

**Die Cyanogenese der Limabohne (*Phaseolus lunatus* L.) —
quantitative Analyse ihrer Bedeutung in der Herbivor-Pflanze
Wechselwirkung**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
im Department Biologie der Fakultät Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Daniel J. Ballhorn

aus
Bad Segeberg

Hamburg 2007

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Symbole	IV
I Einleitung	1
I. 1 Funktionelle Analyse der Cyanogenese — Ansatz der Arbeit	1
I. 2 Pflanzen in ihrer Umwelt	2
I. 3 Verteidigung der Pflanzen	3
I. 4 Chemische Verteidigung	4
I. 5 Cyanogenese	4
I. 5. 1 Verbreitung und Vorkommen der Cyanogenese	5
I. 5. 2 Cyanogenese — die Freisetzung von Blausäure	5
I. 5. 3 Räumliche Trennung	
— Grundprinzipien der Akkumulation cyanogener Vorstufen	5
I. 5. 3. 1 Kompartimentierung auf zellulärer Ebene	6
I. 5. 3. 2 Räumliche Trennung auf Gewebe-Ebene	8
I. 5. 3. 3 Organspezifische Verteilung cyanogener Vorstufen	8
I. 5. 3. 4 α -Hydroxynitril Lyasen	10
I. 5. 4 Cyanogene Verbindungen im Stoffwechsel	
— Metabolismus und Transport	11
I. 5. 5 Genetische Kontrolle und Heterogenität der Cyanogenese	13
I. 5. 6 Einfluss abiotischer Faktoren auf die Cyanogenese	14
I. 5. 6. 1 Temperatur	15
I. 5. 6. 2 Nährelementverfügbarkeit	16
I. 5. 6. 3 Wasserverfügbarkeit	17
I. 5. 6. 4 Salinität	17
I. 5. 7 Cyanogenese — eine pflanzliche Verteidigung gegen Herbivore?	18
I. 5. 7. 1 Cyanogenese in der Pflanze-Pathogen Interaktion	19

I. 6	Ökologische Bedeutung der Cyanogenese	
	— experimenteller Ansatz zur Analyse.....	20
I. 6. 1	Die Limabohne (<i>Phaseolus lunatus</i>)	
	— Modell- und Kulturpflanze zugleich.....	22
I. 6. 1. 1	Die Limabohne als Modellpflanze.....	22
I. 6. 1. 2	Die Limabohne als Kulturpflanze	
	— sozio-ökonomischer Hintergrund ihrer Nutzung.....	23
I. 6. 2	Wüstenheuschrecke (<i>Schistocerca gregaria</i>).....	24
I. 6. 3	Mexikanischer Bohnenkäfer (<i>Epilachna varivestis</i>).....	25
I. 6. 4	Spinnmilbe (<i>Tetranychus urticae</i>).....	25
I. 7	Ziel der Arbeit.....	26
II	Titel der Manuskripte und Beitrag des Autors	27
III	Manuskripte	
III.	Manuskript 1 Plant cyanogenesis of <i>Phaseolus lunatus</i> and its relevance for herbivore-plant interaction: the importance of quantitative data.....	32
III.	Manuskript 2 Oviposition choice of Mexican bean beetle (<i>Epilachna varivestis</i>) depends on host plant cyanogenic capacity.....	59
III.	Manuskript 3 Phenotypic plasticity of cyanogenesis in lima bean (<i>Phaseolus lunatus</i>) — activity and activation of β -glucosidase.....	65
IV	Diskussion	79
IV. 1	Cyanogenese — eine Verteidigung gegen Herbivore?.....	79
IV. 2	Variabilität der Cyanogenese.....	79
IV. 2. 1	Intraspezifische Variabilität.....	80
IV. 2. 2	Ontogenetische Variabilität.....	81
IV. 2. 3	Zeitliche Muster cyanogener Eigenschaften.....	81
IV. 3	Konsequenzen der pflanzlichen Variabilität für das experimentelle Vorgehen.....	83
IV. 4	Variabilität der Herbivore.....	83
IV. 4. 1	Herbivore auf cyanogenen Pflanzen.....	86

IV. 5 Das verwendete System: Limabohne in der Interaktion mit generalistischen und spezialisierten Herbivoren.....	88
IV. 5. 1 Die Limabohne in der Interaktion mit einem generalistischen Herbivor.....	89
IV. 5. 2 Die Limabohne in der Interaktion mit einem spezialisierten Herbivor.....	91
IV. 5. 2. 1 Langzeiteffekte und potenzielle Populationsentwicklung.....	93
IV. 6 Cyanogenese der Limabohne — konstitutive oder induzierbare Verteidigung?.....	95
IV. 7 Konsequenzen der Arbeit für das Modell „Limabohne“.....	99
IV. 8 Perspektive.....	101
V Zusammenfassung.....	105
VI Danksagung.....	109
VII Literaturverzeichnis.....	111
VIII Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	138
IX Lebenslauf.....	139

Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
ANOVA	analysis of variance (statistisches Verfahren, Varianzanalyse)
aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Temperatur in Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
d	Tage (days)
df	Freiheitsgrade (degrees of freedom)
d. h.	das heißt
dw	Trockengewicht (dry weight)
ϵ	Extinktionskoeffizient
EFN	extrafloraler Nektar
e. g.	exempli gratia, zum Beispiel
et al.	et alies / et aliae
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
F	Wert der Signifikanzabschätzung nach ANOVA mittels F-Test ($F = MQ_{\text{Effekt}} \times MQ_{\text{Fehler}}^{-1}$)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
fw	Frischgewicht (fresh weight)
g	Gramm (Masseneinheit)
ggf.	gegebenenfalls
gw	Korngewicht (grain weight)
h	Stunden
ha	Hektar (Flächeneinheit; 10^4 m^2)
HC	hohe cyanogene Kapazität (high cyanogenic capacity)
HCl	Salzsäure
HCN	Cyanwasserstoff (Blausäure)
HCNc	Cyanogene Kapazität; Freisetzung von Blausäure pro Zeiteinheit
HCNp	Cyanogenes Potenzial; Konzentration cyanogener Vorstufen, gemessen als maximal aus diesen freisetzbare Blausäure
H-Group	hoch cyanogene Gruppe von Pflanzen
HSD-test	honest significant difference test (statistischer Signifikanztest nach Varianzanalyse)
i. e.	it est, das heißt
kat	Katal; $1 \text{ kat} = 1 \text{ mol s}^{-1}$
kDa	Kilodalton
L.	Linné
L1	erstes Larvenstadium
L2	zweites Larvenstadium
L3	drittes Larvenstadium
L4	viertes Larvenstadium
LC	niedrige cyanogene Kapazität (low cyanogenic capacity)
LC ⁽⁺⁾	niedrige cyanogene Kapazität (low cyanogenic capacity) bei gleichzeitig hohem cyanogenem Potenzial (HCNp)
L-Group	schwach cyanogene Gruppe von Pflanzen
min	Minuten
mm	Millimeter (Längeneinheit; 10^{-3} m)
mmol	Millimol (Stoffmengeneinheit; 10^{-3} mol)
mol	Mol (Stoffmengeneinheit; $6,022 \cdot 10^{23}$)

mRNA	messenger RNA
µmol	Mikromol (Stoffmengeneinheit; 10^{-6} mol)
µl	Mikroliter
n	Anzahl von Wiederholungen
NaCN	Natriumcyanid
nm	Nanometer (Längeneinheit; 10^{-9} m)
PE	Polyethylen
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
s	Sekunden (=sec)
S.	Seite
SAR	induzierte systemische Resistenz (systemic acquired resistance)
SE	Standardfehler (standard error)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
t	Tonnen (Masseneinheit)
Tab.	Tabelle
vgl.	vergleiche
VOCs	flüchtige organische Verbindungen (volatile organic compounds)
W	Watt
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
%	Prozent
&	und
*	bezeichnet ein signifikantes Ergebnis ($P < 0,05$)
**	bezeichnet ein signifikantes Ergebnis ($P < 0,01$)
***	bezeichnet ein signifikantes Ergebnis ($P < 0,001$)

I Einleitung

I. 1 Funktionelle Analyse der Cyanogenese — Ansatz der Arbeit

Die Blausäurefreisetzung lebender Organismen aus cyanidhaltigen Vorstufen wird als Cyanogenese bezeichnet (Conn, 1991a). Aufgrund der Toxizität des Endproduktes Blausäure (HCN) und der Tatsache, dass die HCN-Freisetzung erst als Antwort auf eine Zellverletzung erfolgt, wird dieses Merkmal generell als eine chemische Verteidigung der Pflanze gegen Herbivore betrachtet (Jones, 1962; Fry & Evans, 1977; Hughes, 1991).

Zahlreiche wichtige Nutz- und Kulturpflanzen sind cyanogen. Der wirtschaftlichen Bedeutung der Cyanogenese entsprechend wurde dieses Merkmal schon früh untersucht und eine große Zahl von Arbeiten existiert zu diesem Thema (z. B. Doak, 1933; Corkhill, 1940; Coop & Blakely, 1949, 1950). Kaum eine Studie kann jedoch cyanogenen Eigenschaften einer Pflanze quantitative Effekte gegenüber ihren Fraßfeinden und Pathogenen zuordnen — die ökologische Bedeutung der Cyanogenese ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt (Hruska, 1988; Gleadow & Woodrow, 2002; Miguel & Alberto, 2005).

Die Schwierigkeit, ökologische Effekte dieses Merkmals tatsächlich analytisch zu erfassen, liegt in dem polyfaktoriellen Charakter der Cyano-

genese begründet. Es handelt sich um ein Merkmal, das mehrere funktionelle Ebenen beinhaltet, die allesamt hoher Variabilität unterliegen können. Zum einen gibt es die cyanogenen Vorstufen. Ihre Konzentration in einem Gewebe bedingt dessen maximal freisetzbare Blausäuremenge (Lloyd & Gray, 1970). Lässt diese Größe Rückschlüsse auf die tatsächliche Blausäurefreisetzung im Falle einer Herbivore-Attacke zu? „Nein“, kann die Antwort nur lauten. Die tatsächliche Freisetzung von Blausäure ist von einer ganzen Reihe von Faktoren abhängig, in der die Aktivität zweier Enzymsysteme, der β -Glycosidase und der α -Hydroxynitril Lyase, eine Schlüsselposition einnimmt (Selmar et al., 1987, 1989). Es ist offensichtlich, dass in der ökologischen Analyse der Cyanogenese zwischen einer statischen Ebene, d. h. der Konzentration cyanogener Vorstufen des jeweiligen Gewebes, und einer kinetischen Komponente, der Blausäurefreisetzung aus diesen Vorstufen pro Zeit, differenziert werden muss. Beide Faktoren können äußerst unterschiedliche Effekte gegenüber Herbivoren haben. Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass die bloße Wertung einer Pflanze als „cyanogen“ ohne weitere Quantifizierung unterschiedlicher funktioneller Ebenen eine Aussage zur Bedeutung der Cyanogenese in der Herbivore-Pflanze Interaktion kaum zulässt. Diese Erkenntnis setzt sich erst in neuester Zeit durch (Miguel & Alberto, 2005) und bietet rückblickend zugleich

eine Erklärung für viele widersprüchliche Ergebnisse zur Bedeutung und Funktion der Cyanogenese in der Herbivor-Pflanze Wechselwirkung.

Die vorliegende Arbeit repräsentiert einen neuen Ansatz zur quantitativen Analyse von Herbivor-Pflanze Interaktionen. Es wurde ein Modellsystem entwickelt, mit dessen Hilfe statische und kinetische Effekte der Cyanogenese in der Interaktion mit Herbivoren funktionell sehr genau zugeordnet werden konnten. Die gewonnenen Erkenntnisse tragen wesentlich dazu bei, Lücken im Verständnis der ökologischen Bedeutung der Cyanogenese zu schließen.

I. 2 Pflanzen in ihrer Umwelt

Welche Stellung hat die pflanzliche Cyanogenese als potenzielle Verteidigung gegen Herbivore im Netzwerk ökologischer Wechselwirkungen?

Wie alle lebenden Organismen stehen Pflanzen mit ihrer Umwelt in vielfältiger Interaktion. Sie sind gleichzeitig einer großen Zahl verschiedener Faktoren ausgesetzt, die sich in unterschiedlicher Weise – positiv, neutral oder negativ – auf Wachstum, Entwicklung und Reproduktion auswirken. Abiotische Einflüsse wie Licht, Temperatur, Wasser- und Ionenversorgung, sowie die mineralische Beschaffenheit des Bodens, stellen für Landpflanzen als an ihren Standort gebundene und photosynthetisch aktive

Organismen zentrale Bedingungen für Wachstum und Entwicklung dar. Neben diesem unbelebten Teil ihrer Umwelt sind Pflanzen in zahlreiche biotische Interaktionen, d. h. in Interaktionen mit anderen Pflanzen, Tieren, Pilzen und Bakterien eingebunden. Diese reichen in ihrer Wertigkeit einschließlich aller Übergänge, von obligat mutualistischen bis hin zu rein parasitischen Beziehungen. Die Stellung der Interaktionspartner zueinander kann in einem gegebenen System zeitlich und ontogenetisch variieren. In der Konsequenz ist nahezu jeder Organismus in ein hoch komplexes ökologisches Netzwerk von biotischen und abiotischen Faktoren eingebunden.

Abgesehen von Pilzen und Bakterien stellen insbesondere zwei Gruppen, die bedecktsamigen Blütenpflanzen (Angiospermae) und die Insekten (Insecta), den Großteil der heute auf der Erde lebenden Arten. Seit der Entwicklung der Samenpflanzen (Spermatophyta) an der Wende vom Devon zum Karbon vor ca. 350 Millionen Jahren existieren zwischen Pflanzen und Insekten viele Interaktionen. Zu Anfang der Kreidezeit vor 135 Millionen Jahren, dominierten nacktsamige Coniferophytina und Cycadophytina; die Ära der Farne, Schachtelhalme und Bärlappe, die zuvor in gewaltigen Wäldern die Erde bedeckten war vorbei. Die zu diesem Zeitpunkt auftretenden ersten Angiospermen hatten einen ungeheuren Erfolg. Bereits 70 Millionen Jahre später, gegen Ende der

Kreidezeit, waren sie absolut vorherrschend und sind es immer noch. Diese enorme Radiation der Angiospermen geht wesentlich auf die Interaktion mit Tieren, insbesondere mit Insekten zurück (Regal, 1977; Lunau, 2004). Viele dieser Interaktionen tragen für die Pflanzen einen positiven Charakter. Die Bestäubung durch Insekten z.B. erlaubt Pflanzen auch bei räumlicher Trennung ihrer Standorte oder bei geringer Individuendichte die Produktion genetisch heterogener Nachkommen.

Neben solchen mutualistisch geprägten Interaktionen zwischen Insekten und Pflanzen sind jedoch auch antagonistische Wechselwirkungen weit verbreitet. Solche „Räuber-Beute“-Verhältnisse sind in der Tat so häufig, dass nahezu jede Pflanzenart für mindestens eine Insektenart eine Nahrungsquelle darstellt (Ehrlich & Raven, 1964). Wie jeder Organismus ist jedoch auch eine Pflanze „bestrebt“ einen gemäß der Fitness-Definition möglichst hohen relativen genetischen Beitrag zu der nächsten Generation zu leisten. Da Pflanzen ihren Fraßfeinden und Pathogenen keine Mobilität entgegenzusetzen haben, müssen sie sich verteidigen, um ihr Überleben bzw. ihre Reproduktion zu sichern.

I. 3 Verteidigung der Pflanzen

Die Verteidigungs- und Resistenzmechanismen der Pflanzen sind vielgestaltig (Crawley, 1983; Rosenthal, 1986; Howe & Westley, 1988; Young, 1991; Bernays & Chapman, 1994). Gegenüber Herbivoren und Pathogenen kann grundsätzlich zwischen chemischer und physikalisch/mechanischer Abwehr unterschieden werden (Simmons & Gurr, 2004; Boughton et al., 2005). Hinsichtlich der Abwehr von Fraßfeinden können beide Verteidigungsformen direkte (bottom-up) und indirekte (top-down) Strategien einschließen. Die direkte Verteidigung wirkt unmittelbar abschreckend oder toxisch auf den Herbivor. Die indirekte Pflanzenverteidigung schließt Faktoren ein, die Carnivore zur Pflanze locken, um den Prädations-Druck auf Herbivore und in der Folge die Fitness der Pflanzen zu erhöhen (Van Loon et al., 2000; Fritsche-Hoballah & Turlings, 2001; Kessler & Baldwin, 2001). Die Attraktion von Prädatoren und Parasitoiden durch Pflanzen kann aktiv auf der Basis direkter Belohnung durch attraktive Nahrungsquellen wie z. B. extrafloralen Nektar (EFN; Koptur, 1992; Heil, 2004a) oder Futterkörperchen (Janzen, 1966; Huxley, 1991) sowie Nistraum (Agrawal & Karban, 1997) geschehen. Weiterhin kann Fraß die *de novo* Synthese und Emission z. T. hoch spezifischer Kompositionen volatiler organischer Verbindungen (VOCs) induzieren, die für carnivore Arthropoden

einen Schlüssel zur Beute- oder Wirtsfindung darstellen können (Turlings et al., 1990; Kessler & Baldwin, 2001). In diesem Fall dient der Herbivor selbst als Belohnung für den angelockten Prädator oder Parasitoiden.

Sowohl direkte als auch indirekte Verteidigungsmechanismen können zudem konstitutiv oder induzierbar sein. Konstitutive Verteidigung ist permanent und unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Fraßfeinden vorhanden, induzierte Verteidigungsmechanismen werden erst als Antwort auf einen äußeren mechanischen oder chemischen Reiz ausgebildet (Underwood & Rausher, 2002).

I. 4 Chemische Verteidigung

Zahlreiche Pflanzenstoffe sind toxisch — sie schrecken Pflanzenfresser ab (Repellents), inhibieren physiologische Vorgänge (d.h. wirken anti-digestiv und/oder anti-nutritiv), repräsentieren Hormonanaloga, wirken mutagen und carcinogen oder stellen antibakterielle, antivirale oder antifungale Antibiotika dar. Es sind bis heute mehr als 100.000 Pflanzenstoffe bekannt, von denen nur relativ wenige (ca. 100-200) für lebenswichtige Stoffwechselprozesse benötigt werden (Schaller, 2002).

Die Funktion der anderen Verbindungen im Grundstoffwechsel ist nicht eindeutig erkennbar. Bei ihnen handelt es sich um

so genannte „Sekundärmetabolite“, die unter bestimmten Bedingungen jedoch wesentliche Selektionsvorteile für die Pflanze bieten können. Vielen dieser Stoffe konnten in Labor- und/oder Freilandexperimenten spezifische Funktionen für die Pflanze, direkt oder in der Interaktion mit anderen Organismen, zugewiesen werden (Harborne, 1995).

I. 5 Cyanogenese

Die Cyanogenese — die Freisetzung von Blausäure aus cyanidhaltigen Vorstufen infolge einer Zellverletzung (Conn, 1991a) — wird als eine konstitutive, präformiert vorliegende, chemische Abwehr betrachtet (Jones, 1966; Kakes, 1997; Patton et al., 1997).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob die pflanzliche Cyanogenese tatsächlich eine Verteidigung gegen Herbivore darstellt und auf welcher Ebene — statisch oder kinetisch — diese Verteidigung ansetzt.

Der folgende Abschnitt befasst sich zunächst mit dem Vorkommen der Cyanogenese, der Struktur und Verteilung cyanogener Vorstufen, ihrer Synthese und ihrem Abbau sowie mit der Beeinflussung cyanogener Eigenschaften durch äußere Faktoren und der daraus resultierenden phänotypischen und genotypischen Variabilität dieses Merkmals.

I. 5. 1 Verbreitung und Vorkommen der Cyanogenese

Mehr als 2500 Arten höherer Pflanzen aus über 130 verschiedenen Familien synthetisieren cyanidhaltige Vorstufen (Conn, 1981a; Knowles, 1988; Aikmann et al., 1996; Hughes, 1996; Jones, 1998; Møller & Seigler, 1999). Die Verbreitung der Cyanogenese reicht von Farnen bis hin zu Angiospermen. Die Fähigkeit zur Blausäurefreisetzung ist jedoch kein rein pflanzliches Merkmal. Manche Arthropoden sind ebenfalls in der Lage, cyanogene Vorstufen zu akkumulieren und Blausäure freizusetzen. Einige Diplopoda und Chilopoda (Duffey & Towers, 1978; Duffey, 1981) sowie Schmetterlinge mehrerer Familien (z. B. Zygaenidae, Papilionidae) stellen hierfür gut untersuchte Beispiele dar (Witthohn & Naumann, 1987a; Nahrstedt, 1993; Holzkamp & Nahrstedt, 1994; Zagrobelny et al., 2004). Schließlich können auch Bakterien und Pilze Blausäure produzieren. Allerdings sind hier die Synthesewege grundsätzlich verschieden von denen der Pflanzen und Tiere, die sich bemerkenswerter Weise sehr ähneln (Conn, 1981a; Knowles, 1988; Zagrobelny et al., 2004). Zudem kann aufgrund der Organisationsform dieser Organismen — einzellig bis hin zu einfach strukturierten Mycelien — nicht von vergleichbaren ökologischen Funktionen der Cyanogenese ausgegangen werden.

I. 5. 2 Cyanogenese — die Freisetzung von Blausäure

Blausäure (HCN) ist für Pflanzen, wie prinzipiell für alle Organismen mit mitochondrialer Atmungskette, toxisch (Nielsen et al., 2006). Diese Toxizität beruht auf der hohen Affinität von HCN zur terminalen Cytochrom-Oxidase. Um eine Autotoxizität zu vermeiden akkumulieren Pflanzen Blausäure in Form von cyanidhaltigen, inaktiven Vorstufen, meist cyanogenen Glykosiden (siehe Box 1), seltener cyanogenen Lipiden (Mikolajczak, 1977; Selmar et al., 1990).

Die Freisetzung von HCN aus cyanogenen Glykosiden verläuft, trotz deren struktureller Variabilität, bei allen cyanogenen Pflanzen nach demselben Prinzip [(Conn, 1991a), siehe Abbildung 1].

I. 5. 3 Räumliche Trennung — Grundprinzipien der Akkumulation cyanogener Vorstufen

Die spontane Blausäurefreisetzung aus unverletzten Pflanzen wird durch die räumliche Trennung cyanogener Glykoside und korrespondierender β -Glykosidasen vermieden (Hughes, 1993). Diese Kompartimentierung kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen. Es kann zwischen einer Trennung auf Gewebe-, zellulärer und subzellulärer Ebene differenziert werden (Poulton, 1988).

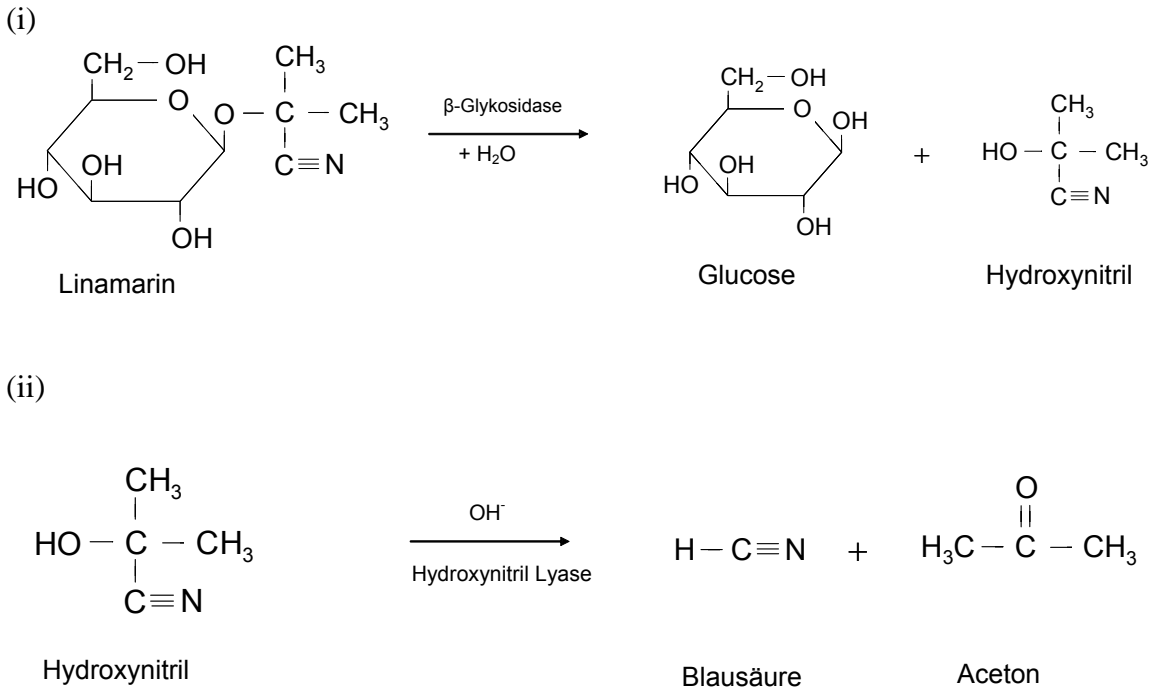


Abb. 1 Freisetzung von Blausäure aus cyanogenen Vorstufen

Nach Dekompartimentierung einer cyanogenen Glykoside enthaltenden Zelle wird in einem ersten Reaktionsschritt die β -glykosidische Bindung der Glykoside (hier Linamarin) zwischen Zuckermolekül und Aglykon mit Hilfe einer oder mehrerer β -Glykosidasen hydrolysiert. Das resultierende α -Hydroxynitril ist instabil und zerfällt spontan ($\text{pH} > 5,0$; Temperatur $> 35^\circ\text{C}$) oder durch eine α -Hydroxynitril Lyase um das Zehn- bis Zwanzigfache beschleunigt, in Blausäure und eine Carbonylverbindung (hier Aceton).

I. 5. 3. 1 Kompartimentierung auf zellulärer Ebene

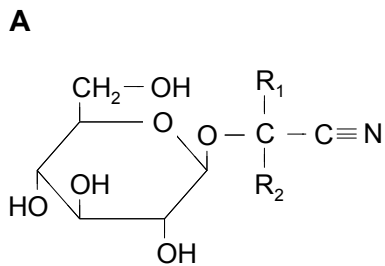
Eine häufige Form der räumlichen Trennung von Substrat und Enzym auf zellulärer Ebene ist die Speicherung cyanogener Glykoside in der Vakuole, zusammen mit einer apoplastischen Lokalisation der β -Glykosidasen (Møller & Poulton, 1993; Wittstock & Gershenzon, 2002). Diese Form der Kompartimentierung konnte z. B. bei *Hevea brasiliensis* und *Manihot esculenta*

(Euphorbiaceae), *Phaseolus lunatus* und *Trifolium repens* (Fabaceae) sowie *Sorghum bicolor* (Poaceae) nachgewiesen werden (Saunders & Conn, 1978; Hughes, 1993; McMahon et al., 1995; Hickel et al., 1996).

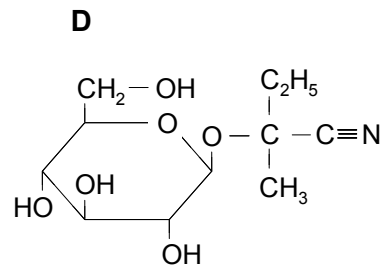
Neben der Lokalisation im Apoplasten können die β -Glykosidasen auch im Cytoplasma, chloroplastenassoziiert oder im Latex vorliegen (Thayer & Conn, 1981; Frehner & Conn, 1987; Wu & Poulton, 1991; Hughes et al., 1992). Zum Ort der Akkumulation der cyanogenen Vorstufen

Box 1 Cyanogene Vorstufen

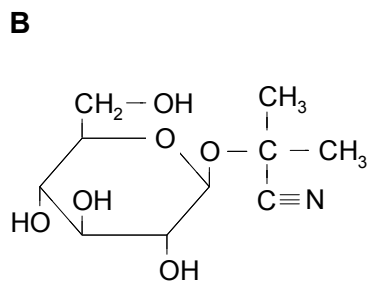
Cyanogene Glykoside sind die häufigsten cyanidhaltigen Vorstufen der Pflanzen. Diese Verbindungen besitzen eine α -Hydroxynitril-Komponente, die durch einen glykosidisch gebundenen Zuckerrest stabilisiert wird [A, allgemeine Struktur]. Meist handelt es sich um Monoglykoside in denen die Zuckerkomponente aus β -D-Glucose besteht und über eine O- β -glucosyl-Bindung mit dem Aglycon verbunden ist [B-D (Conn, 1981b; Seigler, 1991)]. Viele Pflanzen synthetisieren nur einen Typ cyanogener Glykoside, von dem häufig aber auch das entsprechende Diglykosid des jeweiligen Aglykons vorliegt (B \leftrightarrow E und C \leftrightarrow F). Andere Pflanzen, z. B. Maniok (*Manihot esculenta*), Kautschukbaum (*Hevea brasiliensis*), Flachs (*Linum usitatissimum*) und die Limabohne (*Phaseolus lunatus*) besitzen mehrere Typen cyanogener Glykoside. In diesen Pflanzen kommen Linamarin [B] sowie Lotaustralin [D] gemeinsam vor (Conn, 1981b, 1991b). Die Struktur des Aglykons variiert in Abhängigkeit der Aminosäure von der das jeweilige cyanogene Glykosid abgeleitet ist (*).



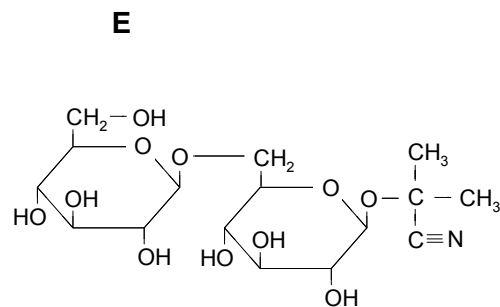
Grundgerüst



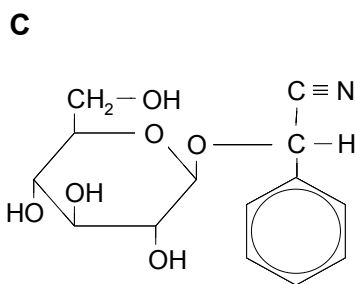
(R)-Lotaustralin: Isoleucin*



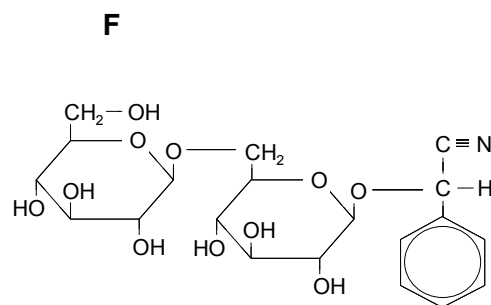
Linamarin: Valin*



Linustatin: Valin*



(R)-Prunasin: Phenylalanin*



Amygdalin: Phenylalanin*

gibt es ebenfalls Sonderfälle. In Blattstielen und Sprossachsen von *M. esculenta* kommen cyanogene Glykoside, neben der vakuolären Lokalisation, auch in vesikelartigen Strukturen innerhalb des Latex vor (Elias et al., 1997).

I. 5. 3. 2 Räumliche Trennung auf Gewebe-Ebene

Zusätzlich zur Kompartimentierung auf zellulärer Ebene ist die räumliche Trennung cyanogener Vorstufen und hydrolytischer Enzyme auf der Ebene von Geweben ebenfalls ein weit verbreitetes Prinzip (Swain et al., 1992). So ist z. B. in *Sorghum* das cyanogene Glykosid Dhurrin ausschließlich in epidermalen Zellen zu finden, wohingegen die entsprechende β -Glykosidase vor allem im Mesophyll lokalisiert ist (Kojima et al., 1979). Die Limabohne, *Phaseolus lunatus*, zeigt neben der Kompartimentierung auf zellulärer Ebene (siehe I. 5. 3 .1) eine analog zu *Sorghum* erhöhte Konzentration cyanogener Glykoside in epidermalen Zellen (Frehner & Conn, 1987).

I. 5. 3. 3 Organspezifische Verteilung cyanogener Vorstufen

Cyanogene Glykoside sind in der Pflanze nicht gleichmäßig verteilt. Neben einer zell- oder gewebespezifischen Akku-

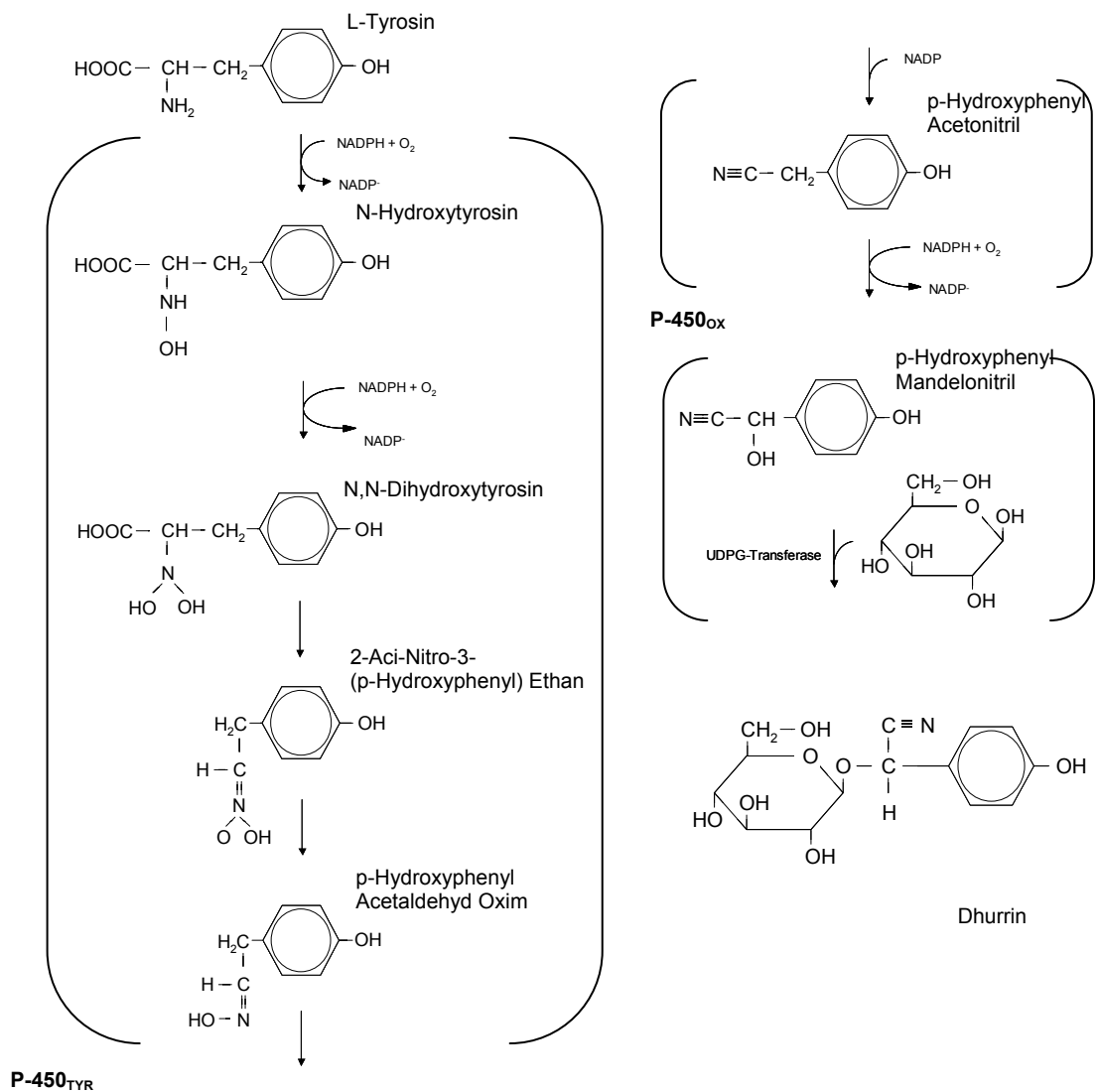
mulation kann die Konzentration cyanogener Vorstufen ebenso in Abhängigkeit des jeweiligen Organs bzw. dessen ontogenetischen Entwicklungsstadiums variieren (Abbildung 2). In vielen Fällen findet sich eine erhöhte Konzentration cyanogener Vorstufen in ontogenetisch jungen Organen (Caradus et al., 1997; Thomsen & Brimer, 1997).

Anfangs wurde vermutet, dass das Vorkommen cyanogener Vorstufen auf photosynthetisch aktive, vegetative Gewebe beschränkt sei (Robinson, 1930; Martin et al., 1938). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass viele Arten cyanogene Blüten und Früchte besitzen (Lloyd & Gray, 1970; Nahrstedt, 1985b; Selmar et al., 1988; Selmar, 1993a; Swain & Poulton, 1994; Chassagne et al., 1996; Seigler, 1998).

Im Gegensatz zu den zahlreichen Untersuchungen zum Gehalt cyanogener Vorstufen in oberirdischen Pflanzenteilen ist nur relativ wenig über die Akkumulation cyanogener Vorstufen in Wurzeln bekannt. Ausnahmen sind Papaya (Caricaceae: *Carica papaya*) und *Prunus* sp., in deren Wurzeln cyanogene Vorstufen nachgewiesen wurden (Bennett et al., 1997). Von Maniok (*M. esculenta*) ist bekannt, dass diese Pflanze in Abhängigkeit des Genotyps stark unterschiedliche Mengen cyanogener Glykoside in ihren Wurzelknollen akkumuliert (Dufour, 1988, 1989; Dixon et al., 1994).

Box 2 Biosynthese cyanogener Vorstufen

Alle cyanogenen Glykoside werden in mehreren Reaktionsschritten — über z. T. sehr kurzlebige Zwischenprodukte (Kahn et al., 1997) — aus Aminosäuren synthetisiert (Halkier et al., 1988). Analysen mehrerer cyanogener Pflanzen zeigten, dass diese alle dieselben drei Enzym-Systeme zur Synthese ihrer jeweiligen cyanogenen Glykoside nutzen (Møller & Conn, 1980; Møller & Poulton, 1993; McMahon et al., 1995; Mederacke et al., 1996). Der Biosynthese-Weg ist anhand des von Kahn et al. (1997) entwickelten Schemas zur Dhurrin-Synthese dargestellt:



Beide Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenasen (P450_{TYR} und P450_{ox}) sind membranassoziiert. Erstere katalysiert die Umwandlung von L-Tyrosin in das Oxim N-Hydroxytyrosin, die zweite die Umwandlung des Oximes p-Hydroxyphenylacetonitril in das Cyanohydrin p-Hydroxymandelonitril (Halkier & Møller, 1991; Sibbesen et al., 1994; Mederacke et al., 1996). Die Glycosylierung des instabilen Cyanohydrins wird durch eine UDP-Glucosyltransferase katalysiert.

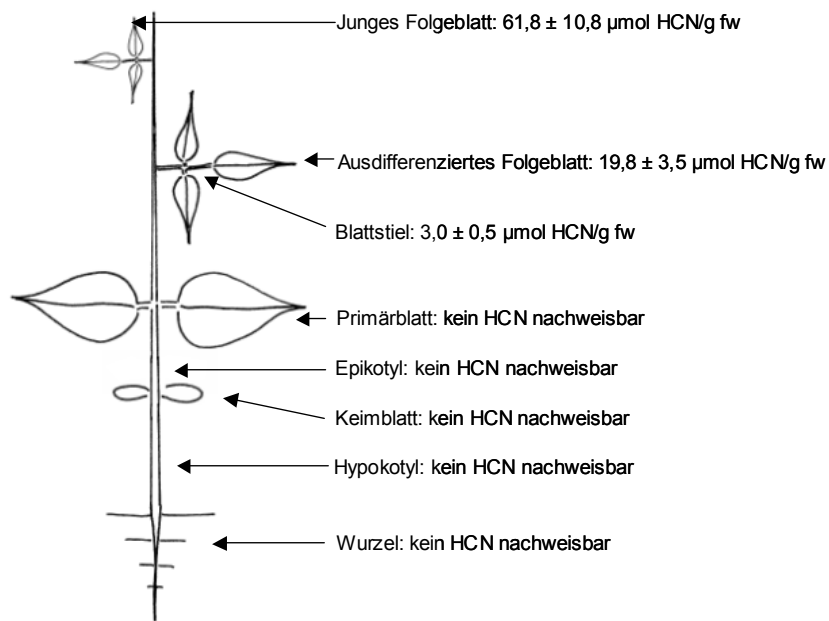


Abb. 2 Akkumulation cyanogener Vorstufen: Ontogenetische und organspezifische Variabilität

Die Konzentration cyanogener Vorstufen in der Limabohne (Akzession 8078; Dreiblattstadium, untersuchte Pflanzen $N = 11$) zeigt große Unterschiede in Abhängigkeit des jeweiligen Gewebes bzw. Organs. Junge Blätter weisen die höchste Konzentration cyanogener Vorstufen auf. In den Primärblättern und den darunter liegenden Sprossbereichen sowie in der Wurzel sind keine mit Linamarase spaltbaren cyanogenen Glykoside nachweisbar (Pietrowski, 2003; Ballhorn, unveröffentlichte Daten).

In dieser Arbeit wurde die obligat cyanogene Limabohne verwendet (Baudoin et al., 1991). Bei dieser Pflanze sind auch bei Genotypen mit hohen Konzentrationen cyanogener Vorstufen in ihren Folgeblättern nahezu keine mit Linamarase spaltbaren Vorstufen in ihren Wurzeln enthalten [(Pietrowski, 2003), siehe Abbildung 2]. Ein ähnlicher Befund liegt für den Weißklee (*T. repens*) vor. Es konnte keinerlei Expression der in die Biosynthese cyanogener Vorstufen oder spezifischer β -Glykosidase involvierten Gene in den Wurzeln nachgewiesen werden (Collinge & Hughes, 1982). Von

der Konzentration cyanogener Vorstufen in einem gegebenen Organ kann nicht auf die Konzentration in einem anderen rückgeschlossen werden (vgl. Abbildung 2).

I. 5. 3. 4 α -Hydroxynitril Lyasen

Zur zellulären Lokalisation der α -Hydroxynitril Lyasen, als weiteren wesentlich die Kinetik der Blausäurefreisetzung bestimmenden Enzymen (Selmar et al., 1987, 1989; Wajant & Pfizenmaier, 1996; Siritunga et al., 2002), liegen kaum Daten vor.

Untersuchungen an *Sorghum* und *H. brasiliensis* lassen ein cytoplasmatisches Vorkommen dieser Enzyme vermuten (Kojima et al., 1979; Hickel et al., 1996).

I. 5. 4 Cyanogene Verbindungen im Stoffwechsel — Metabolismus und Transport

Neben der Freisetzung von HCN als Antwort auf Zellverletzung werden auch in intakten Pflanzen cyanogene Vorstufen ab- bzw. umgebaut; sie unterliegen einem Turnover (Bough & Gander, 1971; Adewusi, 1990).

Diese Stoffwechselprozesse finden ohne eine Freisetzung von Blausäure in die Atmosphäre statt (Lieberei, 1984). In Pflanzen können mehrere HCN-Refixierungsprozesse vorliegen, die ein Entweichen der Blausäure in die Atmosphäre verhindern (siehe Abbildung 3). Unter dieses Refixierungs- bzw. Detoxifikationsprozessen kommt der β -Cyanoalaninsynthase im Zusammenspiel mit der β -Cyanoalaninhydrolase in Pflanzen eine Schlüsselrolle zu. Mit Hilfe dieser Enzyme wird aus den cyanogenen Vorstufen freiwerdendes HCN in den Aminosäurestoffwechsel der Pflanze zurückgeführt [(Castric et al., 1972), siehe Abbildung 3].

In zahlreichen Pflanzen konnten Verlagerungsvorgänge cyanogener Glykoside von einem Gewebe oder Organ in ein anderes nachgewiesen werden (z. B.

Clegg, 1979; Lieberei, 1984; Selmar, 1986, 1993a,b; Selmar et al., 1988; Swain et al., 1992; Ohtsubo et al., 1994). An *M. esculenta* wurde gezeigt, dass das cyanogene Monoglycosid Linamarin vorwiegend in den Blättern und Blattstielen synthetisiert, aber vor allem in den synthetisch wenig aktiven Knollen akkumuliert wird (Bediako et al., 1981). Ein Langstreckentransport innerhalb der Pflanze bedeutet, dass die zu transportierenden cyanogenen Glykoside die Zelle verlassen müssen, ohne von den apoplastischen β -Glykosidasen gespalten zu werden (Clegg et al., 1979; Erickson, 1986). Dies geschieht durch die Anheftung eines weiteren Zuckers (Glykosylierung) an das Glykosid; es entsteht ein Diglykosid (siehe Abbildung 4). Solche Diglykoside werden nicht von den β -(Mono)Glykosidasen hydrolysiert. Sie können über die üblichen Wege des Langstreckentransports, also über das Phloem, von einem Organ bzw. Gewebe in ein anderes verlagert werden, ohne dass dabei Blausäure freigesetzt wird. Am Zielort des Transports angekommen, müssen die Diglykoside ggf. wieder hydrolysiert werden. Dies kann über zwei alternative Wege geschehen [(Selmar, 1993a), Abbildung 4]. Entweder wird im Zuge einer sequentiellen Hydrolyse die terminale, also die neu angeknüpfte Zuckereinheit entfernt, das ursprüngliche Monoglykosid wieder hergestellt und umgehend in den Vakuolen der Zellen des Zielgewebes eingelagert, oder aber beide

Zuckereinheiten werden in einem Schritt abgespalten (simultane Hydrolyse). Bei der simultanen Hydrolyse entstehen, wie bei der verletzungsbedingten Cyanogenese, Hydroxynitrile bzw. freie Blausäure. Diese HCN-Freisetzung geschieht jedoch unter kontrollierten Bedingungen. Über die oben beschriebenen Prozesse der Refixierung entweicht keine Blausäure in die Atmosphäre.

Der in den cyanogenen Glykosiden gebunden vorliegende Stickstoff ist also für die Pflanze nicht funktionell festgelegt. Es handelt sich um einen Pool, der unterschiedlichen physiologischen bzw. ökologischen Erfordernissen entsprechend umgelagert werden kann.

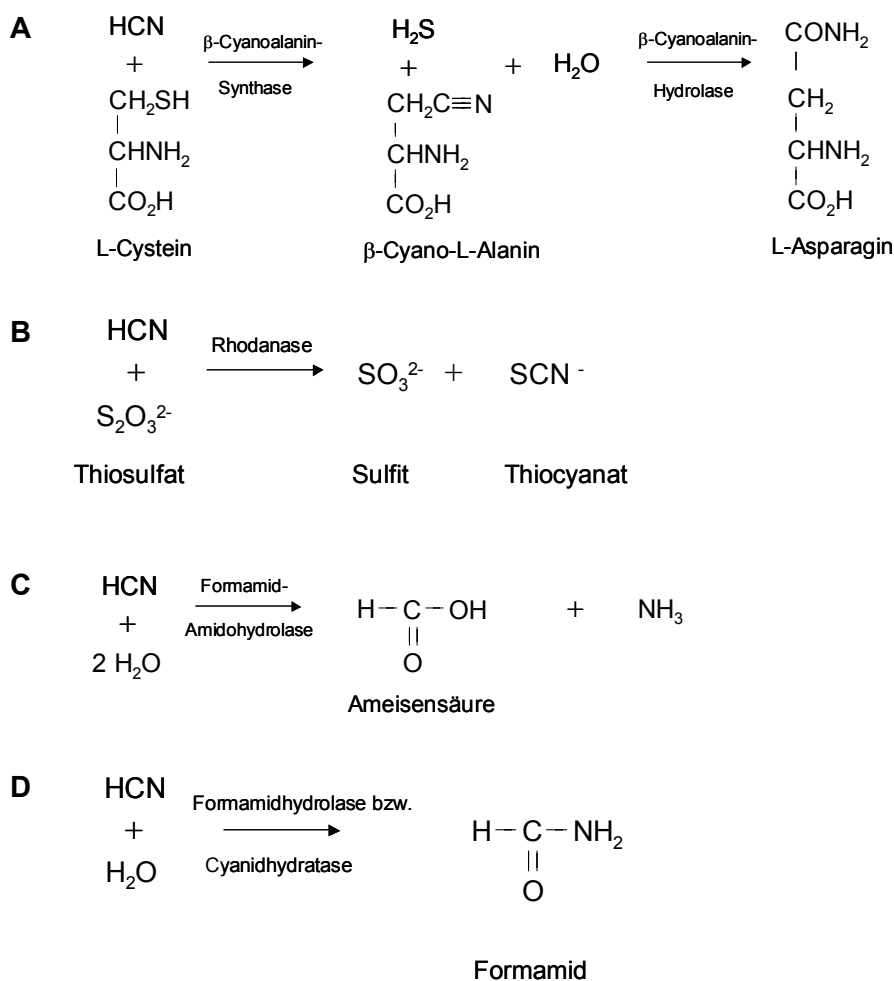


Abb. 3 Cyanid verbrauchende Reaktionen

Blausäure (HCN) wird von der β -Cyanoalaninsynthase zu β -Cyanoalanin umgesetzt, welches anschließend durch die β -Cyanoalaninhydrolase zu Asparagin hydrolysiert werden kann. Dieses gelangt in den Aminosäurestoffwechsel der Pflanze [A]. Die vor allem in höheren Tieren prominente Rhodanase katalysiert die Reaktion von Thiosulfat und Cyanid zu Thiocyanat und Sulfit [B]. Die Umsetzungen von Cyanid und Wasser zu Ameisensäure und Ammoniak [C] bzw. Formamid [D] stellen weitere Cyanid verbrauchende Reaktionen dar.

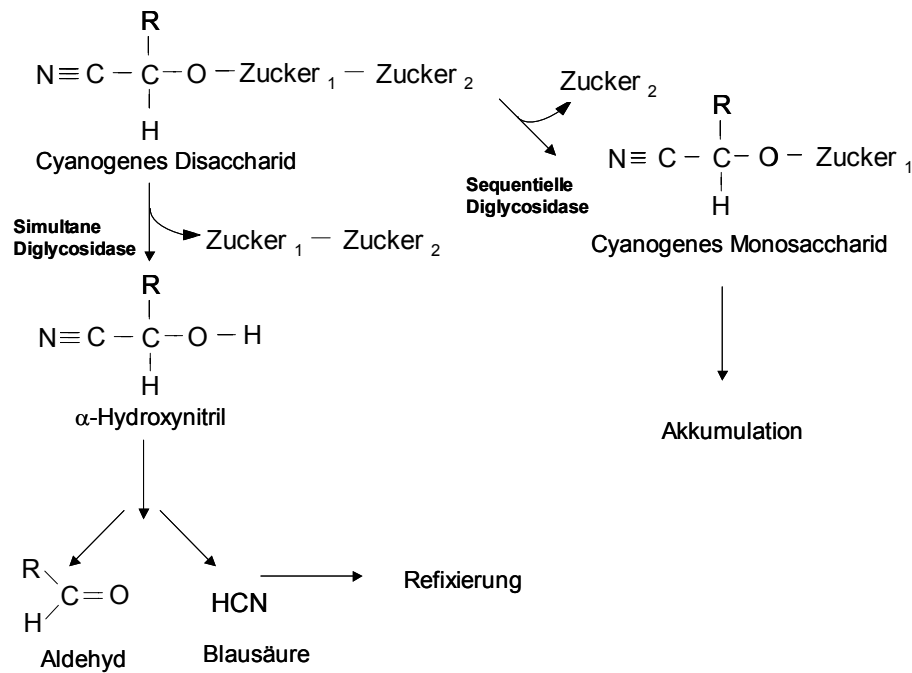


Abb. 4 Stoffwechselwege cyanogener Glykoside

Die Diglycoside des Langstreckentransports werden am Zielort entweder durch simultane oder durch sequentielle Diglycosidasen gespalten. Durch simultane Diglycosidasen werden beide Zuckerreste gleichzeitig abgespalten und das entstehende Hydroxynitril zerfällt unter physiologischen Bedingungen in HCN und die entsprechende Carbonylverbindung. HCN kann refixiert und für die Pflanze nutzbar gemacht werden. Sequentielle Diglycosidasen können durch Abspaltung des endständigen Zuckers das ursprüngliche cyanogene Monoglycosid wieder herstellen. Dieses kann erneut akkumuliert werden.

I. 5. 5 Genetische Kontrolle und Heterogenität der Cyanogenese

Neben obligat cyanogenen Pflanzen [(z.B. *Phaseolus lunatus*, *Manihot esculenta*, *Prunus laurocerasus* (Rosaceae), *Linum usitatissimum* (Linaceae)] gibt es Pflanzen, die hinsichtlich der Cyanogenese polymorph sind. Neben cyanogenen kommen bei diesen Pflanzen auch acyanogene Individuen vor. Die genetische Kontrolle des Cyanogenese-Polymorphismus variiert zwischen Arten. Der Weißklee (*Trifolium repens*) und der Hornklee (*Lotus corniculatus*), beides

Fabaceen, stellen in dieser Hinsicht besonders gut untersuchte Pflanzen dar. Die Cyanogenese von *T. repens* (einer diploiden Pflanze) wird durch Allele zweier unabhängig segregierender Loci bestimmt (Corkhill, 1942). Der Ac Locus kontrolliert die Konzentration der cyanogenen Glucoside Linamarin und Lotaustralin in der Pflanze, der Li Locus bestimmt die Synthese spezifischer β -Glucosidasen (Hayden & Parker, 2002). Die genomische Verteilung dieser Loci resultiert in vier genotypischen Kombinationsmöglichkeiten: AcLi, Acli, acLi und acli. Sowohl die Fähigkeit zur Synthese cyanogener Gluco-

side (Ac), als auch zur Synthese spezifischer β -Glucosidase (Linamarase, Li) ist dominant gegenüber den non-funktionalen Allelen (ac, li). Über die Expression der vier Genotypen können zwei Phänotypen von Pflanzen gebildet werden [cyanogene (AcLi) und acyanogene (AcLi, acLi, acLi) Pflanzen]. Unter experimenteller, exogener Zufuhr sowohl von cyanogenen Glucosiden als auch β -Glucosidase zu homogenisiertem Pflanzengewebe können die verschiedenen acyanogenen Genotypen über die Freisetzung von Blausäure identifiziert werden (Harborne, 1995).

Die hohe Variabilität der Cyanogenese in Populationen kann allerdings nur unzureichend über diesen einfachen genetischen Mechanismus erklärt werden (Hughes, 1991).

Till (1987) konnte eine erhebliche Variabilität cyanogener Eigenschaften in individuellen Pflanzen, sogar in einzelnen Blättern nachweisen. Die Dominanz der funktionalen Allele Ac und Li scheint zum einen auf biochemischer Ebene weiteren Kontrollen zu unterliegen (Hughes, 1996), zum anderen existieren offenbar mehrere Ac Allele, die zur quantitativen Regulation der Konzentration cyanogener Glucoside beitragen (Till, 1987; Hughes, 1991). Der unterschiedliche Funktionalitätsgrad dieser verschiedenen Ac Allele schlägt sich in der Quantität microsomalier Enzyme nieder, die in den Syntheseweg der cyanogenen Glucoside involviert sind (Hughes & Stirling, 1982). Das non-funktionale ac

Allel führt bei homozygoten Formen zu einem Verlust aller drei dieser an der Synthese beteiligten Enzyme (siehe Box 2).

Pflanzenindividuen mit dem homozygot non-funktionalen Li Locus (lili) synthetisieren keine Linamarase (Dunn et al., 1988), dominant homozygote LiLi Pflanzen enthalten hohe Mengen an Linamarase im Blattgewebe, wohingegen heterozygote (Lili) Pflanzen einen mittleren Gehalt aufweisen. Im Gegensatz zum Ac Locus scheint hier die Variabilität also nicht auf Allelen verschiedenen Funktionalitätsgrades zu beruhen (Hughes, 1993).

Die genetischen, den cyanogenen Status beeinflussenden Systeme anderer Pflanzenarten, scheinen komplexer zu sein. Hornklee (*L. corniculatus*) zeigt zwar eine ähnliche Allel-Verteilung wie *T. repens*, allerdings ist *L. corniculatus* tetraploid und damit das Vererbungsmuster entsprechend komplizierter (Nass, 1972). In *Sorghum bicolor* und *Sorghum sudanese* interagieren zahlreichen Allele multipler Loci additiv und bedingen somit eine hohe Zahl von Geno- und Phänotypen (Lamb et al., 1987).

I. 5. 6 Einfluss abiotischer Faktoren auf die Cyanogenese

Abiotische Faktoren können generell auf die Ausprägung biochemischer Merkmale

einer Pflanze Einfluss nehmen (Gershenzon, 1984); das Merkmal der Cyanogenese stellt hier keine Ausnahme dar (Hughes, 1996).

Die Konzentration cyanogener Vorstufen in Nutzpflanzen ist unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten das in vielen Fällen zentrale qualitätsbestimmende Merkmal. Entsprechend der ökonomischen Bedeutung der Cyanogenese wurden in zahlreichen agrarökologisch orientierten Studien Effekte klimatischer und edaphischer Faktoren auf Wachstum und Entwicklung dieser Pflanzen untersucht (z. B. Collinge & Hughes, 1982; Foulds, 1982; Bokanga et al., 1994; Jones, 1998).

Für eine obligat cyanogene Pflanzenart, oder für eine individuelle Pflanze einer polymorphen Art mit einer entsprechenden genetischen Ausstattung, ist die Synthese cyanogener Vorstufen ein qualitatives Merkmal; die jeweilige Pflanze produziert in jedem Fall eine gewisse Menge cyanogener Vorstufen, unabhängig von äußeren Einflüssen. Abiotische Faktoren spielen jedoch eine wesentliche Rolle für die quantitative Ausprägung cyanogener Eigenschaften (Pederson et al., 1996; Stockmal & Oleszek, 1997).

Für Aussagen zu Effekten abiotischer Faktoren auf die Cyanogenese ist es erforderlich, zwischen der Frequenz cyanogener Eigenschaften in Populationen und den Reaktionen individueller Pflanzen auf experimentell veränderte äußere Bedingungen zu differenzieren. In

dem folgenden Abschnitt wird daher — falls entsprechende Daten vorliegen — zwischen Effekten auf Populationsebene und individueller Ebene unterschieden.

I. 5. 6. 1 Temperatur

Die Temperatur ist einer der zentralen, die Lebensvorgänge aller Organismen bestimmenden Faktoren.

In seinen klassischen Arbeiten zu Verbreitungsmustern cyanogener Eigenschaften von *T. repens* korrelierte Daday (1954a, 1954b, 1958) die relative Frequenz cyanogener und acyanogener Individuen in natürlichen Populationen mit der mittleren Januartemperatur. Eine Abnahme der Temperatur von 0,55°C in Folge von Höhenlage der Standorte ging mit einer Reduktion von 4,33 % bzw. 3,16 % in der Häufigkeit der Ac und Li Allele einher. Weitere Versuche von Pederson et al. (1996) unterstützen die Annahme, dass tatsächlich die Wintertemperatur den entscheidenden Faktor darstellte und nicht etwa die Höhe über dem Meeresspiegel an sich.

Der relativen Frequenz cyanogener Eigenschaften in Populationen von *T. repens* liegen offenbar selektionierende Drücke zugrunde, die den einen oder anderen Genotyp unter den jeweils herrschenden Bedingungen favorisieren. Der Faktor „Temperatur“ scheint einen solchen Druck auszuüben (Hughes, 1991; Pederson et al., 1996; Caradus & Forde,

1996). Kakes (1989) allerdings konnte dies in vergleichenden Studien an mehreren Weißklee-Populationen in den Niederlanden nicht bestätigen.

Collinge und Hughes (1982) untersuchten Reaktionen individueller Pflanzen und fanden, dass bei *T. repens* die Konzentration cyanogener Vorstufen am höchsten war, wenn die Pflanzen über mehrere Wochen bei 16-22°C gehalten wurden. Temperaturen über 27°C bzw. unter 8°C hatten eine geringere Konzentration cyanogener Vorstufen in Blättern zur Folge. Darüber hinaus fanden Stockmal und Oleszek (1997) Kurzzeiteffekte der Temperatur auf den Gehalt cyanogener Glykoside. Die Konzentration cyanogener Vorstufen in den Pflanzen wurde maßgeblich durch die Temperatur während der letzten vier Tage vor der Probennahme bestimmt.

I. 5. 6. 2 Nährelementverfügbarkeit

Cyanogene Glykoside enthalten Stickstoff. Somit ist die Synthese dieser Verbindungen unter Kostengesichtspunkten für die Pflanze teuer. Analysen verschiedener Pflanzen [*Sorghum alnum*, *Hordeum vulgare* (Poaceae), *M. esculenta* und *T. repens*] ergaben, dass unter diesen die hoch cyanogenen Arten (*S. alnum* und *M. esculenta*) umso mehr Stickstoff in die Synthese cyanogener Glykoside leiteten,

je höher die Stickstoffversorgung des Substrates war. *H. vulgare* als schwach cyanogene Art hingegen, investierte auch bei hoher Stickstoffverfügbarkeit kaum in cyanogene Glykoside (Forslund & Jonsson, 1997). Allerdings wurde auch von diesen Pflanzen unter Stickstoffmangelbedingungen stets eine gewisse Minimalkonzentration cyanogener Glykoside synthetisiert. Weitere Freilandbeobachtungen, u. a. an *Heteromeles arbutifolia* (Rosaceae) und *L. corniculatus* stützen ebenfalls die Theorie, dass eine hohe Stickstoffverfügbarkeit zu erhöhten Konzentrationen cyanogener Vorstufen führt (Dement & Mooney, 1974; Louveaux et al., 1996). In diesen Studien wurde jedoch nicht konsequent zwischen der Frequenz stark cyanogener Formen in polymorphen Populationen und der Reaktion einzelner Pflanzen auf veränderte Stickstoffangebote differenziert.

Neben Stickstoff sind weitere Elemente für Pflanzen in größerer Menge erforderlich. Zu Effekten anderer Makronährelemente liegen jedoch kaum Daten vor. Patel und Wright (1958) fanden bei *Sorghum* einen Anstieg der Konzentration cyanogener Glykoside unter Phosphatmangelbedingungen. Kriedemann (1964) hingegen wies einen Anstieg des Gesamtgehalts cyanogener Glykoside pro Pflanze um 10 – 15% in mit Phosphat gedüngten Pflanzen (*S. alnum*) nach.

I. 5. 6. 3 Wasserverfügbarkeit

Wassermangel stellt für Pflanzen einen Stressfaktor dar, der ebenfalls Auswirkungen auf die Cyanogenese haben kann. Für Hornklee wurde mit steigender Bodenfeuchtigkeit der Standorte eine zunehmend höhere Frequenz stark cyanogener Individuen in Populationen ermittelt (Abbott, 1977). Genau der entgegengesetzte Trend konnte jedoch bei Weißklee gefunden werden (Foulds, 1982).

Die Analyse der Reaktionen individueller Pflanzen einiger Arten ergab sowohl Anstiege der Konzentration cyanogener Vorstufen bei geringer Bodenfeuchte [Dennstaedtiaceae: *Pteridium aquilinum* (Calatayud et al., 1994; Hopkins, 1995)], als auch eine Akkumulation dieser Verbindungen während feuchter Perioden [z. B. *M. esculenta* und *H. arbutifolia* (Dement & Mooney, 1974; Calatayud et al., 1994)]. Wie sich Wasserstress auf die Veränderung des Gehalts cyanogener Glykoside auswirkt, ist nicht abschließend geklärt (Hösel et al., 1987; Hopkins, 1995).

I. 5. 6. 4 Salinität

In der Nutzpflanzenproduktion stellt weltweit, neben direktem Wassermangel, die zunehmende Versalzung weiter Gebiete durch hohen Düngemittleinsatz oder künstliche Bewässerung einen der

wesentlichen ertragslimitierenden Faktoren dar. Arbeiten zur Auswirkung unterschiedlicher Salinität auf die Ausprägung cyanogener Eigenschaften in Klee-Populationen ergaben eine Reduktion der Frequenz cyanogener Individuen mit steigender Salinität (Keymer & Ellis, 1978; Foulds, 1982).

Experimentelle Arbeiten an individuellen Pflanzen [*L. corniculatus* (Keymer & Ellis, 1978) und *L. australis* (Foulds, 1982)] sowie an osmotisch gestresste Zellkulturen von *Eschscholtzia californica* (Papaveraceae) ergaben hingegen, dass sich eine hohe Salinität positiv auf die Ausprägung der Cyanogenese auswirkte.

Über welche Mechanismen sich Salinitätseffekte hinsichtlich der Erhöhung oder Verminderung cyanogener Merkmale manifestieren, ist ebenfalls nicht geklärt. Einflüsse der Salinität könnten auf direkten Effekten der Natrium- und Chloridionen beruhen oder aber über die Bodenwasserverfügbarkeit indirekt Einfluss auf die Pflanze nehmen (Keymer & Ellis, 1978; Stockmal & Oleszek, 1997).

Die zu verschiedenen abiotischen Faktoren vorliegenden Daten lassen einen Schluss zu:

Es können bislang keine generellen Aussagen zu Effekten abiotischer Faktoren auf die Ausprägung cyanogener Eigenschaften von Pflanzen getroffen werden.

I. 5. 7 Cyanogenese — eine pflanzliche Verteidigung gegen Herbivore?

Cyanogene Glykoside können der Pflanze als Stickstoffspeicher dienen (Selmar, 1993a,b), als Keimungsinhibitoren die Samenkeimung kontrollieren (Esashi et al., 1996) oder allelopathische Wirkung haben (Horsley & Meinwald, 1981).

Was auch immer die primäre Bedeutung cyanogener Eigenschaften für die jeweilige Pflanze ist, eine deutliche Verschiebung der Frequenz cyanogener bzw. acyanogener Genotypen in einer Population hat Selektionsdrücke zur Voraussetzung, welche die eine oder andere Eigenschaft favorisieren.

Bereits Jones (1962, 1966) vermutete einen Zusammenhang der relativen Häufigkeit cyanogener und acyanogener Genotypen innerhalb definierter Weißklee-Populationen und dem Auftreten von Schnecken als wichtigstem Fraßfeind dieser Pflanzen (Horrill & Richards, 1986; Burgess & Ennos, 1987). Der Aktivitätsbeginn dieser Tiere im Frühjahr ist von der Temperatur abhängig. In diesem Fall hätte die Temperatur neben möglichen direkten Effekten auf die Ausprägung cyanogener Eigenschaften [(Hughes, 1991; Pederson et al., 1996), siehe Abschnitt I. 5. 6. 1] einen indirekten, jedoch sehr wesentlichen Effekt: Der unmittelbare Selektionsdruck wäre hier die im Jahresverlauf früher auftretende Fraßaktivität der Schnecken.

Der Cyanogenese käme somit eine Verteidigungsfunktion zu (Jones, 1966).

Es hat sich die Ansicht etabliert, dass es sich bei der pflanzlichen Cyanogenese primär um eine Verteidigung gegen Herbivore handelt (Poulton, 1983; Nahrstedt, 1985b). Mittlerweile liegen neben agrar- auch zahlreiche freilandökologische Untersuchungen zu cyanogenen Pflanzen an ihren natürlichen Standorten vor (z. B. Majak et al., 1980; Schappert & Shore, 1995; Thomsen & Brimer, 1997). Viele dieser Arbeiten ordnen der Cyanogenese eine abschreckende Wirkung gegenüber Weidetieren (Cooper-Driver et al., 1977; Jones, 1988; Caradus & Ford, 1996), Mollusken (Ross & Jones, 1962; Keymer & Ellis, 1978; Nahrstedt, 1985b) und vor allem Insekten zu (Foulds, 1982; Schreiner et al., 1984; Compton & Jones, 1985). Es gibt jedoch ebenfalls zahlreiche Untersuchungen, die keine oder nur geringe Effekte der Cyanogenese auf Herbivore nachweisen konnten (z. B. Scriber, 1978; Brattsten et al., 1983; Schreiner et al., 1984; Ferreira et al., 1997; Mowat & Clawson, 1996). Wie sind diese Widersprüche zu erklären?

Wie von Gleadow und Woodrow (2002) zusammengefasst, ist bei der Analyse von Pflanze-Herbivor Interaktionen grundsätzlich zu berücksichtigen, ob es sich bei dem untersuchten Herbivor um einen Generalisten oder Spezialisten handelt (Feeny, 1976;

Compton & Jones, 1985; Provenza et al., 1992; Birk et al., 1996). Zusätzlich ist von Bedeutung, ob der jeweilige Herbivor cyanogene Nahrung nur als Teil einer gemischten Diät aufnimmt (Provenza et al., 1992) und ob die Art und Weise der Nahrungsaufnahme des Tieres den Mechanismus der Cyanogenese überhaupt auslösen kann (Gleadow & Woodrow, 2002). Eine messbare Blausäurefreisetzung kann z. B. erst dann stattfinden, wenn eine größere Gewebeschädigung gegeben ist, d. h. eine ausreichende Anzahl von Zellen dekompartimentiert wurde. Dies ist der Fall wenn Pflanzenmaterial gekaut wird (Cork, 1996). Insekten mit stechend-saugenden Mundwerkzeugen, z. B. aus den Ordnungen Hemiptera und Homoptera hingegen, verursachen minimale Gewebeerletzung und vermeiden dadurch eine nennenswerte Freisetzung von Blausäure (Schreiner et al., 1984; McMahon et al., 1995).

Trotz dieser zunehmend differenzierten Sichtweise der Cyanogenese in der Herbivor-Pflanze Interaktion liegen viele Aspekte nach wie vor im Dunkeln. Insbesondere quantitative Effekte der verschiedenen funktionellen Ebenen der Cyanogenese — der Konzentration cyanogener Vorstufen (HCNp) und der aus diesen freisetzbaren Blausäure (HCNc) — sowie ihrer Kombination, sind für ein besseres Verständnis dieses Mechanismus von entscheidender Bedeutung.

I. 5. 7. 1 Cyanogenese in der Pflanze-Pathogen Interaktion

Phytophage Insekten zählen zu den bedeutendsten Antagonisten der Pflanzen. Es stellen jedoch auch andere Organismen eine wesentliche Bedrohung für Pflanzen dar. Neben Bakterien sind dies vor allem phytopathogene Pilze.

Blausäure als Inhibitor der mitochondrialen Atmung kann prinzipiell eine toxische Wirkung auf Pilze ausüben. Somit könnte auch die Cyanogenese eine Verteidigungsfunktion gegenüber Pilzen besitzen. Entsprechende Hinweise fanden Nielsen et al. (2006) anhand verschiedener Gerste-Kultivare (*Hordeum vulgare*). Diese Pflanzen waren in der Lage, das cyanogene Glykosid Epiheterodendrin zu synthetisieren, die entsprechende β -Glykosidase zur Freisetzung von Blausäure stand den Pflanzen jedoch nicht in geeigneter Weise zur Verfügung. Über die Partikelbeschuss-Technik wurde cDNA einer β -Glykosidase aus *Sorghum* in Blätter der Gerste eingebracht (Nielsen et al., 1999; Shirasu et al., 1999; Kristensen et al., 2001). In dieser Form behandelte Blätter waren in der Lage, als Reaktion auf Verletzung Blausäure freizusetzen und zeigten eine zuvor nicht vorhandene Resistenz gegenüber Isolaten des Gerste-Mehltaus (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*). Die Infektionsrate transformierter Blätter war negativ mit der Konzentration cyanogener Vorstufen korreliert. Es wurde auf eine

durch Cyanogenese vermittelte Resistenz geschlossen (Nielsen et al., 2006).

Andererseits liegen quantifizierende Arbeiten zu Pathogen-Pflanze Interaktionen vor, die zweifelsfrei eine höhere Suszeptibilität hoch cyanogener Genotypen im Vergleich mit ihren schwächer cyanogenen Artgenossen belegen. In detaillierten Analysen des Wirt-Pathogensystems *Hevea brasiliensis*/*Micorcyclus ulei* — des Kautschukbaumes und eines das Krankheitsbild der „South American Leaf Blight (SALB)“ auslösenden pilzlichen Pathogens, konnte eine Inhibierung der aktiven Verteidigungsantwort der Pflanze nachgewiesen werden (Lieberei et al., 1989, 1996). Die Blausäurefreisetzung während der Cyanogenese hemmte die Phenylalaninammonium Lyase und somit die Synthese von Cinnamat, einem Vorläufer vieler Phytoalexine. Durch Hemmung eines effektiveren Verteidigungsmechanismus als dem der Cyanogenese verkehrte sich die potenzielle Verteidigungsfunktion der Blausäurefreisetzung hier ins Gegenteil.

Die geringe Wirksamkeit der Cyanogenese gegenüber vielen pilzlichen Pathogenen beruht weiterhin auf den sehr effektiven Detoxifikationsmechanismen dieser Organismen. Ein wichtiges Cyanid detoxifizierendes Enzym der Pilze ist die Cyanid-Hydratase. Mit Hilfe dieses Enzyms wird HCN über einen für Pilze spezifischen Weg in Formamid überführt.

Cyanogene Vorstufen bzw. freie Blausäure werden somit letztlich zu einer Stickstoff- und ggf. Kohlenstoffquelle für den pathogenen Pilz (Knowles, 1988; Birk et al., 1996; Osbourn, 1996a). Blausäure kann für Pilze weiterhin einen Induktor der Sporenkeimung darstellen. So konnte für den fakultativ hemibiotrophen Pilz *Colletotrichum gloeosporioides* eine vielfach gesteigerte Sporenkeimungsrate unter künstlicher HCN-Atmosphäre nachgewiesen werden (Pietrowski, 2003). Ähnliche Befunde liegen für *Penicillium olsonii* vor (Ballhorn, unveröffentlichte Daten).

Die Bedeutung der Cyanogenese in der Herbivor-Pflanze Interaktion ist kaum generalisierbar. Gleiches gilt für die Bedeutung dieses Merkmals in der Interaktion von Pathogen und Pflanzen.

I. 6 Ökologische Bedeutung der Cyanogenese — experimenteller Ansatz zur Analyse

Die Komplexität der pflanzlichen Verteidigung macht es in den meisten Fällen nötig, sich in quantitativ-analytischen Fragestellungen zu ihrer Wirkungsweise und Funktion einem einzelnen experimentellen System zu widmen und anhand dieses Systems einen einzelnen Mechanismus oder auch nur einen Teilaspekt dieses Mechanismus detailliert zu untersuchen. Auf diesem

Weg können grundlegende Prinzipien besser verstanden und ggf. auf andere Systeme übertragen werden.

Ein geeignetes Versuchssystem zur Analyse der Bedeutung der Cyanogenese in der Herbivor-Pflanze Interaktion musste einige zentrale Anforderungen erfüllen. Die wichtigste Anforderung an die Versuchspflanze war es, ein unter quantitativen Gesichtspunkten möglichst breites Spektrum cyanogener Eigenschaften abzudecken. Zudem sollte die zu verwendende Pflanze zugleich etablierten Modellcharakter haben und ökonomische Bedeutung besitzen. Die Wahl fiel auf die Limabohne, da bereits erste Screenings hinsichtlich der Konzentration cyanogener Vorstufen eine hohe Variabilität verschiedener Akzessionen erkennen ließen. Eine zudem hoch variable β -Glucosidase Aktivität, mit einer in der Konsequenz sehr unterschiedlichen Freisetzungskinetik von Blausäure, ließ, zusammen mit der relativen Konstanz dieser cyanogenen Eigenschaften innerhalb der jeweiligen Akzessionen, die Limabohne als eine geeignete Versuchspflanze erscheinen.

Die wichtigste Anforderung an die in der Arbeit verwendeten Herbivore war neben leichter experimenteller Handhabbarkeit ein stark unterschiedlicher Spezialisierungsgrad gegenüber der Limabohne. In den Versuchen wurde die Wüstenheuschrecke (Catantopidae: *Schistocerca gregaria*) als extrem polyphager Herbivor mit welt-

wirtschaftlicher Bedeutung eingesetzt. Bereits vorbereitende Versuche zeigten, dass die Larven der Wüstenheuschrecke auch unter stark artifiziellen Bedingungen, wie z. B. in der Luftstromapparatur (siehe Manuskript 1), bereitwillig an der Limabohne fraßen.

Zusätzlich wurde der *Phaseolus*-Arten und insbesondere die Limabohne stark präferierende Mexikanische Bohnenkäfer (Coccinellidae: *Epilachna varivestis*) verwendet. Dieser Käfer kommt an den Wildstandorten der Limabohne in Mittelamerika vor; es handelt sich um ein natürliches Interaktionssystem. Aufgrund seiner großen wirtschaftlichen Bedeutung als Schadinsekt an verschiedenen Bohnenkulturen (Biddle et al., 1992) und seines kurzen Reproduktionszyklus ohne Diapause stellt der Käfer ein gleichermaßen ökonomisch wie experimentell interessantes Insekt dar.

Für Versuche zur Induktion der β -Glucosidase-Aktivität wurde zudem die unter Gewächshausbedingungen häufig vorkommende polyphage Spinnmilbe (Tetranychidae: *Tetranychus urticae*) verwendet.

Es standen somit Herbivore unterschiedlichen Spezialisierungsgrades bzw. unterschiedlicher Art und Weise der Nahrungsaufnahme (beißend-kauend und stechend-saugend) zur Verfügung.

Die Versuchspflanze und die Herbivore werden im Folgenden genauer vorgestellt.

I. 6. 1 Die Limabohne (*Phaseolus lunatus*) — Modell- und Kulturpflanze zugleich

Die Analysen zahlreicher Kultivare und wilder Populationen der Limabohne (Fabaceae: *Phaseolus lunatus* L.) anhand morphologischer, biochemischer und molekularer Marker (AFLP; amplified fragment length polymorphism) lassen im Wesentlichen zwei Genpools der Limabohne vermuten; einen Meso-amerikanischen und einen Anden Genpool (Debouck et al., 1989; Maquet et al., 1990; Fofana et al., 1997, 2001; Caicedo et al., 1999; Lioi & Galasso, 2002). Obwohl beide Genpools nah verwandte wilde und kultivierte Formen beinhalten, werden zwei unabhängige Domestikationsereignisse angenommen (Gutiérrez Salgado et al., 1995). Die Wildformen sind selbstkompatibel, d. h. sie sind in erster Linie selbstbestäubend, zeigen aber einen gewissen Anteil von Auskreuzung (Harding & Tucker, 1969; Zorro Bi et al., 2005). Limabohnen natürlicher Populationen sind annuell oder perennierend und bilden ausgedehnte Samenbänke im Boden. Die Dormanz der Samen wird durch starke Temperaturschwankungen oder ergiebige Regenfälle gebrochen (Degreef et al., 2002).

I. 6.1.1 Die Limabohne als Modellpflanze

In der biochemisch-ökologischen Grundlagenforschung ist die Limabohne innerhalb der letzten 10 Jahre zu einer der wichtigsten Modellpflanzen avanciert. Erkenntnisse zur induzierten, indirekten und über volatile organische Verbindungen (volatile organic compounds; VOCs) vermittelte Abwehr wurden zu wesentlichen Anteilen an der Limabohne gewonnen. Zwar emittieren viele Pflanzen, vielleicht sogar alle, als Antwort auf Verletzung VOCs, die häufig für andere Organismen Informationen tragen¹, jedoch hat sich die Limabohne für die Analyse solcher Interaktionen als besonders geeignet bzw. als besonders leicht zu handhaben erwiesen. Die Limabohne emittiert nach Verletzung über zehn verschiedene VOCs, die über den Lipoxygenase-, Shikimisäure- und den Isoprenoidweg offenbar *de novo* synthetisiert werden (Hopke et al., 1994; Boland et al., 1995; Donath & Boland, 1995; Bouwmeester et al., 1999; Dicke et al., 1999a,b; Ozawa et al., 2000a). Für die emittierten VOCs konnte ein anziehender Effekt auf verschiedene räuberische Arthropoden gezeigt werden (Sabelis & Van De Baan, 1983; Shimoda et al., 2002; Pettitt et al., 1992).

¹Terminologie: **Infochemikalie**: Eine Chemikalie, die in der natürlichen Umgebung die Interaktion zwischen zwei Individuen fördert und eine Antwort des Empfängers evoziert. **Pheromon**: Eine Infochemikalie, welche die Interaktion zwischen zwei Individuen der gleichen Art vermittelt, wobei das aussendende Individuum oder beide profitieren. **Allelochemikalie**: Eine Infochemikalie, die die Interaktion zwischen zwei Individuen vermittelt, die zu verschiedenen Arten gehören. Je nachdem ob der Sender, der Empfänger oder beide profitieren, wird zwischen Allomonen, Kaiomonen und Synomonen unterschieden.

Ein weiterer anhand der Limabohne gut untersuchter indirekter Verteidigungsmechanismus ist die Bereitstellung extrafloralen Nektars (EFN). Dieser wird über spezielle, an der Basis der einzelnen Fiederblättchen des dreiteiligen Fiederblattes paarweise angeordnete Stipulae, abgesondert (Heil, 2004a). Die Sekretionsrate des EFN ist wiederum über emittierte VOCs induzierbar, d. h. eine induzierbare indirekte Verteidigung kann eine weitere indirekte Verteidigung induzieren. Diese Fähigkeiten der Limabohne begründen die große Popularität der Pflanze in der biochemisch-ökologischen Forschung (z. B. Heil; 2004a,b, Kost & Heil, 2005).

I. 6. 1. 2 Die Limabohne als Kulturpflanze — sozio-ökonomischer Hintergrund ihrer Nutzung

Bei der Limabohne handelt es sich nicht nur um einen Modellorganismus mit zunehmender Bedeutung in der ökologischen Grundlagenforschung, sondern auch um eine Pflanze mit ökonomischer Relevanz. Die Limabohne ist eine alte Kulturpflanze. Sie wurde in Peru bereits 6500 v. Chr. in Kultur genommen (Sauer, 1993).

Die Limabohne ist eine der am häufigsten angebauten Arten der Gattung *Phaseolus*. Sie dient als wichtige Proteinquelle der ländlichen Bevölkerung in Südamerika und Afrika (Lioi et al., 1998) und ist zugleich eine wichtige

Wirtschaftspflanze in den USA und Australien. Im Jahr 2002 z. B. wurden in den USA 20.400 ha Limabohnen angebaut und 17.200 t getrockneter Samen exportiert (Lucier & Plummer, 2003). Bei den in großen Monokulturen angebauten Hochleistungssorten handelt es sich um weißsamige Sorten mit einem geringen Gehalt cyanogener Vorstufen in den Samen (Sauer, 1993). Eine dieser Sorten wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit verwendet („Jackson Wonder“ = Akzession 8079).

In Mexiko wird die Limabohne vor allem im Tiefland sowohl auf der pazifischen Seite als auch am Golf von Mexiko kultiviert. Es handelt sich hier um eine weit verbreitete Kulturpflanze traditioneller Agrarsysteme verschiedener ethnischer Gruppen (Ballesteros, 1999). Auf der Halbinsel von Yucatán ist *P. lunatus* Bestandteil des so genannten *milpa* Produktionssystems, eines ancestralen Mesoamerikanischen Trockenland-Agrarsystems in dem die Vegetation in regelmäßigen Abständen abgeschlagen und verbrannt wird. In diesem System werden als wichtige Kulturpflanzen Mais (Poaceae: *Zea mays*), Kürbis (Cucurbitaceae: *Cucurbita moschata*) und Bohnen (*P. lunatus* und *P. vulgaris*) angebaut. Neben diesen wichtigsten Kulturpflanzen werden weitere Arten wie Paprika und Tomate (Solanaceae: *Capsicum* spp.; *Solanum esculentum*), und Süßkartoffel (Convolvulaceae: *Ipomoea batata*) als

Begleitpflanzen genutzt. Nach zwei bis vier Jahren, in Abhängigkeit der Bodenfruchtbarkeit, werden die Kulturflächen für fünf bis 15 Jahre brach liegen gelassen, bevor ein neuer Kulturzyklus beginnt (Hernández-Xolocotzi, 1992; Zizumbo-Villarreal, 1992). Das *milpa* System ist ein zentraler Teil umfassenderer Agrarforstsysteme, die sich seit Jahrhunderten gehalten haben. Das ist zum einen auf die relative ökologische und ökonomische Stabilität dieser Systeme zurückzuführen, zum anderen auf Faktoren wie steinige und flache Böden, welche die Einführung anderer Getreidearten und landwirtschaftlicher Maschinen unrentabel machen. Das traditionelle Bewusstsein der lokalen Bevölkerung tut ein Übriges (Zizumbo-Villarreal, 1992).

I. 6. 2 Wüstenheuschrecke (*Schistocerca gregaria*)

Die Wüstenheuschrecke [Caelifera: (Acrididae) Catantopidae: *Schistocerca gregaria* Forskål] lebt in der Regel vereinzelt (Solitaria-Phase). Unter günstigen Klimabedingungen kann es jedoch zu Massenvermehrungen kommen (Deng et al., 1996). Die Heuschrecken beginnen in Schwärmen zu wandern (Gregaria-Phase). Es können sich Schwärme von 300 - 800 Millionen, in

Einzelfällen bis zu 35 Milliarden Tieren bilden, die täglich ca. 130 km zurücklegen können. Jedes Einzeltier (Länge: 50-75 mm) frisst ca. 2 g Pflanzenmaterial pro Tag, was ungefähr dem Eigengewicht der Tiere entspricht. Als Folge hiervon muss theoretisch von einem Vegetationsverlust von 600-1600 Tonnen bzw. 70.000 Tonnen pro Tag ausgegangen werden.

Die Wüstenheuschrecke nimmt wegen ihrer kaum vorhersehbaren Massenvermehrung, ihrer Fähigkeit zur Schwarmbildung und des grenzüberschreitenden Wanderverhaltens eine Sonderstellung unter den Schadinsekten ein und stellt eine immer wiederkehrende Bedrohung der Nahrungs- und Exportkulturen in Afrika dar. Große Verluste mit entsprechenden Konsequenzen für die Nahrungsmittelversorgung und die Exporteinnahmen können die Folge sein. Von den Bauern können Heuschreckenschwärme, die innerhalb kürzester Zeit in die Kulturen einfallen und große Schäden anrichten, normalerweise nicht selbst kontrolliert werden. In der Regel wird deshalb die Bekämpfung von staatlichen Pflanzenschutzdiensten und von überregionalen Organisationen zur Heuschreckenkontrolle durchgeführt. Diese sind jedoch meist nicht in der Lage, solche kostenintensiven Kampagnen ohne externe Unterstützung durchzuführen und wenden sich daher mit Hilfesuchen an die Landwirtschaftsorganisation der

Vereinten Nationen (FAO) oder direkt an die Geberländer. Trotz internationaler Bemühungen zur Kontrolle stellt die Wüstenheuschrecke nach wie vor eines der gefährlichsten die Nahrungssicherheit bedrohenden Insekten dar.

I. 6. 3 Mexikanischer Bohnenkäfer (*Epilachna varivestis*)

Sowohl die Imagines (Länge: 6-8 mm) als auch die Larven des Mexikanischen Bohnenkäfers (Coleoptera: Coccinellidae: *Epilachna varivestis* Mulsant) fressen an den Blättern mehrerer Fabaceae. Die bevorzugten Wirtspflanzen sind die Buschbohne (*Phaseolus vulgaris*) vor allem aber die Limabohne [*Phaseolus lunatus* (Lapidus et al., 1963; Flanders, 1984; Dover et al., 1987, 1988; Biddle et al., 1992)]. Die Tiere verursachen weiterhin relevante Schäden an Kulturen der Sojabohne [*Glycine max* (Kogan, 1980)]. Das Optimum für Eiablage und Larvenentwicklung liegt zwischen 22°C und 27 °C. Der gesamte Lebenszyklus des Bohnenkäfers dauert 30 - 40 Tage (Graft, 1925).

Es wird angenommen, dass der Mexikanische Bohnenkäfer in den höheren Plateau-Regionen Südmexikos beheimatet ist (Pallister, 1949). Das heutige Hauptverbreitungsgebiet umfasst einen großen Teil der Vereinigten Staaten, überwiegend Regionen östlich der Rocky

Mountains, sowie Mexiko. Südlich reicht das Verbreitungsgebiet bis Costa Rica, nördlich bis Neuengland und Süd-Kanada (Wilkerson et al., 2005).

I. 6. 4 Spinnmilbe (*Tetranychus urticae*)

Die Gemeine Spinnmilbe (Acari: Tetranychidae: *Tetranychus urticae* Koch) hat einen sehr großen Wirtspflanzenkreis von über 200 Pflanzenarten (Gould, 1979). Im Obst- und Weinbau, in der Unterglas-Kultur von Tomaten und Gurken sowie im Zierpflanzenbau stellt die Spinnmilbe (Länge: 0,3-0,5 mm) einen wichtigen Schädling dar (Bostanian & Coulombe, 1986). Bei warmen Temperaturen bringen die Tiere sechs bis neun Generationen pro Jahr hervor. Ein Weibchen legt zwischen 60 bis 120 Eiern. Es kommt schnell zur Ausbildung großer Populationen (Wyatt & White, 1977).

Die Spinnmilben besitzen stechend-saugende Mundwerkzeuge. Die Nahrungsaufnahme findet bevorzugt auf der Unterseite von Blättern statt. Durch das Saugen des Zellsaftes aus den Epidermiszellen tritt Luft in die Zellen ein, die Zellen erscheinen weiß bis silbrig. Das Blatt wirkt anfänglich fein gesprenkelt, mit zunehmendem Befall rücken die punktförmigen Saugstellen aneinander, so dass sich die ganze Blattfläche bis auf schmale Streifen entlang der Blattadern weißlich verfärbt. Das Blatt stirbt ab.

I. 7 Ziel der Arbeit

Die bisher zur ökologischen Bedeutung der Cyanogenese vorliegenden Arbeiten haben, von wenigen Ausnahmen abgesehen (Lieberei, 1988; Miguel & Alberto, 2005), hinsichtlich der quantitativen Unterscheidung funktioneller Ebenen — cyanogenes Potenzial (HCNp) und cyanogene Kapazität (HCNc) — eher fragmentarischen Charakter. Gerade die präzise quantifizierende Analyse dieser verschiedenen cyanogenen Eigenschaften, zusammen mit einer quantifizierenden Erfassung ihrer Effekte auf Herbivore, ist jedoch für die Identifikation einer ökologischen Bedeutung der Cyanogenese essentiell. Ziel der Arbeit war es, ein besseres Verständnis dieser wesentlichen Faktoren der Cyanogenese in der Herbivor-Pflanze Interaktion zu erlangen.

Basierend auf dem von mir benutzten experimentellen System verschiedener Limabohnen Akzessionen mit variablen cyanogenen Eigenschaften in der Interaktion mit Herbivoren verschiedener Spezialisierung bzw. verschiedener Form der Nahrungsaufnahme, wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere, für das ökologische Verständnis der Cyanogenese wichtige Themen- bzw. Fragenkomplexe bearbeitet:

1.: Stellt die Cyanogenese der Limabohne (*Phaseolus lunatus*) gegenüber generalistischen Herbivoren tatsächlich eine

quantifizierbare Verteidigung dar — welche konkreten Effekte haben die funktionellen Ebenen des cyanogenen Potenzials (HCNp) und der cyanogenen Kapazität (HCNc)?

Welcher intraspezifischen und ontogenetischen Variabilität unterliegen die cyanogenen Eigenschaften der Lima-bohne?

2.: HCNp oder HCNc — welches dieser Merkmale ist der Schlüssel zur Ovipositionsentscheidung des an *Phaseolus*-Arten adaptierten Mexikanischen Bohnenkäfers (*Epilachna varivestis*)?

Welche Kurz- und Langzeiteffekte können quantitativ identifiziert werden?

3.: Handelt es sich bei der Cyanogenese der Lima-bohne tatsächlich, wie bisher allgemein angenommen, um eine rein konstitutive Abwehr?

Gibt es möglicherweise doch induzierbare Komponenten?

Die Ergebnisse zu den bearbeiteten Themenkomplexen liegen in Form von drei Veröffentlichungen vor.

II Titel der Manuskripte und Beitrag des Autors

Manuskript 1

Plant cyanogenesis of *Phaseolus lunatus* and its relevance for herbivore-plant interaction: the importance of quantitative data

Daniel J. Ballhorn, Reinhard Lieberei und Jörg U. Ganzhorn

Journal of Chemical Ecology (2005) 31:1445-1473

Dieser Artikel beschäftigt sich mit Effekten der Cyanogenese auf einen generalistischen Herbivor, die Wüstenheuschrecke (*Schistocerca gregaria*). Der Studie liegt eine detaillierte Quantifizierung des cyanogenen Potenzials (HCNp) und der cyanogenen Kapazität (HCNc) der Limabohne (*Phaseolus lunatus*) zugrunde, die sowohl die Variabilität zwischen unterschiedlichen Akzessionen, als auch die ontogenetische Variabilität von Blättern individueller Pflanzen berücksichtigt. In Fraßversuchen wurde das Verhalten der Tiere mit dem cyanogenen Status des jeweils angebotenen Blattmaterials korreliert. Über die Messung während des Fraßvorgangs freigesetzter Blausäure und einer anschließenden Bilanzierung des von den Tieren aufgenommenen und abgegebenen Cyanids konnte zwischen verschiedenen Effekten der Cyanogenese — einem Repellent- und einem Intoxikationseffekt — in Abhängigkeit der

Ausprägung cyanogener Eigenschaften der Pflanzen differenziert werden.

Der Artikel ist das Ergebnis einer interdisziplinären Zusammenarbeit der Abteilung für Angewandte Botanik, repräsentiert durch Herrn Prof. Lieberei und mich, sowie der Abteilung für Ökologie und Umweltschutz (Zoologie) bzw. ihrem Leiter, Herrn Prof. Ganzhorn. Die Planung sämtlicher Versuche und die Durchführung aller Arbeiten im Labor sowie die Auswertung der Daten wurden von mir geleistet. Es bestand ununterbrochen die Möglichkeit zu Gedanken- und Ideenaustausch mit Herrn Prof. Lieberei und Herrn Prof. Ganzhorn. Beide boten Hilfestellung und Anregung beim Verfassen dieses Artikels.

Manuskript 2Oviposition choice of Mexican bean beetle (*Epilachna varivestis*) depends on host plant cyanogenic capacity

Daniel J. Ballhorn und Reinhard Lieberei

Journal of Chemical Ecology (2006) 32:1861-1865

Die richtige Ovipositionsentscheidung des Weibchens ist für viele phytophage Insekten aufgrund der häufig limitierten Mobilität der Larven ein entscheidender Beitrag zum reproduktiven Erfolg, also zur Fitness der Tiere.

Diese Studie analysiert die Bedeutung des cyanogenen Potenzials (HCNp) und der cyanogenen Kapazität (HCNc) der Limabohne (*Phaseolus lunatus*) für das Ovipositionsverhalten des Mexikanischen Bohnenkäfers (*Epilachna varivestis*), eines Herbivors mit eng begrenztem Wirkkreis.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass es die HCNc und nicht das HCNp ist, welche dem Weibchen des Bohnenkäfers als entscheidendes Ovipositionskriterium dient. Ein hohes cyanogenes Potenzial ohne die Fähigkeit zur Freisetzung substanzieller Blausäuremengen als Antwort auf Fraß hat keinen Effekt auf das Auswahlverhalten der Tiere.

Die Konzeption der Versuche, die experimentellen Arbeiten, die Auswertung der Daten und das Verfassen des

Manuskripts wurden von mir durchgeführt. Herr Prof. Lieberei stand als ständiger Ansprechpartner zur Verfügung und leistete wertvolle Diskussionsbeiträge. Andrea Pietrowski war eine große Hilfe bei der Versorgung der Versuchstiere und Christoph Reisdorff gab Hilfestellung zur statistischen Auswertung bzw. zur Nutzung von STATISTICA 6.0.

Manuskript 3Phenotypic plasticity of cyanogenesis in lima bean (*Phaseolus lunatus*) — activity and activation of β -glucosidase

Daniel J. Ballhorn, Martin Heil und Reinhard Lieberei

Journal of Chemical Ecology (2006) 32: 261-275

Die Cyanogenese wird als eine konstitutive Verteidigung gegen Fraßfeinde betrachtet. Wird diese Klassifizierung der Cyanogenese gerecht oder gibt es doch induzierbare Komponenten?

Diese Studie untersucht, ob Verletzungen durch Fraß zweier verschiedener Herbivore — des Mexikanischen Bohnenkäfers (*Epilachna varivestis*) und der Spinnmilbe (*Tetranychus urticae*) — bzw. artifizielle mechanische Verletzung die Cyanogenese der Limabohne (*Phaseolus lunatus*) induzieren können. Versuche mit verschiedenen Limabohnen-Akzessionen, charakterisiert durch unterschiedlich cyanogene Eigenschaften ergaben, dass einige dieser Akzessionen mit einer Erhöhung der β -Glucosidase Aktivität und in der Konsequenz auch mit einer Erhöhung der Blausäurefreisetzung pro Zeit, der cyanogenen Kapazität (HCNc), auf Spinnmilben- und Bohnenkäferfraß

reagierten. Bei Vergleich verschiedener Limabohnen-Akzessionen waren die Muster der Induktion als Antwort auf Schädigung sowohl qualitativ als auch quantitativ von der Art des fressenden Herbivors abhängig.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit muss die Cyanogenese als induzierbar angesehen werden bzw. es handelt sich bei diesem Merkmal nicht ausschließlich um eine rein konstitutive Verteidigung.

Versuchsdesign, Ausführung der Experimente und Analyse der Daten waren mein Anteil an dieser Veröffentlichung. Herr Prof. Heil half das von mir verfasste Manuskript zu optimieren und stand für Diskussionen, ebenso wie Herr Prof. Lieberei, ständig zur Verfügung.

Manuskript 4

An Manuskript 2 schließt sich diese bislang nicht veröffentlichte Arbeit mit folgendem Titel an:

Quantitative effects of cyanogenesis on an adapted herbivore

Daniel J. Ballhorn, Martin Heil, Andrea Pietrowski und Reinhard Lieberei

Journal of Functional Ecology, eingereicht zur Veröffentlichung

An einigen Stellen der Diskussion wird, um Gedankengänge zur Bedeutung der Cyanogenese zu verdeutlichen, auf Ergebnisse dieser Arbeit Bezug genommen. Deswegen werden hier der experimentelle Ansatz der Arbeit und die wichtigsten Ergebnisse kurz vorgestellt:

Inhalt dieses Manuskripts ist eine Langzeitstudie zur Entwicklung des Mexikanischen Bohnenkäfers (*Epilachna varivestis*) auf seiner favorisierten Wirtspflanze, der Limabohne (*Phaseolus lunatus*).

In dieser Studie wurden über einen Zeitraum von vier aufeinanderfolgenden Generationen Entwicklung und Reproduktion des Käfers in Abhängigkeit der Konzentration cyanogener Vorstufen in der Nahrung quantifiziert.

In No-Choice-Versuchen (den Tieren wurde jeweils nur Blattmaterial einer Limabohnen-Akzession als Nahrung angeboten) konnte zunächst bestätigt werden, dass schwach cyanogene Akzessionen der Limabohne für den Käfer sehr gute

Wirtspflanzen darstellten. Das Vorhandensein cyanogener Vorstufen *per se* war kein grundsätzlich die Qualität der Futterpflanze limitierendes Merkmal.

Hohe Konzentrationen cyanogener Vorstufen in den Blättern anderer Limabohnen-Akzessionen hatten jedoch — unabhängig von deren cyanogener Kapazität — negative Effekte, sowohl auf die individuelle Entwicklung, als auch auf die Reproduktion der Tiere. Die individuelle Entwicklung der Tiere war auf Pflanzen mit hohem HCNp verlangsamt und die Tiere erreichten ein geringeres Körpergewicht als auf Pflanzen mit einem niedrigeren HCNp.

Die Gelegegröße und Schlupfrate der Larven nahm auf hoch cyanogenen Limabohnen von Generation zu Generation ab, auf Bohnen mit geringem HCNp lagen keine generationsabhängigen Unterschiede vor.

Diese Studie stellt die Hypothese in Frage, dass adaptierte Herbivore durch die von ihrer Wirtspflanze produzierten Pflanzenstoffe nicht oder wenig negativ beeinflusst werden („specialist-herbivore-paradigm“).

Mein Anteil an dieser Arbeit war die Konzeption der Versuche, ihre praktische Ausführung und die Analyse der Daten. Andrea Pietrowski (Bayreuth) half beim Wiegen der Tiere. Ohne ihre Hilfe wäre die detaillierte Quantifikation der Entwicklung und Reproduktion der Käfer nicht möglich gewesen. Herr Prof. Heil (Essen) half ebenso wie Herr Prof. Lieberei bei der Erstellung des Manuskripts.

III Manuskript 1

PLANT CYANOGENESIS OF *Phaseolus lunatus* AND ITS
RELEVANCE FOR HERBIVORE-PLANT INTERACTION:
THE IMPORTANCE OF QUANTITATIVE DATA

DANIEL J. BALLHORN^{1,*}, REINHARD LIEBEREI¹
and JÖRG U. GANZHORN²

¹Biocenter Klein Flottbek and Botanical Garden, University of Hamburg,
Ohnhorststr. 18, 22609 Hamburg, Germany

²Biocenter Grindel and Zoological Museum, Department of Ecology & Conservation,
University of Hamburg, Martin-Luther King Platz 3, 20146 Hamburg, Germany

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: dballhorn@iangbot.uni-hamburg.de

Abstract—Quantitative experimental results on the antiherbivorous effect of cyanogenesis are rare. In our analyses, we distinguished between the total amount of cyanide-containing compounds stored in a given tissue [cyanogenic potential (HCNp)] and the capacity for release of HCN per unit time (HCNc) from these cyanogenic precursors as a reaction to herbivory. We analyzed the impact of these cyanogenic features on herbivorous insects using different accessions of lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) with different cyanogenic characteristics in their leaves and fourth instars of the generalist herbivore *Schistocerca gregaria* Forskål (Orthoptera, Acrididae). Young leaves exhibit a higher HCNp and HCNc than mature leaves. This ontogenetic variability of cyanogenesis was valid for all accessions studied. In no-choice bioassays, feeding of *S. gregaria* was reduced on high cyanogenic lima beans compared with low cyanogenic beans. A HCNp of about 15 μmol cyanide/g leaf (fresh weight) with a corresponding HCNc of about 1 μmol HCN released from leaf material within the first 10 min after complete tissue disintegration appears to be a threshold at which the first repellent effects on *S. gregaria* were observed. The repellent effect of cyanogenesis increased above these thresholds of HCNp and HCNc. No repellent action of cyanogenesis was observed on plants with lower HCNp and HCNc. These low cyanogenic accessions of *P. lunatus* were consumed extensively—with dramatic consequences for the herbivore. After consumption, locusts showed severe symptoms of intoxication. Choice assays confirmed the feeding preference of locusts for low over high cyanogenic leaf material of *P. lunatus*. The bioassays revealed total losses of HCN between 90-99% related to the estimated amount of ingested cyanide-containing compounds by the locusts. This general finding was independent of the cyanogenic status (high or low) of the leaf material.

Key Words—Cyanogenesis, chemical defense, *Phaseolus lunatus*, *Schistocerca gregaria*, herbivory, cyanogenic potential, cyanogenic capacity, plant-herbivore interactions.

INTRODUCTION

Cyanogenesis is widespread in the plant kingdom (Møller & Seigler, 1999). Over 2500 plant species are known to be cyanogenic and have the capacity to release gaseous HCN from endogenous cyanide-containing compounds, generally cyanogenic glycosides (Jones, 1988;

Poulton, 1990; Seigler, 1998; Gleadow & Woodrow, 2002). Cyanogenic glycosides are β -glucosides of α -hydroxynitriles derived from protein and non-protein amino acids (Zagobelny et al., 2004). Hydrogen cyanide is toxic to the plant itself. Thus, cyanogenic plants must be able to synthesize and accumulate this toxin as inactive precursors to prevent

autotoxicity (Vetter, 2000). Cyanogenic glycosides are separated in the intact plant from one or more specific β -glucosidases that are localized in the apoplast. In addition to separation on the cellular level, the cyanogenic component and the enzyme can be located in different tissues (Thayer & Conn, 1981; Frehner & Conn, 1987; Poulton, 1988; Swain et al., 1992). In case of injury, the β -glucosidase is brought into contact with its substrate. By hydrolysis of the cyanogenic glycosides, α -hydroxynitriles are formed that are relatively unstable and dissociate either spontaneously or are enzymatically accelerated by an α -hydroxynitrile lyase into HCN and an aldehyde or a ketone (Conn, 1980; Hösel & Conn, 1982; Poulton, 1990; Poulton & Li, 1994; Swain et al., 1992).

Hydrogen cyanide is toxic because of its affinity to the terminal cytochrome oxidase in the mitochondrial respiratory pathway and a number of other reactions (Solomonson, 1981; Brattsten et al., 1983). Despite the obvious toxicity of the products of plant cyanogenesis, its role in the scope of plant-herbivore interaction is very complex (Lieberei, 1988, 1989). A range of aspects determines its effectiveness as a mechanism of plant defense. The potential of cyanogenic glycosides as feeding deterrents depends on their concentration in the host plant. The concentration is often highly variable in natural populations. In addition, its

phenotypic appearance depends on environmental conditions, the organ and tissue, and its ontogenetic status (Hughes, 1991; Bokanga, 1994; Schappert & Shore, 1999a,b; Gleadow & Woodrow, 2000b). If the concentration of cyanogenic precursors is below threshold toxicity, herbivores might not be affected (Feeny, 1976; Gleadow & Woodrow, 2000a). Herbivores can also avoid threshold toxicity by feeding on cyanogenic plants only as part of a mixed diet (Provenza et al., 1992). Furthermore, different herbivores are influenced in different ways by the presence of cyanogenic precursors because of their mode of feeding. Insect herbivores with sucking mouth parts such as phloem feeders (e.g. aphids) cause minimal tissue disruption during the feeding process and, therefore, avoid the release of toxic HCN or even reach tissues with low concentration of cyanogenic precursors depending on the length of their stylet (McMahon et al., 1995). A further important aspect is the degree of adaptation of the particular herbivore to its cyanogenic host. Specialist herbivores have evolved mechanisms to face cyanogenic glycosides (Provenza et al., 1992). Some use the cyanide as source of nitrogen or for their own defense against predators (Schappert & Shore, 1999b; Engler et al., 2000). For such herbivores, cyanogenic glycosides sometimes act as phagostimulants instead of feeding inhibitors (Calatayud & Le Rü, 1996;

Mowat & Clawson, 1996). Thus, cyanogenesis may act as plant defense against generalist herbivores, but the effectiveness depends on many factors on both sides of plant-animal interaction (reviewed by Gleadow & Woodrow, 2002).

Numerous authors have reported observations for defense functions of plant cyanogenesis against herbivores (e.g., Nahrstedt, 1985, 1988; Hruska, 1988; Jones, 1962, 1988, 1998; Crush & Caradus, 1995; Caradus & Forde, 1996; Schappert & Shore, 1999b,c; Tattersall et al., 2001). However, clear experimental results considering quantitative aspects of the action of HCN as causal factor of plant defense are rare (Feeny, 1976; Patton et al., 1997; Gleadow & Woodrow, 2000a,b). Analyses are complicated by the fact that the concentrations of cyanogenic precursors vary within a single plant and in relation to the ontogenetic status of the organs. For example, the concentration of cyanogenic precursors in leaves of different age differed by up to 90%. Furthermore, quantitative and kinetic analysis of the capacity for release of hydrogen cyanide as reaction to tissue disruption — the basic measure of plant cyanogenesis — is often neglected. Qualitative statements concerning the release of HCN such as “yes” or “no” or semiquantitative test paper methods are insufficient to describe the complexity of cyanogenesis in interaction with a herbivore.

In view of these gaps, the goal of our study was to investigate quantitatively whether or not and how plant cyanogenesis interacts with the feeding behavior and feeding damage invoked by a generalist herbivorous insect. Furthermore, it has to be considered that deterrent properties of cyanogenic plants could depend on the total amount of bitter-tasting, cyanide-containing compounds stored in a given tissue [cyanogenic potential (HCNp)] or the amount of toxic hydrogen cyanide which can be released per unit time [cyanogenic capacity (HCNc)] or both.

For this, we designed a series of no-choice feeding experiments and additional binary-choice bioassays using lima beans (*Phaseolus lunatus*) as cyanogenic plants and the fourth instars of the African locust *Schistocerca gregaria* as generalist herbivores. Using this model system, we measured the HCNp of every leaf used in the bioassays and, in addition, the release of plant hydrogen cyanide per unit time during the course of feeding as response to damage of the leaf material. In this way, we obtained precise quantitative information on the action of plant hydrogen cyanide.

METHODS AND MATERIALS

Plants. *P. lunatus* seems to be an obligate cyanogenic plant. Extensive screenings of wild and weedy forms and

cultivated genotypes revealed no acyanogenic forms (Baudoin et al., 1991). We tested seven defined *P. lunatus* accessions for resistance: L 2357 [origin: Spain; seed color: white/brown/violet, speckled; 100 grain weight (gw): 149.99 g], L 2233, wild type (origin: Cuba; seed color: gray/brown/black; 100 gw: 8.91 g), L 1315 (origin: Peru; seed color: white; 100 gw: 267.73 g), L 1259 (origin: unknown; seed color: brown/red/black, speckled; 100 gw: 82.39 g), L 2441 (origin: Bulgaria; seed color: white; 100 gw: 134.21 g), L 8079 (origin: unknown; seed color: white; 100 gw: 42.65 g), and L 8071 (origin: unknown; seed color: auburn; 100 gw: 45.23 g). In the following, only the numbers are used for specification of the accessions (2357, 2233, 1315, 1259, 2441, 8079, and 8071).

Seed material was provided by the „Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)“ in Gatersleben, Germany.

In addition to these plants, the almost noncyanogenic *Phaseolus vulgaris* L. cultivar “Saxa” was used as control. This cultivar with the stock number 40.176 was purchased from Carl Sperling & Co., Lüneburg, Germany.

Growing and Treatment of Plants. To work with homogenous, biochemically well-defined plant material, single plants of the respective accessions were cultivated and vegetatively propagated as clones. The clones were cut as one node cutting from the mother plant, rooted in water,

and, after a 2 wk rooting phase, transferred into standard substrate (TKS[®]-1-Instant, Floragard[®]), which was mixed with one third sand of a grain size of 0.3–0.7 mm and one third sand with a grain size of 1–2 mm. Plant containers with a diameter of 18 cm were used.

Between July and August, clonal collections of at least 30 plants were prepared per accession. Plant material was cultivated under greenhouse conditions at a light regime of 16:8-hr light/dark by a photon flux density of 400 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ at the plant container and 900 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ on the top of the plants, respectively. Accessional light was provided by 400-W high-pressure sodium lamps with plant-grow broad-spectrum fluorescent bulbs (Son-Targo 400, Philips[®]). Temperature in the chamber was 30/20°C in a 16:8-hr light/dark period and ambient relative air humidity (range, 60–70%). Climatic conditions and irrigation of the plants were computer-based and controlled by INTEGRO[®] software. Plants were fertilised with a nitrogen-phosphate fertiliser (Blaukorn[®]-Nitrophoska[®]-Perfekt, Compo GmbH) twice a week.

Leaf material was classified by morphological parameters of development into the three classes “young,” “intermediate,” and “mature.” In addition, the insertion position of the leaves at the stem was documented. Leaves at the apex or a side stem that were unfolded for at least 3 days were classified as “young.” These leaves did not exceed one third to

one half of the final leaf size. Leaves that were located one to two leaf insertion positions below the category of “young” leaves were defined as “medium” leaves. Leaves assigned to this category were not completely expanded and still showed thin and delicate leaf tissue. “Mature” leaves were located at the stem at least two insertion positions below the leaves that were classified as “medium.” These leaves were characterized by a dark green color and a hardened midrib, and were always completely expanded.

The occurrence of pests and diseases was controlled, and the harvest of leaf material of a particular plant was followed by at least 4 wk until the next harvest of leaves to minimize possible effects of various induced defense mechanisms known from the Fabaceae (Fischer et al., 1990; Liu et al., 1992; Underwood, 1999; Underwood et al., 2000; Heil, 2004).

Insects. *S. gregaria* is a polyphagous insect and an economic pest throughout many regions of Africa (Mainguet et al., 2000). Locusts were provided by the Biocenter Grindel and Zoological Museum (University of Hamburg) and were held under the same conditions as the plants. They were offered a diet consisting of leaf material of different Poaceae (*Poa annua* and *Agropyron repens*) together with fruits (apple and banana). The fourth instars were used as herbivores.

Cyanogenic Features of Plants.

Plant cyanogenesis requires at least two basic physiological properties: the ability to synthesize and accumulate cyanide-containing compounds [the cyanogenic potential (HCNp)] and the capacity to release hydrogen cyanide from these endogenous compounds [the cyanogenic capacity (HCNc)]. Therefore, release of HCN is described by two cyanogenic features. The HCNp is defined as the total amount of HCN that can be released from a specific tissue (Lloyd & Gray, 1970). HCNc describes the release of HCN per unit time (Lieberei, 1988).

Analysis of Cyanogenic Potential.

HCNp was measured by extraction of the cyanogenic precursors from leaf material. To avoid a premature release of HCN by degradation, the complete procedure from harvest of the leaves to extraction of the cyanogenic precursors was conducted with cooled solutions and devices (4°C). In addition, all steps of processing were conducted on ice. Any injury of leaf material during harvest and transport was avoided, and the harvested leaves were immediately put into water-filled Eppendorf® tubes to minimize effects of wilting. Only the laminae of the leaves were used for analysis. Leaf material was ground with a mortar and pestle for extraction by adding 0.067 mol/l disodium hydrogen phosphate (2 ml/g fresh leaf material). The homogenized sample was filtered and centrifuged for 20 min at

13,000 x g and 4°C. The supernatant was used for further analysis.

For enzymatic degradation of the cyanogenic precursors, exogenous β -glucosidase was added to the respective sample to cleave the precursor glycosides and to detect all HCN that can be released. Different cyanogenic substrates require different β -glucosidases. Therefore, the cyanogenic substrate must be matched with appropriate and possibly specific β -glucosidases. The rubber tree *Hevea brasiliensis* (Willd.) Muell. Arg. (1865) contains the cyanogenic glycosides linamarin and lotaustralin, as does *P. lunatus* (Lieberei et al., 1986). Thus, the β -glucosidase of *H. brasiliensis* was assumed to show specific activity for hydrolysis of the cyanogenic precursors found in the lima bean. Fresh leaf material of *H. brasiliensis* was frozen in liquid nitrogen, ground with mortar and pestle by adding cooled phosphate buffer (4°C), and adjusted to pH 6.8 [1 g leaf fw/4ml buffer (fw = fresh weight)]. The homogenized sample was filtered and centrifuged for 20 min at 13,000 x g and 4°C. The supernatant was filtered through membrane caps with a pore size <10,000 kD (Schleicher & Schuell Bioscience GmbH, Dassel, Germany) and frozen at -20°C for further analysis. Generally, β -glucosidase activity was determined by using *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (Merck) as artificial chromogenic substrate. The amount of β -glucosidase

added per sample corresponded to 20 nkat. Thunberg vessels were used as reaction flasks for the determination of the HCNp. These were stoppered by a glass stopper with a side bulb of about 1-ml volume. Thus, the Thunberg vessel contained a closed head space, and the released HCN could not leak from the preparation. The mixture for incubation consisted of 0.05 ml supernatant of the centrifuged sample, 0.45 ml 0.067 mol/l aqueous sodium dihydrogen phosphate solution, 0.10 ml β -glucosidase solution in McIlvaine buffer, pH 5.6 (20 nkat), and 0.60 ml 0.2 mol/l NaOH in the side bulb of the stopper. This mixture was incubated in a water bath for 20 min at a temperature of 30°C. The enzymatic reaction was stopped by the NaOH solution, which was added from the side bulb of the stopper to the incubation mixture. Sodium salt of HCN was formed, and the concentration of cyanide was measured spectrophotometrically by use of the Spectroquant[®] cyanide test (Merck). This test is based on the formation of cyanogen chloride. This compound reacts with pyridine forming glutacone dialdehyde, which condenses with 1,3-dimethyl barbituric acid to a violet polymethine dye with a maximum absorbance at a wavelength of 585 nm. One mol polymethine dye corresponds to 1 mol cyanide.

The standard preparation for spectrophotometric measurement of cyanide consisted of one aliquot (0.1 ml

sample) that was taken from the stopped incubation mixture. The sample was neutralized by adding an aliquot of 0.1 mol/l HCl (0.1 ml) and made up to 5 ml with 4.8 ml aqua dest. HCl was added for the neutralization of the alkaline sample because pH 7 had to be adjusted to guarantee optimal reaction of Spectroquant® reagents by Merck. The concentration of the chromogenic product was measured spectrophotometrically after 5 min of incubation.

Analysis of Cyanogenic Capacity.

We tested the clonal plant material of different accessions for the total quantities of HCN release and the pattern of HCN release, respectively. In these experiments, we also differentiated for the ontogenetic leaf developmental stages “young,” “medium,” and “mature” of each accession. For this analysis, single trifoliolate leaves were treated with 400 µl chloroform. Chloroform disintegrates cell membranes and leads to a breakdown of cellular compartmentation. HCN is released by this chemical tissue rupture from cyanogenic precursors if any active endogenous β-glucosidases with affinity for the cyanogenic precursors are present. Pattern of hydrogen cyanide, which was released to the atmosphere after addition of chloroform, was followed over a time period of 1 hr. The leaf was treated with chloroform a second time later to test for further release of hydrogen cyanide.

HCN Detection System. Both the release of HCN from cyanogenic leaf

material as reaction to chloroform treatment and the release from injured leaf tissue in the course of the feeding trials were detected by using the same airflow system (Figure 1). This system was passed by an adjustable air flow provided by a pump with upstream potentiometer for capacity control. The pump was connected with an air humidifier (Figure 1B) consisting of a triple neck flask with a total volume of 2 l filled with 1 l aqua dest. to ensure a sufficient ambient air humidity in the experimental system and to guarantee optimal ambient conditions for locust activity and avoid wilting of the leaf during the bioassays (air humidity was >90%). From the humidifier, air was passed through a 200-ml Erlenmeyer flask (Figure 1C) containing leaf material used for the analysis of the HCNc or for feeding trials with single locust nymphs, respectively. The flask was immersed into a water bath adjusted at 30°C to ensure high activity of the insects in the course of feeding trials, whereas light with an intensity of 200 µmol s⁻¹ m⁻² was provided by a 150-W spot (Philips®). The discharge opening of the flask was connected to a glass capillary inserted into a test tube filled with 0.1 mol/l aqueous NaOH solution (Figure 1D). The capillary released bubbles of a defined volume of 0.83 ml at an immersion depth of 10 cm. The air flow in the equipment was adjusted precisely to 70 bubbles per minute (≈ 3.5 l/hr). Inflowing air was kept at this relatively low speed because higher

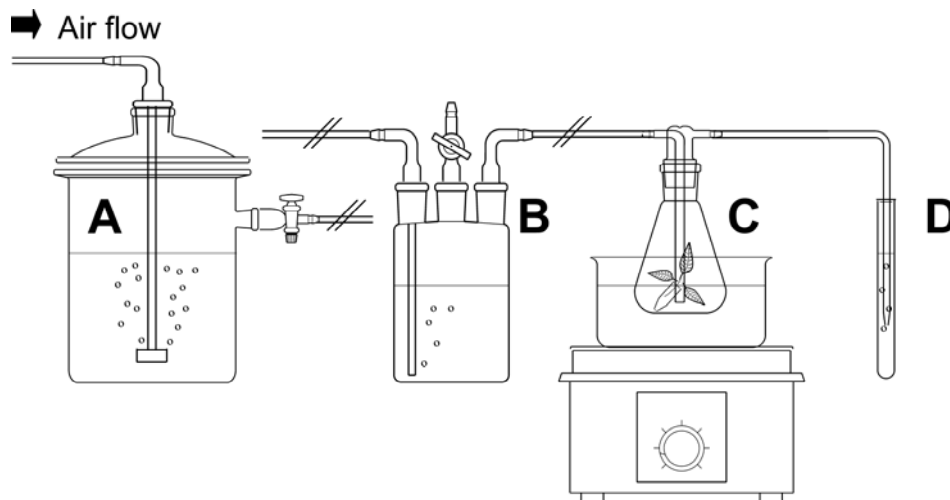


FIG. 1. Equipment for detection of gaseous HCN. The airflow in the vessel system was provided by a diaphragm pump with adjustable capacity. The air passes an air humidifier filled with aqua dest. (B) or a HCN generator (A) depending on the experiment. The HCN generator was filled with KCN solution (0.025 – 2.0 mmol/l) to provide a continuous HCN atmosphere within the airflow system for observation of behavior patterns depending on concentration of gaseous hydrogen cyanide. For detection of the cyanogenic capacity (HCNc), single trifoliolate leaves were put into an Erlenmeyer flask (C) and treated with chloroform. In the course of bioassays, single locust nymphs were put into the flask (C) together with a trifoliolate leaf. The flask was immersed into a water bath with a temperature of 30°C. Gaseous HCN—provided by the HCN generator, released from leaves as reaction to chemical cell disintegration or released from leaves as a result of tissue damage due to insect feeding—was detected quantitatively at the output of the equipment (D).

speed had a negative impact on locusts. The test tube containing the NaOH solution served as collector of the released HCN and was exchanged at intervals of 10 min. The pattern of the HCN release from leaf material per unit time was revealed by quantitative measurement of cyanide in the detection solutions by use of the Spectroquant® cyanide test (Merck). A pH of 7 was adjusted by adding 0.1 mol/l HCl to satisfy conditions required for this reagent kit. For analysis of the HCNc by chloroform treatment of particular leaves, the same speed of airflow was chosen, and the air humidifier was kept connected to the vessel system to achieve a similar

experimental situation as in the feeding trials.

Bioassays. For no-choice feeding trials, single locust nymphs were placed in the 200-ml Erlenmeyer flask for HCN detection (Figure 1C) containing a trifoliolate leaf of a defined accession and developmental stage. *P. lunatus* leaf material was characterized by specific cyanogenic features and was offered to the animals for 1 hr in no-choice feeding trials. In addition to the lima beans, *P. vulgaris* var. *Saxa* with extremely low cyanogenic concentrations was used as control. Only locust nymphs of similar size and body weight were chosen for the

experiments (mean \pm SD, 0.987 ± 0.054 g; $N = 245$). Locust nymphs that molted about 48 hr previously were kept for 24 hr with *ad libitum* access to *Poa annua* leaf material which was part of their normal diet under the conditions mentioned above. They were food deprived for 1 hr prior to the bioassay.

The leaves used in the bioassays were harvested 1 hr after irrigation by the computer-based greenhouse control system. Leaves were put into water-filled Eppendorf[®] tubes with the petiole immediately after harvest and used in this form in the bioassays to guarantee a constant water supply. The amount of consumed leaf material was determined by weighing the particular leaf before and after the bioassay (MC 1 Analytic AC 210 S, Sartorius[®]) during constant water supply. This method for estimation of consumed leaf material was favored over leaf area measurements because even slight pressure during scanning in addition to interrupted water supply may lead to premature release of HCN. During the bioassay, release of HCN as reaction to leaf material consumption by the locusts was consequently detected per unit time, and the duration of feeding on the particular leaf was documented. Detection of released hydrogen cyanide started with the first feeding incidence of the particular locust. Additional binary-choice feeding trials were conducted under the same experimental conditions. In these trials, selected single trifoliate leaves of high and

low cyanogenic accessions were presented pairwise to the locusts, and the amount of leaf consumption was determined, respectively.

Behavior of Insects. A general statement as to whether feeding occurred or not did not seem to be sufficient to characterize the herbivore response. In preliminary studies, behavior of locusts was observed by offering leaves of *P. vulgaris* and *Poa annua* as standard fodder. The animals were observed for 1 hr under the experimental setup for HCN detection. The HCNp of *P. vulgaris* var. Saxa was close to zero, and *Poa annua* did not contain any detectable cyanogenic components. In these preliminary experiments, very low and acyanogenic leaf material was used to ensure that the insects were not affected by cyanogenic precursors or released HCN. These observed characteristics of behavior were interpreted as "normal." The following feeding trials were carried out under the same experimental conditions, but with leaf material of different cyanogenic accessions of *P. lunatus*. Leaf material of *P. vulgaris* var. Saxa was used as control. Apart from feeding time, the following behavioral patterns were considered to reflect responses of the locusts to leaf consumption: general agility of the insects including the change of location after feeding, cleaning of the mouthparts, antennae, and legs, presence of flight reaction, and posture of the antennae and of the legs.

Behavioral patterns were defined as follows: 0, "normal" behavior (similar to behavior after consumption of leaf material of *Poa annua* and *P. vulgaris*); 1, no change of location, legs are angled and pressed onto the abdomen; 2, like 1, but loss of any flight reaction and no cleaning of the mouthparts, antennae, and legs; 3, like 2, but, in addition, the antennae are sloped downwards by 45°.

During and after feeding on leaf material, changes of behavior occurred that were classified as defined above. Normal behavior on leaf material of *P. vulgaris* and *Poa annua* was characterized by high agility of the insects and by complete excitability to visual stimuli or vibrations. The feeding interval of the insects was followed by change of the location on the leaf and cleaning of the antennae, the compound eyes, wings, mouthparts, and legs. After intake of cyanogenic leaf material, the legs were pressed on the abdomen, and the locusts were less agile. This behavior was defined as the first level of negative effects (class 1). At this level, the insect still showed complete excitability with respect to visual stimuli or vibrations. The loss of this ability and the loss of comfort behavior together with the posture described above were interpreted as a more severe level of intoxication (class 2). In some cases, the locusts lowered their antennae downwards by about 45° in addition (class 3). In 1.7% (4 of 230 bioassays), the locust nymph died 1-2 hr after the experiment. These

most severe signs of intoxication were included in class 3.

Exogenous Application of HCN. To test if application of exogenous hydrogen cyanide leads to similar effects with regard to locusts behavior, we added quantified doses of gaseous HCN into the experimental vessel system by replacing the air humidifier (Figure 1B) by a gas generator (Figure 1A). This generator was made of a glass vessel with a total volume of 5 l that was filled with 3 l HCN-containing buffered solutions (phosphate buffer 6.7 mmol/l, adjusted to pH 5.5) and bubbled by a constant stream of air (≈ 3.5 l/hr). By use of defined cyanide solutions in the gas generator from 0.025 to 2 mmol/l, defined concentrations of gaseous HCN were constantly applied to *S. gregaria* individuals that had *ad libitum* access to almost noncyanogenic leaves of *P. vulgaris*. Gaseous HCN was added over a time period of 60 min. The speed of the airflow was controlled by detection of bubbles with defined volume that were released into a 0.1 mol/l aqueous NaOH solution by passing a capillary at the output of the equipment. The constancy of the HCN atmosphere within the equipment could be proved by spectrophotometric measurement of the amount of cyanide that was fixed in the NaOH solution per time unit using the Spectroquant[®] cyanide test (Merck). Experiments were conducted at a room temperature of 25°C, whereas the 200-ml Erlenmeyer flask containing the locust and leaf material was immersed into

a water bath with a temperature of 30°C to ensure optimal conditions for locust activity. Light intensity was 200 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ provided by a 150-W spot (Philips®).

HCN Balance. We calculated a HCN balance to investigate in which way the feeding insect gets in contact with HCN. Contact with released HCN could occur mainly during the feeding process, or large amounts of cyanide in bound form could be ingested and HCN might be released within the gastrointestinal tract of the locust. Five aspects were considered to evaluate the fate of cyanogenic substances during the experiments: (1) amount of cyanide in bound form present in the particular leaf; (2) amount of cyanide consumed by the insect; (3) released HCN from leaf material during the feeding process of the insect; (4) released HCN from the locust bodies after consumption of leaf material; and (5) amount of cyanide in the feces.

The HCNp of every single leaf used in the experiments was estimated. Leaf material that was left behind in the particular bioassay was used for analysis of the HCNp, and from these data, the amount of cyanogenic precursors within the consumed part of the leaf was calculated. The total amount of consumed leaf material was determined by weighing the particular leaf before and after the bioassay during constant water supply (MC 1 Analytic AC 210 S, Sartorius®).

The release of HCN from leaf material during the feeding of *S. gregaria*

was measured per unit time with the equipment for HCN detection. For detection of hydrogen cyanide released from locusts bodies into the atmosphere after leaf consumption, the insect was taken out of the experimental vessel and put in the center of a Conway's microdiffusional apparatus (semimicro type, Shibata Scientific Technology) with the outer ring was filled with 10 ml 0.1 mol/l NaOH. The locust was left in there for 30 min. After that, the cyanide concentration of the surrounding NaOH solution was measured spectrophotometrically. The HCN content of the excrements that were obtained for up to 1 hr after the bioassay was analyzed by the method described for the HCNp determination of leaf material.

Statistics. Statistical analyses were run with Statistica 6.0 (Statistica System Reference, 2001).

RESULTS

Cyanogenic Features of P. lunatus.

The clonal plants of all accessions studied were cyanogenic. All plants synthesized and accumulated cyanide-containing compounds in their leaves and were capable of releasing hydrogen cyanide from these compounds as reaction to chemical or mechanical damage.

Cyanogenic Potential (HCNp). The variation of the HCNp was high and ranged from a HCNp of 0.7 $\mu\text{mol HCN/g}$

TABLE 1. CALCULATED BALANCE OF CYANIDE INGESTED BY NYMPHS OF *S. gregaria*

Accession/ leaf development	Cyanogenic status H=high, L=low	N	HCNp of leaf material ($\mu\text{mol HCN/g leaf fw}$)	Consumed leaf material (mg leaf fw)	Calculated amount of HCN in the consumed leaf material (nmol HCN)	Percentage of detected HCN (%)			
						HCN released to the atmosphere during the feeding process	HCN released from the locust bodies	HCN in the feces	Total loss of HCN
2357 young	H	11	60.5 \pm 7.0	10.6 \pm 7.5	646.8 \pm 478.1	4.4 \pm 3.7	0.4 \pm 0.5	0.0 \pm 0.0	95.1 \pm 4.2
2357 medium	H	11	58.4 \pm 7.7	15.6 \pm 7.5	918.2 \pm 522.7	2.1 \pm 1.3	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	97.6 \pm 1.4
2357 mature	H	11	14.9 \pm 3.2	53.4 \pm 18.3	792.1 \pm 313.7	1.4 \pm 0.7	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	98.2 \pm 0.8
2233 young	H	4	60.0 \pm 3.1	0.5 \pm 0.1	27.0 \pm 7.2	6.5 \pm 4.4	1.9 \pm 2.4	0.0 \pm 0.0	91.6 \pm 2.4
2233 medium	H	3	24.6 \pm 2.7	1.2 \pm 1.1	31.6 \pm 31.9	15.9 \pm 7.1	5.0 \pm 7.6	0.0 \pm 0.0	79.2 \pm 8.4
2233 mature	H	3	6.8 \pm 2.1	0.6 \pm 0.4	4.3 \pm 2.8	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	100 \pm 0.0
1315 young	H	11	51.7 \pm 3.3	10.0 \pm 5.3	514.5 \pm 263.3	5.1 \pm 2.8	0.3 \pm 0.2	0.0 \pm 0.1	94.5 \pm 2.9
1315 medium	H	11	33.5 \pm 4.4	18.3 \pm 11.2	593.0 \pm 321.0	3.1 \pm 1.5	0.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	96.5 \pm 1.5
1315 mature	H	10	18.1 \pm 6.6	42.6 \pm 21.1	677.1 \pm 266.7	1.8 \pm 0.9	0.4 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	97.7 \pm 1.0
1259 young	H	11	30.5 \pm 7.0	18.6 \pm 8.5	544.5 \pm 213.2	2.7 \pm 1.3	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.2	96.9 \pm 1.4
1259 medium	H	11	27.9 \pm 5.1	23.1 \pm 14.2	634.5 \pm 401.8	3.6 \pm 3.6	0.4 \pm 0.4	0.4 \pm 0.5	95.8 \pm 4.1
1259 mature	H	11	18.0 \pm 5.9	32.1 \pm 17.5	588.2 \pm 330.6	2.1 \pm 1.5	0.3 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	97.1 \pm 1.9
2441 young	L	11	18.8 \pm 3.3	36.5 \pm 25.0	635.6 \pm 402.2	3.1 \pm 3.5	0.3 \pm 0.4	2.1 \pm 1.4	94.5 \pm 4.0
2441 medium	L	11	13.1 \pm 3.9	52.3 \pm 35.4	658.3 \pm 434.5	2.6 \pm 2.7	0.7 \pm 1.2	14.3 \pm 34.4	82.4 \pm 38.1
2441 mature	L	11	6.2 \pm 2.1	73.5 \pm 26.1	444.1 \pm 230.4	1.3 \pm 0.7	0.6 \pm 0.3	5.5 \pm 2.1	92.8 \pm 2.4
8079 young	L	8	9.4 \pm 1.0	90.4 \pm 22.6	849.3 \pm 237.1	1.3 \pm 0.3	0.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	98.6 \pm 0.3
8079 medium	L	8	8.6 \pm 0.7	96.4 \pm 20.0	835.8 \pm 214.7	1.3 \pm 0.4	0.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	98.6 \pm 0.4
8079 mature	L	7	8.1 \pm 1.4	90.7 \pm 22.1	726.3 \pm 194.5	0.9 \pm 0.5	0.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	98.9 \pm 0.5
8071 young	L	11	6.5 \pm 0.9	78.5 \pm 18.3	505.4 \pm 127.6	1.1 \pm 0.9	0.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	98.8 \pm 0.7
8071 medium	L	11	5.1 \pm 0.6	52.8 \pm 36.0	276.1 \pm 200.2	1.0 \pm 0.9	0.2 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	98.7 \pm 1.2
8071 mature	L	11	1.2 \pm 0.4	64.4 \pm 25.1	77.2 \pm 37.8	2.4 \pm 1.9	0.5 \pm 0.6	0.0 \pm 0.0	97.1 \pm 2.3
Saxa young	Control	11	0.8 \pm 0.2	84.9 \pm 30.1	68.6 \pm 27.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
Saxa medium	Control	11	0.9 \pm 0.1	79.7 \pm 26.0	71.5 \pm 27.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
Saxa mature	Control	11	0.7 \pm 0.1	87.2 \pm 22.5	63.7 \pm 20.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0

Notes: Cyanide ingestion by locust is calculated from the weight of consumed fresh leaf material and the cyanogenic potential (HCNp) of the particular leaf. The HCNp of every trifoliate leaf that was used in the bioassays was measured ($N = 230$). Data in percentage are related to the calculated amount of ingested cyanide that was considered as 100%.

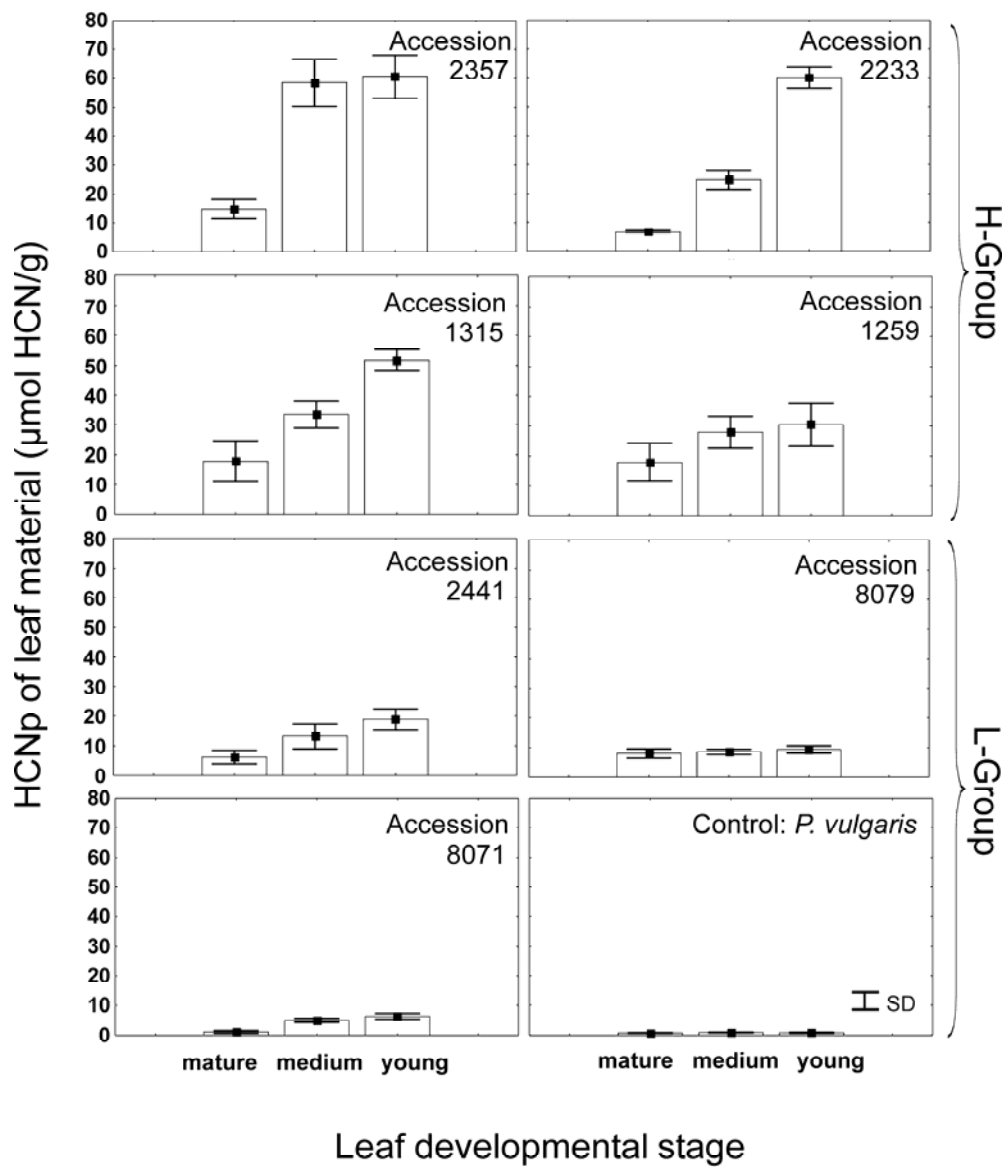


FIG. 2. Cyanogenic potential (HCNp) of *P. lunatus* accessions. Leaves of defined ontogenetic developmental stages of clonal plant material were analyzed. The clearly varying HCNp of the clonal lines allowed to distinguish between a high (H-group) and a low cyanogenic group (L-group) of plants. The control plants (*P. vulgaris* var. Saxa) revealed no substantial HCNp. Values are means \pm SD. For number of observations, see Table 1.

leaf fw in mature leaves of accession 8071 to 82.0 $\mu\text{mol HCN/g}$ leaf fw in young leaves of the accession 2233. In general, the HCNp of young leaves was higher than in leaves of the intermediate or mature developmental stage. This ontogenetic pattern of variation was apparent in all clonal plants of all

accessions studied (Table 1; Figure 2). Leaves of the cultivar "Saxa" (*P. vulgaris*) that served as control were characterized by very low concentrations of HCNp. This genotype was almost noncyanogenic.

Cyanogenic Capacity. The HCNc was estimated by measuring the kinetics of HCN release from leaves as

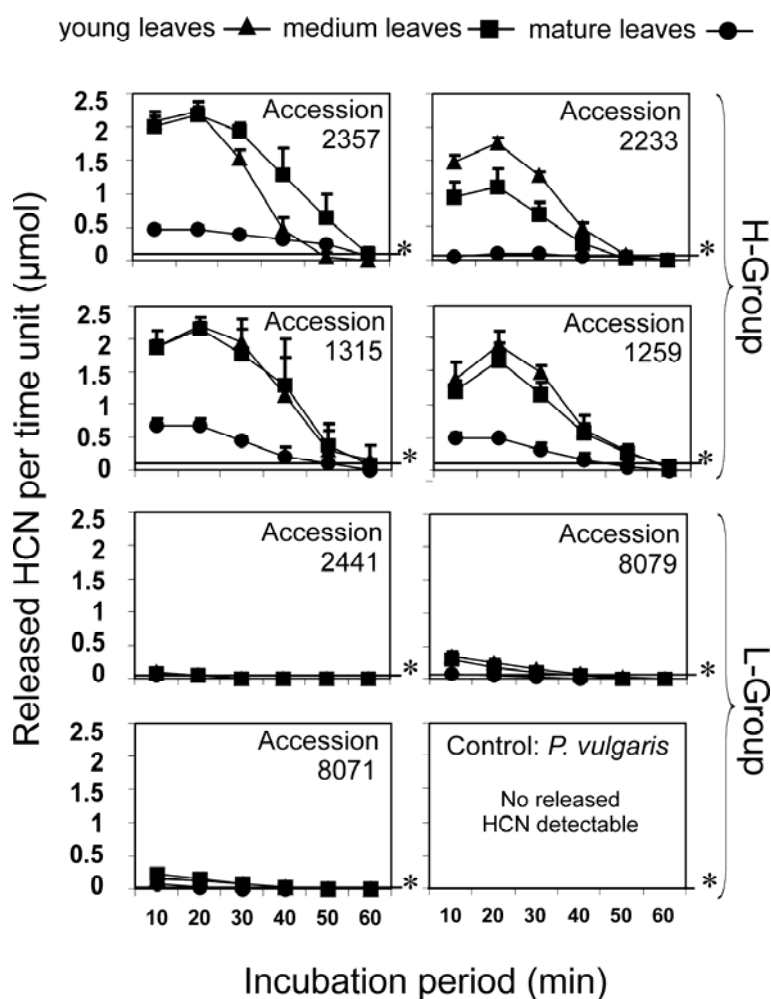


FIG. 3. Cyanogenic capacity (HCNc) of *P. lunatus* accessions. Leaves of defined developmental stages were analyzed for their capacity to release HCN from endogenous cyanide-containing precursors as reaction to chemical tissue disintegration due to chloroform application ($N = 5$ per accession and leaf developmental stage). Values given in the figure are means + SD. The release of HCN was quantitatively estimated per time periods (10 min) between the measurements. The experiments were carried out using the airflow system for detection of gaseous HCN and span a total time period of 1 hr. Application of chloroform to the same leaf a second time later in the experiment revealed no substantial release of hydrogen cyanide. Mean values of released HCN as reaction to this further treatment were below the level marked with an asterisk. The almost noncyanogenic *P. vulgaris* var. Saxa served as control.

reaction to chemically induced tissue disintegration. The pattern and the total amount of HCN released varied considerably between the accessions and the leaf developmental stages used for analysis (Figure 3).

Young and intermediate leaf developmental stages of the high cyanogenic accessions 2357, 2233, 1315, and 1259 revealed a rapid release of HCN and also a fast decrease of measurable hydrogen cyanide within 50 min when treated with chloroform. Mature leaves of these accessions were characterized by a lower and more continuous release of HCN that lasted as long as 60 min. No distinct maximum of hydrogen cyanide release was observed for these leaves. HCN was also released from leaves of all developmental stages of the low cyanogenic accessions of *P. lunatus* (2441, 8079 and 8071), but the release of HCN especially from mature leaves was close to zero. Control plants (*P. vulgaris*) had no capacity to release HCN from leaves. Thus, the pattern of HCN release from leaf material of *P. lunatus* depends on the cyanogenic status of the accessions as well as on the developmental stages of the leaves. No additional HCN loss was observed when chloroform was added to the leaves a second time later in the experiments. In addition, grinding the remaining leaf tissue under application of exogenous β -glucosidase isolated from *H. brasiliensis*

revealed no substantial release of HCN (Figure 3).

Grouping of Plants for Analysis. Considering the results for the HCNp (Figure 2) and the corresponding HCNc (Figure 3), the accessions were assigned into a high (H-group) and a low cyanogenic category (L-group). Plants of the H-group were characterised by a HCNp of 34.4 ± 18.4 $\mu\text{mol HCN/g leaf fw}$ (mean \pm SD; $N = 108$). These plants (accession 2357, 2233, 1315, and 1259) release more than 1 $\mu\text{mol HCN}$ per trifoliate leaf within the first 10 min after treatment with chloroform. The plants of the L-group (accession 2441, 8079, 8071) showed a HCNp of 8.5 ± 5.7 $\mu\text{mol hydrogen cyanide/g leaf fw}$ ($N = 89$). The H- and L-groups differed significantly (ANOVA: $F = 154.97$, $df = 1$, $P < 0.001$). The control *P. vulgaris* var. Saxa was almost noncyanogenic.

No-Choice Bioassays. Different effects of cyanogenesis on the susceptibility of leaf material to *S. gregaria* were observed in the feeding trials in relation to differences of HCNp and HCNc between the accessions of *P. lunatus* and their leaf developmental stages. Below a HCNp of 15 $\mu\text{mol HCN/g leaf fw}$ that corresponds to a release of about 5 nmol HCN/10 min from the beginning of feeding under experimental conditions, there was no deterrent effect of cyanogenic leaf material observed (Figure 4). When feeding on plants of the H-group, locusts

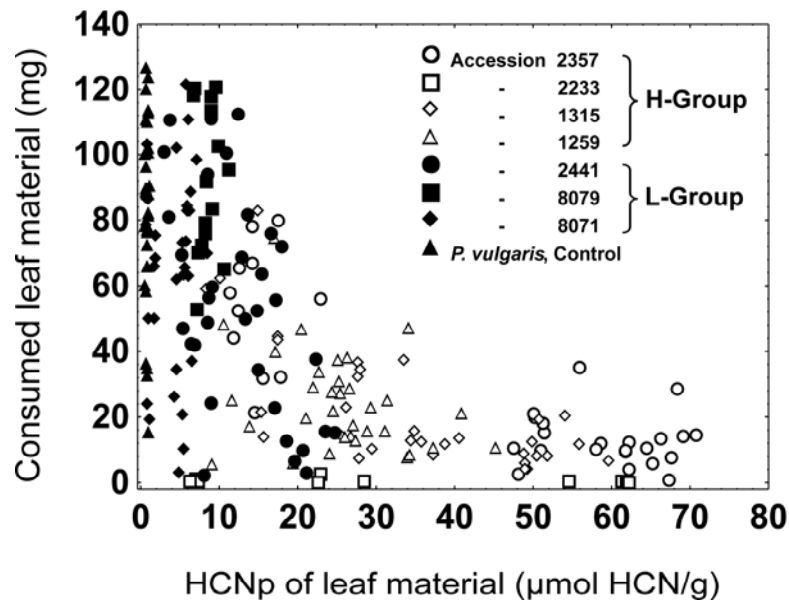


FIG. 4. Cyanogenic potential (HCNp) vs. leaf consumption. Leaves of high (H-group) and low (L-group) cyanogenic accessions of *P. lunatus* were presented to locusts over a time period of 1 hr within the airflow equipment for detection of gaseous HCN. Leaf consumption decreased with increasing HCNp of the presented leaf material. In this figure, there is no discrimination among ontogenetic leaf developmental stages. Results of statistical analyses are given in the text. For number of observations, see Table 1. The almost noncyanogenic *P. vulgaris* var. *Saxa* served as control.

consumed less leaf material than when feeding on the L-group ($F = 197.02$, $df = 1$, $P < 0.001$). The intake of plants assigned to the H-group was 22.3 ± 19.6 mg fresh leaf material ($N = 108$). Within the H-group, substantial leaf consumption occurs exclusively on mature leaves with an HCNp near the threshold range of $15 \mu\text{mol HCN/g}$ leaf fw and a low capacity for HCN release. Leaves of the accession 2233 were barely consumed despite the wide range of HCNp from $5.9 \mu\text{mol HCN/g}$ leaf fw in mature leaves up to more than $81 \mu\text{mol HCN/g}$ leaf fw in leaves of the young developmental stage. It is assumed that feeding deterrence of these plants is partly because of factors not considered in the present study, but also may be a

consequence of their outstanding high capacity for HCN release as reaction to feeding (Table 1). The intake of L-group plants of *P. lunatus* was 65.7 ± 32.9 mg fresh leaf material ($N = 89$). A tendency of reduced feeding was observed on the L-group accession 2441 where young leaves revealed the highest HCNp within this group and reached the threshold level of $15 \mu\text{mol HCN/g}$ leaf fw (Table 1). There was no measurable effect of the HCNp observed within the L-group of *P. lunatus* accessions with regard to leaf consumption. The leaf consumption by locusts on the *P. vulgaris* control plants (83.9 ± 26.6 mg fresh leaf material; $N = 33$) was significantly higher than the leaf intake on plants of the L-group of

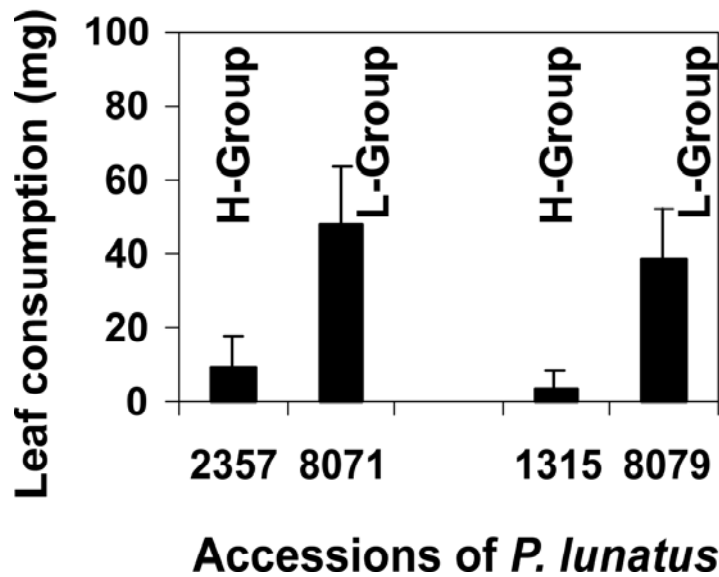


FIG. 5. Binary-choice bioassay. Leaves of H- and L-group plants were offered pairwise to single locust nymphs. Values are means and standard deviations ($N = 9$). Results of statistical analyses are given in the text.

P. lunatus ($F = 7.99$, $df = 1$, $P = 0.006$). The HCNp and the corresponding HCNc affected the feeding behavior of locusts depending on threshold levels.

Binary-Choice Bioassays. Young leaves of the highest and the lowest cyanogenic accession (2357 vs. 8071) and leaves of the second highest and second lowest cyanogenic accession (1315 vs. 8079) were presented pairwise to the locusts (Figure 5). The choice tests between these leaves yielded a significant preference for the lower cyanogenic leaf material ($F = 88.62$, $df = 1$, $P < 0.001$).

Release of HCN as Reaction to Insect Feeding. Similar to the chemical induced release of HCN, the pattern of hydrogen cyanide released from leaf material as reaction to insect feeding

revealed differences depending on the general status of the HCNp, the accession, and the ontogenetic leaf developmental stage (Figure 6). Furthermore, the liberation pattern and amount of released HCN depended on the duration of feeding on selected leaf material. The time of feeding on H-group leaf material was 5 ± 4 min ($N = 108$) over the total observed period of 1 hr. On leaves of L-group plants, the locusts fed 18 ± 9 min ($N = 89$). The duration of feeding on H- and L-group plant material was significantly different (ANOVA: $F = 164.87$, $df = 1$, $P < 0.001$). On high cyanogenic leaf material, further feeding incidences of a few locusts were observed over the time period of 1 hr. These further feeding incidences started 30 – 60 min

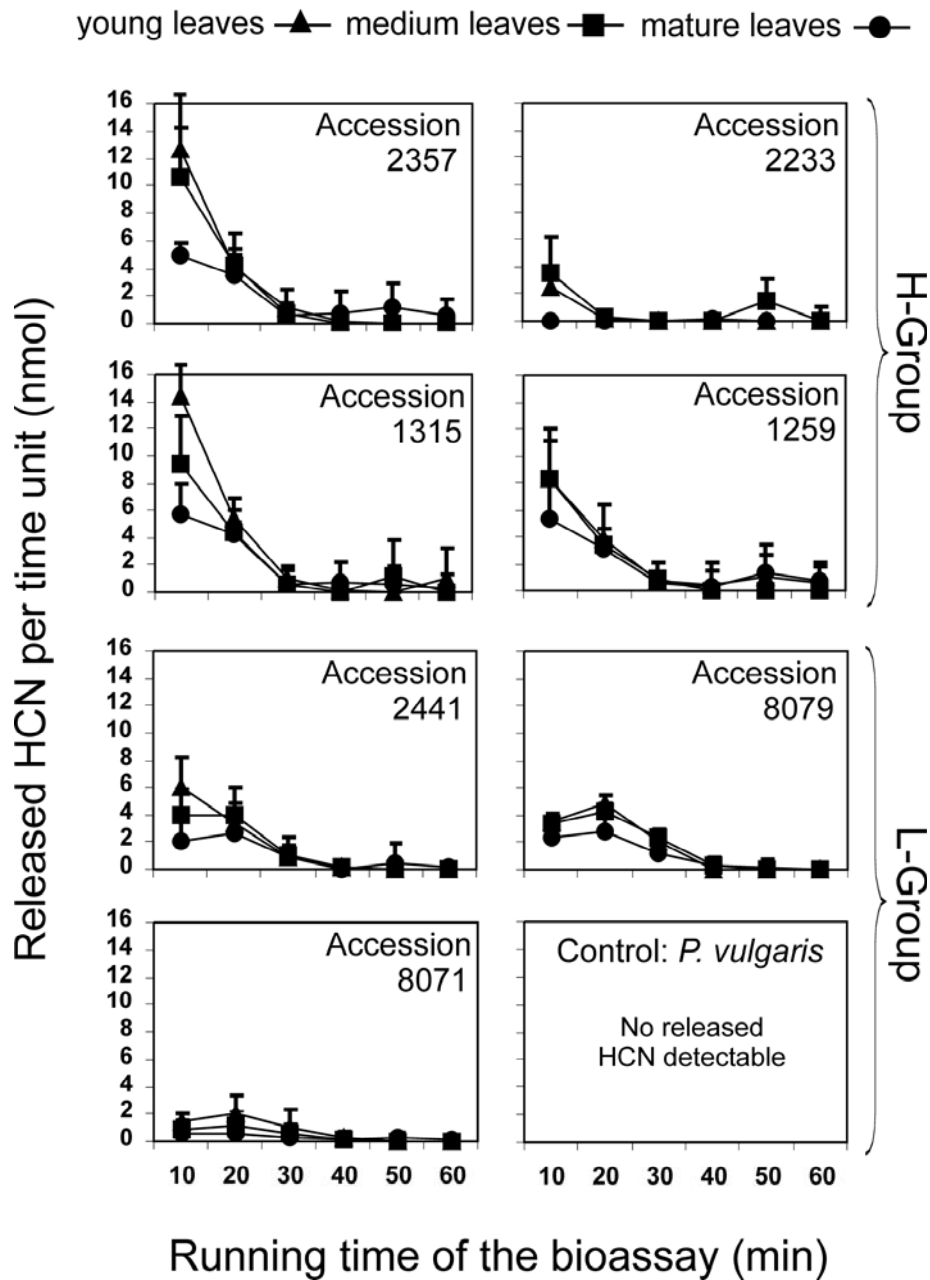


FIG. 6. Release of HCN from leaves as reaction to herbivory.

Illustrated is the quantitative release of HCN as reaction to leaf consumption. This experiment was run with the airflow system for detection of gaseous HCN. The total period of detection of HCN release was 1 hr. The experiments started with the first feeding incidence of the locusts where duration is significantly different between the H- and the L-groups of plants. Peaks of HCN release, 30 - 60 min after start of the feeding trial, were results of further feeding incidents of single locusts. Values given in the figure are means + SD. The duration of the first feeding incidence and results of statistical analyses are given in the text; for number of observations, see Table 1. The almost noncyanogenic *P. vulgaris* var. *Saxa* served as control.

after the beginning of the experiment; they were very short, and were not considered as time of feeding, but resulted in visible additionally peaks of HCN release (Figure 6).

An interesting fact is that young and intermediate leaves of the L-group accession 2441 showed a substantial capacity for release of HCN as a reaction to feeding (Figure 6). This finding is in contrast to the very low HCNc detected as reaction to chemical tissue disintegration by chloroform treatment (Figure 3) and may indicate the existence of endogenous β -glucosidases in the locusts' saliva.

Effects of Leaf Development.

Young leaves of the high cyanogenic accessions that were characterized by the

highest HCNp and HCNc were consumed in small amounts. To clarify whether these cyanogenic features were acting as the effective components of plant defense, or if any other chemical or physical factors could be correlated with leaf maturation and might have influenced the feeding behavior of locusts quantitatively, we applied a post-hoc test after ANOVA to the data set (Tukey's HSD for unequal N , $P < 0.05$, H-group: $N = 108$; L-group: $N = 89$). Within the H-group, no significant differences in consumption of young and intermediate leaves were found, but there was a significant difference between these leaves and the mature developmental stage characterized by lower HCNp and HCNc. Within the L-group, there was no

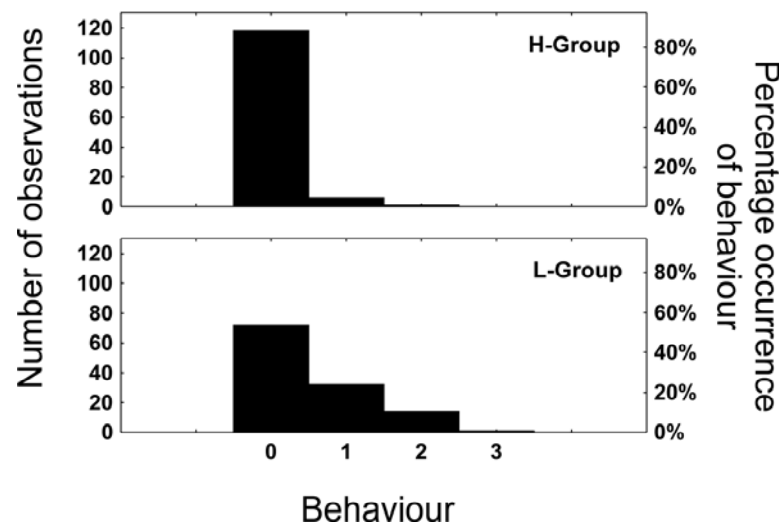


FIG. 7. Behavior of locusts. The behavioral patterns as reaction to consumption of high (H-group) and low (L-group) cyanogenic leaf material were documented and assigned to defined categories. These categories represent different levels of intoxication that range from normal behavior (0) to massive impairment of the herbivore (3). Presented are the total number of observations and the percentage occurrence of defined behavioral patterns among the H-group and L-group of plants.

significant difference in leaf consumption between the developmental stages. Thus, among the H-group plants, leaf consumption decreased with the increase of the cyanogenic features in younger leaves. Young and intermediate leaves of the high cyanogenic plants were not consumed less than mature leaves just because of the leaf developmental stage itself. Deterrent effects on locusts appeared to depend on the high HCNp and HCNc that occurred at this ontogenetic leaf developmental stages.

Effects of Cyanogenesis on Locust Behavior. The state of cyanogenic features affected locust behavior and led to different symptoms of intoxication. The reactions of the locusts feeding on *P. vulgaris* var. *Saxa* were defined as normal (behavioral pattern 0). This behavior contrasted with reactions of the insects after feeding on cyanogenic plant material of *P. lunatus*. These deviating patterns were interpreted as symptoms of intoxication (behavioral pattern 1 to 3).

Strong symptoms of intoxication occurred after extensive consumption of leaf material of the accessions 2441, 8071, and 8079 with a low HCNp and a corresponding low HCNc, whereas feeding on high cyanogenic leaf material (accessions 2357, 2233, 1315, and 1259) resulted in fewer or no symptoms of intoxication (Figure 7). The severity of intoxication strongly interacted with the amount of consumed leaf material ($F = 27.96$, $df = 3$, $P < 0.001$). Furthermore, the release of HCN from leaf material as a reaction to locust feeding was significant higher for bioassays in which low symptoms of intoxication occurred ($F = 62.94$, $df = 3$, $P < 0.001$). Thus, the results indicate detrimental effects because of extensive ingestion of cyanogenic leaf material and a strong repellent action of high HCNc.

Exogenous Application of HCN. Locusts kept under a HCN atmosphere of 0.260 to 0.876 $\mu\text{mol/l}$ revealed normal

TABLE 2. LOCUST BEHAVIOR UNDER EXPERIMENTAL HCN APPLICATION

KCN solution (mmol/l)	HCN atmosphere ($\mu\text{mol/l}$)	Locust Behavior	N
0.025	0.260	0	5
0.100	0.312	0	5
0.250	0.876	0	5
0.500	1.805	1	5
1.000	3.612	2	5
2.000	7.518	3	5

Note. The HCN generator of the airflow system (A, Figure 1) was filled with adjusted KCN solutions to provide defined concentrations of atmospheric HCN. Behavioral patterns of locusts on leaf material of control plants (*P. vulgaris* var. *Saxa*) were documented under these experimental conditions. The meaning of the codes for assignment of locust behavior is given in the text.

behavior (0). Agility, feeding behavior, and flight reactions were unaffected throughout the 1 hr of incubation under these conditions (Table 2). At a HCN concentration of 1.805 $\mu\text{mol/l}$ in the gas phase, which corresponds to a cyanide concentration in the liquid phase of the generator of 0.5 mmol/l , the locusts showed reduced movements and angled legs that are pressed on the abdomen, whereas other aspects of behavior remained unchanged. This behavior corresponded to pattern 1 that was observed in the bioassays with cyanogenic *P. lunatus* leaf material. At the level of 3.612 $\mu\text{mol/l}$, the locusts showed reduced movements and, in addition, less feeding on the leaf material and loss of flight reaction. Therefore, this behavior was similar to pattern 2. At the highest HCN concentration of 7.518 $\mu\text{mol/l}$, the insects stopped feeding on leaf material and the antennae were sloped downwards as was characteristic for behavioral pattern 3 in the feeding experiments. The symptoms of intoxication caused by application of exogenous HCN at higher levels were the same as observed during or after feeding on cyanogenic leaf material. However, an additional characteristic of behavior was the frequent cleaning of the antennae at HCN concentrations above 3.612 $\mu\text{mol/l}$. All symptoms were completely reversible and disappeared about half an hour after taking the locusts out of the equipment and putting them on fresh leaf material.

In this experiment, we chose relatively low concentrations of cyanide compared to the conditions in cyanogenic leaf material. Even the highest concentrations of hydrogen cyanide in the HCN generator were in the lowest range of cyanogenic precursor variation present in *P. lunatus* leaf material. However, the concentration of gaseous HCN in the atmosphere at which first intoxication effects could be observed was 60 times higher than the highest concentration of released HCN that was measured in the course of the feeding trials as reaction to leaf injury by the locusts.

HCN Balance. The amount of cyanide-containing compounds that were consumed together with the leaf tissue was calculated for every bioassay ($N = 230$). In addition, the amount of cyanide in the feces of the particular locust and the HCN released to the atmosphere from the locusts' bodies after the bioassay was included into the HCN balance (Table 1). The total calculated intake of cyanide-containing compounds present in the consumed parts of the leaves was not significantly different among all *P. lunatus* accessions ($F = 2.44$, $df = 1$, $P = 0.120$). But, when feeding on leaves on the mature developmental stage of the L-group accession 8071, the intake of hydrogen cyanide was low because of the extreme low HCNp of these leaves. HCN intake was even lower when locusts were feeding on the H-group accession

2233 with a high HCNp because of the small amounts of leaf material that were consumed from this accession. Within the H-group of plants, the intake of leaf material and, therefore, the intake of HCN tended to be lower by locusts feeding on young leaves with high cyanogenic features than by feeding on intermediate and mature leaves with lower cyanogenic properties. Considering the L-group of plants, in contrast, the intake of HCN by feeding on young leaves tended to be higher than when feeding on intermediate and mature developmental stages because of the similar intake of leaf material but the higher HCNp of the young leaves compared with intermediate and mature leaves. The percentage release of HCN to the atmosphere during the feeding process was higher in the H-group than in the L-group of plants ($F = 475.16$, $df = 1$, $P < 0.001$). The young and medium leaf developmental stages especially revealed a high percentage of HCN release compared to the intake of hydrogen cyanide. A special situation was observed in bioassays with the H-group accession 2233. Here, the percentage of HCN released was 6.5 and 15.9% for the young and medium leaf developmental stages, respectively, higher than for any other accession.

Within the L-group, only young and intermediate leaves of the accession 2441 and the mature leaves of the accession 8071 revealed a considerable percentage release of HCN as reaction to feeding by

the locusts. The relatively high percentage of the latter was because of the fact that the intake of cyanogenic precursors by locusts feeding on these leaves was extremely low corresponding to the very low HCNp that was not much higher than in case of the control plants (*P. vulgaris*). Therefore, even low amounts of released HCN represent a relatively high percentage release.

The release of HCN to the atmosphere from the locusts' bodies for a time period of 1 hr after the bioassay was low for all accessions with exception of locusts that fed on young and intermediate leaves of the H-group accession 2233. Here, the mean release of HCN was clearly higher than for the other bioassays.

Considerable amounts of hydrogen cyanide in locust excrement was detected after feeding on leaves of the accession 2441 (Table 1). This might depend on the obviously low activity of the endogenous β -glucosidase that resulted in extraordinary low release of HCN as reaction to chemical tissue disintegration (Figure 3).

Among all bioassays, the total loss of HCN in this balance was high. Only for young and intermediate leaves of the H-group accession 2233 and the L-group accession 2441 was the loss lower. In bioassays using this leaf material, a high percentage release of HCN to the atmosphere occurred as a reaction to insect feeding, and high contents of HCN were found in the excrement, respectively.

DISCUSSION

There is substantial evidence that plant cyanogenesis acts as an effective herbivore deterrent against generalist herbivores (Jones, 1962; Hughes, 1991; Schappert & Shore, 1999c, 2000). The potential of cyanogenic glycosides in plants to act as a chemical defense was recently demonstrated by transferring the entire pathway for the synthesis of the aromatic tyrosine-derived cyanogenic glycoside dhurrin from *Sorghum bicolor* to *Arabidopsis thaliana*. The accumulation of dhurrin resulted in resistance of the transformed host plant to the flea beetle *Phyllotreta nemorum*, a Chrysomelid beetle, which is a natural pest on members of the cruciferous plants (Tattersall et al., 2001).

Furthermore, cyanogenesis seems to be beneficial for plants under specific environmental conditions (Kakes, 1989). The distribution of cyanogenesis in populations of *Lotus corniculatus* L. and *Trifolium repens* L. depends on abiotic factors that are also determining the occurrence and activity of snails, the important herbivores of clover (Jones, 1966, 1972, 1988). Hayden & Parker (2002) regarded this plasticity in *T. repens* as an important mechanism to reduce fitness-related defense costs.

According to Bernays et al. (1977), leaves of the cyanogenic tuber crop Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) are

consumed more frequently by nymphs of *Zonocerus variegatus* (Acrididae) in a senescent or wilted state than young and fresh leaf tissue. These wilted leaves showed a reduced release of HCN from their leaf tissues, but it should be kept in mind that it is not known to what extent other factors also change in a wilted leaf of *M. esculenta*.

In obligate cyanogenic plants such as *M. esculenta* and the lima bean *P. lunatus*, the precursors and the cleaving enzymes are present in the plant without any induction by abiotic stress or attack by pathogens and herbivores. However, for these obligate cyanogenic plants, the release of HCN during the feeding process of an herbivore has never been quantified. There are several studies which analyze the amount of cyanide-liberating compounds in plants, its spatial distribution, and dependence on environmental conditions (Jones, 1966; Cooper-Driver & Swain, 1976; Abbott, 1977; Cooper-Driver et al., 1977; Ellis et al., 1977a; Till, 1987; Caradus et al., 1990; Blaise et al., 1991; Hughes, 1991; Shore & Obrist, 1992; Schappert & Shore, 1999a; Calatayud et al., 1994; Caradus & Forde, 1996; Gleadow & Woodrow, 2000a). However, the central aspect of cyanogenesis, the capacity to release hydrogen cyanide from these endogenous compounds to the atmosphere, was just roughly classified by “yes” or “no” or semiquantitative estimation by Feigl-Anger test paper methods (Hayden & Parker,

2002). In addition, the additional measurement of β -glucosidase activity together with analysis of the content of cyanogenic precursors in plant material is not a conclusive measure for cyanogenesis occurring under natural conditions because there may be variation in tissue distribution of both factors (Gleadow & Woodrow, 2000b). Apart from the general ability for release of hydrogen cyanide and its total amount, the kinetics of HCN release may be an important aspect of plant cyanogenesis as protection against herbivores. It has to be assumed that the velocity of HCN release will affect the rate of herbivore deterrence. The fast movement of gaseous HCN in leaf tissue has been pointed out by Lieberei et al. (1996).

P. lunatus is an obligate cyanogenic species with quantitative variation of its cyanogenic properties. The status of HCNp and HCNc of leaves varied considerably depending on genotype, physiological state, and ontogenetic leaf development. Quantitative variation was evident in leaves of defined developmental stages of clonal plant material under controlled greenhouse conditions. Young leaves are generally characterized by a higher HCNp and HCNc than leaves of intermediate and mature developmental stages. Young tissues and organs of reproduction are mostly, but not in general, characterized by high contents of cyanogenic precursors. It may be assumed that these tissues need special

protection because of their essential functions (Poulton, 1983, 1988; Gleadow & Woodrow, 2002). Alternatively, there might be investment decisions based on the expected lifespan of leaves (e.g., Coley, 1980, 1988; Coley et al., 1985). An attractive hypothesis would be that these cyanogenic substances are first used as feeding deterrents by young leaves before nitrogen is being metabolized (Selmar, 1986). Previous studies on the effects of cyanogenic glycosides on *Schistocerca americana* (grasshopper, Neoptera) and *Hypera brunneipennis* (alfalfa weevil, Coleoptera) revealed that these compounds deterred insects from feeding, but were not detrimental if ingested. Grasshoppers and weevils seemed to be more sensitive in detecting cyanogenic glycosides within food plants (Bernays, 1991).

The present study indicates a more complex action of cyanide-containing compounds and plant cyanogenesis. We were able to analyze the effect of cyanogenesis concerning the herbivore-plant interaction between nymphs of the generalist locust *S. gregaria* and the cyanogenic plant *P. lunatus*. This was accomplished by the precise measurement of the HCNp of the particular leaf presented to the locusts and by quantitative detection of the HCN released during the feeding process of the insects. However, in consideration of these data and by additional observation of the locusts behavior during and after

leaf consumption, the results suggest that plant cyanogenesis in this experimental system is involved in at least two levels of plant defense. On the one hand, high HCNp and HCNc result in a clear repellent effect. On the other hand, consumption of leaves with low HCNp and HCNc leads to severe intoxication. So, this complex action is based on the presence of cyanide-containing compounds and the kinetics of their bioavailability.

The identification of a certain threshold level at which the HCNp and the HCNc become effective is of special interest. Certain thresholds of cyanogenic precursors and released HCN must be reached to achieve repellent action against *S. gregaria*. Severe intoxication of locusts occurred after extensive consumption of low cyanogenic leaf material. Obviously, the insects did not react to the small amounts of HCN released during the feeding process, and, thus, the total intake of cyanogenic leaf material was above a critical threshold for intoxication. It cannot be excluded that factors other than the HCN releasing compounds may be toxic to the locusts and may have caused the detrimental effects. But, the time sequence and symptoms of intoxication were the same regardless of whether we applied exogenous HCN to locusts feeding on almost noncyanogenic leaf material or whether they were feeding on the cyanogenic varieties. During feeding on high cyanogenic leaf material — especially

on young leaves — considerably more HCN was released per unit time than during feeding on low cyanogenic leaves. This physiological feature of immediate HCN release in high amounts obviously represents a potent repellent effect. Thus, high and low cyanogenic leaves revealed different modes of action on the herbivore. Calculation of a HCN balance based on the consumed cyanogenic leaf material revealed that the amount of cyanide in the excrements and the amount of HCN released from the locust bodies after feeding were always low. Accordingly, the total loss of hydrogen cyanide within this balance was always high, indicating a metabolization of cyanide by the locust or an interaction of this highly reactive substance with the insect tissues. The HCN balance prepared from feeding trials with leaves of the H-group accession 2233 (wild type) indicated the impact of the HCNc as a feature with high repellent potential. Concerning this accession, bioassays with leaves of all defined leaf developmental stages revealed extraordinary high percentage rates of HCN release as reaction to locusts feeding compared to the other high and low cyanogenic accessions. However, leaves of all developmental stages of this accession were consumed in very low amounts independent of the widely varying HCNp.

This study demonstrates for the first time a quantified protective effect of the HCNp and of the corresponding HCNc

against herbivorous insect attack depending on threshold levels. The different modes of action of high and low cyanogenic accessions of *P. lunatus* deserve further discussion, and experiments with respect to the biological function and with special regard to the ecological costs of these systems. *P. lunatus* is an agricultural crop of increasing importance as source for human food and green fodder for livestock (Debouck, 1991). It is important to evaluate possible agroecological advantages or disadvantages of cyanogenesis. HCN release is not only acting on plant-herbivore interaction, but it is also influencing plant-microbe balances (Lieberei et al., 1983) and may also give an allelochemically input to plant-soil relations. The insights gained from this experimental system could easily be transferred to other cyanogenic plants of global economic importance such as cassava (*Manihot esculenta* Crantz).

Acknowledgments—We thank Prof. Dr. David S. Seigler for fruitful discussions. We also thank the “Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung” in Gatersleben for providing the seed material of our experimental plants.

III Manuskript 2

OVIPOSITION CHOICE OF MEXICAN BEAN BEETLE (*Epilachna varivestis*) DEPENDS ON HOST PLANTS CYANOGENIC CAPACITY

DANIEL J. BALLHORN^{1*} and REINHARD LIEBEREI²

¹Department of Botany, University of Duisburg-Essen,
Universitätsstr. 5, 45117 Essen, Germany

²Biocenter Klein Flottbek and Botanical Garden, University of Hamburg,
Ohnhorststr. 18, 22609 Hamburg, Germany

* To whom correspondence should be addressed. E-mail:daniel.ballhorn@uni-due.de

Abstract—The choice of insect females as to where to lay their eggs strongly affects progeny survival and, thus, fitness. We conducted choice experiments with female Mexican bean beetles, which were offered lima bean plants differing in their cyanogenic capacity (HCNc), i.e. in the intensity of hydrogen cyanide release per time unit from damaged plant tissue. Females preferred to lay their eggs on plants with low HCNc. In contrast, the mere concentration of cyanide-containing precursors (the cyanogenic potential, HCNp) did not affect oviposition choices. Plant cyanogenesis occurs after tissue damage, which brings specific β -glucosidases in contact with their substrates, cyanogenic glycosides, from which they are separated by compartmentation in the intact plant tissue. Plants commonly store toxic compounds in an inactive form that function as antiherbivore defense. Our results demonstrate that for cyanogenesis, which is widespread in plants, it is the toxic product itself rather than the precursor that affects oviposition choices of a specialized herbivore.

Key Words—Cyanogenesis, oviposition, cyanogenic capacity, cyanogenic potential, *Phaseolus lunatus*, *Epilachna varivestis*, antiherbivore defense, specialist herbivores.

INTRODUCTION

The fate of the phytophagous offspring of insects is strongly correlated with oviposition on a suitable host plant, since larvae usually are limited in mobility (Rausher, 1979). Choice behavior of female insects can be affected by numerous parameters. Factors determining oviposition choice include quantity and/or quality of resources (Myers, 1985), plant morphology, natural enemies, inter- or intraspecific competition, and allelochemicals (Thompson & Pellmyr, 1991). Plant compounds often serve as cues for phytophagous herbivores to identify suitable hosts for feeding and oviposition.

Many plant defenses are based on active compounds that are enzymatically released from glycosylated precursors accumulated in vacuoles. The general question arises whether the deterrent function is exclusively provided by the aglycones or whether the precursors already have a protective effect in themselves, as has been reported for bitter-tasting cyanogenic glycosides (Nahrstedt, 1985b).

Cyanogenesis is a two-step mechanism, in which cyanide-containing precursors are cleaved by specific β -glucosidases. The resulting α -hydroxynitriles are unstable and decompose spontaneously,

or enzymatically, in the presence of α -hydroxynitrile lyase to yield hydrogen cyanide (HCN) and an aldehyde or a ketone. It is, thus, necessary to consider the effect on oviposition choices of both the release of hydrogen cyanide and the content of cyanogenic precursors to understand the role of host plant cyanogenic features in this ecologically important interaction. In lima bean, both factors underlie high quantitative variability (Baudoin et al., 1991; Ballhorn et al., 2005).

We used Mexican bean beetle, which represents an herbivore specialized on members of the Fabaceae. However, the insects show strong preference for cyanogenic lima bean [*Phaseolus lunatus* (Dover et al., 1988)] and cyanogenic glycosides act as feeding stimulant for the beetles (Lapidus et al., 1963) indicating some specialization to this host plant. In choice experiments with intact lima bean plants characterized by cyanogenic properties, we addressed effects of cyanide release and cyanogenic precursor concentration on oviposition preference of female beetles.

METHODS AND MATERIALS

Plants. Lima beans and snap beans were cultivated under greenhouse conditions adjusted to 25:20°C in a 16-hr light/8-hr dark period and a relative humidity of 60-70%. Lima beans were grown from seeds obtained from one mother plant.

Cyanogenic features of plants. Cyanogenic capacity (HCNc) was measured in an air flow apparatus according to Ballhorn et al. (2005) using chloroform as inductive agent for release of gaseous hydrogen cyanide from leaves. By this treatment, the plant's general capacity for cyanogenesis can be quantified. Cyanogenic potential (HCNp) was measured by complete enzymatic degradation of cyanogenic precursors and quantitative measurement of released HCN (Ballhorn et al., 2005).

Beetles. Beetles were reared on noncyanogenic snap bean (*Phaseolus vulgaris* var. Saxa) under the same ambient conditions as plants. Snap bean represents another important host plant species of the beetle (Dover et al., 1988). Any possible adaptations to particular lima bean accessions were excluded by rearing beetles on snap beans. Beetles that emerged within 3 d were separated from the maintenance culture. Four days after they had started mating, females were removed. In parallel experimental settings, eight female beetles were placed in cages (fabric tubes,

TABLE 1. CYANOGENIC FEATURES OF LIMA BEANS (*Phaseolus lunatus*).

Accessions of <i>P. lunatus</i>	Cyanogenic status High (HC), Low (LC)	Cyanogenic capacity (HCNc) [$\mu\text{mol HCN g fw}^{-1}\text{min}^{-1}$]	Cyanogenic potential (HCNp) [$\mu\text{mol HCN g fw}^{-1}$]
2357	HC	0.58 ± 0.07^a	68.36 ± 14.82^{ab}
2233 (WT) ¹	HC	0.52 ± 0.07^a	64.72 ± 11.38^{ab}
8078	HC	0.56 ± 0.05^a	61.81 ± 5.99^{ab}
1315	HC	0.49 ± 0.08^a	55.92 ± 11.44^b
8067	LC	0.17 ± 0.08^b	18.54 ± 4.23^c
8079	LC	0.16 ± 0.04^{bc}	9.29 ± 3.20^{cd}
8071	LC	0.16 ± 0.03^{bc}	7.31 ± 2.09^{cd}
2116 ²	LC ⁽⁺⁾	0.13 ± 0.03^{bc}	76.53 ± 15.30^a
2441	LC	0.08 ± 0.01^{cd}	19.80 ± 4.84^c
Saxa ³	Non-cyanogenic	0.00 ± 0.00^d	0.00 ± 0.00^d

Notes: Young leaves of the lima bean accessions were screened for their cyanogenic characteristics. Values shown for HCNc and HCNp are means \pm SD ($N = 12$ individual plants per accession). Significant differences were calculated by a post hoc test (Tukey's HSD; $P < 0.001$) after one-way ANOVA and are indicated by different letters. ¹Accession 2233 represents lima bean, *P. lunatus*, wild type (WT) with small seeds and small, relatively hard textured leaves. ²Accession 2116 showed low release of gaseous HCN under high concentrations of cyanogenic precursors. ³Saxa represents *P. vulgaris* cv. Saxa.

70 cm diam) containing four 30-d-old HC, LC⁽⁺⁾ or LC plants of different accessions (replications per combination of plants, $N = 4$). Order of placement of the four plants in each cage was random to eliminate any possible positional effects for oviposition. Plants were exchanged every 3 d, and the egg clutches on the leaves of the removed plants were counted. Oviposition of beetles was observed over a total period of 30 d.

Statistics. Effects of cyanogenic capacity on beetles oviposition choice and assignment of lima beans to homogeneous groups based on different cyanogenic capacity were carried out by application of a post hoc test (Tukey's HSD) after one-way ANOVA to the data set (Statistica 7.0).

RESULTS

We found significant differences in HCNc and HCNp among the plants. Based on the differences in HCNc plants were assigned to a high HCN-releasing group (HC) with an also high HCNp and to a low HCN-releasing group (LC) with low HCNp. Accessions 2116 showed low HCNc under high HCNp (LC⁽⁺⁾). *P. vulgaris* cv. Saxa showed no cyano-genic precursors and, thus no ability to release gaseous HCN (Table 1). Screening of *P. lunatus* leaf material for nutritive factors, such as protein content and total phenolics revealed, in contrast to cyanogenic variability, no significant differences among the accessions (unpublished data).

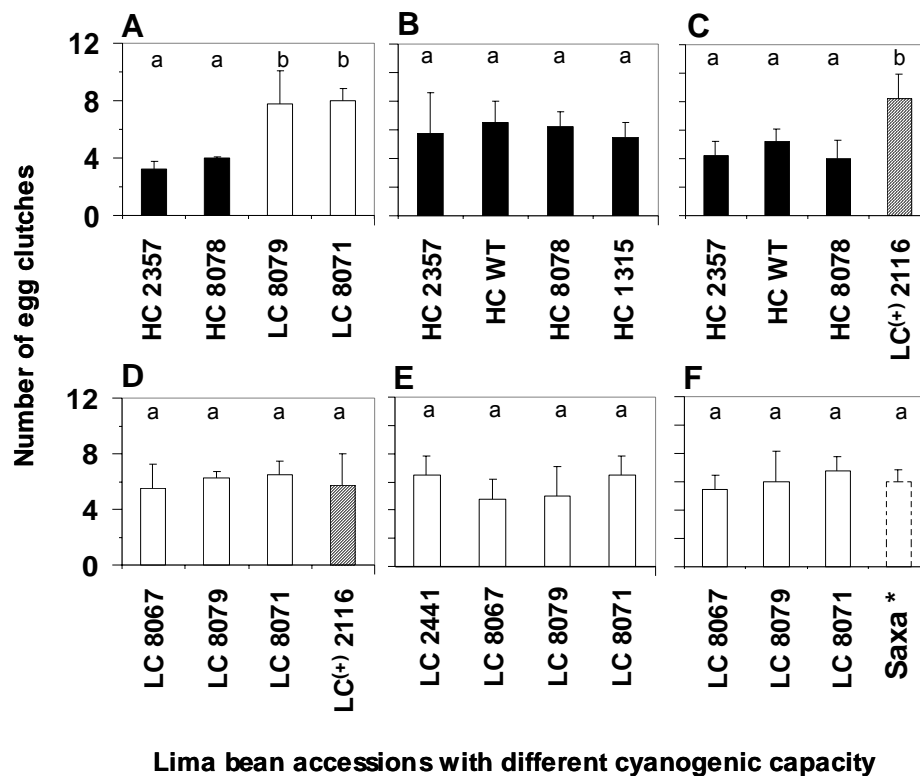


FIG. 1 Oviposition Choice of Beetles. Presented is the number of egg clutches (mean \pm SD, $N = 4$ per choice experiment) positioned by eight females on leaves of lima beans from accessions with different cyanogenic features (HC \blacksquare : high HCN-releasing plants, LC \square : low HCN-releasing plants, LC⁽⁺⁾ \square low HCN releasing plants caused by low activity of endogenous β -glucosidase under high concentration of cyanogenic precursors). Plants were assigned to groups based on significant differences in cyanogenic capacity (HCNc, see Table 1). Oviposition preference of beetles was analyzed in parallel experimental settings comprising different combinations of plants (a-f). Saxa* represents noncyanogenic *Phaseolus vulgaris* cv. Saxa. Different small-typed letters on top of the figure represent significant differences at $P < 0.001$ (*post hoc* test after one-way ANOVA; Tukey's HSD).

Each female beetle usually produced three egg clutches. Clutches were positioned on the undersurface of leaves in intervals of 8-9 d. The oviposition behavior of beetles was affected by the cyanogenic capacity of lima beans. Beetles showed significant oviposition preference for LC plants compared to HC plants (Fig. 1 a). In addition, LC⁽⁺⁾ plants were preferred for oviposition over HC

plants (Fig. 1 c) but not significantly refused compared to the LC plants (Fig. 1 d). Female beetles that were kept exclusively on HC- or LC-plants showed no preference for single accessions (Fig. 1 b, e). Choice experiments including noncyanogenic *P. vulgaris* plants revealed similar preference of beetles for LC plants compared to *P. vulgaris* (Fig. 1 f).

DISCUSSION

The results show that the Mexican bean beetle, although preferring to feed on lima bean (Dover et al., 1988), avoids high HCN-releasing varieties of its host plant. It was the cyanogenic capacity that affected female oviposition choice. Beetles were repelled by high cyanogenic capacity, whereas high concentrations of cyanogenic precursors did not result in reduced oviposition.

Release of HCN is the result of cell damage. Thus, insect feeding on leaves is required as precondition for repellent activity. In contrast to other defenses, which can be triggered by oviposition (Hilker et al., 2002), deposition of eggs on plant surface *per se* has no ability to initiate cyanogenesis.

Considering quantitative aspects, beetles did not differentiate between lima beans showing low capacity for release of HCN and snap beans, which did not contain any cyanogenic precursors at all. This finding indicates that cyanogenic capacity at lower concentrations provides no repellent activity against oviposition by female beetles. Both a role of cyanogenic capacity in female choice behavior as well as a homogeneous food quality of lima bean are supported by the finding that female beetles that were kept exclusively on LC or HC plants showed no oviposition preference for single accessions.

In general, nutritive traits have strong impact on host plant quality and affect

female oviposition preference (Raubenheimer and Simpson, 1994). However, substantial differences in host plant quality can be excluded here because we found contents of protein and total phenolics in leaves among the accessions to be homogenous (data not shown).

Taken together, the results demonstrate that oviposition choice of Mexican bean beetles depends on the cyanogenic capacity of host plants at high thresholds.

Acknowledgments—Seeds and beetles were kindly provided by the “Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK)” in Gatersleben and C.P.W. Zebitz (Hohenheim). We thank Andrea Pietrowski (Bayreuth) and Martin Heil (Essen) for many valuable discussions.

III Manuskript 3

PHENOTYPIC PLASTICITY OF CYANOGENESIS IN LIMA
BEAN *Phaseolus lunatus*—ACTIVITY AND
ACTIVATION OF β -GLUCOSIDASE

DANIEL J. BALLHORN^{1,2*},

MARTIN HEIL¹

and REINHARD LIEBERE²

¹Department of Botany, University of Duisburg-Essen,
Universitätsstr. 5, 45117 Essen, Germany

²Biocenter Klein Flottbek and Botanical Garden, University of Hamburg,
Ohnhorststr. 18, 22609 Hamburg, Germany

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: daniel.ballhorn@uni-due.de

Abstract—Cyanogenesis, the release of toxic HCN from damaged plant tissues, is generally considered as a constitutive plant defense. We found phenotypic plasticity of cyanogenesis in young leaves of lima bean, *Phaseolus lunatus* based on increased activity of the β -glucosidase in response to herbivore attack. Two aspects of plant cyanogenesis have to be considered in ecological analyses: (1) the cyanogenic potential (HCNp), which indicates the total amount of cyanide-containing compounds present in a given tissue, and (2) the cyanogenic capacity (HCNc), representing the release of HCN per unit time. This release is catalyzed by specific β -glucosidases, whose activity is a crucial parameter determining overall toxicity. Enzymatic activity of β -glucosidase—and, in consequence, the rate of HCN release—was increased significantly after 72 hr of incubation with spider mites as compared to noninfested leaves. Feeding by L1 larvae of Mexican bean beetles also led to enhanced enzymatic activity, whereas mechanical damage of leaf tissue had no effect on β -glucosidase activity and the release of HCN. The results place plant cyanogenesis in the group of induced resistance traits, whose degree of activity depends on the feeding by a particular herbivore.

Key Words—Cyanogenesis, β -glucosidase, chemical defense, constitutive defense, phenotypic plasticity, *Phaseolus lunatus*, *Tetranychus urticae*, *Epilachna varivestis*, plant-herbivore interactions.

INTRODUCTION

Plant cyanogenesis, the release of hydrogen cyanide from cyanogenic precursors as response to cell or tissue disruption, is considered as a constitutive plant defense against generalist herbivore attack (Nahrstedt, 1985; Belotti & Riss, 1994; Gleadow & Woodrow, 2002). Most studies focus on the variation of the content of cyanogenic plant compounds; however, cyanogenesis, if defined as the liberation of hydrogen cyanide per unit

time, also has a kinetic character. Therefore, three different components have to be quantified to fully describe this phenomenon. These components are (1) the cyanogenic potential (HCNp), which gives the total amount of cyanide-containing compounds present in a given tissue (Loyd & Gray, 1970), (2) the activity of specific β -glucosidases, and (3) the resulting cyanogenic capacity (HCNc), defined as the release of hydrogen cyanide per unit time (Lieberei, 1988). In contrast to the widely studied HCNp, the

capacity of plants or particular plant organs for HCN release following tissue damage is rarely studied, but data available on *Phaseolus lunatus* indicate a substantial role of such kinetics in herbivore deterrence (Ballhorn et al., 2005). In this context, two modes of defense have to be considered. The function of deterrence depends on the plants' ability for fast release of high amounts of HCN during the feeding process of the herbivore. In contrast, extensive consumption of plant material with lower cyanogenic features in the long term leads to an intoxication of the herbivore. This intoxication results from the endogenous release of hydrogen cyanide within the gastrointestinal tract, which appears to be more harmful to the herbivore than the development of gaseous HCN during the feeding process (Ballhorn et al. 2005; Miguel & Alberto, 2005).

The activity of specific β -glucosidases represents the most important parameter determining the kinetics of hydrogen cyanide release (Swain et al., 1992). However, studies on possible changes of specific β -glucosidase activity and resulting changes of the cyanogenic capacity in response to herbivore or fungal attack are lacking. Only a study on the cyanogenic rubber tree (*Hevea brasiliensis*) reported a distinct increase of β -glucosidase activity in response to local, mechanical damage of leaf tissue (Voß, 2001). For many

cyanogenic plants such as rubber tree, cassava (*Manihot esculenta* Crantz), sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), clover (*Trifolium repens* L. and *Lotus corniculatus* L.), bracken fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn), and lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) there is evidence for the protective effect of plant cyanogenesis (Jones, 1962; Cooper-Driver & Swain, 1976; Hruska, 1988; Bernays, 1991). Furthermore, experiments with genetically modified plants have underlined the effectiveness of cyanogenesis as an antiherbivore defense system. Transferring the complete pathway for synthesis of cyanogenic glycosides and a corresponding, specific β -glucosidase into *Arabidopsis thaliana* provided resistance against *Phyllotreta nemorum*, a chrysomelid beetle that is specialized on cruciferous plants (Tattersal et al., 2001).

However, a broad range of factors on both sides of the plant-herbivore interaction affects the effectiveness of cyanogenesis as an herbivore deterrent. Focusing on the herbivores, the mode of feeding, the availability of alternative foods, as well as mechanisms of adaptation may affect the defensive potential (Walling, 2000; reviewed by Gleadow & Woodrow, 2002).

In the last decades, cyanogenesis has received considerable interest in analyses of ecological costs of plant defense (Kakes, 1989; Blaise et al., 1991; Lieberei et al., 1996; Hayden & Parker,

2002). A number of authors have described genetically based variation in cyanogenesis among populations (Lieberei, 1988; Shore & Obrist, 1992; Caradus & Forde, 1996). In addition to genotypic variability, the state of cyanogenesis may be correlated with the ontogenetic stage of the particular plant or specific plant organs (Lloyd & Gray, 1960; Till, 1987; Thayer & Conn, 1981; Coley, 1980, 1988; Schappert & Shore, 2000).

There seem to be some counteractive forces selecting against cyanogenesis because populations of some potentially cyanogenic plants are partly or even almost entirely composed of acyanogenic genotypes (Hughes, 1991; Schappert & Shore, 1995, 1999). Distribution of cyanogenesis within and among populations may depend on the presence or absence of herbivores, which lowers or increases the net fitness effects of this constitutive plant defense trait, respectively (Abbott, 1977; Bokanga et al. 1994; Ellis et al., 1977a; Gleadow & Woodrow, 2000a,b). In addition, abiotic conditions, such as temperature and humidity, and their seasonal variation, as well as nutrient availability may have an impact directly on the status of cyanogenesis within a given plant and, therefore, can have the potential to affect the distribution of plant cyanogenesis at the level of populations (Jones, 1962, 1966, 1972; Cooper-Driver et al., 1977; Kakes, 1989; Calatayud et al., 1994;

Calatayud & Le Rü, 1996). Thus, general problems of estimating the relevance of cyanogenesis in an ecological context arise from the highly dynamic nature of this trait that also comprises the putatively different responses of its separate parameters, i.e., HCNp, β -glucosidase activity, and HCNc.

In the present study, we use lima bean (*P. lunatus*) as a presumably obligate cyanogenic plant with high intraspecific and ontogenetic variability in its cyanogenic features (Baudoin et al. 1991; Debouck, 1991; Ballhorn et al., 2005). Spider mites (a generalist cell-content feeder) and larvae of the Mexican bean beetle (a specialist herbivore with chewing mouthparts) were used for analysis of phenotypic plasticity of β -glucosidase activity and the corresponding HCNc.

METHODS AND MATERIALS

Plants. The experiments were carried out with 12 accessions of *P. lunatus* including 11 domesticated lines and a wild type. For further characterization of the accessions see (Table 1). Trifoliolate leaves of these accessions were characterized by different concentrations of cyanide-containing compounds (Ballhorn et al., 2005). The cyanogenic potential (HCNp) of young leaves ranged from 7.4 ± 2.1 (accession

8071) to 65.3 ± 13.4 (accession 2357) $\mu\text{mol HCN}$ per gram leaf fresh weight (fw; mean \pm SD; $N = 11$ clonal plants per accession). Seed material was provided by the Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) in Gatersleben, Germany.

Growing and Treatment of Plants.

Single plants of the different accessions were vegetatively propagated (28 plants per accession) to reduce genetic variability of the experimental plants. These plants were used for the experiments when they were 8 wk old and had developed two fully expanded leaves. Clonal plant material was obtained by preparing one-node cuttings from the mother plant. Cuttings were rooted in water supplemented with

Rhizopon AA 1%® (Rhizopon bv, Hazerwoude, Holland). The mother plants obtained from seeds as well as the cuttings were cultivated under green house conditions at a light regime of 16:8 hr light-dark period by a photon flux density of $400 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{ m}^{-2}$ at the plant container and $900 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{ m}^{-2}$ on the top of the plants. Supplementary light was provided by 400-W high-pressure sodium lamps with plant grow broad-spectrum fluorescent bulbs (Son-Targo 400, Philips®). Temperature in the chamber was 30:20°C, and the ambient relative air humidity ranged between 60 and 70 %. Plants were fertilized with a nitrogen-phosphate fertilizer (Blaukorn®-Nitrophoska®-Perfekt, Compo GmbH &

TABLE 1: CHARACTERIZATION OF *Phaseolus lunatus* GENOTYPES

Labeling and origin of genotypes		Physiological and morphological parameter		
Accession-Number	Country of origin	Cyanogenic potential of young leaves ($\mu\text{mol HCN/g leaf fw}$) ^b	Leaf surface	Habit
2233 (WT ^a)	Cuba	63.7 ± 11.6	glabrous	tendrillar
8078	China	61.8 ± 10.8	hairy	tendrillar
2357	Spain	65.3 ± 13.4	hairy	tendrillar
8073	-	28.9 ± 6.6	glabrous	tendrillar
1738	Cuba	37.1 ± 5.8	glabrous	tendrillar
1315	Peru	54.2 ± 8.5	hairy	tendrillar
8067	-	18.6 ± 5.2	glabrous	tendrillar
8151	-	36.9 ± 2.9	glabrous	low tendrillar
8071	-	7.4 ± 2.1	glabrous	tendrillar
8079	-	8.6 ± 1.7	glabrous	low tendrillar
2441	Bulgaria	19.1 ± 3.9	glabrous	low tendrillar
2116	Italy	78.8 ± 10.4	hairy	tendrillar

^aAccession 2233 represents lima bean, *P. lunatus*, wild type (WT) with small seeds and small, relatively hard textured leaves.

^bYoung leaves of accessions were screened for their general cyanogenic potential ($N = 11$ individual plants per accession, values are means \pm SD) according to the method described in (Ballhorn et al., 2005).

Co. KG, Münster, Germany) twice a week and rooted in standard substrate (TKS[®]-1-Instant, Floragard[®], Oldenburg, Germany) that was mixed with two thirds of washed sand with different grain size (0.3–0.7 and 1–2 mm). Plant containers with a diam of 18 cm were used for cultivation.

Selection of Leaf Material. Young leaves were selected for the experiments. Leaves of this developmental stage revealed the highest homogeneity of structural parameters among the accessions and the highest constancy of physiological traits (HCNp and general β -glucosidase activity) within the lines. This leaf developmental stage was classified by the position of leaf insertion at the stem as well as by leaf morphological parameters. By definition, “young leaves” are inserted near the top of the stem or a side stem. They were fully unfolded for at least 4 d, but no longer than 6 d, and the midrib of the central leaflet of these trifoliolate leaves was about 4 cm long. Leaves of this ontogenetic stage were characterized by a bright green color and a soft texture.

Arthropods. Two-spotted spider mites (Acari: Tetranychidae: *Tetranychus urticae* Koch) and Mexican bean beetles (Coleoptera: Coccinellidae: *Epilachna varvestis* Mulsant) were used as activating agents. Both the maintenance culture of the spider mites as well as of the Mexican bean beetles were kept on *Phaseolus vulgaris* cv. “Saxa” under identical ambient conditions as experimental plants. The

progenitors of the Mexican bean beetle culture were provided by C.P.W. Zebitz, Department of Applied Entomology, University of Hohenheim, Otto-Sander Str. 5, Germany.

Infestation of Leaves with Spider Mites. Fourteen clonal plants were used per accession. The terminal leaflet of one trifoliolate leaf per plant was infested with 10 adult females that had been kept on *P. vulgaris* before. Experiments were carried out in the green house under identical ambient conditions as adjusted for plant cultivation. For analysis of plant responses to spider mite attack, the infested leaflets of selected trifoliolate leaves were bagged with perforated, transparent polyethylene foil (approx. 9 holes/cm², each with a diam of 0.5 mm), whereas the other two leaflets of the leaf were bagged but remained uninfested. In addition, leaves of control plants were bagged in the same way. These plants were cultivated in a separate chamber under identical ambient conditions. In parallel experimental settings, mites were left on the leaflets for 24, 48, and 72 hr, respectively. The β -glucosidase activity of the infested leaflets was quantitatively compared to the two untreated leaflets of the same leaf, which were pooled for analysis, as well as to leaves of the control plants characterized by the same ontogenetic stage. Leaflets of these control leaves were pooled for analysis of the β -glucosidase activity.

Leaf Damage by Mexican Bean Beetles. In experiments using the Mexican bean beetle as attacking herbivore, three freshly hatched L1 larvae were placed on the terminal leaflet of a trifoliolate leaf. Running time of the feeding trials and bagging of leaflets were consistent with the experiments using spider mites as herbivores. Noninfested control plants were used in the same way as mentioned above.

Effect of Artificial Damage. Artificial damage was applied to the leaflets using a plastic (PE) pin with a diam of 1.5 mm. Initially, 15 injuries were set per leaflet. In parallel experimental settings, additional 15 injuries were set every 24 hr to achieve an increasing damage of leaf tissue visually similar to the leaf area damaged by the Mexican bean beetles. The damaged leaflets were bagged in the same way, and untreated but bagged control plants were used as described for the plants wounded by herbivores.

Harvest of Leaves for Analysis. Leaves were cut off with a razor blade after the respective period of incubation. The three leaflets per leaf were separated by the criteria "treated" and "untreated" and were immediately prepared for analysis of β -glucosidase activity. Leaf material of control plants was prepared in the same way.

Extraction and Purification of β -Glucosidase. Whole leaflets were weighed and homogenized in a fourfold volume of

67 mmol l⁻¹ phosphate buffer adjusted to pH 6.4. The extract was filtered through cotton fabric and centrifuged at 20,000 x g and 4°C (RC5C, Sorvall). The protein-containing supernatant was concentrated by ammonium sulfate fractionation and filtered through membrane caps with a pore size < 10,000 kD (Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, Germany).

Constitutive β -glucosidase Activity. The quantification of β -glucosidase activity in the extracts was based on the detection of *p*-nitrophenol released by hydrolysis of the chromogenic artificial substrate *p*-NP-glucoside (Merck; Hösel & Nahrstedt, 1975; Selmar, 1981, 1986). The standard incubation mixture for analysis of the enzymatic activity contained 1-ml substrate solution (2 mmol) in citrate buffer adjusted to pH 5.6. The incubation mixture was made up by citrate buffer (pH 5.6) to a volume of 4.9 ml and finally 0.1 ml extract was added. After 10 min of incubation at 30°C, the reaction was stopped by adding 1 ml ice-cold sodium carbonate solution (1 mol/l), and the released *p*-nitrophenol was quantified spectrophotometrically at 400 nm (Pharmacia Biotech, Ultraspec 3000). The β -glucosidase activity was calculated per gram leaf dry weight as katal (kat). An enzyme activity of 1 kat is defined as a substrate conversion rate of 1 mol substrate per second under standard temperature and pressure. The calculation of the enzyme activity was carried out by

use of a coefficient of extinction for *p*-nitrophenol ($\epsilon_{400 \text{ nm}} = 16,159 \text{ l/mol cm}$) (Voß, 2001).

HCN Detection System. The kinetic analysis of HCN release from experimentally treated lima bean leaves was carried out using an airflow system (Ballhorn et al., 2005). This vessel system was passed by a constant air flow adjusted at 7.0 l/hr. Infested and noninfested leaflets of the experimental plants as well as terminal leaflets of the control plants were placed in the equipment, respectively. The leaflets were treated with chloroform (250 μl /leaflet) to achieve complete tissue disintegration and, in consequence, the release of gaseous hydrogen cyanide from the accumulated cyanogenic precursors. At the discharge opening of the equipment, the air together with the transported HCN was led into a test tube containing 0.1 mol/l NaOH solution. Thus, cyanide was fixed as NaCN and then was spectrophotometrically quantified at 585 nm as a polymethine dye that was formed by use of Spectroquant® cyanide test (Merck). We used a coefficient of extinction of ($\epsilon_{585 \text{ nm}} = 131,600 \text{ l/mol cm}$) for calculation of the cyanide concentration in the samples following the product description.

Statistics. Statistical analyses were carried out with STATISTICA 6.0 (STATISTICA System Reference, 2001).

RESULTS

Variability of β -Glucosidase Activity. Substantial interaccession variability of β -glucosidase activity in young leaves was found among the 12 accessions of *P. lunatus* (Figure 1 A). Among these lines, the enzymatic activity ranged from 0.016 to 3.765 μkat per gram leaf dry weight ($N = 9$ per accession) and varied significantly depending on the genotype (ANOVA: $F = 21.861$, $df = 11$, $P < 0.001$).

Attacking Period. In experimental settings that used spider mites as well as Mexican bean beetles as damaging agents, substantial increase of β -glucosidase activity was found after 72 hr of incubation, whereas no distinct increase of the enzymatic activity was observed after an incubation period of 24 and 48 hr. Thus, results presented hereafter refer to an incubation period of 72 hr (Figure 1 B-D).

Effect of Spider Mite Infestation on β -Glucosidase Activity. A factor of β -glucosidase activity increase was calculated by dividing the enzyme activity (μkat) of the infested leaflets by the values of activity of the noninfested leaflets belonging to the same leaves. Enzyme activity in untreated leaflets of treated leaves was not significantly different from activity in completely untreated leaves of control plants (ANOVA: $F = 0.012$, $df = 1$,

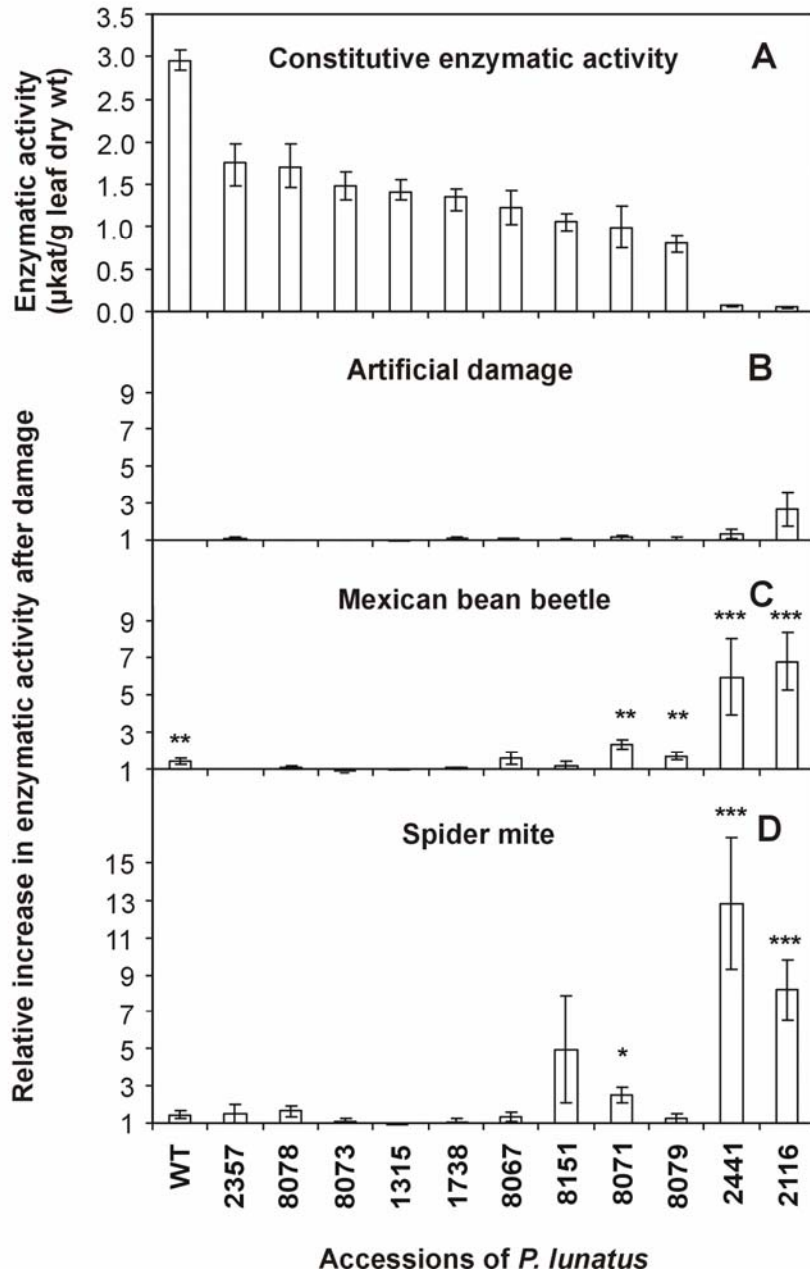


FIG.1. Increase in β -glucosidase activity following leaf damage. Presented is the constitutive β -glucosidase activity in young *Phaseolus lunatus* leaves (A) and relative increases in enzyme activity in response to artificial damage (B), attack of larvae of Mexican bean beetles (C) and spider mites (D). Values are means \pm SE [(N = 9 leaves per accession (A) and N = 7 leaflets of different plant individuals per accession (B-D)]. Asterisks represent significant increase in enzymatic activity (***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$).

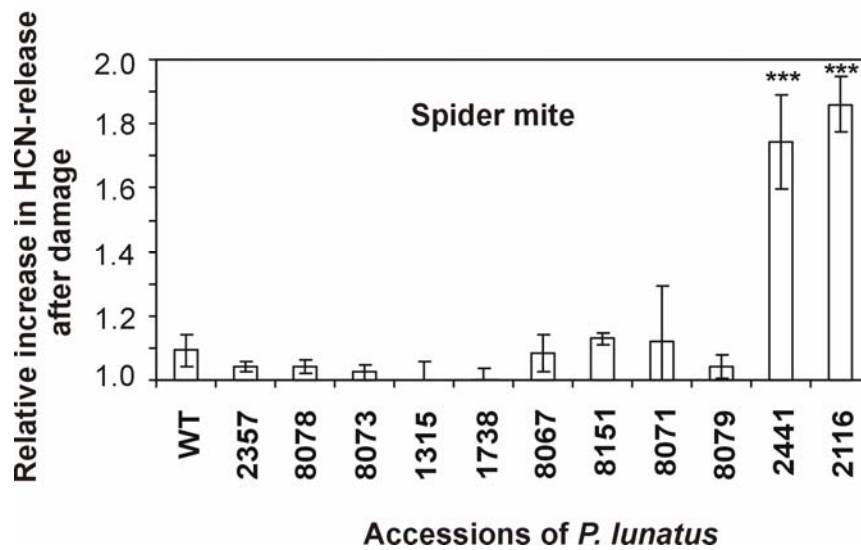


FIG.2. Increase in HCN liberation by enhanced β -glucosidase activity. The relative increase of gaseous hydrogen cyanide release per unit time was accelerated in response to increased β -glucosidase activity provoked by spider mite attack. Values are means \pm SE ($N = 7$ leaflets of different plant individuals per accession). Asterisks represent significant increases in HCN liberation (***: $P < 0.001$).

$P = 0.917$). Relative increases in β -glucosidase activity are therefore expressed as a factor of β -glucosidase activity increase comparing the damaged and undamaged leaflets of single leaves. These factors generally gave values of 1 or more and indicated an increase of β -glucosidase activity following spider mite attack. Only the accession 1315 showed a slight decrease of enzymatic activity after infestation with spider mites (Figure 1 B). The accessions 2441 and 2116 showed a substantial increase of enzymatic activity by the factor 12.8 ± 3.6 and 8.2 ± 1.6 (mean \pm SE), respectively. For these accessions, as well as for the accession 8071, the enzymatic activity in infested leaflets increased significantly in response

to spider mite attack (ANOVA; 2441: $F = 130.614$, $df = 1$, $P < 0.001$; 2116: $F = 317.091$, $df = 1$, $P < 0.001$; and 8071: $F = 5.477$, $df = 1$, $P < 0.05$). However, none of the other accessions showed significantly enhanced enzymatic activity following spider mite attack.

Effect of Damage by Mexican Bean Beetle Larvae on β -Glucosidase Activity. The β -glucosidase activity of selected *P. lunatus* accessions was increased by feeding of Mexican bean beetle larvae (Figure 1 B). Exceptions are only the accessions 2357, 1315, and 8073, which showed a slight decrease of the enzymatic activity. Leaflets of the accessions 2116, 2441, 8071, and 8079 exhibited significantly increased β -glucosidase

activity in response to leaf damage by these insects as compared to the nondamaged leaflets of the same leaf (2116: $F = 31.131$, $df = 1$, $P < 0.001$; 2441: $F = 23.968$, $df = 1$, $P < 0.001$; 8071: $F = 13.320$, $df = 1$, $P < 0.01$; 8079: $F = 14.052$, $df = 1$, $P < 0.01$; WT: $F = 10.397$, $df = 1$, $P < 0.01$). These nondamaged leaflets, in turn, never showed significant differences of β -glucosidase activity when compared to leaves of the control plants ($F = 0.006$, $df = 11$, $P = 0.994$).

Artificial Damage of Leaves.

Among all accessions, injuries of leaflets set with a plastic pin had no effect on β -glucosidase activity in these leaflet as compared to the remaining leaflets ($F = 0.055$, $df = 1$, $P = 0.815$). However, 8 among 12 accessions of *P. lunatus* showed factors of β -glucosidase activity increase higher than 1.

Effect of Increased β -Glucosidase Activity on HCNc. The increase in β -glucosidase activity in spider-mite-infested leaflets compared to untreated leaflets of the same leaves was correlated with increased HCN release from these leaflets as reaction to breakdown of cell integrity (Figure 2). Similar to the relative increase of enzymatic activity, we calculated a factor of relative increase of HCN release per unit time by dividing the amount of released HCN of the infested leaflets by the values of HCN release of noninfested leaflets belonging to the same leaves. The cyanogenic capacity of spider-mite-infested leaflets of the accessions 2116

and 2441 was accelerated compared to noninfested leaflets of these *P. lunatus* lines (2116: $F = 41.850$, $df = 1$, $P < 0.001$ and 2441: $F = 45.984$, $df = 1$, $P < 0.001$). The other accessions showed no increase of HCN release in response to spider mite attack. However, the increase in HCN release of the accession 2357 was close to statistical significance ($F = 4.52$, $df = 1$, $P = 0.051$).

DISCUSSION

Plant cyanogenesis represents a complex trait in herbivore defense because of high variability of the cyanogenic system. Besides the heterogeneous distribution of cyanogenesis among or within plant populations, the cyanogenic status of an individual plant is not static (Till, 1987). Therefore, analyses testing only for the presence or absence of cyanogenic glycosides and the general ability for HCN release do not address the variability of this constitutive herbivore defense.

In this study, enzymatic activity of β -glucosidase, a crucial factor limiting the rate of HCN release, increased in response to herbivore attack. Cyanogenesis thus comprises an inducible component, a finding placing it in the group of induced plant responses to herbivores. We found substantial interaccession variability because significant increases in β -glucosidase

activity were observed only in some of the accessions tested. Furthermore, the responses of these accessions depended on the type of herbivores causing the damage. Spider mite attack generally led to a higher increase in β -glucosidase activity than leaf damage caused by larvae of the Mexican bean beetle (Figure 1 C and D). This result most likely is a consequence of the different modes of feeding of these herbivores. Spider mites are cell-content feeders and damage single cells or limited areas of epidermal and mesophyll cells per feeding incident (Raven, 1983), whereas Mexican bean beetles remove larger areas. Furthermore, elicitors may be present in the herbivores' saliva, which can have varying effects on resistance-related plant enzymes such as pectinases, cellulases, amylases, proteases, lipases, alkaline and acidic phosphatases, and peroxidases (Miles, 1999). Support for this interpretation comes from the observation that pure mechanical damage of similar leaf areas as damaged by the herbivores did not significantly induce β -glucosidase activity. To test whether increased β -glucosidase activity, in fact, leads to increased HCN release, we used spider mite-infested leaves. The highly significant increases in β -glucosidase activity of the accessions 2116 and 2441 indeed were correlated with significant increases in HCN release (Figure 2). This finding underlined the impact of β -glucosidase activity on kinetic patterns of cyanogenesis. However, the

increase in HCN release was quantitatively lower than the increase in β -glucosidase activity. Accessions 2116 and 2441 showed increases in β -glucosidase activity by factors greater than 8 and 12 (Figure 1 D), whereas the magnitude in the relative increases in HCN release was less than twofold (Figure 2). This result can be explained when we assume that increased β -glucosidase activity occurred only in limited areas directly adjacent to the cells affected by spider mite feeding. In experiments with rubber tree, areas of enzymatic activation following leaf damage appeared to be local (Voß, 2001). Thus, increased enzymatic activity and enhanced HCN liberation because of herbivory might not affect the whole leaf. Another explanation for the non-proportional increase of β -glucosidase activity and HCN release could be the activity of hydroxynitrile lyases, which are catalysing the dissociation of hydroxynitriles as the second step of cyanogenesis and, therefore, have the potential to limit the release of HCN (Selmar et al., 1989).

A further point to be regarded in this context is the multifunctional character of β -glucosidases as pointed out by Selmar et al. (1987), particularly the putative involvement of β -glucosidases in mechanisms belonging to systemic acquired resistance against pathogens (SAR). SAR represents a systemic and multigenic plant response to a local infection that leads to a broad-spectrum

resistance to subsequent infections (Lamb & Dixon, 1997). SAR is primarily induced by pathogens, but tissue damage by piercing and sucking insects and mites induces similar responses (Russo et al. 1997; Bostock, 1999; Walling, 2000; Grinberg et al., 2005). Two important aspects of SAR are the accumulation of phytoalexins and enhanced local lignification of cell walls (Hammerschmidt, 1999a,b; Bruxelles & Roberts, 2001), and β -glucosidases are involved in both processes. Garcia et al. (1995) reported an essential function of β -glucosidases for the release of the phytoalexin scopoletin from its glycoside scopolin in leaves of the cyanogenic rubber tree (*Hevea brasiliensis*). The role of β -glucosidases for lignin biosynthesis in the course of defense reactions of *Triticum aestivum* against the fungal pathogen *Puccinia graminis* was demonstrated by Kogel et al. (1991). The induction of β -glucosidase reported is likely to have functions beyond the increase in HCN release.

Taken together, the results of our study underline the plastic character of plant cyanogenesis caused by phenotypic plasticity of β -glucosidase activity. This enzyme is an essential agent for the kinetics of HCN release, but further functions of the β -glucosidase present in *P. lunatus* cannot be excluded. Nevertheless, inducibility of β -glucosidase activity further adds to the ecological complexity in the interaction of cyanogenic plants with their biotic environment.

Mechanisms involved in the activation of specific β -glucosidases remain elusive. Voß (2001) reported immediate activation of specific β -glucosidase of the cyanogenic rubber tree (*H. brasiliensis*) as response to mechanical injury of leaves. This activation takes place within seconds. Hence, mechanisms of gene activation and mRNA synthesis could be excluded for this HCN releasing plant, and posttranslational processes affecting the β -glucosidase activity have to be assumed. In *P. lunatus*, a significant increase of the enzymatic activity was measured at the earliest after 72 hr of incubation. This time lag of activation may be a result of mRNA synthesis in the course of gene activation.

The plastic character of enzymatic activity in *P. lunatus* (and therefore the plasticity of cyanogenesis) appeared to be local because feeding of spider mites and L1 larvae of the Mexican bean beetle on one single leaflet had no inductive effect on β -glucosidase activity in the other two leaflets of the same leaf. This was verified by comparing β -glucosidase activity of these untreated leaflets with leaves of entirely untreated clonal control plants, which were not significantly different. Thus, the increase in β -glucosidase activity of leaflets damaged by herbivores was only detected in the damaged leaflets. The lima bean represents an experimental plant that is well established for analyses of plant responses to herbivore damage. The focus of research lies on the

mechanisms of VOC emission and the processes induced on the molecular level (Arimura et al., 2000) and, more recently, on the activation of extrafloral nectar in the field of indirect defenses (Heil, 2004). Cyanogenesis of the lima bean as a direct defense with high intraspecific and ontogenetic variability, as well as a certain state of phenotypic plasticity, represents an aspect that has to be considered in ecological analysis and evaluation of ecological costs of plant defense in this model system. Plant cyanogenesis of *P. lunatus* appears not to be a constitutive defense in the classical sense.

Acknowledgements—We thank A. Pietrowski, C. Reisdorff and two anonymous reviewers for many valuable discussions and comments on earlier versions of this manuscript. We thank the “Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK)” in Gatersleben, Germany, for providing seed material of *P. lunatus*.

IV Diskussion

IV. 1 Cyanogenese — eine Verteidigung gegen Herbivore?

Seit der ersten Beschreibung der Cyanogenese gibt es auch die Diskussion über die Funktion dieses Vorganges der schnellen Blausäurefreisetzung bei Pflanzen. Bereits in den 60er Jahren festigte sich die Ansicht, dass es sich hierbei um eine präformierte Abwehrreaktion der Pflanze gegen Fraßfeinde handele (Jones, 1962, 1966). Diese Einordnung der pflanzlichen Cyanogenese als eine chemische Verteidigung gegen Fraßfeinde liegt grundsätzlich nahe, da die Freisetzung von Blausäure (HCN) aus cyanogenen Vorstufen erst als eine Reaktion auf Gewebeverletzung erfolgt und zudem eines der Produkte dieser Reaktion, das HCN, eine erhebliche Toxizität besitzt. HCN wirkt toxisch gegenüber Säugern und vermutlich auch gegenüber vielen anderen eukaryotischen Organismen, da grundsätzlich die cytochromabhängige Atmung betroffen ist (Conn, 1979; Lindroth, 1991; Bennett & Wallsgrove, 1994). Den zahlreichen Arbeiten, die eine Verteidigungsfunktion der Cyanogene gegenüber Herbivoren beschreiben, steht eine ebenfalls große Zahl von Studien gegenüber, in denen derartige Effekte der Cyanogenese nur bedingt oder gar nicht festgestellt werden konnten (z. B. Scriber,

1978; Brattsten et al., 1983; Schreiner et al., 1984; Ferreira et al., 1997). Die Schwierigkeit, generelle Aussagen zur Funktion der Cyanogenese zu treffen, liegt wesentlich in dem polyfaktoriellen Charakter dieses Vorgangs begründet, der in seiner quantitativen Ausprägung von zahlreichen Komponenten abhängig ist.

IV. 2 Variabilität der Cyanogenese

Der Einfluss äußerer und endogener Faktoren auf die cyanogenen Eigenschaften individueller Pflanzen ist komplex (siehe Abschnitt I. 5. 5 und I. 5. 6). Ein direkter Bezug der Cyanogenese zur Abwehr von Herbivorie ist kaum herstellbar [(Dritschilo et al., 1979, Hruska, 1988), siehe Abschnitt I. 5. 7]. Die zahlreichen, die Variabilität cyanogener Eigenschaften potenziell bedingenden Parameter machen die Notwendigkeit deutlich, eine abgesicherte, quantifizierende Erfassung des aktuellen Status der Cyanogenese einer Versuchspflanze zu gewährleisten, anstatt mit qualitativen Bewertungen zu arbeiten. Nur auf diese Weise können Fehler in der quantitativ-funktionellen Zuordnung cyanogener Eigenschaften zu den Reaktionen der Tiere vermieden werden. Es gibt mehrere Aspekte, welche die Variabilität cyanogener Eigenschaften von Pflanzen bedingen und die deshalb in der funktionellen Analyse dieses Merkmals berücksichtigt werden müssen.

IV. 2. 1 Intraspezifische Variabilität

Der cyanogene Status vieler Pflanzen ist sehr variabel. Die hohe Variabilität eines Merkmals erschwert prinzipiell die Analyse seiner Funktion in ökologischen Wechselwirkungen. Dementsprechend eignen sich bei detaillierter Betrachtung viele der Untersuchungsobjekte nicht zur Untermauerung der generellen Hypothese einer Verteidigungsfunktion. So ist z. B. der gut studierte Weißklee (*Trifolium repens*) oft sehr heterogen in Bezug auf den Faktor Cyanogenese (siehe Abschnitt I. 5. 5). Die Pflanzen weisen z. T. genetisch bedingte Unterschiede sowohl des Gehalts cyanogener Vorstufen, als auch der Linamaraseaktivität auf (Hughes, 1991, 1993). Die Ausprägung cyanogener Eigenschaften kann, wie beim Weißklee, qualitativ sein, d. h. neben cyanogenen können acyanogene Genotypen vorkommen. Andere Pflanzen wie z. B. Maniok (*Manihot esculenta*), Kautschuk (*Hevea brasiliensis*) und die Limabohne (*Phaseolus lunatus*) sind obligat cyanogen. Acyanogene Individuen kommen bei diesen Pflanzenarten nicht vor. Dennoch unterscheiden sich verschiedene Genotypen dieser Pflanzen in der Konzentration akkumulierter cyanogener Vorstufen [z. B. *M. esculenta* (McMahon et al., 1995), *H. brasiliensis* (Lieberei, 1988; Lieberei et al., 1986), *P. lunatus* (Baudoin et al., 1991, Pietrowski, 2003; Ballhorn et al., 2005)].

Es ist weitgehend unklar, welche äußeren Faktoren zusätzlich zu genetisch fixierten Komponenten den cyanogenen Status einer Pflanze bzw. die Frequenz cyanogener Individuen in Populationen bedingen (siehe Abschnitt I. 5. 6. und I. 5. 7).

Aus diesem Grund wird häufig in experimentellen Ansätzen versucht, variable Faktoren zu eliminieren — mit einem in der Konsequenz zunehmend artifiziellen Charakter des untersuchten Systems. Die biochemischen Reaktionen eines isolierten Protoplasten in einer definierten Nährlösung haben mit der Situation einer Pflanze an ihrem natürlichen Standort nur noch wenig gemein (Naton et al., 1996; McCabe et al., 1997a,b). Die Variabilität eines Faktors ist jedoch nicht nur von Nachteil. Sie bietet grundsätzlich die Möglichkeit, quantitative Effekte des betreffenden Merkmals in vergleichenden Analysen zu erfassen. Die entscheidende Voraussetzung dafür ist allerdings, dass die vorhandene Variabilität bekannt ist bzw. abgeschätzt werden kann. Um auf vergleichendem Weg messbare Effekte einer pflanzlichen Eigenschaft wie die der Cyanogenese auf Herbivore zu erhalten, ist ein experimentelles System mit definierten cyanogenen Eigenschaften bei gleichzeitig hoher intraspezifischer Variabilität aber genotypischer Stabilität, besonders geeignet. Die in der Arbeit verwendeten Akzessionen der Limabohne stellen ein solches System dar.

IV. 2. 2 Ontogenetische Variabilität

Zusätzlich zur intraspezifischen Variabilität der Genotypen tritt in vielen Pflanzen eine ausgeprägte ontogenetische Variabilität in der Akkumulation cyanogener Glycoside auf (z. B. McKey, 1974; Majak et al., 1980; Conn, 1981b; Collinge & Hughes, 1982; Kojima et al., 1983; Lieberei et al., 1986; Selmar et al., 1987; Bennett et al., 1997; Caradus et al., 1997; Thomsen & Brimer, 1997).

Es ist zu prüfen, inwieweit solche Konzentrationsunterschiede cyanogener Vorstufen aus ökologischer Sicht in Bezug auf pflanzliche Verteidigung interpretiert werden können. Substanzen mit Bedeutung für Abwehrprozesse werden häufig bevorzugt in solchen Pflanzenorganen oder Geweben akkumuliert, die entweder für das Wachstum und/oder die Reproduktion besonders wertvoll oder für Herbivore besonders interessant — weil nahrhaft oder leicht zugänglich — sind (Grubb, 1992; Loehle, 1996; van Dam et al., 1996; Koricheva, 2002). Ein wesentlicher Punkt der in diesem Zusammenhang formulierten „optimal allocation“- bzw. „optimal defence“-Theorie besagt, dass die Teile einer Pflanze, die den höchsten Anteil zur aktuellen und zukünftigen Fitness beitragen, am stärksten geschützt sind (z. B. Zangerl & Bazzaz, 1992; Baldwin, 1994; van Dam et al., 1996). Es sollte also eine räumlich und zeitlich bestmögliche Verteidigung der ent-

sprechenden Pflanzenteile vorliegen (Rhoades, 1979). Die starke Verteidigung junger Blätter wäre demnach im Sinne dieser Theorie als eine „Investitionsentscheidung“ zu sehen, da junge Blätter aufgrund der längeren noch vor ihnen liegenden photosynthetischen Phase potenziell wertvoller sind als voll ausdifferenzierte oder gar seneszente Blätter (vgl. Abbildung 2). Ein unter Aspekten der optimalen Verteidigung besonders attraktiver Ansatz besteht hier in der Annahme, dass in jungen Pflanzengeweben akkumulierte Verbindungen zunächst der Verteidigung dienen, um dann später in der Entwicklung metabolisiert zu werden (Coley, 1980, 1988; Coley et al., 1985).

IV. 2. 3 Zeitliche Muster cyanogener Eigenschaften

Der cyanogene Status einer individuellen Pflanze (eines Genotyps) variiert nicht nur in Abhängigkeit des betrachteten Gewebes und dessen ontogenetischen Entwicklungszustandes (Smeathers et al., 1973; Kojima et al., 1979). Zeitliche Muster spielen ebenfalls eine wichtige Rolle für die Ausprägung cyanogener Merkmale einer Pflanze. Eine solche Variabilität kann auf verschiedenen, sich saisonal ändernden Faktoren wie Stickstoffverfügbarkeit, Bodenfeuchtigkeit, Temperatur und Lichteinstrahlung beruhen. Diese Faktoren haben ebenfalls

das Potenzial Allokationen zu beeinflussen (Dement & Mooney, 1974; Calatayud et al., 1994; Bokanga et al., 1994; Carter et al., 1997; Stockmal & Oleszek, 1997).

Die „carbon/nutrient balance“-Theorie versucht in diesem Zusammenhang die Beeinflussung der Verteidigung einer Pflanze durch äußere Faktoren zu erklären. Entsprechend dieser Theorie liegt ein Stoffwechselgleichgewicht zwischen den Kohlenstoff- und Nährstoffbedürfnissen einer Pflanze vor. Steht die eine oder andere Ressource im Überschuss zur Verfügung — d. h. in höherem Maße als für die Wachstumsprozesse der jeweils betrachteten Entwicklungs- oder Wachstumsphase benötigt — wird diese in den Sekundärmetabolismus der Pflanze geleitet (Bryant et al., 1983). Unter hohem Lichteinfluss aber limitiertem Nährstoffangebot sagt die „carbon/nutrient balance“-Theorie voraus, dass „überschüssiger“ Kohlenstoff in Form photosynthetischer Produkte von der Pflanze genutzt wird, um kohlenstoffbasierte verteidigungsrelevanten Stoffe wie z. B. phenolische Substanzen zu synthetisieren (Reichardt et al., 1991; Cronin & Hay, 1996; Kinney et al., 1997). Bei hoher Stickstoffverfügbarkeit aber schwachem Licht hingegen wird eine verstärkte Produktion stickstoffhaltiger Verbindungen (z. B. Alkaloide und cyanogene Glycoside) vorausgesagt (Bryant et al., 1983; Watermann & Mole, 1989; Landsberg &

Stafford Smith, 1992; Bryant et al., 1992; Lambers, 1993). Diese Theorie war und ist sehr effektiv in der Erklärung der Ergebnisse vieler Studien (Cooper-Driver et al., 1977; Tuomi, 1990; Reichardt et al., 1991; Petterson & McDonald, 1992; Cronin & Hay, 1996; Rousi et al., 1996; Kinney et al., 1997; Lawler et al., 1997; Gebauer et al., 1998), ist jedoch auch zahlreichen, z. T. schwerwiegenden Einschränkungen unterworfen (z. B. Gershenzon, 1994; Berenbaum, 1995; Koricheva, 2002). Sie ist weniger geeignet, Voraussagen zu Unterschieden der Verteidigungsstrategie verschiedener Arten oder Genotypen zu treffen, als vielmehr plastische Antworten eines bestimmten Genotyps als Reaktion auf unterschiedliche Verfügbarkeit von Ressourcen zu beschreiben (Lerdau & Coley, 2002).

Ob die zeitliche Variabilität der Cyanogenese sich durch saisonal ändernde Faktoren wie Lichteinstrahlung und Nährstoff-, insbesondere Stickstoffverfügbarkeit erklären lässt, ist nicht sicher (Stockmal & Oleszek, 1997). Andere Faktoren wie Temperatur und Wasserverfügbarkeit scheinen in manchen Fällen ebenso das Potenzial zu haben, auf den cyanogenen Status einer Pflanze Einfluss zu nehmen (siehe Abschnitt I. 5. 6. 1 und I. 5. 6. 3).

Zusätzlich zu äußeren Bedingungen können offenbar auch endogene Rhythmen, seien sie tagesperiodischer oder längerfristiger

Natur, auftreten, die den Metabolismus cyanogener Verbindungen in Pflanzen beeinflussen (Stockmal & Oleszek, 1997). Solche Rhythmen sind hinsichtlich ihrer Bedeutung für den cyanogenen Status einer Pflanze bisher kaum untersucht. Für *Manihot esculenta* (Okolie & Obasi, 1993) sowie für *Trifolium repens* und *Lotus corniculatus* konnten diurnale Schwankungen in der Konzentration cyanogener Glykoside nachgewiesen werden. Die beiden letzteren Arten zeichnen sich durch eine hohe Turnover-Rate cyanogener Vorstufen aus, die diese Schwankungen erklären könnte (Kojima et al., 1979; Jones, 1988). *Trifolium repens* zeigt zusätzlich deutliche — allerdings Kultivar abhängige — längerfristige Oszillationen des Gehalts der cyanogenen Vorstufen Linamarin und Lotaustralin über mehrere Monate hinweg, die bisher keinen klimatischen Bedingungen zugeordnet werden konnten (Frehner et al., 1997; Stockmal & Oleszek, 1997).

IV. 3 Konsequenzen der pflanzlichen Variabilität für das experimentelle Vorgehen

Die zahlreichen, eine Variabilität cyanogener Eigenschaften potenziell bedingenden Parameter machen die Notwendigkeit deutlich, eine abgesicherte Quantifizierung des aktuellen Status der Versuchspflanzen über den experimentellen Zeitraum hinweg zu gewährleisten.

Nur auf diese Weise sind Fehler in der quantitativ-funktionellen Zuordnung cyanogener Eigenschaften zu den Reaktionen der Herbivore zu vermeiden. Im Zuge dessen wurde in der vorliegenden Arbeit über die Kontrolle äußerer Bedingungen, die Auswahl definierter ontogenetischer Blatt-entwicklungsstadien und vor allem durch die konsequente Überprüfung der aktuellen cyanogenen Eigenschaften der Pflanzen die Variabilität dieser Eigenschaften für ihre Analyse nutzbar gemacht.

IV. 4 Variabilität der Herbivore

Nicht nur Pflanzen zeigen eine hohe Variabilität physiologischer Eigenschaften. Die Variabilität physiologischer Leistungen von Insekten ist bekannt und gefürchtet. Die häufig schnelle Resistenzentwicklung von Schadinsekten in der Landwirtschaft (Carriere et al., 1994; Perez et al., 2000) oder medizinisch relevanten Vektoren von Viren, Bakterien und Protozoen (Hemingway & Ranson, 2000) ist von enormer weltwirtschaftlicher Bedeutung. Der oft schnellen Entwicklung von Resistenzen gegen Insektizide und gentechnisch veränderte Pflanzen liegt eine genetische und infolgedessen auch physiologische Variabilität innerhalb der Populationen zugrunde (Tabashnik et al., 1990). Durch das Zusammenwirken häufig kurzer Generationszyklen und hoher Reproduktionsraten können durch den

Selektionsdruck „Insektizid“ physiologische Eigenschaften von Populationen, sprich Resistenzeigenschaften, relativ rasch verschoben werden. Entsprechende Mechanismen werden für die Interaktionen von phytophagen Insekten mit ihren Wirtspflanzen und deren Verteidigungsmechanismen angenommen. Allerdings sind die Pflanzen aufgrund gleicher Prinzipien in ihren Leistungen ebenfalls nicht statisch. Das Ergebnis von Anpassung und Gegenanpassung ist hier die Coevolution mit ihren vielfältigen Mustern.

Zusätzlich zur genotypischen Variabilität spielt auch die phänotypische Plastizität der Herbivore eine wichtige Rolle in der Interaktion mit Pflanzen und ihren Verteidigungen.

Herbivore können sich in gewissem Maße an die Aufnahme für sie toxischer Substanzen adaptieren; sie besitzen z. T. wirkungsvolle Entgiftungsmechanismen für zahlreiche toxische Pflanzenstoffe. Adaptationsvorgänge von Herbivoren an cyanogene Vorstufen wurden z. B. für *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) beschrieben. Dieses Insekt entwickelte eine zunehmende Toleranz gegenüber dem in künstlichen Futtermischungen angebotenen Amygdalin, einem bei Rosaceae und Myrtaceae weitverbreiteten cyanogenen Glycosid [(Ferreira et al., 1997), siehe Box 1 F]. Die beobachteten Effekte wurden hier einer gesteigerten Detoxifikationsrate des Aglykons zugesprochen. Ähnliche Effekte

konnten Brattsten et al. (1983) für *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) demonstrieren. Im Gegensatz dazu funktioniert die Anpassung eines anderen Insekts, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), an Amygdalin über eine reduzierte Synthese endogener β -Glucosidasen und einer infolgedessen erhöhten Ausscheidung unverdauter, d. h. nicht hydrolysierter cyanogener Glykoside (Ferreira et al., 1997). Ähnliche Mechanismen scheinen bei an *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) fressenden spezialisierten und generalistischen phyllophagen Insekten eine Rolle zu spielen. Diese Pflanzen enthalten Iridoidglycoside. Die Spezialisten vermeiden die Freisetzung des toxischen Aglykons ebenfalls durch eine geringe Aktivität endogener β -Glucosidase. Generalisten hingegen zeigen eine hohe endogene Aktivität dieses Enzyms und werden durch die freigesetzten toxischen Substanzen entsprechend stärker tangiert (S. Dobler, H. Pankoke, persönliche Mitteilung). Eigene Versuche zur Aktivität endogener β -Glucosidasen des Mexikanischen Bohnenkäfers lassen ebenfalls eine reduzierte β -Glucosidase Aktivität auf hoch cyanogenen Limabohnen vermuten, wohingegen auf schwächer cyanogenen Genotypen eine höhere Aktivität dieses Enzyms festgestellt werden konnte (Ballhorn, unveröffentlichte Daten). Die Verminderung der β -Glucosidase Aktivität scheint ein generelles Prinzip der Anpassung an

toxische Komponenten enthaltende Glucoside zu sein. Dieses funktioniert allerdings nur dann, wenn nicht von vornherein eine hohe β -Glycosidase - Aktivität im aufgenommenen Pflanzenmaterial vorliegt.

Als weitere Erklärung für Adaptationsvorgänge an cyanogene Vorstufen kommen neben der Absenkung der β -Glucosidase Aktivität im Wesentlichen zwei an der Cyanid-Detoxifikation beteiligte Enzyme in Betracht. Hierbei handelt es sich um die bei Tieren wie Pflanzen weit verbreitete β -Cyanoalaninsynthase sowie die bei höheren Tieren vorherrschende Rhodanase (siehe Abbildung 3 A, B). Letztere überführt HCN und Thiosulfat in das weniger toxische Thiocyanat und Sulfid. Die β -Cyanoalaninsynthase überführt HCN und L-Cystein in Schwefelwasserstoff (H_2S) und β -Cyano-L-alanin, das durch ein weiteres Enzym, die β -Cyanoalaninhydrolase in die proteinogene Aminosäure L-Asparagin umgewandelt werden kann [siehe Abbildung 3 A (Blumenthal et al., 1963; Castric et al., 1972; Selmar et al., 1988)]. Zahlreiche Studien zur Funktion und Aktivität der Rhodanase bei Insekten konnten zwar zeigen, dass dieses Enzym in die Toleranz cyanogener Nahrung involviert ist (Jones, 1972, 1998; Conn, 1979; Duffey, 1981; Long & Brattsten, 1982; Dowd et al., 1983; Beesley et al., 1985), jedoch scheint die β -Cyanoalaninsynthase für Insekten das

wichtigere Enzym zur Detoxifikation von Cyanid darzustellen (Ahmad et al., 1986; Brattsten, 1986). Der große Vorteil dieses Abbauweges ist die Einschleusung des in HCN enthaltenen Stickstoffs in den Aminosäurehaushalt (Wurtele et al., 1984; Brattsten, 1992). Arbeiten zur Induzierbarkeit beider Enzymsysteme an der Traubenkirschenlaus, *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae), eines auf die cyanogene Traubenkirsche (Rosaceae: *Prunus padus*) spezialisierten Insekts, ergaben eine direkte Korrelation der β -Cyanoalaninsynthase-Aktivität mit der saisonalen Variabilität des cyanogenen Status der Nahrungspflanze (Urbańska et al., 2002). Im Frühjahr, wenn die Konzentration der cyanogenen Vorstufen in der Wirtspflanze am höchsten war, zeigten die Blattläuse ebenfalls die höchste β -Cyanoalaninsynthase-Aktivität. Die im Jahresverlauf abnehmende Konzentration cyanogener Glykoside ging mit einer gleichfalls abnehmenden Aktivität der β -Cyanoalaninsynthase in den Insekten einher. Die Aktivität der Rhodanase blieb jedoch über den gleichen Zeitraum hinweg konstant; eine Abhängigkeit der Aktivität dieses Enzyms von der Konzentration cyanogener Vorstufen in der Nahrung konnte nicht nachgewiesen werden.

Viele Tiere (sowie Pflanzen, siehe Abbildung 3) besitzen also die Möglichkeit, Cyanid effizient zu detoxifizieren oder dessen Freisetzung zu vermeiden und auf den cyanogenen Status ihrer Nahrung mit

einer erhöhten bzw. verminderten Aktivität entsprechender Enzyme zu reagieren.

Im Vergleich zu physiologischen Reaktionen auf Seiten der pflanzlichen Interaktionspartner ist die physiologische Plastizität der Herbivore in Analysen von Herbivor-Pflanze Wechselwirkungen stark unterrepräsentiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die genetische und letztlich auch die physiologische Variabilität der Herbivore ebenfalls nicht erfasst. Um Effekte der Cyanogenese mit möglichst kleinem Fehler quantifizieren zu können waren jedoch Herbivore mit intraspezifisch homogener physiologischer Ausstattung und möglichst ähnlichem Verhalten erforderlich. Über die Verwendung definierter larvaler Entwicklungsstadien der Herbivore (Wüstenheuschrecke) bzw. durch konsequente Differenzierung nach Geschlechtszugehörigkeit (Mexikanischer Bohnenkäfer) wurde der Faktor „physiologische Variabilität“ zumindest reduziert. Larvenstadien zeigen weniger komplexe Verhaltensweisen als adulte Insekten, da bei ihnen sensorische Leistungen, die z. B. während der Oviposition aber auch bei der Partnerfindung für die Imagines von entscheidender Bedeutung sind, noch nicht benötigt werden (Hanson, 1979). Entsprechend der Notwendigkeit geeigneter Wirtspflanzen zur Oviposition zu finden, sind weiblicher Insekten gegenüber ihren männlichen Artgenossen häufig erheblich sensibler für qualitative und

quantitative chemische Merkmale ihrer Wirtspflanzen (Smith et al., 1979).

IV. 4. 1 Herbivore auf cyanogenen Pflanzen

Das „specialist-herbivore-paradigm“ besagt, dass spezialisierte Herbivore nicht oder nur geringfügig negativ durch die chemische Verteidigung ihrer Wirtspflanzen beeinflusst werden (Whittaker & Feeny, 1971; Feeny, 1976; Blau et al., 1978; Rhoades, 1979; Van Dam et al., 1993; Dyer, 1995; Giamoustaris & Mithen, 1995; Van Der Meijden, 1996). Für den Bohnenkäfer konnten jedoch deutliche limitierende Effekte eines hohen cyanogenen Potenzials seiner Wirtspflanzen nachgewiesen werden (Manuskript 4, unveröffentlichte Daten). Ist der Bohnenkäfer nun ein Spezialist oder ein oligophages Insekt? Die Limabohne ist nicht seine einzige Wirtspflanze (siehe Abschnitt I. 6. 3). Dennoch sind im Zuge der wechselseitigen Beeinflussung Mechanismen entstanden, über welche die Käfer mit den toxischen Substanzen dieser Wirtspflanze erfolgreich umgehen können. Bei der Beurteilung des Spezialisierungsgrades des Bohnenkäfers ist zu bedenken, dass zahlreiche in der Literatur als spezialisierte Herbivore eingestufte Insekten nicht nur von einer Pflanzenart, noch nicht einmal von Arten derselben Familie leben. Der Große und

der Kleine Kohlweißling (Lepidoptera: Pieridae: *Pieris brassicae* und *Pieris rapae*), beide in der biochemisch-ökologischen Forschung immer wieder als spezialisierte Insekten verwendet (Ohsaki & Sato, 1994; Renwick & Lopez, 1999; Traw & Dawson, 2002), fressen an einer ganzen Reihe von Brassicaceae (*Brassica* sp., *Reseda lutea*, etc.), zusätzlich jedoch auch auf der Kapuzinerkresse (Tropaeolaceae: *Tropaeolum majus*), sowie auf der Kuherbse [Fabaceae: *Vigna unguiculata* (Renwick & Lopez, 1999)]. Der Tabakswärmer (Lepidoptera: Sphingidae: *Manduca sexta*), ein in der biochemisch-ökologischen Forschung ebenfalls häufig verwendeter Spezialist, frisst nicht nur an Tabak sondern an zahlreichen Solanaceae (Orozco-Cárdenas et al., 1993; Osier et al., 1996), genau wie der Kartoffelkäfer (Coleoptera: Chrysomelidae: *Leptinotarsa decemlineata*) sich nicht nur von Blättern der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) ernährt, sondern ebenso das Laub der Tomate (Solanaceae: *Lycopersicon esculentum*), des Schwarzen Nachtschattens (Solanaceae: *Solanum nigrum*) und des Bittersüßen Nachtschattens (Solanaceae: *Solanum dulcamara*) als Nahrungsquelle nutzen kann (Arnett, 2000). In der Reihe dieser Beispiele wäre der Mexikanische Bohnenkäfer, der auf einer sehr begrenzten Zahl von Fabaceen frisst, konsequenter Weise ebenfalls als ein Spezialist einzuordnen. Andernfalls wären

die anderen Tiere umgekehrt als oligophage Insekten einzustufen — was die Aussage einiger hochrangiger Veröffentlichungen zumindest verändern würde (z. B. Van Dam et al., 2000; Halitschke et al., 2001, 2003; Winz & Baldwin, 2001; Voelckel & Baldwin, 2004).

Nicht nur für den Mexikanischen Bohnenkäfer konnten konzentrationsabhängige Effekte sekundärer Metabolite von Pflanzen gegenüber ihren spezialisierten Fraßfeinden beschrieben werden. So konnten z. B. Agrawal und Kurashige (2003) für *Pieris rapae*, den Kleinen Kohlweißling zeigen, dass Isothiocyanate der Wirtspflanzen dosisabhängig die Wachstumsrate der Tiere verringerten sowie Entwicklungsdauer und Mortalität erhöhten.

Es gibt einige auf cyanogene Pflanzen spezialisierte Herbivore zu denen zahlreiche Arbeiten vorliegen. Mehrere Arten der Zygenidae und der Papilionoidea (Lepidoptera) sind biochemisch detailliert untersucht (Nahrstedt & Davis, 1981; Davis & Nahrstedt, 1987; Nahrstedt, 1989; Gebrehiwot & Beuselinck, 2001; Zagobelny et al. 2004). Sequestration und Synthesewege (Wray et al., 1983; Conn, 1991b; Holzkamp & Nahrstedt, 1994), Akkumulation und Abbau cyanogener Vorstufen (Davis & Nahrstedt, 1979; Witthohn & Naumann, 1987b) sowie die Cyanid-Detoxifikationsmechanismen dieser Tiere sind bekannt (Witthohn & Naumann, 1987a; Nahrstedt, 1993). In

bemerkenswertem Gegensatz zu diesem umfangreichen Wissen zu den biochemischen Leistungen der Insekten steht die praktisch unbekannt ökologische Bedeutung der Cyanogenese in der Interaktion dieser Tiere mit ihren Wirtspflanzen. Dies gilt ebenfalls für die dritte trophische Ebene, d. h. für die Interaktion der Insekten mit Parasitoiden und Prädatoren. Bei diesen offenbar hochspezialisierten Herbivoren, die in der Lage sind, cyanogene Vorstufen ihrer Nahrung zu sequestrieren, zu akkumulieren und sogar *de novo* zu synthetisieren sind sowohl positive als auch negative Effekte hoher Konzentrationen cyanogener Vorstufen in der Nahrung denkbar (Agrawal & Kurashige, 2003).

IV. 5 Das verwendete System: Limabohne in der Interaktion mit generalistischen und spezialisierten Herbivoren

Die vorliegende Arbeit bietet neue, reproduzierbare und quantifizierbare Aussagen zur ökologischen Funktion der pflanzlichen Cyanogenese. Über die selektive Zusammenstellung gut beschriebener Genotypen von *P. lunatus* konnte ein experimentelles System etabliert werden, das die Möglichkeit bot, die Funktion der Cyanogenese gegenüber generalistischen und spezialisierten Herbivoren zu analysieren. Mit Hilfe dieses

Systems konnte quantitativ nachgewiesen werden, dass die Identifikation spezifischer, anti-herbivorer Effekte der Cyanogenese die Unterscheidung funktioneller Ebenen dieses Merkmals erfordert. Die Cyanogenese ist ein polyfaktorielles Merkmal, welches in Form des cyanogenen Potenzials (HCN_p = Konzentration cyanogener Vorstufen in einem Gewebe) sowohl eine statische, als auch hinsichtlich der cyanogenen Kapazität (HCN_c = Freisetzung von Blausäure pro Zeit) eine kinetische Größe beinhaltet. Der bittere Geschmack cyanogener Glycoside ermöglicht es evtl. den Herbivoren, diese Substanzen zu detektieren und somit eine Vergiftung zu vermeiden (Nahrstedt, 1985b, 1989). Die cyanogene Kapazität (HCN_c), die Freisetzung von Blausäure aus diesen Vorstufen nach Zellverletzung, bedeutet die direkte Konfrontation mit einem toxischen Produkt (Miguel & Alberto, 2005).

Insbesondere der quantitativ-funktionellen Analyse der Kinetik der Blausäurefreisetzung in der Herbivorpflanze Interaktion wurde in der Vergangenheit nur wenig Aufmerksamkeit zu Teil. Alle tatsächlich mit quantitativ-kinetischen Aspekten der Cyanogenese arbeitenden Studien zu diesem Aspekt sind neueren Datums (Goodger et al., 2002; Miguel & Alberto, 2005). Die geringe Zahl der Arbeiten zu kinetischen Aspekten der Blausäurefreisetzung in der Herbivorpflanze Interaktion steht in starkem

Gegensatz zu zumindest semi-quantitativen Untersuchungen des HCNp (z. B. Briggs, 1990; Calatayud et al., 1994; Caradus & Forde, 1996), wobei auch hier funktionelle Zuordnungen meist fehlen. Diese Situation ist erstaunlich. Es erscheint naheliegend, dass die Abschreckung eines Herbivoren wesentlich durch Geschwindigkeit der Blausäurefreisetzung als Antwort auf Gewebeverletzung durch Fraß beeinflusst wird (Miguel & Alberto, 2005).

Die vorliegende Arbeit demonstriert, dass die qualitative Klassifizierung einer Pflanze als „cyanogen“ ohne die Berücksichtigung dieser funktioneller Aspekte (HCNp und HCNc) keine definitiven Schlüsse hinsichtlich des tatsächlichen Verteidigungsstatus der Pflanze gegenüber Fraßfeinden zulässt. Eine quantitative Analyse der spezifisch vorliegenden Herbivor-Pflanze Interaktionen ist unabdingbar, um eine Aussage zu der ökologischen Funktion der Cyanogenese in der jeweiligen Wechselwirkung treffen zu können. Sowohl in Versuchen mit der Wüstenheuschrecke [(*Schistocerca gregaria*), Manuskript 1] als auch mit dem Mexikanischen Bohnenkäfer [(*Epilachna varivestis*), Manuskript 2, 4] konnten beiden Ebenen in Abhängigkeit ihrer Ausprägung und Kombination sehr unterschiedliche Effekte auf die Herbivore zugeordnet werden.

IV. 5. 1 Die Limabohne in der Interaktion mit einem generalistischen Herbivor

Thema des ersten Kapitels (Manuskript 1) der Arbeit war die Interaktion der Wüstenheuschrecke (*Schistocerca gregaria*) mit der Limabohne. Ziel war die Analyse von Effekten beider funktioneller Ebenen der Cyanogenese auf einen generalistischen Herbivor. In Fraßversuchen mit unterschiedlich cyanogenem Blattmaterial verschiedener Akzessionen wurde das Verhalten der Tiere während des Fraßes und der dazwischen liegenden Ruhepausen beobachtet und die Reaktionen der Tiere entsprechend ihrer Abweichung vom „Normalverhalten“ unterschiedlichen Kategorien zugeordnet. Als Normalverhalten wurden dabei diejenigen Verhaltensweisen der Tiere definiert, die während und nach der Aufnahme nicht cyanogenen Blattmaterials von *Phaseolus vulgaris* cv. Saxa bzw. von Weizenblättern (*Triticum aestivum*) beobachtet wurden (Manuskript 1).

An dieser Stelle muss allerdings betont werden, dass es sich bei diesem „Normalverhalten“ um ein nur unter diesen experimentellen Bedingungen normales Verhalten handelte. Insgesamt weichen die in der verwendeten Luftstromapparatur vorliegenden äußeren Bedingungen (siehe Manuskript 1) recht stark von den Bedingungen ab, die im Freiland erwartet

werden können. Entsprechend ist auch das als Normalverhalten interpretierte Verhalten der Tiere nur eine relative Größe.

Abweichungen von diesem Verhalten in Abhängigkeit des angebotenen Pflanzenmaterials wurden als Anzeichen einer Intoxikation gedeutet. Die auftretenden Merkmale wurden nach dem Grad der Beeinträchtigung des Tieres steigenden Intoxikationsgraden zugeordnet. Diese Zuordnung erschien legitim, da es sich bei den auftretenden Symptomen um kumulative Reaktionen handelte; d. h. zu grundlegenden Beeinträchtigungen wie reduzierter Mobilität kamen weitere Symptome hinzu, ohne dass andere ausfielen. Zusätzlich wurden die Symptome steigender Intoxikation über die Zufuhr exogener Blausäure verschiedener Konzentrationen verifiziert und konnten kausal auf die Gegenwart freier Blausäure zurückgeführt werden.

Über die Verhaltensbeobachtung in Kombination mit der quantitativen Erfassung gefressenen Blattmaterials konnte zunächst ein hoch cyanogener Status der Pflanze (hohes HCNp und hohe HCNC) zweifelsfrei als der eine stark abschreckende Wirkung bedingende Faktor identifiziert werden. Blattmaterial mit geringem cyanogenem Status hingegen wurde von den Heuschrecken in großen Mengen gefressen — führte aber zu deutlich stärkeren Symptomen der Intoxikation. Die Bilanzierung aufgenommenen und abgegebenen

Cyanids ergab, dass die absolut im gefressenen Blattmaterial enthaltenen Cyanidmengen bei Fraß an hoch und schwach cyanogenen Akzessionen vergleichbar waren. Jedoch war die prozentual während des Fraßvorgangs freigesetzte Cyanidmenge bei den hoch cyanogenen Akzessionen, und insbesondere beim Wildtyp, deutlich höher als bei schwach cyanogenen Limabohnen. Im Kot der Tiere wurde kein Cyanid nachgewiesen. Dies lässt mit gegebener Vorsicht darauf schließen, dass zum einen der substanziellen HCN-Freisetzung während des Fraßvorgangs eine wichtige Funktion bei der Herbivorabschreckung zukommt. Zum anderen hat offenbar die Lokalisation dieser Freisetzung — wie von Miguel und Alberto (2005) postuliert — großen Einfluss auf die Schwere der Intoxikation des Herbivoren. Die HCN-Freisetzung im Magen-Darmtrakt, also im Inneren des Tieres hat ein größeres toxisches Potenzial als die Freisetzung im Bereich der Mundwerkzeuge. Dass es zu einer Freisetzung von Blausäure im Verdauungstrakt der Tiere gekommen sein musste, zeigen die nur minimalen Konzentrationen cyanogener Vorstufen im Kot der Heuschrecken. Der Befund, dass der weitaus überwiegende Teil aufgenommenen Cyanids nicht wiedergefunden wurde, spricht zusätzlich für eine Freisetzung und/oder Metabolisierung im Körper der Tiere.

Es konnte somit anhand dieses Herbivor-Pflanze Systems zwischen zwei

unterschiedlichen Formen der Abwehrwirkung gegenüber generalistischen Herbivoren differenziert werden, einer Abschreckung des Herbivoren durch ein hohes HCNp und vor allem durch eine hohe HCNc und seiner Intoxifikation nach extensivem Konsum schwach cyanogenen Blattmaterials.

Ein hoher cyanogener Status nützt also sowohl der Pflanze (es wird wenig Blattmaterial gefressen) als auch den Tieren (sie erkennen die Toxizität der Pflanze, vermeiden ausgedehnten Fraß und in der Konsequenz die eigene Vergiftung).

Im Hinblick auf die evolutionäre Fitness der Pflanzen sind die Ergebnisse schwer zu erklären. Für die Fitness sowohl der Pflanze als auch des Herbivoren wäre es vorteilhafter wenn Letzterer direkt abgeschreckt wird als wenn er nach extensiver Nahrungsaufnahme — und dementsprechend starker Schädigung der Pflanze — eine schwere Vergiftung erleidet (Dicke & Sabelis, 1989; Edwards, 1989; Grubb, 1992). Bei der Betrachtung im evolutionären Kontext ist jedoch zu berücksichtigen, dass es sich mit Ausnahme der Akzession 2233 bei allen analysierten Akzessionen um züchterisch mehr oder weniger stark bearbeitete Kulturformen der Limabohne handelte. Die Pflanzen wurden hinsichtlich produktionsrelevanter Parameter, also anderer Parameter als der optimalen Verteidigung, selektiert. Andererseits, in Anbetracht der begrenzten Möglichkeiten des Pflanzen-

schutzes in der kleinbäuerlichen Subsistenzwirtschaft, dürfte bei den ursprünglichen Kulturformen aus Mittelamerika und der Karibik ein gewisser Resistenzgrad der Bohnenpflanzen durchaus Teil der züchterischen Selektion gewesen sein. Aus den Ergebnissen dieser Studie lassen sich letztlich nur bedingt direkte Schlüsse bezüglich der Rolle verschiedener cyanogener Komponenten (HCNp und HCNc) in vom Menschen unbeeinflussten co-evolutiven Systemen ziehen. Die Ergebnisse liefern jedoch entscheidende Anhaltspunkte zur Wirkungsweise und zur ökologischen Bedeutung der einzelnen Komponenten für die Interaktion cyanogener Pflanzen mit generalistischen Herbivoren und verdeutlichen die Wichtigkeit der Differenzierung funktioneller Ebenen der Cyanogenese.

IV. 5. 2 Die Limabohne in der Interaktion mit einem spezialisierten Herbivor

Das Interaktionssystem Limabohne und Mexikanischer Bohnenkäfer unterscheidet sich wesentlich von dem System Limabohne und Wüstenheuschrecke. Im Gegensatz zur Heuschrecke stellt die Limabohne für den Bohnenkäfer nicht nur eine geeignete, sondern seine favorisierte Nahrungspflanze dar und er ist in der Lage, sich auf dieser Pflanze erfolgreich zu reproduzieren (Lapidus et al., 1963; Dover et al., 1988).

In der Analyse der Wechselwirkung zwischen der Limabohne und dem Bohnenkäfer standen zwei Fragen im Vordergrund:

1. Spielen cyanogene Eigenschaften der Limabohne und wenn ja welche — das HCNp oder die HCNC — für die Erkennung geeigneter Wirtspflanzen eine Rolle?

2. Kann die Cyanogenese als ein Verteidigungsmechanismus seiner bevorzugten Nahrungspflanze die Entwicklung des Bohnenkäfers direkt oder über den Zeitraum mehrerer Generationen hinweg beeinflussen?

Erstere Frage konnte im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden (Manuskript 2). Die letztere Fragestellung wurde in einer weiterführenden, eingereichten jedoch noch nicht veröffentlichten Studie untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie (Manuskript 4, Seite 30) werden im Folgenden ebenfalls diskutiert, um die Bedeutung der Cyanogenese für dieses Interaktionssystem zu verdeutlichen.

Für die funktionelle Analyse cyanogener Eigenschaften im Limabohnen-Bohnenkäfer System stand ein sehr differenziertes Set von Limabohnen unterschiedlicher cyanogener Leistungen zur Verfügung. Über zusätzliche Screenings wurden Akzessionen dieser Bohne zusammengestellt, deren Eigenschaften von

geringem HCNp und minimaler HCNC (2441), geringem HCNp und geringer HCNC (8067, 8079, 8071), hohem HCNp und minimaler HCNC (2116) bis hin zu Akzessionen mit sowohl hohem HCNp als auch hoher HCNC (2357, 8078, WT, 1315, 1259) reichten (Manuskripte 1, 2, 3). In Auswahlversuchen zur Ovipositions-Präferenz (Manuskript 2) wurden den Käfern jeweils vier Pflanzen verschiedener Akzessionen angeboten, die sich in ihren cyanogenen Eigenschaften je nach experimentellem Ansatz unterschieden oder ähnelten. Die Ergebnisse weisen deutlich aus, dass die Konzentration cyanogener Vorstufen an sich, das cyanogene Potenzial, keinen Einfluss auf die Ovipositionsentscheidung des Weibchens hatte (Manuskript 2). Limabohnen mit einem sehr hohem cyanogenen Potenzial aber aufgrund einer äußerst niedrigen β -Glucosidaseaktivität nur sehr geringen cyanogenen Kapazität (Akzession 2116) wurden von den Tieren nicht als cyanogen erkannt. Diese Pflanzen wurden solchen Pflanzen signifikant vorgezogen, die sowohl ein hohes HCNp als auch eine hohe HCNC besaßen. In Ansätzen mit Pflanzen der Akzession 2116 und Pflanzen mit sowohl geringem HCNp als auch geringer HCNC zeigten die Käfer jedoch keine Präferenz für eine der Akzessionen. Als für die Ovipositionsentscheidung wirksames Prinzip konnte somit eindeutig die cyanogene Kapazität identifiziert werden (Manuskript 2, Abb. 1).

Der Bohnenkäfer wurde als ein mehr oder weniger spezialisiertes Insekt eingestuft (siehe Abschnitt IV. 4. 1). Warum ist für diesen Käfer, für den angenommen werden muss, dass er mit toxischen Substanzen seiner Wirtspflanzen physiologisch umgehen kann, die Identifikation von Wirtspflanzen mit bestimmten cyanogenen Eigenschaften wichtig?

Trotz seiner — sowohl beschriebenen als auch in eigenen Versuchen bestätigten — Präferenz für die Limabohne an sich, hat der cyanogene Status seiner Wirtspflanze für den Käfer große Bedeutung. In weiterführenden Langzeitstudien konnten eindeutig negative Effekte auf die individuelle Entwicklung und Reproduktion der Käfer auf hoch cyanogenen Pflanzen identifiziert werden (Manuskript 4). Interessanterweise war hinsichtlich solcher Langzeiteffekte die Konzentration cyanogener Vorstufen, also das HCNp, der allein verantwortliche Faktor für die von Generation zu Generation schlechtere Entwicklung und Reproduktion der Tiere. Dies kann nach bisherigem Stand der Untersuchungen nur den Schluss zulassen, dass die Identifikation einer hoch cyanogenen und damit als Wirtspflanze weniger geeigneten Limabohne durch den Bohnenkäfer, ausschließlich über deren Fähigkeit zur Freisetzung von Blausäure, also über die Höhe ihrer cyanogenen Kapazität geschieht (Manuskript 2).

Unterschiedliche funktionelle Ebenen der Cyanogenese — die cyanogene Kapazität und das cyanogene Potenzial — beeinflussen sowohl das Wahlverhalten des Bohnenkäfers, als auch seine Entwicklung und Reproduktion auf der Limabohne.

IV. 5. 2. 1 Langzeiteffekte und potenzielle Populationsentwicklung

Die beobachteten Langzeiteffekte eines hohen cyanogenen Potenzials auf Reproduktion und Entwicklung des Bohnenkäfers stellen Faktoren dar, die sich möglicherweise auf die Populationsentwicklung der Tiere auswirken können.

Es gibt Arbeiten, die eindeutig demonstrieren, dass pflanzliche Resistenzmechanismen das Verhalten, die Entwicklung und die Reproduktion individueller Insekten limitieren (Engelmann, 1970; Fritz & Simms, 1992). Aufgrund dieser Erkenntnisse wird allgemein angenommen, dass solche pflanzlichen Mechanismen ebenfalls die Entwicklung von Insektenpopulationen beeinflussen können (z. B. Hassel et al., 1976; Rhoades, 1983, 1985; Hunter & Price, 1992; Belovsky & Joern, 1995; Underwood & Rausher, 2000). Studien allerdings, welche die quantifizierte Reproduktion und Populationsentwicklung phytophager Insekten tatsächlich mit ebenfalls quantifizierter pflanzlicher Resistenz in Bezug

setzen, gibt es nur wenige (Webb & Moran, 1978; Karban, 1986).

Verschiedene theoretische Ansätze (Rhoades, 1985; Schultz, 1988; Edelstein-Keshet & Rausher, 1989; Turchin & Taylor, 1992; Lundberg et al., 1994; Turchin, 1995; Underwood, 1999) sagen voraus, dass induzierte Resistenz zur dichteabhängigen Regulation von Insektenpopulationen beitragen sollte. Da die Stärke der Ausprägung induzierter Resistenz einer einzelnen Pflanze und letztlich auch innerhalb von Populationen von der Dichte der vorhandenen Herbivoren abhängen kann (Karbon & Baldwin, 1997; Underwood, 2000), wurde induzierte Resistenz als eine mögliche Grundlage dichteabhängiger Rückkopplung auf die Größe und Entwicklung von Populationen phytophager Insekten betrachtet (Underwood & Rausher, 2002).

Die Bedeutung präformiert vorliegender Resistenzmechanismen für die Populationsentwicklung von Herbivoren — egal ob spezialisiert oder nicht — ist in diesem Zusammenhang bislang wenig untersucht (Rhoades, 1985). Ob solche dichteunabhängigen Verteidigungsformen überhaupt das Potenzial haben die Entwicklung von Populationen zu beeinflussen, ist grundsätzlich unklar (Rhoades, 1985).

Für den Mexikanischen Bohnen-käfer konnte eine zunehmend verminderte Reproduktion in Abhängigkeit des cyanogenen Potenzials der Nahrungspflanzen nachgewiesen werden (Manuskript 4). Zusammen mit der signifikant längeren Entwicklungsdauer der Käfer auf solch hoch cyanogenen Limabohnen sind wichtige Grundvoraussetzungen gegeben, die potenziell Einfluss auf die Populationsentwicklung dieser Tiere im Freiland nehmen könnten. Eine längere Entwicklungsdauer hat statistisch zunächst einen direkten die Fitness der Tiere reduzierenden Effekt. Durch die längere Phase bis zur erneuten Reproduktion wird schlichtweg die Wahrscheinlichkeit erhöht, in dieser Zeit zu sterben. Die verlängerte Exposition gegenüber Prädatoren, Parasitoiden und Pathogenen hat also entscheidenden Einfluss auf die Fitness der Tiere. Die Verlängerung eines reproduktiven Zyklus kann aber noch weitere Effekte haben. Eine verlangsamte Entwicklung hat dann einen zusätzlichen entscheidenden Einfluss, wenn die Aktivität der Tiere im Jahresverlauf durch äußere Faktoren, gleich welcher Art, limitiert wird. Bereits die Verlängerung des reproduktiven Zyklus um wenige Tage, eine Situation wie sie auf hoch cyanogenen Limabohnen gegenüber schwach cyanogenen

Artgenossen unter Laborbedingungen nachgewiesen werden konnte, kann in der Summe mehrerer Generationen pro Vegetationsperiode dazu führen, dass eine Generation pro Jahr ausfällt. Bereits bei einer nur geringfügig verlangsamten Entwicklung der Tiere resultieren aus der Addition dieser Verzögerungen relevante Zeiträume.

Wodurch die verlangsamte Entwicklung individueller Tiere und die in Langzeitversuchen nachgewiesene, stetig abnehmende Reproduktion der Käfer von Generation zu Generation auf Pflanzen mit hohem HCNp genau bedingt war, kann letztlich nicht mit Sicherheit gesagt werden. Allerdings sind die durch die permanent hohe Expression Cyanid abbauender Enzyme entstehenden Kosten für den Metabolismus der Tiere durchaus eine mögliche Erklärung für diese Effekte auf hoch cyanogenen Limabohnen. Die Energie, die für die erhöhte Synthese detoxifikationsrelevanter Enzyme auf hoch cyanogenen Wirtspflanzen bereitgestellt werden muss (siehe Abbildung 3), steht der Synthese digestiver Enzyme oder Prozessen der Oogenese nicht mehr zur Verfügung (Urbańska et al., 2002). Zusätzlich können auch während der Cyanid-Detoxifikation entstehende Produkte direkt toxische Effekte haben. Wird von einer wahrscheinlichen Beteiligung der β -Cyanoalaninsynthese in der Detoxifikation von Cyanid ausgegangen, ist zu berücksichtigen, dass β -Cyanoalanin ein Neurotoxin darstellt

(Ressler et al., 1969; Nahrstedt, 1985a; Lindroth, 1991), dass ebenfalls physiologische Kosten verursachen kann. Gleiches gilt für eine potenzielle Beteiligung von Rhodanase in der Detoxifikation von Cyanid. Bei dem hierbei entstehenden Thiocyanat und Sulfit handelt es sich um Enzyminhibitoren (Urbańska et al., 2002).

IV. 6 Cyanogenese der Limabohne — konstitutive oder induzierbare Verteidigung?

Pflanzen können auf die Verfügbarkeit von Ressourcen sowie auf abiotische oder biotische Stressfaktoren nicht nur mit vorprogrammierten Wachstumsreaktionen, d.h. Veränderungen im Biomassezuwachs reagieren (Silvertown & Gordon, 1989; Aphalo & Ballaré, 1995; Taiz & Zeiger, 2000). Sowohl bei der biochemischen als auch bei der physikalischen Abwehr (z. B. Pullin & Gilbert, 1989; Hartvigsen & McNaughton, 1995; Tschardt et al., 2001; Boughten et al., 2005) kann zwischen konstitutiven bzw. präformierten und induzierten Mechanismen unterschieden werden. Konstitutive biochemische Abwehrmechanismen oder morphologisch-anatomische Strukturen werden von der Pflanze generell gebildet, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Feinden oder Pathogenen (Underwood & Rausher, 2002). Induzierte Abwehr bzw. Resistenz hingegen stellt

eine Antwort der Pflanze auf einen äußeren Reiz physikalischer oder chemischer Art dar. Induzierte Abwehr kann somit am einfachsten definiert werden als eine Erhöhung des pflanzlichen Verteidigungsstatus infolge einer Beschädigung durch Herbivore oder Pathogene (Underwood & Rausher, 2002). Dies kann im Rahmen der biochemischen Verteidigung sowohl eine lokal begrenzte oder systemische Antwort der Pflanze in Form einer Neusynthese sekundärer Pflanzenstoffe und PR-Proteine, Proteinase-Inhibitoren etc., als auch die post-translationale Aktivierung von verteidigungsrelevanten Enzymen bedeuten (Green & Ryan, 1972; Hartley & Lawton, 1991; Karban & Baldwin, 1997). Der weit verbreitete Mechanismus der enzymatisch katalysierten Freisetzung bioaktiver Stoffe aus bereits vorhandenen, akkumulierten Vorstufen als Reaktion auf Verletzung ist in diesem Zusammenhang als ein konstitutiver Mechanismus zu interpretieren [„Phytoanticipine“ (Osborn, 1996b)], es sei denn, die Synthese bzw. Konzentration dieser Vorläufer kann als Antwort auf äußere Reize erhöht oder ihre Zusammensetzung verändert werden (Steele et al., 1995).

In diese Gruppe der konstitutiven Verteidigung, basierend auf präformierten, zunächst biologisch inaktiven Vorstufen, wird auch die Cyanogenese eingeordnet; die Cyanogenese stellt nach bisheriger Meinung somit eine konstitutive, chemische und direkte, aber polyfaktoriell

geregelt Verteidigung der Pflanze gegen Fraßfeinde dar (Hayden & Parker, 2002).

Es wurde immer wieder eine quantitative Variabilität cyanogener Vorstufen infolge äußerer, meist abiotischer Faktoren festgestellt (Collinge & Hughes, 1982; Pederson et al., 1996; Stockmal & Oleszek, 1997). In einigen wenigen Fällen wurde auch eine Erhöhung der Konzentration cyanogener Vorstufen in Pflanzengeweben biotischen Faktoren zugesprochen. So wurde z. B. von Cooper-Driver et al. (1977) der saisonale Anstieg cyanogener Vorstufen in Adlerfarn (Dennstaedtiaceae: *Pteridium aquilinum*) mit dem gleichzeitigen Anstieg des Herbivoriedrucks während des Sommers in Verbindung gebracht. Die Autoren argumentieren, dass die Anwesenheit von Herbivoren entweder direkt oder indirekt verantwortlich für den Anstieg der Konzentration cyanogener Vorstufen in den Pflanzen war. Eine direkte Antwort der Pflanzen wäre somit eine Induktion der Synthese cyanogener Glycoside in Folge von Herbivorieschäden wie im Fall der Alkaloide von *Nicotiana attenuata* (Baldwin, 1994; Baldwin et al., 1994). Als indirekte Antwort wären demnach coevolutive Aspekte in Betracht zu ziehen, denen zufolge Pflanzen, deren saisonal höchste Konzentration cyanogener Vorstufen mit der Periode des höchsten Herbivoriedrucks zusammenfällt, einen selektiven Vorteil genießen. Solche indirekten Effekte sind grundsätzlich möglich; die Synthese von anti-herbivoren

phenolischen Substanzen in der Douglasie (Pinaceae: *Pseudotsuga menziesii*) ist zeitlich eng mit dem Schlüpfen ihres Hauptfraßfeindes korreliert, dem Douglasien-Borkenkäfer [Coleoptera: Scolytidae (Zou & Cates, 1995; Pureswaran et al., 2004)].

In der genannten Studie zum cyanogenen Status des Adlerfarns (Cooper-Driver et al., 1977) sind jedoch direkte ontogenetische und klimatische Effekte, welche die Konzentration cyanogener Glykoside beeinflussen können, nicht auszuschließen (Calatayud et al., 1994; Hopkins, 1995). Ob, und unter welchen Umständen die Synthese cyanogener Glykoside induzierbar ist, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Jedenfalls scheint für diese stickstoffhaltigen Substanzen keine derart eindeutige Situation vorzuliegen wie das z. B. für die unmittelbar durch Fraß induzierbare Nikotinsynthese des Tabaks der Fall ist (Gulmon & Mooney, 1986; Ohnmeiss & Baldwin, 1994).

In dieser Arbeit konnte für die Limabohne ebenfalls keine Erhöhung des cyanogenen Potenzials als Antwort auf Herbivorie durch Bohnenkäferlarven und Spinnmilben bzw. auf mechanische Beschädigung nachgewiesen werden (Manuskript 3). Die Aktivität der β -Glucosidase jedoch, eines der in die Blausäurefreisetzung aus cyanogenen Vorstufen involvierten und die Kinetik dieser Freisetzung entscheidend bestimmenden Enzyme, ließ sich durch

Herbivorie induzieren. Sowohl Spinnmilbenfraß als auch Fraß von Bohnenkäferlarven hatte bei einigen Akzessionen einen hoch signifikanten Anstieg der β -Glucosidaseaktivität zur Folge, der bei diesen Pflanzen mit einer ebenfalls hoch signifikanten Erhöhung der Blausäurefreisetzung einherging.

Die Muster dieser Aktivierung waren bei Vergleich dieser beiden Herbivore nicht identisch (Manuskript 3). Zudem hatte die rein mechanische Verletzung von Blättern praktisch keinen Effekt auf die Aktivität der β -Glucosidase und in der Konsequenz auch nicht auf die Blausäurefreisetzung, so dass, mit gebotener Vorsicht, auf herbivorenspezifische Reaktionen der Pflanzen geschlossen werden kann.

Die Existenz solcher herbivorenspezifischen Reaktionen von Pflanzen ist bekannt (z. B. Schittko et al., 2000; Halitschke et al., 2001; Winz & Baldwin, 2001; Voelckel & Baldwin, 2004). Um die auch mit induzierter Verteidigung verbundenen Kosten zu minimieren, ist es für eine Pflanze von Vorteil, mit spezifischen Verteidigungsstrategien auf den angreifenden Herbivor zu reagieren. Diese differenzierten Antworten konnten sowohl auf der Transkriptionsebene (Voelckel & Baldwin, 2004), auf Ebene von Signalmolekülen (z.B. Jasmonsäure: Schittko et al., 2000; Halitschke et al., 2001, 2003; oder Ethylen: Kahl et al., 2000), auf Ebene verteidigungsrelevanter Verbindungen z. B. Nikotin (Winz &

Baldwin, 2001) oder Proteinase-Inhibitoren (Stout et al., 1994; Tamayo et al., 2000) als auch auf Ebene emittierter volatiler Verbindungen (VOCs) nachgewiesen werden (Takabayashi et al., 1995; De Moraes et al., 1998). Die Induktion und das Zusammenspiel solcher biochemischen und physiologischen Antworten sind komplex. Durch Herbivor-spezifische physikalische und chemische Reize werden Signaltransduktionsketten in Gang gesetzt, die ihrerseits schließlich zu einer Aktivierung verteidigungsrelevanter Gene führen (Voelckel & Baldwin, 2004).

Ob der nachgewiesenen Erhöhung der β -Glucosidase Aktivität und der Erhöhung der cyanogenen Kapazität als Antwort auf Herbivorie eine entsprechend veränderte Genaktivität zugrunde lag, wurde nicht untersucht. Im Fall der Induktion der Cyanogenese spricht jedoch der Zeitraum von 72 Stunden zwischen beginnender Blattschädigung durch Herbivore und einer messbaren Erhöhung der β -Glucosidaseaktivität und in der Konsequenz der cyanogenen Kapazität eher für eine Aktivierung entsprechender Gene als für eine post-translationale Aktivierung vorhandenen Enzyms. Die praktisch nicht stattfindende Induktion der β -Glucosidaseaktivität nach mechanischer Verletzung lässt vermuten, dass Pflanzen zwischen einer solchen artifiziellen Verletzung und einer Verletzung infolge von Tierfraß unterscheiden können (Baldwin, 1988). Ähnliche Befunde nur schwacher Reaktionen der Pflanzen auf

rein mechanische Verletzung gibt es für die Emission von VOCs. Turlings et al. (1990), Mattiacci et al. (1994) sowie Paré und Tumlinson (1997) dokumentierten, dass sowohl die Anzahl als auch die Quantität emittierter Verbindungen nach mechanischer Verletzung deutlich geringer war als nach einer Verletzung durch Herbivore. Ein Ansatz zur Erklärung dieser Unterschiede könnte sein, dass Pflanzen in der Lage sind, zwischen den einmaligen Ereignissen mechanischer Verletzung und kontinuierlicher Verletzung durch z. B. folivore Insekten zu unterscheiden. Der Einsatz von „Roboter-Raupen“, die Blättern eine länger anhaltende und definierte Schädigung, sehr ähnlich einer Schädigung durch Insektenfraß zufügten, führte tatsächlich zu einer Emission von VOC Bouquets, die denen nach echtem Insektenfraß emittierten Bouquets sehr ähnlich waren (Mithöfer et al., 1997). Die von mir während dieses Versuchs durchgeführten wiederholten, aber dennoch zeitlich getrennten Verletzungsereignisse waren möglicherweise dem Fraßmuster von Insekten oder anderen Herbivoren nicht ähnlich genug, um eine Induktion der β -Glucosidaseaktivität zu bewirken. Eine andere Möglichkeit, die ausbleibende Aktivierung der β -Glucosidase zu erklären ist, dass zur Induktion einer spezifischen Antwort der Pflanze, oder überhaupt einer Antwort, neben kontinuierlicher Verletzung Elicitoren (Verbindungen die eine bestimmte Antwort der Pflanze auslösen)

notwendig sind. Aus dem Speichel oder dem Regurgat phytophager Insekten isolierte Elicitoren der VOC-Emission enthalten verschiedene Enzyme (Mattiacci et al., 1995; Felton & Eichenseer, 1999; Funk, 2001) oder Fettsäure-Aminosäure-Konjugate (Alborn et al., 1997). Zumindest für Fettsäure-Aminosäure-Konjugate konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Blätter der Limabohne nicht auf diese Elicitoren reagieren (Spiteller et al., 2001; Truitt et al., 2004).

Definitive Aussagen zu den Mechanismen der durch Herbivorie ausgelösten Aktivierung der β -Glucosidase sind bislang nicht möglich. Dennoch ist aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit die bisherige Einordnung der Cyanogenese als eine strikt konstitutive Abwehr nicht mehr haltbar. Die Cyanogenese der Limabohne kann induziert werden. Diese erstmalig dokumentierte Induzierbarkeit der Cyanogenese (Manuskript 3) durch Fraß eröffnete einen neuen Komplexitätsgrad dieser Verteidigung, der zukünftig in Bewertung von Herbivor-Pflanze Interaktion mit einbezogen werden muss.

IV. 7 Konsequenzen der Arbeit für das Modell „Limabohne“

Die Limabohne ist mittlerweile ein sehr gut beschriebener Modellorganismus in der biochemisch-ökologischen Forschung (siehe Abschnitt I. 6. 1. 1). Genotypen dieser Pflanze dienen insbesondere Analysen der durch VOCs (volatile organic compounds) vermittelten Verteidigung gegen Herbivore. Die Bedeutung der Limabohne in diesem Bereich der Grundlagenforschung scheint, an der Zahl aktueller Studien gemessen, weiter zu steigen (z. B. Arimura et al., 2000a,b; Arimura et al., 2002; Horiuchi et al., 2003; Heil, 2004a,b, Kost & Heil, 2005a,b).

Was für Funktionen haben diese VOCs der Limabohne in der Pflanze-Tier Interaktion? Zum einen scheinen die VOCs direkt abschreckende Effekte auf Herbivore auszuüben (Heil, 2004b), der Fokus des Interesses liegt aber auf ihrer Funktion im Rahmen der indirekten Abwehr von Herbivoren.

Mittlerweile sind zahlreiche Beispiele bekannt, in denen Organismen der dritten trophischen Ebene durch VOCs angelockt werden. Obwohl es nahe liegt, davon auszugehen, dass diese Parasitoide oder Prädatoren für die emittierende Pflanze eine indirekte Verteidigung darstellen (Strong & Larsson, 1994), müssen zwei entscheidende Bedingungen erfüllt sein, um diese Hypothese zu erfüllen (Dicke & Vet, 1999; Van der Meijden & Klinkhamer, 2000; Janssen et al., 2002):

1. Das volatile Signal muss ausreichend spezifisch sein, den natürlichen Feinden der Herbivoren eine effektive Lokalisation ihrer Wirte oder Beute zu ermöglichen.

2. Die Attraktion von Prädatoren und Parasitoiden sollte zu einer reduzierten Herbivor-Last führen, die ihrerseits eine (messbare) Erhöhung der Pflanzenfitness zur Folge haben sollte.

Für das System „Limabohne“ konnte in Labor- und mittlerweile auch Freilandstudien die erste Forderung an VOCs erfüllt werden. Die Menge emittierter VOCs hängt deutlich von dem Grad der Herbivorie ab (DeBoer et al., 2004) und die daraus resultierenden Bouquets waren für räuberische Milben nur dann attraktiv, wenn diese von stark befallenen Pflanzen stammten (Horiuchi et al., 2003a). Das bedeutet, dass Carnivore die Qualität einer Nahrungsquelle über die Konzentration der von der befallenen Pflanzen emittierten VOCs abschätzen können. Weitere Versuche zur Analyse olfaktorischer Antworten von Parasitoiden und Prädatoren auf abgegebene VOCs zeigten zudem die Fähigkeit der Carnivore, zwischen Wirt/Beute und Nicht-Wirt/Nicht-Beute auf Limabohnen zu unterscheiden (Dicke & Groeneveld, 1986; Sabelis & Van de Baan, 1983).

Auch die zweite Forderung einer direkt durch VOCs vermittelten Top-down Regulation im Limabohnensystem konnte mittlerweile erfüllt werden (Kost & Heil,

2005a,b). In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass die Applikation künstlicher VOC-Gemische in „Duftpasten“ auf Limabohnenpflanzen unter Feldbedingungen eine große Zahl parasitoidischer und räuberischer Insekten anlockte (Kost & Heil, 2005a). Die entscheidende Bedeutung der VOCs für die indirekte Verteidigung der Limabohne im Freiland ist aber offenbar die VOC-induzierte Sekretion extrafloralen Nektars (EFN). Sowohl eine erhöhte natürliche Nektarsekretion als auch die Applikation künstlicher EFN-Mischungen auf Limabohnenrankens führte zu einer Attraktion von Prädatoren, insbesondere von Ameisen. Ameisen scheinen tatsächlich das Potenzial zu haben die Herbivorie an der Limabohne zu verringern und einen höheren Samenansatz und somit eine höhere Fitness der Pflanze zu vermitteln (Kost & Heil, 2006, persönliche Mitteilung). Beide Faktoren der indirekten Abwehr im Limabohnen-System — die VOC-Emission und die VOC-induzierte Nektarsekretion — leisten über die dritte trophische Ebene einen positiven Beitrag zur Pflanzenfitness.

Das extensive Studium dieser Mechanismen am Limabohnen-Modellsystem steht in überraschendem Gegensatz zu den wenigen Arbeiten zur ökologischen Funktion der Cyanogenese dieser Pflanze. Dies ist umso erstaunlicher als es sich bei jungen Blättern der Wildformen oder verwilderter Kultursorten um sehr stark cyanogene Pflanzenteile

handelt. Zudem stellt auch die in die Atmosphäre abgegebene Blausäure eine organische volatile Komponente mit einer in dieser Arbeit nachgewiesenen erheblichen Aktivität gegenüber Herbivoren dar. Abgesehen von Screenings hinsichtlich der Konzentration cyanogener Vorstufen vor allem in Samen (Baudoin et al., 1991; Martinez-Castillo, 2004) und lebensmittelchemisch orientierten Studien zu ihrer Nutzung (Sauer, 1993; Wright, 1993; Redden et al., 1996) gibt es jedoch nur sehr wenige Arbeiten, die sich mit cyanogenen Eigenschaften der Lima- bohne beschäftigen. Arbeiten zur ökologischen Bedeutung der Cyano- genese der Limabohne fehlen bislang ganz.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren jedoch deutlich, dass dieses Merkmal der Limabohne in weitere Analysen ihrer Ökologie einbezogen werden muss. Es zeichnet sich ein Bild der Cyanogenese ab, dem die ursprüngliche Annahme einer mono- faktoriellen Abwehr gegenüber Herbivoren nicht mehr gerecht wird. Die grundsätzlich unterschiedlichen Wirkungen der beiden involvierten funktionellen Ebenen (HCNp und HCnc) sowie die verschiedenen Effekte gegenüber Generalisten und Spezialisten stellen zusammen mit der Induzierbarkeit der β -Glucosidase und der HCnc eine wichtige Ergänzung zum bisherigen Modellsystem Limabohne dar. Analyseansätze, in denen sowohl die Cyanogenese als auch VOC- bzw. EFN-

vermittelte Abwehr gemeinsam betrachtet werden, könnten einen wesentlichen Beitrag zum weiteren Verständnis der Interaktion von Pflanzen mit ihrer Umwelt leisten.

IV. 8 Perspektive

Zusätzlich zu wichtigen Erkenntnissen im Bereich der biochemisch-ökologischen Grundlagenforschung haben die Ergebnisse der Arbeit auch für die angewandte Forschung innovatives Potenzial.

Bei der Wüstenheuschrecke und der Limabohne (Manuskript 1) handelt es sich nicht um ein natürliches Interaktionssystem; die Wüsten- heuschrecke stammt aus Afrika, die Limabohne aus Mittel- bzw. Südamerika. Unter agrarökologischen Gesichtspunkten jedoch stellt diese konkrete Interaktion, im Gegensatz zu vielen anderen in der ökologischen Forschung eingesetzten Herbivor-Pflanze Systemen (wie *Spodoptera littoralis* auf *Arabidopsis thaliana*, etc.), eine Interaktion direkter Relevanz dar.

Die Limabohne ist eine Fabacee, die in subtropischen und tropischen Gebieten zunehmend zur menschlichen Nahrungsmittelproduktion in der klein- bäuerlichen Subsistenzwirtschaft, als Viehfutter sowie als funktionelle Hilfspflanzen mit agrarökologischer Bedeutung wie z. B. Bodendeckerfunktion

angebaut wird (Redden et al., 1996). Eine auf den Ergebnisse dieser Arbeit basierende, neue Verwendbarkeit läge in der sich in verschiedenen Systemen bewährenden Push-and-Pull Technik, die besonders in Ländern der Dritten Welt einen Erfolg versprechenden Ansatz zur Erhöhung der Nahrungsmittelproduktion darstellt.

Was ist das Konzept der Push-and-Pull Technik? In den Maisfeldern Kenias zerstören Stängelbohrer [Lepidoptera: Crambidae: *Chilo partellus* (Swinhoe) und Lepidoptera: Noctuidae: *Busseola fusca* (Fuller)] oft komplette Ernten von Kleinbauern (Overholt et al., 1997; Kalule et al., 1997). Bei der Push-and-Pull Technik wird Molassegras (Poaceae: *Melinis minutiflora*) zwischen die Maisreihen gepflanzt. Dessen Düfte locken parasitische Wespen an, natürliche Feinde der Stängelbohrer. Das Molassegras baut über die Attraktion dieser Parasitoiden einen erheblichen Feinddruck auf. Die Stängelbohrer werden aus dem Mais „gedrückt“ (push). Zusätzlich wird Napiergras (Poaceae: *Pennisetum purpureum*) um die Felder gepflanzt. Dieses Wildgras lockt die Stängelbohrer durch Duft an. An den mit klebrigen Sekreten bedeckten Sprossachsen der Pflanzen bleiben erwachsene Falter und Raupen haften. Das Napiergras „zieht“ die Schädlinge aus dem Feld (pull). Diese sehr kostengünstige Technik bewährt sich vor allem auf stark befallenen Feldern. Khan

et al. (1997, 2000, 2001) und Kimani et al. (2000) konnten über die Push-and-Pull Technik die Ernten vervierfachen. In den nächsten Jahren wollen Uganda, Tansania, Äthiopien und Südafrika das Push-and-Pull-Programm übernehmen.

Vergleichbare Systeme zur Kontrolle folivorer Herbivore könnten mit Hilfe verschiedener Limabohnen-Akzessionen etabliert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Limabohnen-Heuschrecken Interaktion zeigen deutlich, dass schwach cyanogene Akzessionen der Limabohne von der Wüstenheuschrecke bevorzugt als Nahrung angenommen wurden — bei gleichzeitig stark toxischer oder gar letaler Wirkung. Zusätzliche Auswahlversuche mit Heuschrecken zwischen Limabohnen und Maniok (*Manihot esculenta*), einer der wichtigsten Kulturpflanzen der Dritten Welt überhaupt, zeigten im direkten Vergleich eine starke Präferenz der Tiere für Blätter schwach cyanogener Limabohnen (nicht veröffentlichte Daten).

Es ist denkbar, dass die Anlage von „Pufferzonen“ um wertvolle landwirtschaftliche Kulturen herum, bepflanzt mit schwach cyanogenen Varietäten der Limabohne eine Besiedelung der Felder durch herbivore Generalisten von außen reduzieren könnte (Pull-Effekt). Für die zusätzliche Pflanzung von Limabohnen direkt in die Kultur ist aufgrund der Auswahlversuche mit Maniok ein Ablenkungs-, d. h. ebenfalls ein Pull-Effekt anzunehmen.

Ein wichtiger funktioneller Aspekt der Limabohne in diesem System ist die zusammen mit Pull-Effekten zu erwartende gleichzeitige Schädigung der Angreifer. Die toxizitätsbedingte Beeinträchtigung der Herbivore könnte zu einer erheblichen Reduzierung der Fraßschäden in der Hauptkultur führen. Diese Kombination von Ablenkung und Intoxikation generalistischer Herbivore, von denen die Wüstenheuschrecke und die Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*) sicherlich nur die Wichtigsten sind, würde einen bisher nicht vorhandenen Ansatz der Schädlingskontrolle in Agrarökosystemen bedeuten. Grundsätzlich ähnliche Effekte müssen auch gegenüber anderen generalistischen Herbivoren postuliert werden, solange es sich um Pflanzenfresser handelt, die sich vor allem von Blättern ernähren.

Für Versuche mit der Wüstenheuschrecke (Manuskript 1) stand die Akzession 2116 (sehr hohes HCNp/extrem geringe HCNc) noch nicht zur Verfügung. Die interessante Kombination cyanogener Eigenschaften dieser Akzession wurde erst in zusätzlichen Screenings von Limabohnen im Zuge der Versuche mit den Bohnenkäfern und zur Induktion der β -Glucosidase aufgedeckt (Manuskript 2, 3). Sowohl für die Heuschrecken als auch für den Bohnenkäfer war die cyanogene Kapazität (HCNc) entscheidend für die Abschätzung der Qualität der Nahrungspflanze. Das cyanogene Potenzial (HCNp)

bzw. die im Körperinneren stattfindende Blausäurefreisetzung hingegen stellte in Abhängigkeit des Spezialisierungsgrades des Herbivors die toxische oder entwicklungslimitierende Komponente dar. Bei der Heuschrecke genügte die extensive Aufnahme von Blattmaterial mit geringem HCNp um negative Effekte auszulösen, bei dem Bohnenkäfer führte nur Blattmaterial mit hohem HCNp zu einer limitierten Entwicklung und Reproduktion (Manuskript 4). Der Einsatz einer Limabohne mit den cyanogenen Eigenschaften der Akzession 2116 (Manuskript 2, 3) dürfte gegenüber der Heuschrecke noch wesentlich gravierendere negative Effekte haben, als die Verwendung von Pflanzen mit einem allgemein niedrigen cyanogenen Status. Eine solche Pflanze wäre für den Pull-Effekt in einem entsprechenden Agrarsystem besonders geeignet. Effekte dieser Akzession auf die Heuschrecke wurden bislang jedoch noch nicht getestet.

Zusätzlich besitzt die Limabohne die Fähigkeit, wie oben dargestellt, über die durch Fraß induzierte VOC-Emission bzw. über die Bereitstellung extrafloralen Nektars, Prädatoren und Parasitoide anzulocken. Somit hat die Limabohne in dieser Beziehung ein dem Molassegras vergleichbares Potenzial. Diese Form der indirekten Verteidigung richtet sich vermutlich weniger gegen Heuschrecken. Dagegen könnte gegen andere relevante Herbivore, wie Schmetterlingslarven etc., eine Effektivität gegeben sein.

In Jahren mit geringem Druck durch Fraßfeinde könnten die in diesem Falle erhalten bleibenden Bohnenpflanzen ebenfalls wichtige Beiträge zur Stabilisierung der Agrarökosysteme leisten. Durch ihre allen Fabaceen gemeinsame Interaktion mit Luftstickstoff bindenden Bakterien der Gattung *Rhizobia* sowie durch ihre Bodendeckerfunktion hat die Limabohne das Potenzial, die Qualität der Kulturlächen durch Stickstoffeintrag und Erosionsschutz zu erhalten oder ggf. zu verbessern. Die Samen könnten — unter Einhaltung evtl. erforderlicher Prozessierungsschritte — zudem der menschlichen Ernährung zugeführt werden.

Die Eignung der Limabohne in entsprechenden landwirtschaftlichen Systemen bleibt zu untersuchen.

V Zusammenfassung

Die Limabohne, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), ist eine tropische Pflanze mit wachsender ökonomischer Bedeutung speziell in semiariden und wechselfeuchten Gebieten. Es handelt sich um eine obligat cyanogene Pflanze, d. h. eine Pflanze, die als Reaktion auf eine Beschädigung Blausäure (HCN) freisetzt. Die Limabohne verfügt über eine lange Nutzungsgeschichte von über 8500 Jahren; diese hat tendenziell zu einer Verminderung der Cyanogenese geführt. Es liegen jedoch auch unter den heutigen Kulturformen keine Genotypen vor, denen das Merkmal der Cyanogenese komplett fehlt. Die Cyanogenese erfolgt als Reaktion auf eine Zellverletzung. Hierbei werden die in der Vakuole akkumulierten cyanogenen Vorstufen mit apoplastisch lokalisierten β -Glucosidasen in Kontakt gebracht. Über die Bildung kurzlebiger Zwischenprodukte und unter Beteiligung eines weiteren Enzyms, der α -Hydroxynitril Lyase, kommt es zur schnellen Freisetzung von HCN. Sofern die Cyanogenese auch in Pflanzenteilen auftritt, die Bestandteil der menschlichen Nahrung sind, stellt sie aufgrund der generellen Toxizität der Blausäure einen qualitätsmindernden Faktor dar.

Andererseits gilt Cyanogenese gemeinhin als pflanzeigene Verteidigung gegen viele generalistische Fraßfeinde (Herbivore). Die Toxizität der

Blausäure mindert also nicht nur die Qualität der Pflanze als menschliche Nahrung, sie bildet möglicherweise gleichzeitig eine wertvolle pflanzeigene Resistenzeigenschaft gegen Fraßfeinde. Ziel der vorliegenden Dissertation war die quantitative Analyse dieser ökologischen Bedeutung der Cyanogenese in der Herbivor-Pflanze Interaktion. Beides, sowohl die Toxizität, als auch die Tatsache, dass es sich bei der HCN-Freisetzung um eine Antwort der Pflanze auf eine Verletzung handelt, sprechen für eine Verteidigungsfunktion der Cyanogenese. Ein tatsächlich quantitativer (d. h. also Dosis-Wirkungs-) Bezug der Cyanogenese zur pflanzlichen Verteidigung konnte bisher jedoch nicht hergestellt werden.

Die grundsätzliche Schwierigkeit, einen funktionellen Bezug zwischen cyanogenen Merkmalen einer Pflanze und spezifischen Reaktionen ihrer Fraßfeinde herzustellen, liegt v. a. in der Variabilität der Cyanogenese begründet. Auch die Cyanogenese der Limabohne unterliegt starker intraspezifischer Variabilität. Es konnte jedoch ein Set von Pflanzenlinien mit unterschiedlichen, quantitativ definierten cyanogenen Eigenschaften zusammengestellt und damit ein quantitativ abgesichertes Modellsystem zur Analyse der Cyanogenese in der Herbivor-Pflanze Interaktion etabliert werden. Mit Hilfe dieses Modellsystems war es möglich, einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Bedeutung dieses Merkmals in der

Interaktion von Pflanzen und ihren Fraßfeinden zu leisten. Folgende zentrale Aussagen konnten getroffen werden:

1. Leistungen des Modellsystems. Obwohl qualitativ obligat, ist die Cyanogenese der Limabohne (*Phaseolus lunatus*) ein polyfaktorielles Merkmal mit hoher quantitativer Variabilität. Es konnten zwei funktionelle Ebenen getrennt quantifiziert werden: Die Konzentration cyanogener Vorstufen (HCNp; cyanogenes Potenzial) und die Freisetzung von Blausäure pro Zeiteinheit (HCNc; cyanogene Kapazität). Die HCNc war wesentlich von der β -Glucosidase-Aktivität abhängig. Die Aktivität dieses Enzyms war ebenso wie das HCNp intraspezifisch und ontogenetisch hoch variabel. Ein hohes cyanogenes Potenzial korrelierte nicht zwangsläufig mit einer hohen β -Glucosidase-Aktivität und somit hoher HCNc. Beide funktionelle Ebenen der Cyanogenese (HCNp und HCNc) unterlagen einer unabhängigen Variabilität.

2. Einflüsse cyanogener Eigenschaften auf einen generalistischen Herbivor.

Beide funktionellen Ebenen der Cyanogenese hatten unterschiedliche Effekte auf die extrem polyphage Wüstenheuschrecke (*Schistocerca gregaria*). Blätter hoch cyanogener Limabohnen, d. h. Pflanzen mit sowohl hohem HCNp als auch hoher HCNc, reagierten mit massiver HCN-Freisetzung

auf eine Fraßverletzung durch die Insekten. Die Tiere fraßen nur kurz, nahmen eine dementsprechend geringe Menge Blattmaterial auf und zeigten geringe bis keine sichtbaren Anzeichen einer Intoxikation. Ein Repellent-Effekt war eindeutig nachweisbar. An schwach cyanogenen Limabohnen (geringes HCNp und geringe HCNc) fraßen die Tiere ausgiebig. Es konnte kein Repellent-Effekt durch freigesetztes HCN beobachtet werden. Eine Bilanzierung ergab, dass die Mengen der im gefressenen Blattmaterial vorhandenen cyanogenen Vorstufen bei Fraß an hoch und schwach cyanogenen Pflanzen vergleichbar waren. Bei letzteren wurde jedoch ein geringerer Prozentsatz des gebundenen Cyanids während des Fraßvorgangs freigesetzt. Die in der Konsequenz verzögerte, aber lang anhaltende Freisetzung von HCN aus dem aufgenommenen Blattgewebe im Körperinneren der Tiere resultierte in einer wesentlich höheren Toxizität schwach cyanogener Limabohnen. Gegenüber generalistischen Herbivoren konnte zwischen einem Repellent-Effekt hoch cyanogener und einem Intoxikationseffekt schwach cyanogener Limabohnen unterschieden werden.

3. Auswirkungen cyanogener Eigenschaften auf einen spezialisierten Herbivor.

Die cyanogene Kapazität (HCNc) hatte quantitativen Einfluss auf das Eiablageverhalten und die Entwicklung des auf

Fabaceen spezialisierten Mexikanischen Bohnenkäfers (*Epilachna varivestis*). In Auswahlversuchen wurden schwach cyanogene Genotypen (geringes HCNp und geringe HCNC) gegenüber hoch cyanogenen Formen (hohes HCNp und hohe HCNC) signifikant zur Eiablage bevorzugt. Pflanzen mit einem hohen HCNp, aber einer geringen HCNC (Akzession 2116), wurden hoch cyanogenen Genotypen vorgezogen und im Vergleich mit schwach cyanogenen Genotypen nicht gemieden. Die HCNC diente den Käfern als Schlüssel zur Identifikation der Qualität der Wirtspflanze. Langzeitversuche zeigten jedoch, dass die Entwicklung und Reproduktion der Tiere nicht durch die HCNC sondern durch das HCNp der Nahrungspflanzen bestimmt wurde. Hohe Konzentrationen cyanogener Vorstufen in den Wirtspflanzen bewirkten eine verlangsamte Entwicklung, geringere Akkumulation von Körperbiomasse und verminderte Reproduktion und somit Fitness der Tiere — unabhängig von der Fähigkeit zur HCN-Freisetzung bei Gewebeschädigung. Pflanzen mit einem hohen HCNp aber geringer HCNC wurden von den Tieren nicht als „hoch cyanogen“ und somit weniger geeignet erkannt — mit allen für die Entwicklung und Reproduktion genannten Konsequenzen. Spezialisierte Herbivore können entgegen des „specialist-herbivore-paradigm“ ebenfalls negativ durch verteidigungsrelevante Verbindungen ihrer Wirtspflanzen beeinflusst werden.

4. Cyanogenese ist partiell induzierbar. Die Fähigkeit der Limabohne zur HCN-Freisetzung konnte durch Fraß verschiedener Herbivore [Mexikanischer Bohnenkäfer und Spinnmilbe (*Tetranychus urticae*)] quantitativ induziert werden. Eine rein mechanische, artifizielle Verletzung hatte keinen Effekt. Die Induzierbarkeit der Cyanogenese betraf nicht die Synthese und somit Quantität cyanogener Vorstufen, sondern die Aktivität der β -Glucosidase. Diese Induzierbarkeit der β -Glucosidaseaktivität und der resultierenden HCN-Freisetzung war sowohl vom Genotyp der Limabohne, als auch von der Art des jeweils fressenden Herbivors bzw. seines Fraßmusters abhängig. Die Einordnung der Cyanogenese als eine rein konstitutive Verteidigung der Pflanze ist aufgrund dieser Ergebnisse nicht mehr haltbar.

Neben neuen Erkenntnissen, die für die weitere züchterische oder gentechnische Bearbeitung wichtiger cyanogener Nutzpflanzen wie v. a. Maniok (*Manihot esculenta*) von Bedeutung sind, leistet die vorliegende Arbeit einen für die Grundlagenforschung zur Herbivore-Pflanze Interaktion relevanten Beitrag.

Bei der Limabohne handelt es sich um eine etablierte Modellpflanze zur Analyse der indirekten Abwehr von Herbivoren. Als Antwort auf Herbivorie emittiert die Limabohne volatile organische Verbindungen (VOCs), die ihrerseits die Sekretion extrafloralen Nektars (EFN)

induzieren können. Beide Faktoren haben eine attraktive Wirkung auf Parasitoide und/oder Prädatoren. Bei der Cyanogenese handelt es sich um eine direkte Verteidigung der Pflanze gegen Herbivore, bei der in Form von HCN und Carbonylverbindungen ebenfalls volatile organische Verbindungen freigesetzt werden. Die Cyanogenese stellt im Limabohnen-System einen Faktor dar, der im Zusammenspiel mit der indirekten Abwehr dieser Pflanze neue Einblicke in die Interaktion von Pflanzen, Herbivoren und der dritten Trophieebene ermöglicht.

VI Danksagung

Viele Menschen haben zum Gelingen der vorliegenden Dissertation auf verschiedenste Art und Weise beigetragen. Ihnen allen möchte ich an dieser Stelle für ihre Mühe, Geduld und ihren Einsatz danken.

Meinem Betreuer, Prof. Dr. Reinhard Lieberei danke ich für die Überlassung des ihm sehr am Herzen liegenden Themas und dafür, dass er sich trotz ständigen Termindrucks stets Zeit für Diskussionen, Anregungen und viele weitere Hilfestellungen nahm. Seiner gesamten Familie danke ich für die freundliche Aufnahme und Toleranz wenn er auch in seiner „Freizeit“ Themen der Dissertation mit mir erörterte.

Herrn Prof. Dr. Jörg. U. Ganzhorn, dem Zweitgutachter meiner Dissertation, habe ich es wesentlich zu verdanken, mich für die spannendste aller Fragestellungen der Biologie, die biochemische Ökologie, entschieden zu haben. Nach der Teilnahme an dem von ihm geleiteten Praktikum „Terrestrische Ökologie“ stand für mich die Entscheidung fest, zukünftig die Interaktionen von Organismen untersuchen zu wollen.

Weiter danke ich der gesamten AG-Lieberei, Nutzpflanzenbiologie, für die sehr gute Arbeitsatmosphäre. Ohne die technische und organisatorische Unterstützung von Dr. Helmut Kassner, Detlef

Böhm und Thomas Thumforde wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Ich danke ebenfalls Semra Ünsal für die Hilfe bei den im öffentlichen Dienst bekanntermaßen nicht auf den ersten Blick einsichtigen, dafür aber umso zahlreicheren bürokratischen Vorgängen.

Ohne Dr. Christoph Reisdorff, meinen Zellengenossen, direkten damaligen Vorgesetzten und nach wie vor einen meiner besten Freunde, wäre die Phase meiner Promotion an der Universität Hamburg unendlich viel ärmer gewesen.

Den Wechsel an die Universität Duisburg-Essen in die AG-Heil; Allgemeine Botanik, Pflanzenökologie habe ich zu keinem Zeitpunkt bereut. Ich danke Prof. Dr. Martin Heil für die zahlreichen Einblicke in neue wissenschaftliche Fragestellungen und Herangehensweisen.

Ebenso bedanke ich mich bei meinen neuen Kollegen Beate Marschalkerweerd, „Freddy“ Lenk, Dr. Manfred Jensen, Dr. Herfried Kutzelnigg und v. a. Michael Neugebauer, für ihre große Hilfsbereitschaft, die mir den neuen Start in Lehre und Forschung erheblich erleichterte. Meine Kollegen Susann Schiwy und Dr. Ulrich Lion waren eine große Hilfe bei der Bewältigung alltäglicher Probleme, die während der Einrichtung neuer Labore und Arbeitsplätze in ungeahntem Maße auftraten. Uli möchte ich weiterhin für seine enorme Hilfe in der

Vorbereitung der Lehre, vor allem in den letzten Wochen vor der Abgabe dieser Dissertation danken.

Einen grundlegenden Beitrag zu der vorliegenden Arbeit haben die Mitarbeiter des Botanischen Gartens der Universität Duisburg-Essen geleistet. Ich danke Monika Filipek, Tina Meier, und Hartmut Ludewig für die zeit- und arbeitsaufwändige Pflege meiner sehr zahlreichen Limabohnen und wohlmöglich noch zahlreicheren Bohnenkäfer.

Meiner Familie (Eldo, Pauline, Janis und Mario) danke ich für die Hilfe und Unterstützung während der Arbeit und in sämtlichen Lebenslagen. Ohne sie hätte ich die Dissertation in dieser Form sicherlich nicht durchführen können.

Was ich ohne Andrea gemacht hätte — da bin ich bisweilen überfragt.

VII Literaturverzeichnis

- ABBOTT, R. J. 1977. A quantitative association between soil moisture content and the frequency of the cyanogenic form of *Lotus corniculatus* L. at Birsay, Orkney. *Heredity* 38:397-400.
- ADEWUSI, S. R. A. 1990. Turnover of dhurrin in green sorghum seedlings. *Plant Physiology* 94:1219-1224.
- AGRAWAL, A. A. & KARBAN R. 1997. Domatia mediate plant-arthropod mutualism. *Nature* 387:562-563.
- AGRAWAL, A.A. & KURASHIGE, N.S. 2003. A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology* 29:1403-1415.
- AHMAD, S., BRATTSTEN, L.B., MULLIN, C.A. & YU, S.J. 1986. Enzymes involved in the metabolism of plant allelochemicals. In Brattsten, L.B. & Ahmad, S. (eds.) *Molecular Aspects of Insect – Plant Associations*. Plenum Press, New York, pp. 73-152.
- AIKMAN, K., BERGMANN, D., EBINGER, J. & SEIGLER, D. 1996. Variation of cyanogenesis in some plant species of the midwestern United States. *Biochemical Systematics and Ecology* 24:637-645.
- Alborn, F.R., Turlings, T. C. J., Jones, T. H., Stenhagen, G., Loughrin, J. H. & Tumlinson, J. H. 1997. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science* 276:945-949.
- APHALO, P. J. & BALLARÉ, C. L. 1995. On the importance of information acquiring systems in plant-plant interactions. *Functional Ecology* 9:5-14.
- ARIMURA, G., OZAWA, R., SHIMODA, T., NISHIOKA, T., BOLAND, W. & TAKABAYASHI, J. 2000a. Herbivory-induced volatiles elicit defense genes in lima bean leaves. *Nature* 406(6795):512-5.
- ARIMURA, G. I, TASHIRO, K., KUHARA, S. NISHIOKA, T. OZAWA, R & TAKABAYASHI, J. (2000b). Gene responses in bean leaves induced by herbivory and by herbivore-induced volatiles. *Biochemical and Biophysical Research and Communications* 277: 305-310.
- ARIMURA, G. I, OZAWA, R., NISHIOKA, T., BOLAND W., KOCH, T. KUHNEMANN, F. & TAKABAYASHI, J. 2002. Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring Lima bean plants. *Plant Journal* 29: 87-98.
- ARNETT JR., R. H. 2000. American Insects: A Handbook of the Insects of America North of Mexico. CRC Press, Boca Raton, pp. 1003-1005.
- BALDWIN, I. T. 1988. The alkaloidal responses of wild tobacco to real and simulated herbivory. *Oecologia* 77:387-381.
- BALDWIN, I. T. 1994. Chemical changes rapidly induced by herbivory. In Bernays, E. A. (ed.) *Insect-plant interactions, volume 5*, CRC Press, Boca Raton, pp. 1-223.
- BALDWIN, I. T., SCHMELZ, E. A. & OHNMEISS, T. E. 1994. Wound- induced changes in root and shoot jasmonic acid pools correlate with induced nicotine synthesis in *Nicotiana sylvestris* Spegazzini and Comes. *Journal of Chemical Ecology* 20:2139-2157.
- BALLESTEROS, G. A. 1999. Contribuciones al conocimiento del frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) en América Tropical. Ph.D. dissertation, Colegio de Posgraduados. Montecillos, Estado de México.

- BALLHORN, D. J., LIEBEREI, R. & GANZHORN, J. U. 2005. Plant cyanogenesis of *Phaseolus lunatus* and its relevance for herbivore-plant interaction: The importance of quantitative data. *Journal of Chemical Ecology* 31:1445-1473.
- BAUDOIN, J. P., BARTHELEMY, Y. J. & NDUNGO, V. 1991. Variability of cyanide contents in the primary and secondary gene pools of the lima bean, *Phaseolus lunatus* L. FAO/IBPGR, *Plant Genetic Resources Newsletter* 85:5-9.
- BEDIAKO, M., TAPPER, B. & PRITCHARD, G. 1981. Metabolism synthetic site and translocation of cyanogenic glucoside in cassava. In Terry, E. (ed.) *Proceedings of the first triennial root crops symposium of the International society for tropical root crops*. IDRC Canada, pp. 143-148.
- BEESELEY, S.G., COMPTON, S.G. & DAVID, A.J. 1985. Rhodanese in insects. *Journal of Chemical Ecology* 11:45-50.
- BELOTTI, A. & RISS, L. 1994. Cassava cyanogenic potential and resistance to pests and diseases. *Acta Horticulturae* 375: 141-151.
- BELOVSKY, G. E. & JOERN, A. 1995. The dominance of different regulating factors for rangeland grasshoppers. In Cappuccino, N. & Price, P. (eds.) *Population dynamics: new approaches and synthesis*. Academic, New York, pp. 359-386.
- BENNETT, R. N. & WALLSGROVE, R. M. 1994. Tansley Review No. 72. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127:617-633.
- BENNETT, R. N., KIDDLE, G. & WALLSGROVE, R. M. 1997. Biosynthesis of benylglucosinolate, cyanogenic glucosides and phenylpropanoids in *Carica papaya*. *Phytochemistry* 45:59-66.
- BENSON, W. W., BROWN, K. S. & GIBERT, L. E. 1975. Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. *Evolution* 29:659-680.
- BERENBAUM, M. R. 1995. Turnabout is fair play: secondary roles for primary compounds. *Journal of Chemical Ecology* 21: 925-940.
- BERNAYS, E. A. 1991. Relationship between deterrence and toxicity of plant secondary compounds for the grasshopper *Schistocerca americana*. *Journal of Chemical Ecology* 17:2519-2526.
- BERNAYS, E. A. & CHAPMAN, R. F. 1994. Host-plant selection by phytophagous insects. New York: Chapman & Hall.
- BERNAYS, E. A., CHAPMAN, E. M., LEATHER, E. M. & MCCAFFERY, A. R. 1977. The relationship of *Zonocerus variegatus* (L.) (Acridoidea: Pyrgomorphidae) with Cassava (*Manihot esculenta*). *Bulletin of Entomological Research* 67:391-404.
- BLAISE, S., CARTIER, D. & REYNAUD, D. 1991. Evolution and differentiation of *Lotus corniculatus* / *Lotus alpinus* populations from French south-western Alps. I. Morphologic and cyanogenic variations. *Evolutionary Trends in Plants* 5:137-148.
- BLAU, P. A., FEENY, P., CONTARDO, L. & ROBSON, D. S. 1978. Allylglucosinolate and herbivorous caterpillars: A contrast in toxicity and tolerance. *Science* 200:1296-1298.
- BLUMENTHAL, S. G., BUTLER, G. W. & CONN, E. E. 1963. Incorporation of hydrocyanic acid labelled with carbon-14 into asparagine in seedlings. *Nature* 197:718-719.
- BIDDLE, A. J., HUTCHINS, S.H. & WIGHTMAN, J. A. 1992. Pests of leguminous crops. In McKinlay, R. G. (ed.) *Vegetable Crop Pests*. CRC Press, Boca Raton, Florida.

- BIRK, R., BRAVDO, B. & SHOSEYOV, O. 1996. Detoxification of cassava by *Aspergillus niger* B-1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45:411-414.
- BOKANGA, M., EKANAYAKE, I. J. & DIXON, A. G. O. 1994. Genotype-environment interactions for cyanogenic potential in cassava. In Bokanga, M., Essers, A. J. A., Poulter, N., Rosling, H. & Tewe, O. (eds.) International workshop on cassava safety. *Acta Horticulturae* 375. pp. 131-140.
- BOLAND, W., HOPKE, J., DONATH, J., NUSKE, J. & BUBLITZ, F. 1995. Jasmonic acid and coronatin induce odor production in plants. *Angewandte Chemie International Edition* 34:1600-1602.
- BOSTANIAN, N. J. & COULOMBE, L. J. 1986. An integrated pest management program for apple orchards in southwestern Quebec. *Canadian Entomologist* 118:1131-1142.
- BOUGH, W. A. & GANDER, J. E. 1971. Exogenous L-Tyrosine metabolism and dhurrin turnover in sorghum seedlings. *Phytochemistry* 10: 67-77.
- BOUGHTON, A. J., HOOVER, K. & FELTON, G. W. 2005. Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. Rapid Communication, published online July 5, 2005. *Journal of Chemical Ecology*.
- BOUWMEESTER, H. J., VERSTAPPEN, F. W. A., POSTHUMUS, M. A. & DICKE, M. 1999. Spider mite-induced (3S)-(E)-nerolidol synthase activity in cucumber and Lima bean. The first dedicated step in acyclic C₁₁-homoterpene biosynthesis. *Plant Physiology* 131:173-180.
- BOSTOCK, R. M. 1999. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:99-109.
- BRATTSTEN, L.B. 1986. Fate of ingested plant allelochemicals in herbivorous insects. In Brattsten, L.B., Ahmad, S. (eds.) *Molecular Aspects of Insect – Plant Associations*. Plenum Press, New York, pp. 211-219.
- BRATTSTEN, L.B. 1992. Metabolic defenses against plant allelochemicals. In Rosenthal, G.A., Janzen, D. (eds.) *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. Academic Press, London, pp. 175-242.
- BRATTSTEN, L. B., SAMUELIAN, J. H., LONG, K. Y., KINCAID, S. A. & EVANS, C. K. 1983. Cyanide as feeding stimulant for the southern armyworm, *Spodoptera eridania*. *Ecological Entomology* 8:125-132.
- BRIGGS, M. A. 1990. Chemical defence production in *Lotus corniculatus* L. I. The effects of nitrogen source on growth, reproduction and defence. *Oecologia* 83: 27-31.
- BRYANT, J. P., CHAPIN, F. S. & KLEIN, D. R. 1983. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* 40:357-368.
- BRYANT, J. P., REICHARDT, P. B. & CLAUSEN, T. P. 1992. Chemically mediated interactions between woody plants and browsing mammals. *Journal of Range Management* 45:18-24.
- BURGESS, R. S. L. & ENNOS, R. A. 1987. Selective grazing of acyanogenic white clover: Variation in behaviour among populations of the slug *Deroceras reticulatum*. *Oecologia* 73:432-435.
- CAICEDO, A. L., GAITÁN, E., DUQUE, M. C., TORO CHICA, O., DEBOUCK, D. G. & TOHME, J. 1999. AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. *Crop Science* 39:1497-1507.

- CALATAYUD, P. A., TERTULIANO, M. & LE RÜ, B. 1994. Seasonal variation in secondary compounds in the phloem sap of cassava in relation to plant genotype and infestation by *Phenacoccus manihoti* (Homoptera: Pseudococcidae). *Bulletin of Entomological Research* 84:453-459.
- CALATAYUD, P. A. & LE RÜ, B. 1996. Study of the nutritional relationships between the cassava mealybug and its host plant. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 121:391-398 (in French).
- CARADUS, J. R. & FORDE, M. B. 1996. Characterization of white clover populations collected from the Caucuses and high altitude regions of eastern Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution* 43:143-155.
- CARADUS, J. R., MACKAY, A. C., CHARLTON, J. F. L. & CHAPMAN, D. F. 1990. Genecology of white clover (*Trifolium repens* L.) from wet and dry hill country pastures. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 33:377-384.
- CARADUS, J. R., CLIFFORD, P. T. P., CHAPMAN, D. F., COUSINS, G. R., WILLIAMS, W. M. & MILLER, J. E. 1997. Breeding and description of grasslands sustain, a medium-large-leaved white clover (*Trifolium repens* L.) cultivar. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 40:1-7.
- CARRIERE, Y., DELAND, J.-P., ROFF, D. A. & VINCENT, C. 1994. Life-history costs associated with the evolution of insecticide resistance. *Proceedings: Biological Sciences* 258:35-40.
- CASTRIC, P. A., FARNDEN, K. F. & CONN, E. E. 1972. Cyanide metabolism in higher plants 5: The formation of asparagine from β -cyanoalanine. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 152:62-69.
- CARTER, E. B., THEODOROU, M. K. & MORRIS, P. 1997. Responses of *Lotus corniculatus* to environmental change. I. Effects of elevated CO₂, temperature and drought on growth and plant development. *New Phytologist* 136:245-253.
- CHASSAGNE, D., CROUZET, J. C., BAYONOVE, C. L. & BAUMES, R. L. 1996. Identification and quantification of passion fruit cyanogenic glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 3817-3820.
- CLEGG, D. O., CONN, E. E. & JANZEN, D. H. 1979. Developmental fate of the cyanogenic glycoside linamarin in Costa Rica wild lima bean seeds. *Nature* 278:343-344.
- COLEY, P. D. 1980. Effects of leaf age and plant life history patterns on herbivory. *Nature* 284:545-546.
- COLEY, P. D. 1988. Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. *Oecologia* 74:531-536.
- COLEY, P. D., BRYANT, J. P. & CHAPIN, F. S. III. 1985. Resource availability and plant anti-herbivore defense. *Science* 230:895-899.
- COLLINGE, D. B. & HUGHES, M. A. 1982. Developmental and physiological studies on the cyanogenic glucosides of white clover, *Trifolium repens* L. *Journal of Experimental Botany* 33:154-161.
- COMPTON, S. G. & JONES, D. A. 1985. An investigation of the responses of herbivores to cyanogenesis in *Lotus corniculatus* L. *Biological Journal of the Linnean Society* 26:21-38.
- CONN, E. E. 1979. Cyanide and cyanogenic glycosides. In Rosenthal, G. A., Janzen, D. (eds.) *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*, Academic Press, New York, pp. 387-412.

- CONN, E. E. 1980. Cyanogenic glycosides. In Bell, E. A. & Charlwood, B. V. (eds.) *Encyclopedia of Plant Physiology*. New Series 8. Springer-Verlag, New York, pp. 461-491.
- CONN, E. E. 1981a. Biosynthesis of cyanogenic glycosides. In Vennesland, V., Conn, E. E., Knowles, C. J., Westly, J. & Wissing, F. (eds.) *Cyanide in biology*. Academic Press, New York, pp. 1-10.
- CONN, E.E. 1981b. Cyanogenic glycosides. In Conn, E.E (ed.) *The biochemistry of plants, volume 7*. Academic Press, New York, pp. 479-499.
- CONN, E.E. 1991a. Metabolic studies on natural products: cyanogenic glycosides and cyanogenesis as possible models. *Proceedings of The National Science Council, ROC. Part B. Life Sciences* 15:220-225.
- CONN, E.E. 1991b. The metabolism of a natural product: lessons learned from cyanogenic glycosides. *Planta Medica Supplement Issue 1* 57:1-9.
- COOP, I. E. & BLAKELY, R. L. 1949. The metabolism and toxicity of cyanides and cyanogenic glucosides in sheep. I. Activity in the rumen. *New Zealand Journal of Science and Technology* 30:277-291.
- COOP, I. E. & BLAKELY, R. L. 1950. The metabolism and toxicity of cyanides and cyanogenic glucosides in sheep. III. The toxicity of cyanides and cyanogenic glucosides. *New Zealand Journal of Science and Technology* 31:44-58.
- COOPER-DRIVER, G. A. & SWAIN, T. 1976. Cyanogenic polymorphism in bracken in relation to herbivore predation. *Nature* 260:604.
- COOPER-DRIVER, G. A., FINCH, S., SWAIN, T. & BERNAYS, E. 1977. Seasonal variation in secondary plant compounds in relation to the palatability of *Pteridium aquilinum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 5:177-183.
- CORK, S. J. 1996. Optimal digestive strategies for arboreal herbivorous mammals in contrasting forest types: Why Koalas and Colobines are different. *Australian Journal of Ecology* 21:10-20.
- CORKHILL, L. 1940. Cyanogenesis in white clover (*Trifolium repens* L.). I. Cyanogenesis in single plants. *New Zealand Journal of Science and Technology* 22B:65-67.
- CORKHILL, L. 1942. Cyanogenesis in white clover (*Trifolium repens* L.) V. The inheritance of cyanogenesis. *New Zealand Journal of Science and Technology* B. 23:178-193.
- CRAWLEY, M. J. 1983. Herbivory: the dynamics of animal-plant interactions. Berkeley: University of California Press.
- CRONIN, G. & HAY, M. E. 1996. Effects of light and nutrient availability on the growth, secondary chemistry, and resistance to herbivory of two brown seaweeds. *Oikos* 77:93-106.
- CRUSH, J. R. & CARADUS, J. R. 1995. Cyanogenesis potential and iodine concentration in white clover (*Trifolium repens* L.) cultivars. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 38:309-316.
- DADAY, H. 1954a. Gene frequencies in wild populations of *Trifolium repens* L. I. Distribution by latitude. *Heredity* 8:61-78.
- DADAY, H. 1954b. Gene frequencies in wild populations of *Trifolium repens* L. II. Distribution by altitude. *Heredity* 8:377-384.
- DADAY, H. 1958. Gene frequencies in wild populations of *Trifolium repens* L. III. World distribution. *Heredity* 12:169-184.

- Daday, H. 1965. Gene frequencies in wild populations of *Trifolium repens* L. IV. Mechanisms of natural selection. *Heredity* 20:355-365.
- DAVIS, R. H. & NAHRSTEDT, A. 1979. Linamarin and lotaustralin as the source of cyanide in *Zygaena filipendulae* (Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology B—Biochemistry & Molecular Biology* 64:395-397.
- DAVIS, R. H. & NAHRSTEDT, A. 1987. Biosynthesis of cyanogenic glucosides in butterflies and moths—effective incorporation of 2-methyl-propanenitrile and 2-methylbutanenitrile into linamarin and lotaustralin by *Zygaena* and *Heliconius* species (Lepidoptera). *Insect Biochemistry* 17:689-693.
- DE BOER, J. G., POSTHUMUS, M. A. & DICKE, M. 2004. Identification of volatiles that are used in discrimination between plants infested with prey or nonprey herbivores by a predatory mite. *Journal of Chemical Ecology* 30:2215-2230.
- DE MOREAS, C. M., MESCHER, M. C. & TURLINSON, J. H. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel nonspecific females. *Nature* 410:577-580.
- DE MORAES, C. M., LEWIS, J. M., PARE, P. W., ALBORN, H. T. & TURLINSON, J. H. 1998. Herbivory-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* 393:570-573.
- DEBOUCK, D. 1991. Systematics and morphology, In van Schoonhoven, A. & Voysest, O. (eds.) *Common Beans: Research for Crop Improvement*. Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, United Kingdom, pp. 55-118.
- DEBOUCK, D. G., MAQUET, A. & POESSO, C. E. 1989. Biochemical evidence for two different gene pools in Lima bean, *Phaseolus lunatus* L. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperation* 32:58-59.
- DEGREEF, J., ROCHA, O. J., VANDERBORGHT, T. & BAUDOIN, J. P. 2002. Soil seed bank and seed dormancy in wild populations of Lima bean (Fabaceae): Consideration for *in situ* and *ex situ* conservation. *American Journal of Botany* 89:1644-1650.
- DENG, A. L., TORRO, B., HASSANALI, A. & ALI, E. E. 1996. Effects of shifting to crowded or solitary conditions on pheromone releases and morphometrics of the Desert Locust *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Insect Physiology* 42:771-776.
- DEMENT, W. A. & MOONEY, H. A. 1974. Seasonal variation in the production of tannins and cyanogenic glucosides in the chaparral shrub *Heteromeles arbutifolia*. *Oecologia* 15:65-76.
- DICKE, M. 1999a. Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91:131-142.
- DICKE, M. 1999b. Specificity of herbivore-induced plant defences. In Chadwick, D. J., Goode, J. A. (eds.) *Insect-plant interactions and induced plant defence*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom, pp. 43-54.
- DICKE, M. & GROENEVELD, A. 1986. Hierarchical structure in kairomone preference on the predatory mite *Amblyseius potentillae*: Dietary component indispensable for diapause induction affects prey location behaviour. *Ecological Entomology* 11:131-138.

- DICKE, M. & SABELIS, M. W. 1989. Does it pay plants to advertize for bodyguards? Towards a cost-benefit analysis of induced synomone production. In Lambers, H., Cambridge, H., Konings, H. & Pons, T. L. (eds.) *Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants*. SPB Academic Publishing, The Hague, pp. 341-358.
- DICKE, M. & VET, L. E. M. 1999. Plant-carnivore interactions: Evolutionary and ecological consequences for plant, herbivore and carnivore. In Olf, H., Brown, V. K., Drent, R. H. (eds.) *Herbivores: Between plants and predators*. Blackwell Science, Oxford, pp. 483-520.
- DIXON, A.G.O., ASEIDU, R. & BOKANGA, M. 1994. Breeding of cassava for low cyanogenic potential: Problems, progress and prospects. *Acta Horticulturae* 375: 153-161.
- DOAK, B. W. 1933. A chemical method for the determination of type in white clover. *New Zealand Journal of Science and Technology* 14:359-365.
- DONATH, J. & BOLAND, W. 1995. Biosynthesis of acyclic homoterpenes: Enzyme selectivity and absolute configuration of the nerolidol precursor. *Phytochemistry* 39:785-790.
- DOVER, B.A., NOBLET, R., MOORE, F. & CULBERTSON, D. 1988. An improved artificial diet for Mexican bean beetles based on host preference. *Journal of Agricultural Entomology* 5:79-86.
- DOWD, P.F., SMITH, C.M. & SPARKS, T.C. 1983. Detoxification of plant toxins by insects. *Insect Biochemistry* 13:453-468.
- DRITSCHLO, W., KRUMMEL, J., NAFUS, D. & PIMENTEL, O. 1979. Herbivorous insects colonising cyanogenic and acyanogenic *Trifolium repens*. *Heredity* 42:49-56.
- DUFOUR, D.L. 1988. Cyanide content of cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) cultivars used by Tukanoan Indians in Northwest Amazonia. *Economic Botany* 42: 255-266.
- DUFOUR, D.L. 1989. Effectiveness of cassava detoxification techniques used by indigenous peoples in Northwest Amazonia. *Intersciencia* 14: 86-91.
- DUFFEY, S. S. 1981. Cyanide and arthropods. In Vennesland, B., Conn, E. E., Knowles, C. J., Westley, J., Wissing, F. (eds.). *Cyanide in Biology*. Academic Press, London, pp. 385-414.
- DUFFEY, S. S. & TOWERS, G. H. N. 1978. On the biochemical basis of HCN production in the millipede *Harpaphe haydeniana* (Xystodesmidae: Polydesmida). *Canadian Journal of Zoology* 56:7-16.
- DUNN, M. A., HUGHES, M. A. & SHARIF, A. L. 1988. Synthesis of the cyanogenic β -glucosidase, linamarase, in white clover. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 260:561-568.
- DYER, L. A. 1995. Tasty generalists and nasty specialists—Antipredator mechanisms in tropical lepidopteran larvae. *Ecology* 76:1483-1496.
- EDELSTEIN-KESHET, L. & RAUSHER, M. D. 1989. The effects of inducible plant defences on herbivore populations. 1. Mobile herbivores in a continuous time. *The American Naturalist* 133:787-810.
- EDMUNDS, M. 2000. Why are there good and poor mimics? *Biological Journal of Linnean Society* 70:459-466.
- EDWARDS, P. J. 1989. Insect herbivory and plant defence theory. In Grubb, P. J. & Whittaker, J. B. (eds.) *Towards a more exact ecology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 275-297.

- EHRlich, P. R. & RAVEN, P. H. 1964. Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution* 18:586-608.
- ELIAS, M., NAMBIAN, B. & SUDHAKARAN, P. R. 1997. Characterization of linamarase of latex and its localization in petioles in cassava. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 341:222-228.
- ELLIS, W. M., KEYMER, R. J., JONES, D. A. 1977. The effect of temperature on the polymorphism of cyanogenesis in *Lotus corniculatus* L. *Heredity* 38:339-347.
- ENGELMANN, F. 1970. The physiology of insect reproduction. Pergamon, New York.
- ENGLER, H. S., SPENCER, K. C. & GILBERT, L. E. 2000. Insect metabolism: Preventing cyanide release from leaves. *Nature* 406:144-145.
- ERICKSON, R. O. 1986. Symplastic Growth and Symplasmic Transport *Plant Physiology* 82:1153.
- ESASHI, Y., MARUYAMA, A., SASAKI, S., TANI, A. & YOSHIYAMA, M. 1996. Involvement of cyanogens in the promotion of germination of cocklebur seeds in response to various nitrogenous compounds, inhibitors of respiratory and ethylen. *Plant Cell Physiology* 37:545-549.
- FEENY, P. 1976. Plant apparency and chemical defense. *Recent Advances in Phytochemistry* 10:1-40.
- FELTON, G. W. & EICHENSEER, H. 1999. Herbivore saliva and its effects on plant defense against herbivores and pathogens. In Agrawal, A. A., Tuzun, S. & Bent, E. (eds.) *Induced plant defenses against pathogens and herbivores: Ecology and agriculture*. American Phytopathology Society Press, St. Paul, pp. 19-36.
- FERREIRA, C., PARRA, R. P & TERRA, W. R. 1997. The effect of dietary plant glycosides on larval β -glucosidases from *Spodoptera frugiperda* and *Diatraea saccharalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27:55-59.
- FISCHER, D., KOGAN, M. & PAXTON, J. 1990. Effect of glyceollin, a soybean phytoalexin on feeding by three phytophagous beetles (Coleoptera: Coccinellidae and Chrysomelidae): Dose versus response. *Environmental Entomology* 19:1278-1282.
- FOFANA, B., DU JARDIN, P. & BAUDOIN, J. P. 2001. Genetic diversity in the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by chloroplast DNA (cpDNA) variations. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50:1-9.
- FOFANA, B., VEKEMANS, X., DU JARDIN, P. & BAUDOIN, J. P. 1997. Genetic diversity in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. *Euphytica* 95:157-165.
- FORSLUND, K. & JONSSON, L. 1997. Cyanogenic glycosides and their metabolic enzymes in barley, in relation to nitrogen levels. *Physiologia Plantarum* 101:367-372.
- FOULDS, W. 1982. Polymorphism for cyanogenesis in *Lotus australis* Andr. Populations at Greenough Front Flats, Western Australia. *Australian Journal of Botany* 30:211-217.
- FRANCISCO, L. A. & PINOTTI, M. H. P. 2000. Cyanogenic glycosides in plants. *Brazilian Archives of Biological Technology* 43(5):487-492.
- FREHNER, M. & CONN, E. E. 1987. The linamarin β -glucosidase in Costa Rica wild bean (*Phaseolus lunatus* L.) is apoplasmic. *Plant Physiology* 84:1296-1300.
- FREHNER, M., LÜSCHER, A., HEBEISEN, T., ZANETTI, S., SCHUBIGER, F. & SCALET, M. 1997. Effects of elevated partial pressure of

- carbon dioxide and season of the year on forage quality and cyanide concentration of *Trifolium repens* L. from a FACE experiment. *Acta Oecologia* 18:297-304.
- FRITSCHÉ-HOBALLAH, M. E. & TURLINGS, T. C. J. 2001. Experimental evidence that plants under caterpillar attack may benefit from attracting parasitoids. *Evolutionary Ecology Research* 3:553-565.
- FRITZ, R. S. & SIMMS, E. L. 1992. Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution, and genetics. University of Chicago Press, Chicago.
- FRY, W. E. & EVANS, P. H. 1977. Association of formamide hydrolyase with fungal pathogenicity to cyanogenic plants. *Phytopathology* 67:1001-1006.
- FUNK, C. J. 2001. Alkaline phosphatase activity in whitefly salivary glands and saliva. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 46:165-174.
- GARCIA, D., CAZAUX, E., RIVANO, F. & D'AUZAC, J. 1995. Chemical and structural barriers to *Microcyclus ulei*, the agent of South American leaf blight, in *Hevea* spp. *European Journal of Forest Pathology* 25:282-292.
- GEBAUER, R. L. E., STRAIN, B. R. & REYNOLDS, J. F. 1998. The effect of elevated CO₂ and N availability on tissue concentrations and whole plant pools of carbon-based secondary compounds in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Oecologia* 13:29-36.
- GEBREHIWOT, L. & BEUSELINCK, P. R. 2001. Seasonal variations in hydrogen cyanide concentration of three *Lotus* species. *Agronomy Journal* 93:603-608.
- GERSHENZON, J. 1984. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. *Recent Advances in Phytochemistry* 18:273-320.
- GERSHENZON, J. 1994. The cost of plant chemical defense against herbivory: a biochemical perspective. In Bernays, E. A. (ed.) *Insect-plant interactions*. CRC Press, pp. 105-173.
- GIAMOUSTARIS, A. & MITHEN, R. 1995. The effect of modifying the glucosinolate content of leaves of oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) on its interaction with specialist and generalist pests. *Annales of Applied Biology* 126:347-363.
- GILBERT, L. E. 1980. Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants. In Gilbert, L. E. & Raven, P. H. (eds.) *Coevolution of animals and plants*. Austin: University of Texas Press, pp. 210-240.
- GLEADOW, R. M. & WOODROW, I. E. 2000a. Temporal and spatial variation in cyanogenic glycosides in *Eucalyptus cladocalyx*. *Tree Physiology* 20:591-598.
- GLEADOW, R. M. & WOODROW, I. E. 2000b. Polymorphism in cyanogenic glycoside content and cyanogenic β-glucosidase activity in natural populations of *Eucalyptus cladocalyx*. *Australian Journal of Plant Physiology* 27:693-699.
- GLEADOW, R. M. & WOODROW, I. E. 2002. Constraints on effectiveness of cyanogenic glycosides in herbivore defense. *Journal of Chemical Ecology* 28:1301-1313.
- GRAFT, J.E. 1925. Climate in relation to Mexican bean beetle distribution. *Journal of Economic Entomology* 18:116-121.
- GOODGER, J. Q. D., CAPON, R. J. & WOODROW, I. E. 2002. Cyanogenic polymorphism in *Eucalyptus polyanthemus* Schaur subsp. *Vestita* L. Johnson and K. Hill (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 30:617-630.

- GOULD, F. 1979. Rapid host range evolution in a population of the phytophagous mite *Tetranychus urticae*. *Evolution* 33:791–802.
- GREEN, T. R. & RYAN, C. A. 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defence mechanism against insects. *Science* 175: 776-777.
- GRINBERG, M., PERL-TREVES, R., PALEVSKY, E., SHOMER, I. & SOROKER, V. 2005. Interaction between cucumber plants and the broad mite, *Polyphogatarsonemus latus*: from damage to defense gene expression. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115:135-144.
- GROETERS, F. R., TABASHNIK, B. E., FINSON, N. & JOHNSON, M. W. 1994. Fitness Costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Evolution* 48:197-201.
- GRUBB, P. J. 1992. A positive distrust in simplicity — lessons from plant defences and from competition among plants and among animals. *Journal of Ecology* 80:585-610.
- GULMON, S. L. & MOONEY, H. A. 1986. Costs of defense and their effects on plant productivity. In Givnish, T. J. (ed.) *On the economy of plant form and function*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 151-197.
- GUTIÉRREZ-SALGADO, A., GEPTS, P. & DEBOUCK, D. G. 1995. Evidence for two gene pools of the lima bean, *Phaseolus lunatus* L., in the Americas. *Genetic Resources and Crop Evolution* 42:15-28.
- HALITSCHKE, R., SCHITTKO, U., POHNERT, G., BOLAND, W. & BALDWIN, I. T. 2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca Sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. *Plant physiology* 125:711-717.
- HALITSCHKE, R., GASE, K., HUI, D. Q., SCHMIDT, D. D. & BALDWIN, I. T. 2003. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VI. Microarray analysis reveals that most herbivore-specific transcriptional changes are mediated by fatty acid-amino acid conjugates. *Plant Physiology* 131:1894-1902.
- HALKIER, B. A. & MØLLER, B. L. 1991. Involvement of cytochrome P-450 in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Physiology* 96:10-17.
- HALKIER, B. A., SCHELLER, H. N. & MØLLER, B. L. 1988. The biosynthesis pathway and the enzyme system involved. In Evered, E. H. S. & Harnet, S. (eds.) *Cyanide compounds in biology*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom, pp. 49-66.
- HAMMERSCHMIDT, R. 1999a. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:77-84.
- HAMMERSCHMIDT, R. 1999b. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology* 37:285-306.
- HANSON, F. E. 1979. Comparative studies on induction of food choice preferences in lepidopterous larvae. *Symposia Biologica Hungarica* 16:71.
- HARBORNE, J. B. 1995: *Ökologische Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- HARDING, J. & TUCKER, C. L. 1969. Quantitative studies on mating systems: III. Methods for the estimation of male gametophytic

- selective values and differential outcrossing rates. *Evolution* 23:85-95.
- HARTLEY, S. E. & LAWTON, J. H. 1991. Biochemical aspects and significance of the rapidly induced accumulation of phenolics in birch foliage. In Tallamy, D. W., Raupp, M. J. (eds.) *Phytochemical Induction by Herbivores*. New York, Wiley, pp 245-276.
- HARTVIGSEN, G. & MCNAUGHTON, S. J. 1995. Tradeoff between height and relative growth rate in a dominant grass from the Serengeti ecosystem. *Oecologia* 102:237-276.
- HASSELL, M., LAWTON, J. & MAY, R. 1976. Patterns of dynamical behaviour in single-species populations. *Journal of Animal Ecology* 45:471-486.
- HAYDEN, K. J. & PARKER, I. M. 2002. Plasticity in cyanogenesis of *Trifolium repens* L.: inducibility, fitness costs and variable expression. *Evolutionary Ecology Research* 4:155-168.
- HEIL, M. 2001. The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). *European Journal of Plant Pathology* 107:137-146.
- HEIL, M. 2004a. Induction of two indirect defences benefits lima bean (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae) in nature. *Journal of Ecology* 92:527-536.
- HEIL, M. 2004b. Direct defense or ecological costs: Responses of herbivorous beetles to volatiles released by wild lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Journal of Chemical Ecology* 30:1289-1295.
- HEIL, M. & BALDWIN, I. T. 2002. Fitness costs of induced resistance: Emerging Experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science* 7:61-67.
- HEIL, M., HILPERT, A., KRÜGER, R. & LINSENMAIR, K. E. 2004a. Competition among visitors to extrafloral nectaries as a source of ecological costs of an indirect defence. *Journal of Tropical Ecology* 20:201-208.
- HEIL, M., GREINER, S., MEIMBERG, H., KRÜGER, R., NOYER, J. L., HEUBL, G., LINSENMAIR, K. E. & BOLAND, W. 2004b. Evolutionary change from induced to constitutive expression of an indirect plant resistance. *Nature* 430:205-208.
- HEMINGWAY, J. & RANSON, H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* 45:371-391.
- HERNÁNDEZ-XOLOCOTZI, E. 1992. La agricultura. In Beltrán, E. (ed.) *Los recursos naturales del sureste y su aprovechamiento, Vol. 3*. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, México, D. F.
- HICKEL, A., HASSLACHER, M & GRIENG, H. 1996. Hydroxynitrile lyases: functions and properties. *Physiologia Plantarum* 98:891-898.
- Hilker, H., Rohfritsch, O. & Meiners, T. 2002. The plant's response towards insect egg deposition. In Hilker, M., Meiners, T. (eds.) *Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition*, Blackwell Publishing, Berlin, pp. 205-233.
- HÖSEL, W. & CONN, E. E., 1982. The aglycone specificity of plant β -glucosidases. *Trends in Biochemical Science* 7:219-221.
- HÖSEL W. & NAHRSTEDT, A. 1975. Spezifische Glucosidasen für das Cyanoglucosid Triglichinin — Reinigung und Charakterisierung von β -Glucosidasen aus *Alocasia macrorrhiza* Schott. Hoppe-Seyler's Zeitschr. *Physiological Chemistry* 356:1265-1275 (in German).

- HÖSEL, W., BERLIN, J., HANZLIK, T. N. & CONN, E. E. 1987. In-vitro biosynthesis of 1-(4'-hydroxyphenol)-2-nitroethane and production of cyanogenic compounds in osmotically stressed cell suspension cultures of *Eshscholtzia californica* Champ. *Planta* 166:176-181.
- HOLZKAMP, G. & NAHRSTEDT, A. 1994. Biosynthesis of cyanogenic glucosides in the Lepidoptera—incorporation of [U-C-14]-2-methylpropanealdoxime, 2S-[U-C-14]-methylbutanealdoxime and D,L-[U-C-14]-N-hydroxyisoleucine into linamarin and lotaustralin by the larvae *Zygaena trifolii*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24:161-165.
- HOPKE, J., DONATH, J., BLECHERT, S. & BOLAND, W. 1994. Herbivore-induced volatiles – The emission of acyclic homoterpenes from leaves of *Phaseolus lunatus* and *Zea mays* can be triggered by a β -glucosidase and jasmonic acid. *FEBS Letters* 352:146-150.
- HOPKINS, A. 1995. Factors influencing cattle bracken-poisoning in Great Britain. In Thornton Smith, R. & Taylor, J. A. (eds.) *Bracken: an environmental issue*. International Bracken Group Special Publication No. 2. Bracken 94 Conference, Aberystwyth, Wales July 1994. International Bracken Group, Aberystwyth, pp. 120-123.
- HORIUCHI, J., ARIMURA, G., OZAWAR, R., SHIMODA, T., TAKABAYASHI, J. & NISHIOKA, T. 2003a. A comparison of the responses of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) to volatiles emitted from Lima bean leaves with different levels of damage made by *T. urticae* or *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Entomology and Zoology* 38:109-116.
- HORRILL, J. C. & RICHARDS, A. J. 1986. Differential grazing by the mollusc *Arion hortensis* Fer. on cyanogenic and acyanogenic seedlings of the white clover, *Trifolium repens* L. *Biochemical Genetics* 22:139-151.
- HORSLEY, S. B. & MEINWALD, J. 1981. Glucose-1-benzoate and prunasin from *Prunus serotina*. *Phytochemistry* 20:1127-1128.
- HOWE, H.F. & WESTLEY, L.C. 1988. Ecological relationship of plants and animals. New York: Oxford University Press.
- HRUSKA, A. J. 1988: Cyanogenic glucosides as defense compounds. *Journal of Chemical Ecology* 14:2213-2217.
- HUGHES, M. A. 1991. The cyanogenic polymorphism in *Trifolium repens* L. (white clover). *Heredity* 66:105-115.
- HUGHES, M. A. 1993. Molecular genetics of plant cyanogenic β -glucosidases. In Esen, A. (ed.) *β -glucosidases: biochemistry and molecular biology*. American Chemical Society, Washington, pp. 153-167.
- HUGHES, M. A. 1996. The molecular biology of disease and pest resistance. In Hughes, M. A. (ed.) *Plant molecular genetics*. Addison Wesley Longman Ltd., Harlow, pp. 200-204.
- HUGHES, M. & STIRLING, J. D. 1982. A study of the dominance at the locus controlling glucoside production in *Trifolium repens* L. *Euphytica* 31:477-483.
- HUGHES, M. A., BROWN, K., MURRAY, B. S., OXTOBY, E. & HUGHES, J. 1992. A molecular and biochemical analysis of the structure of the cyanogenic β -glucosidase from cassava *Manihot esculenta* Crantz. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 295:273-279.
- HUNTER, M. D. & PRICE, P. W. 1992. Playing chutes and ladders: heterogeneity and the relative roles of bottom-up and top-down

- forces in natural communities. *Ecology* 73:724-732.
- HUXLEY, C. R. 1991. Ants and plants: a diversity of interactions. In Huxley, C. R. & Cutler, D. F. (eds.) *Ant-plant interactions*. Oxford: Oxford University Press, pp. 1-11.
- INBAR, M., DOOSTDAR, H. & MAYER, R. T. 1999. Effects of sessile Whitefly nymphs (Homoptera: Aleyrodidae) on leaf-chewing larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology* 28:353-357.
- JANSSEN, A., SABELIS, M. W. & BRUIN, J. 2002. Evolution of herbivore-induced plant volatiles. *Oikos* 97:134-138.
- JANZEN, D. H. 1966. Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America. *Evolution* 20:249-275.
- JONES, D. A. 1962. Selective eating of the acyanogenic form of the plant *Lotus corniculatus* by various animals. *Nature* 193:1109-1110.
- JONES, D. A. 1966. On the polymorphism of cyanogenesis in *Lotus corniculatus*. I. Selection by animals. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 8:556-567.
- JONES, D. A. 1972. Cyanogenic glycosides and their function. In Harborne, J. B. (ed.) *Phytochemical Ecology*. Academic Press, London, pp. 103-124.
- JONES, D. A. 1988. Cyanogenesis in animal-plant interactions. In Evered, D., Harnett, S. (eds.) *Cyanide Compounds in Biology*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom, pp. 151-165.
- JONES, D. A. 1998. Why are so many food plants cyanogenic? *Phytochemistry* 47:155-162.
- KAHN, Z. R., PICKETT, J. A., WADHAMS, L. J. & MUYEKHO, F. 2001. Habitat management strategies for the control of cereal stemborers and striga in maize in Kenya. *Insect Science and its Application* 21:375-380.
- KAHN, R. A., BAK, S., SVENDSEN, I., HALKIER, B. A. & MØLLER, B. L. 1997. Isolation and reconstitution of cytochrome P-450_{ox} and *in vitro* reconstitution of the entire biosynthesis pathway of the cyanogenic glucoside dhurrin from sorghum. *Plant Physiology* 115:1661-1670.
- KAHN, Z. R., PICKETT, J. A., VAN DEN BERG, J., WADHAMS, L. J. & WOODCOCK, C. M. 2000. Exploiting chemical ecology and species diversity: stem borer and striga control for maize and sorghum in Africa. *Pest Management Science* 56:957-962.
- KAHN, Z. R., AMPONG-NYARKO, K., CHILISWA, P., HASSANALI, A., KIMANI, S., LWANDE, W., OVERHOLT, W. A., PICKETT, J. A., SMART, L. E., WADHAMS, L. J. & WOODCOCK, C. M. 1997. Intercropping increases parasitism of pests. *Nature* 388:631-632.
- KAHL, J., SIEMENS, D. H., AERTS, R. J. GABLER, R., KÜHNEMANN, F., PRESTON, C. A. & BALDWIN, I. T. 2000. Herbivore-induced ethylene suppresses a direct defense but not a putative indirect defense against an adapted herbivore. *Planta* 210:336-342.
- KAKES, P. 1989. An Analysis of the costs and benefits of the cyanogenic system in *Trifolium repens*. *Theory of Applied Genetics* 77:111-118.
- KAKES, P. 1997. Difference between the male and female components of fitness associated with the gene Ac in *Trifolium repens*. *Acta Botanica Neerlandica* 46:219-223.
- KALULE, T., OGENGA-LATIGO, M. W. & OKOTH, V. A. O. 1997. Seasonal fluctuations and damage of lepidopteran stem borers of maize in a major agroecozone of Uganda. *African Crop Science Journal* 5:385-393.

- KARBAN, R. 1986. Induced resistance against spider mites in cotton: field verification. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 42:239-242.
- KARBAN, R. & BALDWIN, I. T. 1997. *Induced Responses to Herbivory*. University of Chicago Press, Chicago.
- KESSLER, A. & BALDWIN, I. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291:2141-2144.
- KEYMER, R. J. & ELLIS, W. M. 1978. Experimental studies on *Lotus corniculatus* L. from Anglesey polymorphic for cyanogenesis. *Heredity* 40:189-206.
- KINNEY, K. K., LINDROTH, R. L., JUNG, S. M. & NORDHEIM, E. V. 1997. Effects of CO₂ and NO₃ availability on deciduous trees: phytochemistry and insect performance. *Ecology* 78:215-230.
- KIMANI, S. M., CHHABRA, S. C., LWANDE, W., KHAN, Z. R., HASSANALI, A. & PICKETT, J. A. 2000. Airborne volatiles from *Melinis minutiflora* P. Beauv., a non-host plant of the spotted stem borer. *Journal of Essential Oil Research* 12:221-224.
- KNOWLES, C. J. 1988. Cyanide utilization and degradation by microorganisms. In Evered, D. & Harnett, S. (eds.) *Cyanide compounds in biology*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom, pp. 3-9.
- KOGAN, M. & HERZOG, D. C. 1980. *Sampling Methods in Soybean Entomology*. Springer-Verlag, N.Y.
- KOGEL, G., BEISSMANN, B., REISENER, H. J. & KOGEL, K. 1991. Specific binding of a hypersensitive lignification elicitor from *Puccinia graminis* f. sp. tritici to the plasma membrane from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Planta* 183:164-169.
- KOJIMA, M., POULTON, J. E., THAYER, S. S. & CONN, E. E. 1979. Tissue distribution of dhurrin and of enzymes involved in its metabolism in leaves of *Sorghum bicolor*. *Plant Physiology* 63:1022-1028.
- KOJIMA, M., IWATSUKI, N., DATA, E. S., VILLEGAS, C. D. V. & URITANI, I. 1983. Changes in cyanide content and linamarase activity in wounded cassava roots. *Plant Physiology* 72:186-189.
- KOPTUR, S. 1992. Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. In Bernays, E. (ed.) *Insect-plant interactions*. CRC Press, Boca Raton, pp. 81-129.
- KORICHEVA, J. 2002. The carbon-nutrient balance hypothesis is dead; long live the carbon-nutrient balance hypothesis. *Oikos* 98:537-539.
- KOST, C. & HEIL, M. 2005a. Increased availability of extrafloral nectar reduces herbivory in Lima bean plants (*Phaseolus lunatus*). *Basic & Applied Ecology* 6:237-248.
- KOST, C. & HEIL, M. 2005b. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *Journal of Ecology*, accepted.
- KRIEDEMANN, P. E. 1964. Cyanide formation in *Sorghum almum* in relation to nitrogen and phosphorus nutrition. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 4:15-16.
- KRISTENSEN, B. K., AMMITZBØLL, H., RASMUSSEN, S. K. & NIELSEN, K. A. 2001. Transient expression of a vacuolar peroxidase increases susceptibility of

- epidermal barley cells to powdery mildew. *Molecular Plant Pathology* 2:311-318.
- LAMB, C. & DIXON, R. A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:251-275.
- LAMB, J. F. S., HASKINS, F. A., GORZ, H., J. & VÖGEL, K. P. 1987. Inheritance of seedling hydrocyanic acid potential and seed weight in sorghum-sudangrass crosses. *Crop Science* 27:522-525.
- LAMBERS, H. 1993. Rising CO₂, secondary plant metabolism, plant-herbivore interactions and litter decomposition. *Vegetatio* 104/105:263-271.
- LANDSBERG, J. & STAFFORD SMITH, M. 1992. A functional scheme for predicting the outbreak potential of herbivorous insects under global atmospheric change. *Australian Journal of Botany* 40:565-577.
- LAPIDUS, J. B., CLEARY, R. W., DAVIDSON, R. H., FISK, F. W. & AUGUSTINE, M. G. 1963. Chemical factors influencing host selection by the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* Muls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 11:462-463.
- LAWLER, I. R., FOLEY, W. J., WOODROW, I. E. & CORK, S. J. 1997. The effects of elevated CO₂ atmospheres on the nutritional quality of Eucalyptus foliage and its interaction with soil nutrient and light availability. *Oecologia* 109:59-68.
- LERDAU, M. & COLEY, P. D. 2002. Benefits of the carbon-nutrient balance hypothesis. *Oikos* 98:534-536.
- LIEBEREI, R. 1984. Cyanogenese und Resistenz. Habilitationsschrift. Naturwissenschaftliche Fakultät, TU Braunschweig, FRG.
- LIEBEREI, R. 1988. Relationship of cyanogenic capacity (HCN-c) of the rubber tree *Hevea brasiliensis* to susceptibility to *Microcyclus ulei*, the agent causing South American leaf blight. *Journal of Phytopathology* 122, 54-67.
- LIEBEREI, R., FOCK, H. P. & BIEHL, B. 1996. Cyanogenesis inhibits active defense in plants: inhibition by gaseous HCN of photosynthetic CO₂ fixation and respiration in intact leaves. *Angewandte Botanik* 70:230-238.
- LIEBEREI, R., BIEHL, B., GIESEMANN, A. & JUNQUEIRA, N. T. V. 1989. Cyanogenesis inhibits active defence reactions in plants. *Plant Physiology* 90:33-36.
- LIEBEREI, R., NAHRSTEDT, A., SELMAR, D. & GASPAROTTO L. 1986. The occurrence of Lotaustralin in the genus *Hevea* and changes of HCN-potential in developing organs of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 25:1573-1578.
- LIEBEREI, R., SCHRADER, A., BIEHL, B. & CHEE, K. H. 1983. Effect of cyanide on *Microcyclus ulei* Cultures. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia* 31:227-235.
- LINDROTH, R. L. 1991. Differential toxicity of plant allelochemicals to insects: roles of enzymatic detoxication systems. In Bernays, E. (ed.) *Insect-Plant Interactions*, CRC Press, Boca Ranton, pp. 1-33.
- LIOI, L., LOTTI, C. & GALASSO I. 1998. Isozyme diversity, RFLP of rDNA and phylogenetic affinities among cultivated lima beans, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae). *Plant Systematics and Evolution* 213:153-164.
- LIOI, L. & GALASSO I. 2002. Oligonucleotide DNA fingerprinting revealing polymorphism in *Phaseolus lunatus* L. *Genetic Resources*

- and Crop Evolution* 49:53-58.
- LIU, S., NORRIS, D., HARTWIG, E. & XU, M. 1992. Inducible phytoalexins in juvenile soybean genotypes predict soybean looper resistance in the fully developed plants. *Plant Physiology* 100:1479-1485.
- LOEHLE, C. 1996. Optimal defensive investments in plants. *Oikos* 75:299-302.
- LONG, K.Y. & BRATTSTEN, L.B. 1982. Is rhodanese important in the detoxification of dietary cyanide in southern armyworm (*Spodoptera eridania* CRAMER) larvae? *Insect Biochemistry* 12:367-375.
- LOUVEAUX, A., BLAISE, S., CARTIER, D. & DREUILLAUD, J.-M. 1996. Biodiversité intraspécifique dans les formations prairiales I — Recherche des causes de variation, à l'échelle locale, du polymorphisme cyanogénique chez *Lotus corniculatus* L. (Fabacées). *Acta botanica Gallica* 43:241-249.
- LOYD, R. & GRAY, E. 1970. Amount and distribution of hydrocyanic acid potential during the life cycle of plants of three *Sorghum* cultivars. *Agronomy Journal* 394-397.
- LUCIER, G. & PLUMMER, C. 2003. Vegetables and melons outlook. Electronic Outlook Report from the Economic Research Service. USDA. VGS-298. August. <http://www.ers.usda.gov/publications/vgs/au03/vgs298.pdf>.
- LUNAU, K. 2004. Adaptive radiation and coevolution — Pollination biology case studies. *Organisms Diversity & Evolution* 4:207-224.
- LUNDBERG, S., JAREMO, J. & NILSSON, P. 1994. Herbivory, inducible defence and population oscillations: a preliminary theoretical analysis. *Oikos* 71:537-539.
- MAINGUET, A. M., LOUVEAUX, A., EL SAYED, G. & ROLLIN, P. 2000. Ability of a generalist insect, *Schistocerca gregaria*, to overcome thioglucoside defense in desert plants: tolerance or adaptation. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 94:309-317.
- MAJAK, W., MCDIARMID, R. E., HALL, W. & VAN RYSWYK, A. L. 1980. Seasonal variation in cyanide potential of arrow grass (*Triglochin maritima*). *Canadian Journal of Plant Science* 60:1235-1241.
- MAQUET, A., GUTIERREZ, A. & DEBOUCK, D. G. 1990. Further biochemical evidence for the existence of two gene pools in Lima beans. *Annual Reports of the Bean Improvement Cooperation* 33:128-129.
- MARTIN, J. H., COUCH, J. F. & BRIESE, R. R. 1938. Hydrocyanic acid content of different parts of sorghum plant. *Journal of the American Society of Agronomy* 30:725-734.
- MARTÍNEZ-CASTILLO, J., ZIZUMBO-VILLARREAL, D., PERALES-RIVERA, H. & COLUNGA-GARCÍA-MARIN. 2004. Intraspecific diversity and morpho-phenological variation in *Phaseolus lunatus* L. from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Economic Botany* 58(3):354-380.
- MATTIACCI, L., DICKE, M. & POSTHUMUS, M. A. 1994. Induction of parasitoid attracting synomone in Brussel sprouts plants by feeding *Pieris brassicae* larvae: Role of mechanical damage and herbivore elicitor. *Journal of Chemical Ecology* 20:2229-2247.
- MATTIACCI, L., DICKE, M. & POSTHUMUS, M. A. 1995. β -Glucosidase: An elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:2036-2040.

- MCCABE, P. F., LEVINE, A., MEIJER, P.-J., TAPON, N. A. & PENNELL, R. I. 1997a. A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. *Plant Journal* 12:267-280.
- MCCABE, P. F., VALENTINE, T. A. FORSBERG, S. & PENNELL, R. I. 1997b. Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot. *Plant Cell* 12: 2225-2241.
- MCKEY, D. 1974. Adaptive patterns in alkaloid physiology. *The American Naturalist* 108:305-320.
- MCMAHON, J. M., WHITE, W. L. B., SAYRE, R. T. 1995. Cyanogenesis in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Experimental Botany* 46:731-741.
- MEDERACKE, H., BIEHL, B. & SELMAR, D. 1996. Characterization of two cyanoglucosyltransferases from cassava leaves. *Phytochemistry* 42(6):1517-1522.
- MIGUEL, A. A. & ALBERTO, O. B. 2005. Kinetics of the natural evolution of hydrogen cyanide in plants in neotropical *Pteridium arachnoideum* and its ecological significance. *Journal of Chemical Ecology* 31: 315-331
- MIKOLAJCZAK, K. L. 1977. Cyanolipids. *Progress in Chemistry of Fats and Other Lipids* 15:97-130.
- MILES, P. W. 1999. Aphid saliva. *Biological Reviews* 74:41-85.
- MITHÖFER, A., DAXBERGER, A., FROMHOLD-TREU, D. & EBEL, J. 1997. Involvement of an NAD(P)H oxidase in the elicitor-inducible oxidative burst of soybean. *Phytochemistry* 45: 1101-1107.
- MITHÖFER, A., WANNER, G. & BOLAND, W. 2005. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on Lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. *Plant Physiology* 137:1160-168.
- MØLLER, B. L. & CONN, E. E. 1980. The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. Channeling of intermediates in dhurrin biosynthesis by a microsomal system from *Sorghum bicolor* (Linn) Moench. *Journal of Biological Chemistry* 255:3049-3056.
- MØLLER, B. L. & POULTON, J. E. 1993. Cyanogenic glucosides. In Lea, P. J. (ed.) *Methods in plant biochemistry, volume 9*. Academic Press, London, pp. 183-207.
- MØLLER, B. L. & SEIGLER, T. S. 1999. Biosynthesis of cyanogenic glucosides, cyanolipids, and related compounds. In Singh, B. K. (ed.) *Plant amino acids, biochemistry and biotechnology*. Marcel Dekker, New York, pp. 563-609.
- MOWAT, D. J. & CLAWSON, S. 1996. Oviposition and hatching of the clover weevil *Sitona lepidus* Gyll (Coleoptera, Curculionidae). *Grass and Forage Science* 51:418-423.
- Myers, J. H. 1985. Effect of physiological condition of the host plant on the ovipositional choice of the cabbage white butterfly, *Pieris rapae*. *Journal of Animal Ecology* 54:193-204.
- NAHRSTEDT, A. 1985a. Cyanogenesis and the role of cyanogenic compounds in insects. *Plant Systematics and Evolution* 150:35-47.
- NAHRSTEDT, A. 1985b. Cyanogenic compounds as protecting agents for organisms. In Evered, D. & Harnett, S. (eds.) *Cyanide Compounds in Biology*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom, pp. 131-150.
- NAHRSTEDT, A. 1988. Cyanogenic compounds as protecting agents for organisms. In Evered, D. & Harnett, S. (eds.) *Cyanide*

- Compounds in Biology*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom, pp. 131-150.
- NAHRSTEDT, A. 1989. The significance of secondary metabolites for interactions between plants and insects. *Planta Medica* 138:333-338.
- NAHRSTEDT, A. 1993. Cyanogenesis in the Zygaenidae (Lepidoptera): a review of the state of the art. In Tremewan, W. G., Wipking, W. & Naumann, C. M. (eds.) *Proceedings of the 5th International Symposium on the Biology of the Zygaenidae (Insecta, Lepidoptera)*. Koeltz Scientific Books, Grietherbusch, Germany, pp. 17-29.
- NAHRSTEDT, A. & DAVIS, R. H. 1981. The occurrence of the cyanoglucosides, linamarin and lotaustralin, in *Acraea* and *Heliconius* butterflies. *Comparative Biochemistry and Physiology B—Biochemistry & Molecular Biology* 68:575-577.
- NAHRSTEDT, A. & DAVIS, R. H. 1983. Occurrence, variation and biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin in species of the Heliconiini (Insecta, Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology B—Biochemistry & Molecular Biology* 75:65-73.
- NAHRSTEDT, A. & DAVIS, R. H. 1985. Biosynthesis and quantitative relationships of cyanogenic glucosides, linamarin and lotaustralin, in genera of the Heliiconiini (Insecta, Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology B—Biochemistry & Molecular Biology* 82:745-749.
- NASS, H. G. 1972. Cyanogenesis: its inheritance in sorghum bicolor, *Sorghum sudanese*, *Lotus*, and *Trifolium repens* — a review. *Crop Science* 12:503-506.
- NATON, B., HAHNBROCK, K. & SCHMELZER, E. 1996. Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells. *Plant Physiology* 112:433-444.
- NIELSEN, K. A., OLSEN, O. & OLIVER, R. P. 1999. A transient expression system to assay putative antifungal genes on powdery mildew infected barley leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54:1-12.
- NIELSEN, K. A., HRMOVA, M., NIELSEN, J. N., FORSLUND, K., EBERT, S., OLSEN, C. E., FINCHER, G. B. & MØLLER, B. L. 2006. Reconstitution of cyanogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) and its implications for resistance against the barley powdery mildew fungus. *Planta* 223:1010-1023.
- NIEMELÄ, P. & TUOMI, J. 1987. Does the leaf morphology of some plants mimic caterpillar damage? *Oikos* 50:256-257.
- OHNMEISS, T. E. & BALDWIN, I. T. 1994. The allometry of nitrogen allocation to growth and an inducible defense under nitrogen-limited growth. *Ecology* 75:995-1000.
- OHSAKI, N. & SATO, Y. 1994. Food plant choice of *Pieris* butterflies as a trade-off between parasitoid avoidance and quality of plants. *Ecology* 75:59-68.
- OHTSUBO, T. & IKEDA, F. 1994. Seasonal changes of cyanogenic glucosides in mume (*Prunus mume* Sieb. Et Zucc.) seeds. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science* 62:695-700.
- OKOLIE, P. N. & OBASI, B. N. 1993. Diurnal variation of cyanogenic glucosides, thiocyanate and rhodanese in cassava. *Phytochemistry* 33:775-8.
- OROZCO-CÁRDENAS, M. L., MCGURL, B. & RYAN, C. A. 1993. Expression of an antisense

- prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca Sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:8273-8276.
- OSBOURN, A. E. 1996a. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell* 8:1821-1831.
- OSBOURN, A.E. 1996b. Saponins and plant defence – A soap story. *Trends in Plant Science* 1:4-9.
- OSIER, T. L., TRAUGOTT, M. S. & STAMP, N. E. 1996. Allelochemicals in tomato leaves affect a specialist insect herbivore *Manduca sexta* negatively but with no ill effects on a generalist insect predator, *Podisus maculiventris*. *Oikos* 77:481-488.
- OVERHOLT, W. A., NGI-SONG, A. J., OMWEGA, C. O., KIMANI-NJOGU, S. K., MBAPILA, J. C., SALLAM, M. N. & OFAMATA, V. 1997. A review of the introduction and establishment of *Cotesia flavipes* Cameron in East Africa for Biological Control of Cereal stemborers. *Insect Science and Application* 17:79-88.
- OZAWA, R., ARIMURA, G., TAKABAYASHI, J., SHIMODA, T. & NISHIOKA, T. 2000a. Involvement of jasmonate- and salicylate-related signalling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants. *Plant and Cell Physiology* 41:391-398.
- PALLISTER, J.C. 1949. Mexican bean beetle. *Natural History* 58:162-165.
- PARÉ, P. W. & TUMLINSON, J. H. 1997. *De novo* biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant Physiology* 114:1161-1167.
- PATEL, C. J. & WRIGHT, M. J. 1958. The effect of certain nutrients upon the hydrocyanic acid content of sudangrass grown in nutrient solution. *Agronomy Journal* 50:645-647.
- PATTON, C. A., RANNEY, T. G., BURTON, J. D. & WALGENBACH, J. F. 1997. Natural pest resistance of *Prunus* taxa to feeding by adult Japanese beetles—role of endogenous allelochemicals in host plant resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122:668-672.
- PEDERSON, G., FAIRBROTHER, T. E. & GREENE, S. L. 1996. Cyanogenesis and climatic relationships in US white clover germplasm collection and core subset. *Crop Science* 36:427-433.
- PÉREZ, C. J., ALVARDO, P., NARVÁEZ, C., MIRANDA, F., HERNÁNDEZ, L., VANEGAS, H., HRUSKA, A. & SHELTON, A. M. 2000. Assessment of insecticide resistance in five insect pests attacking field and vegetable crops in Nicaragua. *Journal of Economic Entomology* 93:1779-1787.
- PETTIT, F. L., TURLINGS, T. C. J. & WOLF, S. P. 1992. Adult experience modifies attraction of the leaf miner parasitoid *Opius dissitus* (Hymenoptera: Braconidae) to volatile semiochemicals. *Journal of Insect Behaviour* 5:623-634.
- PETTERSSON, R. & McDONALD, A. J. S. 1992. Effects of elevated carbon dioxide concentration on photosynthesis and growth of small birch plants (*Betula pendula* Roth.) at optimal nutrition. *Plant, Cell & Environment* 15:911-919.
- PIETROWSKI, A. 2003. Einfluss der pflanzlichen Cyanogenese bei der Pflanze-Pathogen Wechselwirkung — eine Untersuchung an der Wirtspflanze *Phaseolus lunatus* L. Diplomarbeit. University of Hamburg.
- POULTON, J. E. 1983. Cyanogenic compounds in plants and their toxic effects. In Keeler,

- R. F. & Tu, T. A. (eds.) *Handbook of Natural Toxins 1*. Marcel Dekker Inc., New York.
- POULTON, J. E. 1988. Localisation and catabolism of cyanogenic glycosides. In Evered, D. & Harnett, S. (eds.) *Cyanide Compounds in Biology*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom, pp. 67-91.
- POULTON, J. E. 1990. Cyanogenesis in plants. *Plant Physiology* 94:401-405
- POULTON, J. E. & LI, C. P. 1994. Tissue level compartmentation of (R)-amygdalin and amygdalin hydrolase prevents large-scale cyanogenesis in undamaged *Prunus* seeds. *Plant Physiology* 104:29-35.
- PRATT, P. D. & CROFT, B. A. 2000. Overwintering and comparative sampling of *Neoseiulus fallcis* (Acari: Phytoseiidae) on ornamental nursery plants. *Environmental Entomology* 29:1034-1040.
- PROVENZA, F. D., PFISTER, J. A. & CHENEY, C. D. 1992. Mechanisms of learning in diet selection with reference to phytotoxicosis in herbivores. *Journal of Range Management* 45:36-45.
- PULLIN, A. S. & GILBERT, J. E. 1989. The stinging nettle, *Urtica dioica*, increases trichome density after mechanical and herbivore damage. *Oikos* 54:275-280.
- PURESWARAN, D. S., GRIES, R. & BORDON, J. H. 2004. Antennal response of four species of tree-killing bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) to volatiles collected from beetles, and their host and nonhost conifers. *Chemoecology* 14:59-66.
- RAUBENHEIMER, D. & SIMPSON, S. J. 1994. The analysis of nutrient budgets. *Functional Ecology* 8:783-791.
- RAUSHER, M. D. 1979a. Larval habitat suitability and oviposition preference in three related butterflies. *Ecology* 60:503-511.
- RAUSHER, M. D. 1979b. Egg recognition: its advantage to a butterfly. *Animal Behaviour* 27:1034-1040.
- RAVEN, J. A. 1983. Phytophages of xylem and phloem. *Advanced Ecology Research* 13:135-234.
- REDDEN, R., WRIGHT, R. & TOMPKINS, W. 1996. Lima beans as a new crop. In Imrie, B. C. & Fletcher, R. (eds.) *First Australian New Crops Conference*. University of Queensland Gatton College, p. 8.
- REGAL, P. J. 1977. Ecology and evolution of flowering plant dominance. *Science* 196:622-629.
- REICHARDT, P. B., CHAPIN, F. S., BRYANT, J. P., MATTES, B. R. & CLAUSEN, T. P. 1991. Carbon/nutrient balance as a predictor of plant defense in Alaskan balsam poplar: potential importance of metabolite turnover. *Oecologia* 88:401-406.
- RENNWICK, J. A. A. & LOPEZ, K. 1999. Experience-based food consumption by larvae of *Pieris rapae*: Addiction to glucosinolates? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91:51-58.
- RESSLER, C., NIGAM, S. & GIZA, Y. 1969. Toxic principle in vetch: isolation and identification of γ -L-glutamyl-L- β -cyanoalanine from common vetch seeds: distribution in some legumes. *Journal of the American Chemical Society*. 91:2758-2765.
- RHOADES, D. F. 1979. Evolution of plant chemical defense against herbivores. In Rosenthal, G. A. & Janzen, D. H. (eds.) *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press, New York, pp. 3-54.
- RHOADES, D. F. 1983. Herbivore population dynamics and plant chemistry. In Denno, R. F. & McClure, M. S. (eds.) *Variable plants and herbivores in natural and managed*

- ecosystems. Academic Press, San Diego, Calif, pp. 155-220.
- RHOADES, D. F. 1985. Offensive-defensive interactions between herbivores and plants: their relevance in herbivore population dynamics and ecological theory. *The American Naturalist* 125:205-238.
- ROBINSON, M. E. 1930. Cyanogenesis in plants. *Biological Reviews* 5:126-141.
- ROSENTHAL, G. A. 1986. The chemical defense of higher plants. *Scientific American Society* 120:76-81.
- ROSS, M. D. & JONES, W. T. 1962. A genetic polymorphism for tannin production in *Lotus corniculatus* and its relationship to cyanide polymorphism. *Theory Applied Genetics* 64:263-268.
- ROUSI, M., MATTSON, W. J., TAHVANAINEN, J., KOIKE, T. & UOTIAL, H. 1996. Growth and hare resistance of birches: testing defense theories. *Oikos* 77:20-30.
- RUSSO, V. M., RUSSO, B. M., PETERS, M., PERKINS-VEAZIE, P. & CARTWRIGHT, B. 1997. Interaction of *Colletotrichum orbiculare* with thrips and aphid feeding on watermelon seedlings. *Crop Protection* 16:581-584.
- SABELIS M. W. & VAN DE BAAN, H. E. 1983. Location of distant spider mite colonies by phytoseiid predators: Demonstration of specific kairomones emitted by *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 33:303-314.
- SAUER, J. D. 1993. Historical geography of crop plants — a select roster. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- SAUNDERS, J. A. & CONN, E. E. 1978. The presence of the cyanogenic glucoside dhurrin in isolated vacuoles from sorghum. *Plant Physiology* 61:154-157.
- SCHAPPERT, P. J. & SHORE, J. S. 1995. Cyanogenesis in *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). I. Phenotypic distribution and genetic variation for cyanogenesis on Jamaica. *Heredity* 74:392-404.
- SCHALLER, A. 2002. Die Abwehr von Fressfeinden: Selbstverteidigung im Pflanzenreich. *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich* 147/4:141-150.
- SCHAPPERT, P. J. & SHORE, J. S. 1999b. Effects on cyanogenesis polymorphism in *Turnera ulmifolia* on *Euptoieta hegesia* and potential *Anolis* predators. *Journal of Chemical Ecology* 25:1455-1479.
- SCHAPPERT, P. J. & SHORE, J. S. 1999c. Cyanogenesis, herbivory and plant defense in *Turnera ulmifolia* on Jamaica. *Ecoscience* 6:511-520.
- SCHAPPERT, P. J. & SHORE, J. S. 2000. Cyanogenesis in *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). I. Developmental expression, heritability and cost of cyanogenesis. *Evolution and Ecology Research* 2:337-352.
- SCHREINER, I., NAFUS, D. & PIMENTEL, D. 1984. Effects of cyanogenesis in bracken fern (*Pteridium aquilinum*) on associated insects. *Ecological Entomology* 9:69-70.
- SCHULTZ, J. C. 1988. Plant responses induced by herbivores. *Trends in Ecology & Evolution* 3:45-49.
- SCHITTKO, U., PRESTON, C. A. & BALDWIN, I. T. 2000. Eating the evidence? *Manduca sexta* larvae can not disrupted specific jasmonate induction in *Nicotiana attenuata* by rapid consumption. *Planta* 210: 343-346.
- SCRIBER, J. M. 1978. Cyanogenic glycosides in *Lotus corniculatus*. Their effect upon growths, energie budget and nitrogen utilization of the southern armyworm *Spodoptera eridania*. *Oecologia* 34:151-155.

- SEIGLER, D. S. 1991. Cyanide and cyanogenic glucosides. In Rosenthal, G. A., Berenbaum, M. R. (eds.) *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites, volume 1. The chemical participants*. Academic Press, San Diego, pp. 35-77.
- SEIGLER, D. S. 1998. Cyanogenic glycosides and cyanolipids. In Seigler, D. S. (ed.). *Plant Secondary Metabolism*. Kluwer Academic Press, Boston, pp. 273-296.
- SELMAR, D. 1986. Cyanogenese in *Hevea brasiliensis*, zwei Wege zur Metabolisierung cyanogener Glycoside. Ph.D. dissertation, TU Braunschweig, 12-13, 14-15, 63-64, 131-136.
- SELMAR, D. 1981. Charakterisierung einer gereinigten β -Glycosidase mit Linamarase Aktivität aus Blättern von *Hevea brasiliensis*. Examensarbeit. Technical University of Braunschweig.
- SELMAR, D. 1993a. Transport of cyanogenic glucosides: Linustatin uptake by *Hevea cotyledons*. *Planta* 191:191-199.
- SELMAR, D. 1993b. Transport of cyanogenic glucosides: linustatin uptake by *Hevea cotyledons*. *Planta* 191:191-199.
- SELMAR, D., GROCHOLEWSKI, S. & SEIGLER, D. S. 1990. Cyanogenic lipids utilization during seedling development of *Ungnadia speciosa*. *Plant Physiology* 93:631-636.
- SELMAR, D., LIEBERI, R. & BIEHL, B. 1988. Mobilization and utilization of cyanogenic glycosides: the linustatin pathway. *Plant Physiology* 86:711-716.
- SELMAR, D., LIEBERI, R., BIEHL, B. & VOIGT, J. 1987. Linamarase in *Hevea* — a non-specific β -glycosidase. *Plant Physiology* 83:557-563.
- SELMAR, D., LIEBERI, R., CONN, E. E. & BIEHL, B. 1989. α -Hydroxynitrile lyase in *Hevea brasiliensis* and its significance for rapid cyanogenesis. *Physiologia Plantarum* 75:97-101.
- SIBBESEN, O., KOCH, B., HALKIER, B. A. & MØLLER, B. L. 1994. Cytochrome P-450_{Tyr} is a multifunctional heme-thiolate enzyme catalyzing the conversion of L-tyrosine to p-hydroxyphenylacetaldehyde oxime in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Journal of Biological Chemistry* 270:3506-3511.
- SHAPIRO, A. M. 1981a. Egg-mimics of *Streptanthus* (Cruciferae) deter oviposition by *Pieris sysimbrii* (Lepidoptera: Pieridae). *Nature* 266:352-355.
- SHIMODA, T., OZAWA, R., ARIMURA, G., TAKABAYASHI, J. & NISHIOKA, T. 2002. Olfactory responses of two specialist insect predators of spider mites toward plant volatiles from Lima bean leaves induced by jasmonic acid and/or methyl salicylate. *Applied Entomology and Zoology* 37:535-541.
- SHIRASU, K., NIELSEN, K., PIFFANELLI, P., OLIVER, R. & SCHULZE-LEFERT, P. 1999. Cell-autonomous complementation of mlo resistance using a biolistic transient expression system. *Plant Journal* 17:293-299.
- SHORE, J. S. & OBRIST, C. M. 1992. Variation in cyanogenesis within and among populations and species of *Turnera* series *Canaligeræ* (Turneraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 20:9-15.
- SILVERTOWN, J. & GORDON, D. M. 1989. A framework for plant behaviour. *Annual Review of Ecology and Systematics* 20:349-366.
- SIMMONS, A. T. & GURR, G. M. 2004. Trichome-based host plant resistance of *Lycopersicon*

- species and the biocontrol agent *Mallada signata*: are they compatible? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 113:95-101.
- SIRITUNGA, D., ARIAS-GARZON, DIANA; WHITE, W. & SAYRE, R. T. 2002. Over-expression of hydroxynitrile lyase in transgenic cassava roots accelerates cyanogenesis and food detoxification. *Plant Biotechnology Journal* 2:37-43.
- SMEATHERS, D. M., GRAY, E. & JAMES, J. H. 1973. Hydrocyanic acid potential of old black cherry leaves as influenced by ageing and drying. *Agronomy Journal* 65:775-777.
- SMITH, C.M., WILSON, R.F. & BRIM, C.A. 1979. Feeding behaviour of Mexican bean beetle on leaf extracts of resistant and susceptible soybean genotypes. *Journal of Economic Entomology* 72:374-377.
- SOLOMONSON, L. P. 1981. Cyanide as a metabolic inhibitor. In Vennesland, B., Conn, E. E., Knowles, C. J., Westby, J. & Wissing, F. (eds.) *Cyanide in Biology*. Academic Press, London, pp. 11-28.
- SOLOMONSON, L. P. 1988. Regulation of nitrate reductase by NADH and cyanide. *Biochimica et Biophysica Acta* 334:297-308.
- SPIPELLER, D., POHNERT, G. & BOLAND, W. 2001. Absolute configuration of volicitin, an elicitor of plant volatile biosynthesis from lepidopteran larvae. *Tetrahedron Letters* 42:1483-1485.
- STATISTICA 6.0. 2001. System Reference by StatSoft, Inc.
- STEELE, C. L., LEWINSOHN, E. & CROTEAU, R. 1995. Induced oleoresin biosynthesis in grand fir as a defense against bark beetles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:4164-4168.
- STOCKMAL, A. & OLESZEK, W. 1997. Changes in the cyanogenic glucosides in white clover (*Trifolium repens* L.) during the growing season. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45:4333-4336.
- STOUT, M. J., WORKMAN, J. & DUFFEY, S. S. 1994. Differential induction of tomato foliar proteins by arthropod herbivores. *Journal of Chemical Ecology* 20:2575-2594.
- STRAUSS, S. Y., RUDGERS, J. A., LAU, J. A. & IRWIN, R. E. 2002. Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution* 17:278-285.
- STRONG, D. R. & LARSSON, S. 1994. Is the evolution of herbivore resistance influenced by parasitoids? In Hawkins, B. A., Sheehan, W. (eds.) *Parasitoid community ecology*. Oxford University Press, Oxford, pp. 261-276.
- SWAIN, E. & POULTON, J. E. 1992. Utilization of amygdalin during seedlings development of *Prunus serotina*. *Plant Physiology* 106:437-445.
- SWAIN, E. & POULTON, J. E. 1994. Utilization of amygdalin during seedling development of *Prunus serotina*. *Plant Physiology* 106:437-445.
- SWAIN, E., LI, C. P. & POULTON, J. E. 1992. Tissue and subcellular localization of enzymes catabolizing (*R*)-amygdalin in mature *Prunus serotina* seeds. *Plant Physiology* 100:291-300.
- TABASHNIK, B. E., CUSHING, N. L., FINSON, N. & JOHNSON, M. W. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: lutellidae). *Journal of Economic Entomology* 83: 1671-1676.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2000. Physiologie der Pflanzen. Heidelberg, Berlin; Spektrum, Akademischer Verlag.

- TAKABAYASHI, J., TAKAHASHI, S., DICKE, M. & POSTHUMUS, M. A. 1995. Developmental stage of herbivore *Pseudaletia separata* affects production of herbivore-induced synomone by corn plants. *Journal of Chemical Ecology* 21:273-287.
- TAMAYO, M. C., RUFAT, M., BRAVO, J. M. & SAN SEGUNDO, B. 2000. Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding and characterization of its activity toward digestive proteinases of *Spodoptera littoralis* larvae. *Planta* 211:62-71.
- Tattersal, D. B., Bak, S., Jones, P. R. Olsen, C. E., Nielsen, J. K. Hansen, M. L., Høj, P. B. & Møller, B. L. 2001. Resistance to an herbivore through engineered glucoside synthesis. *Science* 293:1826-1828.
- THAYER, S. S. & CONN, E. E. 1981. Subcellular localization of dhurrin β -glucosidase and hydroxynitrilase in the mesophyll cells of *Sorghum* leaf blades. *Plant Physiology* 67: 617-622.
- THOMPSON, J. N. & PELLMYR, O. 1991. Evolution of oviposition behaviour and host preference in Lepidoptera. *Annual Reviews of Entomology* 36:65-89.
- THOMSON, K. & BRIMER, L. 1997. Cyanogenic constituents in woody plants in natural lowland rain forest in Costa Rica. *Botanical Journal of the Linnean Society* 124:273-294.
- TILL, I. 1987. Variability of expression of cyanogenesis in white clover (*Trifolium repens* L.). *Heredity* 59:265-271.
- TRAW, M. B. & DAWSON, T. E. 2002. Reduced performance of two specialist herbivores (Lepidoptera: Pieridae, Coleoptera: Chrysomelidae) on new leaves of damaged black mustard plants. *Environmental Entomology* 31:714-722.
- TRUITT, C. L., WEI, H. X. & PARE, P. W. 2004. A plasma membrane protein from *Zea mays* binds with the herbivore elicitor volicitin. *Plant Cell* 16:523-532.
- TSCHARNTKE, T., THIESSEN, S., DOLCH, R. & BOLAND, W. 2001. Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*. *Biochemical Systematics and Ecology* 29:1025-1047.
- TUOMI, J., NIEMELY, P. & SRÉN, S. 1990. The Panglossian paradigm and delayed inducible accumulation of phenolics in mountain birch. *Oikos* 59:399-410.
- TURCHIN, P. 1995. Population regulation: old arguments and a new synthesis. In Cappucino, N. & Price, P. W. (eds.) *Population dynamics: new approaches and synthesis*. Academic Press, New York, pp. 19-40.
- TURCHIN, P. & TAYLOR, A. D. 1992. Complex dynamics in ecological time series. *Ecology* 73:289-305.
- TURLINGS, T. C. J., TUMLINSON, J. H. & LEWIS, W. J. 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* 250:1251-1253.
- UNDERWOOD, N. 1999. The influence of plant and herbivore characteristics on the interaction between induced resistance and herbivore population dynamics. *The American Naturalist* 153:282-294.
- UNDERWOOD, N. 2000. Density dependence in induced plant resistance to herbivore damage: threshold, strength and genetic variation. *Oikos* 89:295-300.
- UNDERWOOD, N. & RAUSHER, M. D. 2000. The effects of host-plant genotype on herbivore population dynamics in a model system. *Ecology* 81:1565-1576.
- UNDERWOOD, N. & RAUSHER, M. D. 2002. Comparing the consequences of induced

- and constitutive plant resistance for herbivore population dynamics. *The American Naturalist* 160:20-30.
- UNDERWOOD, N., MORRIS, W., GROSS, K. & LOCKWOOD, J. R. I. 2000. Induced resistance to Mexican bean beetles in soybeans: variation among genotypes and lack of correlation with constitutive resistance. *Oecologia* 122:83-89.
- URBAŃSKA, A., LESZCZYŃKI, B., MATOK, H. & DIXON, A.F.G. 2002. Cyanide detoxifying enzymes of bird cherry-oat aphid. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Biology*, Volume 5, Issue 2, <http://www.ejpau.media.pl>.
- VAN DAM, N. M., DE JONG, T. J., IWASA, Y. & KUBO, T. 1996. Optimal distribution of defences: are plants smart investors? *Functional Ecology* 10:128-136.
- VAN DAM, N. M., HADWICH, K. & BALDWIN, I. T. 2000. Induced responses in *Nicotiana attenuata* affect behavior and growth of the specialist herbivore *Manduca sexta*. *Oecologia* 122:371-379.
- VAN DAM, N. M., VAN DER MEJDEN, E. & VERPOORTE, R. 1993. Induced responses in three alkaloid-containing plant species. *Oecologia* 95:425-430.
- VAN DER MEJDEN, E. 1996. Plant defence, an evolutionary dilemma: Contrasting effects of (specialist and generalist) herbivores and natural enemies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80:307-310.
- VAN DER MEJDEN, E. & KLINKHAMER, P. G. L. 2000. Conflicting interests of plants and the natural enemies of herbivores. *Oikos* 89:202-208.
- VAN LOON, J. J. A., DE BOER, J. G. & DICKE, M. 2000. Parasitoid-plant mutualism: Parasitoid attack of herbivore increases plant reproduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 97:219-227.
- VETTER, J. 2000. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* 38:11-36.
- VINSON, S. B. 1976. Host selection by insect parasitoids. *Annual Review of Entomology* 21:109-133.
- VOELCKEL, C. & BALDWIN, I. T. 2004. Generalist and specialist lepidoptera larvae elicit different transcriptional responses in *Nicotiana attenuata*, which correlate with larval FAC profiles. *Ecology Letters* 7:770-775.
- VOß, K. 2001. Biologische Bedeutung und Aktivierbarkeit der β -D-Glykosidase in Blättern von *Hevea brasiliensis* (Willd.) Muell. Arg. (1865) Ph.D. dissertation. University of Hamburg.
- WAJANT, H. & EFFENBERGER, F. 1996. Hydroxynitrile lyases of higher plants. *Biological Chemistry* 377:611-617.
- WAJANT, H. & PFIZENMAIER, K. 1996. Identification of potential active-site residues in the hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* 271(42):25830-25834.
- WALLING, L. L. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth* 19:195-216.
- WATERMAN, P. & MOLE, S. 1989. Extrinsic factors influencing production of secondary metabolites in plants. In Bernays, E. A. (ed.) *Insect-plant interactions, volume 5*. CRC Press, Boca Raton, pp. 107-117.

- WEBB, J. W. & MORAN, V. C. 1978. The influence of the host plant on the population dynamics of *Acizzia rusallae* (Homoptera: Psyllidae). *Ecological Entomology* 3:313-321.
- WHITTAKER, R. H. & FEENY, P. P. 1971. Allelochemicals: Chemical interactions between species. *Science* 171:757-770.
- WILKERSON, J.L., WEBB, S.E. & CAPINERA, J.L. (2005). http://pests.ifas.ufl.edu/software/det_veggies.htm.
- WINZ, R. A. & BALDWIN, I. T. 2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. IV. Insect-induced ethylene reduces jasmonate-induced nicotine accumulation by regulating putrescine *N*-methyltransferase transcripts. *Plant Physiology* 125:2189-2202.
- WITTHOHN, K. & NAUMANN, C. M. 1987a. Cyanogenesis—a general phenomenon in the Lepidoptera. *Journal of Chemical Ecology* 13:1789-1809.
- WITTHOHN, K. & NAUMANN, C. M. 1987b. Genus *Zygaena* F and related taxa (Insecta, Lepidoptera). 53. Active cyanogenesis—in Zygaenids and other Lepidoptera. *Zeitung für Naturforschung* 42c:1319-1322.
- WITTSTOCK, U & GERSHENZON, J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinions in Plant Biology* 5:300-307.
- WRAY, V., DAVIS, R. H. & NAHRSTEDT, A. 1983. Biosynthesis of cyanogenic glucosides in butterflies and moths—incorporation of valine and isoleucine into linamarin and lotaustralin by *Zygaena* and *Heliconius* species (Lepidoptera). *Zeitung für Naturforschung* 38c:583-588.
- WRIGHT, R. M. 1993. Lima bean (*Phaseolus lunatus*) research. In Redden, R. & Fletcher, R. (eds.) *National Workshop for New Summer Grain Legumes*. QDPI, pp. 82-86.
- WU, H.-C. & POULTON, J. E. 1991. Immunocytological localization of mandelonitrile lyase in mature black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) seeds. *Plant Physiology* 96:1329-1337.
- WURTELE, E.S., NIKOLAU, B.J. & CONN, E.E. 1984. Tissue distribution of beta-cyanoalanine synthase in leaves. *Plant Physiology* 75:979-982.
- WYATT, I.J. & WHITE, P.F. 1977. Simple estimation of intrinsic rates for aphids and Tetranychid mites. *Journal of Applied Ecology* 14:757-766.
- YOUNG, S. 1991. How plants fight back. *New Scientist* 1771:41-45.
- ZAGROBELNY, M., BAK, S., RASMUSSEN, A. V., JØRGENSEN, B., NAUMANN, C. M. & MØLLER, B. L. 2004. Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions. *Phytochemistry* 65:293-306.
- ZANGERL, A. R. & BAZZAZ, F. A. 1992. Theory and pattern in plant defence allocation. In Fritz, R. S., Simms, E. L. (eds.) *Plant resistance to herbivores and pathogens*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 363-391.
- ZORRO BI, I., MAQUET, A. & BAUDOIN, J. P. 2005. Mating system of wild *Phaseolus lunatus* L. and its relationship to population size. *Heredity* 94:153-158.
- ZOU, J. & CATES, R. G. 1995. Foliage constituents of douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (Pinaceae): their seasonal variation and potential role in

douglas fir resistance and silviculture management. *Journal of Chemical Ecology* 21: 387-402.

Zizumbo-Villarreal, D 1992. Conclusiones Mesa Redonda. La modernización de la milpa en Yucatán. Utopía o realidad. In Zizumbo V., D., Ramussen, C. H., Arias R., L. M. & Terán C., S. (eds.) *La modernización de la milpa en Yucatán: utopía o realidad*. CICY-DANIDA. Mérida, Yucatán, México.

VIII Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 Freisetzung von Blausäure aus cyanogenen Vorstufen	6
Abb: 2 Akkumulation cyanogener Vorstufen: Ontogenetische und organspezifische Variabilität	10
Abb. 3 Cyanid verbrauchende Reaktionen	12
Abb. 4 Stoffwechselwege cyanogener Glykoside	13
Box 1 Cyanogene Vorstufen	7
Box 2 Biosynthese cyanogener Vorstufen	9

III. I Manuskript 1

FIG. 1. Equipment for detection of gaseous HCN.	40
FIG. 2. Cyanogenic potential (HCNp) of <i>P. lunatus</i> accessions.	45
FIG. 3. Cyanogenic capacity (HCNc) of <i>P. lunatus</i> accessions.	46
FIG. 4. Cyanogenic potential (HCNp) vs. leaf consumption.	48
FIG. 5. Binary-choice bioassay.	49
FIG. 6. Release of HCN from leaves as reaction to herbivory.	50
FIG. 7. Behavior of locusts.	51
Table 1. Calculated balance of cyanide ingested by nymphs of <i>S. gregaria</i>	44
Table 2. Locust behavior under experimental HCN application.	52

III. II Manuskript 2

FIG. 1. Oviposition choice of beetles.	63
Table 1. Cyanogenic features of lima beans (<i>Phaseolus lunatus</i>).	62

III. III Manuskript 3

FIG.1. Increase in β -glucosidase activity following leaf damage.	73
FIG.2. Increase in HCN-liberation by enhanced β -glucosidase activity.	74
Table 1: Characterization of <i>Phaseolus lunatus</i> genotypes.	69

IX Lebenslauf

Personalien

Vor- und Familienname	Daniel Janusz Ballhorn
Geburtsdatum und –ort	11. 08. 1975, Bad Segeberg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Beruflicher Werdegang

Mai 1995	Allgemeine Hochschulreife (Gymnasium Hamburg-Ohlstedt)
Jul. 1995 – Jul. 1996	Zivildienst (Amalie-Sieveking Krankenhaus, Volksdorf)
Okt. 1996 – Jun. 2002	Hochschulstudium der Biologie in Hamburg
Jun. 2002	Diplom, Gesamtbewertung „mit Auszeichnung“
Aug. 2002 – Jan. 2005	Angestellter der Universität Hamburg als Wissenschaftlicher Mitarbeiter des EU-Projekts ECOMAN (<u>E</u> cosystem <u>M</u> anagement)
Apr. 2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universität Duisburg-Essen mit Aufgaben in Forschung und Lehre

Daniel J. Ballhorn