

DIE WIRKUNG DER ANAEROBIOSE AUF DIE DIAPAUSE- PUPPEN DES AMERIKANISCHEN WEISSEN BÄRENSPINNERS (HYPHANTRIA CUNEA DRURY)

von

L. VARJAS

Institut für allgemeine Zoologie und Biologie der József Attila-Universität Szeged, Ungarn
(Dir.: Prof. Dr. A. ÁBRAHÁM)

In der Natur müssen sich gewisse Insektenarten, bzw. bestimmte Entwicklungsformen derselben zuweilen mehr oder weniger lange Zeit in sauerstoffarmer oder sauerstofffreier Umgebung aufrecht erhalten. Dies ist nicht nur bei den Endoparasiten, sondern auch im Falle der frei lebenden Organismen keine Seltenheit. Den in stagnierenden Stillwasserregionen oder in irgendwelchem in Zersetzung begriffenen organischen Material (Leichen, Kompost, Dünger) sich aufhaltenden Insekten steht gewöhnlich wenig Sauerstoff zur Verfügung, und ähnlich verhält es sich in wenig gelüfteten, an organischen Stoffen reichen (Sumpf- und Moor-) Böden. Anhaltende oder vorübergehende Überschwemmungen, Regenfälle, Schneeschmelze oder Grundwasseranstiege können den Sauerstoffnachschub für die im Boden lebenden Insekten wesentlich behindern. Auch in praktischer Hinsicht, z. B. vom Gesichtspunkte des Pflanzenschutzes, ist es nicht uninteressant zu wissen, wie lange gewisse Insekten maximal ohne Sauerstoff zu leben vermögen und welchen Einfluss die Anaerobiose auf ihren Organismus, ihre weiteren Lebensfunktionen usw. hat.

Die Möglichkeit, Dauer und Auswirkungen der Anaerobiose werden vor allem von den in Ermangelung von Sauerstoff sich abspielenden energieerzeugenden Prozessen bestimmt. In der insekten-physiologischen Literatur wurde die Möglichkeit spezieller anaerober fermentativer Reaktionen (z. B. Fettsäure \rightarrow $\text{CO}_2 + \text{H}_2$) oder Umbauprozesse (z. B. Glykogen \rightarrow Fett) erwogen, doch wird im allgemeinen als anaerobe Energiequelle auch im Bereich der Insekten die aus den Geweben der Wirbeltiere wohl bekannte Milchsäure-Glykolyse akzeptiert. Dies geht z. B. deutlich aus den Arbeiten von SLATER (1928) und BRAND (1951) hervor. Auf Grund dieser sogenannten Milchsäure-Theorie hat man die physiologisch-biochemischen Erscheinungen der Insekten-Anaerobiose zu erklären versucht, doch haben sich gerade in dieser Beziehung auch zahlreiche Schwierigkeiten ergeben. Nach GILMOUR (1940) betrug z. B. die Tilgung der „ O_2 -Schuld“ bei *Zootermopsis*-Imagos nur 50%, und AGRELL (1953) fand bei *Calliphora*-Puppen nach der Anaerobiose keine Atmungserhöhung. Die gebildete Milchsäure stand gewöhnlich nicht im Verhältnis zu der verbrauchten Glykogenmenge, bzw. zu der Dauer der Anaerobiose. Dies ging u. a. aus den Untersuchungen von BLANCHARD und DINULESCU (1932) an *Gastrophilus*-Larven, von DAWIS und SLATER (1928) an *Periplaneta*-Imagos und von GILMOUR (1941) an *Tenebrio*-Larven hervor. BARRON und TAHMISIAN (1948), sowie HUMPHREY und SIGGINS (1949) beobachteten bei anaerob gehaltenen *Periplaneta*- bzw. *Locusta*-Muskeln eine besonders spärliche Milchsäureproduktion.

Im letzten Jahrzehnt hat sich das Bild einer besonderen Insekten-Glykolyse entwickelt, über die wir einen Begriff aus den Mitteilungen von CHEFURKA (1959) bzw. ZEBE und MC SHAN (1957) oder aus dem Buche von GILMOUR (1961) erhalten. Es hat sich nämlich herausgestellt, dass in den Insektengeweben, in erster Linie in den Muskeln, die α -Glycerophosphat-Dehydro-

genase (GDH)-Aktivität die Aktivität der Milchsäure-Dehydrogenase (LH) gewöhnlich weit übersteigt, und so das Endprodukt der Glykolyse in erster Linie α -Glycerophosphat und Brenztraubensäure ist. Besonders interessant ist die Bildung des α -Glycerophosphats, weil diese Verbindung in der Energielieferung der Insektenmuskeln eine erstklassige Rolle spielt und gleichzeitig nach den meisten Forschern auch die Quelle für das in den einzelnen Diapause-Insekten zur Anreicherung gelangenden Glycerins ist, welches — wie auch SALT (1961) konstatierte — die winterliche Frostbeständigkeit der Tiere erhöht. Wir haben allen Grund, die bisherigen Ansichten bzgl. der Anaerobiose der Insekten einer Revision zu unterziehen, da diese sich ja vorwiegend um die schon überholte Milchsäure-Theorie gruppierten.

Ich stecke mir vor allem das Ziel, bei einer Diapause-Puppe, die im wesentlichen nur den Grundstoffwechsel zeigt, zu ermitteln, wie sich die Frage der mit der Anaerobiose zusammenhängenden „O₂-Schuld“ gestaltet. Daneben waren gewisse Daten hinsichtlich der maximalen Dauer der Anaerobiose, sowie über den Einfluss des O₂-Entzuges auf das Puppenstadium und den Habitus des ausschlüpfenden Imago zu gewinnen.

Material und Methoden

Das Material zu den vorliegenden Versuchen waren Diapause-Puppen des amerikanischen weissen Bärenspinners (*Hyphantria cunea* DRURY). Die in den Herbstmonaten (September—Oktober) gesammelten alten Raupen der II. Generation wurden im Freien aufgezogen. Als Nährpflanzen diente Weiden (*Salix*-Arten). Die Raupen begannen sich zu Ende Oktober, bzw. Anfang November einzupuppen. Die Puppen überwinterten im Freien, worauf ich sie dann einmal im Anfang April des nächsten Jahres und ein andermal Ende Januar ins Laboratorium brachte. Die hier aus ihrem Gespinst befreiten Puppen kamen — auf Watte gebettet — in Petri-Schalen. Im ersteren Falle wurden die Tiere bei Raumtemperatur (etwa 20° C) gehalten und einer kurzfristigeren Anaerobiose unterworfen. Die Ende Januar eingetragenen Individuen kamen in ein Thermostat von 25° C und wurden später zum Studium der länger dauernden Anaerobiose verwendet. Sämtliche Versuche wurden relativ kurze Zeit (2—5 Tage) nach der Einbringung der Puppen in das Laboratorium in Angriff genommen, so dass die Tiere noch in der letzten, milde Wärme beanspruchenden Diapausen-Phase untersucht werden konnten. Auch die Werte des Sauerstoffverbrauchs verraten, dass in dieser Phase die im Anschluss an die Diapause eintretende Morphogenese noch keineswegs eingesetzt hatte. Den nicht verwendeten (und teilweise den benutzten) Puppen begannen die Schmetterlinge erst nach 2—3 Wochen zu entschlüpfen. Die untersuchten Puppen waren 9—12 mm lang, 3—4 mm breit und 80—150 mg schwer. Sie wurden für kürzere — 0,5; 1; 1,5; 2; 3 und 24 Stunden —, bzw. längere Zeit — 2; 3, bzw. 6 Tage — in kleine, gut verschlossenen Röhrchen in mit alkalischem Pyrogallol gewaschenes, mit erhitztem CaCl₂ getrocknetes Stickstoffgas gegeben, wobei — nach Geschlechtern geteilt — Gruppen von 6—8—10 Puppen verwendet wurden.

Der Sauerstoffverbrauch der Tiere wurde bei 25° C im Warburg-Apparat in Luft-Atmosphäre und ohne Schütteln gemessen. Die Messung des O₂-Verbrauchs unmittelbar vor der Anaerobiose dauerte fallweise 40, bzw. 90 Minuten und nachher 15, 25, bzw. 90 Minuten. Diese zweite Messung darf — entsprechend der Methode — erst mit einer gewissen Verspätung (10—40 Minuten) nach der Anaerobiose vorgenommen werden. Der Sauerstoffverbrauch wurde in $\mu\text{l/h}/100$ mg Lebendgewicht ausgedrückt angegeben.

Ergebnisse

In Tabelle 1 und 2 sind die Ergebnisse je einer Versuchsserie angeführt. Es fällt auf den ersten Blick auf, dass der Sauerstoffverbrauch der Puppen weder nach der kürzeren, noch nach der längeren Anaerobiose wesentlich verändert war. Nach der langfristigeren Anaerobiose war eher eine gewisse abnehmende Tendenz festzustellen. Den Ergebnissen ist somit zu entnehmen, dass im Laufe der Anaerobiose der Diapause-Puppen der *Hyphantria cunea* (zumindest in der fraglichen Periode der Diapause) eine „O₂-Schuld“ nicht zustande kommt, d. h. bei diesen Tieren die postanaerobe Atmungssteigerung ausbleibt. Es ist höchst unwahrscheinlich, dass die eventuelle Atmungserhöhung in jedem einzelnen Falle vollkommen ausserhalb der Beobachtungszeit eingetreten wäre und deshalb in Tabellen jegliche Spur davon fehlt.

Interessant ist, dass bei einigen nicht im Diapause-Zustand befindlichen Puppen ähnliche Ergebnisse erhalten worden sind. Die Untersuchungen von AGRELL (1953) wurden bereits erwähnt. Meines Erachtens kam es bei den von GAARDER (1918) an *Tenebrio*-Puppen durchgeführten Versuchen ebenfalls nicht zur Tilgung der „O₂-Schuld“, obwohl der Autor sich auf eine gewisse, verspätet erscheinende Atmungserhöhung beruft. Seine Tabellen entbehren der Beweiskraft.

Auf der Suche nach einer Erklärung für die gemachten Beobachtungen halte ich die Möglichkeit speizeller anaerober energieliefernder Reaktionen nicht für wahrscheinlich. Wenn ein solcher Mechanismus bestünde, so würde möglicherweise auch der normale aerobe Stoffwechsel gewisse Besonderheiten verraten. Meine an weiblichen Puppen zu dieser Periode vorgenommenen RQ-Bestimmungen ergaben Werte von rund 0,77, woraus derartige Schlüsse nicht gezogen werden können. Das Ausbleiben der Abtragung der „O₂-Schuld“ lässt sich auf Grund der speziellen Insekten-Glykolyse gut erklären.

Die terminale Energiequelle ist aller Wahrscheinlichkeit nach Kohlehydrat (Glykogen, Trehalose, Glukose), und das Endprodukt der anaeroben Glykolyse neben den geringen Mengen Milchsäure α -Glycerophosphat und Brenztraubensäure. Nach WYATT und MEYER (1959) bleibt die α -Glycerophosphat-Dehydrogenaseaktivität auch während der Diapause erhalten. Aus der Tatsache, dass die Brenztraubensäure stets in relativ kleineren Mengen nachweisbar ist — mit welcher Frage sich CHEFURKA (1959) und KUBIŠTA (1958) auch besonders beschäftigen, — ist darauf zu schliessen, dass diese Verbindung und die noch geringeren Mengen Milchsäure wahrscheinlich von dem Puffer-Mechanismus der Gewebe gebunden wird. Das Schicksal des α -Glycerophosphats ist — wie zur Zeit der Diapause auch unter aeroben Umständen —, dass es hydrolysiert und Glycerin liefert. Dies beweisen übrigens auch die Untersuchungen von WILHELM (1960), wonach bei Diapause-Puppen die Anaerobiose die Glycerin-anreicherung steigert. Das Glycerin ist unmittelbar nicht oxydierbar. Aus den Versuchen von CHINO (1957) wissen wir, dass es auch zur Glykogen-Resynthese erst zu Ende der Diapause verbraucht wird. Möglicherweise stellt bei den Insekten in der Frage der „O₂-Schuld“ das α -Glycerophosphatbildungsverhältnis und der Grad der Hydrolyse den entscheidenden Faktor dar, und die in der Literatur angegebenen verschiedenen Befunde dürften hiermit zu erklären sein. Wenn im Laufe der Anaerobiose in überwiegender Menge diese Verbindung

gebildet wird und sich in Glycerin weiterverwandelt, so kann die Tilgung der „O₂-Schuld“ ausbleiben.

Dreitägige Anaerobiose wurde von den *Hyphantria*-Puppen ohne jede wahrnehmbare Schädigung vertragen. Die beiliegende Abbildung zeigt ebenfalls, dass die aus solchen Puppen hervorgegangenen Schmetterlinge keinerlei Anomalien verraten. Sechstägiger Sauerstoffentzug dagegen ist bereits von vernichtender Wirkung: hier schlüpfte schon kein einziger Falter aus. Hieraus wird wahrscheinlich, dass bei der fraglichen Art zu der gegebenen Periode der Diapause die maximale Dauer der Anaerobiose etwa 4–5 Tage beträgt. Ein Vergleich dieser Befunde mit der Tabelle von BRAND (1951) lässt feststellen, dass die Diapause-Puppen von *Hyphantria cunea* den Sauerstoffmangel relativ lange Zeit zu überleben vermögen. In Verbindung hiermit ist ein Hinweis auf die Feststellung von HARVEY (1962) lohnenswert: „...the diapausing eggs are resistant to anaerobiosis“ (Seite 70), die eventuell bis zu einem gewissen Grade auch für die Diapause-Puppen Gültigkeit besitzt.

Die Anaerobiose beeinflusste die Dauer des Puppenstadiums in dieser Periode der Puppenentwicklung und Diapause bei beiden Geschlechtern nicht in der gleichen Weise. Da meine diesbezüglichen Untersuchungen weniger eingehende waren, war lediglich in Erfahrung zu bringen, dass der 2–3-tägige Sauerstoffmangel bei den weiblichen Tieren das Puppenstadium um eine längere Zeitspanne als die Anaerobiose, und die 3-tägige Anaerobiose bei Männchen kürzere Zeit als drei Tagen verlängerte. Bei den männlichen Tieren war überraschenderweise die 2-tägige Anaerobiose eher von entwicklungsverkürzendem Effekt. Die gesteigerte Empfindlichkeit der weiblichen Exemplare dürfte mit ihrem regeren Stickstoff-Stoffwechsel im Zusammenhang stehen, denn nach Befunden von JASIČ und MACKO (1961) verfügen die weiblichen *Hyphantria*-Puppen über einen höheren Stickstoffgehalt. In Verbindung mit der bei männlichen Exemplaren beobachteten stimulierenden Wirkung verdient die Ansicht von LEES (1961) Beachtung, wonach während der sogenannten Diapausen-Entwicklung: „...the final high temperature phase is favoured by anoxia“ (Seite 137). Diesen günstigen Einfluss dürften bei den weiblichen Puppen, bzw. im Falle längerer Anaerobiose — gewisse endogene Faktoren beeinträchtigt haben.

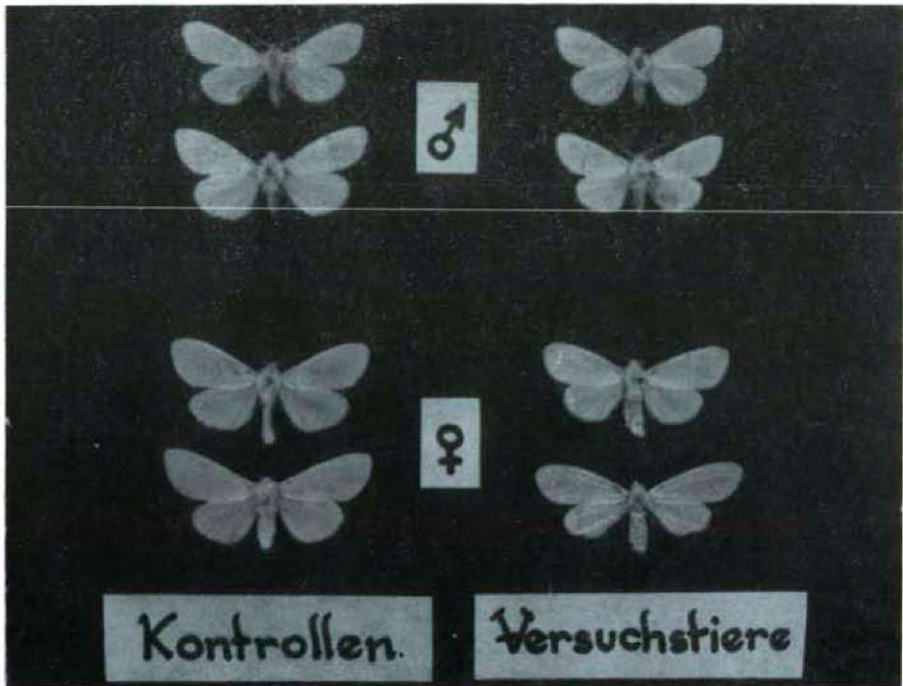
Zusammenfassung

Hyphantria cunea-Puppen wurden in der letzten, wärmebeanspruchenden Phase der Diapause für 0,5; 1; 1,5; 2; 3 und 24 Stunden, bzw. für 2; 3 und 6 Tage in ein anoxibiotisches Milieu (N₂-Atmosphäre) gebracht und dabei folgendes beobachtet:

1. Die maximale Anaerobiose-Dauer beträgt etwa 4–5 Tage.
2. Nach den verschiedenen langen Anaerobiosezeiten war in keinem einzigen Falle eine vorübergehende Steigerung des Sauerstoffverbrauches festzustellen.
3. Die 3-tägige Anaerobiose bewirkte gewöhnlich eine Verlängerung der Entwicklungsdauer der Puppen, doch erwiesen sich in dieser Beziehung die weiblichen Exemplare als empfindlicher. Bei den männlichen Puppen war die 2-tägige Anaerobiose von ausgesprochen entwicklungsstimulierendem Einfluss.
4. Aus den nach der 3-tägigen Anaerobiosen am Leben gebliebenen Puppen schlüpften habituell normale Imagos aus.

Literatur

1. AGRELL, I.: The aerobic utilization of metabolic energy during insect metamorphosis. *Acta Physiol. Scand.* 28, p. 306. 1953.
2. BARRON, E. S. G.; TAHMISIAN, T. N.: The metabolism of cockroach muscle (*Periplaneta americana*). *Journ. Cell. Comp. Physiol.* 32, p. 57. 1948.
3. BLANCHARD, L.; DINULESCU, G.: Le metabolisme glucidique chez les larves de *Gastrophiles* aus cours de l'inanition et de l'anaérobiose. *Compt. Rend. Soc. Biol. (Paris)* 110, p. 343. 1932.
4. БРАНД, Т.: Анаэробноз у беспозвоночных. Изд. Иност. Лит. Москва, 1951. (T. Brand: Anaerobiosis in invertebrates. *Biodyn. Press, Normandy, Missouri*, 1946.)
5. CHEFURKA, W.: Glucose metabolism in insects. *Proc. IVth Int. Congress. Biochem. (Vienna, 1958.)* 12, p. 115. 1959.
6. CHINO, H.: Carbohydrate metabolism in diapause egg of the silkworm, *Bombyx mori*. I. Diapause and the change of glycogen content. *Embryologia* 3, p. 295. 1957.
7. DAWIS, J. G.; SLATER, W. K.: The aerobic and anaerobic metabolism of the common cockroach (*Periplaneta orientalis*). III. *Biochem. Journ.* 22, p. 331. 1928.
8. GAARDER, T.: Über den Einfluss des Sauerstoffdruckes auf den Stoffwechsel. I. Nach Versuchen an Mehlwurmpuppen. *Biochem. Z.* 89, p. 48. 1918.
9. GILMOUR, D.: The anaerobic gaseous metabolism of the termite, *Zootermopsis nevadensis* Hagen. *Journ. Cell. Comp. Physiol.* 15, p. 331. 1940.
10. GILMOUR, D.: Anaerobic metabolism in the larvae of *Tenebrio molitor* L. Gaseous metabolism and changes in glycogen, sugar, fat and lactic acid. *Journ. Cell. Comp. Physiol.* 18, p. 93. 1941.
11. GILMOUR, D.: The biochemistry of insects. *Acad. Press, New York—London*, 1961.
12. HARVEY, W. R.: Metabolic aspects of insect diapause. *Ann. Rev. Ent.* 7, p. 57. 1962.
13. HUMPHREY, G. F.; SIGGINS, L.: Glycolysis in the wing muscle of the grasshopper, *Locusta migratoria*. *Aust. Journ. Exp. Biol. Med. Sci.* 27, p. 353. 1949.
14. JASIČ, J.; MACKO, V.: Some results of experimental study of fall webworm (*Hyphantria cunea* DRURY) (*Lepidoptera: Arctiidae*) ecology. *Biol. Práce, Ed. S. Biol. Vied Slov. Akad. VII/9, Vydav. Slov. Akad., Bratislava*, 1961.
15. KUBIŠTA, V.: Anaerobe Glykolyse in den Insektenmuskeln. *Biochem. Z.* 330, p. 315. 1958.
16. LEES, E. D.: The endocrinology and biochemistry of insect diapause. *Proc. symp. on cryptobiotic stages in biological systems (5th Biol. Conf. „Oholo”, Israel, 1960.)* p. 132. Elsevier Monogr., Biosci. S., Biol. Subser., Elsevier Publ. Comp., Amsterdam—London—New York—Princeton, 1961.
17. SALT, R. W.: Principles of insect cold-hardiness. *Ann. Rev. Ent.* 6, p. 55. 1961.
18. SLATER, W. K.: Anaerobic life in animals. *Biol. Rev.* 3, p. 303. 1928.
19. WILHELM, R. C.: The end products of anaerobic metabolism in pupae of the giant silkworms *Hyalophora cecropia* and *Samia cyanthia*. *Doctoral thesis, Cornell Univ., Ithaca, New York*, 1960. (nach Harvey).
20. WYATT, G. R.; MEYER, W. L.: The chemistry of insect hemolymph. III. Glycerol. *Journ. Gen. Physiol.* 42, p. 1005. 1959.
21. ZEBE, E. C.; McSHAN, W. H.: Lactic and α -glycerophosphate dehydrogenase in insects. *Journ. Gen. Physiol.* 40, p. 779. 1957.



Die Imagos von *Hyphantria cunea* DRURY., die aus solchen Puppen hervorgegangen sind, welche während der letzten Phase der Diapause eine dreitägige Anaerobiose überlebt hatten.

Tabelle 1

Die Wirkung kurzfristiger Anaerobiose auf den O₂-Verbrauch der Diapause-Puppen von *Hyphantria cunea* DRURY.

Dauer der Anaerobiose Stunden	Geschlecht	O ₂ -Verbrauch μl/h/100 mg Lebendgewicht			
		Kontrollen		Versuchstiere	
		vor d. Anaer.	nach d. Anaer.	vor d. Anaer.	nach d. Anaer.
0,5	♀	12,3	16,1	14,1	14,3
1	♀	—	—	14,5	9,8
1,5	♀	12,3	12,9	14,6	11,5
2	♀	14,9	17,5	12,8	14,0
3	♀	16,5	18,5	14,5	11,7
24	♂	19,4	20,8	20,1	17,0

Tabelle 2

Die Wirkung langfristiger Anaerobiose auf den O₂-Verbrauch der Diapause-Puppen von *Hyphantria cunea* DRURY.

Dauer der Anaero- biose	O ₂ -Verbrauch μl/h/100 mg Lebendgewicht							
	♂				♀			
	Kontrollen		Versuchstiere		Kontrollen		Versuchstiere	
Tage	vor d. Anaer.	nach d. Anaer.	vor d. Anaer.	nach d. Anaer.	vor d. Anaer.	nach d. Anaer.	vor d. Anaer.	nach d. Anaer.
2	9,7	10,8	14,3	14,1	11,4	11,9	12,1	12,0
3	11,2	12,3	10,5	9,6	15,6	14,5	10,7	7,5