Chemische Kommunikation bei parasitischen Wespen

Joachim Ruther

Zusammenfassung

Parasitische Wespen sind oft winzige Insekten aus der Ordnung der Hautflügler (Hymenoptera), die sich meist in anderen Arthropoden entwickeln und den Wirtsorganismus am Ende ihrer Entwicklung töten. Sie spielen daher als natürliche Gegenspieler eine enorm wichtige Rolle für das Funktionieren von terrestrischen Ökosystemen und werden auch zur biologischen Schädlingsbekämpfung eingesetzt. Um die Massenzucht dieser Nützlinge zu optimieren, müssen möglichst viele Details ihrer Reproduktionsbiologie bekannt sein. Ein wichtiger Aspekt ist in diesem Zusammenhang die sexuelle Kommunikation, die bei den meisten parasitischen Wespen über chemische Signale, so genannte Sexualpheromone, gesteuert wird. Diese Stoffe werden nicht nur zur Anlockung und Erkennung des richtigen Partners eingesetzt, sondern dienen auch dazu, diesen von den eigenen Qualitäten zu überzeugen und zur Paarung zu bewegen. Ein Modellorganismus zur Erforschung parasitischer Wespen ist *Nasonia vitripennis*. Das Pheromonsystem von *N. vitripennis* besteht aus mindestens drei Elementen: (1) Männchen locken Weibchen über ein flüchtiges Sexualpheromon an, welches sie im Abdomen produzieren. (2) Männchen nutzen kutikuläre Kohlenwasserstoffe der Weibchen zur Partnererkennung. (3) Ein orales Balzpheromon der Männchen löst die Paarungswilligkeit der Weibchen aus und schaltet deren Reaktion auf das abdominale Pheromon ab. Anhand von *N. vitripennis* werden chemische, verhaltensbiologische und evolutionäre Aspekte der faszinierenden Pheromonkommunikation parasitischer Wespen vorgestellt.

Summary

Chemical Communication of parasitic wasps

Parasitic wasps are often tiny insects from the order Hymenoptera that parasitize other arthropods and kill the host organism at the end of their development. They are crucial as natural enemies for the functioning of terrestrial ecosystems and are used for biological pest control. In order to optimize mass breeding of these beneficial insects, all details of their reproductive biology should be known. An important aspect in this context is the sexual communication, which is mediated in most species by chemical signals, so-called sex pheromones. These chemicals are used not only for long-range attraction and for recognition of a suitable mating partner but also to signal mate quality and to elicit receptivity. A model organism for the study of parasitic wasp biology is the jewel wasp *Nasonia vitripennis*. The pheromone system of *N. vitripennis* consists of at least three elements: (1) Males attract females by a volatile sex attractant which is produced in the abdomen. (2) Cuticular hydrocarbons of the females are used by the males for mate recognition. (3) An oral courtship pheromone of the males elicits receptivity in the females and switches off the females' response to the abdominal sex attractant. Based on our long-term research on *N. vitripennis*, I will introduce chemical, behavioral and evolutionary aspects of the intriguing pheromone communication of parasitic wasps.

✉ Prof. Dr. Joachim Ruther, Universität Regensburg, Institut für Zoologie, Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg; joachim.ruther@ur.de

Rundgespräche Forum Ökologie, Bd. 45 »Die Sprache der Moleküle – Chemische Kommunikation in der Natur«, S. 17–28.
© 2016 Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München – ISSN 2366–2875 – ISBN 978–3–89937–214–4

Abb. 1. Adulter Seidenspinner (*Bombyx mori*). – CSIRO, CC-BY 3.0.

Einführung

Der französische Insektenforscher Jean-Henri Fabre (1823–1915) berichtet in einem seiner Werke, wie er ein Weibchen des Wiener Nachtpfauenauges (*Saturnia pyri*) beim Schlupf beobachtete. Als er nach Einbruch der Dunkelheit wieder in das Zimmer kam, wimmelte es dort von Männchen dieser Schmetterlingsart. Diese Beobachtung kann als die erste wissenschaftliche Beschreibung der Wirkung eines Sexualpheromons angesehen werden (Fabre 1911, Hecker & Butenandt 1984). Als Pheromone bezeichnet man »Substanzen, die durch einen Organismus nach außen abgegeben werden und bei einem Individuum derselben Art eine bestimmte Reaktion auslösen, z. B. ein Verhalten oder einen Entwicklungsprozess.« (Karlson & Lüscher 1959). Im Falle von Sexualpheromonen betreffen diese Reaktionen das Sexualverhalten, sie dienen also z. B. der Fernanlockung von Sexualpartnern, der Partnererkennung im Nahbereich oder der Auslösung von Paarungsbereitschaft. Herr Riederer hat in seiner Einführung ja bereits Adolf Butenandt erwähnt[1], der mit seinen Mitarbeitern Bombykol, das Sexualpheromon des Seidenspinners, entdeckte (Butenandt & Hecker 1961). Die Wichtigkeit, die diese chemischen Signale für das Fortpflanzungsverhalten von Insekten besitzen, wird deutlich, wenn man sich die riesigen Antennen des Seidenspinner-Männchens ansieht, auf der sich Tausende hoch spezialisierter olfaktorischer Sensillen befinden, die der Detektion des weiblichen Sexualpheromons dienen (Abb. 1). Mit der Entdeckung des Bombykols setzten intensive Forschungsaktivitäten ein, die in den letzten Jahrzehnten zur Identifizierung von Tausenden von Insektenpheromonen geführt haben.

1 Riederer, M. 2016. Einführung in das Rundgespräch. – In: Bayer. Akademie der Wissenschaften (Hrsg.): Die Sprache der Moleküle – Chemische Kommunikation in der Natur. Pfeil, München: 13–16.

Abb. 2. *Nasonia vitripennis*: Eiablage in eine Fliegenpuppe. – Foto: Joachim Ruther.

Pheromonforschung

Die Erforschung von Insektenpheromonen ist ein ausgesprochen vielseitiges und interdisziplinäres Teilgebiet der Chemischen Ökologie. Zunächst gilt es, geeignete Biotestverfahren zu entwickeln, um das Verhalten der Tiere quantitativ zu beschreiben und zu analysieren. Oftmals sind hierfür Feldversuche nötig, weil viele Insekten dieses Verhalten nur unter natürlichen Bedingungen zeigen. Im nächsten Schritt stellt sich die Frage nach der chemischen Struktur der wirksamen Substanzen. Hierzu werden diese aus den Tieren extrahiert und mit chromatografischen Methoden fraktioniert, um herauszufinden, in welcher Teilfraktion die aktiven Komponenten lokalisiert sind. Nach Isolierung bioaktiver Substanzen werden diese mittels Massen-, Infrarot- und/oder NMR-Spektroskopie charakterisiert. Erschwerend ist hierbei oft, dass Pheromone bereits in geringsten Mengen wirksam sind und oftmals nur in Nanogrammmengen zur Verfügung stehen. Die ermittelten Strukturvorschläge müssen dann durch chemische Synthese verifiziert werden und erst wenn das/die Syntheseprodukt/e das gleiche Verhalten im Tier auslösen wie die Naturstoffe, ist die Pheromonidentifizierung abgeschlossen. Weiterführende Fragen betreffen dann z. B. den Biosyntheseort oder die genetischen und biochemischen Mechanismen von Pheromonbiosynthese und -perzeption oder die Evolution der chemischen Signale.

Viele Insekten, deren Pheromone erforscht werden, besitzen als potenzielle Schädlinge eine ökologische oder ökonomische Relevanz für den Menschen. Somit stellt sich oftmals die Frage nach der Anwendung von Pheromonen im Pflanzenschutz. In den Anfängen der Chemischen Ökologie hatte man sogar gehofft, mithilfe von Pheromonen Pestizide überflüssig machen zu können, aber es stellte sich heraus, dass dies zu optimistisch gedacht war. Trotzdem gibt es zahlreiche Beispiele, die zeigen, dass Pheromone erfolgreich im Pflanzenschutz eingesetzt werden können. Beim so genannten Monitoring werden Pheromonfallen verwendet, um z. B. eingeschleppte Arten frühzeitig zu erkennen oder die Ausbreitung und Dynamik von Insektenpopulationen zu verfolgen. Beim so genannten Mass trapping wird versucht, mit

Pheromonfallen so viele Individuen einer Art zu fangen, dass deren Populationsgröße unter der Schadschwelle bleibt. Das System funktioniert jedoch nur bei sorgfältiger Optimierung, da auch immer die Gefahr besteht, dass Individuen von außerhalb angelockt werden und der Nettoeffekt am Ende gleich Null ist. Die größte Bedeutung haben Pheromone im Pflanzenschutz aber beim Einsatz in der so genannten »Verwirrtechnik« (Mating disruption), bei der man sie in dem zu schützenden Areal in so hohen Konzentrationen ausbringt, dass die Männchen ihre Weibchen nicht mehr lokalisieren können.

Parasitische Wespen

Parasitische Wespen gehören zur Ordnung der Hautflügler (Hymenoptera). Es handelt sich um solitäre, d. h. um nicht sozial lebende Wespen, die meist sehr klein sind und ihre Eier in verschiedene Stadien anderer Arthropoden legen (Abb. 2). Spätestens wenn die Nachkommen der Wespen schlüpfen, sterben die Wirte ab. Aus diesem Grund spielen parasitische Wespen als natürliche Gegenspieler anderer Insekten eine extrem wichtige Rolle für das Funktionieren terrestrischer Ökosysteme, indem sie z. B. Massenvermehrungen herbivorer Insekten verhindern. Daher würde die Welt ohne parasitische Wespen sicherlich anders aussehen – vielleicht vergleichbar mit Bildern, wie man sie aus Teilen des Bayerischen Waldes kennt, in denen Massenvermehrungen von Borkenkäfern (*Ips typographus*) zu erheblichen Schäden an den Fichtenbeständen geführt haben. Parasitische Wespen lassen sich auch für die biologische Schädlingsbekämpfung einsetzen. Durch die oftmals vorhandene Wirtsspezifität können hier im Gegensatz zum Pestizideinsatz sehr gezielte Effekte erreicht werden. Für eine erfolgreiche Massenzucht müssen jedoch alle Aspekte ihrer Biologie verstanden werden, vor allem natürlich solche, die den Reproduktionserfolg beeinflussen.

Doch auch unabhängig von der praktischen Anwendung gibt es gute Gründe, sich mit der sexuellen Kommunikation parasitischer Wespen zu beschäftigen. Denn mit parasitischen Wespen lassen sich zahlreiche übergeordnete Fragestellungen beantworten, welche für die Biologie von Tieren generell relevant sind. Beispiele für solche Fragen, die wir mit parasitischen Wespen als Modellorganismen bearbeitet haben, lauten:

1. Gibt es bei Tieren einen Zusammenhang zwischen Attraktivität und Fruchtbarkeit?
2. Wie können Mütter die sexuelle Attraktivität ihrer Söhne steigern?
3. Wie wichtig ist Sex für Tiere, die auch ohne Sex Nachkommen haben können?
4. Wie entstehen Kommunikationssysteme und wie verändern sie sich im Laufe der Evolution?

In Bezug auf die erste Frage konnten wir zeigen, dass fruchtbarere Männchen, d. h. solche mit besonders vielen Spermien, auch für Weibchen besonders attraktiv sind, da sie auch mehr von ihrem Sexualpheromon produzieren können (Ruther et al. 2009). Zur zweiten Frage fanden wir heraus, dass Weibchen bei der Eiablage Wirte bevorzugen, die es aufgrund ihrer Fettsäurezusammensetzung den männlichen Nachkommen ermöglichen, besonders viel von ihrem Sexualpheromon zu produzieren (Blaul & Ruther 2011). Die dritte Frage ist für parasitische Wespen deshalb relevant, weil Weibchen auch ohne Verpaarung Nachkommen produzieren können. Aus unbefruchteten Eiern entstehen jedoch ausschließlich männliche Nachkommen. Durch Wahlversuche zwischen dem männlichen Sexualpheromon und dem Geruch von Wirten für die Eiablage konnten wir zeigen, dass virgine Weibchen stets das Sexualpheromon bevorzugen. Unmittelbar nach der Paarung legen sie jedoch einen olfaktorischen Schalter um und bevorzugen nunmehr den Wirtsduft (Steiner & Ruther 2009). Somit ist die Möglichkeit, weibliche Nachkommen zu produzieren, offensichtlich von großer Wichtigkeit für den Fortpflanzungserfolg der Weibchen. Bevor auf die vierte Frage nach der Evolution chemischer Signale etwas ausführlicher eingegangen wird, soll zunächst kurz das verwendete Modellsystem vorgestellt werden.

Modellsystem *Nasonia*

Die Gattung *Nasonia* (Chalcidoidea, Erzwespen) besteht aus vier Arten (*N. vitripennis, N. giraulti, N. longicornis* und *N. oneida*), wobei *N. vitripennis* weltweit vorkommt, während die anderen Arten auf Nordamerika beschränkt sind. Die Wespen sind 1–2 mm klein und parasitieren die Puppen verschiedener Fliegenarten. Insbesondere *N. vitripennis* (Abb. 2) wird seit vielen Jahrzehnten intensiv erforscht und auch das Genom dieser Art wurde bereits sequenziert (Werren et al. 2010). *N. vitripennis* kommt im Osten der

USA mikrosympatrisch mit *N. girault*i vor, d. h., Individuen beider Arten entwickeln sich häufig gleichzeitig in denselben Wirtspuppen. Zwischenartliche Paarungen sind möglich, doch kommt es hierbei zu keiner erfolgreichen Befruchtung. Hierfür sind endosymbiontische Bakterien der Gattung *Wolbachia* verantwortlich. *Nasonia*-Weibchen, die sich mit einem »falschen« Männchen verpaaren, können somit nur noch männliche Nachkommen produzieren, was aufgrund des Paarungssystems von *Nasonia* erhebliche Fitnessnachteile mit sich bringt. *N. vitripennis* und *N. girault*i unterscheiden sich in einem wichtigen Aspekt ihrer Reproduktionsbiologie, nämlich dem Ort der Paarung. Während sich bei *N. girault*i fast alle Weibchen bereits im Wirt verpaaren, geschieht dies bei *N. vitripennis* überwiegend außerhalb des Wirtes (Drapeau & Werren 1999). Somit ist anzunehmen, dass ein starker Selektionsdruck für eine artspezifische Pheromonkommunikation insbesondere auf *N. vitripennis* lag, um das Risiko von »kostspieligen« Fremdverpaarungen zu verringern (Ruther et al. 2014).

Das Pheromonsystem von *Nasonia*

An der Partnerfindung/-erkennung von *N. vitripennis* sind drei verschiedene Sexualpheromone beteiligt. Ein Sexualpheromon der Männchen wird im Enddarm produziert, über die Analöffnung auf den Untergrund appliziert und ist hochattraktiv für ungepaarte Weibchen. Es besteht aus den drei Komponenten (4*R*,5*S*)- und (4*R*,5*R*)-5-Hydroxy-4-decanolid (*RR*-HDL, *RS*-HDL) und 4-Methylchinazolin (4-MQ), welches die Wirkung der beiden Lactone synergistisch verstärkt (Abb. 3a). Sofort nach der Paarung reagieren Weibchen jedoch nicht mehr auf das Pheromon der Männchen, von einigen wird der Duft sogar aktiv gemieden (Ruther et al. 2007, 2010, Steiner & Ruther 2009). Im Nahbereich nutzen Männchen dann die kutikulären Kohlenwasserstoffe der Weibchen zur Partnererkennung (Abb. 3b). Diese bestehen aus einem Gemisch von mehr als 70 Komponenten (Steiner et al. 2006, Niehuis et al. 2011) und werden in Drüsen der Epidermis gebildet. Die apolaren Kohlenwasserstoffe dienen primär dem Verdunstungsschutz, sind aber in ihrer Zusammensetzung bei Männchen und Weibchen verschieden. Das Gemisch der Weibchen löst bei Männchen ein stereotypes Balzverhalten aus. Das Männchen setzt sich dazu

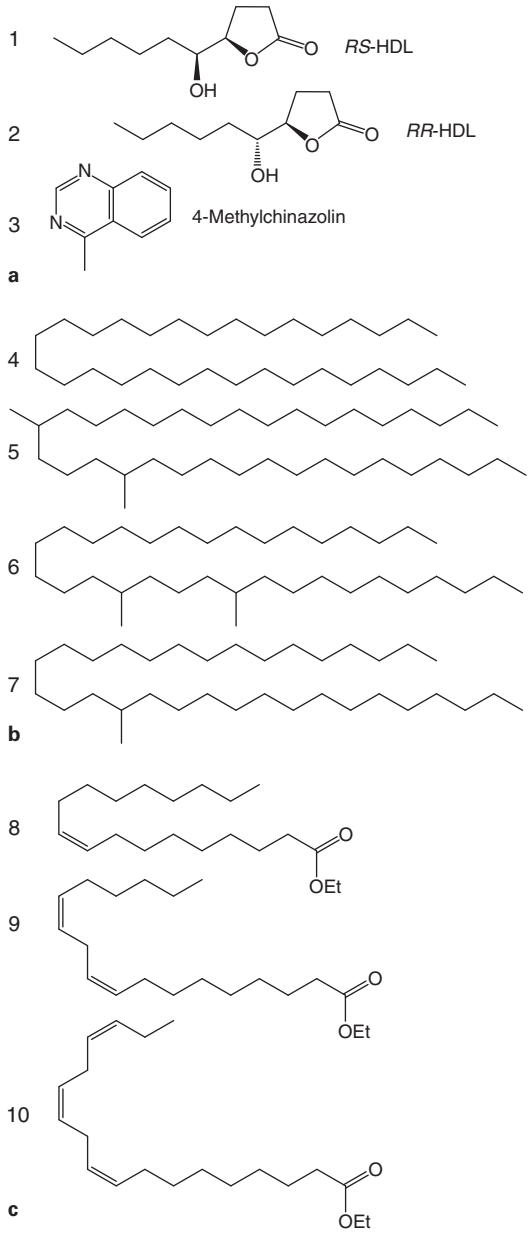

Abb. 3. Strukturformeln von bislang identifizierten Pheromonen von *Nasonia vitripennis*: **a,** Das abdominale Sexualpheromon der Männchen bestehend aus (4*R*,5*S*)- und (4*R*,5*R*)-5-Hydroxy-4-decanolid (1, 2) sowie aus 4-Methylchinazolin (3); **b,** einige Hauptkomponenten der kutikulären Kohlenwasserstoffe der Weibchen: Hentriacontan (4), 15,19-Dimethylpentatriacontan (5), 11,15-Dimethyltritriacontan (6) und 15-Methyltritriacontan (7); **c,** Bestandteile des oralen Balzpheromons der Männchen: Ethyloleat (8), Ethyllinolat (9), und Ethyllinolenat (10).

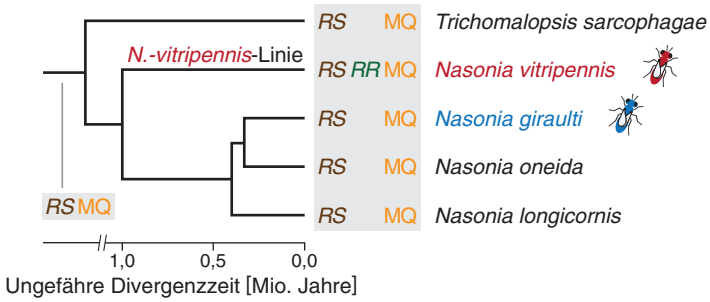

Abb. 4. Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Nasonia* und evolutionäre Historie der männlichen Sexualpheromone. – Modifiziert nach Niehuis et al. (2013).

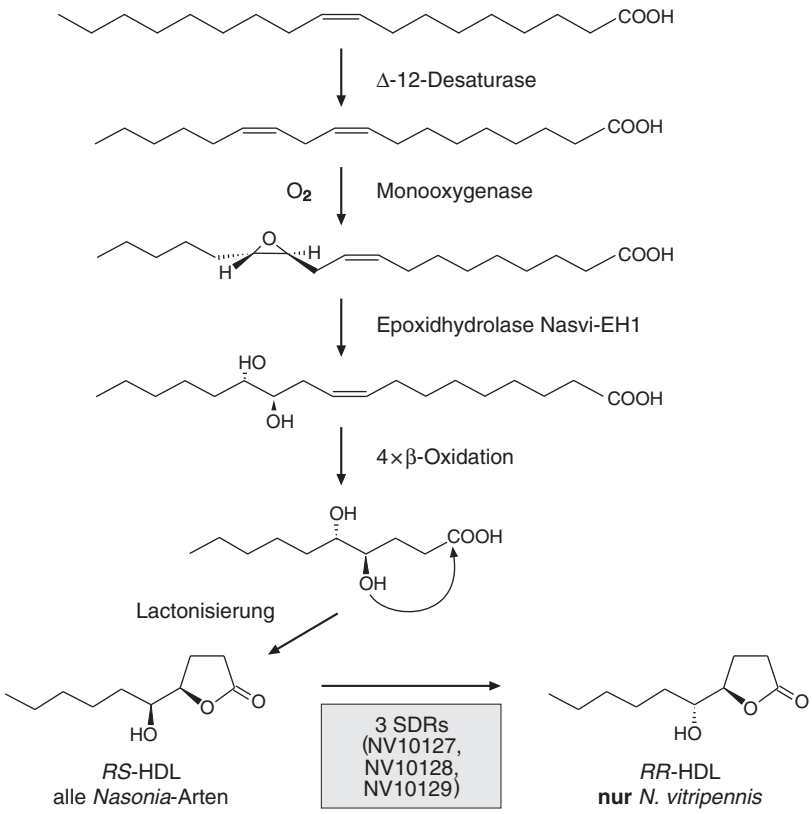

Abb. 5. Angenommener Biosyntheseweg von Pheromonkomponenten (4*R*,5*S*)- und (4*R*,5*R*)-5-Hydroxy-4-decanolid in Männchen der Gattung *Nasonia*.

auf den Rücken des Weibchens und fängt an, mit dem Kopf zu nicken (Head nodding). Aus einer oralen Drüse gibt es dabei ein Sekret ab, das es auf die Antennen der Weibchen appliziert. Nur wenn die Männchen dieses Verhalten zeigen, werden die Weibchen paarungsbereit. Wird die Abgabe experimentell unterbunden, indem man z. B. die Mundwerkzeuge der Männchen verklebt, signalisieren die Weibchen keine Paarungsbereitschaft mehr (van den Assem et al. 1980, Ruther et al. 2010). Um ihre Paarungsbereitschaft zu signalisieren, klappen die Weibchen

die Antennen herunter und öffnen gleichzeitig die Genitaltasche. Die Paarung dauert einige Sekunden, danach läuft die Balzsequenz noch einmal ab. Welche Verbindungen die Paarungsbereitschaft auslösen, ist auch fast vierzig Jahre nach der Entdeckung des Phänomens unbekannt (van den Assem et al. 1980). Wir konnten jedoch in Kopfextrakten der Männchen die drei Fettsäureethylester Ethyloleat, Ethyllinolat und Ethyllinolenat (Abb. 3c) identifizieren, welche für das »Abschalten« der weiblichen Reaktion auf das abdominale Pheromon der Männchen verantwortlich sind (Ruther & Hammerl 2014). Wir haben hier also den bei Insekten bislang einmaligen Fall einer Pheromoninteraktion, bei der ein Pheromon der Männchen die Reaktion der Weibchen auf ein anderes Pheromon derselben Männchen beendet. Auf diese Weise verhindern die Männchen vermutlich, dass die von ihnen begatteten Weibchen noch von anderen Männchen »belästigt« werden.

Pheromonevolution bei *Nasonia*

Auch auf die eingangs gestellte vierte Frage nach der Evolution von Kommunikationssystemen konnten wir mithilfe des *Nasonia*-Modells in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Prof. Thomas Schmitt (Universität Würzburg) und Prof. Jürgen Gadau (Arizona State University) Antworten finden (Niehuis et al. 2013). Eine vergleichende Analyse innerhalb der Gattung ergab, dass nur die Männchen von *N. vitripennis* signifikante Mengen von *RR*-HDL in ihrem Pheromon aufweisen, während alle anderen Arten praktisch nur *RS*-HDL und 4-MQ produzieren (Abb. 4; Niehuis et al. 2013). Somit besitzt *N. vitripennis* also eine zusätzliche Pheromonkomponente, die sich von einer bei allen *Nasonia*-Arten vorkommenden Komponente (*RS*-HDL) ableitet und sich von dieser lediglich in der Konfiguration an einem asymmetrischen Kohlenstoffatom unterscheidet. Wir sind daher gemeinsam mit unseren Kollegen der Frage nachgegangen, ob die Entwicklung dieser neuen Pheromonkomponente in *N. vitripennis* dazu beigetragen hat, die hohen »Kosten« einer Fremdverpaarung, zum Beispiel mit Männchen der mikrosympatrischen Art *N. giraulti*, zu reduzieren. Zudem wollten wir die molekularen Mechanismen verstehen, die zur Evolution der neuen Pheromonkomponente bei *N. vitripennis* geführt haben.

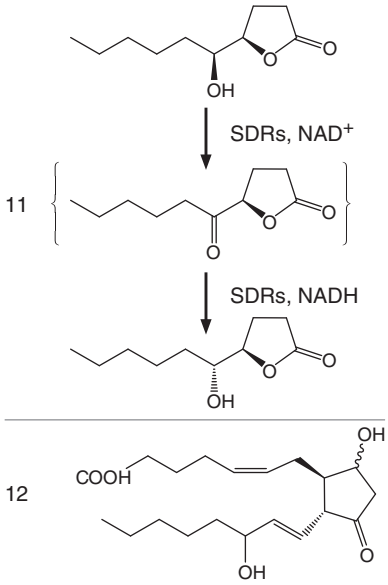

Abb. 6. Epimerisierung von (4*R*,5*S*)-5-Hydroxy-4-decanolid mit dem Zwischenprodukt (4*R*)-5-Oxo-4-decanolid (11) durch SDRs und Strukturformel von Prostaglandin D2 (12); SDR: short chain dehydrogenase/reductase.

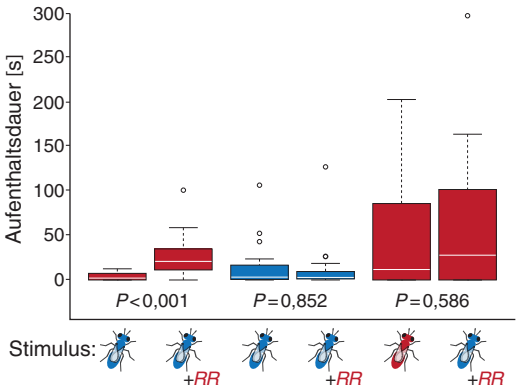

Abb. 7. Reaktion der Weibchen von *N. vitripennis* (rote Boxen) und *N. giraulti* (blaue Boxen) auf natürliche Pheromonextrakte von *N.-giraulti*-Männchen (blaue Wespe) oder *N.-vitripennis*-Männchen (rote Wespe) oder einem experimentell hergestellten *N.-vitripennis*-Pheromon (blaue Wespe + *RR*) in einem 2-Wahl-Olfaktometer. Der experimentell hergestellte *N.-vitripennis*-Pheromontyp wurde durch Zusatz von synthetischem *RR*-HDL zu natürlichem Pheromonextrakt von *N.-giraulti*-Männchen hergestellt. Dargestellt ist die Aufenthaltsdauer der Weibchen in den Duftfeldern des Olfaktometers (Statistische Auswertung: Wilcoxon-Test für Paardifferenzen, $n = 20$). – Modifiziert nach Niehuis et al. (2013).

Hierzu haben wir uns zunächst den Biosyntheseweg von HDL genauer angesehen (Abb. 5). Durch die Verwendung von ^{13}C-markierten Vorläufersubstanzen konnten wir zeigen, dass die Biosynthese mit Linolsäure oder Ölsäure beginnt (Blaul & Ruther 2011, Blaul et al. 2014). Bemerkenswerterweise besitzt *N. vitripennis* also eine Δ-12-Desaturase und kann, anders als Vertebraten, Linolsäure selbst synthetisieren (Blaul et al. 2014). Die Linolsäure wird durch eine Monooxygenase an der zweiten Doppelbindung epoxidiert und das Epoxid wird anschließend durch die Epoxidhydrolase Nasvi-EH1 gespalten (Abdel-latief et al. 2008). Nach vier β-Oxidationsschritten, d. h. einer Verkürzung der C_{18}-Kette um acht Kohlenstoffatome, erfolgt ein Ringschluss (Lactonisierung) der resultierenden Dihydroxydecansäure zum *RS*-HDL, das bei allen *Nasonia*-Arten vorkommt. Ein möglicher Mechanismus für die Bildung von *RR*-HDL in *N. vitripennis* ist eine direkte Epimerisierung von *RS*-HDL, wobei es zu einer Inversion der Stereochemie an C5 kommt. Unser Augenmerk bei unserer Suche nach der genetischen Basis des Pheromonunterschiedes lag daher besonders auf Genen, die Enzyme codieren, welche eine solche Reaktion katalysieren können. Mittels äußerst aufwändiger QTL-Analysen (quantitative trait locus) gelang es, einen Genlocus zu identifizieren, der mit dem Erscheinen der neuen Pheromonkomponente *RR*-HDL korrelierte. An diesem Locus befinden sich u. a. drei Gene mit den Namen *NV10127, NV10128* und *NV10129*, die den genetischen Code für drei kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (engl.: short chain dehydrogenase/reductases, SDRs) enthalten. Vertreter dieser Enzymklasse können als Alkoholdehydrogenasen wirken, d. h., sie oxidieren Hydroxylgruppen an organischen Molekülen zu Carbonylen (Aldehyde oder Ketone) und/oder sie katalysieren die umgekehrte Reaktion, also die Reduktion von Carbonylen zu Alkoholen. Genau ein solcher Mechanismus könnte bei Hydroxylgruppen an chiralen Kohlenstoffatomen mit einer Inversion einhergehen, also mit einer Überführung der *R*- in die *S*-Konfiguration. Somit hatten unsere Kandidatengene bzw. die codierten Enzyme genau jene Eigenschaften, die wir postuliert hatten.

Dass die identifizierten SDRs tatsächlich an der Bildung von *RR*-HDL beteiligt sind, konnte schließlich durch Knock-down-Experimente mittels RNA-Interferenz (RNAi) gezeigt werden. Wurde die Expression der SDRs bei Männchen von *N. vitripennis* ausgeschaltet, produzierten diese auch kein *RR*-HDL mehr (Niehuis et al. 2013). Um auch die letzten Zweifel daran zu beseitigen, dass die Bildung von *RR*-HDL durch Epimerisierung von *RS*-HDL geschieht und dass das Keton (4*R*)-5-Oxodecanolid (ODL) das Zwischenprodukt darstellt (Abb. 6), stellten wir SDRs auf biotechnischem Weg durch Transformation von *Escherichia coli* her und testeten die Aktivität der Enzyme *in vitro*. Auf diese Weise konnten wir schließlich beweisen, dass die SDRs von *N. vitripennis* mit NAD^+ als Co-Faktor auch im Reagenzglas *RR*-HDL und *RS*-HDL ineinander überführen können und dass auch das postulierte Zwischenprodukt ODL involviert ist (Ruther et al. 2016).

Interessanterweise finden wir bei Sequenzvergleichen der *Nasonia*-SDRs mit Datenbanken große Ähnlichkeiten zu 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenasen, welche bei Tieren die OH-Gruppe an C15 von Prostaglandinen zu einer Ketogruppe oxidieren (Cho et al. 2003). Die strukturellen Ähnlichkeiten zwischen Prostaglandinen und HDL sind offensichtlich, bei beiden gibt es einen Fünfring mit einer hydroxylierten Seitenkette (Abb. 6). Wir postulieren daher, dass die *Nasonia*-SDRs ursprünglich eine Funktion im Prostaglandinstoffwechsel gehabt haben könnten oder sogar noch haben und es im Laufe der Evolution zu einer Genduplikation mit nachfolgender Neofunktionalisierung gekommen ist.

Nachdem nun die genetischen und biochemischen Mechanismen der Pheromonevolution bei *Nasonia* in wesentlichen Teilen aufgeklärt waren, stellte sich natürlich die Frage, ob die neue Pheromonkomponente von *N.-vitripennis*-Weibchen auch tatsächlich verwendet wird, um zwischen arteigenen und artfremden Männchen zu unterscheiden. Um dies zu überprüfen, stellten wir einen Pheromonextrakt aus *N.-giraulti*-Männchen her und teilten diesen in zwei Teile. Zu dem einen Teil gaben wir synthetisches *RR*-HDL in den natürlich vorkommenden Mengenverhältnissen und erzeugten so experimentell das *N.-vitripennis*-Pheromon, während der andere Teil unverändert blieb. Dann gaben wir Weibchen von *N. vitripennis* und *N. giraulti* die Wahl zwischen den beiden Düften und konnten zeigen, dass *N.-vitripennis*-Weibchen

den komplexeren »*vitripennis*«-Pheromontyp gegenüber dem »*girault*i«-Typ bevorzugten, während *N.-girault*i-Weibchen dies nicht taten (Abb. 7; Niehuis et al. 2013). *N.-vitripennis*-Weibchen unterschieden auch nicht zwischen dem natürlichen und dem experimentell hergestellten »*vitripennis*«-Pheromontyp. Somit war klar, dass *N. vitripennis* die neue Komponente *RR*-HDL tatsächlich verwendet, um zwischen den eigenen und artfremden Männchen zu diskriminieren.

Szenario der Pheromonevolution bei *Nasonia*

Aus diesen Ergebnissen und weiteren, hier nicht im Detail dargestellten Studien (Ruther et al. 2014) lässt sich folgendes hypothetisches Szenario der Pheromonevolution bei *Nasonia* ableiten. Die rezente Zusammensetzung des männlichen Sexualpheromons innerhalb der Gattung *Nasonia* (Abb. 4) lässt vermuten, dass das Zweikomponentengemisch (*RS*-HDL/4-MQ) den ursprünglichen Zustand darstellte. Demnach haben also auch die beiden mikrosympatrischen Arten *N. vitripennis* und *N. girault*i vermutlich zunächst diese Pheromonzusammensetzung verwendet. Die Überlappung der chemischen Information führte zu einem Selektionsdruck bei *N. vitripennis*, da für diese Art die Gefahr »kostspieliger« Fehlpaarungen größer war als bei *N. girault*i, denn letztere verpaaren sich bereits vor dem Schlüpfen aus dem Wirt. Dies hat dann durch die Epimeraseaktivität der SDRs zur Bildung von *RR*-HDL und letztlich zu einer Diversifizierung des Pheromons bei *N. vitripennis* geführt.

Doch wie kann sich so eine Veränderung in einem Sender-Empfänger-System etablieren? Theoretische Überlegungen gehen davon aus, dass die Entstehung neuer Pheromonphänotypen durch stabilisierende Selektion verhindert wird (Butlin & Trickett 1997). Männchen mit einem abweichenden Pheromon sollten Nachteile bei der Partnerfindung haben, sodass sich Neuerungen in der Pheromonzusammensetzung nicht durchsetzen sollten. Eine Antwort, wie dies bei *Nasonia* trotzdem möglich war, gibt die Reaktion der *N.-girault*i-Weibchen: Sie reagieren gar nicht auf die neue Komponente *RR*-HDL (Abb. 7). Genauso könnte es bei den früheren *N.-vitripennis*-Weibchen auch gewesen sein, sodass *RR*-HDL nicht durch stabilisierende Selektion eliminiert wurde. Somit hätte genügend Zeit für die *N.-vitripennis*-Weibchen zur Verfügung gestanden, um die Chemorezeptoren zu evolvieren, die eine stereoselektive Perzeption von *RS*- und *RR*-HDL möglich machten.

Danksagung

Der Autor dankt allen Coautoren der zitierten Publikationen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für finanzielle Unterstützung (Ru 717/10-1 u. -2).

Literatur

Abdel-latief, M., L. A. Garbe, M. Koch & J. Ruther. 2008. An epoxide hydrolase involved in the biosynthesis of an insect sex attractant and its use to localize the production site. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 105 (26): 8914–8919.

Butenandt, A. & E. Hecker. 1961. Synthese des Bombykols, des Sexual-Lockstoffes des Seidenspinners, und seiner geometrischen Isomeren. – Angewandte Chemie, 73 (11): 349–353.

Butlin, R. & A. J. Trickett. 1997. Can population genetic simulations help to interpret pheromone evolution? – In: Cardé, R. T. & A. K. Minks (eds.): Insect Pheromone Research: New Directions. Chapman & Hall, New York: 548–562.

Blaul, B. & J. Ruther. 2011. How parasitoid females produce sexy sons: a causal link between oviposition preference, dietary lipids and mate choice in *Nasonia*. – Proceedings of the Royal Society B, 278 (1799): 3286–3293.

Blaul, B., R. Steinbauer, P. Merkl, R. Merkl, H. Tschochner & J. Ruther. 2014 Oleic acid is a precursor of linoleic acid and the male sex pheromone in *Nasonia vitripennis*. – Insect Biochemistry and Molecular Biology, 51: 33–40.

Cho, H., M. A. Oliveira & H.-H. Tai. 2003. Critical residues for the coenzyme specificity of NAD^+-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. – Archives in Biochemistry and Biophysics, 419 (2): 139–146.

Drapeau, M. D. & J. H. Werren. 1999. Differences in mating behaviour and sex ratio between three sibling species of *Nasonia*. – Evolutionary Ecology Research, 1: 223–234.

Fabre, J. H. 1911. Bilder aus der Insektenwelt. Autorisierte Übersetzung aus: « Souvenirs entomologiques », « Moeurs des insectes » und « La vie des insectes ». – Franckh, Stuttgart.

Hecker, E. & A. Butenandt. 1984. Bombykol revisited – reflections on a pioneering period and on some of its consequences. – In: Hummel, H. E. & T. A. Miller (eds.): Techniques in Pheromone

Research. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo: 1–44.
Karlson, P. & M. Lüscher. 1959. 'Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. – Nature, 183: 55–56.
Niehuis, O., J. Bullesbach, A. K. Judson, T. Schmitt & J. Gadau. 2011. Genetics of cuticular hydrocarbon differences between males of the parasitoid wasps *Nasonia girault*i and *Nasonia vitripennis*. – Heredity, 107 (1): 61–70.
Niehuis, O., J. Buellesbach, J. D. Gibson, D. Pothmann, C. Hanner, N. S. Mutti, A. Judson, J. Gadau, J. Ruther & T. Schmitt. 2013. Behavioural and genetic analyses of *Nasonia* shed light on the evolution of sex pheromones. – Nature, 494 (7437): 345–348.
Ruther, J. & T. Hammerl. 2014. An oral male courtship pheromone terminates the response of *Nasonia vitripennis* females to the male sex attractant. – Journal of Chemical Ecology, 40 (1): 56–62.
Ruther, J., L. M. Stahl, S. Steiner, L. A. Garbe & T. Tolasch. 2007. A male sex pheromone in a parasitic wasp and control of the behavioral response by the female's mating status. – Journal of Experimental Biology, 210 (12): 2163–2169.
Ruther, J., M. Matschke, L.-A. Garbe & S. Steiner. 2009. Quantity matters: male sex pheromone signals mate quality in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. – Proceedings of the Royal Society B, 276 (1671): 3303–3310.
Ruther, J., K. Thal, B. Blaul & S. Steiner. 2010. Behavioural switch in the sex pheromone response of *Nasonia vitripennis* females is linked to receptivity signalling. – Animal Behaviour, 80 (6): 1035–1040.
Ruther, J., J. McCaw, L. Böcher, D. Pothmann & I. Putz. 2014. Pheromone diversification and age-dependent behavioural plasticity decrease interspecific mating costs in *Nasonia*. – PLoS ONE, 9 (2): e89214; doi:10.1371/journal.pone.0089214.
Ruther, J., A. K. Hagström, B. Brandstetter, J. Hofferberth, A. Bruckmann, F. Semmelmann, M. Fink, H. Lowack, S. Laberer, O. Niehuis, R. Deutzmann, C. Löfstedt & R. Sterner. 2016. Epimerisation of chiral hydroxylactones by short chain dehydrogenases/reductases accounts for sex pheromone diversification in *Nasonia*. – Scientific Reports, 6: 34697; doi:10.1038/srep34697.
Steiner, S. & J. Ruther. 2009. How important is sex for females of a haploid species under local mate competition? – Behavioral Ecology, 20 (3): 570–574.
Steiner, S., N. Hermann & J. Ruther. 2006. Characterization of a female-produced courtship pheromone in the parasitoid *Nasonia vitripennis*. – Journal of Chemical Ecology, 32 (8): 1687–1702.
van den Assem, J., F. Jachmann & P. Simbolotti. 1980. Courtship behavior of *Nasonia vitripennis* (Hym., Pteromalidae): some qualitative, experimental evidence for the role of pheromones. – Behaviour, 75 (3/4): 301–307.
Werren, J. H., S. Richards, C. A. Desjardins, O. Niehuis, J. Gadau, J. K. Colbourne & The Nasonia Genome Working Group. 2010. Functional and Evolutionary Insights from the Genomes of Three Parasitoid *Nasonia* Species. – Science, 327 (5963): 343–348.

Diskussion

J. Heinze: Du hattest gezeigt, dass die Männchen kurzflügelig sind. Heißt das, die Paarung findet direkt am Schlüpfort statt? Wählen dann die *Nasonia*-Weibchen die Männchen tatsächlich aus? Es sind ja meistens ihre Brüder, die Tiere am Schlüpfort sind eng miteinander verwandt und sollten genetisch sehr ähnlich sein. Findet man Unterschiede zwischen den Pheromon-Traits, die in irgendeiner Weise Qualitätsunterschiede darstellen?

J. Ruther: Die Kurzflügeligkeit der Männchen erklärt sehr schön, warum es für Weibchen kostenintensiv ist, nur Männchen als Nachkommen zu haben. Wenn eine Wespenmutter an eine neue Stelle kommt, zu der sich keine andere Wespe verirrt, und es schlüpfen nur Männchen, die nicht fliegen können, dann bedeutet das für sie eine reproduktive Sackgasse. Das muss vermieden werden, und ich denke, das ist eine treibende Kraft für die artspezifische Kommunikation. Zu der Frage nach der Wahl der Weibchen: Es kann sein, dass ein Weibchen allein an einem Hostpatch auftaucht, aber es gibt Feldstudien, die zeigen, dass häufig verschiedene Weibchen von verschiedenen Standorten zu einem Wirtshabitat kommen und dann am selben Wirt vorkommen. Das heißt, die Weibchen haben im Prinzip die Möglichkeit zu wählen. Wir haben zeigen können, dass sie aufgrund der Konzentration des Pheromontiters wählen. Aber wenn es zur Balz kommt, wird eine intraspezifische Paarung zwischen Partnern selten von den Weibchen abgelehnt.

U. Hentschel Humeida: Brucker und Bordenstein konnten zeigen, dass bei *Nasonia* das Darmmikrobiom einen Einfluss auf die Vitalität von interspezifischen Hybriden hat.[3] Dem vorausgegangen war eine Publikation von Zilber-Rosenberg und Rosenberg, die zeigen konnten, dass das Paarungsverhalten von *Drosophila* auch durch das Darmmikrobiom beeinflusst ist.[4] Als Mikrobiologin würde mich interessieren, was Sie davon halten. Spielen Mikroorganismen auch in Ihren Untersuchungen eine Rolle?

J. Ruther: Mikroorganismen spielen insofern eine große Rolle, weil die *Nasonia*-Arten durch verschiedene Stämme des Endosymbionten *Wolbachia* reproduktiv getrennt sind. Das heißt, die männlichen Chromosomen gehen bei der Befruchtung verloren, wenn die *Wolbachia*-Stämme der Eltern nicht zusammenpassen, sodass die Weibchen nur haploide Nachkommen produzieren können. Man kann die Tiere durch Antibiotikabehandlung von Mikroorganismen befreien und dann kann man sie auch kreuzen und sie bekommen fertile Nachkommen, zumindest in der ersten Generation. Inwieweit das Darmmikrobiom bei *Nasonia* bei unseren Versuchen eine Rolle spielt, kann ich nicht beurteilen.

U. Hentschel Humeida: Es ist ein interessanter Gedanke, dass das Mikrobiom viel mehr in das Verhalten eindringen kann als wir bisher wissen.

T. Wichard: Sie haben herausgestellt, wie wichtig das Stereozentrum an der OH-Gruppe für das Kommunikationssystem ist. Was weiß man über weitere Modifikationen an der Fettsäurekette, die eventuell die chemische Interaktion zwischen den Partnern beeinflussen? Was passiert zum Beispiel, wenn man synthetisch das Pheromon aus einer C_{20}-Fettsäurekette herstellt oder sonst in irgendeiner Weise die Struktur verändert? Wie ist die Struktur-Wirkungs-Spezifität?

J. Ruther: Was wir sagen können, ist, dass das Zwischenprodukt der Epimerisierung inaktiv ist, wenn also das Keton an Position C5 ist. Wenn wir die (*S*)-Konfiguration an Kohlenstoffatom 4 haben, ist das Lacton ebenfalls inaktiv. Eine Kettenverlängerung haben wir nicht getestet. Wir haben das aber bei den Kohlenwasserstoffen in

3 Brucker, R. M. & S. R. Bordenstein. 2013. The Hologenomic basis of speciation: gut bacteria cause hybrid lethality in the genus *Nasonia*. – Science, 341 (6146): 667–669.

4 Sharon, G., D. Segal, J. M. Ringo, A. Hefetz, I. Zilber-Rosenberg & E. Rosenberg. 2010. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 107 (46): 20051–20056.

einem anderen System gemacht und folgendes überraschendes Ergebnis erhalten: Wenn wir eine Schlüsselkomponente aus einem Duftbouquet herausnehmen und durch eine Komponente ersetzen, die zwei Kohlenstoffatome länger ist, wird das ganze Duftbouquet inaktiv. Oftmals sind diese Pheromongemische also stereospezifisch in ihrer Zusammensetzung und werden oft auch stereospezifisch wahrgenommen.

T. Wichard: Ich ziele darauf ab, weil es zum Beispiel bei einem Quorum-Sensing-Signal bei Bakterien ja auch davon abhängen kann, wie die Seitenketten modifiziert sind, zum Beispiel an welcher Position die Hydroxy- oder die Ketogruppen sind und wie lang die Kohlenwasserstoffkette ist. Das kann eine ganz entscheidende Rolle spielen bezüglich der Frage, wie spezifisch die Interaktionen sind, die über Quorum-Sensing-Signale ablaufen.

J. Ruther: Wenn wir unsere Betrachtungen z. B. auf die Lepidoptera ausdehnen, so kann hier jeder Parameter eine wichtige Rolle spielen, etwa die cis/trans-Konfiguration und die Position einer Doppelbindung, die funktionelle Gruppe, die Kettenlänge – das sind artspezifische Strukturmerkmale, die für die große chemische Vielfalt verantwortlich sind.

A. Mithöfer: Kann es sein, dass das Head nodding des *Nasonia*-Männchens an der Antenne des Weibchens eine rein mechanische Stimulierung darstellt?

J. Ruther: Das ist eine Frage, die ich mir langsam auch stelle, weil wir so viele Experimente durchgeführt haben, um einen Wirkstoff zu finden, der die Paarungsbereitschaft auslöst. Wir haben es bisher nicht geschafft, einen bioaktiven Extrakt zu bekommen, der, wenn wir ihn auf die weibliche Antenne aufbringen, eine Reaktion auslöst. Es kann aber auch sein, dass wir insofern bis jetzt auf dem Holzweg waren, weil wir uns auf Substanzen konzentriert haben, die wir mittels GC-MS analysieren können. Es könnten natürlich auch Peptide oder irgendwelche Kohlenhydrate involviert sein, die wir mit unseren Extraktions- und Analysenmethoden gar nicht erfassen. Wir sollten vielleicht auch viel polarere Stoffe mit in Erwägung ziehen und ganz neu an das Problem herangehen. Es handelt sich auf jeden Fall nicht um ein volatiles Pheromon, wie in der ursprünglichen Veröffentlichung beschrieben, das haben wir mittlerweile widerlegt. Ich würde mittlerweile aber auch nicht mehr völlig ausschließen, dass es sich um einen rein mechanischen Stimulus handelt.