liefern.

FISH-Untersuchungen mit Stamm-spezifischen Oligonucleotidsonden zeigen, daß die Larven von *Leptura rubra* gleichzeitig wenigstens einen weiteren Hefestamm in ihren Myzetomen beherbergen können (Abbildung III.11). Myzetozyten mit den *Candida shehatae* nahestehenden Zellen waren zwar in allen untersuchten Larven anzutreffen, in Einzelfällen überwogen jedoch mit einem anderen Hefestamm besiedelte Myzetozyten. Die betreffenden Larven zeigten weder äußerliche noch histologische Unterschiede zu „normalen“ Individuen, die nur *Candida shehatae* beherbergten. Die Bedeutung dieses Befunds und die Phylogenie der alternativen Symbionten sind noch zu klären. Da die Larven offenbar mit verschiedenen Hefestämmen erfolgreich in Symbiose leben können, erscheint es möglich, die wechselseitigen Leistungen der Partner durch gezielten Austausch der Hefen zu untersuchen. Mangelmutanten mit definierten Stoffwechseldefekten könnten hierbei sehr detaillierte Einblicke in die Physiologie der Symbiose liefern.

Isolierte Myzetomsymbionten von *Rhagium inquisitor* und *Leptura rubra* verwerten in Kultur verschiedene Stickstoffquellen, darunter Ammonium, Harnstoff und die in Insekten als Stoffwechselendprodukt anfallende Harnsäure. Die Hefen scheiden im Gegenzug zumindest geringe Mengen an Aminosäuren in das Nährmedium aus [JURZITZA et al., 1960]. Es erscheint unter diesen Voraussetzungen möglich, daß die Symbionten Stickstoffformen nutzen bzw. wiederverwerten, die für die Larve nicht zugänglich sind und damit die Stickstoffbilanz des Wirtes aufbessern. Da die Hefen jedoch zumindest einen Teil des Stickstoffs für ihr eigenes Wachstum benötigen und dieser zusammen mit den unverdauten Hefezellen ausgeschieden wird (vgl. Abbildung III.10-C), ist unklar, in welchem Maß die Wirtslarve hiervon profitiert.

Die Myzetomsymbionten von *Rhagium inquisitor* und *Leptura rubra* vermögen in Kultur eine breite Palette verschiedener Kohlenhydrate zu assimilieren (Persönliche Mitteilung, Dr. Peter Hoffman, DSMZ, Braunschweig). Die wenigen nicht verwertbaren Kohlenhydrate Melibiose, Raffinose und N-Acetylglucosamin decken sich mit denen, die der Extrakt des Larvendarms nicht zu spalten vermag. Auch im Verdauungstrakt anderer xylophager Insekten finden sich regelmäßig mehr oder weniger spezifische Hefestämmen, die nicht notwendigerweise in Myzetomen organisiert sind [SUH et al., 2003; SUH et al., 2005; ZHANG et al., 2003]. Auffallend viele dieser Hefen sind in der Lage, Xylane abzubauen und die resultierende D-Xylose zu assimilieren. *Candida*

shehatae als nächster Verwandter des *Leptura*-Symbionten ist aufgrund seiner effizienten Xyloseverwertung beispielsweise von besonderem Interesse für die industrielle Bio-Ethanol-Produktion [WAYMAN&PAREKH, 1985]. Eine Beteiligung der Symbionten an der Kohlenhydratverwertung der Larven ist daher nach wie vor nicht völlig auszuschließen. Wiederum wird die Sonderstellung des Hausbocks *Hylotrupes bajulus* deutlich, da den Larven dieser Spezies Mikroorganismen weder in Form eigener Symbionten, noch aus ihrer Nahrung (werkgetrockenes, verbautes Nadelholz) zur Verfügung stehen.

2. Transiente Mikroorganismen im Verdauungssystem der Cerambycidenlarven

Pilze: Kultivierungsversuche mit Darminhalt zeigen, daß das Verdauungssystem der Larven von *Leptura rubra*, *Plagionotus arcuatus* und *Tetropium castaneum* mit einer gewissen Regelmäßigkeit von weiteren Hefestämmen besiedelt ist (Tabelle III.5). Seltener lassen sich zusätzliche Hefen auch aus dem Darm von *Rhagium inquisitor* isolieren. Diese Stämme kommen ggf. neben den Myzetomsymbionten im Darmlumen vor, können jedoch auch mehr oder weniger fehlen.

Leptura rubra-Larven beherbergen vergleichsweise häufig einen Hefestamm, der durch seine 18S-rRNA-Sequenz als *Candida lignicola* bzw. *ergatensis*⁷ oder als naher Verwandter dieser beiden Spezies ausgewiesen wird (jeweils >98 % Übereinstimmung). Ein Vertreter desselben Verwandtschaftskreises konnte aus einer Larve von *Rhagium inquisitor* isoliert werden. Diese Tatsache deckt sich mit den Befunden anderer Untersuchungen; *Candida lignicola* wurde bereits im Kot weiterer xylophager Insekten gefunden [JINDAMORAKOT, 2007], *Candida ergatensis* wurde ursprünglich aus Larven des Mulmbocks *Ergates faber* isoliert, die sich wie *Leptura rubra*-Larven von verrottendem Nadelholz ernähren. Die beiden Isolate aus *Leptura* bzw. *Rhagium* fallen phylogenetisch in einen Cluster, dem neben *Candida lignicola* und *ergatensis* zahlreiche weitere, bislang nicht näher untersuchte Insekten-Isolate angehören (Abbildung III.3). Eine auffallende Gemeinsamkeit der entsprechenden Wirtsinsekten ist, daß sie sich fast immer von Totholz ernähren. Angehörige dieses

⁷ Neben der ursprünglichen Bezeichnung *Candida ergatensis* wird in der Literatur vielfach *C. ergastensis* verwendet. Da die Hefe ursprünglich aus *Ergates faber* isoliert wurde, ist die erstere Variante wohl als die richtige anzusehen.

Verwandtschaftskreises bewohnen beispielsweise auch das Verdauungssystem der Larven einiger Zuckerkäfer (*Passalidae*). Die Hefen der Passaliden erweisen sich selbst bei Wirtstieren aus geographisch entfernten Gebieten als genetisch nahezu identisch [SUH et al., 2003]. Es wäre daher durchaus denkbar, daß diese und weitere dieser Assoziationen stabile und mutualistische Symbiosen darstellen. Einen Hinweis auf die Funktion der Hefen dieses Clusters sehen einige Autoren in ihrer seltenen Fähigkeit, Xylane abzubauen und die resultierende D-Xylose zu assimilieren [SUH et al., 2003]. Die weitverbreitete *Candida ergatensis* findet sich u. a. jedoch auch im Verdauungssystem der Rossameise *Camponotus vicinus* [MANKOWSKI&MORELL, 2004], deren Lebensraum zwar ebenfalls der Waldboden ist, die sich jedoch vor allem von tierischer Kost ernährt. Die Assoziation scheint also zumindest in diesem Fall in keinem Zusammenhang mit der Xyloseverwertung der Hefe zu stehen.

Interessanterweise sind *Candida lignicola* bzw. *ergastensis* auf Basis von 26S-rRNA-Sequenzen die nächsten bekannten Verwandten von *Candida shehatae* [KURTZMANN&ROBNET, 1997] und damit auch des Myzetomsymbionten von *Leptura rubra*. Eigene Studien der betreffenden 18S-rRNA-Sequenzen bestätigen den hohen Verwandtschaftsgrad (vgl. Abbildung III.3). Nach gängiger Auffassung haben sich die intrazellulären Symbionten der Cerambyciden aus zuvor freilebenden Vertretern entwickelt, die zunächst nur das Darmlumen der Larven besiedelten [JONES et al., 1999]. Das mehrfach parallele Vorkommen eines Myzetomsymbionten und eines eng verwandten Hefestammes als potentieller Vorläufer innerhalb derselben (*Leptura*-) Larven stützt diese Annahme.

Leptura rubra-Larven enthalten mitunter eine weitere Hefe, deren nächste Verwandte *Candida castrensis* und *Candida paludigena* sind (jeweils >96 % Übereinstimmung der 18S-rRNA-Sequenzen). Vereinzelt wurde darüber hinaus *Candida bertae* identifiziert (>99 % Übereinstimmung). Wiederum bilden diese Spezies einen phylogenetischen Cluster dessen Vertreter sich auch ökologisch ähnlich sind und vergleichbare Lebensräume besiedeln. *Candida castrensis* und *Candida bertae* wurden ursprünglich aus verrottetem Holz, *Candida paludigena* aus Torf isoliert [RAMIREZ&GONZALEZ, 1984; SUZUKI et al., 1999; POLIAKOVA et al., 2001]. Weitere Vertreter des Clusters sind aus verschiedenen mycophagen und phytophagen Käferfamilien [SUH et al., 2005] und aus Termiten bekannt [SCHWEIGKOFER et al., 2005], jedoch ohne konkrete Hinweise auf eine mögliche Funktion.

Auch die Larven von *Tetropium castaneum* beherbergen in ihrem Darmlumen eine Reihe von Hefestämmen, die im Gegensatz zu ihren Myzetomsymbionten bereitwillig in Kultur zu bringen sind. Wie bei *Rhagium* und *Leptura* handelt es sich ausschließlich um mit Insekten- und/oder mit Holz assoziierte Arten wie *Pichia canadensis* (>98 % Übereinstimmung), *Pichia pinus* (>98 % Übereinstimmung), *Candida oregonensis* (>99 % Übereinstimmung) und *Candida tenuis* (>98 % Übereinstimmung). Letztere gehört hierbei sicherlich zu den prominentesten Vertretern und ist aus verschiedenen Cerambyciden und Scolytiden bekannt [NARDON&GRENIER, 1989]. Als eine der älteren Spezies innerhalb der künstlichen Gattung *Candida* ist „*tenuis*“ vermutlich als eine Ansammlung nah verwandter Stämme aufzufassen, die zwar physiologisch kaum unterscheidbar, phylogenetisch jedoch nicht identisch sind. Unter den Verwandten der *Tetropium*-Hefen finden sich auffallend viele Borkenkäferisolate, was vermutlich die Rindennahrung dieser Tiere widerspiegelt. *Tetropium*-Larven enthalten mit *Ophiostoma spec.* den einzigen Hyphomyceten, der im Rahmen dieser Arbeit isoliert werden konnte. Verschiedene *Tetropium*-Arten sind bekanntermaßen Vektoren dieser Bläuepilze, die für einen nicht unerheblichen Teil der Schadwirkung der Käfer verantwortlich sind [JACOBS et al., 2003]. Bisher gibt es allerdings keine Hinweise, daß die Larven von den Pilzen profitieren.

Aus Larven des Eichenwiderbocks *Plagionotus arcuatus* konnte nur in einem Einzelfall ein Hefestamm isoliert werden. Dieser fällt mit dem entsprechenden *Tetropium*-Isolat in die *Candida tenuis*-Gruppe (vgl. Abbildung III.3), obwohl die Larven von *Plagionotus* Eichenrinde und damit ein chemisch andersartiges Substrat besiedeln.

Der Darmtrakt der Bockkäfer beherbergt im Normalfall scheinbar ein gewisses Spektrum extrazellulärer Hefen, jedoch ohne daß bestimmte Arten zwingend vorkommen. Die Verhältnisse ähneln damit der Situation bei Borkenkäfern. Vertreter der Scolytiden beherbergen in der Regel ebenfalls mehrere phylogenetisch distinkte Hefestämme, allerdings in wechselnder Kombination und Menge. Wenngleich alle Stadien der Borkenkäfer von Hefen besiedelt sind und diese Begebenheiten bereits seit längerem bekannt sind, gibt es auch bei dieser Käferfamilie kaum fundierte Hypothesen bezüglich des Nutzens der Hefen für den Wirt [SIX, 2003]. Eine Beteiligung der Hefen an der Xylanverwertung der Wirtsinsekten erfordert zweifellos eine ausreichende Zelldichte, deren Bestimmung allerdings im Fall der Zuckerkäfer noch aussteht. Die in dieser Studie für die verschiedenen Bockkäferlarven ermittelten Zelldichten (Tabelle

III.5) erscheinen in jedem Fall zu gering, um einen maßgeblichen Einfluß auf den Kohlenhydraterwerb der Tiere zu haben.

Daß phylogenetisch und ökologisch sehr ähnliche Hefen weltweit und im Darm vieler xylophager Insekten gefunden werden, könnte entgegen weiter gehenden Interpretationen schlicht bedeuten, daß auf den chemisch ähnlichen Substraten der Tiere ähnliche Hefestämme wachsen. Dies würde zumindest im Fall der Bockkäfer erklären, warum die Zusammensetzung der Darmflora derartigen individuellen Schwankungen unterworfen ist: Die Tiere ingestieren die Hefen mit der Nahrung und scheiden sie mit ihr wieder aus. Folglich finden sich frei im Darmlumen lebende Hefen bei *Leptura rubra* und *Tetropium castaneum* zwar jeweils in vielen, jedoch nicht allen Larven und in wechselnden Kombinationen, da die Nahrung der Tiere natürlichen Schwankungen unterworfen ist. Wenngleich Systeme bekannt sind, in denen auch transiente Mikroorganismen einen Einfluß auf den Wirt haben, ist es zumindest unwahrscheinlich, daß die Hefen bei den hier untersuchten Bockkäfern eine essentielle Funktion ausüben. Die auch unter den Cerambyciden-Isolaten verbreitete Fähigkeit zur Assimilation von Xylan stellt daher wahrscheinlich nicht mehr als eine Anpassung der Mikroorganismen an eine in ihrem Lebensraum häufige Kohlenhydratquelle dar.

Bakterien:

PCR-basierte 16S-rRNA-Genbanken (Tabelle III.1, III.2 und III.3) zeigen, daß sich die bakteriellen Darmfloren der verschiedenen Bockkäferlarven ganz erheblich unterscheiden. Dabei bestehen (wie bei der Besiedelung mit Hefen) deutliche Unterschiede auch zwischen Individuen derselben Spezies. Trotz der allgemein hohen Variabilität werden die Larven von *Leptura rubra* durch die Zusammensetzung ihrer Darmflora eindeutig von den übrigen Larven separiert. Sie beherbergen als einzige der untersuchten Cerambyciden Vertreter der *Bacteroidetes* und *Acidobacteria* neben einem vergleichsweise großem Anteil an α - und β -Proteobakterien, jedoch kaum γ -Proteobakterien. Hierin spiegelt sich vermutlich die chemisch andersartige Nahrung der Tiere wider, die sich im Gegensatz zu den übrigen Arten (Kambialbereich und Rinde) von reinem Xylem ernähren. Ein nicht unerheblicher Teil der Klone in zwei der drei untersuchten *Leptura*-Individuen repräsentiert die Gattung *Burkholderia*. Burkholderien kommen in so unterschiedlichen Insekten wie Krummfühlerwanzen (*Alydidae*) [KIKUCHI et al., 2005], Termiten [HARAZONO et al., 2003], Ameisen [van BORM et al., 2002] sowie anderen Bockkäfern vor [PARK et al., 2007]. Kultivierungsversuche mit Darminhalt aus weiteren *Leptura*-Larven (Tabelle III.5) liefern die identischen Stämme,

zeigen allerdings auch, daß Burkholderien nur eine vergleichsweise geringe Zelldichte erreichen. Da Burkholderien außerdem (wie in den PCR-basierten Ansätzen) in einem von drei Fällen völlig fehlen, ist es unwahrscheinlich, daß sie von größerer Bedeutung für die *Leptura*-Larven sind. Ähnlich stellt sich die Situation hinsichtlich der *Acidobacteria* und *Bacteroidetes* dar. Wenngleich sie in einigen Individuen einen erheblichen Anteil der Darmflora stellen, sind sie in anderen überhaupt nicht vertreten. Verschiedenste Vertreter der α -Proteobakterien kommen in allen *Leptura*-Larven vor, ohne jedoch ein Muster erkennen zu lassen. Die 16S-rRNA-Sequenzen der betreffenden Klone fallen phylogenetisch wie die der *Bacteroidetes* und *Acidobacteria* zumeist in die Nähe freilebender Umwelt-Isolate aus Erdreich, Gewässern oder industriellen Biomassereaktoren. Acidobakterien und Vertreter der *Bacteroidetes* sind typische Bewohner der sauren Walderde und dürften in der Umgebung der *Leptura*-Larven damit allgegenwärtig sein. Die Masse der Darmbakterien stammt vermutlich (ähnlich wie die extrazellulär lebenden Hefen) aus dem Substrat der Larven und ändert sich mit dem individuellen Standort der Tiere. Die nachweisliche Assoziation anderer Insektengruppen mit *Burkholderia* steht damit nicht im Widerspruch, da die überwiegend freilebenden Burkholderien auch in deren Lebensraum aufzufinden sind. Ohne weitergehende Erkenntnisse hinsichtlich Herkunft, Dichte und Lokalisierung der Bakterien, kann nicht ausgeschlossen werden, daß Burkholderien auch bei anderen Insekten mehr oder weniger zufällige Darmbewohner sind.

PCR- und kulturbasierte Untersuchungen zeigen, daß in den Darmfloren von *Rhagium inquisitor* und *Plagionotus arcuatus* stets γ -Proteobakterien dominieren (vgl. Tabelle III.1 bzw. Tabelle III.5). Dieser Befund stimmt überein mit Berichten von anderen phytophagen [BRODERICK et al., 2004; DELALIBERA et al., 2007; SCHLOSS et al., 2006; YU et al., 2008] und carnivoren [DUNN&STABB, 2005] Insekten. Die meisten 16S-rRNA-Sequenzen wurden der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet. Die vergleichsweise häufigen Gattungen *Rahnella*, *Enterobacter* und *Pantoea* stellen einen Großteil der Darmflora vieler Insekten. Im Darminhalt einer *Plagionotus*-Larve sowie einer von drei *Rhagium*-Larven fanden sich ausschließlich Enterobacteriaceen. Eine ähnliche Situation wird für Larven des Lindenbocks *Saperda vestita* berichtet [SCHLOSS et al., 2006]. In einer früheren (kulturbasierten) Studie stellt sich die Darmflora derselben Spezies allerdings wesentlich komplexer dar [DELALIBERA et al., 2005], wie auch in den übrigen Larven von *Rhagium inquisitor* in dieser Studie. Sequenzvergleiche der *Rhagium*-Klone liefern neben Umweltkeimen aus anderen Insekten wie bei *Leptura*

rubra solche aus Pflanzen, Erde, Gewässern und sogar der menschlichen Umgebung. Es ist demnach davon auszugehen, daß auch bei den Larven von *Rhagium* zumindest ein Teil der Darmflora aus der Umgebung Tiere stammt und mit der Nahrung ingestiert wird. Dies ist nicht verwunderlich, da das verrottende Kambium zweifellos reich an Bakterien ist. Auch bei *Rhagium* finden sich insgesamt weder in PCR- noch in Kultur-basierten Untersuchungen Bakterien, deren konstantes Auftreten eine distinkte Funktion für die Larven erkennen ließe. FISH-Untersuchungen zeigen außerdem, daß die Bakterienzellen den Nahrungsbrei gleichmäßig durchsetzen. Ein bevorzugtes Wachstum in einer bestimmten Region des Darms erfolgt demnach nicht.

Auf gänzlich andere Verhältnisse weisen die 16S-rRNA-Genbanken im Darm von *Tetropium castaneum*-Larven hin. Im Gegensatz zu allen übrigen untersuchten Larven scheint die Darmflora dieser Tiere maßgeblich aus einem einzigen Bakteriumstamm zu bestehen (Tabelle III.1). FISH-Untersuchungen zeigen, daß große Mengen dieser Bakterien in den Zellen des vorderen Mitteldarms zu finden sind (Abbildung III.15). Seine 16S-rRNA-Sequenz plaziert die Endocytobionten innerhalb der *Enterobacteriaceae* in einem stabilen phylogenetischen Cluster, der darüber hinaus zahlreiche weitere, bislang ausschließlich symbiontische Bakterienstämme enthält. Unter den näheren Verwandten des *Tetropium*-Stammes finden sich so prominente Vertreter wie die Sekundärsymbionten (*Sodalis* spec.) der Tsetse-Fliegen, die Primärsymbionten (*Buchnera aphidicola*) der Aphiden und verschiedener Getreidekäfer (*Sitophilus* spec.), aber auch Stämme aus dem Taubenfederling *Columbicola columbae*, der blutsaugenden Fliege *Craterina melbae* und verschiedenen Blattflöhen (*Psyllidae*) (Abbildung III.17). Wie in früheren Studien berichtet, ließen sich auf alleiniger Basis der 16S-rRNA-Sequenz die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb des *Sodalis*-Clusters nicht abschließend klären [THAO et al., 2000; HOSOKAWA et al., 2006; FUKATSU et al., 2007; NOVAKOWA&HYPSA, 2007]. In Abhängigkeit von der Berechnungsmethode ist die Position des *Tetropium*-Symbionten einmal basal zu den Symbionten der Psylliden oder basal zur ganzen Gruppe. In keinem Fall wurde eine Position innerhalb einer der anderen Gruppen beobachtet, was den *Tetropium*-Symbionten als eigenständige Linie innerhalb des *Sodalis*-Clusters ausweist.

Die Stämme des *Sodalis*-Clusters verbindet neben ihrer Phylogenie die Tatsache, daß ihre Wirtsinsekten unausgewogene Nahrungsquellen nutzen. Da die prinzipiell eiweißreiche Nahrung der blutsaugenden Tsetse-Fliegen und der Federlinge nur ein begrenztes Spektrum an Aminosäuren bietet, ist ihre Entwicklung letztlich wie die der

Blattflöhe, Blattläuse und Bockkäfer eiweißlimitiert. Aufgrund ihrer Bedeutung als Krankheitsüberträger und Vorratsschädlinge wurden Tsetse-Fliegen bzw. Kornkäfer bislang am umfassendsten untersucht. Die jeweiligen *Sodalis*-Stämme sind in diese Tieren bekanntermaßen mutualistisch bzw. lebensnotwendig [HEDDI et al., 1999; DALE&WELBURN, 2001] und dienen vermutlich zur Bereitstellung essentieller Aminosäuren und Cofaktoren [RIO et al., 2003; TOH et al., 2006]. Die Entwicklung xylophager Insekten ist in erster Linie vom Proteingehalt der Nahrung abhängig [BECKER, 1963; ADELSBERGER, 1975]. Ein Symbiont, der in der Lage ist, zusätzliche Aminosäuren zu liefern, könnte das ungünstige Protein-/Kohlenhydrat-Verhältnis in der Nahrung der Tiere aufbessern und ihre Entwicklung damit günstig beeinflussen. Die Larven von *Rhagium inquisitor* und *Tetropium castaneum* fressen beide im Kambialbereich und der Rinde abgestorbener Fichten. Die Larven von *Rhagium inquisitor* benötigen für Ihre Entwicklung regelmäßig zwei Jahre, *Tetropium castaneum* dagegen kann unter günstigen Voraussetzungen zwei Generationen im Jahr durchlaufen. Da beide Myzetome besitzen, ist der zusätzliche *Sodalis*-Symbiont der *Tetropium*-Larven möglicherweise ursächlich für die gegenüber *Rhagium* beschleunigte Entwicklung.

Vereinzelt auftretende weitere Klone in den *Tetropium* 16S-rRNA-Banken weisen auf ein ansonsten ähnliches Spektrum an Darmbakterien hin wie es sich auch bei den übrigen Rindenfressern *Rhagium* und *Plagionotus* findet (Tabelle III.1). Wie bei *Hylotrupes* wurde gelegentlich Plastiden-rRNA amplifiziert, die sich der Gattung *Pinus* zuordnen ließ und offenbar der Nahrung der Tiere entstammt (vgl. Tabelle III.2). Kultivierungsversuche bestätigen, daß im Darmlumen der *Tetropium*-Larven vergleichbare Mengen von Bakterien zu finden sind wie bei den übrigen untersuchten Arten. Sie werden in PCR-basierten Ansätzen demnach lediglich von den viel zahlreicheren *Sodalis*-Zellen „überdeckt“.

Der Besitz einer Symbiose wird gerade bei xylophagen Insekten regelmäßig mit der Nährstoffarmut und Unausgewogenheit der Holznahrung in Verbindung gebracht. Die Larven des Hausbocks *Hylotrupes bajulus* scheinen indes diese Argumentation in Frage zu stellen, da sie sich trotz ihrer kargen Nahrung gänzlich ohne mikrobielle Hilfe zu entwickeln vermögen. Die Tiere besitzen keine Myzetome und wohl infolge ihrer trockenen Holznahrung auch keine nennenswerte Darmflora. PCR-basierte 18S- und 16S-rRNA-Genbanken in *Hylotrupes*-Darmsystemen erbrachten trotz zahlreicher Wiederholungen und mannigfacher Variation in der Methodik keine ernstzunehmenden

Hinweise auf die Existenz einer Darmflora. Die durch eine Erhöhung der PCR-Zykluszahl erzielten Klone erwiesen sich in der Regel als Kontaminanten, wenngleich sich in Einzelfällen auch sinnvolle Identifizierungen in Form von *Spiroplasma* und Chloroplasten-DNA ergaben (Tabelle III.2, III.3 und III.4). Während *Spiroplasma* ein häufiges Insektenpathogen ist, wurde im Fall einer zweiten Larve offenbar die plastidäre rRNA aus dem Nahrungsholz der Tiere amplifiziert. Die gewählten Bedingungen erscheinen demnach durchaus geeignet, die in den Darmproben vorhandenen Zielsequenzen zu erfassen. Diese treten jedoch mengenmäßig in den meisten Fällen hinter eine unvermeidbare Kontamination zurück und liegen demnach nur in Spuren vor. Sind die Larven dagegen von einem bakteriellen Pathogen befallen, gelingt die Amplifikation mühelos, da das Gewebe dann eine wesentlich größere Menge an Zielsequenzen enthält.

Im Gegensatz zu allen anderen in dieser Studie untersuchten Larven lassen sich aus dem Darminhalt von *Hylotrupes bajulus*-Larven keinerlei Mikroorganismen isolieren. Verschiedenste Nährböden blieben selbst nach wochenlanger Inkubation frei von Bewuchs. Die Kultivierungsversuche bestätigen damit zumindest das Fehlen einer Darmflora, wie sie bei den übrigen Bockkäferarten anzutreffen ist. Des Weiteren entlarven sie durch Quervergleich etliche der 16S-rRNA-Sequenzen als Kontaminanten, da die betreffenden Stämme auf den angebotenen Nährmedien wachsen müßten, sofern sie sich tatsächlich im Darm befinden. In Übereinstimmung damit ergaben auch Fluoreszenzmikroskopische (FISH-) Untersuchungen mit Bakterien und Pilzspezifischen Oligonucleotidsonden bei *Hylotrupes* negative Befunde. Während in Darm-Dünnschnitten von *Rhagium*, *Tetropium* und *Plagionotus* bereits nach einer einfachen DAPI-Färbung mühelos eine deutliche Menge prokaryontischer Zellen offensichtlich wird, erwies sich der *Hylotrupes*-Darm in allen Fällen als frei von sichtbaren Mikroorganismen. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von der Innenseite des *Hylotrupes*-Darmkanals bestätigen in letzter Konsequenz, daß Mikroben dort allenfalls vereinzelt vorliegen. Frühere Untersuchungen kommen allerdings aufgrund von DAPI-Färbungen zum Ergebnis, daß der Mitteldarm der Hausbocklarve sogar vergleichsweise viele Bakterien ($1,24 \times 10^9$ Zellen/ml) enthält [CAZEMIER et al., 1997] und stehen damit in offenem Widerspruch zu dieser Arbeit. Zu bemängeln ist allerdings, daß sich dieser Befund auf die Untersuchung einer einzigen Larve stützt. Da die Herkunft des betreffenden Tieres nicht näher erläutert wird, ist eine Fehlbestimmung

der Larve nicht auszuschließen. Bei den als coccoid beschriebenen Bakterien könnte es sich zudem um Pathogene handeln, von denen die betreffende Larve befallen war.

Die weitgehende Abwesenheit von Mikroorganismen in einem Verdauungssystem ist wohl bereits *per se* ein überraschender Befund. Andererseits scheint die Darmflora auch bei Bockkäferlarven, die ein weniger extremes Substrat bewohnen, überwiegend mit der Nahrung aufgenommen zu werden, ohne daß einzelne Stämme sich dauerhaft im Darm zu etablieren vermögen. Da trockenes Holz zweifellos kein geeigneter Nährboden für Mikroben ist, ist der mikrokenarme Darm der *Hylotrupes*-Larven möglicherweise nur eine Konsequenz ihrer vergleichsweise „sterilen“ Nahrung und des enormen Nahrungsdurchsatzes bei Cerambyciden [RIBA, 1976]. Unveröffentlichte Experimente im Rahmen dieser Arbeit deuten darauf hin, daß der Kot von *Hylotrupes*-Larven eine mikrokenhemmende Wirkung haben könnte. Dies würde erklären, warum auch innerhalb des konstant feuchten Larvendarms in der Regel kein Mikrokenwachstum stattfindet. Unklar bleibt, weshalb viele Cerambyciden eine Symbiose entwickelt haben, obwohl sie primär scheinbar nicht notwendig war.

3. Carbohydrasen des larvalen Cerambycidendarms

Die Verwertung von **Cellulose** bei Cerambyciden wird bis heute kontrovers diskutiert. Während einigen Arten eine körpereigene Cellulase nachgesagt wird [MANSOUR, 1934; MÜLLER, 1934; SCHLOTTKE&BECKER, 1942; SCHLOTTKE, 1945; CHARARAS, 1976; CHARARAS, 1981; CHARARAS et al., 1983; MISHRA et al., 1985], sollen andere Arten keine Cellulose abbauen können [ZVERLOV et al., 2002; MARTIN, 1983] oder zumindest auf die Unterstützung durch mikrobielle Cellulasen angewiesen sein [MISHRA&SINGH, 1978; Martin, 1983; KUKOR&MARTIN, 1986a]. Die Ergebnisse der verschiedenen Studien unterscheiden sich oftmals erheblich in Abhängigkeit von den Untersuchungsmethoden und den zum Verdau angebotenen Substraten. Ein Vergleich der Ergebnisse wird dadurch häufig erschwert. Die Argumentation früherer Autoren hinsichtlich der Celluloseverwertung ist aus heutiger Sicht zudem nicht immer überzeugend, da die Befunde mitunter widersprüchlich sind oder schlicht zweifelhaft erscheinen. So attestiert SEIFERT beispielsweise den Larven des Hausbocks *Hylotrupes bajulus*, zwischen 30 und 40% der ingestierten Cellulose zu verwerten - ein Wert der unrealistisch erscheint angesichts der Tatsache, daß die Tiere täglich etwa ein Drittel ihres Eigengewichts an Nahrung aufnehmen [SEIFERT, 1962]. MISHRA&SINGH [1978]

bezeichnen den Anteil verdauter Cellulose in Larven von *Stromatium barbatum* sogar auf 31- 58 %.

Während frühere Untersuchungen vor allem auf vergleichenden chemischen Analysen von Nahrung und Ausscheidungsprodukten beruhen, verwendet man heute in der Regel authentische Substrate, um die enzymatischen Fähigkeiten eines Systems zu bestimmen. Ein häufig eingesetztes Modellsubstrat zur Untersuchung cellulolytischer Systeme ist Carboxymethylcellulose (CMC). Auch der Darmextrakt der Larven von *Rhagium*, *Leptura*, *Tetropium* und *Hylotrupes* spaltet *in vitro* CMC (Abbildung III.22, III.23, III.24 und III.25). Die Aussagekraft dieses Cellulose-Derivats ist allerdings begrenzt, da zum einen nicht klar ist, in wie weit sich die Essigsäurereste der CMC auf den enzymatischen Abbau auswirken und es sich zum anderen um eine Celluloseform handelt, die im Gegensatz zu nativer Cellulose wasserlöslich ist. Insofern beweist die Spaltung von CMC nur die Anwesenheit einer β -1 \rightarrow 4-Glucosidase, die nicht notwendigerweise auch gegen native Cellulose aktiv ist. Gerade die parakristalline Struktur und die damit einhergehende Wasserunlöslichkeit nativer Cellulose ist ernährungsphysiologisch offenbar ein weit größeres Problem als die β -Konfiguration ihrer glycosidischen Bindung. Lösliche Saccharide mit β -1 \rightarrow 4-glycosidischer Bindung wie Cellobiose und Lactose werden von allen Larven effizient gespalten, obwohl Lactose in der Nahrung keiner Bockkäferart in nennenswertem Umfang vorkommen dürfte. Die Larven besitzen offenbar β -1 \rightarrow 4-Glucosidase(n), die hinreichend unspezifisch sind, um auch Verbindungen von Glucoseisomeren umzusetzen. Unlösliche mikrokristalline Cellulose (Avicel) wird indes (ähnlich wie weißfaule Cellulose) von allen Larven deutlich schwächer angegriffen, obwohl dieses Präparat aufgrund der technischen Aufarbeitung viele amorphe Bereiche und damit Ansatzstellen für Enzyme aufweist. Native Cellulose in Form von Baumwollinters erweist sich schließlich als praktisch resistent gegenüber dem Darmextrakt.

Effiziente cellulolytische Systeme bestehen nicht aus einer „Cellulase“, sondern in der Regel aus mehreren synergistischen Einzelenzymen. Die Schlüsselenzyme hierbei sind Endo-Glucanasen, die die parakristalline Struktur der Cellulose aufbrechen und zunehmend wasserlösliche Bruchstücke generieren. Diese Oligomere werden von Exo-Glucanasen (Cellobiohydrolasen) zum Disaccharid Cellobiose abgebaut. Cellobiasen schließlich spalten die Cellobiose in resorbierbare Glucosemonomere [MARTIN, 1983].

In den Cellulose-Ansätzen aller Larven finden sich neben unterschiedlichen Mengen an Glucose mitunter auch Spuren einiger Oligomere. Diese laufen allerdings stets auf Höhe

der α -Glycoside Maltose bzw. Maltotriose. Die α -Konfiguration dieser vermeintlichen Bruchstücke schließt freilich aus, daß es sich um direkte Abbauprodukte der Cellulose handelt. Sie entstehen offenbar sekundär durch eine Verknüpfung und Transglycosylierung der freigesetzten Glucosemonomere. Eine derartige Aktivität des Darmextrakts ist auch beim Verdau von Cellobiose, Lactose und in geringem Umfang bei Maltose zu beobachten. Die Ansätze dieser Disaccharide enthalten nach der Inkubation mit Darmextrakt auch Trisaccharide, die im unbehandelten Substrat nicht vorhanden sind (Abbildung III.23-C und III.24-C). Das Fehlen höhermolekularer Spaltprodukte bei allen Cellulose-Präparaten läßt auf die Abwesenheit von Endo-Glucanasen schließen, die einen effizienten Abbau der Cellulose notwendigerweise einleiten. Die vergleichsweise geringen Mengen an Spaltprodukten sind demnach das Produkt von Exo-Glucanasen, welche die Cellulose allenfalls peripher anzugreifen vermögen.

Während Baumwollhaare überwiegend aus Cellulose bestehen, enthalten die Tracheiden des Holzes darüber hinaus einen wesentlichen Anteil Lignin, der in die Kohlenhydratmatrix der Zellwände inkrustiert ist. Der innige, zum Teil kovalente Verbund der Kohlenhydrate mit dem überaus stabilen und hydrophoben Lignin (Lignocellulose-Komplex) dürfte einen Abbau der Cellulose unter natürlichen Bedingungen weiter erschweren.

Viele Insekten kompensieren das Fehlen eigener Endoglucosidasen durch die Assoziation mit Mikroorganismen [MARTIN, 1983; KUKOR&MARTIN, 1983; KUKOR&MARTIN, 1986a; KUKOR&MARTIN, 1986b; KUKOR et al., 1988]. *Leptura rubra* besiedelt wie viele andere Totholzböcke ein Substrat erst in einem bestimmten Verrottungsgrad. Das anbrüchige Nahrungsholz ist in diesem Zustand meist intensiv mit Pilzhyphen durchsetzt. Bislang ist allerdings nicht näher bekannt, ob die Larven hierbei auf die Mikroorganismen selbst, oder auf deren „Vorarbeit“ bei der Zersetzung der Holznahrung angewiesen sind. Aus Untersuchungen von KUKOR&MARTIN (1986a) geht hervor, daß eine den Larven des Pappelbocks *Saperda calcarata* verabreichte Cellulase im Darm der Tiere weiter aktiv war sodaß die Tiere folglich in der Lage waren, Cellulose zu verdauen. Die darauf basierende Annahme, wonach möglicherweise alle xylophagen Insekten bei der Celluloseverwertung auf pilzliche Enzyme aus der Nahrung angewiesen sind, bestätigt sich bei *Leptura rubra* allerdings nicht. Obwohl die Tiere mit ihrer Nahrung laufend cellulolytische Pilze (häufig *Fomitopsis spec.*) ingestieren, offenbart ihr Darm *in vitro* gegenüber den übrigen Arten keine wesentlich

verbesserte Spaltung von Cellulose oder sonstiger Kohlenhydrate. Die Biodegradation des Nahrungsholzes durch Pilze hinterläßt außer Spuren von Trehalose (aus den Pilzhyphen selbst) weder niedermolekulare Saccharide, noch wirkt sie sich auf die Abbaubarkeit der Cellulose aus. Das Cellulosepräparat aus weißfaulem Holz wird vom Darmextrakt aller Larven in vergleichbar geringem Maß abgebaut wie mikrokristalline Cellulose. Es ist daher fraglich, ob die Befunde an *Saperda calcarata* ohne Weiteres auf die natürliche Ernährungssituation und/oder andere Cerambyciden übertragbar sind. Entgegen anderslautenden Berichten sind die Larven von *R. inquisitor*, *L. rubra*, *T. castaneum* und *H. bajulus* scheinbar nicht in der Lage, parakristalline Cellulose in größerem Umfang abzubauen. Cellulose spielt für die Ernährung dieser Arten folglich eine untergeordnete Rolle.

Leptura-Larven nutzen die Pilzhyphen vermutlich direkt als Nahrungsquelle, da sie als lebendes Gewebe ernährungsphysiologisch höherwertig sind als das abgestorbene Xylem. Dabei dürften Stickstoffverbindungen und Spurenstoffe ausschlaggebender sein als Kohlenhydrate; die Zellwände der Pilze werden nicht verdaut, da keine der untersuchten Larven über Chitinasen verfügt. Der Pilzanteil in der Nahrung der *Leptura*-Larven könnte der Grund für ihre gegenüber *Hylotrupes* deutlich zügigere Entwicklung sein. Die Ernährungssituation der beiden Arten ist in chemischer Hinsicht vergleichbar, da beide im Splintholz einheimischer Nadelbäume (zumeist Fichte oder Kiefer) minieren. Im Gegensatz zu *Leptura rubra* ernähren sich die *Hylotrupes*-Larven jedoch von werktrockenem verbautem Holz, das praktisch frei von Mikroorganismen ist. Sie verfügen zudem weder über Myzetomsymbionten noch über eine nennenswerte Darmflora (Abbildung III.2, Tabelle III.2, III.3 und III.4). Die vergleichsweise lange Larvalentwicklung (3 bis 5 oder mehr Jahre) bei *Hylotrupes* ist möglicherweise in diesem Defizit begründet. Die Entwicklungsdauer von *Hylotrupes* ist damit mehr als doppelt so lang wie die von *Leptura rubra* (2 Jahre).

Stärke und Maltose werden von allen untersuchten Larven in geringem Maß hydrolysiert, nicht dagegen Raffinose und Saccharose. Generell werden α -Saccharide kaum, Saccharide mit β -Konfiguration dagegen gut umgesetzt, selbst Lactose, die für die Ernährung der Tiere keine Rolle spielt. Dies wird deutlich am Beispiel der Disaccharide Melibiose und Gentiobiose. Während die α -1 \rightarrow 6-glycosidisch verbundene Melibiose einem Abbau widersteht, wird die β -1 \rightarrow 6-glycosidisch verbundene Gentiobiose von allen Larven bereitwillig gespalten (Abbildung III.22-C, III.23-C, III.24-C und III.25-C). Bei Nitrophenol-Zucker-Konjugaten liegen ähnliche

Verhältnisse vor (Abbildung III.26, III.27, III.28 und III.29). So ist die spezifische Aktivität des Darmextrakts gegen die β -Konjugate von Glucose und Galactose bei allen Larven mit am höchsten, während die entsprechenden α -Konjugate nur marginal umgesetzt werden.

Speicher- und Transportkohlenhydrate in Pflanzen weisen typischerweise α -Konfiguration auf. Da diese Komponenten in der Nahrung der untersuchten Cerambyciden nur unregelmäßig und in geringer Menge vorkommen (Abbildung III.19 und III.21), sind sie für ihre Ernährung möglicherweise wenig relevant. Die enzymatische Ausstattung der Larven scheint vielmehr an den Abbau von Strukturkomponenten adaptiert zu sein, die zudem in konstant großen Mengen zur Verfügung stehen. So spaltet der Darmextrakt aller Larven die Mehrzahl der angebotenen Hemicellulosen, Pachyman und Pectin (Abbildung III.22-B, III.23-B, III.24-B und III.25-B). Diese Komponenten werden im Allgemeinen in erheblich stärkerem Maß abgebaut als die Cellulose-Präparate.

Xylane gelten als die „wichtigsten“ Hemicellulosen des Holzes, da sie einen wesentlichen Anteil von Angiospermen- und Coniferenholz ausmachen (20-35 bzw. 10-15 % Trockengewicht [TIMELL, 1965; LAINE, 2005]).

Der Darmextrakt aller Larven spaltet Xylanpräparate mit großer Effizienz, wobei es für die Menge an Spaltprodukten weitgehend unerheblich ist, ob es sich um rein lineare (Birkenxylan) oder mit seitlichen Resten versehene Polymere (Arabino- und Methylglucuronoxylan) handelt. Neben dem Monomer Xylose werden vergleichsweise große Mengen an Oligomeren freigesetzt. Dies ist ein Hinweis auf das Vorliegen von sowohl Endo- wie auch Exo-Xylanasen. Im Gegensatz zu anderen Polymeren (s.u.) überwiegen bei den Abbauprodukten der Xylane die Oligosaccharide und Xylobiose. Die Spaltung der Xylobiose in Monomere durch Xylobiase erfolgt *in vitro* nur schwach. Quantitative Untersuchungen unter Verwendung der chromogenen p-Nitrophenyl- β -Xylopyranose (formal Xylobiose) bestätigen, daß die Xylobiaseaktivität des Darmextrakts bei allen Larven vergleichsweise gering ist. Dieser Befund ist angesichts der hohen Endo-Xylanaseaktivitäten schwer interpretierbar. Das Monomer Xylose ist jedoch *in situ* im vorderen Mitteldarm von *Leptura*- und *Hylotrupes*-Larven vorhanden (Abbildung III.20 und III.21); ein vollständiger Xylanabbau findet demnach zumindest bei diesen Arten auch unter natürlichen Bedingungen statt. Viele Verdauungsenzyme sind bekanntermaßen membrangebunden und wären daher in einem zellfreien Extrakt (wie in dieser Studie verwendet) kaum nachweisbar. Die Ergebnisse könnten so

gedeutet werden, daß die Xylobiosespaltung bei den Cerambycidenlarven direkt am Darmepithel stattfindet.

Die Hauptkette des Arabinoxylans besteht aus β -1 \rightarrow 4-glycosidisch verknüpfte Xylose und trägt zahlreiche einzelne Arabinosereste in α -1 \rightarrow 2- und α -1 \rightarrow 3-Position. Der Abbau des Arabinoxylans liefert bei allen Larven (mit Ausnahme von *Hylotrupes*) neben Xylosehomooligomeren zusätzliche Spaltprodukte. Da die entsprechenden Larven unfähig sind, ein Arabinose-Nitrophenol-Konjugat zu spalten, liegt der Schluß nahe, daß es sich hierbei um Heterooligomere aus Xylose und Arabinose handelt, die die Tiere nicht vollständig abbauen können. Möglicherweise verhindern die Arabinosereste jedoch nicht, daß weite Teile der Hauptkette abgebaut werden.

Seit langem ist bekannt, daß die Larven des Hausbocks *Hylotrupes bajulus* ausschließlich das Holz von Coniferen besiedeln [BECKER, 1944; 1963]. Fütterungsversuche mit Angiospermenholz hatten stets ein langsames Absterben der Larven zur Folge. Spätere Untersuchungen kamen zu der Auffassung, daß nicht Sekundärstoffe oder der Ligningehalt, sondern die stark acetylierten Laubholzxylane hierfür verantwortlich sind [HASLBERGER&FENGEL, 1991a, b, c]. Werden die Xylane extrahiert oder durch Alkalibehandlung deacetyliert, so wird auch Laubholz für die Hausbocklarven verwertbar. Unklar ist bislang, auf welche Weise Laubholzxylane die Entwicklung der Hausbocklarven hemmen - schließlich handelt es sich nicht um Giftstoffe im herkömmlichen Sinne. Wie bei allen vorgenannten Larven spaltet der Darmextrakt auch bei Larven von *Hylotrupes* vornehmlich Hemicellulosen und nur in sehr geringem Umfang andere Kohlenhydrate (Abbildung III.25). Die Spaltung von p-Nitrophenyl- α -Arabinofuranosid übersteigt die Spaltung aller übrigen Zucker-Konjugate und läßt auf eine hohe α -Arabinofuranosidase-Aktivität im Darm der *Hylotrupes*-Larven schließen (Abbildung III.29). Da das gleiche Substrat bei allen anderen Larven nur marginal gespalten wird, scheint dies Ausdruck einer speziellen Anpassung des Hausbocks an die im Gymnospermenholz dominierenden Arabinoxylane zu sein. Diese Aussage wird durch die Freisetzung von Arabinose aus authentischem Arabinoxylan bestätigt. Arabinoxylane scheinen in der Ernährung dieser Spezies demnach einen besonderen Stellenwert zu haben. Die vermeintliche Hemmwirkung des Laubholzxylans könnte daher darin bestehen, daß es für die Larven unverdaulich ist und den Tieren somit eine essentielle Kohlenhydratquelle fehlt. Fütterungsversuche an *Hylotrupes* zeigen, daß Zusätze von Pepton die

Larvenentwicklung positiv beeinflussen, während Zusätze von Stärke und Glucose die Entwicklung sogar hemmen [BECKER, 1963]. Dieser Befund erscheint angesichts der mangelnden Fähigkeit zum Abbau von Stärke durchaus schlüssig. Da die Stärke nicht verwertet werden kann, erhöht sich mit ihr nur der Anteil unverdaulicher und osmotisch wirksamer Ballaststoffe in der Nahrung. Der Zusatz größerer Mengen freier Glucose ist den Larven vermutlich insofern abträglich, als dadurch das Wasserpotential in der ohnehin trockenen Nahrung der Tiere nochmals stark erniedrigt wird.

Mannane sind die mengenmäßig vorherrschenden Hemicellulosen in Coniferenholz. Ihr Trockengewichtsanteil beträgt je nach Holzart zwischen 15 und 25 %. Mannane können verschiedentlich mit anderen Zuckern substituiert oder verzweigt sein.

Das in dieser Arbeit verwendete Glucomannan besteht aus einer linearen Kette β -1 \rightarrow 4-glycosidisch verknüpfter Mannose- und Glucoseeinheiten im Verhältnis 4:6. Die Abfolge der Zucker ist dabei mehr oder weniger zufällig [TIMELL, 1965; KATO, 1981]. Dieses Glucomannan wird von allen Larven ähnlich stark wie die Xylane abgebaut und liefert entsprechend seiner Zusammensetzung in etwa gleichen Mengen Glucose und Mannose. Im Gegensatz zu den Xylanen liefert das Glucomannan hauptsächlich Monosaccharide als Abbauprodukte; Cellobiasen und Mannobiasen sind demnach im Darmlumen vorhanden. Dies steht im Einklang mit einer hohen β -Glucosidase- und β -Mannosidase-Aktivität der Darmextrakte bei der Inkubation mit entsprechenden Nitrophenol-Konjugaten (Abbildung III.26, III.27, III.28 und III.29). Glucose und Mannose sind auch *in situ* die mengenmäßig überwiegenden Monosaccharide im vorderen Mitteldarm von *Hylotrupes*-Larven. Das Verhältnis von Mannose und Glucose entspricht hierbei in etwa ihrem Verhältnis im Glucomannan, das demzufolge mit hoher Wahrscheinlichkeit die Quelle beider Zucker ist (Abbildung III.20 und III.21). Auch die im Darm nachweisbare Glucose stammt daher wahrscheinlich aus der Hemicellulose-Fraktion der Nahrung, da ein Abbau von Cellulose das Verhältnis einseitig zugunsten der Glucose verschieben würde. Der Darm von *Leptura rubra*-Larven enthält im Vergleich zu *Hylotrupes* neben Glucose und Mannose größere Mengen an Xylose und Fructose. Der Anteil von Mannose und Glucose ist jedoch auch hier vergleichbar und deutet auf Glucomannan als Quelle hin.

Galactomannan, ein weiteres Heteropolymer aus der Gruppe der Mannane, wird *in vitro* ebenfalls vom Darmextrakt aller Larven deutlich hydrolysiert. Galactomannane sind ein wesentlicher Bestandteil der Hemicellulosefraktion von Coniferen [TIMELL, 1965]. Im Gegensatz zu Glucomannan besteht die Hauptkette dieses Polymers nahezu

ausschließlich aus β -1 \rightarrow 4-glycosidisch verbundener Mannose. Die Hauptkette trägt in β -1 \rightarrow 6-Bindung zahlreiche einzelne Galactosereste. Während der *in vitro*-Abbau des Galactomannans bei *Tetropium* insgesamt schwach ausgeprägt ist, setzt der Darmextrakt von *Rhagium*-, *Leptura*- und *Hylotrupes*-Larven aus der Hauptkette des Polymers eine deutliche Menge an Mannose und Mannose-Oligomeren frei. Um die Galactosereste abzuspalten benötigen die Larven eine β -Galactosidase. Der Darmextrakt aller Larven zeigt zwar eine vergleichsweise hohe Aktivität gegen p-Nitrophenol- β -D-Galactopyranose (formal Galactobiose), allerdings ist die Galactose darin β -1 \rightarrow 4-glycosidisch verbunden. Das entsprechende Enzym spaltet nicht notwendigerweise auch β -1 \rightarrow 6-verbundene Galactose ab. Die Spaltung authentischer Gentiobiose (D-Glucosyl- β -1 \rightarrow 6-Glucopyranosid) beweist andererseits, daß alle Larven grundsätzlich imstande sind, β -1 \rightarrow 6-glycosidische Bindungen zu spalten. Das Unvermögen zur Abspaltung der Galactose aus Galactomannan wäre demnach in der exakten Kombination von β -Galactose in einer 1 \rightarrow 6-glycosidischen Bindung zu suchen. Da Galactose bei keiner der untersuchten Arten *in situ* nachgewiesen werden konnte, ist dieser Zucker für die Ernährung der Larven vermutlich von geringer Bedeutung.

(Lärchen-) **Arabinogalactan** wird im Gegensatz zu den vorgenannten Hemicellulosen von keiner der untersuchten Cerambycidenarten in größerem Umfang angegriffen (Abbildung III.22, III.23, III.24 und III.25). Arabinogalactane sind typische Hemicellulosen in Lärchenholz; ihr Anteil am Trockengewicht beträgt üblicherweise zwischen 10 und 20, bei manchen Vertretern bis zu 25%. Andere Coniferen enthalten dagegen mit meist unter 1 % nur geringe Mengen Arabinogalactan. Das Polymer ist in der Regel kompliziert gebaut und je nach Herkunft sehr variabel in Aufbau und Zusammensetzung. Ein β -1 \rightarrow 3-glycosidisch verknüpftes Galactose-Rückgrat trägt an nahezu jeder Galactoseeinheit in β -1 \rightarrow 6-Position kurze Seitenketten bestehend aus D-Galactose-, D-Glucuronsäure-, und L-Arabinofuranose bzw. -pyranose [TIMELL, 1965; LAINE, 2005]. Da Arabinogalactan ausgesprochen wasserlöslich ist, behindern offenbar allein seine komplexe Verzweigung und die ungewöhnlichen Bindungen den enzymatischen Abbau durch den Larvendarm. Ein vollständiger Abbau des Arabinogalactans würde zweifellos eine Reihe weiterer Enzyme erfordern. Es verwundert daher nicht, wenn die vornehmlich in Fichte und Kiefer minierenden Larven diese dort ohnehin geringfügig enthaltene Komponente nicht verwerten. Interessant

wäre in diesem Zusammenhang, ob verwandte Cerambycidenlarven, die sich wie *Tetropium gabrieli* von Lärchenholz ernähren, das Arabinogalactan zu spalten vermögen.

Das Spektrum der abbaubaren Kohlenhydrate weist bei den vier untersuchten Bockkäferarten viele Ähnlichkeiten auf. Dennoch finden sich weitere artspezifische Unterschiede, die als Anpassung an chemische Charakteristika der jeweiligen Larvennahrung gewertet werden können.

So wird beispielsweise **Xyloglucan** von *Rhagium*- und *Tetropium*-Larven abgebaut, während den Larven von *Leptura* und *Hylotrupes* diese Fähigkeit praktisch fehlt.

Das verwendete Xyloglucan besteht aus einem β -1 \rightarrow 4-glycosidisch verbundenen Glucose-Rückgrat, an das ebenfalls in β -1 \rightarrow 4-Bindung kurze Xylose-Seitenketten geknüpft sind. Xyloglucane verschiedener Pflanzen können darüber hinaus weitere Saccharide in Seiten- und Hauptkette enthalten; die resultierenden Polymere sind (wie Arabinogalactane) komplex und variabel [HOFFMANN et al., 2005]. Der Darmextrakt von *Rhagium* setzt Glucose sowie zwei langkettige Oligomere aus dem Xyloglucan frei (Abbildung III.23-B). Ihrer charakteristisch bräunlichen Färbung nach bestehen die freigesetzten Oligomere überwiegend aus Xylose. Di-, Tri- oder Tetramere im Größenbereich zwischen den Oligomeren und der Glucose fehlen dagegen genauso wie monomere Xylose. Der insgesamt unvollständige Abbau des Xyloglucans und das Fehlen von Oligomeren mittlerer Größe dürften in der komplexen Struktur und den ungewöhnlichen glycosidischen Bindungen des Xyloglucans begründet sein. Bei den freigesetzten Oligomeren handelt es sich vermutlich um die mehr oder weniger vollständigen Xylose-Seitenketten des Xyloglucans, die durch Lösen der endständigen β -1 \rightarrow 4-Bindung von der Hauptkette abgespalten wurden. Die für Xylane ungewöhnliche α -glycosidische Bindung innerhalb der Seitenketten verhindert jedoch einen weiteren Abbau der Seitenkette selbst und damit das Entstehen von Xylose und Xylose-Oligomeren. Das Entfernen der Seitenketten ist scheinbar eine limitierende Voraussetzung für den Abbau der Glucose-Hauptkette. Fehlen die entsprechenden Xylose-Oligomere wie bei *Leptura* und *Hylotrupes*, kommt es infolgedessen auch zu keiner Glucosefreisetzung.

Xyloglucane sind ein wesentlicher Bestandteil pflanzlicher Primärwände, innerhalb derer sie bis zu 20% der Trockenmasse ausmachen können [HOFFMANN et al., 2005]. Xyloglucan findet sich bei Bäumen daher hauptsächlich im meristematischen Kambialbereich, während die Sekundärwände der Xylemzellen nur sehr wenig

Xyloglucane enthalten. Es erscheint daher aus ökologischer Sicht durchaus schlüssig, wenn die im Kambialbereich minierenden Arten *Rhagium* und *Tetropium* diese Komponenten wenigstens teilweise abzubauen vermögen, die im Xylem lebenden Verwandten *Leptura* und *Hylotrupes* dagegen kaum.

In ähnlicher Weise kommen Pectine (Poly- β -1 \rightarrow 4- α -Galacturonsäure mit oder ohne Seitenketten) vor allem im Kambialbereich und der Rinde, kaum jedoch im Xylem von Bäumen vor. Dementsprechend ist die Fähigkeit zur Spaltung von Pectin bei *Rhagium*- und *Tetropium*-Larven wesentlich stärker ausgeprägt als bei *Hylotrupes* und *Leptura*-Larven. Obwohl der Darmextrakt aller Larven ein Pectinpräparat *in vitro* vollständig spaltet, setzen die Rindenfresser *Rhagium* und *Tetropium* im Vergleich mit den übrigen Arten ein Vielfaches an Galacturonsäure frei. Wenngleich Pectine nicht zu den Hauptkomponenten in verholzten Achsen zählen, belegt ein einfaches Experiment (hier nicht gezeigt), daß Pectine auch unter natürlichen Bedingungen gespalten werden und damit für die Ernährung der Larven relevant sind: Überläßt man von löslichen Sacchariden gereinigten Darminhalt aus *Rhagium*- und *Leptura*-Larven einem Selbstverdau, so entsteht nach 15 min unter anderem eine deutliche Menge Galacturonsäure.

Larven von *Rhagium inquisitor* zeigen eine auffallend hohe Laminarinase-Aktivität (β -1 \rightarrow 3-Glucosidase - EC 3.2.1.39) (Abbildung III.23-A). Der Befund, daß Pachyman (Poly- β -1 \rightarrow 3-Glucose) von allen angebotenen Polymeren die mit Abstand größte Menge monomerer Spaltprodukte liefert, legt nahe, daß β -1 \rightarrow 3-Glucane eine wesentliche Rolle in der Ernährung der *Rhagium*-Larven spielen [ZVERLOV et al., 2003]. Pachymanspaltung ist jedoch nicht auf *Rhagium* beschränkt, sondern findet sich in vergleichbarer Ausprägung bei Larven von *Tetropium castaneum* und - deutlich schwächer - Larven von *Leptura rubra*. β -1 \rightarrow 3-Glucane sind ein wesentlicher Bestandteil der Zellwand vieler *Saccharomycetales*. Der Besitz einer körpereigenen β -1 \rightarrow 3-Glucosidase könnte darauf hinweisen, daß die Larven mit der Nahrung aufgenommene und/oder in den Myzetomen gebildete Hefen verdauen und als Nahrungsquelle nutzen.

Wahrscheinlicher ist jedoch, daß sich die in der Kambialregion minierenden Arten *Rhagium inquisitor* und *Tetropium castaneum* lediglich auf die Verwertung pflanzlicher β -1 \rightarrow 3-Glucane spezialisiert haben, die sie dort in Form von Kallose vorfinden. Als stark quellbares und nicht kristallines Polysaccharid dürfte es eine wesentlich

günstigere Kohlenstoffquelle darstellen als Cellulose. *Hylotrupes*-Larven spalten dagegen kaum Pachyman; β -1 \rightarrow 3-Glucane sind für sie scheinbar wenig relevant, da ihre trockene Xylem-Nahrung weder Kallose noch Pilze enthält.

Für die Entwicklung xylophager Insekten ist insgesamt weniger der Kohlenhydratanteil, sondern vor allem der weit geringere Stickstoffgehalt der Nahrung ausschlaggebend [BECKER, 1963, ADELSBERGER, 1975]. Eine Eigenheit xylophager Insekten ist, daß sie verhältnismäßig große Mengen an Nahrungsholz ingestieren, dieses aber größtenteils scheinbar ungenutzt wieder ausscheiden. Aufgrund der Stickstoffknappheit des Substrats erscheint es plausibel, daß die Tiere auf diese Weise selektiv die in geringen Anteilen enthaltenen Stickstoffverbindungen extrahieren, während der aus Kohlenhydraten und Lignin bestehende Rest der Nahrung weitgehend ausgeschieden wird. Diese Situation ist vergleichbar mit der Ernährungsweise der Aphiden, die als Pflanzensäftesauger ebenfalls mit einem Überangebot an Kohlenhydraten konfrontiert sind und den mit der Nahrung aufgenommenen Überschuß an Zuckern als Honigtau ausscheiden [HÖLL et al., 2002]. Die Larven der Cerambyciden können es sich zweifellos leisten, „wählerisch“ zu sein und auf den Abbau von Cellulose zu verzichten. Die wesentlich leichter zugänglichen Hemicellulosen dürften bei kumulativer Nutzung zur Deckung des Kohlenstoffbedarfs mehr als ausreichen, selbst wenn ihr Anteil auch in der Summe den von Cellulose nicht ganz erreicht.

ZUSAMMENFASSUNG

Larven des Zangenbocks *Rhagium inquisitor*, des Rothalsbocks *Leptura rubra* und des braunen Fichtensplintbocks *Tetropium castaneum* besitzen an ihrem vorderen Mitteldarm arttypische Epithel-Ausstülpungen, so genannte Myzetome. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen zeigen, daß diese intrazellulär mit spezifischen hefeartigen Symbionten besiedelt sind. Die Symbionten bei *Rhagium* und *Leptura* sind im Gegensatz zu *Tetropium* kultivierbar; es handelt sich um *Candida rhagii* bzw. um einen *Candida shehatae* nahestehenden Stamm. Larven von *Leptura* beherbergen mitunter einen zweiten, phylogenetisch distinkten Hefestamm innerhalb derselben Myzetome. Größe der Myzetome und Grad ihrer Besiedelung unterliegen bei *R. inquisitor* einem jahreszeitlichen Wechsel. Die in den Myzetomen vermehrten Symbionten werden bei allen Larven laufend zusammen mit den Myzetozyten (Zellen, die die Symbionten beherbergen) ins Darmlumen abgegeben. Larven des Eichenwiderbocks *Plagionotus arcuatus* und des Hausbocks *Hylotrupes bajulus* bilden keine Myzetome aus.

Die Larven von *Tetropium castaneum* beherbergen zusätzlich zu ihren Myzetom-Symbionten einen bislang unbekanntem und nicht kultivierbaren Bakterienstamm in Epithelzellen des vorderen Mitteldarms. Ein Vergleich seiner 16S-rRNA-Sequenz plaziert diese Bakterien innerhalb der Gattung *Sodalis* (*Enterobacteriaceae*), deren Vertreter ausschließlich als Endosymbionten in Insekten vorkommen. Das regelmäßige Auftreten und die Zelldichte des *Sodalis*-Stammes legen nahe, daß es sich um einen weiteren mutualistischen Symbionten von *T. castaneum* handelt.

Kultur- und PCR-basierte Untersuchungen des Darminhalts bei *R. inquisitor*, *L. rubra*, *T. castaneum* und *Plagionotus arcuatus* ergaben eine wenig konstante Besiedelung mit Bakterien und Hefen. Die Zelldichte der kultivierbaren Bakterien und Hefen ist mit einer Größenordnung von maximal 10^6 Zellen/ml vergleichsweise gering. Im Darm der in der Kambialregion ihrer Wirtsbäume minierenden Arten *R. inquisitor* und *T. castaneum* dominieren Vertreter der *Enterobacteriaceae* und andere γ -*Proteobacteria* neben α -*Proteo*- und *Actinobacteria*. In einer Larve von *P. arcutus* fanden sich ausschließlich *Enterobacteriaceae*. Im Darmlumen der Xylem fressenden *L. rubra*-Larven finden sich stattdessen hauptsächlich Vertreter der β -*Proteobacteria*, *Acidobacteria* und *Bacteroidetes*. Die Analyse der entsprechenden 16S/18S-rRNA-Sequenzen weist überwiegend auf freilebende Stämme hin. Die nicht Myzetom-gebundene Darmflora stammt vermutlich überwiegend aus der verrottenden Nahrung

und ist individuellen Schwankungen unterworfen. Ein spezifischer Einfluß auf die Ernährung der Wirtslarven ist damit eher unwahrscheinlich.

Der Darmextrakt aller Spezies hydrolysiert *in vitro* eine breite Palette verschiedener Hemicellulosen und Pectin. Einige artspezifische Unterschiede hierbei können als Anpassung der Larven an ihre Ernährungsweise gesehen werden. Substituierte und unsubstituierte Xylane liefern im Allgemeinen die größte Menge an Spaltprodukten, gefolgt von Glucomannan. Darmextrakt der in der Kambialregion ihrer Wirtsbäume minierenden Larven von *R. inquisitor* und *T. castaneum* spaltet signifikante Mengen von Pectin, während diese Fähigkeit bei den reinen Xylem-Fressern *L. rubra* und *H. bajulus* nur schwach ausgeprägt ist. Larven von *H. bajulus* verfügen stattdessen über eine hohe α -Arabinofuranosidase-Aktivität. Xyloglucan und Arabinogalactan werden vergleichsweise geringfügig bzw. nicht angegriffen. Der Darmextrakt aller Larven zeigt eine deutlich geringere Aktivität gegen lösliche Carboxymethylcellulose und erwies sich als weitgehend unwirksam gegen mikrokristalline und native Cellulose, Stärke und Chitin. Glucose als einziges Spaltprodukt bei allen Cellulose-Varianten deutet auf das Fehlen einer Endo- β -1 \rightarrow 4-Glucosidase im Darm hin. Saccharide mit β -Konformation werden im Allgemeinen hydrolysiert, nicht dagegen solche mit α -Konfiguration. Alle untersuchten Cerambycidenlarven decken ihren Kohlenstoffbedarf demnach überwiegend aus der Hemicellulose-Fraktion, während Cellulose, Transport- und Speicherkohlenhydrate des Wirtsbaumes ernährungsphysiologisch eine untergeordnete Rolle spielen. Die untersuchten Cerambycidenarten besitzen eine funktionell weitgehend übereinstimmende Ausstattung mit Carbohydrasen - unabhängig vom Vorhandensein eines Myzetoms. Eine Beteiligung der Myzetomsymbionten an der Kohlenhydratspaltung im Darm ist damit nicht erkennbar.

Im Gegensatz zu den übrigen Arten konnten im Verdauungstrakt der Larven von *Hylotrupes bajulus* weder Pilze noch Bakterien nachgewiesen werden. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigen die weitgehende Abwesenheit von Mikroorganismen bei dieser Art. Dies macht die Sonderstellung dieser spezialisierten Insektenart deutlich. Cerambyciden sind somit in ihrer Ernährung nicht grundsätzlich auf Mikroorganismen angewiesen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß die Symbiose der Bockkäfer komplexer und weniger gut verstanden ist, als bislang angenommen. Zukünftige Untersuchungen werden mehr als bisher die Anpassungen einzelner Spezies berücksichtigen müssen. Insbesondere gilt

es, Verallgemeinerungen innerhalb der Cerambyciden oder den Anobiiden zu vermeiden.

LITERATUR

U. Adelsberger, Gehalt und Spektrum der Proteine verschieden alten Kiefernspiltholzes (*Pinus sylvestris* L.) und deren Einfluß auf die Entwicklung von Hausbocklarven (*Hylotrupes bajulus* L.), PhD Thesis, Freie Universität Berlin, 1975.

U. Adelsberger, H.-J. Petrowitz, Gehalt und Zusammensetzung der Proteine verschieden lange gelagerten Kiefernholzes (*Pinus sylvestris* L.). *Holzforschung* 30 (1976) 109-113.

J. D. Allison, J. H. Borden, S. J. Seybold, A review of the chemical ecology of the *Cerambycidae* (Coleoptera). *Chemoecology* 14 (2004) 123-150.

R. I. Amann, B. J. Binder B, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, D. A. Stahl, Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 1919-1925.

V. Andreoni, G. Baggi, M. Campana, L. Suss, Gut microbiota of wood eating *Aromia moschata*. *Ann. Microbiol.* 37 (1987) 81-90.

P. Barbosa, M. R. Wagner, Introduction to forest and shade tree insects, Academic Press, Inc, San Diego (1989).

G. Becker, Zur Ernährungsphysiologie der Hausbockkäfer-Larven (*Hylotrupes bajulus* L.). *Naturwiss.* 26 (1938) 462-463.

G. Becker, Der natürliche Schutz des Laubholzes gegen Hausbockkäfer-Larven und seine Ursache. *Z. angew. Entomol.* 30 (1944) 391-417.

G. Becker, Holzbestandteile und Hausbocklarven-Entwicklung. *Holz als Roh- und Werkstoff* 21 (1963) 285-289.

G. Becker, Ecology and physiology of wood destroying *Coleoptera* in structural timber. *Material und Organismen*, 12 (1977) 141-160.

S. Behrens, C. Rühland, I. Inácio, H. Huber, A. Fonseca, I. Spencer-Martins, B. M. Fuchs, R. Amann, In situ accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains Bacteria, Archaea, and Eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 1248-1258.

S. van Borm, A. Buschinger, J. J. Boomsma, J. Billen, *Tetraponera* ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. *Proc. R. Soc. B. Lond.* 269 (2002) 2023-2027.

N. A. Broderick, K. F. Raffa, R. M. Goodman, J. Handelsman, Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 293-300.

J. A. Breznak, A. Brune, Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu. Rev. Entomol.* 39 (1994) 453-487.

A. Brune, Symbionts aiding digestion, In: R. T. Cardé, V. H. Resh (Eds.), *Encyclopedia of insects*. Academic Press, New York (2003) pp. 1102-1107.

P. Buchner, *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. Interscience Publishers, New York, London, Sydney (1965).

A. E. Cazemier, H. J. Op den Camp, J. H. Hackstein, G. D. Vogels, Fibre digestion in Arthropods. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A (1997) 101-109.

C. Chararas, Study on enzymes hydrolysing carbohydrates of *Ergates faber* L. larvae (*Coleoptera: Cerambycidae*). *C. R. Acad. Sc. Paris* 283 (1976) 1523-1525.

C. Chararas, R. Eberhard, J. E. Courtois, F. Petek, Purification of three cellulases from the xylophageous larvae of *Ergates faber* (*Coleoptera: Cerambycidae*). *Insect. Biochem.* 13 (1983) 213-218.

H. Daims, A. Brühl, R. Amann, K.-H. Schleifer, M. Wagner, The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22 (1999) 434-444.

C. Dale, S. C. Welburn, The endosymbionts of tsetse flies: Manipulating host-parasite interactions. *Int. J. Parasitol.* 31 (2001) 628-631.

I. Delalibera Jr., J. Handelsmann, K. F. Raffa, Contrasts in cellulolytic activities of gut microorganisms between the wood borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the bark beetles *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 34 (2005) 541-547.

I. Delalibera Jr., A. Vasanthakumar, B. J. Burwitz, P. D. Schloss, K. D. Klepzig, J. Handelsman, K. F. Raffa, Composition of the bacterial community in the gut of the pine engraver, *Ips pini* (Say) (Coleoptera) colonizing red pine. *Symbiosis* 43 (2007) 97-104.

P. F. Dowd, In situ production of hydrolytic detoxifying enzymes by symbiotic yeasts in the cigarette beetle (Coleoptera: Anobiidae). *J. Econ. Entomol.* 82 (1989) 396-400.

P. F. Dowd, Insect fungal symbionts: a promising source of detoxifying enzymes. *J. Ind. Microbiol.* 9 (1992) 149-161.

A. K. Dunn, E. V. Stabb, Culture-independent characterisation of the microbiota of the ant lion *Myrmeleon mobilis* (Neuroptera: Myrmeleontidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 8784-8794.

T. Ekblom, Cytological and biochemical researches into the intracellular symbiosis in the intestinal cells of *Rhagium inquisitor*. *Skand. Arch. Physiol.* 61 (1931) 35-42.

T. Fukatsu, H. Ishikawa, Phylogenetic position of yeast-like symbiont of *Hamiltonaphis styraci* (Homoptera, Aphididae) based on 18S rRNA sequence. Insect Biochem. Mol. Biol. 26 (1996) 383-388.

T. Fukatsu, R. Koga, W. A. Smith, K. Tanaka, N. Nikoh, K. Sasaki-Fukatsu, K. Yoshizawa, C. Dale, D. H. Clayton, Bacterial endosymbiont of the slender pigeon louse, *Columbicola columbae*, allied to endosymbionts of grain weevils and tsetse flies. Appl. Env. Biol. 73 (2007) 6660-6668.

M. Gardes, T. D. Bruns, ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2 (1993) 113-118.

J. W. Gilmour, The life cycle of the fungal symbiont of *Sirex noctilio*. New Zealand Journal of Forestry 10 (1965) 80-89.

K. E. Gräbner, Vergleichend morphologische und physiologische Untersuchungen an Anobiiden- und Cerambycidensymbionten. Z. Morph. u. Ökol. Tiere 41 (1954) 471.

R. A. Haack, F. Slansky, Jr., Nutritional ecology of wood-feeding *Coleoptera*, *Lepidoptera* and *Hymenoptera*, In: F. Slansky, Jr., J. G. Rodriguez (Eds.), Nutritional ecology of insects, mites, spiders and related invertebrates. John Wiley and Sons, New York (1987), pp. 449-486.

R. A. Haack, T. M. Poland, Evolving management strategies for a recently discovered exotic forest pest: the pine shoot beetle *Tomicus piniperda* (Coleoptera). Biological Invasions 3 (2001) 307-322.

A. Hagn, K. Pritsch, W. Ludwig, M. Schloter, Theoretical and practical approaches to evaluate suitable primer sets for the analysis of soil fungal communities. Acta Biotechnol. 23 (2003) 373-381.

K. Harazono, N. Yamashita, N. Shinzato, Y. Watanabe, T. Fukatsu, R. Kurane, Isolation and characterisation of aromatics-degrading microorganisms from the gut of

the lower termite *Coptotermes formosanus*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67 (2003) 889-892.

T. C. Harrington, Ecology and evolution of mycophagous bark beetles and their fungal partners, In: F. E. Vega, M. Blackwell (Eds.), Insect-fungal interactions: Ecology and evolution. Oxford University Press, New York (2005), pp.1-22.

H. Haslberger, D. Fengel, Versuche zur Wirksamkeit von Ligninabbauprodukten und löslichen Laubholzbestandteilen gegen Hausbockbefall von Laubholz. Holz als Roh- und Werkstoff, 49 (1991) a) 141-146; b) 229-234; c) 333-339.

A. Heddi, A.-M. Grenier, C. Khatchadourian, H. Charles, P. Nardon, Four intracellular genomes direct weevil biology: Nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont and *Wohlbachia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 6814-6819.

S. Heitz, Über intrazelluläre Symbiose bei holzfressenden Käferlarven I. Zoomorphology 7 (1927) 279-305.

W. E. Hillis, Heartwood and tree exudates. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo (1987).

E. R. Hoebeke, New records of immigrant bark beetles (*Coleoptera: Scolytidae*) in New York: attraction of conifer feeding species to ethanol-baited trap logs. Entomol. News 105 (1994) 267-276.

W. Höll, Distribution, fluctuation and metabolism of food reserves in the wood of trees, In: R. Savidge, J. Barnett, J. Napier (Eds.), Cell and molecular biology of wood formation. BIOS Scientific Publishers LTD, Oxford, 2000, pp. 347-362.

W. Höll, M. Frommberger, C. Straßl, Soluble carbohydrates in the nutrition of house longhorn beetle larvae, *Hylotrupes bajulus* (L.) (*Col., Cerambycidae*): from living sapwood to faeces. J. Appl. Ent. 126 (2002) 463-469.

M. Hoffman, Z. Jia, M. J. Peña, M. Cash, A. Harper, A. R. Blackburn II, A. Darvill, W. S. York, Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass Asteridae. *Carbohydr. Res.* 340 (2005) 1826-1840.

B. M. Honigberg, Protozoa associated with termites and their role in digestion, in: K. Krishna, F. M. Wesener (Eds.), *Biology of termites*, vol. 2, Academic press, New York, 1970, pp. 1-36.

T. Hosokawa, Y. Kikuchi, N. Nikoh, M. Shimada, T. Fukatsu, Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PloS Biology* 4 (2006) 1841-1851.

T. Hosokawa, Y. Kikuchi, M. Shimada, T. Fukatsu, Obligate symbiont involved in pest status of host insect. *Proc. R. Soc. B* 274 (2007) 1979-1984

T. Inoue, K. Murashima, J. I. Azuma, A. Sugimoto, M. Slaytor, Cellulose and xylan utilization in the lower termite *Reticulitermes speratus*. *J. Insect Physiol.* 43 (1997) 235-242.

H. Ishikawa, Insect symbiosis: an introduction, in: K. Bourtzis, T. A. Miller (Eds.) *insect symbiosis*, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 2003.

K. Jacobs, K. A. Seifert, K. J. Harrison, T. Kirisits, Identity and phylogenetic relationships of ophiostomatoid fungi associated with native and invasive *Tetropium* species (*Coleoptera: Cerambycidae*) in Atlantic Canada. *Can. J. Bot.* 81 (2003) 316-329.

S. Jindamorakot, S. Limtong, W. Yongmanitchai, M. Tuntirungkij, W. Potacharoen, H. Kawasaki, T. Nakase, Two new anamorphic yeasts, *Candida thailandica* sp. nov. and *Candida lignicola* sp. nov., isolated from insect frass in Thailand. *FEMS Yeast Res.* 7 (2007) 1409-1414.

K. G. Jones, P. F. Dowd, M. Blackwell, Polyphyletic origins of yeast-like endocytobionts from anobiid and cerambycid beetles. *Mycol. Res.* 103 (1999), 542-546.

G. Jurzitza, Physiologische Untersuchungen an Cerambycidensymbionten. Arch. Mikrobiol. 33 (1959) 305-332.

G. Jurzitza, H. Kühlwein, N. J. W. Kreger van Rij, Zur Systematik einiger Cerambycidensymbionten. Arch. Mikrobiol. 36 (1960) 229-243.

G. Jurzitza, Die Symbiose der Anobiiden und Cerambyciden mit hefeartigen Pilzen. Arch. Mikrobiol. 43 (1962) 412-424.

G. Jurzitza, der Vitaminbedarf normaler und aposymbiontischer *Lasioderma serricorne* F. (*Coleoptera, Anobiidae*) und die Bedeutung der symbiontischen Pilze als Vitaminquelle für ihre Wirte. Oecologia 3 (1969) 70-83.

G. Jurzitza, Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen über die Strukturen der Oberflächen von Anobiideneiern (*Coleoptera*) und über die Verteilung der Symbionten auf den Eischalen. Forma et Functio 5 (1972) 75-88.

G. Jurzitza, Über die Lieferung von Sterinen durch die hefeartigen Endosymbionten von *Lasioderma serricorne* F. (*Coleoptera, Anobiidae*) und die ökologische Bedeutung dieser Leistung für den Wirt. Oecologia 16 (1974) 163-172.

K. Kato, Ultrastructure of plant cell wall: Biochemical viewpoint, in: W. Tanner, F. A. Loewus (Eds.), Plant Carbohydrates II, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1981.

Y. Kikuchi, X. Y. Meng, T. Fukatsu, Gut symbiotic bacteria of the genus *Burkholderia* in the broad-headed bugs *Riptortus clavatus* and *Leptochorisa chinensis* (*Heteroptera: Alydidae*). Appl. Environ. Microbiol. 71 (2005) 4035-4043.

T. Kirisits, Fungal associates of european bark beetles with spezial emphasis on the ophistomatoid fungi. In: F. Lieutier, K. R. Day, A. Battisti, J. C. Gregoire, H. F. Evans (Eds.), Kluwer Academic Press, The Netherlands (2004), pp. 181-235

K. D. Klepzig, D. L. Six, Bark beetle-fungal symbiosis: Context dependency in complex associations. *Symbiosis* 37 (2004) 189-205.

G. Kowalchuk and E. Smit, Fungal community analysis using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, In: *Molecular Microbial Ecology Manual*, Second Edition. Kluwer Academic Publishers (2004) 771-788.

J. J. Kukor, M. M. Martin, Acquisition of digestive enzymes by siricid woodwasps, *Science* 220 (1983) 1161-163.

J. J. Kukor, M. M. Martin, Cellulose digestion in *Monochamus marmorator* (Coleoptera: Cerambycidae): role of acquired fungal enzymes. *J. Chem. Ecol.* 12 (1986a) 1057-1070.

J. J. Kukor, M. M. Martin, The transformation of *Saperda calcarata* (Coleoptera: Cerambycidae) into a cellulose digester through the inclusion of fungal enzymes in its diet, *Oecologia* 71 (1986b) 138-141.

J. J. Kukor, D. P. Cowan, M. M. Martin, The role of ingested fungal enzymes in cellulose digestion in the larvae of cerambycid beetles. *Physiol. Zool.* 61 (1988) 364-371.

C. P. Kurtzman, C. J. Robnet, Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence at the 5'-end of the large subunit (26S) ribosomal DNA-gene. *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997) 1216-1223.

C. Laine, Structures of hemicelluloses and pectin in wood and pulp. Dissertation (2005) Helsinki University of Technology, Department of Chemical Technology, Institute of Organic Chemistry.

J. F. Lawrence, *Coleoptera*, In: S. Parker (Ed.) *Synopsis and classification of living organisms*. McGraw Hill, New York. pp 482-553.

E. G. Linsley, The role of *Cerambycidae* in forest, urban and agricultural environments. The Pan-Pacific Entomologist 34 (1958) 105-124.

E.G. Linsley, Ecology of Cerambycidae. Annu. Rev. Entomol. 4 (1959) 99-138.

J. A. Logan, J. A. Powell, Ghost forests, global warming, and the mountain pine beetle (*Coleoptera: Scolytidae*). Am. Entomol. 47 (2001) 160-173.

W. Ludwig, O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Förster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lüßmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode and K-H. Schleifer. ARB: a software environment for sequence data. Nucleic Acids Res. 32 (2004) 1363-1371.

M. E. Mankowski, J. J. Morell, Yeasts associated with the infrabuccal pocket and colonies of the carpenter ant *Camponotus vicinus*. Mycologia 96 (2004) 226-231.

K. Mansour, On the so-called symbiotic relationship between coleopterous insects and intracellular microorganisms. Quart. Jour. Micr. Sci. 77 (1934) 256-274.

M. M. Martin, Cellulose digestion in insects. Comp. Biochem. Physiol. 75 (1983) 313-324.

K. J. Martin, P. T. Rygiewicz, Fungal specific PCR-primers for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Microbiology 5 (2005) - nur online.

S. C. Mishra, P. Singh, Polysaccharide digestive enzymes in the larvae of *Stromatium barbatum* (Fabr.), a dry wood borer (*Coleoptera: Cerambycidae*). Mater. Org. 13 (1978) 115-122.

S. C. Mishra, P. K. Sen-Sarma, R. Singh, Chemical changes in wood during the digestive process in larvae of *Hoplocerambyx spinicornis* (Newm.) (*Insecta: Coleoptera: Cerambycidae*). Material und Organismen 20 (1985) 53-64.

W. Müller, Untersuchungen über die Symbiose von Tieren mit Pilzen und Bakterien. 3. Mitt. Über die Pilzsymbiose holzfressender Insektenlarven. Arch. Mikrobiol. 5 (1934) 84-147.

P. Nardon, A. M. Grenier, Endocytobiosis in *Coleoptera*, biological, biochemical and genetic aspects, In: W. Schwemmler, G. Gassner (Eds.), Insect endocytobiosis: morphology, physiology, genetics, evolution. CRC Press, Boca Raton, Florida (1989) pp. 175-216

E. Novakova, V. Hypsa, A new *Sodalis* lineage from bloodsucking fly *Craterina melbae* (Diptera, Hippoboscoideae) originated independently of the tsetse flies symbiont *Sodalis glossinidius*. FEMS Microbiol. Lett. 269 (2007) 131-135.

D. J. Nowak, J. E. Pasek, R. A. Sequeira, D. E. Crane, V. C. Mastro, Potential effect of *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) on urban trees in the United States. J. Econ. Entomol. 94 (2001) 116-122.

M. Ohkuma, S. Noda, T. Kudo, Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. Appl. Environ. Microbiol. 65 (1999) 4926-4934.

D. S. Park, H. W. Oh, S. Y. Heo, W. J. Jeong, D. H. Shin, K. S. Bae, H. Y. Park, Characterization of an extracellular lipase in *Burkholderia* sp. HY-10 isolated from a longicorn beetle. J. Microbiol. 45 (2007) 409-417.

A. V. Poliakova, I. Yu. Chernov, N. S. Panikov, Yeast biodiversity in hydromorphic soils with reference to grass-Sphagnum swamp in Western Siberia and the Hammocky tundra region (Barrow, Alaska). Microbiologija 70 (2001) 714-720.

C. J. Potrikus, J. A. Breznak, Gut bacteria recycle uric acid nitrogen in termites: a strategy for nutrient conservation. PNAS 78 (1981) 4601-4605.

R. A. Prins, D. A. Kreulen, Comparative aspects of plant cell wall digestion in insects. *Animal Feed Science and Technology* 32 (1991) 101-118.

C. Ramirez, A. Gonzalez, Three new, non-fermenting and nitrate-negative *Candida* species isolated from decayed wood in the evergreen rainy Valdivian forest of southern Chile. *Mycopathologia* 87 (1984) 175-180.

G. Riba, Alimentation des larves de *Rhagium inquisitor* L. (*Coleop. Cerambycidae*) en conditions expérimentales rythme prandial, transit intestinal, indices de consommation et de croissance. *Ann. Zool. anim.* 8 (1976) 499-511.

R. V. M. Rio, C. Lefevre, A. Heddi, and S. Aksoy, Comparative genomics of insect-symbiotic bacteria: Influence of host environment on microbial genome composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 6825–6832.

E. Schimitschek, *Tetropium gabrieli* und *Tetropim fuscum*: Ein Beitrag zu ihrer Lebensgeschichte und Lebensgemeinschaft. *Z. angew. Entomol.* 15 (1929) 229-234.

P. D. Schloss, I. Delalibera Jr., J. Handelsman, K. F. Raffa, Bacteria associated with the guts of two wood-boring beetles: *Anoplophora glabripennis* and *Saperda vestita* (*Cerambycidae*). *Environ. Entomol.* 35 (2006) 625-629.

E. U. Schlottke, G. Becker, Verdauungsfermente im Darm der Hausbockkäferlarven. *Biol. gen.* 16 (1942) 1-11.

E. U. Schlottke, Verdauungsfermente in holzfressenden Käferlarven. *Biol. gen.* 19 (1945) 88-140.

H. Schmidt, Zur Kenntnis des Darmkanals der Hausbockkäfer-Larve *Hylotrupes bajulus*. *Z. Angew. Entomol.* 55 (1965) 288-294.

G. Schmidt, H. U. Schmidt, Ein ungewöhnlicher Gast aus einem Bonsai-Bäumchen: *Anoplophora malasiaca* THOMS. (*Coleoptera: Cerambycidae*). - *Mitt. int. ent. Ver.* 15 (1990) 69-75.

H. Schohmann, Die Symbiose der Bockkäfer. *Zoomorphology* 32 (1937) 542-611.

W. H. Schwarz, The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotech.* 56 (2001) 634-659.

W. Schweigkofler, M. Suzuki, K. Lopandic, H. Prillinger, *Galactocandida* (gen. nov.) *mastotermitis*, *Galactocandida reticulitermitis* and *Galactocandida jahnoperii*: three new ascomycetous yeast species isolated from termites and higher basidiomycetes. Eintrag in die GeneBank-Datenbank unter der *accession-number* AB054525.

K. Seifert, Die chemische Veränderung der Holzzellwand-Komponenten unter dem Einfluß pflanzlicher und tierischer Schädlinge. 3. Mitteilung. *Holzforschung* 16 (1962) 148-154.

S. K. Shen, P. F. Dowd, Detoxification spectrum of the cigarette beetle symbiont *Symbiotaphrina kochii* in culture. *Entomol. exp. appl.* 60 (1991) 51-59.

D. L. Six, Bark beetle-fungus symbiosis, In: K. Bourtzis, T. A. Miller (Eds.) *Insect symbiosis*, CRC Press, New York (2003), pp. 97-114.

E. Smit, P. Leeflang, B. Glandorf, J. D. vanElsas, K. Wernars, Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environm. Microbiol.* 65 (1999) 2614-2621.

E. Stahl, *Dünnschichtchromatographie*, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1967).

V. A. De Stefanis, J. G. Ponte, Separation of sugars by thin layer chromatography. *Journal of Chromatography*, 56 (1968) 99-124.

S.O. Suh, H. Noda, M. Blackwell, Insect symbiosis: derivation of yeast-like endosymbionts within an entomopathogenic filamentous lineage. *Mol. Biol. Evol.* 18 (2001) 995-1000.

S. O. Suh, C. J. Marshall, J. V. McHugh, M. Blackwell, Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. *Mol. Ecol.* 12 (2003) 3137-3145.

S.O. Suh, J. V. McHugh, D. D. Pollock, M. Blackwell, The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. *Mycol. Res.* 109 (2005) 261-265.

M. Suzuki, S. O. Suh, T. Sugita, T. Takase, A phylogenetic study on galactose-containing *Candida*-species based on ribosomal DNA sequences. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45 (1999) 229-238.

M. L. Thao, M. A. Clark, L. Baumann, E. B. Brennan, N. A. Moran, P. Baumann, Secondary endosymbionts of psyllids have been acquired multiple times. *Curr. Microbiol.* 41 (2000) 300-304.

J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson, CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment using through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acid Res.* 22 (1994) 4673-4680.

T. E. Timell, wood and bark polysaccharides, in: W. A. Côté, Cellular ultrastructure of woody plants, Syracuse university press, New York, 1965.

H. Toh, B. L. Weiss, S. A. J. Perkin, A. Yamashita, K. Oshima, M. Hattori, S. Aksoy, Massive genome erosion and functional adaptations provide insights into the symbiotic lifestyle of *Sodalis glossinidius* in the tsetse host, *Genome Res.* 16 (2006) 149-156.

E. J. Vainio, J. Hantula, Direct Analysis of wood inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research* 104 (2000) 927-936.

M. Wayman, S. Parekh, Ethanol and sugar tolerance of *Candida shehatae*. *Biotechnology letters* 7 (1985) 909-912.

W. G. Weisburg, S. M. Barns, D. A. Pelletier, D. J. Lane, 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. of Bacteriol.* 173 (1991) 697-703.

T. J. White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In: *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, inc. (1990) pp 315- 322.

K. H. Wilson, R. B. Blichington, R. C. Green, Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28 (1990) 1942-1946.

H. Yu, Z. Wang, L. Liu, Y. Xia, Y. Cao, Y. Yin, Analysis of the intestinal microflora in *Hepialus gonggaensis* larvae using 16S rRNA sequences, *Curr. Microbiol.* 56 (2008) 391-396.

N. Zhang, S. O. Suh, M. Blackwell, Microorganisms in the gut of beetles: evidence from molecular cloning. *J. Invert. Path.* 84 (2003) 226-233.

D. Zheng, E. W. Alm, D. A. Stahl, L. Raskin, Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 4504-4513.

V. V. Zverlov, W. Höll, W. H. Schwarz, Enzymes for the digestion of cellulose and other polysaccharides in the gut of longhorn beetle larvae, *Rhagium inquisitor* (Col., *Cerambycidae*). *International Biodeterioration and Biodegradation* 51 (2003) 175-179.

DANKSAGUNG

Für das interessante und herausfordernde Thema meiner Doktorarbeit und das entgegengebrachte Vertrauen während meiner Mitarbeit am Fachgebiet für Pflanzenphysiologie möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. W. Höll herzlich danken. Während der gemeinsamen Arbeit im Labor und im Rahmen der Ausbildung konnte ich in vielerlei Hinsicht von ihm lernen. Die weitreichende und stetige Unterstützung, die er mir zu Teil werden ließ, war eine wichtige Voraussetzung für das Entstehen und das Gelingen der Arbeit. Seine fundierten Ratschläge und Empfehlungen waren eine unschätzbare Hilfe, ohne die mein Forschungsprojekt nicht zur Doktorarbeit ausgereift wäre. Die überaus anregenden Diskussionen mit meinem vielgewandten Doktorvater werde ich nach Abschluß der Promotion sehr vermissen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Irmgard Karbach und den von ihr betreuten Auszubildenden Verena Klingl und Carmen Neumaier, die mir bei so mancher Tätigkeit behilflich waren und die Laborroutine durch ihre gute Laune aufzuhellen vermochten.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Erwin Grill, in dessen Räumlichkeiten am Institut für Botanik ich wesentliche Teile meiner Arbeit durchführen durfte. Er und seine Mitarbeiter hatten stets ein offenes Ohr für meine Fragen und bewiesen Geduld und Ausdauer in der Beantwortung methodischer und wissenschaftlicher Fragen. Besonders Dr. Danièle Moes, Dr. Jana Wünschmann, Arthur Korte und Dr. Alexander Christmann ist es zu verdanken, daß ich mir die erforderlichen molekularbiologischen Kenntnisse in kurzer Zeit aneignen konnte. Die unkomplizierte Zusammenarbeit am Lehrstuhl für Botanik schuf eine motivierende Atmosphäre, die mir in schwierigen Phasen meiner Arbeit neuen Antrieb gab.

Herrn Prof. Dr. Kay Schneitz möchte ich danken für die Betreuung und Weiterentwicklung des konfokalen Lasermikroskops am Institut für Botanik, das ein unersetzliches Hilfsmittel für einige Aspekte meiner Arbeit war. Mein Dank gilt auch Dr. Lynette Fulton und Dr. Ram Yadav, sowie weiteren Mitarbeitern des Fachgebiets für Entwicklungsbiologie, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Ludwig vom Lehrstuhl für Mikrobiologie sei gedankt für den Zugang zum ARB-Netzwerk und die überlassenen Sequenz-Datenbanken.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Natuschka Lee, die mir wertvolle Anregungen und methodische Kenntnisse für meine wissenschaftliche Arbeit vermittelte. Daniela Meisinger, Marco Pavlovic, und Dr. Martin Pilhofer möchte ich danken für ihre beratende und praktische Hilfe im Umgang mit der FISH-Technik und der ARB-Software. Margaret C. Henk vom Socolofsky Microscopy Center sei gedankt für die Unterstützung bei der REM.

Danken möchte ich auch Frau Prof. Dr. Christine Gietl und Herrn Prof. Dr. Klaus Lenzian für die gute Zusammenarbeit in zahlreichen Praktika und die stets interessanten Diskussionen.

Herrn Dr. Uwe Noldt von der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft sei gedankt für die fortwährende großzügige Bereitstellung von Hausbocklarven.

Herrn Dr. Peter Hoffmann von der DSMZ schulde ich Dank für die Betreuung meiner Hefeisolate und die freundliche Korrespondenz.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Kollegen Jakob Prestele und Georg Hierl danken, deren Seelenverwandtschaft auf ihre Weise dazu beigetragen hat, daß die Jahre meiner Promotion unvergesslich wurden.