

F. KLIMA, Berlin

## Immunochemische Untersuchungen zur Larvalsystematik der Gattung *Hydropsyche* PICTET (*Trichoptera*, *Hydropsychidae*)

**S u m m a r y** Because by morphological characteristics larvae of the two *Hydropsyche* — species *H. angustipennis* CURT. and *H. pellucidula* CURT. could not be distinguished, extracts of larvae from both species were analysed by two-dimensional immunoelectrophoresis. By a polyspecific antiserum against an extract of larvae from *H. angustipennis*, produced in rabbits, at least 9 different antigens were detected. The antigen with the highest electrophoretic mobility occurred only with the larvae of *H. angustipennis* and were absent with all larvae of *H. pellucidula*. On this foundation the larvae of both species could be sure distinguished.

**Резюме** Так как личинки двух видов *H. angustipennis* CURT. и *H. pellucidula* CURT. с помощью морфологических признаков не различимы, экстракты личинок этих двух видов анализировали и сравнивали между собой в двухмерной иммуноэлектрофорезе. С помощью полиспецифической антисыворотки, полученной против экстракта личинок вида *H. angustipennis* в кролике, были показаны не менее 9-и различных антигенов. Антиген с наибольшей электрофоретической мобильностью встречался только у *H. angustipennis* и отсутствовал у всех исследованных личинок от *H. pellucidula*. На этой основе возможно точно различать личинки этих двух видов между собой.

*Hydropsyche*-Arten sind als Indikatoren für die Gewässergüte wichtig. Wir müssen die Arten eindeutig unterscheiden können und den Artbestand vollzählig kennen. Deshalb sollte jetzt mit dem Versuch begonnen werden, auch die ♀♀ und die Larven der *Hydropsyche*-Arten nach neuen Erkenntnissen zu revidieren (MALICKY 1977).

Die außergewöhnlichen Schwierigkeiten bei der Determination der in Mitteleuropa bekannten *Hydropsyche*-Arten sind bekannt. Bis jetzt waren nur die ♂♂ an der Genitalarmatur bestimmbar, neuerdings wurde auch für die ♀♀ ein Bestimmungsschlüssel an Hand der Genitalmorphologie ausgearbeitet (TOBIAS 1972). Im Larvalzustand sind die einzelnen Arten nur zum Teil eindeutig determinierbar, da die Bestimmungsschlüssel für Larven auf zu stark variierende Merkmale wie Farbmuster des Frontoclypeus und der Thorakalnota oder Größe und Form der Mandibelzähne basieren. Bei Versuchen, im Borstenmuster der Beine und der ventralen, am 8. und 9. Abdominalsegment befindlichen Chitinschildchen artspezifische Unterschiede zu finden, erwies sich ebenfalls die Variationsbreite dieser Merkmale als zu groß, um für Determinationszwecke von Wert zu sein (SCHUHMACHER 1970).

Diese beiden Einschätzungen kennzeichnen treffend den derzeitigen Stand in der Larvalsystematik bei der Gattung *Hydropsyche*. Ob-

wohl in den letzten Jahren eine recht beachtliche Anzahl an Publikationen erschienen ist, die sich mit der Artdetermination von *Hydropsyche*-Larven befassen (BOURNAUD u. Mitarb. 1982, SEDLAK 1971, STATZNER 1976, SZCZESNY 1974, VERNEAUX u. FAESSEL 1976, WIBERG-LARSEN 1980), hat die Sicherheit der Artbestimmung nicht zugenommen. Als Unterscheidungskriterien werden weiterhin die stark variierenden morphologischen Merkmale angegeben. Gerade aber die sichere Larvenbestimmung ist bei ökologischen Untersuchungen wichtig, da gefangene Imagines nicht notwendigerweise aus dem entsprechenden Gewässer stammen, sondern zugeflogen sein können.

Eigene negative Erfahrungen bei Versuchen zur Artbestimmung von *Hydropsyche*-Larven nach morphologischen Merkmalen führten zu der Überlegung, andere, nicht morphologische Merkmale zur Artbestimmung heranzuziehen. Biochemische Untersuchungen von Hämolympfhflüssigkeit bzw. anderen Körperextrakten morphologisch nicht oder schwer unterscheidbarer Insektenarten hatten in letzter Zeit zu einigen Erfolgen geführt (GUPTA 1977, KLAUSNITZER 1982, KLAUSNITZER et al. 1983, MARIAMMAL u. RAJULU 1975, MENKEN 1982). Bei Vertebrata werden derartige Untersuchungen ohnehin schon längst zur Klärung taxonomischer Fragen angewandt

(WRIGHT 1974). Karyologische und biochemische (einschließlich immunologische) Merkmale sind besonders in der supraspezifischen Systematik nützlich, da sie von der Konvergenz weniger beeinflusst werden als die morphologischen Kriterien (BANARESCU 1974). Die Verwendung des stofflichen Aufbaues zur Arttrennung entspricht darüber hinaus dem schon oft formulierten Konzept der Homomorphie (KLAUSNITZER 1982). Aus bestimmten Gründen wurde entschieden, immunchemische Charakteristika zur Art differenzierung heranzuziehen. Immunologische Kriterien konnten bei taxonomischen Studien bereits sehr hilfreich sein und sind zudem unter bestimmten Aspekten spezifischer als biochemische Merkmale. Die Zahl der antigenen Komponenten, die strukturmäßig in zwei Arten verwandt sind, kann verwendet werden, ihre taxonomische Beziehung zu bestimmen (CLOSS u. Mitarb. 1980). Weniger bei Insekten, aber in größerem Umfang bei Reptilien und Amphibien sowie bei Bakterien wurden immunologische Parameter zur Art differenzierung und zur Klärung verwandtschaftlicher Beziehungen eingesetzt. Besonders dann gewinnen stoffliche Merkmale zunehmend für die Aufklärung von Differenzierungen im intraspezifischen Bereich an Bedeutung, wenn Spezialisierungs- und Einnischungsprozesse noch nicht zur Arttrennung geführt haben (KLAUSNITZER 1982). Da von einigen Autoren (DÖHLER 1963, SCHUHMACHER 1970) die Meinung vertreten wird, daß sich die Gattung *Hydropsyche* zur Zeit gerade in der Art aufspaltung befindet bzw. diese noch nicht bei allen Arten abgeschlossen ist (gekennzeichnet u. a. durch das Fehlen bzw. durch die geringe Ausprägung morphologischer Unterscheidungsmerkmale in der Reihenfolge Larven — ♀♀ — ♂♂), war die Anwendung immunbiochemischer Methoden zur Differenzierung besonders angebracht. Mit der vorliegenden Arbeit soll begonnen werden, zunächst für die Arten *H. angustipennis* CURTIS und *H. pellucidula* CURTIS, von denen gesichertes Larvenmaterial vorlag, mit Hilfe zweidimensionaler Immunelektrophoresen von Larvalextrakten mögliche Unterscheidungskriterien herauszufinden.

## Material und Methoden

### Larvenmaterial

Larven von *H. angustipennis* und *H. pellucidula* wurden im Winter 1984/85 an Stellen im Berliner Seengebiet gesammelt, an denen, basierend auf einer fünfjährigen Beobachtung der Imagines nur eine der beiden Arten vorkommt.

Das war für *H. angustipennis* das Stahnsdorfer Fließ in Alt-Stahnsdorf, unmittelbar nach dem Abfluß des Stahnsdorfer Sees (Mühle in Alt-Stahnsdorf). Die *H. pellucidula*-Larven stammten aus der Spree, etwa 3 km westlich von Spreeau, nahe dem Ortsteil Freienbrink. Darüber hinaus wurden Larven auch aus der Löcknitz, etwa 5 km westlich von Erkner, unmittelbar an der Kreuzung mit der Straße nach Fangschleuse gesammelt. An dieser Stelle waren bereits über Jahre Imagines beider Arten festgestellt worden, also auch Larven beider Arten zu erwarten.

### Protein-Extraktion

Das Abdomen von je 10 Larven einer der beiden Arten wurde vom Thorax getrennt (dieser und der Kopf wurden für die morphologische Charakterisierung in 70%igen Alkohol überführt) und mechanisch zerkleinert. Ebenso wurde mit den Larven der Mischpopulation verfahren. Je Larvenhomogenat wurde 100 µl phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4, zugegeben und mit einem Glasstab gründlich verrührt bzw. zerdrückt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben 10 min bei 1000 × g zentrifugiert. Der klare Überstand (60–70 µl) wurde mit einer fein ausgezogenen Pipette abgesaugt und für die Elektrophoresen verwendet.

### Antiserum

Etwa 25 Larvenabdomina von *H. angustipennis* wurden in 10 ml PBS homogenisiert und 15 min bei 1000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Immunisierung von 2 Kaninchen (♀♀, etwa 3 kg) verwendet. Die Primärimmunisierung erfolgte mit 4 × 0,25 ml Extrakt (1:1 mit kompletten Freundschens Adjuvans, KFA) intradermal in die Fußballen. 41 Tage später wurden ebenfalls 4 × 0,25 ml (in KFA) intramuskulär in die Schenkel verabreicht. Weitere Immunisierungen erfolgten an den Tagen 42, 43, 44, 49, 50 und 51 mit je 2 × 0,5 ml intravenös in die Ohrvenen. 7 Tage nach letzter Immunisierung wurden die Tiere entblutet, nach 2 Stunden das Serum abzentrifugiert und portioniert bei etwa –25 °C bis zum Verbrauch aufbewahrt. Für die Elektrophoreseversuche wurde Antiserum beider Tiere 1:1 gemischt verwendet.

### Immunelektrophorese

Crossed-Immunelektrophoresen (CIE) nach SVENDSEN und DEYL (1979) wurden auf Glasplatten 85 mm × 100 mm durchgeführt. 20,0 ml 1%ige Agarose (–m<sub>p</sub> = 0,13) in Tris-Veronal-

Laktat-Puffer (pH 8,7; Ionenstärke 0,2) ergab ein Gel von etwa 1,5 mm Dicke. Bei der Analyse von Triton X-100-Extrakten wurde dem Gel zusätzlich 0,5% Triton (v,v) beigemischt. Die Elektrophorese erfolgte in der 1. Dimension bei  $15 \text{ V cm}^{-1}$  für 90 min. In der zweiten Dimension wurden  $6 \text{ V cm}^{-1}$  angelegt und die Laufzeit betrug 18 h. 1,0 ml Gel enthielt 0,06 ml Antiserum. Nach dem Pressen, Waschen und Trocknen der Gelplatten wurde mit Coomassie-Brillant-Blue R-250 gefärbt (BJERRUM u. WEITZ 1982). Die fotografischen Aufnahmen erfolgten nach endgültigem Trocknen der Platten mit ORWO-Film NP 15 im Durchlicht.

### Ergebnisse

1. Aufstellen eines Referenzpräzipitationsmusters mit dem für die Immunisierung verwendeten *H. angustipennis*-Extrakt

Unter den angegebenen Elektrophoresebedingungen wurden für 50  $\mu\text{l}$  Larvalextrakt das in Abb. 1A gezeigte Präzipitationsbild erhalten. Es entstanden 9 gut voneinander differenzierbare Präzipitatpeaks. Ihre Anzahl und Höhe (als Ausdruck der Quantität der an den Reaktionen beteiligten Proteine) war bei vier Versuchen sehr gut reproduzierbar. Die Numerierung der einzelnen Peaks erfolgte willkürlich in etwa mit steigender elektrophoretischer Mobilität (Abb. 1B). Von der elektrophoretischen Mobilität her waren drei Bereiche zu unterscheiden. Der erste Bereich mit geringer elektrophoretischer Mobilität enthält 3 Antigene (Peaks 1, 2, 3), ein mittlerer Bereich 4 Antigene (Peaks 4, 5, 6, 7) und schließlich trat noch ein Antigen mit relativ hoher elektrophoretischer Mobilität auf (Peak 9). Zwischen der mittleren Gruppe und Antigen 9 lag noch eine Minor-Komponente (Peak 8).

2. Immunchemische Untersuchungen an Larven von *H. angustipennis* und *H. pellucidula* und Vergleich mit Ergebnissen nach morphologischer Bestimmung

Die von den in der Einleitung angegebenen Autoren verwendeten morphologischen Merkmale sind in Abb. 2 zusammengefaßt. Nach diesen Kriterien wurde versucht, Larvenmaterial aus sicheren Art-Populationen (siehe Ma-

Abb. 2: Übersicht der für die Artbestimmung verwendeten morphologischen Strukturen und Merkmale bei Larven der Gattung *Hydropsyche*. 1 – Kopfform, 2 – Clypeusform, 3 – Clypeuszeichnung, 4 – frontale Zeichnung, 5 – Augenfleck dorsal gesehen, 6 – kaudale Binde, 7 – Augenfleck ventral gesehen, 8 – Submentum, 9 – Posterior prosternites, 10 – Borsten seitlich des Submentum, 11 – aboraler Rand des schwarzen Makels des Metanotums.

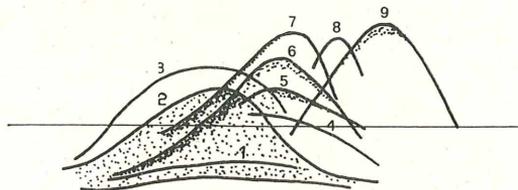
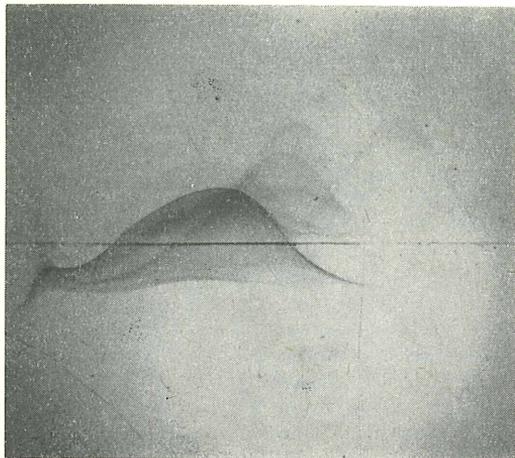
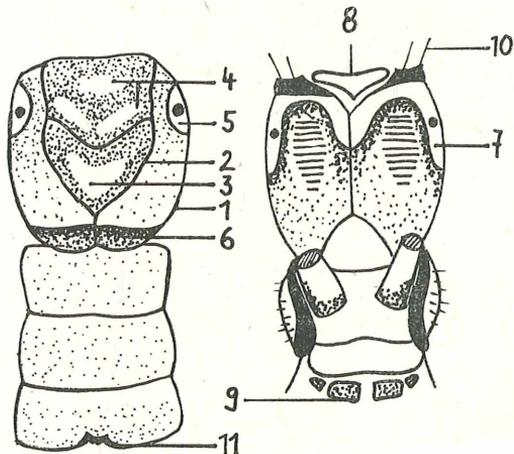


Abb. 1: Crossed-Immunelektrophorese von 50  $\mu\text{l}$  Larvalextrakt von *H. angustipennis*. 1. Dimension:  $15 \text{ V cm}^{-1}$ , 1 h 30 min; 2. Dimension:  $6 \text{ V cm}^{-1}$ , 18 h, 0,06 ml Antiserum pro ml Gel. Färbung: Coomassie-Brillant-Blue R-250. Oben Original-Elektrophoreseplatte, unten Zeichnung derselben mit Numerierung der einzelnen Präzipitatpeaks.



terial und Methoden) zu determinieren. Dafür wurden sowohl bereits vor längerer Zeit dort gesammelte und alkohol-konservierte Larven als auch frisch gesammeltes Material verwendet. Bei *H. angustipennis* wurden 20 Larven untersucht, bei *H. pellucidula* 22 Larven. Das Ergebnis zeigt, daß dieser Stichprobenumfang bereits genügte, um die folgende Aussage zu treffen. Nach den genannten morphologischen Merkmalen war keine sichere Artdetermination möglich. Kennzeichnend war, daß widersprüchliche Bestimmungen bei den einzelnen Merkmalen vorkamen. Bei *H. angustipennis* wurde nach den Merkmalen 3–6 lediglich 7mal die Art richtig determiniert, nach Merkmal 9 (P. prosternites) 9mal. Eine Übereinstimmung beider Determinationen war nur bei 66,7% gegeben. Bei *H. pellucidula* ergab die Kopfzeichnung (Merkmale 3–6) 11mal die richtige Art, Merkmal 9 13mal. Eine Übereinstimmung beider Bestimmungen wurde nur bei 61,1% der Larven gefunden. Besonders die Intensität der Zeichnung des Frontoclypeus erwies sich bei beiden Arten als sehr variabel, so daß eine Entscheidung der Zugehörigkeit zu einer der beiden Arten oft kaum möglich war.

Beim Vergleich der Extrakte beider Arten in der CIE wurden folgende Ergebnisse erhalten. Bei den Untersuchungen an *H. angustipennis*-Larven wurde im wesentlichen ein mit dem Referenzmuster identisches bzw. sehr ähnliches Präzipitationsbild erhalten (Abb. 3A, B). Unterschiede gab es lediglich in der Peakhöhe. Dies war zu erwarten, da die eingesetzte Eiweißmenge unterschiedlich war (auf die unterschiedliche Größe der Larven zurückzuführen). Auf eine Einstellung der Proteinkonzentration auf einen konstanten Wert wurde jedoch verzichtet, um die Methode so rationell wie möglich zu halten. Die Präzipitate 1–3 waren in jedem Fall nachweisbar, bei einigen Larven traten noch 1–2 zusätzliche, jedoch deutlich schwächere Reaktionen in diesem Bereich auf. Bei der Präzipitatgruppe 4–7 waren in den meisten Fällen nur zwei Präzipitate (wahrscheinlich 5 und 6) zu finden, während Nr. 8 immer fehlte. Präzipitat Nr. 9 war dagegen bei allen Larven immer deutlich nachweisbar.

Bei *H. pellucidula*-Larven (Abb. 3C, D) ergab sich das folgende Bild. Die Antigengruppe mit elektrophoretisch geringer Mobilität (Nr. 1–3) war sehr ähnlich wie bei *H. angustipennis*, jedoch bei über der Hälfte der Larven (7 Expl.) waren in diesem Bereich mehr oder weniger stark ausgebildete zusätzliche Präzipitate (bis

zu 4) vorzufinden. Ihre Unregelmäßigkeit, die in erster Linie auf quantitative Schwankungen im Ausgangsmaterial zurückzuführen sein dürfte, ließ jedoch keine sichere Artunterscheidung zu. Im mittleren Bereich waren nur in zwei Fällen 2 Präzipitate aufgetreten (wahrscheinlich Nr. 5 und 6), 6mal 1 Präzipitat und in den restlichen Fällen gar kein Präzipitatpeak zu finden. Ebenso fehlte Präzipitat Nr. 8 und – als wesentlichster Unterschied zum Präzipitationsmuster von *H. angustipennis* – in allen Fällen Nr. 9. Es kann zunächst angenommen werden, daß dieses Antigen *H. angustipennis* spezifisch ist (zumindest im Vergleich zu *H. pellucidula*) und damit eine sichere Artunterscheidung zuläßt. Zumindest müssen jedoch bei diesem Protein extreme quantitative Unterschiede zwischen *H. angustipennis* und *H. pellucidula* vorhanden sein.

Antigen 9 ist das einzige von den untersuchten morphologischen und immunchemischen Merkmalen, daß bei allen 10 *H. angustipennis*-Larven vorhanden war und bei allen 10 *H. pellucidula*-Larven fehlte.

### 3. Immunchemische und morphologische Untersuchungen an Larven einer *H. angustipennis*-*H. pellucidula*-Mischpopulation und Vergleich der Ergebnisse

Das Ergebnis eines Versuchs, 17 Larven dieser Mischpopulation an Hand der morphologischen Merkmale einer der beiden Arten zuzuordnen, ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Eine einigermaßen sichere Determination konnte nur bei 7 Larven (41,2%) erfolgen. In allen anderen Fällen traten Widersprüche bei den einzelnen Merkmalen bezüglich der Artzugehörigkeit auf. Merkmal Nr. 10 (Borsten seitlich des Submentums) ist dabei völlig wertlos, da es für eine Bestimmung ungeeignet ist. Ebenfalls muß Merkmal Nr. 11 entfallen (aboraler Rand des Metanotums), da es keine Differenzierung zuließ. Aus den in Tabelle 1 dargestellten Ergebnissen muß abgeleitet werden, daß eine Artbestimmung mit Hilfe dieser morphologischen Merkmale nicht möglich ist.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen an diesen 17 Hydroptyle-Larven wiedergegeben. An Hand des Vorkommens der Präzipitate 1–8 kann keine Unterscheidung zwischen zwei zu erwartenden Arten getroffen werden. Aber auf Grund des Auftretens von Präzipitat Nr. 9 kann eine eindeutige Einteilung in zunächst zwei Larvengruppen vorgenommen werden. In solche Larven, bei denen Antigen 9 fehlt, und in solche,

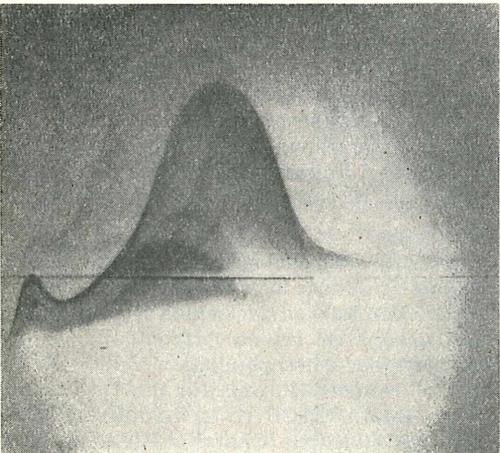
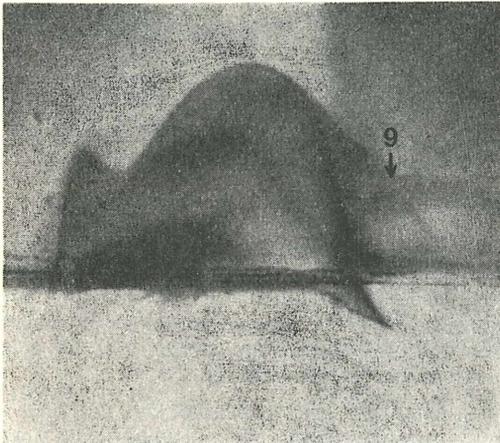
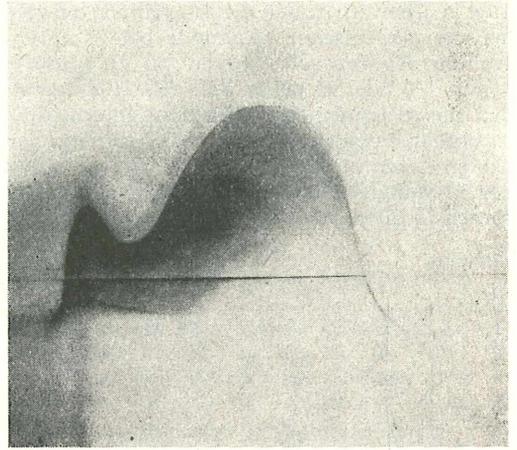
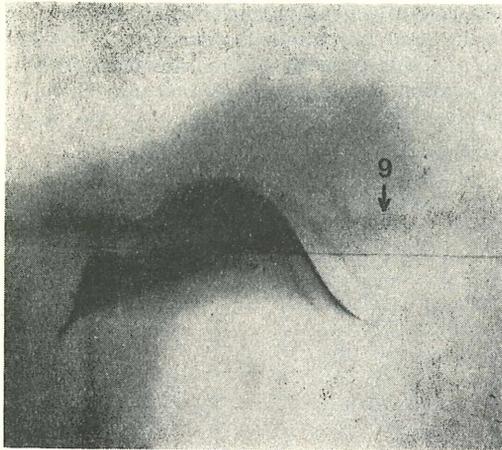


Abb. 3: Crossed-Immunelektrophoresen von Larval-extrakten aus je einem Abdomen von *H. angustipennis* (A, B) und *H. pellucidula* (C, D). Elektrophoresebedingungen wie bei Abb. 1 angegeben. Der Pfeil weist auf Präzipitatpeak Nr. 9. A–D: von oben nach unten.

bei denen es vorhanden ist. 10 Larven (mit Antigen 9) könnten deshalb *H. angustipennis* zugeordnet werden, 7 Larven (ohne Antigen 9) *H. pellucidula*.

#### 4. Immunchemische Untersuchungen

an alkohol-konserviertem Larvenmaterial  
 Untersuchungen an in 70%igem Äthylalkohol konserviertem Larvenmaterial entsprangen dem Wunsch, auch diese Larven nachträglich bezüglich der Zugehörigkeit zu *H. angustipennis* oder *H. pellucidula* einzuordnen. Trotz intensiver Versuche, auch mit Hilfe des nicht-ionischen Detergenzes Triton X-100, gelang es aber nicht, genügend Eiweiß zu solubilisieren. Darüber hinaus ist anzunehmen, daß die meisten Proteinmoleküle durch die Alkoholfixierung bereits so denaturiert sind, daß die auf ihnen befindlichen antigenen Determinanten nicht mehr mit den Antikörpern (die gegen das native Protein gerichtet sind) reagieren können. Es war deshalb nicht verwunderlich, daß in der CIE nur noch Antigen Nr. 2 nachweisbar war. Das bedeutet, daß diese Verfahrensweise unter den beschriebenen Bedingungen nicht für alkoholkonserviertes Larvenmaterial anwendbar ist.

#### Diskussion

Die immunologischen Versuche zur Artdetermination der *Hydropsyche*-Larven entsprangen dem Unvermögen, eine Artbestimmung nach morphologischen Merkmalen vorzunehmen. Es

Tab. 1: Übersicht über die Zuordnung einzelner morphologischer Merkmale bei 17 untersuchten *Hydropsyche*-Larven zu *H. angustipennis* (A) oder *H. pellucidula* (P). N bedeutet, daß das entsprechende Merkmal intermediär ist und eine eindeutige Zuordnung zu einer der beiden Arten nicht möglich war. Numerierung der Merkmale nach Abb. 2. Merkmal 10 entspricht in allen Fällen *H. angustipennis*.

Larven-Nr.	Merkmal								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	P	P	A	A	A	P	A	A	A
2	A	A	A	A	A	N	A	A	A
3	A	A	A	A	A	N	A	A	P
4	N	N	A	A	P	N	P	N	—
5	N	N	A	A	A	A	A	A	P
6	P	P	N	P	P	N	P	N	P
7	N	N	N	N	P	N	P	N	A
8	N	N	N	A	A	N	A	A	A
9	N	N	A	A	N	N	N	A	A
10	A	A	A	A	A	N	A	A	A
11	A	A	A	A	A	N	A	N	P
12	P	P	P	N	P	P	P	N	A
13	P	P	P	P	N	P	P	P	A
14	N	N	N	A	N	N	P	N	A
15	P	P	N	P	P	N	P	P	P
16	P	P	N	N	P	N	A	N	P
17	A	A	A	A	A	A	A	A	A

konnte dabei von gesichertem Larvenmaterial aus Populationen von *H. angustipennis* und *H. pellucidula* ausgegangen werden. Auch wenn die Stichprobenumfänge der untersuchten Larven beider Arten nicht sehr hoch waren, konnte immunologisch ein signifikanter Unterschied zwischen den Larven beider Arten nachgewiesen werden. Das Auftreten eines bestimmten Proteins (Antigen Nr. 9) bei *H. angustipennis* und das Fehlen dieses Proteins bei *H. pellucidula* ließ eine sichere Unterscheidung zu. Die Tatsache, daß dieses Merkmal nur bei einem Teil der Larven einer Mischpopulation von *H. angustipennis* und *H. pellucidula* von einer dritten Lokalität gefunden wurde, unterstützt die Annahme, daß es sich um ein artspezifisches Merkmal handelt und nicht auf ökologische Faktoren wie z. B. unterschiedliche Nahrungsressourcen zurückzuführen ist. Das Vorkommen bzw. Fehlen dieses Proteins in Larvenextrakten ließ eine sichere Unterscheidung von zwei Larvengruppen innerhalb dieser Mischpopulation zu, was allein mit morphologischen Merkmalen nicht möglich war. Es kam vor, daß bei ein und derselben Larve sowohl „*angustipennis*-Merkmale“ als auch „*pellucidula*-Merkmale“

Tab. 2: Auftreten der einzelnen Präzipitate in der Crossed-Immunelektrophorese von Extrakten aus *Hydropsyche*-Larven aus einer Mischpopulation von *H. angustipennis* und *H. pellucidula*.

Larven-Nr.	Präzipitat-Nr.										
	1	a <sup>1</sup>	2	a	3	4	5	6	7	8	9
1	+	+	+	+	+			+	+		+
2	+	+	+	+	+			?			
3	+		+		+			+	+		+
4	+	+	+	+	+			+	+		+
5	+		+		+			?			
6	+		+		+						
7	+	+	+	+	+			+	.		+
8	+		+		+			+	+		?
9	+		+		+			+	?		+
10	+		+		+			+	+		?
11	+	+	+	+	+			?	+		
12	+	+	+	+	+			+			
13	+		+	+	+			+	+		+
14	+	+	+	+	+			?			
15	+	+	+		+			+			
16	+	+	+	+	+			+			?
17	+		+	+	+			+	+		?

<sup>1</sup> Auftreten von weiteren, jedoch nur unregelmäßig vorkommenden Minorpräzipitaten, die nicht numeriert wurden.

auftraten. Auf Grund der vorangegangenen Untersuchungen an reinen Artpopulationen war es aber möglich, die Larvengruppe mit Antigen Nr. 9 *H. angustipennis* zuzuordnen, während die Larven ohne Antigen Nr. 9 *H. pellucidula*-Larven sein müssen.

Auf Grund der großen Ähnlichkeit der Präzipitationsmuster beider Arten ist eine enge Verwandtschaft anzunehmen. Genauere Aussagen können natürlich erst nach Untersuchung weiterer Arten getroffen werden. Andererseits ist aber auch zu berücksichtigen, daß die große phylogenetische Differenz zwischen verwendetem Immunogen (Larven der Gattung *Hydropsyche*) und Antikörperproduzent (Kaninchen) zu einer Verwischung weiterer möglicherweise vorhandener Unterschiede zwischen *H. angustipennis* und *H. pellucidula* beigetragen haben könnte.

Die sichere immunologische Unterscheidung und die fehlende morphologische Differenz zwischen den Larven der beiden *Hydropsyche*-Arten sowohl bei reinen Artpopulationen als auch bei einer Mischpopulation beider Arten sind ein weiterer Hinweis für die Richtigkeit der von BANARESCU (1974) geäußerten Meinung, daß stoffliche Charakteristika stabiler

und weniger beeinflussbar sind als morphologische Merkmale.

Damit dürften auch erstmals qualitative Unterschiede in der stofflichen Zusammensetzung bei Trichopteren-Larven untersucht worden sein. Quantitative Unterschiede zwischen verschiedenen Arten wurden bereits vor allem bezüglich der Konzentration freier Aminosäuren in der Hämolympheflüssigkeit bei *Hydropsyche betteni*, *Cheumatopsyche pettiti* (HAAG u. SULLIVAN 1984), *Limnephilus stigma*, *Anabolia nervosa* und *Phryganea* sp. (SCUTLIFFE 1962) festgestellt, allerdings nicht unter taxonomischen Gesichtspunkten. Weitere Untersuchungen an Trichopteren-Larven liegen über die Zusammensetzung anorganischer Kationen der Hämolymphe vor (BEAUJOT u. Mitarb. 1970). BJARNOV (1972) untersuchte die Karbohydrase-Aktivität bei 10 verschiedenen Trichopteren-Arten unter dem Aspekt des Nahrungserwerbes und verglich carnivor lebende und Detritus-verwertende Larven. Diese noch sporadischen Untersuchungen über die stoffliche Zusammensetzung bei Trichopteren-Larven stellen für diese Insektenordnung vielversprechendes Neuland dar.

Ausgehend von den erhaltenen Ergebnissen und der Möglichkeit einer sicheren immunologischen Unterscheidung der beiden *Hydropsyche*-Arten wurde versucht, eine Wertung der einzelnen morphologischen Merkmale vorzunehmen. Abb. 4 zeigt eine graphische Übersicht über das Verhältnis von Übereinstimmung und Nichtübereinstimmung der morphologischen Merkmale mit der immunologischen Determination, die, von dem untersuchten Material ausgehend, als die sicherste Methode anzusehen ist. Davon abgeleitet wurden für die einzelnen Merkmale Wertungsindizes berechnet (Tabelle 3). Diese ergeben sich aus der Formel  $W = Q - n_N$ , wobei Q der Quotient aus Anzahl der richtigen und falschen Bestimmungen ist und N die Fälle bezeichnet, bei denen eine Zuordnung zu einer der beiden Arten nicht möglich war, da das entsprechende Merkmal intermediären Charakter hatte. Ausgehend von den Wertungsindizes für die einzelnen Arten ergibt sich der Wertungsindex  $W_{AP}$  für die Artunterscheidung nach der Formel  $W_{AP} = Q_{AP} - (n_{NA} + n_{NP})$ , wobei  $Q_{AP}$  das Produkt der beiden Quotienten Richtig/Falsch darstellt. Aus der Größe von  $W_{AP}$  ist er-

Tab. 3: Berechnung von Wertungsindizes (W) für morphologische Merkmale bezüglich der Sicherheit der Artbestimmung auf der Grundlage des Vergleiches mit immunologischer Einstufung (A) und Posterior prosternites (B) als scheinbar sicherstes morphologisches Merkmal.

Merkmal-Nr.	<i>H. angustipennis</i>					<i>H. pellucidula</i>							
	R	F	N	Q <sub>A</sub>	W <sub>A</sub>	R	F	N	Q <sub>P</sub>	W <sub>P</sub>	Q <sub>AP</sub>	W <sub>AP</sub>	
A	1	3	3	4	1,0	-3,0	3	2	2	1,5	-0,5	1,5	-4,5
	2	3	3	4	1,0	-3,0	3	2	2	1,5	-0,5	1,5	-4,5
	3	6	1	3	6,0	+3,0	1	3	3	0,3	-2,7	1,8	-4,2
	4	6	1	3	6,0	+3,0	2	4	1	0,5	-0,5	3,0	-1,0
	5	5	3	2	1,7	-0,3	3	3	1	1,0	0	1,7	-1,3
	6	1	2	7	0,5	-6,5	1	1	5	1,0	-4,0	0,5	-11,5
	7	6	3	1	2,0	+1,0	4	3	0	1,3	+1,3	2,6	+1,6
	8	6	1	3	6,0	+3,0	1	2	4	0,5	-3,5	3,0	-4,0
	9	7	2	0	3,5	+3,5	4	3	0	1,3	+1,3	4,6	+4,6
B	1	3	3	4	1,0	-3,0	3	2	1	1,5	+0,5	1,5	-3,5
	2	3	3	4	1,0	-3,0	3	2	1	1,5	+0,5	1,5	-3,5
	3	5	2	3	2,5	-0,5	0	3	3	—	—	—	—
	4	7	1	2	7,0	+5,0	2	3	1	0,7	-0,3	4,9	+1,9
	5	5	2	3	2,5	-0,5	3	3	0	1,0	+1,0	2,5	-0,5
	6	1	3	6	0,3	-5,7	0	1	5	—	—	—	—
	7	5	4	1	1,3	+0,3	2	4	0	0,5	+0,5	0,7	-0,3
	8	6	1	3	6,0	+3,0	1	2	3	0,5	-2,5	3,0	-3,0

R — richtige, F — falsche Bestimmung (Übereinstimmung), N — Bestimmung nicht möglich, da Merkmal intermediär und nicht einer der beiden Arten zuzuordnen,

$$Q = \frac{n_R}{n_F} \quad Q_{AP} = Q_A \quad Q_P, \quad W = Q - n_N, \quad W_{AP} = Q_{AP} - (n_{NA} + n_{NP}).$$

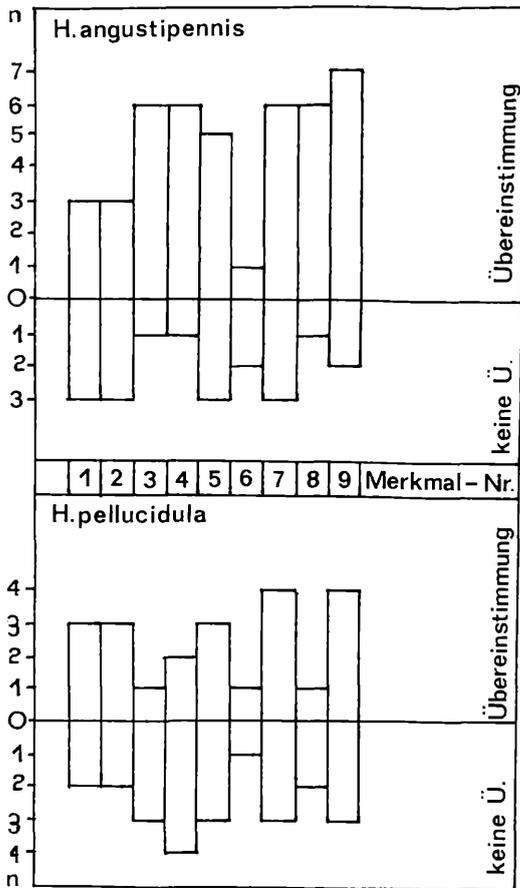


Abb. 4: Übersicht über die Übereinstimmung der Larvendetermination bei 17 untersuchten *Hydropsyche*-Larven nach immunologischer Einstufung mit den einzelnen morphologischen Merkmalen 1 bis 9.

sichtlich, welchen Wert das entsprechende Merkmal für die Artunterscheidung besitzt. Je größer  $W_{AP}$  ist, um so sicherer ist die Artbestimmung, je kleiner  $W_{AP}$  ist, desto unsicherer. Aus den errechneten  $W_{AP}$ -Werten ergibt sich, daß Merkmal 9 (Posterior prosternites) noch am ehesten für die Bestimmung geeignet ist. Allerdings traten auch bei diesem Merkmal bei *H. angustipennis* 2 und bei *H. pellucidula* 3 Fehlbestimmungen auf. Aus den Wertungsindizes der einzelnen Arten ist aber auch ersichtlich, daß bestimmte Merkmale unterschiedliche Werte für die entsprechende Art besitzen.

Die Merkmale 3 und 4 (Clypeuszeichnung) scheinen für *H. angustipennis* noch akzeptabel

zu sein ( $W_A = 3,0$ ), führen bei *H. pellucidula* aber oft zu Fehlbestimmungen ( $W_P = -2,7$  bzw.  $-0,5$ ). Andere Merkmale, wie z. B. Nr. 6 (kaudale Binde) scheinen für die Bestimmung beider Arten ungeeignet zu sein ( $W_A = -6,5$ ,  $W_P = -4,0$ ).

Die Unsicherheit der Bestimmung nach morphologischen Merkmalen tritt sehr deutlich in Tabelle 3B zutage. Beim Vergleich der Einstufung nach dem scheinbar sichersten morphologischen Merkmal, dem P. prosternites, mit den anderen morphologischen Merkmalen ist nur in 56,3% (*H. angustipennis*) bzw. 29,2% (*H. pellucidula*) Übereinstimmung zu verzeichnen und die Wertungsindizes sind zum Teil noch niedriger als beim Vergleich mit der immunologischen Einstufung.

Die vorliegende Arbeit soll ein erster Versuch unter Zuhilfenahme stofflicher Merkmale bei der Klärung taxonomischer Fragen bei den Larven der Gattung *Hydropsyche* sein. Darüber hinaus könnte der Einsatz der gewählten Methode oder ähnlicher Verfahren generell zur Klärung verwandtschaftlicher Beziehungen beitragen, nicht nur bei dieser morphologisch schwer differenzierbaren Gruppe.

Da die beschriebene Methode vertretbar rationell ist, kann sie als wertvolle Ergänzung bzw. Erweiterung zu biochemischen Untersuchungen von Hämolympheproteinen zwecks Arttrennung betrachtet werden. Die Erweiterung besteht darin, daß strukturmäßig verwandte Proteine nachgewiesen werden (durch die Spezifität der Antikörper) und zufällige Ähnlichkeiten, die auf gleiches Molekulargewicht oder andere identische physiko-chemische Eigenschaften zurückzuführen sind, ausgeschlossen werden können.

#### Literatur

- BANARESCU, P (1974): The typological species concept and modern methods in taxonomy. — Ztschr. zool. Syst. Evol.-forsch. 12, 295 bis 299.
- BEAUJOT, J., MAOUMOFF, M., und CH. JEUNIAUX (1970): Les cations inorganiques dans l'hémolymphe larvaire des insectes trichoptères. — Archs. int. Physiol. Biochim. 78, 111–118.
- BJARNOV, N. (1972): Carbohydrases in Chironomus, Gammarus and some Trichoptera larvae. — Oikos 23, 261–263.
- BJERRUM, O., und M. WEITZ (1980): Quantitative detergent immunoelectrophoresis for analysis of membrane antigens. — Praktikumsanleitung zum International Advanced Course on membrane proteins, Bern.
- BOURNAUD, M., TACHET, H., und J. F. PER-RIN (1982): Les Hydropsychidae (Trichoptera)

- du haut-Rhône entre Genève et Lyon. — *Annl. Limnol.* 18, 61–80.
- CLOSS, O., HARBOE, M., AXELSEN, N. H., BUNCH-CHRISTENSEN, K., und M. MAGNUSSON (1980): The antigens of *Mycobacterium bovis* strain BCG, studied by crossed immunoelectrophoresis: A reference system. — *Scand. J. Immunol.* 12, 249–263.
- DÖHLER, W. (1963): Liste der deutschen Trichopteren. — *Nachr. bl. Bayer. Ent.* 12, 17–22.
- GUPTA, U. S. (1977): The use of haemolymph proteins in taxonomic studies. — *Zool. Jb. Syst.* 104, 352–367.
- HAAG, K. H., und D. M. SULLIVAN (1984): Free amino acid concentrations in plasma of larval and adult Hydropsychidae (Trichoptera). — *Insect. Biochem.* 14, 353–358.
- KLAUSNITZER, B. (1982): Biochemische Methoden der Arttrennung bei Insekten. — *Ent. Nachr. Ber.* 26, 18–24.
- KLAUSNITZER, B., PELLMANN, H., und S. WALTER (1983): Zur Trennung verschiedener Arten und Stämme aus der Gattung *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) durch Diskelektrophorese. — *Z. angew. Ent.* 96, 307 bis 315.
- MALICKY, H. (1977): Ein Beitrag zur Kenntnis der *Hydropsyche guttata*-Gruppe (Trichoptera, Hydropsychidae). — *Z. Arb.-gem. öst. Ent.* 29, 1–28.
- MARIAMMAL, N., und G. S. RAJULI (1975): A serological investigation on the phylogenetic relationship of arthropod classes. — *Ztschr. zool. Syst. Evol.-forsch.* 13, 91–97.
- MENKEN, S. B. (1982): Biochemical genetics and systematics of small ermine moths (Lepidoptera, Yponomeutidae). — *Ztschr. zool. Syst. Evol.-forsch.* 20, 131–143.
- SCHUHMACHER, H. (1970): Untersuchungen zur Taxonomie, Biologie und Ökologie einiger Köcherfliegenarten der Gattung *Hydropsyche* (Insecta, Trichoptera). — *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 55, 511–557.
- SCUTLIFFE, D. W. (1962): The composition of haemolymph in aquatic insects. — *J. exp. Biol.* 39, 325–344.
- SEDLAK, E. (1971): Bestimmungstabelle der Larven der häufigen tschechoslowakischen Arten der Gattung *Hydropsyche* PICTET (Trichoptera). — *Acta ent. bohemoslow.* 68, 185–187.
- STATZNER, B. (1976): Zur Unterscheidung der Larven und Puppen der Köcherfliegenarten *Hydropsyche angustipennis* und *pellucidula* (Trichoptera: Hydropsychidae). — *Ent. Germ.* 3, 265–268.
- SVENDSEN, P. J., und Z. DEYL (1979): Electrophoresis. A survey of techniques and applications. — Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York.
- SZCZESNY, B. (1974): Larvae of the genus *Hydropsyche* (Insecta, Trichoptera) from Poland. — *Pol. Arch. Hydrobiol.* 21, 387–390.
- TOBIAS, W. (1972): Zur Kenntnis europäischer Hydropsychidae (Insecta, Trichoptera). — *Senckenbergiana biol.* 53, 59–89, 245–268, 391 bis 401.
- VERNEAUX, J., und B. FAESSEL (1976): Larves du genre *Hydropsyche* (Trichoptera, Hydropsychidae), Taxonomie, données biologique et écologiques. — *Annl. Limnol.* 12, 7–16.
- WIBERG-LARSEN, P. (1980): A key to larvae of the Danish Hydropsychidae (Trichoptera) with notes on distribution and ecology. — *Ent. Meddr.* 47, 125–140.
- WRIGHT, C. A. (1974): Biochemical and immunological taxonomy of animals. — London, New York.

Anschrift des Verfassers:

Dr. Franz Klima  
 Forschungsstelle für Wirbeltierforschung  
 der AdW der DDR (im Tierpark Berlin)  
 DDR - 1136 Berlin  
 Am Tierpark 125

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Entomologische Nachrichten und Berichte](#)

Jahr/Year: 1985

Band/Volume: [29](#)

Autor(en)/Author(s): Klima Franz

Artikel/Article: [Immunochemische Untersuchungen zur Larvalsystematik der Gattung Hydropsyche PICTET \(Trichoptera, Hydropsychidae\). 161-169](#)