

Beiträge zur Biologie des Kleinen Nachtpfauenauges, *Saturnia pavonia* (Linnaeus, 1758)

Contributions to the Biology of the Emperor Moth, *Saturnia pavonia*
(Linnaeus, 1758)

TIM LAUSSMANN, JESSICA BOSSEMS, SABINE METZGER & KLAUS LUNAU

Zusammenfassung: Das Kleine Nachtpfauenaug, *Saturnia pavonia* (Linnaeus, 1758), wird von Mitgliedern des Naturwissenschaftlichen Vereins Wuppertal seit dem Jahr 2004 insbesondere als Anschauungsmaterial für Unterrichtszwecke gezüchtet. Obwohl die Zucht vielfach beschrieben wurde, sind einzelne Aspekte zur Biologie dieser Schmetterlinge noch nicht ausreichend erforscht. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einige dieser Wissenslücken zu schließen. Es ist bekannt, dass meist einige Puppen einer Zucht nicht unmittelbar im Jahr nach der Raupenentwicklung den Falter entlassen, sondern ein weiteres Jahr oder sogar mehrere Jahre überliegen. Die Paarung von Faltern aus überliegenden Puppen ergab keine erhöhte Anzahl überliegender Nachkommen, so dass eine einfache genetische Disposition unwahrscheinlich ist. Simuliert man ein unterschiedlich langes, kühles Frühjahr durch Lagerung der Puppen bei 6 °C bis 10 °C, so ergeben sich keine Zusammenhänge zur Anzahl überliegender Puppen. Demnach spielen die Wetterverhältnisse im Frühling für das Überliegen eine untergeordnete Rolle. Es deutet sich an, dass Puppen mit einem besonders geringen Gewicht nicht zum Überliegen neigen. Durch Manipulation des Tag-Nacht-Rhythmus unter künstlicher Beleuchtung während der Schlupfzeit der Falter konnte gezeigt werden, dass Licht eine wesentliche Rolle bei der Steuerung der Schlupfzeit spielt. So schlüpfen die männlichen Falter signifikant früher, 2 bis 4 h nach dem Anschalten des Lichts, während die Weibchen 2 bis 6 h nach dem Anschalten des Lichts schlüpfen. Die Falter geben beim Schlüpfen ein farbloses Sekret aus der Mundöffnung ab. Bei diesem Sekret handelt es sich um eine Lösung eines Hydrogencarbonats. Es konnten jedoch weder ein proteolytisches Enzym, wie die von *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) bekannte „Cocoonase“, noch ein anderes Protein nachgewiesen werden. Im letzten Stadium (L5) haben die Raupen von *S. pavonia* üblicherweise Warzen, die in der Färbung zwischen Gelb und Orange variieren. Im Jahr 2010 traten in unserer Zucht erstmals Raupen mit auffälligen, weißlichen bis rosafarbenen Warzen auf. Offenbar handelt es sich um zwei genetisch getrennte Raupenformen (gelb-orange Warzen und weißlich-rosafarbene Warzen). Es wurden Kreuzungsexperimente durchgeführt, die mit einem klassischen dominant-rezessiven Erbgang mit dem dominanten Merkmal „rosafarbene Warzen“ in Einklang stehen. Zudem konnte gezeigt werden, dass insbesondere rotes Licht für die Farbgebung der Warzen nach der letzten Häutung der Raupen essenziell ist (gelb → orange bzw. weiß → rosa). Neben der variablen Warzenfärbung lassen sich in den letzten beiden Stadien (L4 und L5) der Raupen auch unterschiedlich stark ausgeprägte Melanisierungsgrade der Kutikula beobachten. Die auftretenden Melaninmuster konnten in Anlehnung an die Literatur in acht (L4) bzw. sechs (L5) Kategorien eingeteilt werden. Es stellte sich heraus, dass insbesondere die Lichtexposition den Grad der Melanisierung beeinflusst. Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit ist die proteinchemische Untersuchung eines milchigen Sekrets, welches bei mechanischer Reizung der Warzen aus diesen austritt. Die entnommenen Proben wurden per SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, um Unterschiede in der Zusammensetzung zwischen Hämolymphe und Warzenssekret aufzuzeigen. Zudem wurden ausgewählte Proteine aufbereitet und mittels Massenspektrometrie einige Peptidsequenzen dieser Proteine ermittelt, jedoch konnten die Proteine bislang nicht identifiziert werden.

Schlüsselwörter: *Saturnia pavonia*, Melanisierung, Überwinterung, Cocoonase, Warzenfarbe

Summary: Since 2004 the emperor moth, *Saturnia pavonia* (Linnaeus, 1758), is continuously bred by members of the Scientific Association Wuppertal (North Rhine-Westfalia, Germany) especially for educational purposes. Although breeding of this moth has been extensively described previously there are still some aspects of its biology that need further investigation. The present work attempts to close some of these knowledge gaps. It is known that a certain percentage of pupae do not hatch after the first hibernation, but are overlying for at least one more year. Mating of moths from overlying pupae did not result in an increased number of overlying descendants. Thus, a simple genetic prevalence for overlying seems to be unlikely. Simulation of a cold spring of different length by refrigerating pupae at 6 °C to 10 °C did not result in a different number of overlying pupae, indicating that the weather in spring does not play a crucial role in the regulation of this phenomenon. However, the results indicate that lightweight pupae do not tend to overlying. By manipulation of the day-night rhythm using artificial illumination developing pupae showed that light plays an important role for regulation of hatching time of the moth. Male moths hatch significantly earlier, 2 to 4 hours after onset of illumination, while female moths hatch 2 to 6 hours after onset of illumination. During hatching the moths secrete a colorless liquid at their mouth. The secretion consists of an aqueous solution of a bicarbonate. However, neither a proteolytic enzyme like the "cocoonase" known from *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) nor any other protein could be detected. Usually, last instar (L5) caterpillars of *S. pavonia* have warts that vary in color between yellow and orange. In 2010 some caterpillars of our breed exhibited striking whitish to pink warts. Obviously, there are two genetically distinct forms of caterpillars (yellow-orange warts and whitish-pink warts). Breeding experiments are in accordance with a classic dominant-recessive mode of inheritance with the dominant allele "pink warts". Additionally, it could be shown that especially red light is essential for the coloring of warts after the last moulting of caterpillars (yellow → orange and white → pink, resp.). Besides different wart colouring, caterpillars in fourth and fifth instar show various degrees of melanisation of the cuticula. The melanin patterns were differentiated into eight (L4), resp. six categories (L5) based on previous references. It could be demonstrated that light seems to be the predominant inducing factor for various melanisation of the cuticula. Another aspect of this study was the protein chemical analysis of a milky liquid, which is secreted when warts are stimulated mechanically. The samples were separated by SDS gel electrophoresis. Differences in composition of wart secretion and haemolymph were shown. Selected proteins were analysed by mass spectrometry and several peptide sequences were found. However, none of the proteins could be identified so far.

Keywords: *Saturnia pavonia*, melanisation, hibernation, cocoonase, wart color

1. Einleitung

Das Kleine Nachtpfauenaug (*Saturnia pavonia*) ist unter Schmetterlingskundlern sehr beliebt, da es relativ einfach zu züchten ist und einen bemerkenswerten Lebenszyklus aufweist.

Die Puppen von *S. pavonia* überwintern in braunen, birnenförmigen Kokons, welche mit Reusen aus dicht zusammenstehenden Spinnfäden versehen sind, die kegelförmig nach außen weisen, so dass potenziellen Räubern das Eindringen erschwert wird. Die Puppen liegen mit dem Kopf zur Reuse ausgerichtet in den Kokons. Es ist seit lan-

gem bekannt, dass meist einige Puppen einer Schmetterlingszucht nicht unmittelbar in dem auf die Raupenentwicklung folgenden Jahr den Falter entlassen, sondern ein weiteres Jahr oder sogar mehrere Jahre überliegen (FRIEDRICH 1983). Die Ursachen für dieses Phänomen liegen weitgehend im Dunkeln. In der Literatur findet man den Hinweis, dass bei Saturniiden der Kältereiz und die Tageslänge eine Rolle bei der Einleitung der Entwicklung des Falters in der Puppe spielen (DANKS 1987; TUSKES et al. 1996). Ebenso liest man, dass die „Dauer der Diapause [...] wohl erbmäßig festgelegt“ ist (FORSTER & WOHLFAHRT, 1954, S. 138).

Die Falter von *S. pavonia* schlüpfen im zeitigen Frühling ab den Mittagsstunden bis in den frühen Abend hinein. Die schlüpfenden Falter geben aus der Mundöffnung ein klares, farbloses Sekret ab, mit dem sie die Reuse einspeichern (LAUSSMANN & RADTKE 2008). Von einem verwandten Schmetterling, dem Seidenspinner *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) ist bekannt, dass er ein vergleichbares Sekret produziert, in dem ein proteolytisches Enzym („Cocoonase“) gelöst ist (KAFATOS et al. 1967). Von einer *B. mori*-Puppe konnten bis zu 200 µg Cocoonase gesammelt werden. Die Cocoonase wird in einem Sekret gelöst, welches im Wesentlichen aus einer ca. 150 mM Lösung von Kaliumhydrogencarbonat besteht (KAFATOS et al. 1967).

Die Eiablage erfolgt zumeist direkt in der auf die Paarung folgenden Nacht in größeren Gelegen. Die Raupen durchlaufen insgesamt fünf Stadien, wobei sich die Färbung der Raupen nach jeder Häutung verändert. Während die Eiraupen komplett schwarz gefärbt sind, bildet sich bei den Raupen im zweiten Larvenstadium ein orangefarbener lateraler Streifen aus. Im dritten Larvenstadium verbreitern sich die lateralen Längsstreifen und verbinden sich oft zu orangefarbenen dorsalen Querstreifen, die über jedes Körpersegment verlaufen. Insbesondere in den ersten beiden Larvenstadien leben die Raupen gesellig und vereinzeln sich anschließend. Die Färbung der Raupen im vierten Stadium ist äußerst variabel und zeichnet sich durch verschiedene grüne und schwarze Elemente sowie eine variable gelb bis orangefarbene oder weiß bis rosafarbene Warzenfärbung aus. Die Warzen können dabei auch durch die schwarzen Zeichnungselemente überdeckt sein (HINTZE-PODUFAL 1977). Im letzten Stadium besitzen die Raupen eine grüne Grundfärbung und mittig auf jedem Segment einen mehr oder weniger stark ausgeprägten schwarzen Querstreifen, der die Warzen umschließt. Es treten zudem Raupen auf, bei denen die schwarze Bände-

run den ganzen Körper bedeckt oder fast vollständig fehlt. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass der Grad der Melanisierung in den letzten beiden Stadien durch Umweltfaktoren, insbesondere durch taktile Reizung, beeinflusst wird (HINTZE-PODUFAL 1977). Dunkle Raupen sollen häufiger im Bergland zu finden sein (BERGMANN 1953). Auch im letzten Lavenstadium variiert die Färbung der Warzen zwischen Gelb-Orange (im Folgenden orangefarbene Morphe genannt) oder Weiß-Rosa (im Folgenden rosafarbene Morphe genannt). Es ist bekannt, dass die Warzen in Dunkelheit gelb bleiben und sich im Licht orange färben (LONG 1954). Die rosafarbene Morphe scheint seltener aufzutreten und wird in aktuellen Büchern zum Teil nicht beschrieben (z. B. EBERT & RENNWALD 1994). Allerdings wurde diese bereits in der historischen Literatur erwähnt (DUPONCHEL et al. 1849; POULTON 1887; BUCKLER 1889; LUTZ 1889). Auch im Internet können über die Google-Bildersuche einige Fotos solcher Raupen gefunden werden (z. B. www.senne-portal.de, „Fauna und Flora“).

Bei mechanischer Reizung wird ein milchiges Sekret aus den Warzen abgesondert (DEML & DETTNER 1990). Dieses Warzenssekret und die Hämolymphe von *S. pavonia* wurden schon mehrfach auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. DEML & DETTNER (1990, 1993, 1995, 1997) publizierten eine Reihe von Untersuchungen, die zeigten, dass sich Hämolymphe und Warzenssekret in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. Weiterhin hemmt das phenolhaltige Sekret das Wachstum von Bakterien, wirkt abwehrend auf räuberische Ameisen und löst Meidereaktionen bei Vögeln aus (DEML & DETTNER 1995).

In dem vorliegenden Artikel sollen insgesamt sechs Einzelaspekte im Lebenszyklus von *S. pavonia* beleuchtet werden:

- 1) Das Phänomen der überliegenden Puppen wurde noch nicht systematisch untersucht. In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob eine genetische

Veranlagung zum Überliegen existiert, welche Rolle der Ernährungszustand der Raupen beim Überliegen spielt und wie sich ein kühles Frühjahr auf die Zahl der überliegenden Puppen auswirkt.

- 2) Die Falter schlüpfen in der Regel ab dem späten Vormittag bis in den Nachmittag hinein. Es liegt die Vermutung nahe, dass der Zeitpunkt, zu dem die Falter schlüpfen, durch das Tageslicht gesteuert wird. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Puppen einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus unterworfen.
- 3) Um festzustellen, ob das Sekret von *S. pavonia*, welches beim Schlupf durch die Reuse des Kokons abgegeben wird, ähnlich zusammengesetzt ist wie das von *B. mori*, wurde das Sekret gesammelt und einer Untersuchung mittels Infrarotspektroskopie und SDS-Gelelektrophorese unterzogen.
- 4) Insbesondere im letzten Stadium treten Raupen in zwei unterschiedlichen Morphphen auf: Die „orangefarbene Morphe“ und die „rosafarbene Morphe“, die sich hinsichtlich der Warzenfarbe unterscheiden. Es soll geklärt werden, ob und, wenn ja, wie die Warzenfarbe vererbt wird.
- 5) Die Raupen variieren hinsichtlich der Melanisierung in den beiden letzten Larvenstadien erheblich. Es wurde versucht, die bekannte erhöhte Melanisierung bei taktiler Reizung der Raupen (HINTZE-PODUFAL 1977) unter definierten Bedingungen zu reproduzieren. Ergänzend wurden die Raupen in Dunkelheit, unter künstlichem Tageslicht und Licht definierter Wellenlängen (rot, grün, blau, ultraviolett) gehalten, um den Einfluss des Lichtes auf die Melanisierung zu erkunden.
- 6) Das Wehrsekret der Raupen, welches bei Berührung aus den Warzen austritt, besitzt eine hohe Proteinkonzentration. Um die bisher unbekannt Proteine zu identifizieren, wurden die Peptidsequen-

zen von einigen ausgewählten Proteinen mittels Massenspektrometrie ermittelt. Zudem wurden die Proteinstmuster in den Wehrsekreten von Raupen, die unter verschiedenen Beleuchtungsbedingungen gehalten wurden, verglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Experimente zu überliegenden Puppen

Weibliche, gezüchtete Falter von *Saturnia pavonia* wurden im Jahr 2008 mit Männchen aus dem Freiland in Wuppertal-Vohwinkel verpaart. Die aus diesen Paarungen (fünf Paare) erhaltenen Eier wurden untereinander gemischt und ein repräsentativer Anteil der Eier bis zur Puppe an Salweide (*Salix caprea*) gezüchtet. Für dieses Experiment wurden 48 Puppen (24 Männchen, 24 Weibchen) verwendet. Die Kokons wurden in einer Puppenkiste (Holzkiste mit Lüftungsöffnungen und einer Wasserschale, über der die Puppen gelagert werden) an einem schattigen Platz an der Westseite eines Gebäudes in Leverkusen-Opladen bei Außentemperatur überwintert und ca. alle vier Wochen mit Wasser besprüht. Anfang Februar des Jahres 2009 wurden die Kokons bei Außentemperatur geöffnet, die Puppe entnommen und mit einer Analysenwaage (Sartorius A200S, $d_d = 0,1 \text{ mg}$) auf 0,001 g genau gewogen. Die Puppen wurden anschließend in den jeweiligen Kokon zurückgegeben. Der Kokon wurde mit einem weißen Lackstift mit einer laufenden Nummer und der Jahreszahl beschriftet und in einen Kühlschrank überführt. Die Temperatur lag zwischen 6 °C und 10 °C (gemessen mit einem Minimum-Maximum-Thermometer). Die Puppen wurden in Gruppen zusammengestellt, so dass jede Gruppe eine repräsentative Anzahl an leichten, mittelschweren und schweren weiblichen oder männlichen Puppen enthielt. In regelmäßigen Abständen wurde eine Gruppe aus dem Kühlschrank entnommen

und auf Raumtemperatur (19 °C bis 23 °C, Minimum-Maximum-Thermometer) überführt. Der Tag des Schlupfes und die Nummer der jeweiligen Puppe wurden notiert. Das Experiment wurde mit 42 Puppen (21 Männchen, 21 Weibchen) aus dem Jahr 2009 im Jahr 2010 wiederholt. Die Daten aus den beiden Jahren wurden zusammengefasst. Zudem wurde das Gewicht weiterer 224 Puppen aus den Jahren 2008, 2009 und 2010 erfasst, die in dem jeweiligen Winter bei Umgebungstemperatur gehalten wurden. Tote Puppen (insgesamt sechs) wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Ergänzend wurden in einem Vorversuch am 10.7.2011, ca. fünf Wochen nach der Verpuppung der Raupen, insgesamt elf Puppen bei 2 °C bis 4 °C in einem Kühlschrank gelagert. Am 14.08. wurden die Puppen auf Raumtemperatur überführt und die Schlupfzeit der Falter dokumentiert. Das Experiment wurde am 02.09.2011 mit fünf Puppen wiederholt, die lediglich für zwei Tage bei 2 °C bis 4 °C im Kühlschrank gelagert wurden.

2.2. Manipulation der Schlupfzeit

Weibliche, gezüchtete Falter wurden im Jahr 2010 mit Männchen aus dem Freiland in Wuppertal-Vohwinkel verpaart. Die Tiere aus drei Paarungen wurden wie oben beschrieben gezüchtet und in einer abgedunkelten Puppenkiste überwintert. Ab dem 17.04.2011 wurden 42 Puppen (21 Weibchen, 21 Männchen) in ihren Kokons in ein leeres, mit schwarzem Karton abgedunkeltes 60-l-Aquarium überführt. Die Kokons wurden mit einer 16-W-Tageslicht-Leuchtstoffröhre einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus unterworfen. Das Licht wurde durch eine Zeitschaltuhr um 14:30 Uhr eingeschaltet und um 03:30 Uhr ausgeschaltet, so dass eine 13-h-Lichtperiode mit einer 11-h-Dunkelperiode abwechselte. Die Temperatur lag zwischen 16 °C und 21 °C (Minimum-Maximum-Thermometer). Die Kokons wurden täglich ab 15:30 Uhr

bis 22:00 Uhr im Abstand von 30 min sowie am folgenden Morgen kontrolliert. Frisch geschlüpfte Falter wurden aus dem Aquarium entnommen und die Schlupfzeit notiert. Ein weiteres Experiment wurde auch unter Tageslichtbedingungen durchgeführt. Hierfür wurden 29 Puppen (22 Männchen und sieben Weibchen) an einem schattigen Platz an der Westseite eines Gebäudes in Leverkusen-Opladen bei Außentemperatur (7 °C bis 22 °C, Minimum-Maximum-Thermometer) in einem transparenten 40-l-Kunststoffgefäß gelagert. Die Kokons wurden bei diesem Experiment täglich ab 10:00 Uhr bis 17:00 Uhr im Abstand von 30 min kontrolliert. Frisch geschlüpfte Falter wurden aus dem Gefäß entnommen und die Schlupfzeit notiert.

2.3. Untersuchung der Faltersekrets

Um das Sekret zu gewinnen, wurden acht Puppen kurz vor dem Schlüpfen aus ihrem Kokon entnommen. Das von den schlüpfenden Faltern aus der Mundöffnung ausgeschiedene Sekret wurde mit einer 20- μ l-Eppendorf-Pipette aufgenommen und in ein 1,5 ml fassendes Reaktionsgefäß aus Kunststoff überführt. Dabei wurden die Sekrete mehrerer Falter zusammengegeben. Auf diese Weise wurden insgesamt fünf Proben zu je ca. 40 μ l gewonnen. In zwei dieser Proben wurde durch Vorlage von 2 μ l konzentrierter Ameisensäure ein pH-Wert von kleiner 3 eingestellt, um einen denkbaren Eigenverdau des gesuchten proteolytischen Enzyms zu verhindern. Die Proben wurden bis zur Untersuchung bei -80 °C gelagert. Eine Probe wurde nach Feststellung des Gewichts gefriergetrocknet, um den Anteil des Feststoffes gravimetrisch zu bestimmen (Analysewaage Sartorius A200S, $d_d = 0,1$ mg). Der Feststoff wurde zudem mit Hilfe eines FT-IR Spektrometers (Nicolet Avatar 370 DTGS mit Smart-Orbit Diamant-ATR) untersucht. Die vier anderen Proben wurden einer SDS-Gelelektrophorese (LAEMMLI 1971) auf einem 12 %igen Poly-

acrylamidgel unterzogen. Hierfür wurde ein PerfectBlue-Doppelsystem Twin S von Peqlab benutzt. Die Anfärbung der Proteine erfolgte mit Hilfe der Coomassie-Brilliant-Blue-Kolloidalfärbung (Detektionslimit ca. 10 ng Protein pro Bande, KANG et al. 2002).

2.4. Vererbung der Warzenfarbe

Drei Kokons von Raupen mit rosafarbenen Warzen, zwei Weibchen und ein Männchen aus einer Zucht im Jahr 2010, wurden markiert. Ein Weibchen wurde 2011 mit dem Männchen verpaart (Paarung a). Das andere Weibchen wurde mit einem Freiland-Männchen verpaart (Paarung b). Leider war nicht bekannt, welche Warzenfarbe die Raupe des Freiland-Männchens hatte. Im folgenden Jahr 2012 wurden wiederum Kreuzungen mit Tieren durchgeführt, die aus den beiden Paarungen stammten. Die Kreuzungsexperimente werden aus der Tabelle 1 (unter 3.4.) ersichtlich.

2.5. Melanisierung der Kutikula

Zur Überprüfung des Einflusses der taktilen und visuellen Reize auf die Melanisierung der Kutikula wurden sieben Versuchsgruppen mit $n = 30$ gebildet, die unter verschiedenen Beleuchtungen aufgezogen wurden. Folgende Versuchsgruppen wurden gebildet: ‚rote Beleuchtung‘, ‚grüne Beleuchtung‘, ‚blaue Beleuchtung‘, ‚ultraviolette Beleuchtung‘, ‚Tageslichtkontrolle‘, ‚Dunkelkontrolle‘ und ‚taktile Reizung unter Tageslicht‘ (hier: $n = 15$). Die Unterbringung erfolgte in den Larvenstadien 1 bis 3 in Metallboxen mit den Maßen L 25 cm x B 35 cm x H 20 cm (Volumen: 17,5 Liter) und in den Larvenstadien 4 und 5 in Metallboxen mit den Maßen L 50 cm x B 40 cm x H 30 cm (Volumen: 60 Liter). Die Seitenwände und Deckel der Boxen wurden mit schwarzer Pappe beklebt und die Böden der Boxen mit weißem Cellulosepapier ausgelegt, so dass ähnliche Re-

flektions- und Absorptionseigenschaften in allen Boxen herrschten. Für die Beleuchtung wurden 30 cm lange Kaltlichtkathoden der Firma Sharkoon in den Farben ultraviolett (380 nm), blau (480 nm), grün (550 nm) und rot (630 nm) mit einer Beleuchtungsstärke von ca. 300 Lux verwendet. Die Beleuchtung der im ‚Tageslicht‘ gehaltenen Versuchsgruppen erfolgte mit vier Vollspektrumlampen ‚Biolum LW36/965‘ der Firma Osram mit einer Beleuchtungsstärke von ca. 2000 Lux. Die Beleuchtungsdauer betrug 14,5 h. Die Raupen der Dunkelkontrolle wurden in dauerhafter Dunkelheit gehalten. Die taktile Reizung erfolgte dreimal täglich für je drei, vier und drei Minuten mit einem Borstenpinsel. Zur Auswertung der Melaninmuster wurden alle Raupen aller Versuchsansätze in L4 und L5 fotografiert und die Melaninkategorien (Beschreibung siehe HINTZE-PODUFAL 1974) bestimmt. Zur statistischen Auswertung wurde die unter Tageslicht gehaltene Versuchsgruppe als Kontrolle definiert und die übrigen Versuchsansätze vergleichend mit einem Chi-Quadrat-Test for trend gegen die Tageslichtkontrolle getestet.

2.6. Proteinanalytische Untersuchung des Warzensekrets und der Hämolymphe

Aus jedem Versuchsansatz wurden Raupen der orangefarbenen Morphe und der rosafarbenen Morphe ausgewählt und mittels Glaskapillare (2 μ l) je eine Warzensekret- und eine Hämolympheprobe entnommen. Die Proben wurden in den Kapillaren belassen und bis zur weiteren Bearbeitung tiefgekühlt aufbewahrt. Zur Vorbereitung der Proben wurden diese aus den Kapillaren in Protein-LoBind-Eppendorf-Gefäße überführt und mit hochreinem Wasser versetzt, so dass je nach vorhandener Probenmenge, zwischen einem und zwei μ l, ein Verdünnungsverhältnis von 1:3 bzw. 1:6 hergestellt wurde. Die vorbereiteten Proben wurden per SDS-Gelelektrophorese, wie oben be-

schrieben, jedoch mit 10 %igem Trenngel aufgetrennt und die Proteinbanden vergleichend betrachtet. Einige auffällige Banden wurden aus den Gelen ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut. Die verdauten Peptide wurden mittels StageTips entsalzt und massenspektrometrisch untersucht. Mittels eines ESI-QqTOF-Hybrid-Massenspektrometers wurde in einem ersten Schritt ein Übersichtsspektrum erstellt. Einige interessante Peptide wurden anschließend mittels Tandem-Massenspektrometrie selektiert und anhand der Fragmentspektren sequenziert.

3. Ergebnisse

3.1. Überliegende Puppen

Um zu prüfen, ob der Ernährungszustand der Raupen von *Saturnia pavonia* eine Auswirkung auf die Veranlagung der Puppen zum Überliegen hat, wurden die Gewichte der Puppen ermittelt. Bei den nicht überliegenden Puppen ist zunächst der bekannte

Gewichtsunterschied der männlichen und weiblichen Puppen offensichtlich (Abb. 1) (LAUSSMANN & RADTKE 2008). Das Gewicht nicht überliegender männlicher Puppen beträgt $0,97 \text{ g} \pm 0,11 \text{ g}$, während das Gewicht nicht überliegender weiblicher Puppen mit $1,95 \text{ g} \pm 0,23 \text{ g}$ doppelt so hoch ist. Bei den überliegenden Puppen ergeben sich mit $0,99 \text{ g} \pm 0,09 \text{ g}$ (Männchen) und $1,93 \text{ g} \pm 0,25 \text{ g}$ (Weibchen) vergleichbare Werte. Ein ungepaarter t-Test zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede im Gewicht zwischen der Gruppe der überliegenden Puppen und der nicht überliegenden Puppen gibt ($p > 0,05$). Dennoch fällt auf, dass die Verteilung der Puppengewichte in der Gruppe der überliegenden Puppen weniger symmetrisch ist und sich insbesondere sehr leichte Exemplare nicht unter den überliegenden Puppen befinden. Überliegende Puppen wiegen im Schnitt $53 \text{ mg} \pm 19 \text{ mg}$ (Männchen, $n = 9$) bzw. $78 \text{ mg} \pm 21 \text{ mg}$ (Weibchen, $n = 5$) weniger als im Vorjahr.

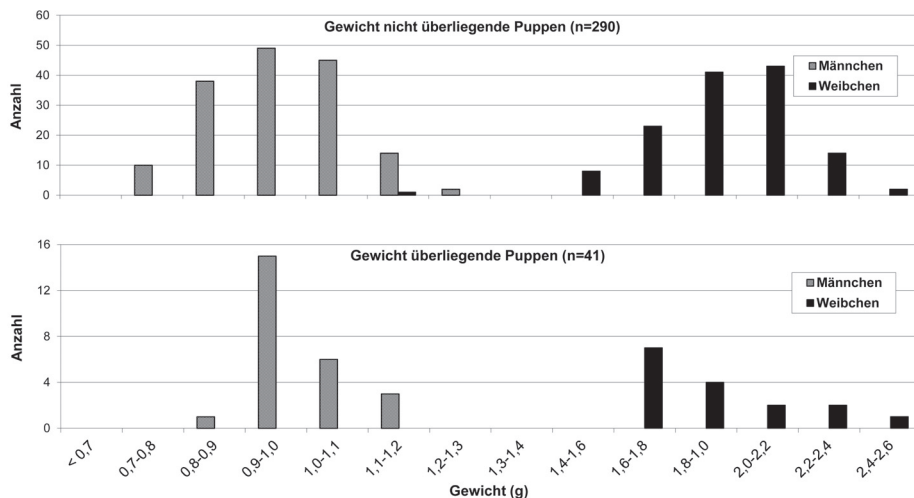


Abb. 1: Gewichtsverteilung von nicht-überliegenden Puppen und überliegenden Puppen von *Saturnia pavonia* aus den Jahren 2008, 2009 und 2010. Puppen mit besonders geringem Gewicht neigen nicht zum Überliegen.

Fig. 1: Weight distribution of non-overlying pupae (upper panel) and overlying pupae (lower panel) of *Saturnia pavonia* from 2008, 2009, and 2010. Light-weight pupae do not tend to overlying.

In einem weiteren Experiment wurden Puppen am Ende der Überwinterung unter natürlichen Bedingungen ab Anfang Februar in einen Kühlschrank überführt, um ein anhaltend kühles Frühjahr zu simulieren. In regelmäßigen Abständen wurde eine Gruppe von Puppen aus dem Kühlschrank entnommen und auf Raumtemperatur überführt. Es fällt auf, dass die Zeitspanne bis zum Schlupf der Falter kontinuierlich sinkt, je später die Puppen aus dem Kühlschrank entnommen wurden (Abb. 2). Es ist daher anzunehmen, dass die Puppen sich auch im Kühlschrank weiterentwickeln,

bis, wie in einem Fall am 15.05. geschehen, die Falter sogar im Kühlschrank schlüpfen. Überliegende Puppen treten allerdings in allen sieben Gruppen auf, ohne dass ein Zusammenhang zur Dauer des Aufenthalts im Kühlschrank zu erkennen ist. Eine weitere Erkenntnis aus diesem Experiment war, dass die Puppen, die sehr lange bei kühlen Temperaturen gehalten wurden, weniger zeitgleich schlüpften (in der Abbildung 2 als größere „Fehlerbalken“ zum Ende des Experiments zu erkennen). Zudem konnten die Falter der Gruppe vom 15.05. teilweise die Flügel nicht vollständig entfalten.

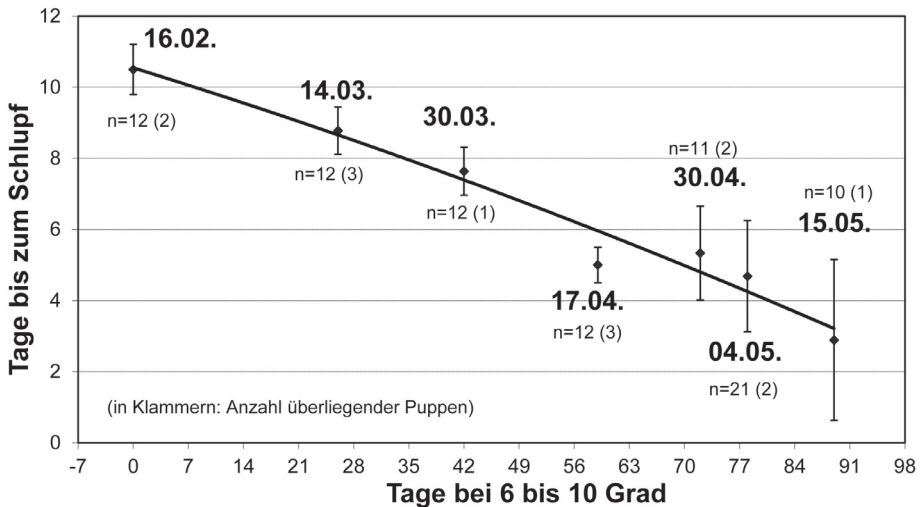


Abb. 2: Schlupf von *Saturnia pavonia*-Puppen in Abhängigkeit von der Aufenthaltsdauer in kühlen Temperaturen. Sieben Gruppen wurden Anfang Februar am Ende der Überwinterung unter natürlichen Bedingungen (Außentemperatur in Leverkusen) in einen Kühlschrank überführt (6 °C bis 10 °C). Die erste Gruppe wurde am 16.02. aus dem Kühlschrank entnommen und bei Raumtemperatur (19 °C bis 23 °C) gelagert. Von den n = 12 Puppen entließen zehn den Falter nach $10,5 \pm 0,7$ Tagen, während zwei Puppen (Zahl in Klammern) sich nicht zum Falter entwickelten. Diese waren jedoch vital und entließen im Folgejahr den Falter. In regelmäßigen Abständen wurden weitere Gruppen von Puppen aus dem Kühlschrank entnommen. In jeder Gruppe fanden sich überliegende Puppen. Ein Falter der letzten Gruppe schlüpfte am 15.05. im Kühlschrank.

Fig. 2: Hatching of *Saturnia pavonia* pupae in dependence on the exposure time in cold temperatures. Seven groups of *S. pavonia* pupae were transferred into a refrigerator (6 °C to 10 °C) at the end of the hibernation period (ambient temperature in Leverkusen, Germany). The first group was taken out of the refrigerator on 16th February and stored at room temperature (19 °C to 23 °C). Ten out of 12 pupae released the moth after $10,5 \pm 0,7$ days, while 2 pupae (number in brackets) did not develop. These two overlying pupae were vital and released the moth in the following year after a second hibernation. Periodically, additional groups of pupae were taken out auf the refrigerator. Overlying pupae were found in every single group. One moth hatched on the 15th May in the refrigerator.

Des Weiteren wurde geprüft, ob möglicherweise eine genetische Veranlagung zum Überliegen existiert. Dazu wurden Falter aus überliegenden Puppen miteinander verpaart. Von den aus der Zucht der Nachkommen erhaltenen 39 Puppen war eine tot und alle anderen entließen direkt im Jahr nach der Raupenentwicklung den Falter.

Um zu erkunden, welche Auswirkung die Dauer der Kälteperiode während der Diapause der Puppen auf die Anzahl der überliegenden Puppen hat, wurden Puppen vor der Frostperiode einmal für fünf Wochen und einmal für zwei Tage bei 2 °C bis 4 °C in einem Kühlschrank gelagert. Alle Puppen, die für fünf Wochen im Kühlschrank lagen, entließen nach Überführung auf Raumtemperatur innerhalb von 12 bis 17 Tagen die Falter. Aus zwei Paarungen dieser Falter konnte dann bis in den Oktober hinein eine „zweite Generation“ gezüchtet werden. Aus den Puppen, die lediglich zwei Tage im Kühlschrank lagen, entwickelten sich keine Falter, sondern die Puppen verblieben in der Diapause.

3.2. Regulation der Schlupfzeit der Falter

Es ist bekannt, dass die Falter von *Saturnia pavonia* im Gegensatz zu vielen anderen Nachtfaltern tagsüber schlüpfen. Die Schlupfzeit hängt zudem von dem vorherrschenden Mikroklima ab. Bei hohen Nachttemperaturen an einem geschützten Ort (z. B. in einem Schuppen in sonniger Lage, DAHL, pers. Mitteilung) schlüpfen die Tiere schon morgens, während bei kühlen Nachttemperaturen in schattiger Lage viele Tiere erst ab den Mittagsstunden schlüpfen. Im warmen Frühling 2011 wurde das Schlupfverhalten der Tiere unter natürlicher Beleuchtung dokumentiert (Abb. 3). Es ist erkennbar, dass die männlichen Tiere tendenzmäßig vor den Weibchen zu schlüpfen beginnen und eine längere tageszeitliche Schlupfphase haben. Um festzustellen, ob die Schlupfzeit durch die Wahrnehmung von Tageslicht gesteuert wird, wurden Puppen einem künstlichen Tag-Nacht Rhythmus (13 h Licht, 11 h Dunkelheit) unterworfen (Abb. 4). Unter diesen definierten Bedingungen tritt der Unterschied zwischen der Schlupfzeit der Männchen und der

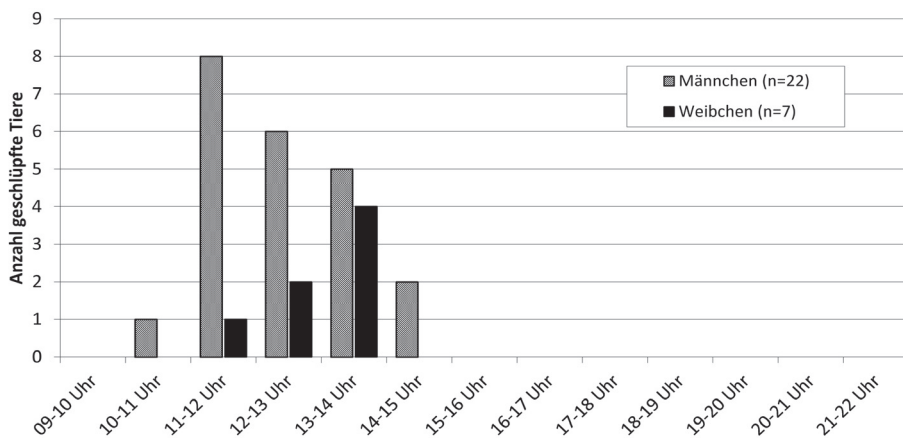


Abb. 3: Schlupfzeiten von *Saturnia pavonia*-Faltern unter natürlichen Bedingungen (Außentemperatur in Leverkusen, schattiger Platz). Männliche Falter beginnen vor den weiblichen Faltern zu schlüpfen.
Fig. 3: Hatching time of *Saturnia pavonia* moths under natural conditions (ambient temperature in Leverkusen, Germany, shady place). Male moths start hatching before female moths.

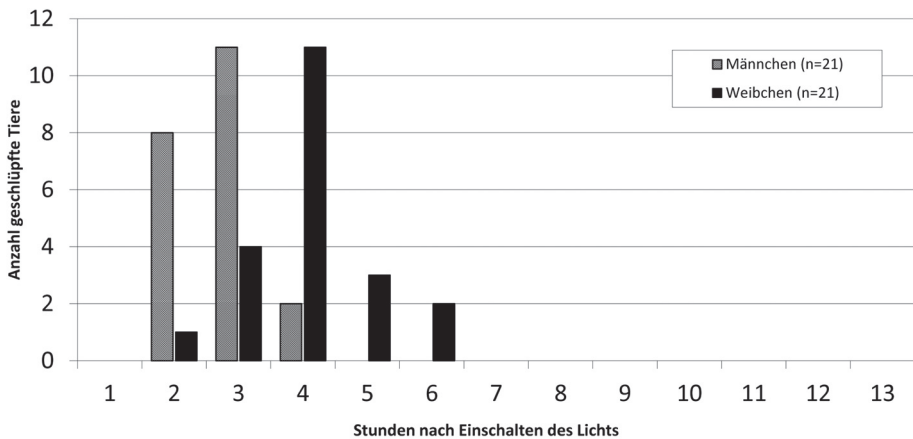


Abb. 4: Schlupfzeiten von *Saturnia pavonia*-Faltern unter künstlicher Beleuchtung (16-W-Leuchtstoffröhre, 13 h Licht – 11 h Dunkelheit). Die Temperatur wurde bei 16 °C bis 21 °C gehalten.

Fig. 4: Hatching time of *Saturnia pavonia* moths under artificial illumination (16 W fluorescent tube, 13 hours light, 11 hours darkness). The temperature was kept between 16 °C and 21 °C.

Weibchen noch deutlicher hervor. Die Unterschiede sind statistisch signifikant (ungepaarter t-Test: $p < 0,001$).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Tageszeit, zu der die Tiere schlüpfen, offensichtlich durch Licht gesteuert wird und die Männchen, bezogen auf die Tageszeit, tendenzmäßig vor den Weibchen schlüpfen. Grundsätzlich schlüpfen unter Zuchtbedingungen jedoch an jedem Tag Männchen und Weibchen in vergleichbarer Anzahl.

3.3. Zusammensetzung des Sekrets der Falter

Um festzustellen, ob das Sekret von *Saturnia pavonia* (Abb. 5) ähnlich zusammengesetzt ist wie das von *Bombyx mori* und ebenfalls ein der Cocoonase vergleichbares proteolytisches Enzym enthält, wurden insgesamt vier Proben mittels SDS-Gelelektrophorese auf enthaltene Proteine untersucht. Es konnte in keiner der Proben eine Proteinbande festgestellt werden. Da das Detektionslimit bei 10 ng Protein liegt und *B. mori* bis zu 200 µg Cocoonase pro Puppe produziert, ist davon auszugehen, dass *S. pavonia* dieses oder ein vergleichbares Protein nicht herstellt. Eine

weitere Probe wurde gefriergetrocknet und das Gewicht des verbliebenen weißen Rückstandes ermittelt. Das Sekret enthielt 1,5 % Feststoff. Durch Infrarotspektroskopie konnte festgestellt werden, dass es sich dabei um ein Hydrogencarbonat handelt. Berechnet man die Molarität der Lösung als Kaliumhydrogencarbonat, so kommt man, wie bei *B. mori*, auf einen Wert von ca. 150 mM. Der pH-Wert des Sekrets betrug 8,5. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *S. pavonia* zwar ein Sekret beim Schlüpfen produziert, dieses jedoch keine Enzyme wie die Cocoonase enthält.

3.4. Vererbung der Warzenfarbe

Um den Erbgang der unterschiedlichen Raupenmorphen aufzuklären, wurden Kreuzungsexperimente durchgeführt. Aus der Paarung eines Weibchens der rosafarbenen Morphe mit einem Männchen der rosafarbenen Morphe entstanden 100 Raupen mit rosafarbenen Warzen und 35 Raupen mit orangefarbenen Warzen (Verhältnis ca. 3 zu 1, F1a-Generation). Aus der Paarung eines Weibchens der rosafarbenen Morphe mit einem Freiland-Männchen entstanden

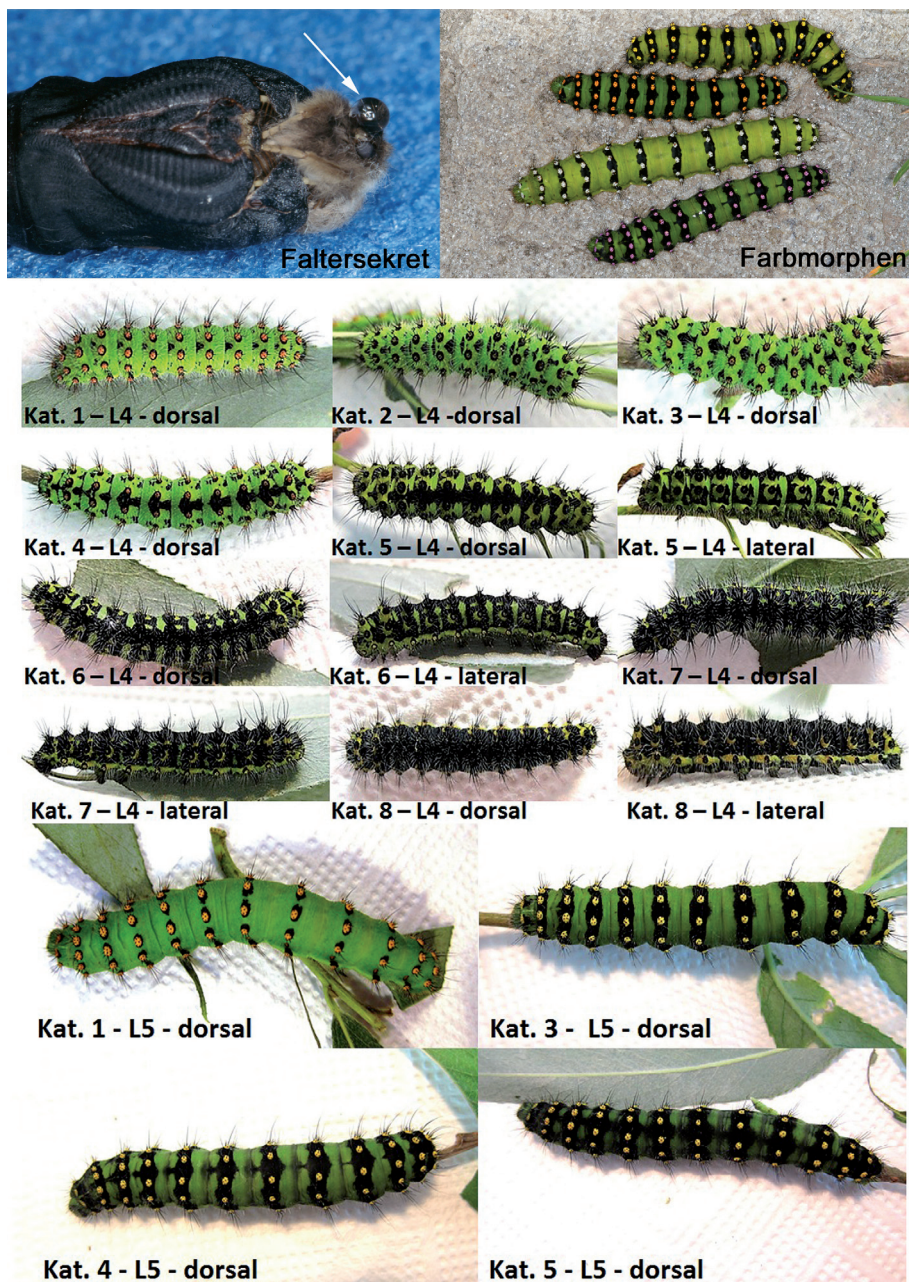


Abb. 5: Oben links: Faltersekret, das während des Schlupfes abgesondert wird (Pfeil); oben rechts: Farbmorphen der Raupen (L5): gelbe bis orangefarbene Warzen und weiße bis rosafarbene Warzen; mitte: Melanisierungskategorien in L4; unten: Melanisierungskategorien in L5 (Beispiele).

Fig. 5: Upper left: secretion of hatching moths (arrow); upper right: colour morphs of caterpillars (L5): yellow to orange warts and white to pink warts; middle: categories of melanisation in L4; bottom: categories of melanisation in L5 (examples).

Tab. 1: Paarungen von Faltern aus Raupen der rosafarbenen und orangefarbenen Morphen und die vermutete und beobachtete Warzenfärbung (L5) der Nachkommen (R = vermutetes dominantes Allel für rosafarbene Warzen, o = vermutetes rezessives Allel für orangefarbene Warzen)

Tab. 1: Mating of moths from caterpillars of orange and pink morphs and the expected and observed wart colour (L5) of their descendants (R = supposed dominant allele for pink warts, o = supposed recessive allele for orange warts; rosa = pink).

Warzenfarbe der Raupen, Paarung der Falter	Ursprung der Falter	vermutete Allelkombination	erwartetes Ergebnis (rosa:orange)	tatsächliches Ergebnis (rosa:orange)
Orange x orange	F1b x F1b	oo x oo	0:1	0:70 (0:1)
Rosa x rosa	F1b x F1b	Ro x Ro	3:1	58:17 (3,4:1)
Rosa x rosa	F1b x F1b	Ro x Ro	3:1	70:27 (2,6:1)
Rosa ♀ x orange ♂	F1b x F1a	Ro x oo	1:1	164:107 (1,5:1)
Rosa ♂ x orange ♀	F1b x F1a	Ro x oo	1:1	37:30 (1,2:1)

43 Raupen mit rosafarbenen Warzen und 45 Raupen mit orangefarbenen Warzen (Verhältnis ca. 1 zu 1, F1b-Generation). Aus diesen Verhältnissen wurde geschlossen, dass es sich möglicherweise um eine klassische dominant-rezessive Vererbung mit dem dominanten Allel „rosafarbene Warzen“ (R) und dem rezessiven Allel „orangefarbene Warzen“ (o) handelt. Im Jahr 2012 wurden daher gezielt weitere Paarungen vorgenommen (Tabelle 1).

3.5. Melanisierung der Kutikula

Die Melaninmuster der Raupen im vierten Larvenstadium wurden in acht Kategorien, die Melaninmuster der Raupen im fünften Larvenstadium in sechs Kategorien eingeteilt (HINTZE-PODUFAL 1974) (Abb. 5). Die auftretenden Melaninmuster der Raupen in L4 und L5 wurden kategorisiert (Kategorien 1-8 in L4, bzw. 1-6 in L5 jeweils mit zunehmendem Melaninanteil (Abb. 6)).

Der Einfluss von Licht ist deutlich erkennbar. Sonnenlicht blockiert eine starke Melanisierung, wohingegen die Haltung in Dunkelheit zur deutlichen Ausprägung der dunkleren Melaninmuster führt. Der Einfluss der Wellenlänge kann nicht eindeutig geklärt werden. Tendenziell lässt sich erkennen, dass die Beleuchtung mit langwelligem Licht zu einer verstärkten Melanisierung

führt, wohingegen die Bestrahlung mit kurzwelligem Licht eine verminderte Melaninsynthese und/oder Melanineinlagerung in die Kutikula bewirkt. Während in L4 auch die Randkategorien 1, 2, 7 und 8 ausgeprägt werden, beschränkt sich der Grad der Melanisierung in L5-Raupen im Wesentlichen auf die mittleren Melaninkategorien 3 und 4. Ein weiterer untersuchter Aspekt ist die Warzenfärbung bei L4 und L5 Raupen von *Saturnia pavonia*. Es konnte festgestellt werden, dass die Umfärbung der Warzen von gelb nach orange bzw. von weiß nach rosa nach der letzten Häutung (L4→L5) durch langwelliges (rotes) Licht bewirkt wird.

3.6. Proteinanalytische Untersuchung des Warzenssekrets und der Hämolymphe

Die Auftrennung der Proben mittels SDS-Gelelektrophorese zeigt, dass die Zusammensetzung der Hämolymphe unabhängig von Morphe (orange bzw. rosa) und Lichtbedingung (rot, grün, blau, UV, Tageslicht, Dunkelheit) zu sein scheint, da hier keine Unterschiede erkennbar sind (Abb. 7). Bei der Zusammensetzung der Warzenssekrete (Abb. 7) konnten Unterschiede im hochmolekularen Bereich beobachtet werden. Nach dem Lösen der Proteine und dem tryptischen Verdau der ausgeschnittenen Gelban-

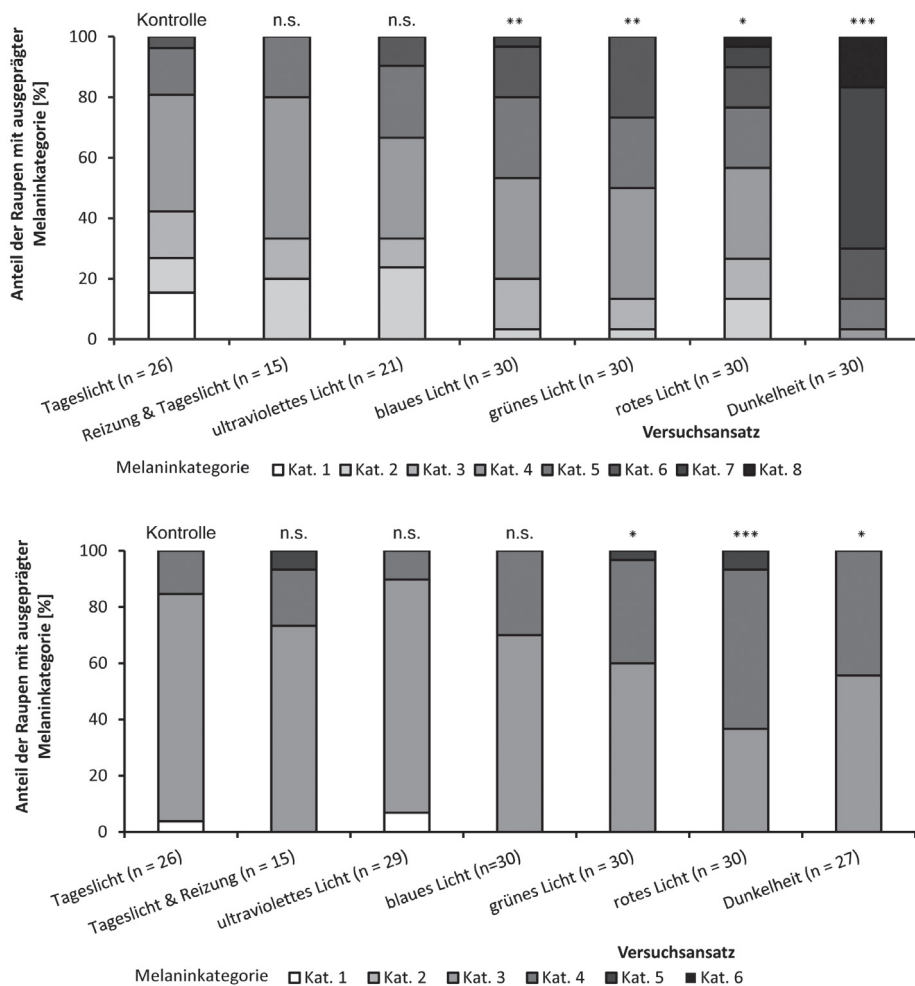


Abb. 6: Häufigkeitsverteilung der Kategorisierung der Melaninmuster nach HINTZE-PODUFAL (1974) in L4- Raupen (oben) und L5-Raupen (unten). Der Anteil der Raupen mit der jeweils ausgeprägten Melaninkategorie wird gegen die Beleuchtungsbedingungen aufgetragen. Nicht signifikante Unterschiede = n.s. signifikante Unterschiede = * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$). **Fig. 6:** Frequency distribution of melanin patterns by HINTZE-PODUFAL (1974) for L4-caterpillars (top) and L5-caterpillars (bottom). The amount of caterpillars belonging to the respective melanin category is plotted in relation to the light conditions applied to the test groups. Non-significant differences = n.s, significant differences = * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

den wurden diese massenspektrometrisch untersucht. Die ermittelten Peptidsequenzen können mit Peptidsequenzen bekannter Proteine, die in Datenbanken erfasst sind, verglichen werden, um so die untersuchten Proteine zu identifizieren. Die Tabellen 2 und 3 zeigen Peptidsequenzen, die massenspektrometrisch ermittelt wurden.

Die Bestimmung der Peptidsequenzen bringt zum derzeitigen Zeitpunkt noch keine neuen Erkenntnisse, da die Proteine von *Saturnia pavonia* oder auch anderer Schmetterlinge gar nicht oder nur vereinzelt in den Datenbanken erfasst sind, so dass auf dieser Ebene keine Übereinstimmungen gefunden werden konnten. Auch die Suche nach Homologien

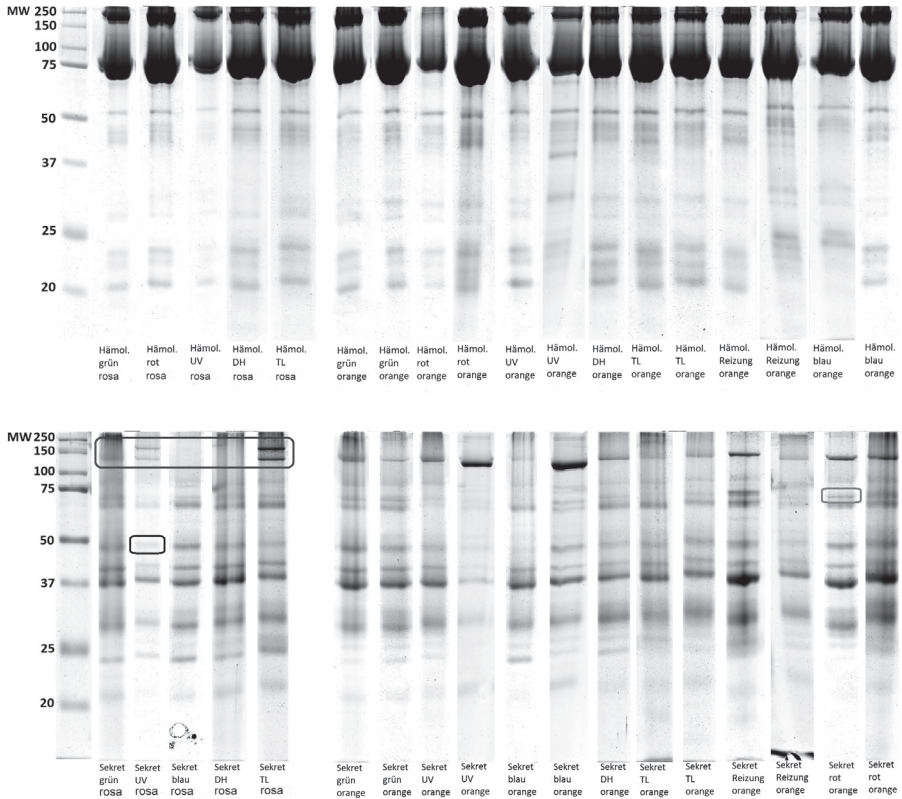


Abb. 7: SDS-Gelelektrophorese der Hämolymphe (oben) und SDS-Gelelektrophorese der Warzensekrete (unten). Links: Größenstandard (MW in kDa). Die Beschriftung ist wie folgt aufgebaut: Probenart (Sekret oder Hämolymphe), Versuchsansatz (Dunkelheit = DH; Tageslicht = TL), Morphe (orange Morphe; rosa Morphe). Die große Markierung zeigt die Auffälligkeiten im hochmolekularen Bereich; die kleinen Markierungen zeigen die Banden, die massenspektrometrisch untersucht wurden.

Fig. 7: SDS gel electrophoresis of haemolymph samples (top) and SDS gel electrophoresis of wart secretion samples (bottom). On the left: molecular weight marker (MW in kDa). The legend describes type of sample (wart secretion = Sekret), test group (darkness = DH; daylight = TL) and type of morph (orange morph; rosa (= pink) morph). The large marking shows remarkable variations in high-molecular area; the small markings show protein-bands, analysed by mass spectrometry.

zu bekannten Proteinen aus Invertebraten brachte kein Ergebnis, da die identifizierten Peptidsequenzen keine solchen Homologien aufweisen.

4. Diskussion

4.1. Überliegende Puppen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass für das Überliegen

der Puppen von *Saturnia pavonia* ein Mindestgewicht erforderlich ist und daher Puppen aus unterdurchschnittlich genährten Raupen weniger zum Überliegen neigen. Dies ist auch plausibel, da die Puppen beim Überliegen merklich an Gewicht verlieren und wahrscheinlich ein gewisser Nahrungsvorrat für die Erhaltung der Vitalität notwendig ist. Die Art der Nahrung der Raupen scheint keine Rolle zu spielen. Mitglieder des Naturwissenschaftlichen Vereins Wuppertal

Tab. 2: Peptidsequenzen des Proteins der Probe einer Raupe der orangen Morphe, aufgezogen unter roter Beleuchtung (siehe markierte Proteinbande bei 75 KDa in Abbildung 7 unten).

Tab. 2: Peptide sequences of a protein sample of an orange morph caterpillar, reared under red light (see marked protein-band at 75 KDa in figure 7 bottom).

Masse [m/z]	Ladung	Molekulargewicht [M+H] ⁺	Sequenz
515,35	++	1029,90	V I/L D E I/L T I/L A R
545,82	++	1090,64	V T M K/Q N I/L N D R
548,82	++	1096,64	W E T W F I/L S K
583,35	++	1165,70	Y E E I/L K/Q V T Q R
590,36	++	1179,72	Y E E I/L K/Q I/L T Q R
602,37	++	1203,74	W T I/L Q E _ _ K
651,39	++	1301,78	S P E E A N W L E V K

Tab. 3: Peptidsequenzen des Proteins der Probe einer Raupe der rosa Morphe, aufgezogen unter ultravioletter Beleuchtung (siehe markierte Proteinbande bei 50 KDa in Abbildung 7 unten).

Tab. 3: Peptide sequences of a protein sample of pink morph caterpillar, reared under ultraviolet light (see marked protein-band at 50 KDa in figure 7 bottom).

Masse	Ladung	Molekulargewicht [M+H] ⁺	Sequenz
445,29	++	889,58	T L T Q L T G R
722,41	++	1444,82	F/M O X D I/L F/M O X Q T V V F/M O X S N K
760,95	++	1520,90	D P oder L V I/L F T E S I/L V N E K

(A. DAHL, A. RADTKE, T. LAUSSMANN) züchten das Kleine Nachtpfauenaug seit vielen Jahren an verschiedenen Pflanzen (Rose, Brombeere, Weide), ohne dass dies eine erkennbare Auswirkung auf den Anteil der überliegenden Puppen hätte. Die Paarung von Faltern aus überliegenden Puppen ergab keine erhöhte Anzahl an überliegenden Nachkommen. Daher ist eine einfache genetische Veranlagung unwahrscheinlich. Zudem zeigen die Experimente, dass ein anhaltend kühles Frühjahr nicht dazu führt, dass mehr Puppen überliegen. Vielmehr scheint spätestens am Ende der Frostperiode im Winter festzustehen, welche Puppen sich entwickeln und welche überliegen. Eine ähnliche Vermutung findet sich auch in der Literatur, jedoch ist es nicht einfach, ein Merkmal zu finden, an dem zu erkennen ist, dass die Diapause beendet wurde und in eine Kälteruhe (Quieszenz) übergegangen ist (HODEK 1996). Offenbar gibt es einen hormonellen „Schalter“, der durch einen Reiz während der Ruhephase aktiviert werden muss, um in der Puppe unwiderruflich

die Entwicklung des Falters auszulösen (DANKS 1987). Bei niedrigen Frühlingstemperaturen erfolgt die Entwicklung der aktivierten Puppen langsam, aber dennoch kontinuierlich. So kommt es, dass Falter sogar im Kühlschrank bei Temperaturen um 7 °C schlüpfen. Puppen, bei denen der hormonelle „Schalter“ am Ende der Frostperiode nicht ausgelöst wurde, überliegen. Dies deutet darauf hin, dass die hormonelle Kontrolle über die Puppendiferenzierung während des Winters individuell zurückgeht und schließlich erlischt. Danach befinden sich die Tiere offenbar in einem Stadium der Kälteruhe (Quieszenz), die im Freiland bei steigenden Temperaturen nach und nach aufgehoben wird, so dass die Falter dort alle in etwa zur gleichen Zeit schlüpfen. Ähnliche Beobachtungen konnte WIPKING (1995) bei der Beendigung der Larvaldiapause von Blutströpfchenschmetterlingen, *Zygaena trifolii* (Esper, 1783), machen. Es stellt sich die Frage, durch welchen Reiz der postulierte „Schalter“, der die Entwicklung des Falters in der Puppe auslöst, aktiviert

wird. Wahrscheinlich spielen hier die Dauer oder die Intensität der Kälteperiode während der Überwinterung und die Tageslänge eine entscheidende Rolle (DANKS 1987). Die durchgeführten Vorversuche deuten an, dass für die Durchbrechung der Diapause eine Kälteperiode zwischen zwei Tagen und fünf Wochen erforderlich ist. Um diese Vermutungen zu bestätigen, sollen in Zukunft weitere systematische Experimente durchgeführt werden. Allerdings konnte bisher kein auffälliger Zusammenhang zwischen dem natürlichen Temperaturverlauf im Winter und der Anzahl überliegender Puppen festgestellt werden. Nach den Wintern 2008/2009, 2009/2010 und 2010/2011 war der Anteil an überliegenden Puppen mit 10 % bis 15 % vergleichbar, obwohl der Temperaturverlauf und der Wechsel von wärmeren und kälteren Perioden in diesen Wintern gemäß den Daten des Deutschen Wetterdienstes deutlich unterschiedlich waren. Es bleibt somit letztlich eine offene Frage, warum für die meisten Puppen der Kältereiz im Winter ausreicht, um die Diapause zu beenden und für andere nicht. Offenbar sind manche Puppen schon vor der Frostperiode hormonell so disponiert, dass sie dazu neigen, den Kältereiz und die kurzen Tageslängen im Winter zu „verschlafen“. Fraglich ist, wie diese Prädisposition gesteuert werden kann. Über den biologischen Sinn des Phänomens wurde spekuliert, dass die Paarung von Geschwistern (Inzucht) reduziert werden könnte (STANDFUSS 1896) und dass sich eine Insektenpopulation durch überliegende Stadien das Überleben sichert, falls es in einem Jahr während der Larvalentwicklung wegen Futtermangel oder anderen negativen Umwelteinflüssen zu einem Totalausfall einer Generation kommt (DANKS 1987).

4.2. Regulation der Schlupfzeit der Falter

In einem früheren Artikel haben wir bereits beschrieben, dass die Falter von *Saturnia*

pavonia ab den frühen Nachmittagstunden bis in den frühen Abend hinein schlüpfen (LAUSSMANN & RADTKE 2008). In den zurückliegenden Jahren mussten wir jedoch feststellen, dass die Tageszeit, zu der die Falter schlüpfen, auch stark von dem Mikroklima vor Ort abhängt. Bei besonders milder Witterung und relativ hohen Nachttemperaturen schlüpfen die Falter schon am Vormittag ab ca. 10 Uhr. Von anderen Saturniiden ist bekannt, dass sie insbesondere außerhalb tropischer und subtropischer Regionen tagsüber schlüpfen (TUSKES et al. 1996). Da bisher ein Schlupf während der Nacht bei *S. pavonia* nicht beobachtet wurde, liegt es nahe, dass die Schlupfzeit der Falter durch das Tageslicht gesteuert wird. Die durchgeführten Experimente bestätigen diese Vermutung und zeigen zudem, dass männliche Falter tageszeitlich vor den Weibchen zu Schlüpfen beginnen. Über den biologischen Sinn dieses Verhaltens mag hier spekuliert werden. Es wäre denkbar, dass die vor den Weibchen geschlüpfen Männchen bereits den Ort der Larvalentwicklung verlassen haben, bevor weibliche Geschwister schlüpfen. Auf diese Weise könnte Inzucht vermieden werden. Diese Hypothese deckt sich auch mit der Beobachtung, dass tageszeitlich früh geschlüpfte Männchen bereits in den Mittagsstunden abfliegen. Typisch ist dabei, dass die Falter rasch in große Höhen aufsteigen und scheinbar zielstrebig den Ort des Schlupfes verlassen.

4.3. Zusammensetzung des Sekrets der Falter

Das Sekret der Falter, mit dem diese beim Schlüpfen die Reuse des Kokons einspeichern, enthält keine Proteine. Insbesondere konnte kein der „Cocoonase“ von *Bombyx mori* vergleichbares proteolytisches Enzym gefunden werden. Dieses Enzym zersetzt den Protein„kleber“ (Sericin) zwischen den Spinnfäden (Fibroin) des vollständig geschlossenen Kokons von *B. mori* (KAFA-

tos et al. 1967). Hierdurch wird der Kokon aufgeweicht und der Falter kann sich von Innen einen Weg durch die Seidenfäden des Kokons bahnen. Vermutlich ist ein solches Enzym bei *Saturnia pavonia* nicht erforderlich, da der Kokon nicht vollständig geschlossen ist und somit ein Auflösen des Proteinklebers zwischen den Seidenfäden nicht nötig ist. Ein Hinweis, dass Saturniiden des Tribus Attacini, die wie *S. pavonia* eine Öffnung an ihrem Kokon anfertigen, eine „weniger stark proteolytische Flüssigkeit“ produzieren, findet sich in der Literatur (TUSKES et al. 1996). Möglicherweise speichert der schlüpfende Falter die Reuse von innen ein, um in Verbindung mit dem Proteinkleber des Kokons einen Gleitfilm zu erzeugen und so das Schlüpfen durch die Reuse zu erleichtern.

4.4. Vererbung der Warzenfarbe

Aus der Paarung von einem Weibchen und einem Männchen der rosafarbenen Morphe entstanden Nachkommen der rosafarbenen Morphe und der orangefarbenen Morphe im Verhältnis 3:1. Aus der Paarung von einem Weibchen der rosafarbenen Morphe mit einem Freiland-Männchen entstanden Nachkommen der rosafarbenen Morphe und der orangefarbenen Morphe im Verhältnis 1:1. Unter der Voraussetzung, dass das Freiland-Männchen der häufigeren orangefarbenen Morphe angehörte, lässt sich der Erbgang nach der klassischen dominant-rezessiven Vererbung erklären: Die für die Kreuzung benutzten Tiere der rosafarbenen Morphe waren mischerbig bezüglich des Merkmals „Warzenfarbe“. Diese Tiere trugen rosa Warzen, da das Allel für die rosafarbenen Warzen („R“) dominant ist, das Allel für die orangen Warzen („o“) jedoch rezessiv. Aus der Paarung „Ro“ x „Ro“ ergeben sich die Genotypen „RR“, „Ro“, „oR“ und „oo“. Da „R“ dominant ist, ergibt sich ein Verhältnis der Phänotypen von 3 (rosa Warzen) zu 1 (orange Warzen). Aus der Paarung „Ro“ x

„oo“ ergeben sich die Genotypen „Ro“, „oR“, „oo“ und „oo“. Da „R“ dominant ist, erhält man ein Verhältnis der Phänotypen von 1 (rosa Warzen) zu 1 (orange Warzen). Auch alle weiteren bisher durchgeführten Kreuzungsexperimente (Tabelle 1) lassen sich mit einem dominant-rezessiven Erbgang mit dem dominanten Merkmal „rosa Warzen“ zwanglos erklären. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Warzenfarbe erblich ist und es offenbar zwei genetisch unterschiedliche Raupenmorphen gibt: Die eine Morphe variiert in der Warzenfarbe zwischen Gelb und Orange (orangefarbene Morphe), die andere zwischen Weiß und Rosa (rosafarbene Morphe). Die Ausprägung der Warzenfarbe innerhalb der Morphene hängt von den Lichtverhältnissen nach der Häutung ab. Bei den Experimenten zum Einfluss von Licht verschiedener Wellenlängen auf die Melanisierung der Kutikula (siehe 4.5) wurde festgestellt, dass rotes Licht für die Farbumwandlung der Warzen von Gelb nach Orange (orangefarbene Morphe) bzw. Weiß nach Rosa (rosafarbene Morphe) entscheidend ist. Ohne rotes Licht bleiben die Warzen gelblich bzw. weißlich. Leider ist nicht bekannt, ob die beiden Farbmorphene, z. B. in bestimmten Biotopen, einen unterschiedlichen Selektionsvorteil besitzen. Gegebenenfalls wäre denkbar, dass die rosafarbene Morphe auf Heidekraut als Futterpflanze besser getarnt ist als die orangefarbene Morphe (siehe auch das Bild unter www.senne-portal.de, „Fauna und Flora“). Historisch interessant ist zudem, dass bereits POULTON (1887) schreibt, dass er aus der Paarung von zwei Tieren, die als Raupe auffällig rosafarbene Warzen hatten, 64 Raupen mit rosafarbenen Warzen und 24 Raupen mit orangefarbenen Warzen erhielt (Verhältnis 2,7:1). Da ihm offenbar die Mendel-Regeln der dominant-rezessiven Vererbung nicht bekannt waren (Mendel veröffentlichte seine Regeln 1866, diese wurden aber erst um das Jahr 1900 wiederentdeckt), konnte er das Ergebnis nicht interpretieren. LONG (1954)

greift die Ergebnisse von POULTON (l.c.) auf und schreibt, dass der Warzenfärbung keine einfache Vererbung zu Grunde läge, sondern die Färbung lediglich durch Licht beeinflusst würde, der Farbübergang wäre je nach Licht von Gelb nach Orange bis Pink möglich. Hier stellt sich die Frage, ob LONG überhaupt Raupen mit pinkfarbenen Warzen beobachtet hatte oder ob die Warzen teilweise sehr intensiv orangerot waren und für die von POULTON beschriebenen pinkfarbenen Warzen gehalten wurden. Nach den aktuellen Ergebnissen hatten beide Autoren teilweise recht: Licht spielt eine wichtige Rolle bei der Ausprägung der Warzenfarbe, aber es gibt zwei genetisch unterschiedliche Morphen.

4.5. Melanisierung der Kutikula

Das Phänomen eines morphologischen Farbwechsels, also einer variablen Färbung, die durch Umweltfaktoren induziert wird (DEITNER & PETERS 2010), ist in der Ordnung der Lepidopteren in großer Zahl vertreten. So weisen beispielsweise die Raupen des Pappelschwärmers *Laotboe populi* (Sphingidae) und des Abendpfauenauges *Smerinthus ocellata* (Sphingidae) in den letzten Larvenstadien einen Färbungspolyphänismus auf, der von der Futterpflanze abhängt und zur Kryptis beiträgt (EDMUNDS & GRAYSON 1991). Auch die unterschiedliche Segmentfärbung, also die variable Melanisierung der Kutikula, von *Saturnia pavonia*-Raupen wird durch viele Umweltfaktoren beeinflusst, wobei nach HINTZE-PODUFAL (1977) der entscheidende Faktor taktile Reizungen sind, die die Raupen durch Artgenossen oder die Umgebung erfahren. Sie reagieren darauf mit einer verstärkten Melanisierung der Kutikula. Eine Melanisierung in Abhängigkeit von der Populationsdichte tritt oftmals während einer gregären Lebensphase auf (z. B. bei *Spodoptera exempta*, GUNN 1998, oder bei *Schistocerca gregaria*, ROESSINGH et al. 1998). Da die gregäre Phase bei Raupen von *S. pavonia* zum

Zeitpunkt des Auftretens der verschiedenen Melaninmuster bereits abgeschlossen ist, ergibt sich die Frage, ob die Populationsdichte, insbesondere taktile Reizung, die auch künstlich erzeugt werden kann, tatsächlich der induzierende Faktor für die Melanisierung der Kutikula ist. Der von HINTZE-PODUFAL (1977) beschriebene Einfluss künstlich erzeugter taktile Reizung auf die verstärkte Melanisierung der Kutikula kann in der vorliegenden Studie nicht reproduziert werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine künstlich erzeugte taktile Reizung für eine Dauer von zehn Minuten pro Tag keinen verstärkenden Effekt auf die Melanisierung der Kutikula hat. Da HINTZE-PODUFAL (1977) die Reizquantität und nicht die Reizqualität als entscheidenden Faktor betrachtet, können die abweichenden Ergebnisse auf eine zu geringe Reizdauer von zehn Minuten zurückzuführen sein. Möglicherweise kann eine verstärkte Melanisierung der Kutikula nur durch das gemeinsame Einwirken von taktile Reizung und weiteren Umweltfaktoren ausgelöst werden. So ist die Färbung von *Pararge xiphia*-Raupen von Fotoperiode, Temperatur, Populationsdichte und genetischen Faktoren abhängig (GOTTHARD et al. 2009). Dass geringe Abweichungen in der Kombination der Versuchsparameter bereits zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können, zeigen Versuche zur Melanisierung von *Mamestra brassicae*-Raupen. KAZIMIROVA (1992) konnte einen Zusammenhang zwischen Populationsdichte und Melanisierung herstellen: Unter hoher Populationsdichte gehaltene Raupen zeigen eine verstärkte Melanisierung der Kutikula. GOULSON (1994) konnte dieses Ergebnis nicht reproduzieren. Als mögliche Ursachen nennt GOULSON genetische Unterschiede in den verwendeten Populationen, aber auch abweichende Interaktionen zwischen verschiedenen Umweltfaktoren. Inwieweit sich genetische Unterschiede und abweichende Versuchsparameter auf die variierenden Ergebnisse auswirken, kann nur vermutet werden.

Die hier vorliegenden Ergebnisse der Analyse des Melaninmusters lassen darauf schließen, dass insbesondere die Lichtexposition die Melaninisierung der Kutikula beeinflusst. Unter Tageslichtbedingungen gehaltene Raupen bilden überwiegend helle Melaninmuster aus, während unter Dunkelheit vermehrte Melanineinlagerungen und damit dunklere Melaninmuster zu beobachten sind. Der unterschiedliche Melanisierungsgrad in Abhängigkeit von Licht deutet auf eine Form der lokalen Adaption an verschiedene Habitate hin. An hellen, sonnigen Standorten fällt eine hell gefärbte Raupe mit geringen Melaninanteilen in ihrer Färbung an ihrer Futterpflanze wesentlich weniger auf als eine dunkel gefärbte Raupe mit starken Melanineinlagerungen. Hingegen ist eine Raupe mit einem dunklen Melaninmuster an dunklen und schattigen Standorten wesentlich besser getarnt als eine hellgrün gefärbte Raupe. Der Einfluss der Wellenlänge kann nicht eindeutig geklärt werden. Tendenziell führt eine Beleuchtung mit langwelligem Licht zu einer verstärkten Melanisierung, wohingegen die Bestrahlung mit kurzwelligem Licht zu einer verminderten Melanisierung der Kutikula führt. Der Einfluss von Licht unterschiedlicher Wellenlänge auf die Melanisierung wurde bereits an Puppen von *Pieris brassicae* nachgewiesen. OLMER (1968) konnte einen Zusammenhang zwischen Melanisierungsgrad der Puppen und Wellenlänge des Lichts herstellen und zeigte durch Schnürungs-experimente, dass die Wahrnehmung des Lichts über einen extraoculären Lichtsinn erfolgt. Weiterhin zeigte OLMER (1968), dass die Melanisierung durch ein hemmendes Hormon beeinflusst wird, so dass bei *P. brassicae* ein Rezeptor denkbar wäre, der bei Anregung durch rotes Licht die Aussendung des hemmenden Hormons initiiert. Ein ähnlicher, konträr aufgebauter Mechanismus könnte auch bei *S. pavonia*-Raupen vorliegen. Bisher konnte aber nicht geklärt werden, ob die verstärkte Melanisierung der Kutikula

auf einer erhöhten Melaninproduktion oder einer verstärkten Einlagerung von Melanin in die Kutikula beruht.

4.6. Proteinanalytische Untersuchung des Warzensekrets und der Hämolymphe

Die Untersuchung des Warzensekrets ist noch nicht abgeschlossen. DEML & DETTNER (1990, 1993, 1995, 1997) haben gezeigt, dass es abwehrend auf Pathogene, Parasiten und Prädatoren wirkt. Im Selbstversuch weist das Warzensekret einen sehr markanten Geruch und einen bitteren, fast schon scharfen Geschmack auf, der mehrere Stunden anhält. DEML & DETTNER (1993) wiesen neben süßlichen Komponenten (z. B. Glycerol, Benzaldehyd und Benzonnitril) auch bittere Komponenten wie Phenole und Phenylalanin in den Sekreten von *Saturnia pavonia* nach, die für den markanten Geruch und Geschmack verantwortlich sein könnten. Eine weitere Eigenschaft des Sekrets ist, dass es binnen weniger Minuten an der Luft zu einem schwarz-braunen Pfropf verklumpt. Möglicherweise spielen hierbei die Proteine eine Rolle und die Pfropfbildung dient der Abwehr von Parasiten, indem diese von dem Sekret eingeschlossen und somit unschädlich gemacht werden. Anzunehmen ist, dass die beiden Mechanismen gemeinsam wirksam werden. Um die im Sekret und in der Hämolymphe enthaltenen Proteine zu identifizieren und einen eventuell bestehenden Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Sekretzusammensetzung der verschiedenen Morphen nachzuweisen, müssen weitere proteinchemische Analysen des Sekrets durchgeführt werden. Auch der Einfluss der Wellenlänge des Lichts kann zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei Frau MARION GEHRKE, Biologisch-Medizinisches

Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die Hilfe bei der SDS-Gelelektrophorese, und bei Dr. REIMUND MÜLLER, Leverkusen, für die Recherche in historischer Literatur.

Literatur

- BERGMANN, A. (1953): Die Großschmetterlinge Mitteldeutschlands, Band 3, Spinner und Schwärmer. Urania-Verlag GmbH; Jena
- BUCKLER, W. (1889): The Larvae of the British Butterflies and Moths. Vol. III. The Ray Society; London.
- DANKS, H.V. (1987): Insect Dormancy: An Ecological Perspective. Biological Survey of Canada; Ottawa, Canada.
- DEML, R., & DETTNER, K. (1990): Chemical defense of *Eudia (Saturnia) pavonia* caterpillars. *Naturwissenschaften* 77: 588-590.
- DEML, R., & DETTNER, K. (1993): Biogenic amines and phenolics characterize the defensive secretion of saturniid caterpillars (Lepidoptera: Saturniidae): a comparative study. *Journal of Comparative Physiology B* 163: 123-132.
- DEML, R., & DETTNER, K. (1995): Effects of emperor moth larval secretions, hemolymph, and components on microorganisms and predators. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 76: 287-293.
- DEML, R., & DETTNER, K. (1997): Chemical defence of emperor moths and tussock moths (Lepidoptera: Saturniidae, Lymantriidae). *Entomologia Generalis* 21: 225-251.
- DETTNER, K., & PETERS, W. (2010): Lehrbuch der Entomologie. Teil 1 und 2. Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg.
- DUPONCHEL, P.A.J., GODART, J.B., & GUÉNÉE, A. (1849): Iconographie et histoire naturelle des chenilles pour servir de complément à l'histoire naturelle des lépidoptères ou papillons de France, de MM. Godart et Duponchel, G. Baillière, Tome Second, Crepusculaires. Nocturnes. G. Baillière; Paris.
- EBERT, G. & RENNWALD, E. (1994): Die Schmetterlinge Baden-Württembergs, Band 4, Nachtfalter. Eugen Ulmer GmbH; Stuttgart
- EDMUNDS, M., & GRAYSON, J. (1991): Camouflage and selective predation in caterpillars of the poplar and eyed hawkmoths (*Laotloe populi* and *Smerinthus ocellata*). *Biological Journal of the Linnean Society* 42: 467-480.
- FORSTER, W., & WOHLFAHRT, T.A. (1954): Biologie der Schmetterlinge. Bd. 1. Franckh'sche Verlagsbuchhandlung; Stuttgart.
- FRIEDRICH, E. (1983): Handbuch der Schmetterlingszucht. 2. Auflage, Franckh'sche Verlagsbuchhandlung W. Keller & Co; Stuttgart.
- GOTTHARD, K., BERGER, D., BERGMANN, M., & MERILAITA, S. (2009): The evolution of alternative morphs: density-dependent determination of larval colour dimorphism in a butterfly. *Biological Journal of the Linnean Society* 98: 256-266.
- GOULSON, D. (1994): Determination of larval melanization in the moth, *Mamestra brassicae*, and the role of melanin in thermoregulation. *Heredity* 73: 471-479.
- GUNN, A. (1998): The determination of larval phase coloration in the African armyworm, *Spodoptera exempta*, and its consequences for thermoregulation and protection from UV light. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 86: 125-133.
- HINTZE-PODUFAL, C. (1974): Untersuchungen zur Farbmusterbildung bei den Larven von *Eudia pavonia* L. (Lepidoptera: Saturniidae). *Biologisches Zentralblatt* 93: 545-559.
- HINTZE-PODUFAL, C. (1977): The larval melanin pattern in the moth *Eudia pavonia* and its initiating factors. *Journal of Insect Physiology* 23: 731-737.
- HODEK, I. (1996): Diapause development, diapause termination and the end of diapause. *European Journal of Entomology* 93: 475-487.
- KAFATOS, F.C., TARTAKOFF, A.M., & LAW, J.H. (1967): Cocoonase. I. Preliminary characterization of a proteolytic enzyme from silk moths. *Journal of Biological Chemistry* 242: 1477-87.
- KANG, D., GHO, Y.S., SUH, M., & KANG, C. (2002): Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie Brilliant Blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 23: 1511-1512.
- KAZIMIROVA, M. (1992): The role of physical contact in the induction of phase polymorphism of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 89: 87-95.
- LAEMMLI, U.K. (1971): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-85.

- LAUSSMANN, T., & RADTKE, A. (2008): Zur Biologie des Kleinen Nachtpfauenauges, *Saturnia pavonia* Linneaus 1758 (Lepidoptera: Saturniidae). Entomologische Zeitschrift 118 : 69-74.
- LONG, D.B. (1954): Factors affecting the larval spot colour of the emperor moth, *Saturnia pavonia* L. Nature 174: 563.
- LUTZ, K.G. (1889): Das Buch der Schmetterlinge. Süddeutsches Verlags-Institut; Stuttgart.
- OLTMER, A. (1968): Die Steuerung des Melaninbaus in das Farbmuster der Kohlweißlingspuppe *Pieris brassicae* L. Wilhelm Roux' Archiv 160: 401-427.
- POULTON, E.B. (1887): Notes upon lepidopterous larvae. Transactions of the entomological society London Part III: 310-312.
- ROESSINGH, P., BOUAICHI, A., & SIMPSON, S.J. (1998): Effects of sensory stimuli on the behavioural phase state of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. Journal of Insect Physiology 44: 883-893.
- STANDFUSS, M. (1896): Handbuch der paläarktischen Gross-Schmetterlinge für Forscher und Sammler. 2. Auflage. Verlag Gustav Fischer; Jena.
- TUSKES, P.M., TUTTLE, J.P., & COLLINS, M.M. (1996): The wild silk moths of North America: a natural history of the Saturniidae of the United States and Canada. Cornell University Press; Ithaca and London.
- WIPKING, W. (1995): Influences of daylength and temperature on the period of diapause and its ending process in dormant larvae of burnet moths (Lepidoptera, Zygaenidae). Oecologia 102, 202-210.

Dr. Tim Laussmann
Naturwissenschaftlicher Verein Wuppertal
Gierener Weg 19
51379 Leverkusen
E-Mail: S.pavonia@t-online.de

Dr. Sabine Metzger
Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Universitätsstraße 1
40225 Düsseldorf
E-Mail: metzger@uni-duesseldorf.de

Jessica Bossems (B. Sc.)
Prof. Dr. Klaus Lunau
Institut für Sinnesökologie
Heinrich-Heine-Universität
Universitätsstraße 1
40225 Düsseldorf
E-Mail: lunau@uni-duesseldorf.de
E-Mail: Jessica.Bossems@uni-duesseldorf.de