

**DAS WIRTSGEBUNDENE AGGREGATIONSPHEROMON
DER TROPISCHEN BUNTZECKE
AMBLYOMMA VARIEGATUM FABRICIUS
(ACARI: IXODIDAE)**

**Eine Studie zur Struktur, Wahrnehmung und Wirkungsweise
des Pheromons und seiner Komponenten**



**Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université
de Neuchâtel pour obtenir le grade de docteur ès. sc.**

par

**RETO SCHÖNI
1987**

*

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Das wirtsgebundene Aggregationspheromon der
tropischen Buntzecke *Amblyomma variegatum*
Fabricius (Acari: Ixodidae). Eine Studie
zur Struktur, Wahrnehmung und Wirkungsweise
des Pheromon und seiner Komponenten.

de Monsieur Reto Schöni

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury,

Messieurs A. Aeschlimann, P.A. Diehl,

E. Hess (Bâle), R. Gothe (Munich) et

R. Immler (St-Aubin, FR)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 11 septembre 1987

Le doyen:

François Sigrist

François Sigrist

DANK

Der praktische Teil dieser Arbeit wurde in den Jahren 1981-1984 am Zoologischen Institut der Universität Neuenburg und in Labors und Versuchsräumen der Ciba-Geigy AG in St. Aubin/FR, Les Barges/VD und Basel durchgeführt. Mein Dank gilt deshalb vor allem den Vertretern dieser beiden Stellen. In erster Linie möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Aeschlimann für die Ueberlassung des Themas und für die Möglichkeit, an seinem Institut zu arbeiten, danken. Herzlich danken möchte ich auch Herrn Dr. Ernst Hess, dessen Einführung in die Thematik und Arbeitsweise sowie Beratung und Unterstützung für mich ausserordentlich wertvoll war. Ebenso danke ich Herrn Dr. R. Immler, der es mir ermöglicht hat, als Praktikant und später auch als Doktorand der Ciba-Geigy AG in seinem Fachbereich Forschung Tiergesundheit/Parasitologie zu arbeiten. An dieser Stelle möchte ich auch der Firma meinen Dank aussprechen für alle finanzielle, materielle und technische Unterstützung, die sie mir im Zusammenhang mit dieser Arbeit gewährt hat. Im speziellen danke ich den Herren Dr. W. Häusermann und H. Bouvard für die Zurverfügungstellung von Zecken, Versuchstieren und Räumlichkeiten sowie für ihr engagiertes Interesse. Nicht vergessen möchte ich auch die Herren J.C. Tschopp und P. Bula, die mich regelmässig mit frischen Zecken versorgt haben.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich auch den Damen und Herren der Zentrale Funktion Forschung der Ciba-Geigy AG in Basel, die bei der Identifikation des Pheromons einen entscheidenden Beitrag geleistet haben, aussprechen. So danke ich Herrn Dr. U. Burckhardt für die grosszügige Unterstützung der analytischen Arbeiten sowie Herrn W. Blum und Frau K. Ramstein für deren Durchführung. Schliesslich möchte ich auch allen Dozenten, Kolleginnen und Kollegen an der Universität Neuenburg, die mir in irgend einer Weise behilflich waren und die mich mit Anregungen und Diskussionen unterstützt haben, danken.

meinen Eltern

und

Yvonne

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	Seite 4
II. MATERIAL UND METHODEN	20
1. Zecken	
1.1. Herkunft	20
1.2. Zucht und Haltung	20
2. Verhalten	
2.1. Versuche zum Festsetzverhalten der adulten Zecken auf einem natürlichen Wirt	20
2.2. Versuche zum Aggregations- und Paarungsverhalten auf einem natürlichen Wirt	21
2.3. Versuche zum Festsetz-, Aggregations- und Paarungs- verhalten <i>in vitro</i>	22
2.4. Biotests für den Nachweis des wirtsgebundenen Aggregationspheromons <u>in vitro</u>	23
2.4.1. Petrischalentest	23
2.4.2. Y-Olfactometer	24
2.4.3. Arena-Test	28
3. Chemie	
3.1. Extraktionen	29
3.2. Fraktionierung	30
3.3. Analyse	31
3.4. Testlösungen	32
4. Sinnesphysiologie	
4.1. Ablationsversuche	33
4.2. Elektrophysiologische Arbeiten	
4.2.1. Grundausrüstung	34
4.2.2. Elektronische Ausrüstung	34
4.2.3. Präparation der Elektroden	34
4.2.4. Präparation der Zecken	35
4.2.5. Stimulierung	36
4.2.6. Aufzeichnung	37
4.2.7. Auswertung	37

	Seite
III. RESULTATE	38
1. Verhalten	
1.1. Das Festsetzverhalten der adulten Zecken auf einem natürlichen Wirt	38
1.2. Das Aggregations und Paarungsverhalten auf einem natürlichen Wirt	39
1.3. Das Festsetz-, Aggregations- und Paarungsverhalten <u>in vitro</u>	43
1.4. Petrischalentests	44
1.5. Y-Olfactometer	60
1.6. Arena-Test	63
1.6.1. Vorversuche	63
1.6.2. Das Verhalten einzelner Zecken in der Arena	65
1.6.3. Der zeitliche Verlauf der Aggregation in der Arena	69
2. Analyse	
2.1. Basisversuche zu Wirkung der Rohextrakte in der Arena	69
2.2. Fraktionierung des aktiven Rohextraktes	70
2.3. Analyse der Extrakte über GC/MS	74
3. Versuche zur Wirkung des synthetischen Pheromons	
3.1. Wirkung der isolierten Pheromonkomponenten in der Arena	79
3.2. Die Wahrnehmungsschwelle des synthetischen Pheromons	79
3.3. Die konzentrationsabhängige Wirkung von ONP	82
3.4. Die Zusammensetzung des Pheromons	85
3.5. Die Varianz der Antwort auf ONP	85
3.6. Die Wirkung der Kombination von MS und PS	88
4. Versuche zur Spezifität des Pheromons	88
5. Versuche zur Reaktion von <i>A. variegatum</i> auf die Substitution von Methylsalicylat im Pheromongemisch	94
6. Sinnesphysiologie	
6.1. Verteilung, Morphologie und Ultrastruktur der untersuchten olfaktorischen Sensillen	99
6.2. Ablationsversuche	105
6.3. Elektrophysiologische Arbeiten	109
IV. DISKUSSION	123

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	134
LITERATURVERZEICHNIS	136
CURRICULUM VITAE	144
ANHANG	146

I. EINFUEHRUNG

Gemäss einer Definition von Karlson und Lüscher (1959) ist ein Pheromon eine chemische Substanz, die von einem Individuum einer Art abgegeben wird und anderen Individuen derselben Art Information vermittelt. Im Laufe der letzten zwanzig Jahre hat sich unser Wissen auf dem Gebiet der pheromonalen Kommunikation von Lebewesen in ihren innerartlichen Beziehungen enorm erweitert. Zunehmend sensiblere und präzisere Methoden der Analytik haben zur Aufklärung der Struktur vieler Pheromone geführt. Pheromone sind oft bereits in sehr geringen Mengen wirksam. Sie treten demgemäss in der Natur häufig nur in kleinen Konzentrationen auf und ihre Gewinnung und Isolierung aus Rohextrakten ist schwierig. Da diese meist nur stark verunreinigt gewonnen werden können, bedürfen sie zur Isolierung und Identifikation der wirksamen Komponenten der weiteren Auftrennung und Reinigung. Dabei hängt der Erfolg meist nicht zuletzt davon ab, mit welcher Prägnanz die biologische Aktivität einzelner isolierter, gereinigter Fraktionen in spezifischen Biotests ermittelt werden kann. Eine enge Zusammenarbeit zwischen Chemiker und Biologe ist deshalb nicht nur anzustreben, sondern unerlässlich. Erst die Synthese der Erkenntnisse über das pheromonal gesteuerte Verhalten einer Tierart, die chemische Struktur und Zusammensetzung ihrer Pheromone, deren Produktion und Abgabe und deren spezifische Wahrnehmung über Geschmacks- und Geruchssinnesorgane, ergibt ein vollständiges Bild der pheromonalen Kommunikation der untersuchten Art.

Schon früh sind Erkenntnisse auf diesem Gebiet, insbesondere im Bereich der Arthropoden, zur Entwicklung selektiver Kontroll- und Bekämpfungsmethoden von Schadinsekten und Parasiten genutzt worden (Kydonius & Beroga, 1982). Diese praktische Bedeutung stand auch damals im Vordergrund, als man sich Ende der sechziger Jahre mit dem pheromonal gesteuerten Verhalten von Zecken zu beschäftigen begann. Erste Arbeiten wurden von R.S. Berger und seinen Mitarbeitern J.C. Dukes und Y.S. Chow an der Auburn University in Alabama/USA durchgeführt. 1971 veröffentlichten sie eine Arbeit, in der sie erstmals den Nachweis für die Präsenz eines Sexualpheromons bei Weibchen der amerikanischen Schildzeckenarten Amblyomma americanum L., Amblyomma maculatum Koch und Dermacentor variabilis (Say) erbrachten (Berger et al., 1971). Im Fall von A. americanum konnte dieses Pheromon als 2,6-Dichlorophenol identifiziert werden (Berger, 1972). Mittlerweile ist an vielen weiteren

Beispielen belegt worden, dass dieses halogenierte Phenol ein bei meta-striaten Zeckenarten generell verbreitetes Sexualpheromon darstellt, mit dessen Hilfe teilweise gesogene, sexuell reife Weibchen die ihrerseits gesogenen, sexuell reifen Männchen auf dem Wirt in ihre unmittelbare Nähe locken und zur Kopulation veranlassen (Chow et al., 1975; Sonenshine et al., 1976; Kellum & Berger, 1977; Norval et al., 1980; Khalil et al., 1981, Berger, 1983; Rechav, 1983). Als Ausnahmen bekannt sind einige wenige Arten der Gattung Rhipicephalus, bei denen anstelle des 2,6-Dichlorphenol ein Gemisch aus Phenol und p-Cresol als Sexualpheromon identifiziert werden konnte (Wood et al., 1975), und einige afrikanische Arten der Gattung Amblyomma, bei denen sich auch das Verhalten der adulten Zecken bei der Fixierung auf einem Wirt und bei der Partnersuche markant von dem anderer meta-striater Zeckenarten unterscheidet. Im Fall der tropischen Buntzecke A. variegatum Fabricius konnte 2,6-Dichlorphenol zwar ebenfalls in Extrakten aus teilweise gesogenen Weibchen nachgewiesen werden (Wood et al., 1975), eine Rolle als Sexualpheromon konnte aber anhand der bisher durchgeführten Verhaltensexperimente weder bestätigt noch ausgeschlossen werden (Rechav et al., 1982). Bei dieser Art und bei den nahe verwandten Arten A. hebraeum Koch, A. gemma (Dönitz) und A. lepidum (Dönitz) sind es die auf dem Wirt festgesetzten, sexuell reifen Männchen, welche die noch ungesogenen Weibchen mit einem Pheromon anlocken und zum Festsetzen in ihrer unmittelbaren Nähe veranlassen (Norval, 1974; Rechav et al., 1977a+b; Rechav, 1978; Norval & Rechav, 1979). Da mit demselben Pheromon nicht nur Weibchen, sondern auch ungesogene Männchen und, wie im Fall von A. hebraeum nachgewiesen, ungesogene Nymphen (Rechav et al., 1976) angelockt werden, was unter natürlichen Umständen zu dichtgedrängten Klumpen der festgesetzten Zecken auf dem Wirt führt, spricht man in diesem Fall nicht von einem Sexualpheromon, sondern von einem wirtsgebundenen Aggregationspheromon. Wirtsgebundenheit in diesem Zusammenhang bedeutet, dass ein Pheromon dieses Typs erst nach einem Blutmahl auf einem geeigneten Wirt von mehreren Tagen abgegeben wird und dass die emittierende Zecke dabei auf dem Wirt fixiert bleibt. Erstmals beschrieben wurde dieser Pheromontyp für Männchen der amerikanischen Gulf Coast Zecke A. maculatum Koch (Gladney et al., 1974). Verhaltensbeobachtungen deuten darauf hin, dass bei dieser Art sowohl das Sexualpheromon der Weibchen (Berger et al., 1971), als auch das wirtsgebundene Aggregationspheromon der Männchen an der Partnerfindung auf dem Wirt beteiligt sind.

Als ich 1981 mit den Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation begann, ordnete man die bis dahin beschriebenen Zeckenpheromone den drei Kategorien Sexualpheromone (sex pheromones), wirtagebundene Aggregationspheromone (aggregation pheromones) und nicht wirtsgebundene Aggregationspheromone (assembly pheromones) zu. Beispiele für den zuletzt genannten Pheromontyp sind sowohl für argaside (Leahy et al., 1973; Leahy et al., 1975a+b; George, 1981; Gothe & Kraiss, 1982) als auch für ixodide Zeckenarten (Treverrow et al., 1977; Hájková et al., 1980; Petney & Bull, 1981; Leahy et al., 1981; Petney & Andrews, 1982; Hájková & Leahy, 1982; Leahy et al., 1983) beschrieben. In jüngster Zeit ist eine weitere, vierte Kategorie beschrieben worden. Es handelt sich dabei um ein genitales (Kontakt-) Sexualpheromon, welches für zwei Arten der Gattung Dermacentor nachgewiesen werden konnte (Sonenshine et al., 1982).

Mit Ausnahme des Sexualpheromons der metastriaten Zecken war damals wie heute für keines der beschriebenen Pheromone die chemische Struktur und Zusammensetzung bekannt (Sonenshine, 1984). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb versucht werden, die Struktur und Zusammensetzung des für die tropische Buntzecke A. variegatum beschriebenen Aggregationspheromons (Norval & Rechav, 1979) aufzuklären und dessen Bedeutung für die Wirtswahl und das Sexualverhalten der Art genauer zu beschreiben.

Die tropische Buntzecke A. variegatum Fabricius ist eine weit verbreitete Zeckenart des tropischen und subtropischen Afrikas südlich der Sahara. Man findet sie zudem in Südafrika, Madagaskar, den Kapverdischen Inseln und Yemen (Hoogstraal, 1956). Aus diesem ursprünglichen Verbreitungsgebiet wurde die Art auch in die Karibik verschleppt. Auf Puerto Rico, Antigua, Martinique, Guadeloupe, St. Kitts, Nevis, St. Martin, Vicques, Anguilla und St. Lucia leben heute etablierte Kolonien (Garris, 1984).

Der Zyklus dieser Zecke ist dreiwirtig, d.h. alle drei Entwicklungsstadien verlassen den Wirt nach dem abgeschlossenen Blutmahl wieder und die Reifungshäutungen werden unabhängig vom Wirt vollzogen. Die adulten Zecken parasitieren mit Vorliebe auf domestizierten Boviden und anderen Huftieren, sind aber in ihrer Wirtswahl wenig spezifisch. Die Nymphen parasitieren auf einer grossen Zahl mittlerer bis grosser Säugetiere, einschliesslich des Menschen, während die Larven vor allem Kleinsäuger und Vögel befallen (Hoogstraal, 1956; Hoogstraal & Aeschlimann, 1982).

Die Art ist sowohl von wirtschaftlicher als auch von veterinär- und humanmedizinischer Bedeutung. Durch ihre Grösse und Befallsdichte kann sie bedeutende Einbussen im Ertrag von Rinderzuchten herbeiführen. Sie ist, zusammen mit der nahe verwandten Art A. hebraeum Koch, primärer Ueberträger von Cowdria ruminantium, dem Erreger der Herzwasserkrankheit bei Rindern, Schafen und Ziegen (Uilenberg, 1981). Auch Rickettsia conori, der Erreger von Mittelmeertyphus beim Menschen, wird von ihr übertragen. Sie kann zudem bei der Uebertragung von Q-Fieber (Coxiella burneti) und von Pilzdermatosen beteiligt sein. Der grobe und schwer heilende Biss der Zecke hinterlässt oft entzündete und schwer heilende Wunden, die unter schlechten hygienischen Bedingungen und ohne Behandlung den Zutritt von Sekundärinfektionen und Myasen erleichtern. Insbesondere die Larven können auch für den Menschen lästig werden, bei dem sie Entzündungen und Hautreizungen hervorrufen können (Hoogstraal, 1956; Arthur, 1962, Walker & Parson, 1964; Garris, 1984).

Zur Ethologie von A. variegatum in Bezug auf die Wirtssuche und das Verhalten der adulten Zecken auf dem Wirt finden sich in der Literatur nur wenige, vereinzelte Angaben. Besser untersucht ist die nahe verwandte Art A. hebraeum. Eine sehr ausführliche und prägnante Beschreibung zum Verhalten der adulten Zecken auf einem Wirt unter Laborbedingungen ist in einer Arbeit von Norval (1974) zu finden. Seine Beobachtungen und Folgerungen bildeten eine wichtige Basis für meine eigenen Beobachtungen an A. variegatum. Im folgenden ist deshalb in einer Uebersetzung die diesbezügliche Passage aus seiner Arbeit, in der er die Resultate seiner Beobachtungen auf einem Rind, resp. Kaninchen beschreibt, in ihrer vollen Länge zitiert:

"Wurden Weibchen in Abwesenheit von Männchen auf einen Wirt gebracht, so setzten sich diese nicht fest. Im Gegensatz dazu setzten sich Männchen in Abwesenheit von Weibchen ohne Zögern fest. Wurden beide Geschlechter gleichzeitig auf einen Wirt gebracht, so setzten sich weitaus die meisten Männchen, aber nur wenige Weibchen fest. Keines der festgesetzten Weibchen wurde in Paarungshaltung, d.h. in der für die Kopulation notwendigen Stellung mit einem Männchen gefunden, und keines nahm ein vollständiges Blutmahl auf. Wurden Weibchen auf einen Wirt gebracht, auf dem Männchen bereits während

1-2 Tagen festgesetzt waren, so setzte sich wiederum keines fest. Die Weibchen setzten sich auch dann nicht fest, wenn sie Bauch gegen Bauch gegen die frisch festgesetzten Männchen gehalten wurden. Wurden sie aber gegen Männchen gehalten, die während 7 Tagen auf dem Wirt festgesetzt waren, setzten sie sich rasch und ohne Zögern fest. Wurden Weibchen 2-3cm entfernt von Männchen, die während 7 Tagen auf dem Wirt ein Blutmahl aufgenommen haben, auf einen Wirt gebracht, so konnten sie diese Männchen lokalisieren und setzten sich innert weniger Minuten fest. Die Dauer des Blutmahls, das die einzelnen Männchen benötigten, um sexuell reif zu werden, variierte individuell zwischen 4 und 6 Tagen.

Einmal auf dem Wirt wanderten die Männchen meist nicht weit von der Stelle weg, an der sie angesetzt wurden und setzten sich innert weniger Minuten fest. Die Weibchen aber waren sehr aktiv und setzten sich nicht fest, bevor sie auf ein sexuell reifes Männchen trafen. Dass sich Weibchen in einzelnen Versuchen dennoch unabhängig von reifen Männchen festgesetzt hatten, könnte ein Resultat der unnatürlichen Beschränkung auf dem Wirt gewesen sein.

Wenn ein Weibchen bis auf 2-5cm in die Nähe eines reifen Männchens kam, so verharrete es gewöhnlich in seinem Lauf und erhob das erste Beinpaar in suchenden Bewegungen. Das Männchen reagierte seinerseits, indem es seinen Körper in eine senkrechte Position zur Oberfläche des Wirtes brachte. Diese Reaktion war gefolgt von periodischen, aktiven Bewegungen der Beine, welche mit den Bewegungen des Weibchens korreliert zu sein schienen. Nach einer Phase des Verharrens von wenigen Sekunden bis zu 2 Minuten bewegte sich das Weibchen direkt auf das Männchen zu und auf die Berührung hin umarmte sich das Paar. Ueber komplizierte Bewegungen der Beine wurde eine Stellung Bauch gegen Bauch erreicht, wonach sich das Weibchen festsetzte und die Kopulation erfolgte.

Mit Ausnahme der Gattung *Ixodes* vollzieht sich bei allen Männchen der Familie der Ixodidae der Abschluss der Spermatogenese erst auf dem Wirt (Arthur, 1962). Bei *A. hebraeum* ist zudem der Abschluss der Spermatogenese von Veränderungen in Physiologie und Verhalten begleitet, d.h. von der Produktion eines Sexualpheromons und der Reaktion auf die Präsenz eines Weibchens. Obwohl nichts über den Ort der Produktion oder die chemische Natur dieses Pheromons bekannt ist, kann an dessen Existenz nicht gezweifelt werden, da dies klar aus dem Verhalten der Weibchen gegenüber sexuell

reifen Männchen hervorgeht und da die Existenz von Sexuelpheromonen bei ixodiden Zecken von anderen Arten her bekannt ist (Gladney 1971, Berger et al. 1971). Die Reaktion der sexuell reifen Männchen auf die Weibchen scheint mechanisch hervorgerufen zu werden, sei es durch eine direkte Berührung des Männchens oder durch Berührung und Bewegung der Haare des Wirts in der unmittelbaren Nähe des Männchens. Nach dieser mechanischen Stimulierung kann das Männchen bis zu einer halben Minute in der senkrecht abgespreizten Haltung verharren und kann auf weitere Reizung hin die Beine suchend bewegen. Die Männchen können so alle möglichen Dinge umarmen, die in ihre unmittelbare Nähe gebracht werden, z.8. eine Fingerspitze, kleine Holzstückchen, ungesogene Männchen derselben Art und sogar ungesogene Weibchen einer fremden Art (Hyalomma marginatum rufipes Koch). Es ist deshalb klar, dass das Männchen nicht zwischen Zecken und anderen Objekten oder zwischen verschiedenen Zeckenarten und den Geschlechtern unterscheiden kann. Dies gibt der Rolle des Sexualpheromons für die Partnerfindung und das Sexualverhalten eine ganz besondere Bedeutung und zeigt zugleich, dass die Partnerwahl einzig durch die Weibchen vollzogen wird."

Ausgehend von dieser Beschreibung habe ich in einem ersten Teil der Dissertation anhand eigener Versuche in vivo und in vitro abgeklärt, inwieweit das für A. hebraeum geschilderte Verhalten der adulten Zecken auch für die nahe verwandte Art A. variegatum zutrifft. Zudem habe ich die bisher im Zusammenhang mit dem wirtsgebundenen Aggregationspheromon verwendeten Möglichkeiten für dessen Nachweis geprüft, um daraus eine eigene Standardmethode abzuleiten, welche in der Folge in einem zweiten Teil der Arbeit für die Identifizierung und Charakterisierung dieses Pheromons verwendet werden konnte.

Bei der chemischen Analyse eines Pheromons muss in der Regel von einem Rohextrakt ausgegangen werden, dessen pheromonale Aktivität in einem Biotest nachgewiesen werden konnte. Ein solcher Rohextrakt kann auf verschiedene Weise gewonnen werden. Eine Möglichkeit besteht darin, grosse Mengen ganzer oder homogener Tiere mit einem, der Polarität des Pheromons entsprechenden Lösungsmittel in einer Säule auszuwaschen. Der Rohextrakt kann so auch direkt aus isolierten Drüsen und Organen, die das Pheromon synthetisieren, anreichern und/oder ausscheiden, gewonnen werden, sofern diese bekannt und auf bestimmte Körperregionen beschränkt sind. In den Fällen, in denen das Pheromon zusammen mit anderen Ausscheidungen der

Tiere wie Urin, Kot oder dermale Sekretionen abgegeben wird, können diese gesammelt, ausgewaschen und extrahiert werden. Handelt es sich um ein hoch volatiles Pheromon, so kann es auch aus der Gasphase absorbiert oder extrahiert werden.

Verschiedene dieser Möglichkeiten wurden im Zusammenhang mit Zeckenpheromonen erfolgreich eingesetzt. Berger et al. (1971) extrahierten das Sexualpheromon teilweise gesogener Weibchen von A. maculatum, A. americanum und D. variabilis aus Homogenaten dieser Zecken in Methylenchlorid. Diese Methode wurde von Berger (1972) weiter modifiziert und verfeinert. Er extrahierte das Pheromon von A. americanum in Benzol und reinigte den Rohextrakt über mehrere Schritte, um neutrale Lipide abzuspalten. Der so gereinigte Extrakt wurde wiederum in Benzol extrahiert.

Sonenshine et al. (1974) verwendeten für die Extraktion des Sexualpheromons teilweise gesogener Weibchen von D. variabilis und D. andersoni verschiedene Methoden. Eine Methode bestand darin, homogenisierte Zecken in Hexan zu extrahieren. Eine weitere Methode war die Auswaschung ganzer, intakter Zecken mit verschiedenen Lösungsmitteln (Hexan, Methylenchlorid, Aether) in einer Chromatographiesäule. Eine dritte Methode bestand darin, das Pheromon direkt aus der Gasphase über Poropak zu absorbieren und aus diesem mit Hexan oder Pentan auszuwaschen.

Gladney et al. (1974) extrahierten das wirtsgebundene Aggregationspheromon der sexuell aktiven Männchen von A. maculatum aus Homogenaten dieser Zecken in Aceton. Die Zecken wurden zuvor in Hexan ausgewaschen. Der Acetonextrakt wurde gefiltert, eingeengt und das Lösungsmittel durch Hexan ersetzt.

Wood et al. (1975) stellten fest, dass im Falle des Sexualpheromons teilweise gesogener Weibchen von Rhipicephalus appendiculatus und Rhipicephalus pulchellus das Auswaschen intakter, gefrorener Zecken in Aether einen hinreichend aktiven Pheromonextrakt ergab.

Kellum & Berger (1977) untersuchten die altersabhängige Produktion und Ausscheidung des Sexualpheromons der Weibchen von A. americanum und A. maculatum, 2,6-Dichlorphenol. Gefrorene und wiederaufgetaute, intakte Zecken wurden dabei in Benzol ausgewaschen.

Rechav et al. (1976) extrahierten das wirtsgebundene Aggregationspheromon der sexuell aktiven Männchen von A. hebraeum aus frisch gesogenen intakten Zecken in Hexan. Bei weiteren Versuchen verwendeten sie daneben auch andere Lösungsmittel wie Diethyl- und Petroläther (Rechav et al., 1977a). Der

Extrakt in Diethyläther erwies sich im Biotest als der aktivste. Für spätere Versuche gaben sie deshalb dem Diethyläther als Lösungsmittel für die Extraktion den Vorzug (Rechav, 1978; Rechav & Whitehead, 1978). Auf dieselbe Weise wurde auch das wirtsgebundene Aggregationspheromon von A. variegatum extrahiert (Norval & Rechav, 1979). Brill & Solomon (1979) verwendeten für die Extraktion des wirtsgebundenen Aggregationspheromon von A. hebraeum ein "cryogenic-trap"-Verfahren, wie es von Browne et al. (1974) vorgeschlagen wurde. Mit diesem Verfahren können grosse Mengen von Luft, in der das volatile Pheromon enthalten ist, abgekühlt, verflüssigt und so über einen längeren Zeitraum gesammelt werden. Für die eigentliche Extraktion wird die verflüssigte Luft anschliessend langsam wieder erwärmt und über Waschflaschen durch ein geeignetes Lösungsmittel geleitet. Im vorliegenden Fall wurde die Luft in Aether extrahiert.

Im Rahmen einiger der zitierten Arbeiten wurde der Rohextrakt weiter bearbeitet, d.h. gereinigt, fraktioniert und analysiert.

Berger et al. (1971) fraktionierten die Rohextrakte des Sexualpheromons über Kieselsäure-Chromatographiesäulen mit einem Hexan-Aethyläther-Gemisch mit steigendem Gradienten. Die dabei resultierende aktive Fraktion wurde mit Hilfe der Gaschromatographie weiter aufgetrennt, wobei das aus der Säule ausströmende Gas aufgespalten und teils über einen Detektor (Flammenionisation) und teils über sexuell aktive Männchen der betreffenden Zeckenarten, die auf einem Kaninchen fixiert waren, geleitet wurde. Eine positive Reaktion der Zecken, d.h. deren Erregung und das Ablösen vom Wirt, diente als Indikator für die aktive Fraktion. Mit dieser Methode gelang es ihnen, eine einzelne aktive Substanz aus dem Extrakt zu isolieren. Ueber den Vergleich des Infrarot- und Massenspektrums der isolierten Substanz mit denjenigen bekannter Isomere konnte das Pheromon als 2,6-Dichlorphenol identifiziert werden.

Chow et al. (1975) identifizierten mit einer nur geringfügig modifizierten Methode dieselbe Substanz als Sexualpheromon teilweise gesogener Weibchen von Rhipicephalus sanguineus.

Sonenshine et al. (1976) reinigten die gewonnenen Rohextrakte über 0.5M Natronlauge und extrahierten sie danach wieder in Hexan. Für die weitere Fraktionierung verwendeten sie einen Gas-Flüssigkeits-Chromatographen (Varian Aerograph GLC, model 274D) mit einem Flammenionisations-Detektor. Massenspektren wurden über eine Kombination eines Finnigan GLC 9500 und

eines Finnigan 3300 Massenspektrometers gewonnen. Die Analyse ergab auch im Fall von D. variabilis und D. andersoni 2,6-Dichlorphenol als Sexualpheromon der teilweise gesogenen Weibchen.

Auch Wood et al. (1975) verwendeten für die Reinigung ihrer Aetherextrakte Natronlauge (1N). Die Titration und Aetherextraktion der wässrigen Phase ergab einen aktiven Extrakt, welcher über eine Natriumcarbonat-Lösung weiter gereinigt wurde. Die Analyse über Gaschromatographie-Massenspektrometrie ergab im Fall von Rh. appendiculatus und Rh. pulchellus Phenol und p-Cresol als aktive Komponenten des Sexualpheromons der Weibchen. Mit derselben Methode wurden auch Extrakte teilweise gesogener Weibchen von Rhipicephalus simus, Rhipicephalus compositus, A. americanum, A. variegatum und Hyalomma truncatum gereinigt, fraktioniert und analysiert. Dies ergab für die beiden erstgenannten Arten wiederum p-Cresol und Phenol. Bei den anderen drei Arten wurde zusätzlich 2,6-Dichlorphenol gefunden. Bei Rh. compositus, A. americanum, A. variegatum und H. truncatum fanden sie zudem zum Teil deutliche Mengen von Salicylaldehyd.

Kellum & Berger (1977) fügten ihren Extrakten als internen Standard für die Analyse je 0.3 µg 2,4,6-Trichlorphenol bei. Die Extrakte wurden ungereinigt über Gaschromatographie mit einem Elektronendetektor analysiert und die Menge des gefundenen 2,6-Dichlorphenols anhand des internen Standards bestimmt.

Norval et al. (1980) analysierten den Diethylätherextrakt aus teilweise gesogenen Weibchen von Amblyomma tholloni ebenfalls ungereinigt über eine Kombination von Gaschromatographie und Elektronendetektor. Die Analyse ergab auch in diesem Fall 2,6-Dichlorphenol als einzige aktive Komponente des Sexualpheromons.

In einer Studie zur Möglichkeit einer Hemmung der Produktion von Sexualpheromon bei D. variabilis und D. andersoni durch Chinone verwendeten Sonenshine et al. (1982a) eine, etwas modifizierte Methode der Identifikation von 2,6-Dichlorphenol in Hexanextrakten ganzer Zecken. Die Zecken wurden in Hexan in Glasampullen eingeschlossen. Ueber wiederholte Exposition in einem Ultraschallbad und über das Abkühlen mit flüssigen Stickstoff und wieder Auftauen wurden die Körperstrukturen und Organe der aufgebrochen. Ueber Sep Pak-Filter (Florasit) wurde das Rohmaterial mehrmals mit Hexan ausgespült, um verbliebene unpolare Moleküle auszuwaschen. Anschliessend wurde das 2,6-Dichlorphenol mit einer Mischung (1:1) aus Petroläther und Diethyläther gelöst und mit Diethyläther vollständig aus

dem Sep Pak extrahiert. Die weitere Analyse und Quantifizierung erfolgte über einen Gaschromatographen mit Elektronendetektor und über einen Chromatopak Multiprozessor.

Der Vollständigkeit halber sei noch eine weitere Arbeit von Sonenshine et al. (1982b) erwähnt. Sie versuchten, die genitalen Sexualpheromone von D. variabilis und D. andersoni aus externen und internen Sexualorganen der Weibchen zu extrahieren. Die Verhaltensversuche mit Hexan- und Aceton-extrakten ergaben keine schlüssigen Resultate und eine Analyse der Pheromone steht bisher noch aus.

Aus der genannten Literatur ergaben sich für meine eigenen Arbeiten zur Extraktion und zur Analyse des wirtsgebundenen Aggregationspheromons der sexuell aktiven Männchen von A. variegatum und A. hebraeum die folgenden Anhaltspunkte.

Aus den Versuchen von Rechav et al. (1977a+b), Rechav (1978) und Norvai & Rechav (1979) durfte geschlossen werden, dass die Wirkung des Pheromons mit grosser Wahrscheinlichkeit auf mindestens zwei verschieden aktiven Komponenten beruht und dass alle essentiellen Komponenten durch Extraktion intakter, sexuell aktiver Männchen in Diethyläther, Petroläther oder Hexan gewonnen werden können. Dass es sich zumindest bei einer dieser Komponenten um eine volatile Substanz handelt, die von den Zecken olfaktorisch wahrgenommen wird und die der Anlockung auf Distanz dient, ging aus Verhaltensbeobachtungen auf dem Wirt und im Y-Olfactometer klar hervor. Bestätigt wurde diese Tatsache zudem durch die erfolgreiche Extraktion dieser Komponente aus der Gasphase durch Brill & Solomon (1979). Die gute Extrahierbarkeit in Aether und Hexan liess den Schluss zu, dass es sich bei allen Komponenten um unpolare bis schwach polare Substanzen handelt. Dass an der Wirkung des Pheromons auch nicht volatile, gustatorisch wahrnehmbare Komponenten beteiligt sind, konnte aufgrund der erwähnten Arbeiten nicht völlig ausgeschlossen werden, erschien aber wegen der lipophilen Löslichkeit wenig wahrscheinlich. In diese Richtung deutete auch die relativ kurze Wirkungs-dauer von nur wenigen Tagen bei Applikation der Extrakte auf einem Wirt (Rechav & Whitehead, 1978).

Da in keiner dieser Arbeiten Versuche beschrieben sind, den Rohextrakt zu reinigen oder zu analysieren, konnten keine weiteren Rückschlüsse auf die Chemie der beteiligten Komponenten gezogen werden.

Gewisse Parallelen in der Extrahierbarkeit und Wirkungsweise der volatilen

Lockkomponente dieses Pheromons mit derjenigen des Sexualpheromons 2,6-Dichlorphenol liessen die Vermutung zu, dass es sich bei dieser Komponente ebenfalls um ein einfaches substituiertes Phenol handeln könnte. Die Arbeit von Wood et al. (1975) hatte gezeigt, dass einfache Phenole und Phenolderivate bei metastriaten Zeckenarten generell verbreitet sind und von den Weibchen als Sexualpheromone eingesetzt werden. Für die Präsenz dieser oder ähnlicher Substanzen bei Männchen gibt die Arbeit jedoch keine Hinweise.

Für die Gewinnung der Rohextrakte habe ich die von Rechav et al. (1977a) beschriebene Extraktion in Diethyläther übernommen, da sich diese einfache Methode als sehr wirkungsvoll und völlig ausreichend erwiesen hatte. Für die Analyse wurden parallel zwei verschiedene Wege beschritten. Auf der einen Seite wurde versucht, in Zusammenarbeit mit Chemikern der Ciba-Geigy AG über den Vergleich aktiver Extrakte mit inaktiven, ansonsten aber identischen Kontrolleextrakten durch Kapillar-Gaschromatographie und Massenspektrometrie die Struktur von Substanzen zu ermitteln, die ausschliesslich in Extrakten von gesogenen, sexuell aktiven Männchen von A. variegatum und A. hebraeum gefunden werden können. Auf der anderen Seite wurde versucht, den aktiven Rohextrakt über einen hochauflösenden Flüssigkeitschromatographen zu fraktionieren, um über einen geeigneten Biotest eine oder mehrere aktive, gereinigte Fraktionen isolieren zu können. Mit Lösungen der gereinigten, identifizierten Substanzen sollte anschliessend deren pheromonale Aktivität im Biotest überprüft und mit derjenigen der Rohextrakte verglichen werden.

Der Problemkreis um die Produktion und Ausscheidung des Pheromons konnte ich im Rahmen der vorliegenden Studie nicht mehr bearbeiten. Dagegen konnte ich die Fragen zur Wahrnehmung anhand von Ablationsexperimenten und sinnesphysiologischen Untersuchungen weiter angehen und zum Teil auch beantworten. Detaillierte Arbeiten von Hess & Vlimant (1982, 1983a+b) zur Morphologie und Ultrastruktur der tarsalen Sinnesorgane von A. variegatum hatten für eine solche Untersuchung beste Voraussetzungen geschaffen. Der elektrophysiologische Teil dieser Untersuchung konnte zudem auf einer Anlage durchgeführt werden, welche bereits zuvor für sinnesphysiologische Untersuchungen an A. variegatum (Hess & Vlimant, 1980) und Ixodes ricinus (Thonney, 1980) erfolgreich eingesetzt worden war.

Bis heute liegen auf dem Gebiet der Sinnesphysiologie der Zecken nur wenige, präzisere Untersuchungen vor. Viele Erkenntnisse darüber, was Zecken wahr-

nehmen können, wurden indirekt aus Verhaltensversuchen gewonnen. Wichtig und wegweisend waren in diesem Zusammenhang die Arbeiten von Totze (1933) und Lees (1948) zur Sinnesphysiologie von I. ricinus. Sie analysierten die Reaktion der Zecken auf verschiedene elementare Stimuli der natürlichen Umwelt wie Licht, Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Gravitation, sowie auf gewisse olfaktorische Reize, die von einem potentiellen Wirt abgesondert werden, wie CO₂ oder Buttersäure. Die meisten nachfolgenden Arbeiten konzentrierten sich entweder auf Verbindungen, die wie die bereits genannten, bei der Anlockung oder Stimulierung der Zecken durch einen potentiellen Wirt eine Schlüsselrolle einnehmen oder dann auf solche, die auf die Zecken eine repellente Wirkung ausüben. Beides geschah vor allem im Hinblick auf eine praktische Anwendung hin. Vergleichenden Aspekten wurde wenig Beachtung geschenkt. Viele Berichte über anlockende resp. repellente Wirkung einer Substanz für Zecken haben nach wie vor eher anekdotischen Charakter und bei den meisten ist die Form und der Ort der Wahrnehmung unbekannt. Eine der bestuntersuchten Verbindungen in dieser Hinsicht ist das CO₂. Bei vielen hämophagen Arthropoden konnte die Rolle des CO₂ als einer der Schlüsselreize bei der Wirtsfindung nachgewiesen werden. Die heftige Reaktion der meisten Zeckenarten auf blosses Anhauchen hin liess vermuten, dass ein Ansteigen der CO₂-Konzentration auch von Zecken spezifisch wahrgenommen wird. Aus verschiedenen, im Feld und im Labor durchgeführten Untersuchungen ist bekannt, dass sowohl argaside als auch idodide Zeckenarten, auf die Stimulierung mit CO₂ mit einer stark erhöhten Wirtssuche-Aktivität antworten und sich dabei gegen eine CO₂-Quelle hin orientieren können (Garcia, 1962, 1965, 1969; Nevill, 1965; Miles, 1968; Wilson, 1972; Wilson et al., 1972, Sauer et al., 1974). In jüngster Zeit wird diese Erkenntnis auch in der praktischen Anwendung eingesetzt. So werden Fallen mit Trockeneis ausgerüstet, um die Zecken über den sich bildenden CO₂-Gradienten anzulocken und damit die Fangergebnisse zu verbessern (Eads et al., 1982; Gray, 1985).

Dass Buttersäure, wichtiger und volatiler Bestandteil der Ausdünstung von Säugetieren und Menschen auf I. ricinus eine verhaltensbeeinflussende Wirkung ausübt, hatte bereits Totze (1933) zeigen können. Daneben sind aber praktisch keine weiteren, von einem potentiellen Wirt abgesonderten Substanzen bekannt, für die eine anlockende Wirkung auf Distanz hätte nachgewiesen werden können. Einzige Ausnahme bildet vielleicht noch Ammoniak. El-Ziady (1958) konnte in Laborversuchen zeigen, dass Zecken

der Art Ornithodoros erraticus durch Ammoniaklösungen von 0.5-1.0% angelockt wurden. Versuche von Haggart & Davis (1979) mit adulten Männchen und Weibchen der ixodiden Zecke Rh. sanguineus hatten andererseits gezeigt, dass zwar ein hoher Prozentsatz von Zecken, welche über einem Luftstrom mit Ammoniak stimuliert werden, mit Erregung und Suchverhalten reagiert. Die Versuche geben aber keinen Hinweis auf eine anlockende Wirkung auf Distanz. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass zu Beginn der vorliegenden Studie im Jahr 1981 aufgrund von Verhaltensbeobachtungen für die folgenden chemischen Verbindungen eine attraktive Wirkung für Zecken nachgewiesen werden konnte:

- Kohlendioxyd (CO₂), nachgewiesen für viele argaside und ixodide Zeckenarten
- Ammoniak (NH₃), nachgewiesen für Ornithodoros erraticus
- Buttersäure, nachgewiesen für Ixodes ricinus
- 2,6-Dichlorphenol, nachgewiesen für gesogene Männchen vieler metastriater Zeckenarten
- Phenol/p-Cresol, nachgewiesen für gesogene Männchen einzelner Arten der Gattung Rhipicephalus

In einigen wenigen Fällen konnte der direkte Nachweis für eine spezifische, konzentrationsabhängige Wahrnehmung solcher Verbindungen über einzelne, definierte Sensillen oder Sensillengruppen mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden erbracht werden. Erste elektrophysiologische Untersuchungen an einzelnen Sinneshaaren von Zecken wurden von Elizarov (1963) an Ixodes persulcatus und Hyalomma asiaticum vorgenommen. Sein primäres Interesse galt damals der Wahrnehmung deterreter und repellenter Substanzen. Obwohl ihm mit verschiedenen Methoden und an verschiedenen tarsalen Sinneshaaren die Ableitung von Aktionspotentialen gelang, lässt sich aus seiner Arbeit wenig Konkretes über die Wahrnehmung definierter aktiver Substanzen erfahren. Für eine detailliertere Interpretation der gewonnenen Daten fehlte ihm seinerzeit noch die Grundlage einer genaueren Kenntnis über Feinstruktur und Funktionsweise der getesteten Sensillen.

Ein weiterer Ansatz wurde von Chow (1970) beschrieben. Im Rahmen seiner Dissertation zum Sexualpheromon der Gulf Coast Zecke A. maculatum unternahm er unter anderem den Versuch, an tarsalen olfaktorischen Sinneshaaren im Bereich des Haller'schen Organs extrazellulär Aktionspotentiale abzuleiten. Als Stimulus verwendete er dabei den Duft teilweise gesogener Weibchen, welcher das, aufgrund von Verhaltensbeobachtungen postulierte

volatile Sexualpheromon enthielt. Wie sich später herausstellen sollte, handelte es sich dabei um das 2,6-Dichlorphenol. Verschiedene methodische Mängel haben dazu geführt, dass aus diesen Versuchen keine gültigen Schlüsse gezogen werden konnten. Auch weitere Versuche, bei denen 2,6-Dichlorphenol (Chow, 1974) oder diverse, von potentiellen Wirten abgesonderte chemische Stoffe (Sinitzina, 1974; Waladde, 1978) als Stimuli verwendet wurden, brachten keine grundlegend neuen Erkenntnisse.

Erste genauere, vor allem auch aus technischer Sicht und von der Interpretation der Resultate her befriedigende Arbeiten wurden von Haggart & Davis (1979, 1980) veröffentlicht. Sie konnten nachweisen, dass adulte Männchen und Weibchen der Hundezecke Rh. sanguineus in einzelnen Sensillen auf den Tarsen des ersten Beinpaars Rezeptorzellen aufweisen, die sehr spezifisch auf eine Stimulierung mit Ammoniak antworteten. Hoch sensible Rezeptoren wurden in Sensillen der vorderen Grube des Haller'schen Organs gefunden. Weitere, weniger sensible Zellen wurden in der 4-er Gruppe, die sich proximal vom Haller'schen Organ befindet, lokalisiert. Versuche mit anderen wirtsspezifischen Stimuli sowie mit 2,6-Dichlorphenol hatten gezeigt, dass es sich um eine spezifische Antwort dieser Rezeptoren auf Ammoniak handeln musste. In einem weiteren Ansatz mit A. americanum konnten Haggart & Davis (1981) wiederum in einem Sensillum der vorderen Grube des Haller'schen Organs eine weitere Rezeptorzelle ermitteln, die eine hohe Spezifität für 2,6-Dichlorphenol aufwies. Diese Rezeptorzelle wurde sowohl bei ungesogenen Männchen und Weibchen als auch bei gesogenen Männchen dieser Art gefunden. Sie zeigte in allen untersuchten Fällen die Charakteristik einer langsam adaptierenden, afferenten Sinneszelle, welche auf aufsteigende Konzentrationsreihen geringster Dosen von 2,6-Dichlorphenol ($0.4 - 8.0 \times 10^{-9}$ mol/Min) mit einer ansteigenden Frequenz der Aktionspotentiale einer phasisch-tonischen Antwort reagierte.

Der jüngste und gleichzeitig für unsere eigenen Arbeiten wichtigste Ansatz stammt von Waladde (1982). Ihm gelangen befriedigende elektrophysiologische Ableitungen von zwei tarsalen olfaktorischen Sinneshaaren adulter Männchen und Weibchen der Arten Rh. appendiculatus und A. variegatum. Im Gegensatz zu der von Haggart & Davis angewandten Technik der Ableitung von Aktionspotentialen an der Basis der Sensillen verwendete Waladde eine spezielle Form der als "tip-recording" bekannt gewordenen Methode, welche bei Arthropoden insbesondere für die Ableitung von gustatorischen Sinneshaaren mit terminalen Porus die Methode der Wahl ist. Die von ihm als md3 und ap1

bezeichneten Sensillen sind homolog zu den beiden olfaktorischen Sensilla basiconica mit einwandigem, poredurchsetztem cuticulären Mantel (wp-sw/A) in Zone I und II auf den Tarsen des ersten Beinpaars, wie sie von Hess & Vlimant (1982) in ihrer Studie zum tarsalen Sinnessystem von A. variegatum detailliert beschrieben wurden. Um mit einer Ableitelektrode an der Spitze eines solchen Sensillums elektrischen Kontakt herstellen zu können, muss die Spitze mit Hilfe feiner Messer und Mikromanipulatoren gekappt werden. Diese Methode hat gegenüber der "tip-recording"-Methode den Vorteil, dass reproduzierbare Ableitungen an klar definierten Sensillen gewonnen werden können. Sie hat aber andererseits den Nachteil, dass die betroffenen Sensillen durch die Öffnung und Verletzung der Spitzen in ihrer Physiologie verändert werden könnten, was im Fall der "base-recording"-Technik zwar nicht ausgeschlossen werden kann, aber doch sehr unwahrscheinlich ist.

Als Stimuli verwendete Waladde 2,6-Dichlorphenol und weitere, aus Zecken isolierte Stoffe wie Phenol, p-Cresol und Salicylaldehyd. Sein primäres Interesse galt dabei der Frage, ob die festgestellten Unterschiede in der Reaktion verschiedener Zeckenarten auf 2,6-Dichlorphenol und andere Phenolderivate auf Unterschiede in der Spezifität und Sensibilität ihrer Rezeptoren beruht. Für Rh. appendiculatus war bis dahin bekannt, dass die teilweise gesogenen Weibchen keine feststellbaren Mengen von 2,6-Dichlorphenol produzieren, und dass die gesogenen, sexuell aktiven Männchen auf Phenol und p-Cresol, nicht aber auf 2,6-Dichlorphenol reagieren (Wood et al., 1975). Im Gegensatz zur Darstellung von Waladde konnten aus teilweise gesogenen Weibchen von A. variegatum deutliche Mengen von 2,6-Dichlorphenol extrahiert werden (Wood et al., 1975); Mengen, die durchaus mit denjenigen vergleichbar sind, die bei Arten gefunden wurden, bei denen eine Funktion dieser Verbindung als Pheromon schlüssig nachgewiesen werden konnte. Aber auch bei dieser und nahe verwandten Arten wurde bisher kein Hinweis auf eine Funktion als Pheromon gefunden.

Die Arbeit von Waladde brachte diesbezüglich einige neue, zum Teil auch überraschende Erkenntnisse. So konnte er feststellen, dass sowohl Männchen als auch Weibchen beider Arten in den getesteten Sensillen mindestens eine, auf geringste Mengen von 2,6-Dichlorphenol spezifisch ansprechende Sinneszellen aufweisen. Im Fall von Rh. appendiculatus reagierte dieselbe Zelle ebenso spezifisch auf Hexan-Extrakte verschiedener Stadien. Mit den anderen getesteten Substanzen konnte eine Antwort, wenn überhaupt, nur bei einer Stimulierung von unphysiologisch hohen Konzentrationen registriert werden.

Ueber Form und Ort der Wahrnehmung des wirtsgebundenen Aggregationspheromon von A. variegatum war zu Beginn der eigenen Arbeiten kaum etwas bekannt. Für die Art A. hebraeum hatte Rechav (1977) zeigen können, dass zumindest eine der Komponenten olfaktorisch wahrgenommen werden muss, und dass sich alle essentiell beteiligten Rezeptoren in Sinneshaaren auf den Tarsen befinden mussten. Er vermutete sie im Bereich des Haller'schen Organs, hatte aber dafür keine direkten Beweise.

Ausgehend von diesen Arbeiten und aufgrund neuer Erkenntnisse über die Zusammensetzung des wirtsgebundenen Aggregationspheromons sollte schliesslich in einem dritten Teil der Arbeit festgestellt werden, welche tarsalen Sensillen an der Wahrnehmung der isolierten Komponenten beteiligt sind. An einzelnen solchen Sensillen sollte anhand elektrophysiologischer Ableitungen überprüft werden, ob sich in diesen Sensillen Rezeptoren befinden, die auf physiologische Mengen von Pheromonkomponenten mit einer spezifischen Antwort reagieren.

II. MATERIAL UNO METHODEN

1. Zecken

1.1. Herkunft

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten adulten Männchen und Weibchen der tropischen Buntzecke Amblyomma variegatum Fabricius wurden uns von Herrn H. Bouvard, Ciba-Geigy AG, Les Barges, Vouvry/CH zur Verfügung gestellt. Sie entstammten alle einer Laborkolonie der dortigen Zeckenstation, die zum Zeitpunkt der Durchführung der Versuche seit 10-15 Generationen regelmässig im Labor gezüchtet wurde. Die Kolonie leitete sich von gesogenen Weibchen her, die am ORSTOM (Office de la recherche scientifique et technique d'outre-mer) bei Adiopodoumé/Elfenbeinküste auf frei weidenden Kühen in der Umgebung der Station eingesammelt wurden.

1.2. Zucht und Haltung

Die Nymphen wurden bei 22-23°C in Nylonmanschetten am Schwanz der Rinder angesetzt und bis zum Abschluss des Blutmahls nach 6-10 Tagen darin belassen. Die vollständig gesogenen und abgefallenen Nymphen wurden eingesammelt und für die Häutung in einem dunklen Zuchtraum bei 28°C und 80-90% rLF gehalten. Für die Versuche wurden jeweils adulte Zecken im Alter von 1-3 Monaten nach der Häutung verwendet. Sie wurden nach Geschlecht getrennt in beidseitig verschlossenen Glasröhren von 23mm Ø und 12,5cm Länge bis zum Zeitpunkt des Versuchs unter den genannten Bedingungen in konstanter Dunkelheit gehalten.

2. Verhalten

2.1. Versuche zum Festsetzverhalten der adulten Zecken auf einem natürlichen Wirt

Eine erste Möglichkeit zum Studium des Verhaltens der adulten Zecken bei ihrem Festsetzen auf einem Wirt wurde mir anlässlich eines Aufenthaltes in der Zeckenstation der Ciba-Geigy AG in Les Barges, Vouvry/CH gewährt. Als Wirt für die Beobachtungen diente ein in einem klimatisierten Raum eingestelltes Rind. Die Temperatur betrug $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$, was der Temperatur für die Zucht dieser Zecken auf dem Rind entspricht. Ungesogene Männchen und Weibchen, sowie gesogene, sexuell reife Männchen, die kurz zuvor von einem anderen Wirt abgenommen worden waren,

wurden einzeln an den Flanken des Rindes angesetzt. Das Verhalten von je 10 Zecken jeder Gruppe vom ersten Kontakt mit dem Wirt bis zum definitiven Festsetzen auf dem Wirt wurde daraufhin beobachtet und protokolliert. Fielen die Zecken ab oder wurden abgeschüttelt, wurden sie bis zu 5 mal frisch angesetzt.

2.2 Versuche zum Aggregations- und Paarungsverhalten auf einem natürlichen

Wirt

Um das Verhalten ungesogener Zecken gegenüber bereits festgesetzten, sexuell reifen Männchen zu beobachten, wurden sowohl gesogene, sexuell reife Männchen (5) als auch ungesogene Männchen (5) unabhängig voneinander auf derselben Seite des Rindes angesetzt. Nachdem sich diese festgesetzt hatten, wurden wiederum einzelne, ungesogene Männchen und Weibchen (je 5) in verschiedener Entfernung von den bereits festgesetzten Zecken angesetzt und deren Verhalten bis zum definitiven Festsetzen beobachtet und protokolliert. Die dabei entstandenen Paare zwischen sexuell reifen Männchen und ungesogenen Weibchen (5) wurden während drei Stunden nach dem Festsetzen der Weibchen weiter beobachtet, um eine eventuelle Kopulation feststellen und verfolgen zu können. Für weitere spezifische Beobachtungen zum Festsetz- und Paarungsverhalten und für dessen Dokumentation (Film) wurden später weitere, ähnliche Versuche auf dem Rücken eines narkotisierten Kaninchens durchgeführt. Auf einem kurz geschorenen Feld von 10 x 15cm wurden wiederum gesogene und ungesogene Männchen sowie ungesogene Weibchen wie oben beschrieben einzeln angesetzt.

Um abzuklären, inwieweit die für sexuell reife Männchen von A. hebraeum beschriebene Klammerreaktion (Norval, 1974), welche im Laufe der vorangegangenen Versuche auch bei sexuell reifen Männchen von A. variegatum beobachtet werden konnte, mit dem physiologischen Vorgang der sexuellen Reifung und der Abgabe des wirtsgebundenen Aggregationspheromons korreliert ist, wurden gleichzeitig 50 ungesogene Männchen in einer Nylonmanschette auf einem Rinderschwanz angesetzt. Das Rind war dazu in einem klimatisierten Raum bei $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ und 70% rLF $\pm 10\%$ eingestallt. Vier Stunden nach dem Ansetzen der Zecken wurden die nicht festgesetzten Männchen aus der Manschette entfernt. Nach jeweils 24 h wurde die Manschette geöffnet und die Reaktion der Männchen auf die Berührung durch ein ungesogenes Weibchen hin geprüft. Nachdem an zwei aufeinander-

folgenden Tagen 100% der Männchen auf diese Reizung mit einer deutlichen und vollständigen Klammerreaktion geantwortet hatten, wurde der Versuch am 8. Tag nach dem Festsetzen der Männchen abgebrochen. Die Zecken wurden am 10. Tag vom Rinderschwanz abgenommen und für Biotests und für die Gewinnung des wirtsgebundenen Aggregationspheromons weiter verwendet (siehe S. 29).

2.3. Versuche zum Festsetz-, Aggregations- und Paarungsverhalten in vitro

Im Rahmen einer Arbeit zur Abklärung von Möglichkeiten der Fütterung der adulten Zecken in vitro konnten auch Beobachtungen zum Festsetzverhalten von ungesogenen und gesogenen, sexuell reifen Männchen auf einer künstlichen Membran gemacht werden. Dabei wurden Silikonmembranen (RTV-M) verwendet, die nach der Beschreibung von Bauer & Wetzel (1975) im Labor hergestellt wurden. In einem der Versuche wurde das Festsetzverhalten von je 10 ungesogenen und 10 gesogenen, sexuell reifen Männchen miteinander verglichen. Die gesogenen Männchen waren während 7 Tagen auf einem Rinderschwanz fixiert gewesen und wurden unmittelbar vor dem Versuch vom Rind abgenommen. Die Versuchsanordnung bestand aus einer, über einem Thermostaten auf 37°C eingestellten Heizplatte, einer fein gerillten Aluminiumplatte (21 x 25cm) und einer Silikonmembran (15 x 15cm) von 4-5mm Dicke. Die Aluminiumplatte wurde auf die Heizplatte gelegt und erwärmt. Gefrorenes und wieder aufgetautes frisches defibriniertes Schafblut wurde auf der Aluminiumplatte verteilt und mit der Silikonmembran so abgedeckt, dass das Blut gleichmässig und ohne Luftblasen in den Rillen zwischen Platte und Membran eingeschlossen wurde. Auf die so präparierte Membran wurden im Abstand von 3cm zwei beidseitig offene Glasrohre mit einem Innendurchmesser von 4cm und einer Höhe von 7cm gestellt. In eines der Rohre wurden die ungesogenen, in das andere die gesogenen Männchen eingesetzt und beide Rohre mit einem Uhrglas verschlossen. Während der ersten 10 Minuten wurde das Verhalten der Zecken in den geschlossenen Rohren beobachtet und protokolliert. Danach wurden die beiden Glasrohre und alle nicht festgesetzten Zecken entfernt. Bei beiden Gruppen wurde die Reaktion der festgesetzten Männchen auf die Berührung durch ein ungesogenes Weibchen geprüft und anschliessend beide Gruppen unter einer umgekehrten Petrischale (Ø 15cm) gemeinsam eingeschlossen. 16 Minuten nach dem Ansetzen der Männchen wurden 10 ungesogene Weibchen eingesetzt und deren Verhalten gegenüber den festgesetzten Männchen beobachtet und protokolliert. Nach 40 Minuten wurde der Versuch abgebrochen.

2.4. Biotests für den Nachweis des wirtsgebundenen Aggregationspheromons in vitro

Erste Untersuchungen wurden mit zwei Standardmethoden durchgeführt, die für den Nachweis attraktiver oder aggregationsauslösender Stimuli allgemein verwendet werden. Es sind dies der Petrischalentest und der Test im Y-Olfactometer. Im Zusammenhang mit Zecken wurde der Petrischalentest erstmals von Leahy et al. (1973) für den Nachweis des nicht wirtsgebundenen Aggregationspheromons der Lederzecke Argas persicus verwendet. In der Folge wurde er sowohl bei argasiden als auch ixodiden Zeckenarten eingesetzt (Leahy et al., 1975; Graf, 1975; Rechav et al., 1977; Treverrow et al., 1977; Rechav, 1977; Norval & Rechav, 1979; George, 1981; Petney & Bull, 1981; Norval et al., 1980; Hájková et al., 1980; Leahy et al., 1981; Hájková & Leahy, 1982; Leahy et al., 1983). Der Test eignet sich vor allem im Hinblick auf nicht volatile Pheromone und deren Komponenten, die über Kontaktchemorezeptoren gustatorisch wahrgenommen werden und die über einen bestimmten Zeitraum statische, lokal begrenzte Aggregationen auslösen. Der Y-Olfactometer wurde erstmals von Rechav et al. (1977) für den Nachweis des wirtsgebundenen Aggregationspheromons der Buntzecke A. hebraeum eingesetzt. Zuvor hatten bereits Wood et al. (1975) mit verschiedenen ixodiden Zeckenarten Biotests zur Bedeutung von 2,6-Dichlorphenol und anderen Phenolen als Pheromone bei diesen Zecken in einem T-förmigen Olfactometer durchgeführt. Der Y-Olfactometer wurde von Norval & Rechav (1979) auch für den Nachweis des wirtsgebundenen Aggregationspheromons bei der tropischen Buntzecke A. variegatum eingesetzt. Dieser Biotest eignet sich vor allem im Hinblick auf volatile Pheromone oder deren Komponenten, die über eine gewisse Distanz hinweg olfaktorisch wahrgenommen werden und die eine orientierte Bewegung auf die Pheromonquelle hin bewirken. Aufbauend auf die Erfahrungen mit diesen beiden Testmethoden wurde im Verlauf der Arbeit eine weitere, eigene Testmethode erarbeitet, welche Anwendung und Vorteile der anderen beiden Methoden kombinieren sollte. Sie wird im weiteren als Arena-Test bezeichnet.

2.4.1. Petrischalentest

Für eine erste Serie von Tests wurde die von Rechav (1977b) beschriebene Versuchsanordnung gewählt. Plastikpetrischalen (\emptyset 15cm) wurden über unter-

legte Schablonen in 8 gleichmässig radiäre Sektoren unterteilt. In jeden der Sektoren wurde zu Beginn der Tests je ein rundes Filterpapier (Whatman Nr. 1, 1,5cm Ø) gelegt. Das Filterpapier im Sektor 1 enthielt jeweils den zu testenden Stimulus, die anderen wurden leer angeboten. Zur Applikation des wirtsgebundenen Aggregationspheromons wurden die Testfilterpapiere während 24 Stunden zusammen mit 10 frisch gesammelten, sexuell reifen Männchen, die während 7 Tagen auf einem Rind fixiert waren, in einem beidseitig verschlossenen Glasrohr in einen Inkubator (27°C/80% rLF ± 5%) belassen. Pro Ansatz wurden 10 Zecken eingesetzt. Jeder Ansatz wurde mindestens 3 mal wiederholt. Für jeden Ansatz wurden frische Zecken verwendet. Die Versuche wurden parallel mit 180 ungesogenen Männchen, 30 gesogenen und sexuell reifen Männchen und 30 ungesogenen Weibchen durchgeführt. Die Verteilung der Zecken in den Petrischalen wurde während 30 Minuten alle 5 Minuten festgehalten. Die Versuche wurden in einem klimatisierten Raum bei 27°C, 75% rLF ± 3% und konstantem Licht durchgeführt. Eine statistische Auswertung wurde anhand des χ^2 -Test vorgenommen.

Weitere Versuche wurden mit einer zweiten Variante des Petrischalentest durchgeführt. Die dabei verwendete Glaspetrischale hatte einen Durchmesser von 30 cm. Pro Ansatz wurden gleichzeitig 40-46 ungesogene Männchen eingesetzt. Der Stimulus im Testsektor bestand aus einem Filterpapier das

- während 24 Stunden zusammen mit 10 frisch abgenommenen, sexuell reifen Männchen, die während 8 Tagen auf einem Rind fixiert waren, in einem verschlossenen Glasrohr belassen wurde,
- während 96 Stunden mit 10 frisch abgenommenen, sexuell reifen Männchen belassen wurde,
- mit 5 Tropfen eines Extraktes von 20 sexuell reifen Männchen (10 Tage und mehr auf einem Rind) in Diethyläther behandelt wurde.

Die Versuchsbedingungen waren dieselben wie für die erste Variante. Die Verteilung der Zecken wurde während 30 Minuten alle 5 Minuten photographisch festgehalten und anschliessend anhand der Fotos ausgewertet. Die Ansätze a) und b) wurden je 2 mal wiederholt.

2.4.2. Y-Olfactometer

Diese weit verbreitete und einfache Testmethode wurde von Rechav et al. (1977) für die Untersuchung des wirtsgebundenen Aggregationspheromons der afrikanischen Suntzecke A. hebraeum übernommen und adaptiert. Nach seiner Beschreibung bestand die Testkammer aus einem Y-förmigen Glasrohr (Innendurchmesser: 12mm) mit einem langen Arm von 25cm Länge und zwei kurzen Armen von 18cm

Länge. Der Spreizwinkel zwischen den beiden Armen betrug 35° . Am unteren Ende des langen Arms befand sich ein Loch, durch das die Zecken zu Beginn des Tests in das Rohr eingesetzt wurden. Diese Öffnung wurde nach dem Einsetzen der Zecken mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen. Ein langsamer Luftstrom von $36\text{cm}^3/\text{Min.}$ wurde über eine am langen Arm des Systems angeschlossene Vakuumpumpe durch den Olfactometer gesogen. Pro Ansatz wurden je 30 ungesogene Männchen oder Weibchen eingesetzt. Die Verteilung der Zecken auf die beiden kurzen Arme wurde in 10 Minuten-Intervallen festgehalten und verglichen. Das Glasrohr wurde nach jedem Ansatz in Chromschwefelsäure gereinigt, mit destilliertem Wasser gespült und in einem Ofen bei 150°C getrocknet. Alle Versuche wurden in einem thermoregulierten Raum ($27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) und unter konstantem Licht durchgeführt.

Einer der beiden kurzen Arme enthielt jeweils den Teststimulus, der andere die entsprechende Kontrolle. Teststimuli waren entweder lebende Zecken oder diverse Extrakte. Ueber Quantität und Applikationsweise der Teststimuli finden sich weder bei Rechav et al. (1977 a+b) noch bei Norval & Rechav (1979) genauere Angaben. Es fehlt auch eine Angabe darüber, woraus die jeweils entsprechenden Kontrollen bestanden. Ebenso fehlt ein Hinweis auf die räumliche Orientierung des Olfactometers.

Für unsere eigenen Versuche wurde die hier beschriebene Versuchsanordnung übernommen und nachgebaut. Wo Angaben fehlten, wurden eigene, sinnvolle Lösungen gesucht. So wurde z.B. das Glasrohr in einen Inkubator ($27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) so montiert, dass die beiden kurzen Arme auf der gleichen Höhe lagen, das ganze System aber in einem Winkel von ca. 30° schräg zum Boden stand. Pro Ansatz wurden je 30 ungesogene Männchen und Weibchen eingesetzt. Jeder Ansatz wurde 6 mal wiederholt. Die angesaugte Luft wurde über ein Rohr mit Aktivkohle vor dem Eintritt in den Olfactometer gefiltert. Diese Versuchsanordnung ist in Fig. 1 dargestellt. Als Teststimuli dienten jeweils 5 frisch vom Rind abgenommene, sexuell reife Männchen, die vor dem Versuch während mindestens 8 Tagen auf einem Rind fixiert waren. Als entsprechende Kontrolle dienten jeweils 5 ungesogene Männchen. Für die Applikation der Teststimuli wurden zwei grundsätzlich verschiedene Methoden gewählt:

- a) Die Zecken wurden in Kammern eingeschlossen, die über Silikonschläuche ($20\text{cm}/\varnothing 4\text{mm}$) mit den kurzen Armen des Systems verbunden waren und durch die gefilterte Luft gesogen wurde (s. Variante A).

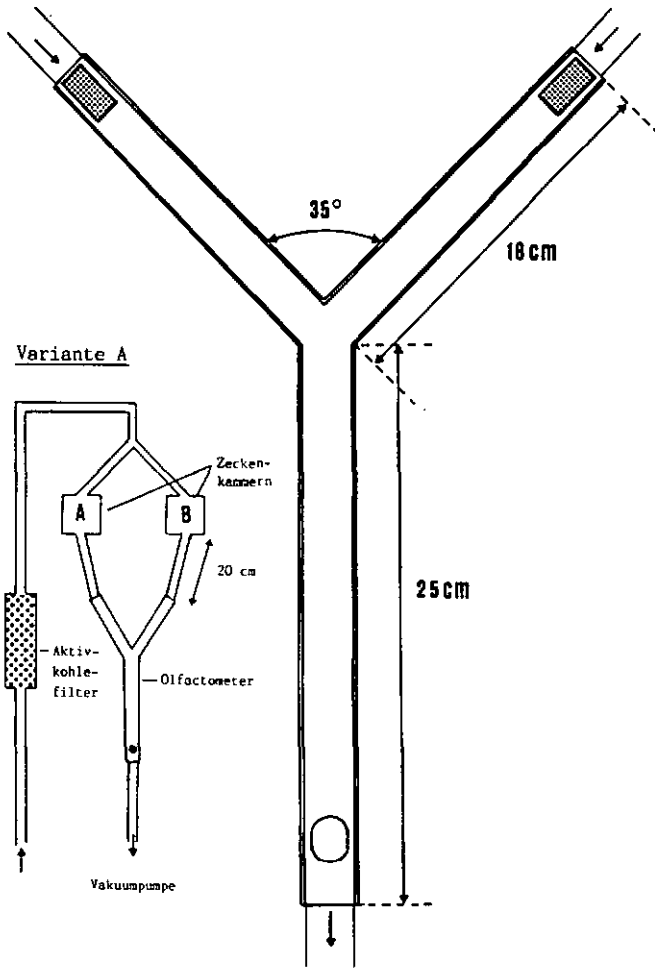


FIG. 1: Schematische Darstellung des Y-Olfactometers

b) Die Zecken wurden in Metallkapseln (2cm x Ø 1cm) mit einem Drahtgitter (Maschengrösse 1x1mm) auf beiden Seiten eingeschlossen und so in die kurzen Arme des Systems eingesetzt.

Die Verteilung der Zecken auf die beiden kurzen Arme des Systems wurde während 30 Minuten in 10 Minuten-Intervallen festgehalten und verglichen.

2.4.3. Arena-Test

Die Testkammer bestand aus einem Plexiglasaquarium mit den Massen 34 x 17 x 20cm (Fig.2). In jeden der vier Ecken der Grundfläche wurde ein doppelt gefalteter Rundfilter (Macherey-Nagel, no 713, Ø 8cm) eingelegt und mit Klebeband so an Grundfläche und Wänden befestigt, dass in jeder Ecke ein Sektor von 4cm Radius bedeckt und markiert wurde. In jeden dieser Sektoren wurde eine Metallkapsel (Balzers Union, Edelstahl, 2cm x Ø 1cm) mit einem feinen Drahtgitter (1x1mm) auf beiden Seiten eingesetzt. Eine der Kapseln enthielt jeweils den Teststimulus, die anderen drei die jeweils entsprechenden Kontrollstimuli. Der Teststimulus bestand entweder aus zwei, frisch von Rind abgenommenen, sexuell aktiven Männchen, die während 10 Tagen auf einem Rind fixiert waren, oder 10 µl eines Extraktes oder einer Lösung in Diethyläther auf einem Wattebausch im Innern der Kapsel. Als Kontrollstimuli dienten je zwei ungesogene Männchen oder je 10 µl des reinen Lösungsmittels. Es wurde dabei darauf geachtet, dass das Lösungsmittel vor dem Einsetzen der Kapseln in die Arena vollständig verdunstet war. In die Mitte der Arena wurden zu Beginn eines Ansatzes 40 ungesogene Männchen oder Weibchen eingesetzt. Die Arena wurde anschliessend mit einer Plexiglasplatte so abgedeckt, dass lediglich ein feiner Spalt zwischen der Platte und dem oberen Rand der Arena von 1-2mm offen gelassen wurde.

10 Minuten nach Beginn eines Ansatzes wurde die Verteilung der Zecken auf die vier Sektoren festgehalten und ausgezählt. Zecken, welche nach 10 Minuten nicht in Kontakt mit einem der Filterpapiere waren, wurden als "nicht entschieden" festgehalten. Jeder Ansatz wurde mindestens 4 mal wiederholt. Dabei wurde das Filterpapier im Testsektor nach jedem Ansatz erneuert. Die Positionen der Testkapsel und der Kontrollkapseln wurden für jeden neuen Ansatz im Uhrzeigersinn vertauscht, um einen Positionseffekt zu vermeiden. Die Auszählung der Zecken in den Sektoren erfolgte im Uhr-

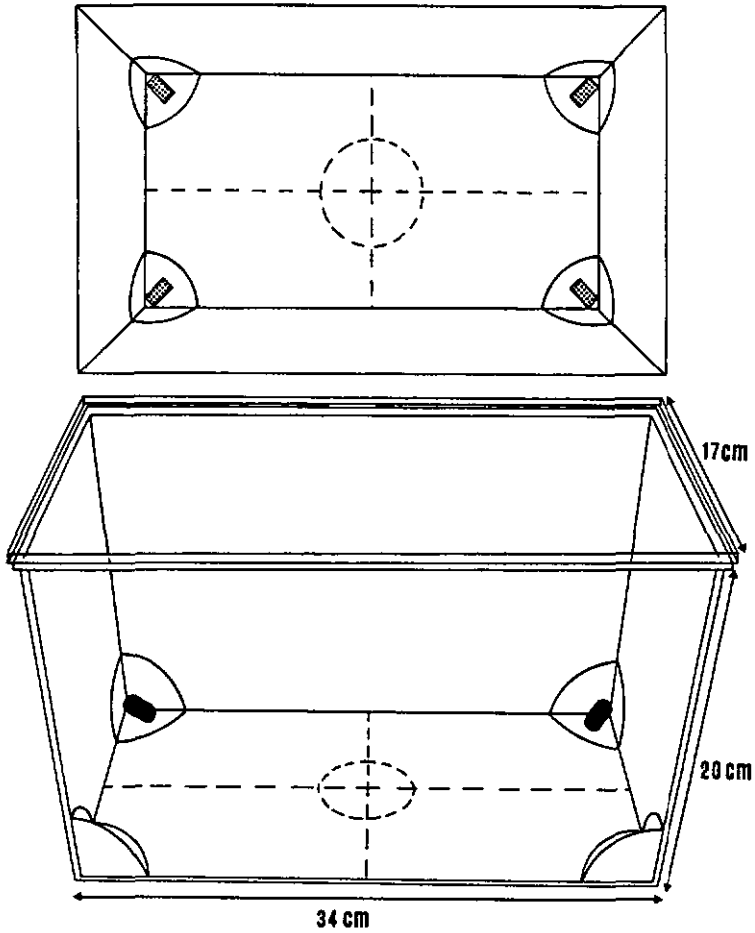


FIG. 2: Schematische Darstellung der Arena

zeigersinn vom jeweiligen Testsektor ausgehend. Die Versuche wurden in einem dunklen, geschlossenen Inkubator bei 37°C und 20-30% rLF durchgeführt. Beobachtungen zum Verhalten der Zecken in der Arena konnten bei geöffnetem Inkubator durch die innere, geschlossene Glastüre des Inkubators gemacht werden.

In allen Fällen, in denen der Inkubator für die Versuche nicht zur Verfügung stand, wurden diese in einer geschlossenen, über ein Wasserbad auf 37°C erwärmten Styroporbox durchgeführt. In einigen Vorversuchen mit dem Arena-Test wurden lediglich zwei der vier Sektoren mit Test- und Kontrollkapsel belegt. Die Verteilung der Zecken auf die beiden Sektoren wurde dabei in verschiedenen Zeitintervallen nach Beginn des Ansatzes (5, 10, 15, 20, 25, 30 Minuten) kontrolliert und festgehalten.

3. Chemie

3.1. Extraktionen

Für die Gewinnung der Rohextrakte wurde die von Rechav et al. (1977a) verwendete Methode der Auswaschung ganzer Zecken in Diethyläther übernommen. Alle Extraktionen wurden mit Diethyläther (p.a. Merck, stabilisiert mit 7 ppm des Antioxidantiums 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol) durchgeführt. In einem ersten Ansatz wurde ein aktiver Pheromonextrakt aus 100 gesogenen, sexuell aktiven Männchen gewonnen. Die Männchen wurden während mindestens 10 Tagen in einer Nylonmanschette bei $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ (vergl. Zucht) auf einem Rinderschwanz angesetzt und erst unmittelbar vor der Extraktion vom Rind abgenommen. Vor dem Abnehmen der Zecken wurde überprüft, ob alle Männchen die sexuelle Reifung abgeschlossen hatten. Sie wurde als abgeschlossen gewertet, wenn das Männchen auf die Reizung durch ein ungesogenes Weibchen hin eine vollständige Klammerreaktion zeigte.

Die Attraktivität der Männchen und damit die Präsenz des Pheromons wurde ebenfalls vor der Extraktion anhand einer Stichprobe von 2 Männchen im Arena-Test mit 40 ungesogenen Weibchen überprüft.

Die Zecken wurden in eine Chromatographiesäule (30cm x 2,5cm Ø) gebracht und in 100ml Aether ($25^{\circ}\text{-}30^{\circ}\text{C}$) extrahiert. Der Extrakt wurde mit einer Rate von 1-1,5ml/Min. in einem gekühlten Glaskolben (Eisbad/ 0°C) aufgefangen, mit Na_2SO_4 getrocknet und grob filtriert (Rundfilter Macherey & Nagel Nr. 713).

Die pheromonale Aktivität dieses unkonzentrierten Rohextraktes wurde anhand von 4 auf dem Wattebausch in der Testkapsel applizierten Tropfen im Arena-Test mit 40 ungesogenen Weibchen (1 Monat nach der Häutung) überprüft. Der Test ergab eine sehr starke Attraktivität. Nach 15 Minuten befanden sich 35 Weibchen im Testsektor. Dieser Rohextrakt wurde in einem Büchi Rotavapor bei 0°C und 200mm Hg Unterdruck auf ein Volumen von 10ml eingengt, in ein vorgekühltes Glaskölbchen (20ml) mit Teflonverschluss gefüllt und bei -20°C und vor Licht geschützt aufbewahrt. Dieser konzentrierte Rohextrakt wird im folgenden als E1 bezeichnet.

In einem zweiten Ansatz wurde mit der gleichen Methode parallel eine Extraktion mit je 100 gesogenen, sexuell aktiven Männchen und 100 ungesogenen Männchen desselben Alters durchgeführt. Wiederum wurden pro Extraktion je 100ml unkonzentrierter Rohextrakt gewonnen. Die Hälfte (50ml) dieser Extrakte wurde in gekühlte Glaskolben (0°C) abgefüllt und direkt für die Analyse (s.S. 31) eingesetzt. Die restlichen 50ml wurden mit Na₂SO₄ getrocknet, grob filtriert und im Rotavapor auf ein Endvolumen von je 5ml eingengt und wie bereits beschrieben aufbewahrt. Der konzentrierte Extrakt der sexuell reifen Männchen wird im folgenden als E2a, derjenige der ungesogenen Männchen als E2b bezeichnet. Ein dritter Extrakt wurde aus Rinderhaaren gewonnen, die vor dem Ansetzen der Männchen in der Nylonmanschette vom Rinderschwanz abgeschoren worden waren. Dabei wurde in der gleichen Weise verfahren wie bei den anderen Extraktionen. Er wird im folgenden als E2c bezeichnet.

In einem dritten Ansatz wurde eine parallele Extraktion mit je 100 gesogenen, sexuell aktiven Männchen von A. variegatum (E3a) und 100 gesogenen, sexuell, aktiven Männchen von A. hebraeum (E3b) durchgeführt. Für das Abnehmen der Zecken wurden die Rinder mit 1,5ml Rompun intramuskulär anästhesiert. Im weiteren wurde gleich verfahren wie bei den Extraktionen 2a und 2b. Je 50ml wurden für die Analyse separiert, die anderen 50ml getrocknet, eingengt und bei -20°C und vor Licht geschützt aufbewahrt.

3.2. Fraktionierung

Versuche zur Fraktionierung des ersten aktiven Rohextraktes (E1) wurden auf einem hochauflösenden Flüssigkeitschromatographen (HPLC, Perkin-Elmer Series 3) durchgeführt. Das Absorptionsspektrum wurde über einen Spektrophotometer (Perkin-Elmer LC 55) bei einer Wellenlänge von 252nm gemessen

und über einen Recorder (Perkin-Elmer 56) aufgezeichnet. Die Sensibilität betrug 0,2.

1ml des aktiven Aetherextraktes wurde bei 22°C vollständig eingeengt und in 1ml 65%igem Methanol in H₂O aufgenommen. Dabei entstand ein unlöslicher Rückstand. Die Methanollösung (1ml) wurde bei einem Initialdruck von 15,1 MPa in die Säule eingespritzt und über einen stetigen Gradienten von 65%-100% Methanol in H₂O (bei pH 7,5 gepuffert) in insgesamt 40 Fraktionen von je 1ml aufgetrennt. Der Rückstand wurde in 1ml Diethyläther aufgenommen und vollständig gelöst. 20 µl dieser Lösung wurden im Biotest auf pheromonale Aktivität überprüft.

Einzelne Fraktionen sowie verschiedene Rekombinationen dieser Fraktionen wurden in der Arena mit 40 ungesogenen Weibchen auf pheromonale Aktivität überprüft. Für die Applikation im Biotest wurde die Methanollösung jeweils mit einer equivalenten Menge Hexan überschichtet und ausgeschüttelt. Das Hexan wurde abdekantiert und bei 60°C unter Stickstoffbelüftung auf ein Endvolumen von 10 µl eingeengt. Dieser Hexanextrakt wurde vor Testbeginn auf den Wattebausch in der Testkapsel pipettiert. In den drei Kontrollkapseln wurden auf dieselbe Weise je 10 µl reines Hexan appliziert. Nachdem das Lösungsmittel vollständig abgedampft war, wurden die Kapseln in die Testsektoren der Arena eingesetzt und der Test mit 40 ungesogenen Weibchen wie auf Seite 28 beschrieben durchgeführt.

3.3. Analyse

Die unkonzentrierten Aetherextrakte E2a (gesogene, sexuell aktive Männchen), E2b (ungesogene Männchen) und E2c (Rinderhaar) sowie der Hexanextrakt der aktiven, aus der Fraktionierung des Aetherextraktes E1 (gesogene, sexuell aktive Männchen) über HPLC gewonnenen Fraktionen (6-8) wurde von Chemikern der Abteilung Spektroskopie, Zentrale Forschung Ciba-Geigy AG, Basel mittels Kapillar-Gaschromatographie (CGC) und Massenspektrometrie (MS) analysiert und verglichen. Das dabei verwendete CGC-MS-System entsprach der Anordnung, wie sie von Blum & Richter (1977) beschrieben wurde. Es bestand aus einem Carlo-Erba 4160 Gaschromatographen (1-Säule-Einspritzung) gekoppelt mit einem Finnegan 4000 Quadrupol Massenspektrometer. Die gaschromatographische Auftrennung erfolgte mit einer mit SE-54 beschichteten Glaskapillare (20m x 0.3mm). Der GC-Ofen wurde mit einer Steigung von 3%/Min. von 40° auf 300° erhitzt.

Als Trägergas wurde Wasserstoff (H_2) verwendet. Die Bedingungen für die Ionenquelle waren 400 μA EC (emission current) und 70 eV IE (ionizing energy). Die Temperatur der Ionenquelle betrug 200°C.

Die chemische Struktur einzelner GC-Fractionen wurde anhand der EI-Messenspektren und der GC-Chromatogramme entsprechender Referenzsubstanzen identifiziert. Die Übereinstimmung der identifizierten Komponenten des Pheromons wurden über einen internen Standard bestimmt. Als interner Standard wurde eine bekannte Menge Methylsalicylat (2-Hydroxy-Benzoesäuremethylester) eingesetzt. Schwach saure Komponenten wurden vor der Fraktionierung im CGC mit Diazomethan methyliert. Die Quantitäten der einzelnen Komponenten wurden anhand der Peakflächen im FID-Chromatogramm ermittelt.

3.4. Testlösungen

Von den drei dominierenden Komponenten des aktiven Pheromonextraktes wurden Lösungen in Diethyläther (DEE) hergestellt. Die dabei verwendeten Konzentrationen reflektierten die Mengenverhältnisse im aktiven Pheromonextrakt, wie sie anhand der Peakflächen im Gaschromatogramm errechnet wurden. Die Konzentrationen wurden zudem so gewählt, dass jeweils 10 μl der Lösung 1 Zecken-equivalent der betreffenden Substanz enthält. Für die Herstellung der Lösungen wurden im Handel erhältliche gereinigte Substanzen (p.a) verwendet. Es wurden die folgenden Stammlösungen hergestellt:

- 0.2 mg/ml O-Nitrophenol (ONP)
- 0.1 mg/ml Methylsalicylat (MS)
- 0.8 mg/ml Pelargonsäure (PS)

Ein "synthetisches" Pheromongemisch wurde hergestellt, indem diese drei Komponenten in den gleichen Gewichtsanteilen in Diethyläther gelöst wurden. Der Zusatz "synthetisch" bedeutet in diesem Zusammenhang nicht, dass an der Herstellung des Pheromongemischs ein Syntheseprozess beteiligt war. Es weist vielmehr auf die Tatsache hin, dass die einzelnen Bestandteile nicht aus einer natürlichen Pheromonquelle extrahiert wurden, sondern gereinigte, käufliche Substanzen anderen Ursprungs waren.

Für weitere Versuche zur Spezifität des Pheromons wurde von einigen wenigen verwandten Substanzen des Methylsalicylats die folgenden Lösungen in Diethyläther hergestellt:

- 0.1 mg/ml Benzoesäure
- 0.1 mg/ml Phenyllessigsäure
- 0.1 mg/ml Salicylsäure

Ausgehend von diesen Stammlösungen wurden für einzelne Versuche auch Verdünnungsreihen hergestellt. Wo weitere, andere Konzentrationen oder Mischungsverhältnisse verwendet wurden, ist dies jeweils bei den einzelnen Versuchen angegeben.

4. Sinnesphysiologie

4.1. Ablationsversuche

Vorgängig zu den eigentlichen sinnesphysiologischen Arbeiten wurde über Ablationsexperimente versucht, die für die Wahrnehmung des Aggregationspheromons verantwortlichen Sensillen zu eruieren. Für alle Ansätze wurden ungesogene Weibchen 2-4 Monate nach der Häutung verwendet. Pro Ansatz wurden je 40 Zecken eingesetzt. Ihre Reaktion auf das Pheromon und seine Komponenten wurde in der Arena getestet. Vor der Ablation wurde jeweils in einem Kontrollversuch die positive Reaktion der Zecken auf einen Pheromon-Rohextrakt oder auf das synthetische Pheromon geprüft. Für eine erste Versuchsserie wurden Zecken verwendet, die bis zu diesem Kontrollexperiment noch nie mit dem Pheromon in Kontakt gekommen waren. Alle übrigen Ansätze wurden mit Zecken durchgeführt, die zuvor bereits mehrfach mit dem natürlichen und synthetischen Pheromon in Kontakt gekommen waren und die deshalb bereits auf die Stimulierung mit einem Gemisch von Methylsalicylat und Pelargonsäure mit einer deutlichen Aggregation im Testsektor der Arena reagierten. In einem der Ansätze wurde allen 40 Zecken die Tarsalglieder auf der Höhe der Gelenke mit einer Rasierklinge abgeschnitten. In allen übrigen Ansätzen wurde versucht, einzelne definierte Sensillen oder Sensillengruppen zu eliminieren, indem die Sensillen mit der Spitze einer feinen Injektionsnadel unter einer Binocularlupe an ihrer Basis gekappt wurden. Nach der Ablation wurde mit dem Beginn der Versuchsserien jeweils

gewartet, bis sich an den verletzten Stellen ein Wundverschluss gebildet hatte und die Zecken ihre normale Aktivität wieder aufgenommen hatten.

4.2. Elektrophysiologische Arbeiten

4.2.1. Grundausrüstung

Die elektrophysiologischen Arbeiten wurden in einem speziell angefertigten Faraday-Käfig durchgeführt. Der Käfig war auf eine schwere Metallplatte montiert, die ihrerseits auf einem Metallrahmen ruhte. Die ganze Anordnung war über Gummiunterlagen und Keile so abgefedert und fixiert, dass auch stärkere Erschütterungen abgefangen und absorbiert werden konnten und so die Präparation auch während den Stimulierungen völlig ruhig gehalten werden konnte. Mit Hilfe eines Ventilators, welcher über ein Rohr mit dem Käfig verbunden war, wurde die Luft über der Präparation laufend aus dem Versuchsraum abgezogen und auf diese Weise durch neue unverbrauchte Luft ersetzt.

4.2.2. Elektronische Ausrüstung

Als Ableitelektrode und indifferente Elektrode wurden selbst hergestellte Wolframelektroden (s. Präparation) verwendet. Ueber kurze Kabel wurden beide Elektroden mit einem Impedanzwandler und Vorverstärker verbunden. Das Gerät war ein Eigenbau der Universität Regensburg. Es hatte einen Eingangswiderstand von $1\text{ G}\Omega$ und wies eine fest eingestellte 20fache Verstärkung auf. Das Ausgangssignal wurde über abgeschirmte Kabel auf einen Endverstärker und Filter (Bandpass: 100–1000 Hz) geleitet. Die so gefilterte und verstärkte Ableitung wurde einerseits auf einen Oszilloskop (Tectronix Dual Beam Oscilloscope 5112) wiedergegeben. Gleichzeitig wurde das Signal auf einen Lautsprecher geleitet, um während der Präparation das Auffangen und Sichtbarwerden von Aktionspotentialen hörbar zu machen, so dass die Ableitelektrode nach Gehör optimal plaziert werden konnte. Die Ableitungen der Aktionspotentiale stimulierter Sinneszellen wurden auf einem Kassettenbandgerät von Bell & Howell (CR 3000:7 1/2) aufgezeichnet.

4.2.3. Präparation der Elektroden

Die für unsere Arbeiten verwendeten Elektroden wurden aus Wolframdraht

(\emptyset 0,1mm) hergestellt. Dazu wurde ein ca. 50cm langes Stück Draht über einer Gasflamme gestreckt und anschliessend Teilstücke von ca. 2,0 - 2,5cm Länge unter Wechselspannung in einem Cyankalibad elektrolytisch zugespitzt. Die Form der Spitze konnte über Dauer und Tiefe des Eintauchens ins Elektrolytbad und über die angesetzte Spannung kontrolliert und den jeweiligen Bedürfnissen angepasst werden. Die Form der Spitze der Ableitelektrode musste in der Regel zwei Grundanforderungen genügen. Einerseits musste die Spitze sehr fein und scharf sein ($< 1 \mu\text{m}$), damit beim Einstich in die Cuticula sowohl die cuticulären als auch die zellulären Strukturen des Sensillum soweit möglich nicht verletzt wurden. Andererseits musste die Spitze gleichzeitig genügend Festigkeit aufweisen, um beim Versuch, in die sehr zähe Cuticula des Zeckentarsus einzudringen, nicht verbogen zu werden. Die feinste Deformierung der Spitze hatte jeweils zur Folge, dass ein verletzungsfreies Eindringen in den flüssigkeitsgefüllten Raum unter dem Sockel des Sensillum verunmöglicht wurde. Als optimal erwies sich eine kurze, nicht allzu steil zulaufende, scharfe Spitze. Für die indifferenten Elektroden wurden etwas längere Drahtstücke (ca. 3-4cm) verwendet. Bei diesen Elektroden wurde eine völlig ausreichende Spitze erreicht, indem der ganze eingetauchte Teil des Drahts bis zur Oberfläche vollständig aufgelöst wurde. Die Konusbildung der Oberflächenspannung um den Draht herum sorgte dabei ohne weiteres Zutun für eine sehr kräftige, scharfe Spitze.

4.2.4. Präparation der Zecken

Die Zecken wurden auf einem speziell angefertigten Halter aus Plexiglas festgespannt. Auf die Oberseite des vorderen, stabförmigen und einseitig abgeflachten Teils wurde mit Wachs ein kleines rechteckiges Stück Balsaholz angeklebt. Auf dieses Balsaholzstück wurde die Zecke mit Parafilm so festgespannt, dass der ganze Körper bedeckt wurde und lediglich das erste Beinpaar freilag. Mit einer feinen Pinzette wurden anschliessend die motorischen Nerven des ersten Beinpaars auf der Höhe der Coxa abgeklemmt und inaktiviert. So konnten einerseits die Beine für die weitere Präparation ruhiggestellt werden. Andererseits wurden so auch störende Muskelpotentiale unterdrückt. Die Beine wurden anschliessend mit je 2-3 sehr feinen Hagraffen, die ebenfalls speziell für diesen Zweck aus Wolframdraht hergestellt wurden, parallel nach vorne gestreckt flach auf der Balsaholzunterlage fixiert. Anschliessend wurde die indifferente Elektrode auf der

Höhe der Coxa des rechten Beinpaars eingesetzt und mit einem kleinen Wachstropfen parallel zum Bein auf der Holzunterlage fixiert. Schliesslich wurde auch das erste Beinpaar der Zecke so mit Parafilm abgedeckt, dass lediglich die Tarsen mit den zu untersuchenden Sensillen auf der Dorsal-seite exponiert blieben. Der Halter mit der präparierten Zecke wurde auf einen frei schwenkbaren und fixierbaren Halter in der Mitte des Faraday-Käfigs festgeschraubt. Die indifferente Elektrode wurde über eine Krokodilklemme an einem ebenfalls fixierbaren Schwenkarm an den Vorverstärker angeschlossen. Unter einer Binocularlupe (Wild, 125x) konnte nun mit Hilfe eines Leitz-Micromanipulators die in einen speziellen Halter eingeführte Ableitelektrode an der Basis des zu untersuchenden olfaktorischen Sensillum eingestochen werden.

4.2.5. Stimulierung

Für die Stimulierung wurde die von Kafka (1970) eingeführte Methode des Spritzenolfactometers verwendet. Eingestellte Mengen von zu testenden lipophilen Substanzen wurden in Paraffinöl gelöst. Ausgehend von einer molaren Lösung wurden in Zehnerschritten Verdünnungsreihen bis zu einer 10^{-6} molaren Lösung hergestellt. 10 Tropfen einer solchen definierten Lösung wurden in ein Tablettenglas (\emptyset 2cm x 4cm) pipettiert, welches offen in eine Wegwerfspritze (B - D, Plastikpak, 30ml) gestellt wurde. Die so präparierte Spritze wurde an einem getrockneten und gefilterten Luftstrom (Silicagel/Aktivkohle) gefüllt. Derselbe getrocknete und gefilterte Luftstrom wurde mit einer Geschwindigkeit von 0.4m/s (64,5 ml/sek.) über einen PVC-Schlauch und ein Glasrohr (\emptyset 4,5mm) permanent über den präparierten Tarsus geleitet. Die Öffnung des Glasrohrs wurde in unmittelbare Nähe des präparierten Tarsus gebracht und die zentrale Achse direkt auf das Sensillum gerichtet, von dem abgeleitet werden sollte.

Die Spritze wurde in ein speziell konstruiertes Stativ eingespannt. Ein darauf montierter pneumatischer Druckarm wurde über einen Fusschalter ausgelöst und presste mit einer konstant eingestellten Geschwindigkeit auf den Kolben der eingesetzten Spritze. 14ml der gesättigten Luft in der Spritze wurden so über eine Injektionsnadel 20cm vor der Austrittsöffnung in den konstanten Luftstrom des Glasrohrs während 4 Sekunden eingespritzt.

Als Teststimuli wurden die Komponenten des wirtsgebundenen Pheromons, O-Nitrophenol, Methylsalicylat und Pelargonsäure, sowie das Sexualpheromon

vieler metastrierter Zeckenarten, 2,6-Dichlorphenol, verwendet. Als Kontrolle diente reines Paraffinöl.

4.2.6. Aufzeichnung

Ueber alle Stimulierungen und Ableitungen wurde laufend Protokoll geführt. Interessante, auswertbare Ableitungen wurden entweder direkt oder ab Band auf dem Bildschirm des Oszilloskops gefilmt. Die Filme wurden mit einer Kamera von Nihon-Kohden, welche direkt auf das Oszilloskop montiert werden konnte, hergestellt. Für alle Aufzeichnungen wurde Filmmaterial von Agfa-Gevaert (Oszilloscript 2) verwendet. Generell wurde eine Filmgeschwindigkeit von 100mm/sek gewählt.

4.2.7. Auswertung

Die entwickelten Filme wurden von Hand ausgewertet, d.h. die aufgezeichneten Aktionspotentiale wurden aufgrund verschiedener Kriterien wie Amplitude, Form und Frequenz je nach Anzahl beteiligter Sinneszellen einer oder mehreren Klassen zugeordnet. Für jede Klasse wurden die Spikes ausgezählt. Als einer der wichtigsten Parameter für die Beurteilung der konzentrationsabhängigen Antwort einzelner Sinneszellen wurde die Spitzenfrequenz des phasischen Teils der Ableitung angesehen. Diese Spitzenfrequenz (Fmax) wurde über den nachfolgenden Algorithmus ermittelt, bei dem mit je 5 aufeinanderfolgenden Intervallen zwischen zwei Spikes (A - E) über zwei Stufen ein Mittelwert berechnet wurde:

$$\left[\frac{A + B + C}{3} + \frac{B + C + D}{3} + \frac{C + D + E}{3} \right] / 3 \cdot 100 = F_{\max}$$

Da die Intervalle in Millimetern gemessen wurden und die Filmgeschwindigkeit 10mm/sek betrug, ergab diese Berechnung direkt Frequenzwerte in Hz.

Daneben wurden die Frequenzen auch über Intervalle von 100, 200, 300, 500 und 1100 msek berechnet.

Anhand dieser Daten wurden für die verwendeten Verdünnungsreihen die Regressionen und Korrelationskoeffizienten berechnet.

III. RESULTATE

1. Verhalten

1.1. Das Festsetzverhalten der adulten Zecken auf einem natürlichen Wirt

Die Versuche auf dem Rind haben bestätigt, dass das Verhalten der adulten Männchen und Weibchen von A. variegatum sehr gut mit dem von Norval (1974) für die Art A. hebraeum beobachteten Verhalten übereinstimmt. Im Folgenden sind deshalb die Resultate dieser Versuche nur so weit wiedergegeben, als sie für die Diskussion dieses Verhaltens eine wichtige Grundlage bieten und die Beschreibung von Norval in irgend einer Form modifizieren, ergänzen oder erweitern.

Eine erste Beobachtung bezieht sich auf die Art und Weise, wie sich frisch angesetzte Zecken auf dem Fell des Tieres fortbewegten. Sowohl Männchen als auch Weibchen zeigten zwei deutlich gegeneinander abgesetzte, zeitlich gestaffelte Fortbewegungsweisen. Die erste war charakterisiert durch ein rasches, hochgestelztes und dabei nicht deutlich orientiertes Rennen. Die Zecken hatten meist keinen sicheren Halt auf den Haaren des Tieres und wurden sehr leicht durch das nervöse Flankenzittern des Rindes abgeworfen oder fielen an einer überhängenden Körperstelle ab. Die zweite Form der Fortbewegung war charakterisiert durch ein langsames, an das Fell des Tieres angeklammertes Klettern, wobei das erste Beinpaar immer wieder hoch über das Fell des Tieres erhoben wurde. Oft blieben die Zecken für eine gewisse Zeit in dieser Stellung verharnt, um danach in eine andere Richtung weiterzuklettern. Bei dieser Form der Fortbewegung hatten die Zecken in der Regel guten Halt im Fell des Rindes und konnten von diesem nicht mehr ohne weiteres abgeschüttelt werden. Wurden die Zecken zum ersten Mal nach der Häutung auf das Rind angesetzt, so dominierte bei allen die erste Form der Fortbewegung. Wurde das Ansetzen mehrere Male hintereinander wiederholt, so fand nach einer gewissen Zeit ein Wechsel von der ersten zur zweiten Form der Fortbewegung statt. Mit jedem neuen Ansatz erfolgte der Wechsel rascher, bis die Zecken schliesslich von Beginn an nur noch die zweite Form zeigten. Bei den Männchen folgten auf diesen Wechsel der Fortbewegungsweise sehr rasch die ersten Versuche, sich in der Haut des Wirtes zu fixieren. Diese Versuche waren gekennzeichnet durch das Eintauchen des Rostrums in die Haare des Tieres, das Spreizen der Palpen und das Absondern von Speichel

an der Spitze des Rostrums. Bei den Weibchen erfolgten auch nach wiederholtem Ansetzen und nach vollzogenem Wechsel der Fortbewegungsweise keine Versuche, sich festzusetzen. Ohne die Präsenz von bereits festgesetzten, sexuell reifen Männchen setzten sich die Weibchen in keinem Fall fest.

1.2. Das Aggregations- und Paarungsverhalten auf einem natürlichen Wirt

Wie bereits das Festsetzverhalten, entsprach auch das Aggregations- und Paarungsverhalten von A. variegatum weitgehend demjenigen von A. hebraeum (Norval, 1974). Insbesondere zeigen auch bei A. variegatum die gesogenen, sexuell reifen Männchen das für diese Gruppe der Amblyomminae typische Klammerverhalten (englisch: claspng behaviour), welches dazu führt, dass sich in der Regel die ungesogenen Weibchen ausschliesslich gepaart und in enger Umarmung mit einem sexuell reifen Männchen auf einem Wirt fixieren. Norval's Vermutung, dass dieses Klammerverhalten mechanisch ausgelöst werde und in Bezug auf die Natur des auslösenden Reizes unspezifisch sei, kann anhand der eigenen Beobachtungen an A. variegatum bestätigt werden. Das Verhalten wird durch eine feine Berührung von Sinneshaaren auf der Dorsal-seite der beiden hinteren Beinpaare ausgelöst, wobei es offenbar keine Rolle spielt, ob diese Reizung durch ein Weibchen, ein Männchen oder durch artfremde Zecken wie Rhipicephalus sp. oder Dermacentor sp. erfolgt. Es kann ebenso durch eine feine Berührung mit Pinselborsten oder anderen Materialien ausgelöst werden. Ein Beispiel für den Ablauf dieses Verhaltens, welches zusammen mit dem, durch das wirtsgebundene Aggregationspheromon gesteuerte Verhalten für die Aggregation und Paarbildung auf dem Wirt von zentraler Bedeutung ist, ist anhand einer Bildsequenz aus einem Film in Abb. 1 wiedergegeben.

Frisch festgesetzte, ungesogene Männchen zeigen auch auf spezifische Berührung durch ein ungesogenes Weibchen kein solches Klammerverhalten. Wie bereits Norval betont, vollzieht sich bei allen metastriaten Arten der Familie der Ixodidae die sexuelle Reifung der Männchen erst auf dem Wirt und ist abhängig von einem Blutmahl von mehreren Tagen. Bei A. hebraeum und A. variegatum beinhaltet diese sexuelle Reifung die von Norval erwähnten Veränderungen in Physiologie und Verhalten, die parallel und in Korrelation mit der Dauer des Blutmahls ablaufen. Bei Männchen von A. hebraeum erscheinen die ersten reifen Spermatozoen in den Hoden nach einem Blutmahl von 6-7 Tagen (Norval & Capitini, 1974). Die Abgabe des wirtsgebundenen Aggregationspheromons

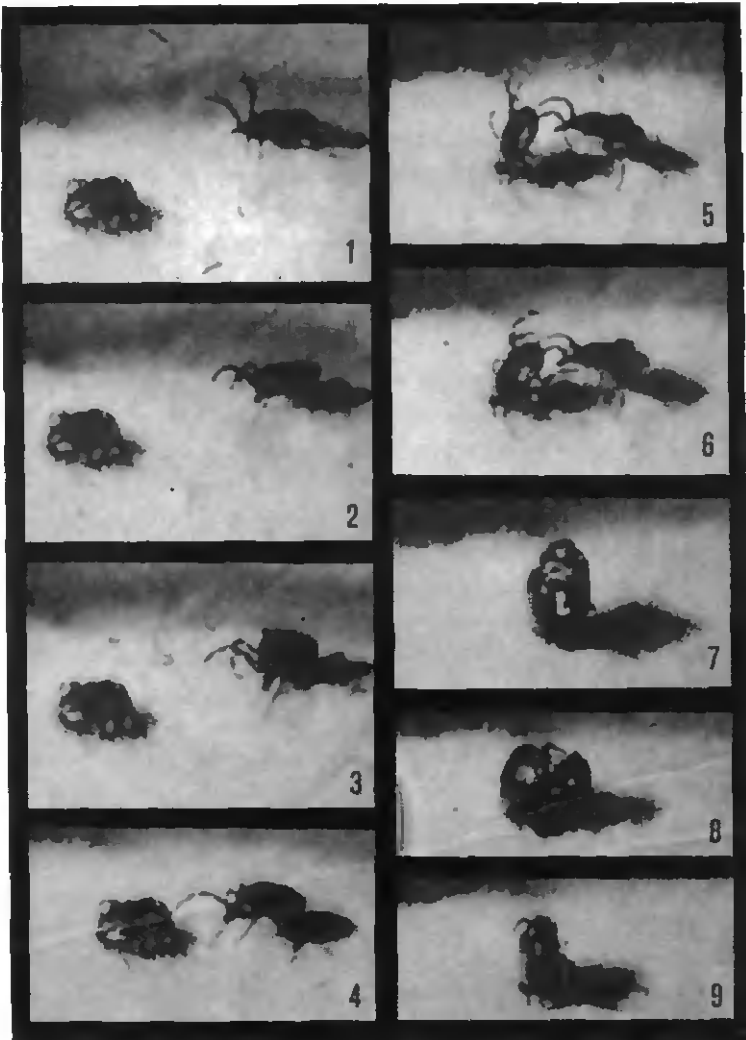


Abb. 1: Filmsequenz zum Ablauf der Klammerreaktion auf einem Wirt

ABB. 1: Filmsequenz zum Ablauf der Klammerreaktion auf einem Wirt

Legende:

Das Männchen (vorne links) ist auf dem Rücken eines narkotisierten, weissen Kaninchens fixiert. Es hat zuvor während 7 Tagen auf einem Rind ein Blutmahl aufgenommen und hat deshalb seine sexuelle Reife erreicht. Dies bedeutet, dass sich in seinen Hoden reife Spermatiden entwickelt haben. Es zeigt eine ausgeprägte Bereitschaft für das Klammerverhalten ("claspig behaviour"). Ueber Drüsen an der Körperoberfläche sondert es nun permanent ein Aggregationspheromon ab, welches von einem Weibchen (hinten rechts) über Geruchssinnesorgane an den Tarsen des ersten Beinpaares wahrgenommen wird. Das Weibchen verharret eine Weile mit hoch erhobenem ersten Beinpaar, um sich dann langsam in Richtung auf das Männchen hin zu bewegen (1). Das erste Beinpaar wird immer wieder über das Fell erhoben und wird dabei deutlich auf das Männchen hin orientiert (2). Die Orientierung des ersten Beinpaares geht bei der weiteren Annäherung jeweils der Orientierung der Körperachse voraus (3). Das Weibchen berührt bei seinen Suchbewegungen mit seinem rechten ersten Bein eines der hinteren Beine des Männchens (4). Dies genügt als Auslöser für die Reaktion des Männchens. Es bringt seinen Körper in eine senkrechte Position zum Fell des Wirtes und spreizt seine Beine weit auseinander (5). Danach versucht es mit suchenden Bewegungen der hinteren Beinpaare das Weibchen zu ergreifen (6). Gleichzeitig bringt sich das Weibchen durch eine leichte Drehung in eine Position Bauch gegen Bauch zum Männchen und umklammert es auch seinerseits (7). Ueber gemeinsame Bewegungen wird das Weibchen so gedreht, dass sein Rostrum schliesslich gegen die Haut des Wirtes orientiert ist (8). Das Weibchen fixiert sich anschliessend in dieser Position auf dem Wirt und bleibt in enger Umklammerung mit dem Männchen (9).

und die damit verbundene Attraktivität der Männchen ist vom fünften Tag an feststellbar und erreicht ihr Maximum mit dem achten Tag (Rechav et al., 1977). Der Abschluss der Reifung der Gonaden der Männchen und die Abgabe des Pheromons fallen somit zusammen. Ueber das erste Auftreten des Klammerverhaltens bei A. hebraeum finden sich in der Literatur keine Angaben. Es darf jedoch angenommen werden, dass auch dieses Verhalten mit der sexuellen Reifung korreliert und um den fünften Tag herum feststellbar wird. Bei den Männchen von A. variegatum scheinen alle diese Prozesse etwas rascher abzu-
laufen. Ueber den Abschluss der Reifung der Gonaden bei A. variegatum finden sich in der Literatur keine Angaben. Die Abgabe des Pheromons beginnt bereits mit dem dritten bis vierten Tag und erreicht ihr Maximum bereits am fünften Tag (Norval & Rechav, 1979). Ein Versuch zur Korrelation zwischen der Dauer des Blutmahls und dem Erscheinen der Klammerreaktion ergab, dass erste positive Reaktionen der Männchen bereits nach drei bis vier Tagen feststellbar waren. Mit jedem weiteren Tag nahm der Prozentsatz der positiv reagierenden Männchen zu. Vom siebten Tag an zeigten 100% der Männchen auf die Reizung mit einem ungesogenen Weibchen hin ein deutliches und vollständiges Klammerverhalten (Fig. 3). Somit ist auch bei A. variegatum die Abgabe des Pheromons und das Auftreten des Klammerverhaltens zeitlich aufeinander abgestimmt.

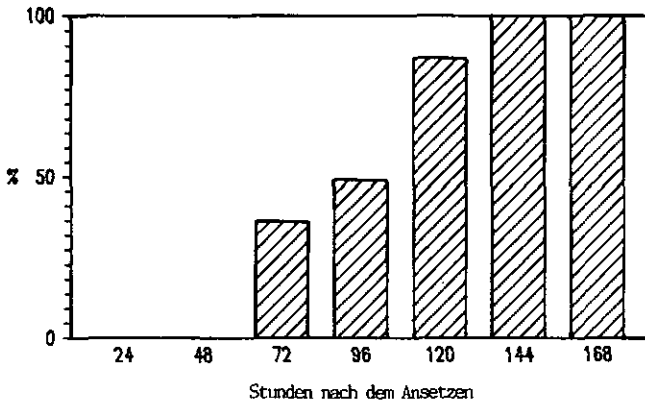


FIG. 3: Korrelation zwischen der Dauer des Blutmahls und dem Auftreten der Klammerreaktion (Clasping) bei festgesetzten, auf einem Wirt saugenden Männchen der Art Amblyomma variegatum. Reagierende Zecken in % der total festgesetzten Zecken.

Das Klammerverhalten der Männchen hat wie bereits erwähnt zur Folge, dass sich die ungesogenen Weibchen in Paarungsstellung zusammen mit einem sexuell reifen, kopulationsbereiten Männchen fixieren. Der Beschreibung von Norval zufolge wird bei A. hebraeum die Kopulation nach dem Festsetzen der Weibchen vollzogen. Seine Formulierung lässt dabei offen, ob die Kopulation unmittelbar danach oder erst nach Stunden oder Tagen folgt. Bei keinem der von mir beobachteten Paare auf dem Rind wurde die Kopulation innerhalb der ersten drei Stunden nach dem Festsetzen der Weibchen vollzogen.

1.3. Das Festsetz-, Aggregations- und Paarungsverhalten in vitro

Ein erster deutlicher Unterschied im Verhalten zwischen gesogenen und ungesogenen Männchen bestand in der Geschwindigkeit, mit der sich die frisch angesetzten Zecken auf der Membran fixierten. Während bei den gesogenen Zecken nach fünf Minuten bereits alle zehn Zecken auf der Membran fixiert waren, waren bei den ungesogenen Zecken zum gleichen Zeitpunkt erst zwei Zecken fixiert. Bei den gesogenen Männchen zeigten alle Zecken nach dem Festsetzen als Antwort auf die Reizung der hinteren Beinpaare mit einer Pinselborste eine deutlich ausgeprägte Klammerreaktion, während keines der beiden festgesetzten, ungesogenen Männchen eine solche Reaktion zeigte. Als nach zehn Minuten die beiden getrennten Gruppen gemeinsam unter einem Petrischalendeckel eingeschlossen wurden, löste sich das erste fixierte, ungesogene Männchen bereits nach fünf weiteren Minuten ab und wanderte zur Gruppe der gesogenen Männchen hinüber, um sich dort vorübergehend festzusetzen. Das zweite ungesogene Männchen löste sich nach elf Minuten ab, setzte sich nicht mehr fest und wurde entfernt.

Als sechzehn Minuten nach Versuchsbeginn zehn ungesogene Weibchen eingesetzt wurden, waren bereits eine Minute später acht Weibchen in Kopulationsstellung mit festgesetzten Männchen auf der Membran fixiert. Die beiden anderen Weibchen waren zwar nicht fixiert, blieben aber in nächster Nähe der festgesetzten Männchen. Die Berührung durch die suchenden Weibchen hatte bei den Männchen die typische Klammerreaktion ausgelöst, worauf die Weibchen von den Männchen festgehalten und mit dem Rostrum auf die Membran gepresst wurden. Fünfundzwanzig Minuten nach Beginn des Versuchs waren noch immer sechs Paare auf der Membran fixiert. Nach fünfundreissig Minuten löste sich das erste gesogene Männchen von der Membran ab, um mit dem Weibchen zu kopulieren.

1.4. Petrischalentests

Die Ergebnisse einer ersten Serie von Versuchen in der kleinen Petrischale sind in den Tabellen I-III und den entsprechenden Figuren 4-6 zusammengestellt. Sie wurde mit je 3x10 ungesogenen Männchen, gesogenen Männchen und ungesogenen Weibchen durchgeführt. Obwohl sich im Fall der ungesogenen Männchen und Weibchen die Verteilung der Zecken auf die acht Sektoren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Ansatzes von einer gleichförmigen Zufallsverteilung signifikant unterschied ($\chi^2 \geq 14,07 / p \leq 0,05$), konnte daraus noch nicht direkt auf eine attraktive oder aggregationsauslösende Wirkung des Stimulus im Testsektor geschlossen werden, da die aufgetretenen Aggregationen nicht oder zumindest nicht eindeutig dem Testsektor und damit dem Teststimulus zugeordnet werden konnten. Sowohl bei den ungesogenen Männchen als auch bei den ungesogenen Weibchen zeigte sich, dass die Tendenz zur Aggregation jeweils zehn bis zwanzig Minuten nach Testbeginn am stärksten ausgeprägt war. Bei den gesogenen Männchen zeigte sich zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Tendenz zur Aggregation.

Wurden die Daten über den ganzen zeitlichen Verlauf zusammengefasst und die Mittelwerte für die einzelnen Sektoren miteinander verglichen, so ergab sich lediglich für die ungesogenen Männchen eine, von einer homogenen Verteilung signifikant abweichende Verteilung.

Die zum Teil recht grossen Standardabweichungen sind einerseits auf die kleinen Zahlenwerte (erwartete Häufigkeit im Falle der homogenen Verteilung: 1.25) zurückzuführen. Andererseits spiegeln sie die Tatsache wieder, dass innerhalb der gleichen Testserie die Verteilung der Zecken auf die acht Sektoren auch dann nicht homogen war, wenn sich die Werte tendenziell über die drei Wiederholungen ausglich, wie das bei den gesogenen Männchen der Fall war.

Ausgehend von diesen Resultaten wurden drei weitere Serien mit je 5x10 ungesogenen Männchen durchgeführt. Obwohl auch in diesen Serien zeitweise eine auffällige Tendenz zur Aggregation feststellbar war, konnte diese auch hier nicht eindeutig dem Testsektor 1 zugeordnet werden (Tab. IV - VI).

Die Zusammenfassung aller Versuche mit ungesogenen Männchen ist in Figur 7 dargestellt. Die mangelnde Zuordnung der jeweils aufgetretenen Aggregationen zum Testsektor schlägt sich hier in der fast homogenen Verteilung der Mittelwerte auf alle acht Sektoren nieder. Die Zusammenfassung der Versuche führt nicht zu einer Verdeutlichung der Tendenz zur Aggregation, sondern verwischt

TABELLEN I - III

Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (s) der Verteilung von 10 Zecken/Ansatz auf 8 Sektoren einer kleinen Petrischale (\emptyset 15cm) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Ansatzes über je 3 Wiederholungen.

Zusätzlich angegeben ist die Summe (Σ) der Zecken/Sektor für alle Messungen (5' - 30'), Mittelwerte und Standardabweichungen der Summen und Mittelwerte pro Sektor über alle Messungen (5' - 30') sowie die χ^2 -Werte für alle Messungen.

Tabelle I: Versuche mit 10 ungesogenen Männchen (vergl. dazu Fig. 4)

Tabelle II: Versuche mit 10 ungesogenen Weibchen (vergl. dazu Fig. 5)

Tabelle III: Versuche mit 10 gesogenen Männchen (vergl. dazu Fig. 6)

TABELLEN IV - VI

Versuche mit je 10 ungesogenen Männchen/Ansatz. 5 Wiederholungen, sonst wie für Tabellen I-III beschrieben.

TABELLE I:

	1		2		3		4		5		6		7		8		χ^2
	Σ	\bar{x} / s	Σ	\bar{x} / s	Σ	\bar{x} / s	Σ	\bar{x} / s	Σ	\bar{x} / s	Σ	\bar{x} / s	Σ	\bar{x} / s	Σ	\bar{x} / s	
5'	6	2.0/1.5	6	2.0/1.0	3	1.0/0.0	2	0.7/1.2	0	0.0/0.0	3	1.0/1.0	1	0.3/0.6	9	3.0/3.0	16.93
10'	6	2.0/1.7	5	1.7/1.5	1	0.3/0.6	0	0.0/0.0	5	1.7/0.6	3	1.0/1.0	1	0.3/0.6	9	3.0/1.7	17.47
15'	13	4.3/2.9	1	0.3/0.6	0	0.0/0.0	3	1.0/1.0	2	0.7/1.2	2	0.7/1.2	2	0.7/1.2	7	2.9/2.2	34.00
20'	13	4.3/2.1	1	0.3/0.6	2	0.7/0.6	1	0.3/0.6	2	0.7/0.6	5	1.7/1.2	0	0.0/0.0	6	2.0/2.6	34.00
25'	8	2.7/2.1	4	1.3/0.6	2	0.7/1.2	3	1.0/1.0	4	1.3/0.5	1	0.3/0.6	1	0.3/0.6	7	2.3/2.5	12.67
30'	10	3.3/2.1	1	0.3/0.6	1	0.3/0.6	4	1.3/0.6	6	2.0/1.0	2	0.7/0.6	1	0.3/0.6	5	1.7/2.9	19.07
\bar{x}	9.3	3.1	2.8	1.0	2.0	0.5	2.0	0.7	3.2	1.1	2.7	0.9	1.0	0.3	7.2	2.4	15.65
s	3.2	1.0	2.5	0.8	0.9	0.4	1.4	0.5	2.2	0.7	1.4	0.5	0.6	0.2	1.6	0.5	

TABELLE 11:

	1	2	3	4	5	6	7	8	χ^2
	Σ \bar{x}/s	Σ \bar{x}/s	Σ \bar{x}/s	Σ \bar{x}/s	Σ \bar{x}/s	Σ \bar{x}/s	Σ \bar{x}/s	Σ \bar{x}/s	
5'	8 2,7/2,1	2 0,7/0,6	4 1,3/0,6	5 1,7/0,6	4 1,3/1,5	1 0,3/0,6	2 0,7/0,6	4 1,3/1,5	8,93
10'	4 1,3/1,5	2 0,7/0,6	5 1,7/0,6	4 1,3/0,6	5 1,7/1,2	2 0,7/1,2	4 1,3/1,2	4 1,3/0,6	2,53
15'	7 2,3/1,5	1 0,3/0,6	5 1,7/0,6	3 1,0/1,0	4 1,3/0,6	4 1,3/1,2	2 0,7/0,6	4 1,3/1,5	6,27
20'	8 2,7/2,1	1 0,3/0,6	3 1,0/0,0	6 2,0/2,0	4 1,3/1,2	2 0,7/0,6	1 0,3/0,6	5 1,7/2,9	11,60
25'	7 2,3/0,6	2 0,7/1,2	1 0,3/0,6	3 1,0/1,0	7 2,3/2,3	2 0,7/0,6	2 0,7/0,6	6 2,0/1,0	11,60
30'	6 2,0/2,0	2 0,7/0,6	3 1,0/1,7	2 0,7/1,2	5 1,7/0,6	2 0,7/0,6	2 0,7/1,2	8 2,7/2,3	10,00
\bar{x}	6,7 2,2	1,7 0,6	3,5 1,2	3,8 1,3	4,8 1,6	2,2 0,7	2,2 0,7	5,2 1,7	5,99
S	1,5 0,5	0,5 0,2	1,5 0,5	1,5 0,5	1,2 0,4	1,0 0,3	1,0 0,3	1,6 0,6	

TABELLE III:

	1.	2	3	4	5	6	7	8	χ^2
	$\Sigma \bar{x} / s$	$\Sigma \bar{x} / s$	$\Sigma \bar{x} / s$	$\Sigma \bar{x} / s$	$\Sigma \bar{x} / s$	$\Sigma \bar{x} / s$	$\Sigma \bar{x} / s$	$\Sigma \bar{x} / s$	
5'	6 2.0/1.0	4 1.3/0.6	8 2.7/1.5	2 0.7/0.6	0 0.0/0.0	3 1.0/1.0	2 0.7/1.2	5 1.7/0.6	12.13
10'	1 0.3/0.6	8 2.7/1.5	10 3.3/1.2	2 0.7/0.6	1 0.3/0.6	3 1.0/1.7	2 0.7/0.6	3 1.0/0.0	21.20
15'	2 0.7/1.2	5 1.7/1.5	10 3.3/2.5	5 1.7/0.6	4 1.3/0.6	0 0.0/0.0	3 1.0/1.0	1 0.3/0.6	18.00
20'	0 0.0/0.0	3 1.0/1.0	10 3.3/0.6	3 1.0/1.0	2 0.7/0.6	1 0.3/0.6	4 1.3/0.6	7 2.3/0.6	20.13
25'	3 1.0/1.0	3 1.0/1.0	9 3.0/1.7	3 1.0/1.0	4 1.3/0.6	3 1.0/1.7	2 0.7/0.6	3 1.0/1.0	8.97
30'	2 0.7/0.6	4 1.3/0.6	7 2.3/2.1	5 1.7/0.6	5 1.7/0.6	1 0.3/0.6	3 1.0/0.0	3 1.0/1.7	6.80
\bar{x}	2.3 0.8	4.5 1.5	9.0 3.0	3.3 1.1	2.7 0.9	1.8 0.6	2.7 0.9	3.7 1.2	10.79
s	2.1 0.7	1.9 0.6	1.3 0.4	1.4 0.5	2.0 0.7	1.3 0.5	0.8 0.2	2.1 0.7	

TABELLE IV:

	1	2	3	4	5	6	7	8	χ^2
	$\Sigma \bar{x} / s$	$\Sigma \bar{x} / s$	$\Sigma \bar{x} / s$	$\Sigma \bar{x} / s$	$\Sigma \bar{x} / s$	$\Sigma \bar{x} / s$	$\Sigma \bar{x} / s$	$\Sigma \bar{x} / s$	
5'	4 0.8/1.3	8 1.6/1.8	5 1.0/1.2	8 1.6/1.5	12 2.4/2.3	6 1.3/1.9	1 0.2/0.4	6 1.2/0.8	11.76
10'	8 1.6/1.1	9 1.8/1.1	10 2.0/1.6	10 2.0/1.4	1 0.2/0.4	3 0.6/0.5	3 0.6/0.9	6 1.2/1.1	14.00
15'	3 0.6/0.9	6 1.2/1.6	10 2.0/1.0	10 2.0/2.0	7 1.4/1.3	5 1.0/0.7	7 1.4/1.3	2 0.4/0.5	9.52
20'	8 1.6/1.8	14 2.8/1.6	10 2.0/2.0	9 1.8/1.5	2 0.4/0.5	2 0.4/0.9	2 0.4/0.9	3 0.6/0.9	21.92
25'	8 1.6/1.1	9 1.8/1.8	8 1.6/1.3	6 1.2/1.1	4 0.8/1.1	3 0.6/0.9	9 1.8/2.2	3 0.6/0.5	7.60
30'	6 1.2/1.3	8 1.6/1.1	5 1.0/1.0	10 2.0/0.7	3 0.6/0.5	10 2.0/1.6	5 1.0/0.7	3 0.6/0.5	8.88
\bar{x}	6.2 1.2	9.0 1.8	8.0 1.6	8.8 1.8	6.8 1.0	4.8 1.0	4.5 0.9	3.8 0.8	
S	2.2 0.4	2.7 0.5	2.5 0.5	1.6 0.3	4.1 0.8	2.9 0.6	3.1 0.6	1.7 0.3	

TABELLE V:

	1		2		3		4		5		6		7		8		χ^2
	I	X / s	I	X / s	I	X / s	I	X / s	I	X / s	I	X / s	I	X / s	I	X / s	
5'	6	1.2/1.6	1	0.2/0.4	15	3.0/2.6	12	2.4/2.2	3	0.6/0.5	4	0.8/0.8	4	0.8/1.3	5	1.0/0.7	25.52
10'	8	1.0/1.9	3	0.6/0.5	15	3.0/2.0	9	1.8/1.8	5	1.0/1.0	7	1.4/0.9	1	0.2/0.4	2	0.4/0.5	21.28
15'	8	1.6/3.0	0	0.0/0.0	15	3.0/2.1	10	2.0/3.4	5	1.4/1.3	6	1.2/1.1	2	0.4/0.9	3	0.6/0.9	26.08
20'	10	2.0/3.9	3	0.6/0.5	11	2.2/2.7	7	1.4/3.1	9	1.8/2.5	7	1.4/1.7	1	0.2/0.4	2	0.4/0.5	16.24
25'	8	1.6/3.6	7	1.4/1.9	10	2.0/2.8	10	2.0/2.8	7	1.4/1.7	7	1.4/1.1	0	0.0/0.0	1	0.2/0.4	15.92
30'	10	2.0/3.9	3	0.3/0.9	9	1.6/2.4	11	2.2/2.9	7	1.4/2.2	7	1.4/1.1	1	0.2/0.4	2	0.4/0.5	16.24
\bar{X}	8.3	1.6	2.8	0.6	12.5	2.5	9.8	2.0	6.0	1.3	6.3	1.3	1.5	0.3	2.5	0.5	
S	1.5	0.4	2.4	0.5	2.8	0.6	1.7	0.3	2.1	0.4	1.2	0.2	1.4	0.3	1.4	0.3	

TABELLE VI:

	1	2	3	4	5	6	7	8	χ^2
	Σ \bar{x} / s	Σ \bar{x} / s	Σ \bar{x} / s	Σ \bar{x} / s	Σ \bar{x} / s	Σ \bar{x} / s	Σ \bar{x} / s	Σ \bar{x} / s	
5'	6 1.2/1.8	8 1.6/0.5	4 0.8/0.8	3 0.6/0.5	11 2.2/2.2	8 1.6/1.1	7 1.4/1.1	3 0.6/0.5	8.68
10'	10 2.0/1.2	9 1.8/1.6	2 0.4/0.5	5 1.0/0.7	11 2.2/1.5	5 1.0/0.7	2 0.4/0.5	6 1.2/0.8	13.36
15'	6 1.6/1.1	5 1.0/0.7	4 0.8/0.8	4 0.8/0.4	13 2.6/1.7	7 1.4/0.5	2 0.4/0.5	7 1.4/1.1	12.72
20'	8 1.6/0.9	7 1.4/0.9	4 0.8/0.4	7 1.4/0.5	10 2.0/1.0	9 1.8/1.1	1 0.2/0.4	4 0.8/1.1	10.16
25'	9 1.8/1.5	6 1.2/1.3	4 0.8/0.4	6 1.2/0.4	11 2.2/1.8	10 2.0/0.7	1 0.2/0.4	3 0.6/0.9	14.00
30'	5 1.0/1.0	5 1.0/1.0	4 0.8/0.8	12 2.4/2.3	8 1.6/1.7	10 2.0/1.6	2 0.4/0.9	4 0.8/0.8	13.04
\bar{x}	7.7 1.5	6.7 1.3	6.0 0.7	6.2 1.2	6.0 2.1	8.2 1.6	2.5 0.5	4.5 0.9	
s	1.9 0.4	1.6 0.3	0.8 0.2	3.2 0.6	1.6 0.3	1.9 0.4	2.3 0.5	1.6 0.3	

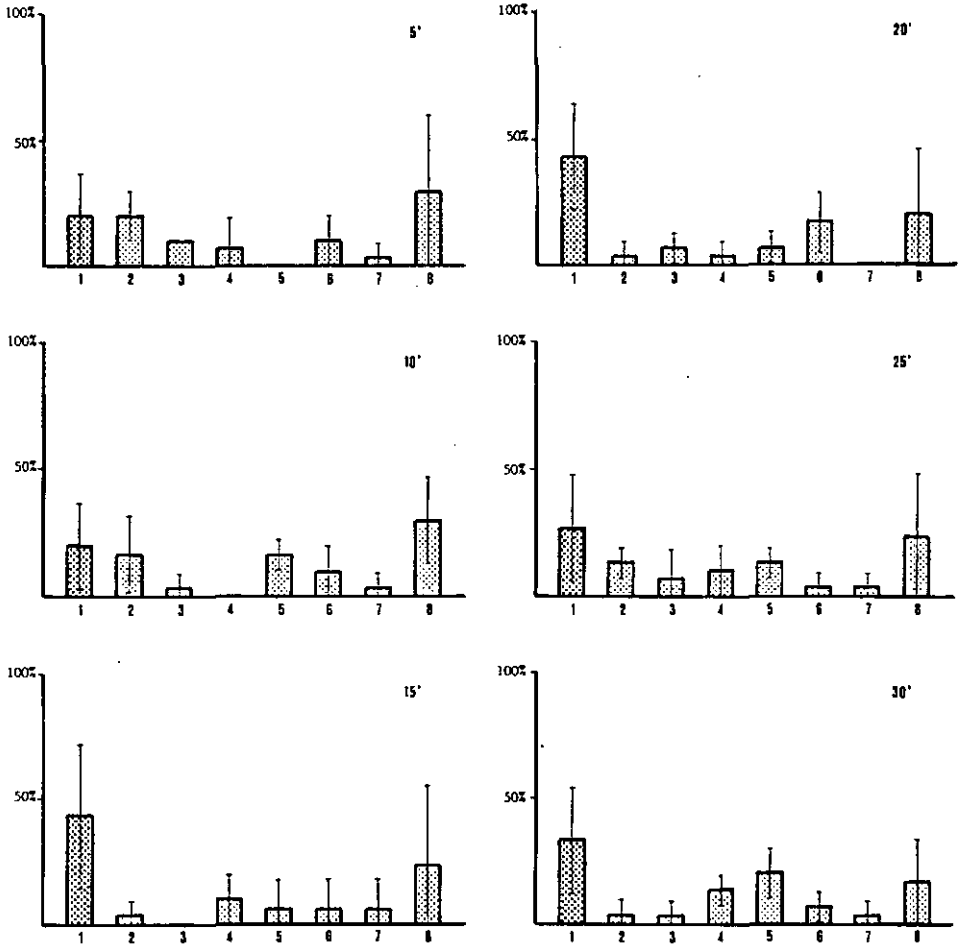


FIG. 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der Verteilung von je 10 ungesogenen Männchen/Ansatz auf 8 Sektoren einer kleinen Petrischale zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Ansatzes. 3 Wiederholungen (siehe Tabelle I).

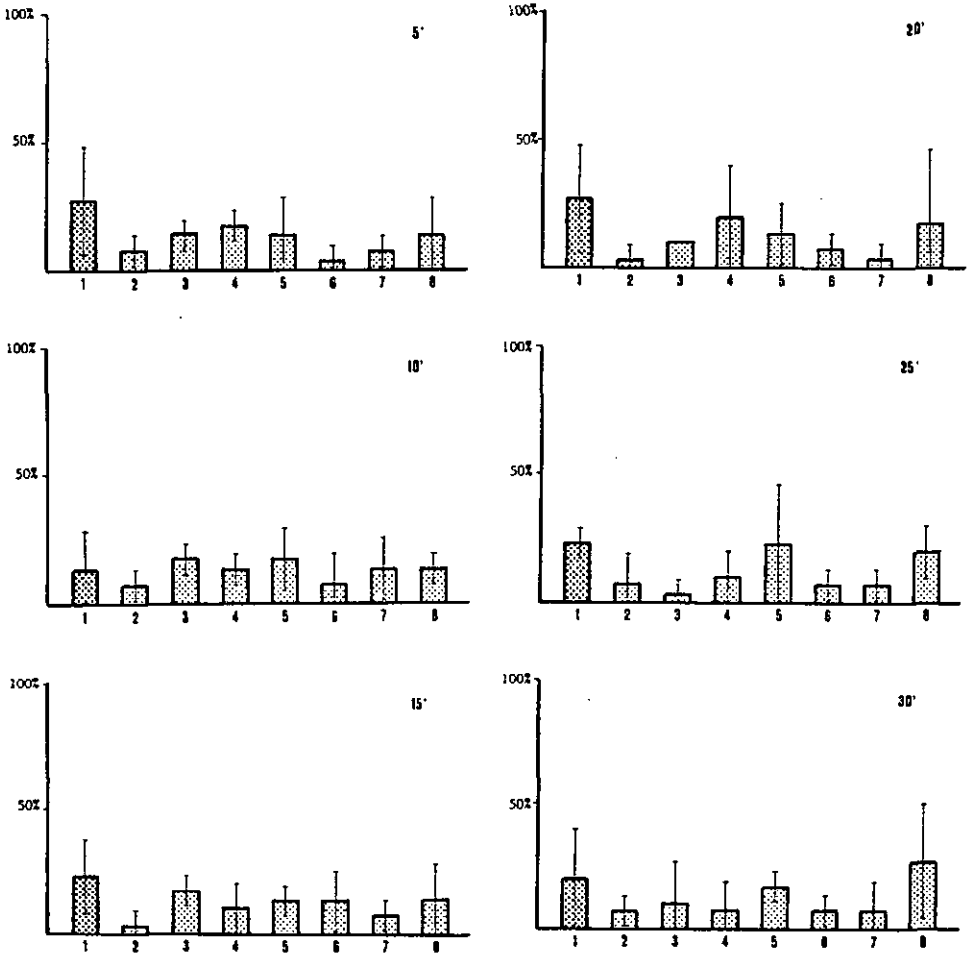


FIG. 5: Mittelwerte und Standardabweichungen der Verteilung von je 10 ungesogenen Weibchen/Ansatz auf 8 Sektoren einer kleinen Petrischale zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Ansatzes. 3 Wiederholungen (siehe Tabelle II).

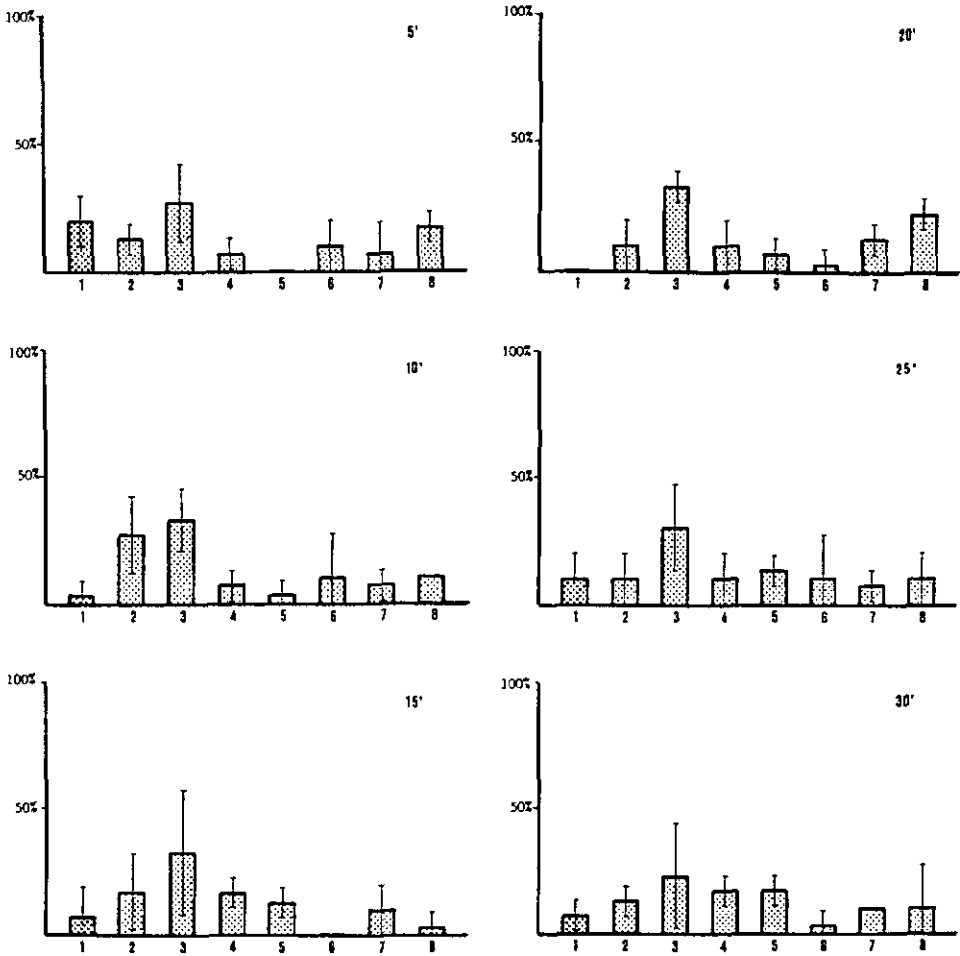


FIG. 6: Mittelwerte und Standardabweichungen der Verteilung von je 10 gesogenen Männchen/Ansatz auf 8 Sektoren einer kleinen Petrischale zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Ansatzes. 3 Wiederholungen (siehe Tabelle III).

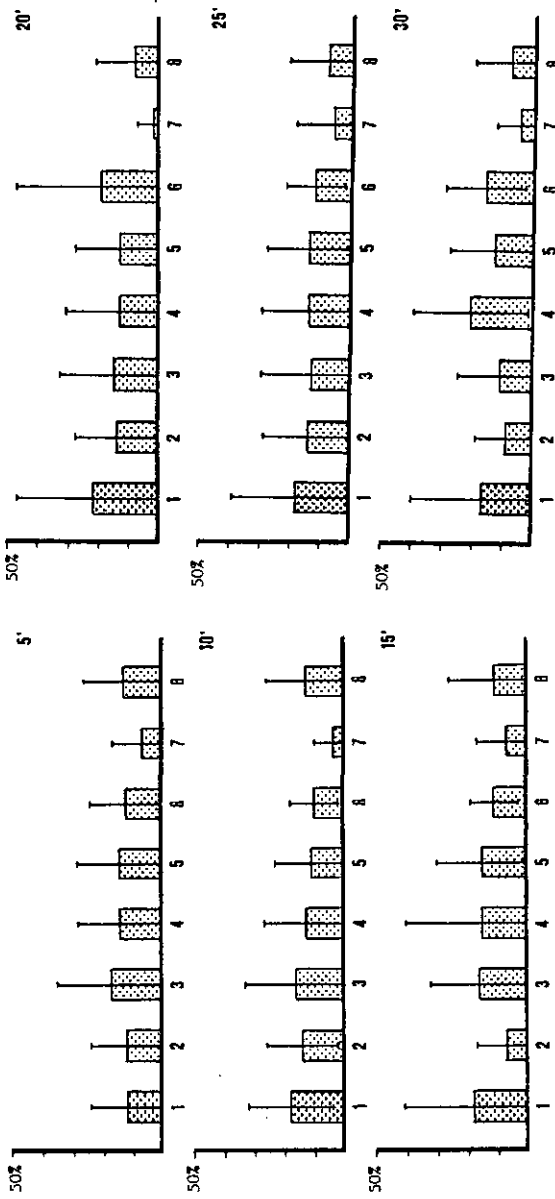


FIG. 7: Zusammenfassung der Resultate aller Versuche mit ungesogenen Männchen in der kleinen Petrischale (Ø 15cm) (vergl. dazu Tabellen I, IV, V, VI). 18 Wiederholungen.

diese. Eine andere Möglichkeit der Zusammenfassung dieser Versuche zeigt Figur 8. Die Werte sind so angeordnet, dass der zeitliche Verlauf der Verteilung für jeden Sektor direkt abgelesen werden kann. Die Figur zeigt, dass mit Ausnahme des Testsektor in allen Sektoren die Zahl der Zecken über alle Wiederholungen hinweg keiner klaren Tendenz folgt oder dann kontinuierlich sinkend ist. Im Testsektor 1 steigt die Zahl der Zecken bis zwanzig Minuten nach Testbeginn kontinuierlich an und geht danach wieder leicht zurück. Dies kann zumindest als Hinweis dafür gewertet werden, dass der in Sektor 1 angebotene Teststimulus während der ersten zwanzig Minuten eine aggregationsauflösende Wirkung zeigte. Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass sich in allen Versuchen, in denen eine Tendenz zur Aggregation festgestellt werden konnte, die Aggregation um einen (möglicherweise zufällig entstandenen) Kern von 2-3 verharrenden Zecken bildete.

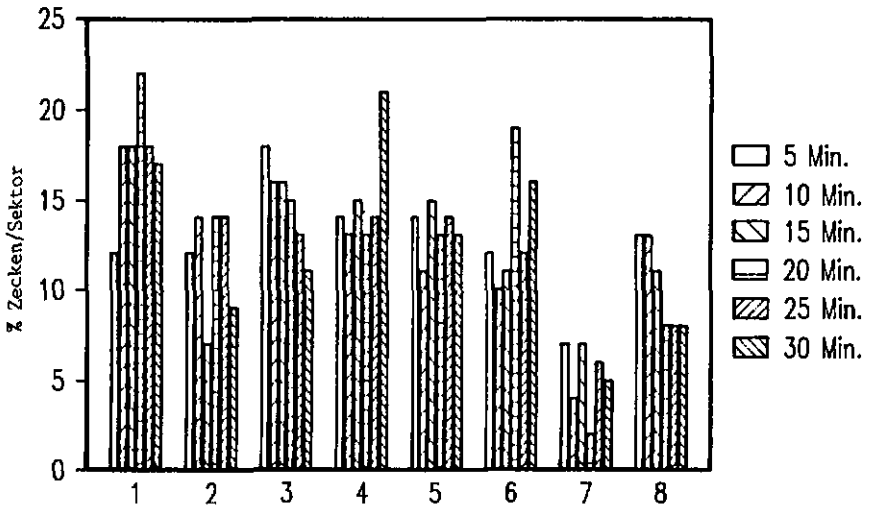


FIG. 8: wie Fig. 7. Die Verteilung (Mittelwerte) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Ansatzes sind in einer Darstellung zusammengefasst.

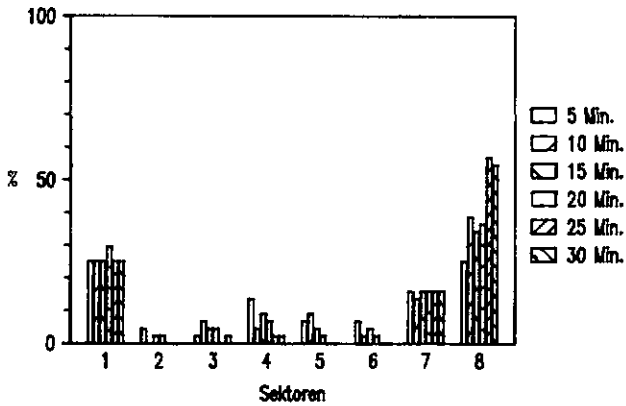


FIG. 9: Prozentuale Verteilung von 44 ungesogenen Männchen auf 8 Sektoren der grossen Petrischale zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Ansatzes.

Stimulus im Testsektor (1): Ein Filterpapier, das während 24h zusammen mit 10 gesogenen, sexuell aktiven Männchen inkubiert wurde. Kontrollsektoren (2-8): leere Filterpapiere.

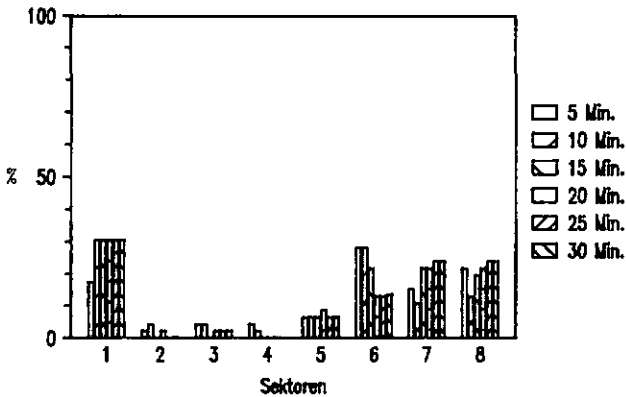


FIG. 10: wie Fig. 9. Ansatz mit 46 ungesogenen Männchen.

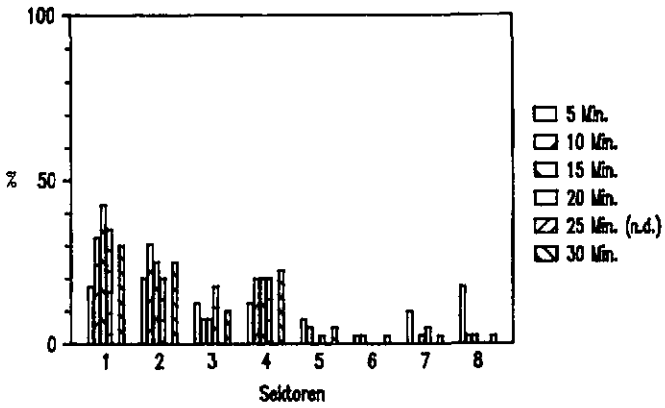


FIG. 11: Prozentuale Verteilung von 40 ungesogenen Männchen auf 8 Sektoren der grossen Petrischale zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Ansatzes.

Stimulus im Testsektor (1): Ein Filterpapier, das während 96h zusammen mit 10 gesogenen, sexuell aktiven Männchen inkubiert wurde. Kontrollsektoren (2-8): leere Filterpapiere

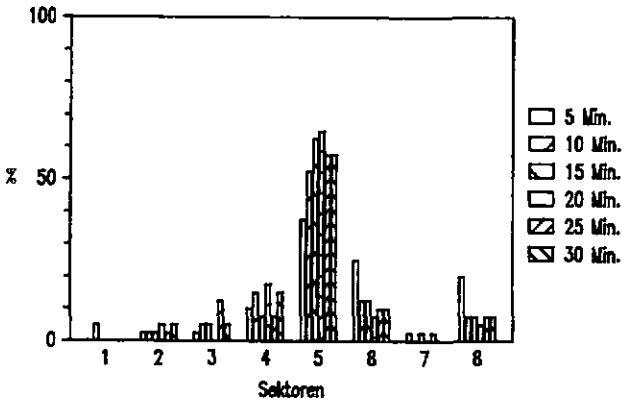


FIG. 12: wie Fig. 11. 2. Ansatz.

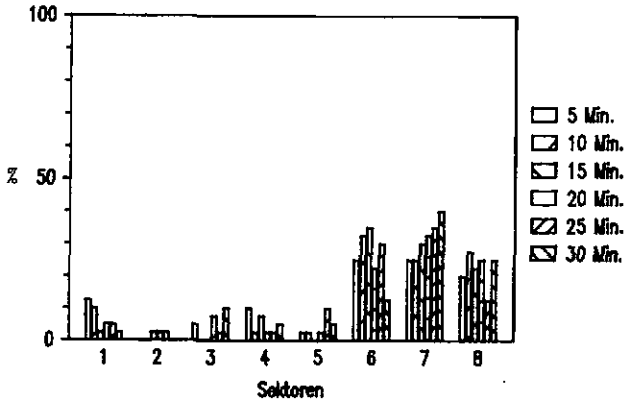


FIG. 13: Prozentuale Verteilung von 40 ungesogenen Männchen auf 8 Sektoren der grossen Petrischale zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Ansatzes.

Stimulus im Testsektor (1): Ein Filterpapier mit 5 μ l eines Aetherextraktes aus 20 gesogenen, sexuell aktiven Männchen. Kontrollsektoren (2-8): Filterpapiere mit je 5 μ l reinem Aether behandelt.

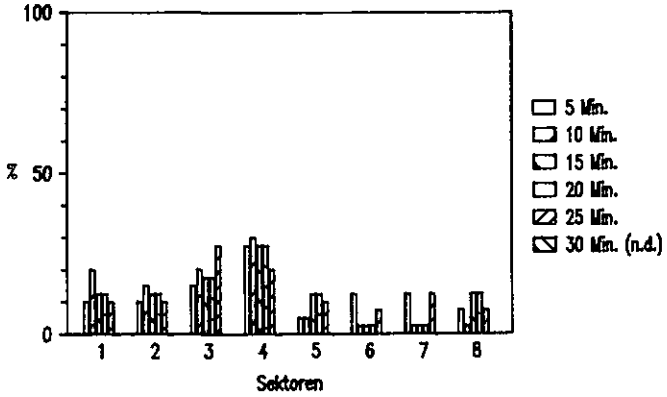


FIG. 14: wie Fig. 13. 2. Ansatz

Die Resultate der Versuche in der grossen Petrischale mit je 40-46 ungesogenen Männchen pro Ansatz sind in den Figuren 9-14 dargestellt. In diesen Versuchen war die Tendenz zur Aggregation wesentlich deutlicher ausgeprägt als in den vorangegangenen Versuchen in der kleinen Petrischale. Aber auch bei diesen Versuchen konnte aus dem Auftreten der Aggregationen nicht direkt auf die Wirkung des Stimulus im Testsektor geschlossen werden, da sich die Aggregationen nicht oder nicht eindeutig auf den Sektor, welcher den Teststimulus enthielt, konzentrierten. Auffällig ist, dass sich die Kerne der Aggregationen jeweils bereits innerhalb der ersten fünf Minuten nach Testbeginn formten. In den Graphiken drückt sich diese Tatsache darin aus, dass die Sektoren, in denen sich im Verlauf der Versuche die Aggregationen formten, bereits bei der Auszählung nach fünf Minuten höhere Zeckenzahlen aufwiesen als die übrigen Sektoren.

1.5. Y-Olfactometer

Die Resultate der Versuche im Y-Olfactometer sind in den Fig. 15 und 16a+b dargestellt. In einem ersten Versuch waren die Kammern, welche Test- und Kontrollstimulus enthielten über Silikonschläuche (20cm) von den kurzen Armen des Olfactometers getrennt. Zu keinem Zeitpunkt der Testdauer von 30 Minuten zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Zahl der Zecken im linken resp. rechten Arm. Der Anteil der Zecken, die jeweils im unteren Teil des Olfactometers reglos verharreten, war bei allen Versuchen sehr hoch, obwohl sich alle Versuchstiere bei der Ueberprüfung ihrer Vitalität vor und nach dem Versuch als sehr aktiv und reaktionsfähig erwiesen. Zwei weitere Ansätze mit je 60 ungesogenen Männchen und Weibchen, bei denen die gesogenen und ungesogenen Männchen als Test- resp. Kontrollstimuli direkt in Metallkapseln in die kurzen Arme des Olfactometers eingesetzt wurden, ergaben schliesslich eine deutliche Entscheidung der Testzecken für den Arm, welcher die Kapsel mit den sexuell aktiven, gesogenen Männchen enthielt. Ein signifikanter Unterschied etablierte sich bereits nach 10 Minuten Testdauer und verschob sich danach sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen nur noch geringfügig. Der Anteil der Zecken, die nicht motiviert werden konnten, in einen der beiden kurzen Arme aufzusteigen, war aber auch in diesen Ansätzen sehr hoch.

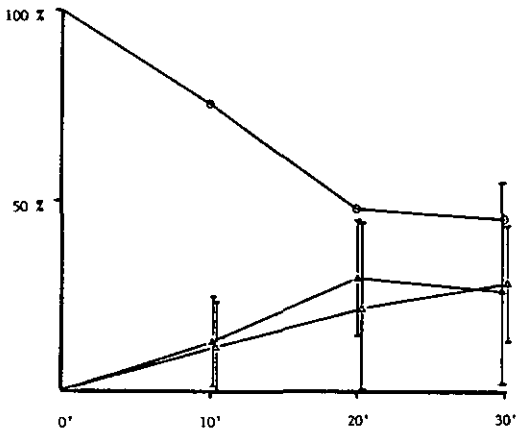


FIG. 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Verteilung von 10 ungesogenen Männchen auf die zwei Arme des Y-Olfactometers zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Ansatzes (vergl. dazu Fig. 1, Variante A). 6 Wiederholungen.

- ▲- % Zecken im Testarm des Y-Olfactometers
- △- % Zecken im Kontrollarm des Y-Olfactometers
- % Zecken im unteren Teil des Y-Olfactometers, die sich nicht entschieden haben.

Teststimulus: 5 gesogene, sexuell reife Männchen

Kontrollstimulus: 5 ungesogene Männchen

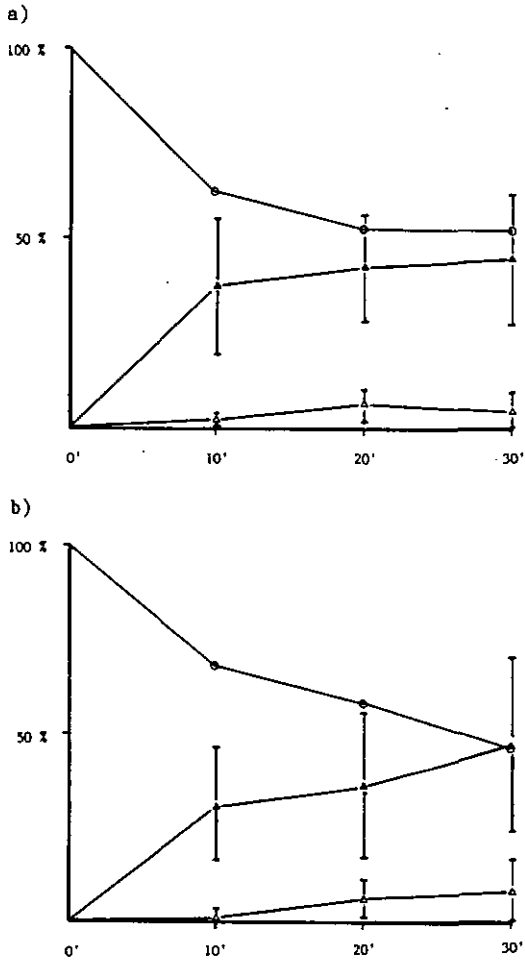


FIG. 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Verteilung von 30 ungesogenen Männchen (a) und 30 ungesogenen Weibchen (b) auf zwei Arme eines Y-Olfactometers zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Ansatzes (vergl. dazu Fig. 1, Variante B). 6 Wiederholungen. Sonst wie Fig. 15.

1.6. Arena-Test

1.6.1. Vorversuche

Erste Vorversuche in der Arena wurden in Form eines 2-Wahl-Tests durchgeführt. In diesen Vorversuchen sollte zunächst einmal der zeitliche Verlauf der Aggregation festgehalten werden. Zudem sollte in einer Serie von Versuchen geprüft werden, ob und wie nach der Entnahme vom Rind gesogene, sexuell aktive Männchen ihre anfänglich deutlich ausgeprägte, aggregationsauslösende Wirkung verlieren. Zwei frisch vom Rind abgenommene Männchen, welche zuvor während mehr als 10 Tagen auf einem Rinderschwanz ein Blutmahl aufgenommen hatten und auf die Reizung mit einem ungesogenen Weibchen hin mit einer deutlichen Klammerreaktion geantwortet hatten, wurden 1,3 und 8 Tage nach der Entnahme in der Arena in einer Kapsel als Teststimulus angeboten. Als Kontrolle dienten jeweils 2 ungesogene Männchen, die in einer Kapsel in der gegenüberliegenden Ecke der Arena angeboten wurden. Jeder Ansatz wurde 2 mal wiederholt, wobei nach jedem Ansatz die Position von Test- und Kontrollstimulus vertauscht wurde. Zusätzlich wurden in einem Nullversuch beide Kapseln leer angeboten. Die Resultate dieser Versuche sind in den Fig. 17a-d zusammengefasst.

Zunächst hat sich in allen Versuchen gezeigt, dass die Zahl der im Test- und in den Kontrollsektoren auagezählten Zecken bis zum Abbruch der Versuche nach jeweils 30 Minuten ansteigend bleibt. Nach 10 Minuten befanden sich aber in allen Fällen über 80% der nach 30 Minuten im Testsektor gezählten Zecken bereits im Testsektor. Nach diesen 10 Minuten flachte der anfänglich starke Anstieg deutlich ab. Aufgrund dieser Beobachtung wurde bei der späteren Standardisierung des Tests die Auszählung jeweils 10 Minuten nach Testbeginn vorgenommen.

Ein Tag nach der Entnahme der Testzecken vom Rind fiel die Entscheidung für den Testsektor sehr deutlich aus (a). Nach 30 Minuten befanden sich 81% der Zecken im Testsektor und 4% im Kontrollsektor, während sich weitere 15% der Zecken ausserhalb der beiden Sektoren befanden. Zwei Tage später fiel die Entscheidung bereits etwas schwächer aus (b). Nach 5 weiteren Tagen war die Entscheidung bereits deutlich abgeschwächt (c). Dennoch befanden sich zu jedem Zeitpunkt signifikant mehr Zecken im Testsektor als im Kontrollsektor. Der Versuch, bei dem die Kapseln leer angeboten wurden, hat gezeigt, dass die Kapseln für sich allein keine aggregationsauslösende Wirkung aufweisen und dass sich in den Testsektoren auch 10 Minuten nach Testbeginn keine Aggregationen bilden (d).

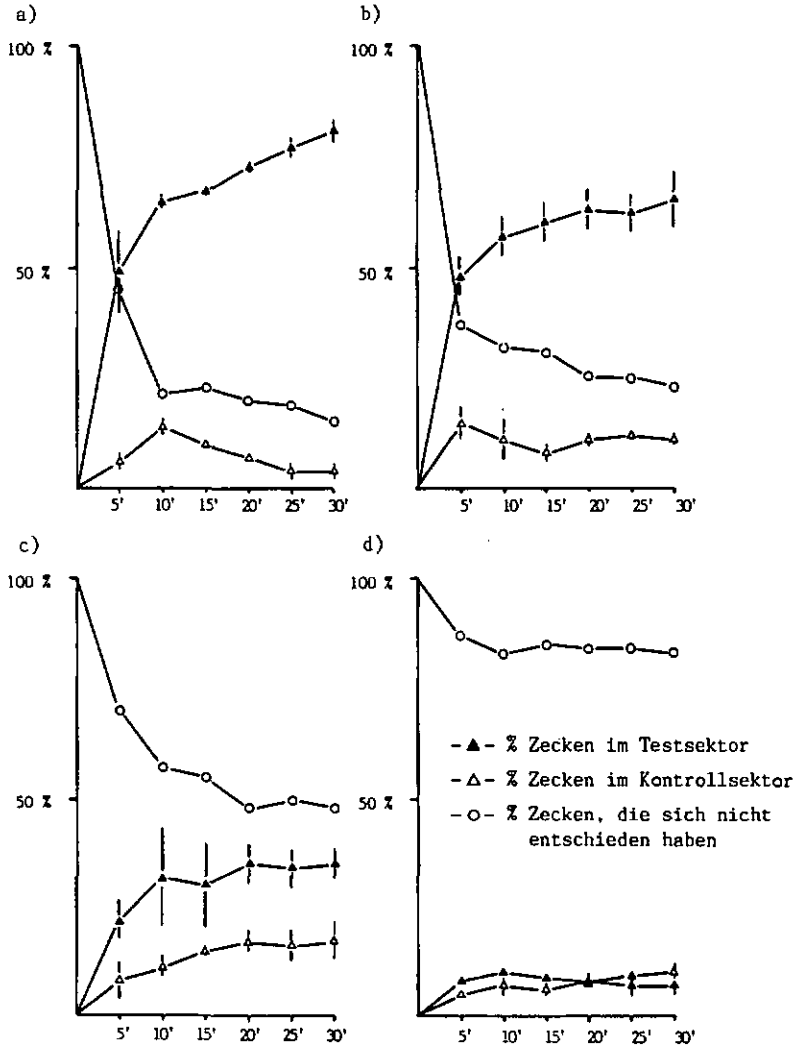


FIG. 17: Vorversuche in der Arena (Zwei-Wahl-Test). Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Verteilung von 50 ungezogenen Weibchen auf Test- und Kontrollsektor der Arena zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Ansatzes.

- a) 1 Tag nach der Entnahme der Zecken vom Rind
- b) 3 Tage " " " " " " "
- c) 8 Tage " " " " " " "
- d) Leerversuch

Je 2 Wiederholungen/Ansatz

1.6.2. Das Verhalten einzelner Zecken in der Arena

Weitere Versuche in der Arena wurden unternommen, um abzuklären, inwieweit am Entstehen der Aggregationen und an der damit verbundenen Wirkung des Pheromons Wechselwirkungen zwischen gleichzeitig aktiven, stimulierten Zecken beteiligt und von Bedeutung sind. Es wurden zwei Ansätze mit je 10 frischen, ungesogenen Weibchen, 2 resp. 4 Monate nach der Häutung, durchgeführt. Die Zecken wurden dabei einzeln in der Mitte der Arena eingesetzt und der zurückgelegte Weg bis zum Standort nach 10 Minuten Testdauer auf einer schematischen Zeichnung der Arena nachgezeichnet. Zusätzlich wurde der jeweilige Standort in 1 Minuten-Intervallen auf dem Protokoll festgehalten und entsprechend bezeichnet. Die Ergebnisse dieser beiden Ansätze sind in den Figuren 18 und 19 wiedergegeben. Die Analyse dieser Versuche ergab die folgenden wichtigen Anhaltspunkte:

- Vergleicht man die Ansätze mit jüngeren (2 Monate nach Schlupf) und älteren Zecken (4 Monate nach Schlupf) miteinander, so fällt zunächst einmal die höhere Aktivität der jüngeren Zecken auf. Der gesamthaft zurückgelegte Weg war im Durchschnitt wesentlich länger als bei den älteren Zecken. Zudem wurden bei den jüngeren Zecken aufgrund einer besseren Kletterfähigkeit auch die Seitenwände und der Deckel der Arena intensiv in die Suchaktivitäten miteinbezogen, während sich die älteren Zecken vorwiegend auf dem Boden der Arena aufhielten.
- Betrachtet man die primär eingeschlagene Richtung der Zecken nach Beginn des Ansatzes, so zeigte sich, dass bei den jüngeren Zecken bereits hier eine deutliche Ausrichtung gegen die Pheromonquelle hin feststellbar wurde, während bei den älteren Zecken eine solche Ausrichtung kaum mehr zum Ausdruck kam.
- Vergleicht man das Schlussresultat beider Ansätze nach Ablauf der Testdauer, so zeigt sich hier eine grosse Uebereinstimmung. In beiden Fällen hielten sich nach 10 Minuten je 6 von 10 Zecken im Testsektor auf. Mit einer Ausnahme hielten sich alle übrigen Zecken ausserhalb der Kontrollsektoren auf. Extrapoliert man nun dieses Ergebnis auf 40 Zecken, so ergibt sich eine Verteilung, wie sie auch im Standardtest, bei dem 40 Zecken gleichzeitig eingesetzt werden, beobachtet werden kann. Es darf deshalb angenommen werden, dass Interaktionen zwischen gleichzeitig aktiven, stimulierten Zecken, sofern überhaupt vorhanden, für das Schlussresultat des Tests nicht von Bedeutung sind.

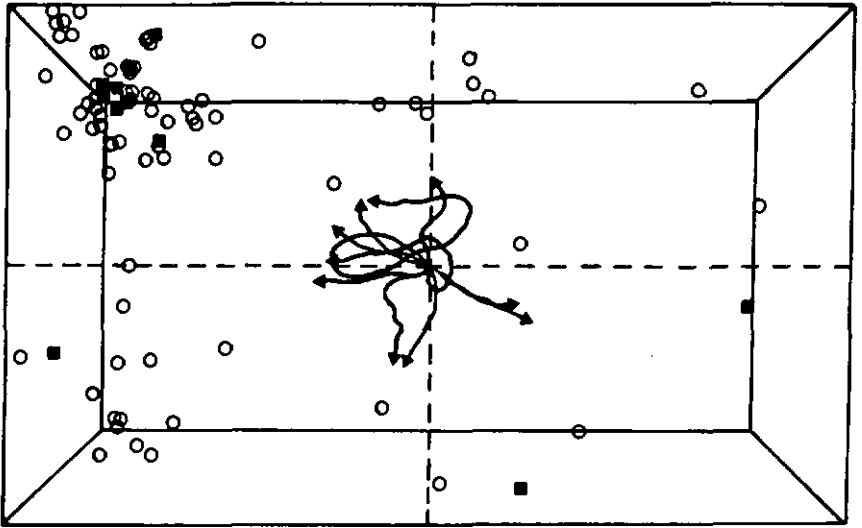


FIG. 18: Zusammenfassung der Resultate aller Versuche mit jüngeren Weibchen (2 Monate nach der Häutung) zum Aggregationsverhalten einzelner Zecken in der Arena. Eingezeichnet ist die primäre Startrichtung, die Standorte in Minutenintervallen (○), sowie der Standort nach 10 Minuten (■). Vergl. dazu Anhang A1-10.

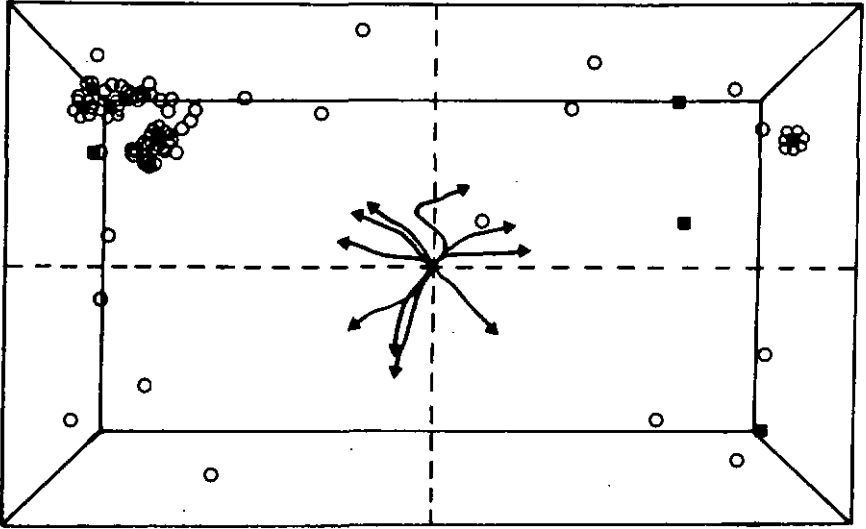


FIG. 19: wie Fig. 18. Versuche mit älteren Weibchen (4 Monate nach der Häutung). Vergl. dazu Anhang B₁₋₁₀.

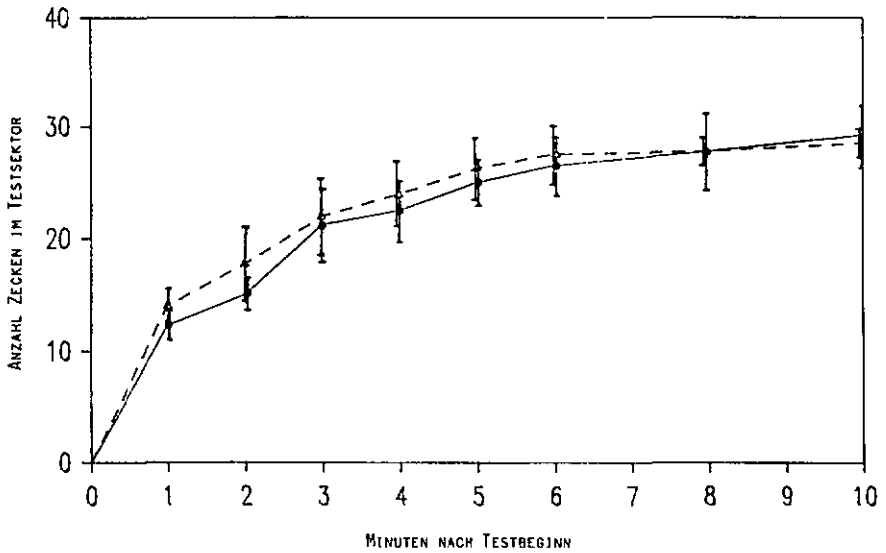


FIG. 20: Versuche zum zeitlichen Verlauf der Aggregation in der Arena. Mittelwerte und Standardabweichungen über je 4 Wiederholungen mit 40 Männchen (●) und 40 Weibchen (Δ).

- In allen Fällen, in denen die Zecken positiv auf den Teststimulus reagierten, war die folgende generelle Verhaltensabfolge deutlich zu erkennen. Zunächst zeigten die Zecken ein ausgedehntes, rasches Suchen im Bereich der ganzen Arena. In unmittelbarer Nähe des Teststimulus verlangsamte sich der Lauf der Zecken und die Suche konzentrierte sich auf den Testsektor und die Metallkapsel, in der die Pheromonquelle eingeschlossen war. Schliesslich zeigten die Zecken ein ausgeprägtes Klammerverhalten im direkten Kontakt mit der Metallkapsel und blieben häufig bis zum Ablauf der Testdauer in nächster Nähe der Kapsel.

1.6.3. Der zeitliche Verlauf der Aggregation in der Arena

In zwei Ansätzen in der Arena mit je 40 Männchen und Weibchen wurde versucht, den Verlauf der Aggregation während der ersten Minuten des Tests genauer zu analysieren. Anstelle der einmaligen Auszählung der Zecken in den Sektoren der Arena nach Ablauf der 10 Minuten wurde die Auszählung während der ersten 6 Minuten jede Minute und danach alle 2 Minuten vorgenommen. Ausgezählt wurden dabei lediglich die Zecken im Testsektor. Die Resultate dieses Versuch sind in der Figur 20 zusammengefasst.

Die Versuche haben gezeigt, dass im zeitlichen Verlauf der Aggregation praktisch keine Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen auftraten, d.h. zu keinem Zeitpunkt konnte eine signifikante Differenz festgestellt werden. Aus dem Kurvenverlauf geht klar hervor, dass sich bereits nach 10 Minuten ein grosser Prozentsatz der Zecken im Testsektor befand. Der Anstieg im Bereich von 6-10 Minuten war nur noch sehr gering und hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Verteilung der Zecken nach Abschluss der Versuche. Dies ist eine weitere Bestätigung dafür, dass bei einer einmaligen Auswertung des Standardversuchs 10 Minuten nach Testbeginn die wesentlichen Züge der Verteilung der Zecken auf Test- und Kontrollsektoren eindeutig festgehalten werden können.

2. Analyse

2.1. Basisversuche zur Wirkung der Rohextrakte in der Arena

In einer ersten Serie von Standardversuchen in der Arena wurde sowohl mit ungesogenen Männchen als auch mit ungesogenen Weibchen die Aktivität der verschiedenen Rohextrakte (E2a, E2b, E2c) geprüft und deren Wirkung mit

derjenigen lebender, gesogener, frisch vom Rind abgenommener Männchen verglichen. Die Resultate dieser Versuche sind in den Figuren 21a+b dargestellt. Sowohl die lebenden, gesogenen Männchen als auch der Hexanextrakt gesogener, sexuell aktiver Männchen (E2a) erwiesen sich für Männchen und Weibchen als hoch signifikant attraktiv und aggregationsauslösend. Dagegen zeigten der Extrakt ungesogener Männchen (E2b) und der Rinderhaarextrakt (E2c) keine attraktive oder aggregationsauslösende Wirkung. Es zeigten sich keine Unterschiede im Aggregationsverhalten der Männchen und Weibchen. Das Verhalten beider Geschlechter war in allen Fällen direkt vergleichbar.

2.2. Fraktionierung des aktiven Rohextraktes

Die Fraktionierung über HPLC ergab 40 Fraktionen zu je 1ml (Fig. 22). Die Fraktionen 1+2 (Vorlauf) sowie die Fraktionen 27-30 (Reinigungslauf und Nachlauf) hatten sich bereits in vorangegangenen Vorversuchen als inaktiv erwiesen. Sie wurden deshalb für das weitere Vorgehen weggelassen. Die verbliebenen 24 Fraktionen wurden in 3 Gruppen zu je 8 Fraktionen unterteilt. In einem ersten Durchgang wurden je 2 Gruppen rekombiniert. Den Fraktionen der jeweiligen Gruppen wurden je 100 µl entnommen. Alle so gewonnenen Stichproben wurden vereinigt und deren Inhaltsstoffe wie in Material und Methode beschrieben in Hexan ausgeschüttelt, extrahiert und eingengt. Dies ergab 3 konzentrierte Hexanextrakte, die in der Arena auf ihre pheromonale Aktivität hin geprüft wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle VII wiedergegeben. Danach ergab die Rekombination der Gruppen 1 und 2 sowie der Gruppen 1 und 3 aktive Lösungen, während eine Rekombination der Gruppen 2 und 3 eine völlig inaktive Lösung ergab. Wären die essentiellen Substanzen, welche an der pheromonalen Aktivität beteiligt sind auf alle drei Gruppen verteilt gewesen, so hätte keine der drei Rekombinationen eine vollständige Aktivität aufweisen dürfen. Wären sie auf 2 Gruppen verteilt gewesen, so hätte nur eine der Rekombinationen aktiv sein dürfen. Somit konnte bereits geschlossen werden, dass die beobachtete Aktivität ausschließlich auf Substanzen zurückzuführen war, die in Fraktionen der Gruppe 1 enthalten waren. Die Fraktionen der Gruppen 2 und 3 wurden deshalb für die restlichen Untersuchungen weggelassen. Die Gruppe 1 wurde ihrerseits in weitere 3 Gruppen (A, B, C) unterteilt. Rekombinationen dieser 3 Gruppen wurden wie zuvor beschrieben hergestellt und im Arena-Test geprüft. Die Resultate dieser Versuche sind ebenfalls in der Tabelle VII wiedergegeben. Die Rekombination

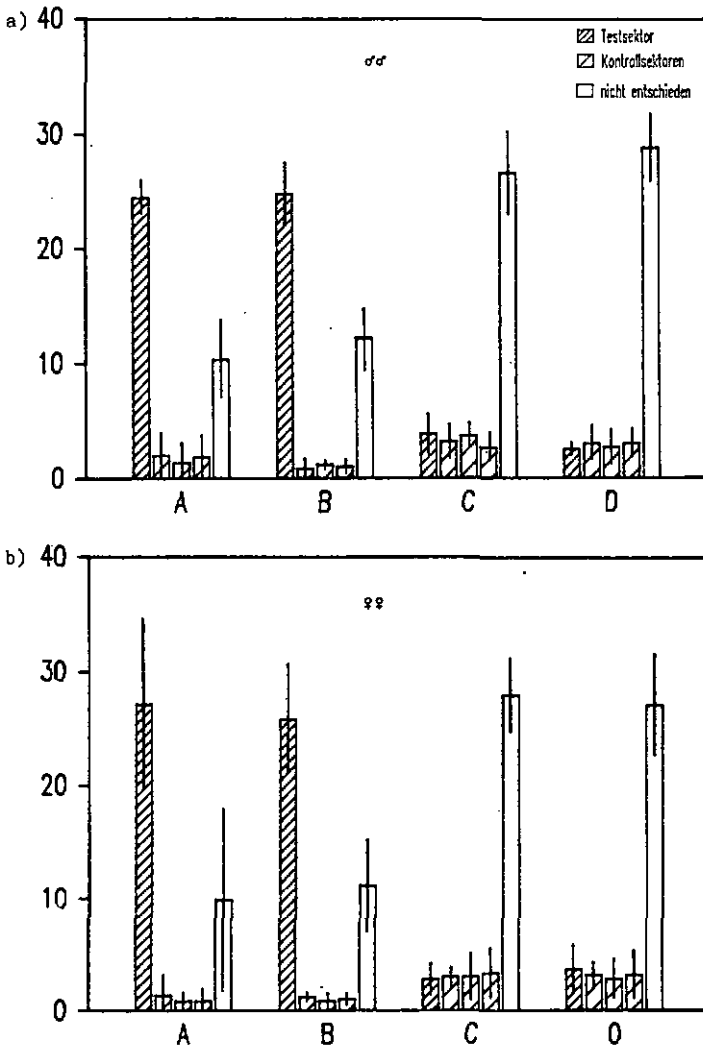


FIG. 21: Basisversuche mit je 40 ungesogenen Männchen (a) und Weibchen (b) in der Arena. Mittelwerte und Standardabweichungen über je 6 Wiederholungen.

- A: Testsektor: 2 gesogene, sexuell aktive Männchen
Kontrollsektor: je 2 ungesogene Männchen
- B: Testsektor: 10 μ l Rohextrakt (E2a) gesogener, sexuell aktiver Männchen in Diethyläther
- C: Testsektor: 10 μ l Rohextrakt (E2b) ungesogener Männchen in Diethyläther
- D: Testsektor: 10 μ l Rinderhaarextrakt (E2c) in Diethyläther
B-D: Kontrollsektoren: je 10 μ l Diethyläther

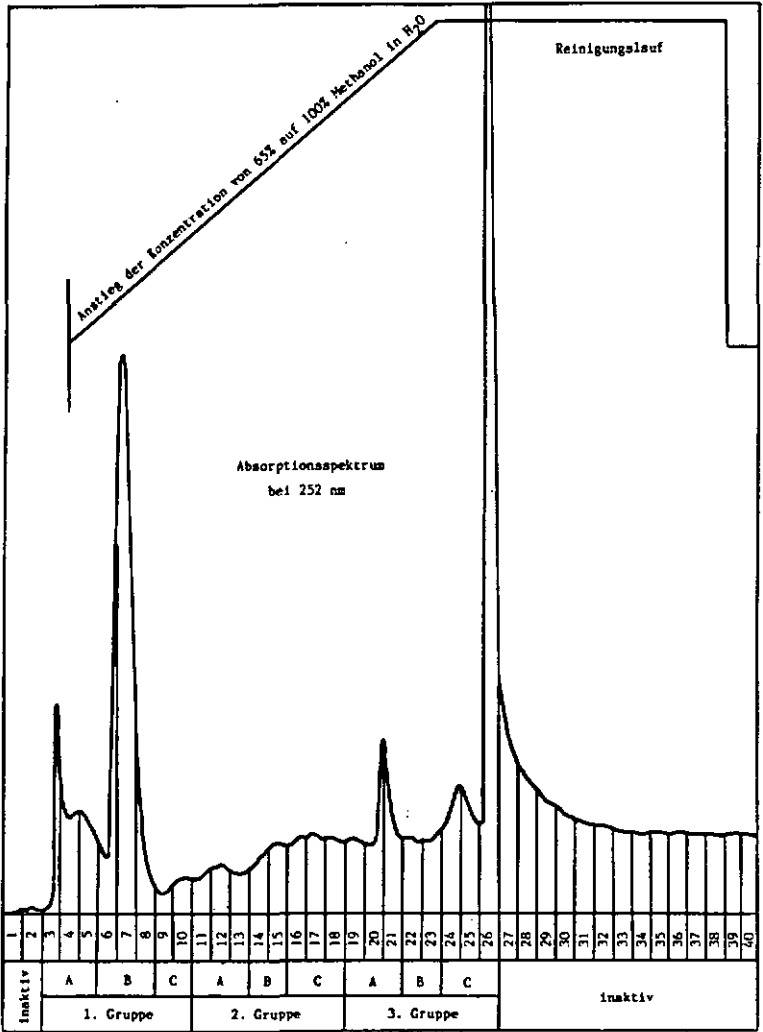


Fig. 22: Absorptionsspektrum und Trennungsverlauf der HPLC-Fraktionierung des aktiven Pheromonextraktes (E1). Eingetragen ist zudem die Gruppeneinteilung der Fraktionen 3-26, wie sie für die Biotests in der Arena vorgenommen wurde.

TABELLE VII: Resultate der Arena-Tests mit 40 ungesogenen Weibchen gegen Rekombinationen von 3x3 Gruppen von Fraktionen nach der Fraktionierung des aktiven Rohextraktes über HPLC.

Serie	Rekombination	Anzahl Zecken / Sektor				
		T	K	K	K	-
1	1. Gruppe + 2. Gruppe	15*	3	2	0	20
	1. Gruppe + 3. Gruppe	17*	0	0	1	22
	2. Gruppe + 3. Gruppe	2	3	6	2	27
2	2. Gruppe: A + B	12*	3	2	0	23
	2. Gruppe: A + C	4	5	4	4	23
	2. Gruppe: B + C	15*	0	2	5	17

*Aggregation im Testsektor

A und C erwies sich danach als inaktiv, während sich die Rekombination A und B und B und C als aktiv erwiesen. Die für die pheromonale Aktivität verantwortlichen Substanzen mussten somit in den Fraktionen der Gruppe B enthalten sein. Allerdings konnte bereits hier festgestellt werden, dass die Antwort der Zecken auf eine Stimulierung mit diesen Rekombinationen nicht mehr der ursprünglichen vollständigen Aggregation entsprach. Sie zeigten vielmehr eine "dynamische" Aggregation, ein Begriff, der später noch zu erläutern sein wird. An diesem Punkt wurden die Versuche vorläufig abgebrochen.

Die Fraktionen 6, 7 und 8, welche in der Gruppe B enthalten waren und die im Absorptionsspektrum einen deutlichen, einheitlichen Peak ergeben hatten, wurden gereinigt, in 2ml Hexan ausgeschüttelt, extrahiert und in eine Glasampulle abgefüllt. Der Extrakt wurde mit Stickstoff überschichtet und die Glasampulle luftdicht versiegelt. Anschliessend wurde er bei -20°C aufbewahrt und zusammen mit den Rohextrakten von Chemikern der Ciba-Geigy AG in Basel über Gaschromatographie und Massenspektrometrie analysiert.

2.3. Analyse der Extrakte über GC/MS

Der Vergleich der Chromatogramme inaktiver Extrakte mit dem des aktiven Extraktes ergab insgesamt 5 Substanzen, die ausschliesslich im aktiven Pheromonextrakt nachgewiesen werden konnten (Fig. 23 a-c). Es sind dies folgende Substanzen:

1. O-Nitrophenol (ONP)
2. 2-Hydroxy-benzoesäure-methylester = Methylsalicylat (MS)
3. Pelargonsäure (PS)
4. Benzoesäure
5. Glycerin

Die Massenspektren und Formeln dieser Substanzen sind in den Figuren 24 a-e wiedergegeben.

Im Hexanextrakt der aktiven HPLC-Fraktion konnte lediglich O-Nitrophenol nachgewiesen werden (Fig. 23d). Eine approximative Quantifizierung der drei dominierenden Komponenten ergab für ONP 2 µg/Zecke, für MS 1 µg/Zecke und für PS 8 µg/Zecke.

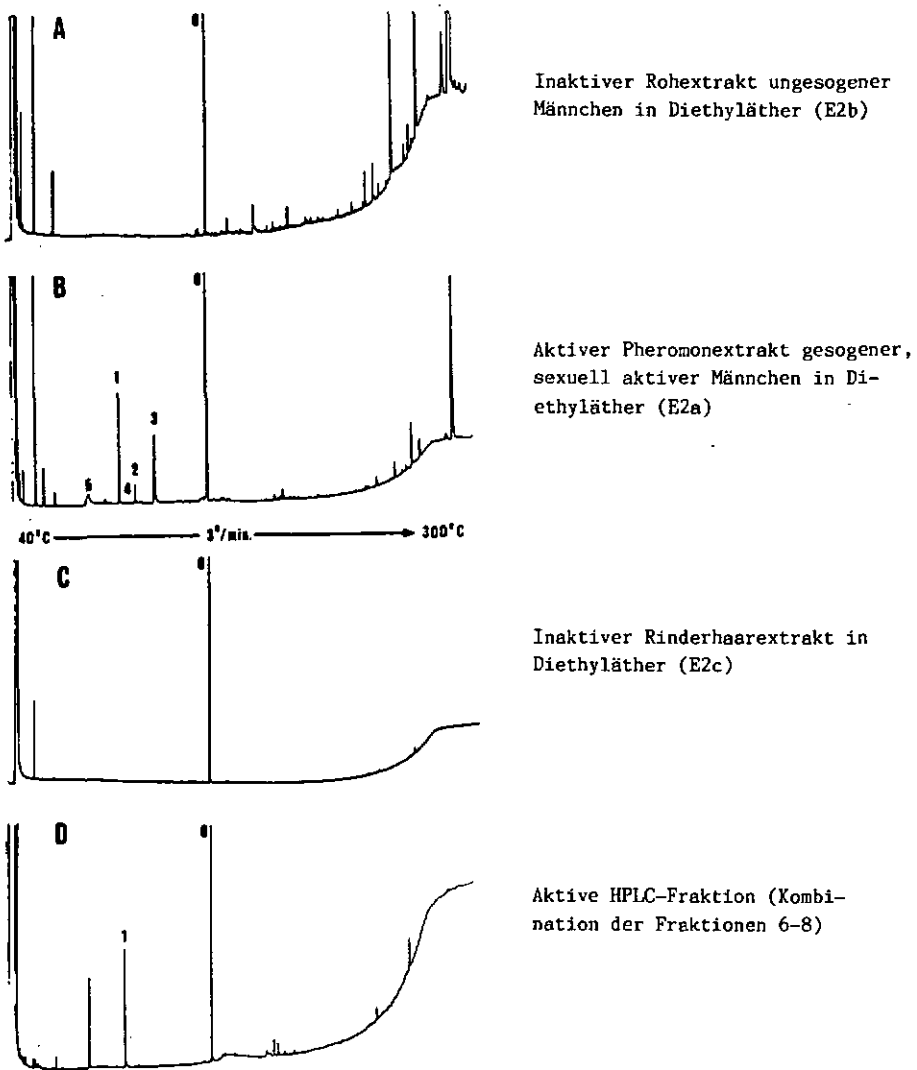
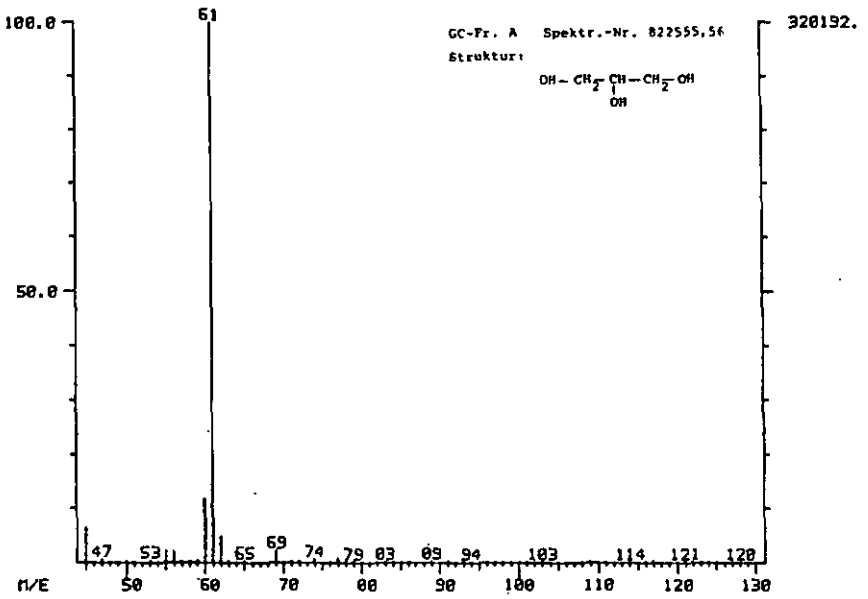


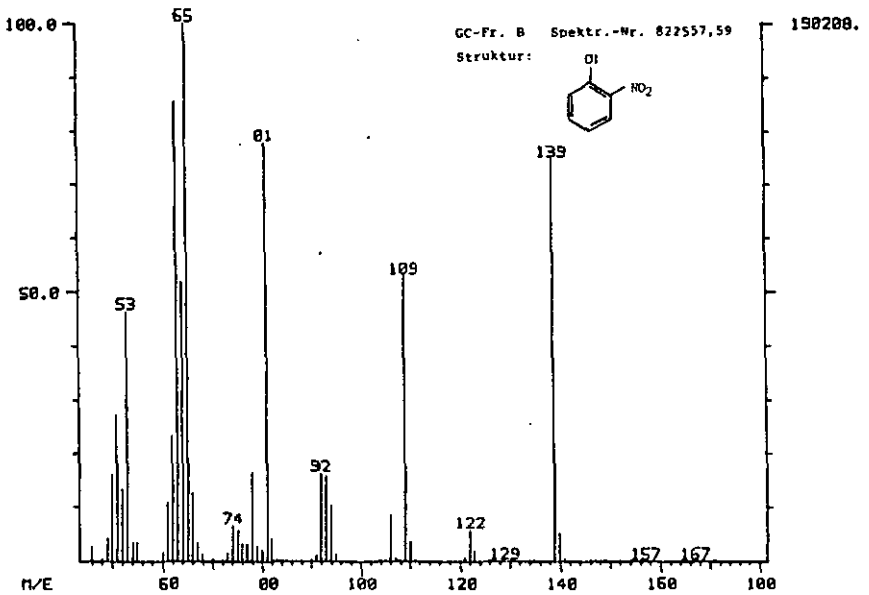
FIG. 23: GC-Chromatogramme der Rohextrakte E2a, E2b und E2c sowie der aktiven HPLC-Fraktionen

1. O-Nitrophenol (= GC-Fraktion B)
2. Methylsalicylat (= GC-Fraktion D)
3. Pelargonsäure (= GC-Fraktion E)
4. Benzoesäure (= GC-Fraktion C)
5. Glycerin (= GC-Fraktion A)
6. 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (Antioxidantium)

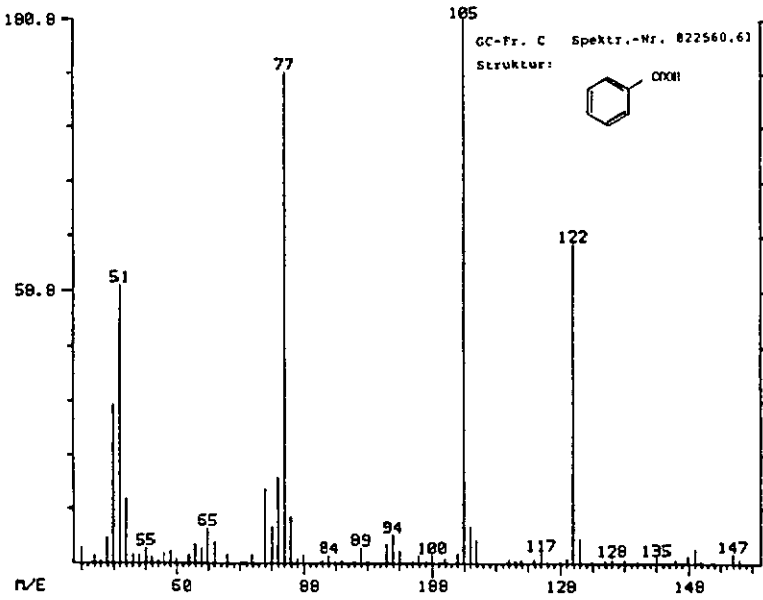
MASSENSPEKTRUM DER GC - FRAKTION A / GLYCERIN



MASSENSPEKTRUM DER GC - FRAKTION B / O-NITROPHENOL

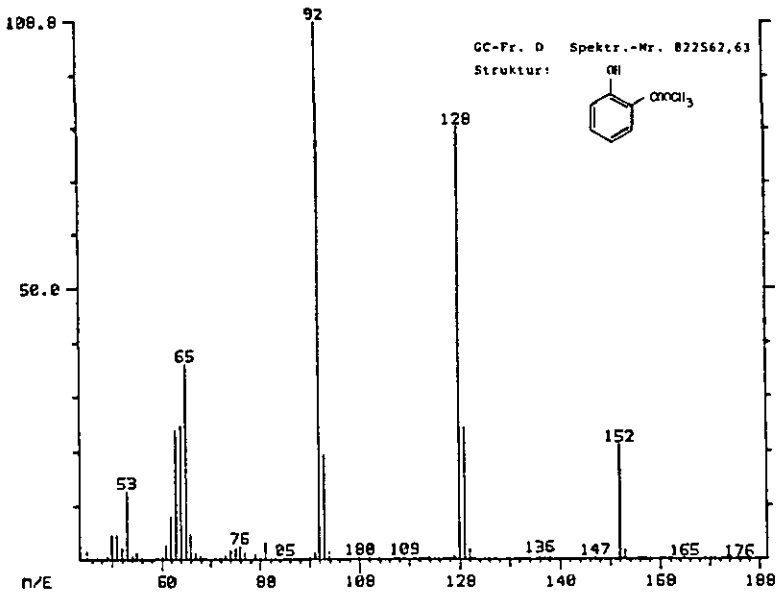


MASSENSPEKTRUM DER GC - FRAKTION C / BENZOESÄURE



27888.

MASSENSPEKTRUM DER GC - FRAKTION D / METHYLSALICYLAT



79616.

MASSENSPEKTRUM DER GC - FRAKTION E / PELARGONSÄURE

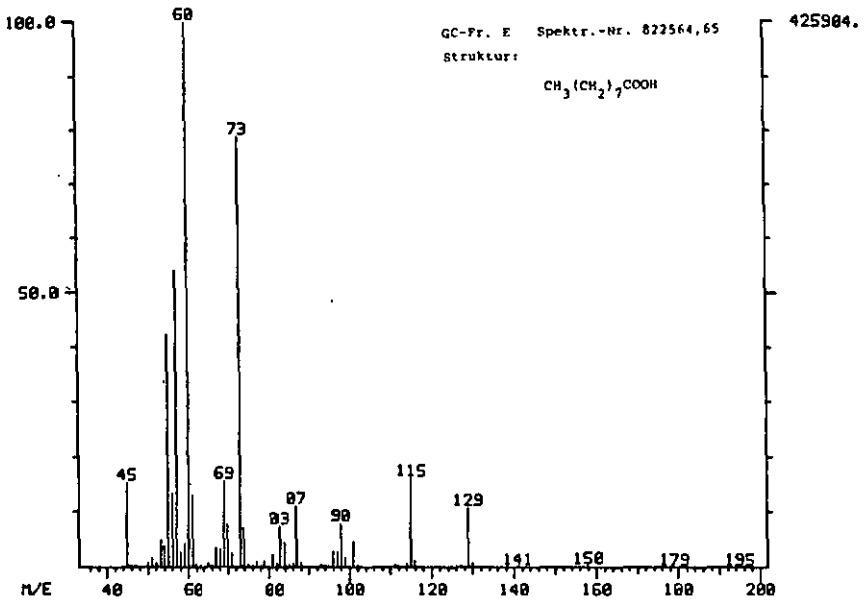


Fig. 24: Massenspektren und Strukturformeln der GC-Fractionen A-E (vergl. dazu Fig. 23).

3. Versuche zur Wirkung des synthetischen Pheromons

3.1. Wirkung der isolierten Pheromonkomponenten in der Arena

Die einzelnen identifizierten Substanzen wurden in weiteren Serien von Standardversuchen in der Arena mit ungesogenen Männchen und Weibchen auf ihren Beitrag zur pheromonalen Wirkung hin untersucht. Die Resultate dieser Versuche sind in den Figuren 25 a+b dargestellt.

Wurden die drei dominierenden identifizierten Komponenten des aktiven Extraktes, d.h. O-Nitrophenol (ONP), Methylsalicylat (MS) und Pelargonensäure (PS) als synthetisches Pheromongemisch im Testsektor angeboten, so war die Wirkung hoch signifikant attraktiv und aggregationsauslösend und von der Wirkung des aktiven Diethylätherextraktes gesogener Männchen nicht unterscheidbar (vergl. dazu Fig. 21 a+b). Wurden dagegen die einzelnen Substanzen in den gleichen Konzentrationen wie im synthetischen Gemisch angeboten, so zeigte sich entweder keine oder nur eine unvollständige Wirkung. Im Fall des Methylsalicylats oder der Pelargonensäure konnte keine sichtbare Wirkung der isolierten Substanzen festgestellt werden. Im Fall von O-Nitrophenol kam eine dynamische Aggregation zustande, d.h. die Zecken wurden zwar von der Testkapsel angelockt und vom Stimulus sichtlich erregt, zeigten aber keine Tendenz zu einem Klammerverhalten oder zum Verharren. Häufig verliessen die Zecken den Testsektor nach einer gewissen Zeit wieder, um auf der weiteren Suche wieder zu ihm zurückzukehren. Obwohl sich durch dieses Verhalten während der ganzen Dauer des Versuchs eine sichtbare Konzentration der Zecken im Bereich des Testsektors ergab, waren im Vergleich zu den Versuchen mit dem synthetischen Pheromon nach 10 Minuten Testdauer weniger angelockte und stimulierte Zecken in Kontakt mit dem Filterpapier des Testsektors. Es kann deshalb in diesem Fall von einer "dynamischen" Aggregation gesprochen werden.

3.2. Die Wahrnehmungsschwelle des synthetischen Pheromons

In einer Serie von Standardversuchen in der Arena wurde abgeklärt, in welchem Konzentrationsbereich des synthetischen Pheromons die Aktivitätsgrenze zu suchen ist. Ausgehend von der Stammlösung (vergl. S. 32) wurde in drei Zehnerschritten eine Verdünnungsreihe hergestellt und in der Arena getestet. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Figuren 26 a+b dargestellt. Daraus ergibt sich, dass die Aktivitätsgrenze in einem Bereich von 10^{-3} bis 10^{-2} liegen muss. Eine tausendfache Verdünnung der Stammlösung zeigte keine Wirkung

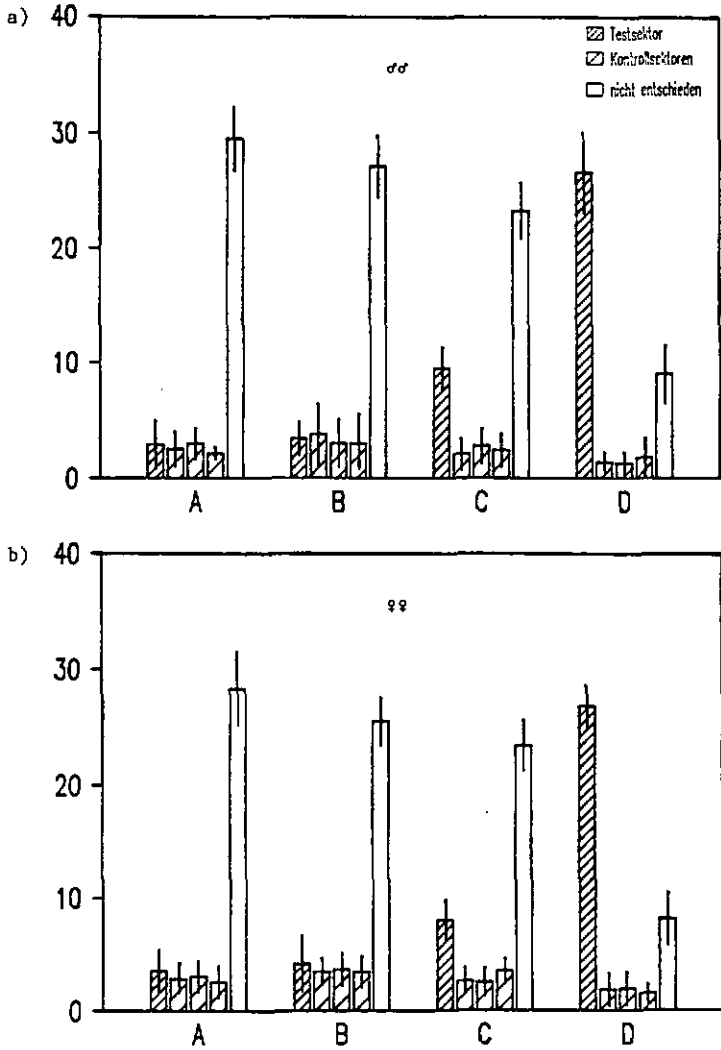


FIG. 25: Versuch mit je 40 ungesogenen Männchen (a) und Weibchen (b) zur Wirkung der isolierten Pheromonkomponenten in der Arena. Mittelwerte und Standardabweichungen über je 8 Wiederholungen.

- A: Testsektor: 10 μ l Pelargonsäure (0.8 mg/ml) in Diethyläther
- B: " : 10 μ l Methylsalicylat (0.1 mg/ml) in Diethyläther
- C: " : 10 μ l O-Nitrophenol (0.2 mg/ml) in Diethyläther
- D: " : 10 μ l synthetisches Pheromon (0.2/0.1/0.8 mg/ml) in Diethyläther

Kontrollsektoren: je 10 μ l Diethyläther

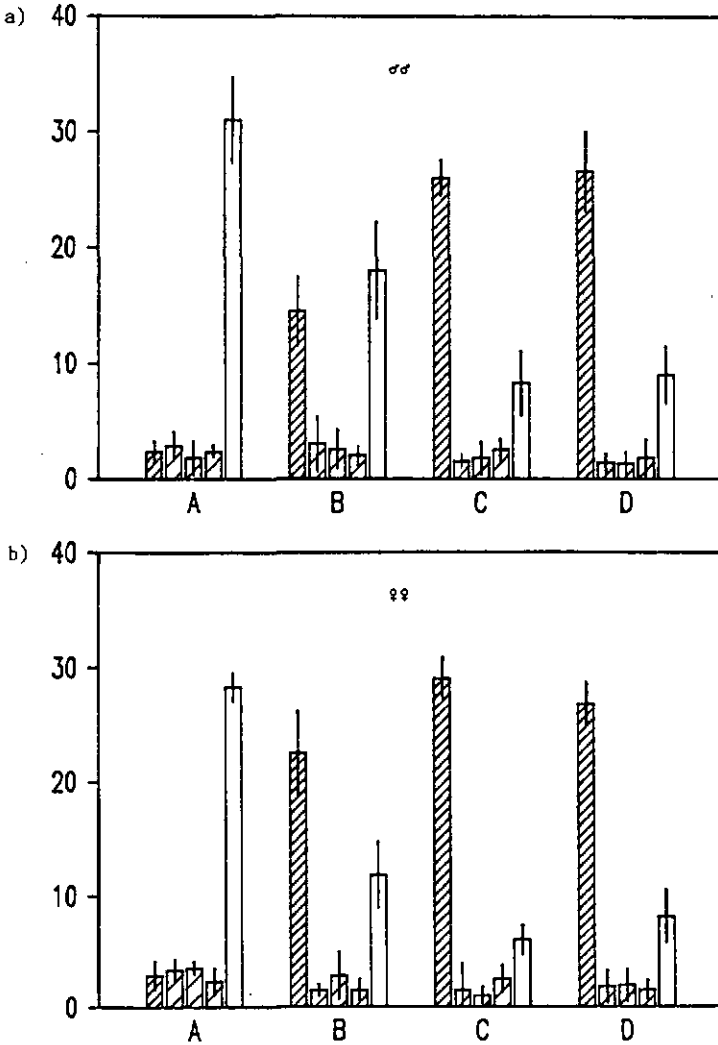


FIG. 26: Versuche mit je 40 ungesogenen Männchen (a) und Weibchen (b) zur Wahrnehmungsschwelle des synthetischen Pheromons in der Arena. Mittelwerte und Standardabweichungen über je 4 Wiederholungen.

Applikation im Testsektor: 10 μ l

- A: Testsektor: 1000fache Verdünnung der Stammlösung des synthetischen Pheromons in Diethyläther
- B: " : 100fache Verdünnung der Stammlösung
- C: " : 10fache Verdünnung der Stammlösung
- D: " : Stammlösung

mehr, während eine hundertfache Verdünnung bereits eine hoch signifikante Aggregation im Testsektor zur Folge hatte. Da jeweils nur 10 µl der Testlösung auf die Watte in der Testkapsel pipettiert wurden, entspricht das im Fall der hundertfachen Verdünnung einer Applikation von 20 ng ONP, 10 ng MS und 80 ng PS im Testsektor.

3.3. Die konzentrationsabhängige Wirkung von ONP

Ausgehend von einer Stammlösung von 10 mg ONP/ml DEE wurde eine Verdünnungsreihe von 1/10 bis 1/10'000 in DEE hergestellt. Diese Verdünnungsreihe wurde in einer Serie von Standardversuchen in der Arena mit ungesogenen Männchen und Weibchen auf ihre Wirkung geprüft. Die Resultate dieser Versuche sind in den Figuren 27 a+b wiedergegeben.

Diese Versuchsreihe gab Hinweise auf einige interessante Parallelen und Differenzen in der Antwort der beiden Geschlechter auf die Stimulierung mit ONP. Eine auffällige Parallele bestand in der Gesamttendenz des Verhaltens beider Geschlechter in Bezug auf die zunehmende Konzentration des Teststimulus. Bei der niedrigsten Konzentration von 0.001 mg/ml, was einer Applikation von 10 ng im Testsektor entspricht, zeigte sich in beiden Fällen eine leichte, noch undeutliche Aggregation im Testsektor. In beiden Fällen war gleichzeitig der diagonal gegenüberliegende und damit am weitesten entfernt liegende Kontrollsektor am schwächsten besetzt. Die steigende Konzentration hatte zur Folge, dass in beiden Fällen die Tendenz zur Aggregation im Testsektor zunächst verstärkt, dann aber wieder neutralisiert wurde. In den höchsten Konzentrationen hatte ONP sogar eine repellente Wirkung. Der Testsektor war in diesen Fällen am schwächsten besetzt, während der diagonal gegenüberliegende Kontrollsektor die meisten Zecken aufwies.

Diese Grundtendenz war bei beiden Geschlechtern deutlich ausgeprägt, aber in auffälliger Weise phasenverschoben. So war bei den Männchen ein Maximum der Aggregation bereits bei einer Konzentration von 0.01 mg/ml erreicht, während dies bei den Weibchen erst bei einer Konzentration von 0.1 mg/ml der Fall war. Analog dazu war bei den Männchen eine Tendenz zur Repellenz bereits bei einer Konzentration von 1 mg/ml erkennbar, während sie bei den Weibchen erst bei einer Konzentration von 10 mg/ml auftrat. Dieser Sachverhalt ist in Figur 28 wiedergegeben.

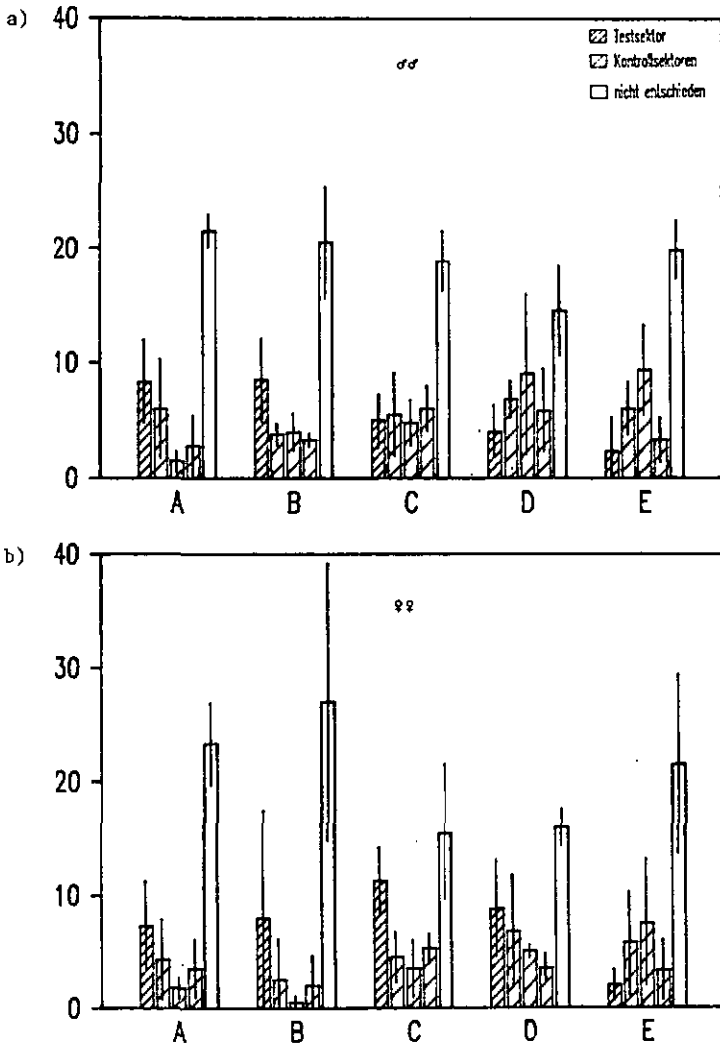


FIG. 27: Versuche mit je 40 ungesogenen Männchen (a) und Weibchen (b) zur Konzentrationsabhängigen Wirkung von ONP in der Arena. Mittelwerte und Standardabweichungen über je 4 Wiederholungen.

- A: Testsektor: 10 µl ONP (0.001 mg/ml) in Diethyläther
 - B: " : 10 µl ONP (0.01 mg/ml) in Diethyläther
 - C: " : 10 µl ONP (0.1 mg/ml) in Diethyläther
 - D: " : 10 µl ONP (1 mg/ml) in Diethyläther
 - E: " : 10 µl ONP (10 mg/ml) in Diethyläther
- Kontrollsektoren: je 10 µl Diethyläther

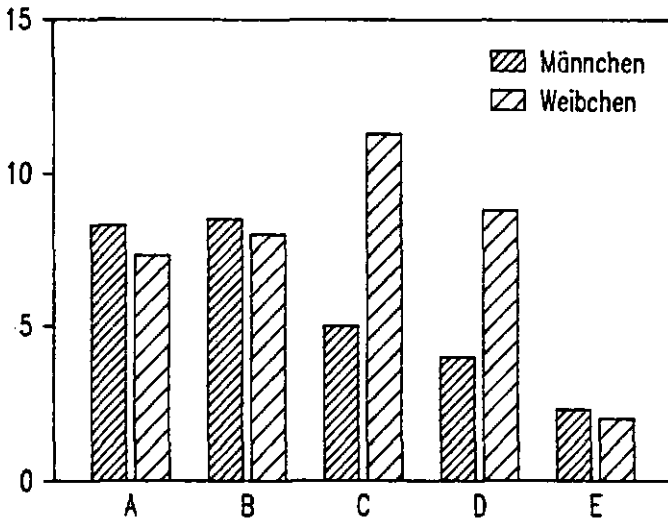


FIG. 28: Vergleich der Antworten von Männchen und Weibchen im Arena-Test auf die Stimulierung mit einer Verdünnungsreihe von ONP (0.001 mg/ml - 10 mg/ml) in Diethyläther. Dargestellt ist jeweils die Anzahl Zecken, die sich nach Ablauf der Testdauer von 10 Minuten im Testsektor befanden (vergl. dazu Fig. 27).

3.4. Die Zusammensetzung des Pheromons

Unmittelbar nach der Identifikation der aktiven Bestandteile des Pheromons, als deren Gewichtsanteile im Rohextrakt noch nicht restlos bekannt waren, wurde bereits eine grössere Serie von Versuchen mit denselben Substanzen, in Konzentrationen derselben Grössenordnung, aber mit verschiedenen Gewichtsanteilen durchgeführt. Folgende Lösungen wurden verwendet:

- 0.25 mg/ml DEE O-Nitrophenol
- 0.10 mg/ml DEE Methylsalicylat
- 0.15 mg/ml DEE Pelargonsäure

Das synthetische Pheromon bestand wiederum in einer Lösung dieser drei Komponenten in den gleichen Gewichtsanteilen. Wie die Figuren 29 a+b zeigen, waren die Resultate dieser Versuche nicht wesentlich verschieden von denjenigen, die später mit den korrigierten und definitiven Proportionen erzielt wurden. Auch bei den Versuchen mit Verdünnungsreihen des synthetischen Pheromons zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Ergebnissen, die mit den alten und denjenigen, die mit den korrigierten Gewichtsanteilen gewonnen wurden (Fig. 30 a+b).

3.5. Die Varianz der Antwort auf O-Nitrophenol

In den meisten Fällen, in denen die Antwort der Zecken auf einzelne Komponenten des Pheromons getestet wurde, hatten die Zecken vor Beginn der Serie Kontakt mit dem aktiven Rohextrakt oder mit dem vollständigen synthetischen Pheromon. So konnte jeweils überprüft werden, ob die im Test verwendeten Zecken auf eine Stimulierung mit dem Pheromon eine deutliche Aggregation im Testsektor zeigten. In einem einzelnen Fall waren die Zecken allerdings nach der Häutung nie in Kontakt mit dem natürlichen oder synthetischen Pheromon gewesen. Als erster und einziger Stimulus wurde ihnen 10 µl einer ONP-Lösung in DEE (0.25 mg/ml) im Testsektor angeboten. Dieser Versuch wurde in je 4 Wiederholungen sowohl mit ungesogenen Männchen als auch Weibchen durchgeführt. In beiden Fällen bildete sich keinerlei Aggregation im Testsektor (Fig. 31A). Die Zecken wurden anschliessend in den Zuchtraum gebracht und erst acht Tage später wieder verwendet. Diesmal wurde ihre Reaktion auf das synthetische Pheromon geprüft. In beiden Fällen bildeten sich Aggregationen im Testsektor (Fig. 31B). Verglichen mit der vollen Antwort auf diesen Stimulus waren die Aggregationen jedoch noch schwach. Die Zecken wurden wiederum für zwei

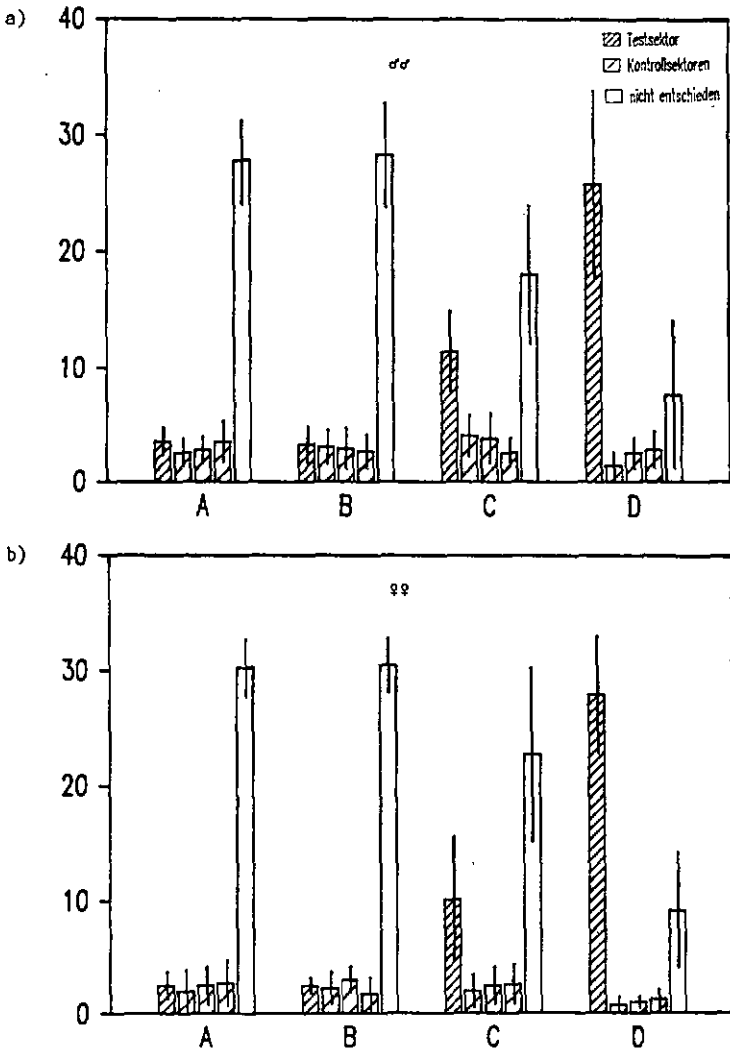


FIG. 29: Versuche mit je 40 ungesogenen Männchen (a) und Weibchen (b) zur Wirkung der isolierten Pheromonkomponenten in der Arena. Mittelwerte und Standardabweichungen über je 8 Wiederholungen (vergl. dazu Fig. 25a+b). Ausnahme: A/Pelargonsäure je 4 Wiederholungen.

- A: Testsektor: 10 μ l Pelargonsäure (0.15 mg/ml) in Diethyläther
 B: " : 10 μ l Methylsalicylat (0.1 mg/ml) in Diethyläther
 C: " : 10 μ l O-Nitrophenol (0.25 mg/ml) in Diethyläther
 D: " : 10 μ l synthetisches Pheromon (0.25/0.1/0.15 mg/ml) in Diethyläther
 Kontrollsektoren: je 10 μ l Diethyläther

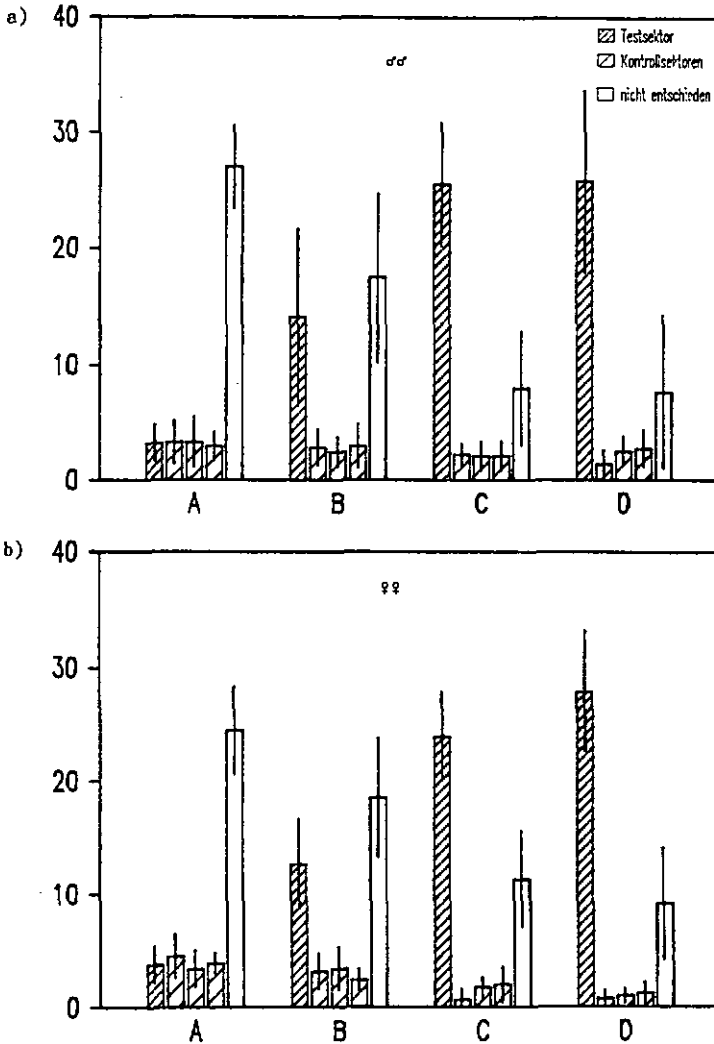


FIG. 30: Versuche mit je 40 ungesogenen Männchen (a) und Weibchen (b) zur Wahrnehmungsschwelle des synthetischen Pheromons in der Arena.

A: Testsektor: 10 μ l einer 1000fachen Verdünnung des synthetischen Pheromons (0.25 mg/ml ONP, 0.1 mg/ml MS, 0.15 mg/ml PS) in Diethyläther
B: " : 10 μ l einer 100fachen Verdünnung
C: " : 10 μ l einer 10fachen Verdünnung
D: " : 10 μ l der Stammlösung
Kontrollsektoren: je 10 μ l Diethyläther

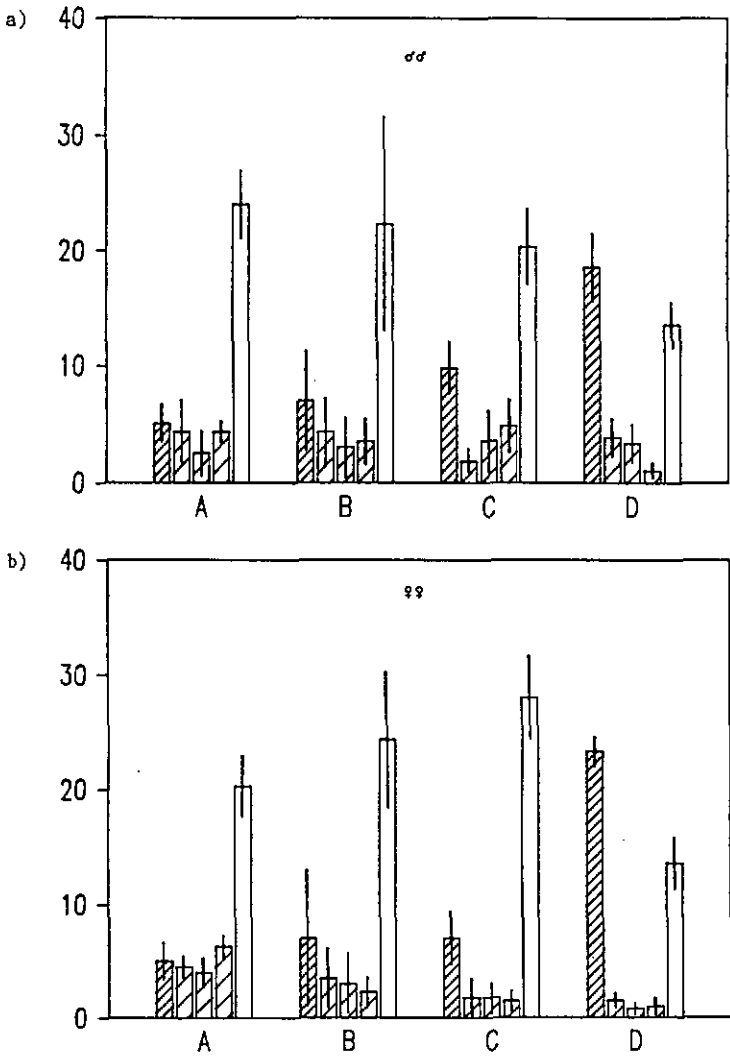


FIG. 31: Versuche mit je 40 ungesogenen Männchen (a) und Weibchen (b) zur Varianz der Antwort auf O-Nitrophenol.

- A: Testsektor: 10 μ l einer DNP-Lösung (0.25 mg/ml) in Diethyläther
 - B: " : 10 μ l des synthetischen Pheromons (0.25 mg/ml ONP, 0.1 mg/ml MS, 0.15 mg/ml PS) in Diethyläther (B. Tag)
 - C: " : 10 μ l einer ONP-Lösung (0.25 mg/ml) in Diethyläther (10. Tag)
 - D: " : 10 μ l des synthetischen Pheromons in Diethyläther (10. Tag)
- Kontrollsektoren: je 10 μ l Diethyläther

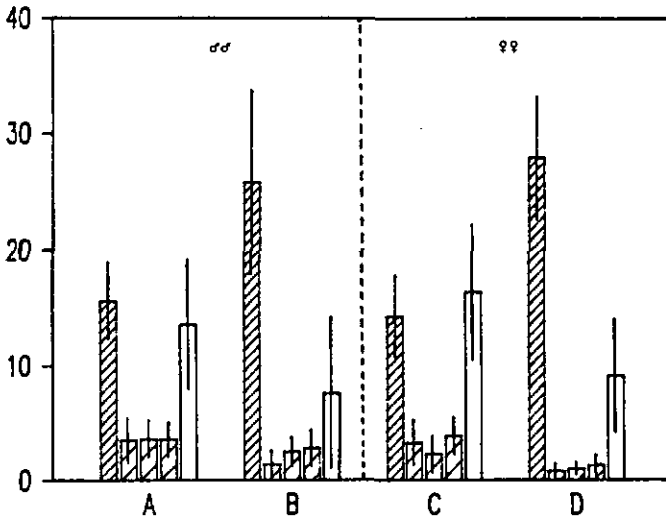


FIG. 32: Versuche mit je 40 ungesogenen Männchen (A+B) und Weibchen (C+D) zur Wirkung der Kombination von Methylsalicylat und Pelargonsäure in der Arena.

A, C: Testsektor: 10 μ l Methylsalicylat (0.1 mg/ml) in Diethyläther +
10 μ l Pelargonsäure (0.15 mg/ml) in Diethyläther
B, D: " : 10 μ l des synthetischen Pheromons in Diethyläther
Kontrollsektoren : je 10 μ l Diethyläther

Tage in den Zuchtraum gebracht. Zehn Tage nach dem ersten Versuch wurde ihre Antwort sowohl auf das synthetische Pheromon als auch auf das isolierte ONP geprüft. Diesmal war in allen Fällen die Antwort der Zecken von gewohnter Stärke (Fig. 31 C+D). Diese Versuche gaben Hinweise darauf, dass bestimmte alters- oder erfahrungsbedingte Umstände die Antwort der Zecken auf eine bestimmte Reizsituation stark beeinflussen können. Dieser Tatsache wurde in der Folge dadurch Rechnung getragen, dass weiterhin die Zecken vor jedem Ansatz auf ihre Reaktion auf das synthetische Pheromon hin geprüft wurden, um sicherzustellen, dass alle verwendeten Zecken eine volle Reaktion auf die Stimulierung durch das Pheromon zeigten.

3.6. Die Wirkung der Kombination von Methylsalicylat und Pelargonsäure

Für diese Versuche wurden ebenfalls noch die alten Konzentrationen der Komponenten verwendet (vergl. S. 32). Die Versuche wurden mit je 40 ungesogenen Männchen und Weibchen durchgeführt. Vorangegangene Versuche mit diesen Zecken hatten bereits gezeigt, dass die Stimulierungen mit den isolierten Komponenten Methylsalicylat (0.1 mg/ml) und Pelargonsäure (0.15 mg/ml) in der Arena keine Aggregation bewirkten. Wurden die beiden Stoffe in denselben Konzentrationen aber gemeinsam angeboten, entstanden deutliche Aggregationen im jeweiligen Testsektor, sowohl im Fall der Männchen (Fig. 32A) als auch der Weibchen (Fig. 32C). Verglichen mit der Antwort auf das synthetische Pheromon (Fig. 32 B,D) waren aber in beiden Fällen diese Aggregationen deutlich schwächer.

4. Versuche zur Spezifität des Pheromons

Parallel zur letzten Extraktion gesogener, sexuell aktiver Männchen von A. variegatum wurden mit derselben Methode auch gesogene, sexuell aktive Männchen und ungesogene Männchen der nahe verwandten Art A. hebraeum extrahiert. Diese Extrakte wurden, wie zuvor der aktive Pheromonextrakt von A. variegatum, von Chemikern der Ciba-Geigy in Basel analysiert und verglichen. Die Analyse, die bis heute noch nicht vollständig abgeschlossen ist, ergab die folgende vorläufige Liste von Substanzen, die ausschliesslich im Extrakt der gesogenen Männchen gefunden wurden. Ein Zeckenäquivalent enthielt:

35% Pelargonsäure	2% Benzaldehyd
19% Benzoesäure	2% Oenanthsäure
19% Phenyllessigsäure	1% Cyclohexansäure
5% Caprinsäure	1% O-Nitrophenol
4% Caprylsäure	5% weitere, bisher unbekannte Substanz

Auffällig ist, dass auch im Pheromon dieser Art, ebenso wie bei A. variegatum, die Pelargonsäure mit einem hohen Anteil vertreten ist. O-Nitrophenol ist dagegen mit 1% vertreten und Methylsalicylat überhaupt nicht. Dagegen konnten in diesem Pheromonextrakt die beiden hoch volatilen und intensiv riechenden Stoffe Benzoesäure und Phenyllessigsäure in grösseren Mengen nachgewiesen werden. Eine definitive Quantifizierung der einzelnen Komponenten konnte bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit nicht gegeben werden. Generell lagen aber die Konzentrationen um ca. eine Zehnerpotenz tiefer als im aktiven Extrakt von A. variegatum.

Um weitere Hinweise auf die Spezifität der Pheromone und insbesondere auf die Antwort beider Arten auf das Pheromon der jeweils anderen Art zu erhalten, wurden verschiedene Versuche in der Arena durchgeführt. Die dabei verwendeten A. hebraeum stammten aus der gleichen Quelle und wurden unter den gleichen Bedingungen gezüchtet wie für A. variegatum in Material und Methode beschrieben. Es handelte sich allerdings um einen etablierten Laborstamm, der bereits über viele Generationen hinweg im Labor gezüchtet wurde. Alle hier beschriebenen Versuche sind deshalb als vorläufig zu betrachten, und sollten mit wildstämmigen Zecken dieser Art verifiziert werden, können aber für Folgearbeiten auf diesem Gebiet wichtige Hinweise liefern.

Zunächst einmal wurde in einem Zwei-Wahl-Test, bei dem nur zwei der vier Ecken der Arena als Testaktoren verwendet wurden, auf einer Seite 5 gesogene, sexuell aktive Männchen von A. variegatum und auf der anderen Seite 5 gesogene, sexuell aktive Männchen von A. hebraeum in eine Metallkapsel eingeschlossen und im Testaktor als Teststimuli angeboten. Wie im Standardtest wurden anschliessend nacheinander je 40 ungesogene Männchen und Weibchen beider Arten eingesetzt und auf ihre Reaktion getestet. Jeder Ansatz wurde 4 mal wiederholt. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Figur 33 wiedergegeben. Es zeigt deutlich, dass wiederum die Antwort der Männchen und Weibchen innerhalb derselben Art direkt vergleichbar war. Ein grosser Unterschied zeigte sich allerdings zwischen den Arten. Während sowohl Männchen als auch Weibchen von A. variegatum fast ausschliesslich um die Kapsel mit

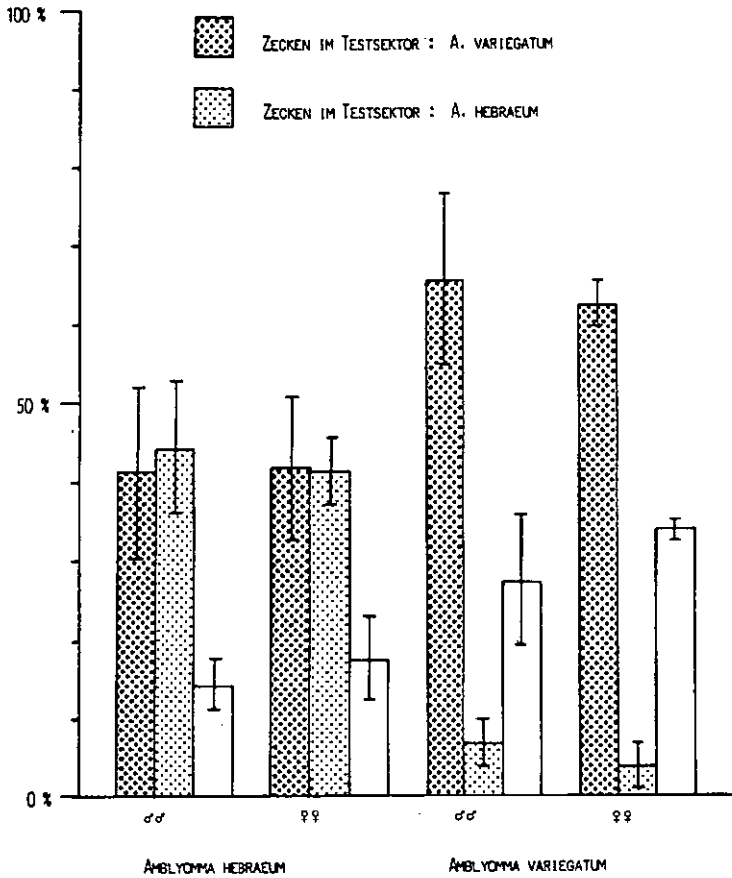


FIG. 33: Vergleich der Antwort von A. variegatum und A. hebraeum auf gesogene, sexuell aktive Männchen der eigenen und der jeweils anderen Art.

Testsektor links: 5 gesogene, sexuell aktive Männchen der Art Amblyomma variegatum

" rechts: 5 gesogene, sexuell aktive Männchen der Art Amblyomma hebraeum

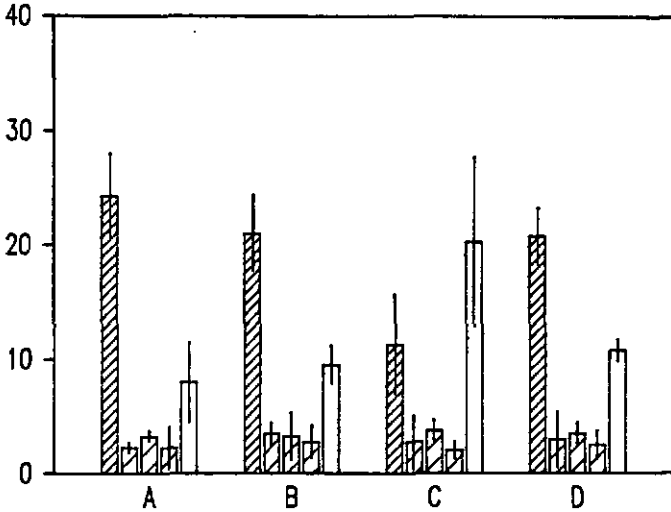


FIG. 34: Versuche zur Antwort von 40 ungesogenen Männchen der Art Amblyomma hebraeum auf gesogene, sexuell aktive Männchen der Art Amblyomma variegatum und deren Pheromonkomponenten.

- A: Testsektor: 2 gesogene, sexuell aktive Männchen der Art A. variegatum
B: " : 10 µl des aktiven Pheromonextraktes (E1) von A. variegatum
C: " : 10 µl O-Nitrophenol (0.2 mg/ml) in Diethyläther
D: " : 10 µl synthetisches Pheromon (0.2 mg/ml ONP, 0.1 mg/ml MS, 0.8 mg/ml PS) in Diethyläther
Kontrollsektoren: je 10 µl Diethyläther

den eingeschlossenen Männchen der eigenen Art eine dichte Aggregation bildeten, verteilten sich stimulierte und angelockte Männchen und Weibchen von A. hebraeum fast gleichmässig auf beide Kapseln. Somit zeigten die Zecken der Art A. variegatum eine deutliche innerartliche Attraktivität, die bei den Zecken der Art A. hebraeum nicht zu erkennen war. Zusätzliche Hinweise für diese Tatsache gab eine weitere Serie von Versuchen, bei denen das Verhalten ungesogener Männchen von A. hebraeum im Standardtest untersucht wurde. Die Resultate dieser Versuche sind in der Figur 34 zusammengefasst. Sie decken sich weitgehend mit denjenigen der Versuche, welche unter gleichen Bedingungen mit ungesogenen Männchen der Art A. variegatum durchgeführt worden waren.

5. Versuche zur Reaktion von A. variegatum auf die Substitution von Methylsalicylat im Pheromongemisch

In zwei kleinen Serien von Versuchen in der Arena wurde mit einigen wenigen ausgewählten Substanzen geprüft, ob im synthetischen Pheromongemisch das Methylsalicylat durch eine andere, von der Struktur her ähnliche Substanz ersetzt werden kann. Von besonderem Interesse waren dabei die Substanzen Benzoesäure und Phenyllessigsäure, welche als dominierende Komponenten im Extrakt gesogener Männchen von A. hebraeum gefunden worden waren. Zusätzlich wurde auch Salicylsäure, der unveresterte Säureanteil des Methylsalicylats geprüft. Die drei Substanzen wurden jeweils zuerst isoliert angeboten, dann mit O-Nitrophenol (0.2 mg/ml), anschliessend mit Pelargonsäure (0.8 mg/ml) kombiniert und schliesslich mit ONP und PS gleichzeitig angeboten. Schliesslich wurde den Zecken noch das vollständige synthetische Pheromon angeboten. Jeder Versuch wurde 2 mal wiederholt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Figuren 35-38 dargestellt. Sie zeigten, dass keine der getesteten Substanzen in der verwendeten Konzentration für ungesogene Weibchen von A. variegatum eine attraktive oder aggregationsauslösende Wirkung hatte. Eine Kombination mit O-Nitrophenol zeigte ebenfalls in keinem Fall eine Wirkung. Die Kombination von Phenyllessigsäure und Pelargonsäure war ebenfalls wirkungslos, während die Kombination von Benzoesäure oder Salicylsäure mit Pelargonsäure in beiden Fällen eine schwache, aber dennoch deutlich erkennbare attraktive und aggregationsauslösende Wirkung zeigten. Die gemeinsame Applikation zusammen mit O-Nitrophenol und Pelargonsäure ergab in allen Fällen eine deutliche, wenn auch im Vergleich zum synthetischen Pheromon schwächere aggregationsauslösende Wirkung.

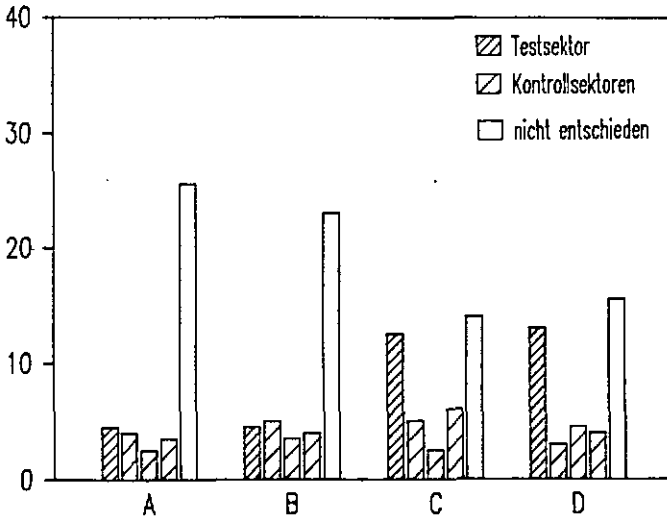


Fig. 35: Versuche mit je 40 ungesogenen Weibchen zur Substitution von Methylsalicylat im Pheromongemisch durch Benzoesäure in der Arena. Mittelwerte über je 2 Wiederholungen.

- A: Testsektor: 10 μ l Benzoesäure (0.1 mg/ml)
 - B: " : 10 μ l Benzoesäure (0.1 mg/ml) +
10 μ l O-Nitrophenol (0.2 mg/ml)
 - C: " : 10 μ l Benzoesäure (0.1 mg/ml) +
10 μ l Pelargonsäure (0.8 mg/ml)
 - D: " : 10 μ l Benzoesäure (0.1 mg/ml) +
10 μ l O-Nitrophenol (0.2 mg/ml) +
10 μ l Pelargonsäure (0.8 mg/ml)
- Kontrollsektoren: je 10 μ l Diethyläther

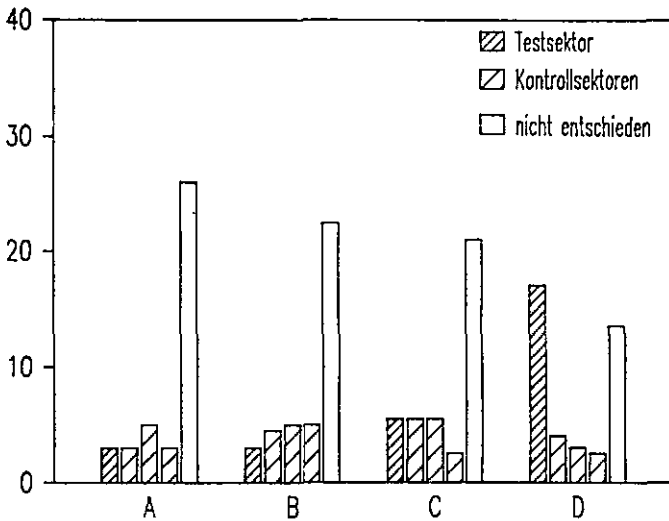


FIG. 36: Versuche mit je 40 ungesogenen Weibchen zur Substitution von Methylsalicylat im Pheromongemisch durch Phenylessigsäure in der Arena. Mittelwerte über je 2 Wiederholungen.

- A: Testsektor: 10 μ l Phenylessigsäure (0.1 mg/ml)
- B: " : 10 μ l Phenylessigsäure (0.1 mg/ml) +
10 μ l O-Nitrophenol (0.2 mg/ml)
- C: " : 10 μ l Phenylessigsäure (0.1 mg/ml) +
10 μ l Pelargonsäure (0.8 mg/ml)
- D: " : 10 μ l Phenylessigsäure (0.1 mg/ml) +
10 μ l O-Nitrophenol (0.2 mg/ml) +
10 μ l Pelargonsäure (0.8 mg/ml)

Kontrollsektoren: je 10 μ l Diethyläther

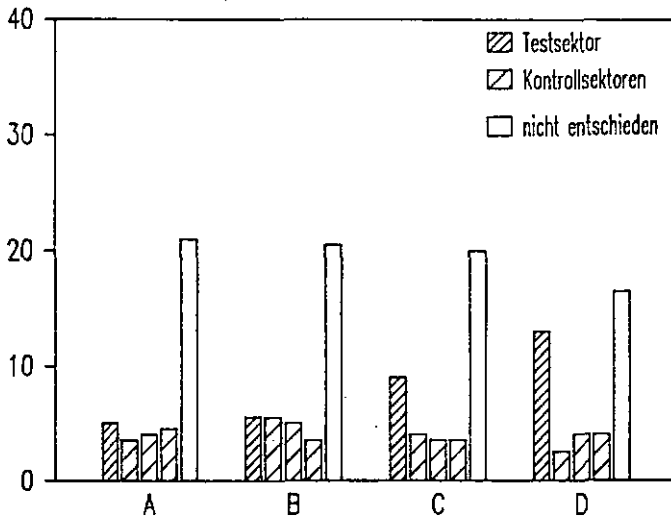


FIG. 37: Versuche mit je 40 ungesogenen Weibchen zur Substitution von Methylsalicylat im Pheromongemisch durch Salicylsäure in der Arena. Mittelwerte über je 2 Wiederholungen.

- A: Testsektor: 10 μ l Salicylsäure (0.1 mg/ml)
- B: " : 10 μ l Salicylsäure (0.1 mg/ml) +
10 μ l O-Nitrophenol (0.2 mg/ml)
- C: " : 10 μ l Salicylsäure (0.1 mg/ml) +
10 μ l Pelargonsäure (0.8 mg/ml)
- D: " : 10 μ l Salicylsäure (0.1 mg/ml) +
10 μ l O-Nitrophenol (0.2 mg/ml) +
10 μ l Pelargonsäure (0.8 mg/ml)

Kontrollsektoren: je 10 μ l Diethyläther

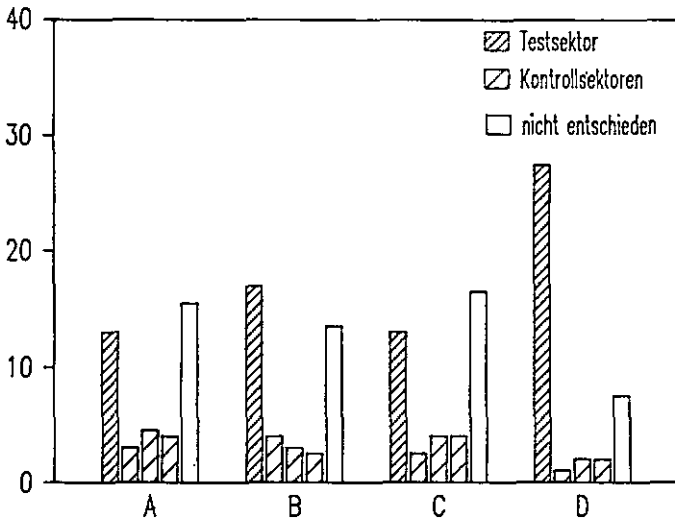


FIG. 38: Vergleich aller Versuche, bei denen Methylsalicylat im synthetischen Pheromon durch Benzoesäure, Phenyllessigsäure oder Salicylsäure ersetzt wurde und dem Resultat der Versuche mit dem synthetischen Pheromon.

- A: Testsektor: 10 μ l Benzoesäure (0.1 mg/ml) +
10 μ l O-Nitrophenol (0.2 mg/ml) +
10 μ l Pelargonsäure (0.8 mg/ml)
- B: " : 10 μ l Phenyllessigsäure (0.1 mg/ml) +
10 μ l O-Nitrophenol (0.2 mg/ml) +
10 μ l Pelargonsäure (0.8 mg/ml)
- C: " : 10 μ l Salicylsäure (0.1 mg/ml) +
10 μ l O-Nitrophenol (0.2 mg/ml) +
10 μ l Pelargonsäure (0.8 mg/ml)
- D: " 10 μ l Methylsalicylat (0.1 mg/ml) +
10 μ l O-Nitrophenol (0.2 mg/ml) +
10 μ l Pelargonsäure (0.8 mg/ml)

Kontrollsektoren: je 10 μ l Diethyläther

6. Sinnesphysiologie

6.1. Verteilung, Morphologie und Ultrastruktur der untersuchten olfaktorischen Sensillen

Eine detaillierte Studie zur Verteilung, Morphologie und Ultrastruktur der Sinneshaare auf den Tarsen des ersten Beinpaars aller Entwicklungsstadien von Amblyomma variegatum wurde von Hess und Vlimant (1982, 1983a+b) durchgeführt. Diese Studie war eine wesentliche Grundlage für meine eigenen sinnesphysiologischen Arbeiten. Da ich im folgenden jeweils auf die darin vorgeschlagene Nomenklatur bezug nehme, möchte ich anschliessend an eine kurze Einführung einige wichtige Ergebnisse dieser Studie, soweit sie meine eigene Arbeit betreffen, zusammenfassen und darstellen. Die dafür verwendeten elektronenmikroskopischen Aufnahmen, Graphiken und Tabellen sind den erwähnten Publikationen entnommen oder wurden mir von Hess & Vlimant für diesen Zweck zur Verfügung gestellt.

Sowohl bei argasiden als auch ixodiden Zeckenarten sind Sensillen, die der Geruchswahrnehmung dienen, im wesentlichen auf die Tarsen des ersten Beinpaars beschränkt. Insbesondere bei den ixodiden Arten übernimmt deshalb das erste Beinpaar analoge Funktionen zu denjenigen der Antenne bei Insekten und anderen Arthropoden. Während aber auf der Insektenantenne olfaktorische Sensillen in der Regel in grosser Zahl mehr oder weniger gleichmässig auf die gesamte Oberfläche der Extremität verteilt sind, sind sie bei den Zecken als einzelne Sensillen oder als kleine Gruppen morphologisch gleichartiger oder verschiedener Sensillen als funktionale Einheiten deutlich getrennt auf dem Tarsus lokalisiert. Figur 39 zeigt eine Zeichnung des rechten Tarsus eines adulten Männchens von A. variegatum nach einer elektronenmikroskopischen Aufnahme (Vergrösserung: 280x). Zur besseren Orientierung wurde die Oberfläche des Tarsus in verschiedene Zonen mit charakteristischen Sensillengruppen aufgeteilt. Nach Hess & Vlimant können dabei sechs dorsale (dI - dVI), fünf ventrale (vI - vV) und je zwei laterale (1a I+II, 1p I+II) Zonen unterschieden werden. Auf der Zeichnung sind die Signaturen der einzelnen Sensillentypen eingetragen. Tabelle VIII gibt die Verteilung der Sensillen und Sensillengruppen auf die verschiedenen Zonen schematisch wieder. Als Ergänzung dazu zeigt Tabelle IX die Signaturen der verschiedenen, morphologisch differenzierbaren Sensillentypen und ihre angenommene oder nachgewiesene Funktion.

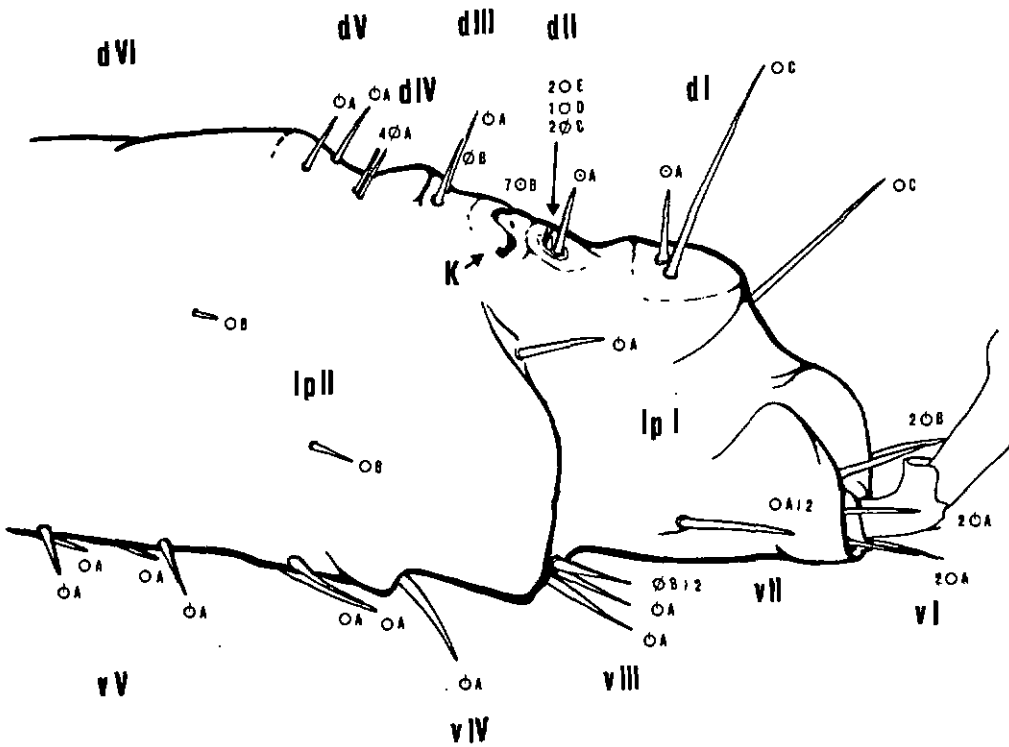


FIG. 39: Tarsalglied des ersten rechten Beinpaars eines adulten Männchens von *A. variegatum* mit den dorsalen (dI - dVI), ventralen (vI - vV) und lateralen (lpI+II) Sensillengruppen (280fach vergrössert). Vergleiche dazu Tabellen VIII und IX.

dorsal	lateral posterior	ventral	lateral anterior	
		v I 2,1... O _B O _B 4,3... O _A O _A 6,5... O _A O _A		distal
d I 1,2... O _A O _C	1p I	v II 2,1... O _A O _A	1a I 1... O _C	
d II 1... O _A 2,3,4. O _E O _E O _D 5,6... O _C O _C				
tarsal scissure.....				
C 1,2..... O _B O _B 3,4,5... O _B O _B O _B 6,7..... O _B O _B	1p II 1.. O _A	v III 4,3,2,1... O _B O _A O _A O _B	1a II 1.. O _B	proximal
d III 1,2.. O _A O _B		v IV 2,1.. O _A O _A		
d IV 1,2... O _A O _A 3,4... O _A O _A	2.. O _B	v V 1..... O _A 2..... O _A 3..... O _A 4..... O _A 5..... O _A	2.. O _B	
d V 1,2... O _A O _A		6..... O _A 7..... O _A 8..... O _A 9..... O _A 10..... O _A		
d VI 1..... O _A 2..... O _B 3..... O _B 4..... O _B 5..... O _B 6..... O _B 7..... O _B 8..... O _B 9..... O _B	3.. O _B 4.. O _B 5.. O _B 6.. O _B 7.. O _B 8.. O _B 9.. O _B		3.. O _B 4.. O _B 5.. O _B 6.. O _B 7.. O _B 8.. O _B	

TABELLE VIII

Schematische Darstellung der Verteilung aller Sinneshaare auf dem Tarsus I der adulten Zecken (*A. variegatum*). Die Signaturen der Sensillen sind in Tabelle IX erläutert.

Aus: The tarsal sensory system of *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae, Metastriata)

III. Mapping of sensory hairs and evolution of the relative importance of sensory modalities during post embryonic development.

Hess & Vlimant, Revue suisse Zool. 90, 887-897

Typ	Symbole	Funktio n e n					Autoren
		olfaktorisch	gustatorisch	temperatur-empfindlich	feuchtigkeits-empfindlich	bewegungs-empfindlich	
wp-sw/A	θ_A	+	-	?	?	-	1) 3) 4) 5) 8)
wp-sw/B	θ_B	+	-	?	?	-	1) 7)
wp-dw/A	θ_A	+	-	?	?	-	1) 3)
wp-dw/B	θ_B	?	-	?	?	*	1)
wp-dw/C	θ_C	+	-	?	?	-	1) 3)
tp/A	θ_A	-	+	+	?	*	1) 2) 9)
tp/B	θ_B	-	+	?	?	*	1) 2)
np/A	θ_A	-	-	-	-	*	1)
np/B	θ_B	-	-	-	-	*	1)
np/C	θ_C	-	-	+	-	*	1) 6)
np/D	θ_D	-	-	?	?	-	1)
np/E	θ_E	-	-	?	?	-	1)

TABELLE IX

Verzeichnis aller 12 morphologisch differenzierbaren Typen tarsaler Sinneshaare von A. variegatum mit deren nachgewiesener oder angenommener Funktion. Herkunft: wie Tabelle VIII.

Legende: + elektrophysiologisch nachgewiesen bei ixodiden Zecken
 * aufgrund der Struktur anzunehmen (Thurm 1964)
 ? von der Struktur her möglich oder elektrophysiologisch nachgewiesen an vergleichbaren Sinneshaaren bei Insekten
 - von der Struktur her ausgeschlossen

Autoren : 1) Altner & Prillinger 1980, 2) Balashov et al 1976, 3) Haggart & Davis 1980, 4) Haggart & Davis 1981, 5) Hess & Vlimant 1982, 6) Hess & Loftus 1984, 7) Sinitzina 1974, 8) Thoney in prep., 9) Waladde et al 1981

Die meisten, wenn auch nicht alle olfaktorischen Sinneshaare sind im Bereich oder in der näheren Umgebung des Haller'schen Organs zu finden. Der Name "Haller'sches Organ" ist eine, in der Fachliteratur häufig verwendete und fest eingebürgte Bezeichnung für die dorsale Zone dII. Diese umfasst zwei Sensillengruppen, die sowohl morphologisch als auch funktional zwei getrennte Einheiten bilden. Die eine Gruppe, bestehend aus sieben gleichartigen Sensillen des Typs wp-sw/B befindet sich geschützt in einer kapselartigen Vertiefung, die über eine schmale, leicht geschwungene Spalte mit der Aussenwelt verbunden ist. Diese Gruppe wird auch als "Kapsel" bezeichnet. Die zweite Gruppe befindet sich weiter distal in einer kleinen Vertiefung, in der vorderen Grube (englisch: "anterior pit"). Sie umfasst eine Gruppe von insgesamt sechs Sinneshaaren, die sich zum Teil morphologisch sehr stark voneinander unterscheiden. Beim weitaus grössten Sensillum der Gruppe handelt es sich um ein olfaktorisches Sinneshaar des Typs wp-sw/A. Daneben findet man zwei weitere olfaktorische Sensillen des Typs wp-dw/C sowie drei Sensillen ohne Poren (np).

Aus Figur 39 und der entsprechenden Tabelle VIII geht klar hervor, dass olfaktorische, poredurchsetzte Sensillen des einwandigen Typs (wp-sw) auf die dorsalen Zonen I und II beschränkt sind. Obwohl sie morphologisch dem gleichen Sensillentyp zugeordnet werden können, unterscheiden sich die beiden Sensillen des Typs wp-sw/A in dI und dII in einigen sehr wesentlichen Details. So befinden sich an der Basis des Sensillums in dI fünf Sinneszellen, die ihre Dendriten in das Lumen des Sensillums entsenden. An der Basis des Sensillums in dII befinden sich drei getrennte Gruppen von Sinneszellen. Zwei dieser Gruppen enthalten je fünf Sinneszellen, die dritte nur vier. Alle 14 Sinneszellen entsenden Dendriten in das Lumen. Die Art der Gruppierung der Sinneszellen lässt vermuten, dass sich dieses Sinneshaar als Verwachsung aus ursprünglich 3 Sinneshaaren gebildet hat. Diese Vermutung wird durch die Tatsache erhärtet, dass bei Nymphen und Adulten der nahe verwandten Art A. americanum an Stelle des einen Sinneshaares zwei Sensillen gefunden werden. Eines dieser Haare enthält eine Gruppe mit 5 Sinneszellen und eine Gruppe mit 4 Sinneszellen, das andere nur eine Gruppe mit 5 Sinneszellen. Abbildung 2 zeigt die Sensillengruppe der vorderen Grube in Zone dII. Für Details zur Morphologie und Ultrastruktur der einzelnen Sensillen dieser Gruppe sei auf die Publikationen von Hess & Vlimant verwiesen.

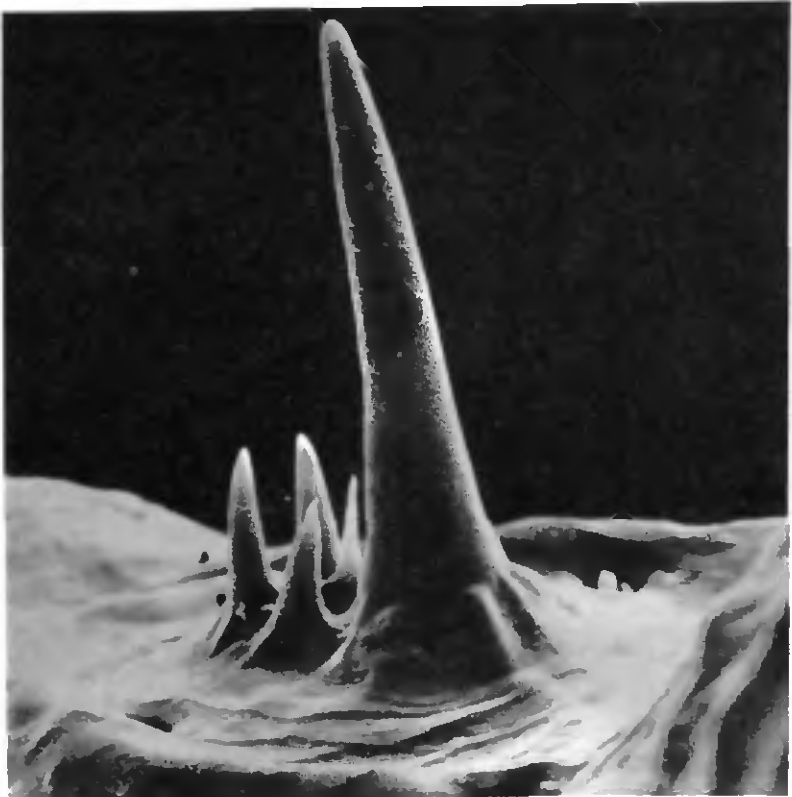
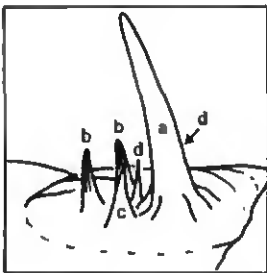


Abb. 2: Detailaufnahme der Sensillengruppe in der vorderen Grube des Haller'schen Organs (dII) (2332fach vergrößert)



- a) "wall pore single-walled" Sensillum (wp-sw/A)
- b) "wall pore double-walled" Sensilla (wp-dw/C)
- c) "no pore" Sensillum (np/D)
- d) "no pore" Sensilla (np/E)

6.2. Ablationsversuche

Die Ergebnisse einer ersten Versuchsserie sind in der Tabelle X wiedergegeben. Der Kontrollversuch mit dem Pheromon-Rohextrakt E1 unmittelbar vor der Ablation ergab die erwartete, deutliche Aggregation im Testsektor. Alle Versuche nach der Ablation wurden in je 4 Wiederholungen durchgeführt. In der Tabelle sind deshalb jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen wiedergegeben. Bei allen 40 Weibchen wurden die 4 Sensillen des Typs wp-sw (A in dI und dII) auf den Tarsen des ersten Beinpaars wie in Material und Methoden beschrieben eliminiert. 24 Stunden nach der Ablation ergab die Stimulierung mit demselben Rohextrakt nur noch eine sehr schwache Tendenz zur Aggregation im Testsektor ($p < 0.025$). 96 Stunden nach der Ablation ergab derselbe Versuch keine Aggregation mehr ($p < 0.1$).

Für eine zweite Versuchsserie wurden die Zecken nochmals gleich behandelt wie für die erste Serie. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in der Tabelle XI wiedergegeben. Die Zecken waren bereits vor der Ablation mehrfach mit dem Pheromon-Rohextrakt E1 in der Arena stimuliert worden und hatten jeweils mit einer deutlich ausgeprägten Aggregation im Testsektor der Arena geantwortet. Die Stimulierung mit Pheromon-Rohextrakt 24 Stunden nach der Ablation ergab diesmal eine fast unverändert deutliche Aggregation im Testsektor ($p < 0.0001$). Auch 20 Tage nach der Ablation war die Tendenz zur Aggregation noch im selben Mass feststellbar ($p < 0.0001$). Die Stimulierung mit ONP 20 Tage nach der Ablation ergab keine sichtbare Aggregationstendenz ($p < 0.1$), ebensowenig die Stimulierung mit dem Rinderhaarextrakt E2c ($p < 0.1$).

Aus diesen beiden ersten Versuchsserien durften in Bezug auf die Wahrnehmung des Pheromons die folgenden wichtigen Schlüsse gezogen werden. Die erste Serie hatte gezeigt, dass eine essentielle Komponente des Pheromons ausschliesslich über Sensillen des eliminierten Typs sw-wp/A wahrgenommen wird. Mit grosser Wahrscheinlichkeit durfte angenommen werden, dass es sich bei dieser Komponente um O-Nitrophenol handelt, was in der zweiten Versuchsserie direkt bestätigt werden konnte. Die zweite Versuchsserie gab zudem wichtige Hinweise darauf, dass die anderen Komponenten des Pheromons, insbesondere aber das Methylsalicylat über andere, von der Ablations nicht betroffene Sensillen wahrgenommen werden.

Für eine dritte Versuchsserie wurde dieselbe Behandlung noch einmal wiederholt. Diesmal wurden die Zecken aber ausschliesslich und direkt auf ihre

Antwort auf das synthetische Pheromon und seine Bestandteile getestet. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in der Tabelle XII wiedergegeben. Auch bei diesem Ansatz wurde durch die Ablation der genannten Sensillen die Antwort auf das vollständige, synthetische Pheromon nicht wesentlich beeinträchtigt. 3 Tage nach der Ablation ergab die Stimulierung mit ONP wiederum keine signifikante Aggregation im Testsektor mehr. Die Stimulierung mit einem Gemisch von Methylsalicylat und Pelargonsäure ergab eine etwas abgeschwächte aber dennoch hoch signifikante ($p < 0.0001$) Aggregation im Testsektor.

Diese Versuchsserie hat die Annahme, dass spezifische Rezeptoren für ONP in Sensillen des Typs wp-sw/A zu suchen sind ein weiteres Mal bestätigt. Auch die Vermutung, dass die Komponenten Methylsalicylat und Pelargonsäure von Sensillen wahrgenommen werden, die von dieser Ablation nicht betroffen sind, wurde durch diese Versuche nochmals bekräftigt. Es stellte sich daraufhin die Frage, ob sich die Rezeptoren für diese Komponenten ebenfalls auf den Tarsus des ersten Beinpaars befanden oder ob an der Wahrnehmung des Pheromons auch gustatorische Sinneshaare und Rezeptoren auf den Tarsen und Palpen der Zecken beteiligt sind. Um diese Frage weiter zu untersuchen, wurden 40 Zecken, die zuvor auf die Stimulierung mit einer deutlichen Aggregation im Testsektor geantwortet hatten, die Tarsalglieder des ersten Beinpaars beidseitig amputiert. Diesmal ergab dieselbe Stimulierung nach der Ablation keine Aggregation im Testsektor mehr. Es durfte somit angenommen werden, dass sich die Rezeptoren, die für die Wahrnehmung zumindest von Methylsalicylat verantwortlich sind, ebenfalls auf den Tarsen der Zecken befinden.

Verschiedene weitere, hier nicht im einzelnen wiedergegebene Versuche hatten anschliessend gezeigt, dass es sich dabei weder um die, in einer 4er Gruppe angeordneten Sensillen des Typs wp-dw/A in Zone dIV noch um die gustatorischen Haare des Typs tp/A+B in VI handeln konnte. Auch die vollständige Ablation aller gustatorischen und olfaktorischen Sensillen, mit Ausnahme der unzugänglichen 7 olfaktorischen Sensillen des Typs wp-sw/B in der Kapsel des Haller'schen Organs (dII), auf beiden Tarsen der Zecke ergab keine Ausschaltung der positiven Antwort auf die Stimulierung mit Methylsalicylat und Pelargonsäure in der Arena. Es durfte deshalb angenommen werden, dass sich spezifische Rezeptoren, die für die Wahrnehmung von Methylsalicylat, möglicherweise auch von Pelargonsäure, verantwortlich sind, in Sensillen der Kapsel befinden. Alle Versuche, die in der Folge unternommen wurde, um diese Hypothese

TABELLE X

Applikation im Testsektor	Sektoren der Arena								χ ²	Sign.		
	T	K	s	̄x	s	̄x	s	̄x				
10 µl Pheromon-Rohextrakt (vor der Ablation)	28	1	1	2	8							
10 µl Pheromon-Rohextrakt 24 Std. nach der Ablation 4 Wiederholungen	9.7	5.2	6.0	2.0	6.7	4.3	5.3	4.5	11.2	3.2	10.94	p < 0.025
10 µl Pheromon-Rohextrakt 96 Std. nach der Ablation 4 Wiederholungen	3.7	2.3	6.0	4.5	4.5	3.3	3.0	2.8	24.3	4.7	3.23	n.s.

TABELLE XI

Applikation im Testsektor	Sektoren der Arena								χ ²	Sign.		
	T	K	s	̄x	s	̄x	s	̄x				
10 µl Pheromon-Rohextrakt (vor der Ablation)	26	1	1	0	12							
10 µl Pheromon-Rohextrakt 24 Std. nach der Ablation	25.8	3.0	1.5	0.6	1.8	1.7	0.5	0.6	10.5	3.9	326.19	p < 0.0001
10 µl Pheromon-Rohextrakt (E1) 20 Tage nach der Ablation	25.3	4.0	2.3	0.5	2.0	2.0	1.0	1.4	9.5	4.2	290.32	p < 0.0001
10 µl 0-Nitrophenol (0.25 mg/ml) 20 Tage nach der Ablation	5.5	3.0	5.5	1.0	5.3	1.3	4.3	2.1	90.5	3.8	1.11	n.s.
10 µl Rinderhaarextrakt (E2c) 20 Tage nach der Ablation je 4 Wiederholungen	5.3	1.3	4.8	1.7	5.3	2.6	4.0	1.4	20.8	4.2	1.16	n.s.

TABELLE XII

Applikation im Testsektor	Sektoren der Arena							χ ²	Sign.			
	T	K	K	K	K	K	K					
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s		
10 µl synthetisches Pheromon (vor der Ablation)	29	0	3	1	7							
10 µl synthetisches Pheromon 3 Tage nach der Ablation	23.0	0.0	0.5	1.0	0.25	0.5	0.5	0.6	15.8	0.5	336.54	p < 0.0001
10 µl ONP (0.25 mg/ml) 3 Tage nach der Ablation	6.8	1.5	4.5	1.9	5.3	3.2	4.3	2.6	19.3	4.3	3.90	n.s.
10 µl Methylsalicylat/Pelargon- säure (0.15/0.1 mg/ml) 3 Tage nach der Ablation	19.5	2.6	2.3	1.9	4.0	2.6	2.5	2.4	11.8	3.3	157.11	p < 0.0001

TABELLEN X - XII : Zusammenfassung der Resultate der Ablationsversuche zur Wahrnehmung des Pheromons und seiner Komponenten im Arena-Test. Mit Ausnahme der Kontrollversuche vor der Ablation wurden alle Versuche in 4 Wiederholungen mit je 40 ungesogenen Weibchen durchgeführt. T = Testsektor, K = Kontrollsektoren, - = nicht unterschieden.

direkt durch gezielte Ausschaltung dieser Sensillen zu überprüfen, waren nicht erfolgreich. Die Öffnung der Kapsel konnte zwar gezielt mit Nagellack übermalt und verschlossen werden. Nach dem Eintrocknen löste sich der Lack aber stellenweise wieder von der Cuticula ab, so dass eine Wahrnehmung über die Sensillen der Kapsel nie vollständig und über längere Zeit wirksam unterbunden werden konnte.

6.3. Elektrophysiologische Arbeiten

Auswertbare Ableitungen konnten an insgesamt 23 Zecken (12♂♂/11♀♀) gewonnen werden. In 12 Ansätzen wurde vom Sensillum des Typs wp-sw/A in dI abgeleitet (Fig. 40a). In 17 weiteren Ansätzen wurde vom wp-sw/A Sensillum in dII abgeleitet (Fig. 40b). Bei allen Ansätzen wurden als Stimuli Konzentrationsreihen der Pheromonkomponenten O-Nitrophenol (ONP), Methylsalicylat (MS) und Pelargonsäure (PS) sowie von 2,6-Dichlorphenol (2,6-DCP) in Paraffinöl verwendet. Als Kontrolle diente jeweils reines Paraffinöl. Beispiele solcher Ableitungen sind in den Fig. 41-43 wiedergegeben.

Eine erste grobe Uebersicht über die Ergebnisse dieser Versuche geben die Tabellen XIII und XIV. In keinem der Ansätze konnte eine spezifische Antwort einer Sinneszelle auf die Stimulierung mit MS oder PS registriert werden. Wo, wie das bei Stimulierungen mit MS zum Teil der Fall war, eine schwache Antwort registriert werden konnte, war diese erst bei einer Stimulierung mit Konzentrationen höher als 10^{-2} feststellbar (Fig. 42e).

Bei Ableitungen vom Sensillum in dI wurden in fast allen Fällen Aktionspotentiale einer Zelle registriert, welche auf eine Stimulierung mit 2,6-DCP klar konzentrationsabhängig und phasisch-tonisch reagierte. In einigen Fällen konnten auch bei Stimulierungen mit ONP schwache Antworten festgestellt werden. Dabei handelte es sich aber wiederum um unphysiologisch hohe Konzentrationen von $10^{-3}M$ und mehr. Experimente, bei denen kurz nacheinander mit 2,6-DCP und ONP stimuliert wurde, zeigten, dass es sich um dieselbe Zelle handeln musste. Eine Auswertung der Ableitungen war bei diesem Sensillum meist ohne Schwierigkeiten möglich, da Aktionspotentiale von nie mehr als 5 Zellen gleichzeitig registriert wurden. Ein gutes Beispiel einer solchen Ableitung ist in Fig. 44 wiedergegeben. Hier treten die Aktionspotentiale der stimulierten Zelle deutlich aus der Ruhefrequenz anderer, nicht stimulierter Zellen heraus. Deutlich zu erkennen ist auch hier der phasisch-tonische Verlauf der Frequenz.

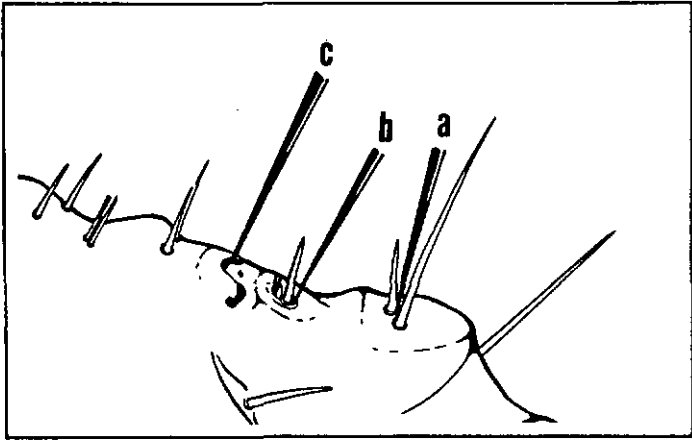


FIG. 40: Ausschnitt aus Figur 39. Sie zeigt Einstichstellen und ungefähre Einstichwinkel für die Platzierung der Ableit-elektrode (Wolfram) an der Basis der drei verschiedenen wp-sw-Sensillen.

a) wp-sw/A₁ b) wp-sw/A₂ c) wp-sw/B

Völlig anders war die Situation bei Ableitungen vom wp-sw/A Sensillum in dII. Je nach Platzierung der Elektrode konnten hier Aktionspotentiale von mehr als 5 Zellen gleichzeitig registriert werden, was die Auswertung enorm erschwerte. An diesem Sensillum konnten in fast allen Fällen spezifische Antworten auf die Stimulierung mit ONP und 2,6-DCP abgeleitet werden. Für beide Stimuli war die Frequenz der Aktionspotentiale konzentrationsabhängig und ebenfalls deutlich phasisch-tonisch (Fig. 41b-e, 42a-d), zumindest bei höheren Konzentrationen.

Die Wahrnehmungsschwelle lag in beiden Fällen zwischen 10^{-6} und 10^{-5} M, die Sättigung im Bereich zwischen 10^{-3} und 10^{-2} M. Häufig wurden bei einer Stimulierung mit 2,6-DCP kleinere Amplituden der Aktionspotentiale gemessen als bei einer Stimulierung mit ONP. Die Beispiele in den Figuren 41, 42 und 43 zeigen zwar, dass die Amplitude der Aktionspotentiale der stimulierten Zellen sehr stark von der jeweiligen Konzentration des Teststimulus abhängig ist. Die Vermutung lag dennoch nahe, dass es sich hier

um zwei gesonderte Zellen handeln könnte, welche jeweils auf einen der beiden Stoffe spezifisch ansprechen. Mit Versuchen, bei denen kurz hintereinander sowohl mit DCP als auch mit ONP stimuliert wurde, konnte diese Vermutung in einigen Fällen direkt bestätigt werden. Einen weiteren Hinweis lieferte eine Ableitung, bei der zwar eine spezifische Antwort auf ONP, nicht aber auf 2,6-DCP registriert werden konnte (Tabelle XIV, *dd*, 5. Versuch). Eine detaillierte Analyse der Ableitungen war in vielen Fällen wegen der grossen Zahl der gleichzeitig registrierten Aktionspotentiale verschiedener Zellen äusserst schwierig. Sie wurde deshalb nur dann vorgenommen, wenn auch hier eine phasisch-tonische Antwort einer einzelnen stimulierten Zelle klar aus der Ruhefrequenz anderer, gleichzeitig registrierter und nicht stimulierter Zellen hervortrat. In 8 Fällen konnte die Spitzenfrequenz der Aktionspotentiale als Antwort auf die Stimulierung mit einer Konzentrationsreihe von ONP (10^{-6} - 10^{-2} M) für mindestens drei aufeinanderfolgende Schritte ermittelt werden. In 8 weiteren Fällen konnte dieselbe Analyse an Ableitungen von Zellen, welche auf eine Stimulierung mit DCP spezifisch geantwortet hatten, vorgenommen werden. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in den Figuren 45 und 46 graphisch dargestellt.

Im Rahmen einer Diplomarbeit hat K. Blendermann (1984) versucht, von Sensillen des Typs wp-sw/B in der Kapsel des Haller'schen Organs abzuleiten. Aufgrund der Ablationsversuche durfte angenommen werden, dass zumindest eine weitere Komponente des Pheromons (Methylsalicylat) über Sensillen der Kapsel wahrgenommen wird. Diese Annahme wurde durch ihre Arbeit voll bestätigt. Ihr gelangen ausgezeichnete Ableitungen, obwohl dies bei Sensillen innerhalb der Kapsel äusserst schwierig ist. Die Kapsel ist lediglich über einen schmalen Spalt zugänglich. Die darin enthaltenen Sensillen sind von aussen her nicht sichtbar und stehen geschützt zwischen chitinösen, verzweigten Strukturen der Kapsel. Die Elektrode kann deshalb nicht gezielt an der Basis eines der Sensillen angesetzt werden und muss auf gut Glück eingestochen werden. Sie erhielt spezifische, konzentrationsabhängige Antworten auf die Stimulierung mit MS, ONP, 2,6-DCP, PS sowie weitere gestestete, substituierte Phenole wie Salicylsäure und Phenyllessigsäure waren nicht stimulierend. Einzig Ethylsalicylat vermochte in höheren Konzentrationen von 10^{-3} und 10^{-2} M eine Zelle zu stimulieren. Die Auswertung ergab somit für Methylsalicylat Resultate, die direkt mit denjenigen verglichen werden können, die ich zuvor an Sensillen des Typs wp-sw/A mit 2,6-DCP und ONP

Ansatz Nr.	Kontrolle	ONP	DCP	MS	PS	
σσ	1	-	(+)	++	0	0
	2	-	0	++	0	0
	3	0	(+)	++	0	0
	4	0	0	++	0	0
	5	0	0	++	0	0
	6	0	0	++	0	0
	7	0	(+)	++	0	0
ππ	1	0	0	++	0	0
	2	0	(+)	++	0	0
	3	0	0	++	0	0
	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0

TABELLE XIII

Zusammenfassung der Resultate aller Ableitungen vom wp-sw/A-Sensillum in dI. Als Teststimuli dienten Konzentrationsreihen (10^{-6} - $10^{-1}M$) von O-Nitrophenol (ONP), 2,6-Dichlorophenol (DCP), Methylsalicylat (MS) und Pelargonsäure (PS) in Paraffinöl. Als Kontrolle diente reines Paraffinöl.

Legende: - Hemmung der Ruhefrequenz

0 kein Einfluss auf die Ruhefrequenz, auch bei sehr hohen Konzentrationen ($> 10^{-2}M$)

(+) schwache Antwort bei hohen Konzentrationen ($> 10^{-3}M$)

+ phasisch-tonische Antwort bereits bei mittleren Konzentrationen (10^{-4} - $10^{-3}M$)

++ deutlich phasisch-tonische Antwort bereits bei niederen Konzentrationen (10^{-5} - $10^{-4}M$)

Ansatz Nr.	Kontrolle	ONP	DCP	MS	PS
<i>σσ</i> 1	-	++	+	(+)	-
2	-	++	++	0	0
3	-	++	++	(+)	0
4	0	++	++	0	0
5	0	++	0	0	0
6	0	++	++	0	0
7	0	++	++	0	0
B	0	++	++	0	0
<hr/>					
<i>φφ</i> 1	-	++	++	-	-
2	-	++	+	0	0
3	0	++	++	0	0
4	0	++	++	(+)	0
5	0	++	++	0	0
6	0	++	++	0	0
7	0	++	++	0	0
8	0	++	+	0	0
9	0	++	+	0	0

TABELLE XIV

Zusammenfassung der Resultate aller Ableitungenvom wp-sw/A-Sensillum in dII. Stimuli und Legende wie für Tabelle XIII angegeben.

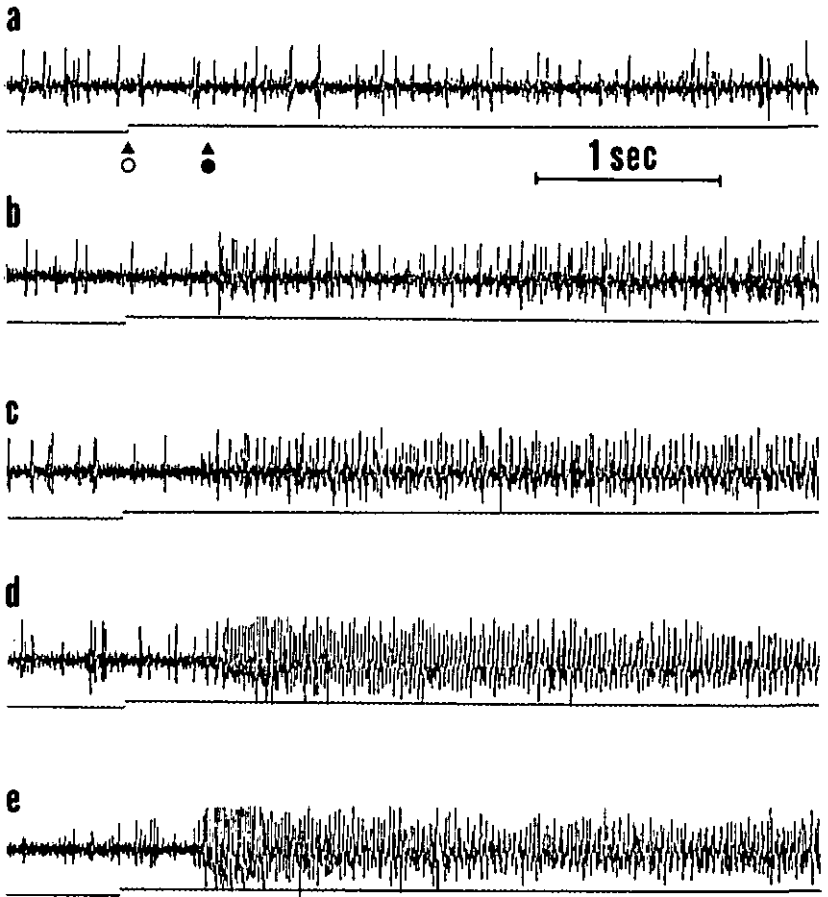


FIG. 41: Serie von Ableitungen an der Basis des wp-sw/a Sensillums in Zone dII eines adulten Männchens. Antworten auf die Stimulierung mit reinem Paraffinöl (a), 0.001mM ONP (b), 0.01mM ONP (c), 0.1mM ONP (d) und 1.0mM ONP (e).

○ Beginn der Einspritzung in den kontinuierlichen Luftstrom
● Ankunft der Duftmoleküle im Bereich des Sensillums

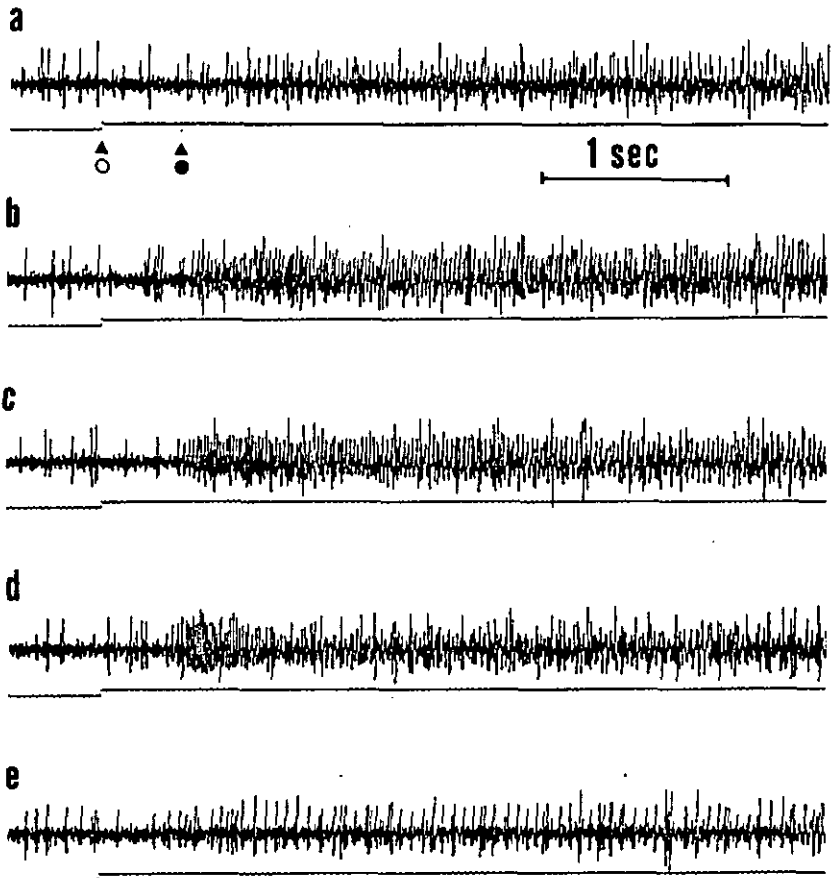


FIG. 42: Serie von Ableitungen an der Basis des wp-sw/A Sensillums in Zone dII eines adulten Männchens. Antworten auf die Stimulierung mit 0.01mM 2,6-DCP (a), 0.1mM 2,6-DCP (b), 1mM 2,6-DCP (c), 10mM 2,6-DCP (d) und 100mM MS (e).

- Beginn der Einspritzung in den kontinuierlichen Luftstrom
- Ankunft der Duftmoleküle im Bereich des Sensillums

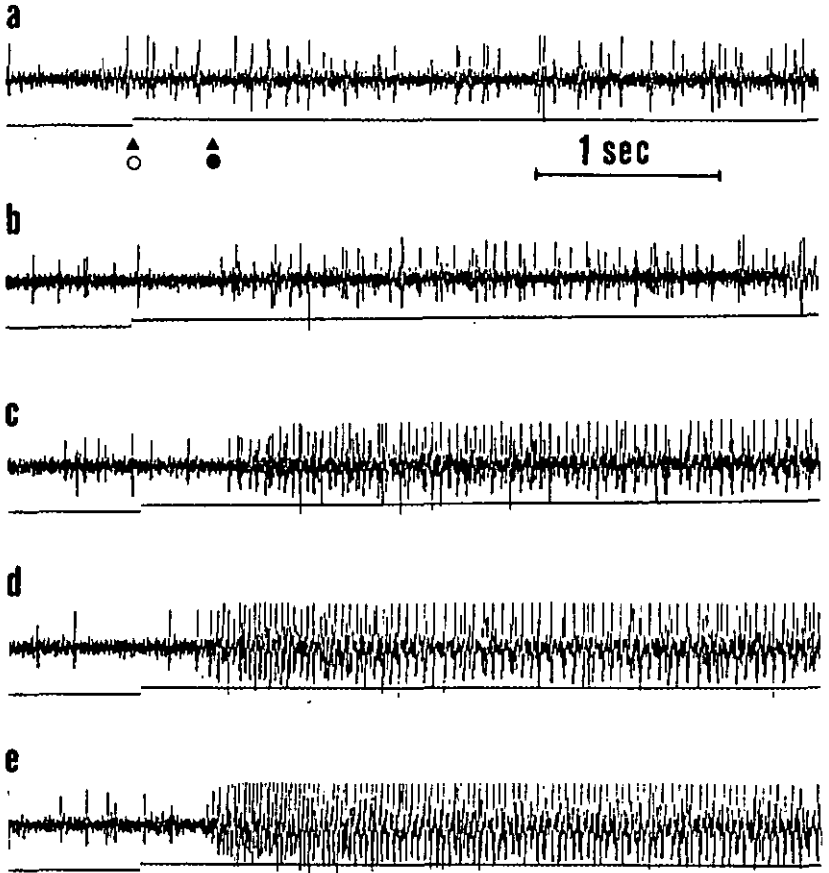


FIG. 43; Serie von Ableitungen an der Basis des wp-sw/A Sensillums in Zone dI eines adulten Männchens. Antworten auf die Stimulierung mit reinem Paraffinöl (a), 0.01mM 2,6-DCP (b), 0.1mM 2,6-DCP (c), 1mM 2,6-DCP (d) und 10mM 2,6-DCP (e).

- Beginn der Einspritzung in den kontinuierlichen Luftstrom
- Anknft der Duftmoleküle im Bereich des Sensillums

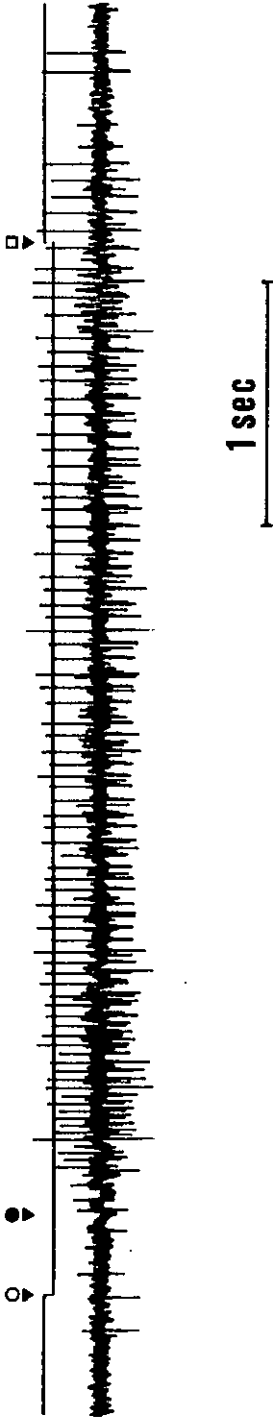


FIG. 44: Antwort der DCP-sensitiven Zelle im ap-sw/A Sensillum in dI auf eine Stimulierung mit gesättigter Luft über einer 0.5 mM Lösung von 2,6-Dichlorophenol in Paraffinöl.

- Ankunft der Duftmoleküle auf der Höhe des Sensillums
- Beginn der Einspritzung in den kontinuierlichen Luftstrom
- Ende der Einspritzung

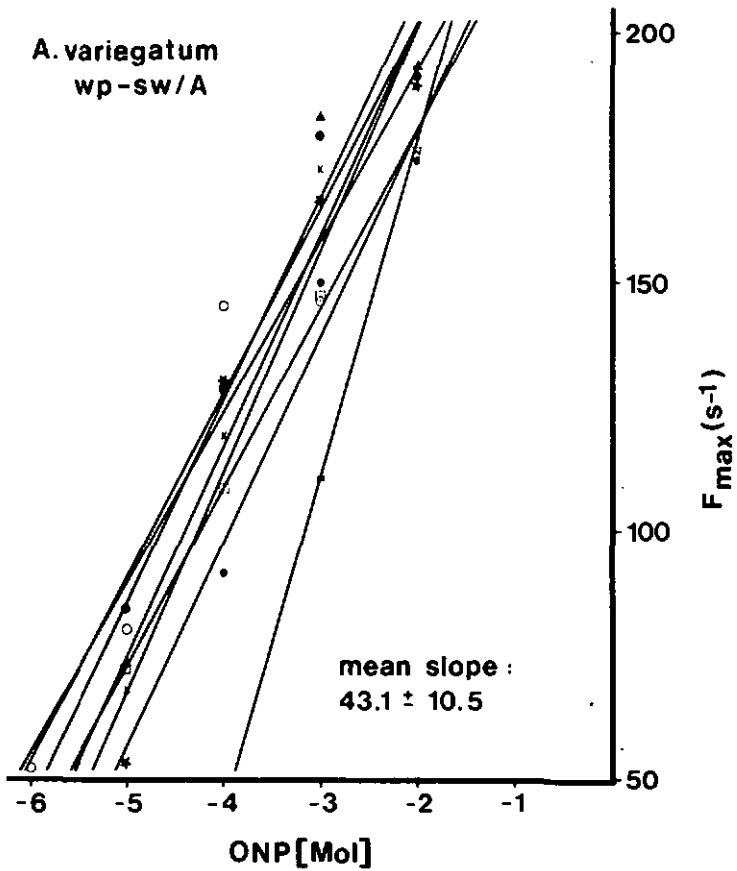


FIG. 45: Zusammenfassung aller auswertbaren Ableitungen (8), bei denen die ONP-sensitive Rezeptorzelle im wp-sw/a Sensillum in dII mit einer Konzentrationsreihe von ONP stimuliert wurde. Die Regressionsgeraden wurden anhand der Spitzenfrequenzen (F_{max}) errechnet. Verschiedene Symbole geben die effektiven Werte für die einzelnen Ableitungen wieder.

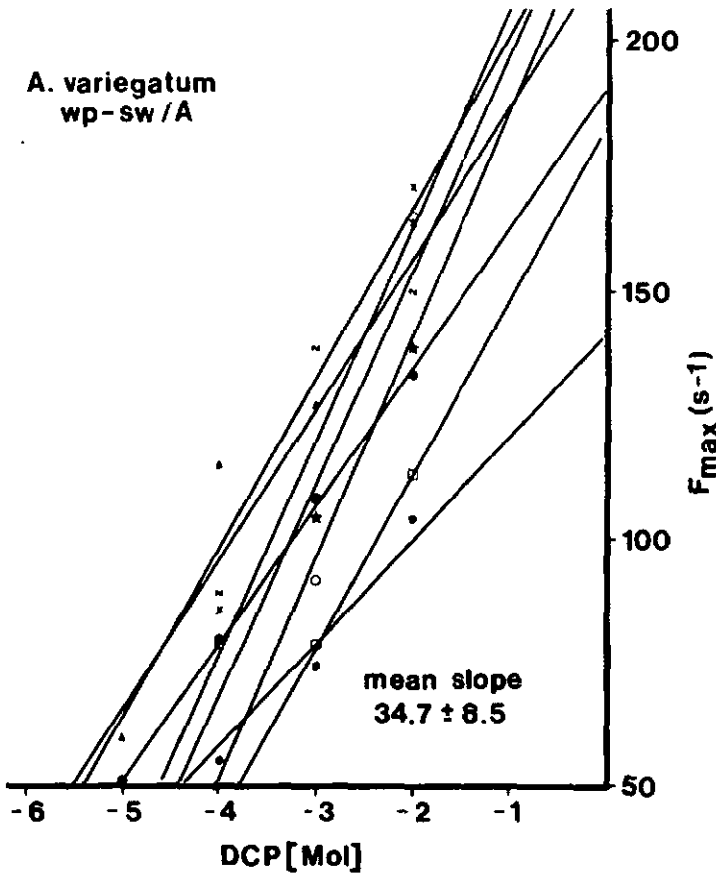


FIG. 46: Zusammenfassung aller auswertbaren Ableitungen (8), bei denen die DCP-sensitive Rezeptorzelle in den wp-sw/A Sensillen der Zonen dI und dII mit einer Konzentrationsreihe von 2,6-DCP stimuliert wurden. Sonst wie Fig. 45.

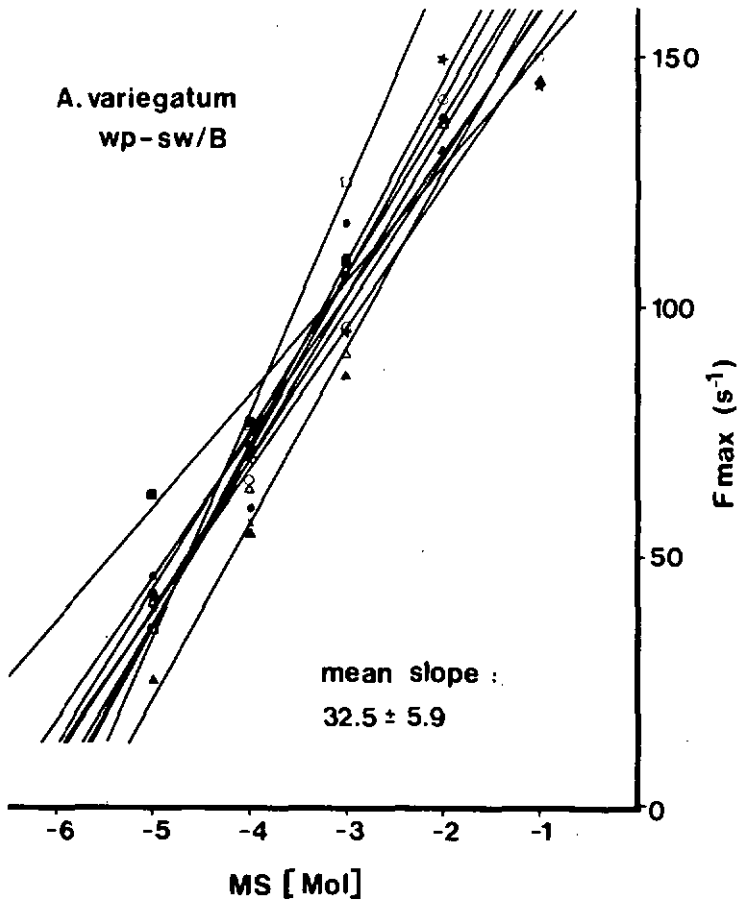


FIG. 47: Zusammenfassung aller auswertbaren Ableitungen (10), bei denen die MS-sensitive Rezeptorzelle in einem der wp-sw/B Sensillen der Kapsel mit einer Konzentrationsreihe von MS stimuliert wurde. Sonst wie Fig. 45.

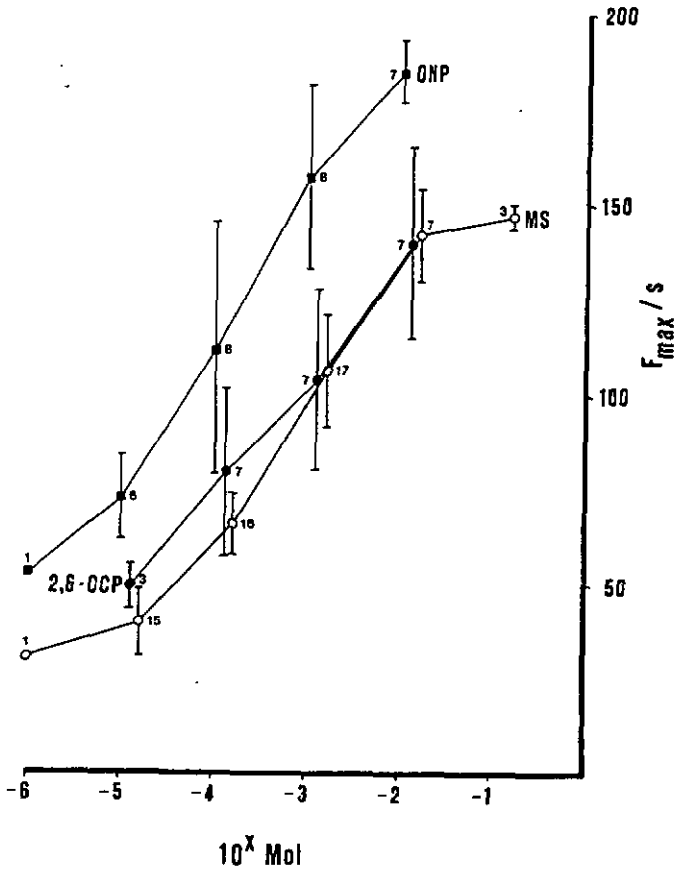


FIG. 48: Zusammenfassung der konzentrationsabhängigen Antworten der verschiedenen Rezeptorzelltypen auf den jeweiligen spezifischen Stimulus (vergl. dazu Fig. 45-47). Mittelwerte und Standardabweichungen der Spitzenfrequenzen für die verschiedenen getesteten Konzentrationen.

gewonnen hatte (Fig. 47).

Figur 48 zeigt eine Zusammenfassung der konzentrationsabhängigen Antworten (F_{max}) der verschiedenen Sinneshaare auf den jeweiligen spezifischen Stimulus. Eingeschlossen in dieser Darstellung sind für den direkten Vergleich auch die Resultate der Ableitungen an der Kapsel adulter Männchen, wie sie von Kirsten Blendermann durchgeführt worden sind. Diese Zusammenfassung zeigt eine überraschend grosse Übereinstimmung der mittleren Spitzenfrequenzen der DCP-sensitiven und der MS-sensitiven Zelle auf. Die Kurve für die ONP-sensitive Zelle verläuft zwar ebenfalls parallel zu derjenigen der anderen beiden Zelltypen. Die mittlere Spitzenfrequenz lag für diese Zelle aber jeweils 30-40 Impulse/Sekunde höher. Die Konzentrationen für die Wahrnehmungsschwelle und für die Sättigung scheinen dennoch für alle drei Zelltypen in ähnlichen Bereichen zu liegen. Mit 0.001 - 0.01 mM liegt die Wahrnehmungsschwelle sehr tief, wobei sie für die ONP-sensitive Zelle noch etwas tiefer liegen mag als für die anderen beiden Zelltypen.

IV. DISKUSSION

Bis heute sind in der Fachliteratur nur spärliche Hinweise auf das Verhalten der tropischen Buntzecke A. variegatum unter natürlichen Bedingungen zu finden. Dasselbe gilt, mit nur wenigen Ausnahmen, auch für die meisten anderen Zeckenarten. Eine dieser Ausnahmen ist der "Holzbock" Ixodes ricinus L. Die Untersuchungen über sein Verhalten haben unsere Vorstellungen über das Verhalten von Zecken im allgemeinen sehr stark geprägt. Nun ist der Holzbock eine jener Zeckenarten, die als "Wegelagerer" (englisch: ambusher) an exponierten Stellen in der Vegetation darauf warten, von einem potentiellen Wirt abgestreift zu werden (Mermod et al., 1973). Erweist sich dieser Wirt als geeignet, so setzen sie sich in dessen Haut fest. Andernfalls lassen sie sich wieder fallen und warten auf eine günstigere Gelegenheit. Im Gegensatz zu den Lederzecken (Argasidae), welche ihre Wirte aktiv aufsuchen, bedienen sich wohl die meisten Schildzeckenarten (Ixodidae) der beschriebenen "Ambusher"-Strategie. Dennoch scheint dies nicht für alle Arten und auch nicht für alle Entwicklungsstadien im gleichen Mass zu gelten. Die adulten Zecken gewisser Arten sind von ihrer Physiologie her durchaus imstande, ihre Wirte über grössere Strecken aktiv aufzusuchen. Das gilt v.a. für Arten der Gattung Hyalomma. Wie der Gattungsname ("hyaIos" = Kristall, Glas; "omma" = Auge) besagt, besitzen die Arten dieser Gattung grosse, deutlich sichtbare Augen. Ueber ihr Sehvermögen ist kaum etwas bekannt. Es wird aber angenommen, dass sie imstande sind, potentielle Wirte mit ihren Augen zu erkennen und zu orten. Die Arten dieser Gattung sind alle relativ gross und mit kräftigen Beinen ausgestattet, die sie befähigen, sich in bemerkenswertem Tempo am Boden fortzubewegen. Die erwähnten Besonderheiten gelten nun auch für gewisse Arten der Gattung Amblyomma. Auch die tropische Buntzecke besitzt relativ grosse, gut entwickelte Augen. Der Gattungsname ("amblys" = stumpf, trüb, unscharf) lässt kein sehr gutes Sehvermögen erwarten. Wie weit das wirklich zutrifft ist unbekannt und ist Thema einer aktuellen Untersuchung. Auch sie sind ausgesprochen gute Läufer. Obwohl über ihre Wirtsfinde-Strategie nichts genaues bekannt ist, darf angenommen werden, dass auch sie imstande sind, ihre Wirtstiere aktiv aufzusuchen, d.h. zu "jagen". Eigene Beobachtungen im Labor haben gezeigt, dass sich erregte Zecken auf eine Distanz von über einem Meter auf eine Wärmequelle hin orientieren und gezielt auf diese zurennen

können. Beobachtungen im Feld (Hess, mündl. Mitteilung) ergaben, dass die Adulten von A. variegatum auch in Gebieten, in denen die weidenden Rinder regelmässig in grosser Zahl von dieser Zeckenart befallen werden, kaum in der Vegetation auszumachen sind. Eine Möglichkeit der Erklärung wäre die Hypothese, dass sich die Zecken im Ruhe- und Wartezustand am Grund der Vegetation aufhalten und erst dann aktiv werden, wenn sie durch das Nahen eines potentiellen Wirtes (Erschütterung, CO₂, Wärme, Silhouette) erregt werden. Aktuelle Felduntersuchungen (Gigon, unpubl.) werden zeigen, ob diese Hypothese den Tatsachen entspricht.

Bei meinen Beobachtungen auf einem eingestallten Rind habe ich häufig feststellen können, dass die Zecken als erste Reaktion auf den Kontakt mit dem Tier eine, für die Fortbewegung im Fell völlig ungeeignete Fortbewegungsweise zeigten, was zur Folge hatte, dass die angesetzten Zecken sehr leicht durch das nervöse Flankenzittern des Rindes abgeworfen wurden oder an einer überhängenden Körperstelle von selbst abfielen. Eine mögliche Erklärung für dieses auffällige, anfängliche "Fehlverhalten" der Zecken könnte darin bestehen, dass das hochgestelzte, nervöse Rennen dem Verhalten entspricht, das die Zecken unter natürlichen Bedingungen auf die Reizung durch die Präsenz eines potentiellen Wirtes in der Vegetation zeigen. Zusammen mit der bereits erwähnten optischen und thermosensiblen Fernorientierung könnte dieses Verhalten dazu beitragen, die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens mit dem potentiellen Wirt zu erhöhen. Diese erste Phase der Erregung durch den Wirt sowie die Annäherung an diesen wurde in meinen Versuchen, bei denen die Zecken direkt auf das Rind angesetzt wurden, jeweils übersprungen. Dass die Zecken dennoch auch in dieser Situation das ungeeignete Rennen zeigten, lässt vermuten, dass sich das Wirtsfinde- und Festsetzverhalten aus einer Abfolge relativ starrer Verhaltensmuster zusammensetzt, die unter natürlichen Umständen durch eine entsprechende Abfolge spezifischer Stimuli ausgelöst wird. Eine schematische Darstellung einer möglichen solchen Abfolge ist in Fig. 49 wiedergegeben. Was das Verhalten der adulten Männchen und Weibchen auf dem Wirt und die Umstände des Festsetzens betrifft, so konnte ich keine Unterschiede zu dem von Norval für die Art A. hebraeum beschriebenen Verhalten feststellen. Ebenso wie die sexuell reifen Männchen von A. hebraeum zeigen die sexuell reifen Männchen von A. variegatum ein typisches Klammerverhalten, dem, zusammen mit dem wirtsgebundenen Aggregationspheromon bei der Fixierung der Weibchen auf dem Wirt und bei der Clusterbildung eine zentrale Bedeutung zukommt. Ohne die Präsenz teilweise gesogener, sexuell reifer

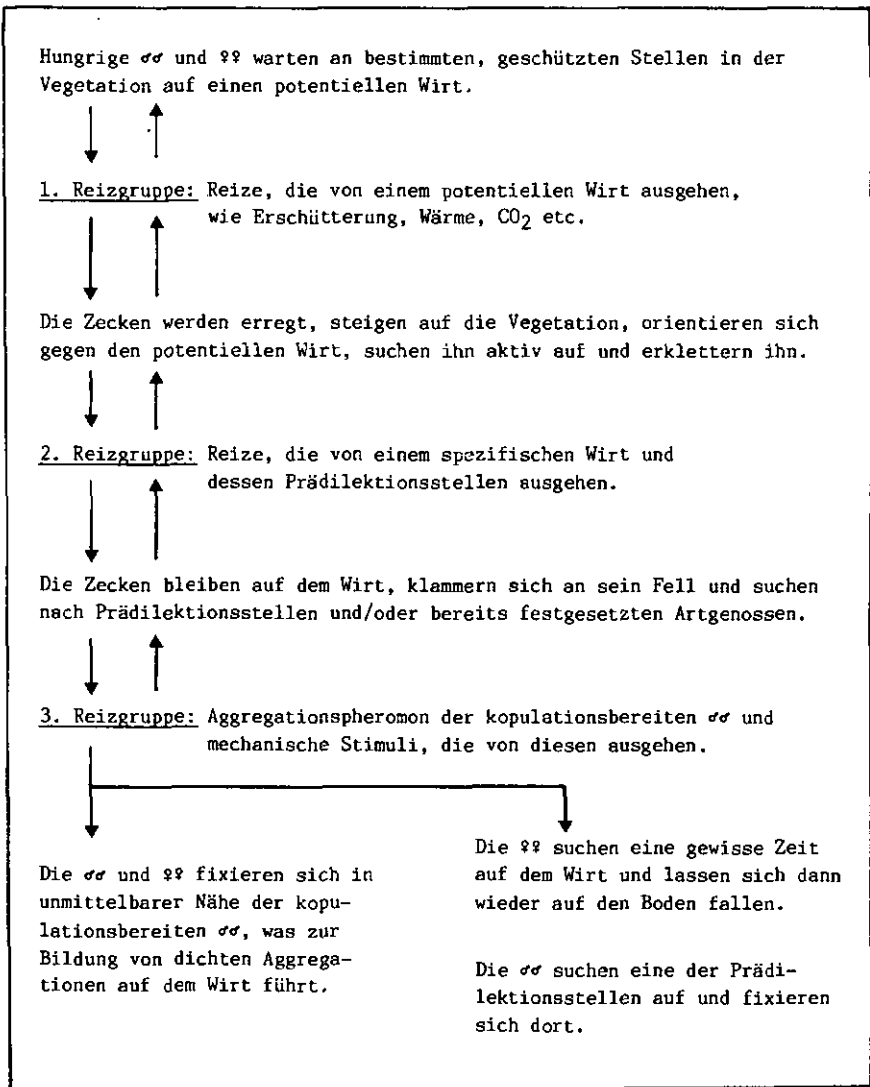


FIG. 49: Theoretisches Modell der Abfolge spezifischer Reize und Verhaltenssequenzen, die bei der Wirtsfindung, Wirtserkennung, beim Festsetzen auf dem Wirt und beim Zustandekommen der Aggregationen von adulten A. variegatum auf dem Wirt eine Rolle spielen.

Männchen setzen sich unter natürlichen Umständen die Weibchen nicht fest. Dies führt dazu, dass sich die Weibchen fast ausnahmslos in enger Umarmung mit einem sexuell reifen Männchen fixieren. So ist sichergestellt, dass einmal festgesetzte Weibchen ohne lange Latenzzeit begattet werden und sich in optimaler Zeit vollsaugen können. Da auch die Weibchen für den Abschluss der sexuellen Reifung ein Blutmahl von wenigen Tagen benötigen (Arthur, 1962), ist nicht anzunehmen, dass die Kopulation unmittelbar nach dem Festsetzen erfolgt. Dies würde erklären, weshalb ich bei meinen Beobachtungen auf dem Rind nie einen Kopulationsversuch innerhalb von 3 Stunden nach dem Festsetzen der Weibchen feststellen konnte.

Der Vorgang der Kopulation ist für A. variegatum anhand von Beobachtungen mit vom Wirt abgenommenen sexuell reifen Männchen und Weibchen ausführlich beschrieben worden (Ammah-Attoh, 1965). Das Männchen leitet die Kopulation ein, indem es sein Rostrum in die Genitalöffnung des Weibchens einführt und diese anschwellen und sich erweitern lässt. Danach bringt es mit Hilfe der Cheliceren das auf dem Bauch des Weibchens abgesetzte Spermatophorenpaket mit dem verjüngten Ende in die vorbereitete Genitalöffnung des Weibchens. Derselbe Ablauf wurde auch für I. ricinus L. (Graf, 1978) und einige weitere ixodide Zeckenarten beschrieben (Sonenshine et al., 1974; Khalil et al., 1981; Andrews & Bull, 1980). Am Beispiel der Zeckenarten Dermacentor variabilis Say und Dermacentor andersoni Stiles konnte zudem nachgewiesen werden, dass das Männchen bei der Kopulation durch ein artspezifisches, über die Genitalöffnung des Weibchens abgesondertes Sexualpheromon animiert und geleitet wird (Sonenshine et al., 1982).

Mit Ausnahme der prostriaten Zeckenarten der Gattung Ixodes, bei denen die Kopulation nicht wirtsgebunden ist (Graf, 1978), müssen sich die Männchen aller ixodiden Zeckenarten vom Wirt ablösen, um die Kopulation zu vollziehen. Da sich die Männchen und Weibchen der meisten metastriaten Arten unabhängig voneinander auf dem Wirt fixieren, und da sowohl die Männchen als auch die Weibchen zur Reifung ihrer Gonaden ein Blutmahl von mehreren Tagen benötigen, müssen die Weibchen den Männchen ihre Kopulationsbereitschaft über ein volatiles Sexualpheromon signalisieren, welches die Männchen veranlasst, sich vom Wirt abzulösen, zu den Weibchen zu wandern und mit diesen zu kopulieren (Berger et al., 1971; Sonenshine et al., 1974; Chow et al., 1975; Kellum & Berger, 1977; Norval et al., 1980; Khalil et al., 1981; Rechav, 1983). Es ist anzunehmen, dass auch die Weibchen von A. variegatum für die Reifung ihrer Gonaden und ihrer Kopulationsbereit-

schaft ein Blutmahl von wenigen Tagen benötigen. Hinweise darauf finden sich bei Ammah-Attoh (1965) für A. variegatum und bei Rechav et al. (1977) für A. hebraeum. Dies würde bedeuten, dass auch sie den Abschluss dieser Reifung den Männchen über ein spezifisches Signal mitteilen müssten.

2,6-Dichlorphenol, das Sexualpheromon vieler metastrierter Zeckenarten, konnte auch in Extrakten aus teilweise gesogenen Weibchen von A. variegatum, welche während 6 Tagen auf einem Wirt fixiert waren, nachgewiesen werden (Wood et al., 1975). Die dabei gefundene Menge liegt mit 16ng/Weibchen durchaus in einer, für ein solches Pheromon zu erwartenden Größenordnung. Bisher konnte aber weder für A. variegatum noch für A. hebraeum eine verhaltensbeeinflussende Wirkung dieser Substanz auf sexuell reife Männchen nachgewiesen werden (Rechav et al., 1982).

Wesentliche Elemente des Festsetz- und Paarungsverhaltens konnten auch unter künstlichen Bedingungen auf einer Silikonmembran beobachtet werden. Dabei bestätigte der auffällige Unterschied im Verhalten der gesogenen und ungesogenen Männchen die Annahme, dass die Art und Weise, wie die Zecken auf eine bestimmte Reizsituation reagieren, eng mit ihrem physiologischen Zustand und ihrer sexuellen Reife zusammenhängt. So schien es, dass Reize, die für die Wirtswahl (Annahme oder Ablehnung eines potentiellen Wirtes) bei ungesogenen Zecken von entscheidender Bedeutung sind, von gesogenen Zecken entweder nicht mehr wahrgenommen werden oder für die Entscheidung sich auf einem Wirt zu fixieren nicht mehr relevant sind.

Dass in der in vitro-Situation auf der Membran die ersten Kopulationsversuche bereits 18 Minuten nach dem Festsetzen des Weibchens beobachtet werden konnten, dürfte auf die unnatürliche Fixierung auf der Silikonmembran zurückzuführen sein. Unter natürlichen Umständen fixieren sich die Zecken nach dem Festsetzen in der Haut des Wirtes mit Hilfe eines, von den Speicheldrüsen über das Rostrum abgegebenen Zements (Arthur, 1962). Diese Verankerung ist erst nach einer gewissen Zeit vollständig ausgebildet. Fixierung und Ablösung erfolgen deshalb auf der Silikonmembran sehr viel rascher und problemloser als auf einem lebenden Tier.

Dem wirtsgebundenen Aggregationspheromon kommt in diesem ganzen Komplex der Wirts- und Partnerfindung eine zentrale Bedeutung zu. Da es ausschliesslich für ungesogene Männchen und Weibchen eine attraktive und aggregationsauflösende Wirkung zeigt, ist es in einem Moment wirksam, in dem die Zecken noch nicht auf dem Wirtstier fixiert sind. Dies ist eine völlig andere Si-

tuation als im Fall des Sexualpheromons 2,6-Dichlorphenol, welches nur für teilweise gesogene, kopulationsbereite Männchen attraktiv ist, d.h. in einem Moment wirksam ist, bei dem bereits Zecken beiderlei Geschlechts auf dem Wirt fixiert sind. Für eine potentielle praktische Anwendung des Aggregationspheromons bei der Zeckenkontrolle ergibt sich dadurch eine ganz besondere Bedeutung. Chemiker der Ciba-Geigy AG Basel waren deshalb bereit, an der Aufklärung der Zusammensetzung dieses Pheromons mitzuhelfen. Dank ihrer Hilfe gelang dies auch in ausserordentlich kurzer Zeit. Voraussetzung war allerdings die Möglichkeit der Ueberprüfung der Wirkung der identifizierten Komponenten in einem verlässlichen Biotest. Dieser Biotest sollte mit möglichst geringem Aufwand durchgeführt werden können. Gleichzeitig sollte mit ihm aber rasch, eindeutig und reproduzierbar eine pheromonale Aktivität nachgewiesen werden können. Die anfänglich in Petrischalen verschiedener Grösse durchgeführten Versuche vermochten in mehrerer Hinsicht nicht zu befriedigen. Zwar konnten aus ihnen klare Hinweise auf die Präsenz des Pheromons gewonnen werden. Erfasst wurde dabei aber nur ein Teilaspekt der pheromonalen Wirkung, die Induktion einer Aggregation. Die ausgelösten Aggregationen konnten aber nur in wenigen Fällen eindeutig dem Testsektor zugeordnet werden. Eine Orientierung auf diesen Sektor hin konnte nicht beobachtet werden. Aufgrund der überaus grossen Varianz der Verteilung konnte ein genereller Schluss in bezug auf die Präsenz des Pheromons erst nach vielen Wiederholungen gezogen werden, wobei die im einzelnen Versuch festgestellte Wirkung durch die Zusammenfassung der Resultate eher verschleiert als verdeutlicht wurde. Wäre es in diesen Biotests lediglich darum gegangen, nachzuweisen, dass die Präsenz gesogener, sexuell aktiver Männchen oder deren Pheromon auf ungesogene Männchen und Weibchen eine aggregationsauslösende Wirkung hat, so wäre der Petrischalentest als Methode durchaus ausreichend gewesen. Beobachtungen in vivo hatten aber gezeigt, dass ein orientiertes Aufsuchen der Pheromonquelle auf dem Rind über eine Distanz von mehreren Zentimetern nicht nur möglich, sondern die Regel ist. Natürliche Aggregationen auf dem Wirt als Reaktion auf die Präsenz einer Pheromonquelle bilden sich deshalb immer in allernächster Nähe dieser Quelle und um sie herum. Auch die Versuch im Y-Olfactometer vermochten aus verschiedenen Gründen nicht restlos zu befriedigen. Zwar konnte mit dieser Methode die Präsenz des Pheromons eindeutig und reproduzierbar nachgewiesen werden. Allerdings konnte in

allen Versuchen nur ein kleiner Prozentsatz der eingesetzten Zecken dazu bewegt werden, im Glasrohr aufzusteigen und sich für einen der beiden Arme zu entscheiden. Es waren deshalb relativ viele Wiederholungen notwendig, um auf genügend grosse Zahlen zu kommen. Zudem ist diese Testmethode spezifisch für den Nachweis volatiler, olfaktorischer Stimuli ausgelegt. Eine Beteiligung gustatorisch wirksamer Komponenten an der Gesamtwirkung des Pheromons konnte aber anhand der verfügbaren Daten nicht von vornherein ausgeschlossen werden.

Ein Vorteil der Petrischale gegenüber dem Olfactometer bestand darin, dass eine aktive Beteiligung der Zecken dadurch gewährleistet war, dass die Zecken zu Beginn des Ansatzes in der Mitte des Bodens eines leeren Behälters gesetzt wurden. Eingeschlossen in ein Glasrohr zeigen die Zecken bei Abwesenheit von starken, wirtsspezifischen Reizen wie Erschütterungen oder direktes Anhauchen wenig bis keine Suchaktivität. In der Mitte eines offenen Raumes ausgesetzt, wie das in der Petrischale der Fall ist, werden fast ausnahmslos alle Zecken aktiv und zeigen ein ausgeprägtes Suchverhalten. Im Petrischalentest bildeten sich Aggregationen jeweils an der Kante des Bodens oder des Deckels, jedoch nie auf einem der Filterpapiere. Diese Erfahrungen haben schliesslich dazu geführt, dass ich eine eigene Standardmethode entwickelt und eingeführt habe, die im wesentlichen die eingangs erwähnten Kriterien zu erfüllen vermochte. Als Testraum wurde eine vierkantige Plexiglasarena gewählt, deren vier untere Ecken für die Applikation der Test- und Kontrollstimuli präpariert wurden.

Das relativ grosse Volumen der Arena sowie die Tatsache, dass der Innenraum nicht vollständig gegen die Umgebungsluft abgeschlossen wurde, erlaubte es, dass sich um die Pheromonquelle herum ein Duftgradient bilden und etablieren konnte, was bei Abwesenheit einer Luftströmung für eine Fernorientierung über kurze Strecken von wenigen Zentimetern unabdingbare Voraussetzung ist.

Die Metallkapseln, in die bei den ersten Versuchen im Olfactometer die lebenden, sexuell aktiven Männchen als Teststimulus eingeschlossen wurden, wurden auch bei den nachfolgenden Versuchen mit Extrakten und isolierten Stoffen in der Arena weiterverwendet, da es sich gezeigt hatte, dass sich die Versuchszecken bei Anwesenheit des Pheromons suchend an der Metallkapsel festklammerten. Dieses Klammerverhalten erinnerte sehr stark an das Verhalten, das die Zecken auf einem natürlichen Wirt in direktem

Kontakt mit einem gesogenen, sexuell aktiven Männchen zeigten und war mit ein deutlicher Hinweis auf die Präsenz des Pheromons.

Die chemische Analyse und der Vergleich aktiver und inaktiver Rohextrakte sowie die damit und mit reinen Substanzen und synthetischen Gemischen durchgeführten Biotests haben klar gezeigt, dass für die attraktive, aggregationsauslösende Wirkung des aktiven Pheromonextraktes gesogener Männchen von Amblyomma variegatum im wesentlichen die drei Komponenten O-Nitrophenol, Methylsalicylat und Pelargonsäure verantwortlich sind. An der Gesamtwirkung des Pheromons, d.h. an der Anlockung ungesogener Männchen und Weibchen in die Nähe eines gesogenen und sexuell aktiven Männchens sowie der Stimulierung zum Verharren und Festsetzen in dessen unmittelbaren Nähe, sind alle drei Komponenten, wenn auch in unterschiedlichem Mass, essentiell beteiligt.

Für die Anlockung auf Distanz dürfte hauptsächlich O-Nitrophenol verantwortlich sein. Es kann deshalb in diesem Fall von einem eigentlichen Lockstoff gesprochen werden, wenn es sich auch nicht um einen Sexuallockstoff im klassischen Sinn handelt, wie wir ihn von vielen Insektenarten her kennen. Zwar ist die Abgabe des Lockstoffs auf ein Geschlecht beschränkt, und steht in direktem Zusammenhang mit der sexuellen Reifung des Emitters und mit dem sexuellen Verhalten der Art. Der Stoff wird aber von ungesogenen Männchen und Weibchen gleichermaßen wahrgenommen und bewirkt bei beiden Geschlechtern direkt vergleichbares Verhalten, ist somit in bezug auf den Empfänger nicht geschlechtsspezifisch.

Beim Verharren in der Nähe der Pheromonquelle, beim Klammerverhalten und beim definitiven Festsetzen auf dem Wirt dürften dagegen die Komponenten Methylsalicylat und Pelargonsäure die wesentliche Rolle spielen. Ueber die exakte Rolle der Pelargonsäure in diesem Zusammenhang kann aufgrund der durchgeführten Versuche nur spekuliert werden. Die Tatsache, dass die isolierten Substanzen Methylsalicylat und Pelargonsäure im Verhaltenstest keine äusserlich sichtbare Wirkung zeigten, wohl aber, wenn sie in denselben Konzentrationen gleichzeitig und gemeinsam im Testsektor angeboten wurden, deutet auf eine zumindest synergistische Rolle der Pelargonsäure hin. Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass diese Rolle gegenüber derjenigen von Methylsalicylat oder O-Nitrophenol von untergeordneter Bedeutung ist. Zwei Beobachtungen weisen in diese Richtung. Der Vergleich der Resultate mit ursprünglichen und mit korrigierten Proportionen der Komponenten im synthetischen Pheromongemisch hat gezeigt, dass auch eine grössere Ver-

änderung im prozentualen Anteil der Pelargonsäure am Gesamtgemisch keine sichtbare Auswirkung auf die attraktive Wirkung des Pheromons hatte. Im weiteren konnte festgestellt werden, dass Zecken, die über längere Zeit immer wieder mit dem Pheromon konfrontiert worden waren, nach einer gewissen Zeit auch auf die Applikation von Methylsalicylat allein mit einer deutlich sichtbaren Aggregation im Testsektor reagierten. Pelargonsäure allein konnte hingegen auch in diesem Fall nie eine Aggregation auslösen. Die Versuche mit Konzentrationsreihen der Substanzen deuten auf einen relativ grossen Spielraum in der konzentrationsabhängigen Wirkung des Pheromons hin. Die Wahrnehmungsschwelle dürfte im Bereich von 10-100 Nanogramm liegen. Bei einer Konzentration, die um ein hundertfaches über dem ermittelten Schwellenbereich liegt, ist noch keine Tendenz zur Neutralisierung oder gar Umkehrung der attraktiven Wirkung festzustellen. Die Resultate der Versuche mit einer Verdünnungsreihe von O-Nitrophenol geben aber Anlass zur Annahme, dass im Bereich von je 10-100 µg/Komponente eine solche Umkehr stattfindet und das Gemisch in diesem Konzentrationsbereich bereits eine repellente Wirkung aufweisen kann.

Erste präliminäre Versuche haben gezeigt, dass sowohl in der Zusammensetzung des von gesogenen Männchen von A. variegatum und A. hebraeum abgegebenen Pheromons, als auch in der Reaktion ungesogener Männchen und Weibchen beider Arten deutliche Unterschiede festgestellt werden können. Es wäre aber sicher falsch, die Resultate dieser Versuche überbewerten zu wollen, solange sie nicht an wildstämmigen Zecken der Art A. hebraeum bestätigt werden können.

Die sinnesphysiologischen Untersuchungen haben gezeigt, dass die beiden wichtigsten Komponenten des Pheromons O-Nitrophenol und Methylsalicylat über zwei verschiedene Rezeptorsysteme wahrgenommen werden. Für eine synergistische Wirkung beider Komponenten ist somit eine zentralnervöse Integration Voraussetzung. Eine spezifische Rezeptorzelle für Pelargonsäure konnte in unseren Untersuchungen nicht gefunden werden. Dies schliesst nicht aus, dass diese Komponente über die nicht untersuchten olfaktorischen Sensillen des doppelwandigen Typs (wp-dw) oder über gustatorische Sensillen wahrgenommen werden kann. In bezug auf 2,6-Dichlorphenol konnten die von Waladde (1983) gemachten Beobachtungen bestätigt werden. 2,6-DCP und ONP werden offensichtlich über verschiedene Rezeptorzellen wahrgenommen. Während eine spezifische Zelle für ONP nur im Sensillum in dII gefunden werden konnte, sind spezifische Rezeptorzellen für 2,6-DCP sowohl in dII als auch in dI zu finden. Die mögliche

Bedeutung von 2,6-DCP für die Art A. variegatum habe ich bereits im Zusammenhang mit dem Sexualverhalten der Art diskutiert. Ein Nachweis für diese Bedeutung dürfte ausserordentlich schwierig zu erbringen sein. Der einzige, mir bekannte Ansatz in dieser Richtung stammt von Rechav et al. (1982). Er war, wie auch Rechav selbst betont, nicht geeignet, um eine pheromonale Wirkung von 2,6-DCP für A. variegatum schlüssig nachzuweisen oder zu widerlegen. Eine spezifische Wahrnehmung dieser Substanz ohne nachweisbaren Einfluss auf das Verhalten wäre eine weitere, nicht auszuschliessende Möglichkeit. Selbst bei I. ricinus, einer prostriaten Zeckenart, bei der noch nie 2,6-DCP aus Extrakten isoliert wurde und für die keine verhaltensbeeinflussende Wirkung dieser Substanz bekannt ist, können an den wp-sw/A Sensillen in dI und dII spezifische Antworten auf die Stimulierung mit kleinsten Mengen dieser Substanz abgeleitet werden (Thonney, unpubl.).

Auf die Bedeutung der Zeckenpheromone für die Zecken selbst sowie für mögliche praktische Anwendungen des diesbezüglichen Wissens im Rahmen der Zeckenbekämpfung und -kontrolle möchte ich hier nicht weiter eingehen. Neuere Review-Artikel von Sonenshine (1984a/b) nehmen zu diesen Themen sehr ausführlich Stellung. Dennoch möchte ich zum Abschluss noch einige interessante Aspekte zur Spezifität des wirtsgebundenen Aggregationspheromons innerhalb der afrikanischen Amblyomminae diskutieren. Kreuzungsversuche mit verschiedenen Arten der Gattung Amblyomma haben gezeigt, dass in verschiedenen Kombinationen Paarungen möglich sind, meist aber keine lebensfähige Nachkommenschaft erbringen (Obenchain, 1984). Unter natürlichen Umständen sind solche Paarungen sehr selten anzutreffen. Im Fall der beiden nahe verwandten Arten A. variegatum und A. hebraeum überschneiden sich die jeweiligen Verbreitungsgebiete kaum. Laborversuche haben gezeigt, dass sich auch diese beiden Arten kreuzen lassen, jedoch ohne lebensfähige Nachkommenschaft (Rechav et al., 1982). Wurde den Weibchen eine Wahl zwischen festgesetzten, sexuell reifen Männchen der eigenen und der anderen Art geboten, so wurden die Männchen der eigenen Art klar bevorzugt. Erstaunlich ist nun aber, dass diese Bevorzugung für die Weibchen von A. variegatum weitaus deutlicher ausfiel als für die Weibchen von A. hebraeum. Meine eigenen Versuche in vitro haben die gleiche Tendenz erkennen lassen. Während die Weibchen der Art A. hebraeum gleichermassen von Männchen der eigenen und der fremden Art angelockt wurden, entschieden sich die Weibchen der Art A. variegatum fast ausschliesslich für die

Männchen der eigenen Art. Die Analyse der Pheromone beider Arten hat Ähnlichkeiten, aber auch deutliche Unterschiede in Zusammensetzung und Konzentration der Pheromone erkennen lassen. Die Versuche mit synthetischen Pheromongemischen haben gezeigt, dass die Weibchen der Art A. hebraeum sehr stark auf das Pheromon von A. variegatum reagieren. Umgekehrt reagieren die Weibchen der Art A. variegatum nur sehr schwach auf das Pheromon von A. hebraeum. Daraus ergibt sich die wichtige Schlussfolgerung, dass bei einer vorliegenden spezifischen Verhaltensantwort zwingend auf eine Spezifität des Pheromons dieser Art geschlossen werden kann, dass aber andererseits bei einer unspezifischen, nicht diskriminierenden Antwort nicht auf ein unspezifisches Pheromon geschlossen werden kann.

Ursache und Bedeutung dieses auffälligen Unterschiedes in der Spezifität der beiden Arten sind noch unklar. Es darf bei der Diskussion dieser Fragen nicht ausser acht gelassen werden, dass die wirtsgebundenen Pheromone im ganzen Komplex des Festsetz- und Paarungsverhaltens für die Spezifität eine ganz wesentliche, aber nicht die alleinige Rolle spielen. Mechanische und andere chemische Signale scheinen im direkten Kontakt der Zecken auf dem Wirt zusätzlich zur Arterkennung beizutragen (Rechav et al., 1982; Obenchain, 1984).

Sonenshine hat in seiner Reviewarbeit über Zeckenpheromone zu Recht darauf hingewiesen, dass unser Wissen auf diesem Gebiet noch sehr beschränkt und lückenhaft ist und weit hinter der aktuellen Wissensstand in anderen Bereichen zurückliegt. Es bestehen aber Anzeichen dafür, dass dieser Rückstand in den kommenden Jahren sehr rasch aufgeholt werden könnte. Dies wäre wünschenswert, sind doch in der Zeckenbekämpfung mit den herkömmlichen Methoden aufgrund der rasanten Entwicklung von Resistenzen gegen Acarizide Probleme und Engpässe zu erwarten. Ein besseres Wissen über das pheromonale Kommunikationssystem der Zecken könnte, ähnlich wie im Bereich der Insekten, Anhaltspunkte für alternative und integrierte Methoden der Zeckenbekämpfung liefern. Ich hoffe in diesem Sinn mit meiner Arbeit einen Beitrag geleistet zu haben.

ZUSAMMENFASSUNG :

1. Die ethologischen Untersuchungen haben gezeigt, dass sich das Festsetz- und Paarungsverhalten von A. variegatum nicht wesentlich von dem für die Art A. hebraeum beschriebenen Verhalten unterscheidet. Bei beiden Arten kommt dem wirtsgebundenen Aggregationspheromon der gesogenen, sexuell aktiven Männchen sowie deren typischem Klammerverhalten ("claspig behaviour") bei der Paar- und Aggregationsbildung auf dem Wirt eine zentrale Bedeutung zu.
2. Das wirtsgebundene Aggregationspheromon hat auf ungesogene Männchen und Weibchen eine attraktive und aggregationsauslösende Wirkung. Teilaspekte dieser Wirkung konnten in Standardtests wie dem Petrischalentest oder dem Y-Olfactometer in vitro nachgewiesen werden. Generell waren die Ergebnisse mit beiden Testverfahren unbefriedigend. Ein neu eingeführter Arena-Test erfüllte schliesslich die in den Biotest gestellten Erwartungen. In diesem Test konnte der ganze mit dem Pheromon verbundene Verhaltensablauf eingehend studiert werden. Er erlaubte aufgrund der damit erzielten raschen, eindeutigen und reproduzierbaren Ergebnisse auch die erfolgreiche Isolierung und Identifikation der aktiven Komponenten des Pheromons.
3. Das Pheromon setzt sich aus den drei aktiven Komponenten O-Nitrophenol, Methylsalicylat und Felargonsäure zusammen. Diese drei Komponenten wurden im Verhältnis 2:1:8 aus gesogenen, sexuell aktiven Männchen in Diethyläther extrahiert und isoliert. Ein synthetisches Gemisch dieser drei Komponenten in den gleichen Mengenverhältnissen erwies sich im Biotest als ebenso wirksam wie lebende, frisch vom Wirt abgenommene, pheromonproduzierende Männchen oder deren Aetherextrakt.
4. O-Nitrophenol allein hat eine starke attraktive Wirkung auf ungesogene Männchen und Weibchen. Im Arena-Test bewirkt die Applikation dieser Substanz im Testsektor eine deutlich erkennbare, "dynamische" Aggregation. Die aggregationsauslösende Wirkung ist jedoch schwach im Vergleich zur Gesamtwirkung des Pheromons.

5. Methylsalicylat und Pelargonsäure zeigen im Arena-Test allein appliziert keine Wirkung. Sie sind aber an der Gesamtwirkung des Pheromons essentiell beteiligt. Zusammen mit O-Nitrophenol appliziert bewirken sie im Testsektor der Arena eine ausgeprägte und andauernde Aggregation.

6. O-Nitrophenol und Methylsalicylat werden über zwei getrennte Rezeptorsysteme wahrgenommen. Eine spezifische Rezeptorzelle für O-Nitrophenol wurde im wp-sw/A Sensillum der vorderen Grube des Haller'schen Organs (dII) lokalisiert, eine spezifische Rezeptorzelle für Methylsalicylat in einem wp-sw/B Sensillum der Kapsel. Weitere, für 2,6-Dichlorophenol sensitive Rezeptorzellen konnten im wp-sw/A Sensillum in dI und im wp-sw/A Sensillum in dII gefunden werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- Altner H. & Prillinger L. (1980) Ultrastructure of Invertebrate Chemo-, Thermo- and Hygroreceptors and its Functional Significance. Int. Rev. Cytol. 67 : 69 - 139
- Ammah-Attoh V. (1965) The mating behaviour and the mode of insemination in the genus Amblyomma with special reference to Amblyomma variegatum (Fabricius, 1794). Ghana journal of science 5 : 243 - 248
- Andrews R. H. & Bull C. M. (1980) Mating behaviour in the Australian reptile tick Aponomma hydrosauri. Anim. Behav. 28 : 1280 - 1286
- Arthur D. R. (1962) Ticks and Disease, Pergamon Press, Oxford
- Balashov Y. S. & Leonovich S. A. (1976) Morphological peculiarities of Haller's organ in the ixodid ticks of the tribe Amblyommatini (Acarina, Ixodidae). Ent. Obozr. 66 : 946 - 952
- Balashov Y. S., Ivanov V. P. & Ignatiev A. M. (1976) Fine structure and function of the palpal receptor organ in ixodid ticks (Acari, Ixodoidea). Russk. zool. Zh. 55 : 1308 - 1317
- Berger R. S. (1972) 2,6-dichlorophenol, sex pheromone of the lone star tick. Science 177 : 704 - 705
- Berger R. S., Dukes J. C. & Y. S. (1971) Demonstration of a sex pheromone in three species of hard ticks. J. Med. Entomol. 8 : 84 - 86
- Berger R. S. (1983) occurrence of 2,6-dichlorophenol in Dermacentor albipictus and Haemaphysalis leporis-palustris (Acari:Ixodidae). J. Med. Entomol. 20 : 103
- Blum W. & Richter W. J. (1977) Parallel flame ionisation detection-total ion current recording in capillary gas chromatography/chemical ionisation spectrometry. J. Chromatog. 132 : 249
- Brill J. H. & Solomon K. R. (1979) Research Communication : A bioassay method for the pheromone(s) of the Bont Tick Amblyomma hebraeum Koch. Onderstepoort J. vet. Res. 46 : 59 - 60

- Browne L. E., Birch M. C. & Wood D. L. (1974) Novel trapping and delivery system for airborne insect pheromones. *J. Ins. Physiol.* 20 : 183 - 193
- Chow Y. S. (1970) Sex pheromone and behavioral studies of the adult Gulf Coast Tick (Amblyomma maculatum Koch) including morphological and electrophysiological studies of the sensory organs. Dissertation, Auburn University/Alabama
- Chow Y. S. (1974) Electro-olfactory potential of Ixodes tick to 2,6-dichlorophenol. In : Proc. 4th Int. Congr. Acarol., Science Press, Budapest, 501 - 505
- Chow Y. S., Wang C. B. & Lin L. C. (1975) Identification of a sex pheromone of the female Brown Dog Tick Rhipicephalus sanguineus Latreille. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 68 : 485 - 488
- Dukes J. C. (1971) Reproductive behaviour and morphological investigations of Amblyomma americanum (Linnaeus) associated with sex pheromones. Dissertation, Auburn University/Alabama
- Elizarov Yu-A. (1963) Insect and tick chemoreception : electrophysiological study of the chemoreception of Ixodidae. *Vestn. Mosk. Univ. Biol. Pochvoved* 18 : 16 - 24
- El-Ziady S. (1958) The behaviour of Ornithodoros erraticus (Lucas, 1849), small form (Ixodoidea:Argasidea), towards certain environmental factors. *Ann. Ent. Soc. Am.* 51 : 317 - 336
- Garris G. I. (1984) Colonization and life cycle of Amblyomma variegatum (Acari:Ixodidae) in the laboratory in Puerto Rico. *J. Med. Entomol.* 21 : 86 - 90
- George J. E. (1981) The influence of aggregation pheromones on the behaviour of Argas cooleyi and Ornithodoros concanensis (Acari:Ixodoidea:Argasidae). *J. Med. Entomol.* 18 : 129 - 133
- Gladney W. J. & Drummond R. O. (1970) Migration of the male Lone Star Ticks on the host in relation to mating. *J. Econ. Entomol.* 63 : 1214 - 1216
- Gladney W. J. & Drummond R. O. (1970) Mating behaviour and reproduction of the Lone Star Tick Amblyomma americanum. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 63 : 1036 - 1039

- Gladney W. J. & Drummond R. O. (1971) Spermatophore transfer and fertilization of Lone Star Ticks off the host. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 64 : 378 - 381
- Gladney W. J. (1971) Mate-seeking by female Amblyomma maculatum (Koch) (Acarina: Ixodidae) on a bovine. *Nature* 232 : 401 - 402
- Gladney W. J., Ernst S. E. & Grabbe R. R. (1974a) The aggregation response of the Gulf Coast Tick on the cattle. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 67 : 750 - 752
- Gladney W. J., Grabbe R. R., Ernst S. E. & Oehler D. D. (1974b) The Gulf Coast Tick : Evidence of a pheromone produced by males. *J. Med. Entomol.* 11 : 303 - 306
- Gladney W. J., Price M. A. & Graham O. H. (1977) Field tests of insecticides for control of the Gulf Coast Tick on cattle. *J. Med. Entomol.* 13 : 579 - 586
- Graf J.-F. (1975) Ecologie et éthologie d'Ixodes ricinus L. en Suisse (Ixodoidea: Ixodidae) (cinquième note) : Mise en évidence d'une pheromone sexuelle chez Ixodes ricinus. *Acarologia* 17 : 436 - 441
- Graf J.-F. (1978) Copulation, nutrition et ponte chez Ixodes ricinus L. (Ixodoidea: Ixodidae) - le partie. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse* 51 : 89 - 97 , 2e partie 241 - 253 , 3e partie 343 - 360
- Gothe R. & Kraiss A. (1982) Zur Lokalisation der Pheromonemission und -perception bei Argas (Persicargas) walkerae Kaiser und Hoogstraal, 1969. *Zbl. Vet. Med. B.* 29 : 573 - 582
- Haggart D. A. & Davis E. E. (1979) Electrophysiological responses of two types of ammonia-sensitive receptors on the first tarsi of ticks. *Rec. Adv. Acarol.* 1 : 421 - 425
- Haggart D. A. & Davis E. E. (1980) Ammonia-sensitive neurons-on the first tarsi of th tick Rhipicephalus sanguineus. *J. Ins. Physiol.* 26 : 517 - 523
- Haggart D. A. & Davis E. E. (1981) Neurons sensitive to 2,6-dichlorophenol on the tarsi of the tick Amblyomma americanum (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 18 : 187 - 193

- Hájková Z., Bouchalová J. & Leahy M. G. (1980) A pre-attachment aggregation pheromone in the adult metastriate tick Hyalomma dromedarii Koch (Acarina: Ixodidae). *Folia Parasitologica (Praha)* 27 : 367 - 372
- Hájková Z. & Leahy M.G. (1982) Pheromone-regulated aggregation in larvae, nymphs and adults of Ixodes ricinus L. (Acarina:Ixodidae). *Folia Parasitologica (Praha)* 29 : 61 - 67
- Hess E. & Vlimant M. (1980) Morphology and fine structure of tarsal chemosensory hairs of the tick Amblyomma variegatum (Acarina, Ixodidae, Metastriata), including preliminary electrophysiological results. in : Olfaction and Taste VII
- Hess E. & Vlimant M. (1982) The tarsal sensory system of Amblyomma variegatum Fabricius (Ixodidae, Metastriata): I. Wall pore and terminal pore sensilla. *Revue suisse Zool.* 89 : 713 -729
- Hess E. & Vlimant M. (1983a) The tarsal sensory system of Amblyomma variegatum Fabricius (Ixodidae, Metastriata): II. No pore sensilla. *Revue Suisse Zool.* 90 : 157 - 167
- Hess E. & Vlimant M. (1983b) The tarsal sensory system of Amblyomma variegatum Fabricius (Ixodidae, Metastriata): III. Mapping of sensory hairs and evolution of the relative importance of sensory modalities during post-embryonic development. *Revue Suisse Zool.* 90 : 887 - 897
- Hoogstraal H. (1956) African Ixodoidea. I. Ticks of the Sudan (with special reference to Equatoria Province and preliminary reviews of the genera *Boophilus*, *Margaropus*, and *Hyalomma*). Dep. Navy, Sur. Med. Surg.; Washington, D.C. 1101 pp.
- Hoogstraal H. & Aeschlimann A. (1982) Tick-Host Specificity, *Mitteilungen der Schweiz. Entomologischen Gesellschaft* 55 : 5 - 32
- Kafka W. A. (1970) Molekulare Wechselwirkung bei der Erregung einzelner Riechzellen. *Z. Vergl. Physiol.* 70 : 105 - 143
- Karlson P. & Lüscher M. (1959) "Pheromones": A new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183 : 55 - 56
- Kellum D. & Berger R. S. (1977) Relationship of the occurrence and function of 2,6-dichlorophenol in two species of Amblyomma (Acari:Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 9 : 67 - 70

- Khalil G. M., Nada S. A. & Sonenshine D. E. (1981) Sex pheromone regulation of mating behaviour in the camel tick Hyalomma dromedarii (Ixodoidea: Ixodidae). J. Parasitol. 67 : 70 - 76
- Leahy M. G., Vandehey R. & Galun R. (1973) Assembly pheromone(s) in the soft tick Argas persicus (Oken). Nature 1461 : 525 - 516
- Leahy M. G., Karuhize G., Mango C. & Galun R. (1975a) An assembly pheromone and its perception in the tick Ornithodoros moubata Murray (Acari:Argasidae). J. Med. Entomol. 12 : 284 - 287
- Leahy M. G., Sternberg S., Mango C. & Galun R. (1975b) Lack of specificity in assembly pheromones of soft ticks (Acari:Argasidae). J. Med. Entomol. 12 : 413 - 414
- Leahy M. G., Hájková Z. & Souchalová J. (1981) Two female pheromones in the metastriate tick Hyalomma dromedarii (Acarina:Ixodidae). Acta ent. bohemslov. 78 : 224 - 230
- Leahy M. G., Kovacic A., Mannion C. & Schulze L. (1983) Pheromone-induced aggregation of ixodid ticks before host contact. Experientia 29 : 859 - 860
- Lees A. D. (1948) The sensory physiology of the sheep tick Ixodes ricinus L. J. Exp. Biol. 25 : 145 - 183
- Mermod C., Aeschlimann A. & Graf J.-F. (1973) Ecology and ethology of Ixodes ricinus Linnaeus 1758, in Switzerland (Acarina, Ixodoidea). First note - numerical fluctuations. Acarologia 15 : 197 - 205
- Norval R. A. I. (1974) The life cycle of Amblyomma hebraeum Koch, 1844 (Acarina:Ixodidae). J. Entomol. Soc. S. Afr. 37 : 357 - 367
- Norval R. A. I. & Capitini L. A. (1974) The rate of feeding and spermatogenesis in Amblyomma hebraeum Koch 1844 (Acarina:Ixodidae). J. Entomol. Soc. S. Afr. 37 : 393 - 401
- Norval R. A. I. & Rechav Y. (1979) An assembly pheromone and its perception in the tick Amblyomma variegatum Fabricius (Acarina:Ixodidae). J. Med. Entomol. 16 : 507 - 512
- Norval R. A. I., Colborne J., Tannock J. & Mackenzie P. K. I. (1980) The life cycle of Amblyomma tholloni Neumann (1899) (Acarina:Ixodidae) under laboratory conditions. Veterinary Parasitology 7 : 255 - 263

- Obenchain F. D. (1984) Behavioural interactions between the sexes, and aspects of species specificity pheromone mediated aggregation and attachment in Amblyomma. in : Acarology VI 1 : 387 - 392
- Petney T. N. & Bull C.M. (1981) Anon-specific aggregation pheromone in two australian reptile ticks. Anim. Behav. 29 : 181 - 185
- Petney T. N. & Andrews R. H. (1982) The influence of similar aggregation pheromones on the microhabitat choice of two parapatric species of reptile ticks (Acari:Ixodidae). Oecologia 55 : 364 -368
- Rechav Y., Whitehead G. B. & Knight M. M. (1976) Aggregation response of nymphs to pheromone(s) produced by males of the tick Amblyomma hebraeum Koch. Nature 259 : 563 -564
- Rechav Y., Parolis H., Whitehead G. B. & Knight M. M. (1977a) Evidence for an assembly pheromone(s) produced by males of the Sont Tick Amblyomma hebraeum Koch (Acarina:Ixodidae). J. Med. Entomol. 14 : 71 - 78
- Rechav Y., Terry S., Knight M. M. & Cross R. H. M. (1977b) Chemoreceptor organs used in detection of pheromone(s) of the tick Amblyomma hebraeum Koch (Acarina:Ixodidae). J. Med. Entomol. 14 : 395 - 400
- Rechav Y. (1978) Specificity in assembly pheromones of the tick Amblyomma hebraeum Koch (Acarina:Ixodidae). J. Med. Entomol. 15 : 81 - 83
- Rechav Y. & Whitehead G. B. (1978) Field trials with pheromone-acaricide mixtures for control of Amblyomma hebraeum Koch. J. Econ. Entomol. 71 : 149 - 151
- Rechav Y., Norval R. A. I. & Oliver J. H. (1982) Interspecific mating of Amblyomma hebraeum an Amblyomma variegatum (Acari:Ixodidae). J. Med. Entomol. 19 : 139 - 142
- Rechav Y. (1983) Bioassay technique for the pheromone emitted by Amblyomma hebraeum males. Onderstepoort J. vet. Res. 50 : 133 - 135
- Sinitzina E. A. (1974) The electrophysiological reaction of the neurons of Haller's organ in Hyalomma asiaticum P.Sc. et E. Schl. to odour (Acari:Ixodidae). Parazitologica 8 : 223 - 226

- Sonenshine D. E., Silverstein R. M., Layton E. C. & Homsher P. J. (1974) Evidence for the existence of a sex pheromone in 2 species of ixodid ticks (Metastigmata: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 11 : 307 - 315
- Sonenshine D. E., Silverstein R. M., Plummer E., West J. R. & McCullough T. (1976) 2,6-dichlorophenol, the sex pheromone of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni* Stiles, and the American Dog Tick, *Dermacentor variabilis* (Say). *J. Chem. Ecol.* 2 : 201 - 209
- Sonenshine D. E., Gainsburg D. J. & Homsher P. J. (1982a) Quinone inhibition of sex pheromone activity in the ticks *Dermacentor andersoni* Stiles and *Dermacentor variabilis* (Say). *J. Parasitol.* 68 : 921 - 929
- Sonenshine D. E., Khalil G. M., Homsher P. J. & Mason S. N. (1982b) *Dermacentor variabilis* and *Dermacentor andersoni* : Genital Sex Pheromones. *Experimental Parasitology* 54 : 317 - 330
- Sonenshine D. E., (1984) Pheromones of Acari and their potential use in control strategies. in : *Acarology VI* 1 : 100 - 108
- Sonenshine D. E. (1984) Tick Pheromones, in K.F. Harris (Editor), *Current Topics in Pathogen-Vector-Host Research*, New York 2 : 225 - 263
- Thonney F. (1980) Morphology and structure of presumed tarsal chemoreceptors of the first pair of legs of *Ixodes ricinus* L. (Acarina, Ixodidae, Prostriata). *Proc. Olfaction and Taste VII*, p.191
- Thurm U. (1964) Mechanoreceptors in the Cuticle of the Honey Bee : Fine Structure and Stimulus Mechanisms. *Science* 145 : 1063 - 1065
- Totze R. (1933) Beiträge zur Sinnesphysiologie der Zecken. *Z. Vergl. Physiol.* 19 : 110 - 161
- Treverrow N.L., Stone B. F. & Cowie M. (1977) Aggregation pheromones in 2 Australian hard ticks, *Ixodes holocyclus* and *Aponomma concolor*. *Experientia* 33 : 680 - 682
- Waladde S. M. (1978) A study of the structure and physiology of certain receptors of the adult cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini; Ixodidae). Ph D thesis, University of Queensland
- Waladde S. M., Kokwaro E. D. & Chintawi M. (1981) A cold receptor in the tick *Rhipicephalus appendiculatus* : Electrophysiological and ultrastructural observations. *Insect Sci. Applications* 1 : 191 - 196

- Waladde S. M. (1982) Tip-recording from ixodid tick olfactory sensilla : responses to tick related odours. J. Comp. Physiol. 148 : 411 - 418
- Walker J. B. & Parson S. T. (1964) The laboratory rearing of Amblyomma sparsum Neumann 1899. Parasitology 54 : 173 - 175
- Wood W. F., Leahy M. G., Galun R., Prestwich G., Meinwald J., Purnel R. E. & Payne R. C. (1975) Phenols as pheromones of ixodid ticks : a general phenomenon ?. J. Chem. Ecol. 1 : 501 - 509

Nachträge :

- Blendermann K. (1984) Un récepteur pour 1 méthyle salicylate dans la capsule de l'Organe de Haller chez la tique Amblyomma variegatum (Fabricius). Travail de licence, Université de Neuchâtel
- Hess E. & Loftus R. (1984) Warm and cold receptors of two sensilla on the foreleg tarsi of the tropical bont tick Amblyomma variegatum. L. Comp. Physiol. A 155 : 187 - 195
- Bauer B. & Wetzel H. (1975) Effect of bacteria on tsetse flies fed through membrane. Proc. Symp. Sterility Principle for Insect Control, IAEA-SM 186 : 495-499

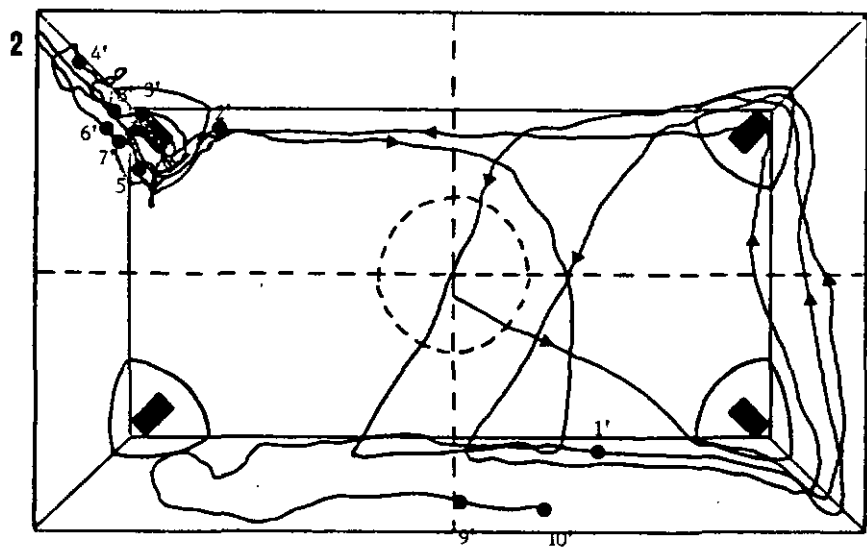
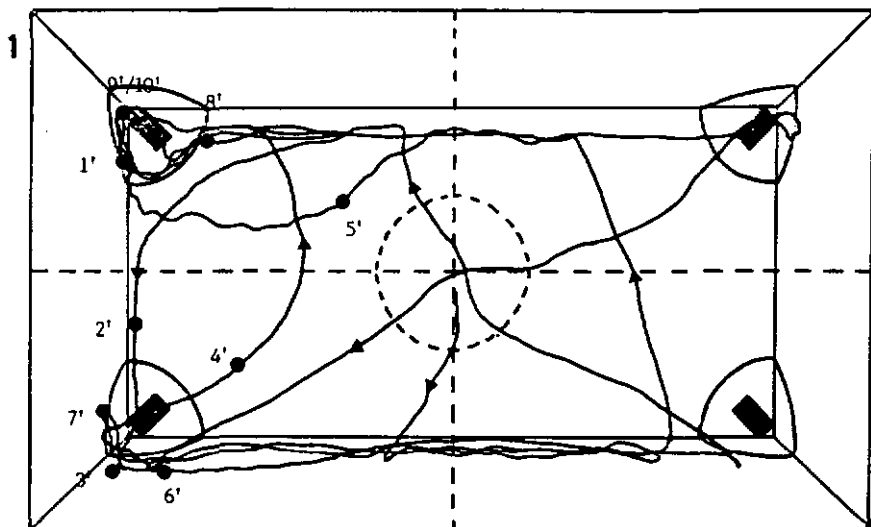
CURRICULUM VITAE

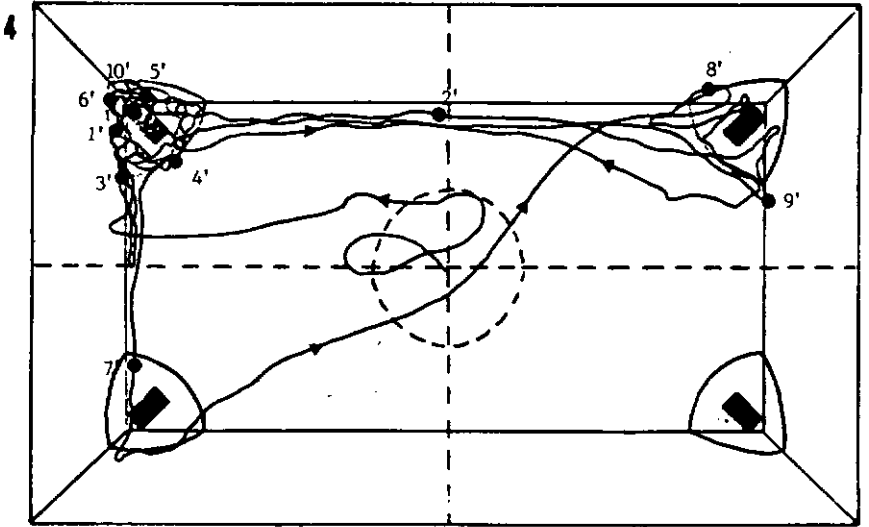
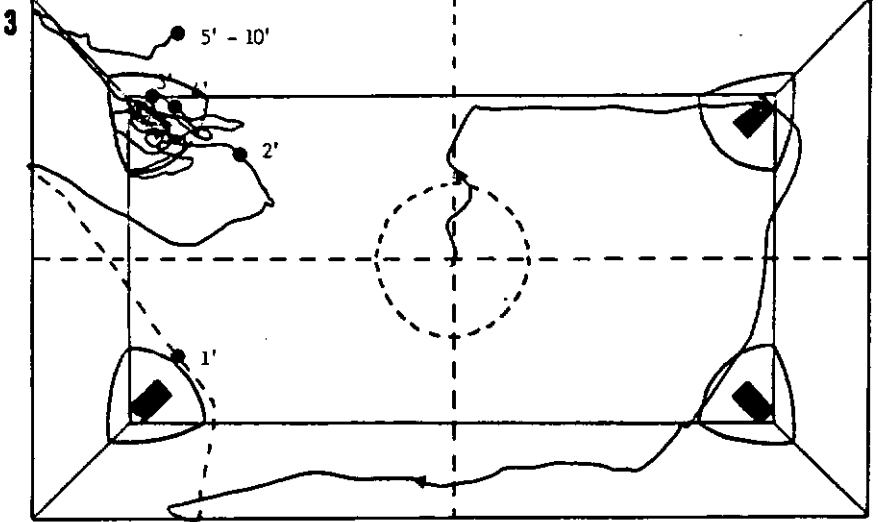
Als Sohn des Erhard Oswald Schöni und der Rosmarie, geborene Stauffer wurde ich, Reto Peter Schöni von Linden (BE), am 31. Oktober 1955 in Basel geboren. In Basel besuchte ich die Primarschule und anschliessend von 1967-1974 das Humanistische Gymnasium. Nach Abschluss der Matur am 20.3.1974 und nach der Rekrutenschule begann ich im Herbst desselben Jahres mit dem Studium der Zoologie und Botanik an den Instituten der Universität Basel. In den Nebenfächern studierte ich organische und anorganische Chemie, Biochemie, physikalische Chemie und Mikrobiologie. Nach dem Abschluss des Vordiploms im Jahr 1976 wählte ich die Schwerpunktfächer Entomologie (inkl. Ontogenese und Genetik), Ethologie, medizinische Biologie/Parasitologie und Pflanzenphysiologie (inkl. Populationsdynamik). Vom 20.2.-31.10.1980 konnte ich unter der Leitung von PD Dr. Leo Jenni am Schweizerischen Tropeninstitut in Basel eine Diplomarbeit mit dem Titel: "Zyklische Uebertragung von *in vitro* gezüchteten Blutformen und prozyklischen Formen von Trypanosoma (Trypanozoon) brucei brucei über Glossina morsitans morsitans" durchführen. Nach dem Abschluss der Diplomprüfung in Biologie I am 15. Dezember 1980 begann ich im Februar des darauffolgenden Jahres mit der vorliegenden Dissertation am Zoologischen Institut der Universität Neuenburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Aeschlimann und Dr. Ernst Hess. Gleichzeitig arbeitete ich zuerst als Praktikant und später auch als Doktorand in der Abteilung Biotechnik (heute: Tiergesundheit) der Ciba-Geigy AG in St.Aubin/FR an der Entwicklung von *in vitro* Modellen für das Screening von Acariziden unter der Leitung von Dr. R. Immler und Dr. W. Häusermann. Ebenfalls während dieser Zeit besuchte ich Vorlesungen und Praktika im Rahmen eines Nachdiplomstudiums (3ème cycle) in Parasitologie (Certificat d'Etudes Approfondies en Parasitologie/CEAP). Nach Abschluss der praktischen Arbeiten an der Dissertation begann ich vorerst temporär und ab Oktober 1984 ganzzeitiglich mit der Mitarbeit an einem Nationalfondsprojekt über eiablagebeeinflussende Pflanzenstoffe und Pheromone für Frucht- und Gemüeschädlinge an der Eidgenössischen Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau in Wädenswil zusammen mit den Herren Dr. Erich Städler und Dr. Ernst Boller.

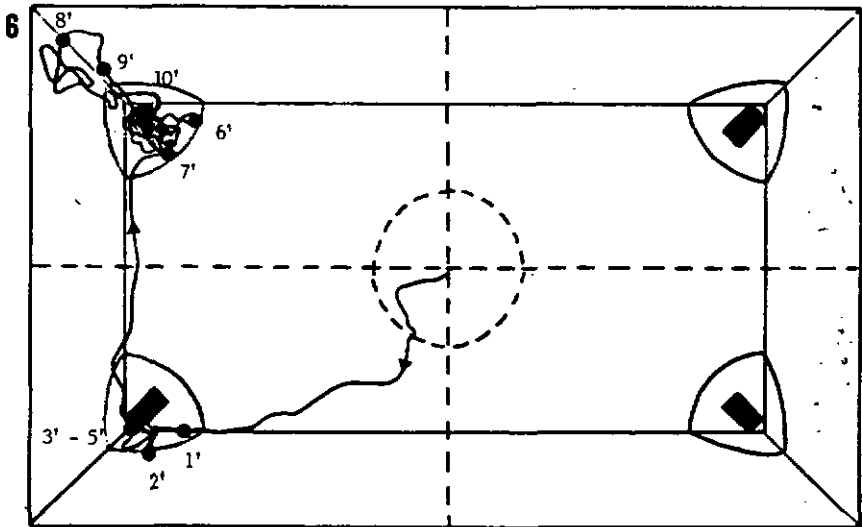
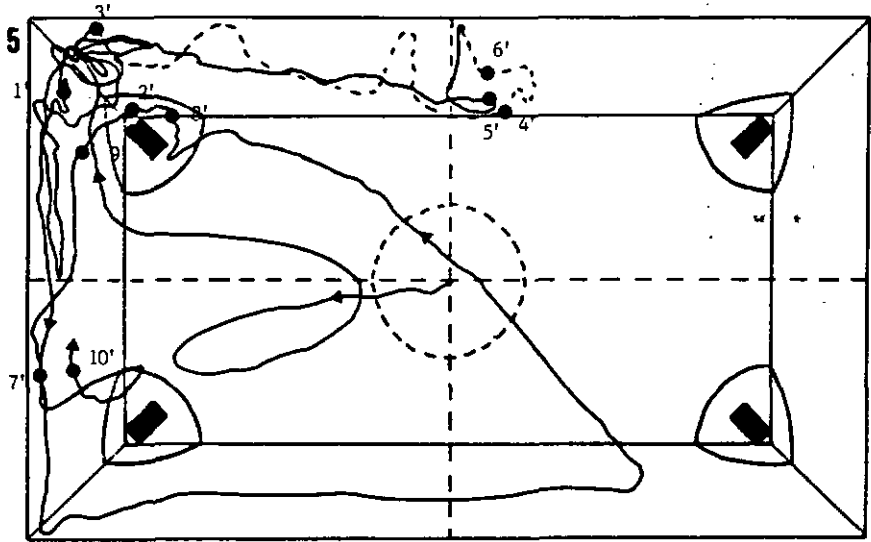
Im Laufe meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Praktika bei den folgenden Dozentinnen und Dozenten:

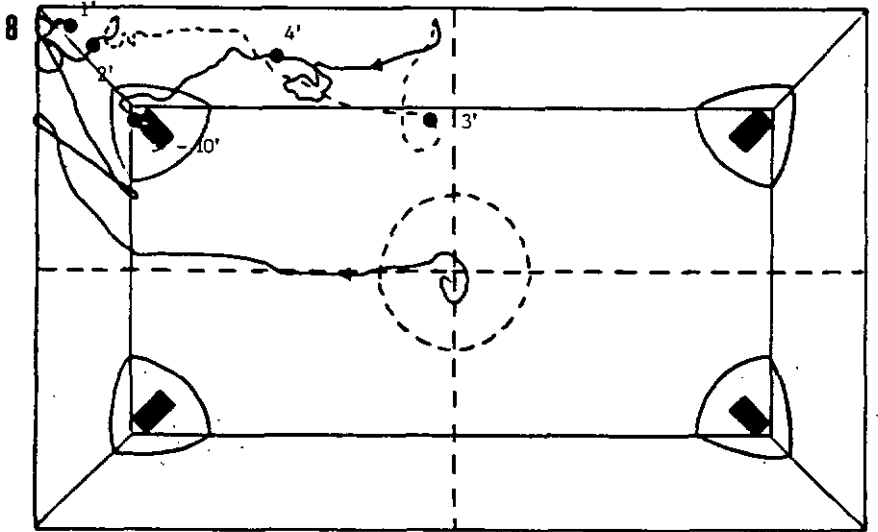
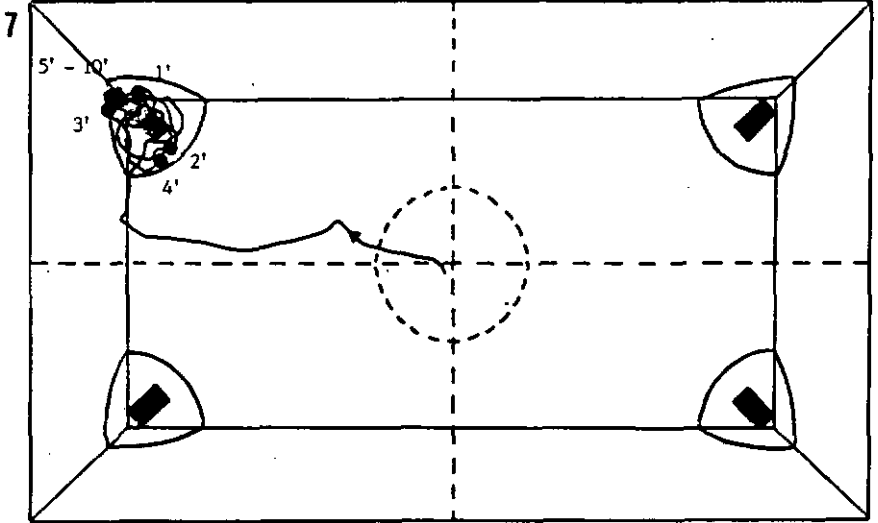
A. Aeschlimann, P. Bärtschi, M. Brossard, P.-A. Diehl, E. Ebert, S. Fallab,
C. Farron, E. Flückiger, W. Flückiger, T.A. Freyvogel, D. Grobe, H.P. von Hahn,
H. Hecker, C. Honegger, L. Hottinger, L. Jenni, L. Jenny, E. Lang, H. Löffler,
H. Nüesch, J.J. Oertli, U. Rahm, R. Schenkel, E. Schmid, F. Schwinn, D. Senn,
H. Sigel, E. Sorokin, W. Stingelin, Ch. Tamm, P. Walter, H. Zoller.

A N H A N G

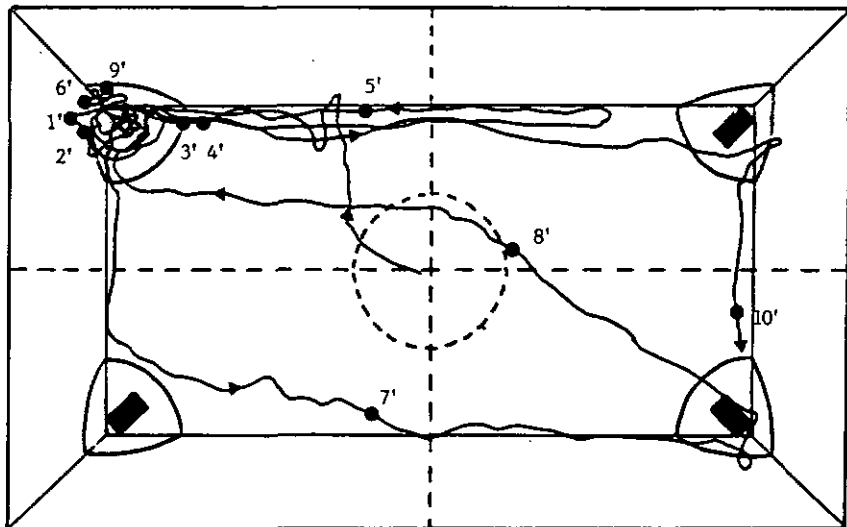








9



10

